

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. E. Gabbert)

Expression und prognostische Bedeutung Zellzyklus- regulierender Faktoren beim kolorektalen Karzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Bettina Müller

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: Prof. Dr. med. Möslein-Wagner

Korreferent: Prof. Dr. med. Dall

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Etablierte histopathologische Prognoseparameter	8
1.1.1	pTNM-System	8
1.1.2	Differenzierungsgrad (Tumorgrading)	9
1.2	Potentielle neue histopathologische Prognoseparameter	9
1.2.1	Blut- und Lymphgefäßinvasion	9
1.2.2	Tumorzellproliferation	10
1.3	Potentielle neue molekulare Prognoseparameter	13
1.3.1	Tumorsuppressorgen p53	13
1.3.2	Retinoblastom-Gen (pRb)	17
1.3.3.	Zellzyklusantigene Cyclin A und Cyclin B1	19
1.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Untersuchtes Patientenkollektiv	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Histopathologische Untersuchung	24
2.2.2	Immunhistochemische Methoden	25
2.2.2.1	Auswertung der Proliferationsaktivität	26
2.2.2.2	Auswertung der Expression von p53 und pRb	26
2.2.2.3	Auswertung der Expression von Cyclin A und Cyclin B1	26
2.2.3	Statistische Auswertung	27

3	Ergebnisse	28
3.1	Proliferationsaktivität	28
3.1.1	Normale Kolonschleimhaut	28
3.1.2	Kolorektale Karzinome	29
3.1.3	Korrelation mit histopathologischen Parametern	30
3.1.4	Prognostischer Einfluß der Tumorzellproliferation	33
3.2	Expression von p53 und pRb	35
3.2.1	Expression in normaler Kolonschleimhaut	35
3.2.1.1	Expression von p53 in normaler Kolonschleimhaut	35
3.2.1.2	Expression von pRb in normaler Kolonschleimhaut	35
3.2.2	Expression in kolorektalen Karzinomen	36
3.2.2.1	Expression von p53 in kolorektalen Karzinomen	36
3.2.2.2	Expression von pRb in kolorektalen Karzinomen	37
3.2.3	Korrelation mit histopathologischen Parametern	38
3.2.3.1	p53-Expression und histopathologische Parameter	38
3.2.3.2	pRb-Expression und histopathologische Parameter	38
3.2.4	Prognostischer Einfluß	41
3.2.4.1	Prognostischer Einfluß der p53-Expression	41
3.2.4.2	Prognostischer Einfluß der pRb-Expression pRb	41
3.3	Expression der Zellzyklusantigene Cyclin A und Cyclin B1	44
3.3.1	Expression in normaler Kolonschleimhaut	42
3.3.1.1	Cyclin A-Expression in normaler Kolonschleimhaut	42
3.3.1.2	Cyclin B1-Expression in normaler Kolonschleimhaut	42
3.3.2	Expression in kolorektalen Karzinomen	42
3.3.2.1	Cyclin A-Expression in kolorektalen Karzinomen	42
3.3.2.2	Cyclin B1-Expression in kolorektalen Karzinomen	44
3.3.3	Korrelation mit histopathologischen Parametern	46
3.3.3.1	Cyclin A-Expression und histopathologische Parameter	46
3.3.3.2	Cyclin B1-Expression und histopathologische Parameter	48

3.3.4	Prognostischer Einfluß	50
3.3.4.1	Prognostischer Einfluß der Cyclin A-Expression	50
3.3.4.2	Prognostischer Einfluß der Cyclin B1-Expression	51
3.4	Korrelation von p53, pRb, Cyclin A und Cyclin B1 untereinander	53
3.5	Prognostischer Einfluß der Koexpression von p53, pRb, Cyclin A, Cyclin B1	53
3.3	Ergebnisse der multivariaten Analyse	54
4	Diskussion	55
4.1	Tumorzellproliferation	55
4.2	Tumorsuppressorgene p53 und pRb	58
4.3	Zellzyklusantigene Cyclin A und Cyclin B	61
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
7	Abkürzungen	87
8	Danksagung	88
9	Lebenslauf	89
10	Abstract	90

1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom zeigt hinsichtlich seiner Häufigkeit weltweit deutliche Unterschiede mit höchster Inzidenz in den westlichen Industrienationen Europas sowie in Nord-Amerika und Australien, während es in Asien und Afrika eine relativ geringe Häufigkeit aufweist (Cohen et al., 1993). In Deutschland ist das Dickdarmkarzinom sowohl bei Frauen als auch bei Männern jeweils die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung. So erkranken jedes Jahr rund 50.000 Patienten an einem kolorektalen Karzinom und 30.000 Patienten sterben jährlich an den Folgen dieser Krebserkrankung. Fett- und fleischhaltige, kalorienreiche Kost sowie verminderter Verzehr von Obst und Gemüse scheinen bedeutsame ätiologische Faktoren für die Entwicklung des Dickdarmkarzinoms zu sein (Willet et al., 1990; Terry et al., 2001). Alkohol- und Tabakgenuß sollen ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für das kolorektale Karzinom assoziiert sein (Le Marchand et al., 1997).

Eine familiäre Belastung gilt auch beim Dickdarmkarzinom als bedeutender Risikofaktor, so geht man heute bei ca. 10% dieser Tumoren von einem erblichen Hintergrund aus (Burt 1996; Lynch und de la Chapelle 1999).

Darüber hinaus sind auch die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa nach mehrjährigem Verlauf mit einem erhöhten Tumorrisiko verbunden (Karlen et al., 1999; Bernstein et al., 2001).

Man geht heute davon aus, daß die weit überwiegende Mehrzahl der kolorektalen Karzine auf dem Boden von zunächst gutartigen Vorstufen, den Adenomen entsteht. Bei ca. 10% der Dickdarmadenome muss von einer malignen Entartung ausgegangen werden, ein Prozeß, der über histopathologisch definierte Stufen über einen Zeitraum von ca. 10 bis 15 Jahren bis hin zum invasiven Adenokarzinom abläuft, und als so genannte Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet wird (Vogelstein et al., 1988; Cohen et al., 1993). Molekularbiologisch ist dieser Ablauf gekennzeichnet durch eine Akkumulierung bestimmter genetischer Veränderungen in den Tumorzellen (Abb. 1), die entsprechenden histopathologischen Adenomstadien in dieser Sequenz zugeordnet werden konnten (Vogelstein et al., 1988; Fearon and Vogelstein 1990).

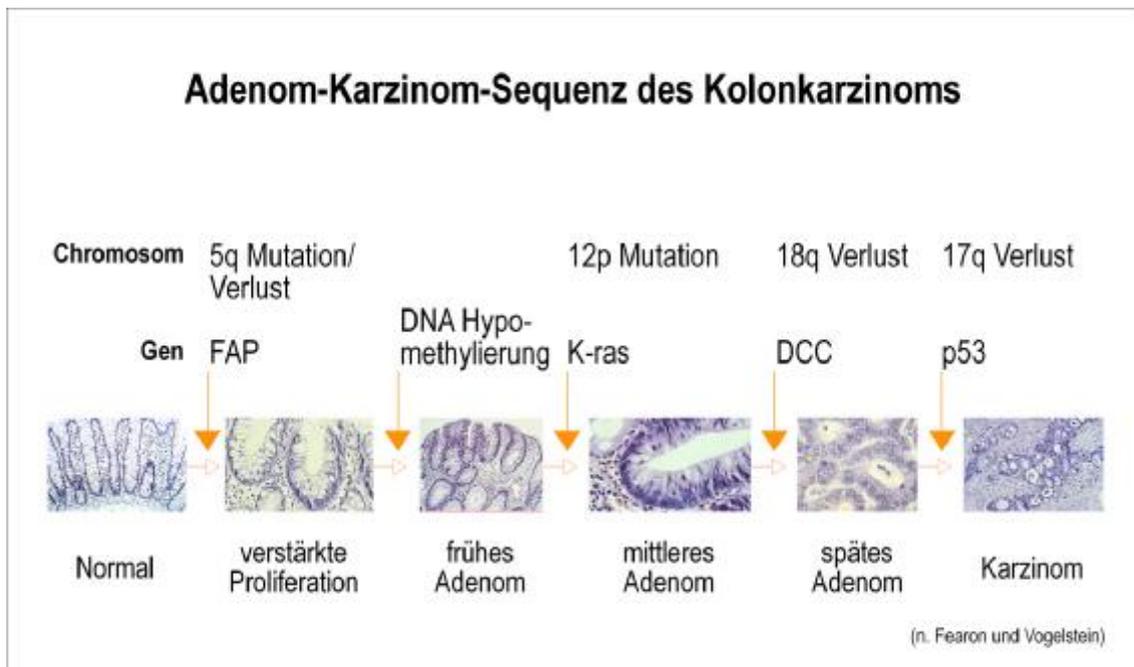


Abb. 1: Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz (Fearon und Vogelstein, 1990).

Die Prognose von Kolonkarzinompatienten hängt von einer Reihe von tumor- und auch patientenbezogenen Faktoren ab. Nach wie vor kommt in diesem Zusammenhang den tumorbezogenen Faktoren des pTNM-Systems die herausragende Bedeutung bei der prognostischen Beurteilung zu. Andererseits ist aber seit längerem bekannt, daß keineswegs jeder Patient eines bestimmten Tumorstadiums tatsächlich die gleiche Chance hat, zu überleben. Dies hat zu erheblichen Anstrengungen geführt, neue zusätzliche Prognosefaktoren zu etablieren, mit dem Ziel, Karzinompatienten mit hohem Risiko besser zu erfassen und damit auch eine individuellere Prognosevorhersage zu erreichen. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von Publikationen über eine Reihe, zum Teil vielversprechender potentieller histologischer und molekularer Prognosefaktoren erschienen. Bei näherer Betrachtung weist die Mehrzahl dieser Arbeiten jedoch nur eine eingeschränkte statistische Aussagekraft auf, die damit auch nur eine bedingte Bewertung und Diskussion der Untersuchungsergebnisse zuläßt. So erfolgte die überwiegende Mehrzahl der Untersuchungen an nur geringen Patientenzahlen, häufig ohne Angabe darüber, ob eine kurative (R0-Resektion) oder nur eine palliative Resektion

durchgeführt wurde. Darüber hinaus wird von vielen Autoren nicht angegeben wieviele der Patienten im Laufe der Nachbeobachtung tatsächlich an ihrem Tumorleiden verstorben sind, und schließlich wird häufig eine Vielzahl von Faktoren an relativ kleinen Fallzahlen lediglich univariat untersucht und auf eine multivariate Analyse verzichtet. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte soll im folgenden zunächst ein kurzer Überblick zum Stand der Forschung hinsichtlich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter gegeben werden.

1.1 Etablierte histopathologische Prognoseparameter

1.1.1 pTNM-System

Auch beim Kolonkarzinom wird die Prognose der Patienten vor allem durch das TNM-Stadium bestimmt. In einer Reihe multivariater Untersuchungen an größeren Tumorserien konnte gezeigt werden, daß den Faktoren Invasionstiefe (pT-Kategorie), Nodalstatus (pN-Kategorie), Fernmetastasierung (pM-Kategorie) sowie insbesondere dem Nachweis eines Residualtumors im Bereich der Resektatgrenzen (R-Status) die größte prognostische Bedeutung zukommt (Roncucci et al., 1996; Mörschel et al., 1997; Monnet et al., 1999; Parry et al., 1999).

Das pTNM-Staging unter Einbeziehung des R-Status stellt somit einerseits die heute allgemein akzeptierte Basis dar, die Prognose von Kolonkarzinompatienten zu beurteilen, andererseits auch den Maßstab, an dem sich alle potentiellen, zukünftigen Prognoseparameter mit Hinblick auf einen möglichen zusätzlichen prognostischen Informationsgewinn messen lassen müssen.

1.1.2 Differenzierungsgrad (Tumorgrading)

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Faktoren des TNM-Stadiums ist die Situation hinsichtlich der prognostischen Bedeutung des Differenzierungsgrades der Tumoren (Tumorgrading) uneinheitlich. So konnte zwar in mehreren Untersuchungen an jeweils größeren Fallzahlen in der multivariaten Analyse ein unabhängiger prognostischer Einfluß des Differenzierungsgrades nachgewiesen werden (Deans et al., 1994; Newland et al., 1994; Park et al., 1999; Parry et al., 1999). Allerdings liegen auch Untersuchungen vor, die keinen oder lediglich in der univariaten Analyse einen Einfluß auf die Prognose von Patienten mit kolorektalen Karzinomen zeigen konnten (Korenaga et al., 1991; Mulder et al., 1995; Ropponen et al., 1997; Tanigawa et al., 1997; Zarbo et al., 1997).

Das Kolonkarzinom nimmt hier übrigens keine Ausnahmestellung ein, da auch bei anderen Adenokarzinomen des Gastrointestinaltraktes wie z.B. dem Magenkarzinom der prognostische Einfluss des Differenzierungsgrades keineswegs als gesichert gelten kann (Gabbert et al., 1991; Schmitz-Moormann et al., 1992; Böttcher et al., 1992; Roder et al., 1993; Victorzon et al., 1996).

1.2 Potentielle neue histopathologische Parameter

1.2.1 Blutgefäß- und Lymphgefäßinvasion

Schon seit längerem ist bekannt, daß der Nachweis einer Gefäßinvasion mit einer erhöhten Metastasierungsrate und einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert ist. So konnte für eine Vielzahl unterschiedlicher Karzinomtypen (Zervixkarzinom: Barber et al., 1978; Endometriumkarzinom: Hanson et al., 1985; Mammakarzinom: Lee et al., 1990), insbesondere aber auch bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes (Ösophaguskarzinom: Sarbia et al., 1994; Magenkarzinom: Hamazaki et al., 1974; Nagao et al., 1975; Korenaga et al., 1989; Noguchi 1990; Gabbert et al., 1991) multivariat gezeigt

werden, daß Blut- bzw. Lymphgefäßeinbrüche der Tumorzellen mit einer signifikant schlechteren Prognose der Patienten einhergehen.

Auch beim kolorektalen Karzinom konnte ein solcher Zusammenhang zwischen Blut- und Lymphgefäßinvasion und reduzierter 5-Jahres-Überlebensrate gezeigt werden (Talbot et al, 1980; Chapuis et al., 1985; Minsky et al., 1988; Hemming et al., 1992; deans et al., 1994; Newland et al., 1994; Tanaka et al., 1994; Zarbo et al., 1997). Dieser prognostische Einfluß der Gefäßinvasion konnte darüber hinaus auch in multivariaten Analysen unter Einschluß der Prognoseparameter des pTNM-Systems als unabhängiger Prognoseparameter bestätigt werden.

1.2.2 Tumorzellproliferation

Auch der Proliferationsaktivität maligner Tumoren wird seit längerem eine mögliche prognostische Bedeutung beigemessen. So ließ sich bei einer Vielzahl unterschiedlicher maligner Tumoren, insbesondere dem Mammakarzinom, aber auch bei zahlreichen anderen Karzinomen, wie dem Bronchialkarzinom oder Tumoren des Gastrointestinaltraktes und des inneren Genitales zeigen, daß eine hohe Proliferationsaktivität der Tumoren eng mit einer schlechteren Prognose und einem früheren Auftreten von Tumorrezidiven korreliert (Tab. 1).

Allerdings stehen diesen Untersuchungen, die zum Teil in multivariaten Analysen auch einen unabhängigen prognostischen Einfluß der Tumorzellproliferation bestätigen konnten, eine Reihe von Beobachtungen entgegen, die bei den gleichen Tumorentitäten keinen prognostischen Einfluß der Tumorzellproliferation verifizieren konnten (Tab. 1). Obwohl sich die Proliferationsaktivität mit einer Vielzahl verschiedener Methoden analysieren läßt, hat sich doch in den letzten Jahren die Immunhistochemie als Routine-methode auch auf diesem Sektor durchgesetzt. Die meisten der Untersuchungen aus den letzten Jahren erfolgten über den immunhistochemischen Nachweis von PCNA (proliferative cell nuclear antigene) oder mit Antikörpern gegen das Ki-67-Antigen (Gerdes et al., 1984).

Das Ki-67-Antigen läßt sich immunhistochemisch in allen Zellzyklusphasen mit Ausnahme der G₀-Phase nachweisen und stellt die Methode mit der höchsten Reliabilität zum Nachweis der Wachstumsfraktion dar (Brown und Gatter, 1990; Quinn und Wright, 1990). Der entscheidende Nachteil des Ki-67-Antikörpers liegt jedoch in seiner Beschränkung auf Gefrierschnitte, die eine Routineanwendung an paraffineingebettetem Archivmaterial nicht zuläßt. Während der PCNA-Antikörper hingegen diesen Beschränkungen nicht unterliegt und so auch an formalinfixiertem, paraffineingebetteten Gewebematerial eingesetzt werden kann.

Allerdings ist die PCNA-Expression nicht nur mit der DNA-Synthese während des Zellzyklus korreliert, sondern wird auch von zahlreichen Zellzyklus-unabhängigen Faktoren beeinflusst. So kann die PCNA-Synthese beispielsweise durch verschiedene Wachstumsfaktoren induziert werden (Bravo 1986; Macdonald-Bravo und Bravo 1985), so daß von der Zahl der PCNA-positiven Tumorzellen nicht unbedingt auf die Zahl tatsächlich proliferierender Tumorzellen rückgeschlossen werden kann.

Der in dieser Untersuchung verwendete Antikörper MIB-1 verknüpft die Vorteile der zuvor erwähnten Antikörper. So ist der MIB-1-Antikörper gegen ein Epitop des Ki-67-Antigens gerichtet, und stellt daher einen ähnlich reliablen Marker für die Messung der Proliferationsaktivität dar wie Ki-67 (Key et al., 1992; Cattoretti et al., 1992). Darüber hinaus kann der MIB-1-Antikörper nach entsprechender Vorbehandlung der Schnittpräparate in der Mikrowelle auch an Paraffinmaterial eingesetzt werden und ermöglicht so einen einfachen Nachweis proliferierender Zellen im formalinfixiertem Routine- und Archivmaterial.

Tabelle 1: Prognostische Bedeutung der Tumorzellproliferation bei malignen Tumoren

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Mamma			
Weikel et al., 1991 (Ki-67)	568	+	n.u.
Gasparini et al., 1992 (Ki-67)	164	+	+
Railo et al., 1993 (Ki-67)	327	+	+
Gasparini et al., 1992 (PCNA)	164	–	n.u.
Bianchi et al., 1993 (PCNA)	173	+	–
Schönborn et al., 1993 (PCNA)	471	+	–
Siitonen et al., 1993 (PCNA)	109	+	+
Aaltomaa et al., 1993 (PCNA)	175	+	+
Haerslev et al., 1994 (PCNA)	509	+	n.u.
Kuhling et al., 2003 (Ki-67)	332	+	+
Magen			
Jain et al., 1991 (PCNA)	93	–	n.u.
Yonemura et al., 1993 (PCNA)	87	+	n.u.
Mori et al., 1993 (PCNA)	138	+	+
Maeda et al., 1995 (PCNA)	108	+	+
Yonemura et al., 1990 (Ki-67)	71	+	+
Victorzon et al., 1996 (Ki-67)	242	–	–
Müller et al., 1996 (MIB-1)	418	–	–
Ösophagus			
Youssef et al., 1995 (MIB-1)	72	+	n.u.
Sarbia et al., 1996 (MIB-1)	150	–	–
Lunge			
Fujii et al., 1993 (PCNA)	90	+	+
Niere			
Tannapfel et al., 1996 (MIB-1)	87	+	+
Jochum et al., 1996 (MIB-1)	58	+	n.u.
Tannapfel et al., 1996 (PCNA)	87	+	–
Prostata			
Harper et al., 1992 (Ki-67)	102	+	n.u.
Mulder et al., 1992 (Ki-67)	316	+	n.u.
Bubendorf et al., 1996 (MIB-1)	137	+	+
Harper et al., 1992 (PCNA)	102	+	n.u.
Harnblase			
Skopelitou et al., 1992 (PCNA)	50	+	n.u.
Lipponen et al., 1992 (PCNA)	178	+	+
Ovar			
Jordan et al., 1993 (Ki-67)	50	+	n.u.
Kerns et al., 1994 (MIB-1)	50	+	+
Thomas et al., 1995 (PCNA)	98	+	–

n.u.: nicht untersucht

1.3 Potentielle neue molekulare Parameter

1.3.1 Tumorsuppressorgen p53

Das p53-Gen ist auf dem kurzen Arm vom Chromosom 17 (17p13.1) lokalisiert und umfaßt 16 bis 20 kb genomischer DNA. Es ist aufgebaut aus 11 Exonen und kodiert ein 375 Aminosäuren großes, nukleäres Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kD, was zur Namensgebung von p53 führte (vgl. Chang et al., 1993; Harris und Hollstein, 1993; Levine et al., 1991; 1994). Alterationen des p53-Gens stellen die häufigsten genetischen Veränderungen sowohl in sporadisch auftretenden als auch in familiär auftretenden malignen Tumoren (Harris und Hollstein 1993). Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen ist im Falle des p53 nicht selten bereits eine Mutation in einem Allel ausreichend, um eine neoplastische Entartung zu induzieren, da offenbar das mutierte p53-Protein die Funktion des Wildtyp-Proteins z.B. durch Komplexbildung inhibieren kann (Milner und Medcalf 1991). Während der Evolution sind 5 Regionen der Aminosäuresequenz von p53 konserviert geblieben, in denen als sog. „hot spots“ Punktmutationen bevorzugt auftreten (Hollstein et al., 1991).

p53 spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus und bei der DNA-Replikation. DNA-Schäden führen so über eine Stabilisierung des Wildtyp p53-Proteins zu einem Arrest der Zelle in der G₁-Phase, in der nun die DNA-Schäden repariert werden können, oder, falls dies nicht möglich ist, der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet werden kann (Lane 1993; Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993; Lee et al., 1993). Somit ergibt sich für Wildtyp p53 eine Funktion als sog. „cell-cycle checkpoint“ (Abb. 2).

Das Wildtyp p53-Protein weist eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten auf, so daß es normalerweise immunhistochemisch im Zellkern nicht nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu weist jedoch das mutierte p53-Protein eine verlängerte Halbwertszeit auf und läßt sich so immunhistochemisch im Zellkern darstellen. Bei der Mehrzahl dieser Mutationen handelt es sich um sog. Missense-Mutationen, und obwohl in einzelnen Tumoren mit mutiertem p53-Gen eine Immunoreaktivität für p53 nicht vorliegt und umgekehrt sich in einzelnen Tumoren ohne nachweisbare p53-Mutationen dennoch eine

p53-Immunoreaktivität im Tumorzellkern nachweisen läßt, ist der positive, immun-histochemische Nachweis einer p53-Expression dennoch ein reliabler Indikator für eine auf DNA-Ebene gestörte p53-Funktion (Levine et al., 1991; Chang et al., 1993; Hall und Lane, 1994). Darüber hinaus kann die Inaktivierung von p53 auch durch unterschiedliche Mechanismen auf Proteinebene erfolgen. So kann z.B. auch das Genprodukt des Onkogens MDM-2 an das Wildtyp p53-Protein binden und über eine Komplexbildung p53 funktionell inaktivieren (Barak et al., 1993; Wu et al., 1993; Momand und Zambetti 1997).

Aufgrund der zentralen Rolle, die p53 für die Überwachung des regelhaften Ablaufes des Zellzyklus einschließlich DNA-Reparatur und DNA-Synthese einnimmt, konnte man erwarten, daß eine gestörte p53-Funktion in einem Verlust der Zellzykluskontrolle resultiert und somit zu einer vermehrten Tumorprogression führt. Dies führte in den letzten Jahren zu einer nahezu unüberschaubaren Vielzahl von Publikationen, die sich mit der Expression von mutiertem p53-Protein in Korrelation zu klinischen und histopathologischen Parametern sowie der Prognose der Patienten befaßte. Tatsächlich liegen zu verschiedenen malignen humanen Tumoren, und hier insbesondere dem Mamma-karzinom, zahlreiche Untersuchungen auch an größeren Patientenzahlen vor, die einen prognostisch ungünstigen Effekt von mutiertem p53 nachweisen konnten (Tab. 2). Allerdings liegen zu den gleichen Tumorentitäten auch hier zahlreiche Untersuchungen vor, die einen solchen prognostischen Einfluß auf das Überleben nicht verifizieren konnten.

Auch zur prognostischen Bedeutung der p53-Expression beim Kolonkarzinom ist in den letzten Jahren ebenfalls eine Reihe von Publikationen mit widersprüchlichen Ergebnissen erschienen, auf die im Rahmen des Diskussionskapitels näher eingegangen wird.

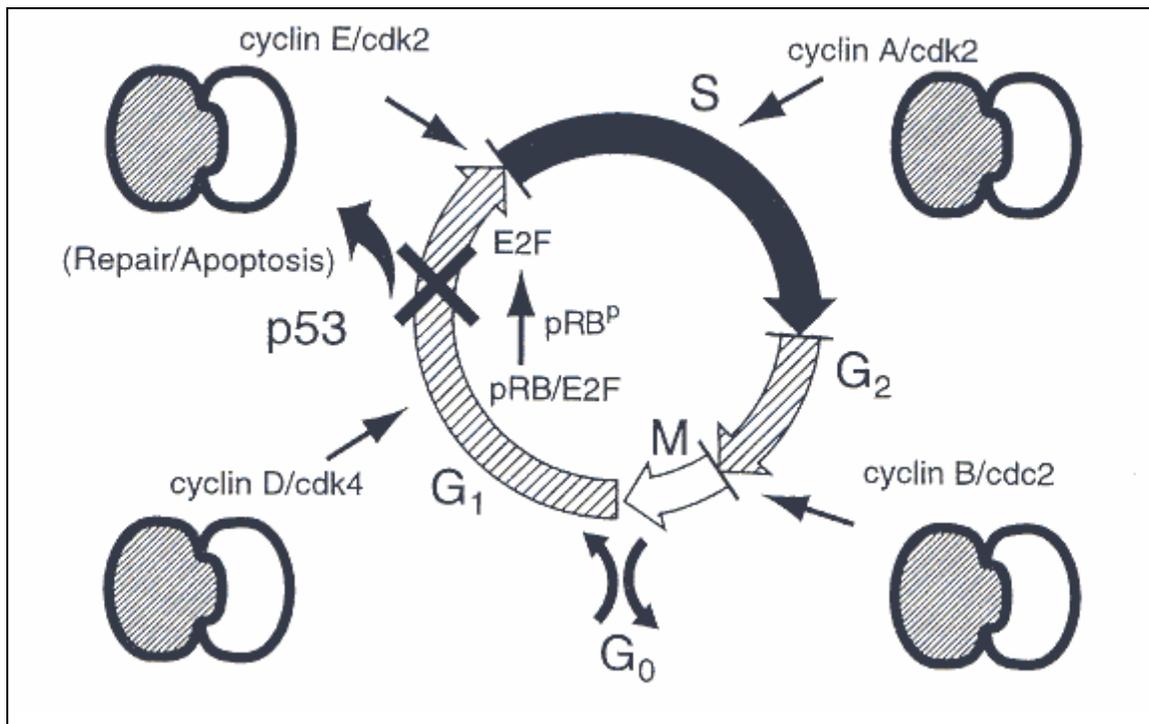


Abb. 2: Schematische Darstellung der Regulation des Zellzyklus. Die Progression durch den Zellzyklus wird von Komplexen aus unterschiedlichen Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen kontrolliert. Während Cyclin D/cdk4 die G₁-Phase beschleunigt, reguliert der Cyclin E/cdk2-Komplex den Eintritt in die S-Phase. Den weiteren Verlauf der S-Phase und den Eintritt in die Mitose regulieren Cyclin A bzw. Cyclin B. Eine negative Regulation kann unter anderem durch p21 und p27 oder durch p53 erfolgen. Ein zellulärer Anstieg von Wildtyp p53 als Folge eines DNA-Schadens kann zu einem Arrest der G₁-Phase mit DNA-Reparatur oder bei irreparablen Schäden der DNA zur Induktion der Apoptose führen. Dargestellt ist auch die Funktion von pRb, das Komplexe mit Transkriptionsfaktoren wie E2F bildet. Nach Phosphorylierung von pRb wird E2F frei und ermöglicht die Transkription von Genen, die an der Induktion der S-Phase beteiligt sind (nach Cordon-Cardo 1995).

Tabelle 2: Prognostische Bedeutung der p53-Expression bei malignen Tumoren

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Mamma			
Thor et al., 1992	295	+	+
Lipponen et al., 1993	193	+	–
Silvestrini et al., 1993	256	+	+
Allred et al., 1993	700	+	+
Caleffi et al., 1994	192	–	n.u.
Haerslev et al., 1995	490	–	–
Gretarsdottir et al., 1996	186	–	–
Michalides et al., 1996	248	–	n.u.
Magen			
Starzynska et al., 1992	47	+	n.u.
Martin et al., 1992	77	+	+
Takeji et al., 1993	96	–	–
Joypaul et al., 1994	160	+	+
Schneider et al., 1994	131	–	–
Hurlimann et al., 1994	63	–	n.u.
Gabbert et al., 1995	418	–	–
Müller et al., 1996	120	+	–
Victorzon et al., 1996	237	+	–
Lim et al., 1996	116	+	–
Ichiyoshi et al., 1997	189	+	+
Lunge			
Quinlan et al., 1992	144	+	n.u.
Hosio et al., 1993	71	+	+
Morkve et al., 1993	112	+	n.u.
Ebina et al., 1994	123	+	+
Ösophagus			
Shimaya et al., 1993	105	+	n.u.
Sarbia et al., 1994	106	–	–
Wang et al., 1994	100	+	n.u.
Coggi et al., 1997	74	–	–
Harnblase			
Sarkis et al., 1993	43	+	n.u.
Lipponen et al., 1993	212	+	–
Endometrium			
Inoue et al., 1994	139	+	–
Lukes et al., 1994	100	+	–
Ito et al., 1994	221	+	+
Soong et al., 1996	122	+	+

n.u.: nicht untersucht

1.3.2 Retinoblastom-Gen (pRb)

Das Retinoblastom-Gen gilt als das erste, beim Menschen beschriebene Tumorsuppressorgen. Es ist auf dem langen Arm von Chromosom 13 lokalisiert (13q14), kodiert ein 105 kD schweres Phosphoprotein, und Deletionen bzw. Keimbahnmutationen sind verantwortlich für die hereditäre und sporadische Form des Retinoblastoms (Friend et al., 1987; Lee et al., 1987; Fung et al., 1987; Marshall 1991). Das Retinoblastom-Gen kann durch eine Vielzahl verschiedener genetischer Mechanismen wie größeren Deletionen, aber auch kleineren Verlusten nur einzelner Exone oder Promotor-Mutationen inaktiviert werden (Marshall 1991). Das kodierte Protein (pRb) gilt ebenso wie p53 als ein zentraler Regulator des Zellzyklus (Abb. 2). Dabei wirkt jedoch während der verschiedenen Zellzyklusphasen nicht die Konzentration des Proteins regulierend, sondern sein Grad der Phosphorylierung, der durch Einwirkung verschiedener Cycline beeinflusst wird (DeCaprio et al., 1989; Buchkovich et al., 1989; Chen et al., 1989). Die Phosphorylierung nimmt in der späten G1-Phase und in der frühen S-Phase zu, bleibt hoch während der G2-Phase, und hat eine Freisetzung des zuvor von pRb gebundenen Transkriptionsfaktors E2F zur Folge, der wiederum für die Aktivierung einer Vielzahl für die Zellproliferation wichtiger Gene verantwortlich ist (DeFeo-Jones et al., 1991; Chellapan et al., 1991; Weintraub et al., 1992; Johnson et al., 1993). Mutationen oder eine gestörte Proteinexpression des Retinoblastom-Gens konnten bei einer Reihe unterschiedlicher maligner Tumoren nachgewiesen werden (Cance et al., 1990; Wunder et al., 1991; Cordon-Cardo et al., 1992; Logothetis et al., 1992; Kornblau et al., 1992; Xu et al., 1994; Phillips et al., 1994).

In einzelnen Untersuchungen fand sich univariat auch eine Assoziation zwischen einer gestörten pRb-Expression und einer schlechteren Prognose der Patienten. Allerdings wurden in diesen Untersuchungen multivariate Analysen nicht durchgeführt und bei der Mehrheit dieser Arbeiten, die zumeist auch nur an relativ kleinen Fallzahlen durchgeführt wurden, konnte ein prognostischer Einfluß nicht nachgewiesen werden (Tab. 3).

Zur prognostischen Bedeutung der pRb-Expression beim Kolonkarzinom liegen hierzu bislang nur einzelne Arbeiten vor, auf die im Rahmen der Diskussion näher eingegangen werden soll.

Tabelle 3: Prognostische Bedeutung der pRb-Expression bei malignen Tumoren

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Mamma			
Sawan et al., 1992	197	–	n.u.
Pietilainen et al., 1995	205	–	–
Berns et al., 1996	87	–	n.u.
Lunge			
Volm et al., 1998	104	–	n.u.
Brambilla et al., 1999	168	+	–
Chen et al., 2001	107	–	n.u.
Sugio et al., 1994	90	–	n.u.
Hirabayashi et al., 2002	108	–	n.u.
Ösophagus			
Nita et al., 1999	62	–	n.u.
zur Hausen et al., 1999	172	–	n.u.
Ikeguchi et al., 2000	191	+	–
Guner et al., 2003	53	+	n.u.
Gallenblase			
Ya-Zhou et al., 2000	36	+	n.u.

n.u.: nicht untersucht

1.3.3 Zellzyklusantigene Cyclin A und Cyclin B1

Die normale Zellproliferation folgt üblicherweise einem regelhaften Durchgang durch den Zellzyklus, der durch eine Vielzahl verschiedener Proteinkomplexe aus Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen reguliert wird (Abb. 2). Während des Zellzyklus bilden sich aus Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen Proteinkomplexe, die, wie bereits oben beschrieben, letztendlich über eine Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins und anschließender Freisetzung verschiedener Transkriptionsproteine einen Eintritt der Zelle in die S-Phase gestatten, in der die DNA synthetisiert wird (Cordon-Cardo 1995). Die Cycline lassen sich funktionell in sog. G1-Cycline (wie beispielsweise Cyclin C, D1-D3 und Cyclin E) und sog. „mitotische“ Cycline trennen, zu letzteren werden Cyclin A und Cyclin B gerechnet (Parwaresch und Rudolph 1996). Während Cyclin D₁ den Übertritt in die G₁-Phase beschleunigt, kontrolliert Cyclin E den Eintritt in die S-Phase (Bates 1995; Lukas et al., 1995; Lewin 1990; Strauss et al., 1995; Dou et al., 1996). Im Gegensatz dazu konnte für Cyclin A eine aktive Rolle sowohl während der S-Phase als auch für die Initiierung der Mitose nachgewiesen werden (Walker et al., 1991; Xiong et al., 1991; Girard et al., 1991; Pagano et al., 1992; Rosenblatt et al., 1992). Sowohl Cyclin D und Cyclin E als auch Cyclin A können durch zwei Familien von cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren gehemmt werden, nämlich p15 und p16 (auch bekannt als CDKN2b und CDKN2a) sowie p21 (WAF 1/CIP1) und p27, auch bekannt als KIP1 (Sherr 1996; Morgan 1995).

Eine Überexpression von Cyclin A konnte bei Mamma- und Lungenkarzinomen sowie beim Ösophaguskarzinom mit einer schlechteren Prognose korreliert werden, in einzelnen Untersuchungen sogar als unabhängiger Prognosefaktor (Tab. 4). Allerdings liegen zu den gleichen Tumoren auch Arbeiten vor, die dies nicht bestätigen konnten. Die einzige bislang zum Kolonkarzinom vorliegende Untersuchung konnte zwar ebenfalls einen unabhängigen ungünstigen Einfluß einer Cyclin A-Überexpression auf die Prognose nachweisen, allerdings schloss diese Arbeit nur 73 Tumoren ein (Handa et al., 1999). Untersuchungen an größeren Tumorserien liegen mit Ausnahme der vorliegenden Arbeit bislang nicht vor.

Der Beginn der Mitose wird insbesondere durch Aktivierung eines Proteinkomplexes aus Cyclin B1 und cdc2 (auch cdk-1 genannt) reguliert, der ursprünglich als sog. „m-phase-promoting-factor“ bezeichnet wurde (Nurse 1990; Hunt 1991). Da cdc2 während der einzelnen Zellphasen relativ konstant vorliegt, scheint die Synthese und Inaktivierung von Cyclin B1 der Hauptmechanismus für die Kontrolle dieses Proteinkomplexes zu sein. Der Anstieg der Cyclin B1-Expression beginnt am Ende der S-Phase und erreicht den Gipfel zum G2-M-Übergang (Pines und Hunter 1989). Die Aktivierung des Cyclin B1-cdc2-Komplexes führt zur Kondensation der Chromosomen, Auflösung der Kernmembran und zum Aufbau der Mitosespindel (Peter et al., 1990; De Souza et al., 2000). Inhibiert wird dieser Komplex durch Phosphorylierung durch Mitglieder der Familie der Wee1/Mik1-Proteinkinasen, die zu einer Hemmung der Kinaseaktivität von Cyclin B1 führt (Lundgren et al., 1991; Parker und Piwnica-Worms 1992). Eine Aktivierung kann durch CDC25B und CDC25C erfolgen, die wiederum den Einfluß von Wee1 hemmen (Dunphy und Kumagai 1991; Gautier et al., 1991). Ein weiterer Mechanismus der Cyclin B1-Kontrolle scheint auch die Lokalisation in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten darzustellen. So ist Cyclin B1 während der S- und G2-Phase zunächst im Zytoplasma lokalisiert und wird erst zu Beginn der Mitose in den Zellkern transportiert, um dort seine biologische Aktivität zu entfalten (Pines und Hunter 1991; Li et al., 1997). Die Kontrolle des G2-M-Phase-Checkpoints durch den Cyclin B1-cdc2-Komplex scheint von zentraler Bedeutung für das korrekte „Timing“ des Eintritts der Zelle in die Mitose zu sein, um so das essentielle Aufrechterhalten der genomischen Integrität der Zelle zu gewährleisten.

Eine Überexpression von Cyclin B1 konnte bei Mamma- und Prostatakarzinomen sowie bei malignen Tumoren der Mundhöhle nachgewiesen werden (Kawamoto et al., 1997; Mashal et al., 1996; Kushner et al., 1999). Darüber hinaus konnte bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und bei Lungenkarzinomen ein ungünstiger prognostischer Einfluß der Überexpression nachgewiesen werden (Tab. 5). Für das kolorektale Karzinom liegen Untersuchungen zum prognostischen Einfluß der Cyclin B1-Expression bislang allerdings nicht vor.

Tabelle 4: Prognostische Bedeutung der Cyclin A-Expression bei malignen Tumoren

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Mamma			
Bukholm et al., 2001	170	+	+
Michalides et al., 2002	394	+	+
Michels et al., 2003	104	-	-
Kuhling et al., 1996	332	-	n.u.
Magen			
Brien et al., 1998	61	-	n.u.
Lunge			
Müller-Tidow et al., 2001	70	-	n.u.
Volm et al., 1993	216	+	n.u.
Dobashi et al., 1993	144	+	n.u.
Ösophagus			
Furihata et al., 1996	124	+	n.u.
Nozoe et al., 2002	45	-	n.u.

n.u.: nicht untersucht

Tabelle 5: Prognostische Bedeutung der Cyclin B1-Expression bei malignen Tumoren

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Mamma			
Kuhling et al., 2003	332	+	+ ¹
Magen			
Brien et al., 1998	61	-	n.u.
Yasuda et al., 2002	59	-	n.u.
Lunge			
Soria et al., 2000	77	-	n.u.
Ösophagus			
Murakami et al., 1999	87	+	+
Nozoe et al., 2002	120	+	+
Takeno et al., 2002	71	+	+

¹nur rezidivfreies Überleben; n.u.: nicht untersucht

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeiten

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Expression Zellzyklus-regulierender Faktoren und ihrer Assoziation mit der Tumorzellproliferation beim kolorektalen Karzinom.

Darüber hinaus war es ein weiteres zentrales Ziel, den Einfluß dieser Faktoren auf die Prognose und die Rezidivhäufigkeit der Tumoren zu untersuchen, um so mögliche neue unabhängige molekulare Prognosefaktoren zu erfassen, die über das pTNM-System hinaus eine zunehmend präzisere und individuellere Prognosevorhersage beim kolorektalen Karzinom ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchtes Patientenkollektiv

Retrospektiv untersucht wurde eine Serie von 342 kolorektalen Karzinomen von 330 Patienten, die im Zeitraum vom 01.01.1990 bis zum 31.12.1995 wegen eines erstmals diagnostizierten Kolon- oder Rektumkarzinoms in der Abteilung für Chirurgie des Marien-Hospitals, Düsseldorf (Leiter: Prof. Dr. med. W. Stock) operiert wurden. Bei allen Patienten wurde eine kurative Resektion, d.h. eine Entfernung des Tumors mit mikroskopisch tumorfreien Absetzungsrändern durchgeführt (R0-Resektion der TNM-Klassifikation, 1997). Postoperativ erhielten 14 Patienten eine adjuvante Chemotherapie, 12 Patienten erhielten eine Bestrahlung sowie 7 Patienten eine Chemo- und Radiotherapie. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 68,8 Jahre (28-88 Jahre), 149 Patienten (45,2%) waren männlichen und 181 (54,8%) Patienten waren weiblichen Geschlechts. Bei allen 330 Patienten lagen Daten hinsichtlich der Überlebenszeiten sowie des rezidivfreien postoperativen Überlebens vor. Der mediane follow-up betrug 4,2 Jahre (5 Monate bis 11,4 Jahre). Am Ende der Nachbeobachtung lag bei 25 Patienten ein Lokalrezidiv vor, 49 Patienten zeigten eine Fernmetastasierung und 8 Patienten beides.

Von den 342 Tumoren waren 75 (21,9%) im Zökum oder Colon ascendens lokalisiert, 35 (10,2%) im Bereich der rechten Flexur, des Colon transversums oder linken Flexur, 109 (31,9%) im Colon descendens oder sigmoideum und 123 (36,0%) Tumoren waren im Rektosigmoid oder Rektum lokalisiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Histopathologische Untersuchung

Die histologischen Präparate der Dickdarmkarzinome wurden jeweils ohne Kenntnis des weiteren Krankheitsverlaufes untersucht. Durchschnittlich lagen 3 (2-6) Paraffinblöcke pro Tumor vor, von denen Paraffinschnitte angefertigt wurden, die routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt wurden.

Histologisch wurden die Tumoren gemäß der WHO-Einteilung klassifiziert (Hamilton und Aaltonen 2000) und bezüglich der Tumorstadien nach der TNM-Klassifikation der UICC (1997) unterteilt.

Um den Einfluß der potentiell neuen Prognosefaktoren mit den bekannten Prognoseparametern zu vergleichen, wurden folgende histopathologische Basisparameter erhoben:

- Infiltrationstiefe des Tumors (pT-Kategorie)
- Lymphknotenbefall (pN-Kategorie)
- Differenzierungsgrad der Tumoren (Grading)
- Blutgefäßinvasion (BVI) und Lymphgefäßinvasion (LVI)

Da lediglich bei 6 Patienten das Vorliegen von Fernmetastasen histologisch verifiziert werden, wurde dieser Parameter (pM-Kategorie) wegen der geringen Fallzahl von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen.

2.2.2 Immunhistochemische Methoden

In allen Fällen erfolgte der immunhistochemische Nachweis an Paraffinschnitten. Die Schnitte wurden bei 60° C über Nacht inkubiert, entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die endogene Peroxidaseaktivität durch 10 minütige Inkubation in 3%-igem H₂O₂ blockiert. Die Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle erfolgte jeweils in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0). Nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit 5%igem Normalserum wurde der Primärantikörper in jeweils spezifisch ausgetesteter Verdünnung bei 4° C über Nacht inkubiert. Nach 30 minütiger Inkubation mit einem Sekundärantikörper wurde für 1 Stunde eine Avidin-Biotin-Komplex-Reaktion (vergleiche Hsu et al., 1981) mit dem ABC-Elite-Kit (Fa. Vector) durchgeführt. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt durch Immersion mit Diaminobenzidintetrachlorid (Fa. Sigma) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle wurde bei allen immunhistochemischen Untersuchungen ein Präparat mit bereits nachgewiesener Expression für das jeweilige zu untersuchende Antigen mitgefärbt. Als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch 5%-iges Serumalbumin ersetzt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte jeweils ohne Kenntnis des klinischen Verlaufs der Patienten und der histopathologischen Daten der Tumoren.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Vorbehandlung	Hersteller
MIB-1	monoklonal	1:100	Mikrowelle	Fa. Dianova
p53 (DO-1)	monoklonal	1:100	Mikrowelle	Fa. Dianova
pRb (G3-245)	monoklonal	1:300	Mikrowelle	Fa. Phar-Mingen
Cyclin A	monoklonal	1:200	Mikrowelle	Fa. Calbiochem
Cyclin B (7A9)	monoklonal	1:100	Mikrowelle	Fa. Novocastra

2.2.2.1 Auswertung der Proliferationsaktivität

Zur Bestimmung des MIB-1-Proliferationsindex (PI) wurden, wie bereits beschrieben (Müller et al., 1996), mindestens 1000 Tumorzellen in 10 Gesichtsfeldern ausgezählt, und zwar in Tumorabschnitten, die in der Übersichtsvergrößerung die augenscheinlich höchste Proliferationsaktivität aufwiesen. Dies erfolgte jeweils bei 400-facher Vergrößerung (sog. high-power-fields/ HPF) in einem 10 x 10 mm großen Gitternetz, das im Okular des Mikroskops in den Strahlengang eingefügt wurde. Der Proliferationsindex wurde als Prozentsatz MIB-1-positiver Tumorzellen bestimmt.

Zur Unterscheidung zwischen Tumoren mit hoher Proliferationsrate und solchen mit geringer Proliferationsaktivität wurde der Median der Proliferationswerte als Grenzwert herangezogen.

2.2.2.2 Auswertung der Expression von p53 und pRb

Der Anteil immunreaktiver Tumorzellen am Gesamttumorgewebe wurde durch mikroskopische Beurteilung des gesamten histologischen Präparates semiquantitativ evaluiert. Dabei wurden Tumoren mit 5% oder mehr positiven Tumorzellen als positiv bewertet. Es wurde jeweils nur die nukleäre Expression der Tumorzellen gewertet, die Färbintensität spielte für die Evaluation keine Rolle.

2.2.2.3 Auswertung der Expression von Cyclin A und Cyclin B1

Der Anteil immunreaktiver Tumorzellen am Gesamttumorgewebe wurde durch mikroskopische Beurteilung des gesamten histologischen Präparates semiquantitativ evaluiert. Dabei wurden die Tumoren für Cyclin A gemäß der nukleären Expression und für Cyclin B1 nach der zytoplasmatischen Expression in folgende Gruppen eingeteilt:

1 (<10% positive Tumorzellen), 2 (10-25% positive Tumorzellen), 3 (26-50% positive Tumorzellen), 4 (>50% positive Tumorzellen). Zusätzlich wurde für Cyclin B1 auch die nukleäre Expression ausgewertet.

2.2.3 Statistische Auswertung

Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte durch Dr. R. Willers im Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Die Testung der Unterschiede zwischen den einzelnen Ausprägungsgraden der untersuchten Parameter erfolgte für dichotome Variablen mit dem Fisher-Exakt-Test, für kategoriale Variablen mit dem Chi-Quadrat-Test sowie für ordinale Variablen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für 2 Gruppen und dem Kruskal-Wallis-Test für mehr als 2 Gruppen.

Die Analyse der Überlebenszeiten wurde nach der Kaplan-Meyer-Methode (Kaplan und Meyer 1958) vorgenommen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem log-rank-Test (Kalbfleisch und Prentice, 1980) geprüft.

Mit Hilfe des Cox'schen Regressionsmodells (Kalbfleisch und Prentice, 1980) wurde in der univariaten Analyse der prognostische Wert jedes einzelnen Parameters und in der multivariaten Analyse der prognostische Wert in Kombination mit anderen bekannten Prognoseparametern bestimmt.

Als statistisch signifikant galt jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationsaktivität

3.1.1 Normale Kolonschleimhaut

Im Bereich der nicht-neoplastischen Kolonschleimhaut ließ sich bei allen untersuchten Tumoren eine distinkte, nukleäre MIB-1-Expression stets nur im Bereich der Kryptenbasis sowie des unteren Drittels der Kryptenepithelien nachweisen (Abb. 3), deren Häufigkeit sich nicht unterschied von der Proliferationsaktivität zusätzlich untersuchter Proben der Dickdarmschleimhaut aus Biopsien und Kolektomiepräparaten von Nicht-Tumorpatienten aus dem Untersuchungsgut des Instituts für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Daten nicht gezeigt).

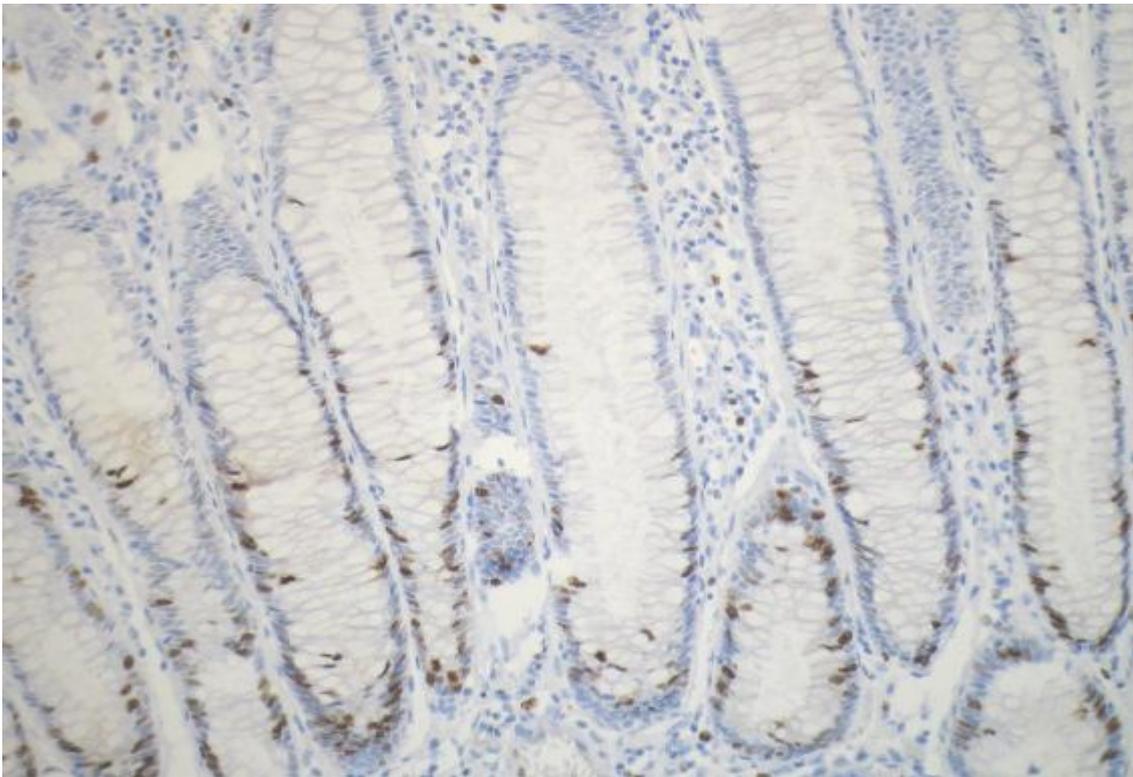


Abb. 3: Immunhistochemischer Nachweis proliferierender Zellen an der Kryptenbasis im Bereich der normalen tumorbenachbarten Dickdarmschleimhaut mittels nukleärer Expression des Antikörpers MIB-1 (Ki-67).

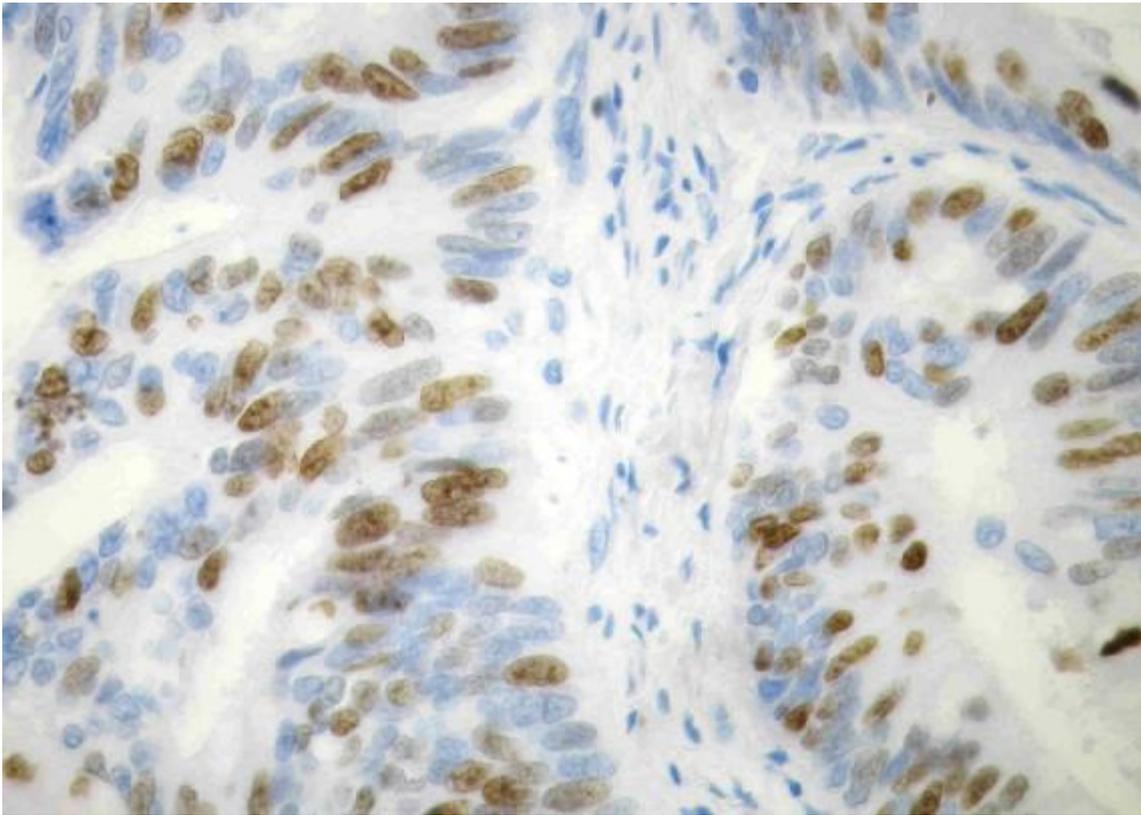


Abb. 4: Nachweis proliferierender Zellen in einem kolorektalen Adenokarzinom mittels nukleärer Expression des Antikörpers MIB-1 (Ki-67).

3.1.2 Kolorektale Karzinome

Im Gegensatz zur normalen Kolonschleimhaut zeigten die untersuchten Dickdarmkarzinome hinsichtlich ihrer Tumorzellproliferation eine deutliche intertumorale Heterogenität (Abb. 4) mit einer Spannweite der Proliferationsindizes von 7,1% bis maximal 96,2% bei einem Mittelwert von 48,7% (Standardabweichung: 24,0) und einem Median von 48,2%.

3.1.3 Korrelation mit histopathologischen Parametern

Hinsichtlich der untersuchten histopathologischen Parameter fand sich für den Differenzierungsgrad (Grading) der Tumoren eine statistisch hochsignifikante Korrelation zur Proliferationsaktivität (Tab. 7). Danach zeigten die Tumoren mit zunehmend schlechterem Differenzierungsgrad eine signifikant höhere Proliferationsaktivität ($p=0,007$). Dies galt auch dann, wenn die Karzinome in 2 Gruppen mit guter (G1/G2) und schlechter (G3/G4) Differenzierung zusammengefaßt wurden und wenn die Tumoren gemäß des Medianwertes der Proliferationsrate in Tumoren mit hoher und mit niedriger Proliferationsrate unterteilt wurden.

Auch hinsichtlich des Lymphknotenbefalls (pN-Kategorie) fand sich eine Korrelation mit der Proliferationsrate, indem Tumoren mit mehr als 3 Lymphknotenmetastasen eine höhere Proliferationsrate aufwiesen als Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen. Allerdings zeigten Tumoren der Gruppen pN0 und pN1 keine signifikanten Unterschiede. Darüber hinaus fand sich bei Dichotomisierung der Proliferationsrate mittels des Medianwertes ebenfalls keine statistische Signifikanz.

Hinsichtlich der Invasionstiefe (pT-Kategorie) der Tumoren zeigte sich ein Trend, daß Tumoren mit zunehmender Infiltrationstiefe auch eine höhere Proliferationsaktivität aufwiesen. Diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,067$). Auch mit dem UICC-Stadium sowie mit der Blutgefäßinvasion (BVI) und der Lymphgefäßinvasion (LVI) ließ sich ebenfalls keine Korrelation mit der Proliferationsaktivität nachweisen.

Drüber hinaus fand sich ebenfalls keine Assoziation mit verschiedenen Altersgruppen der Patienten, dem Geschlecht sowie der Tumorlokalisation.

Hinsichtlich der untersuchten Zellzyklusproteine fand sich eine statistisch hochsignifikante Korrelation mit der Cyclin B1- und der pRb-Expression der Tumorzellen (Tab. 8), indem Tumoren mit hoher Proliferationsaktivität auch häufiger eine starke Cyclin B1- bzw. pRb-Expression aufwiesen ($p<0,0056$). Im Gegensatz konnte weder für die Cyclin A-Expression noch für die p53-Expression eine Korrelation mit der Proliferationsaktivität der Tumoren nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Korrelation der Proliferationsrate mit histopathologischen Parametern

	(n)	Proliferationsrate (Mittelwert \pm Standardabweichung) (%)	p-Wert
pT-Kategorie			
pT1	25	39,6 \pm 22,6 ^a	0,067
pT2	67	44,9 \pm 24,4	
pT3	223	50,4 \pm 23,7	
pT4	27	52,8 \pm 24,3	
pN-Kategorie			
pN0	224	47,4 \pm 24,4	0,0425
pN1	75	47,6 \pm 24,0	
pN2	43	57,4 \pm 20,0	
UICC-Stadium			
Stadium I	77	44,8 \pm 24,4	0,2023
Stadium II	145	48,8 \pm 24,5	
Stadium III/IV ^b	120	51,1 \pm 22,9	
Differenzierungsgrad			
G1 ^c /G2	262	46,8 \pm 23,9	0,0109
G3/G4 ^d	80	54,8 \pm 23,4	
Blutgefäßinvasion			
negativ	314	48,8 \pm 24,0	0,9209
intramural ^e	13	46,1 \pm 26,4	
extramural ^f	15	48,4 \pm 24,1	
Lymphgefäßinvasion			
negativ	249	48,1 \pm 24,3	0,4186
positiv	93	50,4 \pm 23,3	

^aStandardabweichung; ^bStadium IV sechs Tumoren; ^cG1 vier Tumoren; ^dG4 zwei Tumoren; ^eintramural: Submukosa oder M. propria; ^fextramural: Subserosa;

Tabelle 8: Korrelation der Proliferationsrate mit den untersuchten Zellzyklusproteinen

		Proliferationsrate				p-Wert
		niedrig (< 48,2%)		hoch (≥ 48,2%)		
	(n)	n	(%)	(n)	(%)	
p53						
positiv	213	100	(47,0)	113	(53,0)	0,1469
negativ	129	71	(55,0)	58	(45,0)	
pRb						
≥ 50%	302	142	(47,0)	160	(53,0)	0,0025
< 50%	40	29	(72,5)	11	(27,5)	
Cyclin A						
≥ 10%	232	111	(47,8)	121	(52,2)	0,247
< 10%	110	60	(54,6)	50	(45,4)	
Cyclin B1						
≥ 10%	269	124	(46,1)	145	(53,9)	0,0056
< 10%	73	47	(64,4)	26	(35,6)	

3.1.4 Prognostischer Einfluß der Tumorzellproliferation

Die univariate Analyse (Abb. 5 und 6) ergab sowohl hinsichtlich des postoperativen Gesamtüberlebens als auch bezüglich des rezidivfreien Überlebens keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumoren mit einer hohen Proliferationsaktivität (\geq Median) und Tumoren mit einer niedrigen Proliferationsaktivität ($<$ Median). Darüber hinaus ließen sich auch dann keine prognostischen Unterschiede nachweisen, wenn an Stelle des Medianwertes verschiedene Proliferationsindizes als sog. cut-off levels (10%, 20% usw. bis 80%) untersucht wurden (Daten nicht gezeigt).

Um einen möglichen prognostischen Einfluß der Tumorzellproliferation in verschiedenen Patientensubgruppen zu untersuchen, wurden die Überlebenszeiten und das rezidivfreie Überleben der Patienten mit Tumoren der Stadien pT1 und pT2 mit weiter fortgeschrittenen Karzinomen der Stadien pT3 und pT4 verglichen. Patienten der relativ frühen Stadien pT1 und pT2 zeigten erwartungsgemäß eine signifikant bessere Prognose als Patienten mit Tumoren der Stadien pT3 oder pT4 ($p < 0,0001$). Die Proliferationsaktivität hatte jedoch auch innerhalb dieser Subgruppen keinen Einfluß auf die Prognose der Patienten. Ähnliches galt auch für die pN- Kategorie, auch hier zeigte die Tumorzellproliferation weder in der Subgruppe der nodal-negativen noch in der Subgruppe der nodal-positiven Patienten einen Einfluß auf die Prognose.

Auch in der abschließenden multivariaten Analyse unter Einschluß der etablierten Prognosefaktoren des pTNM-Systems konnte ein prognostischer Einfluß der Proliferationsaktivität der Tumorzellen weder auf das gesamte postoperative Überleben noch auf das rezidivfreie Überleben nachgewiesen werden.

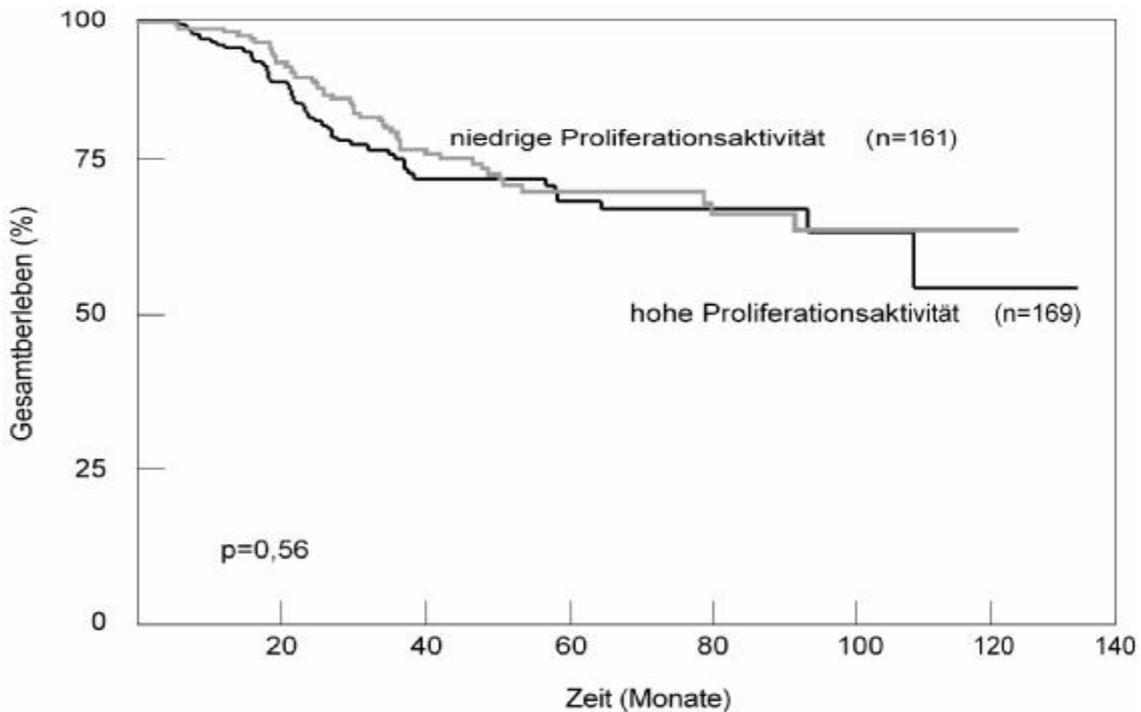


Abb. 5: Postoperatives Gesamtüberleben von Patienten mit kolorektalen Karzinomen mit hoher (\geq Medianwert des PI) und niedriger ($<$ Medianwert des PI) Proliferationsaktivität (log-rank-Test: $p < 0,56$).

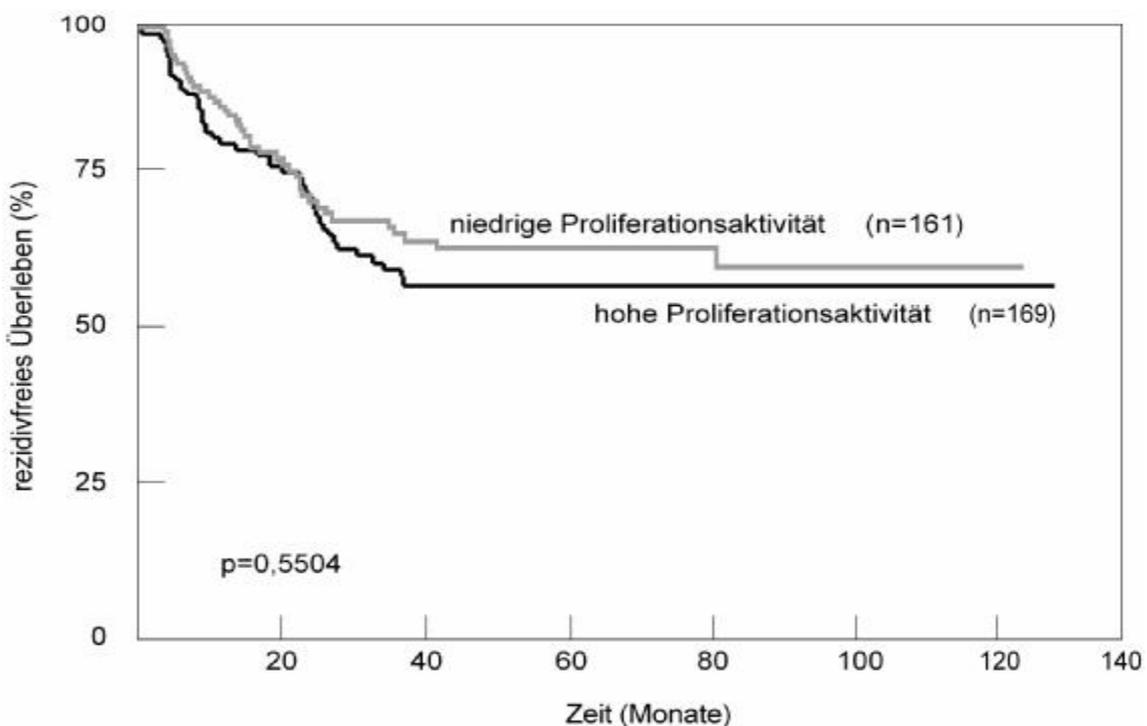


Abb. 6: Rezidivfreies Überleben von Patienten mit hoher (\geq Medianwert des PI) und niedriger ($<$ Medianwert des PI) Proliferationsaktivität der Tumoren (log-rank-Test: $p < 0,5504$).

3.2 Expression von p53 und pRb

3.2.1 Expression in normaler Kolonschleimhaut

3.2.1.1 Expression von p53 in normaler Kolonschleimhaut

Bei keinem der 342 untersuchten Tumoren ließ sich im Bereich der tumorbenachbarten, nicht-neoplastischen Kolonschleimhaut eine p53-Expression nachweisen.

3.2.1.2 Expression von pRb in normaler Kolonschleimhaut

Bei sämtlichen 342 untersuchten Tumoren konnte im Bereich der tumorbenachbarten, nicht-neoplastischen Magenschleimhaut eine deutliche pRb-Expression nachgewiesen werden (Abb. 7).

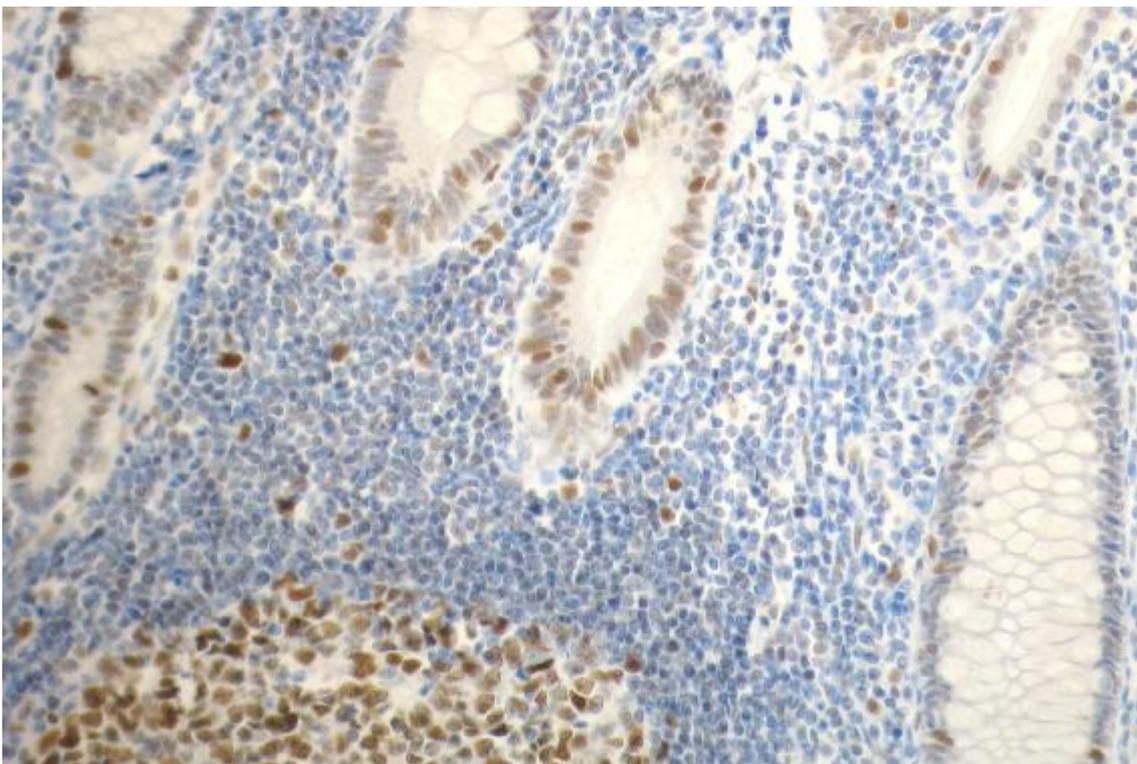


Abb. 7: Nukleäre pRb-Expression im Keimzentrum eines Lymphfollikels sowie in basalen Kryptenepithelien der tumorbenachbarten normalen Dickdarmschleimhaut.

3.2.2 Expression in kolorektalen Karzinomen

3.2.2.1 Expression von p53 in kolorektalen Karzinomen

Eine nukleäre p53-Expression (Abb. 8) der Tumorzellen konnte bei 229 der 342 untersuchten Tumoren (67,0%) mit deutlicher intra- und intertumoraler Heterogenität zwischen 1% und maximal 99% p53-positiver Tumorzellen nachgewiesen werden. Dabei zeigten 16 Tumoren (4,7%) zwischen 1% und 5% positive Tumorzellen; 39 Tumoren (11,4%) 5-25% positive Tumorzellen; 26 Tumoren (7,6%) 26-50% positive Tumorzellen; 29 Tumoren (8,5%) 51-75% positive Tumorzellen und bei 119 Tumoren (34,8%) konnte ein Expression von p53 in mehr als 75% der Tumorzellen nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten 213 Tumoren (62,3%) ein p53-Expression in mehr als 5% der Tumorzellen. Hinsichtlich verschiedener Tumorabschnitte im Bereich der Invasionsfront oder des Tumorzentrums fanden sich keine Unterschiede in der p53-Immunoreaktivität der Tumorzellen.

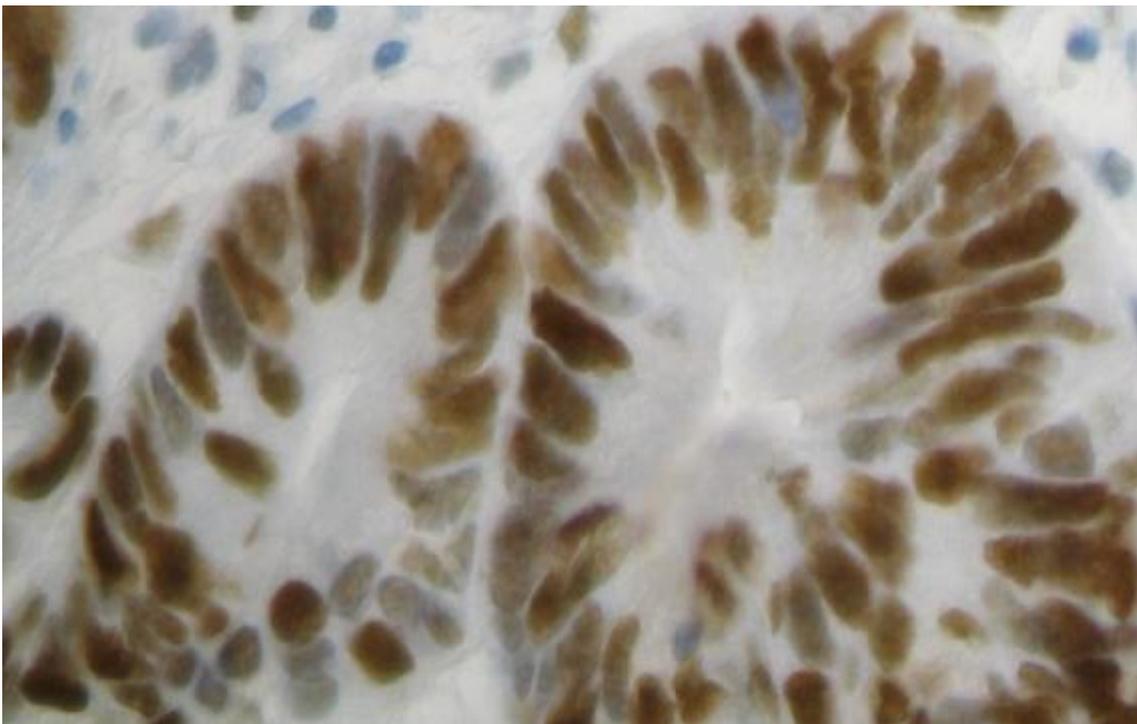


Abb. 8: Starke nukleäre p53-Expression in einem fortgeschrittenen Kolonkarzinom.

3.2.2.2 Expression von pRb in kolorektalen Karzinomen

Eine nukleäre pRb-Expression war bei sämtlichen 342 untersuchten Kolonkarzinomen nachweisbar (Abb. 9). Bei deutlicher intra- und intertumorale Heterogenität lag der Prozentsatz pRb-positiver Tumorzellen zwischen 1% und max. 95%.

Dabei fand sich nur ein Tumor, der lediglich in 1% der Tumorzellen eine pRb-Expression aufwies. Insgesamt zeigten 14 Tumoren (4,1%) 5-25% pRb-positive Tumorzellen; 25 Tumoren (7,3%) 26-50% pRb-positive Tumorzellen; 60 Tumoren (17,5%) 51-75% pRb-positive Tumorzellen, während die weit überwiegende Mehrheit von 242 Tumoren (70,8%) eine deutliche pRb-Expression in mehr als 75% der Tumorzellen aufwies. Insgesamt zeigten 302 Tumoren (88,3%) eine pRb-Expression in mehr als 50% der Tumorzellen.

Hinsichtlich Tumorabschnitte im Bereich der Invasionsfront und des Tumorzentrums fanden sich keine Unterschiede in der Häufigkeit oder der Verteilung der pRb-positiven Tumorzellen.

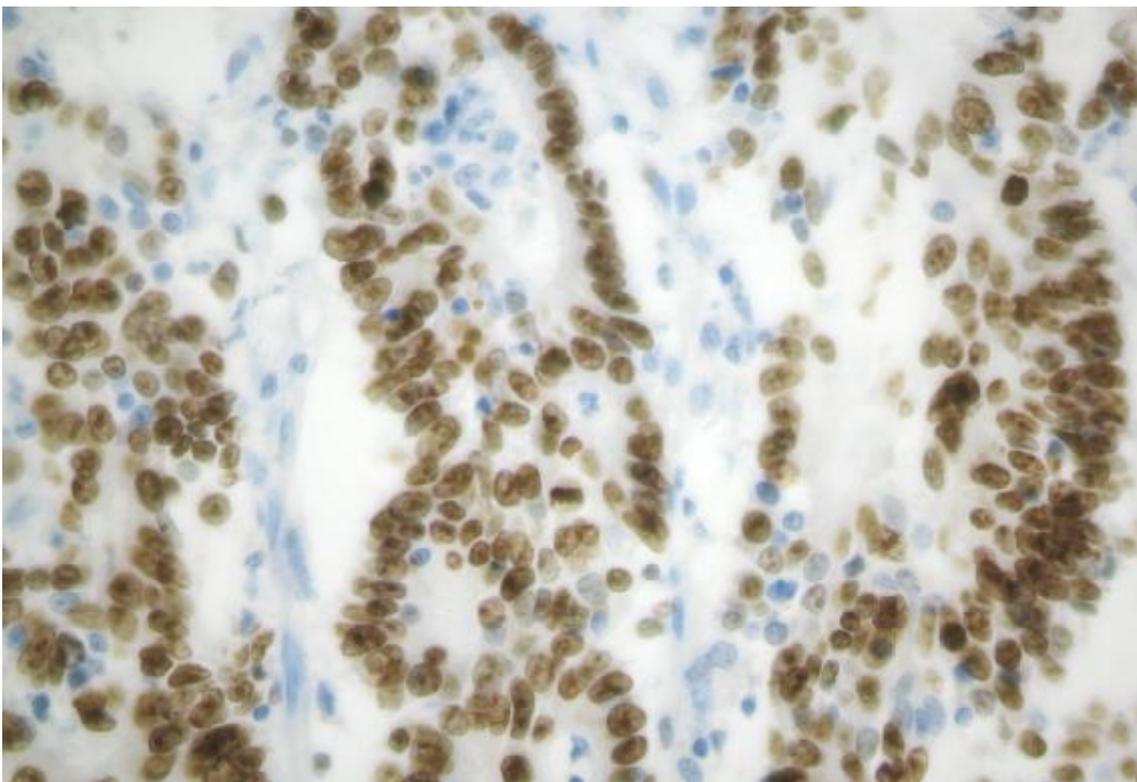


Abb. 9: Starke nukleäre pRb-Expression in einem kolorektalen Adenokarzinom.

3.2.3 Korrelation mit histopathologischen Parametern

3.2.3.1 p53-Expression und histopathologische Parameter

Für keinen der untersuchten histopathologischen Parameter ließ sich eine statistisch signifikante Korrelation mit der p53-Expression nachweisen (Tab. 9).

Drüber hinaus fand sich ebenfalls keine Assoziation mit verschiedenen Altersgruppen der Patienten, dem Geschlecht sowie der Tumorlokalisation.

3.2.3.2 pRb-Expression und histopathologische Parameter

Die statistische Auswertung ergab für pRb, daß hinsichtlich der Korrelation mit histopathologischen Parametern sowie auch der Überlebenszeiten keine Unterschiede bestanden zwischen den einzelnen Gruppen der Tumoren mit einer pRb-Expression von weniger als 50% der Tumorzellen ebenso wie zwischen den Gruppen mit mehr als 50% pRb-positiver Tumorzellen. Daher wurden die Tumoren für die weitere statistische Auswertung in zwei Gruppen unterteilt mit starker pRb-Expression in mehr als 50% der Tumorzellen und mit reduzierter pRb-Expression (weniger als 50% pRb-positive Tumorzellen).

Für keinen der untersuchten histopathologischen Parameter ließ sich eine statistisch signifikante Korrelation mit der pRb-Expression nachweisen (Tab. 10).

Drüber hinaus fand sich ebenfalls keine Assoziation mit verschiedenen Altersgruppen der Patienten, dem Geschlecht sowie der Tumorlokalisation.

Tabelle 9: Korrelation der p53-Expression mit histopathologischen Parametern

	(n)	p53-positiv (%)	p-Wert
pT-Kategorie			
pT1	25	15 (60,0)	0,9794
pT2	67	42 (62,7)	
pT3	223	140 (62,8)	
pT4	27	16 (59,3)	
pN-Kategorie			
pN0	224	141 (62,6)	0,8989
pN1	75	45 (60,0)	
pN2	43	27 (62,8)	
UICC-Stadium			
Stadium I	77	49 (63,6)	0,8146
Stadium II	145	92 (63,5)	
Stadium III/IV ^a	120	72 (60,0)	
Differenzierungsgrad			
G1 ^b /G2	262	166 (63,4)	0,4566
G3/G4 ^c	80	47 (58,8)	
Blutgefäßinvasion			
negativ	314	198 (63,1)	0,4404
intramural ^d	13	8 (61,5)	
extramural ^e	15	7 (46,7)	
Lymphgefäßinvasion			
negativ	249	151 (60,6)	0,3064
positiv	93	62 (66,7)	

^aStadium IV sechs Tumoren; ^bG1 vier Tumoren; ^cG4 zwei Tumoren; ^dintramural: Submukosa or M. propria; ^eextramural: Subserosa;

Tabelle 10: Korrelation der pRb-Expression mit histopathologischen Parametern

	n	pRb-Expression		p-Wert		
		(<50%)	(≥50%)			
		n	(%)	n	(%)	
pT-Kategorie						
pT1	25	3	(12,0)	22	(88,0)	0,8312
pT2	67	10	(14,9)	57	(85,1)	
pT3	223	24	(10,8)	199	(89,2)	
pT4	27	3	(11,1)	24	(88,9)	
pN-Kategorie						
pN0	224	27	(12,1)	197	(87,9)	0,2548
pN1	75	11	(14,7)	64	(85,3)	
pN2	43	2	(4,7)	41	(95,3)	
UICC-Stadium						
Stadium I	77	10	(13,0)	67	(87,1)	0,8999
Stadium II	145	17	(11,7)	128	(88,3)	
Stadium III/IV ^a	120	13	(10,8)	107	(89,2)	
Differenzierungsgrad						
G1 ^b /G2	262	33	(12,6)	229	(87,4)	0,3485
G3/G4 ^c	80	7	(8,8)	73	(91,2)	
Blutgefäßinvasion						
negativ	314	38	(12,1)	276	(87,9)	0,7337
intramural ^d	13	1	(7,7)	12	(92,3)	
extramural ^e	15	1	(6,7)	14	(93,3)	
Lymphgefäßinvasion						
negativ	249	32	(12,9)	217	(87,1)	0,2766
positiv	93	8	(8,6)	85	(91,4)	

^aStadium IV sechs Tumoren; ^bG1 vier Tumoren; ^cG4 zwei Tumoren; ^dintramural: Submukosa or M. propria; ^eextramural: Subserosa;

3.2.4 Prognostischer Einfluß

3.2.4.1 Prognostischer Einfluß der p53-Expression

Die univariate Analyse ergab für die p53-Expression weder einen prognostischen Einfluß auf das gesamte postoperative ($p < 0,093$) noch auf das rezidivfreie Überleben ($p < 0,5711$). Dies galt auch bei separater Analyse verschiedener cut-points sowie bei Vergleich der Subgruppen gemäß der pT- und pN-Kategorien.

Auch in der abschließenden multivariaten Analyse unter Einschluß der etablierten Prognosefaktoren des pTNM-Systems konnte ein prognostischer Einfluß der p53-Expression der Tumorzellen weder auf das gesamte postoperative Überleben noch auf das rezidivfreie Überleben nachgewiesen werden.

3.2.4.2 Prognostischer Einfluß der pRb-Expression

Die univariate Analyse ergab auch für die pRb-Expression weder einen prognostischen Einfluß auf das gesamte postoperative ($p < 0,4066$) noch auf das rezidivfreie Überleben ($p < 0,2019$). Dies galt auch hier bei separater Analyse verschiedener cut-points sowie bei Vergleich der unterschiedlichen Subgruppen gemäß der pT- und pN-Kategorien.

Auch in der abschließenden multivariaten Analyse unter Einschluß der etablierten Prognosefaktoren des pTNM-Systems konnte ein prognostischer Einfluß der pRb-Expression der Tumorzellen weder auf das gesamte postoperative Überleben noch auf das rezidivfreie Überleben nachgewiesen werden.

3.3 Expression der Zellzyklusantigene Cyclin A und Cyclin B1

3.3.1 Expression in normaler Kolonschleimhaut

3.3.1.1 Cyclin A-Expression in normaler Kolonschleimhaut

Bei allen 342 untersuchten Tumoren konnte in der normalen Dickdarmschleimhaut eine nukleäre Expression der Kryptenepithelien hauptsächlich in der Proliferationszone im unteren Kryptendrittel nachgewiesen werden (Abb. 10).

3.3.1.2 Cyclin B1-Expression in normaler Kolonschleimhaut

Bei allen 342 untersuchten Tumoren konnte in der normalen Dickdarmschleimhaut eine zytoplasmatische Cyclin B1-Expression in den Kryptenepithelien in der Proliferationszone im unteren Kryptendrittel nachgewiesen werden (Abb. 12).

3.3.2 Expression in kolorektalen Karzinomen

3.3.2.1 Cyclin A-Expression in kolorektalen Karzinomen

Eine nukleäre Immunreaktion für Cyclin A war bei allen 342 untersuchten kolorektalen Karzinomen (Abb. 11) nachweisbar. Dabei fand sich eine deutliche intra- und inter-tumorale Heterogenität zwischen 1% und 70% positiver Tumorzellen.

Bei 15 Fällen konnte zusätzlich in einzelnen verstreut liegenden Tumorzellen eine zytoplasmatische Expression von Cyclin A nachgewiesen werden.

Von den 342 Tumoren zeigten 32,2% (n=110) eine Cyclin A-Expression in weniger als 10% der Tumorzellen. Bei 140 Tumoren ließen sich 10% bis 25% positive Tumorzellen nachweisen, während bei 84 Tumoren (24,6%) zwischen 26% und 50% positive Tumorzellen nachweisbar waren. Lediglich 8 Tumoren (2,3%) zeigten mehr als 50% positive Tumorzellen.

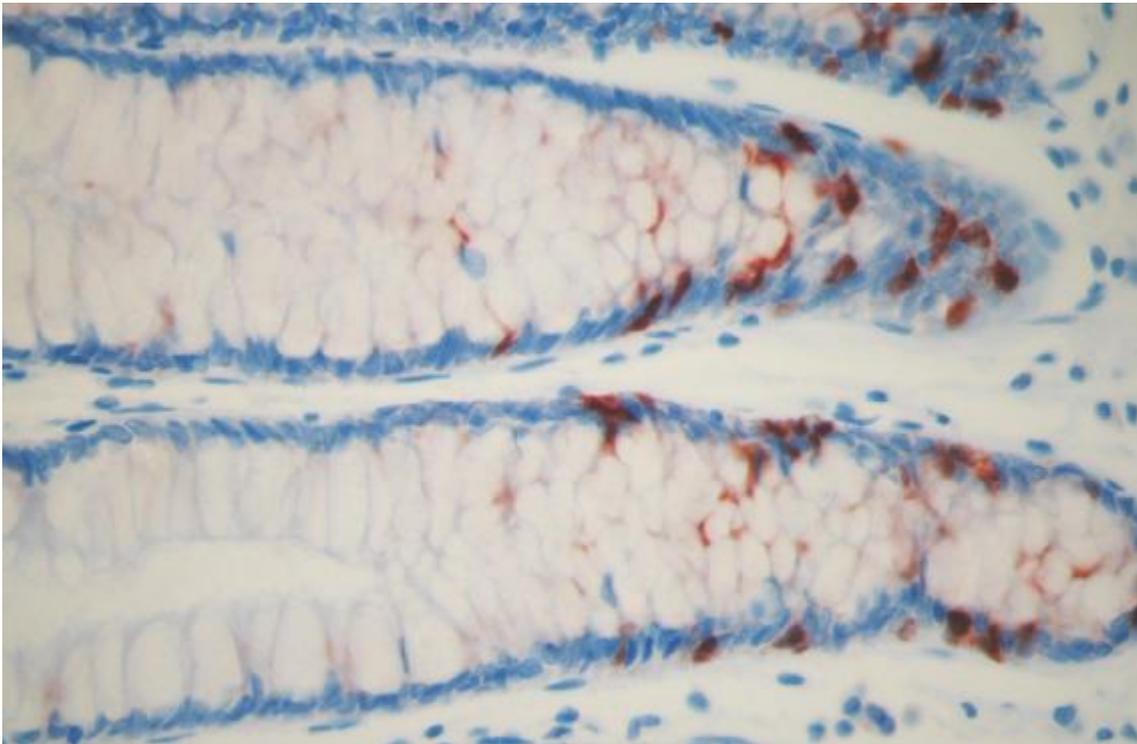


Abb. 10: Cyclin A-Expression in den Zellkernen normaler Kryptenepithelien der tumorbenachbarten normalen Dickdarmschleimhaut im Bereich der Proliferationszone.

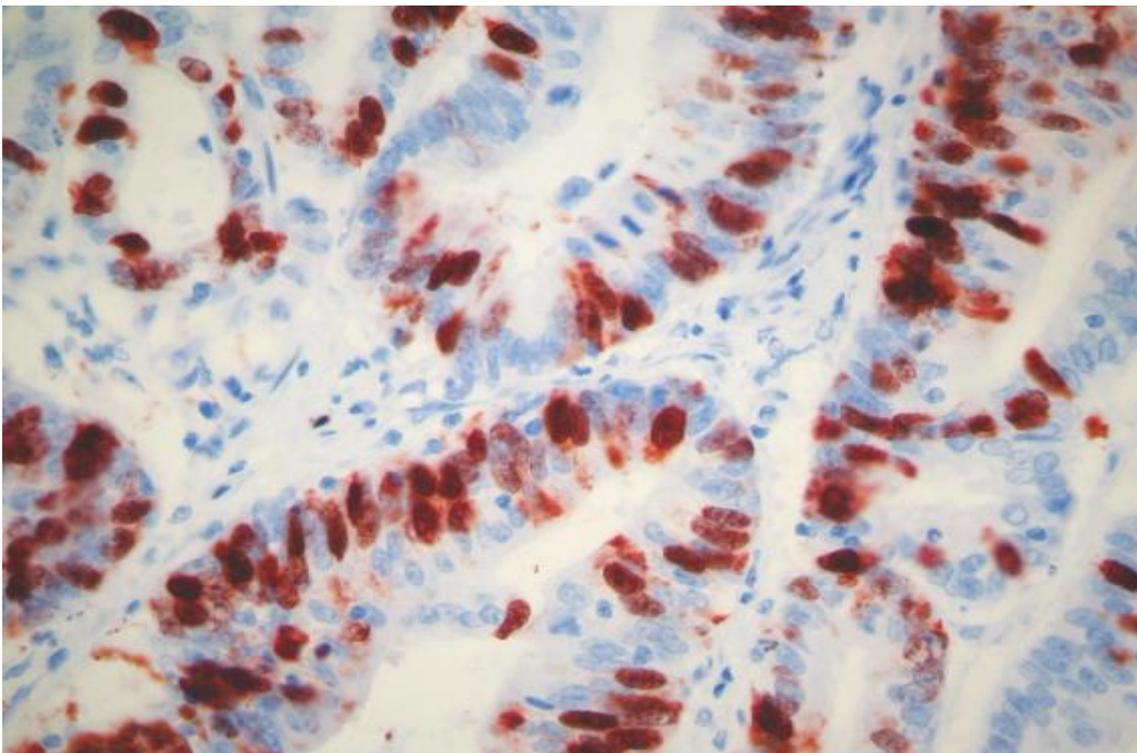


Abb. 11: Heterogene nukleäre Cyclin A-Expression in einem kolorektalen Karzinom.

3.3.2.2 Cyclin B1-Expression in kolorektalen Karzinomen

Eine zytoplasmatische Cyclin B1-Expression konnte bei allen 342 untersuchten Tumoren nachgewiesen werden (Abb. 12). Dabei fand sich auch hier, ähnlich wie bei den übrigen untersuchten Zellzyklusantigenen, eine deutliche intra- und intertumorale Heterogenität von minimal 1% bis maximal 80% Cyclin B1-positiver Tumorzellen.

Eine nukleäre Expression fand sich nur bei einzelnen eingestreuten Tumorzellen und eine ausschließliche nukleäre Expression lag bei keinem der Tumoren vor.

Bei 73 Tumoren (21,3%) fand sich eine Cyclin B1-Expression in weniger als 10% der Tumorzellen. Bei 99 Tumoren (29,0%) konnten 5% bis 25% Cyclin B1-positiv Tumorzellen nachgewiesen werden, während 120 Tumoren 26 - 50% positive Tumorzellen zeigten. Lediglich 50 Tumoren (14,6%) zeigten mehr als 50% positive Tumorzellen.

Dabei fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich oberflächlicher und tiefer Tumorabschnitte und solchen an der Invasionsfront der Tumoren.

Die Mehrzahl der mitotischen Zellen zeigte eine Cyclin B1-Expression, allerdings waren in allen Fällen immer auch einzelne Cyclin B1-negative Mitosen nachweisbar (Abb. 12). Bei 12 Fällen schlossen die untersuchten Tumorschnitte auch vorbestehende Adenomanteile ein (jeweils geringgradige Dysplasien). Bei all diesen Fällen zeigten die Adenomanteile lediglich in einzelnen Adenomzellen eine Cyclin B1-Expression während die benachbarten Karzinomanteile in den meisten Fällen eine starke Cyclin B1-Expression aufwiesen.

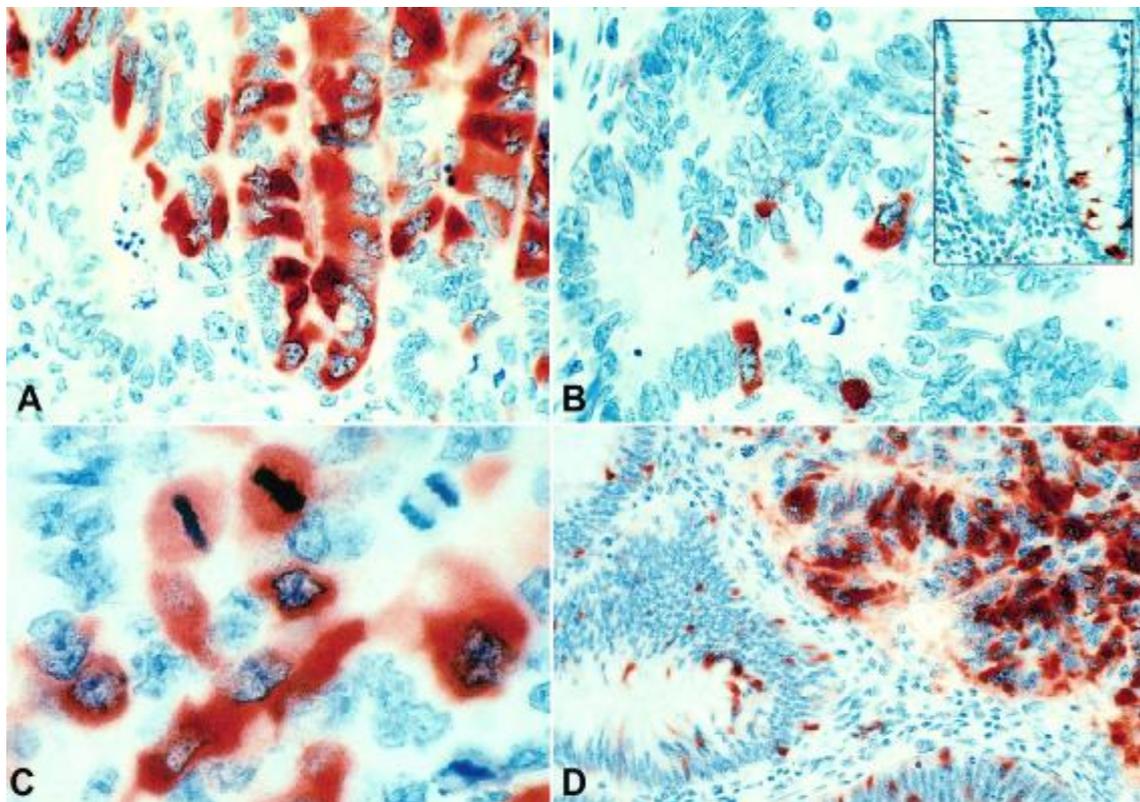


Abb. 12: Cyclin B1-Expression in kolorektalen Karzinomen. **(a,b)** Tumorabschnitte mit starker zytoplasmischer Expression und deutlicher intratumoraler Heterogenität (Inset: Cyclin B1-Expression in normaler, tumorbenachbarter Schleimhaut im Bereich der Proliferationszone im unteren Drittel der Darmkrypten). **(c)** Mitotische Tumorzellen mit Cyclin B1-Expression neben Cyclin B1-negativer Mitose. **(d)** Starke Cyclin B1-Expression (>50% der Tumorzellen) in Karzinomzellen (rechts) neben vorbestehenden Adenomdrüsen mit Cyclin B1-Expression lediglich in einzelnen Adenomzellen (links).

3.3.3 Korrelation mit histopathologischen Parametern

3.3.3.1 Cyclin A-Expression und histopathologische Parameter

Die statistische Auswertung ergab für Cyclin A, daß hinsichtlich der Korrelation mit histopathologischen Parametern sowie auch der Überlebenszeiten keine Unterschiede bestanden zwischen den einzelnen Gruppen der Tumoren mit einer Cyclin A-Expression von mehr als 10% der Tumorzellen. Daher wurden diese drei Gruppen für die weitere statistische Auswertung zusammengefaßt als Tumoren mit starker Cyclin A-Expression (n=232; 67,8%), die der Gruppe mit schwacher Cyclin A-Expression in weniger als 10% der Tumorzellen (n=110; 32,2%) gegenübergestellt wurde.

Auf dieser Basis ließ sich für keinen der untersuchten histopathologischen Parameter eine signifikante Korrelation mit der Cyclin A-Expression nachweisen (Tab. 11).

Lediglich beim Vergleich der UICC-Tumorstadien fand sich ein statistischer Trend, dem zufolge Tumoren eines höheren Stadiums eine Abnahme der Cyclin A-Expression zeigten ($p < 0,0486$).

Drüber hinaus fand sich ebenfalls keine Assoziation mit verschiedenen Altersgruppen der Patienten, dem Geschlecht sowie der Tumorlokalisation.

Tabelle 11: Korrelation der Cyclin A-Expression mit histopathologischen Parametern

	n	Cyclin A-Expression		p-Wert		
		(<10%)	(≥10%)			
		n	(%)	n	(%)	
pT-Kategorie						
pT1	25	6	(24,0)	19	(76,0)	0,3847
pT2	67	17	(25,4)	50	(74,3)	
pT3	223	77	(34,5)	146	(65,5)	
pT4	27	10	(37,0)	17	(63,0)	
pN-Kategorie						
pN0	224	66	(29,5)	158	(70,5)	0,2391
pN1	75	30	(40,0)	45	(60,0)	
pN2	43	14	(32,6)	29	(67,4)	
UICC-Stadium						
Stadium I	77	16	(20,8)	61	(79,2)	0,0486
Stadium II	145	50	(34,5)	95	(65,5)	
Stadium III/IV ^a	120	44	(36,7)	76	(63,3)	
Differenzierungsgrad						
G1 ^b /G2	262	87	(33,2)	175	(66,8)	0,4552
G3/G4 ^c	80	23	(28,8)	57	(71,2)	
Blutgefäßinvasion						
negativ	314	103	(32,8)	211	(67,2)	0,6844
intramural ^d	13	3	(23,1)	10	(76,9)	
extramural ^e	15	4	(26,7)	11	(73,3)	
Lymphgefäßinvasion						
negativ	249	85	(34,1)	164	(65,9)	0,2012
positiv	93	25	(26,9)	68	(73,1)	

^aStadium IV sechs Tumoren; ^bG1 vier Tumoren; ^cG4 zwei Tumoren; ^dintramural: Submukosa or M. propria; ^eextramural: Subserosa;

3.3.3.2 Cyclin B1-Expression und histopathologische Parameter

Die statistische Auswertung ergab für Cyclin B1 ähnlich wie bei Cyclin A, daß hinsichtlich der Korrelation mit histopathologischen Parametern sowie auch der Überlebenszeiten keine Unterschiede bestanden zwischen den einzelnen Gruppen der Tumoren mit einer Cyclin B1-Expression von mehr als 10% der Tumorzellen. Daher wurden diese drei Gruppen für die weitere statistische Auswertung zusammengefaßt als Tumoren mit starker Cyclin B1-Expression (n=269; 78,7%), die der Gruppe mit schwacher Cyclin B1-Expression in weniger als 10% der Tumorzellen (n=73; 21,3%) gegenübergestellt wurde.

Auf dieser Basis ließ sich für keinen der untersuchten histopathologischen Parameter eine signifikante Korrelation mit der Cyclin B1-Expression nachweisen (Tab. 12).

Drüber hinaus fand sich ähnlich wie für Cyclin A ebenfalls keine Assoziation mit verschiedenen Altersgruppen der Patienten, dem Geschlecht sowie der Tumorlokalisation.

Tabelle 12: Korrelation der Cyclin B1-Expression mit histopathologischen Parametern

	n	Cyclin B1-Expression		p-Wert
		(<10%)	(≥10%)	
		n (%)	n (%)	
pT-Kategorie				
pT1	25	4 (16,0)	21 (84,0)	0,5616
pT2	67	12 (17,9)	55 (82,1)	
pT3	223	49 (22,0)	174 (78,0)	
pT4	27	8 (29,6)	19 (70,4)	
pN-Kategorie				
pN0	224	46 (20,5)	178 (79,5)	0,8786
pN1	75	17 (22,7)	58 (77,3)	
pN2	43	10 (23,3)	33 (76,7)	
UICC-Stadium				
Stadium I	77	13 (16,9)	64 (83,1)	0,5377
Stadium II	145	32 (22,1)	113 (77,9)	
Stadium III/IV ^a	120	28 (23,3)	92 (76,7)	
Differenzierungsgrad				
G1 ^b /G2	262	57 (21,8)	205 (78,2)	0,7373
G3/G4 ^c	80	16 (20,0)	64 (80,0)	
Blutgefäßinvasion				
negativ	314	67 (21,3)	247 (78,7)	0,7679
intramural ^d	13	2 (15,4)	11 (84,6)	
extramural ^e	15	4 (26,7)	11 (73,3)	
Lymphgefäßinvasion				
negativ	249	57 (22,9)	192 (77,1)	0,2534
positiv	93	16 (17,2)	77 (82,8)	

^aStadium IV sechs Tumoren; ^bG1 vier Tumoren; ^cG4 zwei Tumoren; ^dintramural: Submukosa or M. propria; ^eextramural: Subserosa;

3.3.4 Prognostischer Einfluß

3.3.4.1 Prognostischer Einfluß der Cyclin A-Expression

Die univariate Analyse ergab für die Cyclin A-Expression weder einen prognostischen Einfluß auf das gesamte postoperative noch auf das rezidivfreie Überleben (Abb. 13 und 14). Dies galt auch bei separater Analyse der unterschiedlichen Gruppen der Cyclin A-Expression, verschiedener cut-points sowie bei Vergleich der Subgruppen gemäß der pT- und pN-Kategorien.

Auch in der abschließenden multivariaten Analyse unter Einschluß der etablierten Prognosefaktoren des pTNM-Systems konnte ein prognostischer Einfluß der Cyclin A-Expression der Tumorzellen weder auf das gesamte postoperative Überleben noch auf das rezidivfreie Überleben nachgewiesen werden.

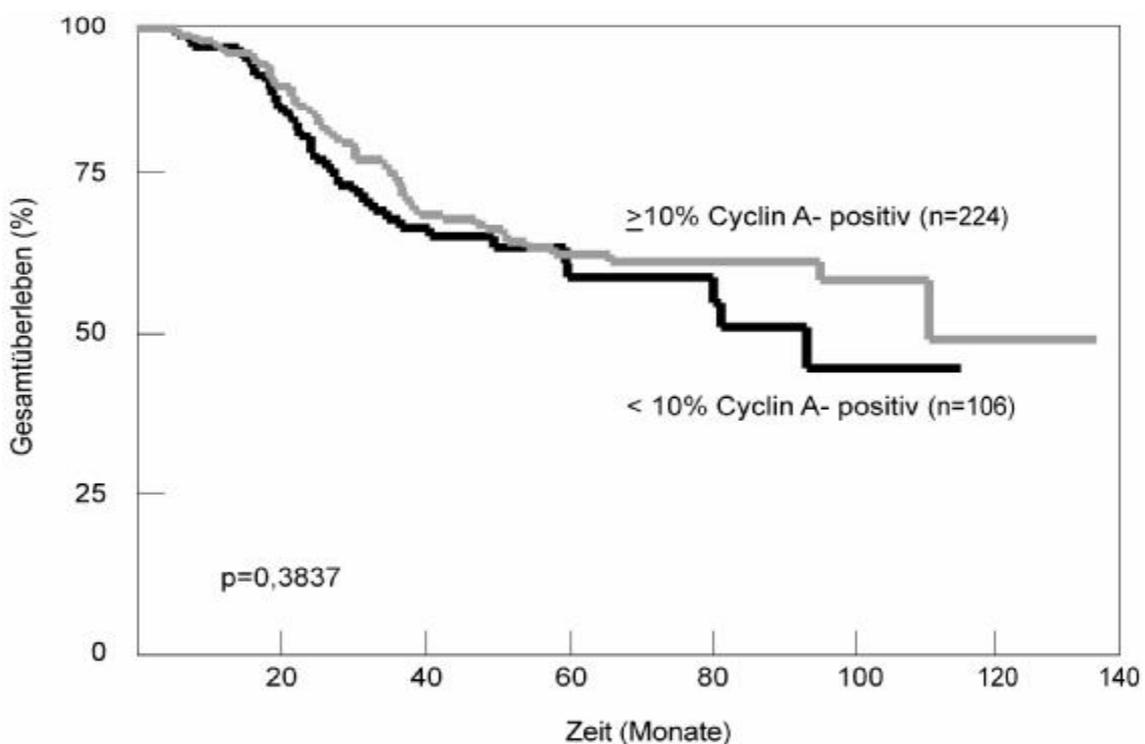


Abb. 13: Postoperatives Überleben bei 330 Patienten mit kolorektalen Karzinomen mit mehr als 10% Cyclin A-positiven Tumorzellen (n=106) und solchen mit weniger als 10% Cyclin A-positiven Tumorzellen (n=224). (log-rank test: $p < 0,3837$)

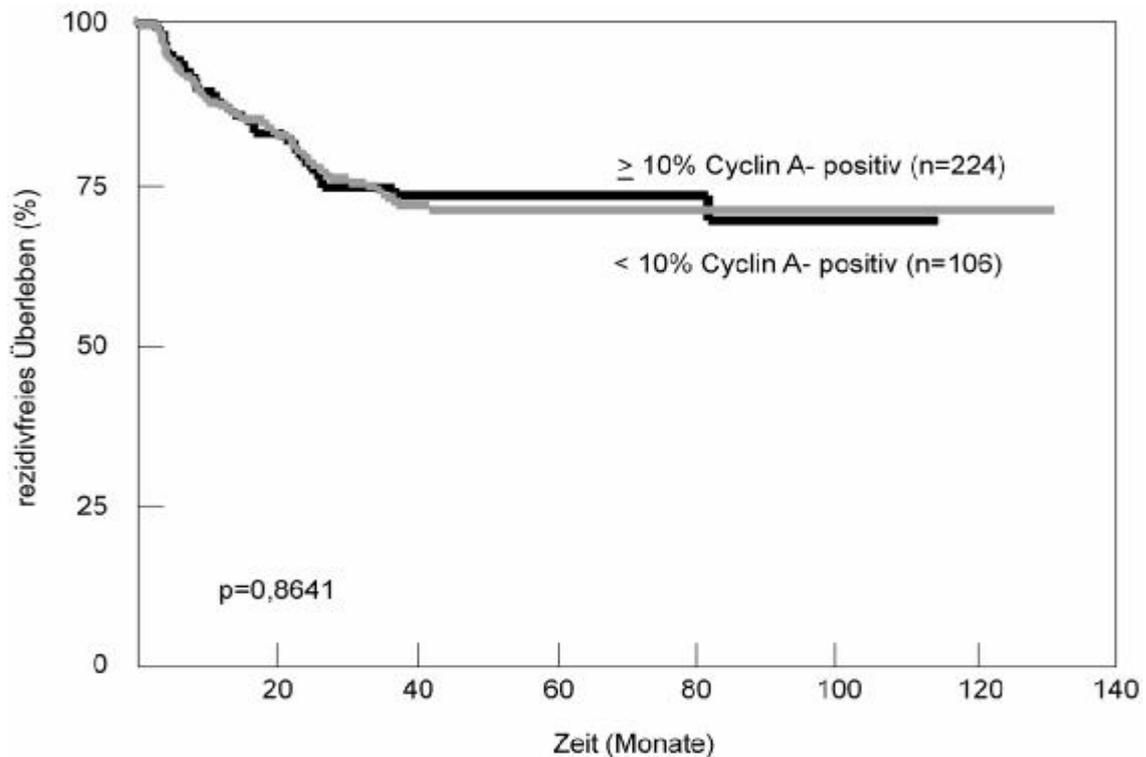


Abb. 14: Rezidivfreies Überleben bei 330 Patienten mit kolorektalen Karzinomen mit mehr als 10% Cyclin A-positiven Tumorzellen (n=107) und solchen mit weniger als 10% Cyclin A-positiven Tumorzellen (n=223). (log-rank test: $p < 0,8641$.)

3.3.4.2 Prognostischer Einfluß der Cyclin B1-Expression

Auch für die Cyclin B1-Expression war in der univariaten Analyse weder ein prognostischer Einfluß auf das gesamte postoperative noch auf rezidivfreie Überleben nachweisbar (Abb. 15 und 16). Dies galt auch hier bei separater Analyse der unterschiedlichen Gruppen der Cyclin B1-Expression, verschiedener cut-points sowie bei Vergleich der Subgruppen gemäß der pT- und pN-Kategorien.

Auch in der abschließenden multivariaten Analyse unter Einschluß der etablierten Prognosefaktoren des pTNM-Systems konnte ein prognostischer Einfluß der Cyclin B1-Expression der Tumorzellen weder auf das gesamte postoperative Überleben noch auf das rezidivfreie Überleben nachgewiesen werden.

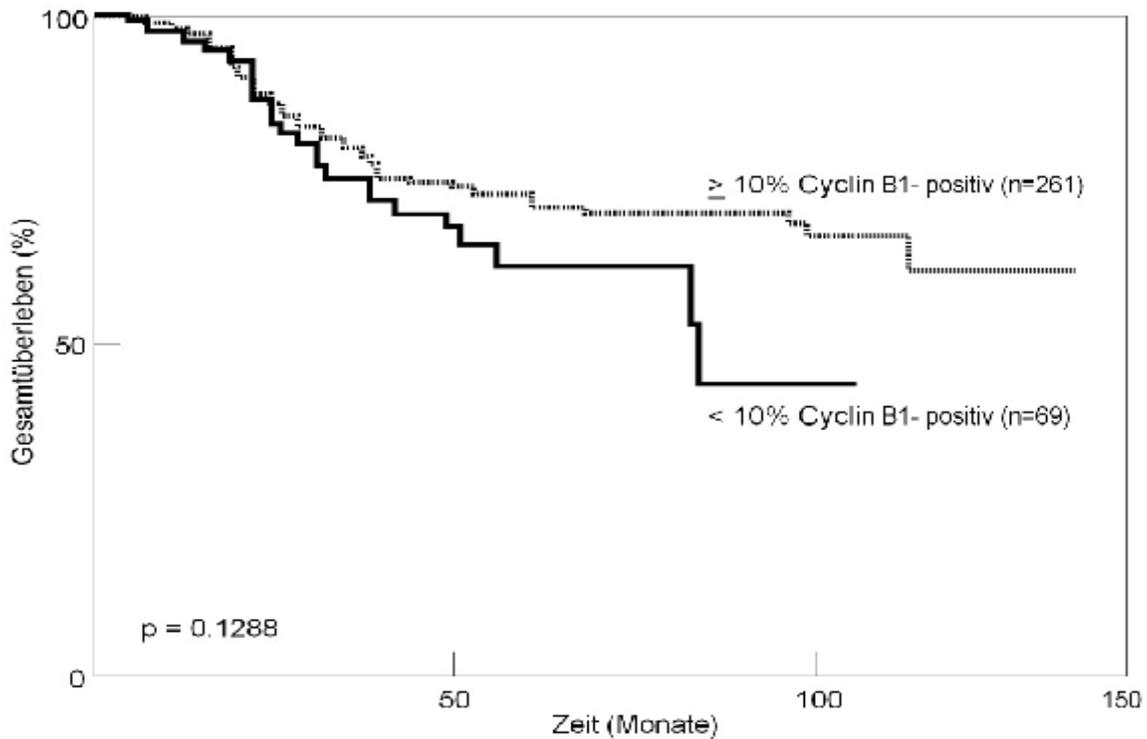


Abb. 15: Postoperatives Gesamtüberleben bei 330 Patienten mit kolorektalen Karzinomen mit mehr als 10% Cyclin B1-positiven Tumorzellen und solchen mit weniger als 10% Cyclin B1-positiven Tumorzellen (log-rank test: $p < 0,1288$).

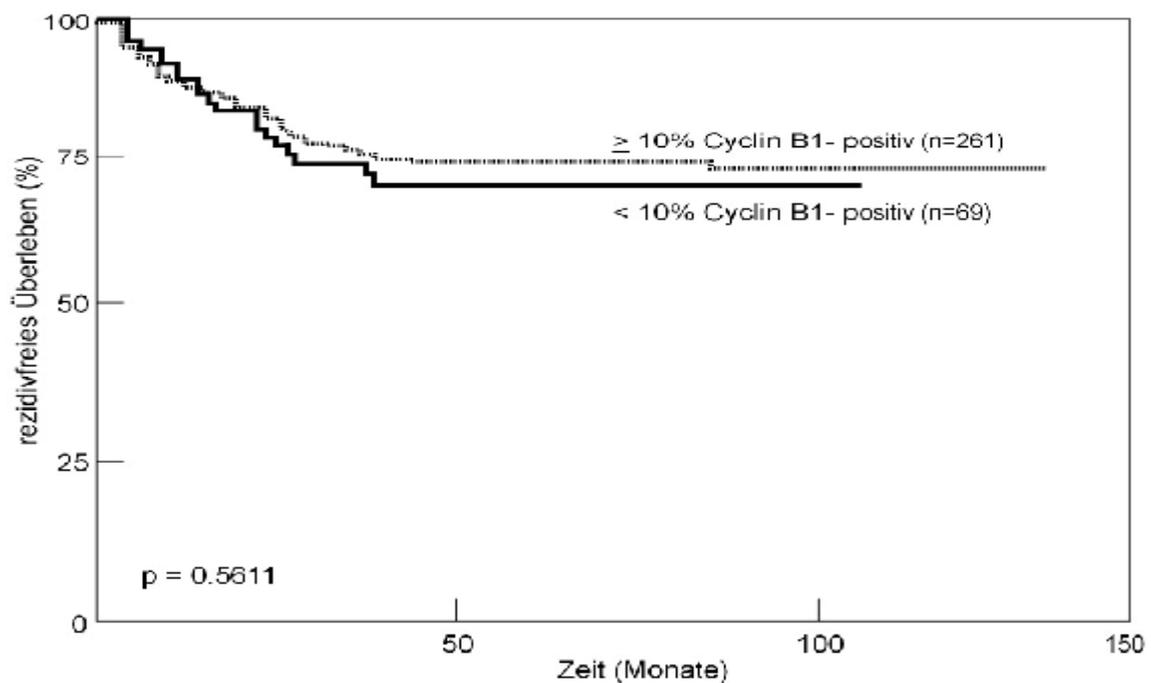


Abb. 16: Rezidivfreies postoperatives Überleben bei 330 Patienten mit kolorektalen Karzinomen mit mehr als 10% Cyclin B1-positiven Tumorzellen und solchen mit weniger als 10% Cyclin B1-positiven Tumorzellen (log-rank test: $p < 0,5611$).

3.4 Korrelation von p53, pRb, Cyclin A und Cyclin B1 untereinander

Bezüglich einer Korrelation der einzelnen untersuchten Zellzyklusproteine zueinander fand sich eine statistisch hochsignifikante Korrelation zwischen einer deutlichen pRb-Expression und einer starken Cyclin A- und Cyclin B1-Expression einerseits sowie auch zwischen Cyclin A und Cyclin B1 (Tab. 13). Im Gegensatz dazu fand sich zwischen p53 und den übrigen Zellzyklusproteinen keine signifikante Korrelation.

Table 13: Korrelation der untersuchten Zellzyklusproteine

	p53	pRb	Cyclin A	Cyclin B1
p53	-----	0,0938	0,9066	0,6759
pRb	0,0938	-----	0,0002	0,0001
Cyclin A	0,9066	0,0002	-----	0,0001
Cyclin B1	0,6759	0,0001	0,0001	-----

n.s.: nicht signifikant

3.5 Prognostischer Einfluß der Koexpression von p53, pRb, Cyclin A und Cyclin B1

Auch für die Koexpression von p53, pRb sowie Cyclin A und Cyclin B1 ließ sich kein prognostischer Einfluß nachweisen. Dies galt sowohl für die gemeinsame Expression aller vier Zellzyklus-assoziierten Proteine sowie verschiedener Kombinationen der gemeinsamen Expression von p53, pRb, Cyclin A oder Cyclin B1.

3.6 Ergebnisse der multivariaten Analyse

In der abschließenden multivariaten Analyse (schrittweise Cox-Regression) konnte weder für die Proliferationsaktivität noch für eines der anderen untersuchten Zellzyklusproteine ein unabhängiger Einfluß auf die Prognose nachgewiesen werden (Tab. 14).

Für das postoperative Gesamtüberleben der Patienten konnten die Invasionstiefe der Tumoren (pT-Kategorie), der Lymphnotenbefall (pN-Kategorie), ein schlechter Differenzierungsgrad (G3/G4) sowie der Nachweis einer extramuralen (subserösen) Blutgefäßinvasion als unabhängige Prognosefaktoren verifiziert werden.

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens konnten in der multivariaten Analyse sowohl die pT- und pN-Kategorie als auch eine distale Tumorlokalisation (Sigma/Rektum) als unabhängige Prognosefaktoren verifiziert werden.

Tabelle 14: Prognostische Bedeutung der untersuchten Parameter hinsichtlich gesamtem postoperativen und rezidivfreiem Überleben beim kolorektalen Karzinom

Parameter	Gesamtüberleben		Rezidivfreies Überleben	
	univariat	multivariat	univariat	multivariat
pT-Kategorie	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
pN-Kategorie	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
Grading ¹	p<0,0001	p<0,0181	p<0,0043	p<0,0820
BVI ²	p<0,0003	p<0,003	p<0,0147	p<0,0923
LVI	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Lokalisation ³	n.s.	n.s.	p<0,0015	p<0,0005
Alter ⁴	p<0,02	n.s.	n.s.	n.s.
Proliferationsrate	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p53	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
pRb	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cyclin A	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cyclin B1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

¹G3/G4; ²extramural; ³Sigma und Rektum; ⁴≥70 Jahre; n.s.: nicht signifikant;

4 Diskussion

4.1 Tumorzellproliferation

Bei verschiedenen humanen Malignomen, insbesondere dem Mammakarzinom, aber auch bei malignen Weichteiltumoren konnte gezeigt werden, daß die Proliferationsrate der Tumoren Rückschlüsse auf den Verlauf und die Prognose dieser Tumorerkrankungen zuläßt (s. Kapitel 1.2.2). Neben dem Auszählen von Mitosen wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Auswertung der Proliferationsrate beschrieben, von denen der immunhistochemische Nachweis von Proliferationsmarkern für eine Routineauswertung derzeit die einfachste Methode darstellt. Mit dem monoklonalen Antikörper Ki-67 liegt ein äußerst zuverlässiger Marker der Proliferationsaktivität vor, der jedoch lediglich eine Anwendung an Gefrierschnitten erlaubt (Brown und Gatter, 1990). Dieser Nachteil konnte durch den monoklonalen Antikörper MIB-1 überwunden werden, der das Ki-67-Antigen auch am formalinfixierten und paraffineingebetteten Material erkennt. Damit ist es möglich, die Wachstumsfraktion von malignen Tumoren an großen, retrospektiven Tumorserien mit Routinemethoden relativ einfach zu untersuchen und das Verhältnis der Tumorzellproliferation mit verschiedenen histopathologischen Parametern und der Prognose der Patienten zu korrelieren. Allerdings gibt es nach wie vor eine Vielzahl von Einflußgrößen, die den Nutzen eines immunhistochemischen Nachweises der Tumorzellproliferation als Prognoseparameter zumindest einschränken können. So sind die meisten Tumoren bekanntermaßen aus heterogenen Zellpopulationen aufgebaut, die zu einer nicht unbedeutenden intra- und intertumoralen Heterogenität unter anderem auch der Tumorzellproliferation führen können (Kerns et al., 1994; Thomas et al., 1995; Hemming et al. 1992, Mori et al., 1993). Auch in der vorliegenden Arbeit an 342 kolorektalen Karzinomen ließ sich eine eindrucksvolle intertumoralen Heterogenität mit einer Spannweite von 7% bis zu max. 96% proliferierender Tumorzellen nachweisen. Darüber hinaus fand sich auch eine deutliche intratumorale Heterogenität mit einer mittleren Proliferationsaktivität von 49%. Diese Heterogenität könnte einerseits tatsächlich in klonalen Subpopulationen von Tumorzellen begründet sein, die einen bestimmten Wachstumsvorteil erlangt haben, wie z.B. durch Ausfall bestimmter Tumorsuppressorgene oder einer gestörten Zellzyklus-

regulation. Andererseits kann jedoch aufgrund der vorliegenden immunhistochemischen Ergebnisse, die nur ein statisches Bild der Tumorzellproliferation wiedergeben, nicht ausgeschlossen werden, daß lediglich temporär aktive lokale Faktoren, wie z.B. die Expression von Wachstumsfaktoren die Tumorzellproliferation beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine statistisch signifikante Korrelation der Tumorzellproliferation mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren und dem Lymphknotenbefall. Darüber hinaus fand sich ein Trend für die Invasionstiefe der Tumoren, indem fortgeschrittene Tumoren eine höhere Proliferationsrate aufwiesen. Allerdings konnten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichen. Immunhistochemische Untersuchungen lassen kaum Rückschlüsse auf die Ursache für diesen unterschiedlichen Proliferationsstatus verschiedener histologischer Tumortypen zu, und so läßt sich letztendlich nur spekulieren, warum schlechter differenzierte Tumoren eine höhere Proliferationsrate aufweisen als höher differenzierte Dickdarmkarzinome. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch, daß der immunhistochemische Nachweis proliferierender Tumorzellen keine Aussage über die eigentliche Dauer des Zellzyklus zuläßt. So könnten beispielsweise Tumoren mit einem kurzen Zellzyklus, trotz nur einzelner Tumorzellen in den MIB-1-positiven Zellzyklusphasen, eine hohe Proliferationsrate aufweisen. Im Gegensatz dazu könnten Tumoren mit langem Zellzyklus trotz Nachweis vieler MIB-1-positiver Tumorzellen eine niedrige Proliferationsrate besitzen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel einer starken p53- oder p21-Aktivierung, auch nicht-prolierierende Zellen der G0-Phase eine Ki-67-Expression zeigen können, und so der Anteil proliferierender Zellen fälschlich zu hoch gemessen werden kann (van Oijen et al., 1998).

Bezüglich der übrigen, prognostisch bedeutsamen Parameter, wie Blut- oder Lymphgefäßinvasion und UICC-Stadium konnte keine signifikante Korrelation mit der Tumorzellproliferation nachgewiesen werden. Dies wird auch durch andere Untersuchungen bestätigt (Kyzer und Gordon 1997; Jansson und Sun 1997).

Hinsichtlich einer möglichen Bedeutung der Proliferationsaktivität der Tumorzellen für die Prognose kolorektaler Karzinom konnte in unserer Untersuchung weder für das postoperative Gesamtüberleben noch für das rezidivfreie Überleben ein signifikanter Einfluß nachgewiesen werden. Dies steht zwar in Widerspruch zu einzelnen Arbeiten, die für PCNA univariat einen ungünstigen prognostischen Einfluß einer hohen

Tumorzellproliferation beim Kolonkarzinom aufdecken konnten (Tab. 15). Allerdings schlossen diese Untersuchungen nur geringe Fallzahlen ein und eine multivariate Analyse wurde nicht durchgeführt. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung werden durch weitere Untersuchungen bestätigt, die mit dem MIB-1-Antikörper beim Kolonkarzinom an größeren Tumorserien ebenfalls keinen prognostischen Einfluß der Tumorzellproliferation nachweisen konnten (Tab. 15).

Tabelle 15: Prognostische Bedeutung der Tumorzellproliferation beim Kolonkarzinom

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Al-Sheneber et al., 1993 (PCNA)	40	+	n.u.
Mayer et al., 1993 (PCNA)	82	+	n.u.
Tanaka et al., 1994 (PCNA)	62	–	–
Neoptolemos et al., 1995 (PCNA)	79	–	–
McKay et al., 2002 (PCNA)	244	–	–
Kubota et al., 1992 (Ki-67)	100	–	–
Kyzer et al., 1997 (Ki-67)	30	–	n.u.
Jannsson et al., 1997 (MIB-1)	255	–	–
Handa et al., 1999 (MIB-1)	73	–	n.u.
Gongoll et al., 2002 (MIB-1)	709	–	–
Hoos et al., 2002 (MIB-1)	100	–	n.u.
Allegra et al., 2002 (MIB-1)	465	–	n.u.

n.u.: nicht untersucht

Aus diesem Grund analysierten wir den Einfluß der Tumorzellproliferation auf die Prognose auch selektiv in den Subgruppen früher Tumoren (Stadium pT1 und pT2) im Vergleich zu weit fortgeschrittenen Karzinomen der Stadien pT3 und pT4. Auch hier konnte ein statistisch signifikanter Einfluß der Tumorzellproliferation auf das Überleben der Patienten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich somit festhalten, daß der immunhistochemische Nachweis von MIB-1 eine zuverlässige Methode zur Messung der Tumorzellproliferationsaktivität an formalinfixiertem Gewebe darstellt, wengleich nach unseren Ergebnissen die Höhe der Tumorzellproliferation beim Kolonkarzinom keine prognostische Bedeutung hat, und sich damit Patientensubgruppen mit höherem Risiko für ein Rezidiv nicht abgrenzen lassen.

4.2 Tumorsuppressorgene p53 und pRb

In der vorliegenden Untersuchung konnte bei 67% der Tumoren eine p53-Expression nachgewiesen werden. Dies steht sowohl in Übereinstimmung mit der Mehrzahl anderer Arbeiten zum Kolonkarzinom (Tab. 16) als auch zu Untersuchungen an anderen Tumoren wie dem Mammakarzinom (Allred et al., 1993), dem Bronchialkarzinom (McLaren et al., 1992) und dem Magenkarzinom (Martin et al., 1992; Joypaul et al., 1994; Starzynska et al., 1992). Als verantwortlicher Mechanismus wurden bei diesen Untersuchungen jeweils Mutationen des p53-Gens angesehen nachdem Baas und Mitarbeitern (1994) an kolorektalen Karzinomen eine enge Korrelation zwischen einer immunhistochemisch nachweisbaren p53-Expression und dem Vorliegen von Mutationen des p53-Gen nachweisen konnten. Allerdings kann durch Bindung von Wildtyp-p53-Protein an Virusprodukte oder zelluläre Proteine (z.B. MDM-2) die Halbwertszeit soweit verlängert werden (Chang et al., 1993), daß auch das Wildtyp-Protein prinzipiell durch die kommerziell erhältlichen Antikörper nachgewiesen werden kann (Hall und Lane 1994).

Der in der vorliegenden Untersuchung eingesetzte Antikörper DO-1 erkennt sowohl das Wildtyp-Protein als auch die mutierte Form des p53-Proteins. Da jedoch in normaler Kolonschleimhaut in keinem der Fälle eine Immunoreaktivität für p53 nachweisbar war, kann daraus geschlossen werden, daß der p53-Expression im Tumorgewebe mit hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich Mutationen des p53-Gens zugrunde liegen. Andererseits ließ sich in unserer Untersuchung bei 33% der Kolonkarzinome eine p53-Expression nicht nachweisen. Dies läßt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu. Zum einen könnte es sich hierbei um eine Gruppe mit normalen p53-Allelen handeln oder auch um solche Tumoren, die beide Allele des p53-Gens verloren haben. Schließlich könnte auch ein mutiertes p53-Protein vorliegen, das mit den verwendeten Antikörpern nicht nachgewiesen werden kann.

Hinsichtlich der gleichzeitig erhobenen histopathologischen Parameter konnte keine Korrelation mit der p53-Expression nachgewiesen werden. Vergleichbare Untersuchungen weisen hierzu widersprüchliche Ergebnisse auf, allerdings konnte in der Mehrzahl der in der Literatur bislang vorliegenden Untersuchungen (Tab. 16) ebenfalls

keine Korrelation zwischen p53-Expression und histopathologischen Tumorparametern nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der Prognose ließen sich in den vorliegenden Untersuchungen bereits in der univariaten Analyse keine Unterschiede zwischen Patienten mit p53-positiven und p53-negativen Tumoren nachweisen. Dies steht zwar im Widerspruch zumindest zu einzelnen Arbeiten, die einen negativen, prognostischen Einfluß der p53-Expression beim Kolonkarzinom nachweisen konnten (Tab. 16). Allerdings ist die Situation hier äußerst widersprüchlich. So zeigt die Mehrzahl der Untersuchungen, die an größeren Tumorserien unter Einschluß einer multivariaten Analyse durchgeführt wurden, für p53 beim Kolonkarzinom keine Bedeutung als unabhängiger Prognosefaktor. Wir untersuchten daher einen möglichen prognostischen Effekt der p53-Expression separat an pT1- und pT2-Tumoren im Vergleich zu weit fortgeschrittenen Tumoren der Stadien pT3 und pT4. Auch hier ließ sich ein prognostischer Einfluß jedoch nicht nachweisen. Da insbesondere beim Mammakarzinom Publikationen vorliegen, die einen prognostischen Einfluß bei Lymphknoten-negativen Patienten nachweisen konnten (Allred et al., 1993), untersuchten wir den prognostischen Einfluß auch separat in den Subgruppen der nodal-negativen und der nodal-positiven Kolonkarzinome. Ein prognostischer Einfluß der p53-Expression ließ sich aber auch in diesen Subgruppen nicht nachweisen. Betrachtet man sich die Ergebnisse aus der Literatur, die zum möglichen prognostischen Einfluß der p53-Expression zum Kolonkarzinom vorliegen, so lässt sich feststellen, daß ein prognostischer Einfluß häufiger in Untersuchungen an relativ kleinen Fallzahlen nachgewiesen werden konnte, während Untersuchungen mit multivariater Analyse an größeren Tumorserien in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen keinen prognostischen Einfluß der p53-Expression zeigen konnten (Tab. 16).

Hinsichtlich der pRb-Expression zeigten in der vorliegenden Untersuchung ca. 70% der untersuchten Karzinome eine starke pRb-Expression in mehr als 75% der Tumorzellen während lediglich 12% der Tumoren eine reduzierte pRb-Expression in weniger als 50% der Tumorzellen aufwiesen. Dies wird durch die Untersuchung von Poller und Mitarbeitern (1997) an einer Serie von 255 Dickdarmkarzinomen bestätigt, während in einer kürzlich erschienen Untersuchung an 249 Dickdarmkarzinomen bei rund 60% der Tumoren eine reduzierte pRb-Expression nachgewiesen werden konnte (McKay et al., 2002). Über die Ursachen dieser Diskrepanz läßt sich nur spekulieren, die Verwendung

unterschiedlicher Antikörper für den Nachweis der pRb-Expression könnte hier beispielsweise eine Rolle spielen. Eine Korrelation der pRb-Expression mit histopathologischen Parametern lag in der vorliegenden Untersuchung nicht vor. Dies wird durch die oben genannten Arbeiten bestätigt (Poller et al., 1997; McKay et al., 2002).

Im Gegensatz dazu fand sich eine statistisch hochsignifikante Korrelation der pRb-Expression mit der Proliferationsaktivität der Tumoren, entsprechend der zentralen Rolle des Retinoblastoma-Proteins im Rahmen der Zellzyklus-Regulation.

Ein Einfluß der pRb-Expression auf das postoperative Überleben der Patienten oder auf das rezidivfreie Überleben ließ sich in der vorliegenden Untersuchung weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse nachweisen. Dies steht in Übereinstimmung mit den wenigen bislang vorliegenden Untersuchungen zum kolorektalen Karzinom (Tab. 17).

Tabelle 16: Prognostische Bedeutung der p53-Expression beim Kolonkarzinom

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Bell et al., 1993	100	–	n.u.
Sun et al., 1993	293	+	+
Yamaguchi et al., 1993	202	+	n.u.
Tanaka et al., 1994	62	–	–
Auvinen et al., 1994	144	+	+
Zeng et al., 1994	107	+	+
Grewal et al., 1995	66	–	n.u.
Poller et al., 1997	250	–	n.u.
Kressner et al., 1999	191	–	n.u.
Gallego et al., 2000	126	–	–
Bouzourene et al., 2000	122	+	+
Hoos et al., 2002	100	–	n.u.
Russo et al., 2002	160	+	+
Morgan et al., 2003	171	–	n.u.
Schwandner et al., 2002	160	+	+
McKay et al., 2002	244	–	–
Allegra et al., 2003	706	+	n.u.

n.u.: nicht untersucht

Tabelle 17: Prognostische Bedeutung der pRb-Expression beim Kolonkarzinom

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Poller et al., 1997	250	–	n.u.
Palmqvist et al., 1998	90	–	n.u.
McKay et al., 2002	244	–	–

n.u.: nicht untersucht

Zusammenfassend kommt nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung somit weder dem immunhistochemischen Nachweis der p53- noch der pRb-Expression beim Kolonkarzinom eine Bedeutung als unabhängiger Prognosefaktor zu. Dies gilt sowohl für Patientensubgruppen mit frühen (pT1/pT2) bzw. fortgeschrittenen Tumoren (pT3/pT4) als auch für Patienten mit nodal-positiven und nodal-negativen kolorektalen Karzinomen, und zwar jeweils für das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben.

4.3 Zellzyklusantigene Cyclin A und Cyclin B

In der vorliegenden Arbeit ließ sich bei 68% der 342 untersuchten kolorektalen Karzinome eine vermehrte Expression von Cyclin A und bei 79% eine vermehrte Expression von Cyclin B1 jeweils in mehr als 10% der Tumorzellen nachweisen. Weder für Cyclin A noch für Cyclin B1 fand sich eine Korrelation mit den etablierten Prognoseparametern der pT-Kategorie und pN-Kategorie oder einer Blut- oder Lymphgefäßinvasion. Im Gegensatz dazu war die Cyclin B1- nicht jedoch die Cyclin A-Expression signifikant mit einer erhöhten Tumorzellproliferation korreliert. Dies spiegelt einerseits die fördernde Wirkung der Cycline auf den Zellzyklus wider, kann andererseits jedoch auch als Hinweis auf eine gestörte Regulation des Zellzyklus gewertet werden. Ein Einfluß auf die Prognose konnte, wie auch für die Tumorzellproliferation, für keines der untersuchten Cycline nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse zum kolorektalen Karzinom liegen bislang nur in einer Untersuchung an 73 Tumoren vor, die bei erhöhter Cyclin A-Expression eine ungünstigere Prognose zeigen konnte (Handa et al.,

1999). Dieser Einfluß konnte von den Autoren auch multivariat als unabhängiger Prognosefaktor bestäätigt werden ($p < 0,049$). Als Ursachen für diese Diskrepanz zu den vorliegenden Ergebnissen sind mehrere Faktoren denkbar. Neben der relativ geringen Fallzahl von 73 Tumoren muß auch darauf hingewiesen werden, daß in der Serie von Honda und Mitarbeitern jeweils ein Drittel der Tumoren hochgradig (G1), mittelgradig (G2) und gering (G3) differenziert waren. Dieser ungewöhnlich hohe Anteil von G1-Tumoren läßt vermuten, daß es sich bei den Tumoren der G1- und G2-Gruppe um mäßig und gering differenzierte Adenokarzinome gehandelt hat, während die letzte Gruppe mehr undifferenzierten Karzinomen entsprechen dürfte, so daß insgesamt die beiden Tumorserien nur eingeschränkt vergleichbar wären. Darüber hinaus wurde nicht wie in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der Cyclin A-positiven Tumorzellen gewertet, sondern ein sog. „staining index“, ein Produkt aus Anzahl der positiven Tumorzellen und der Färbeintensität, so daß auch hier Werte nicht direkt vergleichbar sind. Zur statistischen Signifikanz der Arbeit von Handa und Mitarbeitern muß ebenfalls angemerkt werden, daß sowohl in der univariaten Analyse ($p < 0,048$) als auch in der multivariaten Analyse ($p < 0,049$) das Signifikanzniveau nur marginal unterschritten wurde, jeweils mit einem Konfidenzintervall bei 1,01 beginnend, während überraschenderweise die Infiltrationstiefe (pT-Kategorie) keine unabhängige prognostische Bedeutung aufwies. Insgesamt müßte hier aus statistischer Sicht mehr von einem Trend für Cyclin A gesprochen werden, der sich dann allerdings in einer größeren Tumorserie, nämlich der vorliegenden Untersuchung, nicht bestätigen ließ. Hinsichtlich anderer maligner Tumoren wird der prognostische Einfluß der Cyclin A-Expression ähnlich kontrovers diskutiert, und bei den meisten Untersuchungen fehlt eine multivariate Analyse (vgl. Seite 21, Tabelle 4).

Tabelle 18: Prognostische Bedeutung der Cyclin A-Expression beim Kolonkarzinom

Literatur	[n]	Prognostische Bedeutung	
		univariat	multivariat
Handa et al., 1999	73	+	+
n.u.: nicht untersucht			

Ähnlich wie Cyclin A scheint auch der Cyclin B1-cdc2-Komplex eine Schlüsselrolle für die Regulation des G2-M-Phasen-Überganges und den Start der Mitose zu spielen, während seine Deregulation unkontrollierte Proliferation und Verlust der genomischen Integrität bedeuten könnte. Tatsächlich konnte eine Cyclin B1-Überexpression bei einer Reihe maligner Tumoren nachgewiesen und bei Lungen- und Ösophaguskarzinomen mit einer schlechteren Prognose korreliert werden (vgl. Seite 21, Tabelle 5). Die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesene starke Expression von Cyclin B1 bei 79% der Tumoren könnte lediglich die vermehrte Proliferationsaktivität der Tumorzellen reflektieren, allerdings war in den meisten Tumorzellen eine Koexpression von Cyclin B1 und dem Proliferationsmarker MIB-1 nicht nachweisbar, so daß die hohe Cyclin B1-Expression nicht nur als bloße Konsequenz einer verstärkten Proliferation sondern auch als Hinweis auf eine gestörte Zellzyklusregulation am G2-M-Phase-Checkpoint gewertet werden kann. Diese Annahme wird auch Untersuchungen an Brust- und Lungentumoren unterstützt, die nur eine schwache Assoziation zwischen Proliferationsaktivität und Cyclin B1-Expression nachweisen konnten (Dutta et al., 1995; Soria et al., 2000).

Generell muß man jedoch beachten, daß der immunhistochemische Nachweis der Zellzyklusproteine nichts über ihre Funktionsfähigkeit aussagen kann. Darüber hinaus ermöglicht die Immunhistochemie nur eine statische Momentaufnahme des Zellzyklus und seiner Regulation, bei der es sich bekanntermaßen um ein kompliziertes Netzwerk bislang nur lückenhaft aufgedeckter Mechanismen handelt.

In der vorliegenden Untersuchung war die Cyclin B1-Expression vorwiegend im Zytoplasma der Tumorzellen lokalisiert, nur bei einzelnen Tumoren war zusätzlich in einzelnen Tumorzellen auch eine nukleäre Expression nachweisbar. Normalerweise akkumuliert der Cyclin B1-cdc2-Komplex in der späten S-/G2-Phase und muß in den Zellkern transportiert werden, um die Mitose zu initiieren (Pines und Hunter 1991). Allerdings kann der Komplex, beispielsweise als Folge eines DNA-Schadens, im Zytoplasma zurückgehalten und so die Mitose für eine mögliche Reparatur verzögert werden (Smeets et al., 1994; Toyoshima et al., 1998). Andererseits konnte auch gezeigt werden, daß eine solche zytoplasmatische Anhäufung in der Lage ist, den p53-vermittelten G2-M-Checkpoint auszuschalten (Taylor et al., 1999). So könnte also beim Dickdarmkarzinom die zytoplasmatische Überexpression von Cyclin B1 auf eine aberrante Zellzyklusprogression hindeuten mit daraus resultierender genetischer Instabilität und

maligner Transformation. Darüber hinaus scheint die Cyclin B1-Überexpression ein frühes Ereignis in der kolorektalen Karzinogenese darzustellen, da sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit zwischen frühen Tumoren und lokal fortgeschrittenen Karzinomen ergaben. Dies wird auch durch eine Untersuchung an 41 Dickdarmkarzinomen bestätigt (Wang et al., 1997).

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von Cyclin B1 konnten in der vorliegenden Untersuchung keine Unterschiede zwischen Tumoren mit und solchen ohne Cyclin B1-Überexpression nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse zum Dickdarmkarzinom liegen in der Literatur bislang jedoch nicht vor. Allerdings konnte bei Ösophagus- und Lungenkarzinomen ein prognostischer Einfluß nachgewiesen werden, der sich bei Lungentumoren jedoch nur bei Plattenepithelkarzinomen und nicht bei Adenokarzinomen beobachten ließ, was auf mögliche Unterschiede in der Tumorbio­logie bei diesen unterschiedlichen Tumortypen hindeutet (Murakami et al., 1999; Takeno et al., 2002; Soria et al., 2000).

Zusammenfassend läßt sich nach den vorliegenden Ergebnissen festhalten, daß die Cyclin A- und Cyclin B1-Expression beim kolorektalen Karzinom ein häufiges und frühes Ereignis in der Karzinogenese darstellt, ohne jedoch einen Einfluß auf die Tumorprogression zu zeigen. Die immunhistochemischen Ergebnisse an 342 Tumoren weisen einerseits auf eine Störung der Zellzyklusregulation beim Dickdarmkarzinom hin, spiegeln andererseits jedoch auch die Komplexität dieser Regulation wider.

Darüber hinaus hat nach den vorliegenden Ergebnissen beim Dickdarmkarzinom weder die Expression von Cyclin A noch von Cyclin B1, alleine oder in Kombination mit den Zellzyklusproteinen p53 und pRb oder der Proliferationsaktivität der Tumoren, eine Bedeutung für das postoperative Überleben oder die Häufigkeit von Tumorrezidiven.

5 Zusammenfassung

Die Beurteilung der Prognose von Kolonkarzinompatienten erfolgt heute allgemein anerkannt auf der Basis des TNM-Systems unter Einbeziehung des R-Status. Allerdings hat nicht jeder Patient eines bestimmten Tumorstadiums tatsächlich auch die gleiche Chance zu überleben. Dies hat zu einer Vielzahl von Ansätzen geführt, zusätzliche Prognosefaktoren zu etablieren, jeweils mit dem Ziel, sowohl eine zunehmend präzisere und individuellere Prognoseabschätzung zu erreichen als auch Hochrisikopatienten zu identifizieren, die von neuen adjuvanten Therapieansätzen profitieren könnten.

Wesentliches Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher an einer Serie von 342 kurativ resezierten kolorektalen Karzinomen verschiedene histologische und molekulare Parameter hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung zu untersuchen und in einer multivariaten Analyse mit den etablierten Prognoseparametern des TNM-Systems unter Einschluß einer Blut- und Lymphgefäßinvasion zu vergleichen.

Beginnend mit der Proliferationsaktivität ließ sich zunächst zeigen, daß zwischen den einzelnen Tumoren eine erhebliche intertumorale Heterogenität bestand mit einem mittleren Proliferationsindex von 48% (range: 7-96%). Ein Einfluß auf die Prognose ließ sich nicht nachweisen. Dies galt auch bei Berücksichtigung verschiedener „cut-points“, ebenso wie bei separater Analyse unterschiedlicher Patientensubgruppen gemäß der Invasionstiefe (pT1/pT2 versus pT3/pT4) und des Lymphknotenbefalls (pN0 versus pN1/pN2) der Tumoren.

Hinsichtlich der untersuchten Zellzyklus-assoziierten Proteine konnte in der vorliegenden Untersuchung eine p53-Expression in 67% aller Tumoren ebenfalls mit deutlicher intra- und intertumorale Heterogenität (range: 1-99%) nachgewiesen werden. Ein pRb-Expression fand sich bei allen 342 untersuchten Tumoren, insgesamt zeigten hier 88,3% der Karzinome eine starke pRb-Expression in mehr als 50% der Tumorzellen. Darüber hinaus war auch sowohl eine Cyclin A- als auch eine Cyclin B1-Expression bei allen untersuchten Tumoren nachweisbar. Bei 68% der Tumoren konnte eine starke Cyclin A-Expression in mehr als 10% der Tumorzellen nachgewiesen werden und bei 79% der Tumoren fand sich eine starke Cyclin B1-Expression in mehr als 10% der Tumorzellen.

Eine Korrelation mit den übrigen histopathologischen Parametern ließ sich jeweils für keines der untersuchten Zellzyklusproteine zeigen.

Die univariate Analyse ergab für alle untersuchten Zellzyklusproteine weder einen prognostischen Einfluß auf das gesamte postoperative noch auf das rezidivfreie Überleben. Dies galt auch bei separater Analyse verschiedener cut-points der Proteinexpression sowie bei Vergleich der Subgruppen gemäß der pT- und pN-Kategorien.

In der abschließenden multivariaten Analyse konnte weder für die Proliferationsaktivität noch für eines der anderen untersuchten Zellzyklusproteine ein unabhängiger Einfluß auf die Prognose nachgewiesen werden.

Für das postoperative Gesamtüberleben der Patienten konnten die Invasionstiefe der Tumoren (pT-Kategorie), der Lymphnotenbefall (pN-Kategorie), ein geringer Differenzierungsgrad (G3/G4) sowie der Nachweis einer extramuralen (subserösen) Blutgefäßinvasion als unabhängige Prognosefaktoren verifiziert werden.

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens konnten in der multivariaten Analyse sowohl die pT- und pN-Kategorie als auch eine distale Tumorlokalisation (Sigma/Rektum) als unabhängige Prognosefaktoren verifiziert werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Cyclin A- und Cyclin B1-Expression beim kolorektalen Karzinom ein häufiges und frühes Ereignis in der Karzinogenese darstellt, ohne jedoch einen Einfluß auf die Tumorprogression zu zeigen. Die vorliegenden immunhistochemischen Ergebnisse an 342 Tumoren weisen einerseits auf eine Störung der Zellzyklusregulation beim Dickdarmkarzinom hin, spiegeln andererseits jedoch auch die Komplexität dieser Regulation wider.

Darüber hinaus hat nach den vorliegenden Ergebnissen beim Dickdarmkarzinom weder die Expression von Cyclin A noch von Cyclin B1, alleine oder in Kombination mit den Zellzyklusproteinen p53 und pRb oder der Proliferationsaktivität der Tumoren, eine Bedeutung für das postoperative Überleben oder die Häufigkeit von Tumorrezidiven.

6 Literaturverzeichnis

- Aaltomaa S., Lipponen P., Syrjanen K. (1993). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in axillary lymph node negative breast cancer. *Anticancer Res.*, 13: 533-538.
- Allred D.C., Clark G.M., Elledge R., Fuqua S.A.W., Brown R.W., Chamness G.C. (1993). Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 200-206.
- Al-Sheneber I.F., Shibata H.R., Sampalis J., Jothy S. (1993). Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer*, 71: 1954-1959.
- Baas J.O., Mulder J.W.R., Offerhaus J.A., Vogelstein B., Hamilton S.R. (1994). An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J. Pathol.*, 172: 5-12.
- Barak Y., Juven T., Haffner R., Oren M. (1993). MDM-2-expression is induced by wild type p53 activity, *EMBO J.*, 12: 461-468.
- Barber H.R.K., Sommers S.C., Rotterdam H., Kwon T. (1978). Vascular invasion as a prognostic factor in stage IB cancer of the cervix. *Obstetr. Gynecol.*, 52: 343-348.
- Bates S., Peters G. (1995). Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene. *Cancer Biol.*, 6: 73-82.
- Bell S.M., Scott N., Cross D., Sagar P., Lewis F.A., Blair G.E. (1993). Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterol*, 104: 57-64.
- Berns E.M., de Klein A., van Putten W.L., van Staveren I.L., Bootsma A., Klijn J.G., Foekens J.A. (1995). Association between RB-1 gene alterations and factors of favourable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. *Int. J. Cancer*, 64: 140-145.
- Bernstein C.N., Blanchard J.F., Kliwer E., Wajda A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 91: 854-862.
- Bhatavdekar J.M., Patel D.D., Karelia N.H., Vora H.H., Ghosh N., Shah N.G., Balar D.B., Trivedi S.N. (1994). Tumor markers in patients with advanced breast cancer as prognosticators: preliminary study. *Breast Cancer Res Treat.*, 30(3): 293-7.
- Bhatavdekar J.M., Patel D.D., Thosh N., Chikhlikar P.R., Trivedi T.I., Suthar T.P., Doctor S.S. Shah N.G., Balar D.B. (1997). Coexpression of bcl-2, c-Myc and p53 oncoproteins as prognostic discriminants in patients with colorectal carcinoma. *Dis. Colon Rectum*, 40: 785-90.

- Bianchi S., Paglierani M., Zampi G., Cardona G., Cataliotti L., Bonardi R., Zappa M., Ciatto S. (1993). Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in lymph node-negative breast cancer patients. *Cancer*, 72: 120-5.
- Brambilla E., Moro D., Gazzeri S., Brambilla C. (1999). Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J. Pathol.*, 188: 351-360.
- Bravo R. (1986). Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp. Cell Res.*, 163: 287-293.
- Brien T.P., Depowski P.L., Sheehan C.E., Ross J.S., McKenna B.J. (1998). Prognostic factors in gastric cancer. *Mod. Pathol.*, 11: 870-877.
- Brown D.C., Gatter K.C. (1990). Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 17: 489-503.
- Bubendorf L., Sauter G., Moch H., Schmid H.-P., Gasser T.C., Jordan P., Mihatsch M.J. (1996). Ki-67 labelling index: An independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J. Pathol.*, 178: 437-41.
- Buchkovich K., Duffy L.A., Harlow E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58: 1097-1105
- Bukholm I.R., Bukholm G., Nesland J.M. (2001). Overexpression of cyclin A is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, 93: 283-287.
- Burt R.W. (1996). Familial risk and cancer. *Int. J. Cancer*, 69: 44-46.
- Cance W.G., Brennan M.R., Dudas M.E., Huang C.M., Cordon-Cardo C. (1990). Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N. Engl. J. Med.*, 323: 1457-1462.
- Cattoretti G., Becker M.H.G., Key G., Duchrow M., Schlüter 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.
- Chang F., Syrjänen S., Kurvinen K., Syrjänen K. (1993). The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am. J. Gastroenterology*, 88:174-186.
- Chapuis P.H., Dent O.F., Fisher R., Newland R.C., Pheils M.T., Smyth E. (1985). A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br. J. Surg.*, 72: 698-702.

- Chellappan S.P., Hiebert S., Mudryj M., Horowitz J.M., Nevins J.R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65: 1053-1061.
- Chen P.L., Scully P., Shew J.-Y., Wang J.Y., Lee W.H. (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*, 58: 1193-1198.
- Chen J.T., Chen Y.C., Chen C.Y., Wang Y.C. (2001). Loss of p16 and/or pRb protein expression in NSCLC. An immunohistochemical and prognostic study. *Lung Cancer*, 31: 163-70.
- Clark A.R., Purdie C.A., Harrison D.J. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362: 849-852.
- Coggi G., Bosari S., Roncalli M., Graziani D., Bossi P., Viale G., Buffa R., Gerrero S., Piazza M., Blandamura S., Segalin A., Bonavina L., Peracchia A. (1997). p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. *Cancer*, 79: 425-32.
- Cohen A.M., Minsky B.D., Schilsky R.L. Colon Cancer. In: DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A.: Principles and practice of oncology. 4. Auflage, Lippincott, 1993: 929-977.
- Cordon-Cardo C., Waringer D., Petrylak D., Dalbagni G., Fair W.R., Fuks Z., Reuter V.E. (1992). Altered expression the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84: 1256-1261.
- Cordon-Cardo C. (1995). Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am. J. Pathol.*, 147: 545-560.
- Cummings M.C., Furnival C.M., Parsons P.G., Townsend E. (1993). PCNA immunostaining in breast cancer. *Aust. N. Z. J. Surg.*, 63: 630-636.
- Deans G.T., Patterson C.C., Parks G.T., Spence R.A., Heatley M., Moorehead R.J. (1994). Colorectal carcinoma: importance of clinical and pathological factors in survival. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 76: 59-64.
- DeCaprio J.A., Ludlow J.W., Lynch D., Furukawa Y., Griffin J., Piwnica-Worms H., Huang C.M., Livingston D.M. (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell*, 58: 1085-1095.
- DeFeo-Jones D., Huang P.S., Jones R.E., Haskell K.M., Vuocolo G.A., Hanobik M.G., Huber H.E., Oliff A. (1991). Cloning for cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 352: 251-254.
- De Souza C.P., Ellem K.A., Gabrielli B.G. (2000). Centrosomal and cytoplasmic cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Exp. Cell Res.*, 257: 11-21.

- Dobashi Y., Jiang S.X., Shoji M., Morinaga S., Kameya T. (2003). Diversity in expression and prognostic significance of G1/S cyclins in human primary lung carcinomas. *J. Pathol.*, 199: 208-220.
- Dou Q-P., Pardee A.B., Keomarsi K., Steeg P. (1996). Cyclin E- a better prognostic marker for breast cancer than cyclin D1? *Nature Med.*, 2: 254.
- Dunphy W., Kumagai A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, 67: 189-196.
- Dutta A., Chandra R., Leiter L.M., Lester S. (1995). Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 5386-5390.
- Ebina M., Steinberg S.M., Mulshine J.L., Linnoila R.I. (1994). Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 54: 2496-2503.
- Fearon E.R., Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-67.
- Friend S.H., Horowitz J.M., Gerber M.R., Wang X.F., Bogenmann E., Li F.P., Weinberg R.A. (1987). Deletions of DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of sequence and its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9059-9063.
- Fujii M., Motoi M., Saeki H., Aoe K., Moriwaki S. (1993). Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-small cell lung cancer. *Acta Med. Okayama*, 47: 103-108.
- Fung Y.-K., Murphree A.L., Tang A., Qian J., Hinrichs S.H., Benedict W.F. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. (1987). *Science*, 236: 1657-1661.
- Furuhata M., Ishikawa T., Inoue A., Yoshikawa C., Sonobe H., Ohtsuki Y., Araki K., Ogoshi S. (1996). Determination of the prognostic significance of unscheduled cyclin A overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2: 1781-1785.
- Gabbert H.E., Wagner R., Höhn P. (1982). The relation between tumor cell proliferation and vascularization in differentiated and undifferentiated colon carcinomas in the rat. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, 41: 119-131.
- Gabbert H.E., Meier S., Gerharz C.D., Hommel G. (1991). Incidence and prognostic significance of vascular invasion in 529 gastric cancer patients. *Int. J. Cancer*, 49: 203-207.

Gabbert H.E., Müller W., Schneiders A., Meier S., Hommel G. (1995). The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer*, 76: 720-726.

Gasparini G., Meli S., Pozza F., Cazzavillan S., Bevilacqua P. (1992b). Pc-10 antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is not related to prognosis in human breast carcinoma. *Growth Regul.*, 4: 145-150.

Gautier J., Solomon M.J., Booher R.N., Bazan J.F., Kirschner M.W. (1991). Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*, 67: 197-211.

Gerdes J., Schwab U., Lemke H., 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.

Gillett C., Fantl V., Fisher C. et al. (1994). Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res.*, 54: 1812-1817.

Girard F., Strausfeld U., Fernandez A., Lamb N.J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67: 1169-1179.

Gretarsdottir S., Tryggvadottir L., Jonasson J.G., Sigurdsson H., Olafsdottir K., Agnarsson B.A. Ögmundsdottir H., Eyfjörd J.E. (1996). tp53 mutation analyses on breast carcinomas: a study of paraffin-embedded archival material. *Br. J. Cancer*, 74: 555-561.

Grewal H., Guillem J.G., Klimstra D.S., Cohen A.M. (1995). p53 nuclear overexpression may not be an independent prognostic marker in early colorectal cancer. *Dis. Col. Rect.*, 38: 1176-81.

Guner D., Sturm I., Hemmati P., Hermann S., Hauptmann S., Wurm R., Budach V., Dorken B., Lorenz M., Daniel PT. (2003). Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int. J. Cancer*, 103: 445-454.

Haerslev T., Jacobsen G.K. (1994). Proliferating cell nuclear antigen in breast carcinomas. An immunohistochemical study with correlation to histopathological features and prognostic factors. *Virchows Archiv*, 424: 39-46.

Haerslev, T., Krag Jacobsen G. (1995). An immunohistochemical study of p53 with correlations to histopathological parameters, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen and prognosis. *Hum. Pathol.*, 26: 295-301.

Hall P.A., Lane D.P. (1994). p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *J. Pathol.*, 172: 1-4.

Hamazaki M., Noguchi A., Furutani S., Motoyama Y., Nakamura N. (1974). A study on vascular invasion in advanced gastric carcinoma. *Jap. J. Cancer Clin.*, 20: 311-316.

Hamilton S.R., Aaltonen L.A. (2000). Tumours of the colon and rectum. In: WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press, S. 103-119.

Han S., Yun I.J., Noh D.Y., Choe K.J., Song S.Y., Chi J.G. (1997). Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2 and cathepsin D protein. *J. Surg. Oncol.*, 65: 22-27.

Hanson M.B., van Nagell J.R., Powell D.E., Donaldson E.S., Gallion H., Merhige M., Pawlik E.J. (1985). The prognostic significance of lymph-vascular space invasion in stage-I endometrial cancer. *Cancer*, 55: 1753-1757.

Harper M.E., Glynne-Jones E., Goddard L., Wilson D.W., Matenhelia S.S., Conn I.G., Peeling W.B., Griffiths K. (1992). Relationship of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in prostatic carcinomas to various clinical parameters. *Prostate*, 20: 243-253.

Harris C., Hollstein M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl. J. Med.*, 18: 1318-1327.

Hartwell L. (1992). Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 71: 543-46.

Hemming A.W., Davis N.L., Klufftinger A., Robinson B., Quenville N.F., 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.

Henriksen R., Strang P., Backstrom T., Wilander E., Tribukait B., Oberg K. (1994). Ki-67 immunostaining and DNA flow cytometry as prognostic factors in epithelial ovarian cancers. *Anticancer Res.*, 14: 603-608.

Herod J.J.O., Eliopoulos A.G., Warwick J., Niedobitek G., Young L.S., Kerr D.J. (1996). The prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, 56: 2178-2184.

Hirabayashi H., Ohta M., Tanaka H., Sakaguchi M., Fujii Y., Miyoshi S., Matsuda H. (2002). Prognostic significance of p27KIP1 expression in resected non-small cell lung cancers: analysis in combination with expressions of p16INK4A, pRB, and p53. *J. Surg. Oncol.*, 81: 177-184.

Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. (1991). p53 mutations in human cancer. *Science*, 253: 49-53.

Horio Y., Takahashi T., Kuroishi T., Hibi K., Suyama M., Niimi T., Shimokata K., Yamakawa K., Nakamura Y., Ueda R. (1993). Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 53: 1-4.

Hunt T. (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complex reality. *Semin. Cell Biol.*, 2: 213-222.

Ichiyoshi Y., Oiwa H., Tomisaki S., Sakaguchi Y., Ohno S., Maehara Y., Sugimachi K. (1997). Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer. *Hepato-Gastroenterology*, 44: 546-553.

Ikeguchi M., Oka S., Gomyo Y., Tsujitani S., Maeta M., Kaibara N. (2000). Clinical significance of retinoblastoma protein (pRB) expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Surg. Oncol.*, 73: 104-108.

Inoue M., Okayama A., Fujita M., Enomoto T., Sakata M., Tanizawa O., Ueshima H. (1994). Clinicopathological characteristics of p53 overexpression in endometrial cancers. *Int. J. Cancer*, 50: 14-19.

International Union Against Cancer. TNM Classification of malignant tumours. Sobin LH, Wittekind Ch (Eds.). 5th ed., Wiley-Liss, New York, 66-69, 1997.

Isola J., Kallioniemi O.P., Korte J.M., Wahlstrom T., Aine R., Hell M., Helin H. (1990). Steroid receptors and Ki-67 reactivity in ovarian cancer and in normal ovary: correlation with DNA flow cytometry, biochemical receptor assay, and patient survival. *J. Pathol.*, 162: 295-301.

Ito K., Watanabe K., Nasim S., Sasano H., Sato S., Yajima A., Silverberg S.G., Garrett C.T. (1994). Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res.*, 54: 4667-4670.

Jain S., Filipe M.I., Hall P.A., Waseem N., Lane D.P., Levison D.A. (1991). Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 44: 655-659.

Jansson A., Sun X.-F. (1997). Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *APMIS*, 105: 730-34.

Jochum W., Schröder S., Al-Taha R., August Ch., Gross A.J., Berger J., Padberg B.-C. (1996). Prognostic significance of nuclear DNA content and proliferative activity in renal cell carcinomas. A clinicopathologic study of 58 patients using mitotic count, Mib-1 Staining and DNA cytophotometry. *Cancer* 77: 514-21.

Johnson D.J., Schwarz J.K., Cress W.D., Nevins J.R.. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, 365: 349-352.

Jordan P.A., Kerns B.J., Pence J.C., Kohler M.F., Bast R.C. Jr., Kinney R.B., Berchuck A. (1993). Determination of proliferation index in advanced ovarian cancer using quantitative image analysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 99: 736-740.

Joympaul B.V., Hopwood D., Newman E.L., Qureshi S., Grant A., Ogston S.A. (1994). The prognostic significance of the accumulation of p53 tumor suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*, 69: 943-946.

Takeji Y., Korenaga D., Tsujitani S., Haraguchi M., Maehara Y., Sugimachi K. (1991). Predictive value of Ki-67 and argyrophilic nucleolar organizer region staining for lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Res.*, 51: 3503-3506.

Kawamoto H., Koizumi H., Uchikoshi T. (1997). Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in non-malignant and malignant breast lesions. *Am. J. Pathol.*, 150: 15-23.

Kalbfleisch J.D., Prentice R.L. (1980). *The statistical analysis of failure data*. Wiley, New York.

Kaplan E.L., Meier P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.*, 53: 457-481.

Karlen P., Lofberg R., Brostrom O., Leijonmarck C.E., Hellers G., Persson P.G. (1999). Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am. J. Gastroenterol.*, 94: 1047-1052.

Kerns B.M., Jordan P.A., Faerman L.L., Berchuck A., Bast R.C., Layfield L.J. (1994). Determination of proliferation index with MIB-1 in advanced ovarian cancer using quantitative image analysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 101: 192-197.

Key G., Becker M.H.G., Duchrow M., Schlüter C., Gerdes J. (1992). New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) prepared against recombinant parts of the Ki-67 antigen. *Anal. Cell. Pathol.*, 4: 181-188.

Keyomarsi K., O'Leary N., Molnar G., Lees E., Fingert H.J., Pardee A.B. (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res.*, 54: 380-385.

Keyomarsi K., Conte D., Toyofuku W., Fox P. (1995). Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene*, 11: 941-950.

Khalifa M.A., Mannel R.S., Haraway S.D., Walker J., Min K.W. (1994). Expression of EGFR, HER-2/neu, p53 and PCNA in endometrioid, serous papillary and clear cell endometrial adenocarcinomas. *Gynecol. Oncol.*, 53: 84-92.

- Kornblau S.M., Xu H.-J., del Giglio A., Hu S.-X., Zhang W., Calvert L., Beran M., Estey E., Andreeff M., Trujillo J., Cork M.A., Smith T.L. Benedict W.F., Deisseroth A.B. (1992). Clinical implications of decreased retinoblastoma protein expression in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.*, 52: 4587-4590.
- Korenaga D., Ueo H., Mochida K., Kusumoto T., Baba H., Tamura S., Moriguchi S., Sugimachi K. (1991). Prognostic factors in Japanese patients with colorectal cancer: The significance of large bowel obstruction. Univariate and multivariate analyses. *J. Surg. Oncol.*, 47: 188-192.
- Kubota Y., Petras R.E., Easley K.A., Bauer T.W., Tubbs R.R., Fazio V.W. (1992). Ki-67-determined growth fraction versus standard and grading parameters in colorectal carcinoma. *Cancer*, 70: 2602-2609.
- Kuhling H, Alm P, Olsson H, Ferno M, Baldetorp B, Parwaresch R, Rudolph P. (2003). Expression of cyclins E, A, and B, and prognosis in lymph node-negative breast cancer. *J. Pathol.*, 199: 424-431.
- Kushner J., Bradley G., Young B., Jordan R.C.K. (1999). Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma. *J. Oral. Pathol. Med.*, 28: 77-81.
- Kyzer S., Gordon P.H. (1997). Determination of proliferative activity in colorectal carcinomas using monoclonal antibody Ki67. *Dis. Colon Rectum*, 40: 322-325.
- Lane D.P. (1993). A death in the life of p53. *Nature*, 362: 786-787.
- Lee A.K.C., DeLellis R.A., Silverman M.L., Wolfe H.J. (1990). Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast. *J. Clin. Oncol.*, 8: 1457-1465.
- Lee J.M., Bernstein A. (1993). p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5742-5746.
- Lee W.-H., Shew J.-Y., Hong F.D., Sery T.W., Donoso L.A., Young L.J., Bookstein R., Lee E.Y. (1987). The retinoblastoma protein encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*, 329: 642-645.
- Le Marchand L., Wilkens L. R., Kolonel L. N., Hankin J.H., Lyu L.C. (1997). Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.*, 57: 4787-4794.
- Lewin B. (1990). Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell*, 61: 743-752.
- Levine A.J. Momand J., Finlay C.A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351: 453-456.

- Levine A.J. (1994). The road to the discovery of the p53-protein. *Int. J. Cancer*, 56: 775-776.
- Li J., Meyer A.N., Donoghue D.J. (1997). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 502-507.
- Lim B.H.G., Soong R., Grieu F., Robbins P.D., House A.K., Iacopetta B.J. (1996). p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 69: 200-204.
- Lipponen P.K., Eskelinen M.J. (1992). Cell proliferation of transitional cell bladder tumours determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br. J. Cancer*, 66: 171-176.
- Lipponen P.K., Ji H., Aaltomaa S., Syrjanen S., Syrjanen K. (1993). p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int. J. Cancer*, 55: 51-6.
- Lipponen P.K. (1993). Overexpression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int. J. Cancer*, 53: 365-70.
- Logothetis C.J., Xu H.-J., Ro J.Y., Hu S.X., Sahin A., Ordonez N., Benedict W.F. (1992). Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84: 1256-1261.
- Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A., Jacks T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362:847-849.
- Lukas J., Bartkova J., Rohde M., Strauss M., Bartek J. (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 2600-2611.
- Lundgren K., Walworth N., Booher R., Dembski M., Kirschner M.W., Beach D. (1991). Mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, 64: 1111-1122
- Lynch H.T., de la Chapelle A. (1999). Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J. Med. Genet.*, 36: 801-818.
- Macdonald-Bravo H., Bravo R. (1985). Induction of the nuclear protein cyclin in serum-stimulated quiescent 3T3 cells is independent of DNA synthesis. *Exp. Cell Res.*, 156: 455.
- Maeda K., Chung Y.S., Takatsuka S., Ogawa Y., Onoda N., Sawada T., Nitta A., Arimoto Y., Kondo Y., Sowa M. (1995). Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer*, 72: 319-323.

Martin H.M., Filipe M.I., Morris R.W., Lane D.P., Silvestre F. (1992). p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, 50: 859-862.

Mashal R.D., Lester S., Corless C., Richie J.P., Chandra R., Propert K.J., Dutta A. (1996). Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer. *Cancer Res.*, 56: 4159-4163.

Mayer A., Takimoto M., Fritz E., Schellander G., Kofler K., Ludwig H. (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer*, 71: 2454-2460.

Mazzei T., Tonelli F., Mini E., Mazzoni P., Pesciullesi A., Valanzano R., Ficari F., Biondi C., Periti P. (1995). Flow cytometric analysis of DNA ploidy and cell proliferation activity in colorectal carcinoma. *Anticancer Res.*, 15: 2247-53.

McKay J.A., Douglas J.J., Ross V.G., Curran S., Loane J.F., Ahmed F.Y., Cassidy J., McLeod H.L., Murray G.I. (2002). Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. *J. Pathol.*, 196: 386-393.

McLaren R., Kuzu I., Dunhill M., Harris A., Lane D., Garter K.C. (1992). The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br. J. Cancer*, 66: 735-738.

Michalides R., Hageman P., van Tinteren H. et al. (1996). A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br. J. Cancer*, 73: 728-734.

Michalides R., van Tinteren H., Balkenende A., Vermorken J.B., Benraadt J., Huldij J., van Diest P. (2002). Cyclin A is a prognostic indicator in early stage breast cancer with and without tamoxifen treatment. *Br. J. Cancer*, 86: 402-408.

Michels J.J., Duigou F., Marnay J., Henry-Amar M., Delozier T., Denoux Y., Chasle J. (2003). Flow cytometry and quantitative immunohistochemical study of cell cycle regulation proteins in invasive breast carcinoma: prognostic significance. *Cancer*, 97: 1376-1786.

Milner J., Medcalf E.A. (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild type p53 protein into the mutant conformation. *Cell*, 65: 765-74.

Minsky B.D., Mies C., Recht A., Rich T.A., Chaffey J.T. (1988). Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. II. The influence of blood vessel invasion. *Cancer*, 61: 1417-1424.

Mörschel M., Heintz A., Dutkowski Ph., Böttger T., Jungiger Th. (1997). Der Einfluß der Zahl der dissezierten Lymphknoten auf die Lokalrezidivrate rectaler Carcinome. *Chirurg*, 68: 1023-1028.

Momand J., Zambetti G.P. (1997). Mdm-2: „Big brother“ of p53. *J. Cell. Biochem.*, 64: 343-352.

Monnet E., Faivre J., Raymond L., Garau I. (1999). Influence of stage at diagnosis on survival differences for rectal cancer in three european populations. *Br. J. Cancer*, 81: 463-468.

Morgan D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374: 131-134.

Mori M., Kakeji Y., Adachi Y., Moriguchi S., Maehara Y., Sugimachi K., Jessup J.M., Chen L.B., Steele G.D. Jr. (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen in clinical gastric cancer. *Surgery*, 113: 683-690.

Morkve O., Halvorsen O.J., Skjaerven R., Stangeland L., Gulsvik A., Laerum O.D. (1993). Prognostic significance of p53 protein expression and DNA ploidy in surgically treated non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res.*, 13: 571-8.

Mulder A.H., van Hootegem J.C., Sylvester R., ten Kate F.J., Kurth K.H., Ooms E.C., van der Kwast T.H. (1992). Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen (Ki-67). *J. Pathol.*, 166: 37-43.

Murakami H., Furihata M., Ohtsuki Y., Ogoshi S. (1999). Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.*, 434: 153-158.

Müller W., Schneiders A., Meier S., Hommel G., Gabbert H.E. (1996). Immunohistochemical study on the prognostic value of MIB-1 in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer*, 74: 759-765.

Müller W., Wirtz H.-C., Hommel G., Gabbert H.E. (1999). Expression of cell cycle regulatory proteins cyclin D1, cyclin E and their inhibitor p21^{WAF1/CIP1} in gastric cancer. *J. Pathol.* 189: 186-193.

Müller-Tidow C, Metzger R, Kugler K, Diederichs S, Idos G, Thomas M, Dockhorn-Dworniczak B, Schneider PM, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H. (2001). Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 61: 647-653.

Murakami H., Furihata M., Ohtsuki Y., Ogoshi S. (1999). Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.*, 434: 153-158.

Nagao K., Matsuzaki O., Shigematsu H., Ide G., Onoda S., Sato S., Morohashi Y., Yoshizawa H. (1975). A clinicopathological study on anaplastic gastric carcinomas with special reference to vascular changes. *Jap. J. Cancer Clin.*, 21: 1254-1265.

- Nakamura K., Ueyama T., Yao T., Xin Xuan Z., Ambe K., Adachi Y., Yakeishi Y., Matsukuma A., Enjoji M. (1992). Pathology and prognosis of gastric carcinoma. *Cancer*, 70: 1030-1037.
- Neoptolemos J.P., Oates G.D., Newbold K.M., Robson A.M., McConkey C., Powell J. (1995). Cyclin/proliferation cell nuclear antigen immunohistochemistry does not improve the prognostic power of Dukes' or Jass' classifications for colorectal cancer. *Br. J. Surg.*, 82: 184-87.
- Newland R.C., Dent O.F., Lyttle M.N., Chapuis P.H., Bokey E.L. (1994). Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer*, 73: 2076-2082.
- Nita M.E., Nagawa H., Tominaga O., Tsuno N., Hatano K., Kitayama J., Tsuruo T., Domene C.E., Muto T. (1999). p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb. *Ann. Surg. Oncol.*, 6: 481-488.
- Noguchi Y. (1990). Blood-vessel invasion in gastric carcinoma. *Surgery*, 107: 140-148.
- Nozoe T., Korenaga D., Kabashima A., Ohga T., Saeki H., Sugimachi K. (2002). Significance of cyclin B1 expression as an independent prognostic indicator of patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin. Cancer Res.*, 8: 817-822.
- Nurse P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature (Lond.)*, 344: 503-508.
- Oijen M.G.C.T., Medema R.H., Slootweg P.J., Rijksen G. (1998). Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am. J. Clin. Pathol.*, 110: 24-31.
- Orr-Weaver, T.L., Weinberg R.A. (1998). A checkpoint on the road to cancer. *Nature*, 391: 223-224.
- Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W., Draetta G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.*, 11: 961-971.
- Palmquist R., Stenling R., Oberg A., Landberg G. (1998). Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colon cancer. *Eur. J. Cancer*, 34: 1575-1581.
- Park Y.J., Youk E.G., Choi H.S., Han S.U., Park K.J., Lee K.U., Choe K.J., Park J.-G. (1999). Experience of 1446 rectal cancer patients in Korea and analysis of prognostic factors. *Int. J. Colorect. Dis.*, 14: 101-106.
- Paulovich A.G., Hartwell L.H. (1997). When checkpoints fail. *Cell*, 88: 315-21.
- Parker L.L., Piwnicka-Worms H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*, 257: 1955-1957.

- Parry J.M., Collins S., Mathers K., Scott N.A., Woodman C.B. (1999). Influence of volume of work on the outcome of treatment for patients with colorectal cancer. *Br. J. Surg.*, 86: 475-481.
- Parwaresch R., Rudolph P. (1996). The cell cycle: theory and application to cancer. *Onkologie*, 19: 464-472.
- Patel D.D., Bhatavdekar J.M., Chikhlikar P.R., Patel Y.V., Shah N.G., Ghosh N., Suthar T.P., Balar D.B. (1997). Clinical significance of p53, nm23 and bcl-2 in T3-4N1M0 esophageal carcinoma: an immunohistochemical approach. *J. Surg. Oncol.*, 65: 111-116.
- Peter M., Nakagawa J., Doree M., Labbe J.C., Nigg E.A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and m phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, 61: 591-602.
- Phillips S.M.A., Barton C.M., Lee S.J., Morton D.G., Wallace D.M.A., Lemoine N.R., Neoptolemos J.P. (1994). Loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB1) is a frequent and early event in prostatic tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, 70: 1252.
- Pietilainen T., Lipponen P., Aaltomaa S., Eskelinen M., Kosma V.M., Syrjanen K. (1995). Expression of retinoblastoma gene protein (Rb) in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *Eur. J. Cancer*, 31: 329-333.
- Pines J., Hunter T. (1989). Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* 58: 833-846.
- Pines J., Hunter T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.*, 115: 1-17.
- Poller D.N., Baxter K.J., Shepherd N.A. (1997). p53 and Rb1 protein expression: are they prognostically useful in colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 75: 87-93.
- Porschen R., Kriegel A., Langen C., Classen S., Hilse M., Lohe B., Hengels K.J., Borchard F. (1991). Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int. J. Cancer*, 47: 686-691.
- Quinlan D.C., Davidson A.G., Summers C.L., Warden H.E., Doshi A.M. (1992). Accumulation of p53 protein correlates with poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res.*, 52: 4828-4831.
- Quinn C.M., Wright N.A. (1990). The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J. Pathol.*, 160: 93-102.

Railo M., Nordling S., von Boguslawsky K., Leivonen M., Kyllonen L., von Smitten K. (1993). Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br. J. Cancer*, 68: 579-583.

Roder J.D., Böttcher K., Siewert J.R., Busch R., Hermanek P., Meyer H.J. (1993). Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German gastric carcinoma study 1992. *Cancer*, 72: 2089-2097.

Roncucci L., Fante R., Losi L., Di Gregorio C., Micheli A., Benatti P., Madenis N., Ganazzi D., Cassinadri M.T., Lauriola P., Ponz de Leon M. (1996). Survival for rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur. J. Cancer*, 32: 295-302.

Rosenblatt J., Gu Y., Morgan D.O. (1992). Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phase of the cycle and associates with cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2824-2828.

Sarbia M., Porschen R., Borchard F., Horstmann O., Willers R., Gabbert H.E. (1994). p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 74: 2218-2222.

Sarkis A.S., Dalbagni G., Cordon-Cardo C., Zhang Z.F., Sheinfeld J., Fair W.R., Herr H.W., Reuter V.E. (1993). Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 53-9.

Sawan A., Randall B., Angus B., Wright C., Henry J.A., Ostrowski J., Hennessy C., Lennard T.W., Corbett I., Horne C.H. (1992). Retinoblastoma and p53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immunohistochemical study. *J. Pathol.*, 168: 23-28.

Schneider B.G., Hilsenbeck S.G., Heusel C.H., Pekkel V., Shelton C.H., Rodriguez-Martinez H.A. (1994). p53 mutations in gastric and colorectal cancers in Texas Hispanics versus Anglos. *Virchows Archiv*, 424: 187-193.

Schönborn I., Minguillon C., Möhner M., Ebeling K. (1993). Die Bedeutung der PCNA-Proliferationsfraktion und histomorphologischer Prognosefaktoren für das Überleben beim Mammakarzinom. *Pathologie*, 14: 307-12.

Sherr C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672-1677.

Shi S.R., Key M.E., Kalra K.L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 39: 741-748.

Shimaya K., Shiozaki H., Inoue M., Tahara H., Monden T., Shimano T. (1993). Significance of p53 expression as a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Virchow Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, 422: 271-276.

- Siitonen S.M., Kallioniemi O.P., Isola J.J. (1993). Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry using monoclonal antibody 19A2 and a new antigen retrieval technique has prognostic impact in archival paraffin-embedded node-negative breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 142: 1081-1089.
- Silvestrini R., Benini E., Daidone M.G., Veneroni S., Boracchi P., Cappelletti V., Di-Fronzo G., Veronesi U. (1993). p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 965-70.
- Sinicrope F.A., Ruan S.B., Cleary K.R., Stephens L.C., Lee J.J., Levin B. (1995). Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*, 55: 237-241.
- Skopelitou A., Korkolopoulou P., Papanicolaou A., Christodoulou P., Thomas-Tsagli E., Pavlakis K. (1992). Comparative assesment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. Correlation with other conventional prognostic pathologic parameters. *Eur. J. Urol.*, 22: 235-240.
- Smeets M.F., Mooren E.H., Begg A.C. (1994). The effect of radiation on G2 blocks, cyclin B expression and cdc2 expression in human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Radiother. Oncol.*, 33: 217-227.
- Soong R., Knowles S., Williams K.E., Hammond I.G., Wysocki S.J. Iacopetta B.J. (1996). Overexpression of p53 protein is an independent prognostic indicator in human endometrial carcinoma. *Br. J. Cancer*, 74: 562-567.
- Soria J.C., Jang S.J., Khuri F.R., Hassan K., Liu D., Hong W.K., Mao L. (2000). Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res.*, 60: 4000-4004.
- Starzynska T., Bromley M., Ghosh A., Stern P.L. (1992). Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer*, 66: 558-562.
- Strauss M., Lukas J., Barter K.J. (1995). Unrestricted cell cycling and cancer. *Nature Med.*, 1: 1245-1246.
- Strickler J.G., Zheng J., Shu Q., Burgart L.J., Alberts S.R., Shibata D. (1994). p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: When guardians fail. *Cancer Res.*, 54: 4750-4755.
- Sugio K., Tsukamoto S., Ushijima C., Yamazaki K., Kase S., Yamaguchi M., Ondo K., Yano T., Sugimachi K. (2001). Clinical significance of the Rb expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res.*, 21:1931-1935.

- Sun X.F., Carstensen J.M., Zhang H., Stal O., Wingren S., Hatscheck T. (1992). Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet*, 340: 1369-1373.
- Takeno S., Noguchi T., Kikuchi R., Uchida Y., Yokoyama S., Müller W. (2002). Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 94: 2874-2881.
- Talbot I.C., Ritchie S., Leighton M.H., Hughes A.O., Bussey H.J.R., Morson B.C. (1980). The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer. *Br. J. Surg.*, 67: 439-442.
- Talbot I.C., Ritchie S., Leighton M.H., Hughes A.O., Bussey H.J., Morson B.C. (1981). Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance. *Histopathology*, 5: 141-163.
- Tanaka M., Omura K., Watanabe Y., Oda Y., Nakanishi I. (1994). Prognostic factors of colorectal cancer: K-ras mutation, overexpression of the p53 protein and cell proliferative activity. *J. Surg. Oncol.*, 57: 57-64.
- Tannapfel A., Hahn H.A., Katalinic A., Fietkau R.J., Kühn R., Wittekind C-W. (1996). Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. *Cancer*, 77: 164-71.
- Taylor W.R., DePrimo S.E., Agarwal A., Agarwal M.L., Schonthal A.H., Katula K.S., Stark G.R. (1999). Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol. Cel. Biol.*, 10: 3607-3622.
- Terry P., Giovannucci E., Michels K.B., Bergkvist L., Hansen H., Holmberg L., Wolk A. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 525-533.
- Thomas H., Nasim M.M., Sarraf C.E., Alison M.R., Love S., Lambert H.E., Price P. (1995). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining - a prognostic factor in ovarian cancer? *Br. J. Cancer*, 71: 357-362.
- Thomas M., Noguchi M., Kitagawa H., Kinoshita K., Miyazaki I. (1993). Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labelling index in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 46: 525-528.
- Thor A.D., Moore D.H., Edgerton S.M., Kawasaki E.S., Reihans E., Lynch A.T. (1992). Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84: 845-855.
- Toyoshima F., Moriguchi T., Wada A., Fukuda M., Nishida E. (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *Embo J.*, 17: 2728-2735.

Tubiana M., Pejovic M.H., Koscielny S., Chvaudra N., Malaise E. (1989). Growth rate, kinetics of tumor cell proliferation and long-term outcome in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, 44: 17-22.

UICC, TNM classification of malignant tumors. (1997). Springer-Verlag, Berlin, (5th ed.), pp. 66-69.

Victorzon M., Nordling S., Haglund C., Lundin J., Roberts P.J. (1996). Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Eur. J. Cancer*, 32A: 215-220.

Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M., Bos J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 319: 525-532.

Volm M., Koomagi R., Rittgen W. (1998). Clinical implications of cyclins, cyclin-dependent kinases, RB and E2F1 in squamous-cell lung carcinoma. *Int. J. Cancer*, 79: 294-299.

Volm M., Koomagi R., Mattern J., Efferth T. (2002). Expression profile of genes in non-small cell lung carcinomas from long-term surviving patients. *Clin. Cancer Res.*, 8: 1843-1848.

Walker D.H., Maller J.L. (1991). Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature (Lond.)*, 354: 314-317.

Wang A., Yoshimi N., Ino N., Tanaka T., Mori H. (1997). Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123: 124-127.

Wang D.-Y., Xiang Y.-Y., Tanaka M., Li X.-R., Li J.-L., Shen Q., Sugimura H., Kino I. (1994). High prevalence of p53 protein overexpression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and prognosis. *Cancer*, 74: 3029-3096.

Weikel W., Beck T., Mitze M., Knapstein P.G. (1991). Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res. Treat.*, 18: 149-54.

Weintraub S.J., Prater C.A., Dean C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature*, 385: 259-261.

Willett W.C., Stampfer M.J., Colditz G.A., Rosner B.A., Speizer F.E. (1990). Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N. Engl. J. Med.*, 323: 1664-1672.

World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.). IARC Press: Lyon, 103-119, 2000.

Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J. (1993). The p53-MDM-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.*, 7: 1126-1132.

Wunder J.S., Czitrom A.A., Kandel R., Andrulis I.L. (1991). Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft tissue sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 194-200.

Xiong Y., Connolly T., Futcher B., Beach D. (1991). Human D-type cyclin. *Cell*, 65: 691-699.

Xu H.-J., Quinlan D.C., Davidson A.G., Hu S.-X., Summers C.L., Li J., Benedict W.F. (1994). Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-staged non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86: 695-699.

Yamaguchi A., Nakagawara G., Kurosaka Y., Nishimura G., Yonemura Y., Miyazaki I. (1993). p53 immunoreaction in endoscopic biopsy specimens of colorectal cancer and its prognostic significance. *Brit. J. Cancer*, 68: 399-402.

Yasuda M., Takesue F., Inutsuka S., Honda M., Nozoe T., Korenaga D. (2002). Overexpression of cyclin B1 in gastric cancer and its clinicopathological significance: an immunohistological study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 128:412-6

Yonemura Y., Ohoyama S., Kimura H., Kamata T., Yamaguchi A., Miyazaki I. (1990a). Assessment of tumor cell kinetics by monoclonal antibody Ki-67. *Eur. Surg. Res.*, 22: 365-370.

Yonemura Y., Ohoyama S., Sugiyama K., Ninomiya I., Kamata T., Yamaguchi A., Matsumoto H., Miyazaki I. (1990b). Growth fractions in gastric carcinomas determined with monoclonal antibody Ki-67. *Cancer*, 65: 1130-1134.

Yonemura Y., Ohoyama S., Kimura T., Matsumoto H., Yamaguchi A., Kosaka T., Miwa K., Miyazaki I. (1991a). The expression of proliferative-associated nuclear antigen p105 in gastric carcinoma. *Cancer*, 67: 2523-2528.

Yonemura Y., Kimura H., Fushida S., Tugawa K., Nakai Y., Kaji M., Fonseca L., Yamaguchi A., Miyazaki I. (1993). Analysis of proliferative activity using anti-proliferating cell nuclear antigen antibody in gastric cancer tissue specimens obtained by endoscopic biopsy. *Cancer*, 71: 2448-2453.

Youssef E.M., Matsuda T., Takada N., Osugi H., Higashino M., Kinoshita H., Watanabe T., Katsura Y., Wanibuchi H., Fukushima S. (1995). Prognostic significance of the mib-1 proliferation index for patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 76: 357-66.

Zarbo R.J., Nakhleh R., Brown R.D., Kubus J.H., Ma C.K., Mackowiak R. (1997). Prognostic significance of DNA ploidy and proliferation in 309 colorectal carcinomas as determined by two-color multiparametric DNA flow cytometry. *Cancer*, 79: 2073-2086.

Zeng Z.S., Sarkis A.S., Zhang Z.F., Klimstra D.S., Charytonowicz E., Guillem J.G., Cordon-Cardo C., Cohen A.M. (1994a). p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 12: 2043-50.

zur Hausen A., Sarbia M., Heep H., Willers R., Gabbert HE. (1999). Retinoblastoma-protein (p16) expression and prognosis in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Int. J. Cancer*, 84: 618-622.

7 Akürzungen

ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
BVI	Blutgefäßinvasion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
kb	kilo-Basen
kD	kilo-Dalton
LVI	Lymphgefäßinvasion
n.s.	nicht signifikant
n.u.	nicht untersucht
PBS	Phosphatpuffer („phosphate buffered saline“)
PI	Proliferationsindex
WHO	Weltgesundheitsorganisation

8 Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Müller danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation sowie für die stete Unterstützung sowohl bei den experimentellen Untersuchungen als auch bei der Erstellung des Manuskriptes.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. R. Willers, Rechenzentrum der Universität Düsseldorf, für die hervorragende Betreuung bei der statistischen Auswertung der in dieser Untersuchung erhobenen Daten verpflichtet.

Herzlich danke ich auch Frau M. Bellack und Herrn M. Ringler aus dem Photo- und Graphikstudio des Institutes für Pathologie für gleichermaßen freundliche und unermüdliche Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen der vorliegenden Untersuchung.

9 Lebenslauf

Bettina Müller

Name: Müller, geb. Wassermann
Vorname: Bettina
Geburtsdatum: 22.11.1965
Geburtsort: Aachen

Schule: 09/72-06/76 Grundschule Fürker Irlen, Solingen
08/76-06/82 Albert-Schweitzer-Realschule, Solingen
08/82-06/85 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Solingen

Ausbildung: 10/86-03/89 Krankenpflegeschule, St.-Lukas-Klinik,
Solingen

Studium: 04/89-06/99 Studium der Humanmedizin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/98-06/99 Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf, Wahlfach Anästhesie

Zeugnisse und Prüfungen: 06/85 Abitur und allgemeine Hochschulreife
03/93 Ärztliche Vorprüfung
03/95 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/97 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/99 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Approbation als Ärztin am 1.5.2001

Beruflicher Werdegang: 07/99-04/01 Ärztin im Praktikum
05/01-09/02 Assistenzärztin an den Rheinischen
Kliniken Düsseldorf (Psychiatrische Kliniken der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Die Beurteilung der Prognose von Kolonkarzinompatienten erfolgt heute allgemein anerkannt auf der Basis des TNM-Systems unter Einbeziehung des R-Status. Allerdings hat nicht jeder Patient eines bestimmten Tumorstadiums tatsächlich auch die gleiche Chance zu überleben. Dies hat zu einer Vielzahl von Ansätzen geführt, zusätzliche Prognosefaktoren zu etablieren, jeweils mit dem Ziel, sowohl eine zunehmend präzisere und individuellere Prognoseabschätzung zu erreichen als auch Hochrisikopatienten zu identifizieren, die von neuen adjuvanten Therapieansätzen profitieren könnten.

Wesentliches Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher, an einer Serie von 342 kurativ resezierten kolorektalen Karzinomen verschiedene histologische und molekulare Parameter hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung zu untersuchen und in einer multivariaten Analyse mit den etablierten Prognoseparametern des TNM-Systems unter Einfluß einer Blut- und Lymphgefäßinvasion zu vergleichen. Beginnend mit der Proliferationsaktivität ließ sich zunächst zeigen, daß zwischen den einzelnen Tumoren eine erhebliche intertumorale Heterogenität bestand mit einem mittleren Proliferationsindex von 48% (range: 7-96%). Ein Einfluß auf die Prognose ließ sich nicht nachweisen. Dies galt auch bei Berücksichtigung verschiedener „cut-points“, ebenso wie bei separater Analyse unterschiedlicher Patientensubgruppen gemäß der Invasionstiefe (pT1/pT2 versus pT3/pT4) und des Lymphknotenbefalls (pN0 versus pN1/pN2) der Tumoren. Hinsichtlich der untersuchten Zellzyklus-assoziierten Proteine konnte in der vorliegenden Untersuchung eine p53-Expression in 67% aller Tumoren ebenfalls mit deutlicher intra- und intertumorale Heterogenität (range: 1-99%) nachgewiesen werden. Ein pRb-Expression fand sich bei allen 342 untersuchten Tumoren, insgesamt zeigten hier 88,3% der Karzinome eine starke pRb-Expression in mehr als 50% der Tumorzellen. Darüber hinaus war auch sowohl eine Cyclin A- als auch eine Cyclin B1-Expression bei allen untersuchten Tumoren nachweisbar. Bei 68% der Tumoren konnte eine starke Cyclin A-Expression in mehr als 10% der Tumorzellen nachgewiesen werden und bei 79% der Tumoren fand sich eine starke Cyclin B1-Expression in mehr als 10% der Tumorzellen. Eine Korrelation mit den übrigen histopathologischen Parametern ließ sich jeweils für keines der untersuchten Zellzyklusproteine zeigen. Die univariate Analyse ergab für alle untersuchten Zellzyklusproteine weder einen prognostischen Einfluß auf das gesamte postoperative noch auf das rezidivfreie Überleben. Dies galt auch bei separater Analyse verschiedener cut-points der Proteinexpression und bei Vergleich der Subgruppen gemäß der pT- und pN-Kategorien. In der abschließenden multivariaten Analyse konnte weder für die Proliferationsaktivität noch für einen der anderen untersuchten Zellzyklusproteine ein unabhängiger Einfluß auf die Prognose nachgewiesen werden. Für das postoperative Gesamtüberleben der Patienten konnten die Invasionstiefe der Tumoren, der Lymphknotenbefall, ein geringer Differenzierungsgrad (G3/G4) sowie der Nachweis einer extramuralen (subserösen) Blutgefäßinvasion als unabhängige Prognosefaktoren verifiziert werden. Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens konnten in der multivariaten Analyse sowohl die pT- und pN-Kategorie als auch eine distale Tumorlokalisation (Sigma/Rektum) als unabhängiger Prognosefaktore verifiziert werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Cyclin A- und Cyclin B1-Expression beim kolorektalen Karzinom ein häufiges und frühes Ereignis in der Karzinogenese darstellt, ohne jedoch einen Einfluß auf die Tumorprogression zu zeigen. Die vorliegenden immunhistochemischen Ergebnisse an 342 Tumoren weisen einerseits auf eine Störung der Zellzyklusregulation beim Dickdarmkarzinom hin, spiegeln andererseits jedoch auch die Komplexität dieser Regulation wider. Darüber hinaus hat nach den vorliegenden Ergebnissen beim Dickdarmkarzinom weder die Expression von Cyclin A noch von Cyclin B1, alleine oder in Kombination mit den Zellzyklusproteinen p53 und pRb oder der Proliferationsaktivität der Tumoren, eine Bedeutung für das postoperative Überleben oder die Häufigkeit von Tumorrezidiven.