

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. H. Nizze

**Nachweis von Mutationen im Tumorsuppressorgen p53
in kolorektalen Karzinomen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Ruth Ulrike König
aus Säckingen

Rostock, 2006

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0041-2

Dekan: Prof. Dr. Emil Reisinger

1. Gutachter: PD Dr. med. Friedrich Prall
Oberarzt am Institut für Pathologie
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Emmrich
Leitender Oberarzt der Abteilung für Gastroenterologie
Klinik für Innere Medizin
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Rolf Warzok
Stellvertretender Direktor am Institut für Pathologie
Universität Greifswald

Verteidigung am 28.01.2009

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung.....	2
1.1. Zielsetzung	2
1.2. Phosphoprotein p53.....	3
1.2.1. Struktur.....	3
1.2.2. Funktion.....	5
1.3. Fragestellung.....	7
2. Material und Methoden.....	9
2.1. Untersuchungsmaterial und klinisch-pathologische Daten.....	9
2.2. DNA-Extraktion.....	9
2.3. Polymerasekettenreaktion PCR.....	10
2.4. Reinigung der PCR-Produkte.....	12
2.5. Mutationsscreening mittels TGGE.....	13
2.5.1. Durchführung der TGGE.....	13
2.5.2. Silbernitratfärbung.....	15
2.6. Sequenzierung.....	16
2.7. Statistische Auswertung.....	18
3. Ergebnisse.....	19
3.1. Zusammensetzung des Patientenkollektives.....	19
3.2. Ergebnisse der Mutationsanalyse.....	20
4. Diskussion.....	28
5. Thesen zur Dissertation.....	36
6. Literaturverzeichnis.....	38

1. EINLEITUNG

1.1. Zielsetzung

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes erkrankten im Jahr 2000 in Deutschland über 76 000 Menschen an kolorektalen Karzinomen. Damit war das kolorektale Karzinom hierzulande sowohl bei Frauen (nach dem Mammakarzinom) als auch bei Männern (nach dem Prostatakarzinom) die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung. Etwa jeder 20. Bundesbürger erkrankt im Laufe seines Lebens daran. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter und verdoppelt sich bei den über 40jährigen etwa alle zehn Jahre.

Es gibt hereditäre Formen des kolorektalen Karzinoms, wie zum Beispiel die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP), die als obligate Präkanzerose gilt, oder das Hereditäre Nonpolyposöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC). Die allermeisten Tumoren treten jedoch sporadisch auf. Sie entstehen in der Regel aus Adenomen. Nach dem sogenannten „Tumorprogressionsmodell“ kommt es in Gewebestammzellen der Dickdarmschleimhaut über einen langen Zeitraum zur Akkumulation von verschiedenen genetischen Veränderungen. Dazu gehören aktivierende Onkogen-Mutationen und Tumorsuppressorgen-Inaktivierungen. Das Entartungsrisiko eines Adenoms steigt mit seiner Größe und der Höhe seines villösen Anteils. Entscheidend für die maligne Transformation ist eine kritische Gesamtzahl an Mutationen. Der Verlust des p53-Gens oder das Auftreten von Mutationen in diesem Gen gelten als späte Ereignisse in dieser Adenom-Karzinom-Sequenz (Fearon & Vogelstein, 1990).

Mutationen im p53-Gen gehören zu den am häufigsten beobachteten Mutationen in humanen Karzinomen. Mögliche Formen sind Deletionen, Insertionen, Basenaustausch (Transitionen, Transversionen) und Frameshiftmutationen. Dabei gibt es unterschiedliche Mutationsmuster bei verschiedenen Tumoren. Die Häufigkeit von bestimmten Mutationsformen und ihre Lokalisation innerhalb des Gens variieren in Abhängigkeit von der Karzinomart (Hollstein et al., 1991).

Da es sich bei p53 um ein häufig mutiertes und gleichzeitig aufgrund seiner geringen Größe leicht zu untersuchendes Gen handelt, gibt es eine entsprechend große Zahl von Studien zu diesem Thema. Besonders die Auswirkungen von Mutationen in diesem Gen auf die Prognose einer Krebserkrankung waren Gegenstand vieler verschiedener Arbeiten. Bei einigen Tumorarten konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Vorhandensein einer Mutation und kürzerem Überleben gefunden werden, insbesondere bei Brustkrebs (Soong, Iacopetta et al., 1997; Pharoah et al., 1999; Powell et al., 2000) und Magenkrebs (Lim et al., 1996).

Beim kolorektalen Karzinom kam es bei solchen Untersuchungen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Intention der vorliegenden Arbeit war es, in einer retrospektiven klinisch-pathologischen Untersuchung die Häufigkeit und Arten von Veränderungen im p53-Gen bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen zu ermitteln und hinsichtlich ihrer Bedeutung für den klinischen Verlauf und die Wirkung adjuvanter Therapien zu untersuchen.

1.2. Phosphoprotein p53

1.2.1. Struktur

Das Phosphoprotein p53 wurde Ende der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts in Tieren mit durch Simian Virus (SV40) induzierten Tumoren entdeckt und zunächst für ein Tumor-Antigen gehalten (Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979). Aufgrund seiner transformierenden und immortalisierenden Wirkung in kultivierten embryonalen Rattenzellen wurde es später den Onkogenen zugeordnet (Eliyahu et al., 1984; Parada et al., 1984; Jenkins et al., 1984).

Erst als festgestellt wurde, dass die transformierenden Eigenschaften von mutanten Formen des Proteins ausgehen, während der Wildtyp das Wachstum von transformierten Zellen in Kultur unterdrückt, konnte man p53 den

Tumorsuppressorgenen zuordnen (Finlay et al., 1989; Baker et al., 1990; Chen et al., 1990).

Das p53-Gen ist auf dem Chromosom 17p13.1 lokalisiert und 20kb lang. Es enthält 11 Exons, von denen das erste nicht kodiert. Fünf Regionen des Gens sind während der Evolution hochkonserviert geblieben: die Codons 13-19 (konservierte Region I), die Codons 117-142 (konservierte Region II), die Codons 171-181 (konservierte Region III), die Codons 234-258 (konservierte Region IV) und die Codons 270-286 (konservierte Region V). (Soussi et al., 1990).

Das kodierte Protein besteht aus 393 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 53kD, was zur Namensgebung führte.

Man kann es in drei **strukturelle Domänen** gliedern:

1. Die N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-43) ist vorwiegend sauer und bildet eine transkriptionsaktivierende Region (Unger et al., 1992). Dieser Teil des Proteins interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel dem TATA-Box bindenden Protein (Horikoshi et al., 1995).

2. Die Kerndomäne ist prolinreich und hydrophob. Sie umfasst die Aminosäuren 102-292 und ist damit das Produkt von vier der fünf hochkonservierten Domänen. Dieser Teil des Moleküls hat sequenzspezifisch DNA-bindende Eigenschaften (Bargonetti et al., 1993; Pavletich et al., 1993; Wang et al., 1993) und ist komplex gefaltet. Zwei antiparallele β -Faltblatt-Formationen bilden das Gerüst für ein Schleifen(L1)-Faltblatt-Helix-Motiv und zwei große Schleifen (L2 und L3). Dabei entsprechen L1 (Aminosäuren 112-124) und die angrenzende Faltblatt-Formation (Aminosäuren 124-141) fast genau der konservierten Domäne II. L2 (Aminosäuren 163-195) enthält die konservierte Region III. Es bindet nicht direkt an DNA, interagiert aber mit L3 (Aminosäuren 236-251), das nahezu dem konservierten Bereich IV entspricht. Die konservierte Region V wird von einer weiter C-terminal in der Kerndomäne gelegenen α -Helix (H2, Aminosäuren 278-286) und der davor gelegenen β -Faltblattstruktur gebildet, die L1 stabilisieren und an der DNA-Bindung beteiligt sind. L2 und L3 werden durch ein vierfach koordiniertes Zink-Atom zusammengehalten. Dieses so genannte „Zinkfinger-Motiv“ ist in vielen Transkriptionsfaktoren enthalten und ebenfalls an der DNA-

Bindung maßgeblich beteiligt. Die Liganden des Zink-Atoms sind C176 und H179 in L2, sowie C238 und C242 in L3. Während das Schleifen(L1)-Faltblatt-Helix-Motiv mit der großen Furche der DNA-Spirale interagiert, haben die beiden Schleifen L2 und L3 Kontakt zur kleinen Furche der DNA-Spirale (Cho et al., 1994).

3. Die C-terminale Domäne ist in sich nochmals dreigeteilt. Die Aminosäuren 300-320 bilden das Verbindungsstück zwischen der DNA-bindenden Domäne und der Tetramerisierungsdomäne, die die Aminosäuren 320-360 umfasst. Die letzten 30 Aminosäuren des Proteins sind vorwiegend basisch und enthalten Elemente mit regulierendem Einfluss auf seine DNA-Bindung. Durch Interaktion mit anderen Proteinen, durch Phosphorylierung, durch alternatives Spleißen oder posttranskriptionelle Modifikation an dieser Stelle des Proteins kann seine DNA-Bindungsfähigkeit verändert und auch aufgehoben werden (Wolkowicz et al., 1998). Eine Phosphorylierung der Aminosäure S392 durch CK2 katalysiert beispielsweise Konformationsänderungen in der C-terminalen Domäne, die eine Stabilisierung der Tetramerkonfiguration bewirken (Sakaguchi et al., 1997).

1.2.2. Funktion

Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten zur Funktion von p53 und es sind noch längst nicht alle Wirkmechanismen verstanden.

Wildtyp p53 ist ein kurzlebiges Protein. Es wird durch das Mdm2-Protein kovalent gebunden. Diese Bindung verhindert, dass p53 als Transkriptionsfaktor aktiv wird und bewirkt zudem, dass es durch das Proteasom abgebaut wird. Mdm2 ist wiederum ein Zielgen von p53 und es besteht dadurch ein negativer Feedback-Mechanismus, der die Akkumulation von p53 verhindert (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997).

„Zellulärer Stress“, wie DNA-Schädigung, zum Beispiel durch ionisierende Strahlung oder onkogene Stimuli führen zu einer erhöhten Konzentration von p53 in der Zelle. Das Protein wird durch Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert. Viele verschiedene zelluläre Kinasen vermitteln die Phosphorylierung von p53,

darunter Mitglieder der Phosphoinositide-3-Kinase-Familie (PI-3K), die DNA-aktivierte Proteinkinase (DNA-PK), die Proteinkinase C (PK-C) und diverse andere (Stewart et al., 2001).

P53 wirkt als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor und fördert die Transkription von einer Vielzahl von Genen mit entsprechender Bindungsstelle. Die DNA-Sequenz dieser Bindungsstelle wurde bereits in den 1990er Jahren entschlüsselt (El-Deiry et al., 1992; Wang et al., 1995).

P53 entfaltet seine Wirkung über zwei Hauptmechanismen: Es kann bei DNA-Schäden einerseits einen Wachstumsstopp der Zelle in der G1- und der G2-Phase des Zellzyklus bewirken, der der Zelle Zeit gibt, den Schaden zu reparieren, alternativ kann die Apoptose eingeleitet werden. Hansen und Braithwaite konnten 1996 zeigen, dass die beiden Hauptmechanismen Wachstumsstopp und Apoptose zwei voneinander unabhängige Funktionen sind. Die Apoptose kann sowohl über den mitochondrialen Weg als auch über den rezeptorassoziierten Weg über p53 eingeleitet werden. Was mit der Zelle geschieht, hängt davon ab, welche Zielgene aktiviert werden, was wiederum wahrscheinlich von einer bestimmten Phosphorylierung oder Acetylierung abhängt (Koichi et al., 2002).

Es gibt Hinweise, dass p53 auch direkt an der DNA-Reparatur beteiligt ist (Tanaka et al., 2000). Daneben hat es über Fraktalkine Wirkungen auf die Chemotaxis und damit auf das Immunsystem (Kenji et al., 2000). In Fibroblasten hat es über die Regulation von Thrombospondin-1 auch Kontrolle über die Angiogenese. Thrombospondin-1, das in Zellen mit Wildtyp p53 vermehrt sezerniert wird, hat einen inhibitorischen Effekt auf die Neovaskularisation (Dameron et al., 1994).

Das Protein p21 war eine der zuerst entdeckten Verbindungen zwischen p53 und dem Zellzyklus-Arrest. P53 induziert die Expression von p21, dieses inhibiert die enzymatische Aktivität von verschiedenen Cyclin-abhängigen Kinase-Komplexen (CDK). Über eine Kaskade von Reaktionen führen diese CDKs zu einer vermehrten Transkription von Genen, die den Eintritt in die S-Phase des

Zellzykluses anstoßen. P53 bewirkt auf diesem Weg eine Hemmung des Eintritts in die S-Phase und führt zu einem G1-Arrest (Harper et al., 1993; Pellegata & Ranzani, 1996).

Neben diesem G1-Arrest gibt es auch einen G2-Arrest im Zellzyklus ausgelöst durch p53, vermittelt über 14-3-3 σ , dessen Expression durch p53 gesteigert wird, und das über Bindung und Sequestrierung von Cdc25 den Eintritt in die Mitose verzögert (Hermeking et al., 1997).

Der Einfluss von p53 führt zu erhöhten Konzentrationen von Bax, das den programmierten Zelltod fördert, und zu erniedrigten Konzentrationen von Bcl-2, das gegenteilige Funktionen hat. Diese Veränderung des Bcl-2/Bax-Verhältnisses erhöht die Apoptose-Bereitschaft der Zelle (Miyashita & Reed, 1995).

Im Gegensatz zu den meisten Tumorsuppressorgenen, die rezessiv wirken und daher die Krebsentstehung nur fördern, wenn beide Allele mutiert sind und/oder fehlen, hat p53 einen **dominanten Effekt**. Das mutierte Genprodukt kann die Funktion des noch gesunden durch Komplexbildung interferieren (Martinez et al., 1991).

1.3. Fragestellung

Da p53 über verschiedene Mechanismen die Integrität der genetischen Information aufrecht erhält und schützt, ist anzunehmen, dass ein Funktionsverlust dieses Proteins durch Mutation weitere genetische Aberrationen begünstigt und dadurch entscheidende Auswirkungen auf die weitere Entwicklung des entsprechenden Zellklons hat.

Bezogen auf das kolorektale Karzinom wurde in der vorliegenden Arbeit folgender Fragestellung nachgegangen:

1. Verhalten sich kolorektale Karzinome mit Mutationen im p53-Gen klinisch anders als Tumoren mit Wildtyp p53?

2. Gibt es bestimmte Mutationen, die die Funktion des Proteins besonders kompromittieren können, was in einem ungünstigen klinischen Verlauf zum Ausdruck kommt?

3. Hat der Mutationsstatus des p53-Gens einen Einfluss auf das Verhalten des Tumors unter adjuvanter Chemotherapie?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsmaterial und klinisch-pathologische Daten

Die in dieser Arbeit dargelegten Untersuchungen sind Teil umfassender Untersuchungen zu Prognose- und Prädiktionsfaktoren bei kolorektalen Karzinomen einer am Institut für Pathologie der Universität Rostock angesiedelten Arbeitsgruppe. Aus dieser Arbeitsgruppe wurden das histopathologische Untersuchungsgut und die klinischen Daten zu den Staging-Untersuchungen und zum klinischen Verlauf zur Verfügung gestellt. Es liegen in der Arbeitsgruppe Untersuchungsmaterial und klinische Daten zu allen in den Jahren 1994-1999 in der Chirurgischen Universitätsklinik an einem primären und singulären, nichtmetachronen kolorektalen Karzinom operierten Patienten vor. Perioperativ verstorbene Patienten wurden ausgeschlossen. Endpunkte waren der tumorbedingte Tod und metachron manifeste Metastasen (für Patienten in den UICC-Stadien I-III)

2.2. DNA-Extraktion

Die DNA-Gewinnung erfolgte alternativ durch zwei verschiedene Methoden. Für beide Methoden wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert, indem sie 10 Minuten bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert und daraufhin noch warm für 30 Minuten in Xylol gegeben wurden, anschließend nochmals 10 Minuten in frisches Xylol. In einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 30%) wurden die Gewebeschnitte danach in ein wässriges Milieu überführt. Die Schnitte wurden dann luftgetrocknet und kurz mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dabei hat es sich als essentiell erwiesen, dass die Schnitte nur schwach angefärbt wurden (nicht länger als eine Minute), da stärkere Färbungen die anschließende DNA-Amplifikation inhibierten.

Aus diesen Schnitten wurden durch einen Facharzt für Pathologie aus dem Institut unter einem Stereo-Mikroskop Tumorgewebsanteile isoliert.

1. Isolierung der DNA mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Machery-Nagel):

Das unter dem Mikroskop gewonnene Material wurde in 180µl Lysispuffer gebracht, dem 200µg Proteinase-K zugegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 56°C wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers 200µl Puffer und 210µl Ethanol zugegeben und das Gemisch auf eine Silikatmembran mit selektiv DNA-bindenden Eigenschaften gegeben. Die an der Silikatmembran gebundene DNA wurde in zwei Schritten gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Nach den Waschsritten wurde jeweils zentrifugiert. Durch Zugabe von 50-100µl eines auf 70°C vorgewärmten Elutions-Puffers wurde die DNA gelöst und durch Zentrifugation in ein Eppendorfgefäß überführt. 2-10µl dieser Lösung wurden anschließend in die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

2. Digestion und Proteinase-K-Inaktivierung:

Die isolierten Zellen wurden in 100µl Digestionslösung gegeben (10mM Tris-HCl mit pH 8,5, 0,1mM EDTA, 0,5% Tween 20), die 200µg Proteinase-K enthält. Die Lösung wurde 12 Stunden bei 60°C inkubiert und die Proteinase-K anschließend bei einer Temperatur von 96°C über 10 Minuten inaktiviert. Von dieser Lösung wurden 2-8µl in die PCR eingesetzt.

Beide Vorgehensweisen ergaben DNA-Material, das vervielfältigt werden konnte. Bei manchen Proben gelang dies besser mittels Methode 1, bei anderen mittels Methode 2. Die Gründe für diese Unterschiede sind wahrscheinlich in den verschiedenen langen Fixierungszeiten und den damit verbundenen unterschiedlichen Vernetzungsgraden der DNA der jeweiligen Proben zu sehen.

2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zunächst wurde ein Fragment der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein sogenanntes „Housekeeping-Gen“, das in allen Geweben exprimiert wird, mittels PCR vervielfältigt, um die Integrität und Amplifizierfähigkeit

der präparierten DNA zu testen. Bei den Proben mit positivem Ergebnis der GAPDH-PCR wurde die DNA der Exons 5,6,7 und 8 des p53-Gens amplifiziert.

Die Amplifikationen wurden unter Verwendung von PCR-Puffer und Taq-Polymerase der Firma Qiagen in 50µl-Ansätzen durchgeführt, die sich wie folgt zusammensetzten:

1X PCR-Puffer, 1,5mmol/l Magnesiumchlorid (Exons 5, 6, 7) beziehungsweise 3mmol/l Magnesiumchlorid (Exon 8), 100µmol/l von jedem Desoxy-Nukleotid-Triphosphat, 0,24µmol/l von jedem Primer und eine Unit Taq-Polymerase.

Die PCR für Exon 6 wurde unter Zusatz von 1X Q-Solution (Qiagen) durchgeführt.

Tabelle 1: Für die DNA-Amplifikation verwendete Primer

<i>Exon</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Produktgröße</i>
5 forward	(GC40)TTCCTCTTCCTACAGTACTC	282 bp
5 reverse	CTGGGCAACCAGCCCTGTCGT	
6 forward	(GC40)ACGACAGGGCTGGTTGCCCA	227 bp
6 reverse	AGTTGCAAACCAGACCTCAG	
7 forward	(GC40)TCTCCTAGGTTGGCTCTGACTG	184 bp
7 reverse	GCAAGTGGCTCCTGACCTGG	
8 forward	CCTATCCTGAGTAGTGGTAATC	
8 reverse	(GC40)CCGCTTCTTGTCTGCTTGCTT	215 bp

Für den PCR-Lauf wurde ein Thermal-Cycler (Modell Autogene der Firma Grant) mit folgenden Temperaturprofilen verwendet:

Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten folgten 40 Zyklen mit

Denaturierung	bei 95°C	für 30 Sekunden	
Primeranlagerung	bei 58°C	für 30 Sekunden	bei den Exons 6 und 7
	bei 53°C	für 30 Sekunden	bei den Exons 5 und 8
Polymerisation	bei 72°C	für 60 Sekunden	

Nach Ablauf der 40 Zyklen wurde die Polymerisation bei 72°C für 3 Minuten fortgeführt.

Um eine Kontamination der Ansätze auszuschließen, wurde in jedem PCR-Lauf eine Negativprobe (Ansatz ohne DNA) mitgeführt, außerdem eine Patientenprobe, in der zuvor eine Mutation im entsprechenden Exon des p53-Gens identifiziert wurde, als Positivkontrolle.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Amplifizierung wurden 10µl des PCR-Produktes zusammen mit einem Lastpuffer (0,4% Bromphenolblau, 0,4% Xylencyanol) auf ein 2%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel aufgetragen und der Lauf bei einer Spannung von 90 Volt über 45 Minuten durchgeführt. Dabei wurde ein DNA-Längenstandard mitgeführt, anhand dessen die richtige Größe des Amplifikates und auch seine Reinheit und Konzentration unter UV-Licht beurteilt werden konnten.

2.4. Reinigung der PCR-Produkte

Mit dem Invisorb Spin PCRapid Kit der Firma Invitex wurden die PCR-Produkte von Salzen, Nukleotiden und Primern gereinigt. Dazu wurde jedes zunächst mit 130µl Bindungspuffer durchmischt und auf eine Zentrifugationssäule mit selektiv DNA-bindenden Eigenschaften gegeben. Nach einminütiger Inkubationszeit wurde für eine Minute bei 10000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Es wurden 700µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut für eine Minute bei 10000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute wurde der restliche Waschpuffer aus der Säule entfernt.

Die Zentrifugationssäule wurde in ein neues Auffanggefäß überführt und 50µl Elutionspuffer darauf pipetiert. Nach 5-8 Minuten Inkubationszeit wurde anschließend für eine Minute bei 10000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Zur Verifizierung des Ergebnisses des Reinigungsvorganges wurden 5µl des Eluates zusammen mit 5µl Aqua destillata und 1µl Lastpuffer erneut für 45 Minuten bei 90 Volt in eine Agarosegelelektrophorese gegeben.

2.5. Mutationsscreening mittels Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)

Bei der TGGE werden DNA-Fragmente nach ihren Schmelzeigenschaften getrennt. Dazu lässt man die DNA-Fragmente in einem achtprozentigen Polyacrylamidgel mit einem parallel zur Elektrophoreserichtung linear ansteigenden Temperaturgradienten wandern. Einzelne DNA-Fragmente haben keine einheitliche Schmelztemperatur, sie schmelzen partiell in Domänen. Die Fragmente wandern zunächst in Doppelstrangform, bis Temperaturen erreicht sind, bei denen einzelne Domänen schmelzen und die beiden Stränge sich trennen. Es kommt zu einer Konformationsänderung, die bewirkt, dass die Mobilität des Fragmentes im Gel abnimmt. Domänen, die sich in ihrer Basensequenz unterscheiden, schmelzen bei unterschiedlichen Temperaturen. Bei Vorhandensein einer Mutante und des Wildtyps des zu untersuchenden Gens entstehen in der PCR durch Denaturierung und Renaturierung zwei Homodimere und zwei Heterodimere, die in der TGGE getrennt werden können. Es erscheinen entsprechend vier Banden. Enthält die Probe keine Mutation, wird nur eine Bande sichtbar, die dem Wildtyp entspricht.

Man bedient sich bei der PCR eines Primers mit einer GC-reichen Sequenz von 40 Basenpaaren am 5'-Ende. Diese Bereiche des PCR-Produktes schmelzen erst bei sehr hohen Temperaturen und bewirken, dass die Doppelstrangformation teilweise erhalten bleibt. Das ist wichtig, weil nach vollständiger Trennung der Doppelstränge keine Abhängigkeit mehr zwischen Sequenz und Wanderungsverhalten besteht.

2.5.1. Durchführung der TGGE

Die Durchführung der TGGE erfolgte mit dem Elektrophoresesystem und den Anweisungen der Firma Diagen.

Reagentien: Harnstoff
Acrylamidstammlösung 39%
50X MOPS bestehend aus MOPS 209,2 g/l
EDTA 18,6 g/l
NaOH 5 mol/l mit pH 8,0

Glycerol 40%
Ammoniumpersulfat (APS) 4%
Teramethyldiamin (TEMED)
Lastpuffer bestehend aus Bromphenolblau 0,5 g/l
Xylencyanol 0,5 g/l
EDTA 0,01 mol/l

Zubereitung des Polyacrylamidgels:

21,6g Harnstoff wurden zusammen mit 12ml Acrylamidstammlösung, 0,9ml 50X MOPS, 2,25ml Glycerol und 9,5ml Aqua destillata gemischt und gerührt, bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hatte. Nach Zugabe von 0,34ml APS und 75µl TEMED wurde nochmals kurz durchmischt und die Lösung dann auf die hydrophobe Seite einer Gelträgerfolie (Gel Bond PAG-Film der Firma BIOzym) gegossen, die sich zwischen zwei durch einen Spacer getrennten Glasplatten befand, so dass ein etwa 2mm dickes Gel entstand. Etwa eine Stunde nach dem Gießen konnte das Polyacrylamidgel eingesetzt werden.

Elektrophoreselauf:

Die Apparatur bestand aus einer Thermoplatte, an deren Seiten sich zwei Kammern befanden, in die jeweils ein Liter Laufpuffer (1X MOPS) gefüllt wurde. Die Trägerfolie mit dem Polyacrylamidgel wurde auf die Thermoplatte gelegt, auf beiden Seiten über puffergetränkte Tücher mit den Kammern verbunden und mit einer Glasplatte abgedeckt.

Zur Äquilibration des Elektrophoresesystems wurde für 30 Minuten eine Spannung von 250 Volt bei Raumtemperatur angelegt.

5µl PCR-Produkt und 0,5µl Lastpuffer wurden dann zusammen in die Taschen des Gels gegeben und in Abhängigkeit vom untersuchten Exon bei Raumtemperatur für eine bestimmte Zeit einlaufen gelassen:

Exon 5: 15 Minuten
Exon 6: 100 Minuten
Exon 7: 30 Minuten
Exon 8: 180 Minuten

Nach dieser Einlaufzeit wurden ohne angelegte Spannung mittels zwei Thermostaten die für die Trennung erforderlichen Temperaturgradienten eingestellt, die niedrigere Temperatur jeweils auf der Seite des Gels, auf der die Proben aufgetragen wurden:

Exon 5: 55°C/75°C
Exon 6: 35°C/68°C
Exon 7: 40°C/75°C
Exon 8: 40°C/78°C

Wenn beide Thermostaten ihre Solltemperatur erreicht hatten, wurde wieder eine Spannung von 250 Volt angelegt und die TGGE in Abhängigkeit vom untersuchten Exon für eine bestimmte Zeit fortgesetzt:

Exon 5: 225 Minuten
Exon 6: 170 Minuten
Exon 7: 150 Minuten
Exon 8: 180 Minuten

2.5.2. Silbernitratfärbung

Nach dem Elektrophoreselauf wurden die DNA-Banden mit einer Silbernitratfärbung sichtbar gemacht.

Verwendete Lösungen:

Puffer A: 200ml Ethanol absolut
10ml Eisessig 100% auf 2l Aqua destillata

Puffer B: 1g Silbernitrat auf 1l Aqua destillata

Puffer C: 4,5g Natriumhydroxid
1,2ml Formaldehyd
0,06g Natriumborhydrid auf 300ml Aqua destillata

Puffer D: 15g Natriumcarbonat auf 2l Aqua destillata

Die Gelträgerfolie wurde zunächst zweimal je drei Minuten in Puffer A geschüttelt, anschließend 10 Minuten in Puffer B. Danach wurde mit Aqua destillata gespült und 20 Minuten in Puffer C inkubiert. Zuletzt wurde die Färbung mit Puffer D in 10 Minuten intensiviert. Dann konnten die Banden anhand einer mitgelaufenen Positivkontrolle beurteilt werden.

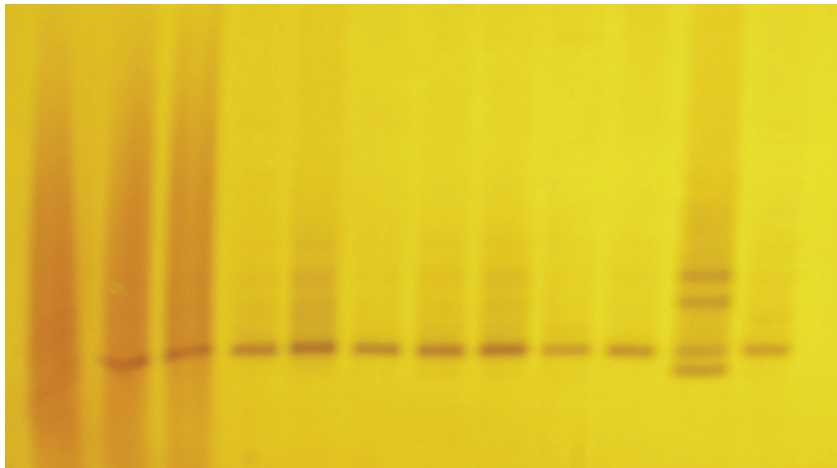


Abbildung 1: Ergebnis der TGGE

Proben mit Wildtyp p53 kommen mit einer einzelnen Bande zur Darstellung.

Bei der zweiten Probe von rechts handelt es sich um eine Probe mit Mutation, sie stellt sich durch die Zusammenlagerung von je zwei Homodimeren und zwei Heterodimeren mit vier Banden dar. Ganz links ist die Negativprobe aufgetragen.

2.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben, die im Mutationsscreening ein verändertes Wanderungsverhalten im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp zeigten, erfolgte

mit der zyklischen Sequenzierung unter Verwendung des Ready Reaction Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits der Firma Applied Biosystems.

Die für die Sequenzierungsreaktion verwendeten Primer waren bis auf die weggelassenen GC-Klammern identisch mit den für die Amplifikation der p53-Exons benutzten. Als DNA-Template wurde dasselbe gereinigte PCR-Amplifikat eingesetzt, das zuvor in der TGGE untersucht worden ist.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem 20µl-Ansatz durchgeführt, der sich wie folgt zusammensetzte:

4µl Terminator Ready Reaction Mix

100-200ng PCR-Produkt-DNA

5pmol Primer

Aqua destillata auf 20µl

Nach gründlichem Mischen der Reaktionskomponenten wurde die zyklische Sequenzierung in 25 Zyklen mit 95°C für 30 Sekunden und 60°C für 4 Minuten durchgeführt.

Die anschließende Reinigung der Sequenzierungsprodukte erfolgt mit Hilfe von CENTRI-SEP-COLUMNS der Firma Princeton Separation. Dazu wurde ein Gel in Säulchen mit 800µl Aqua destillata über mindestens 30 Minuten rekonstruiert, sich dabei bildende Luftblasen wurden durch Vortexen des Säulchens entfernt. Nach Absetzen des Gels in den Säulchen und Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit, zunächst durch Abfließen durch die Schwerkraft und anschließend durch Zentrifugation, wurden die 20µl Sequenzierungsprodukt auf das Gel gegeben. Das Säulchen wurde dann auf ein sauberes Reaktionsgefäß gesteckt und erneut zentrifugiert. Die gereinigte Probe in dem Reaktionsgefäß wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, anschließend in 20µl Template Suppression Reagent gelöst. Die Sequenz der DNA wurde dann im ABI PRISM 310 Genetic Analyser ermittelt (Kooperation Professor H.-J. Thiesen, Institut für Immunologie, Universität Rostock).

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe von SPSS Software. Die vorhandene Datenbank aus der Arbeitsgruppe wurde mit den Daten aus der Mutationsanalyse ergänzt. Die Überlebensanalyse erfolgte nach der Kaplan-Meier-Methode mit Log-Rang-Test, die schließende Statistik anhand von Kreuztabellen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Zusammensetzung des Patientenkollektives

In diese Untersuchung eingeschlossen wurde Material von allen Patienten, die sich in den Jahren 1994-96 an der Universität Rostock der chirurgischen Therapie eines kolorektalen Karzinoms unterzogen haben und die in 2.1. genannten Einschlusskriterien erfüllten. Es handelt sich somit um eine Untersuchung im simuliert prospektiven Design. Wir bedienten uns einer etablierten und gut funktionierenden Methode. Für die 209 eingeschlossenen Patienten lagen komplette Verlaufsdaten vor.

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation bewegte sich zwischen 32 und 90 Jahren mit einem Mittelwert von 64,9 Jahren (Standardabweichung von 12,4). Bei 192 Patienten (94,6%) konnte eine R0-Resektion durchgeführt werden. Die mittlere Überlebenszeit aller Patienten betrug 68 Monate (Standardfehler 2, 95%-Konfidenzintervall 63-72). Der Beobachtungszeitraum umfasste 2-93 Monate (Mittelwert 47,3 Monate, Standardabweichung 23,6). 135 Patienten (64,6%) waren am Ende des Beobachtungszeitraumes noch am Leben. Bei 56 Patienten aus den UICC-Stadien I-III traten metachrone Fernmetastasen auf.

Das UICC-Stadium war unter den erhobenen Parametern erwartungsgemäß ein signifikanter Prognosefaktor ($p < 0,001$, siehe Grafik 1). Ebenfalls prognostischen Wert hatten das Invasionsmuster ($p < 0,001$) und der Differenzierungsgrad ($p = 0,009$).

Für die verschiedenen Histotypen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeiten.

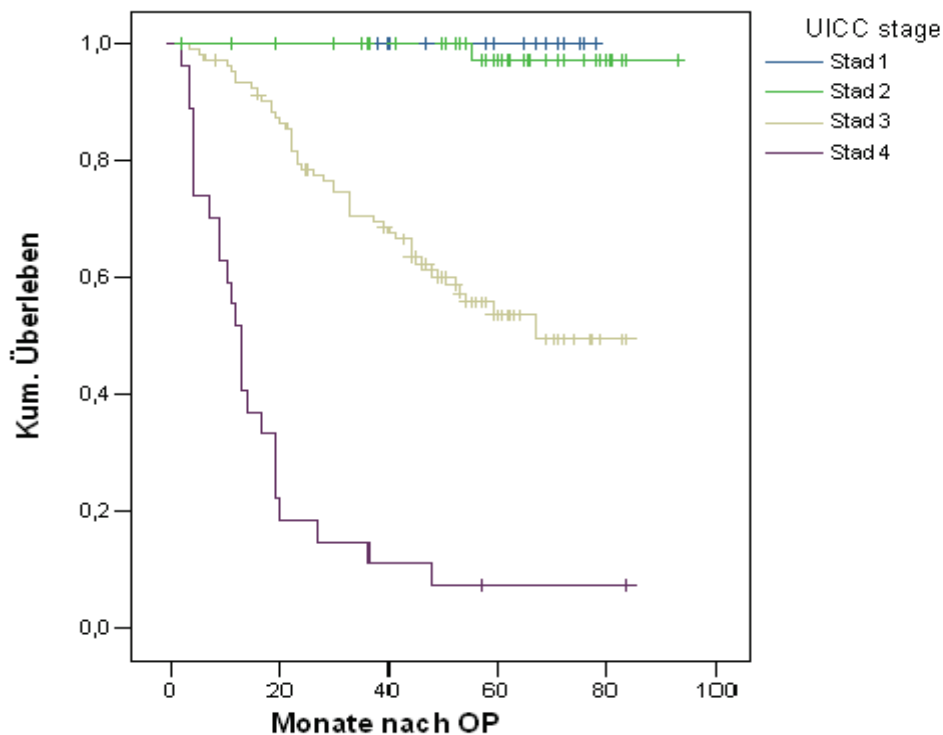


Abbildung 2: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse stratifiziert nach Stadien

3.2. Ergebnisse der Mutationsanalyse

Bei unseren Untersuchungen des p53-Gens beschränkten wir uns auf die Exons 5-8, da sich bei Sequenzierungen des gesamten Gens gezeigt hat, dass die überwiegende Mehrzahl der Mutationen sich in diesen Exons befindet. Die Zahlen reichen von 87% (Greenblatt et al., 1994) über 95% (Hamelin et al., 1994) bis 98% (Hollstein et al., 1991).

In der TGGE fanden sich Mutationshinweise in 78 der 209 untersuchten Fälle (10 in Exon 5, 16 in Exon 6, 31 in Exon 7, 21 in Exon 8). Aus technischen Gründen gelang die Sequenzierung bei sechs dieser 78 Proben auch in wiederholten Versuchen

nicht. Der genaue Mutationsstatus dieser Tumoren ist damit nicht bekannt, sie wurden nachträglich ausgeschlossen.

Über Stadieneinteilung, Altersverteilung, Tumorlokalisierung, Differenzierung und Histotypisierung und ihre Assoziation mit p53-Mutationen gibt die folgende Tabelle Auskunft.

Tabelle 2: Assoziation zwischen Mutationsstatus und klinisch-pathologischen Parametern

	Mutation (%)	Wildtyp (%)	Gesamt (%)	p* ¹
gesamt	72 (35,5)	131 (64,5)	203 (100)	
Stadium				
1	6 (3,0)	15 (7,3)	21 (10,3)	0,878
2	18 (8,9)	33 (16,3)	51 (25,1)	
3	39 (19,2)	65 (32,0)	104 (51,2)	
4	9 (4,4)	18 (8,9)	27 (13,3)	
Lokalisation* ²				
proximal	18 (8,9)	54 (26,6)	72 (35,5)	0,021
distal	54 (26,6)	77 (37,9)	131 (64,5)	
Alter				
< 50	6 (3,0)	17 (8,3)	23 (11,3)	0,437
50-70	42 (20,7)	72 (35,5)	114 (56,2)	
>70	24 (11,8)	42 (20,7)	66 (32,5)	
Grading				
1	11 (5,4)	23 (11,3)	34 (16,7)	0,160
2	54 (26,6)	83 (40,9)	137 (67,5)	
3	7 (3,4)	25 (12,3)	32 (15,8)	
Histotyp				
tubulär	61 (30,0)	112 (55,2)	173 (85,2)	0,882
muzinös	11 (5,4)	19 (9,4)	30 (14,8)	

*1: p: Signifikanz aus Chi-Quadrat-Test

*2: Proximal: Kolon bis zur linken Flexur; distal: distal der linken Flexur

Von den 72 sequenzierten Mutationen befanden sich 51 in den konservierten Bereichen des Gens, das entspricht 70,8%. 31 Mutationen (43,1%) entfielen auf Hot Spots innerhalb der konservativen Domänen: 3 (4,2%) wurden bei R175 gefunden, 6 (8,3%) bei G245, 7 (9,7%) bei R248, 11 (15,3%) bei R273 und 4 (5,6%) bei R282 (Einzelheiten siehe Tabelle 3 und Abbildung 4).

Unter den Mutationen fanden wir 47 Transitionen (Austausch einer Purinbase durch eine Purinbase, oder Austausch einer Pyrimidinbase durch eine Pyrimidinbase), 22 Transversionen (Austausch einer Purinbase durch eine Pyrimidinbase oder umgekehrt) und 3 Insertionen (Einbau eines zusätzlichen Nukleotid-Paares).

Die Mutationen waren zufällig über die verschiedenen Krankheitsstadien, Altersstufen und Differenzierungsgrade verteilt. Mutationen traten signifikant häufiger in distalen Tumoren auf, als in proximalen. Es gab zwischen diesen beiden Lokalisationen jedoch keine Unterschiede bezüglich der Prognose.

Die Unterschiede in den Überlebenszeiten zwischen Patienten mit und ohne Mutationen im p53-Gen erreichten keine statistische Signifikanz. Auch für Subgruppen bestimmter Mutationen konnten keine Unterschiede in den Überlebenszeiten beobachtet werden. Bei den 79 Patienten, die eine adjuvante Therapie erhalten hatten, zeigte sich der klinische Verlauf unabhängig vom Mutationsstatus. Das Auftreten von metachronen Metastasen in den UICC-Stadien I-III war unabhängig vom Mutationsstatus.

Unter den sequenzierten 72 Mutationen fanden sich acht stille Mutationen. Da für die Funktion von p53 die Proteinstruktur von entscheidender Bedeutung ist, und nicht die Basensequenz des zugrunde liegenden genetischen Codes, wurde eine zweite Überlebensanalyse durchgeführt, in der diese acht Fälle in der statistischen Auswertung nicht als Mutationen erfasst wurden. Die Ergebnisse entsprachen denen der Überlebensanalyse nach formalem Mutationsstatus.

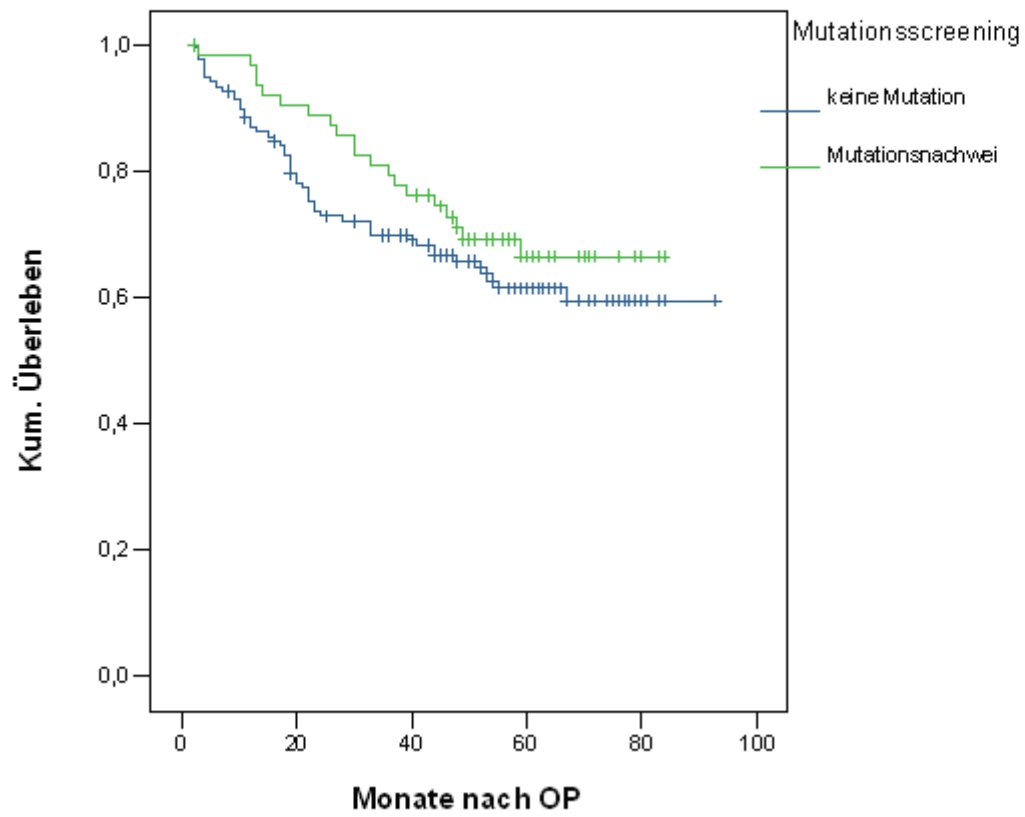


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse stratifiziert nach Mutationsstatus

Tabelle 3: Sequenzierte Mutationen

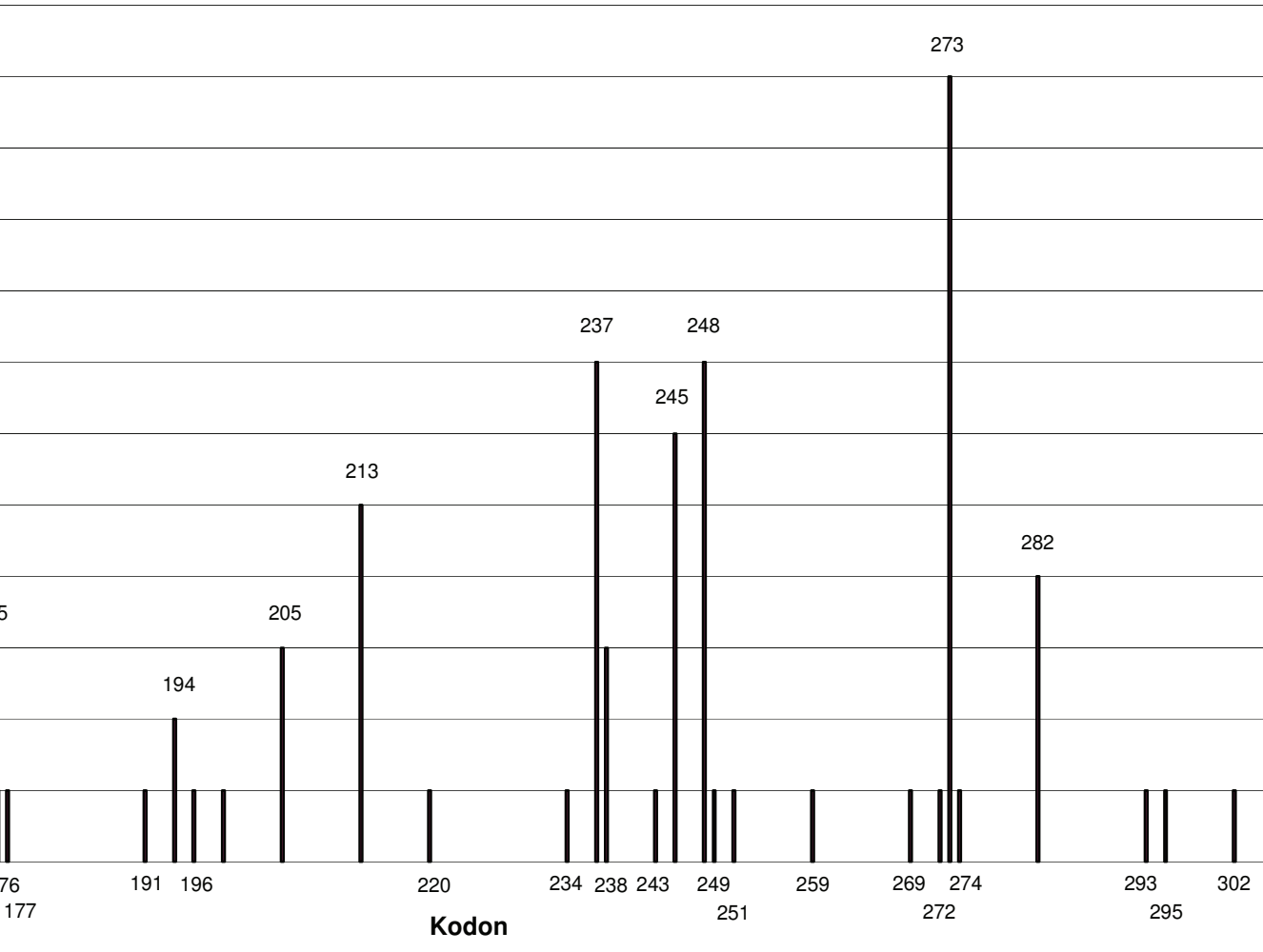
Nr.	Exon	Kodon	Sequenzänderung	Aminosäurenänderung	Mutationsart
1	5	146	TGG - TAG	Trp - STOPP	Transition
2	5	152	CCG - CTG	Pro -Leu	Transition
3	5	172	GTT - TTT	Val - Phe	Transversion
4	5	173	GTG - ATG	Val - Met	Transition
5	5	175	CGC - CAC	Arg - His	Transition
6	5	175	CGC - CAC	Arg - His	Transition
7	5	175	CGC - CAC	Arg - His	Transition
8	5	176	TGC - CGC	Cys - Arg	Transition
9	5	177	CCC - CTC	Pro - Leu	Transition
10	6	191	CCT - TCT	Pro - Ser	Transition
11	6	194	CTT - CAT	Leu - His	Transversion
12	6	194	CTT - CAT	Leu - His	Transversion
13	6	196	CGA - TGA	Arg - STOPP	Transition
14	6	199	GGA - AGA	Gly - Arg	Transition
15	6	205	TAT - TGT	Tyr - Cys	Transition
16	6	205	TAT - TGT	Tyr - Cys	Transition
17	6	205	TAT - CAT	Tyr - His	Transition
18	6	213	CGA - CGG	Arg - Arg	Transition
19	6	213	CGA - CGG	Arg - Arg	Transition
20	6	213	CGA - CGG	Arg - Arg	Transition
21	6	213	CGA - TGG	Arg - Trp	2 Transitionen
22	6	213	CGA - TGA	Arg - STOPP	Transition
23	6	220	TAT - TGT	Tyr - Cys	Transition
24	7	234	TAC - CAC	Tyr - His	Transition
25	7	237	ATG - ATT	Met - Ile	Transversion
26	7	237	ATG - ATT	Met - Ile	Transversion
27	7	237	ATG - ATT	Met - Ile	Transversion
28	7	237	ATG - ATT	Met - Ile	Transversion
29	7	237	ATG - ATA	Met - Ile	Transition
30	7	237	ATG - ATA	Met - Ile	Transition

31	7	237	ATG - TTG	Met - Leu	Transversion
32	7	238	TGT - TAT	Cys - Ser	Transition
33	7	238	TGT - TCT	Cys - Ser	Transversion
34	7	238	Zusätzliche Base		Insertion
35	7	243	ATG - CTG	Met - Leu	Transversion
36	7	245	GGC - AGC	Gly - Ser	Transition
37	7	245	GGC - AGC	Gly - Ser	Transition
38	7	245	GGC - AGC	Gly - Ser	Transition
39	7	245	GGC - AGC	Gly - Ser	Transition
40	7	245	GGC - AGC	Gly - Ser	Transition
41	7	245	GGC - GTC	Gly - Val	Transversion
42	7	248	CGG - AGG	Arg - Arg	Transversion
43	7	248	CGG - AGG	Arg - Arg	Transversion
44	7	248	CGG - AGG	Arg - Arg	Transversion
45	7	248	CGG - CAG	Arg - Gln	Transition
46	7	248	CGG - CAG	Arg - Gln	Transition
47	7	248	CGG - TGG	Arg - Trp	Transition
48	7	248	Zusätzliche Base		Insertion
49	7	249	AGG - AGT	Arg - Ser	Transversion
50	7	251	Zusätzliche Base		Insertion
51	7	259	GAC - GAG	Asp - Glu	Transversion
52	8	269	AGC - AGA	Ser - Arg	Transversion
53	8	272	GTG - ATG	Val - Met	Transition
54	8	273	CGT - CAT	Arg - His	Transition
55	8	273	CGT - CAT	Arg - His	Transition
56	8	273	CGT - CAT	Arg - His	Transition
57	8	273	CGT - CAT	Arg - His	Transition
58	8	273	CGT - CAT	Arg - His	Transition
59	8	273	CGT - TGT	Arg - Cys	Transition
60	8	273	CGT - TGT	Arg - Cys	Transition
61	8	273	CGT - TGT	Arg - Cys	Transition
62	8	273	CGT - TGT	Arg - Cys	Transition
63	8	273	CGT - CTT	Arg - Leu	Transversion

64	8	273	CGT - CTT	Arg - Leu	Transversion
65	8	274	GTT - GTG	Val - Val	Transversion
66	8	282	CGG - TGG	Arg - Trp	Transition
67	8	282	CGG - TGG	Arg - Trp	Transition
68	8	282	CGG - TGG	Arg - Trp	Transition
69	8	282	CGG - CCG	Arg - Pro	Transversion
70	8	293	GGG - AGG	Gly - Arg	Transition
71	8	295	CCT - CTT	Pro - Leu	Transition
72	8	302	GGG - GGC	Gly - Gly	Transversion

Nächste Seite:

Abbildung 4: Lokalisation und Verteilung der Mutationen



4. DISKUSSION

Da p53 in einer großen Anzahl von Tumoren genetische Veränderungen aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass dies einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorentstehung hat. Erhärtet wird diese Vermutung durch die nachgewiesenen molekularen Verbindungen zwischen p53 und der Regulation des Zellzykluses. Wenn das p53-Protein den Zellzyklus dahingehend beeinflusst, dass die Integrität der genetischen Information aufrechterhalten wird, bedeutet ein Funktionsverlust dieses Proteins, dass Zellen mit geschädigter DNA sich weiter teilen, ohne dass sie eine Möglichkeit zur Reparatur erhalten. Das zieht weitere genetische Aberrationen nach sich.

Nach dem Tumorprogressionsmodell von Fearon und Vogelstein (1990) sind eine Reihe von Onkogen-Aktivierungen und Tumorsuppressorgen-Inaktivierungen an der malignen Transformation von Normalgewebe über Adenome zu Karzinomen beteiligt. Mutation und Verlust des p53 Gens scheinen in der Adenom-Karzinom-Sequenz ein relativ spätes Ereignis zu sein. Das klinisch-pathologische Verhalten von Tumoren mit Veränderungen im p53 Gen wurde in vielen Studien untersucht. Diese Studien führten bisher bei kolorektalen Karzinomen zu keinen eindeutigen Ergebnissen.

Einige dieser Studien werden im Folgenden vorgestellt. Die Darstellung beschränkt auf Studien mit mehr als 100 eingeschlossenen Patienten und Studien, die eine ähnliche Methodik aufweisen wie die hier vorgestellte. Studien, bei denen Mutationen mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen wurden, sind aus folgenden Gründen nicht berücksichtigt: In einer Meta-Analyse von 84 Arbeiten, bei denen sowohl immunhistochemische Verfahren als auch eine Sequenzierung des p53-Gens durchgeführt wurde, errechneten Greenblatt und Mitarbeiter 1994 eine mittlere Sensitivität von lediglich 75% für den Nachweis von Mutationen durch immunhistologische Färbung (Variationsbreite 36-100%) und einen positiven Vorhersagewert von nur 63% (Variationsbreite 8-100%). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass man nicht zwingend von dem Vorhandensein von genetischen Aberrationen ausgehen kann, wenn per Immunhistologie eine Überexpression vorliegt. Es ist möglich, dass es auch ohne Mutation zur Akkumulation von p53 kommen kann,

beispielsweise durch die Stabilisierung des Proteins durch zelluläre Liganden oder virale Onkogene. Denkbar ist eine Anhäufung von p53 auch durch einen Feedback-Mechanismus, wenn eine Mutation ein Protein der p53-abhängigen Wirkkaskade betrifft. Umgekehrt können auch Mutationen auftreten, die nicht mittels Antikörper nachweisbar sind, zum Beispiel, weil sie einen Kettenabbruch induzieren und so nicht zu einer Überexpression führen. Die Aussagefähigkeit der immunhistologischen Untersuchung ist auch abhängig von der Art der verwendeten Antikörper. Eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien ist dadurch erschwert, dass manche Mutationen bei Anwendung von bestimmten Antikörpern nicht entdeckt werden können. Die Interpretation der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung ist zudem häufig uneinheitlich. Die Deklaration eines Ergebnisses als positiv oder negativ unterliegt je nach Untersucher verschiedenen Definitionen. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Studie der p53-Mutationsstatus molekularpathologisch bestimmt und der Vergleich nur mit entsprechenden publizierten Studien geführt.

Eine Übersicht über diese gibt Tabelle 4.

Prognostischen Aussagekraft von Mutationen im p53-Gen

Methode	Untersuchte Exons	Eingeschlossene Patienten	Beobachtungszeit [Monate]	Mutationen (%)	Prognostische Relevanz
SSCP	5 - 8	126	mind. 60	74 (58,7%)	Kein Zusammenhang
SSCP, Sequenzierung von 50% der Mutationen	4 - 9	192	im Mittel 24 (14-34)	109 (56,7%)	Schlechtere Prognose bei Patienten mit Mutationen
SSCP	5 - 8	541	im Mittel 87 (37-137)	194 (35,9%)	Trend zu besserer Prognose bei Patienten mit Mutationen
CDGE	5 - 8	222	im Mittel 56,8 (0,5-92,2)	102 (45,9%)	Kein Zusammenhang
Sequenzierung von cDNA	alle	189	Follow-up nach 49	99 (52,3%)	Schlechtere Prognose bei Patienten mit Mutationen
SSCP	4 - 9	328	im Mittel 45,5 (1-99)	166 (50,6%)	Schlechtere Prognose bei Patienten mit Mutationen
SSCP	4 - 8, 10	995	im Mittel 102 (33-178)	385 (38,6%)	Kein Zusammenhang
SSCP, Sequenzierung	5 - 8	1464	Follow-up nach 63	665 (45,4%)	Schlechtere Prognose bei Patienten mit Mutationen, häufiger Mutationen in höheren Stadien

in polymorphism electrophoresis

Bosari und Mitarbeiter fanden 1995 keine signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeiten von Patienten mit Mutationen im Vergleich zu den Patienten ohne Mutationen, auch nicht bezüglich anderer klinisch-pathologischer Parameter wie Krankheitsstadium, Differenzierungsgrad oder Tumorlokalisation.

In einer Arbeit von Goh und Mitarbeitern 1995 hatten Patienten mit Mutationen eine schlechtere Prognose als Patienten ohne Mutationen. Patienten mit Mutationen in konservierten Domänen hatten eine schlechtere Prognose als Patienten mit Mutationen außerhalb dieser Bereiche. Patienten mit Mutationen im Kodon 175 hatten die schlechteste Prognose. In einer Untergruppe von Patienten, die eine postoperative Radiatio oder Chemotherapie erhielten, hatten Patienten mit Mutationen kürzere Überlebenszeiten als Patienten ohne Mutationen.

Eine Untersuchung von Soong, Grier und Mitarbeitern aus dem Jahr 1997 ergab einen Trend zugunsten einer längeren Überlebenszeit von Patienten mit p53-Mutationen im Vergleich zu Patienten ohne Mutationen, ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Børresen-Dale und Mitarbeiter fanden 1998 keine signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeiten insgesamt zwischen den Patienten mit und ohne Mutationen. Eine Untergruppe von Patienten mit Mutationen in L3 hatte jedoch eine schlechtere Prognose, als Patienten mit anderen Mutationen oder ohne Mutationen. Da L3 maßgeblich an der DNA-Bindung von p53 beteiligt ist, führen Mutationen in diesem Bereich zum Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit, und das Protein kann in der Folge nicht mehr als Transkriptionsfaktor wirken. Bei Patienten mit linksseitigen Tumoren traten Transversionen häufiger auf als bei Patienten mit rechtsseitigen Tumoren. Bei Patienten mit linksseitigen Tumoren hatten diejenigen mit Mutationen kürzere Überlebenszeiten, als die ohne Mutationen. Dies veranlasste die Autoren zu der Annahme, dass die Tumorentstehung abhängig von der Tumorlokalisation ist.

Kressner und Mitarbeiter fanden 1999 in ihrer Studie kürzere Überlebenszeiten von Patienten mit Mutationen im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp p53. Hier führten Mutationen außerhalb der konservierten Regionen zu einer schlechteren Prognose als Mutationen in diesen Bereichen. Linksseitige Tumoren hatten häufiger Mutationen als rechtsseitige. Hier erfolgte eine Untersuchung des gesamten Gens

auf Mutationen. Auf diese Weise wurden mehr Mutationen in den nicht konservierten Bereichen des Gens gefunden, als das in Untersuchungen der Fall war, die sich auf einige Exons beschränkten.

Eine weitere Arbeit von Goh und Mitarbeitern aus dem Jahr 1999 zeigte erneut kürzere Überlebenszeiten für Patienten mit Mutationen. Eine Subgruppenanalyse zeigte, dass sich dieser Zusammenhang auf Patienten mit Lymphknotenbeteiligung, Patienten ohne Metastasen zum Zeitpunkt der Operation und Patienten mit linksseitigen Tumoren beschränkte. Die Autoren fanden eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Mutationen einerseits und dem Krankheitsstadium andererseits. Linksseitige Tumoren hatten auch hier signifikant häufiger Mutationen als rechtsseitige.

In einer im Jahr 2000 veröffentlichten Arbeit von Soong und Mitarbeitern wurde keine Assoziation zwischen dem Auftreten von Mutationen und dem Krankheitsstadium, dem histologischen Grading, dem Alter oder dem Geschlecht der Patienten gefunden. Mutationen zeigten keinerlei prognostischen Wert. Auch verschiedene Untergruppen von Mutationen hatten keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten. Mutationen traten auch hier in linksseitigen Tumoren häufiger auf als in rechtsseitigen. In der relativ kleinen Gruppe der Patienten, die postoperativ Chemotherapie erhalten hatten, gab es für die Patienten mit Mutationen einen Trend zu schlechteren Prognosen.

Die Studie mit der größten Zahl von eingeschlossenen Patienten wurde nach Beginn der hier vorgestellten Untersuchung von Samowitz und Mitarbeitern im Jahr 2002 veröffentlicht. Sie fanden p53-Mutationen häufiger in distalen Tumoren und in Tumoren höherer Stadien. In einer univariaten Analyse zeigten Tumoren mit Mutationen eine schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate als Tumoren ohne Mutationen. Es wurde kein Zusammenhang gefunden zwischen p53-Mutationsstatus, histologischem Tumortyp, Geschlecht und Alter. Diese Studie konnte die Annahme nicht erhärten, dass Mutationen in konservativen oder nichtkonservativen Domänen, in L3 oder im Kodon 175 mit Besonderheiten bezüglich des Überlebens einhergehen. In einer multivariaten Analyse, berichtigt nach Alter, Stadium und Tumorlokalisation konnte kein Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und

Überleben gefunden werden. Lediglich eine Subgruppe von Mutationen im Kodon 245 zeigte ein erhöhtes Risiko eines tumorbedingten Todes.

Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, die einen Einfluss auf die Ergebnisse solcher Studien haben.

Es ist zunächst von Bedeutung, wie das untersuchte Patientenkollektiv zusammengesetzt ist. In Hinblick auf das unterschiedliche Vorkommen von kolorektalen Karzinomen in verschiedenen Bevölkerungsschichten und in verschiedenen Regionen ist es verständlich, dass Untersuchungen zu Genveränderungen aus verschiedenen Teilen der Welt auch zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Bestimmte Essgewohnheiten und das Vorkommen von gewissen Mutagenen in der Umgebung und in der Nahrungskette können zu spezifischen Mutationsmustern führen und unterschiedliche Mutationshäufigkeiten erklären. Hier können auch Vererbungsmuster in der Bevölkerung eine Rolle spielen.

Die Studiengröße hat selbstverständlich einen Einfluss auf die Studienergebnisse. Je mehr Patienten in eine Studie eingeschlossen werden, desto eher können Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit gezogen werden, aus der die Patienten stammen. Sehr kleine Studien können durch einzelne Schicksale verzerrt werden.

Auch der Beobachtungszeitraum ist ein wichtiger Einflussfaktor. Die Prognose von Patienten mit Kolonkarzinom stellt sich im Moment folgendermaßen dar:

Patienten im UICC-Stadium I zeigen eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 80%, von den Patienten im UICC-Stadium II leben nach 5 Jahren noch 60-70%, von den Patienten im UICC-Stadium III sind nach 5 Jahren noch 30-40% am Leben, die Patienten im UICC-Stadium IV haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 5-20%, bei solitären, operablen Metastasen auch bis zu 25%. Bei Erkrankungen mit solchen relativ langen Überlebenszeiten können sich Überlebensvorteile, die sich bei der Auswertung nach einem kurzen Beobachtungszeitraum ergeben, zu späteren Zeitpunkten relativieren.

Das Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Untersuchung kann ebenfalls einen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse haben. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit alle Stadien in die Untersuchung einbezogen. Das ist nicht bei allen vorgestellten Studien der Fall.

Ein weiterer entscheidender Einflussfaktor ist die Untersuchungsart. Der Nachweis von Mutationen direkt auf DNA-Ebene ist am genauesten. Er kann über verschiedene Methoden erfolgen. Etabliert haben sich hier insbesondere der Nachweis mittels SSCP (single strand conformation polymorphism) und der Nachweis mittels TGGE (temperature gradient gel electrophoresis). Scholz et al. führten 1993 eine Studie zum Vergleich der beiden Methoden durch und bewerteten die TGGE als schnelle, sensitive und hoch reproduzierbare Screening-Methode zur Identifikation von Mutationen im p53-Gen. Der exakteste Mutationsnachweis ist der mittels DNA-Sequenzierung. Da dieser sehr aufwendig ist, hat es sich bewährt, zunächst ein Mutationsscreening durchzuführen, um anschließend die positiv getesteten Proben einer genauen Analyse zu unterziehen. Die Sensitivität der gewählten Screening-Methode ist ebenfalls ein kritischer Faktor.

Das Ausmaß der untersuchten Genabschnitte ist ebenfalls ein wichtiger Einflussfaktor. Je größer dieses Ausmaß ist, desto genauere Aussagen lassen sich treffen, allerdings wird die Untersuchung enorm aufwendig, wenn das gesamte Gen analysiert wird. Da in früheren Untersuchungen die überwiegende Mehrzahl der Mutationen in den Exons 5-8 des p53-Gens gefunden wurden (Greenblatt et al., 1994; Hamelin et al., 1994), haben wir uns in der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung dieser Abschnitte beschränkt. Mit der Untersuchung der Exons 5-8 findet man mit moderatem Aufwand eine Vielzahl von Mutationen, während man bei ausgedehnteren Untersuchungen einen großen zusätzlichen Aufwand betreiben muss, um relativ wenig mehr Mutationen zu finden. Diese Beschränkung birgt aber die Gefahr der Unterrepräsentation. Auch Mutationen in anderen Exons, den Introns oder der Promotorregion können die Expression und die Funktion von p53 beeinflussen.

In dieser Untersuchung konnten keine besonderen Verteilungsmuster von Mutationen im p53-Gen beobachtet werden, bis auf die Tatsache, dass Mutationen in distalen Tumoren häufiger auftraten als in proximalen. Da sich die Geschwindigkeit der Darmpassage nach distal verringert und im Darmlumen befindliche Mutagene so länger auf die Darmschleimhaut einwirken können, ist dieses Ergebnis plausibel. Auch in anderen Studien wurde dieser Zusammenhang beobachtet.

Die Gesamtheit der in diesem Patientenkollektiv gefunden Mutationen ist mit 35,5% im Vergleich zu anderen Studien eher niedrig. Gründe dafür könnten die Paraffineinbettung der Gewebeschnitte sein, die die Mutationsanalyse erschwerten oder die Tatsache, dass das Kollektiv aus einer eher ländlichen Region stammt. Epidemiologische Erhebungen haben gezeigt, dass kolorektale Karzinome in städtischen Ballungszentren häufiger auftreten als in ländlichen Gebieten.

Auf den klinischen Verlauf der Erkrankung hatte der Mutationsnachweis entgegen der dieser Studie zugrunde liegenden Hypothese keinen Einfluss. Damit ist seine Erhebung weder für die Prognosestellung noch für die Prädiktion von praktischer Bedeutung. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen mittlerweile zu diesem Thema veröffentlichten Studien, die ebenfalls keinen Zusammenhang oder lediglich einen leichten Effekt fanden.

5. THESEN ZUR DISSERTATION

Das Phosphoprotein p53 erhält über verschiedene Mechanismen die Integrität der genetischen Information einer Zelle aufrecht. Funktionsverluste dieses Proteins konnten bei vielen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden, und waren bei einigen Tumorarten auch mit einem kürzeren Überleben korreliert. Beim kolorektalen Karzinom führten solche Untersuchungen bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive klinisch-pathologische Untersuchung zu Häufigkeiten und Arten von Mutationen im p53-Gen bei kolorektalen Karzinomen und ihre Auswirkungen auf den klinischen Verlauf der Erkrankung und die Wirkung von adjuvanten Therapien.

Dazu wurde Tumormaterial zunächst mittels Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) auf Mutationen gescreent. Bei positivem Ergebnis wurde die DNA der Exons 5-8 des p53-Gens sequenziert, um die genaue Mutation festzustellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden mit dem klinischen Verlauf verglichen.

Es wurden 209 Patienten in die Studie eingeschlossen, die in den Jahren 1994-1999 in der Klinik für Chirurgie der Universität Rostock an einem primären, singulären, nichtmetachronen kolorektalen Karzinom operiert wurden. Perioperativ verstorbene Patienten wurden ausgeschlossen. Bei 78 Tumoren fiel das Mutations-Screening positiv aus, bei 72 gelang die Sequenzierung.

Von den entdeckten Mutationen fanden sich 70,8% in den hochkonservierten Bereichen des Gens, 43,1% entfielen auf Hot Spots innerhalb dieser hochkonservierten Bereiche. Es wurden 4,2% bei R175 gefunden, 8,3% bei G245, 9,7% bei R248, 15,3% bei R273 und 5,6% bei R282.

Die Mutationen waren zufällig über die verschiedenen Krankheitsstadien, Altersstufen, Differenzierungsgrade und histologische Typisierungen verteilt.

Mutationen traten häufiger in Tumoren des Linkskolons und des Rektums auf als im proximalen Kolon.

Es wurden keine Unterschiede in den Überlebenszeiten zwischen Patienten mit und ohne Mutationen gefunden. Bei Patienten, die eine adjuvante Therapie erhalten hatten, zeigte sich der klinische Verlauf ebenfalls unabhängig vom Mutationsstatus. Subgruppen von bestimmten Mutationen (Transitionen, Transversionen, Insertionen, Hot Spot-Mutationen) hatten ebenfalls keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf.

Diese Ergebnisse reihen sich ein in mittlerweile auch von anderen Autoren veröffentlichte Untersuchungen zu dieser Fragestellung, die bei Detektion von Mutationen auf DNA-Ebene und Vergleich mit klinisch-pathologischen Daten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang fanden.

Der Prozentsatz der in diesem Patientenkollektiv gefundenen Mutationen ist im Vergleich zu anderen Studien eher niedrig. Gründe dafür könnten die Paraffineinbettung der Gewebeschnitte sein, die die Mutationsanalyse erschweren, oder die Tatsache, dass das Kollektiv aus einer eher ländlichen Region stammte. In solchen Gebieten treten kolorektale Karzinome seltener auf als in städtischen Ballungszentren.

Der auch in anderen Arbeiten gefundene Zusammenhang von erhöhter Mutationshäufigkeit bei distaler Lokalisation der Tumoren, lässt sich dadurch erklären, dass im Darmlumen befindliche Mutagene im distalen Kolon eine längere Kontaktzeit zur Darmmukosa haben und deshalb dort mehr Mutationen auslösen können.

Der Mutationsnachweis hatte entgegen der zugrunde gelegten Hypothese keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Erkrankung. Seine Erhebung scheint damit für die Prognosestellung nicht von praktischer Bedeutung.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Wilson JK & Vogelstein B:
Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type 53
Science 249, 912-915 (1990)
- Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR & Prives C:
A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wildtype but not from oncogenic mutant p53 protein
Genes & Development 7, 2565-2574 (1993)
- Børresen-Dale AL, Lothe RA, Meling GI, Hainaut P, Rognum TO & Skovlund E:
TP53 and long-term prognosis in colorectal cancer: mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival
Clinical Cancer Research 4, 203-210 (1998)
- Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AKC & Coggi G:
p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma
American Journal of Pathology 147, 790-798 (1995)
- Chen PL, Chen Y, Bookstein R & Lee WH:
Genetic mechanisms of tumour suppression by human p53 gene
Science 250, 1576-1580 (1990)
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD & Pavletich NP:
Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations
Science 265, 346-355 (1994)
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA & Bouck N:
Control of Angiogenesis in Fibroblasts by p53 Regulation of Thrombospondin-1
Science 265, 1582-1584 (1994)
- El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW & Vogelstein B:
Definition of a consensus binding site for p53
Nature Genetics 1, 45-49 (1992)
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D & Oren M:
Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells
Nature 312, 646-649 (1984)
- Fearon ER & Vogelstein B:
A genetic model for colorectal tumorigenesis
Cell 61, 759-767 (1990)

- Finlay CA, Hinds PW & Levine AJ:
The protooncogene p53 can act as a suppressor of transformation
Cell 57,1083-1093 (1989)
- Goh HS, Elnatan J, Low CH & Smith DR:
TP53 point mutation and survival in colorectal cancer patients: effect of disease dissemination and tumour location
International Journal of Oncology 15, 491-498 (1999)
- Goh HS, Yao J & Smith DR:
P53 point mutation and survival in colorectal cancer patients
Cancer Research 55, 5217-5221 (1995)
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M & Harris CC:
Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis
Cancer Research 54, 4855-4878 (1994)
- Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jago N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ & Thomas G:
Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer
Gastroenterology 106, 42-48 (1994)
- Hansen RS & Braithwaite AW:
The growth-inhibitory function of p53 is separable from transactivation, apoptosis and suppression of transformation by E1a and Ras
Oncogene 13, 995-1007 (1996)
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K & Elledge SJ:
The p21 Cdk-interacting protein Cipl is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases
Cell 75, 805-816 (1993)
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A & Oren M:
Mdm2 promotes the rapid degradation of p53
Nature 387, 296-299 (1997)
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW & Vogelstein B:
14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression
Molecular Cell 1, 3-11 (1997)
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B & Harris CC:
p53 mutations in human cancers
Science 253, 49-53 (1991)
- Horikoshi N, Usheva A, Chen J, Levine AJ, Weinmann R & Shenk T:
Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13SE1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression
Molecular And Cellular Biology 15, 227-234 (1995)

- Iniesta P, Vega FJ, Caldés T, Massa MJ, de Juan C, Cerdán FJ, Sánchez A, López JA, Torres AJ, Balibrea JL & Benito M:
p53 Exon 7 mutations as a predictor of poor prognosis in patients with colorectal cancer
Cancer Letters 130, 153-160 (1998)
- Jenkins JR, Rudge K & Currie GA:
Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53
Nature 312, 651-654 (1984)
- Jernvall P, Mäkinen M, Karttunen T, Mäkelä J & Vihko P:
Conserved region mutations of the p53 gene are concentrated in distal colorectal cancers
International Journal of Cancer 74, 97-101 (1997)
- Kahlenberg MS, Stoler DL, Rodriguez-Bigas MA, Weber TK, Driscoll DL, Anderson GR & Petrelli NJ:
p53 tumor suppressor gene mutations predict decreased survival of patients with sporadic colorectal carcinoma
Cancer Vol.88, No.8, 1814-1819 (2000)
- Kenji S, Seisuke F, Toshiki M, Koichi M, Tatsuya Y, Chizu T, Michio O, Yusuke N & Hirofumi A:
Identification of Fractalkine, a CX3C-type chemokine, as a direct target of p53
Cancer Research 60, 3722-3726 (2000)
- Ko LJ & Prives C:
p53: puzzle and paradigm
Genes & Development 10, 1054-1072 (1996)
- Koichi M, Koji Y, Yoichi T, Kozo N, Yusuke N & Hirofumi A:
p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway
Cancer Research 62, 2883-2889 (2002)
- Kressner U, Inganäs M, Byding S, Blikstad I, Pählman L, Glimelius B & Lindmark G:
Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer
Journal of Clinical Oncology Vol.17 (No2), 593-599 (1999)
- Kubbutat MH, Jones SN & VousdenKH:
Regulation of p53 stability by Mdm2
Nature 387, 299-303 (1997)
- Lane DP & Crawford LV:
T-antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells
Nature 278, 261-263 (1979)
- Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'Donoghue DP & Parfrey NA:
Prognostic significance of TP53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis
Journal of Pathology 180, 364-370 (1996)

- Lim BH, Soong R, Grieu F, Robbins PD, House AK & Iacopetta BJ:
TP53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma
International Journal of Cancer 69, 200-204 (1996)
- Linzer DIH & Levine AJ:
Characterization of a 53 kD cellular SV40 tumour antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells
Cell 17, 43-52(1979)
- Lowe S, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Houseman DE & Jacks T:
p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo
Science 266, 807-810 (1994)
- Martinez J, Georgoff I, Martinez J & Levine AJ:
Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature sensitive p53 protein
Genes & Development 5, 151-159 (1991)
- Miyashita T & Reed JC:
Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene
Cell 80, 293-299 (1995)
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D & Rotter V:
Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and *ras* in cellular transformation
Nature 312, 649-651 (1984)
- Pavletich NP, Chambers KA & Pabo CO:
The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots
Genes & Development 7, 2556-2564 (1993)
- Pellegata NS, Ranzani GN:
The significance of p53 mutations in human cancer
European Journal of Histochemistry 40, 272-282 (1996)
- Pharoah PD, Day NE & Caldas C:
Somatic mutations in the TP53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis
British Journal of Cancer 80, 1968-1973 (1999)
- Powell B, Soong R, Iacopetta BJ, Seshadri R & Smith DR:
Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the TP53 gene in breast cancer
Clinical Cancer Research 6, 443-451 (2000)
- Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E:
Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53
Biochemistry 36, 10117-10124 (1997)

- Samowitz WS, Curtin K, Ma K, Edwards S, Schaffer D, Leppert MF & Slattery ML:
Prognostic significance of p53 mutations in colon cancer at the population level
International Journal of Cancer 99, 597-602 (2002)
- Scholz RB, Milde-Langosch K, Jung R, Schlechte H, Kabisch H, Wagener C & Löning T:
Rapid screening for Tp53 mutations by temperature gradient gel electrophoresis: a comparison with SSCP analysis
Human Molecular Genetics Vol. 2, No. 12, 2155-2158 (1993)
- Soong R, Grieu F, Robbins P, Dix B, Chen D, Parsons R, House A & Iacopetta B:
p53 alterations are associated with improved prognosis in distal colonic carcinomas
Clinical Cancer Research 3, 1405-1411 (1997)
- Soong R, Iacopetta BJ, Harvey JM et al.:
Detection of TP53 gene mutation by rapid PCR-SSCP and its association with poor survival in breast cancer
International Journal of Cancer 74, 642-647 (1997)
- Soong R, Powell B, Elsaleh H, Gnanasampanthan G, Smith DR, Goh HS, Joseph D & Iacopetta B:
Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma: influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation
European Journal of Cancer 36, 2053-2060 (2000)
- Soussi T, Caron de Fromental C & May P:
Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution
Oncogene 5, 945-952 (1990)
- Soussi T & May P:
Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look
Journal of Molecular Biology 260, 623-637 (1996)
- Stewart ZA, Tang LJ, & Pieterpol JA:
Increased p53 phosphorylation after microtubule disruption is mediated in a microtubule inhibitor- and cell-specific manner
Oncogene 20, 113-124 (2001)
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y & Nakamura Y:
A ribonucleotide reductase gene involved in a p53 dependent DNA damage checkpoint
Nature 404, 42-49 (2000)
- Unger T, Nau MM, Segal S & Minna JD:
p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer
The EMBO Journal 11, 1383-1390 (1992)

- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L & Debussche L:
The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of
apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with
transcriptional repression
The EMBO Journal 17, 4668-4679 (1998)
- Wang Y, Reed M, Wang P, Stenger JE, Mayr G, Anderson ME, Schwedes JF &
Tegtmeyer P:
p53 domains: identification and characterisation of two autonomous DNA-
binding regions
Genes & Development 7, 2575-2586 (1993)
- Wang Y, Schwedes JF, Parks D, Mann K & Tegtmeyer P:
Interaction of p53 with its consensus DNA-binding site
Molecular And Cellular Biology 15, 2157-2165 (1995)
- Wolkowicz R, Peled A, Elkind NB & Rotter V:
DNA-binding activity of wild-type p53 protein is mediated by the central part of the
molecule and controlled by its C-terminus
Cancer Detection and Prevention, 22(1), 1-13(1998)

DANK

Ich danke Herrn Prof. Dr. Malte Barten und Herrn PD Dr. Friedrich Prall für die Bereitstellung des Themas, Herrn Prall auch für die Übernahme der Betreuung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit, für viele hilfreiche Anregungen und Kritik.

Ich danke Frau Dr. Christiane Ostwald für die freundliche Einarbeitung in den experimentellen Teil der Arbeit und die kompetente Unterstützung bei allen hier auftretenden Problemen, sowie ihrer Mitarbeiterin Frau S. Stegemann für die Unterstützung bei der Durchführung der laborchemischen Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern - für alles.