Aus dem Institut für Gynäkopathologie des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg Direktor: Prof. Dr. med. Th. Löning

Das Tumorsuppressorgen p16/INK4a in epithelialen Ovarialkarzinomen

- Eine Mutations-, Expressions- und Methylierungsanalyse -

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Erika Ocon

aus Bukarest

Göttingen, 2003

Inhalt

Ał	okürz	ungsve	rzeichnis	5	
1.	EIN	LEITU	NG	7	
				_	
	1.1.	Ovaria	alkarzinome	7	
		1.1.1.	Klassifikation und Pathologie der epithelialen Ovarialkarzinome	7	
		1.1.2.	Epidemiologie	10	
		1.1.3.	Prognoseparameter des Ovarialkarzinoms	11	
	1.2.	p16 –	Bedeutung für den Zellzyklus und die Tumorentstehung	14	
		1.2.1.	Entdeckung und Klassifikation des INK4a-Gens	14	
		1.2.2.	Zellzyklus-Regulation	14	
		1.2.3.	Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) und Zykline:		
			Positive Zellzyklus-Regulatoren	15	
		1.2.4.	CDK-Inhibitoren: Negative Zellzyklus-Regulatoren	17	
		1.2.5.	Das Tumorsuppressorgen INK4a und seine Produkte	20	
		1.2.6.	p16-Inaktivierung in humanen Malignomen	23	
	1.3.	Ziele o	der Untersuchungen	24	
2.	MA	TERIA	L UND METHODEN	25	
	2.1.	Mater	ial	25	
		2.1.1.	Untersuchungsmaterial	25	
		2.1.2.	Verwendete Chemikalien und Enzyme	29	
		2.1.3.	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	30	
	2.2.	2. Methoden			
		2.2.1.	Immunhistochemie	32	
		2.2.2.	Mikrodissektion: Materialgewinnung und –vorbehandlung		
			für die PCR-SSCP-Durchführung	34	
		2.2.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36	

2.2.4.	Agarose-Gelelekrophorese	41
2.2.5.	DNA-Fällung	42
2.2.6.	SSCP-Analyse (single strand conformation polymorphism analysis)	43
2.2.7.	DNA-Sequenzierung	47
2.2.8.	Methylierungsspezifische PCR (MSP)	48
2.2.9.	Statistik	51

3. ERGEBNISSE

Immunhistochemie	52
Ergebnisse der Deletionsanalyse mittels PCR	57
Ergebnisse der Mutationsanalyse	
durch SSCP-Anwendung und Sequenzierung	58
Ergebnisse der Methylierungsanalyse mittels MSP	62
Pathologie	63
	Immunhistochemie Ergebnisse der Deletionsanalyse mittels PCR Ergebnisse der Mutationsanalyse durch SSCP-Anwendung und Sequenzierung Ergebnisse der Methylierungsanalyse mittels MSP Pathologie

4. DISKUSSION

4.1.	Diskussion der Ergebnisse	66
4.2.	Diskussion der Methoden	75

5. ZUSAMMENFASSUNG

Literaturverzeichnis	82
Bildanhang	100
Danksagung	105
Lebenslauf	106
Erklärung	107

Abkürzungsverzeichnis

А	Adenin
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	Alternative reading frame
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
С	Cytidin
CAKs	CDK activating kinases = CDK aktivierende Kinasen
CDKs	Cyclin dependent kinases = Zyklin-abhängige Kinasen
CKIs	CDK-Inhibitoren
CpG	Cytidin precedes Guanin
	= in einem Codon geht Cytidin Guanin voran
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxy-Nukleotid-Triphosphate
EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat (=Titriplex III)
end.	endometrioid
FIGO	Federation internationale de Gynecologie et d'Obstetrique
G	Guanin
Grad.	Grading
h	Stunde
HBOC	hereditary Breast Ovarian cancer syndrome
Histo	Histologie
HNCCS	hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome
HOC	herditary ovarian cancer syndrome
IHC	Immunhistochemie
IL-2	Interleukin 2
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
Konz.	Konzentration
LOH	Loss of Heterocygosity = Verlust der Heterozygotie
Μ	Molar
MDM2	humanes Onkogen, murine double minute 2-Onkogene

Methyl.	Methylierung
Methyl. Sensit. Enz.	Methylierungssensitive Enzyme
min.	Minute
MOPS	Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MSP	Methylierungsspezifische PCR
Mut.	Mutation
muz.	muzinös
neg.	negativ
nd	nicht durchgeführt
PBS	Phosphate buffer saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
pos.	positiv
pRb	Retinoblastom-Tumorsuppressorgen
ser.pap.	serös-papillär
somat.	somatisch
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SV40	Simian Virus 40
Т	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
TGF-â	transforming growth factor â
Thr	Threonin
TNM	Tumor / Nodulus / Metastase
Transit.	Transition
Transvers.	Transversion
und., undiff.	undifferenziert
UPM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	world health organization
wt	Wildtyp

1. EINLEITUNG

1.1. Ovarialkarzinome

Hinter dem Begriff "Ovarialkarzinome" verbirgt sich eine Vielzahl von Neoplasien unterschiedlicher histogenetischer Herkunft. Nach der Klassifikation der WHO von 1976 werden gemäß dem Histogeneseprinzip Ovarialtumoren in acht Hauptgruppen unterteilt, von denen im weiteren Verlauf nur die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gruppe der epithelialen Tumoren besprochen wird (s. Tab. 1.2.).

1.1.1. Klassifikation und Pathologie der epithelialen Ovarialkarzinome

Unter den malignen Tumoren des Ovars erweisen sich die epithelialen Karzinome mit 90% als die größte Gruppe. Es wird davon ausgegangen, dass die epithelialen Karzinome durch maligne Transformation des Oberflächenepithels entstehen. Vermutlich kommt es durch kontinuierliche Ovulationen zu Invaginationen des Oberflächenepithels mit Ausbildung epithelialer Inklusionszysten, welche den Ursprung epithelialer Karzinome zu bilden scheinen (Saigo 1993, Pfleiderer 1996). Das Oberflächenepithel leitet sich histogenetisch vom Zölomepithel ab, wodurch sich dessen Potenz zu verschiedenen Differenzierungen erklären lässt (Saigo 1993, Stegner 1994). Unklar ist bislang, ob diese neoplastische Transformation zum invasiven Karzinom direkt erfolgt oder beispielsweise über die Zwischenstufen eines benignen Tumors oder eines sog. "Borderline-Tumors", der auch Tumor mit geringem Malignitätspotenzial (LMP-Tumoren = Tumors of low malignant potential) genannt wird (Pfleiderer 1996, Matias-Guiu et Prat 1998, Evans et al. 1999, Schmidt-Matthiesen et al. 2000). Im Gegensatz zum Karzinom liegt beim Borderline-Tumor kein invasives und destruktives Wachstum vor (Pfleiderer 1996, Kommoss et al. 2001). Dieses kann aber durchaus infolge von Invaginationen vorgetäuscht werden (Saigo 1993). 10% der serösen Borderline-Tumoren weisen eine sog. Mikroinvasion auf, die sich jedoch nicht ungünstig auf die Prognose auszuwirken scheint (Lee et Scully 2000, Seidman et Kurman 2000, Kommoss et al. 2001). Gemäß der histologischen Klassifikation sind die vier häufigsten histologischen Subtypen seröse, muzinöse, endometrioide sowie undifferenzierte Karzinome (Tab. 1. 1.).

Die weitaus größte Gruppe bilden die serösen Ovarialkarzinome mit 40-50% aller malignen Ovarialtumoren. Sie kommen am häufigsten zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr vor. In ungefähr 50-80% der Fälle sind beide Ovarien betroffen *(s. Tab. 1.1.; Schmidt-Matthiesen et al. 2000).* Makroskopisch imponieren sie als zystisch-papilläre Tumoren mit soliden Anteilen sowie Nekroseherden und Einblutungen. Die Oberfläche des Ovars erscheint glatt, solange der Tumor die Kapsel nicht durchbrochen hat *(Saigo 1993, Stegner 1994)*.

Hauptgruppe	Tumortyp	Häufigkeit	Bilateralität	
Epitheliale Tumoren	Seröse Zystadenokarzinome Muzinöse Zystadenokarzinome Endometrioide Karzinome Klarzellige Karzinome Undifferenzierte Karzinome	40-50% 10% 15-25% 5% 10%	≈ 50% < 50% < 50% meist einseitig > 50%	
Mesenchymale Tumoren	Granulosazelltumoren Thekazelltumoren Androblastome	1-5% selten selten	meist einseitig meist einseitig meist einseitig	
Keimzelltumoren	Dysgeminome Teratoblastome	5% selten	meist einseitig meist einseitig	

Tab.1.1.: Relative Häufigkeit und beidseitiges Vorkommen bei malignen Ovarialtumoren (modifiziert nach Stegner 1994)

Die muzinösen Karzinome machen ungefähr 10% aller primären Ovarialkarzinome aus und betreffen überwiegend 30- bis 50-jährige Frauen. In der Mehrzahl der Fälle treten sie einseitig auf. Das makroskopische Erscheinungsbild zeigt einen oberflächlich meist glatten Tumor, dessen Schnittfläche solide schwammige oder mikrozystische Bezirke neben großen gekammerten Hohlräumen mit viskösem Zysteninhalt aufweist. Entdifferenzierte Tumoren verlieren die Fähigkeit zur Schleimbildung. Mikroskopisch finden sich häufig gut differenzierte Tumoren mit charakteristischen Zellen, die den endozervikalen Zellen ähneln (Saigo 1993) und irreguläre atypische Drüsenschläuche sowie solide Komplexe bilden. Die Unterscheidung zwischen gut differenzierten Karzinomen und den sog. Borderline-Tumoren erfolgt anhand der vorliegenden Stromainvasion (Saigo 1993).

Endometrioide Karzinome stellen mit 15-25% aller Ovarialkarzinome die zweitgrößte Gruppe dar und weisen einen Häufigkeitsgipfel im 5. und 6. Lebensjahrzehnt auf. Sie kommen in 30 bis 50% der Fälle bilateral vor (*Tab. 1.1.*). Es besteht offensichtlich eine Assoziation zur Endometriose, deren Rate maligner Transformationen auf weniger als 2% geschätzt wird (*Saigo 1993*). Die überwiegende Zahl der endometrioiden Karzinome entwickelt sich jedoch direkt aus dem Oberflächenepithel des Ovars, welches die Potenz zur endometrialen Differenzierung besitzt. Endometrioide Karzinome des Ovars sind in 15-25% der Fälle

vergesellschaftet mit Endometriumkarzinomen, wobei nicht immer eindeutig geklärt werden kann, ob es sich um zwei unabhängig voneinander entstandene Karzinome handelt oder ob eine Ovarialmetastase eines Endometriumkarzinoms vorliegt *(Saigo 1993)*. Makroskopisch finden sich Tumoren mit zystischen und soliden Anteilen, häufig durchsetzt von Nekrosen und Einblutungen *(Stegner 1994)*.

Ι	Epitheliale Tumoren		
А	SeröseTumoren:		
		1.	Benigne Zystadenome und Zystadenofibrome
		2.	Proliferierende Zystadenome und Zystadenofibrome
	.	3.	Zystadenokarzinome
В	Muzinose Tumoren:	1	
		1. 2	Benigne Zystadenome und Zystadenofibrome
		2. 3	Zystadenokarzinome
C	Endometrinide Tumore	5.	ZystadenokarZinome
C		1.	Benigne Zystadenome und Zystadenofibrome
		2.	Proliferierende Zystadenome und Zystadenofibrome
		3.	Adenokarzinome
D	Klarzellige Tumoren:		
		1.	Benigne
		2.	Proliferierende
		3.	Maligne
E	Brenner-Tumoren:	1	ר. י
		1. 2	Benigne
		2. 3	Maligne
F	Gemischte enitheliale	J. Tumi	nren [,]
1		1.	Benigne
		2.	Proliferierende
		3.	Maligne
G	Undifferenzierte Karzii	าอท	<u>e</u>
Н	Unklassifizierte epithel	iale	Tumoren
II	Tumoren des sexuell d	liffe	renzierten Mesenchyms
ш	Lipoidzelltumoren		·
IV	Keimzelltumoren		
V	Gonadoblastome		
v VI	Unanozificaha Dindago	wol	actumoran
V I VIT		wei	JSUIII01 011
V 11	Unklassifizierte 1 umo	oren	
VIII	Metastatische Tumore	en	

Tab.1.2.: Histologische Klassifikation der Ovarialtumoren (WHO 1973, verkürzt nach Stegner, 1994)

1.1.2. Epidemiologie

Epidemiologische Faktoren, die eine ununterbrochene Ovulation bewirken, sind als Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom seit längerem bekannt (*Fathalla 1971, Narod et al. 1998*). Je häufiger Ovulationen auftreten, um so wahrscheinlicher wird die Entstehung eines Ovarialkarzinoms. Nach jeder Ovulation muss das Oberflächenepithel proliferieren und über die entstandene Wunde wachsen. Im Laufe dieser häufigen Zellteilungen ist das Risiko von Mutationen groß (*Kaufmann et Minckwitz 1995*).

Beeinflusst wird die Ovulationshäufigkeit durch die Dauer der fertilen Lebensphase (frühe Menarche, späte Menopause), die Zahl der Schwangerschaften und die Einnahme von sie Ovulationshemmern, wodurch als Risikofaktoren für die Entstehung des Ovarialkarzinoms von Bedeutung sind (Stegner 1994). Das Risiko nimmt mit der Einnahmedauer von oralen Kontrazeptiva und der Anzahl der Schwangerschaften ab (Cramer et al. 1982, Kaufmann et Minckwitz 1995, Claus et Schwartz 1995, Narod et al. 1998). Aber nicht nur eine hohe Parität, sondern auch ein langes Zeitintervall zwischen erstem und letztem Kind sowie insbesondere ein höheres Alter bei Geburt des letzten Kindes scheinen vor allem bei hereditären Ovarialkarzinomen einen protektiven Effekt auszuüben (Godard et al. 1998). Daraus lässt sich folgern, dass eine physiologisch oder medikamentös bedingte Ovulationsruhe bzw. -hemmung eine protektive Wirkung bezüglich einer neoplastischen Entartung des Ovarepithels hat (Cramer et al. 1983, Stegner 1994, Narod et al. 1998).

Die Einnahme oraler Kontrazeptiva reduziert das Risiko einer Entstehung von Malignomen der Ovarien. Auch bezüglich hereditärer Formen von Ovarialmalignomen scheint dies zu gelten (Narod et al. 1998, Godard et al. 1998). Dabei ist zum einen die Dauer der Einnahme oraler Kontrazeptiva entscheidend: Mit zunehmender Einnahmedauer sinkt das Erkrankungsrisiko um 50% und mehr (Whittemore et al. 1992, Narod et al. 1998). Zum Anderen spielt das Alter bei letzter Einnahme von Ovulationshemmern eine wichtige Rolle: So scheint sich gerade ein höheres Alter bei letzter Einnahme sowohl bei sporadischen als auch bei hereditären Ovarialkarzinomen protektiv auszuwirken (Godard et al. 1998).

Auch die Tubensterilisation und Hysterektomie senken das Erkrankungsrisiko. Eine positive Eigen- oder Familienanamnese bezüglich Brustkrebs gehört zu den bedeutenden Risikofaktoren für die Enstehung von Ovarialkarzinomen *(Godard et al. 1998)*.

Mit Ausnahme der hereditären Ovarialkarzinomfamilien mit offenbar autosomal-dominanter Vererbung unterschiedlicher Penetranz existiert bei der Mehrzahl der Ovarialkarzinome augenscheinlich keine genetische Fixierung (*Gallion et al. 1995, Kaufmann et Minckwitz 1995*). Eine positive Familienanamnese gilt jedoch als wichtiger Risikofaktor. Für Verwandte ersten Grades besteht ein 1,5 - 3,6fach erhöhtes Risiko, ebenfalls an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (*Claus et Schwartz 1995, Kaufmann et Minckwitz 1995, Godard et al. 1998*).

Bei 5-10% der Ovarialkarzinom-Patientinnen liegt eine vererbte Prädisposition für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms vor. Es wurden drei hereditäre Ovarial-Karzinom-Syndrom (HBOC, hereditary breast ovarian cancer syndrome), (2) das multiple Karzinom (Kolon-, Endometrium-, Ovarial-Karzinom, andere solide Tumoren) oder auch HNCCS genannt (hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome), (3) das hereditäre Ovarialkarzinom-Syndrom (*HOC*, hereditary ovarian cancer syndrome; Lynch et al. 1993, Buller et al. 1993, Godard et al. 1998, Kiechle et al. 2001). In Familien mit positiven Anamnesen bezüglich Mamma-Ovarial-Karzinomen liegen gehäuft Keimbahnmutationen der Tumorsuppressorgene BRCA-1 und BRCA-2 vor (*Matias-Guiu et Prat 1998*). Das kumulative Risiko für die Entstehung eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms beträgt bei Trägerinnen eines mutierten BRCA1-Gens schätzungsweise 76% bis zum 70. Lebensjahr (*Gallion et al. 1995*).

1.1.3. Prognoseparameter des Ovarialkarzinoms

Ihrer Inzidenz zufolge stehen die Ovarialkarzinome mit 15% aller gynäkologischen Neoplasien nach Zervix- und Korpuskarzinomen unter den Neoplasien der weiblichen Genitalorgane an dritter Stelle (*Stegner 1994, Schmidt-Matthiesen et al. 2000*), nach ihrer Mortalität betrachtet jedoch unverändert an erster Stelle.

Als aussagekräftigster prognostischer Faktor gilt nach wie vor der postoperative Residualtumor, der im günstigsten Fall kleiner als 1 cm sein sollte (Hunter et al. 1992, Kuhn et al. 1994, Kaufmann et Minckwitz 1995). Von ebenso entscheidender Bedeutung für die Prognose des Ovarialkarzinoms sind zum einen die primäre Ausdehnung (Staging), beschrieben durch die TNM- bzw. FIGO-Klassifikation (Tab.1.3.), zum Anderen der histologische Typ sowie die maligne Potenz des Tumorgewebes, erkennbar an Parametern wie Differenzierungsgrad (Grading), Ploidie und Proliferationsrate. Nach dem histologischen Differenzierungsgrad erfolgt die Einteilung in gut differenzierte (G I), mäßig (G II) und undifferenzierte (G III) Ovarialkarzinome. Neben der Bestimmung des Differenzierungsgrades kommen auch noch biochemische Messmethoden zur Anwendung:

Mittels DNA-Zytophotometrie lässt sich der nukleäre DNA-Gehalt messen, der Aufschlüsse über den Ploidiegrad in Tumoren erlaubt (*Friedländer et al. 1988, Brescia et al. 1990, Lage et al. 1992, Saigo 1993, Trope et Kaern 1994, Kühn et al. 2000*). Aneuploidie findet sich in Karzinomen sowie in Borderline-Tumoren mit schlechterer Prognose (*Padberg et al. 1992, Kaufmann et Minckwitz 1995, Diebold et al. 1996a*). Zusätzlich lassen sich zellkinetische Parameter erfassen, so die S-Phasen-Fraktion, die den Anteil DNA-synthetisierender Zellen angibt und in G I-Tumoren niedriger ist als in G II- und G III-Tumoren (*Kühn et al. 1989*).

Auch die immunhistochemische Bestimmung des proliferationsassoziierten Antigens Ki67 ermöglicht eine Beurteilung der proliferativen Aktivität maligner Tumoren (*Röhlke et al.* 1997). Ein hoher Ki67-Score geht mit einer kürzeren Überlebenszeit einher, umgekehrt finden sich bei niedrig exprimiertem Ki67-Antigen höhere Überlebenszeiten (*Isola et al.* 1990).

In letzter Zeit scheint sich auch das p53-Tumor-Suppressorprotein als unabhängiger Prognoseparameter heraus zu kristallisieren. In der Zelle bewirkt p53 nach einem DNA-Schaden einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase und ermöglicht dem zellulären Reparatursystem aktiv zu werden. Immunhistochemisch nachgewiesene mäßige oder starke p53-Überexpression resultiert in der Regel aus Missense-Mutationen des p53-Gens und korreliert insbesondere bei fortgeschrittenen Tumoren signifikant mit kürzeren rezidivfreien Intervallen sowie Überlebenszeiten (*Berchuck et al. 1994, Henriksen et al. 1994, Kappes et al. 1995, Röhlke et al. 1997*).

Unter den Onkogenen findet das Her-2/neu-Onkogen bezüglich der Entstehung von Ovarialkarzinomen zunehmend Beachtung. Bei dem Onkogenprodukt von Her-2/neu handelt es sich um einen Wachstumsfaktor-Rezeptor, der strukturell dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor ähnelt. Eine Überexpression des Onkogens Her-2/neu geht mit einer schlechteren Prognose einher (*Slamon et al. 1989, Berchuck et al. 1990, Gallion et al. 1995, Meden et al. 1998*). Überexpression findet sich bei etwa 30% aller Ovarialkarzinome (*Kaufmann et Minckwitz 1995, Matias-Guiu et Prat 1998*).

Als biochemische Parameter sind ferner der tumorassoziierte Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) und dessen Inhibitor PAI-1 zu nennen, die bedeutend für die Tumorinvasion und Metastasierung sind. Hohe uPA- und PAI-1-Expression war assoziiert mit Residualtumoren, deren Volumina größer als 1 cm waren (Konecny et al. 2001). In einer Studie von Kuhn et al. (1994) wiesen Patientinnen mit niedriger uPA- und PAI-1-Expression längere Überlebenszeiten auf als Patientinnen mit hoher Expression. Insbesondere bei Patientinnen ohne Residualtumor ging eine niedrige Expression beider Faktoren mit einer längeren Überlebenszeit einher (Kuhn et al. 1999). Erhöhte uPA-Expression war assoziiert mit einem verkürzten progressfreien Intervall und einer verkürzten Überlebenszeit im Allgemeinen (Konecny et al. 2001).

Prognostisch interessant scheint auch die Expression von Östrogenrezeptoren zu sein. Einer Studie von Isola et al. (1990) zufolge haben Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus anscheinend eine günstigere Prognose mit längeren Überlebenszeiten als bei negativem Östrogenrezeptorstatus. Es besteht offensichtlich eine Beziehung zwischen dem Östrogenrezeptorstatus und der Tumordifferenzierung. Möglicherweise geht die Fähigkeit der Rezeptorexpression mit der Tumorprogression und Entdifferenzierung verloren,

so dass ein positiver Östrogenrezeptorstatus als Indikator für eine geringere Tumoragressivität angesehen werden könnte (*Isola et al. 1990, Harding et al. 1990*). Des weiteren haben die Sensitivität auf Zytostatika und eine Resistenzentwicklung gegen selbige großen Einfluss auf die Prognose. Nicht zuletzt sind auch das Lebensalter und der Allgemeinzustand der Patientin prognostisch entscheidend (*Kaufmann et Minckwitz 1995*, *Schmidt-Matthiesen et al. 2000, Wagner et al. 2001*).

Verglichen mit dem serösen Zystadenokarzinom ist die Prognose des muzinösen Karzinoms etwas günstiger (Stegner 1994). Nach den Daten des "Annual Report" von 1991 betrug die 5-Jahres-Überlebensrate der 1982-86 behandelten Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom im Stadium Ia 82%, im Stadium Ib 75% und im Stadium Ic 68%. Stadium IIa wies eine 5-Jahres-Überlebensrate von 61% auf, die Stadien IIb und IIc jeweils 54%. Im Stadium III, das bei Erstdiagnose in 44,7% vorliegt, betrug die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 23%, im Stadium IV gar 8%. Die Einführung der platinhaltigen Chemotherapien trug zur Zunahme der 2- und 5-Jahres-Überlebensrate in den Stadien III und IV bei. Das progressionsfreie Intervall einer Cisplatin/Taxol-Kombination etwa 18 betrug bei Monate, die mittlere Gesamtüberlebenszeit lag bei 38 Monaten (Schmidt-Matthiesen et al. 2000). Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Ovarialkarzinome zusammen genommen betrug 1999 weltweit gesehen 48,4% (Schmidt-Matthiesen et al. 2000). Die 10-Jahres-Überlebensrate aller Stadien zusammen lag bei etwa 20% (Wagner et al. 2001).

FIGO		Ovar	TNM
Ι		Tumor begrenzt auf Ovarien	T1
	IA	Ein Ovar, Kapsel intakt	T1a
	IB	Beide Ovarien, Kapsel intakt	T1b
	IC	Kapselruptur, Tumor an der Oberfläche, maligne Zellen	T1c
		im Aszites oder bei Peritonealspülung	
II		Ausbreitung im Becken	T2
	IIA	Uterus, Tube(n)	T2a
	IIB Andere Beckengewebe		T2b
	IIC	Maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung	T2c
III		Peritonealmetastasen jenseits des Beckens und/oder	T3 und/oder N1
		regionäre Lymphknotenmetastasen	
	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastase(n)	T3a
IIIB Makroskopische Peritonealmetastase(n) ≤ 2 cm		T3b	
IIIC Peritonealmetastase(n) > 2 cm und/oder regionäre		T3c und/	
		Lymphknotenmetastasen	oder N1
IV		Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)	M1

Tab.1.3.: FIGO- und TNM-Klassifikation der Ovarialkarzinome (UICC 1997)

1.2. p16 – Bedeutung für den Zellzyklus und die Tumorentstehung

1.2.1. Entdeckung und Klassifikation des INK4a-Gens

Erstmalig fand 1993 die Entdeckung eines neuen Tumor-Suppressorgens auf Chromosom 9p21 Erwähnung. Die Forschungsgruppe um Xiong et al. (1993a) berichtete von einem 16 kDa Protein, das bei der Transformation von humanen diploiden Fibroblasten durch das SV40-Virus (=Simian Virus) mit Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) assoziiert war. Schnell stand fest, dass dieses p16^{INK4a} genannte Protein als ein CDK4-Inhibitor agierte. Da CDK4 den Zellzyklus im Sinne einer Progression reguliert, ist jeder Inhibitor als ein potentieller Tumorsuppressor anzusehen (Okamoto et al. 1994, Nobori et al. 1994, Kamb et al. 1994). Fast zeitgleich isolierten zwei weitere Forschungsgruppen durch Klonierung jene DNA, die als das Melanom-Empfänglichkeitsgen und mutmaßliches Tumorsuppressorgen auf Chromosom 9p21 identifiziert wurde und p16 kodierte (Kamb et al. 1994, Nobori et al. 1994). Zu jener Zeit erhielt das p16-Gen diverse Namen: MTS1 (Multiple Tumor Suppressor), INK4a, CDK4I (CDK4-Inhibitor), CDKN2. Zuletzt setzte sich immer häufiger die Bezeichnung INK4a für das Gen und p16^{INK4a} für das Genprodukt durch (Ruas et Peters 1998). Das p16^{INK4a}-Protein gehört zu der CDK-Inhibitoren der INK4-Familie. Um die Rolle der INK4-Proteine innerhalb der normalen zellphysiologischen Abläufe verständlich zu machen, erfolgt im nächsten Kapitel kurz die Darstellung der Zellzyklus-Regulation gemäß gegenwärtiger Modelle.

1.2.2. Zellzyklus-Regulation

Der Zellzyklus unterliegt verschiedenen Mechanismen, die gewährleisten, dass sich DNA-Synthese- und Mitose-Phasen in einem bestimmten Zeitrahmen und einer bestimmten Reihenfolge alternierend wiederholen. Dabei muss sichergestellt sein, dass pro Zellzyklus jeweils eine einzige Synthese-Phase vollständig und korrekt durchlaufen wird, ehe die Zellteilung in der Mitose-Phase stattfindet, da es andernfalls zur Weitergabe und Akkumulation eines fehlerhaft replizierten Genoms mit nachfolgender Genominstabilität kommt *(Clurman et Roberts 1995, Nurse 1999)*. Die sich teilende eukaryotische Zelle muss hierbei zwei kritische Kontrollpunkte passieren, zum Einen den Übergang von der G1- in die S-Phase, wo die DNA-Synthese beginnt, zum Anderen den Übergang von der G2- in die M-Phase mit Beginn der Mitose *(Kamb et al. 1994)*. Die Kontrolle dieser Übergänge erfolgt u.a. durch Proteinkomplexe, bestehend aus sogenannten Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs = Cyclin-dependent Kinases).

1.2.3. Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) und Zykline: Positive Zellzyklus-Regulatoren

In allen bislang untersuchten eukaryotischen Zellen kontrollieren CDKs sowohl den Anfang der S-Phase als auch den Eintritt in die M-Phase (Nurse 1990). Die enzymatisch aktiven Komplexe bestehen aus einer regulatorischen Untereinheit - einem Zyklin - und einer katalytischen Untereinheit - einer CDK (Li et al. 1994, Clurman et Roberts 1995, Cordon-Cardo 1995). In Komplex-Form regulieren sie die Passage der Kontrollpunkte durch Zellzyklusphasen-abhängige Phosphorylierung von Schlüsselfaktoren, die wiederum den Übergang von der G1- in die S-Phase sowie von der G2- in die M-Phase einleiten (Clurman et Roberts 1995). Ein solches Schlüsselprotein ist das Retinoblastom-Protein (pRb), das durch das Retinoblastom-Gen (RB-1-Gen) - den Prototyp der Tumorsuppressorgene - kodiert wird (Cordon-Cardo 1995). pRb übt durch Komplexbildung mit Transkriptionsfaktoren einen negativ regulatorischen Effekt auf die Expression verschiedener S-Phase-Gene aus. Die Phosphorylierung des pRb erfolgt Zellzyklusphasen-abhängig durch Zyklin-CDK-Komplexe und resultiert in einer Freisetzung dieser Transkriptionsfaktoren, die in ihrer ungebundenen Form die Transkription zellulärer Gene stimulieren können (Li et al. 1994, Cordon-Cardo 1995, Birrer 1997). Die hypophosphorylierte Form ist die funktional aktive Form von pRb und findet sich in ruhenden Zellen (G0) sowie in der frühen G1-Phase (Cordon-Cardo 1995, Graña et Reddy 1995). Mit Fortschreiten der G1-Phase wird pRb zunehmend durch Zyklin D-CDK4/CDK6-Komplexe phosphoryliert, wie aus Abb.1.1. ersichtlich wird (Weinberg 1995, Sellers et Kaelin 1996). Dieser phosphorylierte Zustand wird durch Zyklin E-CDK2 nahe am Restriktionspunkt sowie durch Zyklin A-CDK2 in der S-Phase aufrechterhalten und in der G2-Phase durch Zyklin B-cdc2 fortgesetzt (Cordon-Cardo 1995). Erst während der M-Phase liegt pRb wieder hypophosphoryliert vor (Weinberg 1995, Graña et Reddy 1995).

In hypophosphorylierter Form kann pRb Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie durch Komplexbildung inaktivieren, da nur ungebundene E2F-Proteine die Transkription von S-Phase-Genen stimulieren können. E2F-Proteine binden an Promotorregionen diverser zellulärer Gene, die an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt sind (*Johnson et al. 1993, Cordon-Cardo 1995, Birrer 1997*). Anscheinend kann der am Promoter gebildete pRb-E2F-Komplex als ein Repressor-Komplex *aktiv* die Transkription hemmen und auf diesem Weg den G1/S-Block herbeiführen (*Weinberg 1995, Sellers et Kaelin 1996, Zhang et al. 1999*). p16^{INK4a} hemmt als CDK4/6-Inhibitor die pRb-Phosphorylierung und trägt dadurch wesentlich zur Regulation der pRb-Aktivität bei (*Serrano et al. 1993, Lukas et al. 1995*).

Es wurden diverse CDK-Moleküle identifiziert (cdc2=CDK 1, CDK 2-7), die an der Zellzyklus-Regulierung teilhaben *(s. Abb.1.1.; Kamb et al. 1994, Cordon-Cardo 1995)*. Sie werden durch die Zykline als positive Regulatoren in ihrer Funktion kontrolliert. Neben der

Zyklin-CDK-Interaktion erfolgt zur Regulation der CDK-Aktivität über Phosphorylierung von CDK-Untereinheiten an Threoninresten mit Hilfe von *CAKs (=CDK activating kinase, Weinberg 1995)* eine Aktivierung, durch Phosphorylierung an Tyrosinresten dagegen eine Inhibition der CDK *(Hall et al. 1995, Ruas et Peters 1998)*. CDKs werden aber vor allem durch sog. CDK-Inhibitoren (=CKI), zu denen auch p16^{INK4a} gehört, in ihrer Funktion gehemmt. Die CKIs und ihre Bedeutung bei der Zellzyklus-Regulation werden in einem eigenen Kapitel (1.2.4.) ausführlich behandelt.





R=Restriktionspunkt; P+=Phosphorylierung; P-=Dephosphorylierung; E2F=Transkriptionsfaktoren; TGF- β =transforming growth factor β ; DNA- Σ =DNA-Schaden; cdc2=CDK1

Zykline werden in 5 Hauptgruppen unterteilt (A-E). Sie werden in bestimmten Zellzyklusphasen maximal exprimiert, dementsprechend lassen sich Zellzyklusphasenabhängig bestimmte Zyklin-CDK-Kombinationen nachweisen *(s. Abb. 1.1.)*. So gelten Zyklin E-CDK2- und Zyklin A-CDK2-Komplexe als die Hauptregulatoren für den Eintritt und das Fortschreiten der S-Phase, während Zyklin B-CDK1-Komplexe den Übergang von der G2- in die Mitosephase kontrollieren (*Graña et Reddy 1995, Hall et al. 1995, Cordon-Cardo 1995, Ruas et Peters 1998*). Die D-Zykline D1-3 und ihre Reaktionspartner CDK4 und CDK6 fördern den Fortgang der G1-Phase und kontrollieren gemeinsam mit Zyklin E-CDK2 den G1/S-Übergang (*Li et al. 1994, Weinberg 1995, Cordon-Cardo 1995, Hara et al. 1996*). Bis zum Erreichen des sog. Restriktionspunktes in der späten G1-Phase sind vermutlich alle eukaryotischen Zellen bezüglich der Entscheidung Proliferation oder Differenzierung durch extrazelluläre Signale beeinflussbar (*Pardee 1989, Weinberg 1995*). Nach Passage des Restriktionspunktes wird die S-Phase auch ohne Vorhandensein von Wachstumsfaktoren durchlaufen (*Pardee 1989, Sellers et Kaelin 1996, Ruas et Peters 1998*). Eine mögliche Erklärung für die Passage des Restriktionspunktes wäre, dass Zyklin D-assoziierte CDKs mitogenabhängig die pRb-Phosphorylierung im Verlauf der G1-Phase durchführen und Zyklin E- und A-assoziierte CDKs mitogenunabhängig diesen Zustand in der späten G1-Phase vervollständigen bzw. aufrechterhalten (*Ruas et Peters 1998, Zhang et al. 1999*).

1.2.4. CDK-Inhibitoren: Negative Zellzyklus-Regulatoren

Neben den positiven existieren auch negative CDK-Regulatoren, die durch Steuerung der Kontrollpunkte bedeutend für die Zellentwicklung und -differenzierung sowie für die Zellalterung und Tumorsuppression zu sein scheinen. Basierend auf vergleichende Sequenzanalysen werden zwei Familien von CDK-Inhibitoren (=CKIs) unterschieden, die sich bezüglich der CDK-Inhibition auch in Mechanismus und Spezifität unterscheiden: Die CIP/KIP-Familie und die INK4-Proteine (Serrano et al. 1993, Cordon-Cardo 1995, Elledge et al. 1996, McConnell et al. 1999).

Charakterisierung der CIP/KIP-Proteine: Funktion und Regulation

In diese Gruppe von CKIs fallen die Proteine p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2}. Sie hemmen multiple G1-Phasen-CDKs, insbesondere CDK2/CDK3 sowie CDK4/CDK6. Sie werden daher als "Breitbandinhibitoren" multipler Zyklin-CDK-Komplexe angesehen *(Hall et al. 1995, s. Tab. 1.4.)*. Im Gegensatz zu den INK4-CKIs, welche Zyklin-unabhängig direkt mit CDK4/6-Untereinheiten assoziieren, blockieren die CIP/KIP-CKIs fast ausschließlich durch Bindung an die Zyklin-Untereinheit die CDK-Phosphorylierung durch CDK-aktivierende Kinasen (CAKs) (*Clurman et Roberts 1995, Hall et al. 1995)*. p21^{CIP1} und p27^{KIP1} können im Unterschied zu den INK4-Proteinen den S-Phasen-Eintritt pRb-unabhängig blockieren (*Xiong*)

et al. 1993b). Ihre Expression wird durch mitogene und antimitogene Signale reguliert (Clurman et Roberts 1995).

p21^{CIP1} akkumuliert zunehmend in terminal differenzierten Zellen sowie in alternden Zellen und scheint insbesondere in der Frühphase des Alterungsprozesses für die Inaktivierung von Zyklin E/D-assoziierten Kinasen verantwortlich zu sein *(Graña et Reddy 1995, Hall et al. 1995, Elledge et al. 1996, Stein et al. 1999)*. Nach DNA-Schädigung, z.B. infolge ã-Bestrahlung, wird p53 exprimiert und induziert eine vermehrte Expression von p21^{CIP1}, welches über Zyklin-CDK-Inhibition eine Hypophosphorylierung von pRb bewirkt. Der DNA-Reparaturmechanismus hat während des pRb-vermittelten G1-Arrests Gelegenheit, die genomische Integrität wiederherzustellen *(El-Deiry et al. 1993, Dulic et al. 1994, Weinberg 1995, Zariwala et Xiong 1996)*.

p27^{KIP1} inhibiert unter dem Einfluss sog. externer Signale wie TGF- β oder Zell-zu-Zell-Kontakt Zyklin E/A-CDK2- sowie Zyklin D-CDK4-Komplexe und ist dadurch am G1-Arrest beteiligt (*Clurman et Roberts 1995, Cordon-Cardo 1995, McConnell et al. 1999*). p27^{KIP1} ist in ruhenden Zellen nachweisbar und verringert sich unter Zellstimulation durch Wachstumsfaktoren (*Graña et Reddy 1995*).

Mutationen von p 21^{CIP1} , p 27^{KIP1} und p 57^{KIP2} sind ein seltenes Ereignis in humanen Malignomen (*Kawamata et al. 1995, Shiohara et al. 1994*).

Charakterisierung der INK4-Proteine: Funktion und Regulation

Diese CDK-Inhibitoren-Gruppe umfasst die Proteine p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}, die bezüglich ihrer Sequenz eng miteinander verwandt sind. p16^{INK4a} und p15^{INK4b} weisen eine 82 % ige Sequenzübereinstimmung auf *(Cordon-Cardo 1995)*.

Im Gegensatz zu den CIP/KIP-Proteinen binden alle vier INK4-Proteine kompetitiv zu den D-Cyclinen ausschließlich und direkt an CDK4- und CDK6-Untereinheiten (*Serrano et al. 1993, Clurman et Roberts 1995, Zariwala et Xiong 1996, McConnell et al. 1999*). Es handelt sich demnach um spezifische Inhibitoren der Cyclin D-abhängigen Kinasen mit der Fähigkeit, einen G1-Arrest zu induzieren, indem sie die Phosphorylierung von pRb durch Inhibition von CDK4/6 verhindern (*Kamb et al. 1994, Hall et al. 1995, Graña et Reddy 1995*). Umgekehrt ist diese Fähigkeit der INK4-Proteine zur G1-Arrest-Induktion abhängig von der Existenz von funktionalem pRb (*Serrano et al. 1993, Koh et al. 1995, Bartkova et al. 1996*). Im folgenden Abschnitt werden die p16^{INK4a}-verwandten Proteine kurz vorgestellt (*s. Tab. 1.4.*).

p18^{INK4c} und p19^{INK4d} werden zwar in vielen Gewebetypen exprimiert, allerdings in sehr variierendem Ausmaß, was auf eine gewebespezifische Expression schließen lässt. Bislang

wurde eine hohe Expression beider Proteine in sich entwickelndem Nervengewebe und in Zellen des myelopoetischen Systems nachgewiesen (Adachi et al. 1997, Schwaller et al. 1997, Zindy et al. 1997). Aufgrund der fehlenden Expression in Ovarialgewebe waren beide Proteine für die vorliegende Arbeit nicht von Bedeutung. Zudem fanden sich in den p18^{INK4c} und p19^{INK4d} kodierenden Genen keine gehäuften Mutationen in humanen Tumoren oder Tumorzelllinien (Zariwala et Xiong 1996).

p15^{INK4b} inaktiviert nach Stimulation durch TGF- β in der frühen G1-Phase CDK4 und 6 und führt somit zu einem TGF- β -induzierten G1-Arrest (Hannon et Beach 1994, Cordon Cardo 1995, Xiong 1996). Die kodierenden Gene für p15^{INK4b} und p16^{INK4a} sind tandemartig 30 kb voneinander entfernt auf Chromosom 9p21 lokalisiert und sind in Zelllinien häufig gemeinsam deletiert (Kamb et al. 1994, Ellegde et al. 1996, Ruas et Peters 1998).

Inhibitor	Ziel-CDK	Funktion und Regulation
INK4-Familie:		
p15 ^{INK4b}	CDK4, CDK6	Vermittelt TGF-β-induzierten G1-Arrest In humanen Malignomen mutiert
p16 ^{INK4a}	CDK4, CDK6	Tumorwachstumssuppressor In Zellen mit Rb-Funktionsverlust aktiviert Akkumuliert in alternden und differenzierten Zellen In humanen Malignomen mutiert
p18 ^{INK4c}	CDK4, CDK6	Blockiert CAK-Zugang zu CDK Gewebespezifische Expression
p19 ^{INK4d}	CDK4, CDK6	Gewebespezifische Expression
CIP/KIP-Familie:		
p21 ^{CIP1}	Multiple Cyclin-CDKs	Hemmt PCNA-abhängige DNA-Replikation Blockiert CAK-Zugang zu CDK Durch p53 nach DNA-Schädigung aktiviert Durch Vitamin-D3-Rezeptor aktiviert Akkumuliert in alternden und differenzierten Zellen
p27 ^{KIP1}	Multiple Cyclin-CDKs	Blockiert CAK-Zugang zu CDK Akkumuliert in Kontakt-inhibierten Zellen Downregulation durch IL-2
p57 ^{KIP2}	Multiple Cyclin-CDKs	Gewebespezifische Expression
PCNA=Proliferati	ng cell nuclear antigen; To	$GF-\beta = Transforming growth factor \beta$

Tab1.4.: In Mammalia-Zellen vorkommende CDK-Inhibitoren sowie ihre Funktion und Regulation (modifiziert nach Xiong 1996)

PCNA=Proliferating cell nuclear antigen; TGF- β =Transforming growth factor β CAK=CDK activating kinase; IL-2=Interleukin 2 Die Funktion und Regulation von p16^{INK4a} sowie dessen Rolle bei der Zellalterung wird im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt.

1.2.5. Das Tumorsuppressorgen INK4a und seine Produkte

Organisation von INK4a sowie Aufbau von p16^{INK4a}

Serrano et al. gelang 1993 mittels Klonierung die Isolierung einer humanen p16komplementären DNA, welche ein Protein aus 148 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 15,845 Dalton kodierte. Dieses Protein wird von 4 Ankyrin-Wiederholungen gebildet.

INK4a enthält die gesamte kodierende Sequenz von p16^{INK4a} sowie 2 Introns, welche die kodierende Sequenz von p16^{INK4a} in drei Exons einteilt (*Abb. 1.2.; Kamb et al. 1994*): eine 5'-Region von 126 bp (Exon 1), eine mittlere Region von 307 bp (Exon 2) und eine 3'-Region von 11 bp (Exon 3).

INK4a-Produkte: p16^{INK4a} und p14^{ARF}/p19^{ARF}

An dem INK4a-Genlokus werden von zwei verschiedenen Promotoren ausgehend zwei Transkripte (á, â) und dadurch zwei verschiedene Proteine produziert: $p16^{INK4a}$ und $p14^{ARF}$ beim Menschen bzw. $p19^{ARF}$ bei der Maus. ARF steht für "alternative reading frame", an welchem das alternative â-Transkript entsteht. Diese Fähigkeit der dualen Nutzung von kodierenden Sequenzen scheint in höher organisierten Organismen bislang einzigartig zu sein *(Quelle et al. 1995, Liggett et al. 1996).*

Das alternative Exon E1â wird von einem Promoter P-â transkribiert, welcher etwa 20 kb vom Promoter P-á des Exon E1á zentromerwärts liegt (*Stone et al. 1995, Serrano et al. 1996, Larsen 1996, Gazzeri et al. 1998*). Verglichen mit der p16-mRNA entsteht nach dem *Splicing* eine minimal kürzere alternative mRNA mit identischen Exons 2 und 3, jedoch mit unterschiedlichem Exon 1 (E1á, E1â) (*Abb. 1.2.; Quelle et al. 1995, Serrano et al. 1996, Elledge et al. 1996, Ruas et Peters 1998*). Das humane Protein hat eine Länge von 132 AS (*Larsen 1996*) und ein Molekulargewicht von 13902 Dalton, weswegen es p14^{ARF} genannt wird. Bei der Maus entsteht ein 169 AS langes Protein mit einem Molekulargewicht von 19349 Dalton, als p19^{ARF} bezeichnet. Es existiert keine Sequenz-Ähnlichkeit zwischen E1á und E1â (*Quelle et al. 1995, Larsen 1996, Pomerantz et al. 1998, Ruas et Peters 1998*).



Abb.1.2.: INK4a-Genlokus und Transkripte (modif. nach Ruas et Peters 1998)

kb=Kilobasen; AS=Aminosäuren

Das alternative â-Transkript wird in vielen Zelltypen ähnlich oder noch stärker als das á-Transkript exprimiert (*Merlo et al. 1995, Larsen 1996*). Die Wirkung von p14^{ARF} beruht nicht auf direkter Hemmung von CDKs und ist nicht abhängig vom funktionalen pRb-Status der Zelle, sondern vom p53-Status (*Quelle et al. 1995, Stone et al. 1995, Serrano et al. 1996, Liggett et al. 1996, Pomerantz et al. 1998*). p14^{ARF} hemmt das Onkogen MDM2, welches die p53-Aktivität inhibiert, und führt auf diese Weise zur Stabilisierung und Akkumulation von p53. Dadurch ließe sich der p14^{ARF}-induzierte G1/G2-Arrest erklären (*Pomerantz et al. 1998, Zhang et al. 1998, Ruas et Peters 1998*).

Anders als bei p16^{INK4a} ist das p14^{ARF} kodierende Exon E1â weder in Tumor-Zelllinien noch in Primärtumoren gehäuft von Tumor-spezifischen Mutationen betroffen. Daher ist zu vermuten, dass die Inaktivierung von p16^{INK4a} das kritische Ziel der in menschlichen Tumoren gehäuft gefundenen Alterationen des INK4a-Lokus darstellt (*Mao et al. 1995, Stone et al. 1995, Brenner et al. 1996, Liggett et al. 1996, Fitzgerald et al. 1996*).

Funktion von p16 bei der Zellalterung und Zelldifferenzierung

Der Prototyp der INK4-Familie ist p16^{INK4a}, ein Tumorsuppressorprotein, dessen Aberrationen in einem breiten Tumorspektrum nachweisbar waren. Durch Induktion eines G1-Arrests könnte p16^{INK4a} an Mechanismen der Zelldifferenzierung und Zellalterung teilhaben (*Ruas et Peters 1998, McConnell et al. 1999*). Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass p16^{INK4a} in humanen Fibroblasten mit zunehmender Zahl an Populationsverdoppelungen akkumuliert und beim Erreichen ihres Lebensendes in der Zellkultur signifikant ansteigt (*Li et al. 1994, Hara et al. 1996, Alcorta et al. 1996, Stein et al. 1999, McConnell et al. 1999*). Ferner ruft eine ektope p16^{INK4a}-Expression bei diesen Zellen phänotypische Charakteristika der Zellalterung hervor (*McConnell et al. 1999*). Der Mechanismus der p16^{INK4a}- Akkumulation in alternden Fibroblasten ist bislang unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die p16^{INK4a}-mRNA mit zunehmender Zahl an Zellpassagen akkumuliert. p16^{INK4a}-mRNA ist extrem stabil und verändert sich bezüglich ihrer Menge kaum während des Zellzyklus. Sie akkumuliert allerdings stark in Zellen mit defekter pRb-Funktion, z.B. in SV40-transformierten Fibroblasten, ebenso in humanen Fibroblasten mit zunehmender Alterung (*Li et al. 1994, Hara et al. 1996, Alcorta et al. 1996*).

Funktion und Regulation der p16-Expression

Durch direkte Assoziation mit CDK4/6-Untereinheiten verhindert p16^{INK4a} als kompetitiver Inhibitor eine aktivierende Komplexbildung mit einem D-Zyklin. p16^{INK4a} kann im Gegensatz zu p27KIP1 mit Zyklin-CDK-Komplexen keine höhergeordneten Komplexe bilden und auf diesem Weg deren Inaktivierung bewirken (Ruas et Peters 1998, McConnell et al. 1999). Diverse Untersuchungen an Zelllinien und primären Tumoren bestätigten die Existenz einer umgekehrten Korrelation zwischen der pRb- und p16^{INK4a}-Expression (Serrano et al. 1993, Xiong et al. 1993a, Tam et al. 1994, Otterson et al. 1994, Geradts et al. 1995, Whitaker et al. 1995, Shapiro et al. 1995, Kinoshita et al. 1996). Hypophosphoryliertes aktives pRb kann im Sinne einer negativen Feedback-Schleife den Promoter des INK4a-Gens und damit die p16^{INK4a}-Expression hemmen (Li et al. 1994, Weinberg 1995, Hara et al. 1996). CDKs inaktivieren pRb durch Phosphorylierung, wodurch die pRb-vermittelte Repression des INK4a-Gens wegfällt. Die gesteigerte INK4a-Transkription bewirkt eine CDK 4/6-Inaktivierung. Dadurch liegt pRb wieder vermehrt in hypophosphorylierter aktiver Form vor. Dieser Feedback-Mechanismus gewährleistet, dass Zyklin D-CDK-Aktivitäten durch p16^{INK4a} gehemmt werden, sobald die pRb-Inaktivierung durch Phosphorylierung erfolgt ist (Graña et Reddy 1995).

p16^{INK4a} scheint weder von p53 reguliert zu werden wie p21^{CIP1}, noch durch andere externe Membransignale wie TGF- β oder Zell-zu-Zell-Kontakt beeinflusst zu werden *(Cordon-Cardo 1995)*.

1.2.6. p16-Inaktivierung in humanen Malignomen

Der Prototyp der INK4-Familie ist p16^{INK4a}, ein Tumorsuppressorprotein, welches in einer Vielzahl menschlicher Tumoren sowie Tumor-Zelllinien infolge homozygoter Deletion, somatischer Mutation und Promoter-Methylierung des INK4a-Gens fehlt bzw. inaktiviert vorliegt (*Kamb et al. 1994, Nobori et al. 1994, Herman et al. 1995, Liu et al. 1995, Elledge et al. 1996, Ruas et Peters 1998*). Ebenso scheinen Keimbahn-Mutationen im p16^{INK4a}-Gen mit dem Auftreten des familiären Melanoms assoziiert zu sein (*Hussussian et al. 1994, Gruis et al. 1995b, Fitzgerald et al. 1996*).

Zahlreiche Studien mit Nachweis von p 16^{INK4a} -Veränderungen in Primärtumoren verdeutlichen zwei Aspekte: Zum Einen sind genetische Aberrationen von p 16^{INK4a} in auserwählten Tumoren häufig vorhanden, zum Anderen finden sich in pRb-positiven Tumoren viel häufiger Funktionsverluste als genetische Aberrationen von p 16^{INK4a} .

Homozygote Deletionen als Hauptmechanismus des p16^{INK4a}-Verlustes finden sich insbesondere in primären Glioblastomen, GIII-Astrozytomen, akuten lymphoblastischen Leukämien von Kindern und Erwachsenen (T-ALL), in Pankreaskarzinomen sowie in primären squamösen Hals- und Kopf-Karzinomen (*Caldas et al. 1994, Jen et al. 1994, Moulton et al. 1995, Cairns et al. 1995, Reed et al. 1996, Liggett et al. 1996, Herman et al. 1997, Barker et al. 1997*).

Heterozygote Deletionen eines Wildtyp-Allels mit gleichzeitigen inaktivierenden somatischen Mutationen im verbleibenden Allel sind gehäuft nachweisbar in Pankreaskarzinomen und Ösophaguskarzinomen (*Caldas et al. 1994, Zhou et al. 1994, Mori et al. 1994*).

Methylierungsanalysen verschiedener Arbeitsgruppen ergaben, dass die Methylierung des INK4a-Lokus ein häufiges Ereignis in Mamma- und Colonkarzinomen ist, ebenso in GIII-Non-Hodgkin-Lymphomen, Pankreaskarzinomen, Harnblasenkarzinomen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Ösophaguskarzinomen sowie in primären squamösen Hals- und Kopf-Karzinomen (Gonzales-Zulueta et al. 1995, Mao et al. 1995, Herman et al. 1995, Serrano et al. 1996, Reed et al. 1996, Kinoshita et al. 1996, Herman et al. 1997, Wong et al. 1997a, Schutte et al. 1997, Martinez-Delgado et al. 1997).

Da p16-Methylierungen ausschließlich in p16-Wildtyp-Karzinomen entdeckt wurden, scheint es sich bei der Hypermethylierung um einen spezifischen Mechanismus der Gen-Inaktivierung alternativ zur somatischen Mutation und homozygoten Deletion zu handeln *(Schutte et al. 1997)*.

1.3. Ziele der Untersuchungen

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Mutations- und Expressionsanalyse des p16-Tumorsuppressorgens in epithelialen Ovarialkarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe. Die hierzu angewandten molekularbiologischen Techniken (immunhistochemische Verfahren, PCR, SSCP, direkte Sequenzierung, methylierungsspezifische PCR) dienten der Untersuchung folgender Fragestellungen:

- 1. In welcher Häufigkeit sind p16-Alterationen in epithelialen Ovarialkarzinomen nachweisbar?
- 2. Existiert ein Hauptmechanismus zur Inaktivierung der p16-Funktion (Mutation, Deletion, Methylierung) in Ovarialkarzinomen?
- 3. Existieren in den verschiedenen histologischen Subtypen unterschiedliche bevorzugte Mechanismen der p16-Inaktivierung?
- 4. Ist eine Reduktion der p16-Expression immunhistochemisch in Assoziation zum histologischen Subtyp nachweisbar? Besteht ferner eine Korrelation zu anderen molekularbiologisch detektierten p16-Aberrationen?
- 5. Welche Beziehung besteht zwischen dem Auftreten von p16-Alterationen und dem Differenzierungsgrad bzw. klinischen Stadium der Tumoren?
- 6. Wie häufig kommen ARF-Mutationen in epithelialen Ovarialkarzinomen vor? Treten sie in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp gehäuft auf?

Zum Zeitpunkt der Untersuchung existierten nur vereinzelte Arbeiten zu epithelialen Ovarialkarzinomen, die detailliert die Verteilung der unterschiedlichen p16-Alterationen auf die histologischen Subtypen analysierten. Die Beantwortung der obigen Fragen zielte daher darauf ab, Hinweise auf die diagnostische und prognostische Relevanz einer p16-Expressions- und Mutationsanalyse bei Ovarialkarzinomen zu gewinnen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Untersuchungsmaterial

Es wurden 75 Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete primäre epitheliale Ovarialkarzinome sowie 9 weitere histologisch unauffällige Ovarien untersucht, die in der Abteilung für Histopathologie der Universitätsfrauenklinik Hamburg, Eppendorf archiviert wurden. Hierbei handelte es sich um Operationsmaterial von Patientinnen, die zwischen 1984 und 1993 in der Frauenklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg behandelt worden waren.

Nach dem klinischen Staging sowie anhand des histologischen Befundes wurden 4 Tumoren als Stadium I (5%), 9 Fälle als Stadium II (12%), 28 Fälle als Stadium III (37%) und 32 als Stadium IV (43%) gemäß der FIGO-Klassifikation eingestuft. In zwei Fällen (Nr. E6 und E7) konnte aufgrund der fehlenden klinischen und histologischen Daten keine Aussage zum Stadium gemacht werden.

Bezüglich der histologischen Subtypen erfolgte eine Verteilung der 75 Tumoren auf 55 seröspapilläre Karzinome (73%), 8 endometrioide (11%), 6 muzinöse (8%) und 6 anaplastischundifferenzierte (8%) Karzinome.

Eine Einteilung nach Tumordifferenzierung (Grading) fand anhand des histologischen Befundes in G I (low grade) bis G III (high grade) statt, wie aus *Tab.2.1.* ersichtlich. In 9 Fällen (12%) handelte es sich um G I-Tumoren; 25 Fälle (33%) erwiesen sich als G II-Tumoren. In 41 Fällen lagen G III-Tumoren vor (55%).

Die meisten dieser Primärtumoren sind bereits untersucht worden bezüglich p53-, Ki67- und pRb-Expression (*Kappes et al. 1995, Röhlke et al. 1997*).

Nr.	Fall	Diagnose	Alter	Grad.	FIGO	Ki67	Rb	p53	p53
						IHC	IHC	IHC	Mut.
		epitheliale Ovarial-							
		<u>karzinome (n=75)</u>							
1	1	serös-papilläres Adenokarzinom	42	G III	2c	1	3	0	-
2	4	serös-papilläres Adenokarzinom	78	G III	3	3	0	3	w
3	9	serös-papilläres Adenokarzinom	48	G III	1a	3	2	0	-
4	12	serös-papilläres Adenokarzinom	43	G II	3	2	3	0	-
5	14	serös-papilläres Adenokarzinom	65	G III	4	2	2	3	m
6	19	serös-papilläres Adenokarzinom	68	G II	4	2	1	2	-
7	22	serös-papilläres Adenokarzinom	55	G III	3	2	2	0	m
8	23	serös-papilläres Adenokarzinom	64	G II	2	1	0	0	-
9	25	serös-papilläres Adenokarzinom	62	G III	4	3	3	2	W
10	29	serös-papilläres Adenokarzinom	68	G III	4	0	2	3	-
11	32	serös-papilläres Adenokarzinom	55	G II	4	-	0	1	m
12	36	serös-papilläres Adenokarzinom	72	G II	4	1	2	2	m
13	45	serös-papilläres Adenokarzinom	78	G III	3c	2	2	-	-
14	47	serös-papilläres Adenokarzinom	53	G II	4	2	0	1	-
15	50	serös-papilläres Adenokarzinom	49	G III	4	3	1	3	m
16	52	serös-papilläres Adenokarzinom	44	G III	4	1	1	3	m
17	53	serös-papilläres Adenokarzinom	50	G III	2	2	0	0	W
18	54	serös-papilläres Adenokarzinom	48	G III	4	1	1	1	W
19	56	serös-papilläres Adenokarzinom	47	G III	3	2	1	0	-
20	58	serös-papilläres Adenokarzinom	70	G II	3	1	3	1	-
21	59	serös-papilläres Adenokarzinom	49	G III	3a	1	1	2	m
22	60	serös-papilläres Adenokarzinom	74	G III	2c	1	0	0	-
23	62	serös-papilläres Adenokarzinom	80	G III	3	2	1	1	W
24	63	serös-papilläres Adenokarzinom	67	G III	4	2	2	3	-
25	65	serös-papilläres Adenokarzinom	69	G I	3	1	3	1	W
26	66	serös-papilläres Adenokarzinom	53	G III	4	3	3	3	m
27	67	serös-papilläres Adenokarzinom	70	G II	2c	2	3	3	m
28	68	serös-papilläres Adenokarzinom	61	G II	4	1	3	0	-
29	69	serös-papilläres Adenokarzinom	59	G III	4				
30	71	serös-papilläres Adenokarzinom	42	G II	3	-	3	1	W
31	74	serös-papilläres Adenokarzinom	65	G III	3	2	0	1	W
32	75	serös-papilläres Adenokarzinom	61	G II	4	3	2	1	-

Tab.2.1.: Übersicht über das Untersuchungsgut

Nr.	Fall	Diagnose	Alter	Grad.	FIGO	Ki67	Rb	p53	p53
						IHC	IHC	IHC	Mut.
33	76	serös-papilläres Adenokarzinom	52	G III	3	2	3	2	m
34	78	serös-papilläres Adenokarzinom	59	G III	3c	1	1	0	w,m
35	79	serös-papilläres Adenokarzinom	81	G II	3	1	3	2	-
36	81	serös-papilläres Adenokarzinom	86	G III	4	2	3	0	-
37	82	serös-papilläres Adenokarzinom	51	G III	4	3	3	3	m
38	83	serös-papilläres Adenokarzinom	73	G III	3	2	3	2	m
39	84	serös-papilläres Adenokarzinom	66	G III	3	3	3	0	m
40	87	serös-papilläres Adenokarzinom	53	G III	4	2	2	3	m
41	88	serös-papilläres Adenokarzinom	71	G II	4	1	1	0	-
42	89	serös-papilläres Adenokarzinom	53	G III	4	3	2	0	w
43	90	serös-papilläres Adenokarzinom	51	GI	1	1	1	0	w
44	92	serös-papilläres Adenokarzinom	24	G II	2	1	3	0	w
45	93	serös-papilläres Adenokarzinom	70	G II	2	2	13	1	w
46	94	serös-papilläres Adenokarzinom	63	G III	3	2	1	2	-
47	96	serös-papilläres Adenokarzinom	49	G II	2	1	1	2	m
48	98	serös-papilläres Adenokarzinom	47	G II	2	1	1	1	-
49	99	serös-papilläres Adenokarzinom	52	G III	3	1	0	2	w
50	100	serös-papilläres Adenokarzinom	44	G II	2	1	1	1	m
51	106	serös-papilläres Adenokarzinom	50	G III	3	2	0	3	m
52	110	serös-papilläres Adenokarzinom	74	G III	2	1	2	3	m
53	111	serös-papilläres Adenokarzinom	48	G III	4	2	2	0	m
54	112	serös-papilläres Adenokarzinom	49	G III	4				
55	E7	serös-papilläres Adenokarzinom	73	G II	-	-	3	0	w
56	13	endometrioides Karzinom	69	G II	1a	1	3	1	w
57	20	endometrioides Karzinom	42	G II	4	2	3	0	-
58	26	endometrioides Karzinom	47	G II	3	1	1	1	-
59	31	endometrioides Karzinom	77	GI	1a	1	0	0	w
60	85	endometrioides Karzinom	61	G II	3	2	3	0	-
61	86	endometrioides Karzinom	67	G III	4	3	1	1	w
62	108	endometrioides Karzinom	45	GI	4	2	3	2	w
63	E1	endometrioides Karzinom	43	G III	2	-	3	0	w
64	21	muzinöses Karzinom	62	GI	4	2	3	0	m
65	33	muzinöses Karzinom	50	GI	4	1	1	0	-

Nr.	Fall	Diagnose	Alter	Grad.	FIGO	Ki67	Rb	p53	p53
						IHC	IHC	IHC	Mut.
66	35	muzinöses Karzinom	53	G II	3	1	1	0	m
67	91	muzinöses Karzinom	56	GI	4	1	0	0	-
68	103	muzinöses Karzinom	70	GI	3	1	2	0	-
69	E6	muzinöses Karzinom	36	GI	-	-	3	0	w
70	6	anaplastisches Karzinom	56	G III	3	3	1	1	m
71	38	anaplastisches Karzinom	71	G III	4	2	1	1	-
72	39	anaplastisches Karzinom	71	G III	3	2	3	3	m
73	64	anaplastisches Karzinom	60	G III	4	3	3	3	m
74	E3	anaplastisches Karzinom	44	G III	3	-	1	0	w
75	27	undifferenziertes Karzinom	55	G III	2b	3	3	3	-
		<u>nichtneoplastische Ovarien (n=9)</u>							
76	9	altersentsprechendes Ovar	48						
77	23	altersentsprechendes Ovar	64						
78	26	altersentsprechendes Ovar	47						
79	38	altersentsprechendes Ovar	71						
80	45	altersentsprechendes Ovar	78						
81	59	altersentsprechendes Ovar	49						
82	60	altersentsprechendes Ovar	74						
83	103	altersentsprechendes Ovar	70						
84	112	altersentsprechendes Ovar	49						

Grad.=Grading; IHC=Immunhistochemie; Mut.=Mutation

2.1.2. Verwendete Chemikalien und Enzyme

Allgemein

Ethanol 70%, 80%, 96%, 100%; Formaldehyd;Merck, DarmstadtGlyzerin 40%, 87%; Natriumacetat; Natriumcarbonat;Natriumchlorid; Natriumhydroxid; Silbernitrat; DMSOTrishydroxymethylaminomethanEDTA; MOPS (Morpholino-Propansulfonsäure);Bromphenolblau; Xylene CyanolSigma, Deisenhofen

Immunhistochemie

ABC-Kit Vectastain[®] Bovines Serum-Albumin Peroxydase Substrate Kit DAB Monoklonaler Maus-anti-Human-p16 IgG1, G175-405 (Katalog-Nr: 13251 A) Methanol; H₂O₂ 30% Perhydrol[®] Xylol Xylene

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ampliwax Mineralöl Desoxyribonukleosid-triphosphate: dNTPs Primer für â-Globin und p16 Taq-Polymerase Proteinase K

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose NuSieve Ethidiumbromid DNA-Molekulargewichtsmarker V Serva, Heidelberg Sigma, Deisenhofen Serva, Heidelberg PharMingen, Hamburg

Merck, Darmstadt Riedel-de Häen, Seelze

Perkin Elmer, Weiterstadt Sigma, Deisenhofen Boehringer, Mannheim MWG-BIOTECH, Ebersberg Boehringer, Mannheim Boehringer, Mannheim

Biozym, Hess. Oldendorf Sigma, Deisenhofen Boehringer, Mannheim

Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP)

APS 4% (Ammoniumpersulfat) MDETM gel solution, 2x konzentriert TEMED (Tetramethylethylendiamin) Essigsäure 100%; Formamid 95% Natriumborohydrid

Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Hydrochinon Natriumbisulfit p16-Primer (UF, UR, MF, MR) Taq-Polymerase Bio-Rad, München Biozym, Hess. Oldendorf Serva, Heidelberg Riedel-de Häen, Seelze Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Sigma-Aldrich, Deisenhofen Sigma-Aldrich, Deisenhofen MWG-BIOTECH, Ebersberg Boehringer, Mannheim

2.1.3. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Centricon 100 Einweg-Mikrokonzentrator SafeLockTM Röhrchen 0,5 ml und 1,5 ml Kolbenhubpipetten Mikrotom Rotary Mixer Wide Mini SubTM Electrophoresis Cell DNA Sub CellTM Electrophoresis System UV-Transilluminator Polaroid MP-4 Land Camera Polaroid 665 Instant Pack Film Refrigerated Centrifuge, Sorvall[®] RT 6000 SSCP-Elektrophorese-Kammer SSCP-Trägerfolie (Gel Support-Film) Thermocycler Autogene II Amicon, Witten Eppendorf, Hamburg Eppendorf-Gerätebau, Hamburg Jung AG, Heidelberg Labinco B.V., Deutschland Bio-Rad, München Bio-Rad, München Spectroline, Deutschland Polaroid Corporation, Offenbach Polaroid Corporation, Offenbach DuPont de Nemours, Bad Homburg Quiagen, Hilden Quiagen, Hilden

2.2. Methoden

Nach aktueller Erkenntnis kann eine p16-Inaktivierung durch folgende Mechanismen stattfinden:

- homozygote Deletion
- somatische Mutation
- Methylierung der CpG-reichen Promoterregion

Um die Expression des Genprodukts, des p16-Proteins, in Tumorzellen im Vergleich zu Nicht-Tumorzellen beurteilen zu können, wurden alle Fälle einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen.

Zur Deletionsanalyse im p16-Gen wurde bei allen Fällen nach einer getrennten DNA-Extraktion mittels Mikrodissektion aus Tumorgewebe und Nicht-Tumorgewebe eine Amplifikation von drei p16-Fragmenten aus Exon 1 und 2 (2a und 2b) im Vergleich zu β -Globin (Positivkontrolle für vorhandene DNA) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Da Exon 1 und 2 zusammen 97% der kodierenden Sequenz ausmachen (Kamb et al. 1994, Gruis et al. 1995a), wurde auf die Untersuchung von Exon 3 verzichtet. Mittels Agarose-Gelelektrophorese ließen sich vorhandene Deletionen darstellen.

Die Proben ohne Nachweis einer Deletion wurden anschließend bei ausreichender Konzentration zur Detektion von Mutationen einer Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP) unterzogen. Fand sich in einer Probe eine Mutation, erfolgte die Sequenzierung des betroffenen Exons zur Bestimmung des Mutationstyps und der Lokalisation.

Immunhistochemisch p16-negative Fälle sowie einige p16-positive Fälle wurden mit Hilfe einer methylierungsspezifischen PCR (MSP) auf ihren Methylierungsstatus in der Promoterregion des Exon 1 untersucht.

2.2.1. Immunhistochemie

Materialien:

Xylol Alkohol 100% Alkohol 96% Alkohol 80% Methanol H₂O₂ 30% 10x PBS (Phosphatpuffer): 14,3 g Dikaliumhydrogenphosphat 2,5 g Kaliumhydrogenphosphat 85 g Natriumchlorid Aqua dest. ad 11 1x PBS: 10x PBS 1:10 verdünnt Primär-Antikörper 0,5 mg/ml: Monoklonaler Maus-anti-p16 IgG1 G175-405 1% BSA (bovines Serumalbumin) in PBS ABC-Kit "Vectastain[®]": Normalserum (Pferd) Sekundär-Antikörper: Biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-IgG A = AvidinB = Biotin-Peroxidase-Komplex DAB-Substrat-Kit: Puffer pH = 7,5DAB (Diaminobenzidin) H_2O_2 Eukitt

Mit Hilfe der p16-Immunhistochemie wurde in allen 75 Tumoren an Paraffingewebeschnitten die Akkumulation des p16-Proteins in Zellkernen untersucht. Zum Vergleich wurden auch Schnitte von neun tumorfreien Ovarien auf ihre p16-Expression untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität der Markierung wurden Negativkontrollen mitgeführt, bei denen statt des Primär-Antikörpers 1% iges BSA aufgetragen wurde. Als Positivkontrolle wurde Tumorgewebe mit positiver p16-Expression aus Vorversuchen verwendet.

Prinzip:	1.	Anti-p16-Antikörper (Maus) =	Primär-Antikörper,				
			bindet an vorhandenes p16				
	2.	. biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper = Sekundär-Antikörpe					
		bindet an den Primär-AK bei Vorliegen von p16					
	3.	Detektionssystem:					
		Bei Vorliegen von p16 und erfolgter Bindung des Primär- und Sekundär-AK					
		entsteht der Avidin-Biotin-Perox	idase-Komplex				
		+ DAB					
	\rightarrow	Farbreaktion bei vorhandenem p	16-Protein				

Die 5 μ m dünnen Paraffinschnitte mussten mit Xylol entparaffiniert und durch Spülen in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%) rehydriert werden. Hiernach erfolgte die Methanolblockade, die stets frisch anzusetzen war:

$\begin{array}{l} 200 \text{ ml Methanol} \\ 5 \text{ ml } H_2O_2 \ 30\% \end{array}$

Die Schnitte wurden 30 Minuten in der Methanolblockade belassen. Sie diente zur Hemmung der endogenen Peroxidase, da andernfalls durch unspezifische Reaktionen ein störender Hintergrund entstanden wäre. Anschließend wurden die Schnitte zweimal kurz mit Leitungswasser und zweimal mit Aqua dest. gespült. Als nächstes folgte eine Spülung in 1x PBS (3x3 Min.). Die Schnitte wurden in eine feuchte Kammer gelegt und 20 Minuten mit Normalserum (vom Pferd) inkubiert, das 1:50 in 1x PBS verdünnt werden musste. Pro Schnitt wurden 100 µl Normalserum (1:50) benötigt. Es diente zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. Nach abgelaufener Zeit wurde der Serumüberschuss abgetropft und der monoklonale Primär-Antikörper aufgetragen. Hierzu musste der Antikörper zuvor 1:100 in 1% BSA verdünnt werden. Pro Schnitt wurden 100 µl Primär-Antikörper verwendet. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer belassen.

Am zweiten Tag erfolgte erneut eine Spülung in PBS für 3x3 Minuten und daraufhin eine 30minütige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper. Dieser wurde 1:200 in PBS verdünnt. Während dieser Inkubation wurde die Lösung für den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex angesetzt. Hierzu wurden 98 Teile PBS mit 1 Teil A und 1 Teil B aus dem ABC-Kit gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert.

Nach abgelaufener Zeit wurde der Sekundär-Antikörper 3x3 Minuten in PBS gespült. Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex wurde aufgetragen (100 μ l pro Schnitt) und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Nach erneuter Spülung in PBS (3x3

Minuten) wurde die Farbreaktion gestartet mit Hilfe einer aus dem DAB-Substrat-Kit angesetzten Lösung, bestehend aus:

5 ml Aqua dest.
2 Tropfen Puffer 7,5
4 Tropfen DAB
2 Tropfen H₂O₂

Die Schnitte wurden mit je 200 µl überschichtet und 15 Minuten unter Lichteinwirkung inkubiert. Nach Abtropfen der DAB-Lösung wurden die Schnitte in PBS gestellt und 2-3x mit Leitungswasser gespült. Zuletzt wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (80%, 96%, 100%) dehydriert, in Xylol gespült und mit Eukitt eingedeckelt.

In p16-negativen Tumoren wiesen stets mehrere nicht-neoplastische Zellen ((Granulozyten, Lymphozyten, Fibrozyten, ovarielles Oberflächenepithel) positive Zellkernmarkierungen auf, die als positive interne Kontrolle dienten.

Es wurde nur die Intensität der Zellkernmarkierung im Tumor semiquantitativ ausgewertet:

Negativ:	0	Keine Zellkernmarkierung im Tumor
Positiv:	+	schwache oder fokale Markierung
	++	mittelgradige Immunoreaktivität
	+++	starke Markierung

2.2.2. Mikrodissektion:

Materialgewinnung und -vorbehandlung für die PCR-SSCP-Durchführung

Die Methode der Mikrodissektion ermöglichte die getrennte Untersuchung von Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen, indem Tumorzellverbände unter Vermeidung einer Kontamination mit nicht malignen (Stroma-)Zellen aus einem Paraffinschnitt unter dem Lichtmikroskop gewonnen wurden (*Zhuang et al. 1995*).

Zunächst wurden für die Mikrodissektion zwei 5 µm dünne Gewebeschnitte pro Paraffinblock mit einem Mikrotom angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Nach Entparaffinieren der Schnitte mit Xylol und Spülen mit Ethanol in absteigender Konzentration (100%-96%-80%) wurde ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.-Färbung) angefärbt und eingedeckelt. Da Hämatoxylin mit der PCR interferierte, wurde der zweite Schnitt nur kurz mit Eosin angefärbt und nicht eingedeckelt. Eosin störte den Ablauf der PCR nicht. Der H.E.-Schnitt diente als Kontrolle, an dem unter dem Mikroskop eine geeignete, möglichst nur Tumorzellen enthaltende Stelle ausgesucht wurde.

An dem Eosin-Schnitt wurde diese Stelle aufgesucht und mit einer modifizierten Pasteur-Pipette, deren Spitze in der Bunsenbrennerflamme mit einem Glasstab fein ausgezogen wurde, unter mikroskopischer Kontrolle ausgekratzt, wodurch eine Läsion von ca. 1 mm Durchmesser im Schnitt entstand. Die hierbei gewonnenen Zellen wurden direkt in ein Reaktionsgefäß mit 10-30 µl Proteinase-Puffer überführt und über Nacht ins Wasserbad bei 37 °C gestellt.

Zusammensetzung des Proteinase-Puffers:

Substanzen:	<u>Stammlösung:</u>	Endkonz.:	<u>auf 1 ml:</u>
Tris-HCl pH 8,0	1 M	0,1 M	100 µl
EDTA	0,5 M	1 mM	2 µl
Tween 20	10%	1%	100 µl
Proteinase K	10 mg/ml	0,1 mg/ml	10 µl
steriles Aqua dest.			788 µl

Vor PCR-Amplifikation musste die Proteinase K durch 10-minütiges Erhitzen auf 98 °C im Thermocycler denaturiert werden.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, mit der DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert werden können mittels spezifischer Primer und einer thermostabilen Taq-Polymerase. Sie wurde gemäß den Anweisungen von *Rolfs et al. (1992)* durchgeführt.

Materialien:

	Konzentration der Stammlösung:
10x Puffer J:	600 mM Tris-HCl $pH = 9,5$ 150 mM (NH ₄)SO ₄
	20 mM MgCl ₂
DMSO:	100%
p16-forward-Primer:	20 µM
p16-reverse-Primer:	20 µM
dNTPs: (dATP, dGTP,	1,25 mM
dCTP, dTTP)	
Taq-Polymerase:	5 units/µl
10x Puffer N:	600 mM Tris-HCl pH = 10,0
	150 mM $(NH_4)SO_4$
	20 mM MgCl ₂
β-Globin-Primer PC04:	20 µM
β-Globin-Primer GH20:	20 µM
steriles Aqua dest.	
Positivkontrolle C2:	0,01 ng/µl, extrahierte DNA aus Normalgewebe (Portio)
Ampli-Wax, Wachskugeln	
Mineralöl	

Für die Amplifikation von p16 Exon 1 wurden bereits beschriebene Primer eingesetzt (*Caldas et al. 1994*). Die Amplifikation von p16 Exon 2 erfolgte in zwei sich überlappenden Fragmenten 2a und 2b. Die hierzu verwendeten Primer wurden von *Hussussian et al. 1994* (Primer 305F, 346R und X2.62F) sowie von *Caldas et al. 1994* (reverse-Primer für Exon 2b) übernommen und sind in *Tab. 2.2.* dargestellt.
p16	Richtung	PCR-Primersequenz	Fragment-
Exon			größe in bp
1	forward	5' - AAG AAA GAG GAG GGG CTG - 3'	339
	reverse	5' - GCG CTA CCT GAT TCC AAT TC - 3'	
2a	forward	5' - AGC TTC CTT TCC GTC ATG C - 3'	269
	reverse	5' - CCA GGT CCA CGG GCA GA - 3'	
2b	forward	5' - TGG ACG TGC GCG ATG C - 3'	199
	reverse	5' - TCT GAG CTT TGG AAG CTC TC - 3'	

Tab. 2.2.: Primersequenzen und Fragmentgrößen der p16-Fragmente

bp = *Basenpaar*

Vom β -Globin-Gen wurde ein Fragment amplifiziert mit den bereits beschriebenen Primern PC04 und GH20 (*Bauer et al. 1992*), wie in *Tab.2.3.* dargestellt.

Tab. 2.3.: Primersequenzen und Fragmentgrößen der β -Globin-Fragmente

β-Globin	Richtung	PCR-Primersequenz	Fragment-
Primer			größe in bp
PC04	forward	5' - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC - 3'	268
GH20	reverse	5' - GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC - 3'	268

bp = *Basenpaar*

Aufgrund der geringen Zellzahl, die durch Mikrodissektion gewonnen wurde, stand zur Amplifikation mittels PCR nur eine geringe DNA-Menge zur Verfügung. Daher musste die PCR im Vorfeld stark optimiert werden.

Für jede Versuchsreihe wurde für alle Proben ein gemeinsamer "Master-Mix" hergestellt, der für den sog. "Hot start" (s.u.) bei der PCR von p16-Fragmenten in eine Unterphase und eine Oberphase geteilt wurde.

<u>Unterphase</u>	<u>e:</u>				
	<u>µl/Ansatz:</u> Substanz:		Konz. Stammlösung:	Endkonz.:	
	5,0	Puffer J	10x	1x	
	2,5	DMSO	100%	5%	
	2,5	forward-Primer	20 µM	1 µM	
	2,5	reverse-Primer	20 µM	1 µM	
	3,5	Steriles Aqua dest.			
	16,0				
Oberphase	<u>:</u>				
	4	dNTPs	1,25 mM	100 µM	
	0,4	Taq-Polymerase	5 units/µl	1 unit/Ans.	
	20,6	Steriles Aqua dest.			
	25,0				

Für die PCR von p16 Exon 1, 2a und 2b wurde ein "Hot start" durchgeführt. Hierbei wurde eine Unterphase aus 16 μ l Master-Mix, der die Primer enthielt, mit 9 μ l Probe (insgesamt 25 μ l) sowie einer steril entnommenen Kugel Ampli-Wax in einem 500 μ l Reaktionsgefäß bei 80 °C für 5 Minuten im Thermocycler inkubiert. Nach Abkühlung auf 20 °C wurde auf das feste Wachs die Oberphase (25 μ l) pipettiert, die die dNTPs und die Taq-Polymerase enthielt. Der Hot start erhöht die Spezifität, da die Reaktion (Kettenverlängerung) erst bei höheren Temperaturen ablaufen kann, wenn das Wachs geschmolzen ist und die Primer aus der Unterphase mit der Taq-Polymerase aus der Oberphase in Kontakt kommen. Eine unspezifische Bindung der Primer und somit eine Amplifikation unspezifischer DNA-Fragmente wird dadurch verhindert.

Hot start:	- Unterphase:	25 µl	\rightarrow	16 µl Mastermix
			+	9 µl Probe
			+	Ampli-Wax, im Thermocycler schmelzen:
			\rightarrow	5 Minuten bei 80 °C, dann 2 Minuten bei 20 °C
	- Oberphase:	25 µl	\rightarrow	auf das abgekühlte feste Wachs geben

Anschließend wurde nach einer einmaligen Denaturierung für 3 Minuten bei 95 °C die PCR gestartet, wobei durch "Touchdown" die Annealing-Temperatur von 65 °C (4 Zyklen) über 60 °C (4 Zyklen) auf 55 °C (34 Zyklen) gesenkt wurde *(s. Tab. 2.4.)*. Die höhere Annealing-

Temperatur zu Beginn erhöht ebenfall die Spezifität, allerdings zu Lasten der Sensitivität. Die Reduktion der Annealing-Temperatur im weiteren Verlauf verbessert die Sensitivität.

Nach Abschluss des letzten Zyklus verweilten die Proben 6 Minuten bei 72 °C, um die Kettenverlängerung zu vervollständigen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Denaturierung Temp./Dauer	Annealing Touchdown Temp./Dauer	Extension Temp./Dauer	Anzahl der Zyklen
95 °C / 1 min.	65 °C / 1 min.	72°C / 1 min.	4
95 °C / 1 min.	60 °C / 1 min.	72°C / 1 min.	4
95 °C / 1 min.	55 °C / 1 min.	72°C / 1 min.	34

Tab.: 2.4.: PCR-Reaktionsbedingungen für p16 Exon 1, 2a und 2b

Temp. = Temperatur; min. = Minuten

Zur Kontrolle, dass DNA in der Probe vorhanden war, wurde aus derselben Probe ein Fragment des β -Globin-Gens amplifiziert, das in allen DNA-haltigen Zellen vorkommt. Zum Nachweis von homozygoten Deletionen wurden in Nicht-Tumorzellen ebenfalls p16 und β -Globin untersucht.

PCR-Versuchsansatz für â-Globin:

Für jede Versuchsreihe wurde für alle Proben ein gemeinsamer "Master-Mix" hergestellt. Zusammensetzung:

<u>µl/Ansatz:</u>	Substanz:	Konz. Stammlösung:	Endkonz.:
5	Puffer N	10x	1x
4	dNTPs	1,25 mM	100 µM
2,5	Primer PC04	20 µM	1 μM
2,5	Primer GH20	20 µM	1 μ M
0,2	Taq-Polymerase	5 units/µl	1 unit/Ansatz
30,8	Steriles Aqua dest.		
45,0			

45 μl Master-Mix und 5 μl Probe wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Als Verdunstungsschutz wurden zwei Tropfen Mineralöl aufgetropft. Im Thermocycler erfolgte zunächst ein Denaturierungsschritt für 5 Minuten bei 94 °C. Anschließend folgten 40 Reaktionszyklen *(s.Tab.2.5.)*, nach deren Ablauf die Proben bei 72 °C für 7 Minuten verweilten, um die Extension zu vervollständigen. Die Proben wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Tab.2.5.: PCR-Reaktionsbedingungen für â-Globin:				
	<u>Temp./Dauer:</u>			
Denaturierung:	94 °C/30 sek.			
Annealing:	55 °C/30 sek.			
Extension:	72 °C/30 sek.			
Anzahl der Zyklen:	40			

Zur Beurteilung des Amplifikationsablaufs wurden pro Versuchsreihe sowohl bei p16 als auch bei â-Globin zwei Kontrollen mitgeführt:

1. Negativkontrolle:

Zur Überprüfung einer Kontamination des Master-Mix mit DNA, die nicht aus der Probe stammte, wurden bei p16 9 μ l und bei β -Globin 5 μ l Aqua dest. (steril) statt der entsprechenden Probenmengen eingesetzt.

2. Wildtyp-Positivkontrolle:

Um den Erfolg der Amplifikation zu überprüfen, wurde extrahierte DNA aus Normalgewebe (Portio) in einer Konzentration von 0,01 ng/ μ l für p16 und β -Globin verwendet.

Bei der Deletionsanalyse wurde in deletionsverdächtigen Fällen die p16-PCR wiederholt unter Mitführung einer Deletionskontrolle. Es handelte sich hierbei um DNA der Mamma-Karzinom-Zelllinie MDA-MB 231 mit nachgewiesener p16-Deletion (Kamb et al. 1994, Herman et al. 1995).

2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Materialien:

Agarose:	3%	
50x Tris-Acetat-Puffer:	2 M Trishydroxymethylaminomethan	
	0,1 M EDTA	
	\rightarrow pH = 7,8 mit Eisessig eingestellt	
Aqua dest.		
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml	
Lastpuffer:	43% Glyzerin	
	1 mM EDTA	
	4 mg/ml Bromphenolblau	
	4 mg/ml Xylene Cyanol	
Molekulargewichtsmarker V:	0,25 µg/µl	

Zur Abschätzung der Fragmentlänge der PCR-Amplifikate sowie zum Nachweis einer homozygoten Deletion wurden die PCR-Produkte in einem 3% igen Agarosegel aufgetrennt. 3 g Agarose wurden in 98 ml Aqua dest. und 2 ml 50x Tris-Acetat-Puffer gut gemischt und in der Mikrowelle bis zur Homogenität aufgekocht. Nach kurzer Abkühlung wurden unter Rühren 5 µl Ethidiumbromid-Lösung in das 100 ml Gel pipettiert. Anschließend wurde das Gel zum Erstarren luftblasenfrei auf den Gelträger gegossen.

Von jedem PCR-Amplifikat wurden 15 μ l mit 1,5 μ l Lastpuffer gemischt, um eine Diffusion der Proben aus den Geltaschen zu verhindern sowie die zurückgelegte Laufstrecke erkennbar zu machen. Zur Abschätzung der Fragmentlänge wurde auf jedem Gel der Molekulargewichtsmarker V für kleine Fragmente (bis 587 Basenpaare) mitgeführt, von dem hierzu 5 μ l mit 0,5 μ l Lastpuffer vermengt wurden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Laufpuffer (1x Tris-Acetat-Puffer) bei 100 V für ca. 30 Minuten. Nach dem Lauf wurden die Banden der DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

2.2.5. DNA-Fällung

Materialien:

Konzentration der Stammlösung:

Na-Acetat	3 M, $pH = 5,2$
Ethanol	100%, - 20 °C
Ethanol	70%, - 20 °C
Aqua dest. (steril)	
50x SSCP-ME-Puffer:	1 M MOPS (Morpholino-Propansulfonsäure)
	250 mM EDTA pH = 8
1x SSCP-ME-Puffer	50x SSCP-ME-Puffer, 1:50 verdünnt

Um deutlichere Banden im SSCP-MDE-Gel zu erzielen, wurde die DNA-Menge konzentriert, indem sie aus ca. 30 μ l gefällt und anschließend in einem geringeren Volumen (6 μ l) wieder gelöst wurde. Dadurch wurde die DNA um das Fünffache konzentriert.

Zu 30 µl PCR-Produkt wurden 30 µl steriles Aqua dest., 6 µl Na-Acetat sowie 200 µl Ethanol (100%, -20 °C) pipettiert und gut gemischt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert. Nun wurden die Proben unter Kühlung (4 °C) 30 Minuten mit 13000 UPM zentrifugiert. Der Überstand über dem sichtbaren DNA-Sediment wurde dann vorsichtig abpipettiert, ohne das Sediment aufzuwühlen. Es wurden 200 µl Ethanol (70%, -20°C) zugegeben und erneut 30 Minuten bei 4 °C mit 13000 UPM zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand erneut abpipettiert und das Sediment bei offenem Reaktionsgefäß im Trockenschrank (37 °C) ca. 30 min. getrocknet.

Zur weiteren Verwendung wurde die gefällte DNA in 6 µl 1x SSCP-ME-Puffer gelöst.

2.2.6. SSCP-Analyse (Single strand conformation polymorphism analysis)

Materialien:

Polyacrylamid-Gel:	2x MDE - Gellö	sung			
	10x TBE (Trisbo	oratpuffer):	108 g Tris Base		
			55 g Borsäure		
			40 ml 0,5 M EDTA pH 8		
			Aqua dest. ad 1 l		
			pH 8,43		
	4% APS (Ammo	oniumpersul	fat) : 0,4 g APS in 10 ml Aqua dest.		
	TEMED (Tetran	nethylethyle	ndiamin)		
	40% Glycerin				
	Aqua dest.				
Denaturierungslösung:	95% Formamid				
	20 mM EDTA				
	0,05% Bromphenolblau				
	0,05% Xylene-C	Cyanol			
Laufpuffer:	0,6x TBE: 60	0 ml 10x TH	BE + 940 ml Aqua dest.		
Silbernitratfärbung:	Puffer A: 20	00 ml Ethar	nol 100%		
	Puffer B: 1	Puffer B: 1 g Silbernitrat auf 1 l Aqua dest.			
	10	0 ml Essigs	äure 100%		
	А	qua dest. ad	21		
	Puffer C: 4	,5 g Natriun	nhydroxid auf 300 ml Aqua dest.		
	0,	,03 g Natriu	mborohydrid		
	1,	,2 ml Forma	aldehyd		
	Puffer D: 1:	5 g Natrium	carbonat auf 2 l Aqua dest.		

Mit der SSCP-Analyse wird Einzelstrang-DNA auf Punktmutationen untersucht. Die SSCP-Analyse macht sich das Prinzip zunutze, dass DNA-Einzelstränge gleicher Länge mit unterschiedlichen Sequenzen unterschiedliches Laufverhalten während der Elektrophorese in nicht-denaturierenden Acrylamid- oder MDE-Gelen aufweisen. Unter nicht-denaturierenden Bedingungen bildet Einzelstrang-DNA eine Faltstruktur aus, die durch die intramolekularen Interaktionen determiniert wird und somit durch die Sequenz. Mutationen verändern die DNA-Sequenz und können dadurch zu einer veränderten Faltstruktur führen, was wiederum ein verändertes Laufverhalten im MDE-Gel bewirkt (*Rolfs et al. 1992*).

Als erster Schritt erfolgte die Amplifikation des interessanten DNA-Segments mittels PCR und anschließend der Vergleich der Mobilität der Einzelstränge im MDE-Gel. Hierzu mussten die PCR-Produkte denaturiert werden, um DNA-Einzelstränge zu erhalten. Die Zusammensetzung des MDE-Gels beeinflusste entscheidend die Vergleichbarkeit des Laufverhaltens, so dass ihre Optimierung vorteilhaft war. Zum Nachweis der Einzelstrangbanden wurde eine Silbernitratfärbung durchgeführt. Da schon einzelne Punktmutationen in der DNA-Sequenz zu einem veränderten Laufverhalten im MDE-Gel führen können, ist diese Methode gut geeignet zur Detektion von Mutationen in einem DNA-Segment. So sollen mittels SSCP 75-95% aller Mutationen identifiziert werden können (*Ravnik-Glavac et al. 1994, Hussussian et al. 1994).* In der Regel wird für die SSCP in Abhängigkeit von der amplifizierten Segmentgröße eine Sensitivität von 70% angegeben (*Sheffield et al. 1993, Campbell et al. 1995*).

Herstellung des Polyacrylamid-MDE-Gels:

Zum Aufbau der Gelkammer wurde auf eine Glasplatte eine Trägerfolie *(Gel Support-Film, Quiagen)* so gelegt, dass ihre hydrophobe Seite der Glasplatte, ihre hydrophile Seite dagegen dem herzustellenden Gel zugewandt war. Auf der Folie wurde der Teflon-Spacer positioniert, der das Gel an drei Seiten begrenzte. Eine silikonisierte Glasplatte wurde mit ihren Teflon-Taschenformern nach innen und zum unteren Spacer-Rand hin aufgelegt und mit Klemmen fixiert. Die Gelkammer wurde mit der offenen Seite nach oben senkrecht aufgestellt.

Das MDE-Gel besaß je nach Exon eine andere Zusammensetzung (*Tab.5*). Der entscheidende Unterschied lag in der Verwendung von Glycerin beim MDE-Gel für Exon 1, was eine genauere Auftrennung der Banden bewirkte. Dagegen ließen sich bei beiden Fragmenten des Exon 2 (2a, 2b) bessere Ergebnisse mit Gelen ohne Glycerin erzielen.

Bei allen drei Fragmenten wurden für das 40 ml-Gel mit Ausnahme von APS und TEMED alle übrigen in der *Tab.2.6.* genannten Substanzen in der angegebenen Menge in ein Gefäß pipettiert und bis zur Homogenität gerührt. Nach Zugabe von 400 μ l APS sowie 16 μ l TEMED startete die Polymerisationsreaktion. Das Gel musste sodann zügig mit einer 50 ml-Pipette luftblasenfrei in die Gelkammer pipettiert werden und mindestens eine Stunde polymerisieren.

Substanz	Konz.	Endkonz. im	Exon 1	Exon 2a	Exon 2b
	Stammlsg.	Gel			
MDE	2 x	0,5 x	10 ml	10 ml	10 ml
TBE	10 x	0,6 x	2,4 ml	2,4 ml	2,4 ml
Glycerin	40%	5%	5 ml		
Aqua dest.			22,6 ml	27,6 ml	27,6 ml
(ad 40 ml)					
APS	4%	0,04%	400 µl	400 µl	400 µl
TEMED	100%	0,04%	16 µl	16 µl	16 µl

Tab.2.6.: Zusammensetzung der MDE-Gele

Probenvorbehandlung:

Um die doppelsträngigen PCR-Produkte in Einzelstränge aufzutrennen, mussten die Proben mit einer Denaturierungslösung behandelt werden. Das darin enthaltene Formamid senkt die Schmelztemperatur der DNA-Doppelstränge. Es wurden 3 µl PCR-Produkt (in 1x SSCP-ME-Puffer gelöst) mit 3 µl Denaturierungslösung für zehn Minuten bei 90 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben im Eiswasserbad abgeschreckt und bis zum Auftragen auf das MDE-Gel darin aufbewahrt. Dies gewährleistete, dass sich möglichst wenig DNA-Doppelstränge neu bildeten.

Verwendete Kontrollen:

Als Kontrollen wurden die in der PCR amplifizierte Wildtyp-Positivkontrolle sowie die Mutationskontrolle CaPan-2 mit einer bekannten Mutation in Exon 1 auf dem MDE-Gel mitgeführt. Bei CaPan-2 handelt es sich um die Zelllinie eines humanen Pankreaskarzinoms mit einer 6-Basenpaar-Insertion (Thr+Ala) in Exon 1 Codon 11/12 (*Caldas et al. 1994*).

Präelektrophorese und Elektrophorese:

Die Puffertanks der horizontalen SSCP-Elektrophoresekammer wurden mit jeweils einem Liter des Laufpuffers 0,6x TBE gefüllt. Nach vorsichtiger Herausnahme des auf der Trägerfolie haftenden MDE-Gels aus der Gelkammer und Reinigung der Folienränder wurde das Gel auf der temperierbaren Platte waagerecht mit den Geltaschen zur Kathode plaziert. Das Gel wurde zum Schutz vor Austrocknung mit einer Folie bedeckt, die die Geltaschen freiließ. Die mit Laufpuffer getränkten Elektrodentücher stellten die Verbindung zwischen Gel und Puffer her, ohne die Taschen zu bedecken. Die ganze Anordnung wurde mit einer Glasplatte beschwert.

Zunächst erfolgte die Präelektrophorese für 30 Minuten bei 20 °C und 6 W. Sie sollte sicherstellen, dass sich möglichst keine den Probenlauf störenden Verunreinigungen in dem Gel befanden.

Im Anschluss an die Präelektrophorese wurden nach Entfernung der Glasplatte die bis dahin im Eiswasserbad gelagerten Proben in die 6 µl fassenden Geltaschen pipettiert. Die Wildtypund Mutations-Positivkontrollen wurden in der Gelmitte plaziert. Sodann wurde die Elektrophorese unter den für jedes Exon optimierten Laufbedingungen *(s. Tab. 2. 7.)* gestartet.

Exon	Leistung	Temperatur	Zeit
1	2,5 W	20 °C	18 h
2a	6 W	20 °C	3,5 h
2b	6 W	20 °C	5,5 h

Tab.2.7.: Elektrophorese-Laufbedingungen

Silbernitratfärbung:

Zur Darstellung der DNA-Banden wurde das MDE-Gel nach Ablauf der Elektrophorese einer Silbernitratfärbung unterzogen. Dazu wurde das beständig leicht geschüttelte Gel zweimal für jeweils drei Minuten gleichmäßig mit Puffer A überschichtet, dann nach Abgießen von Puffer A für 15 Minuten in Puffer B belassen und mit sterilem Aqua dest. abgespült. Es folgte eine 20minütige Inkubation im frisch anzusetzenden Puffer C und zuletzt eine 10minütige Inkubation in Puffer D. Nach kurzem Abspülen mit sterilem Aqua dest. wurde das Gel zwecks Konservierung in Plastikfolie eingeschweißt.

Die einzelnen DNA-Banden kamen in dem Gel dunkelbraun gefärbt zur Darstellung.

In Fällen, in denen das Bandenmuster abwich vom Bandenmuster der Wildtyp-Kontrolle, wurden PCR und SSCP-Analyse erneut durchgeführt, diesmal aber unter Mitführung von Proben aus Nicht-Tumorgewebe. Diese dienten als Kontrolle, ob es sich bei den in der SSCP nachgewiesenen Abweichungen im Tumorgewebe um Keimbahnmutationen oder um Polymorphismen oder tatsächlich um neu aufgetretene, in Nicht-Tumorgewebe nicht nachweisbare Mutationen handelte.

2.2.7. DNA-Sequenzanalyse

In den Fällen, in denen nach wiederholter PCR und SSCP-Analyse Abweichungen von der Wildtyp-Kontrolle im Bandenmuster bestanden, wurde eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt. Hierzu wurden die abweichenden Banden mit sterilen Skalpellklingen aus dem MDE-Gel ausgeschnitten und über Nacht in 0,1 ml Aqua dest. eluiert. Für die Reamplifizierung mittels PCR wurden dieselben Primer verwendet wie in *Tab.2.2.* beschrieben. Die amplifizierten Fragmente wurden mittels Centricon-100-Filtern gemäß Vorschrift von überschüssigen Pufferbestandteilen und Primern gereinigt.

Die gereinigten Sequenzierungsprodukte wurden zur automatischen Sequenzanalyse in das Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf (Hamburg) gegeben, wo Dr. Friedrich Buck die Detektion der Sequenz vornahm. Es wurden 3 bis 7 μ l zur nicht-radioaktiven Sequenzierung mittels eines Kits (Dye terminator cycle sequencing kit, Perkin Elmer) der Vorschrift entsprechend verwendet und der automatischen Sequenzanalyse (Applied Biosystems, Foster City, CA) zugeführt. Die für die nicht-radioaktive Sequenzierung benutzten internen Primer sind in *Tab.2.8.* aufgeführt.

Exon	Richtung	Primersequenz
1	forward	GTC ACC AGA GGG TGG GGC GGA
1	reverse	CTG CAA ACT TCG TCC TCC AG
2a	forward	CTG GCT CTG ACC ATT CTG
2a	reverse	CCC AGG CAT CGC GCA CGT C
2b	Es wurden die Po	CR-Primer (<i>Tab.2.2.</i>) zur Sequenzierung verwendet.

Tab.2.8.: Primersequenzen für die Zyklussequenzierung

2.2.8. Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Neben der Mutation und Deletion ist die Hypermethylierung der CpG-reichen 5'-Promoterregion ein weiterer möglicher Weg der Inaktivierung von p16 (Merlo et al. 1995, Herman et al. 1995). Der Methylierungszustand der DNA hat entscheidende regulatorische Effekte auf die Gen-Expression durch transkriptionale Inaktivierung bei Hypermethylierung. Der Methylierungsstatus der DNA-Proben wurde durch methylierungsspezifische PCR nach Herman et al. 1996 bestimmt, bei der im Gegensatz zu anderen Methoden (Verwendung von Restriktionsenzymen mit PCR oder Southern Blot-Hybridisierung) geringere DNA-Mengen ausreichten (Herman et al. 1996, Wong et al. 1997a). Zudem wurden die Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCR nicht durch eine mögliche Kontamination mit Nicht-Tumorzellen beeinflusst (Herman et al. 1996). Alle immunhistochemisch p16-negativen Fälle sowie 19 weitere Fälle - darunter sämtliche muzinösen und endometrioiden Karzinome wurden bezüglich ihres Methylierungsstatus der CpG-reichen Region des Exon 1 untersucht (insgesamt 29 Fälle). Hierzu wurde gröberes Mikrodissektionsmaterial aus Paraffingewebeschnitten verwendet, das 50-90% Tumorzellen enthielt.

Nach proteolytischer Behandlung erfolgte eine DNA-Modifikation mittels Bisulfit, wodurch alle unmethylierten Cytosine zu Uracil konvertiert wurden. Die methylierten Cytosine (5-Methylcytosin) dagegen blieben unverändert. Ein 150 Basenpaar-Fragment dieser modifizierten DNA wurde mit Hilfe der methylierungsspezifischen PCR amplifiziert, die sich die Sequenzunterschiede von methylierten und unmethylierten Allelen zunutze macht. Hierbei wurden Primerpaare für methylierte und unmethylierte CpG-Regionen in der Promoter-Region des Exon 1 benutzt, wie durch *Herman et al. (1996)* beschrieben (*s.Tab.2.10.*).

Materialien:

DNA-Denaturierung:	2M NaOH H ₂ O Proteinase-Puffer mit Proteinase K			
Bisulfit-Behandlung:	10mM Hydrochinon 3M Natriumbisulfit, pH 5			
Reinigung:	Centricon 100-Filter 2M NaOH			

Fällung:	100% Ethanol	
	70% Ethanol	
	H ₂ O	
Methylierungsspezifische		
PCR (MSP):	Konz. Stammlösung:	Endkonzentration:
Puffer J	10x	1 x
Primer p16-UF	20 µM	1 µM
Primer p16-UR	20 µM	1 µM
Primer p16 MF	20 µM	1 µM
Primer p16-MR	20 µM	1 µM
Ampli-Wax		
dNTPs	je 1,25 mM	100 μM
Taq-Polymerase	5 U/ µl	1 U/Ansatz
H ₂ O		

Das Mikrodissektionsmaterial wurde, wie unter 2.2.2. beschrieben, mit einem Proteinase Khaltigen Puffer behandelt. Für die MSP war zunächst eine Denaturierung der DNA erforderlich. Hierzu wurden zu 15 µl der Proteinase-behandelten Proben 5 µl 2M NaOH sowie H₂O ad 50 µl hinzugegeben und bei 75°C 10 Minuten lang inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in Eiswasser abeschreckt und der Bisulfit-Behandlung zugeführt: Nach Hinzufügen von 30 µl 10 mM Hydrochinon sowie 520 µl 3M Na-Bisulfit erfolgte die Inkubation bei 50°C über Nacht bzw. für 16 Stunden. Das Na-Bisulfit musste frisch angesetzt werden, das Lösen erfolgte unter langsamer Erwärmung, der PH wurde mit NaOH-Plätzchen auf pH 5 eingestellt. Als nächstes erfolgte die Reinigung über Centricon 100-Filter gemäß Vorschrift. Das Eluat von ca. 50 µl wurde mit 7,5 µl 2M NaOH bei Raumtemperatur 5 Minuten lang denaturiert. Anschließend wurde die DNA-Fällung mit 100% Ethanol und anschließendem Waschen in 70% Ethanol (wie unter 2.2.5 beschrieben) vorgenommen. Das Sediment wurde im Trockenschrank getrocknet und zur Weiterverwendung in 20 µl H₂O gelöst.

Für die methylierungsspezifische PCR (MSP) wurden je 5 μ l eingesetzt. Es wurde wie unter 2.2.3. ein Hot start vorgenommen, für den in einer Unterphase von insgesamt 25 μ l der Puffer J, die Primer UF/UR bzw. MF/MR, 5 μ l Probe sowie H₂O ad 25 μ l und ein Kügelchen Ampli-

Wax enthalten waren. Der Hot start erfolgte für 5 Minuten bei 95°C, wodurch mit Hilfe des Ampli-Wax die Unterphase versiegelt wurde. Jetzt wurde die Oberphase hinzugefügt, die die dNTPs sowie die Taq-Polymerase und H₂O ad 25 μ l enthielt. Die Amplifikation fand im Thermocycler statt, die Denaturierung erfolgte für 30s bei 95°C, Annealing für 30s bei 60°C für Primerpaar UF/UR bzw bei 65°C für Primerpaar MF/MR und die Verlängerung für 30s bei 72°C. Nach 40 Zyklen wurden die Proben für eine abschließende Verlängerungsphase von 4 min. bei 72°C im Thermocycler belassen.

	<u>Temp./Dauer:</u>
Denaturierung:	95 °C/30 sek.
Annealing:	
- Primer UF/UR	60 °C/30 sek.
- Primer MF/MR	65 °C/30 sek.
Extension:	72 °C/30 sek.
Anzahl der Zyklen: 40	

Tab.2.9.: MSP-Reaktionsbedingungen für p16-Exon1:

Zur Visualisierung wurden die Proben der Gelelektrophorese zugeführt und auf ein 3% iges Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel (s. 2.2.4.) aufgetragen, in dem sie unter dem UV-Transilluminator sichtbar wurden.

Primer-	Richtung	PCR-Primersequenz			
Paar					
p16-M	forward	5' – TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC - 3'			
	reverse	5' – GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA - 3'			
p16-U	forward	5' – TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT - 3'			
	reverse	5' – CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A- 3'			

Tab.2.10.: Primerpaare für methylierungsspezifische PCR (Herman et al. 1996)

p16-M=Primer spezifisch für methylierte DNA; p16-U=Primer spezifisch für unmethylierte DNA

2.2.9 Statistik

Die statistische Datenauswertung erfolgte durch computergestützte Datenanalyse. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde unter zu Hilfenahme des Computerprogramms SPSS Version 10.0 für Windows ermittelt. Zur Anwendung kam der Chi-Quadrat-Test nach Pearson. Bei den Ergebnissen wurde p<0,05 als signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden alle 75 Tumor-Fälle bezüglich ihrer p16-Protein-Expression untersucht, wobei nur die Zellkernmarkierung ausschlaggebend war für die Beurteilung der Expression. Die vergleichende Untersuchung von neun Fällen mit normalem, nicht-neoplastischen Ovarialepithel ergab wie in der Studie von *Geradts et al. (1995)* eine schwache oder mittelgradige Immunreaktivität (+, ++) der Zellkerne, lymphatische Zellen und Fibrozyten sowie das ovarielle Oberflächenepithel reagierten überwiegend positiv. Sämtliche Negativkontrollen erwiesen sich als komplett p16-negativ, was die hohe Spezifität des Primär-Antikörpers beweist.

Die Verteilung der positiven Immunreaktivität auf Zellkerne und Zytoplasma entsprach im wesentlichen der von *Geradts et al. (1995)* beschriebenen Verteilung. In den meisten Fällen zeigten die Tumor-Zellkerne eine größere p16-Immunreaktivität als das zugehörige Zytoplasma, welches oft nur schwach positiv war. Bei einigen immunhistochemisch p16negativen und schwach positiven Fällen fand sich eine deutlich größere Immunreaktivität des Zytoplasma. Dieses Phänomen wurde auch von *Geradts et al. (1995)* beobachtet, wobei zum Untersuchungszeitpunkt unklar war, inwiefern extranukleäres p16 dafür verantwortlich war oder ob es sich um unspezifische Zytoplasma-Reaktivität handelte. Da diese zytoplasmatische Immunreaktivität die Evaluation der nukleären Markierung zuweilen erschwerte, war eine sorgfältige Untersuchung vieler Zellen erforderlich.

In Anlehnung an die Studie von *Geradts et al. (1995)* wurde ein Tumor als p16-negativ bezeichnet, wenn keinerlei Zellkernmarkierung im gesamten Tumor nachweisbar war, unabhängig von der Zytoplasmamarkierung. Nichtneoplastisches anliegendes Gewebe wies dabei stets positive Zellkernmarkierungen auf und diente somit als positive interne Kontrolle. Komplett p16-negative Schnitte konnten nicht interpretiert werden. Ein Tumor galt als p16positiv, wenn sämtliche interpretierbaren Tumorareale eine positive Zellkern-Immunreaktivität aufwiesen. Dabei fanden sich auch in dieser Studie in einigen deutlich p16positiven Tumoren Areale ohne Zellkernmarkierung *(s. Bildanhang: IHC).*

Die Ergebnisse der p16-Immunhistochemie sind in Tab. 3.1. und Tab. 3.2. dargestellt.

	n	p16-	fokal/schwach	mittelgradig	stark	ñ
		negativ	pos.	pos.	pos.	
Histologie						
serös-papillär	55	4 (7%)	14 (26%)	21 (38%)	16 (29%)	
endometrioid	8	4 (50%)	4 (50%)	-	-	
muzinös	6	1 (17%)	3 (50%)	1 (17%)	1 (17%)	
anaplastisch/undiff.	6	1 (17%)	2 (33%)	1 (17%)	2 (33%)	0,027
Grading						
G1	9	4 (44%)	2 (22%)	2 (22%)	1 (11%)	
G2	25	2 (8%)	11 (44%)	6 (24%)	6 (24%)	
G3	41	4 (10%)	10 (24%)	15 (37%)	12 (29%)	0,068
klin. Staging (FIGO) ¹						
Ι	4	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	-	
II	9	2 (22%)	3 (33%)	3 (33%)	1 (11%)	
III	28	4 (14%)	8 (29%)	8 (29%)	8 (29%)	
IV	32	3 (9%)	11 (34%)	8 (25%)	10 (31%)	0,311 ⁴
p53-IHC ²						
0	30	7 (23%)	11 (37%)	9 (30%)	3 (10%)	
1	17	-	6 (35%)	4 (24%)	7 (41%)	
2	11	2 (18%)	2 (18%)	4 (36%)	3 (27%)	
3	16	1 (6%)	4 (25%)	6 (38%)	5 (31%)	0,512
Ki67-IHC ³						
0	1	-	-	-	1 (100%)	
1	27	3 (11%)	12 (44%)	7 (26%)	5 (19%)	
2	26	5 (19%)	3 (12%)	9 (35%)	9 (35%)	
3	13	1 (8%)	5 (39%)	5 (39%)	2 (15%)	0,265
Alter (in Jahren)						
< 50	21	3 (14%)	9 (43%)	6 (29%)	3 (14%)	
50	54	7 (13%)	14 (26%)	17 (32%)	16 (30%)	0,354
Tumoren insgesamt	75	10 (13%)	23 (31%)	23 (31%)	19 (25%)	

Tab.3.1: Ergebnisse der nukleären p16-Immunhistochemie in Assoziation mit histologischen, klinischen und biochemischen Parametern

pos.: positiv; IHC: Immunhistochemie; undiff.: undifferenziert

In 2 Fällen mit mittelgradig positiver p16-IHC waren keine Staging-Daten verfügbar.
In einem Fall mit stark positiver p16-IHC lag keine p53-IHC vor (Kappes et al. 1995).
In 8 Fällen lag keine Ki67-IHC vor (1x negative, 1x schwach positive, 3x mittelgradig positive und 3x stark positive p16-IHC; Röhlke et al. 1997).

⁴Stadium I/II gegen Stadium III/IV

1. Von den 75 Fällen zeigten 10 keine p16-Expression (13%). 65 Fälle reagierten immunhistochemisch positiv, wobei 23 Fälle schwach oder fokal (+; 31%), 23 mittelgradig (++; 31%) und 19 Fälle stark (+++; 25%) positiv waren *(Tab.3.1.)*. 2. Der Verlust der p16-Expression fand sich insbesondere in endometrioiden Karzinomen (50%), während nur 7% der serös-papillären Karzinome betroffen waren. Muzinöse und anaplastisch-undifferenzierte Karzinome zeigten sich in jeweils 17% immunhistochemisch negativ.

3. Der Anteil der schwach oder fokal exprimierten Fälle belief sich bei den endometrioiden und muzinösen Karzinomen auf jeweils 50%, bei den serös-papillären Karzinomen dagegen nur auf 26%.

4. 67% der serös-papillären Karzinome wiesen eine starke (29%) oder mittelgradige (38%) p16-Expression auf. Der Anteil der muzinösen Karzinome mit mittelgradiger oder starker p16-Expression betrug dagegen nur jeweils 17%. Die endometrioiden Karzinome waren ausschließlich p16-negativ (50%) oder schwach positiv (50%). Dieser Unterschied war signifikant (\tilde{n} =0,027).

5. Tumoren ohne p16-Expression waren häufig hochdifferenziert (40% G1-Tumoren). Die Unterschiede waren nicht signifikant (ñ=0.068), wiesen jedoch die beschriebene Tendenz auf. Bei 50% dieser Tumoren handelte es sich um endometrioide und muzinöse Karzinome. Insgesamt waren endometrioide und muzinöse Karzinome häufiger nukleär immunhistochemisch p16-negativ bzw. schwach/fokal positiv als serös-papilläre und anaplastisch-undifferenzierte Karzinome. Der Unterschied war signifikant (ñ=0,027). Ebenso waren p16-negative Tumoren assoziiert mit frühen klinischen Stadien (FIGO I/II). 23% aller Tumoren im Stadium I/II waren nukleär immunhistochemisch p16-negativ (3/13), während nur 12% aller Tumoren im Stadium III/IV (7/60) keine nukleäre p16-Expression aufwiesen. Die Differenzen waren statistisch nicht signifikant (ñ=0.311). Es ließ sich keine Assoziation zum Patientinnenalter, zur proliferativen Aktivität - gemessen an der Ki67-Immunreaktivität sowie zur p53-Expression feststellen (Kappes et al. 1995, Röhlke et al. 1997). Drei Tumoren waren immunhistochemisch p16-negativ sowie p53-positiv, was für eine Inaktivierung beider Suppressorgene sprach. Ein Vergleich mit vorhandenen TGGE-Ergebnissen von Kappes et al. (1995) bezüglich p53-Mutationen ergab in allen drei Fällen p53-Wildtypkonformation. Demnach fand sich in keinem der p16-negativen Fälle eine p53-Mutation.

6. In 7 von 10 immunhistochemisch p16-negativen Fällen ließen sich Veränderungen nachweisen, die die fehlende Expression von p16 erklären können: eine Deletion (*Fall 90*), 3 Mutationen (*Fälle 20, 21, 25*) sowie 3 Hypermethylierungen (*Fälle 53, 99, 85*). Bei den fokal/schwach positiven Fällen fanden sich dagegen nur in 6 von 23 Fällen Abnormitäten (*2 Mutationen: Fälle 103, E1; 4 Hypermethylierungen: Fälle 4, 35, 86, 64*). Bei den

mittelgradig positiven Fällen wurde nur in einem von 23 Fällen eine Mutation festgestellt *(Fall E6).* Die 19 stark positiv exprimierten Fälle wiesen keine Aberrationen auf *(Tab.3.2.).*

1 10 01 1 41 01 101					
p16-Immunhistochemie	n	Deletion	Somatische Mutation	De novo- Methylierung	Aberrationen/ p16-IHC
Negativ	10	1	3	3/10	7 (70%)
Fokal/schwach positiv	23	0	2	4/10	6 (26%)
Mittelgradig positiv	23	0	1	0/4	1 (4%)
Stark positiv	19	0	0	0/5	0

Tab.3.2.: Beziehung zwischen p16-IHC-Ergebnissen und anderen detektierten p16-Aberrationen

IHC=Immunhistochemie

7. In den vier immunhistochemisch p16-negativen serös-papillären Karzinomen fanden sich eine Deletion (Fall 90), eine somatische Mutation (Fall 25) sowie p16-Hypermethylierung der Promoterregion in den Fällen 53 und 99.

8. Im p16-negativen Fall 21 eines muzinösen Karzinoms ließ sich mit der SSCP im Exon 1 eine Mutation aufzeigen, die sich in der Sequenzierung als somatische Mutation bestätigte.

9. Von den vier endometrioiden Karzinomen ohne p16-Expression fielen die Fälle 20 und 31 in der SSCP auf, wobei in der Sequenzierung des Exon 1 *(Fall 20)* eine heterozygote Mutation in der Promoter-Region festgestellt wurde, während die Sequenzierung des Exon 2a im Fall 31 einen Polymorphismus ergab *(Tab.3.4.)*. Fall 85 wies eine p16-Hypermethylierung auf.

10. Aufgrund der z.T. beobachteten starken immunhistochemischen Zytoplasmamarkierung wurde nach eine etwaigen Korrelation zwischen Zytoplasmamarkierung und histologischen, klinischen sowie biochemischen Parametern gesucht. Es ließ sich keine statistisch signifikante Korrelation oder tendenzielle Assoziation bezüglich des histologischen Subtyps, des klinischen Stadiums, der Tumordifferenzierung, des Alters, der Ki67-Immunoreaktivität oder der p53-Expression ermitteln (*Tab. 3.3.*).

In der überwiegenden Zahl der Tumoren mit nachgewiesener p16-Aberration (Mutation, Deletion, Methylierung, nukleäre p16-negative IHC) fand sich immunhistochemisch eine schwach/fokal positive p16-Expression (12/17). 3 Tumoren wiesen keine zytoplasmatische p16-Expression auf, 2 Tumoren waren zytoplasmatisch stark positiv *(s. Tab. 3.8.)*.

	n	p16-	fokal/schwach	mittelgradig	stark	ñ
		negativ	pos.	pos.	pos.	
Histologie						
serös-papillär	55	6 (11%)	29 (53%)	13 (24%)	7 (13%)	
endometrioid	8	0	7 (87%)	0	1 (13%)	
muzinös	6	1 (17%)	2 (33%)	2 (33%)	1 (17%)	
anaplastisch/undiff.	6	0	3 (50%)	1 (17%)	2 (33%)	0,549
Grading						
G1	9	1 (11%)	5 (55%)	2 (22%)	1 (11%)	
G2	25	3 (12%)	15 (60%)	3 (12%)	4 (16%)	
G3	41	3 (7%)	22 (54%)	11 (27%)	6 (15%)	0,887
klin. Staging (FIGO) ¹						
I	4	0	4 (100%)	0	0	
П	9	2 (22%)	4 (44%)	2 (22%)	1 (11%)	
III	28	3 (11%)	16 (58%)	3 (11%)	6 (21%)	
IV	32	2 (6%)	16 (50%)	11 (34%)	3 (9%)	$0,703^{4}$
p53-IHC ²						
0	30	4 (13%)	16 (53%)	7 (23%)	3 (10%)	
1	17	1 (6%)	7 (41%)	4 (24%)	5 (29%)	
2	11	2 (18%)	7 (63%)	1 (9%)	1 (9%)	
3	16	0	9 (56%)	5 (31%)	2 (13%)	0,494
Ki67-IHC ³						
0	1	0	0	1 (100%)	0	
1	27	4 (15%)	12 (44%)	7 (26%)	4 (15%)	
2	26	2 (8%)	15 (58%)	7 (27%)	2 (8%)	
3	13	0	8 (62%)	1 (8%)	4 (31%)	0,159
Alter (in Jahren)			. ,		. ,	
< 50	21	0	12 (57%)	4 (19%)	5 (24%)	
50	54	7 (13%)	29 (54%)	12 (22%)	6 (11%)	0,208
Tumoren insgesamt	75	7 (9%)	41 (55%)	16 (21%)	11 (15%)	

Tab.3.3.: Zytoplasmabeurteilung - p16-IHC-Ergebnisse in Assoziation mit histologischen, klinischen und biochemischen Parametern

pos.: positiv; IHC: Immunhistochemie; undiff.: undifferenziert

In 2 Fällen mit zytoplasmatisch schwach und mittelgradig positiver p16-IHC waren keine Staging-Daten verfügbar.

²In einem Fall mit zytoplasmatisch schwach positiver p16-IHC lag keine p53-IHC vor (Kappes et al. 1995).

³ In 8 Fällen lag keine Ki67-IHC vor (1x negative, 6x schwach positive und 1x stark positive zytoplasmatische p16-IHC; Röhlke et al. 1997).

⁴Stadium I/II gegen Stadium III/IV

3.2. Ergebnisse der Deletionsanalyse mittels PCR

Zur Deletions- und Mutationsanalyse wurden mittels Mikrodissektion gezielt Tumorzellverbände gewonnen, um eine Kontamination und damit möglicherweise Verfälschung der Ergebnisse durch nichtneoplastisches Gewebe zu vermeiden. Als Deletionen wurden in der PCR ausschließlich komplett p16-negative Proben bei eindeutig positiven β -Globin-Banden gewertet.

1. Durch vergleichende PCR eines β -Globin-Fragments und der p16-Exons 1/2 in Tumorund Normalgewebe ließ sich lediglich in einem Fall von 75 (1 %, Nr. 90) eine homozygote d.h. beide Allele betreffende - Deletion in Exon 1 nachweisen *(s. Bildanhang).*

2. Im Fall 90 mit der nachgewiesenen p16-Deletion handelte es sich um ein serös-papilläres Adenokarzinom, welches sich immunhistochemisch als p16-negativ erwies.

3.3. Ergebnisse der Mutationsanalyse durch SSCP-Anwendung und Sequenzierung

An allen 75 Fällen wurde die PCR-SSCP-Analyse der p16-Exons 1 und 2 durchgeführt, die 97% der kodierenden DNA-Sequenz enthalten *(Kamb et al. 1994, Gruis et al. 1995a)*. Zeigte sich in der Elektrophorese eine Mobilitätsveränderung, wurden zur Kontrolle PCR und SSCP des Tumorgewebes wiederholt, diesmal im Vergleich zu korrespondierendem Normalgewebe, um zwischen somatischer Mutation und Polymorphismus differenzieren zu können. Bestätigte verdächtige Fälle wurden der Sequenzanalyse unterzogen, um die veränderte Sequenz zu ermitteln. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in *Tab.3.4.* dargestellt.

1. In insgesamt 14 von 75 Tumoren (19%) fand sich in der PCR-SSCP-Analyse und eine Mobilitätsveränderung, von denen wiederum 12 Fälle (86%) bei der nachfolgenden Sequenzanalyse eine Abweichung von der Wildtypsequenz *(Tab.3.4.; s. Bildanhang)* aufwiesen. In zwei Fällen mit mutationsverdächtigem Laufverhalten in der SSCP wurde durch Sequenzierung die Wildtypsequenz ermittelt (14%).

In 6 Fällen (8%) handelte es sich um Polymorphismen, d.h. stille Mutationen oder 2. Aminosäurensubstitutionen, durch die die Funktion des Proteins entweder nicht oder nur wenig verändert wird, so dass sie ohne klinische Folgen bleiben und daher keinen Krankheitswert besitzen. Sie sind sowohl in Tumorpatientinnen als auch in Normalkollektiven gleichermaßen nachweisbar und werden als Keimbahnvarianten ohne Bedeutung für die Tumorigenese interpretiert, im Gegensatz zu Keimbahnmutationen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind und gehäuft in Tumorpatientinnen, selten aber in Normalkollektiven zu finden sind (Hussussian et al. 1994, Zhou et al. 1994). Innerhalb einer Person kommen Polymorphismen sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe vor, was im Laufverhalten bei der SSCP-Analyse auch teilweise deutlich wurde.

In 4 Fällen (*Nr. 66, 69, 12, E7*) ließ sich nach auffälligem Laufverhalten in der SSCP mittels nachfolgender Sequenzierung ein Polymorphismus in Codon 140 nachweisen, der zu einem Ersatz der Aminosäure Alanin durch Threonin führte. Im Fall 62 (Codon 119) kam es ebenfalls zum Austausch von Alanin gegen Threonin. Der Polymorphismus in Fall 31 führte zu keinem Aminosäurenersatz, da auch das veränderte Nukleotid zum Einbau von Arginin führte. In allen 6 Fällen war nur ein Allel betroffen (*Heterozygotie*), das andere Allel zeigte Wildtyp-Mobilität in der SSCP. In drei Fällen war auch im korrespondierenden Normalgewebe das veränderte Bandenmuster in der SSCP nachweisbar.

Insgesamt handelte es sich bei dem Basenaustausch überwiegend um Transitionen (5), die den Austausch gleichnamiger Basen (Purin \rightarrow Purin; Pyrimidin \rightarrow Pyrimidin) bezeichnen. Dabei fanden sich ausnahmslos Transitionen in Form von G \rightarrow A-Veränderungen. Nur in einem Fall lag eine Transversion (A \rightarrow C) vor, d.h. der Austausch einer Purin- gegen eine Pyrimidinbase oder umgekehrt.

3. Von 6 Polymorphismen erwiesen sich 5 immunhistochemisch als p16-positiv (meist ++), histologisch lagen serös-papilläre Karzinome vor. Ein endometrioides Karzinom mit nachgewiesenem Polymorphismus wies immunhistochemisch eine negative p16-Expression auf.

4. Somatische Mutationen wurden mittels SSCP in 6 Tumoren (8%) gefunden und durch Sequenzierung nachfolgend bestätigt. Die korrespondierenden Normalgewebeproben wiesen in der SSCP Wildtypkonfiguration auf.

In der Sequenzanalyse wiesen 4 der 6 Fälle Mutationen in mehreren Codons gleichzeitig auf (*Fälle 103, 25, E1, E6*), so dass die Zahl der gesamten detektierten somatischen Mutationen (12) die Fallzahl (6) übertrifft. Es ließen sich 7 "Missense"-Mutationen aufdecken, die zu einem Aminosäurenaustausch führten (*Fälle 103, 25, 3 in E1, 2 in E6*). In 3 Fällen fanden sich zudem somatische Mutationen, die keine Aminosäurensubstitution verursachten, bei denen es sich demnach um stille Mutationen handelte (*Fälle 103, 25, E1*). 8 der 12 Mutationen waren Transitionen (2x C \rightarrow T, 2x T \rightarrow C, 3x G \rightarrow A, 1x A \rightarrow G), bei zwei Mutationen handelte es sich um die Transversion T \rightarrow A. Ein Fall (*Nr. 20*) enthielt eine heterozygote Mutation des Nukleotids 72 in der nichtkodierenden 5'-Promoterregion. In Fall 21 erwies sich die Mutation im Exon 1 als eine 6-Basenpaar-Insertion mit Duplikation von Codon 9/10 im einen Allel und gleichzeitigem Verlust des anderen Allels (*homozygote Mutation*).

In 3 Fällen (*Nr. 21, 103, E6*) kam es zum Verlust des einen Allels mit gleichzeitiger Mutation im übrig gebliebenen Allel (*Homozygotie*). Die Fälle 20 und 25 enthielten Mutationen in einem Allel bei erhaltenem zweiten Wildtyp-Allel, erkennbar an der Wildtypbande im SSCP-Gel. Der Fall E1 wies auf einem Allel drei Sequenzveränderungen in Exon 2 und eine Mutation in Exon 1 auf. Insgesamt ließen sich 4 somatische Mutationen in Exon 1 und 8 in Exon 2 detektieren.

Bei allen untersuchten Banden mit Wildtypposition im SSCP-Gel wurden auch mittels Sequenzierung immer Wildtypsequenzen ermittelt.

Fall-Nr.	Histo-	Exon	Codon ¹	Nukleotid-/Basen-		AS-	Homo-/	IHC ²	Methyl
	logie			Austa	usch	Ersatz	Hetero.		status ³
Poly-									
morphismen									
66	serpap.	2b	140	<u>G</u> CG- <u>A</u> CG	Transit.	ala-thr	hetero	++	nd
69	serpap.	2b	140	<u>G</u> CG- <u>A</u> CG	Transit.	ala-thr	hetero	+++	nd
12	serpap.	2b	140	<u>G</u> CG- <u>A</u> CG	Transit.	ala-thr	hetero	+	nd
E7	serpap.	2b	140	<u>G</u> CG- <u>A</u> CG	Transit.	ala-thr	hetero	++	nd
31	endometr.	2a	50	CG <u>A</u> -CG <u>C</u>	Transvers.	arg-arg	hetero	-	-
62	serpap.	2a	119	<u>G</u> CA- <u>A</u> CA	Transit.	ala-thr	hetero	++	nd
somatische									
Mutationen									
103	muzinös	2a	76	GA <u>C</u> -GA <u>T</u>	Transit.	asp-asp	homo	+	-
		2a	82	<u>T</u> TC- <u>C</u> TC	Transit.	phe-leu			
25	serpap.	2a	121	<u>T</u> AC- <u>C</u> AC	Transit.	tyr-his	hetero	-	-
		2a	128	GG <u>C</u> -GG <u>T</u>	Transit.	gly-gly			
21	muzinös	1	8	Insertion GCO	CACG	Insert.	homo	-	-
				(Duplik. Code	on 9/10)	ala+thr			
E1	endometr.	1	37	<u>G</u> GT- <u>A</u> GT	Transit.	gly-ser	hetero	+	-
		2a	120	CG <u>G</u> -CG <u>A</u>	Transit.	arg-arg			
		2b	134	CA <u>T</u> -CA <u>A</u>	Transvers.	his-gln			
		2b	138	GA <u>T</u> -GA <u>A</u>	Transvers.	asp-glu			
E6	endometr.	1	18	<u>G</u> AG- <u>A</u> AG	Transit.	gln-lys	homo	++	-
		2a	76	G <u>A</u> C-G <u>G</u> C	Transit.	asp-gly			
20	endometr.	1	nt 721	G-C			hetero	-	-

Tab.3.4.: Ergebnisse der Sequenzierung

¹Nummerierung nach Serrano et al. (1993); nt=Nukleotid

²*IHC=Immunhistochemie:*

- = negativ; + = schwach/fokal positiv; ++ = mittelgradig positiv; +++ = stark positiv ³Methyl.=Methylierung: - = nicht methyliert; m = methyliert; nd = nicht durchgeführt; AS=Aminosäure; Homo-= Homozygotie; Hetero.=Heterozygotie; Insert.=Insertion; Duplik.= Duplikation; Transit.= Transition, Austausch gleichnamiger Basen (Purinbasen: A=Adenin, G=Guanin; Pyrimidinbasen: T=Thymin, C=Cytosin); Transvers.= Transversion, Austausch einer Purin- gegen eine Pyrimidinbase oder umgekehrt ser.-pap.=serös-papillär; endometr.=endometrioid ala=Alanin; thr=Threonin; arg=Arginin; asp=Aspartat; phe=Phenylalanin; leu=Leucin;

tyr=Tyrosin; his=Histidin; gly=Glycin; ser=Serin; gln=Glutamin; glu=Glutamat; lys=Lysin

5. Im Gegensatz zu den Polymorphismen kamen somatische Mutationen gehäuft in muzinösen (*Fälle 103, 21, E6*) und endometrioiden Karzinomen (*Fälle E1, 20*) vor und lediglich in einem serös-papillären Karzinom (*Fall 25*). Immunhistochemisch zeigten sich 3 von 6 Karzinomen mit somatischen Mutationen p16-negativ (*Fälle 25, 21, 20*) und 2 Karzinome (*Fälle 103, E1*) schwach oder fokal positiv (+).

6. Der immunhistochemisch p16-negative Fall 53 eines serös-papillären Karzinoms zeigte in der SSCP ein mutationsverdächtiges Laufverhalten, was sich in der Sequenzierung jedoch nicht bestätigte. Auch der immunhistochemisch stark positive Fall 32 wies ein aberrierendes Bandenmuster in der SSCP auf. Die Sequenzanalyse ergab auch hier die Wildtypsequenz.

7. Die in Exon 2 detektierten Sequenzveränderungen wurden dahingehend untersucht, inwiefern sie zu einem Aminosäure-Austausch im alternativen â-Transkript ARF führten. 4 der 15 detektierten Veränderungen in der p16-kodierenden Basensequenz befanden sich in dem für beide Transkripte kodierenden DNA-Abschnitt. Die Basensubstitutionen in den p16-Codons 50 und 76 (*Fälle 31, 103*) bewirkten keine Veränderung der p16-Aminosäuresequenz, führten jedoch zu einem Aminosäure-Austausch im ARF-Protein. Die Mutation im p16-Codon 82 (*Fall 103*) wirkte sich in beiden Proteinen im Sinne eines Aminosäure-Wechsels aus. Bei den Fällen 31 und 103 handelte es sich um ein endometrioides und ein muzinöses Ovarial-Karzinom. Durch die Basensubstitution im Fall E6 (p16-Codon 76) fand nur in p16 ein Aminosäure-Austausch statt (*Tab.3.5.*). Insgesamt führte eine p16-DNA-Sequenz-Veränderung in 3 von 4 Fällen zu einer ARF-Sequenzänderung mit Aminosäuren-Austausch (75%). Sämtliche anderen p16-Mutationen befanden sich nicht in den ARF-kodierenden DNA-Sequenzen.

Fall-	Histo	p16-	p16-Basen-	p16-AS-	ARF-	ARF-Basen-	ARF-AS-
Nr.		Codon	austausch	Wechsel	Codon	austausch	Wechsel
31	End.	50	CG <u>A</u> -CG <u>C</u>	Arg-Arg	73	<u>A</u> GT- <u>C</u> GT	Ser-Arg
103	Muz.	76	GA <u>C</u> -GA <u>T</u>	Asp-Asp	99	<u>C</u> GC- <u>T</u> GC	Arg-Cys
103	Muz.	82	<u>T</u> TC- <u>C</u> TC	Phe-Leu	104	C <u>T</u> T-C <u>C</u> T	Leu-Pro
E6	End.	76	G <u>A</u> C-G <u>G</u> C	Asp-Gly	98	CG <u>A</u> -CG <u>G</u>	Arg-Arg

Tab.3.5.: p16-Se	guenzveränderungen	und deren	Effekt auf ARF
	1 . /		

Histo = histologischer Subtyp; end. = endometrioid; muz. = muzinös; AS = Aminosäure Arg = Arginin; Asp = Aspartat; Phe = Phenylalanin; Leu = Leucin; Gly = Glycin; Ser = Serin; Cys = Cystein; Pro = Prolin

3.4. Ergebnisse der Methylierungsanalyse mittels MSP

Insgesamt wurden 29 Fälle der Methylierungsanalyse unter Anwendung der methylierungsspezifischen PCR (MSP) unterzogen, darunter sämtliche immunhistochemisch p16-negativen Fälle (10), ferner alle endometrioiden (8) und muzinösen (6) Karzinome sowie 11 seröse und 4 undifferenzierte Karzinome (*Tab. 3.6.; s. Bildanhang*).

1. In 7 von 29 (24%) untersuchten Fällen ließ sich eine Methylierung der CpG-reichen 5'-Promoter-Region nachweisen. Bezogen auf die histologischen Subtypen ließ sich keine Häufung an Methylierungen feststellen. 3 der 11 serösen Karzinome (27%), 2 der 8 endometrioiden Karzinome (25%), 1 von 6 muzinösen (17%) sowie 1 von 4 (25%) anaplastisch-undifferenzierten Karzinomen waren hypermethyliert.

2. p16-Hypermethylierung wurde nur in Karzinomen detektiert, die immunhistochemisch p16-negativ waren oder eine schwach bzw. fokal positive p16-Expression aufwiesen *(Diagramm 1).* Von den 7 Fällen mit p16-Hypermethylierung waren 3 Fälle (53, 85, 99) immunhistochemisch p16-negativ, 4 Fälle (4, 35, 64, 86) zeigten eine schwach oder fokal positive p16-Expression.

3. In keinem Fall mit p16-Hypermethylierung der Promoterregion waren gleichzeitig somatische Mutationen in der SSCP und Sequenzierung nachweisbar.





3.5. Pathologie

Die Verteilung der p16-Aberrationen auf die histologischen Ovarialkarzinom-Subtypen ist Gegenstand der Betrachtung in diesem Abschnitt. Eine Übersicht hierzu findet sich in *Tab.3.6.*

Histologischer Typ	n	negative	somat.	homozyg.	De novo-	jegliche
		p16-IHC	Mutation	Deletion	Methyl.	Aberration
serös-papillär	55	4	1	1	3/11	5 (9%)
endometrioid	8	4	2	0	2	6 (63%)
muzinös	6	1	3	0	1	4 (67%)
anaplastisch-undiff.	6	1	0	0	1/4	2 (33%)
Tumoren insgesamt	75	10	6	1	7/29	17 (23%)

Tab.3.6.: Verteilung der p16-Aberrationen auf die histologischen Subtypen

somat.: somatische; homozyg.: homozygote; Methyl.: Methylierung; undiff.: undifferenziert IHC: Immunhistochemie

1. Zusammengenommen fanden sich in 17 (23%) der 75 untersuchten Ovarialkarzinome p16-Aberrationen, die eine Inaktivierung der p16-Funktion belegen könnten. Die meisten p16-Veränderungen waren in endometrioiden und muzinösen Karzinomen nachweisbar.

2. In 6 von 8 endometrioiden Karzinomen lagen p16-Aberrationen vor (63%, *s. Tab. 3.6.*), darunter 2 somatische Mutationen (*Fälle 20, E1*) und 2 p16-Methylierungen (*Fälle 85, 86*). 2 von 4 immunhistochemisch p16-negativen endometrioiden Karzinomen wiesen keine weiteren p16-Aberrationen auf (*Fälle 31, 108*).

3. In muzinösen Karzinomen ließen sich in 4 (67%) von 6 Fällen p16-Veränderungen nachweisen. Dabei handelte es sich um eine p16-Methylierung (*Fall 35*) und 3 somatische Mutationen (*Fälle 21, 103, E6*), von denen Fall 21 gleichzeitig auch immunhistochemisch keine p16-Expression zeigte, während die Fälle 35 und 103 eine schwach/fokal positive p16-Expression aufwiesen.

4. Die serös-papillären Karzinome bildeten mit 55 Fällen die größte Untersuchungsgruppe, in welcher sich in 5 Fällen (9%) p16-Alterationen fanden. In den 4 immunhistochemisch p16negativen Tumoren ließen sich gleichzeitig eine homozygote Deletion *(Nr. 90)*, eine somatische Mutation (Nr. 25) sowie 2 p16-Methylierungen (Nr. 53, 99) detektieren. Eine weitere p16-Methylierung wurde in einem immunhistochemisch fokal/schwach positiven Fall (Nr. 4) nachgewiesen. Insgesamt wurden 11 serös-papilläre Karzinome hinsichtlich ihres Methylierungsstatus untersucht (s. Tab. 3.8.).

5. Unter den anaplastisch-undifferenzierten Karzinomen wiesen 2 (33%) von 6 Tumoren p16-Aberrationen auf. Ein Fall *(Nr. E3)* war immunhistochemisch p16-negativ. In einem von 4 untersuchten Fällen fand sich eine p16-Methylierung in einem Tumor *(Nr. 64)*, der immunhistochemisch eine schwach/fokal positive p16-Expression zeigte *(Tab.3.8.)*.

		<u> </u>					
Grading	n	Negative	Somatische	Homozygote	De novo-	Tumoren mit	
		p16-IHC	Mutation	Deletion	Methylierung	jegl. Aberrat.	
G1	9	4	3	1	0/8	6 (67%)	
G2	25	2	1	0	2/7 (29%)	3 (12%)	
G3	41	4	2	0	5/14 (36%)	8 (20%)	

Tab.3.7.: Verteilung der p16-Aberrationen in Abhängigkeit von der Tumordifferenzierung

Jegl. Aberrat. = jegliche Aberration, mehrere Aberrationen in einem Tumor möglich

6. Wie aus *Tab.3.7.* hervorgeht, waren die meisten Aberrationen in G1-Tumoren nachweisbar (6/9 Tumoren, 67%). Es handelte sich hierbei um 3 muzinöse, 2 endometrioide und ein serös-papilläres Karzinom (*Tab.3.8.*). Unter den 25 G2-Tumoren fanden sich Aberrationen in 2 endometrioiden und einem muzinösen Karzinom (3/25, 12%). Bei den G3-Tumoren wiesen 2 endometrioide, 4 serös-papilläre und 2 anaplastisch-undifferenzierte Karzinome p16-Aberrationen auf (8/41, 20%).

Fall-Nr./Histo	x/n	Grading	Staging	p16- Mut. ¹	Deletion ¹	Methyl. ¹	N-p16- IHC ²	Z-p16- IHC ³
Muzinös	4/6							
21		1	4	1	0	0	0	1
35		2	3	0	0	1	1	1
103		1	3	1	0	0	1	0
E6		1	?	1	0	0	2	3
Endometrioid	6/8							
20		2	4	1	0	0	0	1
31		1	1	0	0	0	0	1
85		2	3	0	0	1	0	1
86		3	4	0	0	1	1	1
108		1	4	0	0	0	0	1
E1		3	2	1	0	0	1	1
Serös-papillär ⁴	5/55							
4		3	3	0	0	1	1	1
25		3	4	1	0	0	0	3
53		3	2	0	0	1	0	0
90		1	2c	0	1	0	0	1
99		3	3	0	0	1	0	0
Undifferenziert ³	2/6							
64		3	4	0	0	1	1	1
E3		3	3	0	0	0	0	1

Tab.3.8.: Fälle mit p16-Aberrationen

 $^{1}1 = vorhanden; 0 = nicht vorhanden$

²*N*-*p*16-*IHC* = *nukleäre p*16-*IHC*; 0 = *negativ*; 1 = *schwach/fokal positiv*; 2 = *mäßig positiv* ³*Z*-*p*16-*IHC* = *zytoplasmatische p*16-*IHC*; 0 = *negativ*; 1 = *schwach/fokal positiv*; 2 = *mäßig positiv*; 3 = *stark positiv*

⁴3 von 11 untersuchten serös-papillären sowie 2 von 6 untersuchten undifferenzierten Karzinomen waren hypermethyliert.

Histo = Histologie; Mut. = (somatische) Mutation; Methyl. = Methylierung; IHC = Immunhistochemie; x/n = x von n untersuchten Fällen wiesen p16-Aberrationen auf.

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Beziehung zwischen p16-Expression und p16-Inaktivierung durch Deletion, Mutation und Promotermethylierung in Ovarialkarzinomen unterschiedlichen histologischen Typs unter Berücksichtigung des Tumorgrades und -stadiums zu durchleuchten.

Obgleich in 30-40% aller untersuchten Ovarialkarzinom-Zelllinien Deletionen oder Mutationen im INK4a-Tumorsuppressor-Gen nachweisbar waren (*Liu et al. 1995, Rodabaugh et al. 1995, Schultz et al. 1995*), ließen sich in primären Ovarialkarzinomen nur sporadisch Sequenzalterationen oder Deletionen im INK4a-Gen detektieren, wie aus *Tab.4.1.* hervorgeht (*Campbell et al. 1995, Rodabaugh et al. 1995, Schultz et al. 1995, Hatta et al. 1995, Marchini et al. 1997, Suh et al. 2000*).

In der vorliegenden Studie zur p16-Inaktivierung in Ovarialkarzinomen wurde neben der bereits mehrfach untersuchten p16-Inaktivierung durch Deletion und Mutation auch die Proteinexpression immunhistochemisch sowie die CpG-reiche Exon1-Region bezüglich Hypermethylierung untersucht.

In früheren Studien zu p16-Mutationen, Deletionen und LOH in Ovarialtumoren ließen sich homozygote Deletionen lediglich in 2 muzinösen LMP-Tumoren sowie in je einem muzinösen und serösen Karzinom nachweisen (*Campbell et al. 1995, Devlin et al. 1996, Fujita et al. 1997*). Die einzige detektierbare Deletion dieser Arbeit fand sich in einem serösen Ovarialkarzinom. Die Deletionsrate dieser Studie entspricht mit 1% den Ergebnissen anderer Studien, deren Rate an Deletionen sich in überwiegender Mehrzahl zwischen 0-3% beläuft (*s. Tab.4.1.*). Zwei Studien berichten von 12% bzw. 14% nachgewiesener Deletionen (*Schultz et al. 1995, Ichikawa et al. 1996*). Möglicherweise hat die von *Schultz et al. (1995)* als Detektionsmethode verwendete vergleichende Multiplex-PCR zu differierenden Deletionsraten geführt. Zudem handelte es sich in 50% der Tumoren um nicht-epitheliale, überwiegend benigne Ovarialtumoren und in den anderen 50% um epitheliale Tumoren, die nicht genauer bezüglich ihrer histologischen Subtypen differenziert wurden.

In der Arbeit von *Wong et al. (1997b)* wird ohne Anwendung der Mikrodissektion eine Deletionsrate von 7% angegeben, wobei diese in frühen Stadien (FIGO I und II) auftraten.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich in der PCR komplett negative Proben als Deletion gewertet, schwach positive Banden galten als Nachweis für ein ausreichend amplifizierbares p16-Fragment in der Probe. Bei wenig Tumormaterial in der Probe fiel in der Regel auch die â-Globin-Bande entsprechend schwächer aus. Unterschiedliche Deletionsraten könnten nicht zuletzt aufgrund unterschiedlicher Bewertungskriterien zustande kommen, wobei in der Arbeit von *Ichikawa et al. (1996)* mit einer homozygoten Deletionsrate von 12% nicht auf diese Kriterien eingegangen wird. In der Studie von *Wong et al. (1997b)* lag in jenen Fällen eine Deletion vor, in denen die Signalintensität im Tumor weniger als 25% der Vergleichsprobe (Blutprobe) betrug.

Hinsichtlich der Detektion somatischer Mutationen decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit weitgehend mit jenen anderer Studien. Die Mutationsrate belief sich auf 8%, drei weitere Studien fanden Mutationsraten von 6-7% (*Schuyer et al. 1996, Fujita et al. 1997, Shih et al. 1997*). Ähnlich wie bei *Fujita et al. (1997)*, die ausschließlich in 2 muzinösen Tumoren (1 LMP-Tumor, 1 Karzinom) und 2 endometrioiden Karzinomen eine Mutation im untersuchten Exon 2 ermittelten (= 6% aller Tumoren), lagen somatische Mutationen in dieser Studie überwiegend in muzinösen (2) und endometrioiden (3) Karzinomen vor. Bei *Ichikawa et al. (1996)* belief sich die Mutationsrate nach alleiniger Sequenzierung ohne vorausgegangene SSCP lediglich auf 2% (1 endometrioides Karzinom). In drei weiteren Studien ohne Anwendung der Mikrodissektionstechnik zur Vermeidung von Kontamination mit Normalgewebe ließen sich keine somatischen Mutationen nachweisen (*Rodabaugh et al. 1995, Schultz et al. 1995, Wong et al. 1997b*). Allerdings wurde in der Studie von *Wong et al. (1997b*) ausschließlich Exon 2 auf p16-Mutationen untersucht.

Bei den nachgewiesenen somatischen Mutationen handelte es sich fast ausschließlich um Missense-Mutationen in unterschiedlichen Regionen des Gens, deren Auswirkungen auf die Funktion des gebildeten Proteins nicht geklärt sind. In keinem Fall lag eine Nonsense-Mutation vor mit Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons, welches zur Synthese eines unvollständigen p16-Proteins geführt hätte. Die in Fall 21 detektierte 6 bp-Insertion ist identisch mit der durch *Caldas et al. (1994)* in der Pankreaskarzinom-Zelllinie CaPan-2 nachgewiesenen Insertion. Die somatische Mutation in Codon 76 (Fall 103) wurde ebenfalls von *Takeshima et al. (1996)* sowie *Milde-Langosch et al. (1999)* beschrieben.

Neben den somatischen Mutationen fand sich mittels SSCP und nachfolgender Sequenzierung eine relativ hohe Zahl an Polymorphismen, bei denen es sich um stille Mutationen bzw. Aminosäuresubstitutionen handelt, die als Keimbahnvarianten ohne Bezug zur Karzinogenese angesehen werden (*Hussussian et al. 1994, Zhou et al. 1994*). Der in drei

Fällen (Nr. 12, 66, 69) ermittelte Polymorphismus in Codon 140 entspricht einem schon häufiger beschriebenen Polymorphismus, der zu einem Ersatz der Aminosäure Alanin durch Threonin führt (*Cairns et al. 1994, Hussussian et al. 1994, Kamb et al. 1994, Spruck et al. 1994, Zhou et al. 1994, Geradts et al. 1995, Fitzgerald et al. 1996, Olshan et al. 1997).*

Auch der Polymorphismus in Codon 50 (Fall 31) fand bereits mehrfach Erwähnung (*Tung et al. 1996, Barker et al. 1997*). In Codon 119 wurde ebenfalls ein Polymorphismus beschrieben, der allerdings zu dem Aminosäure-Wechsel von Alanin gegen Serin führte (*Zhou et al. 1994, Gruis et al. 1995a*), während es in dieser Studie zu dem Austausch von Alanin gegen Threonin kam.

Die vorliegende immunhistochemische Studie an 75 primären epithelialen Ovarialkarzinomen konnte aufzeigen, dass eine p16-Inaktivierung - ersichtlich an der negativen nukleären p16-Expression - in 13% der untersuchten Tumoren stattfindet, wobei typischerweise die Subtypen der muzinösen und endometrioiden Karzinome bevorzugt betroffen sind. Dagegen handelt es sich um ein eher seltenes Ereignis in der Hauptgruppe der Ovarialkarzinome, den serös-papillären Karzinomen. Endometrioide und muzinöse Karzinome repräsentieren insgesamt ca. 30% aller epithelialen Ovarialmalignome (Saigo et al. 1993). Es handelt sich meist um gut bis mäßig differenzierte, häufig diploide Tumoren. p53-Mutationen finden sich selten in diesen Tumortypen, wie durch die am gleichen Kollektiv durchgeführte Studie von Kappes et al. (1995) belegt werden konnte. Im Gegensatz zu serösen Karzinomen, welche charakteristischerweise eine hohe Rate an p53-Alterationen aufweisen (Fujita et al. 1994, Kappes et al. 1995, Caduff et al. 1998), finden sich in muzinösen Karzinomen in 70-85% der Fälle K-ras-Mutationen (Enomoto et al. 1991, Cuatrecasas et al. 1997). Diese Alterationen scheinen mit einem weniger aggressiven Phänotyp assoziiert zu sein, da K-ras-Mutationen überwiegend in gut differenzierten muzinösen Tumoren (Karzinome und LMP-Tumoren) auftreten (Pieretti et al. 1995). Endometrioide Karzinome wiederum zeigen bevorzugt eine bcl-2-Überexpression (Diebold et al. 1996a).

Die in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie und SSCP-Sequenzierung ermittelten unterschiedlichen Raten an p16-Inaktivierung in verschiedenen histologischen Subtypen stützen die Vermutung anderer Untersucher (*Pieretti et al. 1995, Kappes et al. 1995, Diebold et al. 1996b, Cuatrecasas et al. 1997*), dass die histologischen Ovarialkarzinom-Subtypen durch unterschiedliche genetische Defekte und ihre Kombinationen entstehen. Muzinöse und endometrioide Karzinome scheinen eine Untergruppe der Ovarialkarzinome zu sein, welche sich durch seltene p53-Alterationen und häufige p16-Alterationen auszeichnen.

Hypermethylierung der CpG-reichen Region des Exon 1 ist in letzter Zeit zunehmend als dominierender Mechanismus der p16-Inaktivierung in verschiedenen Malignomen beschrieben worden, insbesondere in 67% der Harnblasenkarzinome (Gonzales-Zulueta et al. 1995), in 20-31% der Mammakarzinome (Herman et al. 1995, Hui et al. 2000), in 40% der Colonkarzinome (Herman et al. 1995) sowie in 38% der Ösophaguskarzinome (Wong et al. 1997a). Untersuchungen an Ovarialtumoren kamen hinsichtlich des Methylierungsstatus zu unterschiedlichen Ergebnissen. Fujita et al. (1997) konnten mittels methylierungssensitiver Hypermethylierungen feststellen. Enzyme und PCR 18% Dabei korrelierte Hypermethylierung sehr gut mit fehlender mRNA-Expression (5/10 50%, ñ=0.001) und immunhistochemisch negativer nukleärer p16-Expression (6/13 46%, ñ=0,002). In den 75 Ovarialkarzinomen der vorliegenden Studie handelte es sich übereinstimmend mit den Ergebnissen von Fujita et al. (1997) bei der Hypermethylierung um den Hauptmechanismus der p16-Inaktivierung. Ähnlich wie in Ösophaguskarzinomen (Wong et al. 1997a) waren in dieser Studie Hypermethylierungen mit 24% der untersuchten Fälle deutlich frequenter als Mutationen (8%) oder Deletionen (1%). In keinem Fall war eine Kombination von somatischer Mutation und Hypermethylierung vorgekommen. Diese Beobachtung stützt die zuvor schon von Merlo et al. 1995 sowie Tanake et al. 1997 geäußerte Vermutung, dass p16-Hypermethylierungen nur in Tumoren mit p16-Wildtypsequenz auftreten und somit einen alternativen Weg der p16-Inaktivierung zur Mutation und Deletion darstellen.

Unterschiede in der Rate detektierter Hypermethylierungen könnten daher rühren, dass unterschiedliche Detektionsmethoden zur Anwendung kamen. *Ichikawa et al. (1996)* konnten in 28 Primärtumoren und 6 Zelllinien mittels Southern blot nach Behandlung mit Restriktionsenzymen (*Hin*dIII) und methylierungssensitiven Enzymen (*Sac*II bzw. *Eag*I) keine Hypermethylierung der CpG-reichen Exon1-Region von p16 nachweisen. Auch *Shih et al. (1997)* fanden nach Anwendung methylierungssensitiver Enzyme und nachfolgender PCR in 50 primären Ovarialkarzinomen und 3 Zelllinien keine Hypermethylierungen. In einer weiteren Studie von *Ryan et al. (1998)* an 23 primären Ovarialkarzinomen ließ sich mittels methylierungssensitiven Enzymen 16-Exon1-Region nachweisen.

Im Gegensatz zu den erwähnten Studien betrug die Detektionsrate bei Anwendung der methylierungsspezifischen PCR in dieser Studie 24% (7/29 Fällen). Eine Erhöhung der untersuchten Fallzahl mit besonderem Augenmerk auf weitere muzinöse und endometrioide Ovarialkarzinome führte zu einer Steigerung der Detektionsrate auf 36% (16/44; *Milde-Langosch et al. 1998*). Auch *Fujita et al. (1997)* konnten in 18% der untersuchten Fälle

Hypermethylierungen nachweisen, indem sie sich der Kombination von Restriktionsenzymen und anschließender Multiplex-PCR bedienten.

Die Beurteilung der p16-Immunoreaktivität wird nach wie vor nicht einheitlich vorgenommen. Während *Geradts et Wilson (1996)* in primären Mammakarzinomen nukleär komplett negative oder fokal negative p16-Expression als abnorme Expression definierten, sahen *Dong et al. (1997)* die starke nukleäre p16-Expression als prognostisch entscheidendes Kriterium an. *Milde-Langosch et al. (1999)* fanden in 81% der endometrioiden Endometriumkarzinome eine negative oder fokal positive nukleäre p16-Expression, konnten jedoch nur 2 Mutationen mittels PCR-SSCP und Sequenzierung nachweisen. *Fujita et al. (1997)* konnten in 37% der untersuchten Ovarialtumoren immunhistochemisch keine oder nur schwache nukleäre p16-Expressionen nachweisen, was signifikant mit der detektierten mRNA-Expression korrelierte. In der Studie von *Sui et al. (2000)* ließ sich in 43% der untersuchten malignen Ovarialtumoren keine bzw. eine verminderte p16-Expression nachweisen. Der Verlust der p16-Expression korrelierte hierbei mit G2- und G3-Tumoren.

Die IHC-Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen mit 13% immunhistochemisch p16-negativen Fällen jenen von Dong et al. (1997), in deren Studie 11% aller Ovarialkarzinome immunhistochemisch keine p16-Expression aufwiesen (s. Tab. 4.1.). Allerdings lag der Schwerpunkt bei Dong et al. (1997) ähnlich wie bei Shigemasa et al. (1997) auf den p16-Fällen mit stark positiver nukleärer p16-Expression, welche mit Tumorprogression und ungünstigerer Prognose assoziiert war. Auch in dieser Studie war p16 in 19% der Fälle nukleär stark exprimiert, wobei nach wie vor unklar ist, welche Bedeutung dieser beobachteten p16-Akkumulation zukommt. Es könnte sich um eine Abkopplung des p16-Proteins von der Zellzyklus-Kontrolle handeln, deren Mechanismus bislang unbekannt ist, der aber möglicherweise zu einer Induktion und Akkumulation von p16 führt (Dong et al. 1997). Denkbar wäre auch die Akkumulation des in der G1-Phase exprimierten p16-Proteins aufgrund dessen extrem langer Halbwertszeit mit zunehmender Zellzykluszahl (Ruas et Peters 1998). Dadurch ließe sich partiell erklären, warum p16-Expression in stark proliferierenden Tumoren stärker vorzufinden ist als in normalen Zellen, in denen p16 nur schwach exprimiert wird (Milde-Langosch et al. 2001). Möglicherweise ist die p16-Überexpression als bedeutendes frühes Ereignis in der Tumorigenese der Ovarialkarzinome zu werten (Shigemasa et al. 1997).

Ebenso unklar schien bislang die Rolle der zytoplasmatischen p16-Überexpression zu sein. *Geradts et Wilson (1996)* vermuteten noch unspezifische Markierungen des Zytoplasma, während *Shiozawa et al. (1997)* zytoplasmatische p16-Markierungen als "Ruhezustand" des p16-Proteins interpretierten. Eine jüngst erschienene Studie von *Milde-Langosch et al. (2001)* konnte aufgrund einer vergleichenden Untersuchung der p16-Expression mittels Western blot und IHC an Mammakarzinomen nachweisen, dass sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische Immunoreaktivität in Tumorzellen für p16-Expression spezifisch ist. Hohe p16-Reaktivität im Zellkern oder Zytoplasma ging dabei in Mammakarzinomen mit einem undifferenzierteren, maligneren Phänotyp einher. In einer weiteren Studie an Mammakarzinomen fand sich zwar keine Assoziation zu klinischen und biochemischen prognostischen Parametern, allerdings besaßen die Patientinnen mit immunhistochemisch hoher p16-Expression eine ungünstige Prognose, während Patientinnen mit schwacher p16-Expression die beste Prognose aufwiesen (*Dublin et al. 1998*). Anhand der in dieser Arbeit untersuchten Ovarialkarzinome lässt sich keine Aussage zur Prognose treffen. Die funktionelle Bedeutung der zytoplasmatischen p16-Expression bleibt weiterhin unverstanden.

Von den in dieser Arbeit vorliegenden 10 Fällen ohne immunhistochemisch detektierbare p16-Expression waren 1 Fall Stadium I (25%) und 2 Fälle Stadium II (22%) (*vgl. Tab.3.1.*) Auch wenn eine Tendenz sichtbar wird, sind diese Zahlen statistisch nicht signifikant ($\tilde{n} = 0,068$). Zudem ist aufgrund der niedrigen Zahl an FIGO I- und II-Tumoren die statistische Aussagekraft eingeschränkt. Die Verteilung von p16-Anomalien in verschiedenen klinischen Stadien zeigt, dass p16-Inaktivierung durch Hypermethylierung oder Mutation ein frühes Ereignis in der Tumorigenese der meisten Karzinome darstellt.

In der Arbeit von *lchikawa et al. (1996)* war die Inzidenz der p16-Inaktivierungen in Primärtumoren signifikant höher in den fortgeschrittenen Stadien (7/29 FIGO III und IV, 24%, ñ=0,048) als in frühen Stadien (0/14, FIGO I und II). Die p16-Inaktivierung in Ovarialkarzinomen war assoziiert mit dem Progress zu fortgeschrittenen Stadien (FIGO III/IV.

Fujita et al. (1997) fanden einen signifikant häufigeren Expressionsverlust des p16-Proteins in low-grade Tumoren (G1 50%, G2 29%, G3 7,7%) sowie eine umgekehrte Korrelation mit grenzwertiger Signifikanz zwischen p16-Expression und klinischem Stadium (Stadium I 53%, II 57%, III 19%, IV 17%, ñ=0,056). Patientinnen mit aberrierender p16-Expression wiesen eine bessere Prognose auf, gemessen an der 5-Jahres-Überlebenszeit.

In dieser Studie war der Expressionsverlust des p16-Proteins tendenziell häufiger in GI-Tumoren vorzufinden, erreichte aber keine statistische Signifikanz (40%, \tilde{n} =0,068). 50% der GI-Tumoren ohne p16-Expression waren muzinöse Karzinome (3/6).

Der Mechanismus der p16-Inaktivierung in den drei immunhistochemisch p16-negativen Tumoren (Nr. 31, 108, E3) ohne Nachweis einer Deletion, Mutation oder Hypermethylierung ist nicht geklärt. Ebenso unklar ist die Bedeutung der Mutation des Nukleotids 72 in der Promoterregion bei Erhalt eines Wildtyp-Allels im immunhistochemisch negativen Fall 20. Möglicherweise spielen regulatorische Prozesse auf Translationsebene oder durch die SSCP-Analyse nicht erfasste Mutationen eine Rolle in der p16-Inaktivierung dieser 4 Fälle, bei denen es sich um ein undifferenziertes und 3 endometrioide Karzinome handelt. Immerhin waren einige Fälle mit p16-Methylierung immunhistochemisch fokal bzw. schwach p16-positiv. Diese Beobachung ließe sich durch eine möglicherweise inkomplette Methylierung oder eine Heterogenität der p16-Expression innerhalb des Tumors erklären. Das Phänomen der minimalen p16-Expression trotz nachgewiesener Exon 1-Methylierung wurde ebenfalls in der Mamma-Karzinom-Zelllinie T47D beschrieben *(Herman et al. 1995).*

In der Studie von *Suzuki-Takahashi et al.* 1997 übte die Transfektion von Zellen aus Zelllinien mit cDNA für p16 einen signifikanten Effekt auf das Wachstum der Zellen sowohl in Abhängigkeit vom pRB-Status als auch vom p16-Status der Zelle aus. Denn obgleich exogenes p16 das Wachstum von Zellen mit positiver pRB-Expression, aber fehlender p16-Expression (pRB+/p16- Zellen), hemmte, beeinflusste es Zellen vom Phänotyp pRB+/p16+ oder pRB-/p16+ nur wenig. Daher ist anzunehmen, dass der Deregulierung des RB-p16-Rückkopplungsmechanismus durch p16-Defizienz eine bedeutende Rolle in Zellen ohne p16-Proteinexpression zukommt *(Suzuki-Takahashi et al. 1997)*.

In den letzten Jahren wurde die Existenz eines alternativen â-Transkriptes beschrieben, welches von einem zweiten Promoter des INK4a-Lokus aus transkribiert wird und durch Fusion eines alternativen Exon 1 (E1â) mit dem für p16 identischen Exon 2 zustandekommt *(Quelle et al. 1995, Larsen 1996).* Durch *Splicing* entsteht ein mit p16 nicht verwandtes Protein: p14^{ARF} beim Menschen bzw. p19^{ARF} bei der Maus. Beide ARF-Proteine besitzen eine Repressorfunktion im Zellzyklus.

Aufgrund des gemeinsamen Exon 2 erscheint es denkbar, dass p16-Mutationen auch gleichzeitig einen Effekt auf das ARF-Protein haben könnten. In dieser Studie führten zwei detektierte Basensubstitutionen in den p16-Codons 50 und 76 (Fälle 31, 103) zu keiner Änderung der p16-Aminosäuresequenz, bewirkten aber einen von *Ruas et Peters (1998)* gleichfalls beschriebenen Aminosäure-Wechsel im ARF-Protein. Ähnliche Sequenzvarianten wurden auch von *Kamb et al. (1994)* in einigen Melanom-Zelllinien nachgewiesen. Die Mutation im p16-Codon 82 (Fall 103) führte sowohl im p16-Protein als auch im ARF-Protein zu einem Aminosäure-Austausch. Bei keiner dieser ARF-Mutationen handelte es sich um eine Nonsense-Mutation mit Bildung eines vorzeitigen Stop-Codons, das ein verkürztes Protein infolge vorzeitiger Termination verursacht hätte. Insgesamt führten 75% (3/4) der im gemeinsam kodierenden DNA-Abschnitt festgestellten Basensubstitutionen zu einer veränderten ARF-Aminosäuresequenz. Die prozentuale Angabe dieser Studie weicht
erheblich ab von den Ergebnissen von *Ruas und Peters (1998)*, die anhand eines Vergleichs zahlreicher Studien belegen konnten, dass 36% der p16-Mutationen auch die ARF-Aminosäuresequenz beeinflussen. Nach wie vor ist jedoch unklar, inwiefern Alterationen des ARF-Proteins beim Menschen an der Karzinogenese beteiligt sind.

Autoren	n	9p LOH	Homoz. n16-Delet	Somat. Mut	De novo- Methyl	p16-neg.	Sonst./ Methoden
Chenevix-Trench	91 en Tu	37% Tu	20% ZL	-		-	memouch
et al. 1994	10 ZL	5770 14	2070 22				
Campbell et al.	67 Tu:	48%	1 (2%)	0	_	-	Keine Mikro-
1995	59 ep. Ca	(24/50)	(muz. Ca)				dissektion
	42 ser.						
	9 muz.						
	8 end.						
Hatta et al.	21 Tu:	-	0	0	-	-	K.A. zu histol.
1995	16 Ca		-				Subtypen
Rodabaugh et al.	43 Tu:	31-38%	0 Tu	0/18 Ca	-	-	Keine Mikro-
1995	18 ep. Ca		50% ZL				dissektion
	(13 ser.						
	3 ena.						
	1 HIUZ. 1 klarz)						
	8 7I						
Schultz et al	115 Tu·	13%	14% Tu	0 Tu			K A zu histol
1995	58 ep. Tu	(5/40)	(16/115)	1 ZL			Subtypen:
1770	12 ZL	(5/10)	25% ZL	1 22			Keine Mikro-
			(3/12)				dissektion
							Multiplex-PCR
Devlin et al.	33 Tu:	70%	1 (3%)	-	-	-	-
1996	28 ep. Ca		(muz.LMP)				
Ichikawa et al.	49 Tu:	5% Tu	12% Tu:	1/49 (2%)	0/28 Tu	-	Mikrodissek-
1996	37 ep. Ca	(1/19)	3/12 ser.	(end. Ca)	0/6 ZL		tion; Southern
	6 ZL		3/9 end.	(keine SSCP			blot nach
			1/4 klarz.	nur Sequ.)			Restr.enz.
			0/7 muz.				
Cohumaratal	22 Car		50% ZL	2			Value Milere
SCHUYEL EL AL. 1006	32 Ca:	-	1 LL	2(6%)	-	-	Keine Mikro-
1990	7 ord		(20%)	$(1 \text{ Klarz.}, 1 \text{ sor } C_2)$			25 75% Tu
	/ enu.			I sel. Ca)			ZJ-75% Tu, Kontamination
	2 klarz						mit Normal-
	4 sonst						gewebe
	5 ZL						50.000
Diese Studie	75 ep. Ca:	-	1 (1%)	6 (8%)	7/29 (24%)	10 (13%)	Mikrodissek-
	55 ser.		(1 ser. Ca)	1 ser.	3/11 ser.	4 ser.	tion;
	8 end.			2 end.	2/8 end.	4 end.	MSP (nach
	6 muz.			3 muz.	1/6 muz.	1 muz.	Mikrodissek-
	6 und.				1/4 und.	1 und.	tion)

Tab.4.1.: p16-Aberrationen in Ovarial-Tumoren, Schwerpunkt primäre Ovarialkarzinome

Forts. Tab.4.1.

Autoren	n	9p LOH	Homoz.	Somat.	De novo-	p16-neg.	Sonst./
			p16-Delet.	Mut.	Methyl.	IHC	Methoden
Fujita et al.	70 ep. Tu:	-	2 (3%)	4 (6%)	8/43	22/60(37%)	Restr.enzyme/
1997	32 ser. Ca		(1 ser. Ca,	1 muz.	(18%)	6/25 ser.	Multiplex-PCR
	12 muz.		1 muz.	2 end.		5/10 muz.	IHC: 22 neg.
	12 end.		LMP)	1 muz. LMP		7/12 end.	und schwach
	9 klarz.			(nur Ex. 2)		0/7 klarz.	pos. Fälle
	5 LMP					4/6 LMP	
Shih et al.	135 Tu:	45 %	2/88 (2%):	1/15 (7%)	0/50 Ca	-	Southern blot;
1997	88 Ca		1 end.	(muz. LMP)	0/3 ZL		Methyl.sensit.
	11 ZL		1 muz. LMP	(nur Sequ.)			Enz. und PCR
			5/11 ZL				
			(45%)				
Dong et al.	190 Tu:	-	-	-	-	11% Ca	
1997	159 Ca					8/18 muz.	
Kanuma et al.	30 Tu	-	5/30 (17%)	4/30 (13%)	-	-	
1997	11ZL		3/11 (27%)	1/11 (9%)			
Marchini et al.	42 Ca	-	0 (PCR,	0	0	$11/42^{1}$	Keine Mikro-
1997	5 ZL		South blot)			(26%)	dissekt, Methyl.
							sensit. Enzyme
Shigemasa et al.	32 Tu:	-	-	0	-		*Western Blot
1997	24 Ca			(1 silente		*	und IHC: p16-
	6 LMP			Mut.)			Überexpress.
	2 benigne						
Wong et al.	27 Ca	-	2 (7%)	0	-	-	Keine Mikro-
1997b				(Exon 2)			dissektion
Ryan et al.	23 Tu:	4/22	0	-	0	-	Methyl.sensit.
1998	10 ser. Ca	(18%)					Enzyme und
	2 muz. Ca						Multiplex-PCR
	2 end. Ca						für Methyl.
	8 klarz. Ca						
	2 LMP-Tu						
Suh et al.	20 Ca	-	0	0	19 (95%)	-	K.A. zu histol.
2000					MSP		Subtypen;
Sui et al.	129 Tu	-	0		-	40,4% (v.	p16-Expression
2000	(103+26)					103 Tu)	vermindert; 26
							Tu Western blot
Diese Studie	75 ep. Ca:	-	1 (1%)	6 (8%)	7/29 (24%)	10 (13%)	Mikrodissek-
	55 ser.		(1 ser. Ca)	1 ser.	3/11 ser.	4 ser.	tion;
	8 end.			2 end.	2/8 end.	4 end.	MSP (nach
	6 muz.			3 muz.	1/6 muz.	1 muz.	Mikrodissek-
	6 und.				1/4 und.	1 und.	tion)

Somat. Mut. = somatische Mutation, mittels SSCP und Sequenzierung detektiert; LOH = loss of heterozygosity; Sequ. = Sequenzierung; K.A. = Keine Angaben

Tu = Tumor(en); Ca = Karzinom(e); ZL = ZeIIIinien; LMP = Iow malignant potential-Tumor ser. = serös-papillär; end. = endometrioid; muz. = muzinös; klarz. = klarzellig; gem. = gemischt; und. = undifferenziert; sonst. = sonstige; - = nicht untersucht; Ex. = Exon; histol. = histologisch; MSP = methylierungsspezifische PCR; Restr.enz. = Restriktionsenzyme; Methyl.sensit. Enz. = Methylierungssensitive Enzyme; South. blot = Southern blot

Negative p16-Expression durch Western blot-Analyse ermittelt

4.2. Diskussion der Methoden

In dieser Studie kam die Methode der Mikrodissektion zur Anwendung, um gezielt möglichst nur Tumorzellen für die DNA-Amplifikation mittels PCR zu gewinnen und eine Kontamination mit normalen Zellen weitgehend zu vermeiden. Andere Forschungsgruppen (*Tab.4.1.*) konnten ohne Anwendung der Mikrodissektion eine geringere Zahl an somatischen Mutationen detektieren. So untersuchten *Schultz et al. (1995)* sowie *Campbell et al. (1995)* Paraffinschnitte auf p16-Mutationen, deren Gehalt an Tumorzellen mindestens 50% betrug. *Schultz et al. (1995)* konnten keine somatischen Mutationen nachweisen und bei *Campbell et al. (1995)* belief sich die Detektionsrate auf nur 2%, vermutlich aufgrund der Kontamination mit normalen Zellen, da z.T. nur 50% Tumorzellen zur Untersuchung vorlagen. Bei Anwendung der selektiven und hochsensitiven PCR bleiben Mutationen dadurch oftmals unentdeckt, da kontaminierendes Normalgewebe dominiert.

Die PCR diente als Grundlage für die Durchführung der SSCP- und Sequenzierungsanalyse. Bei der Untersuchung von in Paraffinblöcken fixiertem Gewebe erwies sich die PCR als eine gut geeignete Methode zur effizienten Amplifikation von darin enthaltener DNA. Dabei ließen sich aus frisch angefertigten Paraffinschnitten ausreichende Mengen an spezifischer DNA amplifizieren, die für die SSCP- und Sequenzierungsanalyse weiter verwertet werden konnte.

Die SSCP gilt als effektive Methode zur qualitativen Bestimmung von DNA mit einer Sensitivität von 70-95% (Hayashi et Yandell 1993, Okamoto et al. 1994). Entscheidend für eine optimale exponentielle Amplifikation mittels PCR ist die Berücksichtigung der DNA-Segmentlänge, da die SSCP optimalerweise DNA-Segmente bis zu einer Länge von 400 Basenpaaren nachweisen kann, während die Amplifikation größerer DNA-Segmente zu ungenauen Ergebnissen führt. Gemäß Untersuchungen von Sheffield et al. 1993 ist die Sensitivität der SSCP-Analyse für Segmente bis 200 Basenpaaren am größten. Die Sensitivität für die SSCP-Analyse von PCR-Produkten mit einer durchschnittlichen Länge von 255 Basenpaaren wird auf 70% geschätzt (Sheffield et al. 1993, Campbell et al. 1995). Dieser Tatsache wurde in der vorliegenden Arbeit Rechnung getragen, indem das längere Exon 2 in zwei überlappenden Abschnitten (Exon 2a und 2b) mittels PCR amplifiziert wurde. Sämtliche PCR-Produkte bestanden aus weniger als 350 Basenpaare. In 7 Fällen fiel in der SSCP ein mutationsverdächtiges Laufmuster auf. In 6 Fällen konnte eine somatische Mutation mittels Sequenzierung bestätigt werden. Lediglich in einem Fall, dem immunhistochemisch p16-negativen Fall 53, lag trotz abweichendem Laufmuster die Wildtypsequenz vor. Nach Hayashi et Yandell (1993) liegt die falsch negative Rate bei der SSCP unter 10%. *Okamoto et al. (1994)* konnten diese Angabe anhand einer vergleichenden Analyse von Primärtumoren unterschiedlichen Ursprungs mittels SSCP und Sequenzierung bestätigen.

Die SSCP-Analyse ermöglicht im Sinne eines "Mutationsscreenings" die Detektion von Mutationsbanden, sie erlaubt jedoch keine endgültige Differenzierung der Punktmutationen. Zwar lässt das im korrespondierenden Normalgewebe gleichermaßen veränderte Bandenmuster mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen natürlichen genetischen Polymorphismus schließen, wie es in dieser Studie bei vier Polymorphismen auch der Fall war, wie durch Sequenzierung bestätigt wurde. Letztendlich kann die Frage, ob die in der SSCP detektierte Punktmutation einen Aminosäurewechsel bewirkt oder eine stille somatische Mutation darstellt bzw. einen natürlichen genetischen Polymorphismus, nur durch eine Basensequenzanalyse beantwortet werden. Auch kann die SSCP oftmals nicht zwischen unterschiedlichen Basensubstitutionen an der gleichen Nukleotidposition differenzieren, da sie zu einem ähnlichen aberrierenden Bandenmuster führen (*Sheffield et al. 1993*). Zu diesem Zweck kam in dieser Arbeit die Methode der direkten DNA-Sequenzierung zur Anwendung. Dieses direkte Verfahren bietet den Vorteil, auf die Verwendung von radioaktiven Nukliden verzichten zu können.

Für die Methylierungsanalyse wurde in dieser Studie auf die Methode der methylierungsspezifischen PCR (MSP) zurückgegriffen, die bereits bei Herman et al. (1996) in mehreren Aspekten anderen Detektionsmethoden gegenüber als vorteilhafter gewertet wurde. So wird für Southern blot-Hybridisierung eine größere Menge hochmolekularer DNA benötigt (5µg oder mehr), zudem kann Methylierung nur durch die methylierungssensitiven Restriktionsenzyme detektiert werden, wenn prozentual gesehen mehr Allele methyliert sind. Überdies werden nur Methylierungen in jenen CpG-Regionen nachgewiesen, deren Sequenzen auch von den Restriktionsenzymen erkannt werden. Eine sensitivere Methode der Methylierungsanalyse stellt eine Kombination aus der Anwendung methylierungssensitiver Restriktionsenzyme und PCR dar: Nach DNA-Bearbeitung durch die Enzyme werden über Primer, die nur die methylierungssensitiven Restriktionsregionen flankieren, mittels PCR jene methylierten DNA-Fragmente amplifiziert. Wie beim Southern blot wird auch bei dieser Methode nur Methylierung nachgewiesen, die in CpG-reichen Regionen vorliegen, die durch methylierungssensitive Enzyme identifiziert werden können. Schwierigkeiten ergeben sich bei inkompletter Restriktion, die ein falsch positives Methylierungsergebnis zur Folge hat, sowie bei einer niedrigen Zahl methylierter Allele (Herman et al. 1996, Wong et al. 1997a). Bei der MSP handelt es sich um eine PCR-Methode, mit der sensitiv und spezifisch in praktisch jeder CpG-reichen Region Methylierungen detektiert werden können. Hierzu kommen spezifische Primer zur Anwendung, die in bisulfitmodifizierter DNA methylierte von unmethylierter DNA differenzieren können, da durch die Bisulfitmodifikation detektierbare Sequenzunterschiede entstanden sind. Selbst bei inkompletter Bisulfitmodifikation wird die unmodifizierte DNA nicht durch die für modifizierte DNA spezifischen Primer erkannt. Es entsteht daher - anders als bei inkompletter Restriktion durch methylierungssensitive Enzyme - kein falsch positives Ergebnis. Auch die Fähigkeit der Primer zur Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Allelen wird durch inkomplette Modifikation nicht beeinträchtigt.

Die MSP weist eine hohe Sensitivität auf: Nach Untersuchungen von *Herman et al. (1996)* waren nach Vermischen von methylierter DNA mit unmethylierter DNA 0,1% an methylierter DNA (ca. 50 pg) in einer normalerweise unmethylierten Probe nachweisbar. Sie ist demnach deutlich sensitiver als die Southern-blot-Analyse, ermöglicht die spezifische Detektion methylierter Allele auch in geringer Zahl sowie die Untersuchung kleiner DNA-Proben, auch anhand von Material aus Paraffinblöcken.

Auch wenn nach *Herman et al. (1996)* eine mäßige Kontamination mit nichtmethylierten Normalzellen keinen Einfluss auf den Nachweis von Methylierungen haben soll, kam in dieser Studie zur Reduktion störenden Nichttumorgewebes eine gröbere Mikrodissektion zu Anwendung, bei der sicher 50-90% Tumorzellen gewonnen wurde.

Bezüglich des Methylierungsstatus des p16-Gens in Ovarialkarzinomen bestehen zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und jenen anderer Studien z.T. beträchtliche Unterschiede: Die Detektionsrate belief sich in dieser Arbeit auf 24% (7/29 Fällen), die mit Hilfe der MSP ermittelt werden konnten. Lediglich *Fujita et al. (1997)* konnten ebenfalls in 18% der untersuchten Fälle Hypermethylierungen nachweisen, indem sie sich der Kombination von Restriktionsenzymen und anschließender Multiplex-PCR bedienten. Weder *lchikawa et al. (1996)* noch *Shih et al. (1997)* konnten mittels Southern blot bzw. Anwendung methylierungsspezifischer Enzyme und nachfolgender PCR Hypermethylierungen in primären Ovarialkarzinomen oder Zelllinien nachweisen. Möglicherweise hat die im Vergleich zu den übrigen Detektionsmethoden höhere Sensitivität der MSP zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen geführt.

Mittels Immunhistochemie lässt sich sehr gut die Expression von p16 in Ovarialgewebe ermitteln. Sie stellt daher eine gut geeignete Methode zum Nachweis von p16-Inaktivierung in Ovarialkarzinomen dar und ermöglicht darüber hinaus auch die Feststellung einer p16-Überexpression. *Geradts et al. (2000)* bestätigten in einer kürzlich erschienenen Studie, dass der in dieser Studie verwendete monoklonale Primär-Antikörper gegenüber 3 anderen - z.T. auch polyklonalen - p16-Antikörpern die größte Spezifität hinsichtlich der p16-Expression besitzt. Die z.T. starke zytoplasmatische Markierung wurde auch in dieser Studie beobachtet und erschwerte in einzelnen Fällen die Beurteilung der Zellkernmarkierung.

Insgesamt stellt die IHC eine sensitive und gut einsetzbare Methode zum Screening von p16-Alterationen dar *(Kinoshita et al. 1996)*. In der vorliegenden Studie lagen in 70% der Fälle mit Verlust der p16-Expression (7/10) somatische Mutationen, Methylierungen sowie eine Deletion vor. In 3 Fällen ließ sich mit den angewandten Methoden keine Erklärung für den immunhistochemischen p16-Expressionsverlust finden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden 75 in Paraffin eingebettete epitheliale Ovarialkarzinome (55 serös-papilläre, 8 endometrioide, 6 muzinöse, 6 anaplastisch-undifferenzierte Karzinome) einer Deletions- und Mutationsanalyse des p16-Tumorsuppressorgens (Exon 1, 2) mittels PCR und SSCP unterzogen. In mutationsverdächtigen Fällen wurde anschließend eine nicht-radioaktive DNA-Sequenzanalyse vorgenommen. In allen Fällen wurde immunhistochemisch die Expression des p16-Proteins untersucht. In insgesamt 29 Fällen erfolgte eine Analyse des Methylierungsstatus in der CpG-reichen Region des p16-Exon 1 mit Hilfe der MSP. Untersucht wurden hierbei sämtliche immunhistochemisch p16-negativen Fälle, alle endometrioiden und muzinösen Karzinome, 11 serös-papilläre sowie 4 anaplastisch-undifferenzierte Karzinome.

Deletionen und Mutationen waren ein eher seltenes Ereignis in den untersuchten Ovarialkarzinomen. In einem serös-papillären Karzinom fand sich eine homozygote Deletion. Dieser Fall wies auch immunhistochemisch keine nukleäre p16-Expression auf.

Mittels SSCP wurden in 14 Fällen aberrierende Bandenmuster festgestellt. Durch Sequenzierung dieser Fälle fanden sich 6 Polymorphismen sowie in 6 Fällen somatische Mutationen, darunter Mehrfachmutationen. In 2 Fällen lag trotz aberrierendem SSCP-Bandenmuster die Wildtypsequenz vor. Bei den somatischen Mutationen handelte es sich um eine 6bp-Insertion sowie um 11 Punktmutationen, darunter 7 Missense-Mutationen und 3 silente Mutationen sowie eine heterozygote Mutation im Nukleotid 72 der nichtkodierenden 5'-Promoterregion des Exon 1. Immunhistochemisch waren 3 dieser Fälle ebenfalls p16-negativ und 2 schwach/fokal positiv.

Hypermethylierung der CpG-reichen Region des p16-Exon 1 erwies sich mit 24% der untersuchten 29 Fälle als die häufigste Form der p16-Inaktivierung. Hypermethylierungen traten bei allen histologischen Subtypen gleichermaßen auf. Sämtliche 7 Tumoren waren immunhistochemisch p16-negativ (3) oder schwach bzw. fokal positiv (4).

Bei Betrachtung der Verteilung sämtlicher p16-Aberrationen auf die histologischen Subtypen fiel auf, dass p16-Aberrationen in 69% der untersuchten muzinösen und in 63% der endometrioiden Ovarialkarzinome nachweisbar waren und somit in diesen Subtypen häufig vorkamen. In der Hauptgruppe der epithelialen Ovarialkarzinome, den serös-papillären Karzinomen, waren sie mit 9% hingegen ein vergleichsweise seltenes Ereignis *(s. Tab.3.6.)*.

Die detektierten p16-Basensubstitutionen wurden dahingehend untersucht, inwiefern sie gleichzeitig auch einen Effekt ausübten auf das alternative â-Transkript (p14^{ARF}), welches ebenfalls vom Exon2 des INK4a-Lokus aus transkribiert wurde. 4 der 15 verschiedenen p16-Basensequenzänderungen betrafen den DNA-Abschnitt des Exon2, der beide Proteine kodierte. 3 dieser 4 Basensubstitionen führten zu einer veränderten ARF-Aminosäuresequenz. In einem Fall wirkte sich die Basensubstitution nur auf die Aminosäure-Frequenz von p16 aus, im ARF-Protein fand hingegen kein Aminosäurewechsel statt.

Tendenziell waren p16-Aberrationen mit fortgeschrittenen Tumorstadien (FIGO III und IV) assoziiert *(s. Tab. 3.8.)*. Den Untersuchungsergebnissen zufolge besteht zudem eine Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad und nachweisbaren p16-Aberrationen, insbesondere Methylierungen. Es lies sich eine Assoziation zu hohem Differenzierungsgrad feststellen. Aufgrund der geringen Fallzahl ist es jedoch problematisch, von einer Signifikanz zu sprechen. Hierzu müsste in zukünftigen Studien eine größere Fallzahl bezüglich des Methylierungsstatus untersucht werden.

Ausblick

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass p16-Aberrationen gehäuft in bestimmten Subtypen der epithelialen Ovarialkarzinome vorkommen. Es erscheint sinnvoll, eine größere Fallzahl dieser Subtypen zu untersuchen, insbesondere auch hinsichtlich zukünftiger Therapieoptionen, z.B. der Gentherapie. Untersuchungen an Ovarial-Zelllinien und Nacktmäusen mit Transfektion von p16 mittels Adenoviren haben sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt, dass p16 in der Lage ist, effektiv Tumorwachstum zu hemmen i.S.e. Gentherapie bzw. Tumor-Suppressor-Therapie (Modesitt et al. 2001, Murphy 2001). Auch Allay et al. (2000) fanden heraus, dass ein adenoviraler Vektor, der Wildtyp-p16 enthielt (Adp16), eine hohe Transduktionsrate in Prostatakrebszellen sowohl in vitro als auch in vivo erzielte. Nach Injektion von Adp16 in Prostatatumoren wurde das Transgen durch den adenoviralen Vektor bis zu 14 Tage lang exprimiert. Wildtyp-p16 hemmte die Proliferation von Prostata-Karzinomzellen in vitro und supprimierte Tumorwachstum in vivo. Bei der pathologischen Untersuchung wiesen die Adp16-behandelten Tumoren dosisabhängige Nekrosen und Fibrosierungen auf. Allay et al. (2000) halten den Tumorsuppressor p16 bzw dessen Gen p16^{INK4a} für einen geigneten Ansatzpunkt einer noch zu entwickelnden Gentherapie. Auch Murphy (2001) und Modesitt et al. (2001) kommen zu dem Schluss, dass eine adenoviral-vermittelte p16-Expression in vivo

bei Nacktmäusen effizienter zu sein scheint bezüglich der Suppression von Ovarialtumoren, aber auch anderen Tumortypen. Offensichtlich ist ein Teil der wachstumshemmenden Aktivität von p16 unabhängig von pRb. Eine weitere Arbeitsgruppe fand heraus, dass p16-Expression zu einer Down-Regulation des Angiogenesefaktors VEGF (Vascular endothelial growth factor) führt und darüber in der Lage ist, in Nacktmäusen die Angiogenese zu (Harada et al. 1999). Auch im Hinblick hemmen auf unterschiedliche Chemotherapiesensibilität bei Adp16-Therapie besteht noch Forschungsbedarf. Grim et al. (1997) konnten eine Chemoresistenz gegenüber Paclitaxel und Cisplatin in Ovarial-Malignomen nachweisen, die mit Adp16 behandelt wurden. Andererseits ließen sich bestimmte Lungentumoren durch Adp16-Behandlung radiosensibilisieren (Kawabe et al. 2000). Zukünftiges Ziel könnte die Kombination von Gentherapien mit sog. Standardtherapien des Ovarialkarzinoms sein, wobei geeignete Therapeutika bzw. Therapieformen für den jeweiligen Tumortyp zu identifizieren wären.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Adachi M, Roussel MF, Havenith K, Sherr CJ (1997) Features of macrophage differentiation induced by p19^{INK4d}, a specific inhibitor of cyclin D-dependent kinases. Blood 90: 126-137

2. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 93: 13742-13747

3. Allay JA, Steiner MS, Zhang Y, Reed CP, Cockroft J, Lu Y (2000) Adenovirus p16 gene therapy for prostate cancer. World J Urol 18: 111-120

4. Barker FG, Chen P, Furman F, Aldape KD, Edwards MSB, Israel MA (1997) P16 deletion and mutation analysis in human brain tumors. J Neuro-Oncol 31: 17-23

5. Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J, Bartek J (1996) The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. Cancer Res 56: 5475-5483

6. Bauer HM, Greer CE, Manos MM (1992) Determination of genital human papilloma virus infection by consensus PCR amplification. In: Herrington CS, McGee JOD (Hrsg.) Diagnostic Molecular Pathology: a practical approach. Oxford Press: 131-152

7. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P, McKenzie S, Yin S, Bast RC (1990) Overexpression of Her-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. Cancer Res 50: 4087-4091

8. Berchuck A, Kohler MF, Hopkins MP, Humphrey PA, Robboy SJ, Rodriguez GC, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC (1994) Overexpression of p53 is not a feature of benign and early-stage borderline epithelial ovarian tumors. Gynecol Oncol 52: 232-236

9. Birrer MJ (1997) Discoveries in the cell cycle and ovarian cancer. Gynecol Oncol 64: 187-188

10. Brenner AJ, Paladugu A, Wang H, Olopade OI, Dreyling MH, Aldaz M (1996) Preferencial loss of expression of p16^{INK4a} rather than p19^{ARF} in breast cancer. Clin Cancer Res 2: 1993-1998

11. Buller RE, Anderson B, Connor JP, Robinson R (1993) Familial ovarian cancer. Gynecol Oncol 51: 160-166

12. Caduff RF, Svoboda-Newman SM, Bartos RE, Ferguson AW, Frank TS (1998) Comparative analysis of histologic homologues of endometrial and ovarian carcinoma. Am J Surg Pathol 22: 319-326

13. Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE, Sidransky D (1994) Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. Science 265: 415-416

14. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter JL, Buckler A, Gabrielson E, Tockman M, Cho KR, Hendrick L, Bova GS, Isaacs W, Koch W, Schwab D, Sidransky D (1995) Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. Nat Genet 11: 210-212

15. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1994) Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. Nat Genet 8: 27-32

16. Campbell IG, Beynon G, Davis M, Englefield P (1995) LOH and mutation analysis of CDKN2 in primary human ovarian cancers. Int J Cancer 63: 222-225

17. Chenevix-Trench G, Kerr J, Friedlander M, Hurst T, Sanderson B, Coglan M, Ward B, Leary J, Khoo SK (1994) Homozygous deletions on the short arm of chromosome 9 in ovarian adenocarcinoma cell lines and loss of heterozygosity in sporadic tumors. Am J Hum Genet 55: 143-149

18. Claus EB, Schwartz PE (1995) Familial ovarian cancer. Cancer Suppl 76: 1998-2003

19. Cordon-Cardo C (1995) Mutation of Cell Cycle Regulators. Am J Pathol 147: 545-560

20. Clurman BE, Roberts JM (1995) Cell cycle and cancer. J Natl Cancer Inst 87: 1499-1501

21. Cramer DW, Hutchinson GB, Welch WR, et al. (1982) Factors affecting the association of oral contraceptives and ovarian cancer. N Engl J Med 307: 1047-1051

22. Cramer DW, Hutchinson GB, Welch WR, et al. (1983) Determinants of ovarian cancer risk. Reproductive experiences and family history. J Natl Cancer Inst 71: 711-716

23. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J (1997) K-ras mutations in mucinous ovarian tumors. Cancer 79: 1581-1586

24. Devlin J, Elder PA, Gabra H, Steel CM, Knowles MA (1996) High frequency of chromosome 9 deletion in ovarian cancer: evidence for three tumour-suppressor loci. Br J Cancer 73: 420-423

25. Diebold J, Baretton GB, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M, Löhrs U (1996a) Bcl-2 expression, p53 accumulation and apoptosis in ovarian carcinomas. Am J Clin Pathol 105: 341-349

26. Diebold J, Suchy B, Baretton GB, Blasenbreu S, Meier W, Schmidt M, Rabes H, Löhrs U (1996b) DNA ploidy and myc DNA amplification in ovarian carcinomas. Correlation with p53 and bcl-2 expression, proliferative activity and prognosis. Virchows Arch 429: 221-227

27. Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, Gabrielli BG, Cummings MC, Wright RG, Hurst T, Khoo SK, Parsons PG (1997) Increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product $p16^{INK4A}$ in ovarian cancer is associated with progression and unfavourable prognosis. Int J Cancer 74: 57-63

28. Dublin EA, Patel NK, Gillet CE, Smith P, Peters G, Barnes DM (1998) Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histological parameters. Int J Cancer 79: 71-75

29. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, TlstyTD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. Cell 76: 1013-1023

30. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 suppression. Cell 75: 817-825

31. Elledge SJ, Winston J, Harper JW (1996) A question of balance: the role of cyclinkinase inhibitors in development and tumorigenesis. Cell Biol 6: 388-392

32. Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM (1991) K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. Amer J Pathol 139: 777-785

33. Evans MF, McDicken IW, Herrington CS (1999) Numerical abnormalities of chromosomes 1, 11, 17, and X are associated with stromal invasion in serous and mucinous epithelial ovarian tumours. J Pathol 189: 53-59

34. Fathalla MF (1971) Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? Lancet II: 163

35. Fitzgerald MG, Harkin DP, Silva-Arrieta S, MacDonald DJ, Lucchina LC, Unsal H, O'Neill E, Koh J, Finkelstein DM, Isselbacher RJ, Sober AJ, Haber DA (1996) Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. Proc Natl Acad Sci USA 93: 8541-8545

36. Friedländer ML, Hedley DW, Swanson C, Russel P (1988) Prediction of long-term survival by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. J Clin Oncol 6: 282-290

37. Fujita M, Enomoto T, Inoue M, Tanizawa O, Ozaki M, Rice JM, Nomura T (1994) Alteration of the p53 tumor-suppressor gene occurs independently of K-ras activation and more frequently in serous adenocarcinomas than in other common epithelial tumors of the human ovary. Jap J Cancer Res 85: 1247-1256

38. Fujita M, Enomoto T, Haba T, Nakashima R, Sasaki M, Yoshino K, Wada H, Buzard GS, Matsuzaki N, Wakasa K, Murata Y (1997) Alteration of p16 and p15 genes in common epithelial ovarian tumors. Int J Cancer 74: 148-155

39. Gallion HH, Pieretti M, DePriest PD, van Nagell JR (1995) The molecular basis of ovarian cancer. Cancer 76: 1992-1997

40. Gazzeri S, Della Valle V, Chaussade L, Brambilla C, Larsen CJ, Brambilla E (1998) The human $p19^{ARF}$ protein encoded by the \hat{a} transcript of the $p16^{INK4a}$ gene is frequently lost in small cell lung cancer. Cancer Res 58: 3926-3931

41. Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE (1995) Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/ multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16^{INK4A} in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. Cancer Res 55: 6006-6011

42. Geradts J, Wilson PA (1996) High frequency of aberrant p16 INK4A expression in human breast cancer. Am J Pathol 149: 15-20

43. Geradts J, Hruban RH, Schutte M, Kern SE, Maynard R (2000) Immunohistochemical p16INK4a analysis of archival tumors with deletion, hypermethylation, or mutation of the CDKN2/MTS1 gene. A comparison of four commercial antibodies. Appl Immunohistochem Molecul Morphol 8: 71-79

44. Graña X, Reddy EP (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-depentent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). Oncogene 11: 211-219

45. Grim J, D`Amico A, Frizelle S, Zhou J, Kratzke RA, Curiel DT (1997) Adenovirusmediated delivery of p16 to p16-deficient human bladder cancer cells confers chemoresistance to cisplatin and paclitaxel. Clin Cancer Res 3: 2415-2423

46. Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Frye C, Eeles R, Orlow I, Lacombe L, Ponce-Castaneda V, Lianes P, Latres E, Skolnick M, Cordon-Cardo C, Kamb A (1995a) Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression. Am J Pathol 146: 1199-1206

47. Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, Bergman W, Frants R (1995b) Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. Nat Genet 10: 351-353

48. Hall M, Bates S, Peters G (1995) Evidence for different modes of action of cyclindependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. Oncogene 11: 1581-1588 **49. Hannon GJ,** Beach D (1994) p15 ^{INK4b} is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest. Nature 371: 257-261

50. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G (1996) Regulation of p16^{CDKN2} expression and its implications for cell immortalization and senescence. Mol Cell Biol 16: 859-867

51. Harada H, Nakagawa K, Iwata S, Saito M, Kumon Y, Sakaki S, Sato K, Hamada K (1999) Restoration of wild type p16 downregulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human gliomas. Cancer Res 59: 3783-3789

52. Harding M, Cowan S, Hole D, et al. (1990) Estrogen and progesterone receptors in ovarian cancer. Cancer 65: 486-491

53. Hatta Y, Hirama T, Takeuchi S, Lee E, Pham E, Miller CW, Strohmeyer T, Wilczynski SP, Melmed S, Koeffler HP (1995) Alterations of the p16 (MTS1) gene in testicular, ovarian and endometrial malignancies. J Urol 154: 1954-1957

54. Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mutat 2: 338-346

55. Henriksen R, Strang P, Wilander E, Bäckström T, Tribukait B, Öberg K (1994) P53 expression in epithelial ovarian neoplasms: relationship to clinical and pathological parameters, Ki-67 expression and flow cytometry. Gynecol Oncol 53: 301-306

56. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JPJ, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 55: 4525-4530

57. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylationspecific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9821-9826

58. Herman JG, Civin CI, Issa JPJ, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB (1997) Distinct patterns of inactivation of p15^{INKB} and p16^{INK4} characterize the major types of hematological malignancies. Cancer Res 57: 837-841

59. Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JF, Sutherland RL (2000) INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. Clin Cancer Res 6: 2777-2787

60. Hunter RW, Alexander NDE, Soutter WP (1992) Meta-analysis of surgery in advanced ovarian carcinoma: is maximum cytoreductive surgery an independent determinant of prognosis? Am J Obstet Gynecol 166: 504-511

61. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark Jr WH, Tucker MA, Dracopoli NC (1994) Germline p16 mutations in familial melanoma. Nat Genet 8: 15-21

62. Isola J, Kallioniemi OP, Korte JM, Wahlström T, Aine R, Helle 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

63. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulus N, Markowitz S, Willson JKV, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. Cancer Res 54: 6353-6358

64. Johnson DJ, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. Nature 365: 349-352

65. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 264: 436-440

66. Kanuma T, Nishida J, Gima T, Barrett JC, Wake N (1997) Alterations of the p16 INK4A gene in human ovarian cancers. Mol Carcinog 18: 134-141

67. Kappes S, Milde-Langosch K, Kressin P, Passlack B, Dockhorn-Dworniczak B, Röhlke P, Löning T (1995) p53 mutations in ovarian tumors, detected by temperature-gradient gel electrophoresis, direct sequencing and immunohistochemistry. Int J Cancer 64: 52-59

68. Kaufmann M, v. Minckwitz G (1995) Ovarialkarzinom. In: Onkologie. Hrsg.: Zeller, zur Hausen: 1-8

69. Kawabe S, Roth JA, Wilson DR, Meyn RE (2000) Adenovirus-mediated p16INK4A gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells in a p53-dependent manner. Oncogene 19: 5359-5366

70. Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilcynski S, Lee YY, Bartram CR, Koeffler HP (1995) Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. Cancer Res 55: 2266-2269

71. Kiechle M, Jakisch C, Bauknecht T (2001) Genetik und Prävention des Ovarialkarzinoms. Gynäkologe 34: 1013-1019

72. Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Mishina T, Akie K, Nishi M, Hiroumi H, Hommura F, Kawakami Y (1996) Altered $p16^{INK4}$ and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. Cancer Res 56: 5557-5562

73. Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E (1995) Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. Nature 375: 506-510

74. Kommoss F, Richter B, Breitbach GP (2001) Borderline-Tumoren des Ovars. Gynäkologe 34: 1003-1012

75. Konecny G, Untch M, Pihan A, Kimmig R, Gropp M, Stieber P, Hepp H, Slamon D, Pegram M (2001) Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression and prognosis in ovarian cancer. Clin Cancer Res 7: 1743-1749

76. Kühn W, Kaufmann M, Feichter GE, Rummel HH, Schmid H, Heberling D (1989) DNA flow cytometry, clinical and morphological parameters as prognostic factors for advanced malignant and borderline ovarian tumors. Gynecol Oncol 33: 360-367

77. Kühn W, Schmid H, Breitbach GP (2000) Ovarieller Borderlinetumor oder hoch differenziertes Zystadenokarzinom? Ist eine Unterscheidung mittels DNA-Zytometrie möglich? Geburtsh Frauenheilkd 60: 1

78. Kuhn W, Pache L, Schmalfeldt B, Dettmar P, Schmitt M, Jänicke F, Graeff H (1994) Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy. Gynecol Oncol 55: 401-409

79. Kuhn W, Schmalfeldt B, Reuning U, Pache L, Berger U, Ulm K, Harbeck N, Späthe K, Dettmar P, Höfler H, Jänicke F, Schmitt M, Graeff H (1999) Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. Br J Cancer 79: 1746-1751

80. Lage JM, Weinberg DS, Huettner PC, Mark SD (1992) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in ovarian tumors. Association of ploidy with tumor type, histologic grade, and clinical stage. Cancer 69: 2668-2675

81. Larsen CJ (1996) $p16^{INK4a}$: a gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression. Oncogene 12:2041-2044

82. Lee KR, Scully RE (2000) Mucinous tumors of the ovary. A clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type) and carcinoma, including an evaluation of 11 cases with "pseudomyxoma peritonei". Am J Surg Pathol 24: 1447-1464

83. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y (1994) Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. Cancer Res 54: 6078-6082

84. Liggett Jr WH, Sewell DA, Rocco J, Ahrendt SA, Koch W, Sidransky D (1996) p16 and p16ß are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. Cancer Res 56: 4119-4123

85. Liu Q, Neuhausen S, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Gruis NA, Eddington K, Allalunis-Turner MJ, Skolnick MH, Fujimura FK, Kamb A (1995) CDKN2 (MTS1) tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines. Oncogene 10: 1061-1067

86. Lukas J, Parry J, Aagaard L, Mann D, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J (1995) Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. Nature 375: 503-506 **87.** Lynch HT, Watson P, Lynch JF, Conway TA, Fili M (1993) Hereditary ovarian cancer: heterogeinity in age at onset. Cancer 71: 573-81

88. Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D (1995) A novel p16^{INK4A} transcript. Cancer Res 55: 2995-2997

89. Marchini S, Codegoni AM, Bonazzi C, Chiari S, Broggini M (1997) Absence of deletions but frequent loss of expression of p16INK4 in human ovarian tumors. Br J Cancer 76: 146-149

90. Martinez-Delgado B, Fernandez-Piqueras J, Garcia MJ, Arranz E, Gallego J, Rivas C, Robledo M, Benitez J (1997) Hypermethylation of a 5'CpG island of p16 is a frequent event in non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia 11: 425-428

91. Matias-Guiu X, Prat J (1998) Molecular pathology of ovarian carcinomas. Virchow Arch 433: 103-111

92. McConnell BB, Gregory FJ, Stott FJ, Hara E, Peters G (1999) Induced expression of p16^{INK4a} inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. Mol Cell Biol 19: 1981-1989

93. Meden H, Marx D, Roegglen T, Schauer A, Kuhn W (1998) Overexpression of the oncogene e-erbB-2 (HER2/neu) and response to chemotherapy in patients with ovarian cancer. Int. J Gynecol Pathol 17: 61-65

94. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995) 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. Nat Med 1: 686-692

95. Milde-Langosch K, Ocon E, Becker G, Löning T (1998) p16/MTS1 inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hypermethylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors. Int J Cancer 79: 61-65

96. Milde-Langosch K, Riethdorf L, Bamberger AM, Löning T (1999) p16/MTS1 and pRB expression in endometrial carcinomas. Virchows Arch 434: 23-28

97. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rueck G, Kelp B, Löning T (2001) Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. Breast Cancer Res Treatm 67: 61-70

98. Modesitt SC, Ramirez P, Zu Z, Bodurka-Bevers D, Gershenson D, Wolf JK (2001) In vitro and in vivo adenovirus-mediated p53 and p16 tumor suppressor therapy in ovarian cancer. Clin Cancer Res 7: 1765-1772

99. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y (1994) Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squammous cell carcinoma. Cancer Res 54: 3396-3397

100. Moulton T, Samara G, Chung WJ, Yuan L, Desai R, Sisti M, Bruce J, Tycko B (1995) MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. Am J Pathol 146: 613-619

101. Murphy ME (2001) The battle between tumor suppressors: Is gene therapy using $p16^{INK4a}$ more efficacious than p53 for treatment of ovarian carcinoma? Clin Cancer Res 7: 1487-1489

102. Narod SA, Risch H, Moslehi R, Dorum A, Neuhausen S, Olsson H, Provencher D, Radice P, Evans G, Bishop S, Brunet JS, Ponder BA (1998) Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. N Engl J Med 339: 424-428

103. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 368: 753-756

104. Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature 344: 503-508

105. Nurse P (1999) Cyclin dependent kinases and regulation of the fission yeast cell cycle. Biol Chem 380: 729-733

106. Olshan AF, Weissler Mc, Pei H, Conway K, Anderson S, Fried DB, Yarbrough WG (1997) Alterations of the p16 gene in head and neck cancer: frequency and association with p53, PRAD-1 and HPV. Oncogene 14: 811-818

107. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, Harris CC (1994) Mutations and altered expression of $p16^{INK}$ in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA 91: 11045-11049

108. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ (1994) Absence of p16^{INK4} protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. Oncogene 9: 3375-3378

109. Padberg BC, Arps H, Franke U, Thiedemann C, Rehpennung W, Stegner HE, Lietz H, Schröder S, Dietel M (1992) DNA cytophotometry and prognosis in ovarian tumours of borderline malignancy. A clinicomorphologic study of 80 cases.Cancer 69: 2510-2514

110. Pardee AB (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. Science 246: 603-608

111. Pfleiderer A (1996) Tumorartige Läsionen und Tumoren der Fortpflanzungsorgane und der Brustdrüse. In: Martius G, Breckwoldt M, Pfleiderer A (Hrsg.) Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York: 467

112. Pieretti M, Cavalieri C, Conway PS, Gallion HH, Powell DE, Turker MS (1995) Genetic alterations distinguish different types of ovarian tumors. Int J Cancer 64: 434-440

113. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19^{Arf}, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. Cell 92: 713-723

114. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. Cell 83: 993-1000

115. Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M (1994) Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. Hum Molec Genet 3: 801-807

116. Reed A, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones R, Koch W, Bartek J, Sidransky D (1996) High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squammous cell carcinoma. Cancer Res 56: 3630-3633

117. Rodabaugh KJ, Biggs RB, Qureshi JA, Barrett AJ, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC (1995) Detailed deletion mapping of chromosome 9p and p16 gene alterations in human borderline and invasive epithelial ovarian tumors. Oncogene 11: 1249-1254

118. Röhlke P, Milde-Langosch K, Weyland C, Pichlmeier U, Jonat W, Löning T (1997) p53 is a persistent and predictive marker in advanced ovarian carcinomas: multivariate analysis including comparison with Ki67 immunoreactivity. J Cancer Res Clin Oncol 123: 496-501

119. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I (1992) PCR: Clinical Diagnostics and research. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg: 1-17, 51-57, 112-116, 163-167

120. Ruas M, Peters G (1998) The p16^{INK4a}/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochim Biophys Acta 1378: F115-F177

121. Ryan A, Al-Jehani RM, Mulligan KT, Jacobs IJ (1998) No evidence exists for methylation inactivation of the p16 tumor suppressor gene in ovarian carcinogenesis. Gynecol Oncol 68: 14-17

122. Saigo PE (1993) The histopathology of malignant ovarian tumors. In: Markman M, Hoskins WJ (Hrsg.) Cancer of the ovary. Raven Press, New York: 21-43

123. Schmidt-Matthiesen H, Bastert G, Wallwiener D (2000) Ovarialtumoren. In: Gynäkologische Onkologie (Hrsg. s.o.). Schattauer, Stuttgart New York: 68-91

124. Schultz DC, Vanderveer L, Buetow KH, Boente MP, Ozols RF, Hamilton TC, Godwin AK (1995) Characterization of chromosome 9 in human ovarian neoplasia identifies frequent genetic imbalance on 9q and rare alterations involving 9p, including CDKN2. Cancer Res 55: 2150-2157

125. Schutte M, Hruban R, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG (1997) Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. Cancer Res 57: 3126-3130

126. Schuyer M, van Staveeren IL, Klijn JGM, v.d. Burg MEL, Stoter G, Henzen-Logmans SC, Foekens JA, Berns EMJJ (1996) Sporadic CDKN2 (MTS1/ p16^{INK4}) gene alterations in human ovarian tumours. Br J Cancer 74: 1069-1073

127. Schwaller J, Pabst T, Koeffler HP, Niklaus G, Loetscher P, Fey MF, Tobler A (1997) Expression and regulation of G1 cell-cycle inhibitors (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}) in human acute myeloid leukemia and normal myeloid cells. Leukemia 11: 54-63

128. Seidman JD, Kurman RJ (2000) Ovarian serous borderline tumors: A critical review with emphasis on prognostic indicators. Hum Pathol 31: 539-557

129. Sellers WR, Kaelin WG (1996) xRB as a modulator of transcription. Biochim Biophys Acta 1288: M1-M5

130. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 366: 704-707

131. Serrano M, Lee HW, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, De Pinho RA (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. Cell 85: 27-37

132. Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, Rollins BJ (1995) Reciprocal Rb inactivation and p16^{INK4} expression in primary lung cancers and cell lines. Cancer Res 55: 505-509

133. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformational polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 16: 325-332

134. Shigemasa K, Hu C, West CM, Clarke J, Parham GP, Parmley TH, Korourian S, Baker VV, O'Brien TJ (1997) p16 overexpression: a potential early indicator of transformation in ovarian carcinoma. J Soc Gynecol Invest 4: 95-102

135. Shih YC Kerr J, Liu J, Hurst T, Khoo SK, Ward B, Wainwright B, Chenevix-Trench G (1997) Rare mutations and no hypermethylation at the CDKN2 locus in epithelial ovarian tumours. Int J Cancer 70: 508-511

136. Shiohara M, El Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP (1994) Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. Blood 84: 781-784.

137. Shiozawa T, Nikaido T, Shimizu M, Zhai Y, Fujii S (1997) Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and $p16^{INK4}$ in human endometrioid-type endometrial carcinoma. Cancer 80: 2250-2256

138. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989) Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 244: 707-712

139. Spruck CH, Gonzales-Zulueta MG, Shibata A, Simoneau AR, Lin MF, Gonzales F, Tsai YC, Jones PA (1994) p16 gene in uncultured tumours. Nature 370: 183-184

140. Stegner HE (1994) Gynäkologie und Geburtshilfe. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

141. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V (1999) Differential roles for cyclindependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. Mol Cell Biol 19: 2109-2117

142. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A (1995) Complex structure and regulation of the p16 (MTS1) locus. Cancer Res 55: 2988-2994

143. Suh SI, Cho JW, Baek WK, Suh MH, Carson DA (2000) Lack of mutation at p16INK4A gene but expression of aberrant p16INK4A RNA transcripts in human ovarian carcinoma. Cancer Lett 153: 175-182

144. Sui L, Dong Y, Ohno M, Goto M, Inohara T, Sugimoto K, Tai Y, Hando T, Tokuda M (2000) Inverse expression of Cdk4 and p16 in epithelial ovarian tumors. Gynecol Oncol 79: 230-237

145. Suzuki-Takahashi I, Higashi H, Yoshida E, Nishimura S, Kitagawa M (1997) Effects of exogenous p16INK4a on growth of cells with various status of cell-cycle regulators. Biochem Biophys Res Commun 234: 386-392

146. Tam SW, Shay JW, Pagano M (1994) Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor $p16^{INK4}$. Cancer Res 54: 5816-5820

147. Takeshima Y, Nishisaka T, Kawano R, Kishizuchi K, Fujii S, Kitaguchi S, Inai K (1996) p16/CDKN2 gene and p53 gene alterations in Japanese non-smoking female lung adenocarcinoma. Jpn J Cancer Res 87: 134-140

148. Tanake H, Shimada Y, Imamura M, Shibagaki I, Ishizaki K (1997) Multiple types of abberations in the p16 (INK4a) and the p15 (INK4b) genes in 30 esophageal squammous-cell-carcinoma cell lines. Int J Cancer 70: 437-442

149. Trope C, Kaern J (1994) DNA ploidy in epithelial ovarian cancer: a new independent prognostic factor? Gynecol Oncol 53: 1-4

150. Tung WS, Shevlin DW, Bartsch D, Norton JA, Wells SAJ, Goodfellow PJ (1996) Infrequent CDKN2 mutation in human differentiated thyroid cancers. Mol Carcinogen 15: 5-10

151. UICC (1997) Gynäkologische Tumoren. In: Wittekind C, Wagner G (Hrsg.) TNM Klassifikation maligner Tumoren. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 5. Auflage, S. 119-123

152. Wagner U, Blohmer JU, Lück HJ (2001) Medikamentöse Rezidivtherapie. Gynäkologe 34: 1020-1023

153. Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81: 323-330

154. Whitaker NJ, Bryan TM, Bonnefin P, Chang ACM, Musgrove EA, Braithwaite AW, Reddel RR (1995) Involvement of RB-1, p53, p16^{INK4} and telomerase in immortalization of human cells. Oncogene 11: 971-976

155. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J (1992) Collaborative Cancer Group. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Am J Epidemiol 136: 1184-1203

156. Wong DJ, Barrett MT, Stöger R, Emond EJ, Reid BJ (1997a) p16^{INK4a} promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas. Cancer Res 57: 2619-2622

157. Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Nobori T, Yim SF, Lai KW, Phil M, Yu AL, Diccianni MB, Li TZ, Chang AM (1997b) p16 INK4 and p15INK4B alterations in primary gynegologic malignancy. Gynecol Oncol 65: 319-324

158. Xiong Y, Zhang H, Beach D (1993a) Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. Genes Dev 7: 1572-1583

159. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993b) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366: 701-704

160. Xiong Y (1996) Why are there so many CDK inhibitors? Biochim Biophys Acta 1288: 01-05

161. Zariwala M, Xiong Y (1996) Lack of mutation in the cyclin-dependent kinase inhibitor, $p19^{INK4d}$, in tumor-derived cell lines and primary tumors. Oncogene 13: 2033-2038

162. Zhang HS, Postigo AA, Dean DC (1999) Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16^{INK4a}, TGFB, and contact inhibition. Cell 97: 53-61

163. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. Cell 92: 725-734

164. Zhou X; Tarmin L, Yin J, Jiang HY, Suzuki H, Rhyu MG, Abraham JM, Meltzer SJ (1994) The MTS1 gene is frequently mutated in primary human esophageal tumors. Oncogene 9: 3737-3741

165. Zhuang Z, Bertheau P, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Gnarra J, Linehan WM, Lubensky IA (1995) A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions <1 mm in size. Am J Pathol 146: 620-25

166. Zindy F, Soares H, Herzog KH, Morgan J, Sherr CJ, Roussel MF (1997) Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. Cell Growth Differ 8: 1139-1150

Bildanhang



Bild 1: p16-Immunhistochemie: Serös-papilläres Adenokarzinom (Fall 25) mit negativer nukleärer p16-Proteinexpression, Zytoplasma mit 3-fach positiver p16-Expression. Vergrößerung 400-fach. Pfeil: p16-negativer Zellkern



Bild 2: p16-Immunhistochemie: Serös-papilläres Adenokarzinom (Fall 29) mit starker nukleärer p16-Expression (3-fach positiv) und schwacher zytoplasmatischer p16-Expression. Pfeile zeigen positive p16-Expression in Stromazellen. 400-fache Vergrößerung. Pfeil: Zellkern mit dreifach positiver p16-Expression



Bild 3: p16-Immunhistochemie: Serös-papilläres Adenokarzinom (Fall 100), 1-3-fach positive nukleäre p16-Expression, zytoplasmatische Expression 3-fach positiv, 400-fache Vergrößerung.



Bild 4: p16-Immunhistochemie: positive nukleäre p16-Expression in Normalgewebe (Fall 45), 200fache Vergrößerung. Pfeil: Stromazelle mit positiver nukleärer p16-Expression



Bild 5: Vergleichende PCR-Analyse zur Detektion von homozygoten Deletionen in Tumorgewebe (t) und Normalgewebe (n) nach Mikrodissektion der Fälle 6 und 90; oben: p16-Banden, unten: â-Globin-Banden (B); Fall 90: Nachweis einer p16-Deletion, erkennbar an fehlender p16-Bande



Bild 6: Methylierungsspezifische PCR (MSP) nach Bisulfit-Behandlung der DNA aus Tumorgewebe: u = Primer für unmethylierte DNA, m = Primer für methylierte p16-5'-Region. Methylierung der 5'-CpG-reichen Region fand sich in den Fällen 53 und 104 (Fall 104 wurde mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. K. Milde-Langosch abgebildet). Aufgrund gleichzeitig präsenter Zellen aus Normalgewebe fand in Fall 53 eine Amplifikation mit beiden Primerpaaren statt, erkennbar an zwei Banden (m, u). Im Fall 6 war die p16-5'-Region unmethyliert.



Bild 7: SSCP-Analyse von p16-Exon 1 und p16-Exon 2, aufgeteilt in zwei Fragmente (Exon 2a und 2b). Aberrierende Banden sind in 6 Fällen erkennbar (Pfeile): Fall 20: Endometrioides Karzinom, Fall 21: Muzinöses Karzinom, Fall 31: Endometrioides Karzinom, Fall 103: Muzinöses Karzinom, Fall 7 (=E7): Serös-papilläres Karzinom, Fall 41: Serös-papilläres Karzinom (Fall 41 wurde mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. K. Milde-Langosch abgebildet; *Milde-Langosch et al. 1998*). Die identischen aberrierenden Banden in den Fällen E7 und 41 wurden durch einen Polymorphismus verursacht, der mittels Sequenzierung in beiden Fällen nachgewiesen wurde.



Bild 8: Sequenzanalyse nach SSCP-Analyse und DNA-Reamplifikation. Fall 21: Muzinöses Karzinom, aberrierende Banden in der SSCP-Analyse. Die direkte Sequenzierung ergab eine 6-Basenpaar-Insertion mit Duplikation von Codon 9/10. wt = Wildtyp-Sequenz. Eckige Klammer : 6-Basenpaar-Insertion; Unterstrichene Basenpaare (ATG; 1) = Codon 1

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. T. Löning für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie für die stete Bereitschaft zur kritischen wissenschaftlichen Diskussion.

Des weiteren möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. K. Milde-Langosch bedanken für ihre engagierte Betreuung sowie für ihre wertvollen zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau G. Rieck für die intensive Einarbeitung in die verschiedenen Labortechniken und die ständige Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung auftretender Probleme.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Gynäkopathologie sowie den Mitdoktoranden für die angenehme Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Persönliche Angaben	Name: Geburtsdatum: Geburtsort: Staatsangehörigkeit:	Ingrid Erik 16. Mai 19' Bukarest, F deutsch	a Ocon 72 Rumänien			
Schulbildung	1978-1991 Grundschule und Gymnasium in Hamburg, Abitur 06/1991					
Studium						
10/1991-10/1998 11/1998	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg Studienabschluss, Gesamtnote: gut					
Famulaturen						
02-03/1994 09-10/1994 08-09/1995	Kardiologie: Pathologie: Unfallchirurgie:		AK St. Georg (Hamburg) Universitäts-KH Eppendorf (Hamburg) Praxis Dr. J. Schmidt (Hamburg)			
09-10/1995 02-03/1996	Gynäkologie und Ge Gynäkologie und Ge	burtshilfe: burtshilfe:	Marienkrankenhaus (Hamburg) Hospital Maternidad de Lima, Peru			
Praktisches Jahr						
10/97-02/98 02-06/1998	Innere Medizin im AK Wandsbek (Hamburg) bei Prof. Dr. V. Sill Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe, Frauenklinik Finkenau (Hamburg) bei Prof. Dr. P. Schmidt-Rhode					
06-10/1998	Chirurgie: 8 Wochen im Southmead Hospital (Bristol, GB) 8 Wochen im AK St. Georg (Hamburg) bei Prof. Dr. C. Eggers					
Tätigkeit als Ärztin						
02/1999-07/2000	Ärztin im Praktikum in der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des Albertinen-Krankenhauses (Hamburg) bei Prof. Dr. M. H. Carstensen					
11/2000-06/2001	Bereitschaftsdienste in der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des Kreis-KH Wedel (S-H) bei PD Dr. V. Pahnke					
06/2001-05/2001	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe im KH Buchholz i.d. Nordheide (NS) bei Dr. V. Müller					
Seit 06/2002	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum Kassel bei PD Dr. T. Dimpfl					
Promotion	Seit 10/1995, Betreuung: Prof. Dr. T. Löning Abteilung für Gynäkopathologie des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg					
Thema	Das Tumorsuppressorgen p16/INK4a in epithelialen Ovarial-Karzinomen - Eine Mutations-, Expressions- und Methylierungsanalyse.					
Veröffentlichung	Milde-Langosch K, Ocon E, Becker G, Löning T (1998) P16/MTS 1 inactivation in ovarian carcinomas. Int. J. Cancer, 79, 61-65					

ERKLÄRUNG

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

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

Erika Ocon

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: