

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden 75 in Paraffin eingebettete epitheliale Ovarialkarzinome (55 serös-papilläre, 8 endometrioiden, 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  $\hat{\alpha}$ -Transkript (p14<sup>ARF</sup>), 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 Basensubstitutionen 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 Prostata Tumoren wurde das Transgen durch den adenoviralen Vektor bis zu 14 Tage lang exprimiert. Wildtyp-p16 hemmte die Proliferation von Prostata-Karzinomzellen in vitro und suppressierte 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<sup>INK4a</sup> für einen geeigneten 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 hemmen (*Harada et al. 1999*). Auch im Hinblick 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 Genterapien mit sog. Standardtherapien des Ovarialkarzinoms sein, wobei geeignete Therapeutika bzw. Therapieformen für den jeweiligen Tumortyp zu identifizieren wären.