

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Expression des p16 Proteins in humanen Tumoren und Normalgeweben

Dissertation

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

vorgelegt von:

Marcus Bauer
geboren in Kiel

Hamburg

2020

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.05.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Georg Rosenberger

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Guido Sauter

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	11
2.1 Tissue Microarray (Methode)	11
2.2 Normalgewebe Tissue Microarray.....	13
2.3 Multitumor Tissue Microarray	14
2.4 Immunhistochemie	15
2.5 Statistik.....	15
3. Ergebnisse	16
3.1 p16 Expression in Normalgeweben.....	16
3.2 p16-Expression in Tumoren	21
4. Diskussion	30
5. Zusammenfassung	37
6. Abstract	38
7. Literaturverzeichnis	39
8. Danksagung	51
9. Lebenslauf	52
10. Eidesstattliche Versicherung	52

1. Einleitung

Das p16 Tumorsuppressorgen wurde erstmals 1993 beschrieben. Der Name p16 richtet sich nach dem ursprünglich beschriebenen Molekulargewicht des Proteins (Serrano, Hannon, and Beach 1993). P16 liegt auf Chromosom 9p21.3. Es kodiert für ein 15,8 kDa schweres Protein, für welches die Namen MTS-1 (Major-Tumor-Suppressor 1), INK4A (Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4A) und CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A) vergeben wurden (Serra and Chetty 2018). Von dem Protein bestehen verschiedene Splice-Varianten, welche sich insbesondere in den für die Transkription genutzten Exons unterscheiden (Serra and Chetty 2018; Lin et al. 2007). Es bestehen zumindest drei alternative Splice-Varianten, wovon eine die Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK4) und damit den Zellzyklus inhibiert (p16 γ). Das Protein p12 hemmt hingegen pRb-unabhängig das Zellwachstum (Lin et al. 2007). Das dritte alternative Transkript ist ARF, welches ein alternatives Exon 1, 20 kB oberhalb des p16 Gens, nutzt (Stone et al. 1995; Freedberg et al. 2008). Diese Splice-Variante nutzt einen alternativen „open reading frame“ (ARF), was zu einem strukturell andersartigen Protein führt als die anderen Splice-Varianten (Stone et al. 1995).

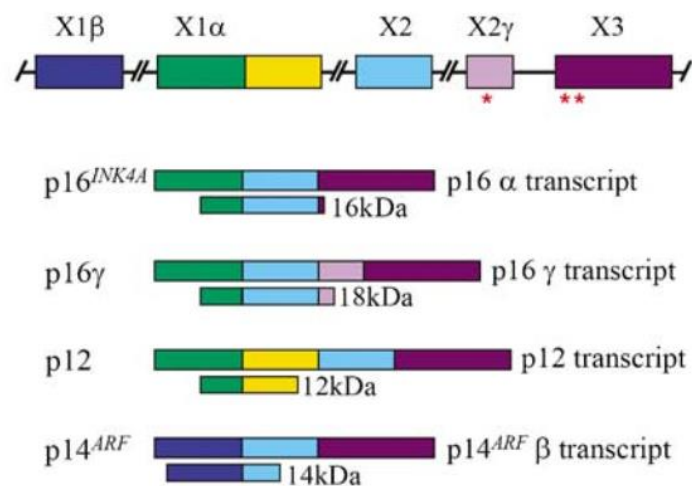


Abbildung 1 (INK4A-Gen und alternative Splice-Varianten):

* markiert das Stopp-Codon von p16 γ . ** markiert das Stopp-Codon für p16.
P14ARF nutzt ein alternatives Exon 1.

(Lin et al. 2007, größenverändert)

Die Funktion von ARF liegt in der Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 durch Interaktion und Abbau von MDM2, einem Protein, welches für die Degradierung von p53 benötigt wird (Zhang, Xiong, and Yarbrough 1998). Trotz ihrer strukturellen Unterschiedlichkeit kommen die nahe verwandten Splice-Varianten einer gemeinsamen Funktion nach, der Regulierung der Zellzyklusprogression durch die G1-Phase (Lin et al. 2007). Die Aminosäuresequenzen der alternativen Splice-Varianten von p16, einschließlich p14ARF, p12 und p16 γ , sind in Abbildung 1 und 2 dargestellt. Die Proteinstruktur des p16 Proteins CDKN2A ist in Abbildung 3 dargestellt. Das Protein besteht aus vier sogenannten „Ankyrin-Repeats“, welche jeweils aus zwei Alpha-Helices bestehen und durch eine Beta-

Schleife (sogenannter Beta-Turn) verbunden sind (Serrano, Hannon, and Beach 1993; Serra and Chetty 2018). In dieser Konfiguration fungiert eine Helix als Erkennungsstruktur und bindet über molekulare Wechselwirkungen an das Zielprotein bzw. die Ziel-DNA (Brennan and Matthews 1989; Serra and Chetty 2018). Die Interaktion von p16 mit seinen wichtigsten Partnern ist in Abbildung 4 dargestellt. P16 bindet sich an CDK4/6. Dies stört die für den Zellzyklus notwendige Bindung von CDK4/6 an Cyclin D und führt so zu einer Verminderung der Cyclin D abhängigen Phosphorylierung des pRb (Serrano, Hannon, and Beach 1993; Serra and Chetty 2018; Liggett and Sidransky 1998).

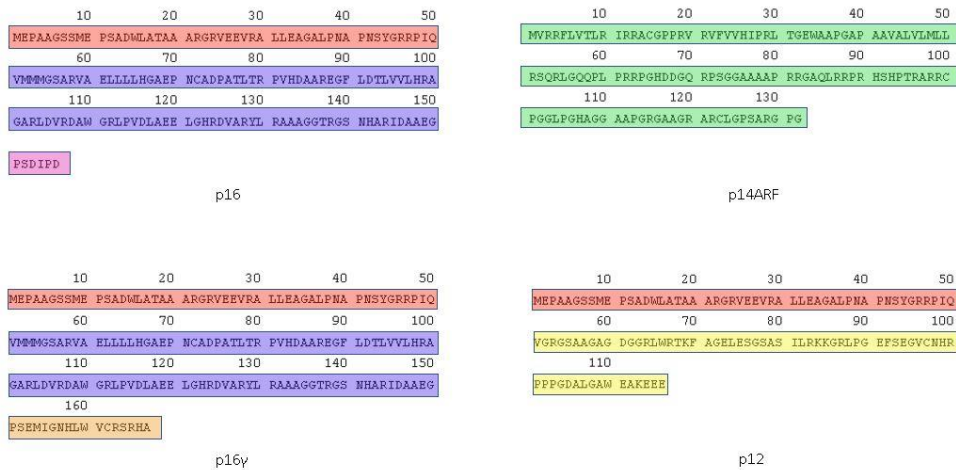


Abbildung 2 (Aminosäuresequenzen der einzelnen Splice-Varianten von p16):

In gleicher Farbe markierte Abschnitte sind jeweils homolog.

URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P42771> (Stand: 29.11.18 18:05)

URL: <https://www.uniprot.org/blast/?about=Q8N726-1> (Stand: 29.11.18 18:05)

(größenverändert, Farbmarkierung nachträglich eingefügt)

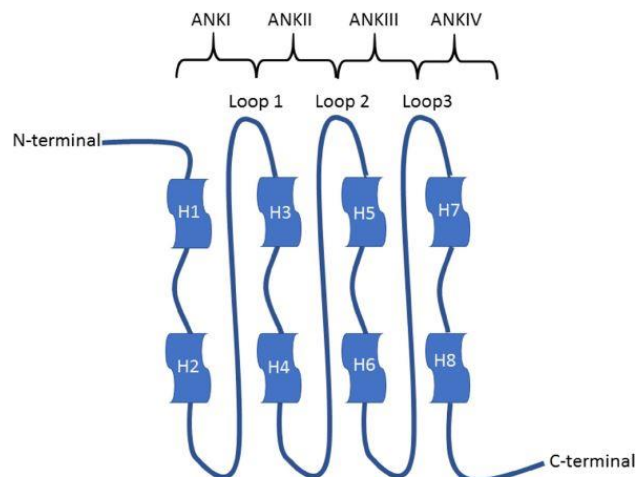


Abbildung 3 (Proteinstruktur von p16):

Jeweils zwei α -Helices (H1-8) sind durch ein β -Faltblatt (s.g. β -turn) verbunden und bilden so insgesamt 4 „Ankyrin-Repeats“. Zwischen diesen Repeats befinden sich Schleifen (loops) unterschiedlicher Länge. (Serra and Chetty 2018).

(größenverändert)

Von besonderer Bedeutung ist die Interaktion von p16 mit HPV. Die onkogene Wirkung von HPV entsteht hauptsächlich durch die Hemmung bzw. den Abbau von p53 durch das HPV-Protein E6 in Kombination mit der Inaktivierung des pRB durch das HPV-Protein E7 (Suh et al. 2014). Beide Mechanismen, die Alteration von pRB und die Störung von p53, führen zu einer kompensatorischen p16 Hochregulierung, mit der paradoxen Situation, dass ein Tumorsuppressorgen in einem Tumor nicht vermindert, sondern vermehrt vorkommt (Suh et al. 2014; Serra and Chetty 2018).

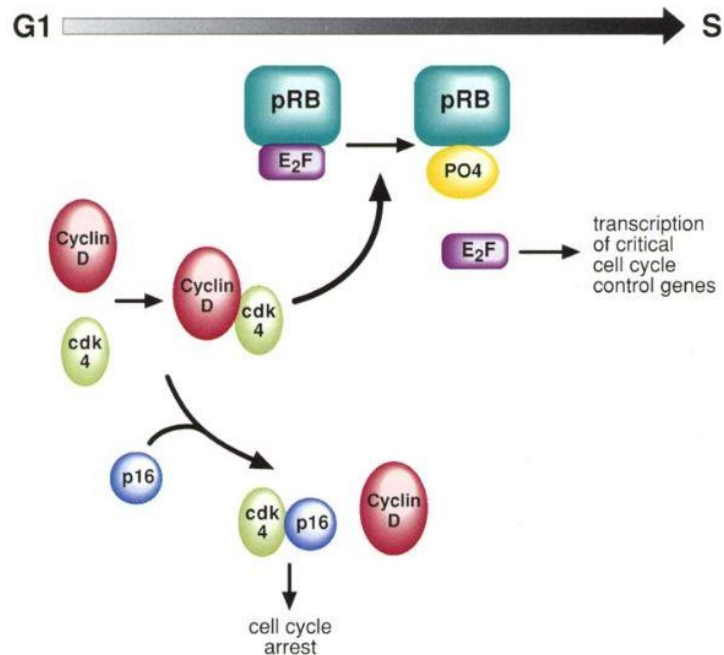


Abbildung 4 (Interaktionspartner von p16):

Die Cyclin D abhängige Phosphorylierung des pRB durch die CDK4/6 führt zu einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. E2F bindet an die Promoterregion von Zielgenen, die für eine Progression der Zelle von der G1- in die S-Phase verantwortlich sind.

P16 unterbricht diesen Mechanismus durch Proteinbindung an CDK4/6.

(Ligget and Sidransky 1998) (größenverändert)

Zum Nachweis von p16 Protein bestehen zahlreiche verschiedene Antikörper und zahlreiche verschiedene Studien haben p16 in praktisch allen menschlichen Tumorarten untersucht. Die Daten dieser Studien haben gezeigt, dass in einem Teil der Fälle eine aberrante p16 Expression vorliegt. Teilweise wurde eine p16 Überexpression in Tumoren gefunden (Romagosa et al. 2011), in anderen Studien wurde über eine p16 Herunterregulierung berichtet (Padhi et al. 2017). Abbildung 5 zeigt eine Zusammenstellung immunhistochemischer p16 Analysen in Studien, welche mindestens 20 Patienten umfassten. Die Darstellung zeigt, dass sich die einzelnen Studien in der diagnostizierten Häufigkeit einer „p16 Positivität“ stark unterscheiden. Zahlreiche Studien, welche Patientenkollektive untersuchten, von denen auch klinische Verlaufsdaten vorlagen, kamen zum Schluss, dass eine vermehrte p16 Expression mit einer ungünstigen Patientenprognose assoziiert ist. Dies fand sich beispielsweise bei

Mammakarzinomen, Astrozytomen oder Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) (Lebok et al. 2016; Steigen et al. 2008; Arifin et al. 2006). In anderen Studien fand sich eine Assoziation zwischen einer p16 Positivität und einer günstigen Prognose (Sedghizadeh et al. 2016; Tang et al. 2017; Bu et al. 2014; Gan et al. 2016; Wang et al. 2016; Wang, Wang, et al. 2017). Dies gilt insbesondere für HNO-Tumoren, bei denen die p16-Positivität als Surrogat für eine HPV-Infektion verwendet wird. Es ist bekannt, dass HPV assoziierte HNO-Tumoren sich durch eine überdurchschnittlich günstige Prognose auszeichnen (Wang, Zhang, et al. 2017; Argiris et al. 2014; Ang et al. 2010).

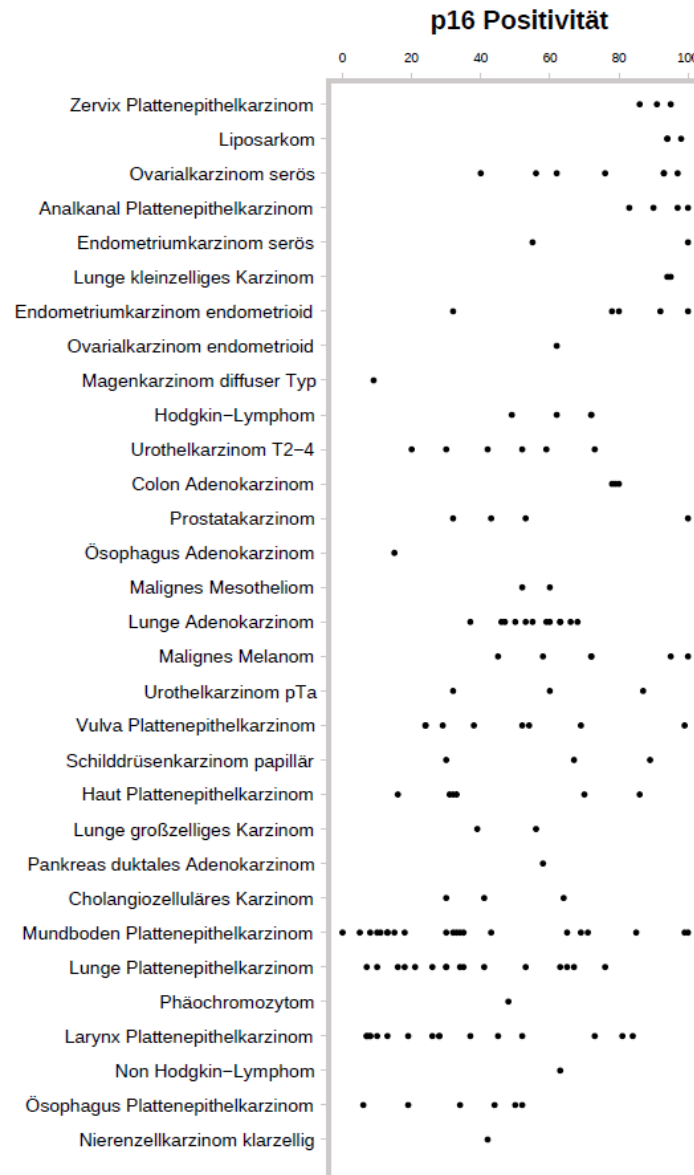


Abbildung 5 (p16 Positivität ausgewählter Tumorentitäten beschrieben in der Literatur):

Die Abbildung stellt die in vorherigen Studien gefundenen Positivitätsraten ausgewählter Tumorentitäten dar. Jeder Punkt entspricht dabei einer Studie. Auf der Y-Achse sind einige der in unserer Studie untersuchten Tumorentitäten aufgelistet. Die X-Achse beschreibt den Prozentsatz p16 positiver Fälle bezogen auf die Anzahl untersuchter Fälle.

Literaturverweise zu Abbildung 5 – Es wird jede Tumorentität aus obiger Grafik aufgelistet und die Quellen genannt. Hierbei werden die Autoren, welche die niedrigste Positivitätsrate für eine bestimmte Entität ermittelt hatten, zuerst genannt. Aufsteigend folgen die Autoren, die höhere Positivitätsraten gefunden hatten:

Zervix Plattenepithelkarzinom: (Cioffi-Lavina et al. 2010; Kanthiya et al. 2016; Gupta et al. 2010)

Liposarkom: (Thway et al. 2012; Kammerer-Jacquet et al. 2017; Kang and Horvai 2017)

Ovarialkarzinom serös: (Sui et al. 2000; Altman et al. 2013; Ferguson et al. 2015; Fujita et al. 1997; Milde-Langosch et al. 1998; O'Neill et al. 2007; Phillips, Kelly, and McCluggage 2009)

Analkanal Plattenepithelkarzinom: (Koerber et al. 2014; Gilbert et al. 2013; Meulendijks et al. 2015; Lu, El-Mofty, and Wang 2003)

Endometriumkarzinom serös: (Salvesen, Das, and Akslen 2000; Yemelyanova et al. 2009)

Lunge kleinzelliges Karzinom: (Svajdler et al. 2018; Yuan et al. 1999)

Endometriumkarzinom endometrioid: (Ignatov et al. 2008; Netzer et al. 2011; Nakashima et al. 1999; Salvesen, Das, and Akslen 2000; Stewart et al. 2009)

Ovarialkarzinom endometrioid: (Ferguson et al. 2015)

Magenkarzinom diffuser Typ: (Pinto et al. 2009)

Hodgkin-Lymphom: (Kim, Peh, and Poppema 2006; Al-Salam et al. 2013; Zhao et al. 2008, 2011)

Urothelkarzinom T2-4: (Tzai, Tsai, and Chow 2004; Yang et al. 2002; Mhawech et al. 2004; Primdahl et al. 2002; Lee et al. 2010; Shariat et al. 2004)

Colon Adenokarzinom: (King-Yin Lam, Ong, and Ho 2006; Lam, Ong, and Ho 2008; Lam et al. 2008)

Prostatakarzinom: (Zhang et al. 2006; Lee et al. 1999; Seipel et al. 2016; Seipel et al. 2014)

Ösophagus Adenokarzinom: (Hardie et al. 2005)

Malignes Mesotheliom: (Chiosea et al. 2008; Nonaka et al. 2005)

Lunge Adenokarzinom: (Leversha et al. 2003; Lingfei et al. 1998; Cheng et al. 2003; Sterlacci et al. 2011; Brambilla et al. 1999; Bian et al. 2015; Kawabuchi et al. 1999; Kratzke et al. 1996; Akin et al. 2002; Su et al. 2014; Kashiwabara et al. 1998; Huang et al. 2000)

Malignes Melanom: (Pavey et al. 2002; Talve et al. 1997; Mihic-Probst et al. 2006; Straume, Sviland, and Akslen 2000; Straume and Akslen 1997; Radhi 1999)

Urothelkarzinom pTa: (Mhaweck et al. 2004; Yang et al. 2002; Primdahl et al. 2002)

Vulva Plattenepithelkarzinom: (Nogueira et al. 2006; Fons et al. 2009; Lavorato-Rocha et al. 2013; Chan et al. 1998; Dong et al. 2015; Hay et al. 2016; Knopp et al. 2004; Riethdorf et al. 2004)

Schilddrüsenkarzinom papillär: (Zafon et al. 2008; Evans et al. 2012; Lam et al. 2007)

Haut Plattenepithelkarzinom: (Ciortea et al. 2015; Mattos, Oliveira, and Sotto 2017; Satgunaseelan et al. 2017; Beadle et al. 2013; Marinescu et al. 2016; Ramezani et al. 2016)

Lunge großzelliges Karzinom: (Sterlacci et al. 2011; Peng et al. 2005)

Pankreas duktales Adenokarzinom: (Hu et al. 1997)

Cholangiozelluläres Karzinom: (Sasaki et al. 2014; DeHaan et al. 2007; Kang, Kim, and Jang 2002)

Mundboden Plattenepithelkarzinom: (Salehinejad et al. 2014; Doxtader and Katzenstein 2012; Deng et al. 2014; Wang, Zhang, et al. 2017; Riener et al. 2017; Nemes et al. 2006; Muirhead, Hoffman, and Robinson 2006; Loeschke et al. 2016; Snietura et al. 2010; Zafereo et al. 2016; Shintani et al. 2002; Ryu et al. 2017; Chen, Kao, and Yang 2012; Laco et al. 2012; Abrahao et al. 2011; Dragomir et al. 2012; Karsai et al. 2007; Grobe et al. 2013; Yuen et al. 2002; Vallonthaiel et al. 2016; Queiroz et al. 2010)

Lunge Plattenepithelkarzinom: (Dessy et al. 2008; Gatta et al. 2012; Sterlacci et al. 2011; Leversha et al. 2003; Wang et al. 2009; Akin et al. 2002; Kashiwabara et al. 1998; Brambilla et al. 1999; Cheng et al. 2003; Doxtader and Katzenstein 2012; Kratzke et al. 1996; Huang et al. 2000; Fan et al. 2015; Su et al. 2014; Lingfei et al. 1998; Xue et al. 2002)

Phäochromozytom: (Muscarella et al. 2008)

Larynx Plattenepithelkarzinom: (Young et al. 2015; Tiefenbock-Hansson et al. 2017; Ciesielska et al. 2017; Hernandez et al. 2016; Karpathiou et al. 2016; Deng et al. 2014; Ryu et al. 2017; Kalfert et al. 2014; Allegra et al. 2013; Chernock et al. 2013; Yuen et al. 2002; Kanyilmaz et al. 2015; Meshman et al. 2017; Karsai et al. 2007; Krecicki et al. 2004; Grobe et al. 2013)

Non Hodgkin-Lymphom: (Villuendas et al. 1998)

Ösophagus Plattenepithelkarzinom: (Liu et al. 2007; Hardie et al. 2005; Chang et al. 2005; Malik et al. 2011; Taghavi et al. 2010; Takeuchi et al. 1997; Takeuchi et al. 2004)

Nierenzellkarzinom klarzellig: (Gayed et al. 2013)

Die wichtigste klinische Anwendung der immunhistochemischen p16 Untersuchung ist die Unterstützung der zytologischen und histologischen Diagnostik von neoplastischen Zervixbefunden. Eine p16 Positivität gilt als starke Evidenz für das Vorliegen einer schweren Dysplasie oder eines Karzinoms des Plattenepithels oder des Drüsenepithels der Zervix uteri (Serra and Chetty 2018; O'Neill and McCluggage 2006; Cameron et al. 2002). Die p16 Positivität, welche bei der überwiegenden Mehrzahl der Zervixkarzinomen auftritt, hat dazu geführt, dass viele Pathologen eine immunhistochemische p16 Untersuchung durchführen, wenn bei einer Manifestation eines Tumors mit unbekanntem Ausgangspunkt auch ein Zervixkarzinom zur Debatte steht. Eine p16 Positivität wird in dieser differentialdiagnostischen Situation oftmals als Argument für einen zervikalen Ursprung der Neoplasie verwendet (G. Sauter, persönliche Mitteilung). Angesichts der widersprüchlichen Angaben über die Häufigkeit der p16 Expression in Tumoren und einer gleichzeitig fehlenden Übersicht über die p16 Expression in Normalgeweben haben wir uns in dieser Arbeit die Frage gestellt, wie signifikant das diagnostische Potential der p16 Immunhistochemie in der Tumordiagnostik sein könnte. Insbesondere interessierten uns die folgenden Fragen:

1. Kann eine positive p16 Immunhistochemie ein Argument für das Vorliegen eines HPV induzierten Karzinoms sein (Beispiel: Zervix uteri oder HNO-Tumoren)?
2. Könnte die p16 Immunhistochemie in anderen diagnostischen Situationen, möglicherweise bei der Erkennung von Präkanzerosen oder von malignen Tumoren nützlich sein?

Zur Klärung dieser Frage wurden Tissue Microarrays untersucht, welche neben einer großen Zahl von verschiedenen Normalgeweben von verschiedenen Probanden auch bis zu 50 verschiedene Tumoren von 83 verschiedenen Tumortypen und Tumorsubtypen beinhaltet. Die standardisierte Untersuchung sämtlicher Gewebe unter absolut identischen Bedingungen erlaubt es in optimaler Art und Weise die Ergebnisse der einzelnen Gewebetypen miteinander zu vergleichen und Schlussfolgerungen abzuleiten, inwieweit der p16 Untersuchung eine klinische Relevanz zukommen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Tissue Microarray (Methode):

Die Tissue Microarray (TMA) Technik erlaubt die *in situ* Untersuchung von molekularen Veränderungen von bis zu 1000 verschiedenen Geweben auf einem einzigen Objektträger (Kononen et al. 1998). Bei der Herstellung von Tissue Microarrays werden aus geeigneten Gewebelöcken mit einer Hohlzylinder 0,6 mm durchmessende Zylinder entnommen und danach in einen TMA-Empfängerblock eingebracht, wo bereits im Vorfeld ein entsprechendes Loch an einer definierten Stelle des Arrays vorgefertigt wurde. Die zylindrischen Proben von bis zu 1000 Tumoren werden dann im Empfängerblock gemäß einem definierten Koordinatensystem platziert. Schnitte dieses TMA-Blocks können dann mittels *in situ* Methoden (Immunhistochemie, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) untersucht werden. Die verschiedenen Schritte der Tissue Microarray Herstellung sind in Abbildung 6 dargestellt.

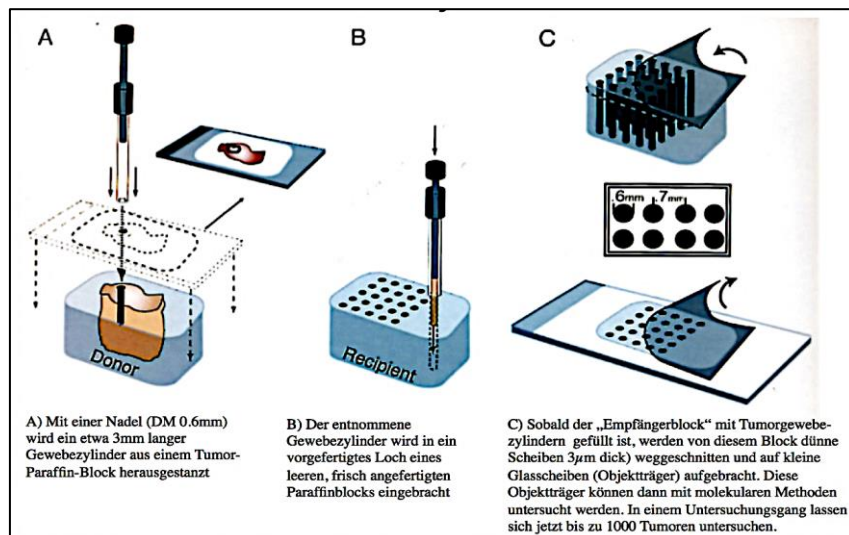
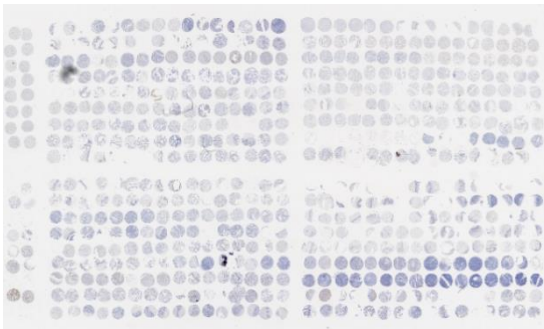


Abbildung 6 (TMA-Herstellung):

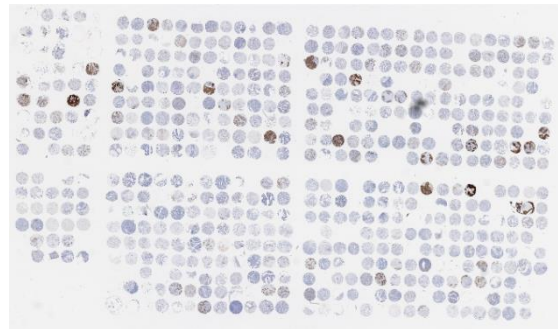
In den Abbildungen A-C ist beispielhaft die Herstellung eines TMA-Blocks dargestellt. In einem gleichartigen Verfahren entstanden auch die in dieser Studie verwendeten Multitumor Array- und Normalgewebe Array-Blöcke.

(Kononen et al. 1998)

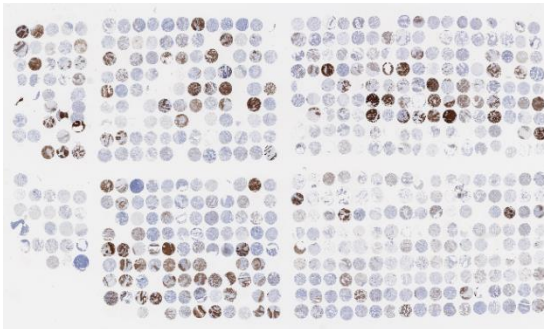
Ein wesentlicher Vorteil der Methode ist, dass sie eine perfekte Pseudonymisierung oder Anonymisierung von Patientenproben erlaubt. Die Zuordnung von Patientendaten zu einem Tumorgewebe erfolgt ausschließlich durch die bei der Herstellung des TMAs definierten Koordinaten. Damit sind die Patientendaten wirkungsvoll pseudonymisiert. Falls eine komplette Anonymisierung angestrebt wird, kann das Datenfile, welches die Zuordnung der Koordinaten zu individuellen Patienten beinhaltet, unwiderruflich gelöscht werden und der Tissue Microarray kann problemlos weiterverwendet werden. Auch die Verwendung der meist zur Pseudonymisierung verwendeten Biopsienummern, welche aber im EDV-System der Pathologie mit Patientendaten verbunden werden, wird so vermieden. Abbildung 7 zeigt eine Übersichtsaufnahme der in dieser Studie verwendeten Tissue Microarrays.



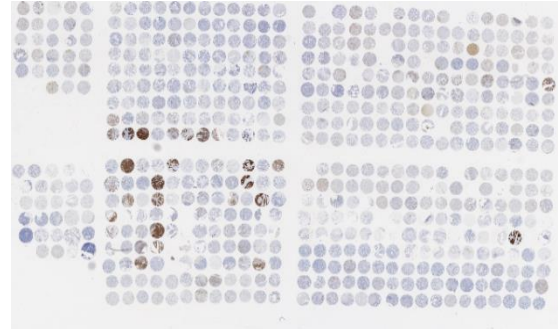
NTA



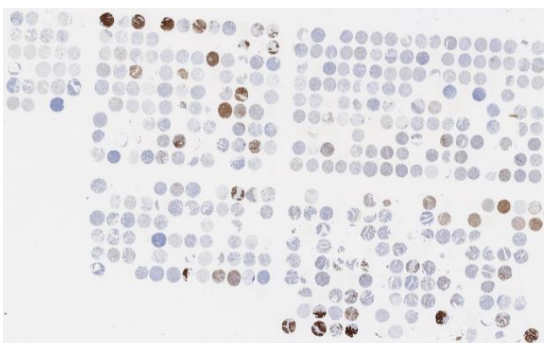
MTA 5.2 A



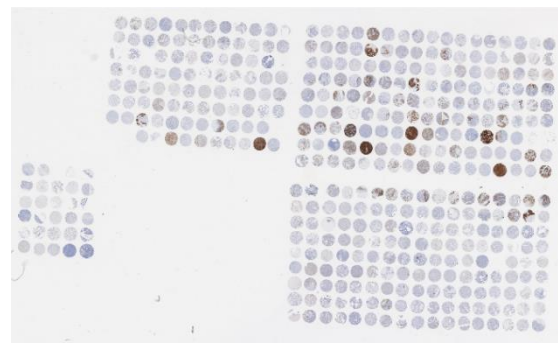
MTA 5.2 B



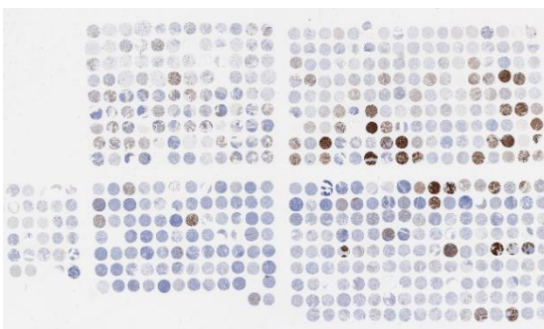
MTA 5.2 C



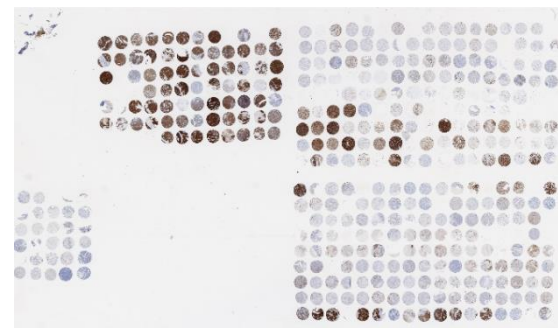
MTA 5.2 D



MTA 5.2 E



MTA 5.2 F



MTA 5.2 G

Abbildung 7 (NTA und MTA):
Darstellung des in dieser Studie verwendeten Nomalgewebe Arrays und des Multitumor Arrays.

In Abbildung 8 wird das zugehörige Koordinatensystem erklärt. Tabelle 1 zeigt ein mit dem TMA verbundenes Datenfile.

MTA 5.2 A

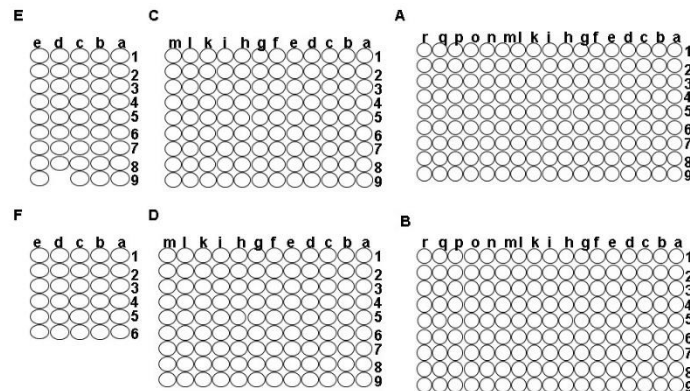


Abbildung 8 (Koordinatensystem TMA):

Dargestellt ist das Koordinatensystem des in dieser Studie verwendeten MTA 5.2 A-Blocks. Jedem Tumorspot kann eine eindeutige Koordinate zugeordnet werden.

	A	B	C	D	E
1	Array Name	Array_Part	Lokalisation	Entität_VT	
41	MTA 5.2. A 43 A		A 3f	Prostata-Ca	
42	MTA 5.2. A 44 A		A 3g	Prostata-Ca	
43	MTA 5.2. A 45 A		A 3h	Prostata-Ca	
44	MTA 5.2. A 46 A		A 3i	Prostata-Ca	
45	MTA 5.2. A 47 A		A 3k	Prostata-Ca	
46	MTA 5.2. A 48 A		A 3l	Prostata-Ca	
47	MTA 5.2. A 49 A		A 3m	Prostata-Ca	
48	MTA 5.2. A 50 A		A 3n	Prostata-Ca	
49	MTA 5.2. A 51 A		A 3o	Prostata-Ca	
50	MTA 5.2. A 52 A		A 3p	Prostata-Ca	
51	MTA 5.2. A 53 A		A 3q	Lungen-Platten-Ca	
52	MTA 5.2. A 54 A		A 3r	Lungen-Platten-Ca	
53	MTA 5.2. A 55 A		A 4a	Lungen-Platten-Ca	
54	MTA 5.2. A 56 A		A 4b	Lungen-Platten-Ca	
55	MTA 5.2. A 57 A		A 4c	Lungen-Platten-Ca	
56	MTA 5.2. A 58 A		A 4d	Lungen-Platten-Ca	
57	MTA 5.2. A 59 A		A 4e	Lungen-Platten-Ca	

Tabelle 1 (MTA 5.2 Datenfile):

Dargestellt ist das zum A-Block des MTA 5.2 gehörige Datenfile. Jedem Tumorspot wird eine eindeutige Tumorentität zugeordnet. Eine Anonymisierung bzw. Pseudonymisierung der Patienten ist gewährleistet.

2.2 Normalgewebe Tissue Microarray:

Der Normalgewebe Tissue Microarray des UKEs war mit dem Zweck hergestellt worden eine möglichst komplette Sammlung von Normalgeweben zusammen zu bringen. Um patientenindividuelle Faktoren oder auch präanalytische Gewebeschäden möglichst auszuschließen, wurden von jedem Gewebetyp Proben von acht verschiedenen Patienten verwendet. Insgesamt enthält der Normalgewebe TMA 76 verschiedene Gewebetypen von jeweils acht verschiedenen Patienten (608 Gewebeprobe). Die Zusammensetzung des Normalgewebe TMAs ist in Tabelle 2 dargestellt.

Aorta, Endothel	Harnblase, Urothel	Hoden
Aorta, Tunica Media	Plazenta im 3. Trimenon, Amnion und Chorion	Bronchus, Mukosa
Herz	Lymphknoten	Bronchus, Drüsen
quergestreifte Muskulatur	Milz	Sinus paranasales
Zunge, Muskulatur	Thymus	Lunge
Uterus, Myometrium	Tonsille	Mamma
Appendix, muskuläre Wand	Magenantrum	Endozervix
Ösophagus, muskuläre Wand	Magencorpus	Endometrium, Proliferationsphase
Magen, muskuläre Wand	Duodenum, Mukosa	Endometrium, Sekretionsphase
Ileum	Ileum, Mukosa	Tube, Mukosa
Colon, muskuläre Wand	Appendix, Mukosa	Plazenta im 1. Trimenon, Dezidua
Nierenbecken, muskuläre Wand	Colon descendens, Mukosa	Ovar, Corpus luteum
Harnblase, muskuläre Wand	Rektum, Mukosa	Ovar, Follikelzyste
Penis, Corpus spongiosum	Gallenblase, Epithel	Plazenta im 1. Trimenon
Ovar, Stroma	Leber	Plazenta im 3. Trimenon
Fett	Pankreas	Nebenniere
Haut	Parotis	Nebenschilddrüse
Haut, Haarfollikel mit Talgdrüse	Glandula Submandibularis	Schilddrüse
Lippe, Mundschleimhaut	Glandula Sublingualis	Cerebellum, Cortex Stratum molekulare
Mundhöhle	Knochenmark	Cerebellum, Cortex Stratum neuronorum
Tonsille, Oberflächenepithel	Duodenum, Brunnerdrüsen	Cerebrum, graue Substanz
Analkanal, Haut	Nierenrinde	Cerebrum, weiße Substanz
Analkanal, Schleimhaut der Übergangszone	Niere, Mark	Hypophysenhinterlappen, Infundibulum
Ektozervix	Prostata	Hypophysenvorderlappen
Nierenbecken, Endothel	Nebenhoden	

Tabelle 2 (Zusammensetzung NTA):

Darstellung der in dieser Studie untersuchten Normalgewebe des Normalgewebe Tissue Microarrays.

2.3 Multitumor Tissue Microarray:

Der Multitumor Tissue Microarray des UKEs wurde hergestellt um die Prävalenz molekularer Parameter in den wichtigsten humanen Tumortypen und Tumorsubtypen vergleichend zu untersuchen. Der verwendete Array enthielt zwischen 6 und 50 verschiedene Gewebeprobe von 83 verschiedenen Tumortypen und Tumorsubtypen. Die ursprünglich angestrebte Zahl von 50 Tumoren pro Entität konnte wegen der relativen Seltenheit einiger Tumorarten nicht komplett realisiert werden. Die Tumoren des Multitumor-Arrays sind auf sieben verschiedene TMA-Blöcke verteilt, welche jeweils zwischen 386 und 604 Tumoren enthalten. Alle TMA-Blöcke des Multitumor-Arrays enthalten auch eine

Standardkontrollsektion, welche jeweils 30 Normalgewebe von Haut, Niere, Prostata, Colon, Herz, Hirn, Pankreas, Schilddrüse, Lymphknoten und Leber beinhaltet.

2.4 Immunhistochemie:

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden 4 µm dicke Tissue Microarray Schnitte verwendet, welche alle gleichzeitig wenige Tage vor der immunhistochemischen Untersuchung hergestellt wurden. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Mausantikörper p16 (Dianova 1:350) verwendet. Die Schnitte wurden deparaffiniert und für 15 min bei 95 °C in einem pt-Linkgerät (Firma Dako) einer hitzeinduzierten Antigendemaskierungsprozedur unterworfen, bei einem pH 9-Puffer. Die Färbung erfolgte in einem Dako-Färbeautomaten (Typ: Autostainer Link 48). Die Färbungen wurden semiquantitativ von einem Pathologen (Prof. Dr. Guido Sauter) ausgewertet. Für jeden Tumor wurde der prozentuale Anteil der positiven Fälle bewertet und die Intensität der Färbung auf einer Skala von 1-3 angegeben. Zur definitiven Tumorklassifizierung wurden alle Proben aufgrund von Färbeintensität und Anteil positiver Zellen nach folgenden Kriterien in vier Gruppen eingeteilt: Negativ, schwache Färbung, mäßiggradige Färbung, starke Färbung. Die Definitionen für diese Kategorien waren wie folgt:

Negativ: Keine Färbung nachweisbar

Schwache Färbung: Färbeintensität 1+ in weniger als 70 % der Tumorzellen oder 2+ in maximal 30 % der Tumorzellen

Mäßiggradige Färbung: 1+ in mehr als 70 % der Tumorzellen oder 2+ in mehr als 30 %, aber höchstens 70 % der Tumorzellen oder 3+ Intensität in maximal 30 % der Tumorzellen.

Starke Färbung: 2+ in mehr als 70 % der Tumorzellen oder 3+ in mehr als 30 % der Tumorzellen.

2.5 Statistik:

Für die Analyse der Beziehung zwischen kategorischen Variablen wurden χ^2 -Tests bzw. Kontingenztabellenanalysen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 p16 Expression in Normalgeweben:

Eine regelmäßig auftretende kräftige p16 Expression fand sich in den untersuchten Normalgeweben lediglich in Pankreasinseln und der Adenohypophyse. Darüber hinaus war in einigen Normalgeweben eine gelegentliche und meist schwächere Färbung einzelner Zellen nachweisbar. Die Befunde in Normalgeweben waren im Einzelnen wie folgt:

Zwei Präparate aus der Mundhöhle zeigten fokal eine schwache zytoplasmatische Positivität des bedeckenden, nicht verhornenden Plattenepithels (Bild 1).

In einem Patienten fand sich eine deutliche nukleäre Positivität der obersten Zellschichten des Oberflächenepithels der Tonsille. In der Tonsille fand sich in einem Präparat auch eine teilweise deutlichere Anfärbung des Kryptenepithels. Auch einzelne epitheloide (histiozytäre) Zellen der Tonsille waren p16 positiv.

Im Plattenepithel der Analregion kam vereinzelt eine zytoplasmatische Färbung von einzelnen Plattenepithelien zur Darstellung (Bild 2).

Bei zwei Patienten fand sich im Plattenepithel des Ösophagus fokal eine schwache zytoplasmatische p16 Expression (Bild 3 und 4).

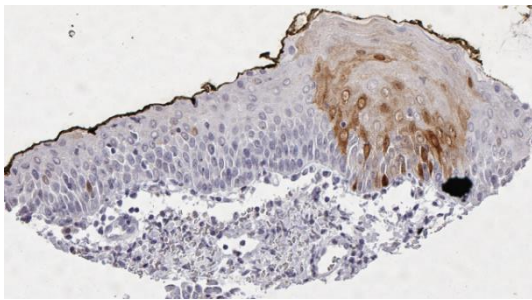


Bild 1: Präparat Mundhöhle mit schwacher zytoplasmatischer Anfärbung des Epithels.

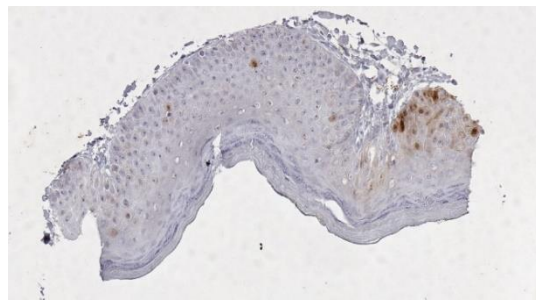


Bild 2: Analkanal mit vereinzelt zytoplasmatischer Anfärbung des Plattenepithels.

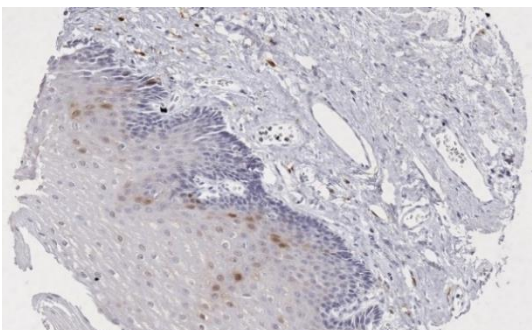


Bild 3: Ösophagus mit fokaler zytoplasmatischer Positivität des Plattenepithels.

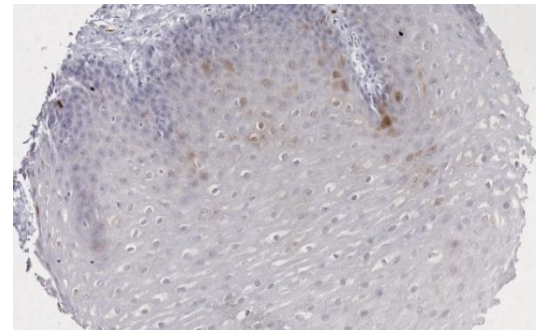


Bild 4: Ösophagus mit fokaler zytoplasmatischer Positivität des Plattenepithels.

In der Plazenta bestand fokal eine schwache Einzelzellpositivität von Chorionzellen (Bild 5).

In der Harnblase fand sich vereinzelt eine gering- bis mäßig starke Positivität von Deckzellen des Urothels und vereinzelt auch zytoplasmatisch von tiefer gelegenen Urothelien (Bild 6).

In der Milz kam es zu einer teils starken, nukleär betonten Anfärbung einzelner Zellen. Es handelt sich hier möglicherweise um Gefäße (Bild 7).

Im Thymus kam es zu einer teils kräftigen zytoplasmatischen Anfärbung von Hassal-Körperchen. Lymphozyten waren wie in allen anderen lymphatischen Organen weitestgehend negativ.

Im Magenantrum fanden sich im Bereich einer intestinalen Metaplasie gruppenartig zusammengelagerte, mäßig stark, vor allem nukleär positive Zellen. Im Magencorpus bestand teilweise eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung von tief gelegen Drüsen. Diese Art der Färbung wird bei vielen Antikörpern gesehen und stellt möglicherweise ein Artefakt dar (G. Sauter, persönliche Mitteilung).

Im Pankreas zeigten die Inselzellen eine deutliche, auch nukleäre Positivität. Vereinzelt war auch eine Anfärbung anderer Zellen erkennbar. Diese dürfte wahrscheinlich kleinen Ausführungsgängen entsprechen (Bild 8).

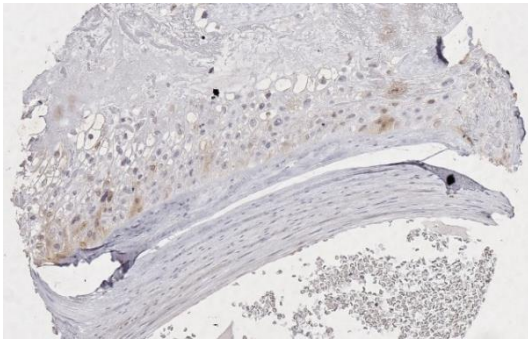


Bild 5: Plazenta mit vereinzelt p16 positiven Chorionzellen.

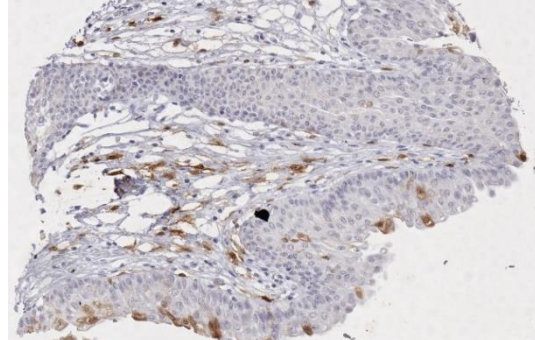


Bild 6: Harnblase mit vereinzelt positiven Deckzellen des Urothels. Teilweise stellen sich auch tiefer gelegene Urothelien p16 positiv dar.

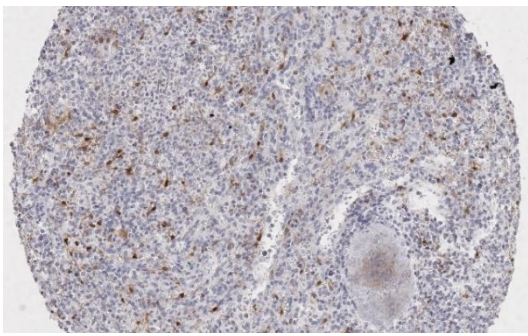


Bild 7: Milz mit teils starker nukleärer Anfärbung einzelner Zellen.

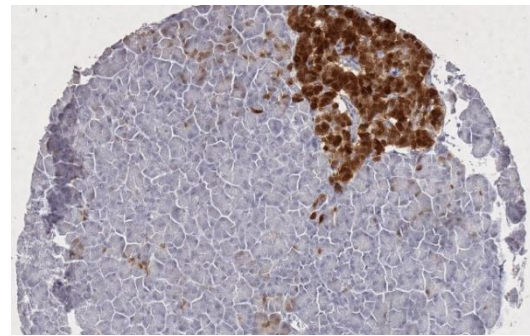


Bild 8: Pankreas mit starker nukleärer Anfärbung von Inselzellen.

In der Parotis bestand vereinzelt eine schwache zytoplasmatische, aber auch nukleäre Positivität von Ausführungsgängen (Bild 9).

In der Glandula sublingualis war vereinzelt eine positive Anfärbung von Drüsen- bzw. Gangstrukturen zu sehen (Bild 10).

In der Prostata wurden herdförmig Basalzellen mäßig stark angefärbt, dies aber nicht in allen Prostata und nicht in allen Drüsen (Bild 11).

Im Hoden fanden sich vereinzelt p16 positive Zellen (Zelltyp unklar) (Bild 12).

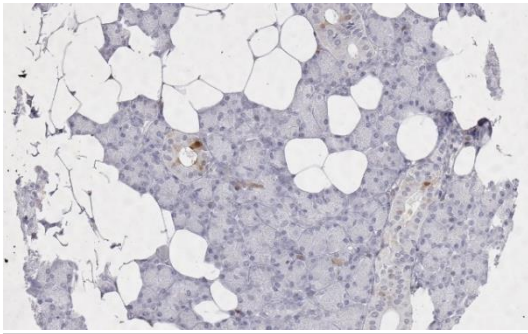


Bild 9: Parotis mit vereinzelt schwach positiv gefärbten Zellen der Ausführungsgänge.

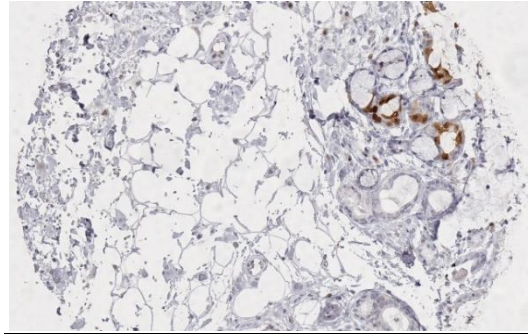


Bild 10: Glandula sublingualis mit vereinzelt positiven Drüsen- und Gangstrukturen.

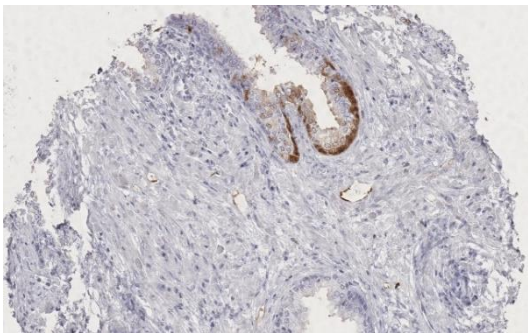


Bild 11: Prostata mit herdförmig angefärbten Basalzellen.

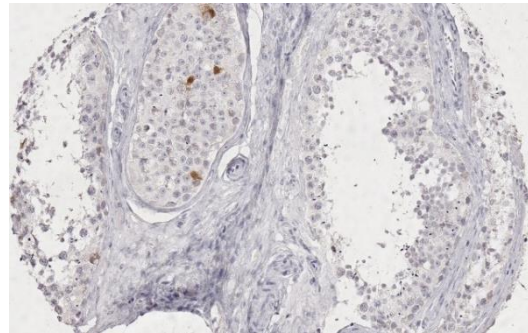


Bild 12: Hoden mit vereinzelt p16 positiven Zellen.

In der Bronchusschleimhaut eines Patienten war eine umschriebene Zellgruppe mit mäßig starker, vor allem zytoplasmatischer, teilweise aber auch nukleärer p16-Positivität darstellbar (Bild 13).

In einer Patientin war eine kräftige p16 Positivität in normalem / atrophem Brustdrüsengewebe nachweisbar (Bild 14).

Es fanden sich zwei Fälle von Endometrium in Proliferationsphase mit kleinen und größeren Gruppen von Zellen mit überwiegend zytoplasmatischer, aber auch nukleärer p16 Positivität (Bild 15). Auch im sekretorischen Endometrium fand sich in einer Patientin eine kräftig positive Drüse und in diesem Fall auch im Stroma reichlich nukleär positive Zellen (Bild 16).

In der Dezidua der Plazenta im ersten Trimenon waren vereinzelt schwach positive Zellen darstellbar (Bild 17).

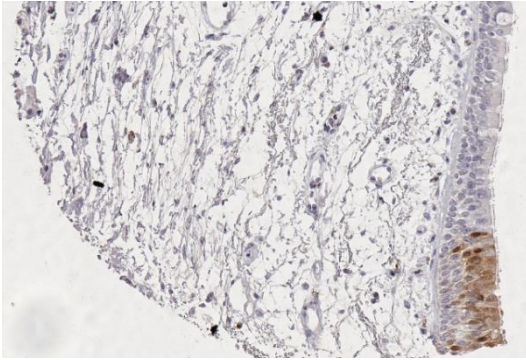


Bild 13: Bronchusschleimhaut mit umschriebener p16 positiver (zytoplasmatisch und nukleär) Zellgruppe.

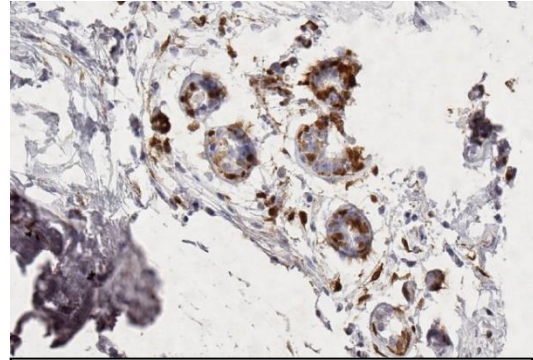


Bild 14: Mamma mit kräftiger p16 Anfärbung von Gefäßen.

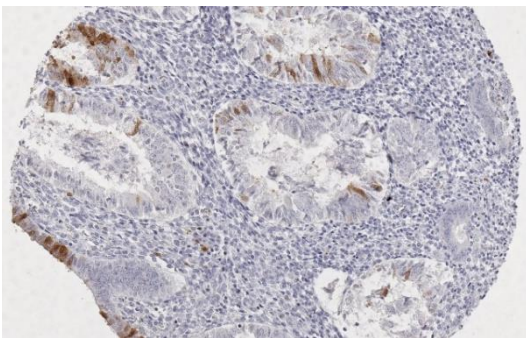


Bild 15: Endometrium (Proliferationsphase) mit Gruppen von zytoplasmatisch, aber teils auch nukleärer p16 angefärbten Zellen.

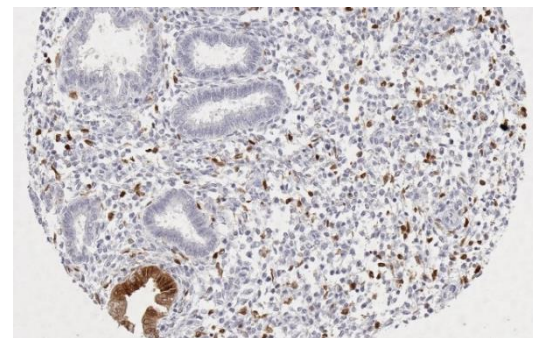


Bild 16: Endometrium (Sekretionsphase) mit einer kräftig p16 angefärbten Drüse und reichlich nukleär positiven Stromazellen.

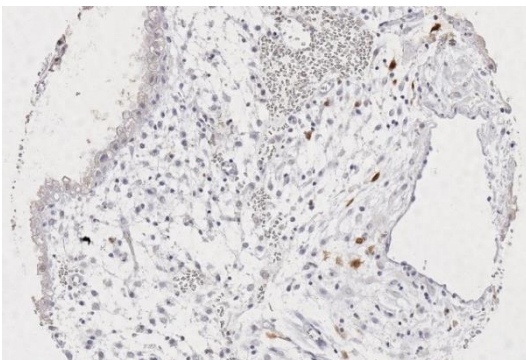


Bild 17: Plazenta (1. Trimenon) mit vereinzelt schwach positiven Zellen.

In unmittelbarer Umgebung des Corpus luteum des Ovars fand sich stellenweise eine sehr starke nukleäre Positivität von kleinen Gefäßen (nachgewiesen in zwei Fällen, Bild 18 und 19). In der Plazenta im ersten Trimenon gab es in einem Fall eine sehr kräftige, nukleäre und zytoplasmatische Positivität einzelner Zellen (Typ unklar) (Bild 20). In der reifen Plazenta fanden sich teilweise deutlich angefärbte plazentare Stromazellen (Bild 21).

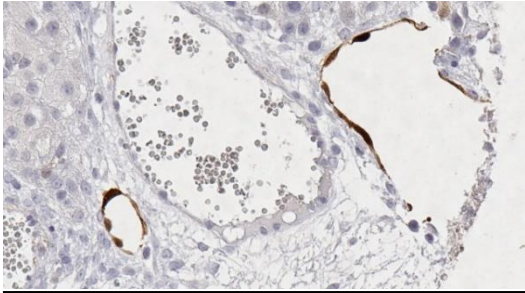


Bild 18: Umgebung des Corpus luteum mit sehr starker Gefäßanfärbung.

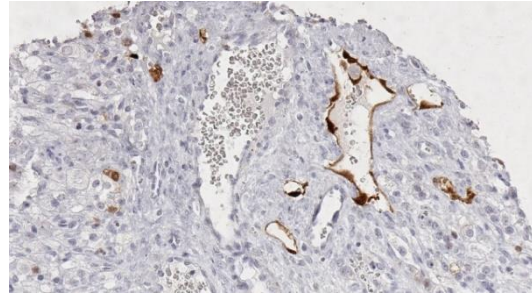


Bild 19: Umgebung des Corpus luteum mit sehr starker

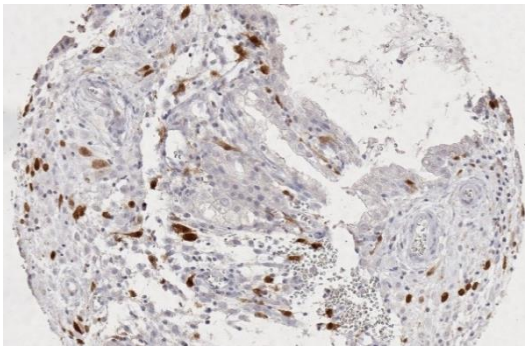


Bild 20: Plazenta (1. Trimenon) mit sehr starker zytoplasmatischer und nukleärer Positivität vereinzelter Zellen.

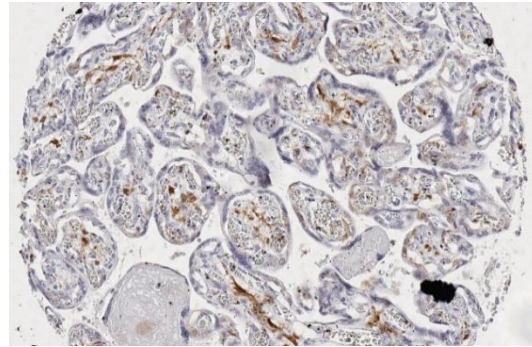


Bild 21: Plazenta (3. Trimenon) mit teilweise deutlich angefärbten Stromazellen.

Das Nebennierenrindengewebe zeigte manchmal eine geringe p16 Positivität in zusammenliegenden Zellgruppen (Bild 22).

Die Adenohypophyse zeigte generell eine starke nukleäre und zytoplasmatische Färbung, welche oft alle Zellen eines TMA-Spots betraf. Arealweise waren aber auch einzelne Drüsenzellen ausgespart. Diese könnten einem besonderen Zelltyp entsprechen (Bild 23).

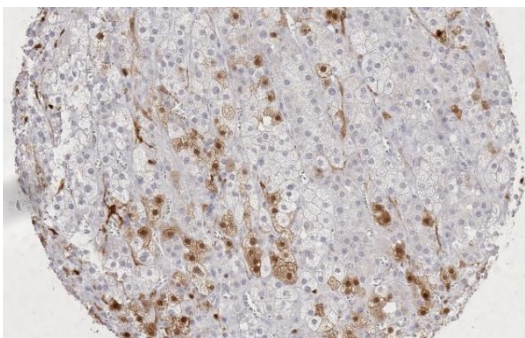


Bild 22: Nebennierenrinde mit geringer p16 Positivität in zusammenliegenden Zellgruppen.

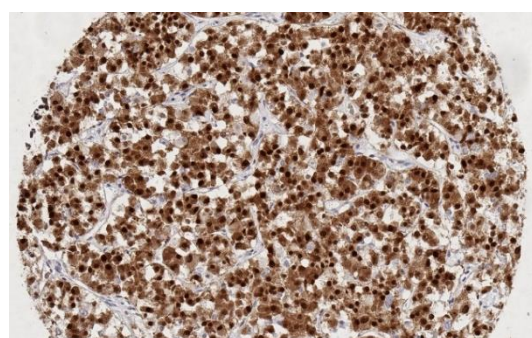


Bild 23: Adenohypophyse mit starker nukleärer und zytoplasmatischer p16 Färbung.

3.2 p16-Expression in Tumoren:

Unsere immunhistochemische Untersuchung ergab in vielen verschiedenen Tumortypen häufig eine signifikante p16 Positivität.

Die Befunde waren insgesamt sehr heterogen. Dies ist unter anderem anhand einer Gruppe von unmittelbar nebeneinander liegenden Ovarialkarzinomen erkennbar. Bild 24 zeigt links ein komplett negatives Karzinom, in der Mitte ein Karzinom mit sehr starker zytoplasmatischer Anfärbung ohne eindeutige Beteiligung von Kernen. Der Tumor rechts zeigt eine mäßig starke zytoplasmatische Anfärbung bei deutlich prominenter Anfärbung von zumindest einem großen Teil der Kerne.

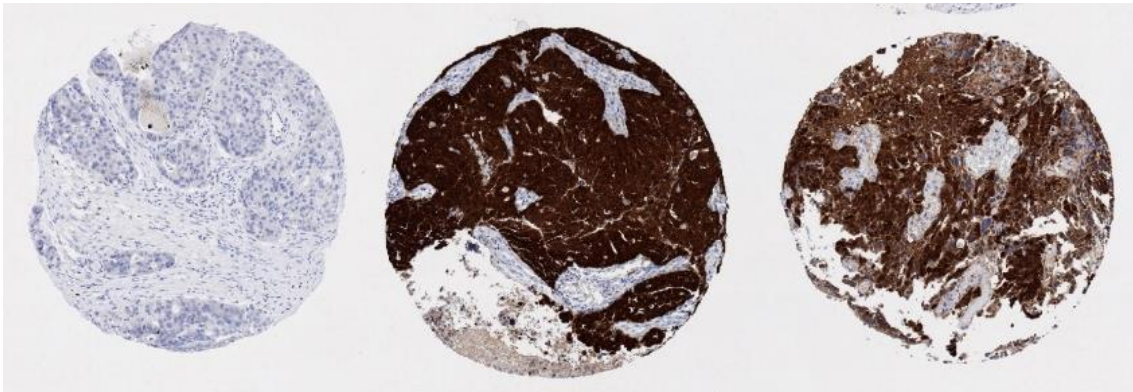


Bild 24: Gruppe nebeneinander liegender Ovarialkarzinome. Links stellt sich ein p16 negatives Karzinom dar. Das Karzinom in der Mitte zeigt eine starke zytoplasmatische Anfärbung ohne eindeutige Beteiligung von Kernen. Das Karzinom rechts ist mäßig zytoplasmatisch p16 positiv, bei Anfärbung eines Großteils der Kerne.

Eine Reihe von Tumoren zeigten besondere, auffällige Färbemuster. Bei endometrioiden Endometriumkarzinomen gab es Beispiele von unterschiedlicher p16 Anfärbung in glandulär und plattenepithelial differenzierten Anteilen. Ein Beispiel ist in Bild 25 dargestellt, wo die soliden Areale eine deutliche nukleär betonte p16 Anfärbung zeigen, während die drüsigen Anteile negativ bleiben.

In einigen Tumorentitäten kam eine besondere „mikrofokale“ p16 Anfärbung vor. In derartig angefärbten Tumoren fanden sich in Umgebung p16 negativer Tumorzellen unregelmäßig begrenzte Gruppen von unterschiedlich stark p16 angefärbten Zellen, wobei die Färbung zytoplasmatisch oder nukleär dominiert sein kann. Zu den Tumorarten mit gelegentlichem oder häufigem Auftreten derartiger Fälle gehören beispielsweise Colonadenome, das endometrioide Endometriumkarzinom, Plattenepithelkarzinome der Haut oder pleomorphe Adenome.

Bei einigen Tumortypen kam es zu einem noch „mikrofokaleren“ Bild mit vereinzelt „masernartig“ eingestreuten positiven Einzelzellen mit teils auch prominent positiven Kernen. Dieser Befund fand sich beispielsweise in chromophoben Nierenzellkarzinomen (Bild 26) und in Phäochromozytomen.

Bei einzelnen Plattenepithelkarzinom der Haut oder des Mundbodens kam es zu einer ausschließlichen Anfärbung der Basalschicht mit schwacher Intensität (Bild 27).

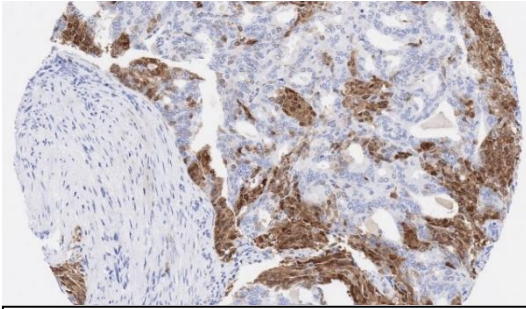


Bild 25: Endometrioides Endometriumkarzinom mit heterogener p16 Anfärbung und ausschließlicher p16 Positivität von plattenepithelial-differenzierten Tumoranteilen.

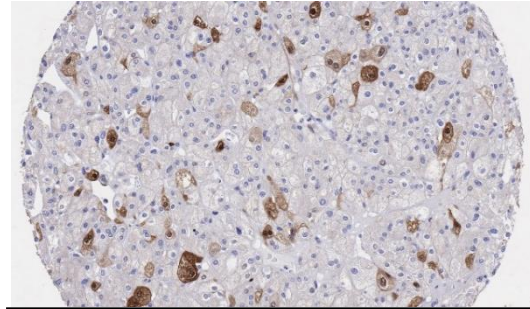


Bild 26: Chromophobes Nierenzellkarzinom mit „buntem Bild“ der p16 Anfärbung. Immer wieder zeigen Einzelzellen eine geringe, mäßig starke oder auch starke p16 Positivität.

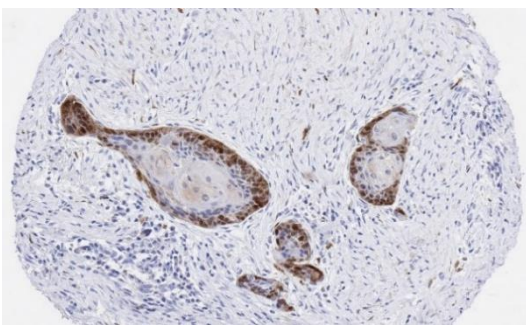


Bild 27: Mundbodenkarzinom mit Beschränkung der p16 Färbung auf die peripheren Zellen invasiver Tumorzellverbände.

In einzelnen Basaliomen fand sich eine p16 Positivität vorwiegend im Zentrum der Zellnester, während die basalen Zellschichten weitgehend negativ waren. In anderen Basaliomen war das Muster umgekehrt mit besonders prominenter Anfärbung von basalen Zellen.

Liposarkome waren sehr häufig und sehr kräftig positiv. In einzelnen Fällen wurde auch ausdifferenziertes Fettgewebe deutlich p16 positiv gefärbt (Bild 28).

Bei kleinzelligen Tumoren aller Art war p16 häufig kräftig exprimiert (Bild 29).

Bei biphasischen Tumoren fanden sich nicht selten besonders auffällige Färbemuster. Beim Malignen Mesotheliom waren häufig nur einzelne wenige Zellen p16 positiv. In anderen Fällen bestand eine starke, auch nukleäre Anfärbung in allen Zellen. In einzelnen Fällen gab es auch eine kräftige Anfärbung von spindelzelligen Elementen, während epitheliale Anteile p16 negativ waren (Bild 30). Phylloides Tumoren zeigten oft eine teils kräftige, nukleär betonte Positivität im Stromaanteil. Das Epithel war zwar manchmal auch positiv angefärbt, aber deutlich weniger häufig und auch weniger stark. Ein Beispiel hierfür ist in Bild 31 dargestellt.

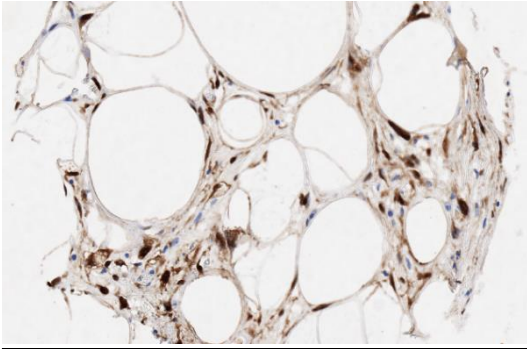


Bild 28: Hochdifferenziertes Liposarkom mit Anfärbung atypischer Lipozyten.

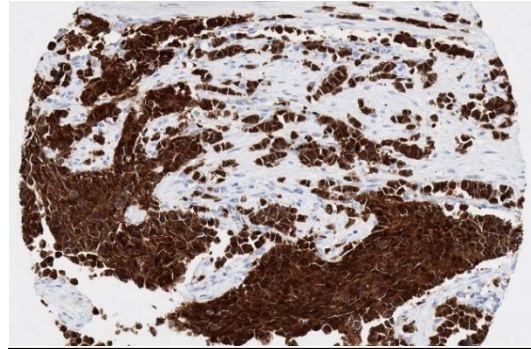


Bild 29: Kleinzelliges Neuroendokrines Karzinom der Harnblase mit intensiver, nukleär betonter p16 Anfärbung.

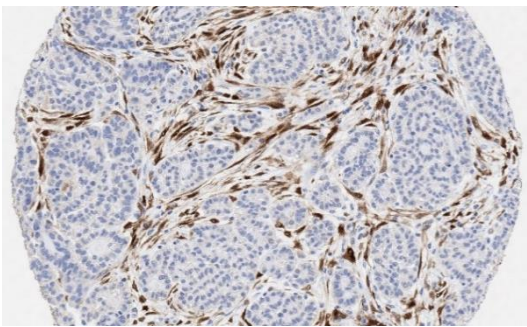


Bild 30: Malignes Mesotheliom mit eindeutiger Anfärbung von spindeligen Stromazellen. Die epitheloiden Tumorteile sind p16 negativ.

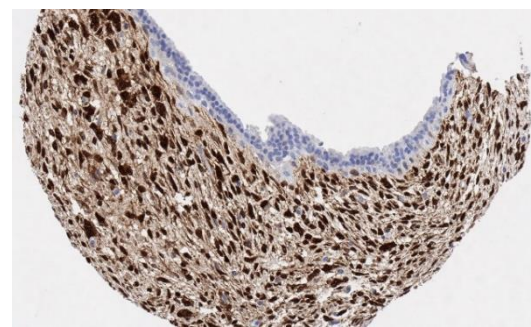


Bild 31: Phylloides tumor der Mamma mit starker nukleärer p16 Anfärbung in der mesenchymalen Komponente. Das Epithel ist p16 negativ.

In mehreren Tumorarten fanden sich auch Fälle mit einer auffälligen p16 Anfärbung in nicht-neoplastischen Stromazellen. Dies fand sich auch bei Tumoren mit kompletter p16 Negativität in neoplastischen Epithelien. Beispiele hierfür fanden sich bei Karzinomen des Ovars (muzinös) (Bild 32), dem Mammakarzinom (tubulär) (Bild 33), Onkozytomen (Bild 34), Plattenepithelkarzinomen der Haut, Schilddrüsenadenomen und dem Larynxkarzinom.

Vereinzelt färbten sich auch Tumorgefäße kräftig an. Dies war unter anderem in einem pTa Harnblasentumor (Bild 35) und in einem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom (Bild 36) nachweisbar.

Die Befunderhebung war bei Pankreaskarzinomen und bei Melanomen erschwert. Bei Pankreastumoren (Karzinome und Neuroendokrine Tumoren) wird die Beurteilung dadurch erschwert, dass manchmal stark p16 positive Inseln zur Darstellung kommen, wie beispielsweise in Bild 37 dargestellt.

Normale Pankreasinseln sind physiologisch p16 positiv. Die Beurteilung von Melanomen ist wegen brauner Pigmente schwierig. Diese Pigmente können nur schwer von einer positiven immunhistochemischen Färbung unterschieden werden. Mindestens ein Melanom zeigte aber eine kräftige, kernbetonte Anfärbung in fast allen Zellen.

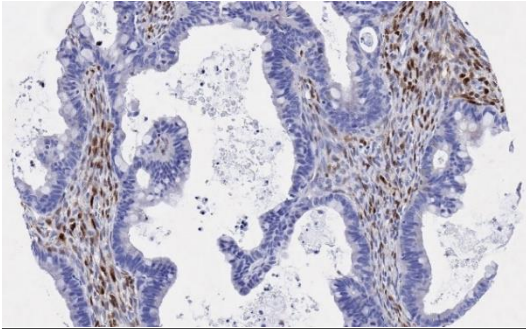


Bild 32: Muzinöses Ovarialkarzinom mit p16 Positivität im Tumorstroma. Das neoplastische Epithel zeigt keine Anfärbung.

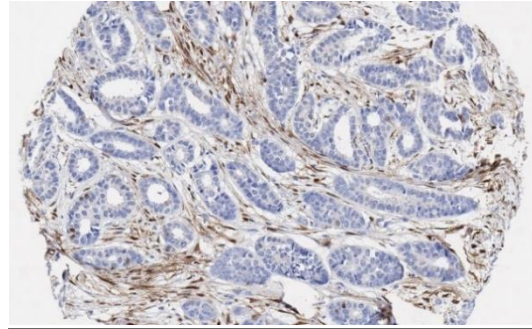


Bild 33: Tubuläres Mammakarzinom (p16 negativ) mit p16 Anfärbung von spindeligen Stromazellen.

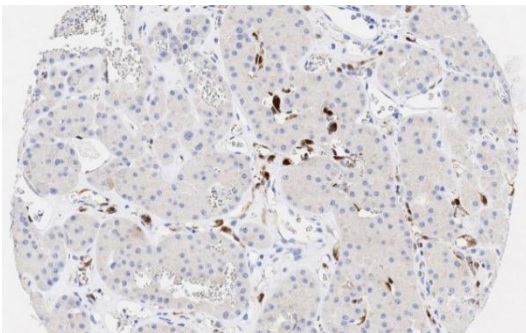


Bild 34: Onkozytom der Niere (p16 negativ) mit eindeutig positiven kleinen Gefäßen.

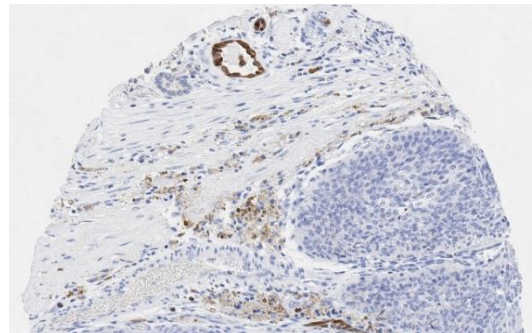


Bild 35: Urothelkarzinom (pTa) mit kräftig p16 angefärbtem Gefäß.

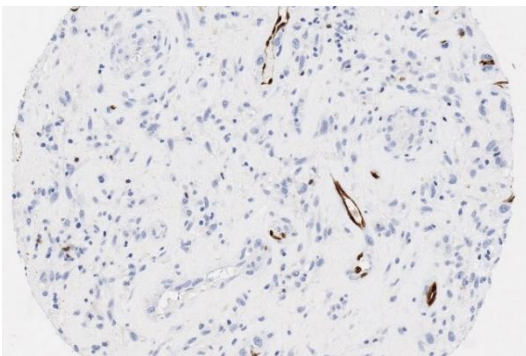


Bild 36: Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (p16 negativ) mit kräftiger Anfärbung von kleinen Gefäßen.

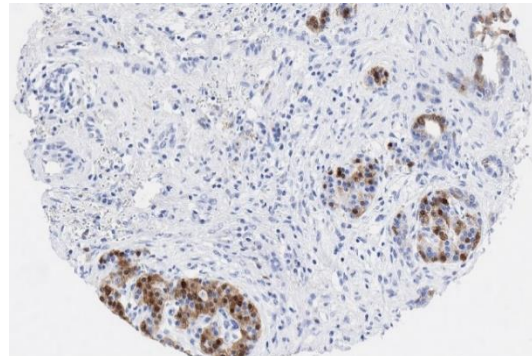


Bild 37: Duktales Adenokarzinom des Pankreas mit kräftig p16 gefärbten Inselzellen.

Zumindest mehrere Fälle mit einer zumindest mäßig starken Färbung fanden sich in 70 von 83 untersuchten Tumorentitäten. Die Ergebnisse zu den einzelnen Tumortypen unserer Studie sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

		p16 im Tumor						
		zytoplasmatisch und/oder nukleär						
	Entität	n auf TMA	n	neg. %	schw. %	md. %	stark %	pos. %
Haut	Pilomatrixom	35	27	11,1	74,1	11,1	3,7	88,9
	Basaliom	48	42	14,3	57,1	21,4	7,1	85,7
	Benigner Naevus	29	24	8,3	20,8	12,5	58,3	91,7
	Plattenepithelkarzinom	50	42	73,8	14,3	2,4	9,5	26,2
	Malignes Melanom	48	43	62,8	16,3	4,7	16,3	37,2
	Merkellzellkarzinom	46	42	2,4	2,4	14,3	81,0	97,6
	Larynx Plattenepithelkarzinom	50	47	80,9	8,5	6,4	4,3	19,1
Atemwege	Mundboden Plattenepithelkarzinom	50	43	74,4	11,6	0,0	14,0	25,6
	Lunge Plattenepithelkarzinom	50	24	75,0	12,5	0,0	12,5	25,0
	Lunge großzelliges Karzinom	31	23	73,9	8,7	4,3	13,0	26,1
	Lunge Adenokarzinom	50	38	60,5	18,4	5,3	15,8	39,5
	Lunge bronchioalv. Karzinom	6	6	83,3	16,7	0,0	0,0	16,7
	Lunge kleinzelliges Karzinom	20	15	33,3	6,7	0,0	60,0	66,7
	Malignes Mesotheliom	48	37	59,5	32,4	2,7	5,4	40,5
	Parotis Pleomorphes Adenom	50	45	17,8	75,6	4,4	2,2	82,2
	Parotis Warthin Tumor	49	44	27,3	65,9	4,5	2,3	72,7
	Speicheldrüse Basalzelladenom	15	15	26,7	73,3	0,0	0,0	73,3

		p16 im Tumor						
		zytoplasmatisch und/oder nukleär						
	Entität	n auf TMA	n	neg. %	schw. %	md. %	stark %	pos. %
gynäkologisch	Vagina Plattenepithelkarzinom	48	31	48,4	3,2	6,5	41,9	51,6
	Vulva Plattenepithelkarzinom	50	31	64,5	6,5	12,9	16,1	35,5
	Zervix Plattenepithelkarzinom	50	43	16,3	4,7	20,9	58,1	83,7
	Zervix Adenokarzinom	50	37	45,9	32,4	10,8	10,8	54,1
	Endometriumkarzinom endometrioid	50	44	40,9	43,2	4,5	11,4	59,1
	Endometriumkarzinom serös	50	34	32,4	23,5	8,8	35,3	67,6
	Uterus Stromasarkom	12	12	83,3	8,3	0,0	8,3	16,7
	Karzinom	48	45	31,1	17,8	11,1	40,0	68,9
	Ovarialkarzinom endometrioid	37	29	41,4	13,8	17,2	27,6	58,6
	Ovarialkarzinom serös	50	42	23,8	7,1	16,7	52,4	76,2
	Ovarialkarzinom muzinös	26	23	87,0	4,3	4,3	4,3	13,0
	Brennertumor	9	7	14,3	57,1	14,3	14,3	85,7
	Mammakarzinom duktal	46	26	61,5	15,4	11,5	11,5	38,5
	Mammakarzinom lobulär	43	32	53,1	40,6	3,1	3,1	46,9
	Mammakarzinom medullär	15	10	20,0	20,0	0,0	60,0	80,0
	Mammakarzinom tubulär	18	8	87,5	0,0	12,5	0,0	12,5
	Mammakarzinom muzinös	22	16	81,3	12,5	6,3	0,0	18,8
	Phylloides tumor der Mamma	50	38	81,6	18,4	0,0	0,0	18,4
gastrointestinal	Colonadenom, low grade	50	26	69,2	26,9	3,8	0,0	30,8
	Colonadenom, high grade	50	23	39,1	39,1	17,4	4,3	60,9
	Colon Adenokarzinom	50	35	54,3	34,3	8,6	2,9	45,7

		p16 im Tumor						
		zytoplasmatisch und/oder nukleär						
	Entität	n auf TMA	n	neg. %	schw. %	md. %	stark %	pos. %
	Dünndarm Adenokarzinom	10	5	80,0	20,0	0,0	0,0	20,0
	Magenkarzinom diffuser Typ	50	32	46,9	28,1	12,5	12,5	53,1
	Magenkarzinom intestinaler Typ	50	30	33,3	40,0	6,7	20,0	66,7
	Ösophagus Adenokarzinom	50	34	58,8	17,6	8,8	14,7	41,2
	Ösophagus Plattenepithelkarzinom	49	34	91,2	8,8	0,0	0,0	8,8
	Analkanal Plattenepithelkarzinom	50	25	28,0	4,0	8,0	60,0	72,0
	Cholangiozelluläres Karzinom	50	31	74,2	19,4	6,5	0,0	25,8
	Hepatozelluläres Karzinom	50	45	97,8	0,0	2,2	0,0	2,2
	Pankreas duktales Adenokarzinom	50	27	74,1	18,5	0,0	7,4	25,9
	Pankreas/Papille Adenokarzinom	30	16	68,8	0,0	12,5	18,8	31,3
	Pankreas Neuroendokriner Tumor	49	28	67,9	17,9	7,1	7,1	32,1
	Gastrointestinaler Stromatumor	50	39	51,3	28,2	2,6	17,9	48,7
urogenital	Urothelkarzinom pTa	50	42	64,3	21,4	7,1	7,1	35,7
	Urothelkarzinom T2-4	50	47	53,2	8,5	8,5	29,8	46,8
	Harnblasenkarzinom kleinzellig	18	17	0,0	0,0	23,5	76,5	100
	Nierenzellkarzinom klarzellig	50	46	95,7	4,3	0,0	0,0	4,3
	Nierenzellkarzinom papillär	50	43	83,7	11,6	2,3	2,3	16,3
	Nierenzellkarzinom chromophob	50	43	86,0	14,0	0,0	0,0	14,0
	Onkozytom	50	44	90,9	9,1	0,0	0,0	9,1
	Prostatakarzinom	49	41	58,5	31,7	9,8	0,0	41,5
Prostatakarzinom kleinzellig	17	11	9,1	9,1	36,4	45,5	90,9	

		p16 im Tumor						
		zytoplasmatisch und/oder nukleär						
	Entität	n auf TMA	n	neg. %	schw. %	md. %	stark %	pos. %
	Seminom	50	46	91,3	8,7	0,0	0,0	8,7
	embryonales Karzinom (Hoden)	50	40	92,5	7,5	0,0	0,0	7,5
	Dottersacktumor	50	33	87,9	12,1	0,0	0,0	12,1
	Teratom	50	22	81,8	13,6	0,0	4,5	18,2
endokrin	Schilddrüsenadenom	50	47	100	0,0	0,0	0,0	0,0
	Schilddrüsenkarzinom papillär	50	47	68,1	27,7	2,1	2,1	31,9
	Schilddrüsenkarzinom follikulär	49	47	91,5	6,4	2,1	0,0	8,5
	Schilddrüsenkarzinom medullär	50	42	85,7	14,3	0,0	0,0	14,3
	Schilddrüsenkarzinom anaplastisch	26	23	73,9	0,0	8,7	17,4	26,1
	Nebennieren-Adenom	50	47	72,3	25,5	2,1	0,0	27,7
	Nebennieren-Karzinom	26	14	35,7	21,4	28,6	14,3	64,3
	Phäochromozytom	50	33	75,8	12,1	12,1	0,0	24,2
	Neuroendokriner Tumor (NET)	50	27	59,3	29,6	7,4	3,7	40,7
hämatologisch	Hodgkin-Lymphom	45	30	50,0	3,3	23,3	23,3	50,0
	Non Hodgkin-Lymphom	48	43	83,7	11,6	2,3	2,3	16,3
	Thymom	29	27	74,1	18,5	3,7	3,7	25,9
Bindegewebe	Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	45	44	9,1	72,7	18,2	0,0	90,9
	Granularzelltumor	30	24	62,5	25,0	8,3	4,2	37,5
	Leiomyom	50	47	80,9	10,6	6,4	2,1	19,1
	Leiomyosarkom	49	47	55,3	10,6	10,6	23,4	44,7
	Liposarkom	49	40	22,5	12,5	5,0	60,0	77,5

		p16 im Tumor						
		zytoplasmatisch und/oder nukleär						
	Entität	n auf TMA	n	neg. %	schw. %	md. %	stark %	pos. %
	Angiosarkom	32	24	37,5	50,0	4,2	8,3	62,5
Ossät	Osteosarkom	25	20	35,0	10,0	10,0	45,0	65,0
	Chondrosarkom	25	10	80,0	10,0	10,0	0,0	20,0

Tabellen 3 (p16 Positivität):

Die Tabellen zeigen die Positivitätsraten der in unserer Studie untersuchten Tumorentitäten. Angegeben ist sowohl die Stärke (schwach, moderat, stark), als auch die Lokalisation der Expression (nukleär, zytoplasmatisch). Der Phylloides tumor zeigte als einzige Entität eine kräftige p16 Stromaanfärbung.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden 76 verschiedene Normalgewebe von jeweils acht verschiedenen Patienten sowie 3442 menschliche Tumoren immunhistochemisch auf die Expression von p16 untersucht. Die Untersuchung identifiziert eine Reihe von Tumoren und auch von Normalgeweben mit einer kräftigen p16-Expression, während andere Gewebe in unserer Untersuchung häufig oder immer p16 negativ waren.

Für das Verständnis unserer Daten und ihre relative Bedeutung im Vergleich zur vorbestehenden Literatur ist es von Bedeutung, dass immunhistochemische Verfahren, insbesondere unter Verwendung der sogenannten „Hellfeld-Technik“, keine exakte Quantifizierung der Proteinexpression zulassen. Die für eine immunhistochemische Untersuchung definierten Bedingungen (Auswahl des Antikörpers, Affinität des Antikörpers, Konzentration des Antikörpers, Art und Intensität der Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung) definieren lediglich ein verhältnismäßig kleines diagnostisches Fenster, in dem eine semiquantitative Proteinquantifizierung möglich ist. Es ist keinesfalls davon auszugehen (auch angesichts der zellbiologischen Bedeutung von p16), dass p16 negative Tumoren und Gewebe kein p16 Protein exprimieren. Es ist lediglich davon auszugehen, dass die Konzentration von p16 in diesen Zellen so gering ist, dass wir das Protein mit dem gewählten Verfahren nicht darstellen können. Übersteigt die p16-Expression einen gewissen Schwellenwert – welcher durch unsere Bedingungen definiert ist – wird die immunhistochemische Methode zu einem positiven Färbeargebnis führen. In einem begrenzten Bereich oberhalb der Detektionsschwelle steigt die Färbeintensität proportional zur p16 Proteinmenge in der Zelle an, bis zu einem Punkt, bei dem eine maximale Anfärbung besteht und der Gewebespot komplett dunkelbraun imponiert. Ab diesem Punkt könnte eine weitere Erhöhung der p16 Konzentrationen in den Zellen zu keiner wahrnehmbaren weiteren Verstärkung des Signals führen. Der Spot bleibt in diesem Expressionsbereich auch bei nochmals zehnfach höherer p16 Konzentration mehr oder weniger gleich braun.

Angesichts dieser Eigenheit immunhistochemischer Untersuchungen sind unsere Ergebnisse mit denjenigen aus anderen Studien, bei denen andere Antikörper, andere Schwellenwerte und andere Färbeprotokolle verwendet wurden, nur bedingt vergleichbar. Eine maximale – fast 100 %ige – Vergleichbarkeit besteht allerdings innerhalb unserer Studie, da sämtliche Gewebe unter absolut identischen Bedingungen gefärbt und auch beurteilt wurden.

Die Möglichkeit, eine dermaßen umfassende Untersuchung von hunderten von Tumoren unter hochstandardisierten Bedingungen durchzuführen, ist im Wesentlichen durch die Tissue Microarray Methode entstanden. Die vor 20 Jahren erstmals publizierte Methode erlaubt eine rasche und effiziente Untersuchung sehr großer Tumorkollektive (Kononen et al. 1998). Der kleine Durchmesser des pro Patienten zur Untersuchung gelangenden Gewebes (0,6 mm) wird gelegentlich als Nachteil der TMA-Methode wahrgenommen, da kleinherdige fokale Veränderungen in einem Tumor bei Untersuchung einer so

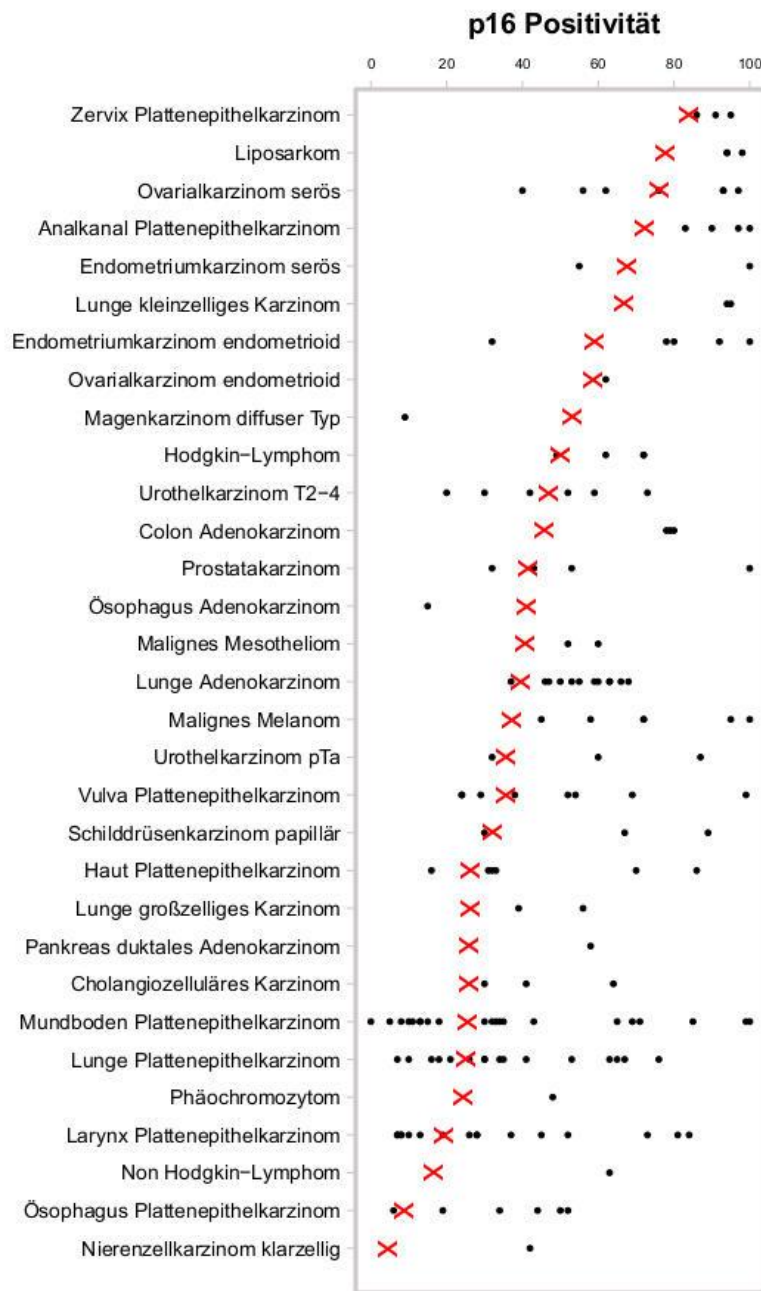
kleinen Tumormenge kaum nachgewiesen werden können (Camp, Neumeister, and Rimm 2008). Zahlreiche Studien haben in den ersten Jahren nach der Erstbeschreibung der TMA-Technik deswegen die Frage untersucht, ob möglicherweise die Verwendung mehrerer Gewebeproben pro Tumor zu einer besseren Repräsentativität eines TMAs führen könnte (Engellau et al. 2001; Rosen et al. 2004; Rubin et al. 2002). Tatsächlich haben Studien gezeigt, dass die Verwendung von drei bis vier Gewebeslots aus einem bestimmten Tumorblock die Übereinstimmung der Befunde zwischen einem TMA und dem für die Entnahme verwendeten Tumorblock steigern (Camp, Charette, and Rimm 2000; Hoos et al. 2001; Torhorst et al. 2001). Dies ist möglicherweise aber nicht von einer relevanten Bedeutung, da gerade bei größeren Tumoren, die bei der histologischen Untersuchung nicht komplett eingebettet werden, aber trotzdem zur Herstellung von zehn Gewebelöcken oder mehr führen, auch nicht davon ausgegangen werden kann, dass ein kleinherdiger Befund in einem zufällig ausgewählten Gewebelöck bzw. in einem davon angefertigten Großschnitt nachgewiesen werden kann. Der Nachteil, dass fokale Befunde eines heterogenen Tumors in einem TMA übersehen werden können, wird offensichtlich durch andere Vorteile der TMA-Methode mehr als kompensiert. Der größte Vorteil der TMA-Technik ist die maximal denkbare Standardisierung der experimentellen Abläufe und auch der Interpretation der Befunde. Alle Präparate von jedem einzelnen Tumor können gleichzeitig an einem Tag in einem einzigen Experiment in den identischen Reagenzien für absolut identische Zeiten bei identischen Temperaturen gefärbt werden. Auch das Schnittalter kann für eine ganze Studie fast identisch sein. Das Schnittalter, die Zeit zwischen der Herstellung eines Paraffinschnittes und seiner immunhistochemischen Färbung, ist ein wichtiger Parameter für die immunhistochemische Färbequalität. Mirlacher et al. konnten ebenso wie andere Untersucher zeigen, dass die Färbeintensität für zahlreiche Antikörper bereits nach ein bis zwei Wochen Lagerung eines Paraffinschnittes markant geringer wird (Mirlacher et al. 2004). Für unsere Studie wurden insgesamt acht TMA-Schnitte innerhalb einer Stunde hergestellt und zwei Tage später gleichzeitig immunhistochemisch gefärbt. Eine derartige Standardisierung der Lagerungszeit eines Paraffinschnittes wäre bei einer Großschnittuntersuchung an 3000-4000 Präparaten rein logistisch kaum machbar. Auch die Auswertung durch den Pathologen ist bei TMA Studien beispiellos standardisiert, weil von jedem Tumor die gleiche Gewebemenge vorliegt und der Pathologe die gesamte Untersuchung in wenigen Stunden durchführen kann. Für das aktuelle Projekt dauerte die Auswertung der 3442 Tumoren weniger als fünf Stunden. Wenn die Beurteilung der histologischen Färbungen in einer ununterbrochenen Sitzung durchgeführt wird, bleiben dem Pathologen die selbstgewählten und subjektiven Kriterien für die Definition einer 1+, 2+ oder 3+ Positivität bestmöglich im Gedächtnis, sodass davon auszugehen ist, dass die Kriterien so standardisiert, wie bei einem subjektiven Auswertungsverfahren möglich, angewendet werden.

Die Untersuchung von Normalgewebe zeigte verschiedene interessante Befunde. Mit der Adenohypophyse und den Langerhansinseln des Pankreas konnten zwei Gewebetypen identifiziert werden, welche die eindeutig stärkste p16-Expression in Normalgeweben aufweisen. Beide Organe wurden in früheren

Studien bereits als p16 positiv beschrieben (Nielsen et al. 1999; Seemann et al. 2001). Doch lässt sich aus diesen Studien die besondere, herausragende Rolle von p16 in diesen Organen/Zelltypen im Vergleich zu anderen Geweben nicht ohne Weiteres entnehmen. Die Ursache für die besondere Rolle von p16 in diesen Gewebetypen ist unklar. In einigen Studien wurde über eine aberrante Methylierung des p16 Gens in der Hypophyse berichtet. Dies scheint über eine Herunterregulierung von p16 an der Tumorgenese beteiligt zu sein (Woloschak, Yu, and Post 1997; Simpson et al. 1999; Jaffrain-Rea et al. 1999). Eine schwächere und weniger regelmäßig erkennbare Expression von p16 fand sich in verschiedenen Geweben, unter anderem in verschiedenen Plattenepithelien, im gastrointestinalen Epithel und auch im Endometrium. Auffällig war in diesen Geweben, dass eine mit unseren Protokollen nachweisbare p16 Positivität häufig in zusammenliegenden Zellgruppen auftrat. Entsprechende Beispiele sind in den Bildern 13,15 und 22 für Bronchusschleimhaut, Endometrium und Nebennierenrinde gezeigt. Die Ursache für diese auffällige Anordnung p16 positiver Zellen ist nicht klar. Möglicherweise handelt es sich um kleine Zellklone, welche temporär p16 exprimieren, entweder als Reaktion auf einen besonderen „zellulären Stress“, oder die sich in einer besonderen Zellzyklus-Phase befinden. Gegen letztere Annahme spricht allerdings die Tatsache, dass derartig auffällige Gruppierungen in diesen Geweben in der Ki-67 Färbung nicht auftraten (G. Sauter, persönliche Mitteilung). Dafür, dass p16 unter besonderen Bedingungen in normalem Gewebe deutlich hochreguliert werden kann, sprechen auch die Befunde in kleinen Gefäßen in der Umgebung von Corpora lutea im Ovar. Hier wurde in zwei von acht auswertbaren Fällen eine kräftige p16 Positivität in kleinen Gefäßen gefunden (Bild 18 und 19). Die Tatsache, dass eine p16-Expression in allen anderen Gefäßen aller anderer Normalgewebe nie gesehen wurde, könnte für eine Corpus luteum spezifische Besonderheit sprechen. Das Corpus luteum des Ovars ist für die Fortpflanzung des Menschen von immenser Bedeutung, da dieses Organ für den Erhalt des Schwangerschaftsprodukts unerlässlich ist. Die kräftige Expression des immunsuppressiven PD-L1 Proteins im Corpus luteum ist ein weiteres Indiz dafür, dass in diesem Organ besondere Schutzmechanismen gegen mögliche schädigende Einflüsse bestehen. Da das Corpus luteum im Falle einer Schwangerschaft auch schnell wachsen muss, wäre es denkbar, dass die p16-Expression in Gefäßen mit einer besonders aktiven Angiogenese in Zusammenhang stehen könnte. Die p16 Expression in Corpus luteum Gefäßen wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Auch in Tumorgewebeproben fanden sich gelegentlich kräftige p16 Anfärbungen von nicht neoplastischen Zellpopulationen. Hierzu gehören z.B. der Nachweis eines kräftig p16 positiven Gefäßes in einem pTa Urothelkarzinom (Bild 35) oder der Nachweis von p16 Protein in nicht-neoplastischem Stroma von Ovarialkarzinomen und Endometriumtumoren. Insgesamt machen diese Befunde deutlich, dass p16 im Rahmen einer physiologischen Adaptation an bestimmte Gegebenheiten eines nicht-neoplastischen Gewebes deutlich hochreguliert werden kann.

Im Vergleich zu Normalgeweben fand sich in Tumoren generell eine wesentlich häufigere und deutlich intensivere p16 Anfärbung. Während die meisten Normalgewebe keine oder kaum eine p16 Anfärbung zeigten, fanden sich in den

meisten Tumorarten zumindest einige stark positive Fälle, häufig auch viele. Die Daten unserer Studie sind im Vergleich mit der früher publizierten Literatur in Abbildung 9 dargestellt.



Tabellen 3 (p16 Positivität):
 Die Tabellen zeigen die Positivitätsraten der in unserer Studie untersuchten Tumorentitäten. Angegeben ist sowohl die Stärke (schwach, moderat, stark), als auch die Lokalisation der Expression (nukleär, zytoplasmatisch). Der Phylloidestumor zeigte als einzige Entität eine kräftige p16 Stromaanfärbung.

Literaturverweise zu Abbildung 9: siehe Abbildung 5

Diese Darstellung macht den Wert unserer Untersuchung besonders deutlich. In vielen Tumorarten bestehen in der Literatur erhebliche Abweichungen in der Häufigkeit der beschriebenen p16 Expression. Beispielsweise variiert die berichtete p16 Positivität im Plattenepithelkarzinom des Mundbodens von 5 % bis 100 %, im Plattenepithelkarzinom der Lunge von 7 % bis 76 % und im invasiven Urothelkarzinom von 20 % bis 73 %. Wie bereits einleitend ausgeführt, kann nicht belegt werden, dass unsere Art der p16 Bestimmung im Vergleich zu früheren Untersuchungen überlegen oder minderwertig ist. Der besondere Wert unserer Untersuchung liegt aber darin, dass sie eine umfassend vergleichende Darstellung der Häufigkeit der p16 Expression in verschiedenen Tumoren gestattet. Unsere Daten machen deutlich, dass die größten p16 Positivitätsraten in kleinzelligen Neuroendokrinen Karzinomen jeglichen Ursprungs bestehen. Angesichts der bekannten Assoziation der p16 Positivität mit HPV-Befall ist es nicht erstaunlich, dass HPV-induzierte Karzinome, wie Karzinome der Zervix, Analkarzinome und Vulvakarzinome ebenfalls besonders häufig stark p16 positiv waren. Die besonders hohe Rate p16 positiver Fälle beim serösen Ovarialkarzinom passt zu früheren Studien, in denen bei diesem Tumor ebenfalls hohe Häufigkeiten der p16 Positivität beschrieben wurde (Phillips, Kelly, and McCluggage 2009; O'Neill et al. 2007; Milde-Langosch et al. 1998). In diesem Tumor kommt es auch besonders häufig zu einer p53 Alteration (Cancer Genome Atlas Research 2011), sodass dieser Mechanismus für die reaktive p16 Überexpression in diesem Tumortyp sorgen könnte. Andere wichtige Tumoren mit häufiger und häufig auch starker p16 Positivität waren verschiedene Sarkome (Osteosarkom, Liposarkom, Leiomyosarkom), das Karzinosarkom (Maligner Müllerscher Misch tumor des Endometriums), das seröse Endometriumkarzinom, Magenkarzinome oder das medulläre Mammakarzinom. Einige dieser Tumoren wurden bereits früher als häufig p16 positiv beschrieben (Kang and Horvai 2017; Yemelyanova et al. 2009). Am anderen Ende des p16 Spektrums identifiziert unsere Arbeit Schilddrüsenkarzinome (mit Ausnahme des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms), Hodentumoren und Mammakarzinome mit besonders seltener p16 Positivität (unter den von uns gewählten Bedingungen). Wie bereits ausgeführt, sind die Unterschiede in der p16 Expression zwischen Tumoren mit häufiger und seltener p16 Positivität aber nicht ausgeprägt genug, um die p16 Färbung für die Unterscheidung verschiedener Tumortypen zu nutzen.

Aus den dargestellten Daten ergibt sich, dass die diagnostische Anwendung der p16 Immunhistochemie nicht darin liegt bestimmte Tumortypen voneinander zu unterscheiden, sondern vielmehr darin, bei der Unterscheidung benigne vs. maligne zu helfen. Tatsächlich ist die Sicherung der Diagnose Zervixneoplasie bzw. eines HPV-Befalls der Zervix die am meisten etablierte klinische Anwendung der p16 Immunhistochemie. In unserer Studie waren 36 von 43 Plattenepithelkarzinome der Zervix p16 positiv (83,7 %). Dies liegt im Bereich früherer Studien, wo beim Zervixkarzinom Positivitätsraten um 90 % gefunden worden waren (Kanthiya et al. 2016; Cioffi-Lavina et al. 2010; Gupta et al. 2010). Die HPV-Infektion führt bekanntermaßen zu einer kräftigen p16 Überexpression. Die vom HPV-Virus initiierten Proteine E6 und E7 führen über eine Kompromittierung der normalen p53- und Retinoblastomgen-Funktion zu einer überschießenden reaktiven p16 Expression. Diese ist dermaßen stark

ausgeprägt, dass sie – weitgehend unabhängig von den gewählten immunhistochemischen Protokollen – meist klar nachgewiesen werden kann (O'Neill and McCluggage 2006; Keating et al. 2001; Sano et al. 1998). Auch für die Abgrenzung eines Liposarkoms von normalem Fettgewebe wurde die p16 Färbung vorgeschlagen (Thway et al. 2012; He et al. 2009). Tatsächlich waren von unseren Liposarkomen 77,5 % positiv, wobei 60 % eine kräftige Anfärbung zeigten. Zumindest in einem Fall ließ sich in einer von uns untersuchten Probe auch eine kräftige p16 Positivität in differenzierten Lipozyten nachweisen, welche ohne diesen immunhistochemischen Befund nicht ohne Weiteres als atypisch hätten beurteilt werden können (Bild 28).

Die ausgedehnten Untersuchungen unserer Studie erlauben es, Rückschlüsse auf mögliche zusätzliche Anwendungen der p16 Immunhistochemie in der Diagnostik zu ziehen. Da beim nichtinvasiven Urothelkarzinom (pTa G1/2) 64 % der Tumoren komplett negativ waren, ist zunächst nicht davon auszugehen, dass subtile Urothelveränderungen, wie Dysplasien, durch die p16 Immunhistochemie sicherer diagnostiziert werden könnten, zumal eine gewisse p16 Färbung auch im Normalgewebe, in Deckzellen und darunter liegenden Urothelien, gefunden werden konnte. Auch Nierentumoren waren, wie normales Nierengewebe, meistens p16 negativ, sodass auch bei Fällen mit sehr kleinen tumorverdächtigen Arealen die p16 Immunhistochemie kaum in der sicheren Diagnose eines malignen Nierentumors in einer Nierenbiopsie weiterhelfen dürfte. Allerdings waren 117 von 132 Nierentumoren und 24 von 41 Prostatakzinome p16 negativ, aber 14 von 47 der invasiven Urothelkarzinome stark positiv (29,8 %). Eine p16 Positivität in einem wenig differenzierten Tumor in der Niere oder im Blasenboden könnte somit ein Argument für eine urotheliale Neoplasie darstellen und gegen die – lokalisationsbedingt – differentialdiagnostisch zu erwägenden Prostata- oder Nierenkarzinome sprechen. Angesichts der hohen Häufigkeit der p16 Positivität in muskelinvasiven Urothelkarzinomen kann die p16 Immunhistochemie aber sicher nicht bei weiblichen Patienten für die gelegentlich klinisch relevante Frage einer Abgrenzung eines in die Harnblase einwachsenden Zervixkarzinoms herangezogen werden.

Interessanterweise waren alle 47 untersuchten Schilddrüsenadenome p16 negativ. Angesichts einer p16 Positivität in immerhin 32 % der papillären und beinahe 10 % der follikulären Schilddrüsenkarzinome erscheint es sinnvoll zu prüfen, inwieweit die p16 Immunhistochemie in der schwierigen Malignitätsdiagnostik der Schilddrüse weiterhelfen könnte. Die höhere Rate p16 positiver Fälle beim Nebennierenkarzinom (64,3 % positiv) im Vergleich zum Nebennierenadenom (27,7 % positiv) ist aufgrund der geringen Fallzahl im Bereich der Karzinome (n = 14) von eingeschränkter Aussagekraft. Dennoch könnte der Befund auf eine diagnostische Nutzbarkeit der p16 Expression bei Nebennierentumoren hindeuten. Auch im Bereich „glattemuskuläre Tumoren“ könnte die p16 Immunhistochemie nützlich sein. Hier waren von den gutartigen Leiomyomen nur 19,1 % der Fälle positiv, wovon keiner eine nukleär dominante Färbung zeigte und nur ein Tumor eine als „kräftig“ interpretierte Färbung. Dies kontrastiert zu den 23,4 % stark positiven Leiomyosarkomen bzw. 17 % von Tumoren mit kräftiger, nukleärer Positivität. Eine diagnostische Applikation der p16 Immunhistochemie bei der Diagnose von Leiomyosarkomen wurde

tatsächlich bereits früher von Bodner-Adler et al. vorgeschlagen. In dieser Studie wurde in 57 % von 21 Leiomyosarkomen, aber nur in 12 % von 26 Leiomyomen eine signifikante p16 Expression beschrieben (Bodner-Adler et al. 2005). Insgesamt zeigen die Daten unserer Studie, dass p16 in einer Vielzahl verschiedener Tumoren teilweise kräftig exprimiert wird und somit für eine zuverlässige Bestimmung des Tumorursprungs nicht besonders geeignet ist. Dies trifft insbesondere auf Tumoren des uro-ano-genitalen Traktes (Urothel-, Cervix-, Vaginal-, Analkarzinom) zu. Die wesentlich häufigere und kräftigere Expression von p16 in Tumoren als in Normalgeweben spricht für eine wesentliche tumorbiologische Rolle von p16. Die wesentliche praktische Rolle der p16 Immunhistochemie liegt demzufolge in der Malignitätsdiagnostik. Die auch in nicht-neoplastischen Geweben sporadisch auftretende p16 Hochregulierung ist ein zusätzliches Argument für die große biologische Bedeutung dieses Proteins.

5. Zusammenfassung

P16 ist ein Tumorsuppressorgen, welches in zahlreichen verschiedenen Tumorarten kräftig exprimiert wird. Frühere Studien haben für viele Tumorarten stark unterschiedliche Ergebnisse zur Prävalenz einer gesteigerten oder verminderten p16 Expression gefunden. Eine erhöhte bzw. verminderte p16 Expression wurde in mehreren Tumortypen als prognostisch relevant beschrieben. Bisher gab es keine vergleichenden Studien, bei denen ein standardisierter Ansatz zur vergleichenden immunhistochemischen Untersuchung an verschiedenen menschlichen Tumoren und Normalgeweben verwendet wurde. Deshalb wurde in dieser Studie ein Normalgewebe-Array bestehend aus 76 verschiedenen Geweben von jeweils acht verschiedenen Patienten und ein Multitumor-Array bestehend aus bis zu 50 Tumoren von 83 verschiedenen Tumortypen und Tumorsubtypen immunhistochemisch auf p16 untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Normalgewebe meistens p16 negativ sind oder nur fokal eine verhältnismäßig geringe p16 Anfärbung zeigen. Die mit Abstand kräftigste p16 Expression fand sich in normalen Pankreasinseln und in der Adenohypophyse. Bei Tumoren fand sich eine deutlich größere Häufigkeit der p16 Positivität. Besonders häufig fand sich eine starke p16 Positivität in kleinzelligen Karzinomen (Harnblase: 76,5 %, Lunge: 60 %, Prostata: 45,5 %, Merkelzellkarzinom der Haut: 81 %), in medullären Mammakarzinomen (60 %), Liposarkomen (60 %), Plattenepithelkarzinomen des Analkanales (60 %), Plattenepithelkarzinomen der Zervix (58,1 %), serösen Ovarialkarzinomen (52,4 %), Osteosarkomen (45 %), Plattenepithelkarzinomen der Vagina (41,9 %), Karzinosarkomen des Endometriums (40 %), serösen Endometriumkarzinomen (35,3 %), muskelinvasiven Urothelkarzinomen (29,8 %) und endometrioiden Ovarialkarzinomen (27,6 %). Eine p16 Anfärbung war hingegen selten in Nierenzellkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Phäochromozytomen, Prostatakarzinomen oder Keimzelltumoren des Hodens (0 % Zellen mit starker Anfärbung). Der Vergleich der Befunde von Tumoren mit Normalgeweben bzw. zwischen gutartigen und bösartigen Tumoren ergibt mehrere Bereiche, in denen die p16 Immunhistochemie potentiell diagnostisch genutzt werden könnte. Dies beinhaltet die Identifikation von Neoplasien der Zervix, wo die Immunhistochemie heute bereits routinemäßig zur Anwendung kommt, aber auch die Unterscheidung Liposarkom vs. normales Fettgewebe oder Leiomyosarkom vs. Leiomyom. Die Daten der Untersuchung zeigen auch, dass Normalgewebe- und Multitumor Tissue Microarrays hervorragend dafür geeignet sind, die diagnostische Bedeutung eines Antikörpers zu evaluieren.

6. Abstract

P16 is a tumor suppressor, which is expressed strongly in several tumor types. Previous studies showed very different results regarding the prevalence of increased or decreased p16 expression levels in many of those. An increased or decreased p16 expression was found relevant for prognosis in several tumor types. So far there have been no comparative studies, in which a standardized approach for comparative immunohistochemistry analysis of human tumors and normal tissue was used.

In this study a normal tissue array containing 76 different tissue types of eight patients each and a multi tumor-array containing up to 50 tumors of 83 different tumor types and subtypes each were analyzed by immunohistochemistry for p16. The results show that normal tissue is mostly negative or just shows a focal relatively small p16 staining. By far the strongest p16 expression was found in normal pancreatic islands and the adenohypophysis.

Within the tumors a much higher frequency of p16 positivity was found. Particularly often a strong p16 positivity was found on small cell carcinomas (bladder: 76,5 %, lung: 60 %, prostate: 45,5 %, Merkel cell carcinoma of the skin: 81 %), medullary carcinomas of the breast (60 %), liposarcoma (60 %), squamous cell carcinoma of the anal canal (60%), squamous cell carcinoma of the cervix (58,1 %), serous ovarian carcinoma (52,4 %), osteosarcoma (45 %), squamous cell carcinoma of the vagina (41,9 %), carcinosarcoma of the endometrium (40 %), serous endometrial carcinoma (35,3 %), muscle invasive urothel carcinoma (29,8 %) and the endometrioid ovarian carcinoma (27,6 %). On the other hand, p16 positivity was rare in renal cell carcinomas, thyroid carcinomas, pheochromocytomas, carcinomas of the prostate and germ cell carcinomas of the testicles (0 % cells with strong staining).

The comparison of results of tumors and normal tissue, respectively benign and malign tumors, reveals some areas, where p16 immunohistochemistry could potentially be used diagnostically. This contains the identification of neoplasia of the cervix, where immunohistochemistry is already routinely used today, but also the distinction liposarcoma vs. normal fat tissue or leiomyosarcoma vs. leiomyoma. The data of the study also show, that normal tissue- and multitumor tissue microarrays are ideally suited for evaluating diagnostic significance of an antibody.

7. Literaturverzeichnis

- Abrahao, A. C., B. V. Bonelli, F. D. Nunes, E. P. Dias, and M. G. Cabral. 2011. 'Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders', *Braz Oral Res*, 25: 34-41.
- Akin, H., D. Yilmazbayhan, Z. Kilicaslan, S. Dilege, O. Dogan, A. Toker, and G. Kalayci. 2002. 'Clinical significance of P16INK4A and retinoblastoma proteins in non-small-cell lung carcinoma', *Lung Cancer*, 38: 253-60.
- Al-Salam, S., A. Awwad, M. Sudhadevi, S. Daoud, N. J. Nagelkerke, A. Castella, S. M. Chong, and M. Alashari. 2013. 'Epstein-Barr virus infection correlates with the expression of COX-2, p16(INK4A) and p53 in classic Hodgkin lymphoma', *Int J Clin Exp Pathol*, 6: 2765-77.
- Allegra, E., R. Caltabiano, A. Amorosi, E. Vasquez, A. Garozzo, and L. Puzzo. 2013. 'Expression of BMI1 and p16 in laryngeal squamous cell carcinoma', *Head Neck*, 35: 847-51.
- Altman, A. D., G. S. Nelson, P. Ghatage, J. B. McIntyre, D. Capper, P. Chu, J. G. Nation, A. N. Karnezis, G. Han, S. E. Kalloger, and M. Kobel. 2013. 'The diagnostic utility of TP53 and CDKN2A to distinguish ovarian high-grade serous carcinoma from low-grade serous ovarian tumors', *Mod Pathol*, 26: 1255-63.
- Ang, K. K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D. I. Rosenthal, P. F. Nguyen-Tan, W. H. Westra, C. H. Chung, R. C. Jordan, C. Lu, H. Kim, R. Axelrod, C. C. Silverman, K. P. Redmond, and M. L. Gillison. 2010. 'Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer', *N Engl J Med*, 363: 24-35.
- Argiris, A., S. Li, M. Ghebremichael, A. M. Egloff, L. Wang, A. A. Forastiere, B. Burtness, and R. Mehra. 2014. 'Prognostic significance of human papillomavirus in recurrent or metastatic head and neck cancer: an analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials', *Ann Oncol*, 25: 1410-6.
- Arifin, M. T., S. Hama, Y. Kajiwara, K. Sugiyama, T. Saito, S. Matsuura, F. Yamasaki, K. Arita, and K. Kurisu. 2006. 'Cytoplasmic, but not nuclear, p16 expression may signal poor prognosis in high-grade astrocytomas', *J Neurooncol*, 77: 273-7.
- Beadle, B. M., W. N. William, Jr., M. S. McLemore, E. M. Sturgis, and M. D. Williams. 2013. 'p16 expression in cutaneous squamous carcinomas with neck metastases: a potential pitfall in identifying unknown primaries of the head and neck', *Head Neck*, 35: 1527-33.
- Bian, C., Z. Li, Y. Xu, J. Wang, L. Xu, and H. Shen. 2015. 'Clinical outcome and expression of mutant P53, P16, and Smad4 in lung adenocarcinoma: a prospective study', *World J Surg Oncol*, 13: 128.
- Bodner-Adler, B., K. Bodner, K. Czerwenka, O. Kimberger, S. Leodolter, and K. Mayerhofer. 2005. 'Expression of p16 protein in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical analysis', *Gynecol Oncol*, 96: 62-6.
- Brambilla, E., D. Moro, S. Gazzeri, and C. Brambilla. 1999. 'Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance', *J Pathol*, 188: 351-60.
- Brennan, R. G., and B. W. Matthews. 1989. 'The helix-turn-helix DNA binding motif', *J Biol Chem*, 264: 1903-6.
- Bu, J., H. Li, L. H. Liu, Y. R. Ouyang, H. B. Guo, X. Y. Li, and T. Xiao. 2014. 'P16INK4a overexpression and survival in osteosarcoma patients: a meta analysis', *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 6091-6.
- Cameron, R. I., P. Maxwell, D. Jenkins, and W. G. McCluggage. 2002. 'Immunohistochemical staining with MIB1, bcl2 and p16 assists in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo-endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia', *Histopathology*, 41: 313-21.
- Camp, R. L., L. A. Charette, and D. L. Rimm. 2000. 'Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma', *Lab Invest*, 80: 1943-9.

- Camp, R. L., V. Neumeister, and D. L. Rimm. 2008. 'A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers', *J Clin Oncol*, 26: 5630-7.
- Cancer Genome Atlas Research, Network. 2011. 'Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma', *Nature*, 474: 609-15.
- Chan, M. K., T. H. Cheung, T. K. Chung, S. Y. Bao, C. L. Zhao, T. Nobori, and Y. F. Wong. 1998. 'Expression of p16INK4 and retinoblastoma protein Rb in vulvar lesions of Chinese women', *Gynecol Oncol*, 68: 156-61.
- Chang, M. S., H. S. Lee, B. L. Lee, Y. T. Kim, J. S. Lee, and W. H. Kim. 2005. 'Differential protein expression between esophageal squamous cell carcinoma and dysplasia, and prognostic significance of protein markers', *Pathol Res Pract*, 201: 417-25.
- Chen, Y. W., S. Y. Kao, and M. H. Yang. 2012. 'Analysis of p16(INK4A) expression of oral squamous cell carcinomas in Taiwan: prognostic correlation without relevance to betel quid consumption', *J Surg Oncol*, 106: 149-54.
- Cheng, Y. L., S. C. Lee, H. J. Harn, C. J. Chen, Y. C. Chang, J. C. Chen, and C. P. Yu. 2003. 'Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer', *Eur J Cardiothorac Surg*, 23: 221-8.
- Chernock, R. D., X. Wang, G. Gao, J. S. Lewis, Jr., Q. Zhang, W. L. Thorstad, and S. K. El-Mofty. 2013. 'Detection and significance of human papillomavirus, CDKN2A(p16) and CDKN1A(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx', *Mod Pathol*, 26: 223-31.
- Chiosea, S., A. Krasinskas, P. T. Cagle, K. A. Mitchell, D. S. Zander, and S. Dacic. 2008. 'Diagnostic importance of 9p21 homozygous deletion in malignant mesotheliomas', *Mod Pathol*, 21: 742-7.
- Ciesielska, U., T. Zatonski, K. Nowinska, K. Ratajczak-Wielgomas, J. Grzegorzolka, A. Piotrowska, M. Olbromski, B. Pula, M. Podhorska-Okolow, and P. Dziegiel. 2017. 'Expression of Cell Cycle-related Proteins p16, p27 and Ki-67 Proliferating Marker in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and in Laryngeal Papillomas', *Anticancer Res*, 37: 2407-15.
- Cioffi-Lavina, M., J. Chapman-Fredricks, C. Gomez-Fernandez, P. Ganjei-Azar, M. Manoharan, and M. Jorda. 2010. 'P16 expression in squamous cell carcinomas of cervix and bladder', *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 18: 344-7.
- Ciortea, C. D., I. Jung, S. Gurzu, A. Kovacs, S. G. Turdean, and T. Bara. 2015. 'Correlation of angiogenesis with other immunohistochemical markers in cutaneous basal and squamous cell carcinomas', *Rom J Morphol Embryol*, 56: 665-70.
- DeHaan, R. D., B. R. Kipp, T. C. Smyrk, S. C. Abraham, L. R. Roberts, and K. C. Halling. 2007. 'An assessment of chromosomal alterations detected by fluorescence in situ hybridization and p16 expression in sporadic and primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinomas', *Hum Pathol*, 38: 491-9.
- Deng, Z., M. Hasegawa, K. Aoki, S. Matayoshi, A. Kiyuna, Y. Yamashita, T. Uehara, S. Agena, H. Maeda, M. Xie, and M. Suzuki. 2014. 'A comprehensive evaluation of human papillomavirus positive status and p16INK4a overexpression as a prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma', *Int J Oncol*, 45: 67-76.
- Dessy, E., E. Rossi, A. Berenzi, A. Tironi, A. Benetti, and P. Grigolato. 2008. 'Chromosome 9 instability and alterations of p16 gene in squamous cell carcinoma of the lung and in adjacent normal bronchi: FISH and immunohistochemical study', *Histopathology*, 52: 475-82.
- Dong, F., S. Kojiro, D. R. Borger, W. B. Growdon, and E. Oliva. 2015. 'Squamous Cell Carcinoma of the Vulva: A Subclassification of 97 Cases by Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features (p16, p53, and EGFR)', *Am J Surg Pathol*, 39: 1045-53.

- Doxtader, E. E., and A. L. Katzenstein. 2012. 'The relationship between p16 expression and high-risk human papillomavirus infection in squamous cell carcinomas from sites other than uterine cervix: a study of 137 cases', *Hum Pathol*, 43: 327-32.
- Dragomir, L. P., C. Simionescu, C. Margaritescu, A. Stepan, I. M. Dragomir, and M. R. Popescu. 2012. 'P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas', *Rom J Morphol Embryol*, 53: 89-93.
- Engellau, J., M. Akerman, H. Anderson, H. A. Domanski, E. Rambech, T. A. Alvegard, and M. Nilbert. 2001. 'Tissue microarray technique in soft tissue sarcoma: immunohistochemical Ki-67 expression in malignant fibrous histiocytoma', *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 9: 358-63.
- Evans, J. J., H. S. Crist, S. Durvesh, R. D. Bruggeman, and D. Goldenberg. 2012. 'A comparative study of cell cycle mediator protein expression patterns in anaplastic and papillary thyroid carcinoma', *Cancer Biol Ther*, 13: 776-81.
- Fan, X., K. Yu, J. Wu, J. Shao, L. Zhu, and J. Zhang. 2015. 'Correlation between squamous cell carcinoma of the lung and human papillomavirus infection and the relationship to expression of p53 and p16', *Tumour Biol*, 36: 3043-9.
- Ferguson, D. C., D. J. Long, M. C. Smith, L. D. Craig-Owens, J. Means, O. Fadare, and M. M. Desouki. 2015. 'Comparative analysis of Rb1, P16 and ER as diagnostic, prognostic and potential targets for therapeutic agents in ovarian epithelial tumors: an immunohistochemical study of 130 ovarian carcinomas', *J Ovarian Res*, 8: 34.
- Fons, G., M. P. Burger, F. J. ten Kate, and J. van der Velden. 2009. 'Assessment of promising protein markers for vulva cancer', *Int J Gynecol Cancer*, 19: 756-60.
- Freedberg, D. E., S. H. Rigas, J. Russak, W. Gai, M. Kaplow, I. Osman, F. Turner, J. A. Randerson-Moor, A. Houghton, K. Busam, D. Timothy Bishop, B. C. Bastian, J. A. Newton-Bishop, and D. Polsky. 2008. 'Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma', *J Natl Cancer Inst*, 100: 784-95.
- Fujita, M., T. Enomoto, T. Haba, R. Nakashima, M. Sasaki, K. Yoshino, H. Wada, G. S. Buzard, N. Matsuzaki, K. Wakasa, and Y. Murata. 1997. 'Alteration of p16 and p15 genes in common epithelial ovarian tumors', *Int J Cancer*, 74: 148-55.
- Gan, X., X. Lin, R. He, X. Lin, H. Wang, L. Yan, H. Zhou, H. Qin, and G. Chen. 2016. 'Prognostic and Clinicopathological Significance of Downregulated p16 Expression in Patients with Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Dis Markers*, 2016: 5259602.
- Gatta, L. B., P. Balzarini, A. Tironi, A. Berenzi, A. Benetti, F. Angiero, P. Grigolato, and E. Dessy. 2012. 'Human papillomavirus DNA and p16 gene in squamous cell lung carcinoma', *Anticancer Res*, 32: 3085-9.
- Gayed, B. A., R. F. Youssef, A. Bagrodia, P. Kapur, O. M. Darwish, L. M. Krabbe, A. Sagalowsky, Y. Lotan, and V. Margulis. 2013. 'Prognostic role of cell cycle and proliferative biomarkers in patients with clear cell renal cell carcinoma', *J Urol*, 190: 1662-7.
- Gilbert, D. C., A. Williams, K. Allan, J. Stokoe, T. Jackson, S. Linsdall, C. M. Bailey, and J. Summers. 2013. 'p16INK4A, p53, EGFR expression and KRAS mutation status in squamous cell cancers of the anus: correlation with outcomes following chemo-radiotherapy', *Radiother Oncol*, 109: 146-51.
- Grobe, A., H. Hanken, L. Kluwe, M. Schollchen, S. Tribius, P. Pohlenz, T. Clauditz, T. Grob, R. Simon, G. Sauter, M. Heiland, and M. Blessmann. 2013. 'Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma', *J Oral Pathol Med*, 42: 676-81.
- Gupta, R., R. Srinivasan, R. Nijhawan, V. Suri, and R. Uppal. 2010. 'Protein p 16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix', *Indian J Pathol Microbiol*, 53: 7-11.
- Hardie, L. J., S. J. Darnton, Y. L. Wallis, A. Chauhan, P. Hainaut, C. P. Wild, and A. G. Casson. 2005. 'p16 expression in Barrett's esophagus and esophageal

- adenocarcinoma: association with genetic and epigenetic alterations', *Cancer Lett*, 217: 221-30.
- Hay, C. M., J. A. Lachance, F. L. Lucas, K. A. Smith, and M. A. Jones. 2016. 'Biomarkers p16, Human Papillomavirus and p53 Predict Recurrence and Survival in Early Stage Squamous Cell Carcinoma of the Vulva', *J Low Genit Tract Dis*, 20: 252-6.
- He, M., S. Aisner, J. Benevenia, F. Patterson, H. Aviv, and M. Hameed. 2009. 'p16 immunohistochemistry as an alternative marker to distinguish atypical lipomatous tumor from deep-seated lipoma', *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 17: 51-6.
- Hernandez, B. Y., M. Rahman, C. F. Lynch, W. Cozen, E. R. Unger, M. Steinau, T. Thompson, M. S. Saber, S. F. Altekruze, M. T. Goodman, A. Powers, C. Lyu, and M. Saraiya. 2016. 'p16(INK4A) expression in invasive laryngeal cancer', *Papillomavirus Res*, 2: 52-55.
- Hoos, A., M. J. Urist, A. Stojadinovic, S. Mastorides, M. E. Dudas, D. H. Leung, D. Kuo, M. F. Brennan, J. J. Lewis, and C. Cordon-Cardo. 2001. 'Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors', *Am J Pathol*, 158: 1245-51.
- Hu, Y. X., H. Watanabe, K. Ohtsubo, Y. Yamaguchi, A. Ha, T. Okai, and N. Sawabu. 1997. 'Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma', *Clin Cancer Res*, 3: 1473-7.
- Huang, C. I., T. Taki, M. Higashiyama, N. Kohno, and M. Miyake. 2000. 'p16 protein expression is associated with a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung', *Br J Cancer*, 82: 374-80.
- Ignatov, A., J. Bischoff, C. Schwarzenau, T. Krebs, D. Kuester, K. Herrmann, S. D. Costa, A. Roessner, A. Semczuk, and R. Schneider-Stock. 2008. 'P16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma', *Gynecol Oncol*, 111: 365-71.
- Jaffrain-Rea, M. L., E. Ferretti, E. Toniato, K. Cannita, A. Santoro, D. Di Stefano, E. Ricevuto, M. Maroder, G. Tamburrano, G. Cantore, A. Gulino, and S. Martinotti. 1999. 'p16 (INK4a, MTS-1) gene polymorphism and methylation status in human pituitary tumours', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 51: 317-25.
- Kalfert, D., P. Celakovsky, J. Laco, and M. Ludvikova. 2014. 'The role of protein p16(INK4a) in glottic laryngeal squamous cell carcinoma', *Pathol Oncol Res*, 20: 909-15.
- Kammerer-Jacquet, S. F., S. Thierry, F. Cabillic, M. Lannes, F. Burtin, S. Henno, F. Dugay, G. Bouzille, N. Rioux-Leclercq, M. A. Belaud-Rotureau, and N. Stock. 2017. 'Differential diagnosis of atypical lipomatous tumor/well-differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma: utility of p16 in combination with MDM2 and CDK4 immunohistochemistry', *Hum Pathol*, 59: 34-40.
- Kang, Y., and A. E. Horvai. 2017. 'p16 Immunohistochemistry is Less Useful Than MDM2 and CDK4 to Distinguish Dedifferentiated Liposarcomas From Other Retroperitoneal Mimics', *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 25: 58-63.
- Kang, Y. K., W. H. Kim, and J. J. Jang. 2002. 'Expression of G1-S modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in intrahepatic cholangiocarcinoma', *Hum Pathol*, 33: 877-83.
- Kanthiya, K., J. Khunrarong, S. Tangjitgamol, N. Puripat, and S. Tanvanich. 2016. 'Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer', *Asian Pac J Cancer Prev*, 17: 3201-6.
- Kanyilmaz, G., O. Ekinci, A. Muge, S. Celik, and F. Ozturk. 2015. 'HPV-associated p16 INK4A expression and response to therapy and survival in selected head and neck cancers', *Asian Pac J Cancer Prev*, 16: 253-8.
- Karpathiou, G., A. Monaya, F. Forest, M. Froudarakis, F. Casteillo, J. Marc Dumollard, J. M. Prades, and M. Peoc'h. 2016. 'p16 and p53 expression status in head and

- neck squamous cell carcinoma: a correlation with histological, histoprognostic and clinical parameters', *Pathology*, 48: 341-8.
- Karsai, S., U. Abel, M. Roesch-Ely, A. Affolter, C. Hofele, S. Joos, P. K. Plinkert, and F. X. Bosch. 2007. 'Comparison of p16(INK4a) expression with p53 alterations in head and neck cancer by tissue microarray analysis', *J Pathol*, 211: 314-22.
- Kashiwabara, K., T. Oyama, T. Sano, T. Fukuda, and T. Nakajima. 1998. 'Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers', *Int J Cancer*, 79: 215-20.
- Kawabuchi, B., S. Moriyama, M. Hironaka, T. Fujii, M. Koike, H. Moriyama, Y. Nishimura, S. Mizuno, and M. Fukayama. 1999. 'p16 inactivation in small-sized lung adenocarcinoma: its association with poor prognosis', *Int J Cancer*, 84: 49-53.
- Keating, J. T., A. Cviko, S. Riethdorf, L. Riethdorf, B. J. Quade, D. Q. Sun, S. Duensing, E. E. Sheets, K. Munger, and C. P. Crum. 2001. 'Ki-67, cyclin E, and p16(INK4) are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia', *American Journal of Surgical Pathology*, 25: 884-91.
- Kim, L. H., S. C. Peh, and S. Poppema. 2006. 'Expression of retinoblastoma protein and P16 proteins in classic Hodgkin lymphoma: relationship with expression of p53 and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death', *Hum Pathol*, 37: 92-100.
- King-Yin Lam, A., K. Ong, and Y. H. Ho. 2006. 'Colorectal mucinous adenocarcinoma: the clinicopathologic features and significance of p16 and p53 expression', *Dis Colon Rectum*, 49: 1275-83.
- Knopp, S., T. Borge, J. M. Nesland, C. Trope, M. Scheistroen, and R. Holm. 2004. 'p16INK4a and p21Waf1/Cip1 expression correlates with clinical outcome in vulvar carcinomas', *Gynecol Oncol*, 95: 37-45.
- Koerber, S. A., C. Schoneweg, A. Slynko, D. Krug, M. F. Haefner, K. Herfarth, J. Debus, F. Sterzing, M. von Knebel Doeberitz, E. S. Prigge, and M. Reuschenbach. 2014. 'Influence of human papillomavirus and p16(INK4a) on treatment outcome of patients with anal cancer', *Radiother Oncol*, 113: 331-6.
- Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter, and O. P. Kallioniemi. 1998. 'Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens', *Nat Med*, 4: 844-7.
- Kratzke, R. A., T. M. Greatens, J. B. Rubins, M. A. Maddaus, D. E. Niewoehner, G. A. Niehans, and J. Geradts. 1996. 'Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors', *Cancer Res*, 56: 3415-20.
- Krecicki, T., R. Smigiel, M. Fraczek, M. Kowalczyk, and M. M. Sasiadek. 2004. 'Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue', *J Laryngol Otol*, 118: 676-80.
- Laco, J., J. Nekvindova, V. Novakova, P. Celakovsky, H. Dolezalova, L. Tucek, H. Vosmikova, M. Vosmik, T. Neskudlova, E. Cermakova, M. Hacova, F. A. Sobande, and A. Ryska. 2012. 'Biologic importance and prognostic significance of selected clinicopathological parameters in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, with emphasis on smoking, protein p16(INK4a) expression, and HPV status', *Neoplasma*, 59: 398-408.
- Lam, A. K., C. Y. Lo, P. Leung, B. H. Lang, W. F. Chan, and J. M. Luk. 2007. 'Clinicopathological roles of alterations of tumor suppressor gene p16 in papillary thyroid carcinoma', *Ann Surg Oncol*, 14: 1772-9.
- Lam, A. K., K. Ong, M. J. Giv, and Y. H. Ho. 2008. 'p16 expression in colorectal adenocarcinoma: marker of aggressiveness and morphological types', *Pathology*, 40: 580-5.
- Lam, A. K., K. Ong, and Y. H. Ho. 2008. 'Aurora kinase expression in colorectal adenocarcinoma: correlations with clinicopathological features, p16 expression, and telomerase activity', *Hum Pathol*, 39: 599-604.

- Lavorato-Rocha, A. M., I. S. Rodrigues, B. de Melo Maia, M. M. Stiepcich, G. Baiocchi, K. C. Carvalho, F. A. Soares, J. Vassallo, and R. M. Rocha. 2013. 'Cell cycle suppressor proteins are not related to HPV status or clinical outcome in patients with vulvar carcinoma', *Tumour Biol*, 34: 3713-20.
- Lebok, P., M. Roming, M. Kluth, C. Koop, C. Ozden, B. Taskin, K. Hussein, A. Lebeau, I. Witzel, L. Wolber, S. Geist, P. Paluchowski, C. Wilke, U. Heilenkotter, V. Muller, B. Schmalfeldt, R. Simon, G. Sauter, L. Terracciano, R. H. Krech, A. von der Assen, and E. Burandt. 2016. 'p16 overexpression and 9p21 deletion are linked to unfavorable tumor phenotype in breast cancer', *Oncotarget*, 7: 81322-31.
- Lee, C. T., P. Capodieci, I. Osman, M. Fazzari, J. Ferrara, H. I. Scher, and C. Cordon-Cardo. 1999. 'Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer', *Clin Cancer Res*, 5: 977-83.
- Lee, K., E. S. Jung, Y. J. Choi, K. Y. Lee, and A. Lee. 2010. 'Expression of pRb, p53, p16 and cyclin D1 and their clinical implications in urothelial carcinoma', *J Korean Med Sci*, 25: 1449-55.
- Leversha, M. A., P. Fielding, S. Watson, J. R. Gosney, and J. K. Field. 2003. 'Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays', *J Pathol*, 200: 610-9.
- Liggett, W. H., Jr., and D. Sidransky. 1998. 'Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer', *J Clin Oncol*, 16: 1197-206.
- Lin, Y. C., M. B. Diccianni, Y. Kim, H. H. Lin, C. H. Lee, R. J. Lin, S. H. Joo, J. Li, T. J. Chuang, A. S. Yang, H. H. Kuo, M. D. Tsai, and A. L. Yu. 2007. 'Human p16gamma, a novel transcriptional variant of p16(INK4A), coexpresses with p16(INK4A) in cancer cells and inhibits cell-cycle progression', *Oncogene*, 26: 7017-27.
- Lingfei, K., Y. Pingzhang, L. Zhengguo, G. Jianhua, and Z. Yaowu. 1998. 'A study on p16, pRb, cdk4 and cyclinD1 expression in non-small cell lung cancers', *Cancer Lett*, 130: 93-101.
- Liu, Y. S., C. H. Yu, L. Li, B. F. Zhang, J. Fang, Q. Zhou, Y. Hu, Y. M. Li, and H. Jun Gao. 2007. 'Expression of p53, p16 and cyclooxygenase-2 in esophageal cancer with tissue microarray', *J Dig Dis*, 8: 133-8.
- Loeschke, S., A. K. Ohlmann, J. H. Brasen, R. Holst, and P. H. Warnke. 2016. 'Prognostic value of HMGA2, P16, and HPV in oral squamous cell carcinomas', *J Craniomaxillofac Surg*, 44: 1422-9.
- Lu, D. W., S. K. El-Mofty, and H. L. Wang. 2003. 'Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA', *Mod Pathol*, 16: 692-9.
- Malik, S. M., D. T. Nevin, S. Cohen, J. L. Hunt, and J. P. Palazzo. 2011. 'Assessment of immunohistochemistry for p16INK4 and high-risk HPV DNA by in situ hybridization in esophageal squamous cell carcinoma', *Int J Surg Pathol*, 19: 31-4.
- Marinescu, A., A. E. Stepan, C. Margaritescu, A. M. Marinescu, R. E. Zavoi, C. E. Simionescu, and M. Niculescu. 2016. 'P53, p16 and Ki67 immunoexpression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursor lesions', *Rom J Morphol Embryol*, 57: 691-96.
- Mattos, M. S. G., W. R. Oliveira, and M. N. Sotto. 2017. 'Comparative study of p16 protein expression in squamous cell carcinomas from patients with epidermodysplasia verruciformis and patients without the disease', *Arch Dermatol Res*, 309: 479-83.
- Meshman, J., P. C. Wang, R. Chin, M. S. John, E. Abemayor, S. Bhuta, and A. M. Chen. 2017. 'Prognostic significance of p16 in squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx', *Am J Otolaryngol*, 38: 31-37.
- Meulendijks, D., N. B. Tomaso, L. Dewit, P. H. Smits, R. Bakker, M. L. van Velthuysen, E. H. Rosenberg, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, and A. Cats. 2015.

- 'HPV-negative squamous cell carcinoma of the anal canal is unresponsive to standard treatment and frequently carries disruptive mutations in TP53', *Br J Cancer*, 112: 1358-66.
- Mhaweck, P., V. Greloz, C. Oppikofer, I. Szalay-Quinodoz, and F. Herrmann. 2004. 'Expression of cell cycle proteins in T1a and T1b urothelial bladder carcinoma and their value in predicting tumor progression', *Cancer*, 100: 2367-75.
- Mihic-Probst, D., C. D. Mnich, P. A. Oberholzer, B. Seifert, B. Sasse, H. Moch, and R. Dummer. 2006. 'p16 expression in primary malignant melanoma is associated with prognosis and lymph node status', *Int J Cancer*, 118: 2262-8.
- Milde-Langosch, K., E. Ocon, G. Becker, and T. Loning. 1998. 'p16/MTS1 inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hyper-methylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors', *Int J Cancer*, 79: 61-5.
- Mirlacher, M., M. Kasper, M. Storz, Y. Knecht, U. Durmuller, R. Simon, M. J. Mihatsch, and G. Sauter. 2004. 'Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry', *Mod Pathol*, 17: 1414-20.
- Muirhead, D. M., H. T. Hoffman, and R. A. Robinson. 2006. 'Correlation of clinicopathological features with immunohistochemical expression of cell cycle regulatory proteins p16 and retinoblastoma: distinct association with keratinisation and differentiation in oral cavity squamous cell carcinoma', *J Clin Pathol*, 59: 711-5.
- Muscarella, P., M. Bloomston, A. R. Brewer, A. Mahajan, W. L. Frankel, E. C. Ellison, W. B. Farrar, C. M. Weghorst, and J. Li. 2008. 'Expression of the p16INK4A/Cdkn2a gene is prevalently downregulated in human pheochromocytoma tumor specimens', *Gene Expr*, 14: 207-16.
- Nakashima, R., M. Fujita, T. Enomoto, T. Haba, K. Yoshino, H. Wada, H. Kurachi, M. Sasaki, K. Wakasa, M. Inoue, G. Buzard, and Y. Murata. 1999. 'Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours', *Br J Cancer*, 80: 458-67.
- Nemes, J. A., L. Deli, Z. Nemes, and I. J. Marton. 2006. 'Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma', *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102: 344-52.
- Netzer, I. M., H. Kerner, L. Litwin, L. Lowenstein, and A. Amit. 2011. 'Diagnostic implications of p16 expression in serous papillary endometrial cancer', *Int J Gynecol Cancer*, 21: 1441-5.
- Nielsen, G. P., A. O. Stemmer-Rachamimov, J. Shaw, J. E. Roy, J. Koh, and D. N. Louis. 1999. 'Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues', *Lab Invest*, 79: 1137-43.
- Nogueira, M. C., P. Guedes Neto Ede, M. W. Rosa, E. Zettler, and C. G. Zettler. 2006. 'Immunohistochemical expression of p16 and p53 in vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva', *Pathol Oncol Res*, 12: 153-7.
- Nonaka, D., S. Kusamura, D. Baratti, P. Casali, A. D. Cabras, R. Younan, J. Rosai, and M. Deraco. 2005. 'Diffuse malignant mesothelioma of the peritoneum: a clinicopathological study of 35 patients treated locoregionally at a single institution', *Cancer*, 104: 2181-8.
- O'Neill, C. J., H. A. McBride, L. E. Connolly, M. T. Deavers, A. Malpica, and W. G. McCluggage. 2007. 'High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour', *Histopathology*, 50: 773-9.
- O'Neill, C. J., and W. G. McCluggage. 2006. 'p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis', *Adv Anat Pathol*, 13: 8-15.
- Padhi, S. S., S. Roy, M. Kar, A. Saha, S. Roy, A. Adhya, M. Baisakh, and B. Banerjee. 2017. 'Role of CDKN2A/p16 expression in the prognostication of oral squamous cell carcinoma', *Oral Oncol*, 73: 27-35.

- Pavey, S. J., M. C. Cummings, D. C. Whiteman, M. Castellano, M. D. Walsh, B. G. Gabrielli, A. Green, and N. K. Hayward. 2002. 'Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion', *Melanoma Res*, 12: 539-47.
- Peng, W. X., T. Sano, T. Oyama, O. Kawashima, and T. Nakajima. 2005. 'Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a comparison with large cell carcinoma with neuroendocrine morphology and small cell carcinoma', *Lung Cancer*, 47: 225-33.
- Phillips, V., P. Kelly, and W. G. McCluggage. 2009. 'Increased p16 expression in high-grade serous and undifferentiated carcinoma compared with other morphologic types of ovarian carcinoma', *Int J Gynecol Pathol*, 28: 179-86.
- Pinto, R. P., F. K. Lima, J. M. Kulkzynski, and L. F. Moreira. 2009. 'Expression of P16 and PDGFR-beta in gastric adenocarcinoma', *Rev Col Bras Cir*, 36: 199-203.
- Primdahl, H., H. von der Maase, F. B. Sorensen, H. Wolf, and T. F. Orntoft. 2002. 'Immunohistochemical study of the expression of cell cycle regulating proteins at different stages of bladder cancer', *J Cancer Res Clin Oncol*, 128: 295-301.
- Queiroz, A. B., G. Focchi, C. Dobo, T. S. Gomes, D. A. Ribeiro, and C. T. Oshima. 2010. 'Expression of p27, p21(WAF/Cip1), and p16(INK4a) in normal oral epithelium, oral squamous papilloma, and oral squamous cell carcinoma', *Anticancer Res*, 30: 2799-803.
- Radhi, J. M. 1999. 'Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, and Bcl-2: expression in benign versus malignant components', *J Cutan Med Surg*, 3: 293-7.
- Ramezani, M., E. Abdali, S. Khazaei, A. Vaisi-Raygani, and M. Sadeghi. 2016. 'P16INK4a Immunostaining but Lack of Human Papilloma Virus Type 16 in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Basal Cell Carcinoma: a Report from West Iran', *Asian Pac J Cancer Prev*, 17: 1093-6.
- Riener, M. O., J. Hoegel, H. Iro, A. Hartmann, and A. Agaimy. 2017. 'IMP3 and p16 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: A comparative immunohistochemical analysis', *Oncol Lett*, 14: 1665-70.
- Riethdorf, S., E. F. Neffen, A. Cviko, T. Loning, C. P. Crum, and L. Riethdorf. 2004. 'p16INK4A expression as biomarker for HPV 16-related vulvar neoplasias', *Hum Pathol*, 35: 1477-83.
- Romagosa, C., S. Simonetti, L. Lopez-Vicente, A. Mazo, M. E. Leonart, J. Castellvi, and S. Ramon y Cajal. 2011. 'p16(INK4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors', *Oncogene*, 30: 2087-97.
- Rosen, D. G., X. Huang, M. T. Deavers, A. Malpica, E. G. Silva, and J. Liu. 2004. 'Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma', *Mod Pathol*, 17: 790-7.
- Rubin, M. A., R. Dunn, M. Strawderman, and K. J. Pienta. 2002. 'Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis', *Am J Surg Pathol*, 26: 312-9.
- Ryu, H. J., E. K. Kim, S. J. Heo, B. C. Cho, H. R. Kim, and S. O. Yoon. 2017. 'Architectural patterns of p16 immunohistochemical expression associated with cancer immunity and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma', *APMIS*, 125: 974-84.
- Salehinejad, J., N. Sharifi, M. Amirchaghmaghi, N. Ghazi, M. T. Shakeri, and A. Ghazi. 2014. 'Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus', *Ann Diagn Pathol*, 18: 210-3.
- Salvesen, H. B., S. Das, and L. A. Akslen. 2000. 'Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis', *Clin Cancer Res*, 6: 153-9.

- Sano, T., T. Oyama, K. Kashiwabara, T. Fukuda, and T. Nakajima. 1998. 'Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions', *Am J Pathol*, 153: 1741-8.
- Sasaki, M., T. Matsubara, Y. Kakuda, Y. Sato, and Y. Nakanuma. 2014. 'Immunostaining for polycomb group protein EZH2 and senescent marker p16INK4a may be useful to differentiate cholangiolocellular carcinoma from ductular reaction and bile duct adenoma', *Am J Surg Pathol*, 38: 364-9.
- Satgunaseelan, L., N. Chia, H. Suh, S. Virk, B. Ashford, T. Lum, M. Ranson, J. Clark, and R. Gupta. 2017. 'p16 expression in cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck is not associated with integration of high risk HPV DNA or prognosis', *Pathology*, 49: 494-98.
- Sedghizadeh, P. P., W. D. Billington, D. Paxton, R. Ebeed, S. Mahabady, G. T. Clark, and R. Enciso. 2016. 'Is p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma associated with favorable prognosis? A systematic review and meta-analysis', *Oral Oncol*, 54: 15-27.
- Seemann, N., D. Kuhn, C. Wrocklage, K. Keyvani, W. Hackl, M. Buchfelder, R. Fahlbusch, and W. Paulus. 2001. 'CDKN2A/p16 inactivation is related to pituitary adenoma type and size', *J Pathol*, 193: 491-7.
- Seipel, A. H., H. Samaratunga, B. Delahunt, F. Wiklund, P. Wiklund, J. Lindberg, H. Gronberg, and L. Egevad. 2014. 'Immunohistochemical profile of ductal adenocarcinoma of the prostate', *Virchows Arch*, 465: 559-65.
- Seipel, A. H., H. Samaratunga, B. Delahunt, P. Wiklund, M. Clements, and L. Egevad. 2016. 'Immunohistochemistry of ductal adenocarcinoma of the prostate and adenocarcinomas of non-prostatic origin: a comparative study', *APMIS*, 124: 263-70.
- Serra, S., and R. Chetty. 2018. 'p16', *J Clin Pathol*, 71: 853-58.
- Serrano, M., G. J. Hannon, and D. Beach. 1993. 'A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4', *Nature*, 366: 704-7.
- Shariat, S. F., H. Tokunaga, J. Zhou, J. Kim, G. E. Ayala, W. F. Benedict, and S. P. Lerner. 2004. 'p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer', *J Clin Oncol*, 22: 1014-24.
- Shintani, S., M. Mihara, Y. Nakahara, A. Kiyota, Y. Ueyama, T. Matsumura, and D. T. Wong. 2002. 'Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity', *Oral Oncol*, 38: 235-43.
- Simpson, D. J., J. E. Bicknell, A. M. McNicol, R. N. Clayton, and W. E. Farrell. 1999. 'Hypermethylation of the p16/CDKN2A/MTS1 gene and loss of protein expression is associated with nonfunctional pituitary adenomas but not somatotrophinomas', *Genes Chromosomes Cancer*, 24: 328-36.
- Snietura, M., M. Jaworska, W. Piglowski, A. Goraj-Zajac, G. Wozniak, and D. Lange. 2010. 'High-risk HPV DNA status and p16 (INK4a) expression as prognostic markers in patients with squamous cell cancer of oral cavity and oropharynx', *Pol J Pathol*, 61: 133-9.
- Steigen, S. E., B. Bjerkehagen, H. K. Haugland, I. S. Nordrum, E. M. Loberg, V. Isaksen, T. J. Eide, and T. O. Nielsen. 2008. 'Diagnostic and prognostic markers for gastrointestinal stromal tumors in Norway', *Mod Pathol*, 21: 46-53.
- Sterlacci, W., A. Tzankov, L. Veits, B. Zelger, M. P. Bihl, A. Foerster, F. Augustin, M. Fiegl, and S. Savic. 2011. 'A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas', *J Thorac Oncol*, 6: 1649-57.
- Stewart, C. J., M. L. Crook, Y. C. Leung, and M. Platten. 2009. 'Expression of cell cycle regulatory proteins in endometrial adenocarcinoma: variations in conventional tumor areas and in microcystic, elongated and fragmented glands', *Mod Pathol*, 22: 725-33.
- Stone, S., P. Jiang, P. Dayananth, S. V. Tavtigian, H. Katcher, D. Parry, G. Peters, and A. Kamb. 1995. 'Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus', *Cancer Res*, 55: 2988-94.

- Straume, O., and L. A. Akslen. 1997. 'Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma', *Int J Cancer*, 74: 535-9.
- Straume, O., L. Sviland, and L. A. Akslen. 2000. 'Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma', *Clin Cancer Res*, 6: 1845-53.
- Su, C. Y., Y. C. Chang, Y. C. Chan, T. C. Lin, M. S. Huang, C. J. Yang, and M. Hsiao. 2014. 'MTAP is an independent prognosis marker and the concordant loss of MTAP and p16 expression predicts short survival in non-small cell lung cancer patients', *Eur J Surg Oncol*, 40: 1143-50.
- Suh, Y., I. Amelio, T. Guerrero Urbano, and M. Tavassoli. 2014. 'Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer', *Cell Death Dis*, 5: e1018.
- Sui, L., Y. Dong, M. Ohno, M. Goto, T. Inohara, K. Sugimoto, Y. Tai, T. Hando, and M. Tokuda. 2000. 'Inverse expression of Cdk4 and p16 in epithelial ovarian tumors', *Gynecol Oncol*, 79: 230-7.
- Svajdler, M., R. Mezencev, O. Ondic, B. Saskova, P. Mukensnabl, and M. Michal. 2018. 'P16 is a useful supplemental diagnostic marker of pulmonary small cell carcinoma in small biopsies and cytology specimens', *Ann Diagn Pathol*, 33: 23-29.
- Taghavi, N., F. Biramijamal, M. Sotoudeh, H. Khademi, R. Malekzadeh, O. Moaven, B. Memar, A. A'Rabi, and M. R. Abbaszadegan. 2010. 'p16INK4a hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma', *BMC Cancer*, 10: 138.
- Takeuchi, H., S. Ozawa, N. Ando, C. H. Shih, K. Koyanagi, M. Ueda, and M. Kitajima. 1997. 'Altered p16/MTS1/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus', *Clin Cancer Res*, 3: 2229-36.
- Takeuchi, H., S. Ozawa, C. H. Shih, N. Ando, Y. Kitagawa, M. Ueda, and M. Kitajima. 2004. 'Loss of p16INK4a expression is associated with vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinoma of the esophagus', *Int J Cancer*, 109: 483-90.
- Talve, L., I. Sauroja, Y. Collan, K. Punnonen, and T. Ekfors. 1997. 'Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage', *Int J Cancer*, 74: 255-9.
- Tang, Y., C. Yang, Z. Guo, Y. Fu, X. Yu, B. Liu, H. Zhou, J. Wang, W. Li, and Q. Pang. 2017. 'P16 protein expression as a useful predictive biomarker for neoadjuvant chemotherapy response in patients with high-grade osteosarcoma: A systematic meta-analysis under guideline of PRISMA', *Medicine (Baltimore)*, 96: e6714.
- Thway, K., R. Flora, C. Shah, D. Olmos, and C. Fisher. 2012. 'Diagnostic utility of p16, CDK4, and MDM2 as an immunohistochemical panel in distinguishing well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas from other adipocytic tumors', *Am J Surg Pathol*, 36: 462-9.
- Tiefenbock-Hansson, K., A. Haapaniemi, L. Farnebo, B. Palmgren, J. Tarkkanen, M. Farnebo, E. Munck-Wikland, A. Makitie, S. Garvin, and K. Roberg. 2017. 'WRAP53beta, survivin and p16INK4a expression as potential predictors of radiotherapy/chemoradiotherapy response in T2N0-T3N0 glottic laryngeal cancer', *Oncol Rep*, 38: 2062-68.
- Torhorst, J., C. Bucher, J. Kononen, P. Haas, M. Zuber, O. R. Kochli, F. Mross, H. Dieterich, H. Moch, M. Mihatsch, O. P. Kallioniemi, and G. Sauter. 2001. 'Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints', *Am J Pathol*, 159: 2249-56.
- Tzai, T. S., Y. S. Tsai, and N. H. Chow. 2004. 'The prevalence and clinicopathologic correlate of p16INK4a, retinoblastoma and p53 immunoreactivity in locally advanced urinary bladder cancer', *Urol Oncol*, 22: 112-8.

- Vallonthaiel, A. G., M. K. Singh, A. K. Dinda, A. Kakkar, A. Thakar, and S. N. Das. 2016. 'Expression of Cell Cycle-associated Proteins p53, pRb, p16, p27, and Correlation With Survival: A Comparative Study on Oral Squamous Cell Carcinoma and Verrucous Carcinoma', *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 24: 193-200.
- Villuendas, R., M. Sanchez-Beato, J. C. Martinez, A. I. Saez, B. Martinez-Delgado, J. F. Garcia, M. S. Mateo, L. Sanchez-Verde, J. Benitez, P. Martinez, and M. A. Piris. 1998. 'Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression', *Am J Pathol*, 153: 887-97.
- Wang, C. W., T. I. Wu, C. T. Yu, Y. C. Wu, Y. H. Teng, S. Y. Chin, C. H. Lai, and T. C. Chen. 2009. 'Usefulness of p16 for differentiating primary pulmonary squamous cell carcinoma from cervical squamous cell carcinoma metastatic to the lung', *Am J Clin Pathol*, 131: 715-22.
- Wang, C., J. Wang, Z. Chen, Y. Gao, and J. He. 2017. 'Immunohistochemical prognostic markers of esophageal squamous cell carcinoma: a systematic review', *Chin J Cancer*, 36: 65.
- Wang, F., H. Zhang, Y. Xue, J. Wen, J. Zhou, X. Yang, and J. Wei. 2017. 'A systematic investigation of the association between HPV and the clinicopathological parameters and prognosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas', *Cancer Med*, 6: 910-17.
- Wang, L., J. Li, X. Yu, Z. Zhang, L. Pang, S. Li, J. Hou, and F. Li. 2016. 'Prognostic significance of overexpressed p16(INK4A) in esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis', *Biomark Med*, 10: 537-46.
- Woloschak, M., A. Yu, and K. D. Post. 1997. 'Frequent inactivation of the p16 gene in human pituitary tumors by gene methylation', *Mol Carcinog*, 19: 221-4.
- Xue, Q., T. Sano, K. Kashiwabara, M. Saito, T. Oyama, and T. Nakajima. 2002. 'Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in stage I adenocarcinomas of the lung', *Pathol Int*, 52: 103-9.
- Yang, C. C., K. C. Chu, H. Y. Chen, and W. C. Chen. 2002. 'Expression of p16 and cyclin D1 in bladder cancer and correlation in cancer progression', *Urol Int*, 69: 190-4.
- Yemelyanova, A., H. Ji, M. Shih le, T. L. Wang, L. S. Wu, and B. M. Ronnett. 2009. 'Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases', *Am J Surg Pathol*, 33: 1504-14.
- Young, R. J., D. Urban, C. Angel, J. Corry, B. Lyons, N. Vallance, S. Kleid, T. A. Iseli, B. Solomon, and D. Rischin. 2015. 'Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma', *Br J Cancer*, 112: 1098-104.
- Yuan, J., J. Knorr, M. Altmannsberger, G. Goeckenjan, A. Ahr, A. Scharl, and K. Strebhardt. 1999. 'Expression of p16 and lack of pRB in primary small cell lung cancer', *J Pathol*, 189: 358-62.
- Yuen, P. W., M. Man, K. Y. Lam, and Y. L. Kwong. 2002. 'Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas', *J Clin Pathol*, 55: 58-60.
- Zafereo, M. E., L. Xu, K. R. Dahlstrom, C. A. Viamonte, A. K. El-Naggar, Q. Wei, G. Li, and E. M. Sturgis. 2016. 'Squamous cell carcinoma of the oral cavity often overexpresses p16 but is rarely driven by human papillomavirus', *Oral Oncol*, 56: 47-53.
- Zafon, C., G. Obiols, J. Castellvi, S. Ramon y Cajal, J. A. Baena, and J. Mesa. 2008. 'Expression of p21cip1, p27kip1, and p16INK4a cyclin-dependent kinase inhibitors in papillary thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological factors', *Endocr Pathol*, 19: 184-9.

- Zhang, Y., Y. Xiong, and W. G. Yarbrough. 1998. 'ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways', *Cell*, 92: 725-34.
- Zhang, Z., D. G. Rosen, J. L. Yao, J. Huang, and J. Liu. 2006. 'Expression of p14ARF, p15INK4b, p16INK4a, and DCR2 increases during prostate cancer progression', *Mod Pathol*, 19: 1339-43.
- Zhao, P., Y. Lu, L. Liu, and M. Zhong. 2008. 'Aberrant expression of ID2 protein and its correlation with EBV-LMP1 and P16(INK4A) in classical Hodgkin lymphoma in China', *BMC Cancer*, 8: 379.
- . 2011. 'Aberrant cytoplasmic expression of cyclin B1 protein and its correlation with EBV-LMP1, P53 and P16(INK4A) in classical Hodgkin lymphoma in China', *Pathol Oncol Res*, 17: 369-73.

8. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen mich bei Betreuern, Familie und Freunden zu bedanken, die mich während der Promotion unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt diesbezüglich Herrn Prof. Dr. Sauter, meinem Doktorvater, der mir im Verlauf der Arbeit sowohl fachlich als auch bezüglich des Schreibprozesses mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für Fragen zu Datenerhebung und Auswertung konnte ich mich jederzeit an Herrn PD Dr. Simon wenden. Manche Zusammenhänge wurden mir bei diesen Gesprächen erst vollkommen klar.

Auch meinen Betreuerinnen Frau Möller-Koop und Frau Witt, die mich in den Aufgabenbereich einwiesen und bei Fragen jeglicher Art zur Verfügung standen, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen.

Zu einer wundervollen Arbeitsatmosphäre trugen meine Mitdotorandinnen und Mitdotoranden bei, von denen viele zu meinen Freunden wurden. Besonders bedanke ich mich daher bei: Sarah Baltruschat, Vera Nickelsen, Kim Daboe, Sabrina Bardick und Greta Sökeland.

Ebenfalls möchte ich meinen Dank den übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pathologischen Instituts aussprechen, die mir durch ihre Arbeit erst die Möglichkeit gaben die Dissertation wie geplant durchzuführen.

Meine Familie und meine Freunde waren eine großartige Unterstützung im privaten Umfeld.

9. Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: