

Aus der Frauenklinik  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

# **Die Rolle von p16-Alterationen im metastasierten Endometriumkarzinom**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(Doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Christa Schwarzenau-Szydłowski

aus Hannover

Magdeburg 2010

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung

Schwarzenau-Szydłowski, Christa:

Die Rolle von p16-Alterationen im metastasierten Endometriumkarzinom. 2010. 68 Bl.: 17 Abb., 11 Tab., 139 Lit.

Magdeburg, Med. Fakult., Diss.

## Kurzreferat

Das Endometriumkarzinom stellt das häufigste Malignom des weiblichen Genitaltrakts dar, tritt vornehmlich postmenopausal auf und ist ätiologisch eng mit einem Ungleichgewicht zwischen Östrogen und Progesteron verknüpft. Es werden zwei verschiedene pathogenetische Typen unterschieden: Typ I wird hauptsächlich durch endometrioiden Karzinome vertreten und entsteht auf der Grundlage eines Östrogenüberschusses über die Hyperplasie, während Typ II v.a. serös-papilläre Karzinome hervorbringt und sich auf der Basis eines atrophischen Endometriums entwickelt. Für jeden dieser pathogenetischen Typen konnte ein Progressionsmodell aufgestellt werden, in dessen Verlauf die Alteration bestimmter Gene eine Rolle spielt. Es ist postuliert worden, dass das Tumorsuppressorgen p16 bei beiden Typen zu einem späten Zeitpunkt während der Karzinogenese verändert wird. In der vorliegenden Studie wurden daher anhand von 89 primären Endometriumkarzinomen und 38 Metastasen/ Rezidiven Untersuchungen hinsichtlich genetischer und epigenetischer Veränderungen des p16-Gens vorgenommen, um deren Rolle bei der Metastasierung zu analysieren. Hierzu erfolgte die Methylierungsanalyse mit Hilfe der methylierungsspezifischen PCR (MSP) sowie die Deletionsanalyse mittels PCR-Technik. Außerdem wurde die Proteinexpression mittels immunhistochemischer Färbetechnik bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Alterationen des p16-Gens in metastasierten Primärtumoren signifikant häufiger auftreten als in nicht metastasierten Primärtumoren und eine Verminderung der Proteinexpression bewirken. In den Metastasen selbst scheinen die p16-Veränderungen dann noch weiter zuzunehmen. Möglicherweise können p16-Alterationen im Endometriumkarzinom also als Progressionsmarker dienen. Mitunter liefert dieses Wissen auch neue Therapieansätze, die das rezidivfreie Überleben verlängern könnten.

# Schlüsselwörter

Alterationen, genetische und epigenetische

Deletionen

Endometriumkarzinom

Epigenetik

Immunhistochemie

Korpuskarzinom

Metastasen

Methylierung

Mutation

p16

Proteinexpression

Tumorsuppressorgen

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1 Einführung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie des Endometriumkarzinoms	1
1.2 Ätiologie des Endometriumkarzinoms	1
1.3 Histopathogenetische Typen des Endometriumkarzinoms	2
1.4 Molekulare Pathogenese des Endometriumkarzinoms	3
1.4.1 Molekulargenetische Grundlagen der Karzinogenese	3
1.4.2 Progressionsmodelle des Endometriumkarzinoms	6
1.4.3 Bedeutung einzelner molekularer Marker	9
1.4.4 Das Tumorsuppressorgen p16	10
1.5 Biologisches Verhalten und Prognosefaktoren des Endometriumkarzinoms	12
1.6 Zielstellung der Arbeit	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Material	15
2.1.1 Untersuchungsmaterial	15
2.1.2 Charakteristik des Kollektivs	15
2.1.3 Verwendete Chemikalien	16
2.1.4 Verwendete Geräte	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Molekulargenetische Methoden	19
2.2.1.1 DNA-Isolation	19
2.2.1.2 Kontroll-PCR	20
2.2.1.3 PCR zur p16-Gen-Deletionsanalyse	21
2.2.1.4 Methylierungsspezifische PCR (MSP)	23
2.2.1.5 Elektrophorese	26
2.2.1.5.1 Herstellung und Anwendung von Elektrophoresegele	26
2.2.1.5.2 Färbung der Elektrophoresegele	28
2.2.2 Immunhistochemische Methoden	28
2.2.2.1 Immunhistochemische Färbung	28
2.2.2.2 Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen	29
2.2.3 Statistische Auswertung	29

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<i>3.1 Validierung des Kollektivs</i>	30
<i>3.2 DNA - Analysen</i>	32
3.2.1 Methylierungsanalyse	32
3.2.2 Deletionsanalyse	34
3.2.3 p16-Alterationen	36
<i>3.3 Immunhistochemische Analyse der p16-Proteinexpression</i>	38
3.3.1 p16-Proteinexpression als Prognosefaktor	39
3.3.2 p16-Proteinexpression in Abhängigkeit von DNA - Alterationen	41
<i>3.4 Vergleich von Primärtumoren und Metastasen</i>	42
3.4.1 Vergleich der genetischen und epigenetischen p16-Alterationen	42
3.4.2 Vergleich der p16-Proteinexpression	44

<b>4 Diskussion</b>	<b>45</b>
<i>4.1 Validierung des Kollektivs</i>	45
<i>4.2 DNA - Alterationen des Tumorsuppressors p16</i>	46
4.2.1 Promotormethylierung	46
4.2.2 Deletionen	49
4.2.3 p16-Alterationen	50
<i>4.3 p16-Proteinexpression</i>	52
4.3.1 Diskussion der immunhistochemischen Methodik	53
4.3.2 p16-Proteinexpression als Prognosefaktor	54
4.3.3 p16-Proteinexpression in Abhängigkeit von genetischen Alterationen	55
<i>4.4 Vergleich von Primärtumoren und Metastasen</i>	56
<i>4.5 Klinische Bedeutung der Ergebnisse</i>	57

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
--------------------------	-----------

## Literaturverzeichnis

## Danksagung

## Erklärung

## Darstellung des Bildungsweges

## Publikationen

## Originalarbeit "p16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma"

# Abkürzungsverzeichnis

AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cyclin dependent kinase = cyclinabhängige Kinase
CDK4I	CDK4-Inhibitor
CHES	Cyclohexylaminoethansulfonsäure
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DNA	Desoxyribonucleid acid = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	endometriales intraepitheliales Karzinom
EmGD	endometriale glanduläre Dysplasie
FAMMM-Syndrom	Familial atypical multiple mole-melanoma Syndrome = Nävusdysplasie-Syndrom
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique = Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase-Komplex
HE	Hämatoxylin-Eosin
kD	kiloDalton
Konz.	Konzentration
LOH	Loss of heterozygosity = Verlust der Heterozygotie
MBD	(Protein mit) Methyl-bindender Domäne
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSP	Methylierungsspezifische PCR
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Piperizinamid
Rb	Retinoblastomprotein
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
sog.	so genannt
SSCP	single strand conformation polymorphism = Einzelstrang-Konformations-polymorphismus (-Analyse)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	Unter anderem
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

# 1 Einführung

## 1.1 Epidemiologie des Endometriumkarzinoms

Mit einem Anteil von knapp 6% an allen Malignomen der Frau stellt das Endometriumkarzinom nach Mamma-, Bronchial- und kolorektalem Karzinom die vierthäufigste Krebslokalisation bei Frauen der westlichen Welt dar (1,2). Bezogen auf den weiblichen Geschlechtstrakt ist es somit das am häufigsten auftretende Malignom.

Die Inzidenzrate ist stark altersabhängig: bis zum 50. Lebensjahr tritt das Endometriumkarzinom nur selten auf (Inzidenzraten in Deutschland unter 10 pro 100.000 Frauen pro Jahr), zwischen dem 50. und 55. Lebensjahr steigt die Inzidenzrate dann sprunghaft auf knapp 32 pro 100.000 an und erreicht zwischen dem 75. und 80. Lebensjahr mit circa 86 Fällen pro 100.000 ihr Maximum (1). Werden die altersspezifischen Inzidenzraten durch die Hysterektomieraten korrigiert, fallen erstere noch höher aus (3). Die seit den 1980er Jahren leicht rückläufige Entwicklung der Neuerkrankungen erklärt sich dementsprechend durch die steigende Häufigkeit dieser Operation.

Auch die Mortalitätsrate steigt mit dem Alter an und beträgt bei Patientinnen über 85 Jahren in Deutschland 45 pro 100.000 Frauen, beläuft sich altersstandardisiert aber lediglich auf etwa 3 pro 100.000 Frauen. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 82% und einem Anteil von knapp 3% an allen Todesfällen durch Tumoren zählt das Endometriumkarzinom zu den prognostisch günstigen Tumorentitäten (1).

## 1.2 Ätiologie des Endometriumkarzinoms

Im Laufe des normalen menstruellen Zyklus ist das Endometrium einem morphologischen Wandel unterworfen, der durch die Wirkung von wechselnden Konzentrationen an Östradiol und Progesteron bedingt ist. Ansteigende Östradiolspiegel regen die endometrialen Drüsen, Stromazellen und Endothelien zur Proliferation an, während Progesteron als Gegenspieler einer weiteren Proliferation Einhalt gebietet und die Differenzierung in sekretorisches Endometrium induziert. Folgerichtig führt eine langanhaltende ungebremste Östradiolwirkung zu gesteigerter Mitoseaktivität und fehlendem Abbau des Endometriums, so dass sich eine endometriale Hyperplasie ausbilden kann. In dieser wiederum ist durch die hohe Proliferationsaktivität das Risiko von Replikationsfehlern und somatischen Mutationen erhöht, die die Entwicklung einer atypischen Hyperplasie und schließlich eines Endometriumkarzinoms verursachen können (4). Daher gelten Bedingungen, die mit einem Ungleichgewicht zwischen Östrogenen und Progesteron einhergehen, zu den Risikofaktoren des

Endometriumkarzinoms. Dazu gehören Adipositas (5,6), Diabetes mellitus Typ II (7,8), das Syndrom polyzystischer Ovarien (PCO-Syndrom) (9), Nulliparität (10,11), eine frühe Menarche und späte Menopause (10,12), sowie die Östrogenmonotherapie als Hormonersatztherapie (5), während eine hohe Zahl an Schwangerschaften (12), die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Kombinationspräparate aus Östrogen und Progesteron) in der Anamnese (11,13), Rauchen (14,7) und regelmäßige körperliche Aktivität (15) als protektive Faktoren gelten. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass nur ein Typ des Endometriumkarzinoms auf übermäßige Östrogeneinwirkung zurückzuführen ist, worauf im folgenden Unterkapitel näher eingegangen wird.

Östrogenunabhängige Risikofaktoren sind höheres Alter, wie die in Abschnitt 1.1 beschriebene altersspezifische Inzidenz zeigt, und eine genetische Prädisposition wie sie insbesondere beim hereditären nonpolypösen Kolonkarzinom (HNPCC)- Syndrom (Lynch-Syndrom) vorkommt (16). Ferner konnte eine langfristige Einnahme von Tamoxifen, das als Therapeutikum beim Mammakarzinom eingesetzt wird, als Risikofaktor identifiziert werden (17,18). Das anamnestisch eruierebare Mammakarzinom an sich stellt allerdings auch einen eigenständigen Risikofaktor dar (19).

### **1.3 Histopathogenetische Typen des Endometriumkarzinoms**

Anfang der 1980er Jahre wurde von Bokhman die noch heute gültige Theorie eingeführt, dass es zwei unterschiedliche pathogenetische Typen des Endometriumkarzinoms gibt (20). Der östrogenabhängige Typ I wird wie unter Abschnitt 1.2 beschrieben durch eine uneingeschränkte Östrogenwirkung, die nicht von Progesteron antagonisiert wird, hervorgerufen und entwickelt sich über die Hyperplasie fort. Der hormonelle Einfluss zeichnet sich einerseits in erhöhten Östrogenspiegeln im Blut der Patientinnen ab (21) und drückt sich andererseits in der erhöhten Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in den Tumorzellen aus (22). Der seltenere Typ II lässt sich dagegen nicht mit einem Ungleichgewicht zwischen Östrogenen und Progesteron erklären und entsteht auf dem Boden eines atrophen Endometriums. Patientinnen dieses Typs sind mit einem durchschnittlichen Alter von 65 Jahren sechs Jahre älter als Patientinnen mit einem Typ I -Karzinom (23).

Der Typ I macht mit etwa 80% aller sporadischen Karzinome des Endometriums die häufigere Erscheinungsform aus (24) und bietet mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 86% die deutlich günstigere Prognose als Typ II, der lediglich eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 59% aufweist (20). Damit einher gehen beim Typ II eine schlechtere Differenzierung, tiefere myometriale Invasion und häufigere Lymphknotenmetastasierung bei Diagnosestellung. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich den beiden pathogenetischen Typen auch unterschiedliche histologische Varianten zuordnen lassen (23). So sind mit dem Typ I die histologischen Formen assoziiert, deren Morphologie nur in eher geringem Maße vom Bild der normalen glandulären Struktur des Endometriums abweicht. Darunter fallen endometrioides und squamöses Adenokarzinome, sowie das Adenokankroid. Oft finden



sich in diesen Tumoren auch muzinöse Komponenten. Unter Typ II- Karzinomen finden sich dagegen serös- papilläre, klarzellige und auch anaplastische Morphologien wieder.

## **1.4 Molekulare Pathogenese des Endometriumkarzinoms**

### **1.4.1 Molekulargenetische Grundlagen der Karzinogenese**

Die Entstehung eines malignen Tumors, gleich welcher Art, setzt voraus, dass die normalen Regulationsmechanismen des Zellzyklus einer Zelle außer Kraft gesetzt sind und es auf diese Weise zu unkontrolliertem Wachstum innerhalb eines Gewebeverbandes kommen kann. Für die Ausschaltung der Regulationsmechanismen werden Mutationen in unterschiedlichen Genklassen verantwortlich gemacht. Zu diesen gehören die sog. Proto-Onkogene, die an den normalen Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Zelle beteiligt sind, jedoch zu Onkogenen mutieren und dann den Zellzyklus beschleunigen können. Unkontrollierte Proliferation setzt aber auch ein, wenn Tumorsuppressorgene ihre Funktion verlieren. Diese Gene sind in der gesunden Zelle dafür verantwortlich, dass der Zellzyklus z.B. bei DNA-Schäden angehalten und ggf. der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet werden kann. Viele DNA-Schäden und Replikationsfehler können durch Reparaturgene wie z.B. Mismatch-Repair-Gene wieder korrigiert werden. Sind solche Reparaturgene aber selbst mutiert, kommt es zu einer Anhäufung von fehlerhaften DNA-Sequenzen und damit zu einer immer größer werdenden genetischen Instabilität, die einer Karzinogenese Vorschub leistet (25).

Die Schädigung eines Allels ist für den Funktionsverlust des entsprechenden Gens jedoch nicht unbedingt ausreichend. Nach der "Two-Hit-Theorie" von Knudson sind für eine bezüglich der Karzinogenese wirksame Mutation zwei Treffer nötig (26). Bei hereditären Tumoren ist ein sog. Hit schon durch eine Keimbahnmutation in dem betreffenden Gen gewährleistet, es liegt also ein Verlust der Heterozygotie (LOH) vor. Der zweite Treffer erfolgt dann in Form einer somatischen Mutation. Bei sporadischen Tumoren finden beide Hits in der somatischen Zelle statt.

Ein Hit kann ganz unterschiedliche Formen annehmen: ein Gen oder Teile davon können entweder durch Chromosomen(arm)verlust oder große Deletionen ganz verloren gehen oder aber die kodierende Sequenz wird durch eine kleinere Mutation, mitunter auch nur eine Punktmutation, verändert (27). Es gibt aber auch die Möglichkeit, dass die DNA-Sequenz selbst unangetastet bleibt und die Transkription durch sog. epigenetische Phänomene unterdrückt wird (28).

## Epigenetische DNA-Modifikation als Mechanismus der Karzinogenese

Das Feld der Epigenetik ist in den letzten Jahren intensiv beforscht worden. Zwei Mechanismen konnten identifiziert werden, die bei der Karzinogenese eine Rolle spielen: Modifikationen der Histone, die dazu führen, dass das Chromatin lockerer oder dichter gepackt und somit der Transkription zugänglich oder unzugänglich gemacht werden kann (29), und Methylierungen von CpG (Cytosinphosphatidyl-Guanosin)-Dinukleotiden innerhalb bestimmter regulatorischer Sequenzen, v.a. im Bereich von Promotoren. Dabei kann sowohl die Hypomethylierung von Genen eine Rolle spielen, die zu einer Aktivierung der Genexpression führt und daher in der Karzinogenese v.a. an Onkogenen von Bedeutung ist, als auch die Hypermethylierung, die die Transkription blockiert und somit an Tumorsuppressorgenen von besonderem Interesse ist (30). Da sich diese Arbeit mit einem Tumorsuppressorgen beschäftigt, soll im Folgenden auf die Hypermethylierung näher eingegangen werden.

Zunächst muss darauf hingewiesen werden, dass DNA-Methylierung in Säugetierzellen ein ubiquitäres Verfahren ist das gewebespezifische Genexpressionsmuster festzulegen (31). Auf diese Weise können sich während der Embryogenese verschiedene Gewebe differenzieren, obwohl alle Zellen des Körpers die gleiche genetische Ausstattung in Form der DNA-Sequenz besitzen (32).

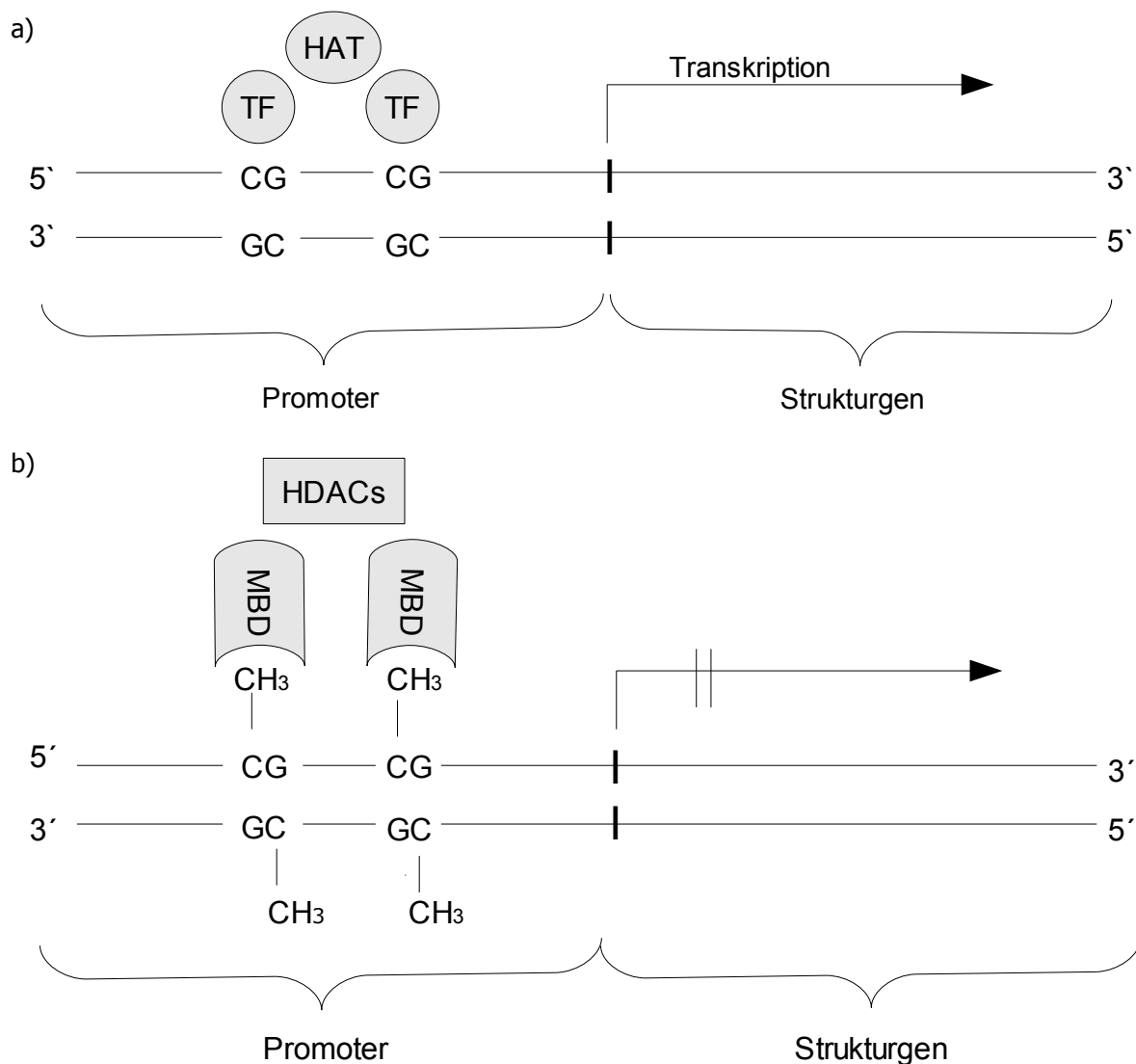
Für die Einführung und die Aufrechterhaltung der Methylierung gibt es verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMT), die an der 5'-Position des Cytosins eines CpG-Dinukleotids eine Methylgruppe anfügen. Die als erstes identifizierte DNMT1 hat eine hohe Affinität zu hemimethylierter DNA wie sie bei der Replikation eines methylierten DNA-Stranges entsteht, wenn der ursprüngliche Doppelstrang auf zwei Tochterzellen aufgeteilt wird (33). Sie dient also hauptsächlich der Erhaltung des gewebespezifischen Methylierungsmusters bei der Zellteilung. Die DNMT3-Familie (DNMT3a, 3b und der 3a-Regulator 3L) ist dagegen in der Lage sowohl an hemimethylierter als auch an unmethylierter DNA Methylgruppen einzufügen, weshalb ihnen die Funktion der de-novo-Methylierung zugeschrieben wird (34). Eine weitere Methyltransferase, DNMT2, konnte identifiziert und geklont werden, jedoch gelang bisher nicht der Nachweis einer katalytischen Aktivität und ihre Inaktivierung in embryonalen Stammzellen blieb ohne Folgen (35).

Für die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen in Tumoren sind sowohl die DNMT3-Familie als auch die DNMT1 von Bedeutung, denn während die eine Klasse für die Initiierung der Methylierung verantwortlich ist, garantiert die andere die Aufrechterhaltung des neu erworbenen Methylierungsprofils (36).

Auf der Suche nach der Wirkungsweise der Methylierung von regulatorischen CpG-Inseln stellte sich heraus, dass Methylierung und Histonmodifikation keine gänzlich voneinander unabhängige Mechanismen der epigenetischen Geninaktivierung darstellen. Proteine mit Methyl-CpG bindenden Domänen (MBD) rekrutieren nämlich einen Histon-Deacetylase-Komplex (HDAC), der über die Deacetylierung von Histonen zu einer geschlossenen Form des Chromatins führt und dadurch die Transkription des entsprechenden Genabschnitts verhindert (37). Wird die Methylierung mit Hilfe eines

demethylierenden Agens aufgehoben, werden die MDB freigesetzt und über Transkriptionsfaktoren setzen Histon-Acetyltransferasen (HAT) an, die durch die Acetylierung von Histonen eine aufgelockerte Chromatinstruktur zur Folge haben (38). Die bildliche Gegenüberstellung von den Aktivitäten an methylierten und unmethylierten CpG-Inseln im Bereich von Promotoren findet sich in Abbildung 1.1.

Wie die immer neuen Entdeckungen von Proteinen und Modifikationen, die die Chromatinstruktur verändern und mit Methylierungen interagieren, ahnen lassen, ist die epigenetische Regulation von Genen äußerst komplex und wartet noch auf weitere Erforschung.



**Abb. 1.1:** Der Mechanismus der Promotormethylierung (in Anlehnung an die Abb. von Herman und Baylin (28)

a) unmethylierte CpG-Dinukleotide im Promotorenbereich (HAT= Histon-Acetyltransferase; TF= Transkriptionsfaktor)

b) methylierte CpG-Dinukleotide im Promotorenbereich (HDAC= Histon-Deacetylase-Komplex; MBD= Methyl-CpG bindende Domänen)

## 1.4.2 Progressionsmodelle des Endometriumkarzinoms

Viele verschiedene Gene konnten als Angriffspunkt von genetischen und epigenetischen Veränderungen während der Karzinogenese identifiziert werden. Das Muster aus alterierten Genen ist dabei einerseits tumorspezifisch und andererseits häufig auch zeitlich determiniert. So konnten neben der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms (39) beispielsweise auch für das Pankreaskarzinom (40) und das Urothelkarzinom (41) Progressionsmodelle erarbeitet werden, die eine bestimmte Reihenfolge von Genausfällen während der Karzinogenese beschreiben.

Ebenso konnten bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms typische frühe und späte Genaberrationen aufgedeckt werden. Der unterschiedlichen Pathogenese der beiden Typen des Endometriumkarzinoms Rechnung tragend konnten zwei Progressionsmodelle entwickelt werden.

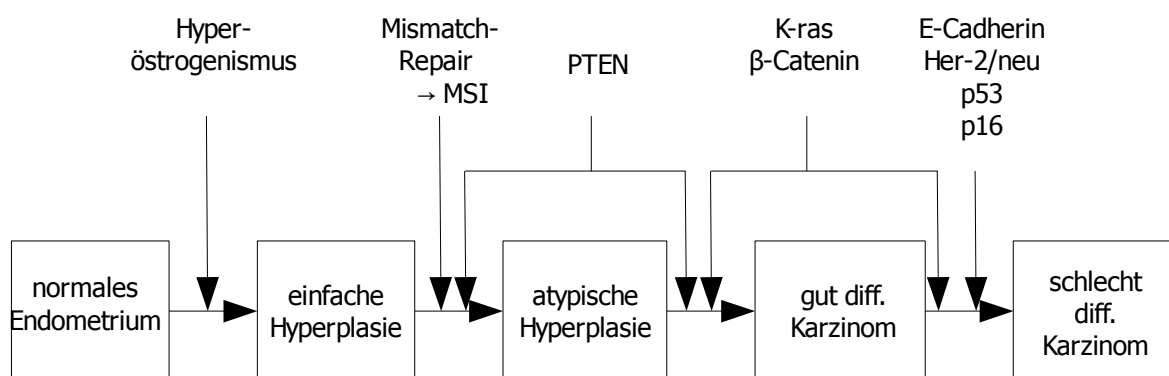
### Progression des Typ I-Karzinoms

Wie bereits unter Abschnitt 1.2 und 1.3 beschrieben entwickelt sich das Typ I-Karzinom unter Östrogeneinwirkung über die atypische Hyperplasie, die im Gegensatz zur einfachen endometrialen Hyperplasie bereits monoklonales Wachstum beinhaltet und insofern als intraepitheliale Neoplasie gilt (42). In ihr finden sich auch schon Veränderungen in Mismatch-Repair-Genen, u.a. in ca. 41% der Hyperplasien in Form von Hypermethylierungen des hMLH1-Gens, die dann zu Mikrosatelliteninstabilität (MSI) führen und Frameshift-Mutationen im Tumorsuppressorgen PTEN verursachen können (43). Doch auch viele andere Mutationen von PTEN wie Deletionen, Insertionen und Missense-Mutationen spielen eine große Rolle in der frühen endometrialen Karzinogenese: in bis zu 33% der untersuchten Hyperplasien konnten solche Mutationen nachgewiesen werden (44). Eine andere Studie konnte die Bedeutung dieser Veränderungen in Bezug auf die Fortentwicklung zum Karzinom herausstellen: während PTEN-Mutationen in nur etwa 8% der Hyperplasien aufgespürt werden konnten, auf die in den nachfolgenden ein bis zwei Jahrzehnten kein Karzinom folgten, waren es in den Hyperplasien mit darauffolgend nachgewiesenem Karzinom 28% (45). Ebenfalls zu den frühen Veränderungen zählen Aktivierungen des Proto-Onkogens K-ras und Modifikationen des Adhäsions- und Signaltransduktionsmoleküls  $\beta$ -Catenin, die beide ab der atypischen Hyperplasie nachgewiesen werden können, jedoch in Karzinomen noch weitaus häufiger anzutreffen sind (46,47, 48).

Zu den eher späten Progressionsschritten zählen die Ausschaltung des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, die hauptsächlich über die Promotorhypermethylierung verwirklicht wird (49), und die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (50). Beiden gemeinsam ist, dass sie in der atypischen Hyperplasie nicht oder nur selten nachzuweisen sind, im Karzinom dafür dann aber mit zunehmender Entdifferenzierung immer häufiger auftreten und mit invasivem Verhalten assoziiert sind. Auch Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors Her-2/neu (= c-erbB-2) durch Amplifikationen des entsprechenden

Onkogens und Alterationen des Tumorsuppressorgens p16 sind mit Entdifferenzierung bzw. hohem klinischem Stadium und schlechter Prognose assoziiert und werden deshalb zu den späten Progressionsfaktoren gezählt, die einem Teil der endometrioiden Karzinome zu ungewöhnlicher Aggressivität verhelfen (51,52).

Natürlich ist davon auszugehen, dass weitere genetische Veränderungen in noch komplexeren Zusammenhängen bei der Karzinogenese des endometrioiden Endometriumkarzinoms eine Rolle spielen. Der hier umrissene Entwurf eines Progressionsmodells erhebt also keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern soll die typischen genetischen Veränderungen, die bisher für die Tumorgenese des Typ I- Karzinoms identifiziert werden konnten, darlegen. Eine übersichtliche Darstellung findet sich in Abbildung 1.2.



**Abbildung 1.2:** Progressionsmodell des Typ I -Karzinoms (diff.= differenziertes)

### Progression des Typ II -Karzinoms

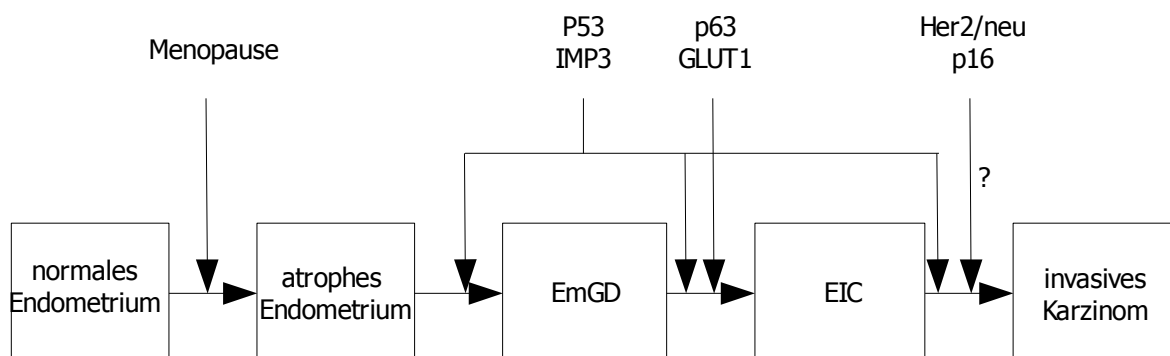
Von dem selteneren Typ II -Karzinom wird angenommen, dass es sich im Gegensatz zum Typ I-Tumor im atrophem Endometrium entwickelt ohne den Weg über eine Hyperplasie zu gehen (s. Kapitel 1.3). Dennoch konnte kürzlich auch dem Typ II -Karzinom eine sehr frühe Vorläuferläsion zugeordnet werden: die endometriale glanduläre Dysplasie (EmGD), die im Vergleich zum normalen Endometrium bereits in ca. 43% der Fälle eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 beherbergt (53). Auch in der weiteren Progression bleiben p53- Mutationen von großer Bedeutung: in der nächsten Entwicklungsstufe, dem endometrialen intraepithelialen Karzinom (EIC), das als maligne Veränderung des Oberflächenepithels definiert ist, lassen sie sich in knapp 80% der Fälle nachweisen und finden sich in identischer Form auch in synchronen serösen Karzinomen wieder (54). Von den wenigen Fällen der EIC, in denen noch keine p53- Mutation vorliegt, akquirieren auf dem Weg zum invasiven Karzinom noch weitere diese Modifikation, so dass ungefähr 90% aller Typ II -Karzinome p53-Abwandlungen aufweisen (54). Mit einer Überexpression von p53 geht oft auch der Nachweis einer erhöhten p63-Aktivität einher. Dieses Protein gehört zur gleichen Familie von Transkriptionsfaktoren

wie p53 und zeigte sich in einer Studie an 12 EIC in 75% der Fälle (55). Noch höher lag in der gleichen Studie auf dieser Ebene die Expression des Glukosetransporters GLUT1, die sich auf 92% bezifferte und in invasiven Typ II -Karzinomen sogar auf 100% stieg.

Ebenfalls früh und im Laufe der Entwicklung stark ansteigend lässt sich die Expression des Insulin-like growth factor II mRNA-binding Proteins (IMP3) detektieren, das als RNA-bindendes Protein die Translation regulieren kann und nur im fetalen Gewebe regulär ausgeprägt wird, sich jedoch auch in malignen Tumoren vorfinden lässt. In der EmGD lässt es sich in ca. 14% der Fälle nachweisen, im EIC dann aber in etwa 89% und im invasiven Karzinom in etwa 94% (56).

Zu den späten Veränderungen in der Dynamik der Typ II -Karzinogenese gehört wahrscheinlich die Her-2/neu-Überexpression. Dafür spricht zumindest die Tatsache, dass diese vor allem in klinisch fortgeschrittenen Typ II -Karzinomen vorkommt und mit kürzeren Überlebenszeiten korreliert ist (57). Untersuchungen in Vorläufern des invasiven Karzinoms gibt es dazu aber leider nicht, so dass eine nähere Eingrenzung des Auftrittszeitpunktes derzeit nicht möglich ist. Ähnlich verhält es sich mit p16-Alterationen. Sie können ebenso wie beim Typ I -Karzinom in etwa einem Drittel der Fälle nachgewiesen werden und stehen mit einer schlechten Prognose im Zusammenhang (52), doch können mangels geeigneter Studien keine Aussagen bezüglich des Zeitpunktes dieser Modifikationen gemacht werden.

Auffällig im Gegensatz zum Typ I -Karzinom ist, dass die verschiedenen beschriebenen zellulären Aberrationen bei einem sehr hohen Anteil der Typ II -Karzinome feststellbar sind. Dies deutet auf einen eher einheitlichen Verlauf der Karzinogenese. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass Studien an Typ II -Karzinomen aufgrund der Seltenheit der Tumoren stets durch die Fallzahlen limitiert sind, und viele Facetten der molekularen Genese mit hoher Wahrscheinlichkeit noch nicht entdeckt sind. Ein bildlicher Überblick des hier beschriebenen Progressionsmodells ist in Abbildung 1.3 zu finden.



**Abbildung 1.3:** Progressionsmodell des Typ II-Karzinoms (EmGD= endometriale glanduläre Dysplasie; EIC= endometriales intraepitheliales Karzinom)

### 1.4.3 Bedeutung einzelner molekularer Marker

Wie die vorhergehend beschriebenen Progressionsmodelle aufzeigen, ist während der Karzinogenese ein komplexes Zusammenspiel aus molekulargenetischen Veränderungen für das Fortschreiten der Tumorerkrankung verantwortlich. Ein einzelner molekularer Marker kann daher niemals allein die weitere Entwicklung des Tumors vorhersagen, aber dennoch scheint es im Verlauf einige Schlüsselmarker (sog. "candidate genes") zu geben, die besonderen Einfluss auf das klinische Verhalten des Tumors haben (58). So ist zum Beispiel eine p53-Überexpression im Endometriumkarzinom mit einem kürzeren Überleben assoziiert (59,60), sowie die Methylierung von PTEN mit dem Auftreten von Metastasen (61).

Beim erblichen Endometriumkarzinom im Rahmen des HNPCC-Syndroms gehören Defekte der Mismatch-Repair-Gene mit dem Resultat der Mikrosatelliteninstabilität zur Pathogenese, so dass Untersuchungen in dieser Hinsicht, u.a. auch die Methylierungsanalyse des hMLH1-Gens, zur Diagnostik dieses Syndroms beitragen können (62).

Da auch das p16-Gen als sog. "Kandidatengen" im Endometriumkarzinom gilt und erst spät während der Karzinogenese verändert vorliegt (s. 1.4.2), erscheint seine Untersuchung insbesondere in Hinblick auf die Metastasierung des Endometriumkarzinoms als lohnenswert und soll in dieser Arbeit vorgenommen werden.

Neben dem Verständnis der Tumorphathogenese ruht auf der Untersuchung von molekularen Markern aber auch die Hoffnung, sie für sog. "targeted therapies", also zielgerichtete Therapien, nutzen zu können, welche in der Onkologie zusehends an Bedeutung gewinnen. Als Beispiel sei hier die Anwendung von Trastuzumab, einem Antikörper gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2-neu, beim Mammakarzinom genannt, der mittlerweile als etablierte Substanz beim HER2-neu-positivem Mammakarzinom gilt (63). Beim Endometriumkarzinom sind die Erfahrungen mit solchen zielgerichteten Therapieansätzen zwar noch sehr limitiert, scheinen aber gerade in Hinblick auf die geringe Chemosensibilität des Tumors und das meist günstigere Toxizitätsprofil der zielgerichteten Therapeutika im Vergleich zu den üblichen Zytostatika bei dem üblicherweise betagten und multimorbiden Patientenkollektiv ein lohnenswertes Forschungsgebiet darzustellen.

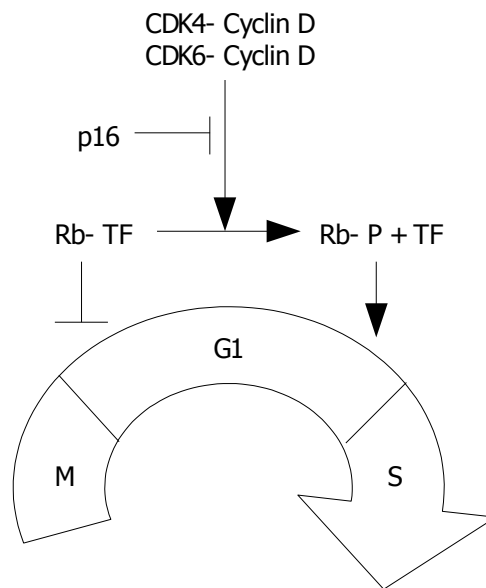
#### 1.4.4 Das Tumorsuppressorgen p16

Das p16-Gen, auch CDKN2A genannt, liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 (an der Stelle 9p21) und beinhaltet drei Exons. Da diese Region in vielen verschiedenen Tumorzelllinien deletiert oder von anderen Mutationen betroffen ist, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Gen um ein Tumorsuppressorgen handeln könnte (64,65). Diese These wurde durch die Beobachtung gestützt, dass eine Keimbahnmutation des p16-Gens in vielen Familien mit Nävusdysplasie-Syndrom (FAMMM-Syndrom) vorzufinden ist (66) und in homozygoter Form im Mausmodell die Empfindlichkeit auf karzinogene Substanzen erhöht und die Entwicklung von verschiedenen spontanen Tumoren in jungem Alter fördert (67). Die Autoren der letztgenannten Studie merkten jedoch auch an, dass die erhöhte Tumorsuszeptibilität bei Deletion des 9p21-Locus möglicherweise nicht allein durch das Fehlen des p16-Gens zu erklären ist, sondern auch durch den Verlust des Zellzyklusregulators p19 (= p14 im Menschen), der durch alternatives Spleißen desselben Primärtranskripts im Bereich von Exon 1 und ein alternatives Leseraster entsteht. Offensichtlich ist aber tatsächlich das p16-Gen der eigentliche Angriffspunkt von Mutationen in diesem Bereich, denn in einer parallelen Analyse von p16- und p19 (p14)-Mutationen in verschiedenen Tumorzelllinien und Primärtumoren konnten zwar Veränderungen im p16-Gen aufgespürt werden, jedoch keine Mutationen innerhalb der p19 (p14)-Sequenz (68). Eine gleichzeitige Ausschaltung beider Gene ist also nur bei großen Deletionen nicht auszuschließen (69).

Die Häufigkeit, mit der das p16-Gen in den verschiedensten Neoplasien mutiert vorgefunden wurde, brachte ihm auch den Namen Multipler Tumorsuppressor 1 (MTS1) ein. Die Inaktivierung des Gens erfolgt dabei nicht nur über große Deletionen, die zu dem häufig anzutreffenden LOH führen, und über kleinere Veränderungen der DNA-Sequenz, sondern auch über die Promotorhypermethylierung (70).

Das Genprodukt von p16 ist ein 16 kD großes Protein mit der Fähigkeit die cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4 und CDK6) zu inhibieren, woraus auch das Synonym CDK4-Inhibitor (CDK4I) resultiert. Ohne Einwirkung von p16 phosphorylieren CDK4 und CDK6 im Komplex mit Cyclin D das Retinoblastomprotein (Rb), welches daraufhin die gebundenen Transkriptionsfaktoren entlässt und auf diese Weise die Replikation in der S-Phase ermöglicht. In Anwesenheit von p16 kann die Phosphorylierung von Rb nicht erfolgen, so dass die Transkriptionsfaktoren an Rb gebunden bleiben und der Übergang in die S-Phase verhindert wird. Von Bedeutung ist dieser in Abbildung 1.4 illustrierte Mechanismus am Restriktionspunkt, an dem p16 als typischer Tumorsuppressor z.B. bei DNA-Schäden dafür sorgen kann, dass der Zellzyklus angehalten wird, so dass die Schäden entweder repariert werden oder die Apoptose eingeleitet werden kann. In Zellkulturen wird dieser Mechanismus auch als Faktor für den G1-Arrest während des Alterungsprozesses von Zellen verantwortlich gemacht (71,72). Voraussetzung für einen Zellzyklusstopp ist jedoch aufgrund der Wirkungsweise immer die Existenz von intaktem Retinoblastomprotein (73).





**Abbildung 1.4:** Funktion von p16 im Zellzyklus (adaptiert nach (63))  
 (TF= Transkriptionsfaktor, Rb = Retinoblastomprotein, Rb-P = phosphoryliertes Retinoblastomprotein)

Als Zellzyklusinhibitor wirkt p16 also antiproliferativ, während seine Inaktivierung einer Tumorprogression Vorschub leisten kann.

Dies verhält sich im Endometriumkarzinom nicht different von anderen Tumoren. In dieser Neoplasie scheinen p16-Alterationen, wie anhand der Progressionsmodelle unter 1.4.2 bereits aufgezeigt, vornehmlich in fortgeschrittenen Stadien aufzutreten. So nehmen Veränderungen des p16-Gens sowohl mit dem FIGO-Stadium als auch mit dem Differenzierungsgrad zu und scheinen einen ungünstigen Einfluss auf das Überleben der Patientinnen zu haben (74). Dies schlägt sich auch in der Genexpression nieder: mit steigendem Tumorstadium und zunehmender Entdifferenzierung sinkt das immunhistochemisch nachweisbare p16-Protein (75).

Bisherige Studienergebnisse erwecken also den Eindruck, dass das p16-Gen und dessen Transkriptionsprodukt in der Progression des Endometriunkarzinoms eine wichtige Rolle spielen.

## 1.5 Biologisches Verhalten und Prognosefaktoren des Endometriumkarzinoms

Wie im Kapitel 1.1 dargelegt gehört das Endometriumkarzinom zu den prognostisch günstigen Tumoren. Einerseits fällt es oft schon in niedrigem Stadium durch postmenopausale Blutungen auf und kann daher früh erkannt werden, andererseits besitzt es kein besonders hohes Potenzial hämatogen zu streuen. Stattdessen schreitet es häufig lokal fort und infiltrierte per continuitatem benachbarte Strukturen. Rezidive treten folglich hauptsächlich als Lokalrezidive auf, während Fernmetastasen selten anzutreffen sind und am ehesten lymphogen oder kavitär entstehen. Mehrere Faktoren, die im Folgenden aufgeführt werden sollen, sind für die Prognose der Erkrankung entscheidend, wesentlich ist aber die Operabilität, die wiederum vom Ausbreitungsstadium abhängt. Im Gegensatz zu lokal begrenzten Primärtumoren bzw. Rezidiven, die der operativen Therapie gut zugänglich sind, weisen Tumoren mit starker Infiltration und Ausdehnung eine schlechte Prognose auf, zumal die Behandlungsoptionen in diesen Fällen äußerst begrenzt sind. Dies lässt sich einerseits auf die begrenzte Chemosensibilität des Endometriumkarzinoms zurückführen und beruht andererseits auf der Problematik des eher alten und oft multimorbiden Patientengutes, für welches die meisten Zytostatika-Schemata nur schlecht verträglich sind. Um die Prognose auch bei diesen fortgeschrittenen Fällen mit möglicherweise hohem Morbiditätsprofil zu verbessern, erscheint die Untersuchung von möglichen Angriffspunkten für zielgerichtete Therapien mit günstigen Toxizitätseigenschaften von Bedeutung. Da es beim Endometriumkarzinom jedoch noch keine solche etablierten molekularen Angriffspunkte gibt, sollen im Folgenden zunächst die klassischen Prognosefaktoren vorgestellt werden.

### Stadium

Die Prognose von Tumoren hängt entscheidend davon ab, wie weit sie bei Diagnosestellung schon fortgeschritten sind. Die Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe (FIGO) führte 1988 ein chirurgisches Staging-System für die Einteilung des Endometriumkarzinoms ein, wodurch der operativen Therapie und der pathologischen Beurteilung ein hoher Stellenwert eingeräumt wurde (76). Im Jahr 2000 brachte die FIGO eine überarbeitete Version ihres Klassifikationssystems für gynäkologische Tumoren heraus, was sich auf die Einteilung des Endometriumkarzinoms jedoch nicht auswirkte.

Neben der FIGO-Einteilung besitzt die TNM- Klassifikation der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC) Gültigkeit, bei der Tumorausbreitung (T), Nodalstatus (N), Vorkommen von Fernmetastasen (M) und neuerdings auch Lymphgefäßinvasion (L), Gefäßinvasion (V) und das mögliche Zurückbleiben eines Residualtumors (R) beurteilt werden. Wie in Tabelle 1.1 ersichtlich sind beide Systeme kompatibel und bieten eine gute Möglichkeit der Prognoseeinschätzung.

**Tabelle 1.1:** Tumorstadien des Endometriumkarzinoms und deren Prognose (77)

<b>Tumorausbreitung</b>	<b>FIGO-Stadium</b>	<b>TNM-Klassifikation</b>	<b>5 Jahres-Überleben in %</b>
Carcinoma in situ	0	Tis	Keine Angaben
Begrenzt auf Corpus uteri	I	T1	86 - 93%
Zervixinfiltration	II	T2	73%
Lokale/ regionäre Ausbreitung	III	T3/ jedes T + N1	48%
Infiltration von Rektum/ Blase oder Fernmetastasen	IV	T4/ jedes T + M1	25%

#### Histologischer Typ und Differenzierungsgrad

Auf die Bedeutung des histopathogenetischen Typs für die Prognose wurde bereits in Kapitel 1.3 eingegangen. Die deutlich schlechtere Prognose von Patientinnen mit einem Typ II-Karzinom konnte auch durch eine Studie mit über 41.000 Fällen bestätigt werden (5-Jahres-Überlebensrate bei klarzelligem Karzinom 58% im Gegensatz zu knapp 90% beim endometrioiden Adenokarzinom (77)). Die gleiche Erhebung belegt auch den Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und Überleben: während die 5 Jahres- Überlebensrate bei Patientinnen mit gut differenziertem (G1) Tumor 98% betrug, waren es bei Patientinnen mit mäßig differenziertem (G2) Tumor 89% und bei Frauen mit schlecht differenziertem Karzinom nur noch 61%.

#### Andere Prognosefaktoren

Auch höheres Alter ist mit einer schlechten Prognose verbunden. Zum einen finden sich in älteren Patientinnen gehäuft Tumoren in hohen Stadien und mit schlechter Differenzierung und zum anderen konnte das Alter zusätzlich als eigenständiger Prognosefaktor identifiziert werden (78).

Mit der Zunahme der molekularbiologischen Herangehensweise an Tumoren steigt auch das Interesse Biomarker durch genetische oder immunhistochemische Analysen als Prognosefaktoren zu nutzen. So konnte z. B. der immunhistochemische Nachweis einer hohen Proliferationsrate mit einer schlechten Prognose korreliert werden (79). Die in der gleichen Studie verheißungsvoll aussehende univariate Analyse von Überleben und Hormonrezeptorstatus, p53-Expression und Cathepsin D-Expression konnte einer multivariaten Analyse jedoch nicht standhalten. Es bleibt also abzuwarten, inwiefern zelluläre Marker in der Prognoseeinschätzung von Endometriumkarzinomen Eingang erhalten werden.

## 1.6 Zielstellung der Arbeit

Wie in den einleitenden Kapiteln deutlich geworden ist, kann die Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen durch große Deletionen, kleinere Mutationen oder die Hypermethylierung ihres Promotors eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielen. Das Tumorsuppressorgen p16 bildet hierbei keine Ausnahme, scheint im Endometriumkarzinom aber als später Progressionsfaktor aufzutreten. Als solcher ist seine Untersuchung in Bezug auf den letzten Schritt der Progression, die Metastasierung, aber besonders interessant. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen p16-Alterationen und dem Metastasierungspotenzial von Endometriumkarzinomen näher beleuchtet und der p16-Status in der Metastase selbst exploriert werden. Dabei sollen sowohl genetische Veränderungen in Form von Deletionen als auch epigenetische Veränderungen in Form der Promotormethylierung und die Proteinexpression berücksichtigt und in ihrer prognostischen bzw. prädiktiven Bedeutung bewertet werden. Hierbei werden selbstverständlich auch die Beziehungen zwischen genetischen Alterationen und messbarer Expression und der Zusammenhang mit herkömmlichen Prognosefaktoren als auch mit den histopathogenetischen Typen des Endometriumkarzinoms überprüft.

Da Patientinnen mit Endometriumkarzinom häufig höheren Alters sind (s. Kapitel 1.1) und sowohl diesem als auch der Ätiologie der Krankheit geschuldet (Adipositas, Metabolisches Syndrom, s. Kapitel 1.2) oft multimorbide sind, erscheint die Untersuchung von "Kandidatengenen" wie dem Tumorsuppressor p16 außerdem nicht nur in Hinblick auf prädiktive Aussagen, sondern auch hinsichtlich neuen Angriffspunkten für spezifische, relativ gut verträgliche Therapien von Bedeutung zu sein und soll daher in dieser Arbeit Berücksichtigung finden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Untersuchungsmaterial**

Es wurden 89 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete sporadische Endometriumkarzinome untersucht, an denen die Patientinnen in den Jahren 1995-2006 in der Frauenklinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, im AMEOS Klinikum St. Salvator, Halberstadt, im Städtischen Klinikum Magdeburg oder in der Frauenklinik der Universität Lublin, Polen, operiert wurden. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme durch diagnostische Abrasio oder therapeutische Hysterektomie hatte keiner der Tumoren eine hormonelle, chemotherapeutische oder strahlentherapeutische Vorbehandlung erfahren. In den jeweiligen pathologischen Instituten der oben genannten Kliniken wurden die Präparate hinsichtlich Diagnose, histologischem Typ, Differenzierungsgrad und Tumorstadium histologisch an Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Schnitten beurteilt und anschließend archiviert.

Mit Stand von April 2007 waren 41 der 89 Fälle metastasiert. Als Metastase galten neben Fernmetastasen auch regionale Lymphknotenmetastasen und Lokalrezidive, unabhängig davon, ob sie synchron oder metachron zum Primärtumor auftraten. Von den 41 Metastasen standen 38 den genetischen Untersuchungen zur Verfügung. In 15 Fällen gelang es, eine vollständige vergleichende Analyse von Primärtumor und korrespondierender Metastase bezüglich aller erhobenen genetischen Parameter durchzuführen.

#### **2.1.2 Charakteristik des Kollektivs**

Die histologischen Typen wurden nach Deligdisch und Holinka (23) den pathogenetischen Typen des Endometriumkarzinoms (s. Kapitel 1.3) zugeordnet. Demnach entsprechen endometrioides und squamöses Karzinome ebenso wie das Adenokankroid dem Typ I, während serös-papilläre und klarzellige Tumoren zu Typ II gezählt werden. Das Durchschnittsalter der Patientinnen mit einem Typ I-Tumor betrug 64,12 Jahre, während es bei den Patientinnen mit einem Typ II-Tumor bei 71,00 Jahren lag.

Der Differenzierungsgrad des Tumors wurde vom Gynäkopathologen nach den Regeln der UICC in gut differenziert (G1), mäßig differenziert (G2) und schlecht differenziert (G3) eingeteilt.

Anhand des histologischen Befundes und des klinischen Stagings erfolgte die Klassifikation der

Karzinome nach den gerade gültigen Vorgaben der FIGO. In den Zeitraum der Datenerhebung fiel im Jahr 2000 eine Überarbeitung der FIGO-Kriterien, die auf die Einteilung des Endometriumkarzinoms und somit die Konsistenz der Daten jedoch keinen Einfluss hatte.

Eine zusammenfassende Beschreibung des Kollektivs findet sich in Tabelle 2.1 .

**Tabelle 2.1:** Zusammenfassung der Kollektivcharakteristik

<b>Klinisch-pathologischer Faktor</b>	<b>Mittelwert bzw n (%)</b>
<b>Patientenalter</b> Durchschnittsalter Standardabweichung Minimum Maximum	64,97 Jahre 11,67 Jahre 29 Jahre 87 Jahre
<b>FIGO-Stadium</b> I II III IV	43 (48,31) 7 (7,87) 27 (30,34) 12 (13,48)
<b>Histo-pathogenetischer Typ</b> Typ I Typ II	78 (87,64) 11 (12,36)
<b>Grading</b> Grad 1 Grad 2 Grad 3	27 (30,34) 43 (48,31) 19 (21,35)
<b>Nodalstatus (pathologisch gesichert)</b> negativ (N0) positiv (N1) unbekannt (Nx)	33 (35,10) 16 (17,00) 45 (47,90)
<b>Metastasierung</b> nicht metastasiert metastasiert	48 (53,93) 41 (46,07)

n: Anzahl

PT: Primärtumor

### 2.1.3 Verwendete Chemikalien

#### DNA-Isolation

Roticlear®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, 100%ig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NucleoSpin® Tissue Kit	Macherey- Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

MgCl <sub>2</sub>	Eurogentec, Seraing, Belgien
PCR-Puffer	Eurogentec, Seraing, Belgien
Nucleotide	Eurogentec, Seraing, Belgien
Primer für PAH, D9S162, D9S171, Exon 1 und 2 des p16-Gens	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Deutschland
Taq-Polymerase (Hot Gold Star)	Eurogentec, Seraing, Belgien

### Methylierungsspezifische PCR (MSP)

CpGenome DNA Modification Kit	Chemicon International, Temecula, Kalifornien, USA
NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA
Primer für un-/methyliertes p16	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Deutschland

### Elektrophorese

Acrylamidlösung, 30%ig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PDA	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Tris-base	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ameisensäure, 85%ig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
APS, 10%ig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
CHES	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Salpetersäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
AgNO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formalin, 30%ig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure, 10%ig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

### Immunhistochemische Färbung

Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat, 0,1 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure, 0,1 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
P16 Maus-Antikörper	Quartett Immunodiagnostika & Biotechnologie GmbH, Berlin, Deutschland

## 2.1.4 Verwendete Geräte

### DNA-Isolation

Thermoschüttler	Eppendorf Thermomixer 5437, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5403, Hamburg, Deutschland
Vakuumzentrifuge	Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Deutschland

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Thermocycler	MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cyclers, MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA
--------------	---

### Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Thermoblock	TM 130-6, HLC Heap Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Minishaker	IKA-Minishaker MS 2, IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Zentrifuge	Universal 32R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Thermocycler	MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cyclers, MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA

### Elektrophorese

Elektrophoresekammer	Multiphor II, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Schüttler	Rocky, Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland

### Immunhistochemische Färbung

Druckkammer	Pascal-Druckkammer, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Färbeautomat	Nexes Immunostainer der Firma Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekulargenetische Methoden**

#### **2.2.1.1 DNA-Isolation**

Um möglichst reine Tumor-DNA isolieren zu können, wurden vor der DNA-Präparation HE- Schnitte der in Paraffin eingebetteten Präparate angefertigt und mit Hilfe einer Pathologin die Areale markiert, die mikroskopisch die höchste Dichte (mindestens 70%) an Karzinomzellen aufwiesen. Anschließend wurden von den Paraffinblöcken jeweils zwei 10 µm dicke Schnitte entnommen und die Markierung des entsprechenden HE-Schnitts auf diese übertragen. Auf diese Weise konnten mittels einer Rasierklinge und ggf. einer Kanüle zielgenau geeignete Tumorareale isoliert und in ein 2 ml fassendes Zentrifugenröhrchen (Tube) überführt werden.

Mittels Zugabe von 1 ml Roticlear<sup>®</sup>, das als Gemisch verschiedener Kohlenwasserstoffe analog zu Xylol eingesetzt werden kann, erfolgte bei 37°C im Thermoschüttler die Entparaffinierung über 30 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für 3 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Es folgte ein Waschschrift mit 100% Ethanol bevor das Material schließlich in einer Vakuumzentrifuge getrocknet wurde.

Aus dem entparaffinierten Gewebe konnte unter Einsatz des NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue Kits der Firma Macherey- Nagel GmbH & Co. KG die DNA extrahiert werden. Zu diesem Zweck wurde den Proben 200 µl T1- Lysepuffer und 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugefügt und das Gemisch für 18-20 Stunden bei 50°C im Thermomixer inkubiert. Das weitere Prozedere folgte dem vom Hersteller vorgeschlagenen standardisierten Protokoll mit Ausnahme der auf 2 Minuten verlängerten und auf 15.000 rpm erhöhten Zentrifugierschritte und der Verringerung der BE- Puffermenge zur Lösung der DNA auf 80 µl im letzten Schritt.

### 2.2.1.2 Kontroll-PCR

Zur Erfolgsüberprüfung der DNA-Isolation bezüglich Qualität und Menge der DNA wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Verwendet wurden hierfür zwei Primer des Housekeeping-Gens Phenylalaninhydroxylase (PAH) mit der Sequenz 5´- ATG CCA CTG AGA ACT CTC TT - 3´ (sense) und 5´- TTT GGG TGT ATG GGT CGT AG - 3´ (antisense), á 10 µM. Folgendermaßen setzte sich der Reaktionsansatz zusammen:

2,0 µl der DNA-Lösung

1,25 µl MgCl<sub>2</sub> (Konz.: 25mM)

2,5 µl PCR-Puffer

2,5 µl Nukleotide (Konz.: 160 µM)

je 1,0 µl PAH-Primer (sense und antisense)

0,1 µl Taq-Polymerase (Hot Gold Star; Konz.: 0,5 units/µl)

14,65 µl Aqua dest.

Bei der folgenden PCR mittels automatischem Thermocycler lief ein Ansatz ohne DNA als Kontrolle (Leerwert) mit. Nach einer zehninütigen Aktivierung der Polymerase und Denaturierung der DNA bei 95°C gewährleistete der Thermocycler folgende schrittweise aufgebauten Konditionen für 35 Zyklen:

1. 95°C für 60 Sekunden (Denaturierung der DNA)
2. 56°C für 90 Sekunden (Annealing der Primer)
3. 72°C für drei Minuten (Elongation der gebundenen Primer mittels Taq-Polymerase)

Nach Durchlaufen der 35 Zyklen wurden die 72°C noch für weitere 10 Minuten aufrechterhalten bevor die Proben dann auf 10°C heruntergekühlt wurden, um die PCR-Reaktionen abzuschließen.

Die PCR-Produkte wurden auf ein Polyacrylamidgel (8% VWA) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe einer Silberfärbung visualisiert (s. Kapitel 2.2.1.5).

### 2.2.1.3 PCR zur p16-Gen-Deletionsanalyse

Nach positiver Amplifikation des Housekeeping-Gens in der Kontroll-PCR wurden zur Identifikation relevanter Deletionen innerhalb des p16-Gens weitere PCR eingesetzt: jeweils eine PCR zum Nachweis von Exon 1 und Exon 2, die zusammen den Hauptbestandteil des kodierenden p16-Genbereichs ausmachen, und zusätzlich jeweils eine auf die Mikrosatellitenmarker D9S162 und D9S171 bezogene PCR. D9S162 ist ein Mikrosatellitenmarker am 5`-Ende des p16-Gens, D9S171 eine Region am 3`-Ende vom p16-Gen, so dass deren Analyse zusätzlich zur Aussage über das Vorhandensein von Deletionen im p16-Gen eine Abschätzung der Ausdehnung dieser Deletionen in benachbarte Sequenzen ermöglichte.

Die Durchführung der PCR erfolgte wie die Kontroll-PCR mit Hilfe des MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler unter Nutzung der gleichen Chemikalien (s. Kapitel 2.2.1.2) und spezifisch hergestellter Primer (TIB MOLBIOL Syntheselabor). Die Primer-Sequenzen, Reaktionsansätze und PCR-Konditionen nach der initial einheitlichen Aktivierung der Taq-Polymerase und Denaturierung der DNA (10 Minuten bei 95°C) sind den Tabellen 2.2 und 2.3 zu entnehmen. Allen Ansätzen war gemeinsam, dass die Temperatur nach Durchlaufen der Zyklen für weitere 10 Minuten auf 72°C gehalten und abschließend auf 10°C gesenkt wurde.

Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel (p16 Exon 1 und Exon 2 auf einem TC 11-Gel, D9S162 und D9S171 auf einem 8% VWA-Gel; s. Kapitel 2.2.1.5).

Die Auswertung der Deletionsanalyse beruhte auf der Annahme, dass bei nachgewiesener DNA in der Probe durch die Kontroll-PCR jede PCR Banden ergeben müsste, sofern der zu amplifizierende Bereich nicht deletiert war. Ergab eine PCR keine Amplifikationsprodukte, obwohl in der Kontroll-PCR DNA nachweisbar war, wurde also auf eine Deletion in diesem Bereich geschlossen. Zum Ausschluss eines negativen Amplifikationsergebnisses durch eine fehlerhafte PCR-Durchführung wurde eine Wiederholung der PCR und ggf. auch der vorangehenden DNA-Präparation angesetzt.

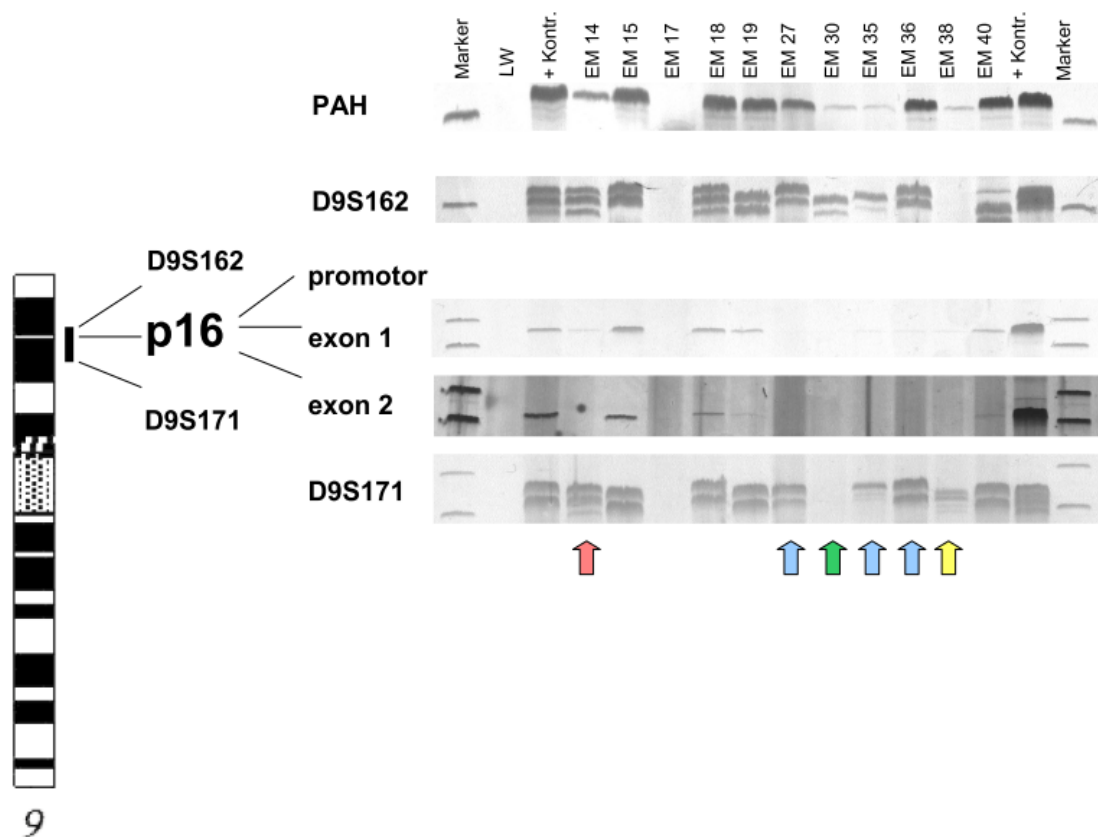
Mögliche Ergebnisse der Deletionsanalyse waren neben dem Fehlen einer Deletion in den untersuchten Bereichen isolierte Deletionen von Exon 1 und/ oder Exon 2 sowie größere Deletionen, die sich nicht auf das p16-Gen beschränkten, sondern auch noch darüber hinaus D9S162 und/ oder D9S171 erfassten (s. Abbildung 2.1). Wenn die methylierungsspezifische PCR (MSP) bei positiver PAH-PCR weder Amplifikationsprodukte mit dem spezifischen Primer für die methylierte Sequenz noch mit dem Primer für die unmethylierte Sequenz lieferte (s. Kapitel 2.2.1.4), konnte außerdem von einer Mutation des Promotors ausgegangen werden.

**Tabelle 2.2:** Primer-Sequenzen und PCR-Reaktionsansätze zur p16-Deletionsanalyse

<b>Primer</b>	<b>Primer-Sequenz (5' → 3')</b>	<b>PCR-Reaktionsansatz</b>
D9S162	GCA ATG ACC AGT TAA GGT TC (sense) AAT TCC CAC AAC AAA TCT CC (antisense)	1,5 µl DNA-Lösung 1,5 µl MgCl <sub>2</sub> 2,5 µl PCR-Puffer 2,0 µl Nukleotide 2,5 µl Primer 0,15 µl Taq-Polymerase 12,35 µl Aqua dest.
p16 Exon 1	GGA GAG GGG GAG AGC AGG CAG C (sense) GCG CTA CCT GAT TCC AAT TC (antisense)	2,0 µl DNA-Lösung 2,0 MgCl <sub>2</sub> 5,0 µl PCR-Puffer 4,0 µl Nukleotide 2,0 µl Primer 0,2 µl Taq-Polymerase 32,8 µl Aqua dest.
p16 Exon 2	ACC CTG GCT CTG ACC ATT CTG TTC T (sense) CCG GGC TGA ACT TTC TGT GCT (antisense)	1,0 µl DNA-Lösung 1,0 µl MgCl <sub>2</sub> 2,5 µl PCR-Puffer 2,0 µl Nukleotide 1,0 µl Primer 0,1 µl Taq-Polymerase 16,4 µl Aqua dest.
D9S171	AGC TAA GTG AAC CTC ATC TCT GTC T (sense) ACC CTA GCA CTG ATG GTA TAG TCT (antisense)	2,0 µl DNA-Lösung 1,5 µl MgCl <sub>2</sub> 2,5 µl PCR-Puffer 3,0 µl Nukleotide 2,5 µl Primer 0,15 µl Taq-Polymerase 10,35 µl Aqua dest.

**Tabelle 2.3:** PCR-Konditionen zur p16-Deletionsanalyse nach initialer Aktivierung der Taq-Polymerase und Denaturierung der DNA bei 95°C für 10 Minuten

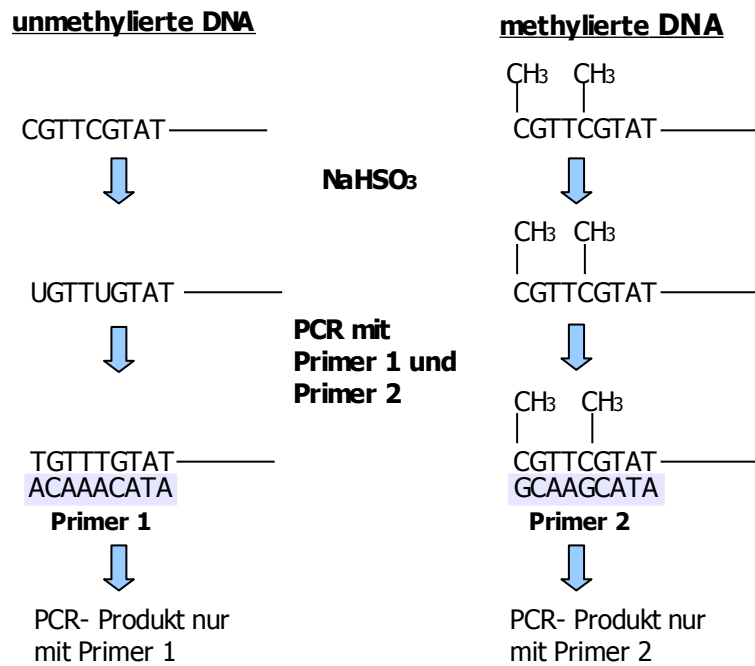
<b>Primer</b>	<b>PCR-Konditionen</b>
D9S162	dreimal den folgenden Zyklus: 95°C für 10 s → 60°C für 10 s → 72°C für 10 s dreimal den folgenden Zyklus: 95°C für 10 s → 58°C für 10 s → 72°C für 10 s dreimal den folgenden Zyklus: 95°C für 10 s → 56°C für 10 s → 72°C für 10 s dreimal den folgenden Zyklus: 95°C für 10 s → 54°C für 10 s → 72°C für 10 s 26mal den folgenden Zyklus: 95°C für 10 s → 52°C für 10 s → 72°C für 10 s
p16 Exon 1	37mal den folgenden Zyklus: 95°C für 60 s → 64°C für 60 s → 72°C für 150 s
p16 Exon 2	37mal den folgenden Zyklus: 95°C für 60 s → 64°C für 60 s → 72°C für 150 s
D9S171	s. PCR-Konditionen von D9S162



**Abbildung 2.1:** Beispiele für Ergebnisse der p16-Deletionsanalyse. Die Probe EM 17 enthielt offensichtlich nicht genug DNA für die Analyse, denn die Kontroll-PCR (PAH) ist negativ. Die Fälle EM 15, EM 18, EM 19 und EM 40 zeigen alle zu erwartenden Banden, d.h. es liegt keine Deletion der untersuchten Bereiche vor. Den mit Pfeilen markierten Fällen fehlen dagegen Teile des p16-Gens: Fall EM 14 (lachsfarbener Pfeil) weist eine isolierte Deletion von Exon 2 auf, die Fälle EM 27, EM 35 und EM 36 (blaue Pfeile) zeigen eine Deletion von Exon 1 und Exon 2, während die Deletion bei EM 30 (grüner Pfeil) und EM 38 (gelber Pfeil) nicht auf Exon 1 und Exon 2 beschränkt sind, sondern zusätzlich noch D9S171 bzw D9S162 beinhalten. (LW= Leerwert; +Kontr.= bekannte Positivkontrolle ohne Deletionen)

#### 2.2.1.4 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die Methylierungsspezifische PCR (MSP) wurde in der hier angewendeten Form erstmals 1996 von Herman et al. (80) eingeführt. Grundlage der Methode ist eine initiale Behandlung der isolierten DNA mit Natrium-Bisulfit ( $\text{NaHSO}_3$ ), welches unmethyliertes Cytosin zu Uracil desaminiert, während methyliertes Cytosin nicht umgewandelt werden kann. Auf diese Weise entstehen je nach Methylierungsstatus der ursprünglichen DNA zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen, die mit spezifischen Primern detektiert werden können (s. Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2:** Prinzip der Methylierungsspezifischen PCR

### Die Bisulfitbehandlung

Die Bisulfitbehandlung wurde mit Hilfe des CpGenome DNA Modification Kits der Firma Chemicon International nach deren Protokoll wie folgt durchgeführt:

Nach Lösung von 227 mg Modifikationsreagenz I in 571 µl Aqua dest. und 20 µl 3 M NaOH je Probe wurden 60 µl DNA-Lösung (5 µl beim Einsatz von Standard-DNA) mit 2 µl Reagenz IV, 38 µl Aqua dest. (93 µl beim Ansatz mit Standard-DNA) und 7 µl 3 M NaOH angesetzt und 10 Minuten bei 50°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend konnte die DNA-Modifikation initiiert werden, indem der DNA-Lösung 550 µl der gelösten Modifikationsreagenz I zugefügt wurden und die Proben 16 Stunden bei 50°C inkubierten. Als Positivkontrolle diente methylierte Standard-DNA, als Negativkontrolle bekannte unmethylierte Leukozyten-DNA.

Am nächsten Tag erfolgte zunächst ein Entsalzen der Proben. Dazu wurden 5 µl Reagenz III und 750 µl einer Lösung aus 1,35 g Reagenz II, 750 µl Aqua dest. und 0,1 µl Mercaptoethanol hinzugefügt, kurz im Minishaker gemixt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit Ethanol (70%), die mit dem Zentrifugieren der Proben für 1 Minute bei 7500 rpm und der Isolation von Pellets endeten. Zur Vollendung der DNA-Modifikation wurden den Pellets 50 µl einer 20 mM NaOH/ 90% Ethanol-Lösung zugesetzt und für 5 Minuten inkubiert. Es folgten wiederum 2 Waschschrte mit Ethanol (90%) bevor 5 Minuten lang bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert wurde. Nach einer fünfminütigen Trocknungszeit wurde das Pellet in 60 µl TE-Puffer (10 mM Tris/ 0,1 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert, 15 Minuten bei 55°C inkubiert und 3

Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Da der Überstand nun die modifizierte DNA enthielt, wurde dieser in ein 0,5 ml Safe Lock Tube (Eppendorf) überführt und konnte entweder gleich im Anschluss in der PCR verwendet oder zunächst bei -20°C eingefroren werden.

#### Die PCR

Nach der Modifikation der DNA durch die Bisulfitbehandlung ermöglichte der Einsatz zwei verschiedener Primersets die Differenzierung der methylierten von der unmethylierten Variante des p16-Gens. Die spezifischen Primersequenzen sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

**Tabelle 2.4:** Für die MSP genutzte Primer eines p16-Genabschnitts

<b>Primer</b>	<b>Primer-Richtung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
p16 - methyliert	sense antisense	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CG GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA
p16- unmethyliert	sense antisense	TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A

Der Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

3,5 µl modifizierte DNA-Lösung

1,5 µl MgCl<sub>2</sub>

2,5 µl PCR-Puffer

2,0 µl Nucleotide (160 µM)

1,75 µl Primer (entweder spezifisch für die methylierte oder für die unmethylierte Sequenz)

0,1 µl Taq-Polymerase (Hot Goldstar)

11,9 µl Aqua dest.

Eine Probe wurde als Leerwert, also ohne DNA, angesetzt.

Im automatischen Thermocycler startete die PCR mit einer 10 Minuten dauernden Aktivierung der Polymerase und Denaturierung der DNA bei 95°C. Es folgten 37 Zyklen nach dem folgendem Schema:

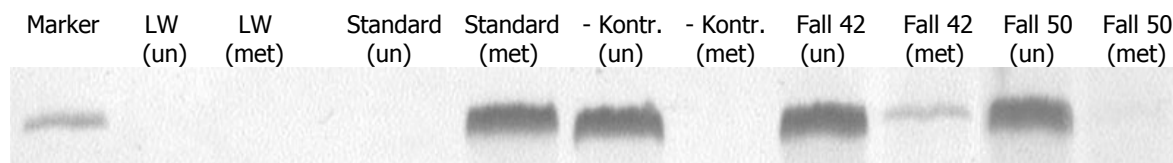
1. 95°C für 60 Sekunden (Denaturierung der DNA)
2. 64°C für 60 Sekunden (Annealing der Primer)
3. 72°C für 150 Sekunden (Elongation der gebundenen Primer mittels Taq-Polymerase)

Nach weiteren 10 Minuten bei 72°C wurden die Proben auf 10°C abgekühlt. Die PCR-Produkte wurden auf ein Polyacrylamidgel (9% VWA) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht (s. Kapitel 2.2.1.5).

### Die Auswertung

Vor der Auswertung der einzelnen Fälle erfolgte die Leerwert-Beurteilung: lag eine Kontamination des Leerwertes vor, wurde die Analyse verworfen und die MSP komplett wiederholt.

Die Abbildung 2.3 zeigt beispielhaft die gefärbten Banden der MSP. Von demselben Fall wurden die PCR-Produkte mit dem Primer für unmethylierte Sequenzen neben die PCR-Produkte mit dem Primer für methylierte Sequenzen pipettiert, so dass ein Fall übersichtlich als Einheit interpretiert werden konnte. War nur eine Bande mit dem Primer für die unmethylierte DNA-Sequenz sichtbar, sprach dies dafür, dass die DNA der Gewebeprobe am p16-Locus unmethyliert vorlag. Zeigte sich zusätzlich eine Methylierungsbande, wurde der Fall als methyliert gewertet. Waren trotz vorheriger positiver Amplifikation des Housekeeping-Gens in der Kontroll-PCR (s. Kapitel 2.2.1.2) auch nach wiederholter MSP weder eine Bande für die unmethylierte Sequenz noch eine Methylierungsbande erkennbar, wurde von einer Deletion des Promotors ausgegangen.



**Abbildung 2.3:** Banden nach MSP und elektrophoretischer Auftrennung. Links ist der Größenmarker (DNA-Leiter) aufgetragen, der die Identifizierung der richtigen Banden erleichtert. Neben Leerwert (LW), methylierter Standard-DNA und einer Negativkontrolle (unmethylierte Kontrolle) finden sich ein Beispiel für eine Probe mit unmethylierter und methylierter DNA (Fall 42) und ein Beispiel für einen unmethylierten Fall (Fall 50).

(un): PCR mit zu unmethylierter Sequenz passendem Primer-Set  
(met): PCR mit zu methylierter Sequenz passendem Primer-Set

## 2.2.1.5 Elektrophorese

### 2.2.1.5.1 Herstellung und Anwendung von Elektrophoresegelen

Die Auswahl des geeigneten Polyacrylamidgels für die Elektrophorese richtete sich nach der Größe der PCR-Produkte. So wurde für die elektrophoretische Auftrennung des 171 bp großen PAH-Produkts der Kontroll-PCR ein achtprozentiges Polyacrylamidgel (Typ 1a) hergestellt, ebenso für die Produkte der D9S162-(187 bp) und D9S171-PCR (175 bp). Die 276 bp und 340 bp großen Produkte der p16 Exon1-



und Exon2- PCR dagegen forderten die Herstellung eines Gels, das größere PCR-Produkte auftrennen kann (Typ 2), während die Auftrennung der p16-MSP-Produkte (unmethyliert: 152 bp, methyliert: 151 bp) auf einem neunprozentigen Polyacrylamidgel (Typ 1b) durchgeführt wurde.

#### Herstellung eines Typ 1-Gels

Folgende Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge für ein achtprozentiges Polyacrylamidgel (Typ 1a) angemischt:

22,8 ml Acryl-PDA (Stammlösung bestehend aus 500 ml 30%iger Acrylamidlösung und 4,5 g PDA)

17,2 ml Tris-Puffer (Stammlösung hergestellt aus 90,75 g Tris-base und 5,21 ml 85%iger Ameisensäure ad 1000 ml Aqua dest.)

400 µl APS

40 µl TEMED

Für ein neunprozentiges Polyacrylamidgel (Typ 1b) wurde die gleiche Anleitung befolgt, unter Einsatz von 25,6 ml Acryl-PDA und 14,4 ml Tris-Puffer statt der oben angegebenen Mengen.

Nach dem Durchmischen der Chemikalien wurde die Flüssigkeit auf eine folienbeschichtete Glasplatte gegossen und eine weitere Glasplatte blasenfrei aufgelegt. Das Gel wurde im Kühlschrank mindestens 30 Minuten gelagert bis es auspolymerisiert war.

#### Herstellung eines Typ 2-Gels

Für ein Typ 2-Gel wurden folgende Chemikalien verwendet:

9,2 ml Acryl-PDA (Zusammensetzung s. oben)

20,1 ml Aqua dest.

4,1 ml CHES

6,6 ml Tris-Form (500mM; Stammlösung hergestellt aus 19,23 ml Ameisensäure (85%) und 500 ml Aqua dest., mit Tris base auf pH 9 eingestellt und zu 1000 ml Aqua dest. hinzugefügt)

360 µl APS

18,6 µl TEMED

Wie beim Typ 1-Gel wurde die Flüssigkeit zwischen zwei Glasplatten gegeben und im Kühlschrank verfestigt.

Auf die verfestigten Gele wurden die entsprechenden PCR-Produkte neben einer Basenpaarleiter als Größenmarker aufgetragen und gekühlt bei 10°C in einer horizontalen Elektrophoresekammer aufgetrennt.

### **2.2.1.5.2 Färbung der Elektrophoresegele**

Zur Darstellung der aufgetrennten PCR-Produkte wurde eine Färbung mit Silbernitrat durchgeführt. Hierzu wurde das Gel zunächst in 3 %iger Salpetersäure geschwenkt bis sich die Lauffront gelb gefärbt hatte. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit Aqua dest. bevor das Gel 20 Minuten lang in 0,2 %iger Silbernitratlösung (0,4 g AgNO<sub>3</sub> ad 200 ml Aqua dest.) geschüttelt wurde. Nach erneuter dreimaliger Spülung mit Aqua dest. wurde die Färbung mit einer Lösung aus Natriumcarbonat und Formalin (15 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 0,5 ml Formalin (30 %) ad 1000 ml Aqua dest.) fortgeführt, wobei die Lösung mehrmals gewechselt wurde. Nachdem sich die Banden entwickelt hatten, wurde die Färbereaktion mit 10 %iger Essigsäure beendet, ohne eine Einwirkzeit von 90 Sekunden zu überschreiten. Es wurde wiederum dreimal mit Aqua dest. gespült und das Gel für mindestens 20 Minuten in 5 %iger Glycerollösung (25 ml Glycerol ad 475 Aqua dest.) eingelegt. Abschließend konnte das Gel luftgetrocknet und ausgewertet werden.

## **2.2.2 Immunhistochemische Methoden**

Die im Folgenden beschriebenen immunhistochemischen Methoden wurden an 67 Schnitten von Tumorgewebe ausgeführt.

### **2.2.2.1 Immunhistochemische Färbung**

Der immunhistochemische Nachweis von p16 beruhte auf folgendem Prinzip: um die Anlagerung eines primären Antikörpers an das Antigen sichtbar zu machen, wurde ein sekundärer Antikörper mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase eingesetzt, der an den Fc-Teil des primären Antikörpers ansetzte. Das Enzym Alkalische Phosphatase wiederum setzte dann nach Zugabe eines zunächst farblosen Chromophors dieses in seine rote Variante um.

Bevor mit dieser Prozedur begonnen werden konnte, war zunächst jedoch eine Vorbehandlung der 3 µm dicken Paraffinschnitte notwendig. So erfolgte zuerst die Entparaffinierung der Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe. Die Antigendemaskierung (antigen retrieval) gelang durch Kochen der Schnitte in 0,01 M Citratpuffer mit pH 6, der zuvor aus 75 ml Natriumcitrat (0,1 M), 2 ml Aqua dest. und 25 ml Citronensäure (0,1 M) gefertigt wurde. Die Antigendemaskierung fand in einer DakoCytomation Pascal-Druckkammer bei 120°C für 30 Sekunden statt. Die anschließenden immunhistochemischen Schritte wurden standardisiert von dem Färbeautomaten Nexes Immunostainer der Firma Ventana Medical Systems übernommen. Lediglich der primäre Maus-

Antikörper (IgG, Verdünnung: 1:100) wurde per Hand aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 32 Minuten bevor der Automat mit dem Färbeprotokoll fortfahren konnte. Die Färbung der Schnitte mit dem FAST RED Detection Kit des Automatenherstellers wurde nach Beendigung des Programms durch die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer ergänzt. Abschließend wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder hydratisiert und schließlich mit Kanadabalsam eingedeckt.

Als Positivkontrolle wurde der Schnitt eines Kolonkarzinoms mit bekanntem p16-Status mitgeführt.

### **2.2.2.2 Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen**

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung des p16-Proteins wurden mit Hilfe eines Olympus BH2 Mikroskops je Schnitt die Tumorzellen mit positiver nukleärer Färbung in 40 Blickfeldern bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Begleitende zytoplasmatische Färbungen wurden dabei nicht berücksichtigt. Der Anteil der gefärbten Tumorzellen wurde in zwölf Gruppen zusammengefasst: 0 (0%), 0,5 (1-4%), 1 (5-14%), 2 (15-24%), 3 (25-34%), 4 (35-44%), 5 (45-54%), 6 (55-64%), 7 (65-74%), 8 (75-84%), 9 (85-94%) und 10 (95-100%).

Je Schnitt wurde ein Durchschnittswert ermittelt.

Die Auswertungsvalidität wurde stichprobenartig durch eine Pathologin gesichert.

### **2.2.3 Statistische Auswertung**

Alle statistischen Analysen erfolgten unter Zuhilfenahme des SPSS-Software-Pakets der Version 11.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA), wobei das Signifikanzniveau bei  $p < 0,05$  angenommen wurde.

Zum Vergleich von Häufigkeiten genetischer Alterationen in Beziehung zu klinisch-pathologischen Parametern wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson bzw. bei kleiner Fallzahl der exakte Test nach Fisher angewandt. Die Überlebenszeitanalysen wurden nach der Kaplan-Meier-Methode und dem Logrank-Test durchgeführt, wobei Daten von Patientinnen, die an einer anderen Ursache gestorben sind als dem Endometriumkarzinom, zensiert wurden. Für den Mittelwertsvergleich der immunhistochemisch ermittelten Proteinexpression in den verschiedenen klinisch-pathologisch eingeteilten Gruppen wurde der T-Test vorgenommen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Validierung des Kollektivs

Um die Belastbarkeit der Daten aus dem verhältnismäßig kleinen Kollektiv zu überprüfen, wurden zunächst klinisch-pathologische Standardparameter mit dem Überleben korreliert, deren Wirkung auf die Prognose schon seit langem bekannt sind. Dafür standen Follow-up-Daten von 79 Patientinnen zur Verfügung.

Bei der Durchführung der Überlebenszeitanalyse mit Hilfe des Logrank-Tests konnte eine signifikante Beeinflussung der Überlebenszeit und der Rezidivfreiheit durch das FIGO-Stadium bei Diagnosestellung nachgewiesen werden: ein höheres FIGO-Stadium korrelierte mit einer kürzeren Überlebenszeit ( $p < 0,001$ ) und einer kürzeren rezidivfreien Zeit (disease-free survival;  $p = 0,006$ ).

Auch ein positiver Nodalstatus ( $p = 0,012$ ) und das Auftreten von Metastasen im Krankheitsverlauf ( $p < 0,001$ ) führten zu einer signifikant schlechteren Prognose. Die Kaplan-Meier-Kurve ergab, dass Patientinnen mit Metastasen in 55,7 % der Fälle an ihrer Krankheit verstarben, während es bei Patientinnen ohne Metastasen nur 9,1 % waren.

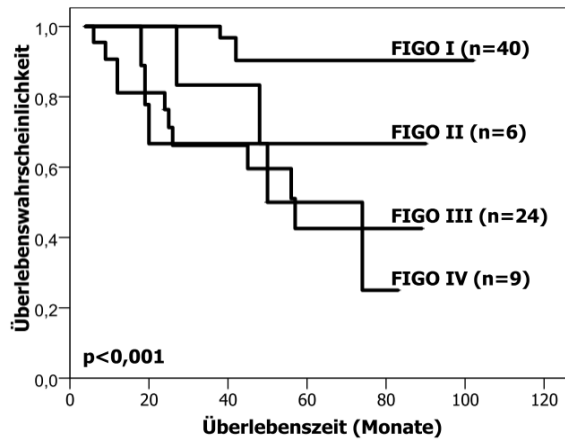
Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom vom histopathogenetischen Typ II zeigten ein tendenziell verkürztes Überleben im Vergleich zu Patientinnen mit einem Typ I- Karzinom ( $p = 0,056$ ) und ein signifikant verkürztes Überleben ohne Rezidiv (disease-free survival;  $p = 0,046$ ).

Das Grading zeigte beim Vergleich aller drei Differenzierungsgrade einzeln keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Überleben, nach Zusammenfassen von mittel (G2) und schlecht (G3) differenzierten Tumoren zeigte ein gut differenzierter (G1) Tumor im Gegensatz zu den G2- und G3-Karzinomen aber eine signifikant längere Überlebenszeit ( $p = 0,038$ ).

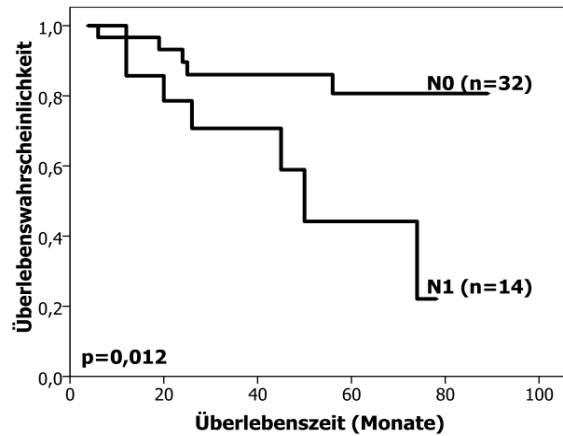
Patientinnen, die bei Erstdiagnose 70 Jahre und älter waren und somit über dem Durchschnittsalter des Gesamtkollektivs von 65 Jahren lagen, demonstrierten im Unterschied zu jüngeren Patientinnen kein kürzeres Überleben ohne Rezidiv und lediglich eine statistisch nicht signifikante Tendenz dazu häufiger an ihrer Krebserkrankung zu sterben ( $p = 0,332$ ).

Die entsprechenden Überlebenskurven nach Kaplan-Meier, die klinisch-pathologische Parameter und Gesamtüberleben in Beziehung setzen, sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

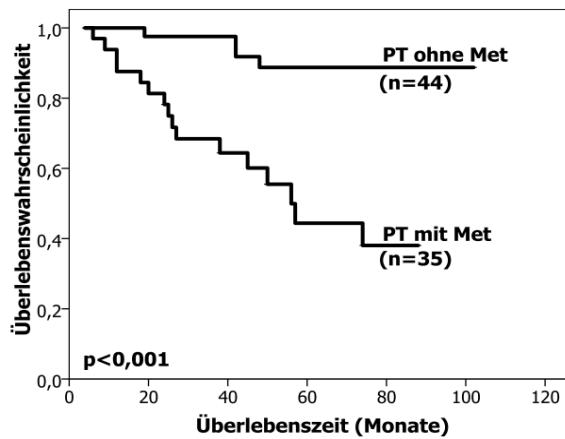
a)



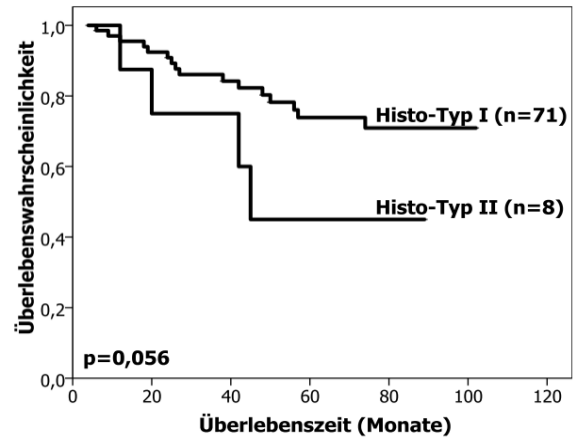
b)



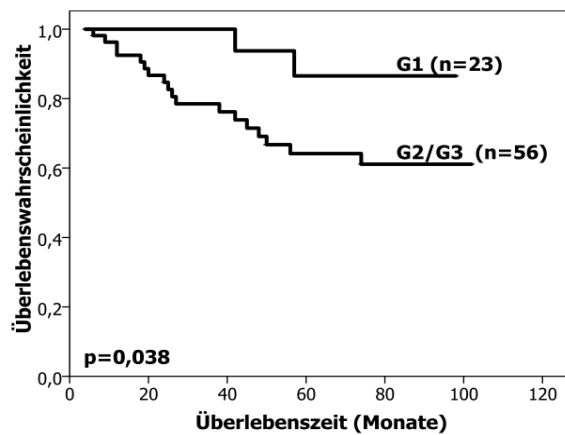
c)



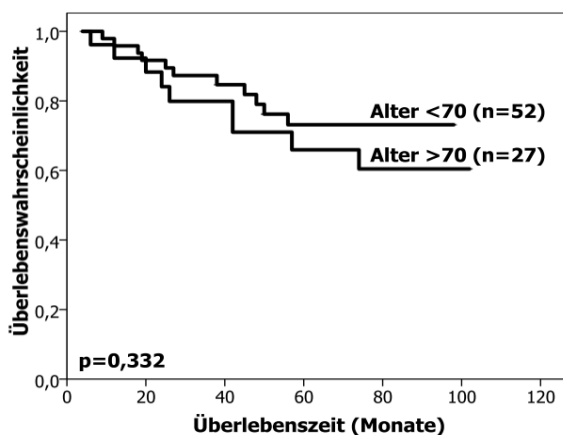
d)



e)



f)



**Abbildung 3.1:** Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von FIGO-Stadium (a), Nodalstatus (b), Metastasierung (c), histopathogenetischem Typ (d), Differenzierungsgrad (e) und Patientenalter (f)

## 3.2 DNA - Analysen

### 3.2.1 Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse des p16-Promotors mittels MSP konnte an 59 Primärtumoren und 17 Metastasen erfolgreich durchgeführt werden. Von diesen zeigten acht Primärtumoren (13,6%) und zwei Metastasen (11,8%) neben der Bande für unmethylierte DNA eine Methylierungsbande, so dass von einem methylierten Allel in einer Subpopulation der Tumorzellen ausgegangen werden konnte. Von den acht methylierten Primärtumoren wiederum entwickelten fünf (62,5%) zu einem beliebigen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf ein Rezidiv oder eine Metastase. Wegen des insgesamt seltenen Vorkommens der p16- Methylierung konnte mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren in der Methylierungshäufigkeit nachgewiesen werden ( $p = 0,265$ ; s. Tabelle 3.1).

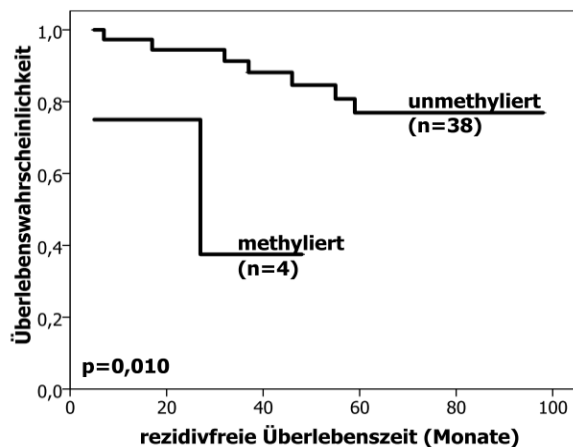
Auch die Korrelation der Methylierung im Primärtumor mit dem FIGO-Stadium blieb insignifikant, obwohl sich tendenziell abzeichnete, dass Tumoren im FIGO-Stadium 1 eine niedrigere Methylierungsrate aufweisen als Tumoren höheren Stadiums. Ebenso ergab die Korrelation der p16-Methylierung mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern wie Nodalstatus, histopathogenetischem Typ, Differenzierungsgrad und Alter keine signifikanten Beziehungen (s. Tabelle 3.1). Die Altersverteilung gestaltete sich sogar sehr homogen: das Durchschnittsalter der Patientinnen mit methyliertem Primärtumor betrug ebenso wie bei Patientinnen mit unmethyliertem Primärtumor 65 Jahre.

Wie die hohe Metastasierungsrate in methylierten Primärtumoren bereits erahnen lässt, wirkt sich die Methylierung im Logrank-Test signifikant auf das rezidivfreie Überleben (disease-free survival) aus ( $p = 0,010$ ). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve findet sich in der Abbildung 3.2 a). Der Effekt auf das Gesamtüberleben ist dagegen statistisch nicht signifikant ( $p = 0,679$ ; Abbildung 3.2 b).

**Tabelle 3.1:** Übersicht über die Korrelation von p16-Methylierung und klinisch-pathologischen Parametern

Klinisch-pathologische Parameter (Zahl der Fälle)	Anzahl (%) der methylierten Primärtumoren	p-Wert (exakter Test nach Fisher)
Gesamtzahl (59)	8 (13,6)	
Metastasierung nicht metastasiert (34) metastasiert (25)	3 (8,8) 5 (20,0)	0,265
FIGO-Stadium I (33) II (5) III (16) IV (5)	3 (9,1) 1 (20,0) 3 (18,8) 1 (20,0)	0,733 (Chi-Quadrat-Test)
Nodalstatus Nx (29) N0 (22) N1 (8)	2 (9,1) 2 (25)	0,284
Histopathogenetischer Typ I (53) II (6)	7 (13,2) 1 (16,7)	1,000
Differenzierungsgrad G1 (22) G2/G3 (37)	3 (13,6) 5 (13,5)	1,000
Alter <70 Jahre (35) ≥70 Jahre (24)	4 (11,4) 4 (16,7)	0,704

a)



b)

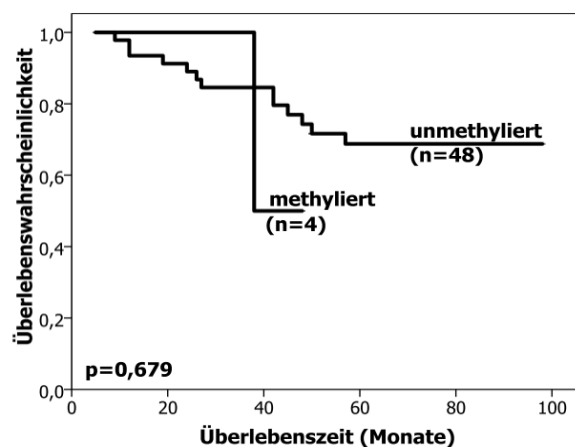


Abbildung 3.2: Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens (a) und Gesamtüberlebens (b) in Bezug zur Methylierung

### 3.2.2 Deletionsanalyse

Wie im Kapitel 2.2.1.3 vorgestellt wurde, konnten Deletionen verschiedenen Ausmaßes mittels PCR-Analysen festgestellt werden. Als relevante Deletionen wurden all jene gewertet, die mindestens ein Element des p16-Gens, also den Promotor, Exon 1, Exon 2 oder eine Kombination aus diesen betrafen. Eine isolierte Deletion von D9S171, wie sie in einem Fall auftrat (Fall 24), galt dementsprechend nicht als relevante Mutation.

64 Primärtumoren und 15 Metastasen konnten erfolgreich der Deletionsanalyse unterzogen werden. Von diesen waren 42 Primärtumoren (65,6%) und 12 Metastasen (80%) von Deletionen des p16-Gens betroffen. In den meisten Fällen handelte es sich um partielle Deletionen, die nur einen Teil des p16-Gens betreffen, in jeweils vier Fällen der Primärtumoren (9,5%) und der Metastasen (33,3%) trat ein kompletter Allelverlust zutage. Von den partiellen Deletionen manifestierten sich die meisten in Exon 1 und Exon 2 gleichzeitig (22 Primärtumoren). War aber nur ein Exon betroffen, war es eher Exon 1 (8 Fälle) als Exon 2 (4 Fälle).

Zwischen metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Deletionen registriert werden. Ähnlich verhielt es sich mit der Beziehung zwischen Deletionen und FIGO Stadium, Nodalstatus, histopathogenetischem Typ, Differenzierungsgrad und Alter. Das Durchschnittsalter von Patientinnen mit p16-deletiertem Primärtumor betrug 66 Jahre, das der Patientinnen mit Tumoren ohne p16-Deletion 65 Jahre.

Es zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz dazu, dass p16-Deletionen im Primärtumor mit kürzerem rezidivfreien Überleben und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert sind.

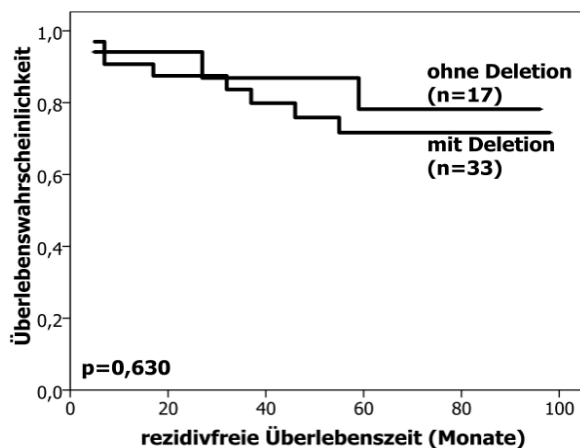
Eine Zusammenfassung der Korrelation von p16-Deletionen und klinisch-pathologischen Parametern findet sich in Tabelle 3.2, die Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung von rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von den Deletionen sind in Abbildung 3.3 vertreten.



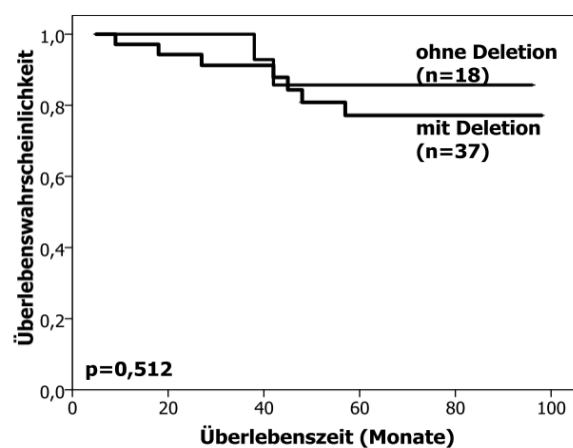
**Tabelle 3.2:** Übersicht über die Korrelation von p16-Deletionen und klinisch-pathologischen Parametern

Klinisch-pathologische Parameter (Zahl der Fälle)	Anzahl (%) der Tumoren mit p16-Deletion	p-Wert (exakter Test nach Fisher)
Gesamtzahl (64)	42 (65,6)	
Metastasierung nicht metastasiert (44) metastasiert (20)	27 (61,4) 15 (75,0)	0,397
FIGO-Stadium I (40) II (7) III (13) IV (4)	22 (55,0) 6 (85,7) 11 (84,6) 3 (75,0)	0,139 (Chi-Quadrat-Test)
Nodalstatus Nx (37) N0 (21) N1 (6)	12 (57,1) 5 (83,3)	0,363
Histopathogenetischer Typ I (56) II (8)	36 (64,3) 6 (75,0)	0,704
Differenzierungsgrad G1 (25) G2/G3 (39)	16 (64,0) 26 (66,7)	1,000
Alter <70 Jahre (40) ≥70 Jahre (24)	28 (70,0) 14 (58,3)	0,418

a)



b)



**Abbildung 3.3:** Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens (a) und Gesamtüberlebens (b) in Bezug zu Deletionen des p16-Gens

### 3.2.3 p16-Alterationen

Promotormethylierung und Deletionen sind zwei verschiedene Mechanismen mit der gleichen Wirkung: der Geninaktivierung. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden Inaktivierungsmechanismen nicht nur isoliert, sondern auch in ihrer Zusammenwirkung untersucht.

Von 75 Primärtumoren, bei denen mindestens eine der beiden Analysen von Methylierung und Deletion erfolgreich war, konnte in 12 Fällen keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine p16-Alteration vorlag, weil die vorhandene Analyse keine Alteration ergab und bei der fehlenden Analyse ein Treffer nicht auszuschließen war. Für die Berechnung des Einflusses von p16-Veränderungen auf die Prognose von Endometriumkarzinomen konnte daher auf 63 Fälle zurückgegriffen werden. Zusätzlich konnte bei 15 Metastasen das Vorhandensein von p16 Alterationen eingeschätzt werden.

48 der 63 Primärtumoren (76,2%) und 13 der 15 Metastasen (86,7%) zeigten mindestens eine Alteration des p16-Gens, also eine Promotormethylierung, eine Deletion des Promotors, eine Deletion von Exon 1 und/ oder 2 oder eine Kombination aus diesen Aberrationen. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren offensichtlich: während sich in immerhin 68,2% der nicht metastasierten Primärtumoren eine p16-Alteration manifestierte, waren es bei den metastasierten Primärtumoren sogar 94,7%. Es konnte außerdem eine signifikante Assoziation zwischen p16-Alterationen und höherem FIGO-Stadium belegt werden.

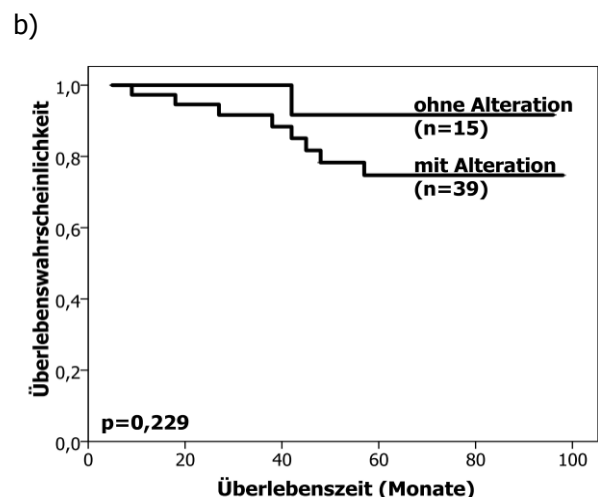
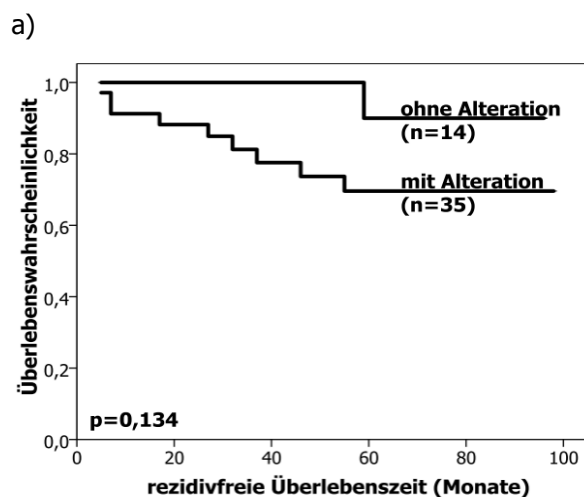
Die Korrelation mit Nodalstatus, histopathogenetischem Typ, Differenzierungsgrad und Alter ließ dagegen keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Vorhandensein einer p16-Alteration erkennen.

Die genauen Daten der Korrelation von p16-Alterationen und den klinisch-pathologischen Parametern sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Beim Bestehen einer p16-Alteration im Primärtumor zeichnete sich ferner ein Trend zu kürzerem rezidivfreien Überleben und kürzerem Gesamtüberleben ab (s. Abbildung 3.4), der jedoch kein signifikantes Niveau erreichte ( $p= 0,134$  bzw  $0,229$ ).

**Tabelle 3.3:** Übersicht über die Korrelation von p16-Alterationen und klinisch-pathologischen Parametern

Klinisch-pathologische Parameter (Zahl der Fälle)	Anzahl (%) der PT mit p16-Alteration	p-Wert (exakter Test nach Fisher)
Gesamtzahl (63)	48 (76,2)	
Metastasierung nicht metastasiert (44) metastasiert (19)	30 (68,2) 18 (94,7)	<b>0,026</b>
FIGO-Stadium I (40) II (7) III (12) IV (4)	25 (62,5) 7 (100,0) 12 (100,0) 4 (100,0)	<b>0,010</b> (Chi-Quadrat-Test)
Nodalstatus Nx (37) N0 (21) N1 (5)	14 (66,7) 5 (100,0)	0,278
Histopathogenetischer Typ I (55) II (8)	41 (74,5) 7 (87,5)	0,667
Differenzierungsgrad G1 (25) G2/G3 (38)	18 (72,0) 30 (78,9)	0,558
Alter <70 Jahre (39) ≥70 Jahre (24)	31 (79,5) 17 (70,8)	0,545



**Abbildung 3.4:** Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens (a) und Gesamtüberlebens (b) in Bezug zu Alterationen des p16-Gens

Ob Promotormethylierung und Deletion auch parallel auftreten, wurde an 48 Primärtumoren und 15 Metastasen evaluiert, bei denen der Promotor vorhanden und sowohl Methylierungsanalyse als auch Deletionsanalyse erfolgreich waren.

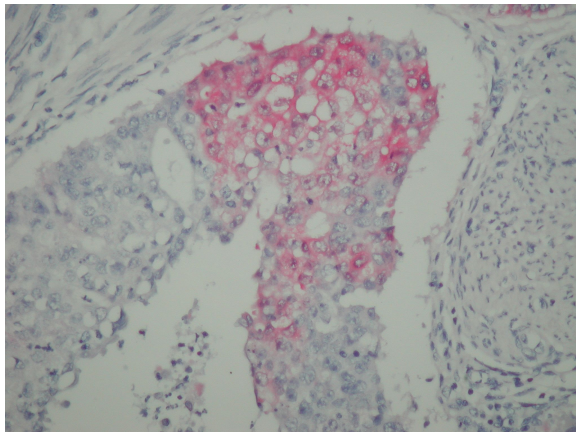
Lediglich zwei Primärtumoren (4,2%) und eine Metastase (6,7%) zeigten sowohl eine Methylierung als auch eine Deletion.

### 3.3 Immunhistochemische Analyse der p16-Proteinexpression

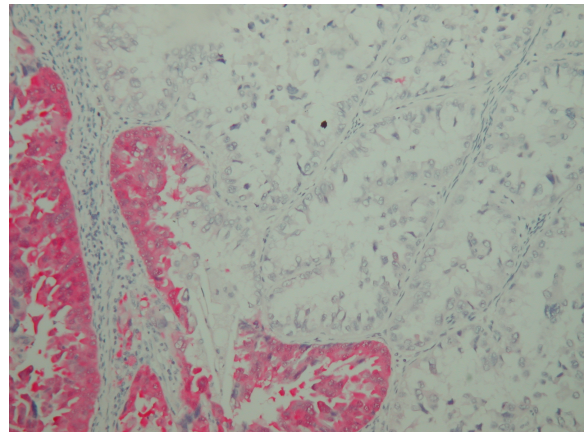
66 Primärtumoren und 16 Metastasen wurden der immunhistochemischen Analyse der p16-Proteinexpression unterzogen.

Auf vielen Schnitten mit detektierbarer p16-Proteinexpression fiel auf, dass die Färbung sehr inhomogen verteilt war, ohne dass ein immer wiederkehrendes Verteilungssystem erkennbar oder Unterschiede in der zellulären Struktur offensichtlich gewesen wären. Zur Veranschaulichung sind zwei verschiedene Tumoren mit inhomogener Färbung in Abbildung 3.5 dargestellt, anhand derer auch deutlich wird, dass die nukleäre Färbung häufig von einer zytoplasmatischen Komponente begleitet wird.

a)



b)



**Abbildung 3.5:** Ein Beispiel eines gut differenzierten (a) und eines schlecht differenzierten Tumors (b) mit inhomogener p16-Färbung: in demselben Tumor liegen jeweils positive wie komplett negative Bereiche unmittelbar nebeneinander, zum Teil sogar innerhalb einer Tumordrüse

25 von 66 Primärtumoren (37,9%) zeigten keine oder nur eine minimale Proteinexpression (<15% gefärbte Zellen), während 41 Fälle (62,1%) eine relevante Menge an p16-Protein exprimierten (≥15% der Zellen wiesen eine nukleäre Färbung auf). Im Mittel wurde ein Expressionsscore von 2,55 erreicht, der Median lag bei einem Score von 2, wobei sich die Ergebnisse zwischen 0 und 9 bewegten. Die Häufigkeitsverteilung der Expressionsscores lässt sich an Tabelle 3.4 ablesen.

**Tabelle 3.4:** Häufigkeitsverteilung der Expressionsscores in den Primärtumoren

Expressionsscore	Häufigkeit (%)	
0	9 (13,36)	Keine/ minimale Expression
0,5	5 (7,58)	
1	11 (16,67)	
2	12 (18,18)	
3	10 (15,15)	moderate/ hohe Expression
4	7 (10,61)	
5	7 (10,61)	
6	1 (1,52)	
7	1 (1,52)	
8	2 (3,03)	
9	1 (1,52)	
10	0 (0)	

Von den 16 untersuchten Metastasen konnte in 9 Fällen (56,3%) keine oder nur eine minimale Expression detektiert werden, während in den restlichen 7 (43,7%) mindestens 15% der Zellen eine Färbung aufwiesen. Auch hier lag die Spanne der tatsächlich vorkommenden Ergebnisse zwischen 0 und 9. Der Mittelwert betrug 2,31, der Median fiel auf 1.

### 3.3.1 p16-Proteinexpression als Prognosefaktor

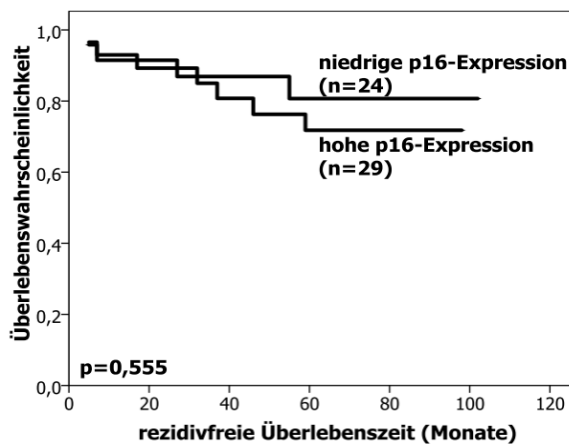
Beim Mittelwertsvergleich mit Hilfe des t-Testes konnte zwischen metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren kein signifikanter Unterschied in der Expression des p16-Proteins festgestellt werden (s. Tabelle 3.5), es zeigte sich aber die Tendenz zu einer niedrigeren Expression in den Primärtumoren mit Metastasen. Auch die Korrelation der Proteinexpression mit FIGO-Stadium, Nodalstatus, Differenzierungsgrad, histopathologischem Typ und Alter deckte keine signifikanten Zusammenhänge auf (s. Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5:** Übersicht über die Korrelation von Proteinexpression und klinisch-pathologischen Parametern

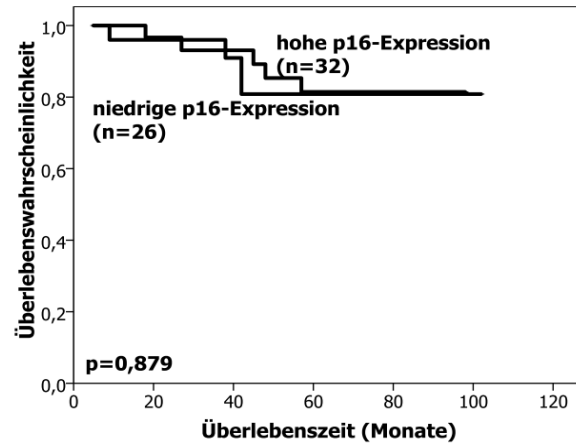
<b>Klinisch-pathologische Parameter (Zahl der Fälle)</b>	<b>Durchschnittliche Proteinexpression (Score-Mittelwert)</b>	<b>p-Wert (t-Test)</b>
Gesamtzahl (66)	2,55	
Metastasierung nicht metastasiert (46) metastasiert (20)	2,57 2,48	0,877
FIGO-Stadium I/II (49) III/IV (17)	2,57 2,44	0,832
Nodalstatus Nx (39) N0 (21) N1 (6)	3,24 3,33	0,931
Histopathogenetischer Typ I (58) II (8)	2,44 3,25	0,322
Differenzierungsgrad G1 (24) G2/G3 (42)	2,56 2,52	0,945
Alter <70 Jahre (40) ≥70 Jahre (26)	2,51 2,58	0,907

Die Höhe der Proteinexpression zeigte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben ( $p=0,555$  und  $p=0,879$ ; s. Abbildung 3.6). Auch bei Verwendung anderer Grenzwerte zwischen niedriger und hoher Proteinexpression (z.B. 5% oder 25% statt 15% gefärbte Zellen) ließ sich keine signifikante Beziehung zum Überleben herstellen.

a)



b)



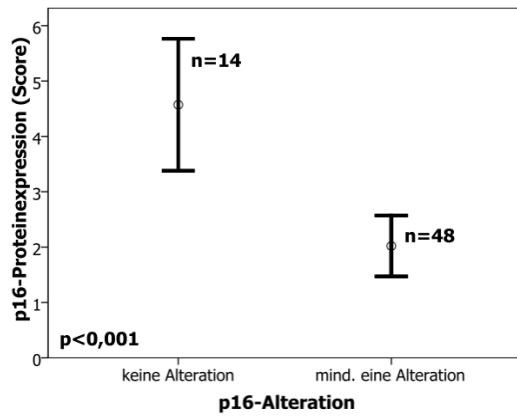
**Abbildung 3.6:** Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens (a) und des Gesamtüberlebens (b) in Bezug zur p16-Proteinexpression

### 3.3.2 p16-Proteinexpression in Abhängigkeit von DNA - Alterationen

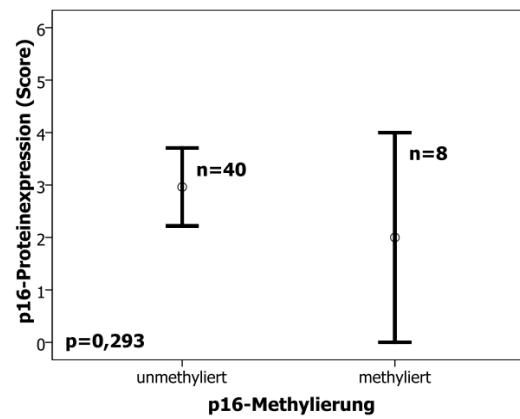
Mit Hilfe des t-Testes wurde überprüft, inwieweit die p16-Proteinexpression von dem Vorkommen von Alterationen des p16-Gens abhängt. Dabei erwies sich die Proteinexpression in Tumoren mit mindestens einer DNA-Alteration signifikant geringer als in Tumoren ohne Alterationen ( $p < 0,001$ ). Aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Mechanismen der Geninaktivierung stellte sich heraus, dass eine Promotormethylierung nur tendenziell zu einer Verringerung der Proteinexpression führte ( $p = 0,293$ ), während eine homozygote Deletion die Expression signifikant reduzierte ( $p = 0,001$ ). Die Tumoren mit Promotormethylierung zeigten jedoch auch stets eine Bande des unmethylierten Allels, während die Deletionen stets homozygot auftraten.

Die beiden Primärtumoren und die Metastase, die im p16-Gen sowohl eine Deletion als auch eine Promotormethylierung beherbergten, waren alle von einem p16-Expressionsverlust betroffen. Der visuellen Veranschaulichung dieser Zusammenhänge dient die Abbildung 3.7.

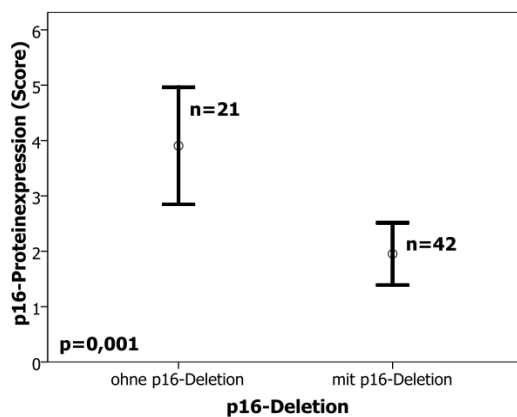
a)



b)



c)



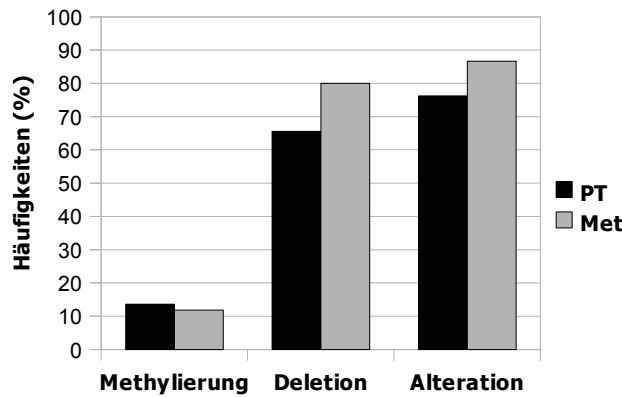
**Abbildung 3.7:** Korrelation von p16-Proteinexpression und DNA-Alterationen (a) und aufgeschlüsselt nach p16-Methylierung (b) und p16-Deletion (c)

### 3.4 Vergleich von Primärtumoren und Metastasen

#### 3.4.1 Vergleich der genetischen und epigenetischen p16-Alterationen

In den vorangegangenen Kapiteln sind die Häufigkeiten der p16-Alterationen sowohl in den Primärtumoren als auch in den Metastasen bereits aufgeführt. In Abbildung 3.8 sollen die genetischen und epigenetischen Aberrationen zusammenfassend gegenübergestellt werden, so dass ein Vergleich zwischen Primärtumoren und Metastasen anschaulich möglich ist.





**Abbildung 3.8:** Häufigkeiten von p16-Alterationen in Primärtumoren (PT) und Metastasen (Met) im Vergleich

Wie aus der Abbildung 3.8 ersichtlich ist, ist die Methylierungsrate in Primärtumoren und Metastasen in etwa gleich hoch (13,6% in PT und 11,8% in Met), während Deletionen (65,6% in PT und 80,0% in Met) und folglich auch p16-Alterationen insgesamt (76,2% in PT und 86,7% in Met) in den Metastasen häufiger anzutreffen sind.

Abbildung 3.9 zeigt den direkten Vergleich von Primärtumor und korrespondierender Metastase, wie er anhand von 15 Fällen angestellt werden konnte, in denen die DNA-Analysen in beiden Tumorgeweben pro Fall vollständige Ergebnisse erbrachten.

Fall	1		2		3		4		5		8		9		11		38		39		40		52		53		54		55	
	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
D9S162		■		■					■			■					■	■	■	■										
Promotor							m			m	m	m				m	■	■	■	■	■	■					m		m	
Exon 1	■	■	■	■					■		■	■	■		■		■	■	■	■	■	■	■			■	■	■		
Exon 2	■	■	■	■					■		■	■	■		■		■	■	■	■	■	■	■			■	■	■		
D9S171																	■	■	■	■	■	■								

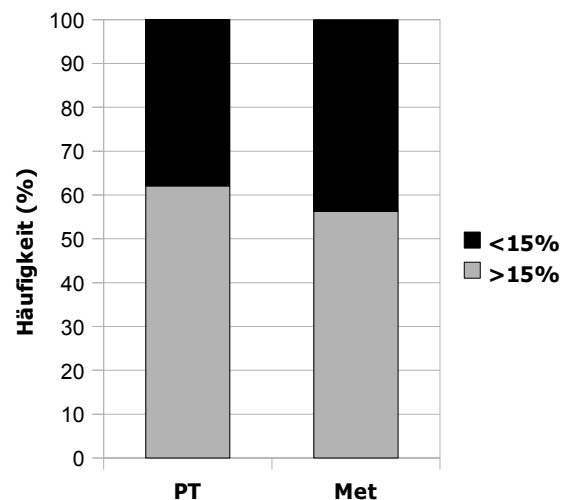
**Abbildung 3.9:** p16-Alterationen im direkten Vergleich von Primärtumor und korrespondierender Metastase (PT= P= Primärtumor; Met= M= Metastase; m= Promotor methyliert; schwarze Felder= deletierte Bereiche; weiße Felder= unveränderte Bereiche)

Alle 15 Fälle waren von mindestens einer p16-Alteration betroffen. Im Progressionsverlauf schien die Methylierung dabei relativ variabel aufzutreten, während Deletionen vom Primärtumor zur Metastase meistens bestehen blieben oder an Größe zunahmen. In zwei Fällen (Fall 4 und 54) kam es in der Metastase zu einem Neuauftreten einer Deletion, während die Methylierung aufgehoben wurde. In den Fällen 5 und 11 trat dagegen das umgekehrte Phänomen auf: der Primärtumor zeigte im Gegensatz zur Metastase eine Deletion, dafür war das p16-Gen in der Metastase dann durch Promotormethylierung inaktiviert.

### 3.4.2 Vergleich der p16-Proteinexpression

Wie bereits unter Kapitel 3.3 aufgezeigt, lag die p16-Proteinexpression in den Metastasen mit einem Mittelwert von 2,31 leicht unter der der Primärtumoren (im Mittel 2,55). Auch der Median differierte um eine Score-Einheit (Median der Primärtumoren 1, Median der Metastasen 2).

Die grafische Gegenüberstellung der Häufigkeit von minimaler (<15% gefärbte Zellen) und hoher (>15% gefärbte Zellen) Proteinexpression in Primärtumoren und Metastasen ist in Abbildung 3.10 gezeigt.



**Abbildung 3.10:** Häufigkeiten von einer p16-Proteinexpression <15% (PT:37,9%; Met:56,3%) und einer Expression >15% (PT:62,1%; Met:43,7%) in Primärtumoren und Metastasen  
PT= Primärtumoren; Met= Metastasen;

## 4 Diskussion

### 4.1 Validierung des Kollektivs

Da das Endometriumkarzinom zu den Tumoren zählt, die eher selten metastasieren, beruht diese Studie, die die Rolle des Tumorsuppressors p16 im Prozess der Metastasierung näher untersucht, auf einem Kollektiv mit nur zweistelliger Fallzahl. Dies birgt die Gefahr einer nicht repräsentativen Patientenauswahl mit der Folge einer mangelhaften Belastbarkeit der Daten. Um trotz der Fallzahl von insgesamt 89 Fällen, die nochmals auf eine metastasierte und eine nicht metastasierte Untergruppe aufgeteilt sind, sicherzustellen, dass das Kollektiv mit seiner Charakteristik ein repräsentatives Abbild vom Endometriumkarzinom darstellt, wurden vor der Auswertung der genetischen Daten die klinisch-pathologischen Parameter überprüft.

Wie zu erwarten ist, zeigte sich hierbei, dass hohes FIGO-Stadium, positiver Nodalstatus, Metastasierung und hohes Grading die Überlebenszeit signifikant verkürzten (vergleiche mit Einführungskapitel 1.5). Dass Patientinnen mit einem Tumor vom histopathogenetischen Typ II ein signifikant kürzeres rezidivfreies Intervall zeigten, geht konform mit den Beobachtungen von Hendrickson et al., die bereits 1982 aufdeckten, dass serös-papilläre Tumoren wesentlich häufiger für Rezidive verantwortlich sind als endometrioiden Tumoren desselben Stadiums (81). Auch Bokhman, der im darauffolgenden Jahr die Einteilung des Endometriumkarzinoms in die beiden pathogenetischen Typen I und II etablierte, charakterisierte Karzinome vom Typ II als Tumoren mit einer schlechteren Prognose sowie früher und häufiger auftretenden Rezidiven (20).

Hendrickson et al. beschrieben in ihrer Arbeit auch, dass Patientinnen mit serös-papillären Karzinomen mit durchschnittlich 66 Jahren circa 7 Jahre älter sind als Patientinnen mit endometrioiden Tumoren. In unserem Patientenkollektiv ist das Durchschnittsalter zwar im Gesamten ein paar Jahre höher, doch auch hier weisen Patientinnen mit einem Karzinom vom Typ II mit durchschnittlich 71 Jahren ein circa 7 Jahre höheres Alter auf als Patientinnen mit einem Typ I- Karzinom (s. 2.1.2 Charakteristik des Kollektivs).

Als unabhängiger Prognosefaktor konnte das Alter bei Erstdiagnose in der vorliegenden Arbeit dagegen nicht bestätigt werden. Auch wenn das Patientenalter in vielen Studien als relevanter Prognosefaktor identifiziert werden konnte (s. 1.5 Prognosefaktoren), finden sich in der Literatur ebenfalls Beispiele, die wie im vorliegenden Fall keinen unabhängigen Einfluss des Alters auf das Überleben beziehungsweise die Rezidivfreiheit nachweisen konnten (82,83).

Das Kollektiv kann unter Betrachtung der klinisch-pathologischen Parameter demzufolge als valide eingestuft werden, so dass auf dieser Grundlage Korrelationen der genetischen und immunhistochemischen Daten mit den klinisch-pathologischen Parametern und dem Überleben sinnvoll ausgeführt werden können.

## 4.2 DNA - Alterationen des Tumorsuppressors p16

Als bedeutsames zellzyklusregulierendes Gen ist das p16-Gen ein Ziel von genetischen und epigenetischen Veränderungen während der Karzinogenese verschiedener Tumoren. Wie in der Einführung aufgezeigt, scheinen p16-Alterationen im Endometriumkarzinom während der Tumorentwicklung eher spät aufzutreten, wenngleich der genaue Zeitpunkt und die genaue Rolle vor allem im Typ II-Karzinom noch nicht in vollem Ausmaße verstanden sind. Als später Angriffspunkt während der Tumorprogression ist das Wissen um die Aberrationen des p16-Gens aber insbesondere in Hinblick auf den letzten Progressionsschritt, die Metastasierung, von besonderem Interesse, weshalb diese Arbeit eben jene Zusammenhänge näher beleuchten möchte.

Wie in der Einführung unter 1.4.1 ausgeführt, kann die Ausschaltung eines Tumorsuppressorgens sowohl auf genetischer als auch auf epigenetischer Ebene erfolgen. Bezogen auf das p16-Gen gelten homozygote Deletionen auf genetischer Ebene und Hypermethylierung auf epigenetischer Ebene als Hauptmechanismen der Geninaktivierung in Malignomen (84), auch wenn in bestimmten Tumoren Regionen des Gens identifiziert werden konnten, die gehäuft Punktmutationen aufweisen können (85). In Endometriumkarzinomen sind p16-Punktmutationen nur vereinzelt aufgespürt worden (52,74), so dass sich diese Arbeit auf die Untersuchung von Deletionen als genetischen und Promotormethylierung als epigenetischen Inaktivierungsmechanismus konzentriert.

### 4.2.1 Promotormethylierung

Seit Mitte der 1990er Jahre ist bekannt, dass Hypermethylierung des p16-Gens eine Hemmung seiner Transkription bewirkt (86). Seither wurde diese Form der Geninaktivierung in vielen verschiedenen Tumoren untersucht. Hierbei stellte man fest, dass jede Tumorentität ihr ganz eigenes Methylierungsprofil aufweist (87), weshalb die Methylierungshäufigkeit am p16-Promotor je nach Tumortyp stark variiert. So konnten Esteller et al. beispielsweise nur in 1% der von ihnen untersuchten Leukämien eine Methylierung des p16-Gens feststellen, in Colon- und Pankreaskarzinomen aber in knapp 40% und in Lymphomen sogar in 48% der Fälle (88).

Im Endometriumkarzinom schwanken die Angaben zur p16-Methylierung zwischen 0 und 37% (s. Tabelle 4.1). Von Semczuk et al. (52) wurde diesbezüglich die Vermutung geäußert, dass epidemiologische Faktoren bei der Methylierungsrate eine Rolle spielen könnten. Wie die Übersicht in Tabelle 4.1 jedoch verdeutlicht, konnten in asiatischen Patientinnen sowohl die niedrigsten als auch die höchsten Methylierungsraten vorgefunden werden, obwohl in fast allen Studien mit der gleichen Methode, nämlich der Methylierungsspezifischen PCR (MSP), gearbeitet wurde.

**Tabelle 4.1:** Häufigkeiten von p16-Methylierung im Endometriumkarzinom in der Literatur

<b>Methylierungshäufigkeit (%)</b>	<b>Autoren (Literaturverweis)</b>	<b>Publikationsjahr, Studienort</b>
0/52 (0)	Banno et al. (89)	2006, Japan
0/21 (0)	Kang et al. (90)	2006, Korea
0/26 (0)	Nakashima et al. (91)	1999, Japan
0/32 (0)	Yanokura et al. (92)	2006, Japan
1/138 (0,7)	Salvesen et al. (75)	2000, Norwegen
2/47 (4,2)	Semczuk et al. (52)	2003, Polen
10/49 (20,4)	Wong et al. (93)	1998, Hong Kong
6/29 (20,7)	Esteller et al. (88)	2001, USA
32/127 (25,2)	Yang et al. (94)	2006, China
10/27 (37,0)	Tsuda et al. (95)	2000, Japan

Die beiden europäischen Studien von Semczuk et al. (52) und Salvesen et al. (75) ähneln sich in ihren Ergebnissen dagegen und sprechen sich für die Bedeutung der p16-Methylierung in wenigen Fällen des Endometriumkarzinoms aus. Obwohl die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobene Methylierungshäufigkeit von 13,6% im mittleren Bereich der internationalen Ergebnisse liegt, erscheint sie im Vergleich zu den oben genannten europäischen Studien erstaunlich hoch zu liegen. Zieht man die unterschiedlichen Kollektivzusammensetzungen in Betracht, wird diese Beobachtung jedoch plausibel: bei Semczuk et al. und Salvesen et al. bestehen die Kollektive zum Großteil (etwa 75%) aus Karzinomen im frühen FIGO I-Stadium, während diese im hier beschriebenen Kollektiv nur knapp 56% ausmachen. Und sowohl Semczuk et al. als auch Wong et al. (93) konnten demonstrieren, dass p16-Methylierung in hohen FIGO-Stadien signifikant häufiger vorzufinden ist als in FIGO I-Tumoren. Der Zusammenhang zwischen höherem FIGO-Stadium und vermehrt auftretender p16-Promotormethylierung ist in der vorliegenden Arbeit zwar nicht signifikant, aber dieser Trend bildet sich auch an unserem Kollektiv ab und könnte für die im europäischen Vergleich hohe Methylierungsrate verantwortlich sein.

Da Tsuda et al. (95) aber keinen nennenswerten Unterschied zwischen FIGO I-Tumoren und Karzinomen höheren Stadiums bezüglich der p16-Methylierungsrate entdecken konnten und Yang et al. (94) im Gegenteil sogar nur eine Methylierung des p16-Promotors im FIGO I- Stadium beschreiben, ist es auch möglich, dass die Streuung der Ergebnisse in den verschiedenen Studien nicht nur auf Kollektivunterschiede, sondern mitunter auf technische Einflussgrößen wie z.B. unterschiedliche Primersequenzen zurückzuführen ist.

Unter Umständen ist die große Varianz der p16-Promotormethylierung auch ein Indiz dafür, dass diese Form der Geninaktivierung in der Karzinogenese des Endometriumkarzinoms zwar eine Rolle spielen

kann, aber einzeln nicht zu den essenziellen Mechanismen dieses Prozesses gehört und daher variabel auftritt. Da das Vorkommen von p16-Methylierung in endometrialen atypischen Hyperplasien ähnlich stark schwankt wie im Karzinom (89,91,92,95), scheint es auch keinen typischen Zeitpunkt für das Auftreten dieser Alteration im Verlauf der endometrialen Karzinogenese zu geben, auch wenn Guida et al. einen signifikanten Anstieg der Methylierung vom normalen Endometrium über die atypische Hyperplasie zum Endometriumkarzinom feststellen konnten (96).

Ebenso wenig ließ sich in der vorliegenden Studie ein relevanter Zusammenhang zwischen der p16-Methylierung und klinisch-pathologischen Parametern wie Nodalstatus, histopathogenetischem Typ, Differenzierungsgrad und Patientenalter bei Erstdiagnose registrieren. Die Beobachtung von Yang et al. (94), dass die Hypermethylierung des p16-Gens vom histologischen Typ abhängt, konnte also nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse gehen mit denen von Wong et al. (93) konform, die ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen p16-Methylierung und histologischem Typ, Differenzierungsgrad und Patientenalter nachweisen konnten.

Trotz der schwankenden Häufigkeit und der fehlenden signifikanten Beziehung zu klinisch-pathologischen Parametern scheint die Methylierung des p16-Promotors in der Karzinogenese des Endometriumkarzinoms nicht ganz unbedeutend zu sein. So konnte hier gezeigt werden, dass 62,5% der methylierten Primärtumoren zu einer Metastase oder einem Rezidiv führten. Das erweckt die Hoffnung, dass die p16-Methylierung im Endometriumkarzinom als Progressionsmarker dienen könnte ähnlich wie sie in der oralen epithelialen Dysplasie (97,98) und dem Barrett-Ösophagus (99) als Prädiktor für die Transformation zum Karzinom postuliert wurde. In der Tat sind die metastasierten Primärtumoren doppelt so häufig methyliert wie die nicht metastasierten Primärtumoren, bei insgesamt niedriger Methylierungsrate und statistisch kleinen Zahlen wurde das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht. Da das Endometriumkarzinom aber verhältnismäßig selten zu Metastasen führt und es daher noch keine vergleichbaren Studien an größeren metastasierten Kollektiven gibt, sind die vorgestellten Daten auch bei nicht erreichtem Signifikanzniveau als erster deutlicher Hinweis für die Bedeutung der p16-Methylierung während der Tumorprogression zu werten. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass Patientinnen mit methyliertem Primärtumor im Gegensatz zu Patientinnen mit unmethyliertem Karzinom in der vorliegenden Untersuchung ein signifikant verkürztes rezidivfreies Überleben aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch im nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom, in dem die Methylierung des p16-Promotors ebenfalls mit kürzerem rezidivfreiem Überleben assoziiert war und daher als prädiktiver Marker angesehen wird (100,101). Vergleichbar mit den hier vorgestellten Daten konnten auch Wong et al. (93) im Endometriumkarzinom registrieren, dass die Methylierung in den Patientinnen häufiger auftritt, die im Verlauf ein Rezidiv oder Progress erleiden oder an ihrer Krebserkrankung sterben. Wie bei Yang et al. (94) konnte in unserem Kollektiv bezogen auf das Gesamtüberleben allerdings kein signifikanter Einfluss des Methylierungsstatus am p16-Promotor nachgewiesen werden.

Insgesamt präsentiert sich die p16-Methylierung im Endometriumkarzinom also als variabel auftretender Mechanismus der Geninaktivierung, der potenziell im Primärtumor auf eine Neigung zur Metastasierung hindeutet, wobei Letzteres an größeren Kollektiven bestätigt werden sollte.

#### 4.2.2 Deletionen

In vielen verschiedenen Malignomen stellen Deletionen des p16-Gens eine häufig anzutreffende genetische Alteration dar. Mit 83% sehr häufig anzutreffen sind sie laut Reed et al z.B. in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (102). Auch in Glioblastomen und Adenokarzinomen des Pankreas wurden mit 57% bzw 37% hohe Raten an p16-Deletionen beobachtet (103,104). In gynäkologischen Tumoren variiert die Häufigkeit von nur wenigen Prozent im Zervix- und Ovarialkarzinom bis zu 50% im Vulvakarzinom, wobei bei Letzterem nur auf kleine Fallzahlen zurückgegriffen werden kann (105,106).

In dem hier vorgestellten Kollektiv aus Endometriumkarzinomen ist das p16-Gen in mehr als 65% der Primärtumoren von einer Deletion betroffen. Die Deletion scheint also ein Hauptmechanismus der Inaktivierung des p16-Gens im Endometriumkarzinom zu sein, wobei sie von einer kleinen partiellen Deletion bis hin zum kompletten Allelverlust unterschiedliche Ausmaße annehmen kann.

Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Fällen finden sich in anderen Studien mit Endometriumkarzinomen indes nur wenige p16-Deletionen. Problematisch stellt sich beim Vergleich allerdings die uneinheitliche Methodik dar: einerseits variiert die Anzahl der untersuchten Exons, andererseits die Methode zur Deletionsanalyse. Der kodierende Bereich des p16-Gens besteht aus drei Exons, wovon Exon 1 und 2 über 90% des kodierenden Bereiches ausmachen, weswegen wir diese beiden untersucht haben. Nakashima et al. (91), die nur in 3% der 38 untersuchten Endometriumkarzinome p16-Deletionen detektieren konnten, haben ihre Suche auf Exon 2-Intron 2 beschränkt und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit einen nicht unerheblichen Teil der partiellen Deletionen nicht erfassen können. Milde-Langosch et al. fanden in 36 Karzinomen keine Deletion, haben aber auch nur einen einzelnen Abschnitt des p16-Gens untersucht (107). Aber auch Hatta et al. (108) und Semczuk et al. (52), die zwar Exon 1 und 2 bzw. sogar alle drei Exons in ihre Untersuchung einbezogen haben, konnten in keinem von 15 bzw. vier von 50 Fällen (8%) eine Deletion nachweisen. Beide nutzten jedoch zur Analyse die single strand conformation polymorphism-Methode (SSCP), deren Sensitivität nur bei kleinen DNA-Fragmenten ausreichend hoch ist und daher vor allem zum Aufspüren von Punktmutationen geeignet ist (109). Bei großen Deletionen, insbesondere einem Allelverlust, liefert sie in der Regel kein Ergebnis, so dass der betroffene Fall als nicht analysierbar ausgesondert wird anstelle als deletiert erkannt zu werden. Die unter 2.2.1.3 beschriebene PCR-Methode erlaubt dagegen insbesondere auch unter Nutzung der benachbarten Mikrosatellitenmarker D9S162 und D9S171 eine weitaus genauere Deletionsanalyse, die neben kleinen Deletionen auch

große Allelverluste aufdecken kann. Um auszuschließen, dass die trotz der schon erwähnten Unterschiede in der Untersuchung noch hoch erscheinenden Deletionsraten in dieser Studie nicht auf einer fehlerhaften PCR-Durchführung beruhen, wurden die Analysen bei fehlendem Nachweis eines DNA-Abschnitts wiederholt ausgeführt, wenn möglich durch eine andere Person. Da demnach von einer korrekten Analyse ausgegangen werden kann, müssen noch weitere Gründe für das hier häufige Auftreten von Deletionen in Betracht gezogen werden. Neben epidemiologischen Unterschieden könnte es auch eine Rolle spielen, dass das Kollektiv ungewöhnlich viele fortgeschrittene FIGO-Stadien beinhaltet, die zwar nicht signifikant, aber doch tendenziell häufiger von Deletionen betroffen waren. Im Gegensatz zu Semczuk et al. (52), bei denen das Kollektiv zu 76% aus FIGO I-Tumoren zusammengesetzt war, machten FIGO I-Tumoren hier nur einen Prozentsatz von 48% aus.

Unter Berücksichtigung aller erläuterten Differenzen in der Methodik und im Kollektiv erscheint die Deletionsrate von 65% durchaus plausibel, bei fehlendem signifikanten Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern und Patientenüberleben scheint sie alleine jedoch nicht aussagekräftig für die klinische Anwendung.

Interessant in Hinblick auf die Identifizierung eines möglicherweise bestehenden "Deletions-Hotspots" innerhalb des p16-Gens ist aber, dass in der vorliegenden Untersuchung ebenso wie in der Studie von Semczuk et al. (52) Exon 1 etwas häufiger von Deletionen betroffen ist als Exon 2. Bei Punktmutationen wurde dagegen bezogen auf verschiedene Malignome beobachtet, dass Exon 2 eher prädestiniert sei als Exon 1 (85). Da in über der Hälfte der Primärtumoren mit partieller Deletion aber Exon 1 und Exon 2 Zielort der Mutation waren, wäre es übertrieben von einem tatsächlichen "Deletions-Hotspot" allein in Exon 1 auszugehen.

### **4.2.3 p16-Alterationen**

In den beiden vorangegangenen Unterkapiteln wurden epigenetische und genetische Alterationen des p16-Gens unabhängig voneinander betrachtet. Da sie schlussendlich aber den gleichen Effekt haben und das Gen in seiner Funktion ausschalten, müssen beide in ihrer Zusammenwirkung betrachtet werden. Dabei fällt auf, dass das p16-Gen im Endometriumkarzinom sehr häufig, nämlich in ungefähr dreiviertel aller Primärtumoren, von einem "Hit" getroffen ist. Ab FIGO-Stadium II scheinen p16-Alterationen sogar ubiquitär aufzutreten. Wie in den unter 1.4.2 vorgestellten Progressionsmodellen bereits abgebildet, scheint die Veränderung von p16 in der Tumorigenese des Endometriumkarzinoms also Teil eines späten Progressionsschritts zu sein.

Die signifikante Korrelation von p16-Alterationen und FIGO-Stadium ist u.a. von Semczuk et al. beobachtet worden, die ebenfalls ab Stadium II einen deutlichen Häufigkeitsanstieg verzeichnen konnten (52). In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass diese Anhäufung von Alterationen in fortgeschrittenen Tumorstadien den gesamten Rb-Signalweg, inklusive des p16-Gens und CDK4-



Cyclin D-Komplexes (siehe Kapitel 1.4.4), betrifft (110). Der Eingriff in diese Stelle des Zellzyklus scheint für das Fortschreiten des Endometriumkarzinoms offenbar von großer Bedeutung zu sein. So wurde auch von Salvesen et al. bereits postuliert, dass ein p16-Hit mit aggressivem Tumorverhalten und schlechter Prognose einhergeht, denn in ihrem Kollektiv fanden sich nicht nur eine Assoziation zu hohen FIGO-Stadien, sondern auch zu schlechtem Differenzierungsgrad und kurzem Patientenüberleben (74).

Der Einfluss der p16-Alterationen auf das rezidivfreie bzw. Gesamtüberleben ist in den unter 3.2.3 abgebildeten Kaplan-Meier-Kurven zwar sichtbar, jedoch ohne statistische Signifikanz. Trotzdem sprechen auch die hier vorgestellten Daten dafür, dass die Inaktivierung des p16-Gens mit einem aggressiven Phänotyp in Verbindung gebracht werden kann: die Rate an Alterationen war in den Primärtumoren, die im Laufe des Beobachtungszeitraums zu einer Metastase führten, signifikant höher als in den nicht metastasierten Tumoren. Als spätes Ereignis in der Karzinogenese präsentieren sich p16-Alterationen also tatsächlich als relevant für den letzten Schritt der Progression, die Metastasierung. Sie scheinen den betroffenen Tumorzellen einen Selektionsvorteil zu bieten, der die Ausbreitung der Krankheit fördert. Dabei ist in der Regel ein einzelner Hit, also eine Methylierung oder eine Deletion als singulärer Inaktivierungsmechanismus, ausreichend, denn nur selten treten beide gleichzeitig auf, wie nicht nur in der vorliegenden Arbeit, sondern auch von Wong et al. registriert wurde (93).

Da es sich bei den detektierten Deletionen um homozygote Deletionen handelt, ist dieses auch verständlich, denn sie bewirken ja bereits eine vollständige Inaktivierung des p16-Gens. Bei der Methylierungsanalyse trat neben der Methylierungsbande allerdings auch immer eine Bande für unmethylierte DNA auf, so dass das Vorkommen einer Methylierung von nur einem einzigen Allel möglich ist. In diesem Fall wäre das Gen nicht vollständig inaktiviert und ein zweiter Hit im Sinne von Knudsons Zwei-Treffer-Theorie wäre für die Tumorprogression zweckmäßig. Nicht jede parallel auftretende unmethylierte Bande muss aber auf eine heterozygote Methylierung hinweisen. Sie könnte auch auf eine Kontamination mit normalen Stromazellen oder das Vorkommen verschiedener Zellklone in demselben Tumor zurückzuführen sein, denn in tumorösen Veränderungen aus Lunge und Zervix uteri konnte mit Hilfe einer MSP-in situ Hybridisierung vorgeführt werden, dass die Methylierung des p16-Gens nicht flächendeckend, sondern in Foci innerhalb der Läsion auftritt (111). Dann wäre das p16-Gen in den betroffenen Zellen auch durch die Methylierung vollständig inaktiviert und eine zweite Alteration in Form einer Deletion nicht notwendig, um den Selektionsvorteil durch den p16-Verlust zu erwerben. Es ist aber auch zu überlegen, ob nach einer möglichen heterozygoten Methylierung mitunter deshalb keine Deletion als zweiter Hit auftritt, weil die Halbierung der einsatzbereiten Gendosis bereits genügt der Tumorzelle einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Allein die Verringerung des p16-Genprodukts könnte die Lebenszeit der Zelle bereits so erhöhen, dass über die Zeit eine Akkumulation von genetischen Abnormalitäten möglich wird, die im Weiteren einen Selektionsvorteil erbringt. Zu dieser Theorie passt, dass Träger einer heterozygoten familiären p16-Mutation zumindest in der Melanomentwicklung keinen Vorteil im Vergleich zu homozygoten

Mutationsträgern aufzuweisen scheinen (66).

Um die tatsächliche Auswirkung der genetischen Alterationen auf die Transkription des Genprodukts einschätzen zu können, ist die Beurteilung der Proteinexpression von Bedeutung, die in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet werden soll.

### **4.3 p16-Proteinexpression**

Bei der immunhistochemischen Analyse der p16-Proteinexpression fiel, wie Abbildung 3.5 illustriert, auf vielen Tumorschnitten eine sehr inhomogene Verteilung der Färbung auf. Da sie sich dabei an keinen histologisch erkennbaren Merkmalen wie Differenzierungsgrad oder histologischem Typ orientiert, lässt sich dieses Phänomen nicht mit der unterschiedlichen Ausprägung einzelner Bereiche innerhalb des Karzinoms in Zusammenhang bringen. Eine schlüssige Erklärung bleibt die bisherige Literatur schuldig, auch wenn dieses inhomogene Erscheinungsbild nicht unbekannt ist (112,113, 114). Horrée et al. beobachteten an der Invasionsfront des Tumors eine höhere p16-Expression als im restlichen Karzinom und stellten deshalb die These auf, dass die inhomogene Färbung auf einer Interaktion mit dem gesunden Gewebe oder möglicherweise auch einer klonalen Selektion beruhen könnte (115). Diese Beobachtung konnte im vorliegenden Kollektiv zwar in manchen Fällen nachvollzogen werden, auf den meisten Schnitten ließ sich histologisch aber kein wiederkehrendes Verteilungssystem hinter der inhomogenen p16-Verteilung erkennen, so dass eine Interaktion mit dem umgebenden gesunden Gewebe als Ursache für die uneinheitliche Färbung unwahrscheinlich erscheint. Womöglich ist die immunhistochemische Inhomogenität aber Ausdruck einer genetischen Variabilität, die auf der Entwicklung verschiedener Subklone aus dem ursprünglichen Tumorzellklon beruht (116), denn wie bereits unter 4.2.3 zitiert, konnte belegt werden, dass auch die Methylierung des p16-Gens heterogen in Foci auftreten kann (111).

Da sich nicht nur die p16-Färbung selbst als inhomogen präsentiert, sondern auch ihre Bewertung sehr uneinheitlich vorgenommen wird, soll im Folgenden kurz auf die immunhistochemische Methodik eingegangen werden bevor die Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern und genetischen Alterationen erörtert wird.

### 4.3.1 Diskussion der immunhistochemischen Methodik

Die immunhistochemische Analyse gilt als etabliertes Verfahren zur Bestimmung der Proteinexpression. Das hat für das p16-Protein Gültigkeit wie für andere Proteine auch, jedoch gibt es eine Kontroverse über die histologische Beurteilung der p16-Färbung. Einerseits werden für die Scoring-Systeme unterschiedliche Grenzwerte verwendet, andererseits herrscht Unklarheit über die heranzuziehenden Elemente der Färbung. Während die Färbeintensität nur gelegentlich mit in die Bewertung einbezogen wird, ist man sich einig, dass der Anteil der gefärbten Zellen wesentlicher Bestandteil der Beurteilung ist. Da die p16-Färbung aber sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch auftreten kann, stellt sich die Frage, welche als die "wahre", relevante Färbung angesehen werden kann oder ob beide parallel berücksichtigt werden müssen.

Einen entscheidenden Hinweis lieferte diesbezüglich die Beobachtung, dass die zytoplasmatische Reaktivität auch in p16-negativen Zellkulturen vorzufinden ist, weshalb sie als unspezifisches Artefakt gedeutet wurde (117). Da man von einem Zellzyklusinhibitor erwartet, dass er an der DNA und dementsprechend im Nukleus wirkt, interpretierten Shiozawa et al. das zytoplasmatische Vorkommen des p16-Proteins als eine ruhende Form desselben (112). Die genaue Entstehung der zytoplasmatischen p16-Färbung ist also nicht abschließend geklärt, aber offenbar ist sie am ehesten als Begleiterscheinung aufzufassen. Zumindest trat sie in der vorliegenden Untersuchung nie einzeln, sondern stets konkomitierend zur nukleären Färbung auf, während Letztere auch eigenständig vorkam. Dass der zytoplasmatischen Färbung nicht die entscheidende Bedeutung zukommt, wird auch durch die Gegebenheit gestützt, dass zur Unterscheidung von Zervix- und Endometriumkarzinomen die nukleäre p16-Färbung einzeln oder in Kombination mit der zytoplasmatischen Färbung zu Rate gezogen werden kann, nicht jedoch die zytoplasmatische Färbung allein (118). Wie in der vorliegenden Arbeit wird deshalb in der Regel die nukleare Färbung als Kriterium für die immunhistochemische Bewertung genutzt.

Uneinheitlich erfolgt dagegen die Einteilung der Tumoren in Gruppen verschiedener Expressionsstärke. In den meisten Studien wird der Grenzwert zwischen niedriger und relevanter Expression aber bei 10% gefärbten Zellen angesetzt, weshalb auch hier der Schwellenwert bei 1 (maximal 15% gefärbte Zellen) angelegt wurde. Wünschenswert wäre jedoch eine Vereinheitlichung des Scoring-Systems zur Beurteilung des p16-Status, um eine hohe Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Studien zu gewährleisten.

### 4.3.2 p16-Proteinexpression als Prognosefaktor

Wahrscheinlich aufgrund von Unterschieden in der methodisch-technischen Anwendung der Immunhistochemie und den oben beschriebenen Differenzen in der Bewertung der Färbung ist die Spanne der publizierten Ergebnisse zur p16-Proteinexpression im Endometriumkarzinom sehr groß. So berichten einige Autoren, dass nur 14-25% der Endometriumkarzinome einen p16-Proteinverlust aufweisen (75,95,91,92,119,120), während andere dies in 55-74% der Fälle beobachteten (121,107, 112).

Der hier aufgetretene p16-Verlust in knapp 38% der Primärtumoren liegt im Mittelfeld dieser Bandbreite. Auffällig ist jedoch, dass sich der Mittelwert des Expressionsscores mit 2,55 und der Median mit 2 insgesamt recht niedrig präsentieren. Eine Häufung niedriger Scores findet sich aber z.B. auch bei Reid-Nicholson et al. (122) und geht konform mit der beobachteten Inhomogenität der Färbung, denn bei nur fokalem Auftreten des p16-Proteins kann kein hoher Score erreicht werden.

Die Färbheterogenität könnte ebenfalls ein Grund für die unterschiedlich angegebenen Expressionshäufigkeiten sein, denn je nachdem von welchem Teil des Karzinoms der Schnitt für die Immunhistochemie entnommen wird, könnte das Ergebnis stark schwanken.

Ferner könnte die Zusammensetzung des Kollektivs Einfluss auf den Expressionsscore haben, denn klinisch-pathologische Parameter wie z.B. der histopathogenetische Typ korrelieren in manchen Studien signifikant mit der Proteinexpression. Dabei zeigt sich in Tumoren des histopathogenetischen Typs II stets eine höhere p16-Proteinexpression als in Tumoren vom Typ I (75,122). In einigen Studien, wie auch der Vorliegenden, ist dieser Zusammenhang jedoch aufgrund geringer Zahlen an Typ II-Karzinomen statistisch nicht signifikant (107,123).

Zu der Bedeutung des Differenzierungsgrads gibt es widersprüchliche Angaben: Salvesen et al. (75) und Buchynska et al. (121) legten dar, dass ein schlechter Differenzierungsgrad mit einem p16-Verlust einhergeht, während Milde-Langosch et al. in vielen schlecht differenzierten Tumoren eine p16-Überexpression feststellen konnten, von der sie allerdings annahmen, dass sie Zeichen einer Entkopplung des Proteins von seiner normalen inhibitorischen Funktion im Zellzyklus sei (107). Möglicherweise sind sowohl der Verlust als auch die Überexpression des Proteins Ausdruck einer genetischen Aberration, die im ersten Fall zu einem vollständigen Transkriptionsausfall beziehungsweise einem nicht mehr kenntlichen Protein führt, im zweiten Fall dagegen die Produktion eines Proteins bewirkt, das noch p16-Strukturen besitzt, die vom verwendeten Antikörper erkannt werden können, jedoch keine Funktion mehr innehat. Da die Zelle in letzterer Situation ohne Erfolg versucht den Zellzyklus zu stoppen, veranlasst sie dann mitunter eine kompensatorische Überproduktion des defekten Proteins, so dass es zu der beobachteten p16-Überexpression kommt.

In der vorliegenden Arbeit wie auch in der Studie von Semczuk et al. (120) konnte allerdings weder ein p16-Verlust noch eine Überexpression in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad

festgestellt werden.

Ähnliches gilt für FIGO-Stadium und Überleben, die zwar in zwei Studien signifikant mit einem p16-Verlust korrelierten (75,119), sich jedoch hier wie auch in anderen Untersuchungen (52,91,95) ohne Einfluss auf die Proteinexpression zeigten.

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich die p16-Proteinexpression demzufolge nicht als zuverlässiger Prognosefaktor im Endometriumkarzinom einsetzen. Eine niedrige Expression liefert aber möglicherweise einen Hinweis auf eine drohende Progression der Erkrankung, auch wenn sich bei kleiner Zahl metastasierter Tumoren und insgesamt niedriger Expression hier keine Signifikanz nachweisen ließ.

### **4.3.3 p16-Proteinexpression in Abhängigkeit von genetischen Alterationen**

Da die Produktion des funktionsfähigen p16-Proteins von der Unversehrtheit des p16-Gens abhängt, ist es interessant, genetische Alterationen und Proteinexpression nicht nur getrennt voneinander, sondern auch im Zusammenhang zu beurteilen.

Wie in Abbildung 3.7 visualisiert, konnte gezeigt werden, dass Alterationen des p16-Gens eine signifikante Reduktion der Proteinexpression bewirken. Dies entspricht der Erwartung, denn sowohl Methylierung als auch Deletion verhindern die korrekte Transkription des Gens. Dieser Zusammenhang konnte auch von Semczuk et al. (52) und Salvesen et al. (74) identifiziert werden, die aber ebenfalls feststellten, dass nicht jeder immunhistochemische p16-Verlust mit einer detektierbaren genetischen Alteration assoziiert ist. Ein Teil dieser Fälle könnte Mutationen besitzen, die methodisch nicht erfasst worden sind wie in der vorliegenden Studie z.B. Punktmutationen, die in etwa 4-5% der Endometriumkarzinome vorkommen (52,74,91). Auch veränderte Transkriptionsfaktoren oder ein Feedback-Mechanismus mit anderen Proteinen könnte an einer unerwartet niedrigen Proteinexpression beteiligt sein. Zumindest konnte in Sarkomen aufgedeckt werden, dass eine CDK4-Überexpression mit einer p16-Überexpression assoziiert ist (124) ähnlich wie es für eine Rb-Inaktivierung in Bronchialkarzinomen der Fall war (125). Im Endometriumkarzinom konnte ein Feedback-Mechanismus zwischen CDK4 bzw. Rb und p16 zwar nicht nachgewiesen werden (107, 120), aber trotzdem ist es nicht auszuschließen, dass es Proteine gibt, die mit p16 in Wechselwirkung treten und außer einer Überexpression auch einen p16-Verlust verursachen können ohne dass das p16-Gen von einer Alteration betroffen wäre.

Ist das p16-Gen aber nachweislich von einer homozygoten Deletion betroffen, tritt wie erwartet ein signifikanter Verlust der Proteinexpression auf. Bei einer p16-Methylierung dagegen ist die Reduktion der Proteinexpression nicht signifikant und die Spanne der beobachteten Expressionsscores reicht von

negativer bis weit verbreiteter Färbung. Diese Ergebnisse lassen sich mit denen von Tsuda et al. vergleichen, die ebenfalls in nur 30% der methylierten Karzinome einen immunhistochemischen Verlust des p16-Proteins verzeichnen konnten (95).

Wie bereits unter 4.2.3 erwähnt, zeigte sich bei der Methylierungsanalyse neben der Bande für methylierte DNA auch immer eine Bande für unmethylierte DNA, die dafür sprechen könnte, dass nur ein Allel des Gens von der Alteration betroffen ist. Demzufolge macht es Sinn, dass trotz Methylierung noch Protein synthetisiert werden kann. Dass dessen ungeachtet einige Fälle mit p16-Methylierung ohne einen zweiten Hit einen kompletten Verlust des p16-Proteins aufweisen, könnte einerseits darauf beruhen, dass die Bande für unmethylierte DNA in diesen Tumoren durch Kontamination mit gesunden Zellen zustande gekommen ist oder andererseits bereits die Inaktivierung eines Allels genügt die Transkription in gewissen Situationen zu verhindern. In den morphologisch unauffälligen Kolonkrypten von Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) konnte man nämlich bereits eine Veränderung des Proteoms ermitteln, obwohl sich diese Patienten nur durch eine heterozygote Mutation des APC-Gens auszeichneten, die in den untersuchten Zellen noch nicht zu einer homozygoten Mutation fortgeschritten war (126). Es erscheint also lohnenswert in diese Richtung weiter zu forschen, um die genauen Umstände und Mechanismen zu identifizieren, die bereits bei einem einzelnen genetischen Hit zu einer veränderten Proteinexpression führen können.

#### **4.4 Vergleich von Primärtumoren und Metastasen**

Wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert wurde, sprechen die Daten dieser Studie dafür, dass p16-Alterationen im Endometriumkarzinom eine große Bedeutung für die Metastasierung haben und mitunter prädiktive Aussagen erlauben könnten. Um die Betrachtung zu komplettieren, wurden auch die Metastasen selbst einer genetischen und immunhistochemischen Analyse unterzogen. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl an Alterationen in den Metastasen noch höher war als in den Primärtumoren, welches einer Zunahme an Deletionen geschuldet war. Dementsprechend prägte sich in den Metastasen auch die Proteinexpression etwas niedriger aus.

Der unmittelbare Vergleich von Primärtumor und korrespondierender Metastase demonstriert, dass die Deletionen während der Progression oft sogar noch an Größe zunehmen. Das unterstreicht einerseits ihre Bedeutung, könnte andererseits aber auch Zeichen einer zunehmenden genetischen Instabilität im Laufe der Tumorprogression sein. Die Methylierung des p16-Gens scheint dagegen während der Metastasierung ebenso wie in den Primärtumoren eher variabel aufzutreten und nicht wie zum Teil beschrieben während der Tumorprogression zuzunehmen (127). Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass die Methylierung des p16-Gens im Endometriumkarzinom nicht der Hauptmechanismus der Geninaktivierung ist, sondern variabel eingesetzt wird. Möglicherweise erfolgt dies immer dann, wenn es unter bestimmten Umweltbedingungen von Vorteil ist, denn vom Charakter her ist eine

epigenetische Veränderung wie die Methylierung zwar sehr stabil, aber potenziell reversibel. So gibt es Hinweise, dass die Methylierung während der Meiose eliminiert werden kann (128) und für die Methylierung an Histonen konnte bereits gezeigt werden, dass sie durch das Enzym Peptidylarginin-Deiminase 4 entfernt werden kann (129). Eine Deletion bedeutet für die Zelle dagegen stets einen endgültigen Verlust von genetischem Material, aber trotzdem führt Abbildung 3.9 vor, dass eine Metastase Bereiche, die im Primärtumor deletiert waren, wieder aufweisen kann. Da einmal verlorene DNA jedoch nicht einfach wieder akquiriert werden kann, muss der entsprechende Primärtumor verschiedene Subpopulationen von Zellen mit und ohne Deletion beherbergt haben, von denen offensichtlich die Zellen mit p16-Deletion zur Metastase führten. Dass Tumoren trotz monoklonalen Ursprungs im Verlauf unterschiedliche Subklone beinhalten können, ist bereits lange bekannt (130) und konnte wenigstens für die p16-Methylierung mit Hilfe der MSP-in situ Hybridisierung auch visualisiert werden (111).

Die vorgestellten Daten legen nun erstmals an den Tag, dass Subpopulationen mit einer Alteration des p16-Gens innerhalb des Endometriumkarzinoms offenbar einen Selektionsvorteil im Rahmen der Metastasierung besitzen. Dabei scheint es kein Einzelfall zu sein, dass das p16-Gen bei der Metastasierung von Tumoren involviert ist, denn auch in Metastasen des Malignen Melanoms und des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms konnten p16-Alterationen in einem beträchtlichen Teil der untersuchten Fälle detektiert werden (131,132).

#### **4.5 Klinische Bedeutung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Zusammenhang zwischen p16-Alterationen und der Progression des Endometriumkarzinoms untersucht.

Wie vorhergehend beschrieben sprechen die Daten dafür, dass p16-Alterationen nicht als eigenständiger Prognosefaktor Angaben zur statistischen Überlebenszeit der Patientinnen erlauben, wie es zum Beispiel die Bestimmung des Tumorstadiums ermöglicht. Als Prädiktionsmarker in Bezug auf die Tumorprogression, insbesondere die Metastasierung, scheinen die Veränderungen aber von großer Bedeutung zu sein.

So konnte gezeigt werden, dass die Methylierung des p16-Promotors einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben hat und Primärtumoren mit einer p16-Alteration eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen zu metastasieren als Tumoren ohne entsprechende Alteration.

In Bezug auf die Methylierung ergibt sich dadurch möglicherweise auch eine Option die rezidivfreie Zeit zu verlängern: so gibt es erste klinische Erfahrungen mit den DNA-Methyltransferasehemmern Azacitidin und Decitabin, die eine Demethylierung hypermethylierter DNA-Bereiche bewirken und auf diese Weise deaktivierte Tumorsuppressorgene wieder aktivieren können. Folgerichtig kann die

tumortypische ungeordnete Proliferation mit Hilfe der wieder aktivierten Tumorsuppressoren mitunter gestoppt werden. Studien beim Myelodysplastischen Syndrom und bei der akuten myeloischen Leukämie konnten diesbezüglich erste Therapieerfolge bei insgesamt guter Verträglichkeit aufzeigen (133,134).

Im Glioblastom gibt es Hinweise, dass die Methylierung der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) die Effektivität einer kombinierten Radiochemotherapie mit Temozolomid vorhersagen kann (135) ähnlich wie im Colonkarzinom der molekulare Status des Mismatch-repair-Gens hMLH1 Aussagen über die Effektivität einer Chemotherapie mit 5-Fluorouracil machen kann (136,137)

Auch wenn diese Beispiele sich nicht speziell auf die Methylierung des p16-Promotors und das Endometriumkarzinom beziehen, verdeutlichen sie doch das Potenzial des Wissens um diese molekularen Veränderungen, zumal es für die Situation des Progresses auch beim Endometriumkarzinom bereits klinische Studien zu sog. "targeted therapies" z.B. mit Temsirolimus, Lapatinib und Bevacizumab gibt, die an spezifischen molekularen Zielorten angreifen (138). Für ein Tumorsuppressorgen wie p16 erscheint es erstrebenswert, seine Ausschaltung durch genetische oder epigenetische Phänomene rückgängig zu machen, um den deregulierten Zellzyklus der entarteten Zellen anzuhalten.

Während die Methylierung zum Beispiel durch hypomethylierende Substanzen wie Azacitidin und Decitabin rückgängig gemacht werden kann, bleiben Genverluste durch Deletionen jedoch irreversibel.

Die Wiedereinführung der verlorenen DNA-Sequenzen mittels Gentherapie hat sich bis jetzt nicht als klinisch durchführbar erwiesen, doch gibt es erste Versuche die fehlende p16-Aktivität pharmakologisch zu ersetzen: so konnten Klein et al. kürzlich ein Pharmakophor mit p16-Aktivität identifizieren, das potenziell zur Entwicklung eines therapeutisch verwendbaren Wirkstoffes mit p16-Aktivität eingesetzt werden könnte, um die Tumorprogression in vivo einzudämmen (139). Bis zu der Verwendung einer solchen Substanz in der klinischen Routine sind zwar noch ausgiebige Testungen notwendig, aber die Ergebnisse unterstreichen dennoch, dass sich mit der Untersuchung molekularer Marker wie dem Tumorsuppressor p16 neben Progressionsanalysen auch neue Ansätze für Tumorthérapien eröffnen.



## 5 Zusammenfassung

Zielstellung dieser Arbeit war es, Alterationen des p16-Gens im Endometriumkarzinom insbesondere in Hinblick auf ihre Beteiligung bei der Metastasierung zu untersuchen. Hierzu wurden 89 Endometriumkarzinome, von denen 41 metastasiert waren, der methylierungsspezifischen PCR (MSP), einer PCR zur Deletionsanalyse und einer immunhistochemischen Färbung unterzogen, um Alterationen des p16-Gens und die p16-Proteinexpression zu detektieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass p16-Alterationen als späte Veränderung während der Tumorpromotion tatsächlich mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert sind. Von besonderer Bedeutung erwiesen sich hierbei Deletionen des Gens, während die Methylierung als epigenetischer Mechanismus variabel aufzutreten scheint.

Da sich der Einfluss der p16-Alterationen auf das rezidivfreie bzw. das Gesamtüberleben nicht als signifikant darstellte, kann die Verwendung von p16 derzeit nicht als eigenständiger Prognosefaktor empfohlen werden. Möglicherweise könnten p16-Alterationen aber der Risikoabschätzung bezüglich der Metastasierung von Endometriumkarzinomen dienlich und somit als Progressionsfaktor von Bedeutung sein. Hierzu sind Studien mit größeren Fallzahlen erstrebenswert. Zu beachten ist allerdings, dass aufgrund der Heterogenität der Karzinome, sowohl innerhalb einer Entität als auch innerhalb eines Individuums, ein einzelner Marker nicht in der Lage sein wird das Verhalten des Tumors allein vollständig vorherzusagen. p16 präsentiert sich im Endometriumkarzinom aber als ein wesentlicher Faktor, der Bestandteil eines Panels aus mehreren Progressionsmarkern werden könnte.

Neben diesen prädiktiven Eigenschaften könnte die Kenntnis des p16-Status zukünftig möglicherweise auch therapeutisch eingesetzt werden: einerseits um das Ansprechen auf bestimmte (Chemo-) Therapien abschätzen zu können und andererseits um der Tumorproliferation durch neue Pharmaka Einhalt zu gebieten, die die fehlende p16-Aktivität in Zellen mit p16-Alteration ersetzen. Auch auf diesem Gebiet ist auf weiterführende Forschung zu hoffen, um zukünftig im Fall von inoperablen Tumoren oder mitunter auch zur Rezidivprophylaxe Therapieoptionen in der Hand zu haben, die ein möglichst günstiges Toxizitätsprofil aufweisen und bei den häufig multimorbiden Patientinnen angewendet werden könnten.

# Literaturverzeichnis

- 1: Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends, 2008
- 2: Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ: Cancer Statistics 2007. *CA Cancer J Clin.* 57. 43-66 (2007)
- 3: Luoto R, Raitanen J, Pukkala E, Anttila A: Effect of hysterectomy on incidence trends of endometrial and cervical cancer in Finland 1953-2010. *Br J Cancer.* 90. 1756-1759 (2004)
- 4: Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P: Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 943. 296-315 (2001)
- 5: Baanders-van Halewyn EA, Blankenstein MA, Thijssen JH, de Ridder CM, de Waard F: A comparative study of risk factors for hyperplasia and cancer of the endometrium. *Eur J Cancer Prev.* 5. 105-112 (1996)
- 6: Reeves GK, Pirie K, Beral V, Spencer E, Bull D, Million Women Study Collaboration: Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ.* 335. 1134-1144 (2007)
- 7: Lindemann K, Vatten LJ, Ellstrom-Engh M, Eskild A: Body mass, diabetes, and smoking, and endometrial cancer risk: a follow-up study. *Br J Cancer.* 98. 1582-1585 (2008)
- 8: Saltzman BS, Doherty JA, Hill DA, Beresford SA, Voigt LF, Chen C, Weiss NS: Diabetes and endometrial cancer: an evaluation of the modifying effects of other known risk factors. *Am J Epidemiol.* 167. 607-614 (2008)
- 9: Pillay OC, Te Fong LF, Crow JC, Benjamin E, Mould T, Atiomo W, Menon PA, Leonard AJ, Hardiman P: The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. *Hum Reprod.* 21. 924-929 (2006)
- 10: La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Gallus G, Tognoni G: Risk factors for endometrial cancer at different ages. *J Natl Cancer Inst.* 73. 667-671 (1984)
- 11: Brinton LA, Sakoda LC, Lissowska J, Sherman ME, Chatterjee N, Peplonska B, Szeszenia-Dabrowska N, Zatonski W, Garcia-Closas M: Reproductive risk factors for endometrial cancer among Polish women. *Br J Cancer.* 96. 1450-1456 (2007)
- 12: McPherson CP, Sellers TA, Potter JD, Bostick RM, Folsom AR: Reproductive factors and risk of endometrial cancer. The Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol.* 143. 1195-1202 (1996)
- 13: Deligeoroglou E, Michailidis E, Creatas G: Oral contraceptives and reproductive system cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 997. 199-208 (2003)
- 14: Loerbroeks A, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA: Alcohol consumption, cigarette smoking, and endometrial cancer risk: results from the Netherlands Cohort Study. *Cancer Causes Control.* 18. 551-560 (2007)
- 15: Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA: Anthropometry, physical activity, and endometrial cancer risk: results from the Netherlands Cohort Study. *J Natl Cancer Inst.* 96. 1635-1638 (2004)
- 16: Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Jass JR, Green JS, Nomizu T, Müller H, Lynch HT: The epidemiology of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res.* 14. 1675-1678 (1994)

- 17: Fornander T, Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, Mattsson A, Silfverswärd C, Skoog L, Somell A, Theve T, Wilking N, Askergrén J, Hjalmar M: Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet*. 333. 117-120 (1989)
- 18: Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM: Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst*. 86. 527-537 (1994)
- 19: Harvey EB, Brinton LA: Second cancer following cancer of the breast in Connecticut, 1935-82. *Natl Cancer Inst Monogr*. 68. 99-112 (1985)
- 20: Bokhman JV: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 15. 10-17 (1983)
- 21: Sherman ME, Sturgeon S, Brinton LA, Potischman N, Kurman RJ, Berman ML, Mortel R, Twigg LB, Barrett RJ, Wilbanks GD: Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas. *Mod Pathol*. 10. 963-968 (1997)
- 22: Halperin R, Zehavi S, Habler L, Hadas E, Bukovsky I, Schneider D: Comparative immunohistochemical study of endometrioid and serous papillary carcinoma of endometrium. *Eur J Gynaecol Oncol*. 22. 122-126 (2001)
- 23: Deligdisch L, Holinka CF: Endometrial carcinoma: two diseases?. *Cancer Detect Prev*. 10. 237-246 (1987)
- 24: Ryan AJ, Susil B, Jobling TW, Oehler MK: Endometrial cancer. *Cell Tissue Res*. 322. 53-61 (2005)
- 25: van Boxtel R, Toonen PW, van Roekel HS, Verheul M, Smits BM, Korving J, de Bruin A, Cuppen E: Lack of DNA mismatch repair protein MSH6 in the rat results in hereditary non-polyposis colorectal cancer-like tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 29. 1290-1297 (2008)
- 26: Knudson AG Jr: Heredity and human cancer. *Am J Pathol*. 77. 77-84 (1974)
- 27: Hansen MF, Cavenee WK: Genetics of cancer predisposition. *Cancer Res*. 47. 5518-5527 (1987)
- 28: Herman JG, Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 349. 2042-2054 (2003)
- 29: Struhl K: Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*. 12. 599-606 (1998)
- 30: Feinberg AP, Tycko B: The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 4. 143-153 (2004)
- 31: Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE: Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Gen*. 31. 175-179 (2002)
- 32: Razin A, Cedar H: DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev*. 55. 451-458 (1991)
- 33: Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ: Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*. 274. 33002-33010 (1999)
- 34: Okano M, Xie S, Li E: Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 19. 219-220 (1998)
- 35: Okano M, Xie S, Li E: DNMT2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 26. 2536-2540 (1998)
- 36: Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E: Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*. 236. 87-95 (1999)
- 37: Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP: Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*. 19. 187-191 (1998)

- 38: Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, Esteller M: A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res.* 66. 8342-8346 (2006)
- 39: Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alteration during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 319. 525-532 (1988)
- 40: Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH: Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol.* 16. 902-912 (2003)
- 41: Al-Sukhun S, Hussain M: Current understanding of the biology of advanced bladder cancer. *Cancer.* 97 (8 Suppl). 2064-2075 (2003)
- 42: Mutter GL, Baak JP, Crum CP, Richart RM, Ferenczy A, Faquin WC: Endometrial precancer diagnosis by histopathology, clonal analysis, and computerized morphometry. *J Pathol.* 190. 462-469 (2000)
- 43: Kanaya T, Kyo S, Sakaguchi J, Maida Y, Nakamura M, Takakura M, Hashimoto M, Mizumoto Y, Inoue M: Association of mismatch repair deficiency with PTEN frameshift mutations in endometrial cancers and the precursors in a Japanese population. *Am J Clin Pathol.* 124. 89-96 (2005)
- 44: Konopka B, Paszko Z, Janiec-Jankowska A, Goluda M: Assessment of the quality and frequency of mutations occurrence in PTEN gene in endometrial carcinomas and hyperplasias. *Cancer Lett.* 178. 43-51 (2002)
- 45: Orbo A, Kaino T, Arnes M, Kopp M, Eklo K: Genetic dearrangements in the tumor suppressor gene PTEN in endometrial precancers as prognostic markers for cancer development: a population-based study from northern Norway with long-term follow-up. *Gynecol Oncol.* 95. 82-88 (2004)
- 46: Lagarda H, Catusus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J: K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol.* 193. 193-199 (2001)
- 47: Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tsao JL, Shibata DK: Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 54. 1604-1607 (1994)
- 48: Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T, Okayasu I: Beta-catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer.* 84. 209-217 (2001)
- 49: Saito T, Nishimura M, Yamasaki H, Kudo R: Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Cancer.* 97. 1002-1009 (2003)
- 50: Ambros RA, Vigna PA, Figge J, Kallakury BV, Mastrangelo A, Eastman AY, Malfetano J, Figge HL, Ross JS: Observations on tumor and metastatic suppressor gene status in endometrial carcinoma with particular emphasis on p53. *Cancer.* 73. 1686-1692 (1994)
- 51: Saffari B, Jones LA, el-Naggar A, Felix JC, George J, Press MF: Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: correlation with overall survival. *Cancer Res.* 55. 5693-5698 (1995)
- 52: Semczuk A, Boltze C, Marzec B, Szczygielska A, Roessner A, Schneider-Stock R: p16INK4A alterations are accompanied by aberrant protein immunostaining in endometrial carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 129. 589-596 (2003)
- 53: Jia L, Liu Y, Yi X, Miron A, Crum CP, Kong B, Zheng W: Endometrial glandular dysplasia with frequent p53 gene mutation: a genetic evidence supporting its precancer nature for endometrial serous carcinoma. *Clin Cancer Res.* 14. 2263-2269 (2008)

- 54: Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L: p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol.* 150. 177-185 (1997)
- 55: Idrees MT, Schlosshauer P, Li G, Burstein DE: GLUT1 and p63 expression in endometrial intraepithelial and uterine serous carcinoma. *Histopathology.* 49. 75-81 (2006)
- 56: Zheng W, Yi X, Fadare O, Liang SX, Martel M, Schwartz PE, Jiang Z: The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 32. 304-315 (2008)
- 57: Diaz-Montes TP, Ji H, Smith Sehdev AE, Zahurak ML, Kurman RJ, Armstrong DK, Bristow RE: Clinical significance of Her-2/neu overexpression in uterine serous carcinoma. *Gynecol Oncol.* 100. 139-144 (2005)
- 58: Hecht JL, Mutter GL: Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol.* 24. 4783-4791 (2006)
- 59: Pisani PL, Barbuto DA, Chen D, Ramos L, Lagasse LD, Karlan BY: HER-2/neu, p53, and DNA analyses as prognosticators for survival in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol.* 85. 729-734 (1995)
- 60: Soong R, Knowles S, Williams KE, Hammond IG, Wysocki SJ, Iacopetta BJ: Overexpression of p53 protein is an independent prognostic indicator in human endometrial carcinoma. *Br J Cancer.* 74. 562-567 (1996)
- 61: Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Jacobs IJ, Lynch ED, Akslen LA, Das S: PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. . 91. 22-26 (2001)
- 62: Sheng JQ, Zhang H, Ji M, Fu L, Mu H, Zhang MZ, Huang JS, Han M, Li AQ, Wei Z, Sun ZQ, Wu ZT, Xia CH, Li SR: Genetic diagnosis strategy of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 15. 983-989 (2009)
- 63: Zuckschwerdt (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Germering München. 1. 93 (2008)
- 64: Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 264. 436-440 (1994)
- 65: Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature.* 368. 753-756 (1994)
- 66: Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, Bergman W, Frants RR: Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet.* 10. 351-353 (1995)
- 67: Serrano M, Lee HW, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA: Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell.* 85. 27-37 (1996)
- 68: Zariwala M, Xiong Y: Lack of mutation in the cyclin-dependent kinase inhibitor, p19INK4d, in tumor-derived cell lines and primary tumors. *Oncogene.* 13. 2033-2038 (1996)
- 69: Serrano M: The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res.* 237. 7-13 (1997)
- 70: Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D: 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1. 686-692 (1995)

- 71: Loughran O, Malliri A, Owens D, Gallimore PH, Stanley MA, Ozanne B, Frame MC, Parkinson EK: Association of CDKN2A/p16INK4A with human head and neck keratinocyte replicative senescence: relationship of dysfunction to immortality and neoplasia. *Oncogene*. 13. 561-568 (1996)
- 72: Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC: Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16(INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93. 13742-13747 (1996)
- 73: Lukas J, Aagaard L, Strauss M, Bartek J: Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. *Cancer Res*. 55. 4818-4823 (1995)
- 74: Salvesen HB, Kumar R, Stefansson I, Angelini S, MacDonald N, Smeds J, Jacobs IJ, Hemminki K, Das S, Akslen LA: Low frequency of BRAF and CDKN2A mutations in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 115. 930-934 (2005)
- 75: Salvesen HB, Das S, Akslen LA: 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. 153-159 (2000)
- 76: Mikuta JJ: International Federation of Gynecology and Obstetrics staging of endometrial cancer 1988. *Cancer*. 71. 1460-1463 (1993)
- 77: Kosary CL: FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina. *Semin Surg Oncol*. 10. 31-46 (1994)
- 78: Abeler VM, Kjørstad KE: Endometrial adenocarcinoma in Norway. *Cancer*. 67. 3093-3103 (1991)
- 79: Gassel AM, Backe J, Krebs S, Schön S, Caffier H, Müller-Hermelink HK: Endometrial carcinoma: immunohistochemically detected proliferation index is a prognosticator of long term outcome. *J Clin Pathol*. 51. 25-29 (1998)
- 80: Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB, Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands, 1996
- 81: Hendrickson M, Ross J, Eifel P, Cox RS, Martinez A, Kempson R: Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 6. 93-108 (1982)
- 82: Mogensen O, Sorensen FB, Bichel P, Jakobsen A: Mean nuclear volume: a supplementary prognostic factor in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 9. 72-79 (1999)
- 83: Mundt AJ, Waggoner S, Yamada D, Rotmensch J, Connell PP: Age as prognostic factor for recurrence in patients with endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 79. 79-85 (2000)
- 84: Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JPJ, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*. 55. 4525-4530 (1995)
- 85: Pollock PM, Pearson JV, Hayward NK: Compilation of somatic mutations of the CDKN2 gene in human cancers: non-random distribution of base substitutions. *Genes Chromosomes Cancer*. 15. 77-88 (1996)
- 86: Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen TD, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA: Methylation of the 5`CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res*. 55. 4531-4535 (1995)

- 87: Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomäki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Huang H-JS, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA: Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 24. 132-138 (2000)
- 88: Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 61. 3225-3229 (2001)
- 89: Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Tsukazaki K, Aoki D: Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer. *Oncol Rep.* 16. 1189-1196 (2006)
- 90: Kang S, Kim JW, Kang GH, Lee S, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP: Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 118. 2168-2171 (2006)
- 91: Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, Haba T, Yoshino K, Wada H, Kurachi H, Sasaki M, Wakasa K, Inoue M, Buzard G, Murata Y: Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Br J Cancer.* 80. 458-467 (1999)
- 92: Yanokura M, Banno K, Susumu N, Kawaguchi M, Kuwabara Y, Tsukazaki K, Aoki D: Hypermethylation in the p16 promoter region in the carcinogenesis of endometrial cancer in Japanese patients. *Anticancer Res.* 26. 851-856 (2006)
- 93: Wong YF, Chung TKH, Cheung TH, Nobori T, Yu AL, Yu J, Batova A, Lai KWH, Chang AMZ: Methylation of p16INK4a in primary gynecologic malignancy. *Cancer Lett.* 136. 231-235 (1999)
- 94: Yang HJ, Liu VWS, Wang Y, Tsang PCK, Ngan HYS: Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. *BMC Cancer.* 6. 212 (2006)
- 95: Tsuda H, Yamamoto K, Inoue T, Uchiyama I, Umesaki N: The role of p16-cyclin D/CDK-pRb pathway in the tumorigenesis of endometrioid-type endometrial carcinoma. *Br J Cancer.* 82. 675-682 (2000)
- 96: Guida M, Sanguedolce F, Bufo P, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, Nappi C, Pannone G: Aberrant DNA hypermethylation of hMLH-1 and CDKN2A/p16 genes in benign, premalignant and malignant endometrial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 30. 267-270 (2009)
- 97: Hall GL, Shaw RJ, Field EA, Rogers SN, Sutton DN, Woolgar JA, Lowe D, Liloglou T, Field JK, Risk JM: p16 promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17. 2174-2179 (2008)
- 98: Cao J, Zhou J, Gao Y, Gu L, Meng H, Liu H, Deng D: Methylation of p16 CpG island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: a prospective cohort study. *Clin Cancer Res.* 15. 5178-5183 (2009)
- 99: Wang JS, Guo M, Montgomery EA, Thompson RE, Cosby H, Hicks L, Wang S, Herman JG, Canto MI: DNA promoter hypermethylation of p16 and APC predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 104. 2153-2160 (2009)
- 100: Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, Glöckner S, Piantadosi S, Gabrielson E, Pridham G, Pelosky K, Belinsky SA, Yang SC, Baylin SB, Herman JG: DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med.* 358. 1118-1128 (2008)
- 101: Yoshino M, Suzuki M, Tian L, Moriya Y, Hoshino H, Okamoto T, Yoshida S, Shibuya K, Yoshino I: Promoter hypermethylation of the p16 and Wif-1 genes as an independent prognostic marker in stage IA non-small cell lung cancers. *Int J Oncol.* 35. 1201-1209 (2009)

- 102: Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D: High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 56. 3630-3633 (1996)
- 103: Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, Deimling von A, Louis DN: CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 56. 150-153 (1996)
- 104: Caldas C, Hahn SA, Costa da LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE: Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet.* 8. 27-32 (1994)
- 105: Wong YF, Chung TKH, Cheung TH, Nobori T, Yim SF, Lai KWH, Yu AL, Diccianni MB, Li TZ, Chang AMZ: p16INK4 and p15INK4B alterations in primary gynecologic malignancy. *Gynecol Oncol.* 65. 319-324 (1997)
- 106: Fujita M, Enomoto T, Haba T, Nakashima R, Sasaki M, Yoshino K, Wada H, Buzard GS, Matsuzaki N, Wakasa K, Murata Y: Alteration of p16 and p15 genes in common epithelial ovarian tumors. *Int J Cancer.* 74. 148-155 (1997)
- 107: Milde-Langosch K, Riethdorf L, Bamberger AM, Löning T: p16/MTS1 and pRB expression in endometrial carcinomas. *Virchows Arch.* 434. 23-28 (1999)
- 108: Hatta Y, Hiramata T, Takeuchi S, Lee E, Pham E, Miller CW, Strohmeyer T, Wilczynski SP, Melmed S, Koeffler HP: Alterations of the p16 (MTS1) gene in testicular, ovarian, and endometrial malignancies. *J Urol.* 154. 1954-1957 (1995)
- 109: Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics.* 16. 325-332 (1993)
- 110: Semczuk A, Cybulski M, Tomaszewski J, Rechberger T, Jakowicki A: Clinicoprognostic significance of pRb1 pathway alterations in uterine endometrial adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 154. 186-189 (2004)
- 111: Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG: In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96. 12754-12759 (1999)
- 112: Shiozawa T, Nikaido T, Shimizu M, Zhai Y, Fujii S: Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and p16INK4 in human endometrioid-type endometrial carcinoma. *Cancer.* 80. 2250-2256 (1997)
- 113: Milde-Langosch K, Bamberger AM, Goemann C, Rössing E, Rieck G, Kelp B, Löning T: Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol.* 127. 537-544 (2001)
- 114: McCluggage WG, Jenkins D: p16 immunoreactivity may assist in the distinction between endometrial and endocervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 22. 231-235 (2003)
- 115: Horree N, Diest van PJ, Sie-Go DMDS, Heintz APM: The invasive front in endometrial carcinoma: higher proliferation and associated derailment of cell cycle regulators. *Hum Pathol.* 38. 1232-1238 (2007)
- 116: Ignatov A, Bischoff J, Schwarzenau C, Krebs T, Kuester D, Herrmann K, Costa SD, Roessner A, Semczuk A, Schneider-Stock R: p16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 111. 365-371 (2008)
- 117: Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CA: Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/ multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res.* 55. 6006-6011 (1995)



- 118: Koo CL, Kok LF, Lee MY, Wu TS, Cheng YW, Hsu JD, Ruan A, Chao KC, Han CP: Scoring mechanisms of p16 immunohistochemistry based on either independent nucleic stain or mixed cytoplasmic with nucleic expression can significantly signal to distinguish between endocervical and endometrial adenocarcinomas in tissue microarray study. *J Transl Med.* 7. 25 (2009)
- 119: Engelsens IB, Stefansson I, Akslen LA, Salvesen HB: Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas. *Am J Obstet Gynecol.* 195. 979-986 (2006)
- 120: Semczuk A, Miturski R, Skomra D, Jakowicki JA: Expression of the cell-cycle regulatory proteins (pRb, cyclin D1, p16INK4A and cdk4) in human endometrial cancer: correlation with clinicopathological features. *Arch Gynecol Obstet.* 269. 104-110 (2004)
- 121: Buchynska RE, Nesina IP: Expression of the cell cycle regulators p53, p21WAF1/CIP1 and p16INK4A in human endometrial adenocarcinoma. *Exp Oncol.* 28. 152-155 (2006)
- 122: Reid-Nicholson M, Iyengar P, Hummer AJ, Linkov I, Asher M, Soslow A: Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis. *Mod Pathol.* 19. 1091-1100 (2006)
- 123: O'Neill CJ, McCluggage WG: p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 13. 8-15 (2006)
- 124: Yao J, Pollock RE, Lang A, Tan M, Pisters PW, Goodrich D, El-Naggar A, Yu D: Infrequent mutation of the p16/MTS1 gene and overexpression of cyclin-dependent kinase 4 in human primary soft-tissue sarcoma. *Clin Cancer Res.* 4. 1065-1070 (1998)
- 125: Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, Rollins BJ: Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res.* 55. 505-509 (1995)
- 126: Yeung AT, Patel BB, Li XM, Seeholzer SH, Coudry RA, Cooper HS, Bellacosa A, Boman BM, Zhang T, Litwin S, Ross EA, Conrad P, Crowell JA, Kopelovich L, Knudson A: One-hit effects in cancer: altered proteome of morphologically normal colon crypts in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 68. 7579-7586 (2008)
- 127: Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3. 415-428 (2002)
- 128: Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, Suter CM, Martin DI, Hawkins NJ, Ward RL: Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med.* 356. 697-705 (2007)
- 129: Zhang Y: No exception to reversibility. *Nature.* 431. 637-639 (2004)
- 130: Heppner GH: Tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 44. 2259-2265 (1984)
- 131: Eggeling von F, Werner G, Theuer C, Riese U, Dahse R, Fiedler W, Schimmel B, Ernst G, Karte K, Claussen U, Wollina U: Analysis of the tumor suppressor gene p16(INK4A) in microdissected melanoma metastases by sequencing, and microsatellite and methylation screening. *Arch Dermatol Res.* 291. 474-477 (1999)
- 132: Okamoto A, Hussain SP, Hagiwara K, Spillare EA, Rusin MR, Demetrick DJ, Serrano M, Hannon GJ, Shiseki M, Zariwala M, Xiong Y, Beach DH, Yokota J, Harris CC: Mutations in the p16INK4/MTS1/CDKN2, p15INK4B/MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res.* 55. 1448-1451 (1995)
- 133: Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, Sanz G, List AF, Gore S, Seymour JF, Dombret H, Backstrom J, Zimmermann L, McKenzie D, Beach CL, Silverman LR: Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 28. 562-569 (2010)

- 134: Zhu X, Ma Y, Liu D: Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. *J Hematol Oncol.* 3. 17 (2010)
- 135: Fukushima T, Takeshima H, Kataoka H: Anti-glioma therapy with temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT. *Anticancer Res.* 29. 4845-4854 (2009)
- 136: Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, Balaguer F, Sempere L, Xicola RM, Bujanda L, Rene JM, Clofent J, Bessa X, Morillas JD, Nicolas-Perez D, Pons E, Paya A, Alenda C: The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer.* 45. 365-373 (2009)
- 137: Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, French AJ, Kabat B, Foster NR, Torri V, Ribic C, Grothey A, Moore M, Zaniboni A, Seitz JF, Sinicrope F, Gallinger S: Defective mismatch repair as predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 28. 3219-3226 (2010)
- 138: Engelsens IB, Akslen LA, Salvesen HB: Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS.* 117. 693-707 (2009)
- 139: Klein MA, Mayo KH, Kratzke RA: p16(INK4a) peptide mimetics identified via virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett.* 20. 403-405 (2009)

# Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt all jenen, die mir die Erstellung der vorliegenden Arbeit ermöglicht und mich während der ganzen Zeit unterstützt und begleitet haben.

Bei einer interdisziplinären Arbeit wie der vorliegenden ist die Einbindung in ein gutes Team aus den verschiedenen Fachrichtungen für den Erfolg sehr entscheidend, weshalb ich allen Beteiligten aus der Universitätsfrauenklinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.med. Dr. h.c. S.D. Costa und dem Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. A. Roessner zutiefst dankbar bin für die konstruktive Beratung und Begleitung.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. S.D. Costa möchte ich dafür danken, dass er mir die wissenschaftliche Arbeit an seiner Klinik ermöglicht und mir das Thema vermittelt hat.

Bei Herrn Dr. med. J. Bischoff, geschäftsführender Oberarzt der Universitätsfrauenklinik Magdeburg, möchte ich mich für die Initiierung des Projekts, sein allzeit offenes Ohr und die engagierte Betreuung speziell in Hinblick auf die klinischen Belange bedanken. Dank seiner Anregungen hat die molekularbiologisch orientierte Arbeit den klinischen Bezug nicht verloren.

Frau Prof. Dr. rer. nat. R. Schneider-Stock, ehemalige Leiterin der Abteilung für Molekulare Genetik des Instituts für Pathologie Magdeburg und nun Professorin für Experimentelle Tumorpathologie des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Erlangen, möchte ich in ganz besonderem Maße für die Möglichkeit danken, die experimentellen Arbeiten in ihrem DNA-Labor durchführen zu dürfen. Sie hat es verstanden mir stets zum richtigen Zeitpunkt die richtigen Impulse zu geben und eine konzentrierte und effektive, aber auch sehr persönliche und entspannte Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Für die ausgesprochen hilfreiche Unterstützung im DNA-Labor möchte ich mich bei Frau H. Scharfenort und Frau A. Schinlauer sowie Herrn T. Krebs bedanken, die mich an ihrem enormen Erfahrungsschatz teilhaben ließen und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für die Einweisung und Zuarbeit bei den immunhistochemischen Färbungen möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeiterinnen des Labors für Immunhistochemie, insbesondere Frau Kügler, bedanken.

In Hinblick auf die hervorragende Beratung bei der Beurteilung der immunhistochemischen Färbung gilt mein besonderer Dank Frau Dr. med. D. Kuester, Oberärztin des Instituts für Pathologie Magdeburg.

Danken möchte ich außerdem Herrn Dr. med. A. Ignatov, Facharzt der Universitätsfrauenklinik Magdeburg, vor allem für seine Geduld und Hartnäckigkeit beim Publikationsprozess, und Herrn PD Dr. med. Dr. h.c. M. Löttge, Chefarzt der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Städtischen Klinikums Magdeburg, und Herrn Dr. med. K. Hellwig, Chefarzt der Abteilung für Pathologie des

Städtischen Klinikums Magdeburg, sowie Herrn Prof. Dr. med. A. Semczuk, Professor für Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universität Lublin, Polen, und Herrn Dr. med. E. Erbstößer, Chefarzt für die Pathologische Abteilung des AMEOS Klinikums St. Salvator Halberstadt, für die freundliche Überlassung von Tumormaterial.

Für die immerwährende emotionale Unterstützung möchte ich zum Abschluss meinem lieben Mann Jakob und meinen Eltern großen Dank aussprechen, die emotionale Höhepunkte mit mir geteilt und mich während der Tiefpunkte stets aufs Neue motiviert haben.

# Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

## **Die Rolle von p16-Alterationen im metastasierten Endometriumkarzinom**

in der Universitätsfrauenklinik in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

# Darstellung des Bildungsweges

Christa Schwarzenau-Szydlowski, geb. Schwarzenau

Geburtsdatum: 17.02.1983

Geburtsort: Hannover

Daten	Schule/Institution/ Arbeitgeber	Anmerkung
09/89 - 07/92	Grundschule Am Königsgraben in Berlin-Lankwitz	-
09/92 - 07/93	Grunewaldgrundschule in Berlin-Grunewald	-
09/93 - 09/96	Ev. Gymnasium zum Grauen Kloster in Berlin-Grunewald	-
09/96 - 06/03	Sophienschule Hannover	Abschluss: Abitur
06/00 - 05/01	Austauschjahr in Michigan,USA: Besuch der Brandon High School in Ortonville	Abschluss: High School Diploma
09/03 - 11/09	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg	Studium der Humanmedizin, Abschluss: Staatsexamen
seit 01/10	Universitätsfrauenklinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg	Ausbildung zur Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe

# Publikationen

## Originalarbeiten:

- Ignatov A / Bischoff J, **Schwarzenau C**, Krebs T, Kuester D, Herrmann K, Costa SD, Roessner A, Semczuk A, Schneider-Stock R: P16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. 111. 365-371 (2008)

*Publikation von einem maßgeblichen Teil der Daten der vorliegenden Arbeit*

- Ignatov A, Bischoff J, Ignatov T, **Schwarzenau C**, Krebs T, Kuester D, Costa SD, Roessner A, Semczuk A, Schneider-Stock R: APC promoter hypermethylation is an early event in endometrial tumorigenesis. Cancer Sci. 101. 321-327 (2010)

## Vorträge:

- **Schwarzenau-Szydlowski C**: Molekularbiologie des Endometriumkarzinoms – Die Rolle der Methylierung. XVII. Herbsttagung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universitätskliniken Magdeburg und Halle, 18.09.2010, Magdeburg

## Poster:

- **Schwarzenau C**, Krebs T, Ignatov A, Herrmann K, Kuester D, Costa SD, Roessner A, Schneider-Stock R, Bischoff J: Die Rolle der Promotor-Hypermethylierung in der Risikoabschätzung von Endometriumkarzinomen. 2. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO) in der DGGG und der DKG, 18.05.2007, Bergisch Gladbach

*Prämierung zum Top Ten- Poster*

- **Schwarzenau C**, Krebs T, Herrmann K, Ignatov A, Kuester D, Costa SD, Roessner A, Bischoff J, Schneider-Stock R: Vergleich des Methylierungsprofils bei Endometriumkarzinomen mit und ohne Metastasen. 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 31.05.2007, Magdeburg

*Prämierung zum Top Ten- Poster*

- Ignatov A, Bischoff J, Schwarzenau C, Krebs T, Costa SD, Schneider-Stock R: P16-Gen-Alterationen erhöhen das Metastasenpotential des sporadischen Endometriumkarzinoms. 57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. 16.09.2008, Hamburg

- **Schwarzenau-Szydowski C**, Ignatov A, Krebs T, Kuester D, Herrmann K, Roessner A, Costa SD, Schneider-Stock R, Bischoff J: Vom Primärtumor zur Metastase: der Stellenwert von p16-Alterationen im metastasierten Endometriumkarzinom. 3. Jahrestagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe. 16.05.2009, Magdeburg
- Bischoff J, Ignatov A, Budner O, **Schwarzenau-Szydowski C**: Feasibility of bevacizumab and metronomic chemotherapy in heavily pre-treated patients with ovarian cancer (OC). 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. 06.10.2010. München
- **Schwarzenau-Szydowski C**, Redlich A, Welger L, Costa SD: Abruption of placenta praevia: a case report. 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. 07.10.2010, München