

Kristina Nehls
Dr. med.

p16^{INK4a} Methylierung und p16^{INK4a} Expression in HPV-induzierten Tumoren

Geboren am 11.08.1980 in Neubrandenburg
Staatsexamen am 15.05.2007 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. N. Wentzensen

In der vorliegenden Arbeit wurde die p16^{INK4a} Methylierung und Expression in HPV-induzierten Tumoren am Beispiel des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen analysiert. Die Motivation für diese Analysen war eine sehr widersprüchliche Datenlage zu dieser Thematik. Zum einen wurde in unterschiedlichen Studien eine Methylierungsfrequenz von 19 – 61% des CDKN2A-Gens, das für p16^{INK4a} kodiert, beschrieben. In diesen Arbeiten wird in der Regel eine Reduktion der p16^{INK4a} Expression und damit eine Rolle in der Karzinogenese diskutiert, allerdings fehlen in den meisten Arbeiten Expressionsdaten. Auf der anderen Seite ist inzwischen überzeugend gezeigt worden, dass das Hochrisiko-HPV-Onkogen E7 eine Überexpression von p16^{INK4a} in HPV-transformierten Zellen bewirkt. Dementsprechend wird in nahezu allen Zervixkarzinomen und den hochgradigen Krebsvorstufen (CIN3) eine starke p16^{INK4a} Expression beobachtet. Ein kausaler Zusammenhang zwischen p16^{INK4a} Inaktivierung und Zervixkarzinogenese kann inzwischen aufgrund zahlreicher funktioneller Studien ausgeschlossen werden. Ziel dieser Arbeit war es, diese gegensätzlichen Hypothesen näher zu untersuchen. Dafür wurde an einer Serie von HPV-induzierten Zervixkarzinomen und CIN-Läsionen der Methylierungsstatus und die Proteinexpression analysiert und verglichen. Dies ist die erste umfassende Untersuchung von p16^{INK4a} Methylierung und Expression in der Zervixkarzinogenese.

Es wurde ein neues BSM-nested PCR-System mit anschließender Bisulfidsequenzierung entwickelt, das die Detektion der Methylierung von 28 CpG-Dinukleotiden des relevanten CpG-Islands im CDKN2A Exon 1 α erlaubt. Im Gegensatz dazu wurden die meisten in der Literatur beschriebenen Daten mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) generiert, einem Verfahren, das zwar einen hohen Probendurchsatz erlaubt, aber nur eine begrenzte Anzahl von CpGs analysieren kann. Ein Vergleich der Methylierungsanalyse ohne und mit Mikrodissektion des Gewebes zeigte, dass die Kontamination mit Normalgewebe die Ergebnisse der Methylierungsanalyse verfälschen kann.

Die p16^{INK4a} Methylierungs- und Expressionsanalyse wurde an insgesamt 94 klinischen Proben durchgeführt, welche sich in 70 plattenepitheliale Zervixkarzinome sowie 24 CIN-Läsionen aufteilen. Zusätzlich wurden 13 Hochrisiko-HPV-positive bzw. p53- und Rb-mutierte Zervixkarzinomzelllinien sowie Vorhautkeratinozyten und vier HPV-negative Kolonkarzinomzelllinien in diese Studie miteingeschlossen.

Zwölf der dreizehn Zervixkarzinomzelllinien zeigten sich komplett unmethyliert im Exon 1 α . Für die Zervixkarzinomlinie ME180 wurde ein heterogenes Methylierungsmuster nachgewiesen. Die Kolonkarzinomlinien SW480, SW48 und Colo60H waren vollständig methyliert im analysierten CpG-Island, während LS174T bis auf wenige CpG-Dinukleotide unmethyliert war. Für alle Zelllinien bis auf die Linien HeLa, SiHa, Caski und SW480 wurde der Methylierungsstatus im p16^{INK4a} Promoter in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Analog dazu wurde für alle Zervixkarzinomlinien eine deutliche Überexpression von p16^{INK4a} nachgewiesen, außer für ME180, welche eine schwächere Expression dieses Proteins aufwies. Die Kolonlinien zeigten erwartungsgemäß keine Expression von p16^{INK4a}.

In 18 von 70 (25,7%) untersuchten Zervixkarzinomen wurde vollständige oder heterogene Methylierung gefunden. Keine der CIN-Läsionen zeigte eine komplette Methylierung aller CpGs, hier wurden nur vereinzelt methylierte CpG-Dinukleotide detektiert. In einigen Fällen wurden einzelne methylierte CpGs im Bereich der MSP-Primerbindungsstellen gefunden, was zu falsch positiven MSP Ergebnissen führen könnte. .

Für alle CIN3-Läsionen und Zervixkarzinome wurde eine starke p16^{INK4a} Überexpression nachgewiesen, ebenso für 5 der CIN1 und 3 der CIN2. Diese Ergebnisse werden durch zahlreiche Literaturdaten zur p16^{INK4a} Expression in der Zervixkarzinogenese bestätigt. Insgesamt hatte der p16^{INK4a} Methylierungsstatus keinen Einfluss auf die Expression, da die 18 methylierten Zervixkarzinome keine qualitativen und quantitativen Unterschiede in der p16^{INK4a} Expression zeigten.

Diese Daten zeigen, dass Methylierung in Exon 1α von CDKN2A nicht mit einem Expressionsverlust von p16^{INK4a} gleichzusetzen ist. Bevor ein kausaler Zusammenhang zwischen p16^{INK4a} Methylierung und Karzinogenese hergestellt werden kann, muss die Relevanz der Methylierung in Expressionsanalysen und funktionellen Studien gezeigt werden. Im CDKN2A-Locus liegen weitere CpG-Islands, die zum Teil die p16^{INK4a} Expression hemmen können. Für die meisten Bereiche liegen allerdings keine ausreichenden funktionellen Daten vor. In der Zervixkarzinogenese scheint die p16^{INK4a} Methylierung eher ein Ausdruck einer „epigenetischen Instabilität“ zu sein, die spät in der Karzinogenese auftritt, als ein tumorinitiierender oder -fördernder Faktor, den man auch in den Krebsvorstufen erwarten würde.