

Mirjam Seiz

Dr.med.

**Untersuchung der Koexpression des Biomarkers
p16^{INK4a} und des proliferationsassoziierten Markers Ki-67
in HPV assoziierten Läsionen
des weiblichen Genitaltraktes**

Fach/Einrichtung: Pathologisches Institut

Doktorvater: Prof. Dr. med. Magnus von Knebel Doeberitz

Das Zervixkarzinom stellt der zweithäufigste Tumor der Frauen weltweit dar. Um eine Vorbeugung der Krebsentstehung zu ermöglichen, wurden verschiedene Screening-Verfahren erforscht. Diese Verfahren sind jedoch mit Mängeln behaftet. So besitzt der HPV-DNA Nachweis für hochgradige Dysplasien eine geringere Spezifität, im Vergleich zu zytologischen Verfahren und der derzeit gängige PAP-Abstrich eine niedrige Sensitivität von nur ungefähr 50%. Des Weiteren erschweren Unstimmigkeiten unter den einzelnen Betrachtern die Diagnostik. Hierbei bereiten die morphologischen Ähnlichkeiten der Läsionen, sowie die Differenzierung atropher und metaplastischer Läsionen, von hochgradig dysplastischen Neoplasien diagnostische Schwierigkeiten. Durch die Entdeckung des p16^{INK4a} wurde ein potenter Biomarker für HPV transformierende Läsionen gefunden.

p16^{INK4a} ist ein Tumorsuppressorprotein, das während des physiologischen Vorgangs der Zellalterung vermehrt exprimiert wird. Im Rahmen einer Infektion mit einem Hochrisiko-HPV findet in den Zellen eine, durch das virale Onkogen E7 bedingte, unkontrollierte Expression des p16^{INK4a} statt. Die Schwierigkeit in der Diagnostik, insbesondere in der Zytologie besteht darin, diejenigen Läsionen zu erkennen, die p16^{INK4a} im Rahmen einer HPV induzierten Transformation exprimieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, p16^{INK4a} positive Läsionen und Zellen auf ihr Proliferationspotenzial zu untersuchen, um dadurch eine diagnostische Methodik zu etablieren, die transformierende und damit dysplastische Zellen und Läsionen hervorhebt.

Hierfür wurden 128 Gewebeproben aus der Zervix uteri, bestehend aus 21 CIN1, 23 CIN2, 27 Carzinoma in situ und CIN3-Läsionen und 46 Zervixkarzinome, sowie 21 Metaplasien verwendet. Ferner wurden, in einem zweiten Teil dieser Arbeit ,186 Vulvakarzinome unterschiedlicher Ätiologie rekrutiert. Für die explorative Analyse wurde ein Färbekit verwendet, welches für die Anwendung in der Zytologie entwickelt wurde. Nach Optimierung

des Protokolls konnte es erfolgreich in der Immunhistologie angewandt werden. Basierend auf dem Färbeprotokoll war es möglich $p16^{INK4a}$, als auch der verwendete Proliferationsmarker Ki-67, zeitgleich in einer Zelle anzufärben.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem steigenden Dysplasiegrad der Läsionen und der Anzahl an doppelt positiven Zellen festgestellt. In allen Gewebeproben der 27 CIN3/CIS Läsionen und den 46 Karzinomen der Zervix uteri, sowie in nahezu allen HPV positiven Vulvakarzinomen konnten doppelt positiv gefärbte Zellen in hohem Maße nachgewiesen werden. Durch die $p16^{INK4a}$ -/Ki-67-Doppelexpression wird zum einen der transformierende Charakter durch $p16^{INK4a}$, zum anderen der proliferative Charakter durch Ki-67 beleuchtet.

Im Kontrast zu diesen Ergebnissen konnten in nicht dysplastischen Läsionen, wie den Metaplasien, sowie in HPV negative Vulvakarzinome keine doppelt positiven Zellen ausgewertet werden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Zellen die $p16^{INK4a}$ und Ki-67 ko-exprimieren, ausschließlich in zervikalem Gewebe mit diffusem $p16^{INK4a}$ -Färbemuster nachzuweisen sind. Dagegen weisen Läsionen mit fokalem $p16^{INK4a}$ -Expressionsmuster keine doppelt positiven Zellen auf. Diese Daten bestätigen die Assoziation des diffusen $p16^{INK4a}$ -Expressionsmusters mit der Deregulation des Zellzykluses in zervikalen Neoplasien.

Es ist stark anzunehmen, dass eine Differenzierung zwischen HR-HPV transformierenden und nicht HR-HPV transformierenden Läsionen auf der Basis des immunhistochemisch bedingten $p16^{INK4a}$ -Expressionsmusters möglich ist. In der Zytologie jedoch ist es unklar, ob eine $p16^{INK4a}$ positive Zelle aus einem diffus, oder einem fokal gefärbten Zellareal stammt. Durch die Anwendung der $p16^{INK4a}$ -/Ki-67-Doppelfärbung ist die Differenzierung in HR-HPV assoziierte und nicht HR-HPV assoziierte Zellen möglich. Die präzisere diagnostische Interpretation von dysplastischen Zellen würde zu einer frühzeitigeren Identifizierung der Frauen mit hochgradig-dysplastischen Läsionen beitragen. Dies hätte große Auswirkungen auf die ökonomische Effektivität des Screening Programmes und die weiteren klinischen Behandlung der Frauen.