

Philipp Daniel Ritter  
Dr. med.

## **Methodische und klinische Aspekte von p53-Mutationen bei Hypopharynxkarzinomen**

Geboren am 08.04.1977 in Duisburg  
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 20.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. H. Weidauer

Patienten mit Hypopharynxkarzinomen haben verglichen mit anderen Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes eine sehr ungünstige Prognose. Nach wie vor sind die Krankheitsverläufe und die Therapieeigenschaften dieser Tumoren schwer vorhersehbar. In der molekularbiologischen Tumorforschung wird daher ergänzend zu klassischen Kriterien wie TNM-Klassifikation, UICC-Stadium und histopathologischem Grading nach neuen Faktoren für Prognose und Therapieplanung gesucht. Die Suche konzentriert sich u. a. auf Komponenten der Zellzyklusregulation und der Apoptoseinduktion, da Entgleisungen in diesen Bereichen wichtige Ereignisse in der frühen Phase der Karzinogenese darstellen. Ein bedeutender molekularer Faktor, der in beiden genannten Bereichen wichtige Funktionen erfüllt, ist das p53-Tumorsuppressorgen.

In laborinternen Mutationsanalysen hatte sich abgezeichnet, dass Mutationen des p53-Gens und insbesondere Kontaktmutationen in Hypopharynxkarzinomen häufiger auftreten könnten als in anderen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches. In der Literatur ergaben sich zudem Hinweise, dass die Prävalenz von p53-Mutationen unter Einbeziehung aller kodierenden p53-Exons in die Mutationsanalysen deutlich höher liegen könnte als nach den Ergebnissen der konventionellen Sequenzierung bislang angenommen. Mit der Entwicklung des p53-Genchip von Affymetrix<sup>®</sup> eröffnete sich die Möglichkeit, alle kodierenden Exons sowie angrenzende Intronbereiche des p53-Gens in relativ kurzer Zeit zu analysieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv von 116 Patienten mit Hypopharynxkarzinomen untersucht. In einem Subkollektiv von 44 Patienten wurde der p53-Mutationsstatus mit dem Genchip bestimmt (Genchip-Kollektiv), bei 24 dieser Patienten zusätzlich durch den ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer. In einem weiteren Subkollektiv von 33 Patienten, das für den Vergleich der beiden Sequenzierungsmethoden herangezogen wurde, war der p53-Mutationsstatus zuvor ausschließlich mit dem ABI 310 untersucht worden (ABI-Kollektiv). Der p53-Proteinstatus war mittels Immunhistochemie im gesamten Patientenkollektiv bestimmt worden.

Der Vergleich des Genchip- und des ABI-Kollektivs ergab, dass der Genchip eine moderat, jedoch nicht signifikant höhere p53-Mutationsrate nachwies als der ABI 310 (65,9% vs. 60,6%,  $p=0,81$ ). Diese Differenz beruhte auf dem Nachweis von vier Splicesite-Mutationen und einer in Exon 10 gelegenen Stop-Mutation, die sich außerhalb des üblichen Untersuchungsbereiches (Exons 5-8) der konventionellen Sequenzierung befanden. Der Genchip besaß eine hohe Sensitivität für den Nachweis von Punktmutationen. Er zeigte jedoch auch erhebliche Schwächen, die seinen alleinigen Einsatz für Mutationsanalysen ausschließen. Dazu gehörten v. a. die geringe Spezifität bei multiplen Mutation Scores und die geringe Sensitivität für den Nachweis von Deletionen und Insertionen. Da in vielen Fällen eine Überprüfung der gefundenen Mutation Scores durch konventionelle Sequenzierung erforderlich war, erwies sich der Genchip letztendlich als zu arbeits- und kostenintensiv.

Die Immunhistochemie erwies sich als eine sehr gute Ergänzung zu den Mutationsanalysen. Es zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem p53-

Mutations- und dem p53-Proteinstatus ( $p < 0,0001$ ), was v. a. auf die zusätzliche Anwendung der tyramid-signalverstärkten IHC zurückzuführen war.

Insgesamt konnten in 51 (66,2%) der 77 Tumoren des Genchip- und des ABI-Kollektivs p53-Mutationen nachgewiesen werden. Die Hypopharynxkarzinome besaßen damit eine signifikant höhere Mutationsrate als Tumoren anderer Kopf-Hals-Lokalisationen (Mundhöhle, Oropharynx, Larynx). Die Hypopharynxtumoren wiesen jedoch keinen höheren Anteil an Kontaktmutationen auf als die Tumoren der anderen Lokalisationen.

Weder der p53-Mutations- noch der p53-Proteinstatus korrelierte mit den klinischen Parametern, eine Zunahme der Alterationen von niedrigen zu höheren Stadien war nicht feststellbar. Diese Resultate bestätigen somit, dass p53-Mutationen ein frühes Ereignis in der Karzinogenese von Kopf-Hals-Malignomen darstellen und vor dem Übergang zum invasiven Karzinom auftreten.

Weder der p53-Mutationsstatus (p53-Mutationen insgesamt, Kontaktmutationen und Nonsense-Mutationen) noch der p53-Proteinstatus korrelierte mit den posttherapeutischen Verläufen. p53-Alterationen besitzen demnach eine geringe prognostische Bedeutung bzgl. der Tumorprogression von Hypopharynxkarzinomen.