

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Campus Innenstadt

Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

Die CpG-Insel-Methylierung des Östrogenrezeptor-Promotors
im invasiven Zervixkarzinom

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ivanka Zaharieva
aus Sofia, Bulgarien
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. Udo Jeschke |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. Eva-Maria Grischke Priv. Doz. Dr. Beyhan Ataseven |
| Dekan: | Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 29.06.2017 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung | 2 |
| 1.1 | Zervixkarzinom | 2 |
| 1.1.1 | Epidemiologie | 2 |
| 1.1.2 | Ätiologie und Risikofaktoren | 2 |
| 1.1.3 | Prävention | 5 |
| 1.1.4 | Histologische Einteilung | 12 |
| 1.1.5 | Klinische Symptome des Zervixkarzinoms | 12 |
| 1.1.6 | Stadieneinteilung vom invasiven Zervixkarzinom, stadiengerechte Therapie und Prognose. | 13 |
| 1.2 | Epigenetik und Methylierung von DNA als Regulationsmöglichkeit der Genexpression in der Zelle. | 19 |
| 1.3 | Epigenetische Veränderungen im Zervixkarzinom | 22 |
| 1.4 | Der Östrogenrezeptor und das Tumorsuppressorgen ESR1 - Funktion und Rolle in der Tumorentstehung des Zervixkarzinoms | 27 |
| 1.5 | Zielsetzung | 31 |
| 2 | Material und Methoden | 32 |
| 2.1 | Material | 32 |
| 2.1.1 | DNA-Isolation aus Tumorgewebe | 32 |
| 2.1.2 | Bisulfitkonversion der gewonnenen DNA | 33 |
| 2.1.3 | Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion | 34 |
| 2.1.4 | Allgemeine Utensilien für alle Versuchsteile | 35 |
| 2.2 | Methoden | 37 |
| 2.2.1 | DNA-Isolation aus Tumorgewebe | 37 |
| 2.2.2 | Bisulfitkonversion der gewonnenen DNA | 38 |
| 2.2.3 | Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion | 40 |
| 3 | Ergebnisse | 44 |
| 4 | Diskussion | 55 |
| 4.1 | Repräsentativität des Kollektivs | 55 |
| 4.2 | Ergebnisinterpretation | 58 |
| 5 | Zusammenfassung und Ausblick | 61 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 62 |
| 7 | Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme | 70 |
| 8 | Danksagung | 71 |

1 Einleitung

1.1 Zervixkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom ist weltweit eines der häufigsten Genitalkarzinome der Frau, wobei durch die Einführung und Verbreitung der von Papanicolaou und Traut entwickelten zytologischen Vorsorgeuntersuchungen die Inzidenz der Karzinome auf Kosten der Diagnose präinvasiver Läsionen zurückgegangen ist – das gilt zumindest für die Industrienationen mit hohem sozioökonomischem Status. Weltweit steht es jedoch bei Frauen an dritter Stelle nach dem Mamma- und dem Kolonkarzinom¹. Pro Jahr bekommen insgesamt 370.000 Frauen die Diagnose eines Gebärmutterhalskarzinoms. Für Deutschland wird diese Zahl auf ungefähr 4600 pro Jahr geschätzt^{1, 2}. Somit ist das Zervixkarzinom in Deutschland auch nur an zehnter Stelle der bösartigen Neubildungen der Frau³. Durch die multimodale Therapie ist in Deutschland die altersstandartisierte Mortalität auf einem stabilen niedrigen Niveau von 2,6/100.000. Für Länder ohne Screening-Programme und mit nur begrenzten Therapiemöglichkeiten wie für die Staaten des afrikanischen Kontinents ist die Inzidenz 4 mal höher und die Mortalität 10 mal höher³. Durch das verbesserte Langzeitüberleben der vorwiegend jüngeren betroffenen Patientinnen (Altersgipfel deutlich früher als bei den meisten anderen genitalen Malignomen der Frau) ist in Deutschland die Entwicklung von schonenden morbiditätssenkenden Therapieformen in den Vordergrund getreten.

Das durchschnittliche Alter bei Diagnose invasiver Läsionen liegt bei 50 Jahren, wobei dieses bei In-Situ-Karzinomen deutlich früher liegt – bei 35 Jahren⁴. Der Nachweis eines der relevantesten Risikofaktoren wiederum, der HPV-Infektion, erfolgt dabei bereits ungefähr ein Jahrzehnt früher (Altersgipfel zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Humane Papillomaviren und viralbedingte Onkogenese

Der Hinweis auf diesen wichtigen Risikofaktor hat sich aus der Beobachtung ergeben, dass das Zervixkarzinom bei sexuell aktiven Frauen und praktisch nie bei Jungfrauen vorkommt. Die Durchseuchung mit dem Virus beginnt mit Aufnahme der sexuellen Aktivität, erreicht ihren Gipfel zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr und hat Prävalenzen je nach Kollektiv und Nachweismethode zwischen 5 und 30%⁵. Der Rückgang der nachweisbaren HPV-Infektionen im späteren Lebensalter könnte sich einerseits durch Abnahme der Zahl der Sexualpartner, andererseits durch die erfolgreiche Infektionsbekämpfung bei steigender Immunkompetenz erklären.

Je nach Kanzerogenesepotential unterscheidet man bei den Viren *low risk* (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54), *intermediate risk* (HPV 33, 35, 51, 52) und *high risk* Gruppen (HPV 16, 18, 31, 45). Obwohl Infektionen mit HR-HPV-Viren meistens innerhalb 12-18 Monaten remittieren und danach erfolgreich vom Immunsystem eliminiert werden, können sie in 10% der infizierten Frauen längerfristig persistieren und zur malignen Entartung führen⁶. Die beiden *high risk*-Typen HPV-16 und HPV-18 findet man in 50-60%, beziehungsweise in 10-20% der malignen Zervixtumoren^{7, 8}. Umgekehrt findet man in > 99% der Zervixkarzinome HPV-DNA⁹. Die Geninformation des HPV-Virus verteilt sich auf kodierenden (*early genes*: E1, E2, E4, E5, E6, E7 für die frühe Virusreplikation und *late genes* L1, L2 für Kapsidproteine) und nicht kodierenden Regionen⁸. Die Proteinprodukte von den Onkogenen E6 und E7 spielen dabei die entscheidende Rolle bei der malignen Transformation der Plattenepithelzellen der Zervix, indem sie die physiologischen Tumorsuppressoren Rb (Interaktion mit E6/E7) und p53 (Interaktion mit E7) ausschalten (siehe Abb. 1)¹⁰. Das Rb-Protein verhindert in seiner Funktion als Tumorsuppressorgen normalerweise die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und blockiert somit den Zellteilungsprozess⁶, siehe Abb. 1. Das p53-Protein ist wiederum in seiner Rolle als Tumorsuppressor vor allem für die Apoptoseeinleitung zuständig¹¹. Nach anfänglicher Infektion kann sich die DNA des Virus dabei als Episom parallel zur Zellteilung replizieren⁶. Das ist einer noch latenten Persistenz gleichzusetzen. Am Anfang der malignen Entartung steht dann die Integration des Virusgenoms in das humane Genom. Die Entstehung von malignen Neoplasien hängt dabei von einer Reihe von Faktoren ab – der Immunkompetenz der Patientin, dem onkogenen Potential des Virustyps und ganz wesentlich von der Integration der zunächst episomal vorliegenden DNA in das Wirtsgenom mit Überexpression von E6 und E7. Während eine HPV-Infektion nicht zwingend eine Neoplasie hervorbringt, zeigen Studiendaten, dass in 99% aller Zervixkarzinome und dessen Vorstufen HPV-DNA nachweisbar ist^{9, 12}. Bei 70-80% heilt die Infektion folgenlos mit Ausbildung einer Immunität für 12-18 Monate aus, 20% der infizierten Patientinnen entwickeln eine subklinische und 10% eine manifeste Infektion und 2-3% davon wiederum schwere Dysplasien. Diese gehen nun mit einer Wahrscheinlichkeit von 30-50% in ein invasives Karzinom über¹².

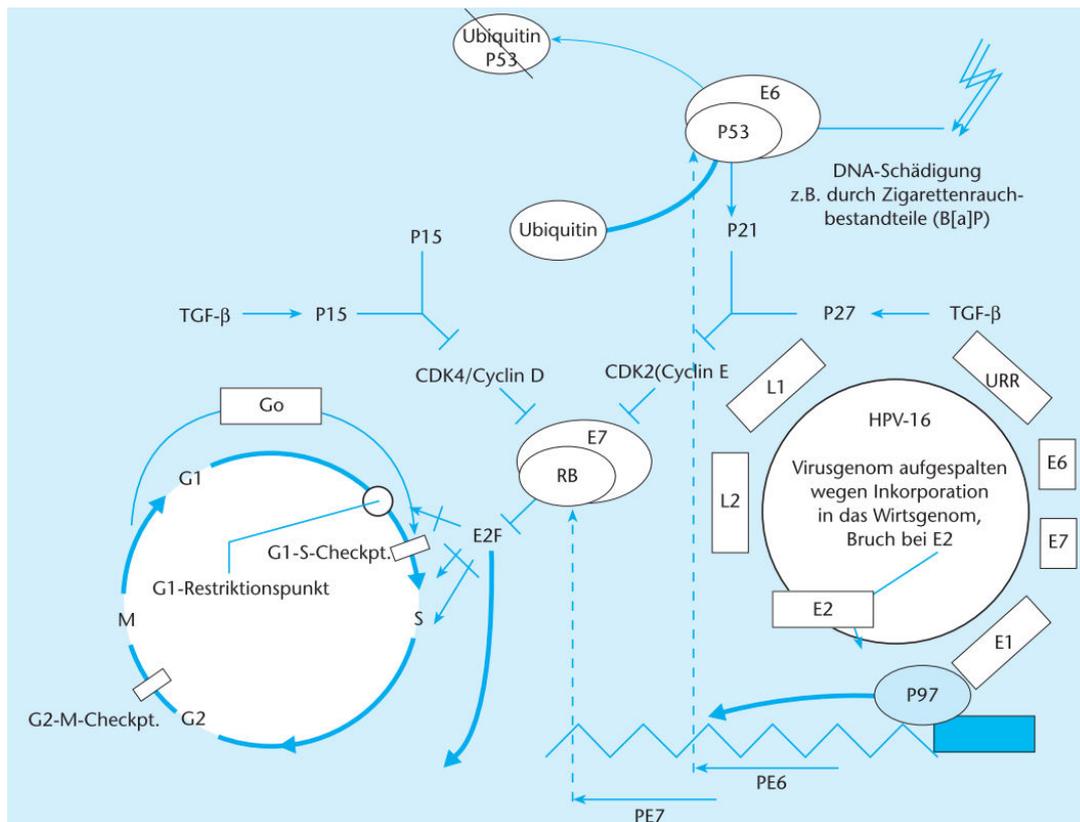


Abb. 1 Das Bild zeigt die Integration der viralen DNA in das humane Genom und die Blockade von den Tumorsuppressorgenen p53 (durch E6) und (Rb durch E7).¹¹

Die verschiedenen Dysplasiegrade haben entsprechend ein unterschiedliches Entartungspotential wie die Tabelle 1 zeigt (schwere Dysplasien führen zum Beispiel häufiger zur malignen Entartung). Neuere Studien beschäftigen sich deswegen vor allem mit dem Regressionspotential von schweren Dysplasien wie CIN 2/3. Der HPV-Status kann dazu zur Risikostratifizierung genutzt werden. HPV-16-positive CIN 2 Läsionen zeigen nämlich eine höhere Persistenzneigung¹³. Trimble et al. weisen in Ihrer Studie eine Regressionsrate von 28% von CIN 2 / CIN 3 innerhalb von 15 Wochen und zeigen ebenfalls, dass die HPV-16-positive Läsionen ein niedrigeres Regressionspotential haben. Von den HPV-16-positiven Patientinnen erlangten zudem diese mit der niedrigeren Viruslast die Remission¹⁴. Durch die HPV-Genotypisierung können somit HPV-16-negative Frauen mit CIN 2 / ASCUS / LSIL von weniger invasivem Vorgehen profitieren.

| Dysplasiegrad | n | Regression (%) | Persistenz (%) | Progression (%) | Invasion (%) |
|---------------|------|----------------|----------------|-----------------|--------------|
| CIN 1 | 4505 | 57 | 32 | 11 | 1 |
| CIN 2 | 2247 | 43 | 35 | 22 | 5 |
| CIN 3 | 767 | 32 | < 56 | - | 12 |

Tab. 1 Progressionsneigung der präkanzerösen Zervixläsionen.

Weitere Risikofaktoren

Sexuelle und reproduktive Faktoren wie frühe Kohabitarche, Anzahl der Sexualpartner und Multiparität korrelieren eng mit der Wahrscheinlichkeit einer HPV-Infektion, wodurch auch das Erkrankungsrisiko steigt. Das sind deswegen keine unabhängigen Risikofaktoren ⁴. Mit der Entdeckung der zentralen Rolle von HPV in der Onkogenese ist die Bedeutung dieser Risikofaktoren relativiert. Das Rauchen und die karzinogene Wirkung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen kann allerdings als ein HPV-unabhängiger Faktor postuliert werden ¹¹. Das hat vor allem Roura et al. in der *EPIC-Cohort-Study* nachgewiesen, die über 300.000 Frauen verlaufsbeobachtet hat, ein zweifach höheres Risiko für CIN 3 / Carcinoma in situ / invasiven Zervixkarzinom bei Raucherinnen sowie eine zweifache Risikoreduktion nach Expositionsstopp zeigt. Dabei wurden die Ergebnisse anhand von serologischem Nachweis von L1-Antikörpern für multiple HPV-Genotypen für HPV adjustiert ¹⁵.

Eine allgemeine Immunsuppression, wie sie im Rahmen einer HIV-Infektion ¹⁶, einer Organtransplantation ¹⁷ oder Immunsuppressiva-Einnahme ¹⁸ auftritt beziehungsweise erwünscht ist, erhöht ebenfalls die Detektionsrate von Papillomaviren und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten oder fehlender Remission von zervikalen Dysplasien. Eine leichte gestationsbedingte Immunschwäche kann ebenfalls die Erklärung für den erhöhten HPV-Nachweis und dysplastischen Veränderungen in der Schwangerschaft sein ¹¹.

Ovulationshemmereinnahme als weiterer Risikofaktor über einen längeren Zeitraum (mehr als 3 Jahre) ist laut Vanakankovit et al. (2008) mit einem statistisch signifikant erhöhten Risiko für das Zervixkarzinom verbunden (OR 2.57), wohingegen eine Einnahme für weniger als 3 Jahre keine Korrelation zu dieser Tumorentität zeigt. Deswegen ist die Durchführung eines Screenings mittels PAP-Abstrichen bei Langzeitanwenderinnen von oralen Antikonzeptiva von besonderer Bedeutung. ¹⁹.

1.1.3 Prävention

Primäre Prävention

Die primäre Prävention ist zweifelsohne die effektivste Form von Prävention sowohl des Zervixkarzinoms als auch von seinen Vorstufen. Nach dem Herauskrystallisieren des onkogenen Potentials des HPV-Virus wurden Impfungen entwickelt, die leere Viruskapside ohne onkogene HPV-DNA enthalten und eine Immunität induzieren sollen. Es gibt derzeit einen tetravalenten Impfstoff zur Prophylaxe der Ansteckung mit HPV Typ 6, 11, 16 und 18 und einen bivalenten, der nur die High-Risk-HPV-Typen 16 und 18 abdeckt. Der tetravalente Impfstoff bietet zusätzlich Schutz vor Condylomata acuminata durch den Schutz vor HPV-Typ 6 und 11 ²⁰. In der großen Studie „*Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types*“ (=

Papilloma Trial against Cancer in young Adults oder PATRICIA)“ wurde die Effizienz des Impfstoffes Cervarix (gegen HPV-16 und -18) in der Verhinderung von CIN 2-Läsionen, die HPV assoziiert waren, geprüft ²¹. Der Erfolg in der Gruppe ungeachtet des HPV-Status (repräsentiert die normale Bevölkerung) lag bei 30,4% gegenüber der Kontrolle (durchgeführte Hepatitis A Impfung). In der Gruppe ohne HPV-Infektion mit onkogenen Viren (repräsentiert Frauen vor dem ersten Sexualkontakt) ist der Erfolg bei 70,2% gewesen. Die Erfolgsraten für die Verhinderung von CIN 3 sind sogar höher ausgefallen – 33,4% in der ersten (Normalpopulation ungeachtet des HPV-Status) und 87,0% in der zweiten Gruppe (HPV-negativen Frauen). Durch eine Kreuzprotektion verhinderte die Impfung sogar CIN 2-Läsionen, die mit anderen onkogenen Viren assoziiert waren und nicht durch die Impfung abgedeckt waren (insbesondere HPV-31, HPV-33 und HPV-45) ²¹. Laut Hillemanns et al. würde durch die HPV-Impfung in Zukunft bei 120 vor ihrem Geschlechtsverkehr geimpften Mädchen ein Zervixkarzinom und in 4 weiteren Fällen behandlungspflichtige Dysplasien verhindert werden ²⁰. Die Ständige Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut hat somit 2014 eine Empfehlung zur generellen Impfung gegen HPV für alle Mädchen von 9 bis 14 Jahren zur Primärprävention des Zervixkarzinoms ausgesprochen ²⁴. Die Früherkennung mittels PAP-Abstrich sollte allerdings weiterhin erfolgen, da die Impfung gegen HPV-16 und HPV-18 vor Infektion mit anderen onkogenen Virustypen nicht schützt und derzeit bekannt ist, dass 30% der Zervixkarzinomerkrankungen mit anderen onkogenen HPV-Typen als HPV-16 und -18 assoziiert sind ²⁰. Die Grundlage für die Altersempfehlung ist, dass 74% der Infektionen mit HPV im Alterskollektiv zwischen 15 und 24 Jahren beobachtet werden und die Prävalenz der Infektion mit zunehmendem Alter abfällt ²⁵. Die Prävalenzzahlen berücksichtigen allerdings nicht, dass in 70-90% der Fälle eine Spontanremission erfolgt und in 1-2 Jahren keine HPV-DNA mehr nachweisbar ist, das heißt es ist ein dynamischer Prozess vieler Neuinfektionen und Remissionen ⁷.

Eine weitere Kernaussage der bisherigen Forschung ist, dass bereits bestehende HPV-Infektionen und Folgeerkrankungen wie zum Beispiel CIN, VIN, VAIN durch eine Impfung nicht therapiert werden können ²⁰. In der Studie von Hildesheim et al. *“Effect of Human Papillomavirus 16/18 L1 Viruslike Particle Vaccine Among Young Women With Preexisting Infection”* wurden speziell zur Erforschung des Therapiepotentials einer HPV-Impfung HPV-DNA-positive Frauen rekrutiert und mit HPV-16/18 L1 protein viruslike particle AS04 oder Hepatitis-A-Vakkzine als Kontrolle geimpft ²⁷. Das Ergebnis zeigte keine erhöhten Remissionsraten und keine erhöhte Viruseliminierung in der Gruppe mit der durchgeführten HPV-Impfung. Das Ziel der Impfung ist und bleibt folglich die Primärprävention von Neuinfektionen und den damit assoziierten Erkrankungen.

Sekundäre Prävention

A.) Zytologie

Bei der sekundären Prävention spielt der PAP-Abstrich sowie die Kenntnis zum Aufbau der Portioschleimhaut die entscheidende Rolle. Die Ektozervix ist von einem nicht verhornenden Plattenepithel bedeckt, während die Endozervix ein einschichtiges drüsenreiches Zylinderepithel an der Oberfläche trägt. Während bei der geschlechtsreifen Frau die Transformationszone (die Grenze zwischen den Epithelienarten mit hoher Zellteilungsaktivität) an der Portiooberfläche zu identifizieren ist, ist sie bei jungen Mädchen sowie bei postmenopausalen Frauen nach endozervikal verschoben, wo sie auch schwerer zugänglich für die makroskopische Beurteilung ist. Diese Transformationszone ist der Bereich, in dem vor allem das Zervixkarzinom entsteht und dessen Zellen bei der Abstrichentnahme miterfasst werden sollten ⁶.

Zur Bewertung des gewonnenen Materials werden die zwei verbreitetsten Nomenklaturen verwendet – die nach Papanicolaou (das "Münchner Schema") und das Bethesda-System ³⁰. Eine Übersicht ist in der Tabelle 2 dargestellt.

| Gruppe | Definition | Korrelat im Bethesda-System |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PAP 0 | Unzureichendes Material → Abstrichwiederholung | |
| PAP I | Unauffällige Befunde → Abstrich im Vorsorgeintervall | NILM |
| PAP II-a | Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese → ggf. zytologische Kontrolle wegen auffälliger Anamnese (zytologischer / histologischer / kolposkopischer / klinischer Befund) | NILM |
| PAP II | Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert | |
| PAP II-p | Plattenepithel mit geringgradigen Kernveränderungen als bei CIN1 → zytologische Kontrolle evtl. nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung | ASC-US (<i>atypical squamous cells of undetermined significance</i>) |
| PAP II-g | Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen → zytologische Kontrolle evtl. nach Entzündungsbehandlung | AGC endocervical NOS (<i>Atypical glandular endocervical cells not otherwise specified</i>) |
| PAP II-e | Endometriumzellen bei Frauen > 40. Lebensjahr in der zweiten Zyklushälfte → klinische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und Befund | Endometrial cells |
| PAP III | Unklare bzw. zweifelhafte Befunde | |
| PAP III-p | CIN2/CIN3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen → Differentialkolposkopie, evtl. kurzfristige zytologische Kontrolle nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung | ASC-H (<i>Atypical cells of undetermined significance cannot exclude HSIL</i>) |
| PAP III-g | Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen → Differentialkolposkopie | AGC endocervical favor neoplastic (<i>Atypical glandular endocervical cells favor neoplastic</i>) |
| PAP III-e | Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal) → Weiterführende klinische Diagnostik, ggf. mit histologischer Klärung | AGC endometrial (<i>Atypical glandular endometrial cells</i>) |
| PAP III-x | Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs → Weiterführende Diagnostik (z.B. Abrasio, Differentialkolposkopie) | AGC favor neoplastic (<i>Atypical glandular cells favor neoplastic</i>) |
| PAP IIID | Dysplasiebefunde mit grösserer Regressionsneigung | |
| PAP IIID1 | Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN1 → Zytologische Kontrolle in 6 Monaten, bei Persistenz länger als 1 Jahr Differentialkolposkopie | LSIL (<i>low-grade squamous intraepithelial lesion</i>) |
| PAP IIID2 | Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN2 → Zytologische Kontrolle in 3 Monaten, bei Persistenz länger als 6 Monate Differentialkolposkopie | HSIL (<i>high-grade squamous intraepithelial lesion</i>) |
| PAP IV | Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms, die Differentialkolposkopie und Therapie erfordern | |

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| PAP IVa-p | Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog CIN3 | HSIL |
| PAP IVa-g | Zellbild eines Adenocarcinoma in situ | AIS (<i>Adenocarcinoma in situ</i>) |
| PAP IVb-p | Zellbild einer CIN3, Invasion nicht auszuschließen | HSIL with features suspicious for invasion |
| PAP IVb-g | Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen | AIS with features suspicious for invasion |
| PAP V | Malignome, die weiterführende Diagnostik mit Histologie und Therapie erfordern | |
| PAP V-p | Plattenepithelkarzinom | Squamous cell carcinoma |
| PAP V-g | Endozervikales Adenokarzinom | Endocervical adenocarcinoma |
| PAP V-e | Endometriales Adenokarzinom | Endometrial adenocarcinoma |
| PAP V-x | Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs | Other malignant neoplasms |

Tab. 2 Gegenüberstellung der Münchner und Bethesda-Nomenklaturen zur Beschreibung histologischer und zytologischer Befunde an der Zervix uteri sowie der jeweils empfohlenen Maßnahmen³⁰.

B.) HPV-DNA-Nachweis

Zu den zusätzlichen und sinnvollen diagnostischen Möglichkeiten (in Deutschland noch nicht in der Jahreskontrolle einbezogen), vor allem bei wiederholtem PAP IIID (CIN 1 bzw. CIN 2) über mehr als 1 Jahr indiziert, gehört die HPV-Hybridisierung. Bei der Untersuchung von 60.000 Frauen zeigt eine Meta-Analyse, dass der HPV-Nachweis als Mittel zur Identifikation von Frauen mit CIN II und CIN III deutlich sensitiver als die konventionelle Zytologie ist (96.1% vs. 53.0%), aber weniger spezifisch (90.7% vs. 96.3%)^{31, 32}. Das heißt, Frauen mit negativem HPV-Nachweis-Ergebnis haben ein geringeres Risiko für CIN 3+ Läsionen und Karzinom als Frauen mit zytologisch negativem Ergebnis – das Risiko für CIN 3+ Läsionen nach negativem HPV-Nachweis oder Co-Test (HPV-Nachweis + Zytologie) ist 0,27% bzw. 0,28%, während nach alleinigem negativem Zytologieresultat das 6-Jahres-Risiko für CIN 3+ bei 0,97% deutlich höher liegt³³. Diese Korrelation zeigt auch das Ergebnis in der Studie von Katki et al. “*Cervical Cancer Risk for 330,000 Women Undergoing Concurrent HPV Testing and Cervical Cytology in Routine Clinical Practice at a Large Managed Care Organization*” – das 3-Jahres-Risiko für CIN3+ ist nach alleiniger negativer Zytologie gleich wie das 5-Jahres-Risiko nach alleinigem negativem HPV-Nachweis (0,17%)³⁴, siehe Abb. 2 a). Das ist auch der Grund dafür, dass bei der Anwendung eines Co-Verfahrens (Zytologie und HPV-Nachweis) das Screeningintervall von 3 auf 5 Jahren verlängert werden kann.

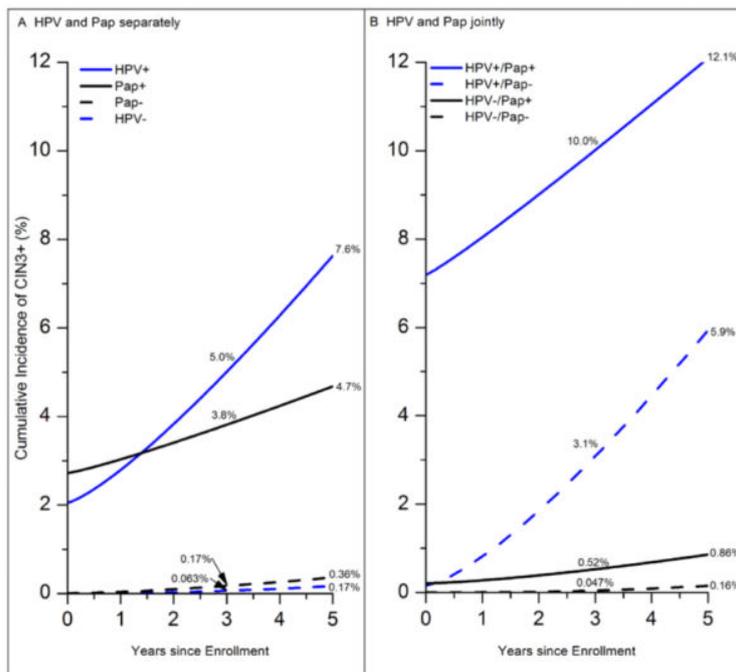
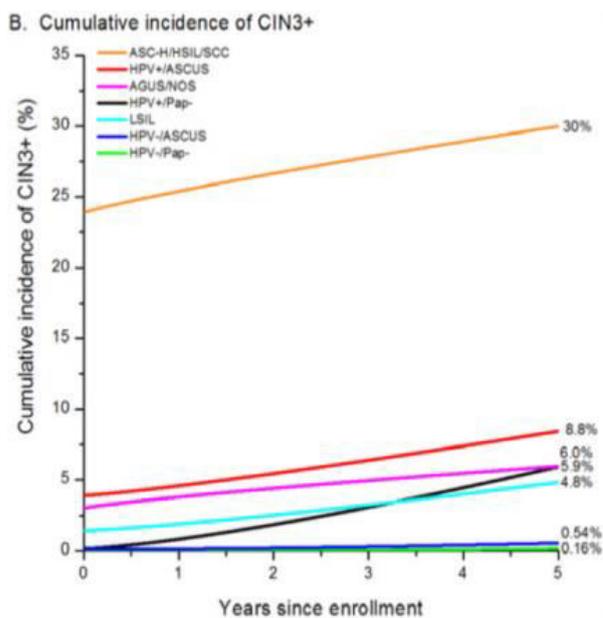


Abb. 2 a)



Add. 2 b)

Abb. 2 a) Das Diagramm zeigt, dass der HPV-Test die Hochrisiko-Patientinnen effektiver entdeckt - HPV-positive Frauen bei Studienbeginn haben höheres CIN3+ Risiko als Pap-positive in den nächsten 5 Jahren. Die zweite Grafik zeigt die noch bessere prognostische Bedeutung vom Co-Test (HPV-Test und Zytologie). **b)** Das Diagramm soll das niedrige Risiko eines HPV-negativen ASC-US (*Atypical squamous cells of undetermined significance* oder PAP II-p nach der neuen Münchner Nomenklatur) zeigen. Das soll zur besseren Triage von Patientinnen mit ASC-US-Zytologie führen (bei HPV-Positivität sollte die kolposkopische Kontrolle erfolgen, bei HPV-Negativität reguläre Kontrollen)³⁴.

Während die Sensitivität des HPV-Nachweisverfahrens in allen Altersgruppen unbeeinflusst bleibt, steigt die Spezifität mit dem Alter. Verantwortlich für das Phänomen ist die hohe Prävalenz der transienten HPV-Infektionen unter jungen Frauen (90% der Infektionen sind in 2 Jahren nicht mehr nachweisbar³³), die

einen virologischen Nachweis als Screening-Verfahren wesentlich unspezifischer als die Zytologie macht. Dieser Fakt ist auch die Grundlage für die Empfehlung der HPV-DNA-Sequenzierung als Screeningverhalten erst ab dem 30. Lebensjahr in den USA.

Neben der obengenannten Indikation für die HPV-Hybridisierung (wiederholte PAP IIID-Resultate, Co-Testung ab dem 30. Lebensjahr) stellt der DNA-Nachweis der HPV-Viren die sensitivere und gleich spezifische Variante für die Erkennung von CIN 2/3 oder ggf. invasiven Karzinomen bei Frauen mit atypischen Abstrichen - ASC-US (*Atypical squamous cells of undetermined significance*) - als die Zytologie^{31, 36} dar. Also im Falle eines ASC-US wäre die HPV-Testung statt die wiederholte zytologische Untersuchung empfohlen. Dies wird in Amerika auch in der Triage von Patientinnen mit ASC-US angewendet - bei HPV-Negativität werden reguläre Kontrollen weitergeführt, bei HPV-Positivität werden ASC-US Patientinnen entsprechend dem höheren Progressionsrisiko einer Kolposkopie zugeführt (siehe Abb. 2 a) und b)),³³. Darüber hinaus wurde ebenfalls gezeigt, dass das Vorhersagerisiko für die Rekurrenz der CIN nach behandelten höhergradigen Zervixdysplasien durch die HPV-Testung besser eingeschätzt wird als im Zytologieverfahren³⁶ und die HPV-Persistenz als wichtiger prognostischer Faktor nach Therapie von Bedeutung ist³⁷.

C.) Kolposkopie

Die Kolposkopie ist eine entscheidende und informative Untersuchungsmethode vor allem bei auffälligen zytologischen Abstrichen. Zuerst erfolgt die makroskopische Beurteilung und in der Folge werden auffällige Bereiche chemisch behandelt – mittels Essigsäure (meistens 5%) sowie Jod⁵¹. Kernreiche Bereiche mit entsprechend hohem Proteingehalt wie dysplastische Zellen werden durch die Denaturierung der Proteine weiß dargestellt und gelten somit als essigweiß und auffällig⁵. Eine anschließende Behandlung mit Jod führt bei normalem ausdifferenziertem Plattenepithel mit hohem Glykogengehalt zu einer Braunfärbung und bei einem dysplastischen, undifferenzierten Epithel (aber auch dem normalen Zylinderepithel) zu einer ausbleibenden Färbung⁵². Der Grund dafür ist, dass beim normalen Plattenepithel die Zellen ihre Kerne verlieren und diese komplexe Kohlenhydrate anreichern, das dann als Energiereserve der kernlosen Zellen in den oberen Schichten dient. Dysplastische Zellen behalten eher ihr Kerne und reichern weniger Glykogen an. Die Kolposkopie und die Essig-/Jodprobe wird auch vor allem vor einer Knipsbiopsie und ggf. Konisation zur Lokalisierung der dysplastischen Bereiche angewendet.

1.1.4 Histologische Einteilung

Unter den invasiven Karzinomen der Zervix uteri ist das Plattenepithelkarzinom der verbreitetste Typ mit Anteil zwischen 80% und 90% laut verschiedenen Literaturangaben⁵³. Am zweithäufigsten findet man das Adenokarzinom mit 15%⁵⁴. Die Früherkennung hat allerdings dazu geführt, dass die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms sich verringert hat, während sich die Inzidenz des Adenokarzinoms, in Relation zu allen Zervixmalignomen, verdoppelt hat⁵⁵. Das zeigt die Insuffizienz des Screeningsprogramms für die Früherkennung des zuletzt genannten Karzinomsubtyps. Die anderen Entitäten des Zervixkarzinoms findet man durchaus seltener (darunter adenosquamös und neuroendokrin). Mit prognostisch ungünstigen Kriterien verbindet man das neuroendokrine (groß- und kleinzelliges) und das klarzellige Zervixkarzinom²⁸. Das Plattenepithelkarzinom zeigt verschiedene Subtypen – verhornt und nicht verhornt sind darunter die häufigsten. Weitere seltenere histologische Einteilungen des Plattenepithelkarzinoms wären die basaloiden, verrukösen, kondylomatösen, papillären und lymphoepitheliomartigen Gruppen der Plattenepithelkarzinome.

Das Adenokarzinom wird ebenfalls in verschiedene Subtypen unterteilt – das muzinöse (57%), endometroide (30%) und das klarzellige (4%) Adenokarzinom. Im Falle eines Nachweises eines Adenokarzinoms sollte differentialdiagnostisch ein Endometriumkarzinom ausgeschlossen werden, das bis in die Zervix vorgewachsen ist.

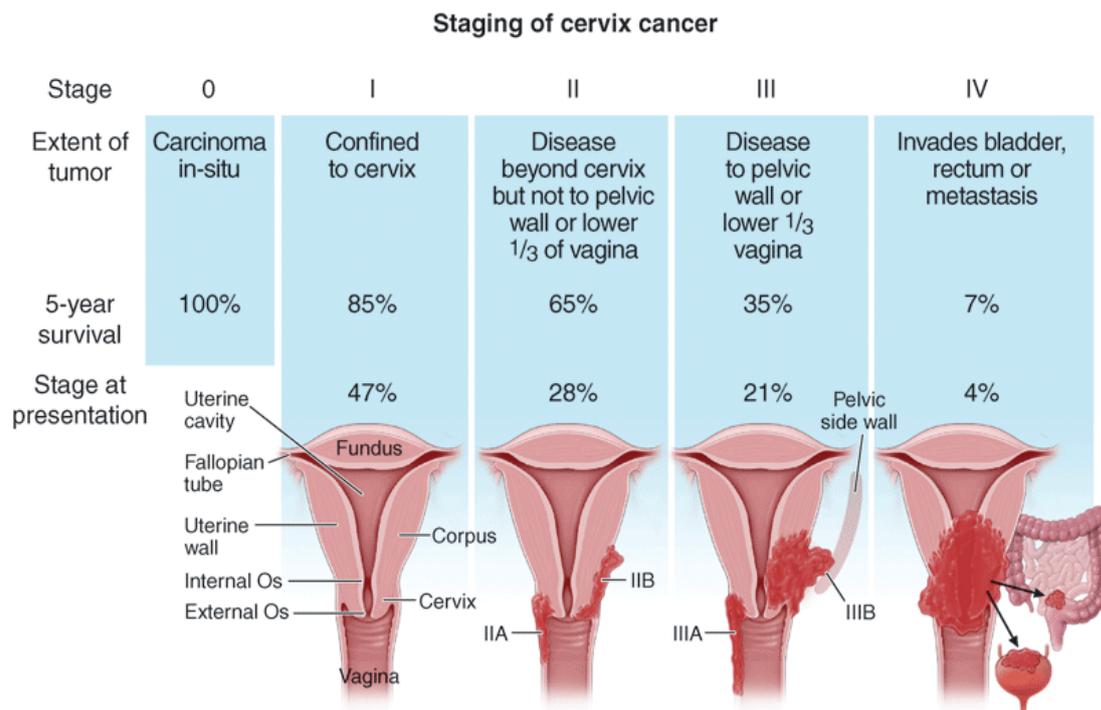
1.1.5 Klinische Symptome des Zervixkarzinoms

Präinvasive Läsionen des Zervixkarzinoms sind meistens symptomarm bis -frei und werden häufig bei Vorsorgeuntersuchungen entdeckt. Typisch sind abnorme Blutungen in der Form von Zwischen- und Schmierblutungen bei prämenopausalen Frauen und postmenopausale Blutungen, genau wie Kontaktblutungen, beispielsweise beim/nach dem Geschlechtsverkehr.

Bei lokal fortgeschrittenen Stadien des Karzinomleidens gibt es als Symptome lumbosakrale Schmerzen als Zeichen der Plexusinfiltration, Beinödeme bei pelvinen/paraaortalen Lymphknoteninfiltration⁵⁶ und ab Stadium IIIB Ureterobstruktion⁵⁷ durch befallene Parametrien mit daraus resultierender Hydronephrose bis hin zur Urämie und postrenaler Niereninsuffizienz. Durch Einmauerung und Einengung von Beckenvenen kann es auch zu Beinvenenthrombosen kommen. Symptome können sowohl Zeichen einer Invasion, einer Re-Invasion nach Therapie als auch der Therapie selbst (Lymphödeme der unteren Extremitäten infolge Lymphonodektomie) sein.

1.1.6 Stadieneinteilung vom invasiven Zervixkarzinom, stadiengerechte Therapie und Prognose

Die Tumoreinteilung des Zervixkarzinoms erfolgt nach TNM und FIGO, wobei die FIGO-Klassifikation den Lymphknotenbefall und die Fernmetastasen berücksichtigt (siehe Tab. 3), ⁵⁵. Sehr wichtig, vor allem für die stadiengerechte Therapie ausschlaggebend, sind die Tumorgöße und der Organbefall. Die Einzelheiten der Stadieneinteilung sind in der unten stehenden Tab. 3 und in der Abb. 3 zusammengefasst.



Source: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th Edition: www.accessmedicine.com
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Abb. 3 Abbildung der Tumorstadienklassifikation anhand anatomischer Verhältnisse und entsprechende 5-Jahresüberlebensraten (Harrison's Principles of Internal Medicine, 18. Edition (2011)).

| T | N | M | FIGO | Definition |
|------------|----------------|-----------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TX | - | - | - | Primärtumor kann nicht beurteilt werden |
| T0 | - | - | - | Kein Anhalt für Primärtumor |
| <u>Tis</u> | N0 | M0 | 0 | <u>Carcinoma in situ</u> |
| T1 | N0 | M0 | I | Zervixkarzinom beschränkt auf den Uterus |
| T1a | N0 | M0 | IA | Invasives Karzinom, ausschließlich durch Mikroskopie diagnostiziert. Maximale Tiefe 5 mm, maximale <u>horizontale Ausdehnung</u> 7 mm. |
| - T1a1 | N0 | M0 | IA1 | <u>Stromainvasion</u> unter 3 mm in der Tiefe und nicht mehr als 7 mm in größter horizontaler Ausdehnung |
| - T1a2 | N0 | M0 | IA2 | <u>Stromainsavion</u> von 3 bis 5 mm und nicht mehr als 7 mm in größter horizontaler Ausdehnung |
| T1b | N0 | M0 | IB | Klinisch sichtbare Läsion auf die Zervix begrenzt oder mikroskopische Läsion > T1a/1A |
| - T1b1 | N0 | M0 | IB1 | Klinisch sichtbare Läsion < 4 cm in größter Ausdehnung |
| - T1b2 | N0 | M0 | IB2 | Klinisch sichtbare Läsion > 4 cm in größter Ausdehnung |
| T2 | N0 | M0 | II | Tumor infiltriert jenseits des Uterus aber nicht bis zur Beckenwand und nicht bis zum unteren Drittel der Vagina |
| T2a | N0 | M0 | IIA | <u>Ohne Infiltration des Parametriums</u> |
| - T2a1 | N0 | M0 | IIA1 | <u>Klinische Läsion</u> < 4 cm |
| - T2a2 | N0 | M0 | IIA2 | <u>Klinische Läsion</u> > 4 cm |
| T2b | N0 | M0 | IIB | <u>Mit Infiltration des Parametriums</u> |
| T3 | N0 | M0 | III | Tumor breitet sich bis zur Beckenwand aus, befällt das untere Drittel der Vagina, oder verursacht Hydronephrose |
| T3a | N0 | M0 | IIIA | Tumor befällt unteres Drittel der Vagina, keine Ausbreitung zur Beckenwand |
| T3b | Jedes N | M0 | IIIB | Tumor breitet sich bis zur Beckenwand aus oder verursacht Hydronephrose |
| T1-3 | N1 | M0 | | |
| T4 | Jedes N | M0 | IVA | Tumor infiltriert Schleimhaut von Blase oder Rektum oder überschreitet die Grenzen des kleinen Beckens |
| Jedes T | Jedes N | M1 | IVB | Fernmetastasen |

Tab. 3 TNM- und FIGO-Stadienklassifikation des Zervixkarzinoms. NX - keine Beurteilung der regionalen Lymphknoten möglich, N0 - keine Metastasierung der regionalen Lymphknoten, N1 - Metastasierung der regionalen Lymphknoten. M0 - keine Fernmetastasen, M1 - Fernmetastasen. ^{55, 58}.

Therapie

Beim frühen Stadium des Zervixkarzinoms, vor allem beim FIGO IA1 mit bis zu einem Risikofaktor (lymphogener oder vaskulärer Beteiligung - L1 bzw. V1, nicht beurteilbarem Absetzungsrand, G3, neuroendokrines Karzinom), ist eine organerhaltende Therapie (Konisation mit ausreichenden Sicherheitsabständen oder ggf. Trachelektomie) im Falle eines Kinderwunsches möglich. Voraussetzung in diesem Fall sind tumorfreie Präparatränder, ggf. sollte eine Rekonisation erfolgen⁵⁹. Bei abgeschlossener Familienplanung wird allerdings die einfache Hysterektomie ohne Adnexektomie empfohlen, die pelvine Lymphonodektomie ist nicht indiziert.⁵⁵

Ab zwei Risikofaktoren im Stadium IA1 und bis maximal 1 Risikofaktor im Stadium IA2 wird ein operatives Staging mit Lymphknoten-Asservierung durchgeführt. Das wird weiterhin laut den deutschen Leitlinien empfohlen, obwohl ein positiver Lymphknoten nur in 0.5% und nicht wie bisher vermutet in 7.3% bis 8.3% der Patientinnen im Stadium IA2 nachgewiesen wird⁶⁰. Bei negativem Lymphknotenstatus kann ebenfalls fertilitätserhaltend operiert werden (Konisation oder radikale Trachelektomie), generell gilt aber die Empfehlung zur Hysterektomie ohne Parametrienresektion. Im Falle eines pelvinen Lymphknotenbefalls kann keine organerhaltende Operation durchgeführt werden und die paraaortalen Lymphknoten werden mit entfernt. Eine Adnexektomie ist nicht indiziert, eine Ovariopexie kann im prämenopausalen Status zur Ovarialfunktionserhaltung durchgeführt werden⁵⁵.

Im Stadium IA2 mit mindestens 2 Risikofaktoren ist keine fertilitätserhaltende Therapie mehr möglich. Es wird eine radikale Hysterektomie unter Parametrien-Mitnahme durchgeführt und im Falle positiver pelviner Lymphknoten ebenfalls eine paraaortale Lymphonodektomie durchgeführt. Eine adjuvante Radiochemotherapie sollte erfolgen.

In den Stadien IB1 bis IIA1 kann bei Kinderwunsch eine radikale Trachelektomie lediglich bei Tumoren < 2 cm und bei fehlenden Risikofaktoren durchgeführt werden. Das geht ebenfalls aus der Studie von Biliatis et al., die ein gleichwertiges Outcome in Patientinnen im IB1-Stadium nach Konisation und Hysterektomie belegte - Voraussetzung dafür ist allerdings eine niedrige Tumormasse mit 500 mm³, Tumorgroße bis 9.75 mm und Invasionstiefe bis 1.55 mm⁶¹. Für die fertilitätserhaltende Therapie müssen allerdings unbedingt Lymphknotenmetastasen mittels pelviner Lymphknoten-Asservierung ausgeschlossen werden (in der Studie von Biliatis et al. ist entsprechend nur in einem einzigen Fall ein Lymphknotenbefall nachgewiesen). Ansonsten wird eine radikale Hysterektomie mit Parametrienresektion und im Falle von positiven Lymphknoten im Staging zusätzlich die paraaortale Lymphonodektomie empfohlen.

Im Falle von IB2 und IIA2 wird eine erweiterte Hysterektomie nach Piver III durchgeführt, Organerhaltung kann nicht angeboten werden. Ab diesen Stadien wird im postmenopausalen Status ebenfalls eine Adnexektomie durchgeführt

und bei Adenokarzinomen generell unabhängig vom Menopausalstatus empfohlen⁵⁵. Bei positivem Lymphknotenbefall im IB2 - IIA2 und generell im Stadium IIB ist die adjuvante Radiochemotherapie indiziert. Eine Benefit von neoadjuvanter Therapie vor operativer Behandlung kann im lokal fortgeschrittenen Stadium IB2 - IIA nicht erzielt werden⁶².

Im Stadium III nach FIGO wird eine Staging-Operation durchgeführt, diese hat meistens die Bestimmung der Tumorausdehnung und die Entfernung von Lymphknoten vor geplanter Radiochemotherapie (Therapie der Wahl) zum Ziel^{55, 63}. Dabei gilt streng genommen die Inoperabilität ab Stadium IIIB - ab Befall der Beckenwand. Liegt ein Stadium IIIA mit ausgedehntem Vaginalbefall allerdings ohne Beckenwandinfiltration vor, ist unter Umständen eine erweiterte Operation unter Mitnahme der gesamten Scheide und Anlegen einer Neovagina möglich.

Die Empfehlung für Patientinnen im Stadium IV ist die Radiochemotherapie. Falls die Beckenwand nicht infiltriert ist, könnte man allerdings im Stadium IVA bei isolierter Blasen- und/oder Darminfiltration die Exenteration (neben der radikalen gynäkologischen Operation Entfernung der Blase und/oder des Enddarms) als gleichwertige Option zur primären Radiochemotherapie angesehen werden und zeigt in Studien immerhin ein 2-Jahresüberleben von 60%, wenn die Operation in kurativer Absicht stattfindet⁶⁴.

Während bei primären Plattenepithelkarzinomen stadiumabhängig niedrige Metastasierungsraten in den Ovarien (0.22% im Stadium IB und 2.2% im Stadium IIB) festgestellt werden, fallen diese beim Adenokarzinom deutlich höher aus (3.72% im Stadium IB und 9.85% im Stadium IIB)^{55, 65}. Insgesamt postulieren Shimada et al.⁶⁵, dass Ovarialmetastasen mindestens 5 mal häufiger beim Adenokarzinom vorliegen (5.31% vs. 0.79%). Somit wird ab dem Stadium IB1 entsprechend des Metastasierungsrisikos bei postmenopausalen Frauen die Adnexektomie durchgeführt, beim Adenokarzinom allerdings auch bei prämenopausalen Frauen ab IB2.

Eine adjuvante Radio-Chemotherapie nach initialer operativer Sanierung ergibt sich aus dem Vorliegen von verschiedenen Risikofaktoren - Lymphknotenbefall, großen Tumoren (> 4 cm), tiefer Stromainvasion, ausgedehntem parametranem Befall, unzureichender Lymphonodektomie (pelvin < 15 Lymphknoten, paraaortal < 10 Lymphknoten), R1-Resektion, Grading G3, ausgeprägter lymphovaskulärer Infiltration⁶³.

In Zukunft sollte ein neues operatives Verfahren möglicherweise eine Rolle in der Therapie des Zervixkarzinoms spielen - die totale mesometriale Resektion (TMMR). Das Konzept beruht darauf, dass man den Tumor in den Grenzen seiner aus der Embryonalentwicklung abgeleiteten morphogenetischen Einheit operiert, dabei wichtige Nervengeflechte schont und trotz Risikofaktoren auf Radiotherapie verzichtet. Durch dieses Konzept erzielt man tatsächlich geringe Rezidivrate (2% bei TMMR ohne Strahlentherapie vs. 6% bei Kontrollen aus dem FIGO-Annual Report), besseres rezidivfreies 5-Jahresüberleben (94% vs.

80%) sowie besseres Gesamtüberleben (98% vs 81%)⁶⁶. Durch das nervenschonende Vorgehen und die fehlende Radiotherapie verspricht man sich zusätzlich eine geringere Morbidität. Weitere prospektive Studien werden überprüfen, ob dieses Verfahren wirklich der Standardtherapie überlegen ist und ob eine Chemotherapie eine sinnvolle Kombinationsmöglichkeit darstellt.

Prognose

Zu den Prognosefaktoren beim Zervixkarzinom zählen das Tumorstadium nach FIGO mit Größe (beim makroinvasiven Karzinom), Status der Resektionsränder sowie der Befall der pelvinen/paraaortalen Lymphknoten. Die Tabelle 4 zeigt das 5-Jahresüberleben abhängig vom FIGO-Stadium vor einer und während laufender Radiochemotherapie⁶⁷. Der histologische Tumortyp spielt (vor allem bei den Hauptentitäten - Adeno- und Plattenepithelkarzinom) eine untergeordnete Rolle⁶⁸ - eine Ausnahme stellt das neuroendokrin differenzierte Zervixkarzinom dar, was mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist^{55, 69}.

| FIGO stage | Prior to CCRT era [55,61,66,143] | Current CCRT era [55,66,178-180] |
|------------|----------------------------------|----------------------------------|
| IB | 85% | 95% |
| IIA-IIIB | 70% | 77% |
| IIIA-IIIB | 40% | 43% |
| IVA | 15% | 18% |

Tab. 4 5-Jahresüberleben beim Zervixkarzinom abhängig vom FIGO-Stadium⁶⁷ (CCRT = Simultane Radiochemotherapie).

Eine bedeutsame Prognoseänderung ergibt sich aus dem Lymphknotenstatus. Da mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium auch die Wahrscheinlichkeit für pelvine und paraaortale Lymphknotenmetastasen steigt, ist der Lymphknotenbefall als stärkster Confoundingfaktor in der Prognoseabstufung nach FIGO anzusehen. So liegt das Risiko für pelvine Lymphknotenmetastasen im Stadium I bei 10-15%, bzw. 0% für paraaortale Lymphknotenmetastasen, während im Stadium IVA das Risiko für pelvine bei 85-95% und paraaortale Lymphknotenmetastasen bei 45-50% liegt⁶⁷. So verändert sich je nach Lymphknotenbefall das 5-Jahresüberleben signifikant - Patientinnen im Stadium IB haben 88% 5-Jahresüberlebens-Wahrscheinlichkeit bei nodalnegativem Status und nur 40% bei nodalpositivem Status. Die Tabelle 5 fasst das krankheitsfreie 3-Jahresüberleben abhängig vom Lymphknotenbefall zusammen. Eine positive Korrelation zwischen Invasionstiefe und Lymphknotenbefall wurde ebenfalls in Studien nachgewiesen wie bei Feng et al., die eine tiefe Muscularisinfiltration und Parametrieninvolvierung als Risikofaktoren für die Lymphknotenmetastasierung hervorheben konnten⁷⁰. Laut S3-Leitlinie gilt allerdings die Invasionstiefe ebenfalls als eigenständiger Prognosefaktor.

| | Node negative | Node positive |
|---------------|---------------|---------------|
| Stage IB-IIA | 100 % | 67 % |
| Stage IIB-IVA | 56 % | 24 % |

Tab. 5 Die Tabelle zeigt das krankheitsfreie 3-Jahresüberleben abhängig vom Nodalstatus. ⁶⁷.

Als Prognosefaktoren haben dagegen die Lymphgefäß-, Veneninvasion sowie Perineuralscheideninfiltration eine unklare Bedeutung ⁵⁵.

1.2 Epigenetik und Methylierung von DNA als Regulationsmöglichkeit der Genexpression in der Zelle

Die DNA-Methylierung gehört zu den epigenetischen Prozessen, die eine Information vermitteln, die unabhängig von der Basenpaarsequenz der DNA ist. Die Regulationsmöglichkeit für die Expression von bestimmten Proteinen findet über Sequenzen in der DNA, die außerhalb der kodierenden Regionen liegen und reich an Cytosin-Guanin-Sequenzen sind, statt - die sogenannten Promotorregionen oder "Kontrollzentren" der kodierenden Gene - die CpG-Inseln⁷¹. Durch enzymatische Methylierung der Cytosin-Kohlenstoffringe an Position 5 in diesen CpG-Inseln wird ein Gen stillgelegt und dieser Mechanismus findet sowohl bei der Stilllegung des zusätzlichen X-Chromosoms im weiblichen Individuum als auch beim genetischen Imprinting (Hypermethylierung eines Allels - des maternalen oder paternalen - bei monoalleler Expression) statt. Darüber hinaus spielt er bei der Onkogenese vieler Tumorarten eine Rolle, wo beispielsweise Tumorsuppressorgene hypermethyliert sein können (*gene silencing*)^{71, 72}.

Die Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin findet nicht willkürlich im Genom sondern vor allem in CpG-Dinukletiden statt. Ca. 3-4% aller Cytosinmoleküle im Genom sind methyliert. Die CpG-Dinukleotide (sonst selten im menschlichen Genom) finden sich in hoher Abfolge vor allem in den bereits obengenannten CpG-Inseln - diese Regionen sind von der Grösse 0.5 - 5 kb, enthalten zu 60-70% Cytosin und Guanin und haben ein Verhältnis von CpG zu GpC von mindestens 0.6^{73, 74}. Sie kommen vor allem in den Promotorregionen vor, die die Expression der Gene regulieren (sowohl bei *Housekeeping*-Genen als auch in Genen mit gewebespezifischer Expression). CpG-Dinukleotide im übrigen Genom sind meistens hypermethyliert, während sie in Keimzellen oder Promotorregionen von Genen in normalen somatischen Zellen im Allgemeinen unmethyliert bleiben - mit Ausnahme beim genetischen Imprinting⁷². Das epigenetische Gleichgewicht in Tumorzellen ist meist so gestört, dass die Mehrheit des Genoms (das arm an CpG-Dinukleotiden ist im Vergleich zu den CpG-Inseln) anders als in den normalen somatischen Zellen hypomethyliert ist und die CpG-Inseln der Promotorregionen hypermethyliert sind (statt unmethyliert wie im Normalfall)⁷⁵. Die genomweite Hypomethylierung führt erstens zur Massenexpression von primär stillgelegten Genen, der potentiell schädlichen Expression von integrierten viralen Genen, der Expression beider Allele von ursprünglich „imprinted Genes“ (Gene, bei denen 1 Allel in der Embryonalentwicklung stillgelegt wurde und nur ein Allel abgelesen wird) oder Genen des inaktivierten X-Chromosoms. Zum Zweiten sorgt die Hypomethylierung für eine Instabilität des Genoms, da die normale Methylierung des pericentrometrischen Abschnitts der Chromosomen für die Stabilität und die ordnungsgemäße DNA-Replikation notwendig ist^{72, 76}. Das führt zu unbalancierten chromosomalen Translokationen und Strangbrüchen in der pericentrometrischen Region - z.B. beim ICF-Syndrom (Komplex aus

Immunodefizienz, Chromosomeninstabilität und facialem Dismorphien) führt die Mutation von DNMT 3b durch Hypomethylierung der pericentrometrischen Regionen der Chromosomen 1, 9 und 16 zu deren Instabilität⁷⁴. In bestimmten Tumoren wie Mamma- oder Ovarialkarzinomen findet man ebenfalls viele unbalancierte Translokationen mit Strangbrüchen ausgerechnet in der pericentrometrischen Region der Chromosomen 1 und 16, was eine Instabilität aufgrund möglicher Hypomethylierung zeigt.

Die zweite wichtige epigenetische Veränderung in Tumorzellen ist die Methylierung von CpG-Inseln in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen. Nach Knudsons Hypothese müssen beide Kopien eines solchen Gens defekt sein, damit sich das onkogene Potential auswirkt - das kann entweder durch die Hypermethylierung des Promotors dieses Gens sein oder durch Deletion/Mutation⁷⁷. Das Silencing des Gens wird durch die DNA-Methyltransferasen vermittelt (DNMT1 für bereits vormethylierte DNA und wichtig bei der Replikation, DNMT 3a und DNMT 3b für die De-Novo-Methylierung in der embryogenetischen Entwicklung)⁷³. Die methylierten Cytosinmoleküle bilden einen Komplex mit den MBPs (*Methyl cytosine binding proteins*). Die DNA-Methyltransferasen und die MBPs rekrutieren ihrerseits die Histon-Deacetylasen (HDAC), wie in Abbildung 4 dargestellt. Das sind Enzyme, die durch Entfernung von negativen Ladungen (Acetatresten) die positiven Ladungen der Histone freisetzen. Diese können nun die negativ geladene DNA binden und die Komprimierung einleiten⁷⁸. Zusätzlich können DNA-Methyltransferasen direkt mit Transkriptionsfaktoren interagieren und diese hemmen. Zusammengefasst vermitteln DNA-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen das Silencing von Tumorsuppressorgenen mittels CpG-Inselmethylierung ihrer Promotorregionen und Komprimieren von DNA-Bereichen. Beide Enzyme können ein Ziel von Therapiemöglichkeiten mit epigenetischem Ansatz sein. 5-Azacytidine kamen zum Beispiel bereits als DNMT-Hemmer in der Therapie des Myelodysplastischen Syndroms zum Einsatz⁷⁷. HDAC-Inhibitoren finden ebenfalls bereits Anwendung in der Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen⁷⁹.

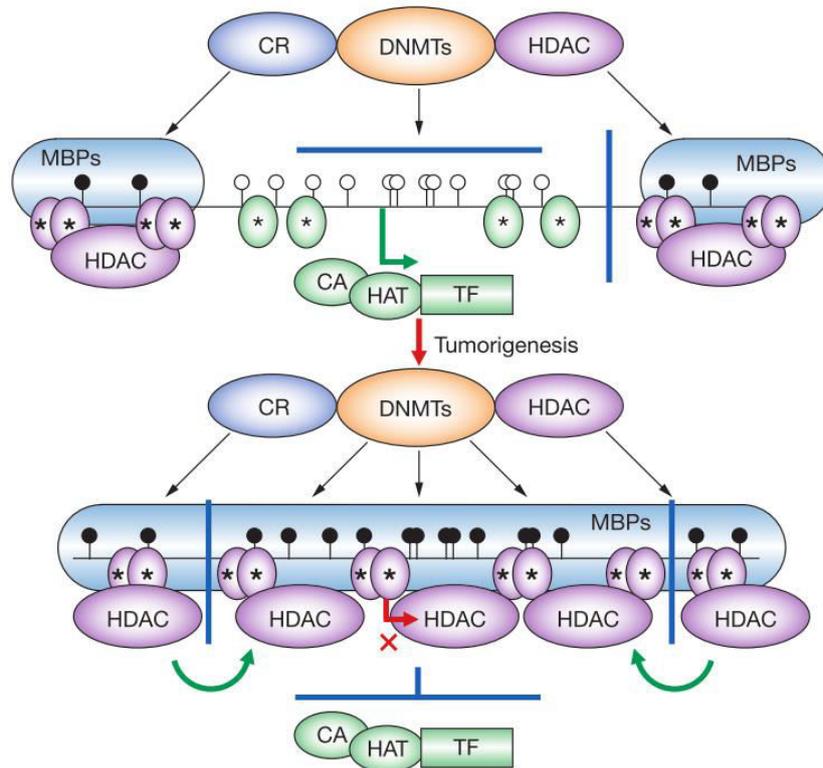


Abb. 4 Das obere Bild zeigt eine normale, nicht methylierte Promotorregion eines Gens (weiße Punkte = unmethylierte Cytosinmoleküle, schwarze Punkte = methylierte Cytosinmoleküle). Transkriptionsfaktoren (TF), Co-Aktivatoren (CA) und Histone-Acetylasen (HAT) sorgen für die aktive Transkription dieses Gens. Nach der DNMT-abhängigen Methylierung sorgen die rekrutierten MBPs und Histondeacetylasen (HDAC) für das *gene silencing*⁷³.

1.3 Epigenetische Veränderungen im Zervixkarzinom

Epigenetische Veränderungen des HPV-Genoms

Epigenetische Veränderungen gibt es auch beim Zervixkarzinom - entweder im Genoms des HP-Virus oder im Genom der Wirtszelle. In Zervixkarzinom-Zelllinien (SiHa), die HPV-16 enthalten, konnte eine Hypermethylierung der *late genes* des HPV gefunden werden, während die LCR (*long control region*) und die Onkogene E6 und E7 nicht methyliert waren ⁷⁴. Die LCR ist die Region, die sogenannte Enhancer oder Transkriptionsverstärker für die E6 und E7 enthält und über deren Methylierung eine Herunterregulation von deren Produktion erreicht werden kann ⁸⁰. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass mit der Progredienz des Läsionsgrads (von normalen, präinvasiven zu invasiven Läsionen) die Hypomethylierung von LCR- und E6-Genregionen zunimmt und diese Regionen somit aktiv sind (eine Hypermethylierung fand man in 52% der PAP-Abstriche von asymptomatischen Patientinnen, in 21.7% der präinvasiven, und 6.1% der invasiven Befunde) ⁸¹. In der Studie von Kalantari et al. wurde die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in der LCR- und L1-Region in 115 Patientenproben untersucht - mit dem Ergebnis von niedrigem Methylierungsstatus in niedriggradigen Läsionen (hohe Transkriptionsraten der episomalen Virusform) und hohem Methylierungsstatus im Karzinom nach Integration (wahrscheinlich durch Schutzmechanismus des Wirtsgenoms vor integrierten viralen Genen) ⁸². Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl eine Hypomethylierung als auch Hypermethylierung der LCR-Region in kanzerösen Läsionen vorliegen, und sind somit inkonsistent. In der Studie von Turan et al. wurde 2 Jahre später gezeigt, dass die L1-Region von HPV-18 in invasiven Läsionen der Zervix hypermethyliert ist. Bei infektiösen oder präkanzerösen Läsionen fand man die L1-Region kaum methyliert vor, sodass die Hypermethylierung dieser L1-Region mit invasiven Läsionen korreliert werden und als möglicher Marker dafür postuliert wurde ⁸³. In der Studie konnte zusätzlich mittels 5-Aza-2'-Deoxycytidine eine Demethylierung der L1-Region erreicht werden, eine klinische Bedeutung dieser Erkenntnisse scheint allerdings noch nicht relevant.

Epigenetische Veränderungen im Zervixkarzinom (Wirtsgenom)

Tumorsuppressorgene sind meist solche Gene, die die Zellteilung eingrenzen oder aber auch in Signaltransduktionswege der Apoptose eingeschaltet sind. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass im Zervixkarzinom die Gene für die Membranrezeptoren DcR1 und DcR2 zu 100% abnorme Methylierung aufweisen. Diese sind ein Teil der *tumor necrosis factor receptor*-Superfamilie und vermitteln über Fas-Ligand die Aktivierung von Caspasen - eine Kaskade, die in die Apoptose mündet. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass im Zervixkarzinom entweder DcR1 oder/und DcR2 in allen untersuchten Fällen

methyliert waren und somit ein Proliferationsvorteil aufgrund der blockierten Apoptose entstand^{74, 84}.

Ein weiteres Gen, welches epigenetische Veränderungen im Zervixtumor erfährt ist das *hTERT*-Gen. Es ist zuständig für die Expression von *hTERT* - das ist die katalytische Einheit der Telomerase, die darüber hinaus noch eine RNA-Untereinheit und telomeraseassoziiertes Protein besitzt und für die Erhaltung der Telomere zuständig ist⁸⁵. Somatische Zellen verfügen über sehr geringe bis fehlende Aktivität dieses Enzyms, sodass die Telomere bei jeder Replikation sich verkürzen und die Zelle somit "altert" bis zu einem Zeitpunkt, wo keine Teilung mehr möglich ist. Immortalisierte Krebszellen verfügen hingegen über hohe Telomeraseaktivität. So zum Beispiel exprimieren normale Zervixzellen in 0-33% *hTERT*-mRNA, Karzinomzellen hingegen in 80-100% der Fälle⁷⁴. In der Studie von Guilleret et al. wurde bereits gezeigt, dass entgegen der Erwartung die Hypermethylierung des Promotors *hTERT*-Gens zu dessen Aktivierung und die Demethylierung zu dessen Inaktivierung führt⁸⁵. So wurde beispielsweise in der Studie von Widschwendter et al. herausgefunden, dass im Zervixkarzinom der Promotor des Gens methyliert und somit die *hTERT*-Expression signifikant höher als im normalen Zervixgewebe war⁸⁶. Zervixkarzinom-Patientinnen mit unmethyliertem *hTERT*-Promotor (was eine reduzierte Aktivität bedeutet) hatten in derselben Studie ein signifikant besseres Outcome - der Tumor war durch begrenzte Zellteilung wahrscheinlich weniger aggressiv.

Im Zervixkarzinom sind auch andere Tumorsuppressorgene hypermethyliert und die Expression derer Genprodukte reduziert. p73 ist zum Beispiel das Produkt eines Tumorsuppressorgens und es kann ähnlich dem p53 den Zyklusarrest induzieren. Dessen Hypermethylierung wird mit erhöhter Radiotherapie-Resistenz der Zervixkarzinome assoziiert, wohingegen dessen Überexpression mit radiosensitiven Tumoren und besserer Prognose korreliert ist^{80, 87} - klinisch relevant wäre in diesem Fall, wenn eine Demethylierungstherapie zur erhofften Tumorsensibilisierung führen könnte.

Weitere Proteine, die für die Adhäsion der Zellen wichtig sind, wie CADM1 und E-Cadherin, werden im Zervixkarzinom durch Hypermethylierung derer Promotorregionen signifikant weniger exprimiert - das führt zur Ausbreitung und Invasion⁸⁸.

Ein anderes Tumorsuppressorgen - das RASSF1A, das die *ras*-vermittelte Onkogenese antagonisiert - zeigt Hypermethylierungsmuster abhängig vom histologischen Typ. Es ist vor allem im Adenokarzinom hypermethyliert und selten im Plattenepithelkarzinom der Zervix, sodass es eine Rolle für die Entstehung dieser Tumorentität spielen könnte⁸⁹.

| Gene | Rate | Function |
|-------------|-----------|--------------------------|
| DcR1/DcR2 | 100% | Apoptosis |
| hTERT | 57% | Apoptosis |
| p73 | 39% | Apoptosis |
| p16 | 8–42% | Cell-cycle |
| PTEN | 58% | WNT-pathway |
| E-cadherin | 28–80.5% | WNT-pathway |
| APC | 11–94% | WNT-pathway |
| MGMT | 5–81% | DNA repair |
| FANCF | 30% | FA-BRAC pathway |
| BRAC1 | 6.1% | FA-BRAC pathway |
| hMLH1 | 5% | Mismatch repair |
| RASSF1A | 0–45% | Negative ras-effector |
| DAPK | 45–100% | Metastasis/cell death |
| TSLC1 | 58–65% | Tumor suppressor |
| FHIT | 11–88% | DNA repair?/cell death? |
| HIC1 | 18–45% | Transcription factor |
| RAR β | 33–66% | Cell differentiation |
| TIMP2/TIMP3 | 47%/1–10% | Tissue inhibitor MTs |
| Caveolin-1 | 6% | Caveolae membrane |
| ER α | 25% | Steroid hormone receptor |

Tab. 6 Liste der hypermethylierten Tumorsuppressogene im invasiven Zervixkarzinom. ⁷⁴

Die Kenntnis und die Bedeutung der Epigenetik des Zervixkarzinoms kann als Ergänzung für dessen Früherkennung genutzt werden. Während beispielsweise die Hypermethylierung einzelner Gene geringeren Stellenwert als einziger Marker besitzt, so kann man beispielsweise das Methylierungsmuster einer kompletten Reihe von Genen untersuchen, von denen man weiß, dass sie eine Rolle in der Tumorentstehung spielen. So wurde in der Studie von Feng et al. "Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia" die Promotor-Hypermethylierung von 20 Genen untersucht - diese wurden aufgrund ihrer Rolle beim Zervixkarzinom ausgewählt ⁹⁰. Für 4 Gene (*CDH13*, *DAPK1*, *RARB* und *TWIST1*) wurde insgesamt eine Zunahme der Methylierungshäufigkeit mit der Zunahme des Dysplasiegrads gefunden. Und für die Kombination von 3 von diesen Genen - *DAPK1*, *RARB* und *TWIST1* (sogenanntes "Panel") - wurden die besten Ergebnisse für eine Korrelation mit hohen Dysplasiegraden gefunden. Mindestens 1 von ihnen war in 57% der CIN 3-Proben und 74% der Karzinomproben hypermethyliert. Nur in 5% der CIN 1 war eine Methylierung nachzuweisen, was eine bessere Auslese höhergradiger Läsionen erlauben sollte. So hatte dieser 3-Genpanel-Test eine sehr hohe Spezifität für CIN 3 / Karzinom (95%), die Sensitivität für das Karzinom ist allerdings 74% und für CIN3 52% gewesen. Da herkömmliche Verfahren wie der PAP-Abstrich und der HR-HPV-Nachweis genau in puncto Spezifität schlecht abschneiden, kann man eventuell die Proben einer methylierungsspezifischen PCR für Genpanels unterziehen, um eine höhere Spezifität zu erreichen.

In einer weiteren Studie von Wisman et al. wurde beispielsweise ein weiteres 4-Gen-Panel (hypermethylierte *CALCA*, *DAPK*, *ESR1*, *APC*) als gleichsensitiv für

das Zervixkarzinom wie der PAP-Abstrich und HR-HPV-Nachweis (Sensitivität von ca. 89%) allerdings als weitaus spezifischer postuliert - Spezifität von 100% vs. 83% der zytomorphologischen und 68% der HR-HPV-Untersuchung⁹¹. Basierend auf solchen Ergebnissen könnten in Zukunft Tests vorliegen, die mittels methylierungsspezifischer PCR von einer bestimmten Genkombination die Aussagekraft einer rein zytologischen Untersuchung der PAP-Abstriche verbessern.

Durch epigenetische Tests kann man ebenfalls eine zuverlässigere Triage von Patientinnen mit ASCUS-Zytologie erreichen. Der HPV-Test ist bis jetzt das beste Triagemittel, wobei 40-60% der Patientinnen mit ASCUS HPV-positiv sind und nur bei < 1% ein Karzinom diagnostiziert wird⁸⁰. Lin et al. haben einen Test entwickelt, bei dem die Sensitivität der für 3 hypermethylierte Marker für die Diagnose für CIN3+ unter Patientinnen mit ASCUS gleich hoch wie bei der HR-HPV-Bestimmung war - jedoch bei nur einem Drittel falsch-positiven Ergebnissen im Vergleich dazu sowie weniger Zuweisungen zur Kolposkopie⁹². Diese Testung war somit besser im klinischen Setting. Cjao et al. konnten 2013 ebenfalls zeigen, dass der Nachweis der Methylierung des PAX1-Gens eine höhere Spezifität und Sensitivität für HSIL bei Patientinnen mit unklaren zytologischen Ergebnissen (ASCUS) als der HPV-Nachweis hat und für die Triage genutzt werden könnte (Sensitivität 87.5% vs. 62.5% und Spezifität 98.0% vs. 86.0%)⁹³. Bei Patientinnen mit positivem HR-HPV-Test ist eine Triage mittels neuen Genpanels ebenfalls besser als die Zytologie bei der Entdeckung von CIN3 und höhergradigen Läsionen⁹⁴.

In der Studie von Müller et al. fand man einen Hinweis dafür, dass die Anwendung solcher Gen-Panels nicht nur präventiver Intention dient, sondern auch prognostische Bedeutung haben kann. Er konnte anhand des Methylierungsmusters von 25 Genen in normalem und Tumorgewebe zeigen, dass Karzinom-Patientinnen mit Methylierung ähnlich einer gesunden Kontrollgruppe ein signifikant besseres Überleben hatten als solche, die deutliche Abweichungen von dem Methylierungsmuster des normalen Zervixgewebes zeigten ($p < 0,03$)⁹⁵. Trotz des Fehlens eines zeitlichen Stufenkonzeptes der Methylierungsvorgänge im Zervixkarzinom, konnte laut Virmani et al. nachgewiesen werden, dass die Methylierung in frühen Dysplasiestufen beginnt, mit fortschreitender pathologischer Veränderung zunimmt und bestimmte Gene früh (*RARB*, *GSTP1*) oder erst spät (*p16*, *MGMT*, *FHIT*) in der Onkogenese mittels Methylierung ausgeschaltet werden⁹⁶.

Vorausgesetzt, dass die Methylierung von Genen im Zervixkarzinom stufenweise zunimmt und mit einer schlechten Prognose einhergeht, sollte dann auch die Überlegung einer potentiellen Therapie mit demethylierenden Agenzien angestellt werden. In humanen Zervixkarzinom-Zelllinien (HeLa und CaSki - in beiden liegt das Tumorsuppressorgen APC methyliert oder teilmethyliert vor) konnte mittels Hydralazin eine Demethylierung des APC-Gens und dessen Re-Expression in vitro um das 10- bis 11-fache erreicht werden. Dies bewirkte den Zellzyklusarrest und führte zu einer signifikant höheren Apoptoserate als in nicht behandelten Zelllinien⁹⁷. Hydralazin ist außerdem

eine gut verträgliche Substanz, so dass seine Potenz zur Demethylierung von Tumorsuppressorgen in vivo an Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Zervix in einer klinischen Studie von Zambrano et al. nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden die Gene *p16*, *RARb*, *MGMT*, *ER*, *FHIT*, *APC*, *DAPK* vor und nach epigenetischer Therapie getestet und es wurden je nach Gen Demethylierungsraten von 15% bis 67% nachgewiesen. Da Hydralazin allerdings lediglich für 10 Tage verabreicht wurde und die Patientinnen sich im Anschluss einer definitiven Therapie unterzogen, konnte ein therapeutisches Benefit nicht evaluiert werden ⁹⁸. Coronel et al. konnten jedoch einen signifikanten Vorteil im progressionsfreien Überleben beim fortgeschrittenen Zervixkarzinom nachweisen, wenn zur Standardtherapie mit Cisplatin und Topotecan zusätzlich Hydralazin und Valproat kontinuierlich bis zur Progression verabreicht wurde ⁹⁹. Beide Substanzen sind synergistisch wirksam in der Re-Expression von stillgelegten Genen und brachten den Patienten 4 progressionsfreie Monate mehr (10 statt 6 Monate, $p = 0,0384$) ⁹⁹. Es bleibt in dieser Hinsicht abzuwarten, wann sich die epigenetische Therapie einen Weg in den klinischen Alltag bahnen wird.

1.4 Der Östrogenrezeptor und das Tumorsuppressorgen ESR1 - Funktion und Rolle in der Tumorentstehung des Zervixkarzinoms

Das Östrogen gehört zu der Gruppe der lipidlöslichen Steroidhormone, die die zelluläre Membran ungehindert passieren können, um an ihren intrazellulären lokalisierten Rezeptor (ER) zu binden. Dieser Komplex dimerisiert und bindet entweder direkt oder über Proteinkomplexe an *estrogen response elements* (EREs) in den Promotorregionen von östrogenabhängigen Genen, wie in der Abb. 5 gezeigt. Neben diesem genomischen Wirkmechanismus, kann Östrogen ebenfalls Östrogenrezeptor-unabhängig an plasmamembran-assoziierte Proteine binden und zu zellulären Veränderungen wie Erhöhung des Ca^{2+} - oder NO-Spiegels führen¹⁰⁰. Ebenfalls können auch Kinasen (B-RAF, IP3K, Src, ERK, AKT, PKA, PKC) aktiviert werden, die Transkriptionsfaktoren von Genen phosphorylieren und beeinflussen können¹⁰¹.

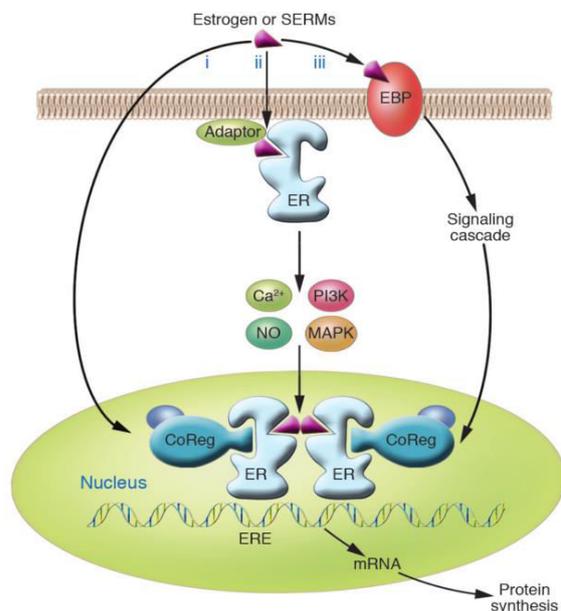


Abb. 5 Darstellung der genomischen (über ER-Rezeptor und *estrogen response elements*) und nicht genomischen (Kinasen, die ebenfalls die Transkription beeinflussen) Wirkung des Östrogens¹⁰¹.

Insgesamt sind 2 Subtypen von Östrogenrezeptoren bekannt - $\text{ER}\alpha$ und $\text{ER}\beta$. Der $\text{ER}\alpha$ wurde in den 1980ern Jahren von MCF-7-Zellen isoliert (humanen Mammakarzinomzellen) und wies mehrere Isoformen durch unterschiedliche Splicingprodukte auf. Zehn Jahre später wurde $\text{ER}\beta$ zuerst aus Prostatazellen der Ratte und später von Maus und Mensch isoliert. Die Gene für diese Rezeptoren liegen auf unterschiedlichen Chromosomen - ESR1 für $\text{ER}\alpha$ auf Chromosom 6q25.1 und ESR2 für $\text{ER}\beta$ auf Chromosom 14q23.2^{102, 103}. Die beiden Proteine zeigen nur zu 30% eine Ähnlichkeit, wobei die DNA-Bindungsdomäne den am besten konservierten Anteil mit 96% Übereinstimmung repräsentiert. Die Östrogenrezeptoren werden in verschiedenen Geweben exprimiert - Brustgewebe, Gehirn, kardiovaskulärem System, Urogenitaltrakt, Knochen, wobei in jedem ein Subtyp dominiert - beispielsweise $\text{ER}\alpha$ in der Leber und $\text{ER}\beta$ im Colon. Ebenfalls können sie im selben Gewebe in

unterschiedlichen Zelltypen verteilt sein - im Ovar ER α in den Thekazellen, ER β in den Granulosazellen¹⁰³.

Am besten untersucht sind die Rezeptoren und ihre Rolle im Mammakarzinom. In der klinischen Routine wird die Expression des ER und PR hinzugezogen. 2/3 der diagnostizierten Karzinome sind ER positiv, 1/3 exprimieren den ER dagegen nicht, was mit nicht differenzierten Tumoren mit hohem Proliferationsindex, schlechtem Ansprechen einer endokrinen Therapie¹⁰³ und insgesamt schlechter Prognose assoziiert ist^{103, 104}. Das dazugehörige Gen ESR1, auf dem Chromosom 6q25.1 liegend, besitzt im Exon 1 CpG-Sequenzen, die in Zelllinien wie MCF-7, T47-d und ZR75-1 (ER exprimierend, ER+) nicht methyliert und in Zelllinien wie MDA-MB-231, MDA-MB-435 (ER nicht exprimierend, ER-) in über 50% methyliert sind¹⁰⁵. Studien haben gezeigt, dass die ER-Negativität bei Mammakarzinom-Patientinnen wesentlich auf die Hypermethylierung vom ESR1-Promotor zurückzuführen ist, so dass experimentelle Versuche angestellt wurden, diese rückgängig zu machen und auf diese Weise ein Tumoransprechen für endokrine Therapie durch Re-Expression von ER zu erlangen. So konnte bei ER-negativen humanen Mammakarzinomzellen durch einen Methyltransferase-Inhibitor (5-aza-2-deoxycytidine) bereits eine partielle Demethylierung, Re-Expression von ER-mRNA und Synthese von funktionierendem ER-Protein erreicht werden¹⁰⁶. Das wäre ein wichtiger Therapieansatz, vor allem weil man weiß, dass auch ein Teil der ER-positiven Karzinome sekundär die Fähigkeit verlieren, ER zu exprimieren und somit sich einer antiendokrinen Therapie entziehen.

Das Östrogen spielt ebenfalls im Zervixkarzinom eine Rolle, wo es seine Wirkung vor allem über ER α entfaltet¹⁰⁷. Laut gepoolten Daten von 8 Fallkontrollstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Langzeiteinnahme von oralen Kontrazeptiva das Risiko für Zervixkarzinome bis zum vierfachen in HPV-positiven Frauen erhöhen kann - Einnahme oraler Antikonzeptiva für weniger als 5 Jahre ergab kein Risiko (OR 0.73), 5-9 Jahre mindestens 2-faches Risiko (OR 2.82) und ab 10 Jahre das 4-fache Risiko (OR 4.03)¹⁰⁸. Das und die Tatsache, dass die Parität 2- bis 4-fach das Risiko für Plattenepithelkarzinome gegenüber Nullipara in HPV-positivem Kollektiv erhöht¹⁰⁹, führt zu der Annahme, dass weibliche Sexualhormone ein wichtiger Cofaktor für die Entstehung des Zervixkarzinoms sind.

Meilenstein in der Untersuchung der hormonabhängigen Onkogenese des Zervixkarzinoms ist die Entwicklung von Mausmodellen, die die Onkogene E6 oder E7 von HPV-16 unter der Kontrolle des *human keratin 14* (K14) Promotor in ihren Epithelien, einschließlich des Zervixepithels, produzieren¹¹⁰. Transgene K14E6- und K14E7-Mäuse entwickelten spontan Tumore des Hautepitheliums, allerdings keine Malignome des reproduktiven Trakts. Solchen transgenen Mäusen wurde in Versuchen 6 Monate lang exogenes Östrogen (17 β -Estradiol) verabreicht mit dem Ergebnis, dass das exogene Östrogen zur Entwicklung vom Zervixkarzinom beitrug - weder HPV (die Onkogene E6 oder E7) allein

noch Östrogen allein waren suffizient für die Tumorentstehung. Man sah allerdings auch einen Unterschied im onkogenen Potential von E6 und E7 ¹¹¹, ¹¹². Unter physiologischen Spiegeln exogen zugeführten Östrogens entwickelten K14E7-Mäuse ein Zervixkarzinom, nicht transgene Mäuse oder K14E6 allerdings nicht (E6 trug trotzdem bei östrogenbehandelten K14E6/E7+/+ "doppelt" transgenen Mäusen zur weiteren Größenzunahme der Tumoren gegenüber K14E7-Stämmen bei). In der Studie von Brake et al. hat man auch gezeigt, dass nach längerer Exposition transgener K14E7-Mäuse mit Östrogen (nach 9 Monaten statt nach 6 Monaten) die Tumormasse um das 6-fache gegenüber dieser nach 6-monatiger Exposition gestiegen ist ¹¹². Bei doppelt-transgenen K14E6/E7+/+ Mäusen ist die Tumormasse nach 9-monatiger Exposition sogar um das 18-fache gegenüber der 6-monatigen Exposition gestiegen - das unterstreicht die synergistische Wirkung von E6. In der Studie hat man zusätzlich nachgewiesen, dass nach 6 Monaten Östrogenbehandlung und nachfolgendem Östrogenentzug teilweise oder komplette Remission erreicht wird, was erneut die Rolle von Östrogen nicht nur für die Tumorentstehung, sondern auch für die Persistenz, Erhaltung und Progredienz des Zervixkarzinoms hervorhebt. In der Studie von Chung et al. "*Requirement for Estrogen Receptor α in a Mouse Model for Human Papillomavirus-Associated Cervical Cancer*" konnte in einem weiteren Schritt nachgewiesen werden, dass für diese Wirkung des Östrogens der ER α zuständig und sogar absolut erforderlich ist ¹¹³. Für den Versuch wurden Knock out Mäuse für das ER α -Gen verwendet - K14E7/ER $\alpha^{-/-}$. Der Großteil der Wildtyp-Mäuse (K14E7/ER $\alpha^{+/+}$), die den Östrogenrezeptor produzierten, entwickelten unter Östrogengabe ein Zervixkarzinom und eine CIN3. Die K14E7/ER $\alpha^{-/-}$ entwickelten hingegen weder Karzinome noch Dysplasien. So konnte gezeigt werden, dass das Östrogen über seinen Rezeptor ER α eine wesentliche Rolle in der Karzinogenese des Zervixkarzinoms im Mausmodell spielt. Über den genauen Mechanismus ist weniger bekannt, man weiß allerdings, dass über den ER α generell verschiedene Protoonkogene wie *c-myc*, *Cyclin D1*, *epidermal growth factor receptor (EGFR)*, *insulin-like growth factor I (IGF-I)* aktiviert werden und proapoptotische Gene supprimiert werden können ¹¹⁴. Das kann auch eine Erklärung für die beobachtete Überexpression von Cyclin D1 in Zervixkarzinomen und der c-myc-Überexpression in E6- und E7 produzierenden Zervixzellen sein ¹¹³.

Ausgehend von der Rolle des Östrogens und des ER α in der Onkogenese des Zervixkarzinoms hat man die Vermutung angestellt, dass eine antihormonelle Therapie ein Benefit in der Behandlung haben könnte. Das konnte in Studien für Tamoxifen nicht sicher nachgewiesen werden, was allerdings damit zusammenhängt, dass Tamoxifen zwar als Antagonist im Brustgewebe aber als Agonist im Endometrium- und Zervixgewebe fungiert [41], ¹¹⁵. Man konnte darüber hinaus zeigen, dass Tamoxifen trotz seiner östrogen-synergistischen Wirkung keine Dysplasien im Zervixgewebe hervorrufen kann ¹¹⁶.

Nach dem Nachweis der Rolle des ER α im transgenen Mausmodell, hat man deswegen versucht diesen Rezeptor experimentell zu blocken, um den Benefit einer möglichen antihormonellen Therapie zu untersuchen. Man hat dazu K14E6/K14E7 transgene Mäuse mit exogenem Östrogen behandelt, die zu 100% Karzinome entwickelten. Nach 1 Monat Östrogenentzug hat man in einer Subgruppe wie erwartet in nur 79% der Fälle Karzinome nachweisen können. In einer weiteren Subgruppe, wo man zusätzlich Fulvestrant (voller ER-Antagonist) oder Raloxifen (*selective estrogen receptor modulator* oder SERM - agonistisch an Knochen, antagonistisch im Endometrium) gab, hatten nur noch 8% respektive 0% der Mäuse Karzinome¹¹⁷. Das heißt, dass endogenes Östrogen ebenfalls zur Aufrechterhaltung dieser Tumorentität beiträgt und die Blockade der ER α -Rezeptoren zur Eliminierung von Karzinomen und deren Vorstufen im Mausmodell des HPV-assoziierten Zervixkarzinoms beiträgt.

Über klinische Daten in Bezug hormonelle Therapieansätze verfügen wir bis jetzt vom NSABP (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*), im Rahmen dessen beide *selective estrogen receptor modulators* (SERMs) Tamoxifen und Raloxifen nach ihrer Potenz zur Mammakarzinom-Prävention getestet wurden. Während beide antiöstrogen im Brustgewebe wirken, weiß man, dass Tamoxifen Agonist und Raloxifen Antagonist am Östrogenrezeptor im weiblichen reproduktiven Trakt ist. Entgegen Vermutungen wurde das Risiko für *Carcinoma in situ* und Zervixkarzinom weder durch Tamoxifen erhöht noch durch Raloxifen reduziert¹¹⁸. Diese Ergebnisse deuten daraufhin hin, dass die vielversprechenden Mausmodelle nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragbar sind.

Unabhängig von der Rolle des Östrogens und des ER α in Mausmodellen oder Humanstudien beschäftigten sich bis jetzt wenige Forscher mit der Untersuchung der Methylierung vom Östrogenrezeptor im Zervixkarzinom. Das Interesse für dessen Methylierung ist durch seine Bedeutung im Mammakarzinom entstanden, wo in ER-negativen Patientinnen keine chromosomalen Veränderungen wie Deletionen oder Mutationen sondern eben epigenetische Mechanismen für die veränderte Expression eine Rolle spielten¹¹⁹. Die Methylierung des ESR1-Promotors im Zervixkarzinom variiert je nach Studie - zwischen 32% laut Wisman et al.⁹¹ und 74% laut Müller et al.⁹⁵ (beide haben quantitative oder RT-PCR - *Real-time Polymerase Chain Reaction* dazu benutzt). Dagegen wurde in der Studie von Wisman et al. gezeigt, dass normale Zervixzellen zu einem viel geringeren Anteil eine Methylierung aufweisen (in 5,2% der Fälle). Bis jetzt wurden vor allem Forschungen angestellt, die diese Modifikation des Tumorsuppressorgens in Zusammenhang mit der anderer Gene als Früherkennungsmarker untersuchen. Dies geschieht durch die Anwendung von Gen-Panels wie bereits erwähnt. Eine prognostische Bedeutung und Korrelation der ESR1-Promotor-Methylierung mit klinischen Merkmalen wurde bis jetzt nicht untersucht.

1.5 Zielsetzung

Wie bereits in Studien untersucht wurde, liegt eine Methylierung des ESR1-Promotors in einem Teil der Zervixkarzinome vor, wohingegen gesundes Gewebe fast keine Methylierung aufweist^{91, 95}. Diese epigenetische Veränderung ist jedoch nicht obligat (sie liegt also nicht in allen Karzinomen vor) und manche Zervixkarzinome behalten das Methylierungsmuster des normalen Zervixepithels. Das heißt die Spezifität für maligne Läsionen ist nicht sehr hoch, da der aktive unmethylierte ESR1-Promotor sowohl in Karzinomen als auch in gesunden Proben vorliegt. Obwohl sich aus dem Grund dieser einzelne Marker nicht zur Primärselektion von invasiven Läsionen in der Allgemeinpopulation eignet, ist die ESR1-Methylierung doch ein karzinomspezifisches Phänomen, was in obengenannten Prozentzahlen auftritt.

In dieser Hinsicht wollen wir in unserer Studie an einem Kollektiv aus Zervixkarzinom-Patientinnen herausfinden, ob das Vorliegen oder die Abwesenheit dieser epigenetischen Modifikation mit dem histopathologischen Befund, FIGO-Stadium, Grading oder dem Überleben beim Zervixkarzinom in einem relevanten Zusammenhang steht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 DNA-Isolation aus Tumorgewebe

Für die DNA-Isolation wird das „*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*“ von der Firma QIAGEN® benutzt. Dieses ist speziell für die Aufreinigung von genomischer DNA aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben geeignet¹²⁰. Das Kit enthält folgende Reagenzien und Zubehör:

| | |
|---------------------------------------------------|---------|
| ➤ <i>QIAamp MinElute Columns</i> | 50 |
| ➤ <i>Collection Tubes (2 ml)</i> - Sammelröhrchen | 3 x 50 |
| ➤ Puffer ATL (Gewebeilysepuffer) | 10 ml |
| ➤ Puffer AL | 12 ml |
| ➤ Puffer AWL 1 (Waschpuffer, Konzentrat) | 19 ml |
| ➤ Puffer AWL 2 (Waschpuffer, Konzentrat) | 13 ml |
| ➤ Puffer ATE | 12 ml |
| ➤ Proteinase K | 1,25 ml |

Darüber hinaus werden folgende, nicht im Kit enthaltene Chemikalien und Zubehör gebraucht:

- Xylol
- Ethanol (96-100%)
- 1,5 ml Mikrozentrifuge-Röhrchen für die Lyseschritte
- Pipettenspitzen
- Thermalblock, fähig zur 90°C Inkubation
- Mikrozentrifuge
- Vortex®

Die Puffermischungen müssen laut Arbeitsanweisung für den Gebrauch folgendermaßen vorbereitet werden:

- **Puffer ATL** – wenn Präzipitate vorhanden sind, sollten diese bei 70°C durch sanftes Schütteln aufgelöst werden.
- **Puffer AL** – wenn Präzipitate vorhanden sind, sollten diese bei 70°C durch sanftes Schütteln aufgelöst werden.
- **Puffer AW1** – Hinzufügen von 25 ml Ethanol (96-100%). In dieser Form ist das Puffer bis zu 1 Jahr bei Raumtemperatur (15-25°C) lagerbar. Vor jeder Prozedur ist Mischen durch Schütteln erforderlich.
- **Puffer AW2** – Hinzufügen von 30 ml Ethanol (96-100%). In dieser Form ist das Puffer bis zu 1 Jahr bei Raumtemperatur (15-25°C) lagerbar. Vor jeder Prozedur ist Mischen durch Schütteln erforderlich.

2.1.2 Bisulfitkonversion der gewonnenen DNA

Für die Bisulfitbehandlung der aufgereinigten DNA wird das „*EpiTect Bisulfite Kit*“ von der Firma QIAGEN® benutzt, das speziell für die Bisulfitkonversion und die DNA-Aufreinigung für Methylierungsanalysen zusammengestellt ist ¹²¹. Dieses Kit enthält folgende Reagenzien und Zubehör:

| | |
|------------------------------------------------------|------------|
| ➤ Bisulfit-Mix (Teilproben für jeweils 8 Reaktionen) | 6 x |
| ➤ DNA Schutzpuffer (<i>DNA Protect Buffer</i>) | 1,9 ml |
| ➤ RNase-freies Wasser | 3 x 1,9 ml |
| ➤ „ <i>EpiTect Spin Columns</i> “ | 48 x |
| ➤ <i>Collection Tubes</i> (2 ml) – Sammelröhrchen | 96 x |
| ➤ Puffer BL | 31 ml |
| ➤ Puffer BW (Konzentrat) | 2 x 13 ml |
| ➤ Puffer BD (Konzentrat) | 3 ml |
| ➤ Puffer EB | 15 ml |
| ➤ <i>Carrier RNA</i> | 310 µg |

Darüber hinaus werden folgende, nicht im Kit enthaltene Chemikalien und Zubehör gebraucht:

- Ethanol (96-100%)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- PCR-Röhrchen
- Thermalcycler
- 1,5 ml Mikrozentrifuge-Röhrchen für die Lyseschritte
- Mikrozentrifuge

Folgende Vorbereitungen sind vor Gebrauch zu treffen:

- **Puffer BW** – Hinzufügen von 30 ml Ethanol (96-100%) und Lagerung bei Raumtemperatur (15-25°C). Vor der Prozedur wird der Behälter zum Mischen geschwenkt.
- **Puffer BD** – Hinzufügen von 27 ml Ethanol (96-100%) und Lagerung bei 2-8°C. Vor der Prozedur wird der Behälter zum Mischen geschwenkt und es wird für den sofortigen Verschluss der Flasche nach Gebrauch gesorgt. Eventuelle Präzipitate beeinflussen das Ergebnis nicht, sollten jedoch nicht auf die „*EpiTect Spin Columns*“ transferiert werden.
- **Carrier RNA (310 µg)** – Vor Gebrauch werden 310 µg RNAase-freies Wasser hinzugefügt um eine Konzentration von 1 µg/µl zu erreichen. So ist die Lösung bei -20°C für bis zu 1 Jahr lagerbar. Die Carrier RNA und das Puffer BL werden zu einer Lösung gemischt, deren Volumen von der Anzahl der zu behandelnden Proben abhängig ist. Aus der folgenden Tabelle werden die benötigten Volumina für die Mischung bei verschiedener Anzahl der Proben entnommen:

| Anzahl der Proben | 1 | 4 | 8 | 16 | 24 | 48 |
|----------------------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Puffer BL | 620 µl | 2,5 ml | 5 ml | 10 ml | 15 ml | 31 ml |
| Carrier-RNA-Lösung ¹⁾ | 6,2 µl | 25 µl | 50 µl | 100 µl | 150 µl | 310 µl |

¹⁾ Nach Hinzufügen der Carrier-RNA zum Puffer BL wird die Konzentration von **10 µl/ml Carrier RNA** erreicht.

2.1.3 Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion

Primersequenzen und -kits

Für die PCR des ESR1-Promotors werden Primer mit folgenden Sequenzen benutzt:

- Forward: 5'-GGCGTTCGTTTTGGGATTG-3'
- Reverse: 5'-GCCGACACGCGAACTCTAA-3'
- Sonde: FAM-5'-CGATAAAACCGAACGCCCGACGA-3'-TAMRA

Für die PCR des *Housekeeping*-Gens CK19 wird das TaqMan[®] Gene Expression Assay Hs00761767 von Life Technologies[®] benutzt, welches die hergestellten Primer und Sonde bereits enthält.

Agenzienzusammensetzung für die PCR-Reaktionen

Für die RT-PCR der Abschnitte des ESR1-Promotor Gens werden folgende Agenzien im angegebenen Verhältnis mit Gesamtvolumen von 25 µl für je 1 Probe angewendet:

- TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase[®] UNG, Applied Biosystems[®] 12,5 µl
- Forward-Primer, Applied Biosystems[®] 2,5 µl
 - mit Konzentration 9 µM
- Reverse-Primer, Applied Biosystems[®] 2,5 µl
 - mit Konzentration 3 µM
- Sonde, Applied Biosystems[®] 2,5 µl
- Aqua 3,0 µl
- Proben-DNA (mit Bisulfit behandelt) 2,0 µl

Für die RT-PCR der Kontrollprobe mit Cytokeratin 19 (KRT19, Chromosom 17q12-q21) werden folgende Agenzien im angegebenen Verhältnis mit Gesamtvolumen von 25 µl für je 1 Probe angewendet:

- TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase[®] UNG, Applied Biosystems[®] 12,5 µl
- Cytokeratin 19 TaqMan[®] Gene Expression Assay, Hs00761767, Life Technologies[®] 1 µl
- Aqua 9,5 µl
- Proben-DNA (nativ, nicht mit Bisulfit behandelt) 2 µl

Die PCR wird mit Geräten vom Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System durchgeführt (Abb. 6 und Abb. 7):

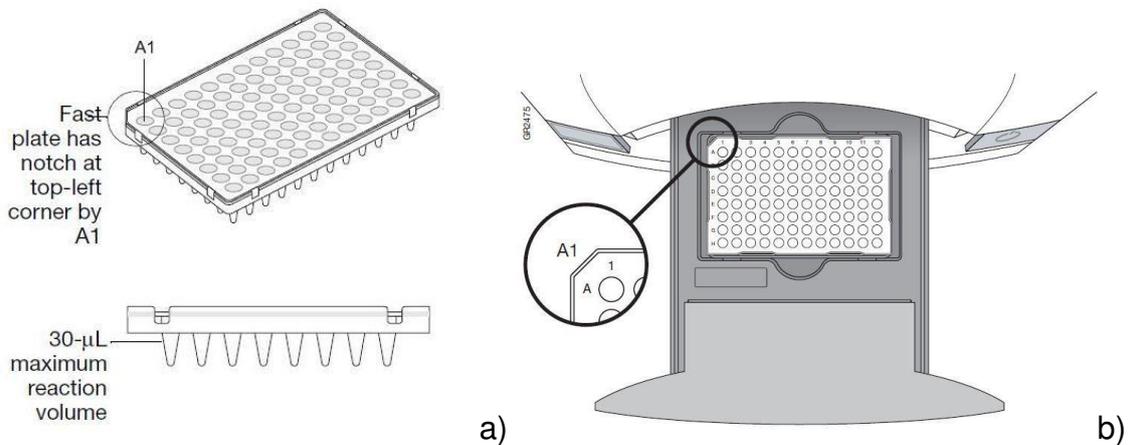


Abb. 6 a) Für die RT-PCR angewendeten *Plates*. b) Einsetzen der *Plate* ins *Thermal Cycler*.¹²².



Abb. 7 Der Thermalcycluser des Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System¹²².

Für den Vorgang der PCR werden außerdem verwendet:

- PCR-Platten: MicroAmp[®], Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml), Applied Biosystems[®]
- Plattenabdeckfolie: MicroAmp[®], Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA-/RNA-/RNAasefree
- PCR-Tubes

2.1.4 Allgemeine Utensilien für alle Versuchsteile

- Thermalcycluser: Mastercycler gradient von Eppendorf[®]
- Zentrifuge: MiniSpin Plus von Eppendorf[®]

- Thermalblock: Techne Dri-Block® DB-2A
- Photometer: Nanophotometer von IMPLEN mit Einsätzen factor 50 LP 0,2 mm und factor 10 LP 1 mm
- Shaker: IKA® MS1 Minishaker
- Pipetten von Eppendorf Research Plus® und Eppendorf Reference® mit je 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Pipettiervolumen
- Pipetten von Falcon Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA mit je 5 ml, 10 ml und 25 ml Pipettiervolumen
- Reaktionsgefäße 2,0 ml, farblos, graduiert, mit Druckverschluss, DNA-, DNase-, RNasefrei von Biozym Scientific GmbH, Art.-Nr. 710320
- Reaktionsgefäße 1,6 ml, RCF = 25.000 x g, graduiert, mit Druckverschluss, DNA-, DNase-, RNasefrei von Biozym Scientific GmbH, Art.-Nr. 710360
- Pipettenspitzen:
 - Biozym Premium Tips, pyrogen-, DNA-, DNase-, RNase-free
 - 1 ml Safe Seal-Tips Premium®, Biozym Budget Line, Art.-Nr. 691000
- Ethanol: Emprove® exp, Ph Eur, BP, JP, USP, absolute suitable for use as excipient, Index-No: 603-002-00-5, Merck KGaA, 64271 Darmstadt
- Molecular Biology Grade Water von Nalgene®

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation aus Tumorgewebe

Erster Schritt in der Versuchsanordnung ist die Gewinnung der DNA aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben. Diese liegen als Paraffinblöcke vor, so dass dünne Schnitte der Tumorbereiche angefertigt werden. Diese werden mit dem „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ von der Firma QIAGEN® wie im Folgenden beschrieben nach Anweisungen des Kit-Herstellers aufgearbeitet ¹²⁰. Dazu wird die Gewebeprobe in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben und nach 1 ml Xylol-Gabe für 10 Sek. mit dem Mixer vermischt. Nach Zentrifugieren der Probe wird die überstehende Lösung abpipettiert und zu dem verbliebenden Pellet 1 ml Ethanol (96-100%) hinzugefügt. Nach erneutem Mixen und Entfernen des Überstands wird die Probe bis zur Ausdünstung des restlichen Alkohols für 10 Minuten offen inkubiert. Das verbliebende Pellet, welches die DNA enthält, wird in 100 µl ATL-Puffer und 20 ml Proteinase K aufgelöst und vermischt. Die Probe wird bei 56°C über Nacht bis zur Auflösung der Pelletbestandteile inkubiert. Nachfolgend wird die Temperatur für 1h auf 90°C eingestellt und weiter inkubiert - der ATL-Puffer hat die Funktion, die Formaldehyd-Modifikation der DNA teilweise rückgängig zu machen.

Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer und 200 µl Ethanol (96-100%) zu jeder Probe und Zentrifugieren werden die Proben in das vorgefertigte "*MinElute columnne*"-Röhrchen gegeben. Diese Röhrchen enthalten eine Membran, die die DNA nach Zugabe von Puffern auffängt. Nach Zentrifugieren bei 8000 rpm (*repeats per minute*) für 1 Minute wird die Lösung, die in das Eppendorf-Gefäß durchgeflossen ist, entfernt und das "*MinElute Columnne*" in ein sauberes Gefäß platziert. Im Folgenden werden 500 µl AW1-Puffer in die "*MinElute Columnne*" gegeben und es wird für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die durchgeflossene Flüssigkeit wird entfernt und dasselbe wird nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer durchgeführt.

Nachdem die DNA auf diese Weise "gewaschen" wurde, wird erneut bei 14000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert, um die gesamte übriggebliebene Flüssigkeit durch die Membran zu pressen und lediglich die DNA auf der Membran des "*MinElute Columnne*" zu erhalten. Nachfolgend wird das "*MinElute Columnne*" Röhrchen in ein sauberes 1,5 ml Gefäß platziert und es werden 50 ml des ATE-Puffers hinzugegeben, welches die auf der Membran haftende DNA herauslöst. Nach 5 bis 10 Minuten Inkubation mit diesem Puffer wird für 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Die gelöste DNA befindet sich jetzt in dem überstehenden 1,5 ml Eppendorf-Gefäß, in ATE-Puffer gelöst, und wird bei -20°C gelagert. Die Konzentration der DNA in jeder einzelnen Probe wird im nachhinein photometrisch bestimmt, da im nachfolgenden Schritt eine bestimmte Menge der DNA der Bisulfitkonversion unterzogen wird.

2.2.2 Bisulfitkonversion der gewonnenen DNA

Die Bisulfitkonversion der DNA ist die Voraussetzung für die Durchführung der methylierungsspezifischen PCR (MSP). Nach einer Bisulfitbehandlung werden unmethylierte Cytosine der DNA-Abfolge in Uracil umgewandelt, während methylierte Cytosinmoleküle unbeeinflusst bleiben⁷¹. So "übersetzt" man den Methylierungsstatus in eine neue DNA-Abfolge, wo nur methylierte Cytosine tatsächlich als Cytosine detektiert werden und unmethylierte Cytosine (in Uracil umgewandelt) außen vor bleiben¹²³. Die Bisulfit-DNA ist dann das Substrat für die im nachfolgenden Kapitel durchgeführte MSP (Methylierungsspezifische Polymerasenkettenreaktion).

Für die Bisulfitkonversion wird das „EpiTect Bisulfite Kit“ von der Firma QIAGEN® benutzt¹²¹. Bei jeder Reaktion werden 2000 ng DNA behandelt, wobei sich unterschiedliche Volumina wegen der unterschiedlichen DNA-Konzentrationen der isolierten Proben ergeben. Zu den verschiedenen Volumina wird das entsprechende Volumen RNAase-freies Wasser hinzugefügt. Die Mischung enthält zum Schluss ein Volumen von 20 µl mit 2000 ng Patienten-DNA. Dazu werden folgende Komponente pipettiert:

| <u>Komponente</u> | <u>Volumen</u> |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <i>DNA-Lösung</i> | <i>variabel</i> |
| <i>RNAase-freies Wasser</i> | <i>variabel</i> |
| <i>Bisulfit-Mix (vorher aufgelöst in 800 ml RNAase-freiem Wasser)</i> | <i>85 µl</i> |
| <i>DNA-Protect-Puffer</i> | <i>35 µl</i> |
| <i>Totales Volumen</i> | <i>140 µl</i> |

Der korrekte pH-Wert für die Reaktion wird durch den Farbwechsel des DNA-Protect-Puffers von grün in blau angezeigt, so dass die Bisulfitkonversion in einem Thermalcycler wie folgt durchgeführt wird:

| <u>Schritt</u> | <u>Zeit</u> | <u>Temperatur</u> |
|-----------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Denaturierung</i> | <i>5 Min.</i> | <i>95°C</i> |
| <i>Inkubation</i> | <i>25 Min.</i> | <i>60°C</i> |
| <i>Denaturierung</i> | <i>5 Min.</i> | <i>95°C</i> |
| <i>Inkubation</i> | <i>85 Min.</i> | <i>60°C</i> |
| <i>Denaturierung</i> | <i>5 Min.</i> | <i>95°C</i> |
| <i>Inkubation</i> | <i>175 Min.</i> | <i>60°C</i> |

Die Proben können problemlos über Nacht bei 20°C im Thermalcycler belassen werden. Daraufhin wird mit der Reinigung der konvertierten DNA begonnen, indem die Proben zentrifugiert werden und ihnen je 310 µl BL-Puffer (Präparation desselben mittels RNA-Carrier-Lösung im Kapitel "Material" enthalten) hinzugefügt wird. Nach Mischen und Zentrifugieren werden weitere 250 ml Ethanol (96-100%) hinzugefügt und erneut gemischt.

Die so vorbereitete Lösung wird in die "*EpiTect spin column*"-Röhrchen gegeben, zentrifugiert und die durchgeflossene Flüssigkeit entfernt. Nachfolgend werden je 500 µl BW-Puffer und 500 µl BD-Puffer hinzugefügt und zentrifugiert, die durchfließende Flüssigkeit wird entfernt. Nach Zugabe des BD-Puffers wird die Lösung vor Zentrifugieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird erneut zweimalig 500 µl BW-Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Nach Inkubation der offenen Behälter für 5 Minuten bei 56°C wird dafür gesorgt, dass die komplette Restflüssigkeit von den "*EpiTect spin columns*" verdunstet.

Auf die Membran der "*EpiTect spin columns*", die jetzt die bisulfitkonvertierte DNA enthält, werden 20 µl EB-Puffer pipettiert und erneut für 1 Minute bei 12000 rpm zentrifugiert. Die so behandelte DNA-Lösung kann bei -20°C für mindestens 3 Jahre gelagert werden.

2.2.3 Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, die in den 80-er Jahren entwickelt wurde, um enzymatisch spezifische Bereiche der DNA exponentiell in multiplen Zyklen zu replizieren und so eine detektierbare Anzahl von Kopien zu produzieren. Das erfolgt durch den Einsatz von genspezifischen Primern, die an den Enden der Sequenz andocken und Ausgangspunkt für die Synthese eines neuen komplementären DNA-Strangs sind. Nach mehreren Zyklen thermischer Denaturierung und erneuter Synthese entsteht eine exponentielle Anzahl von Sequenzkopien¹²⁴. Eine gute Effizienz des Prinzips wurde erst nach der Entdeckung der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase (isoliert vom *Thermos aquaticus*) erreicht, die bei hohen Temperaturen nicht denaturiert. Dieses DNA-synthetisierendes Enzym verfügt ebenfalls über eine DNA-5'-3'-Exonuklease-Aktivität, aufgrund der sie bei der Synthese des neuen Strangs bereits eingefügte Nukleotide "rückwärts" spalten kann¹²⁵. Diese Fähigkeit macht man sich bei der Real-Time-PCR zunutze, bei der die amplifizierte Kopien quantitativ während der PCR gemessen werden (im Unterschied zur konventionellen PCR, bei der mithilfe der Gelelektrophorese die Produkte erst im Anschluss nach Beendigung der Zyklen detektiert werden). Dazu fügt man der Probe eine Sonde (ein Oligonukleotid) hinzu, die eine spezifische Nukleotidabfolge hat, am 5'-Ende einen Reporter (fluoreszierende Substanz, z.B. *6-Carboxyfluorescein*, FAM) und am 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher (z.B. *6-Carboxy-tertramethyl-rhodamin*, TAMRA) trägt (siehe Abb. 8),¹²². Wird die Sonde in einer bestimmten Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt, kann der Reporter wegen der räumlichen Nähe zum Quencher aufgrund des stattfindenden Fluoreszenz-Energietransfers nicht fluoreszieren. In der Extensionsphase der RT-PCR geschieht eben die räumliche Trennung von beiden, da auf dem Weg entlang des Matrizenstrangs die DNA-Polymerase auf die Sonde trifft und diese aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität spaltet. Der Reporter wird freigesetzt und gibt ein fluoreszierendes Signal ab^{125, 126}. Das geschieht sequenzspezifisch, weil nur hybridisierte Sonden von der DNA-Polymerase gespalten werden. Sonden, die aufgrund nicht komplementärer Basenabfolge am Matrizenstrang nicht andocken können, werden nicht hydrolysiert. Während der Amplifikation steigt deswegen sequenzspezifisch das Reportersignal (Spezifität durch die Sonde vorausgesetzt) und das simultan während der PCR.

Während die Menge der amplifizierten DNA (und damit das Fluoreszenzsignal) exponentiell über einen Cut-Off-Bereich steigen (das Cut-Off trennt die detektierbaren Signale vom Hintergrundfluoreszenzniveau), wird nach Verbrauch der Reagenzien ein Plateau erreicht, siehe Abb. 9. Zu diesem Endpunkt können aber keine Rückschlüsse auf die Startmenge der DNA gezogen werden¹²⁵. Das kann nur im exponentiellen Anstiegsbereich erfolgen, wo die Nummer der Zyklen, die nötig sind das Cut-Off zu erreichen (sog. *cycle threshold* oder Ct), von der DNA-Startmenge abhängig ist¹²⁶ - bei kleiner

Startmenge werden zum Beispiel mehr Zyklen gebraucht, um das Cut-Off zu erreichen als bei größerer Startmenge.

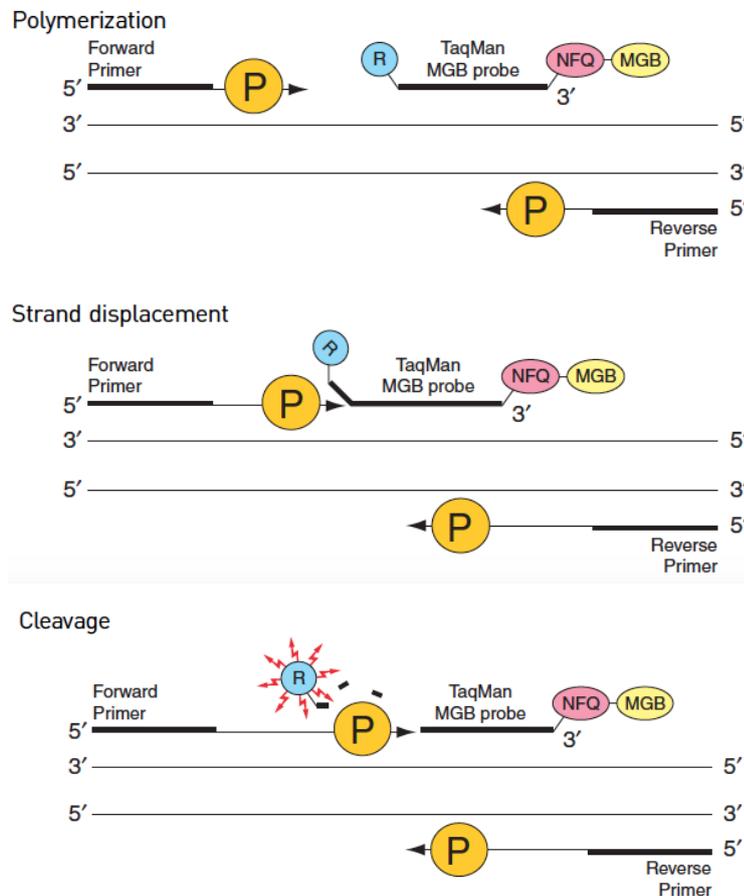


Abb. 8 Die Abbildung zeigt die Spaltung der Sonde während der Extensionsphase der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase und die Freigabe des Reporters, der durch die räumliche Entfernung vom Quencher ein messbares Fluoreszenzsignal abgibt. (R - Reporter, NFQ - Nicht fluoreszierender Quencher)

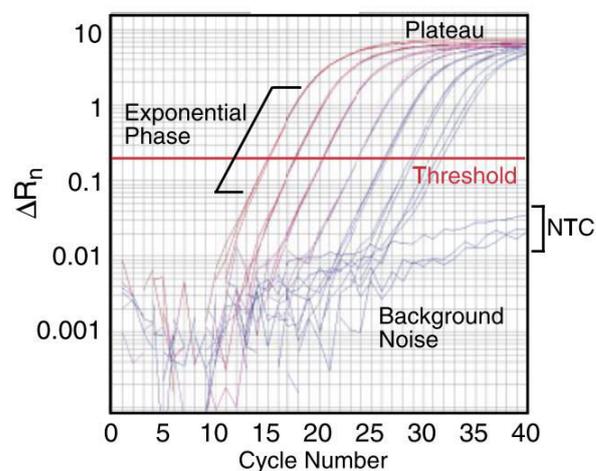


Abb. 9 Die Abbildung zeigt den exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignal beim Amplifizieren eines spezifischen Sequenzbereichs über das "Hintergrundfluoreszenzsignal" (*background noise*). Die y-Achse stellt das Fluoreszenzsignal dar, die x-Achse die Zyklusnummer. Der Zyklus, bei dem das Cut-Off (die threshold) erreicht wird, heißt Ct (*cycle threshold*) und ist proportional zur DNA-Startmenge.

Die PCR wird in unserer Versuchsanstellung in folgenden thermischen Zyklen durchgeführt - initiale Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten, daraufhin 50 Zyklen zu je 15 Sek. bei 95°C gefolgt von 1 Minute bei 60°C.

Bei der Durchführung der ESR1-Promotor-PCR werden stets bisulfitbehandelte DNA von MD-MBA-231-Zelllinien als Positivkontrolle (methylierter ESR1-Promotor), und MCF7-Zelllinien als Negativkontrolle (nicht methylierter ESR1-Promotor) verwendet - beide Zelllinien stammen aus menschlichem Brustdrüsengewebe mit Mammakarzinom ¹²⁷. Zusätzlich wird Wasser als Indikator für die fehlende Verunreinigung durch DNA untersucht - diese sollte stets negativ ausfallen (siehe Abb. 10).

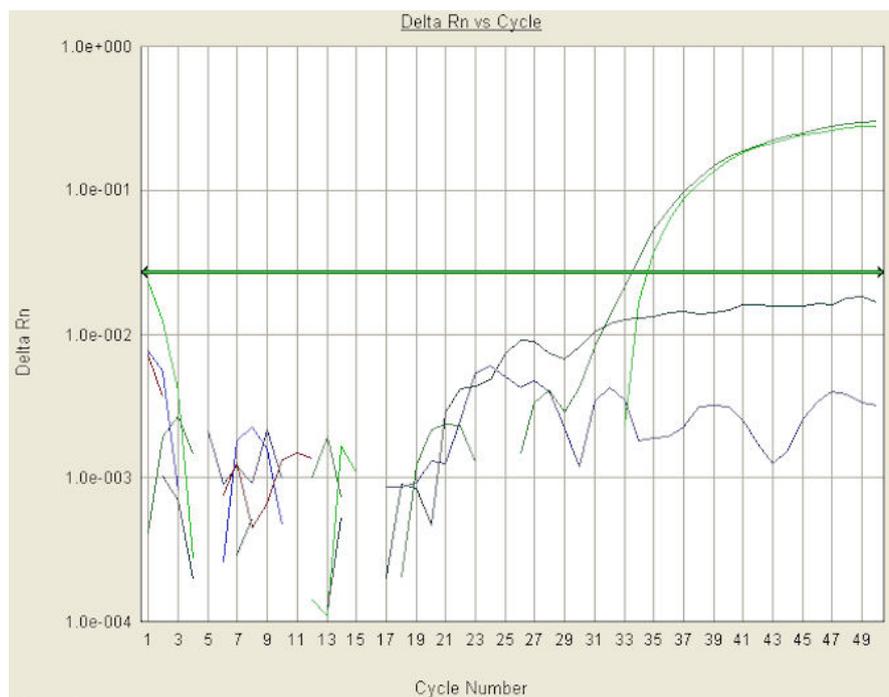


Abb. 10 Die Abbildung zeigt die ESR1-Promotor-PCR für die Positivkontrolle MD-MBA 231 (2 x pipettiert, beide Kurven zeigen einen exponentiellen Verlauf, der die Baseline beim 33. Zyklus kreuzt) sowie die Negativkontrollen MCF-7 und H₂O.

Als Letztes wird die PCR für jede DNA-Probe aus Tumorgewebe, die Positiv- und die Negativkontrolle (MD-MBA 231 und MCF-7) mit den Primern für CK-19 durchgeführt - das Gen für das humane Cytokeratin, das konstitutiv in den menschlichen Zellen exprimiert wird (ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen). Die PCR mit CK-19 fällt als Indikator vorliegender DNA stets positiv aus, solange sich menschliche DNA in der Probe befindet. Für die CK-19-PCR fallen also alle DNA-haltigen Proben positiv aus - MD-MBA 231, MCF-7 und alle Patientenproben; nur die H₂O-Probe ist als Zeichen, dass keine Kontamination vorliegt negativ, wie in Abb. 11 dargestellt. Die CK-19-PCR wird allerdings stets mit nicht bisulfit-behandelten Proben durchgeführt, da die Bisulfatierung zu einer negativen Reaktion mit den vorhandenen CK-19-Primern aufgrund einer zu starken DNA-Veränderung führt.

Nach der Durchführung der PCR wird anhand der positiven MD-MBA-231-Kontrollprobe die Baseline festgesetzt (das Cut-off ab dem die Reaktion als positiv für die Amplifikation des ESR1-Promotor-Bereichs gewertet wird) - in der logarithmischen Skalierung wird diese in der Mitte des linear ansteigenden Teils der Kurve gesetzt und es wird darauf geachtet, dass die Kurven beider negativen Proben (MCF-7 und H₂O zeigen keine Amplifikation für die ESR1-Promotor-Region) darunter verlaufen ¹²². Der Grund dafür ist, dass genau in diesem linearen Teil eine direkte Beziehung zwischen Fluoreszenz und DNA-Menge hergeleitet werden kann ¹²⁶.

Als PCR-positiv wird eine Probe gewertet, die einen typischen exponentiellen Verlauf zeigt **und** die Baseline (das Cut-Off) spätestens bei Zyklus 39 kreuzt (siehe Abb. 10). Diese Begrenzung auf Zyklus 39 ergibt sich aus der Tatsache, dass bei unendlich laufender PCR irgendwann jede Probe aufgrund von kleinsten Kontaminationen positiv werden kann aber eine spezifische Amplifikation früher einsetzen sollte - nicht später als beim 39. Zyklus.



Abb. 11 Die Abbildung zeigt die CK-19-PCR für die Positivkontrolle (MD-MBA 231), die Negativkontrolle (MCF-7) und H₂O. Die ersten beiden Kurven haben einen typischen Verlauf und kreuzen die Baseline bis zum 39. Zyklus. Die einzige Kurve, die unter der Baseline verläuft, ist die des H₂O, da in der Probe erwartungsgemäß keine DNA enthalten ist.

3 Ergebnisse

Das Gewebe der in Paraffin eingebetteten Präparaten, das wir benutzen, ist zwischen 2000 und 2002 intraoperativ entnommen worden - dieser Zeitraum erlaubt noch relativ gute DNA-Qualität für die PCR-Analyse (das Alter der Präparate ist nicht älter als 12 Jahre) bei besserer Follow-Up-Möglichkeit. In der Studie haben wir von ursprünglich 50 Patientinnen mit Zervixkarzinomen lediglich 44 aufgrund ungenügender DNA-Konzentration der restlichen Proben nach Extraktion eingeschlossen. Die Patientinnen sind zwischen 1933 und 1974 geboren und deren mittleres Alter bei Diagnose liegt bei 46,5 Jahren (die jüngste Patientin ist 27 und die älteste 69 Jahre alt bei Diagnosestellung). Von diesen Patientinnen sind zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Januar 2013 insgesamt 5 verstorben, die Charakteristika von diesen Patientinnen sind in der Tab. 11 am Ende des Kapitels zusammengefasst. Von den restlichen 39 Patientinnen ist bei 17 bis dato kein Rezidiv diagnostiziert, bei 22 Patientinnen kann retrospektiv nicht eruiert werden, ob sie rezidivfrei geblieben sind. Es handelt sich bei 43 der Patientinnen um Erkrankungen an Plattenepithelkarzinomen (davon 28 nicht verhornend, 13 verhornend, 2 gering differenziert). Im Kollektiv liegt histologisch kein Adenokarzinom vor, in einem Fall fehlt die histologische Klassifizierung. Die meisten Tumoren weisen eine mäßige Differenzierung mit G2 (26 von 44 Patientinnen, 59.1%) auf, der zweitgrößte Anteil (16 von 44, 36.4%) weist schlecht differenzierte G3-Karzinome auf. Eine Patientin hat G1-Grading, bei einer ist das Grading nicht festgehalten (siehe Tab. 7). Durchschnittlich sind pro Patientin 35,67 Lymphknoten entnommen und untersucht worden, 29 der Patientinnen haben keine Lymphknotenmetastasen, bei 15 sind die Lymphknoten befallen. Im Rahmen der operativen Therapie haben sich 42 Patientinnen einer nicht fertilitätserhaltenden Behandlung in Form einer Hysterektomie unterzogen, eine Patientin hatte bereits 1992 eine suprazervikale Hysterektomie, ein Fall wurde nicht ausreichend dokumentiert. Bei ca. der Hälfte der Patientinnen (21 Patientinnen, 47.7%) ist zusätzlich eine beidseitige Adnexektomie durchgeführt worden. Bei genau demselben Anteil von 47.7% Prozent ist die Operation im Sinne des klassischen Wertheim-Meiggs-Konzeptes - ohne Adnexektomie - durchgeführt worden. Bei einer schwangeren Patientin wurde eine primäre Sectio in der 36+4 SSW mit gleichzeitiger Wertheim-Operation (Hysterektomie und pelvine Lymphonodektomie) kombiniert - diese Patientin wurde im Verlauf relaparotomiert, erlebte 2004 einen Rezidiv mit nachfolgender Ovariopexie und ist trotz Radio-Chemotherapie verstorben. Die Mehrheit der Patientinnen (50.0%) entspricht den lokalen, lymphogen und systemisch nicht fortgeschrittenen FIGO-Stadien I und II. 36,4% der Patientinnen haben bereits Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen und befinden sich im FIGO-Stadium III-IV. Ein Anteil von 6% weist keine ausreichenden Kriterien zur FIGO-Klassifikation auf (siehe Tab. 8).

| Merkmal | Subpopulationen | Absolute Patientenzahl | Anteil in % von insgesamt 44 P. |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|
| Histologischer Befund | <i>Plattenepithelkarzinom:</i> | 43 | 97.7% |
| | • <i>Nicht verhornend</i> | 28 | 63.6% |
| | • <i>Verhornend</i> | 13 | 29.5% |
| | <i>Adenokarzinom</i> | 0 | - |
| | <i>Gering diff. Karzinome</i> | 2 | 4.6% |
| | <i>Nicht klassifiziert</i> | 1 | 2.3% |
| Grading | <i>G1 (Gut differenziert)</i> | 1 | 2.3% |
| | <i>G2 (Mässig differenziert)</i> | 26 | 59.1% |
| | <i>G3 (Schlecht differenziert)</i> | 16 | 36.4% |
| | <i>Nicht klassifiziert</i> | 1 | 2.3% |
| Lymphknoten-Status | <i>Nicht befallen</i> | 29 | 65.9% |
| | <i>Befallen</i> | 15 | 34.1% |
| Operative Therapie | <i>Hysterektomie</i> | 42 | 95.5% |
| | <i>Keine Hysterektomie (St.n. Hysterektomie)</i> | 1 | 2.3% |
| | <i>Nicht klassifiziert</i> | 1 | 2.3% |
| Adnexektomie im Rahmen der operativen Therapie | <i>Beidseitige Adnexektomie</i> | 21 | 47.7% |
| | <i>Einseitige Adnexektomie</i> | 1 | 2.3% |
| | <i>Keine Adnexektomie</i> | 21 | 47.7% |
| | <i>Nicht klassifiziert</i> | 1 | 2.3% |
| Adjuvante Radio-Chemotherapie | <i>Keine adjuvante RTX+CTX</i> | 21 | 47.7% |
| | <i>Adjuvante RTX+CTX</i> | 7 | 15.9% |
| | <i>Adjuvante RTX (keine oder nicht dokumentierte CTX)</i> | 9 | 20.45% |
| Rezidive | <i>Rezidiv</i> | 0 | - |
| | <i>Kein Rezidiv</i> | 17 | 38.6% |
| | <i>Todesfälle</i> | 5 | 11.4% |
| | <i>Nicht klassifiziert</i> | 22 | 50.0% |
| Rauchverhalten | <i>Raucherinnen</i> | 13 | 29.5% |
| | <i>Nicht-Raucherinnen</i> | 20 | 45.5% |
| | <i>Nicht klassifiziert</i> | 11 | 25.0% |
| BMI-Index | <i>< 18.5 (Untergewicht)</i> | 4 | 9.0% |
| | <i>18.5 - 25 (Normalgewicht)</i> | 15 | 34.1% |
| | <i>25 - 30 (Präadipositas)</i> | 8 | 18.2% |
| | <i>> Adipositas (Adipositas)</i> | 8 | 18.2% |
| | <i>Nicht klassifiziert</i> | 9 | 20.5% |

Tab. 7 Die Tabelle zeigt die Aufteilung des Kollektivs nach den evaluierten diagnostischen, therapeutischen und klinischen Merkmalen.

| FIGO-Stadium | TNM-Stadium | Absolute Patientenzahl (N) | Anteil in % von allen 44 Patienten |
|---------------------|---------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Stadium I | T1 N0 M0 | 15 | 34.1% |
| - Stadium IA | T1a N0 M0 | 0 | |
| - Stadium IB | T1b N0 M0 | 15 | |
| Stadium II | T2 N0 M0 | 7 | 15.9% |
| - Stadium IIA | T2a N0 M0 | 3 | |
| - Stadium IIB | T2b N0 M0 | 4 | |
| Stadium III | T1-3 N0-1 M0 | 15 | 34.1% |
| - Stadium IIIA | T3a N0 M0 | 0 | |
| - Stadium IIIB | T1-3 N1 M0 | 15 | |
| | T1 N1 M0 | 3 | |
| | T2 N1 M0 | 10 | |
| | T3 N1 M0 | 2 | |
| Stadium IV | | 1 | 2.3% |
| - Stadium IVA | T4 NX M0 | 0 | |
| - Stadium IVB | T2b N1 M1 | 1 | |
| Nicht klassifiziert | - | 6 | 13.6% |

Tab. 8 Die Tabelle zeigt die Aufteilung des Kollektivs nach der FIGO- und TNM-Klassifikation.

Die Mehrheit der Patientinnen im Kollektiv (47.7%) bekam keine adjuvante Radiochemotherapie, was gut mit den Ergebnissen korreliert, dass die meisten Fälle niedriggradigen FIGO-Stadien (Stadium I-II) angehören, die meisten Patientinnen einen negativen Lymphknotenstatus und ein günstiges Gradingprofil (G1-G2) aufweisen (Zusatzkriterien, die gegen die Durchführung einer adjuvanten Therapie sprechen). Eine kombinierte Radiochemotherapie erhielten ca. 15.9% der Patientinnen, für einen Teil von 20.5% ist alleinig die Durchführung einer Radiotherapie dokumentiert.

Zusätzlich haben wir bei den Patientinnen weitere Merkmale berücksichtigt - wie Rauchverhalten oder BMI. Der größte Teil der Patientinnen (45.5%) sind Nichtraucherinnen, die Mehrheit ist norm- oder untergewichtig (43.1%), adipös hingegen 18.2%.

Nach den im Methodenteil erklärten Kriterien werden 17 von den 44 Patientinnen (38.6%) als PCR-positiv gewertet und weisen somit eine Methylierung des ESR1-Promotors auf. Die Charakteristika dieser 17 Patientinnen sind am Ende des Kapitels in der Tabelle 10 zusammengefasst. Die Abbildung 12 zeigt exemplarisch die PCR einer Patientin mit methyliertem ESR1-Promotor. Die restlichen 27 Patientinnen (61.4%) sind PCR-negativ, ihr ESR1-Promotor ist also nicht methyliert. Ein Beispiel hierfür zeigt die Abbildung 13. In der Gruppe mit dem methylierten ESR1-Promotor sind zum Zeitpunkt der

Datenerhebung 16 Patientinnen am Leben, eine ist verstorben. In der Gruppe wo keine Methylierung vorlag, sind 4 von den 27 Patientinnen verstorben (zensiert 3 von 26). Für das durchschnittliche Überleben ergibt die Kaplan-Meier-Kurve keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (10-Jahresüberleben bei methyliertem Promotor 94,1%, bei nicht methyliertem Promotor 88,5%, $p = 0.554$). Die absolute Überlebensdauer beträgt für die Gruppe mit dem methyliertem Promotor 9,44 Jahre, und mit nicht methyliertem 9,08 Jahre (siehe Tab. 9 und Abb. 14). Der Methylierungsstatus zeigt keine Korrelation mit dem Überleben sowohl in der Subgruppe mit verhorntem Plattenepithelkarzinom (10-Jahres-Überleben 100% methyliert vs. 85,7% unmethyliert, $p = 0,317$) als auch in der Subgruppe mit nicht verhornendem Karzinom (10-Jahres-Überleben 90,0% methyliert vs. 88,2 nicht methyliert, $p = 0,960$).

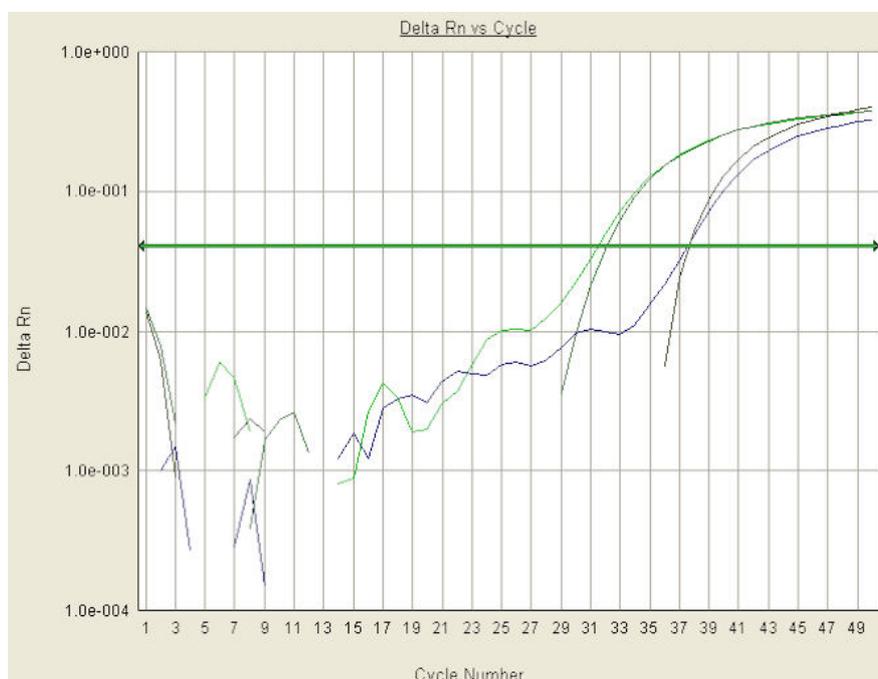


Abb. 12 Die Abbildung zeigt die PCR-Ergebnisse einer 52-jährigen Patientin, die als PCR-positiv (ESR1-Promotor methyliert) gewertet wird. Die Kurve der Positivkontrolle MD-MBA 231 (doppelt angesetzt) kreuzt die Baseline durchschnittlich bei Zyklus 32. Die Kurve der Patientinnenprobe (ebenfalls doppelt angesetzt) kreuzt die Baseline durchschnittlich bei Zyklus 38. Das ist eine Patientin im Stadium T2b N0 M0 (FIGO IIB) mit schlecht differenziertem (G3), großzelligem verhornendem Plattenepithelkarzinom.

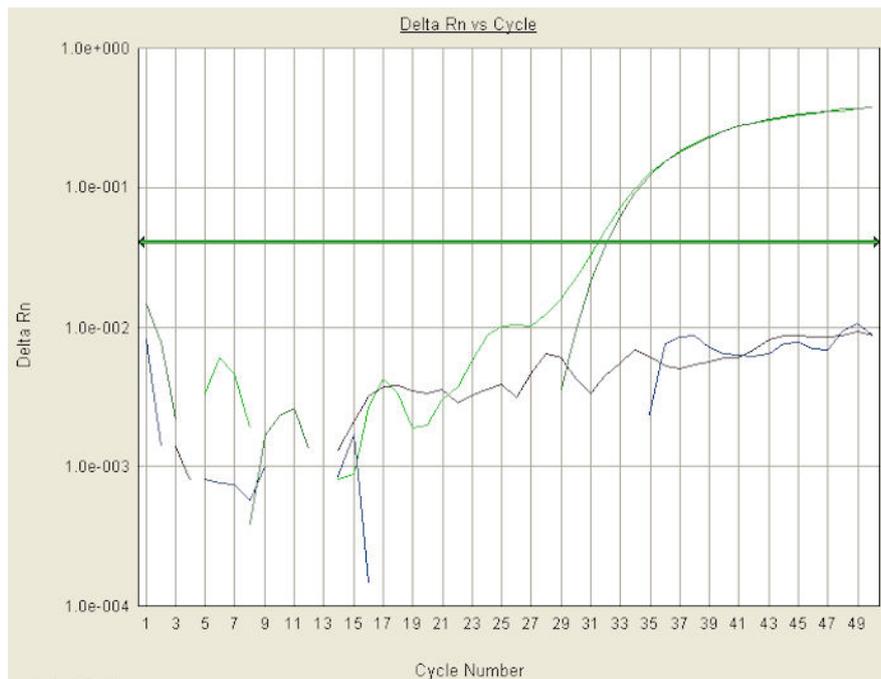


Abb. 13 Die Abbildung zeigt die PCR-Ergebnisse einer 45-jährigen Patientin, die als PCR-negativ (ESR1-Promotor nicht methyliert) gewertet wird. Die Kurve der Positivkontrolle MD-MBA 231 (doppelt angesetzt) kreuzt die Baseline durchschnittlich bei Zyklus 32. Die Kurve der Patientinnenprobe (doppelt angesetzt) erreicht die Baseline nicht. Das ist eine Patientin im Stadium T1b1 N0 Mx mit mittelgradig differenziertem (G2), nicht verhornendem Plattenepithelkarzinom.

| Zusammenfassung der Fallverarbeitung | | | | |
|--------------------------------------|------------|-----------------------|----------|---------|
| ESR1-Promotor (PCR) | Gesamtzahl | Anzahl der Ereignisse | Zensiert | |
| | | | H | Prozent |
| nicht methyliert | 26 | 3 | 23 | 88,5% |
| methyliert | 17 | 1 | 16 | 94,1% |
| Insgesamt | 43 | 4 | 39 | 90,7% |

a)

| ESR1-Promotor (PCR) | Mittelwert ^a | | | |
|---------------------|-------------------------|----------------|------------------------|------------|
| | Schätzung | Standardfehler | 95%-Konfidenzintervall | |
| | | | Untergrenze | Obergrenze |
| nicht methyliert | 9,083 | ,500 | 8,104 | 10,063 |
| methyliert | 9,438 | ,545 | 8,370 | 10,505 |
| Insgesamt | 9,225 | ,372 | 8,497 | 9,953 |

a. Wenn die Schätzung zensiert ist, wird sie auf die größte Überlebenszeit begrenzt.

b)

Tab. 9 Die Tabelle zeigt die statistische Auswertung für das Überleben in den Gruppen mit methyliertem und nicht methyliertem ESR1-Promotor. a) Das 10-Jahresüberleben in der Gruppe korreliert nicht mit dem Methylierungsstatus ($p = 0.554$). b) Die entsprechende Überlebensdauer in Jahren, abhängig vom Methylierungsstatus.

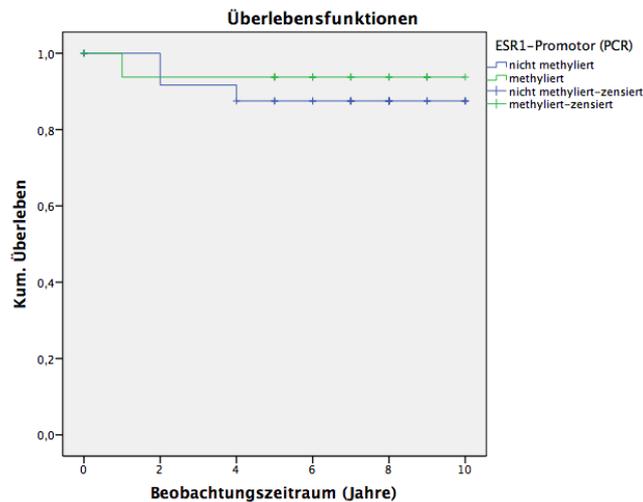


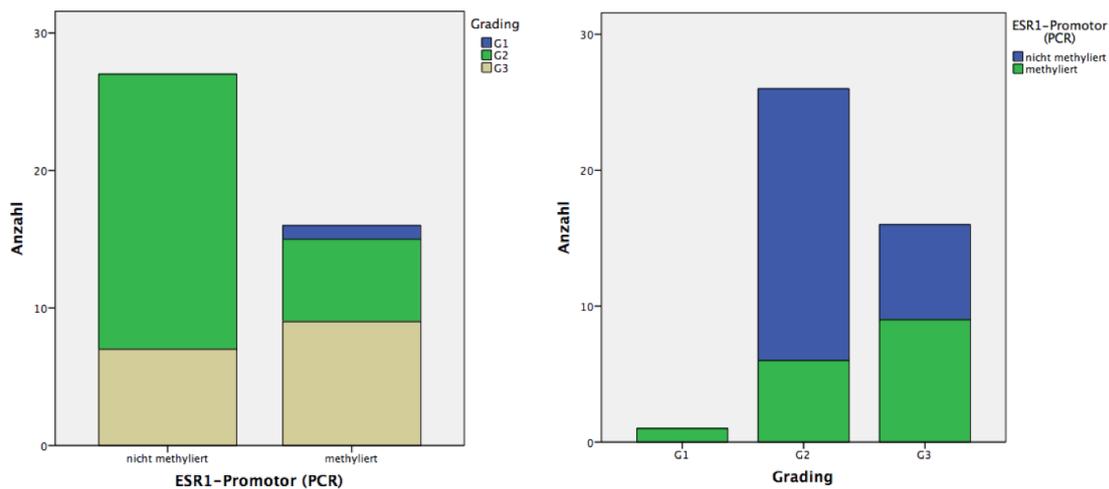
Abb. 14 Graphische Darstellung des 10-Jahres-Überlebens von Patientinnen mit methyliertem und nicht methyliertem ESR1-Promotor.

Beim Grading zeigt sich allerdings ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. In der Gruppe mit methyliertem ESR1-Promotor kommen häufiger schlecht differenzierte G3-Karzinome als in der Gruppe mit nicht methyliertem ESR1-Promotor vor (G3-Fälle: 9 von 16 Patientinnen bei methyliertem vs. 7 Patienten von 27 bei nicht methyliertem Promotor), $p = 0.041$, siehe Abb. 15 a). Über die Hälfte der Patientinnen (56.3%) weisen G3-Befunde auf, falls bei ihnen eine Methylierung vorliegt. Ist der ESR1-Promotor nicht methyliert, werden um ca. die Hälfte weniger G3-Befunde erhoben (G3 in 25.9% der Fälle), siehe Abb. 15 a), und 15 b). Bei schlecht differenzierten G3-Karzinomen liegt häufiger eine Methylierung des ESR1-Promotors als bei gut- bis mäßig differenzierten Karzinomen vor - in G3-Karzinomen ist der ESR1-Promotor zu 56.3% methyliert, in G2-Karzinomen ist er hingegen zu 23.1% methyliert, siehe Abb. 15 a) und 15 c).

| Kreuztabelle ESR1-Promotor (PCR)*Grading | | | | | | |
|------------------------------------------|------------------|--------------------------|----------------|-----------------|----------------|-------------|
| | | | Grading | | | Gesamtsumme |
| | | | G1 | G2 | G3 | |
| ESR1-Promotor (PCR) | nicht methyliert | Anzahl | 0 _a | 20 _a | 7 _a | 27 |
| | | % in ESR1-Promotor (PCR) | 0,0% | 74,1% | 25,9% | 100,0% |
| | | % in Grading | 0,0% | 76,9% | 43,8% | 62,8% |
| | methyliert | Anzahl | 1 _a | 6 _a | 9 _a | 16 |
| | | % in ESR1-Promotor (PCR) | 6,3% | 37,5% | 56,3% | 100,0% |
| | | % in Grading | 100,0% | 23,1% | 56,3% | 37,2% |
| Gesamtsumme | | Anzahl | 1 | 26 | 16 | 43 |
| | | % in ESR1-Promotor (PCR) | 2,3% | 60,5% | 37,2% | 100,0% |
| | | % in Grading | 100,0% | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

Jeder tiefgestellte Buchstabe gibt ein Subset von Grading Kategorien an, deren Spaltenanteile sich auf dem ,05-Niveau nicht signifikant voneinander unterscheiden.

a)



b)

c)

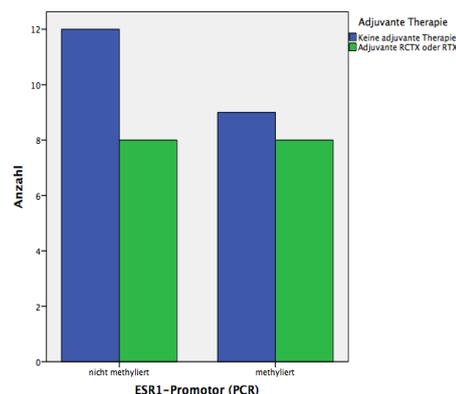
Abb. 15 a) Die Tabelle zeigt den absoluten und prozentualen Anteil der verschiedenen Differenzierungsgraden in den Gruppen mit methyliertem und nicht methyliertem ESR1-Promotor. b) In der Gruppe mit methyliertem Promotor liegt in 56,3% der Fälle ein G3 vor, in der Gruppe mit nicht methyliertem Promotor ist ein G3 in 25,9% vorliegend. c) In schlecht differenzierten Karzinomen liegt der ESR1-Promotor häufiger methyliert vor.

Eine Beziehung zwischen Lymphknotenbefall und Methylierungsstatus des Tumors kann in unserer Studie nicht gezeigt werden ($p = 0,598$).

Im unserem Kollektiv zeigen die Patientinnen mit negativen Nodalstatus keinen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den Patientinnen mit positivem Nodalstatus ($p = 0,500$). Von 16 LK-positiven Patientinnen sind 2 verstorben (1 mit methyliertem und 1 mit nicht methyliertem Promotor), von den 27 LK-negativen Patientinnen sind ebenfalls 2 verstorben (beide mit nicht methyliertem Promotor). Sowohl in der LK-positiven als auch in der LK-negativen Subgruppe ist die Methylierung des ESR1-Promotors nicht mit Überlebensunterschieden assoziiert ($p = 0,281$ bzw. $p = 0,881$).

Keine Signifikanz zeigt sich ebenfalls zwischen der ESR1-Promotor-Methylierung und der Durchführung einer adjuvanten Therapie. In der Gruppe mit methyliertem Promotor erhielten 47,1% der Patientinnen adjuvante Therapie und in der Gruppe mit nicht methyliertem Promotor erhielten 40,0% eine ($p = 0,666$), siehe Abb. 16. Die Durchführung der adjuvanten Therapie korreliert in unserer Studie mit einem positiven Nodalstatus - von 13 Patientinnen mit positiven Lymphknoten erhielten 12 eine adjuvante Therapie (92,3%, $p < 0,005$). Von den insgesamt 24 LK-negativen Patientinnen erhielten hingegen 4 eine adjuvante Radiochemotherapie (16,7%). Die Differenzierung steht weiterhin in keiner Assoziation mit durchgeführter postoperativer Weiterbehandlung ($p = 0,157$) - von 13 Patientinnen mit G3-Tumoren erhielten 8 eine adjuvante Therapie (61,5%), von 22 Patientinnen mit G2-Tumoren 7 (31,8%), die eine Patientin mit G1-Tumor erhielt keine adjuvante Therapie (0,0%).

| | | | Adjuvante Therapie | | Gesamtsumme |
|---------------|------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|
| | | | Keine adjuvante Therapie | Adjuvante RCTX oder RTX | |
| ESR1-Promotor | nicht methyliert | Anzahl | 12 | 8 | 20 |
| | | % in ESR1-Promotor | 60,0% | 40,0% | 100,0% |
| | methyliert | Anzahl | 9 | 8 | 17 |
| | | % in ESR1-Promotor | 52,9% | 47,1% | 100,0% |
| Gesamtsumme | | Anzahl | 21 | 16 | 37 |
| | | % in ESR1-Promotor | 56,8% | 43,2% | 100,0% |

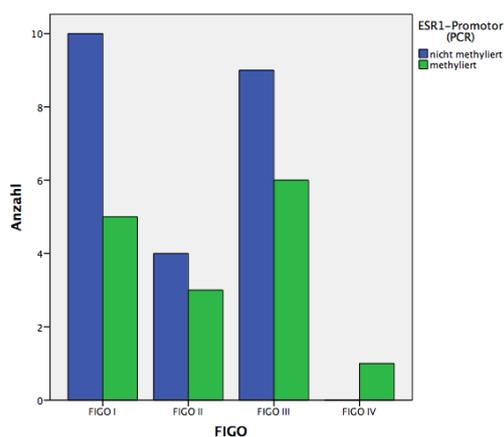


a)

b)

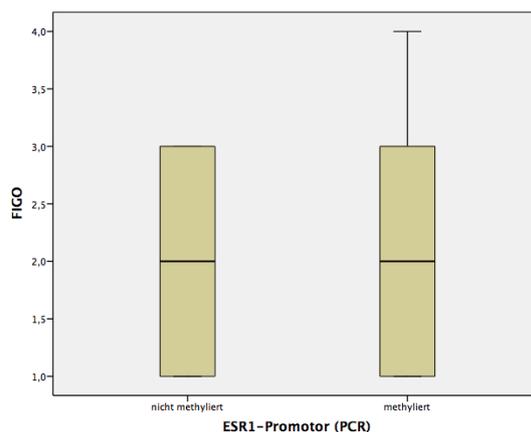
Abb. 16 Die Tabelle und die Grafik zeigen (a,b), dass in beiden Gruppen - mit methyliertem oder nicht methyliertem ESR1-Promotor - ähnlich häufig adjuvante Therapie (RCTX oder RTX) durchgeführt wurde ($p = 0,666$).

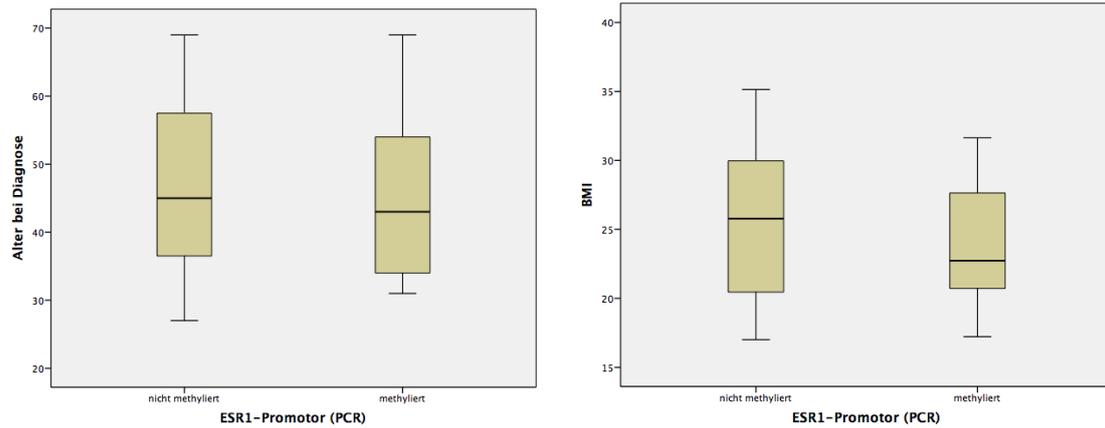
In unseren Ergebnissen zeigt sich noch, dass die Methylierung des ESR1-Promotors keinen Einfluss auf das FIGO-Tumorstadium ($p = 0,720$) oder das mittlere Erkrankungsalter ($p = 0,605$) hat. Der BMI-Index steht auch in keinem Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus ($p = 0,465$), sowie der Nikotingenuss - in Raucherinnen- und Nichtraucherinnengruppen unterschied sich die Methylierungshäufigkeit des ESR1-Promotors nicht ($p = 0,840$). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 17 dargestellt.



a)

b)



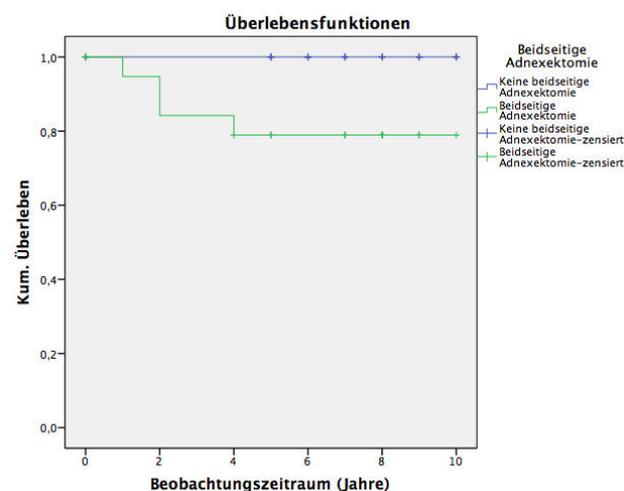


c)

d)

Abb. 17 Die Graphiken zeigen, dass kein Zusammenhang des FIGO-Stadiums (a,b, $p = 0,720$), Erkrankungsalters (c, $p = 0,605$) und BMI-Index mit dem Methylierungsstatus besteht (d, $p = 0,465$).

Die Patientinnen sind ebenfalls je nach der durchgeführten operativen Therapie bezüglich etwaiger Adnexektomie evaluiert. Von 42 Fällen (zensiert nach vorhandenen Daten) ist die Hälfte beidseitig adnexektomiert und bei der anderen Hälfte ist keine Adnexektomie durchgeführt worden. In der Gruppe, wo beidseits adnexektomiert wurde, sind 4 Patientinnen von insgesamt 21 verstorben (siehe Abb. 18). Bei 3 der 4 verstorbenen Patientinnen ist der ESR1-Promotor nicht methyliert. In der Gruppe, wo die Adnexe in situ belassen wurden, ist keine Patientin verstorben (0 von 21), $p = 0,032$. Das schlechtere Überleben in der Gruppe mit der Adnexektomie korreliert weder mit dem FIGO-Stadium ($p = 0,210$) noch mit dem Lymphknotenstatus ($p = 0,137$). Patientinnen, bei denen eine beidseitige Adnexektomie durchgeführt wurde, haben weder ein höheres FIGO-Stadium, noch häufiger befallene Lymphknoten.



a)

| Zusammenfassung der Fallverarbeitung | | | | | |
|--------------------------------------|---------------------|------------|-----------------------|----------|---------|
| Beidseitige Adnexektomie | ESR1-Promotor (PCR) | Gesamtzahl | Anzahl der Ereignisse | Zensiert | |
| | | | | H | Prozent |
| Keine beidseitige Adnexektomie | nicht methyliert | 13 | 0 | 13 | 100,0% |
| | methyliert | 8 | 0 | 8 | 100,0% |
| | Insgesamt | 21 | 0 | 21 | 100,0% |
| Beidseitige Adnexektomie | nicht methyliert | 12 | 3 | 9 | 75,0% |
| | methyliert | 9 | 1 | 8 | 88,9% |
| | Insgesamt | 21 | 4 | 17 | 81,0% |
| Insgesamt | Insgesamt | 42 | 4 | 38 | 90,5% |

b)

Abb. 18 a) Signifikant schlechteres Überleben der Patientengruppe, die eine beidseitige Adnexektomie erhalten hat ($p = 0,032$). b) Sterbefälle in Abhängigkeit vom Adnexektomie- und Methylierungsstatus.

| FIGO | TNM | Grading | Plattenepithelkarzinom-Subtyp (Verhornung) | LK-Status | Beids. Adnexektomie | Patient lebt |
|----------|------------|---------|--------------------------------------------|------------------|---------------------|--------------|
| St. IVB | T2b N1 M1 | G3 | nicht verhornend | positiv (14/101) | ja | ja |
| St. IIIB | T3b N1 M0 | G3 | nicht verhornend | positiv (5/47) | ja | ja |
| St. IIB | T2b N0 M0 | G3 | verhornend | negativ (0/32) | ja | ja |
| St. IIIB | T3b N1 M0 | - | nicht verhornend | positiv (20/22) | ja | nein |
| St. IIIB | T2b N1 M0 | G3 | nicht verhornend | positiv (12/57) | nein | ja |
| St. IIA | T2a N0 M0 | G3 | nicht verhornend | negativ (0/23) | ja | ja |
| St. IB | T1b1 N0 M0 | G2 | verhornend | negativ (0/43) | nein | ja |
| St. IBI | T1b1 N0 M0 | G2 | nicht verhornend | negativ (0/21) | ja | ja |
| St. IB2 | T1b2 N0 M0 | G1 | verhornend | negativ (0/25) | nein | ja |
| St. IBI | T1b1 N0 M0 | G2 | gering differenziert | negativ (0/23) | nein | ja |
| St. IIIB | T1b2 N1 M0 | G3 | nicht verhornend | positiv (2/39) | nein | ja |
| St. IIIB | T2b N1 M0 | G2 | verhornend | positiv (2/40) | nein | ja |
| St. - | T2b N0 Mx | G3 | verhornend | negativ (0/38) | nein | ja |
| St. IBI | T1b1 N0 M0 | G2 | nicht verhornend | negativ (0/47) | ja | ja |
| St. IIIB | T2a N1 M0 | G3 | nicht verhornend | positiv (3/25) | nein | ja |
| St. IB | T1b N0 M0 | G3 | nicht verhornend | negativ (0/15) | ja | ja |
| St. IIA | T2a N0 M0 | G2 | verhornend | negativ (0/21) | ja | ja |

Tab. 10 Zusammenfassung der Charakteristika der 17 PCR-positiven Patientinnen.

| FIGO | TNM | Grading | Plattenepithel-Karzinom-Subtyp | Lymphknoten-Status | Beidseitige Adnexektomie | ESR1-Promotor |
|----------|------------|---------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------|------------------|
| St. IIIB | T2b N1 M0 | G2 | nicht verhornend | positiv | ja | nicht methyliert |
| St. IIIB | T3b N1 Mx | nicht bekannt | nicht verhornend | positiv | ja | methyliert |
| St. IIB | T2b N0 M0 | G2 | nicht verhornend | negativ | ja | nicht methyliert |
| St. IBI | T1b1 N0 M0 | G2 | nicht verhornend | negativ | nein | nicht methyliert |
| St. IIB | T2b N0 M0 | G2 | verhornend | negativ | ja | nicht methyliert |

Tab. 11 Charakteristika der Patientinnen im Kollektiv, die verstorben sind. Der vierte Fall ist in der Kaplan-Meier-Kurve zensiert.

4 Diskussion

1.1 Repräsentativität des Kollektivs

Um allgemeine Aussagen über onkogenetische Einfluss- oder Risikofaktoren für eine bestimmte Tumorentität zu treffen, ist es wichtig zu wissen, in wie weit das ausgewählte Kollektiv der Gesamtpopulation entspricht. Die hier angeführten epidemiologischen Daten für Prävalenzen und Überlebensdaten beim Zervixkarzinom stammen von der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) und werden uns zur Abschätzung unseres Kollektivs dienen⁵⁵.

Als Erstes ist von Interesse, wie alt unsere Patientinnen bei Diagnose waren, da das Zervixkarzinom eine Tumorentität ist, die früher als andere gynäkologische Malignome auftritt und zusätzlich das Erkrankungsalter sich um 15 Jahre in den letzten 25 Jahren aufgrund konsequenter Vorsorge reduziert hat. Laut AWMF liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 53 Jahren, die höchsten Erkrankungsraten liegen derzeit für 40- bis 59-jährige Frauen. In unserem Kollektiv liegt das Alter bei Diagnose bei 46,5 Jahren. Damit wären die Patientinnen 8,5 Jahre jünger als der Durchschnitt in der Normalbevölkerung. Wenn man sich die Altersverteilung in unserer Studie ansieht, macht die Gruppe der 30- bis 39-Jährigen den größten Anteil aus. Das frühere Erkrankungsalter unseres Kollektivs könnte mit der besseren medizinischen Versorgung in einer Großstadtbevölkerung zusammenhängen, die Neuerkrankungen früher detektiert. Wenn man die 40- bis 59-Jährigen als eine Gruppe zusammenfasst, würde sie trotzdem wie oben angegeben den normkonform größten Teil mit 45,5% ausmachen. Dagegen wären nur 36,4% der Patientinnen jünger und 18,2% älter.

Laut Angaben der AWMF von den Jahren 2009-2010 präsentieren sich die Patientinnen bei Erstdiagnose in den folgenden Stadien: 62% im Stadium T1, 25% im Stadium T2, 8% im Stadium T3 und 6% im Stadium T4. In unserer Studie sind 21 Patientinnen im Stadium T1 (47,7%), 21 im Stadium T2 (47,7%) und 2 im Stadium T3 (4,6%), keine war dem Stadium T4 zuzuordnen. Die Ursache, dass mehr als 95% der Patientinnen den lokalen Tumorstadien T1 und T2 ohne Ausbreitung auf die Beckenwand angehören, ist darauf zurückzuführen, dass die Patientinnen in unserem Kollektiv operiert waren und sich deswegen in einem "operablen" Stadium befinden. Patientinnen, die einzig Radiochemotherapie aufgrund fortgeschrittener Stadien erhalten haben, wurden dementsprechend nicht eingeschlossen und die Gruppe im Stadium T3 bis T4 fällt entsprechend mit 4,6% klein aus (vs. 14% in der Normalbevölkerung). Warum dennoch Patientinnen dieser Gruppe (T3/T4) operiert wurden, ist wie im Kapitel "Therapie" erwähnt, darauf zurückzuführen, dass man prinzipiell jedes T-Stadium operieren kann - im T3 solange keine Ausbreitung auf die Beckenwand vorliegt (weil das technisch sehr schwierig ist) und im T4 dank aufwendiger Blasen- und Rektum-Rekonstruktionstechniken. Bei einer der

beiden T3-Patientinnen in unserer Studie wurde zusätzlich eine vordere Exenteration im Sinne einer radikalen Zystektomie und Anlage einer Neoblase durchgeführt, was eigentlich einen Blasen-Befall und ein T4-Stadium suggeriert - der Anteil der Patienten in den Stadien T3 plus T4 würde sich dann aber trotzdem nicht verändern.

Ein wichtiges Populationsmerkmal, das sich vor allem aus dem hohen Standard der medizinischen Versorgung in den Industrieländern ableitet und erheblich von den Ergebnissen in den Entwicklungsländern unterscheidet, ist die Überlebensrate. Die Daten, auf die sich die AWMF bezieht, sind aus dem Bayerischen Krebsregister und die folgenden nach Stadium berechneten 10-Jahresüberlebensraten beziehen sich auf den Zeitraum von 1988 bis 2011 ⁵⁵: 93% für Stadium UICC I (T1 N0 M0), 71% für Stadium UICC II (T2 N0 M0), 51% für Stadium UICC III (T3 N0 M0 oder T1-3 N1 M0), 16% für UICC IV (T4 N0 M0, T4 N1 M0 oder Tx Nx M1). Da die Stadieneinteilung der *Union internationale contre le cancer* (UICC) der FIGO-Klassifikation entspricht, haben wir einen direkten Vergleich angestellt und aufgrund geringer Fallzahl Stadien zusammengefasst. Bei mittlerer Beobachtungsdauer von 9,32 Jahren starb 1 Patientin von den 21 Patientinnen im FIGO-Stadium I-II und 2 Patientinnen im FIGO-Stadium III-IV - entsprechende Überlebensraten sind 95,2% für FIGO I-II und 87% für FIGO III-IV. Die beiden anderen Patientinnen, die verstorben sind, können nicht berücksichtigt werden, da bei einer das FIGO-Stadium und bei der anderen das genaue Sterbedatum nicht bekannt ist. Warum die Raten so unterschiedlich ausfallen (bei uns höhere Überlebensraten), liegt mit Sicherheit daran, dass wir in unserer Studie eine geringe Zahl von Patientinnen untersucht haben. Außerdem kann es sein, dass ein operables Patientenkollektiv wie unser per se eine geringere Mortalität haben könnte und bei gleichem Tumorgrad deswegen eine bessere Prognose hat. Das bessere Überleben unserer Patientinnen in den Stadien FIGO I-II (als das vom AWMF angegebene) kann auf jeden Fall nicht an der operativen Therapie des Kollektivs liegen, da bewiesen ist, dass in den Stadien FIGO IB-II eine primäre Radio-Chemotherapie im Falle geringen Allgemeinzustandes durchgeführt werden kann und gleichwertige Ergebnisse (wie die operative Therapie) liefert ⁵⁵.

Nach Evaluation der histopathologischen Befunde unserer Gruppe haben wir wie erwartet eine Mehrzahl an Plattenepithelkarzinomen feststellen können - 43 der 44 Patientinnen sind an einem Plattenepithelkarzinom erkrankt, was mit einer Prävalenz von 97,7% deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten von 75-80% liegt ¹²⁸, ¹²⁹. Bei der Patientin, die kein Plattenepithelkarzinom hat, handelt es sich um einen schlecht differenzierten Tumor. Wir haben in unserer Studie keinen Fall eines Adenokarzinoms, welches statistisch mit einer Häufigkeit von 15% bis 20% auftritt ¹²⁹. Diese Entität wäre allerdings von Interesse gewesen, da SERMs primär eine Wirkung auf das Endometrium zeigen (Tamoxifen steigert das Risiko eines Endometriumkarzinoms) und eventuell diese Art von Tumoren eher unter hormonalem Einfluss stehen würde als das Plattenepithelkarzinom. Eine

mögliche Erklärung dafür, dass wir keine Patientin mit dieser Tumorentität haben, ist dass Adenokarzinome seltener vorkommen, durch ihren intrazervikalen Sitz schwerer zugänglich sind und trotz Vorsorgeuntersuchungen später entdeckt werden. Fortgeschrittene Karzinome werden aber seltener einer operativen Therapie zugeführt und bleiben somit aus unserem Kollektiv ausgeschlossen. Im Übrigen könnten alle Parameter, die durch die Selektion in Bezug auf die operative Therapie beeinflusst sind, störfaktorfrei an Biopsiepräparaten statt an Operationspräparaten untersucht werden. Darüber hinaus, kann sich auch die geringe Zahl an Patientinnen in unserer Studie darin äußern, dass kein Fall mit Adenokarzinom vorliegt.

Für unser Follow-Up war außerdem wichtig die Rezidive zu ermitteln, was sich allerdings aufgrund der alten Daten und der meist nicht in elektronischer Form vorliegenden Patienteninformationen schwierig gestaltete. Soweit Rezidive bestehen, sind sie immer Patientinnen zuzuordnen, die gestorben sind - insgesamt sind 3 Rezidive bestätigt und die Patientinnen sind im Verlauf gestorben. Umgekehrt war es schwierig zu eruieren, woran die Patientinnen tatsächlich gestorben sind. Insgesamt sind 5 Patientinnen verstorben, bei 3 von ihnen liegt wie bereits erwähnt ein bestätigtes Rezidiv vor, so dass eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass sie am Zervixkarzinom verstorben sind. Bei den restlichen zwei Patientinnen ist nicht eruierbar, ob sie ein Rezidiv hatten - die eine Patientin hatte als Nebenerkrankung ein Bronchialkarzinom und einen Nierenbeckentumor. Die zweite Patientin hatte kein Rezidiv, bei ihr wurde allerdings 2 Jahre nach der Zervixkarzinom-Diagnose ebenfalls ein Bronchialkarzinom diagnostiziert und sie ist 5 Monate später verstorben. Bei diesen beiden Fällen ist es sehr wahrscheinlich, dass die Sterbeursache nicht das Zervixkarzinom ist.

Bei der Erstellung der Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben abhängig vom Methylierungsstatus des ESR1-Promtors sind nur 4 der Todesfälle berücksichtigt, da bei der einen Patientin das genaue Sterbedatum nicht bekannt ist. Diese Patientin weist einen nicht methylierten ESR1-Promotor auf, so dass (wenn alle Sterbefälle berücksichtigt werden) in den Proben von 4 von 5 verstorbenen Patientinnen schlussendlich ein nicht methylierter ESR1-Promotor vorliegt. Eine bessere Aussagekraft wäre mit Sicherheit bei größerer Patientenzahl möglich, da das Zervixkarzinom (vor allem die operablen Stadien) mit relativ guter Prognose assoziiert ist und man mehr Patientinnen braucht, um eine relevante Ereigniszahl (Rezidive, Todesfälle) zu beobachten. Wenn man in einer Studie die Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien ohne operative Therapie (mit alleiniger Radiochemotherapie) mitberücksichtigen würde (beispielsweise durch Biopsieuntersuchungen), würde die Ereigniszahl auch höher ausfallen.

4.2 Ergebnisinterpretation

Das Östrogen und sein Rezeptor ER α haben eine unklare Funktion in der Onkogenese des Zervixkarzinoms. Erste vage Zusammenhänge ergaben sich aus der Tatsache, dass Multiparität und orale Kontrazeptiva das Risiko dieser Erkrankung erhöhen¹⁹ und Mausmodelle die Notwendigkeit des Östrogens und seines Rezeptors ER α für die Entwicklung von Zervixmalignomen in HPV-transgenen Mäusen bestätigen¹¹². Trotz der vielversprechenden Behandlung von solchen Mäusen mit Östrogenrezeptorantagonisten (Fulvestrant) oder SERMs (Raloxifen) in der Studie von Chung et al.¹¹⁷, konnte allerdings eine therapeutische Wirkung weder für Tamoxifen noch für Raloxifen in klinischen Studien beim Menschen nachgewiesen werden¹¹⁸. Die gegenteilige Vorstellung vom ER α als Tumorsuppressorgen, das laut Studien in 32% bis 74% der Fälle mit Zervixkarzinom methyliert ist^{91, 95}, lässt schlussendlich ungeklärt, welche ER α -vermittelte Wirkung Östrogen in vivo am Zervixepithel im humanen Gewebe hat.

Da das Zervixgewebe vor allem über ER α und nicht über ER β hormonell reguliert wird und sein ESR1-Promotor in einem Anteil der Zervixkarzinome methyliert vorliegt, wollten wir mit unserer Studie die klinische Relevanz dieser Methylierung ermitteln, indem wir deren Korrelation mit Parametern wie histopathologischem Befund, Stadium, Grading, BMI und Überleben untersuchen. Für die Versuchsanstellung haben wir die Methode der methylierungsspezifischen Real-time PCR angewandt, die eine präzisere quantitative Aussage als die klassische PCR zulässt. Das, was wir feststellen können ($p < 0,05$), ist dass Tumoren mit ESR1-Promotor-Methylierung signifikant häufiger schlecht differenziert sind und ein G3-Differenzierungsgrad zeigen - trotzdem weisen solche Patientinnen mit methyliertem Promotor (und meist G3-Status) wie oben ausgeführt keinen Überlebensnachteil auf. Eine weitere Korrelation mit dem FIGO-Stadium, der Histopathologie und dem BMI-Index lässt sich ebenfalls nicht ermitteln.

Bis jetzt beschäftigte sich noch Müller et al. mit der klinischen Relevanz einer Gen-Methylierung im Zervixkarzinom, allerdings für eine Anzahl von 25 Genen (darunter ESR1-Promotor), und stellte fest, dass ein dem Normalgewebe ähnliches Methylierungsmuster in Zervixkarzinomen ein besseres Überleben zeigt⁹⁵. Dass sich unsere Ergebnisse diesbezüglich unterscheiden, liegt sicher daran, dass wir nur ein Gen untersucht haben und ein Methylierungsmuster von einer Reihe von Genen sensitiver Unterschiede zwischen Normal- und Zervixkarzinomgewebe sowie in der Klinik (Gesamtüberleben) aufzeigt. Wir können ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen der Methylierung des ESR1-Promotors und dem FIGO-Stadium nachweisen - das spricht dafür, dass es keine stadiumabhängige obligate Genmodifikation im ESR1-Promotor-Bereich in der Onkogenese des Zervixkarzinoms gibt und die ESR1-Promotormethylierung nicht als Parameter einer fortschreitenden malignen

Entartung angesehen werden kann. Und das obwohl die Gesamtmethylierung des Genoms mit Progredienz der Erkrankung laut Müller et al. zunimmt.

Für ein einzelnes Gen konnte bis jetzt ein signifikanter Unterschied im Überleben nur durch Widschwendter et al. nachgewiesen werden, der die Methylierung von einer Reihe von Genen im Serum und in den Tumoren von Patientinnen untersucht hat (CALCA, hTERT, MYOD 1, PGR, TIMP3) - nur die Patientinnen mit unmethyliertem MYOD 1 im Serum zeigten signifikant besseres Überleben, die Methylierung der anderen Gene zeigte keinen signifikanten Unterschied¹³⁰. Unsere Studie weist zwar nach, dass die Methylierung des Promotors mit schlecht differenzierten G3-Tumoren assoziiert ist aber trotzdem nicht mit einer schlechten Prognose für das Gesamtüberleben verbunden ist - so bleibt die MYOD 1-Genmethylierung als Einzelfall mit klinischer Bedeutung auf das Gesamtüberleben in der Literatur.

Da das Zervixkarzinom eine Erkrankung ist, deren Entdeckung im Screening stark an Bedeutung zugenommen hat, beschäftigen sich andere Studien vor allem aber auch mit der Bedeutung der Methylierung für die Vorsorge und sekundäre Prävention und nicht nur mit der Prognose und Überleben bei einer bereits eingetretenen Erkrankung. So beweist Wisman et al., dass ein Panel von 4 methylierten Genen (CALCA, DAPK, ESR1 und TIMP3) eine vergleichbare Potenz mit den etablierten Screeningverfahren hat - bei gleicher Sensitivität (Sensitivität von 89% vs. 89% bei Zytologie und 90% bei HR-HPV-Nachweis) und besserer Spezifität (Spezifität von 100% vs. 83% bei Zytologie und 68% bei HR-HPV-Nachweis)⁹¹. Diese Studie schließt allerdings eine große Anzahl von Adenokarzinomen ein (33.3%), was einen direkten Vergleich zu unseren Ergebnissen schwierig macht. Zusätzlich berücksichtigt sie weder klinische Parameter noch Outcome wie oben bereits erwähnt. Außerdem kann sie eine präventive Bedeutung einer Ein-Gen-Untersuchung nicht zeigen.

Eine interessante Beobachtung ergibt sich aus der Tatsache, dass Patientinnen mit Adnexektomie ein schlechteres Überleben zeigen. Die Annahme, dass diese Patientinnen radikaler aufgrund höherer FIGO-Stadien oder positiver Lymphknoten operiert wurden, bestätigt sich nicht. Es zeigt sich, dass bei allen in der Überlebenskurve berücksichtigten Sterbefällen zugleich eine beidseitige Adnexektomie anamnestisch vorlag. Das heißt, alle verstorbenen Patientinnen hatten eine erwartungsgemäß geringere endogene Östrogenproduktion als Frauen im prämenopausalen Status und der Methylierungsstatus des Östrogenrezeptors bei mangelnder endogener Aktivierung unerheblich für das Ableben / die schlechte Prognose wäre. In dem Fall wäre ein postmenopausaler Status mit niedrigen Östrogenspiegeln und ein relativer Östrogenmangel ein schlechter Prognosefaktor und würde für eine tumorsuppressive Wirkung dieses Hormons sprechen. Eine solche Vermutung würde einerseits im Gegensatz zur onkogenen Wirkung des Östrogens im Mausmodell stehen¹¹⁷, andererseits wird sie durch den fehlenden Einfluss von Östrogenrezeptorantagonisten (Fulvestrant) oder SERMs (Raloxifen) auf das maligne Zervixgeschehen widerlegt.

Der ineffektive Hormon-/Antihormon-Therapieansatz treibt die Wissenschaft zu einem Versuch der epigenetischen Behandlung mit demythisierenden Agenzien wie Hydralazin. Für Letzteres wurde von Song et al. nachgewiesen, dass es die Methylierung des Tumorsuppressorgens APC (Adenomatöse Poliposis Coli) rückgängig macht und die Apoptose in Tumorzelllinien von Zervixkarzinomen einleitet (*HeLa, CaSki, SiHa*)⁹⁷. Diese Erkenntnisse konnten auf den Menschen übertragen werden und so zeigte Coronel et al., dass Hydralazin und Valproat zusätzlich zur Standardchemotherapie signifikant das progressionsfreie Überleben erhöhen - 10 Monate vs. 6 Monate⁹⁹. Eine neue Studie von Mani et al. zeigt zusätzlich, dass Hydralazin und Valproat die Toxizität einer Radiochemotherapie mit Cisplatin nicht erhöhen allerdings deren Radiosensitivität¹³¹ - was wahrscheinlich durch die stärker ausgeprägte Apoptoseneigung erklärt wird⁹⁷. Der Effekt auf das Gesamtüberleben ist allerdings nicht evaluiert, sodass die epigenetische Therapie bis heute eher marginale Vorteile aufzeigt und weiterer Studien zur Etablierung bedarf.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Laut der Ergebnisse unserer Studie hat die Methylierung des ESR1-Promotors keine prognostische Bedeutung für den klinischen Verlauf des Zervixkarzinoms. Weder das Gesamtüberleben noch Tumorstadium korrelieren mit der epigenetischen Modifikation des Östrogenrezeptor-Promotors. Eine Reihe von klinischen Faktoren, darunter Erkrankungsalter und der BMI-Index, stehen ebenfalls in keinem Zusammenhang damit. Die einzige signifikante Beobachtung ist, dass ein methylierter ESR1-Promotor häufiger mit schlecht differenzierten G3-Tumoren assoziiert ist. Das spiegelt sich allerdings nicht in der Prognose wieder. Unsere Studie stößt an ihre Grenze vor allem aufgrund der geringen Zahl der Patientinnen bei einem Tumor mit guter Prognose in den operablen Stadien (das bedeutet geringe Zahl an Ereignissen/Rezidiven). Ein Konzept für mehr Informationsgewinn wäre die Untersuchung des Promotors in Biopsien (um auch fortgeschrittene inoperable Stadien zu erfassen) und eine größere Zahl an Patientinnen einzuschließen.

Zusammenfassend schlussfolgern wir, dass die ESR1-Methylierung mit niedrigdifferenzierten Tumoren einhergeht und sich der Nachweis eines Überlebensnachteils aufgrund geringer Fallzahlen nicht darstellen lässt. In Bezug auf künftige epigenetische Therapieansätze und möglichen Benefit von Patientinnen mit ESR1-Methylierung (und undifferenzierten Tumoren) durch Behandlung mit demethylierenden Agenzien könnte sich allerdings eine umfangreichere Studie positiv auf die Erkenntnisse für den klinischen Alltag auswirken. Bis dahin bleibt die Untersuchung von einer Mehrzahl an Genen (Gen-Panels) für Präventionszwecke ein vielversprechenderes Einsatzgebiet für epigenetische Tests.

6 Literaturverzeichnis

1. Dürst M, Backsch C, Kaufmann AM, Schneider A. Ätiologie und Pathogenese des Zervixkarzinoms. *Der Gynäkologe* 2003;36(4):282–8.
2. Kaatsch P, Spix C, Hentschel S. Krebs in Deutschland 2009/2010 [Internet]. 2013. Available from: <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=3479>
3. Fleisch MC, Scholz C, Rein DT, Janni W. Zervixkarzinom. *Der Gynäkologe* 2011;44(9):694–700.
4. Schneider A, Kaufmann AM, Köhler C, Marnitz S. Zervixkarzinom. 2010;1038–68.
5. Gossmann S, Oetting G, Kreienberg R. Cervix uteri, Kapitel 27. 2013;437–65.
6. Bodily J, Laimins LA. Persistence of Human Papillomavirus infections: keys to malignant progression. *Trends in Microbiology* 2011;19(1):33–9.
7. Robert Koch Institut. Mitteilung der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert-Koch-Institut: Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren - Empfehlung und Begründung. 2007.
8. Alp Avci G. Genomic organization and proteins of human papillomavirus. *Mikrobiyoloji bulteni* 2012;46(3):507–15.
9. Kajitani N, Schwartz S. RNA Binding Proteins that Control Human Papillomavirus Gene Expression. *Biomolecules* 2015;5(2):758–74.
10. Goia CD, Iancu IV, Socolov D, Botezatu A, Lazaroiu A M, Huica I, Plesa A AG. The expression of cell cycle regulators in HPV - induced cervical carcinogenesis. *Romanian Biotechnological Letters* 2010;15(4).
11. A. Feige W. Würfel, J. Jawny and A. Rohde AR. *Frauenheilkunde Fortpflanzungsmedizin - Geburtsmedizin Onkologie - Psychosomatik*. 2005;
12. Hampl M. Vermeidung und Therapie HPV-assoziiertes Erkrankungen durch Vakzinationsprogramme. *Der Gynäkologe* 2006;39(2):122–33.
13. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia-Grade 2. *Obstet Gynecol* 2009;113(1):18–25.
14. Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clinical Cancer Research* 2005;11(13):4717–23.
15. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *International Journal of Cancer* 2014;135:453–66.
16. Ene L, Voinea C, Stefanescu C, Sima D, Duiculescu D, Mehta SR. Cervical HPV infection in Romanian women infected with HIV during early childhood. *International Journal of STD & AIDS*
17. Tanaka Y, Ueda Y, Kakuda M, et al. Clinical outcomes of abnormal cervical cytology and human papillomavirus-related lesions in patients with organ transplantation: 11-year experience at a single institution. *International Journal of Clinical Oncology* 2015;(Dec):1–5.
18. Dugue P-A, Rebolj M, Hallas J, Garred P, Lynge E. Risk of cervical cancer in women with autoimmune diseases, in relation with their use of immunosuppressants and screening: population-based cohort study. *International Journal of Cancer* 2015;136(6):E711–9.

19. Vanakankovit N, Taneepanichskul S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer. *Journal of The Medical Association of Thailand* 2008;91(1):7–12.
20. Hillemanns P. HPV-Impfungen. *Der Gynäkologe* 2009;42(10):750–6.
21. Paavonen J, Naud P, Salmerón J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *The Lancet* 2009;374(9686):301–14.
22. Munoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, et al. Impact of Human Papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 Vaccine on All HPV-Associated Genital Diseases in Young Women. *Journal of the National Cancer Institute* 2010;102(5):325–39.
23. The FUTURE II Study Group. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. *The New England Journal of Medicine* 356(19):1915–27.
24. Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 1. September 2014/Nr. 35. Neuerungen in den aktuellen Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am RKI vom August 2014. 35.
25. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States. *Journal of the Medical Association* 2007;297(8):813–9.
26. Tiggelaar SM, Lin MJ, Viscidi RP, JJSJ. Age-Specific Human Papillomavirus Antibody and DNA Prevalence: A Global Review. *Journal of Adolescent Health* 2012;50(2):110–31.
27. Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, et al. Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *Journal of the Medical Association* 2007;298(7):743–53.
28. Gossmann S, Oetling G, Kreienberg R. *Cervix uteri*. 2013;437–65.
29. Sprenger E, Schwarzmann P, Kirkpatrick M, et al. The false negative rate in cervical cytology. Comparison of monolayers to conventional smears. *Acta cytologica* 1996;40(1):81–9.
30. Griesser H, Marquardt K, Schenck U, Neis K, Kühn W, Neumann HH, Jordan B, Steiner M, Bollmann R PB. *Münchener Nomenklatur III für die gynäkologische Zytodiagnostik der Zervix*. 2014;1–12.
31. Schneider A, Knebel-Doerberitz M, Muth C, Kühn W, Keyserling H. Sekundäre Prävention des Zervixkarzinoms: aktueller Stand der Diagnostik. *Der Gynäkologe* 2007;40(5):377–88.
32. Cuzick J, Clavel C, Petry K-U, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International Journal of Cancer* 2006;119:1095–101.
33. Saslow D, Solomon D et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *Cancer Journal for Clinicians* 2012;62(3):147–72.
34. Katki H, Kinney W, Fetterman B. Cervical Cancer Risk for 330,000 Women Undergoing Concurrent HPV Testing and Cervical Cytology in Routine Clinical Practice at a Large Managed Care Organization. *Lancet Oncol* 2011;12(7):663–72.

35. Castellsagué X, Díaz M, Sanjosé S De, et al. Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical Adenocarcinoma and Its Cofactors: Implications for Screening and Prevention. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98(5):303–15.
36. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecologic Oncology* 2005;99(3 Suppl 1):S7–11.
37. Mariani L, Sandri MT, Preti M, et al. HPV-Testing in Follow-up of Patients Treated for CIN2+ Lesions. *Journal of Cancer* 2016;7(1):107–14.
38. Yim E-K, Park J-S. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association* 2005;37(6):319–24.
39. Mclaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses. *Virus Res* 2010;143(2):195–208.
40. Benevolo M, Mottolèse M, Marandino F, et al. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology* 2006;19(3):384–91.
41. Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Lea O. Induction of pRb Degradation by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein Is Essential To Efficiently Overcome p16 INK4a-Imposed G1 Cell Cycle Arrest. *Journal of Virology* 2001;75(10):4705–12.
42. Klaes R, Friedrich T SD et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276–84.
43. Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology* 2004;445(6):616–20.
44. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL Pap cytology results. *American Journal of Clinical Pathology* 2010;134:12–21.
45. Cattani P, Zannoni GF, Ricci C, et al. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47(12):3895–901.
46. Lie AK, Risberg B, Borge B, et al. DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecologic Oncology* 2005;97(3):908–15.
47. Molden T, Nygård JF, Kraus I, et al. Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-Proofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *International Journal of Cancer* 2005;114:973–6.
48. Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie H a. Human Papillomavirus Type Specific DNA and RNA Persistence - Implications for Cervical Disease Progression and Monitoring. *Journal of Medical Virology* 2004;73:65–70.
49. Jentschke M, Soergel P, Hillemanns P. Neue Biomarker in der Prävention des Zervixkarzinoms. *Der Gynäkologe* 2013;

50. Mehlhorn G, Hautmann SK, Koch MC, et al. HPV16-L1-specific antibody response is associated with clinical remission of high-risk HPV-positive early dysplastic lesions. *Anticancer Research* 2014;34(9):5127–32.
51. Qiao L, Li B, Long M, Wang X, Wang A, Zhang G. Accuracy of visual inspection with acetic acid and with Lugol's iodine for cervical cancer screening: Meta-analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2015;41(9):1313–25.
52. Sankaranarayanan R SJ. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. World Health Organization - International Agency for Research on Cancer (IARC) 2003;1–132.
53. Berrington De González A, Green J. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *International Journal of Cancer* 2007;120(4):885–91.
54. Schmidt D, Horn LC, Kommos F. Histopathology of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Pathologe* 2005;26(4):255–61.
55. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) DK e. V (DKG) und DK e. V (DKH). S3-Leitlinie Diagnostik , Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom. 2014;1–74.
56. Tunio MA, Asiri M Al, Mohamed R, Al-dandan S. Case Report Supraclavicular Lymphadenopathy : Initial Manifestation of Metastasis in Carcinoma of Cervix. Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Obstetrics and Gynecology 2013;4–6.
57. Pandey D, Shetty J, Sambhaji C, Saxena PU, Mishra D, Chawla A. Cervical Cancer as a silent killer: A rare case report with review of literature. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2015;11(3):653.
58. Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *International Journal of Gynecology and Obstetrics: The Official Organ of The International Federation of Gynecology and Obstetrics* 2009;105(2):107–8.
59. Mota F. Microinvasive squamous carcinoma of the cervix: treatment modalities. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 2003;82(6):505–9.
60. Rogers LJ, Luesley DM. Stage IA2 cervical carcinoma: how much treatment is enough? *International Journal of Gynecological Cancer : Official Journal of The International Gynecological Cancer Society* 2009;19(9):1620–4.
61. Biliatis I, Kucukmetin A, Patel A, et al. Small volume stage 1B1 cervical cancer: Is radical surgery still necessary? *Gynecologic Oncology* 2012;126(1):73–7.
62. Musaev A, Guzel AB, Khatib G, et al. Assessment of primary radical hysterectomy and neoadjuvant chemotherapy followed by radical hysterectomy in Stage IB2, IIA bulky cervical cancer. *European Journal of Gynecological Oncology* 2015;36(5):579–84.
63. Becker S, Henes M. Diagnostik und Primärtherapie des Zervixkarzinoms. *Der Gynäkologe* 2012;45(5):391–405.
64. Marnitz S, Kohler C, Muller M, Behrens K, Hasenbein K, Schneider A. Indications for primary and secondary exenterations in patients with cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2006;103(3):1023–30.
65. Shimada M, Kigawa J, Nishimura R, et al. Ovarian metastasis in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology* 2006;101(2):234–7.
66. Höckel M. Totale mesometriale Resektion (TMMR). *Der Gynäkologe* 2008;41(5):361–8.

67. Gupta, MK, Revannasiddaiah S, Thakur P, Sharma M PK. Prognostic Factors for Carcinoma of the Uterine Cervix Treated with Concurrent-Chemoradiotherapy. *Global Journal of Oncologist* 2013;1:50–70.
68. Ayhan A, Al RA, Baykal C, Demirtas E, Yüce K AA. A comparison of prognoses of FIGO stage IB adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *International Journal of Gynecological cancer : Official Journal of The International Gynecological Cancer Society* 2004;14(2):279–85.
69. Sodsanrat K, Saeai N, Liabsuetrakul T. Comparison of Clinical Manifestations and Survival Outcomes between Neuroendocrine Tumor and Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix: Results from a Tertiary Center in Southern Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2015;98(8):725–33.
70. Feng S-Y, Zhang Y-N, Liu J-G. Risk factors and prognosis of node-positive cervical carcinoma. *Chinese Journal of Cancer* 2005;24(10):1261–6.
71. Dehan P, Kustermans G, Guenin S, Horion J, Boniver J, Delvenne P. DNA methylation and cancer diagnosis: new methods and applications. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2009;9(7):651–7.
72. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine* 2003;349(21):2042–54.
73. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 2005;2:4–11.
74. Dueñas-González A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer* 2005;4:38.
75. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002;21(35):5400–13.
76. Fanelli M, Caprodossi S, Ricci-Vitiani L, et al. Loss of pericentromeric DNA methylation pattern in human glioblastoma is associated with altered DNA methyltransferases expression and involves the stem cell compartment. *Oncogene* 2008;27(3):358–65.
77. Esteller M. Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine* 2008;358(11):1148–59.
78. Ghavifekr Fakhr M, Farshdousti Hagh M, Shanehbandi D, Baradaran B. DNA methylation pattern as important epigenetic criterion in cancer. *Genetics Research International* 2013;
79. Wagner JM, Hackanson B, Lübbert M, Jung M. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clinical Epigenetics* 2010;1(3-4):117–36.
80. Yang H-J. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. *Chinese Journal of Cancer* 2013;32(1):42–8.
81. Badal V, Chuang L, Tan E, Badal S. CpG Methylation of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Cancer Cell Lines and in Clinical Specimens: Genomic Hypomethylation Correlates with Carcinogenic Progression. *Journal of Virology* 2003;77(11):6227–34.
82. Kalantari M, Calleja-macias IE, Tewari D, et al. Conserved Methylation Patterns of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Asymptomatic Infection and Cervical Neoplasia. *Journal of Virology* 2004;78(23):12762–72.
83. Turan T, Kalantari M, Calleja-Macias IE, et al. Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: A biomarker of neoplastic progression? *Virology* 2006;349(1):175–83.

84. Shivapurkar N, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *International Journal of Cancer* 2004;109(5):786–92.
85. Guilleret I, Yan P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT, Benhattar J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *International Journal of Cancer* 2002;101(4):335–41.
86. Widschwendter A, Muller HM, Hubalek MM, et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2004;93(2):407–16.
87. Liu SS, Leung RC, Chan KY, Chiu P, Cheung AN, Tam K. p73 Expression Is Associated with the Cellular Radiosensitivity in Cervical Cancer after Radiotherapy p73 Expression Is Associated with the Cellular Radiosensitivity in Cervical Cancer after Radiotherapy. *Clinical Cancer Research* 2004;10:3309–16.
88. Overmeer RM, Henken FE, Snijders PJF, et al. Association between dense CADM1 promoter methylation and reduced protein expression in high-grade CIN and cervical SCC. *The Journal of Pathology* 2008;215(4):388–97.
89. Cohen Y, Singer G, Lavie O. The RASSF1A Tumor Suppressor Gene Is Commonly Inactivated in Adenocarcinoma of the Uterine Cervix. *Clinical Cancer Research* 2003;9(410):2981–4.
90. Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, et al. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97(4):273–82.
91. Wisman GB, Nijhuis ER, Hoque MO, et al. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. *International Journal of Cancer* 2006;119(8):1908–14.
92. Lin CJ, Lai H-C, Wang KH, et al. Testing for methylated PCDH10 or WT1 is superior to the HPV test in detecting severe neoplasms (CIN3 or greater) in the triage of ASC-US smear results. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2011;204(1):21.e1–7.
93. Chao T-K, Ke F-Y, Liao Y-P, Wang H-C, Yu C-P, Lai H-C. Triage of cervical cytological diagnoses of atypical squamous cells by DNA methylation of paired boxed gene 1 (PAX1). *Diagnostic Cytopathology* 2013;41(1):41–6.
94. Eijsink JJH, Lendvai A, Deregowski V, et al. A four-gene methylation marker panel as triage test in high-risk human papillomavirus positive patients. *International Journal of Cancer* 2012;130(8):1861–9.
95. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. A DNA methylation pattern similar to normal tissue is associated with better prognosis in human cervical cancer. *Cancer Letters* 2004;209(2):231–6.
96. Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zochbauer-mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Aberrant Methylation during Cervical Carcinogenesis. *Clinical Cancer Research* 7:584–9.
97. Song Y, Zhang C. Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2009;63(4):605–13.
98. Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, et al. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer* 2005;5:44.

99. Coronel J, Cetina L, Pacheco I, et al. A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 2011;28 Suppl 1:540–6.
100. Acconcia F, Kumar R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Letters* 2006;238(1):1–14.
101. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2006;116(3):561–70.
102. Gibson DA, Saunders PT. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012;348(2):361–72.
103. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2004;50(1):3–22.
104. Agarwal G, Nanda G, Lal P, et al. Outcomes of Triple-Negative Breast Cancers (TNBC) Compared with Non-TNBC: Does the Survival Vary for All Stages? *World Journal of Surgery* :1–11.
105. Martínez-Galán J, Torres-Torres B, Núñez MI, et al. ESR1 gene promoter region methylation in free circulating DNA and its correlation with estrogen receptor protein expression in tumor tissue in breast cancer patients. *BMC Cancer* 2014;14:59.
106. Giacinti L, Claudio P, Lopez M. Epigenetic Information and Estrogen Receptor Alpha Expression in Breast Cancer. *The Oncologist* 2006;11:1–8.
107. Chung SH, Franceschi S, Lambert PF. Estrogen and ERalpha: Culprits in Cervical Cancer? *Trends Endocrinol Metab* 2010;21(8):504–11.
108. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: The IARC multicentric case-control study. *The Lancet* 2002;359(9312):1085–92.
109. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: The IARC multicentric case-control study. *The Lancet* 2002;359(9312):1093–101.
110. Brake T, Connor JP, Petereit DG, Lambert PF. Comparative Analysis of Cervical Cancer in Women and in a Human Papillomavirus-Transgenic Mouse Model : Identification of Minichromosome Maintenance Protein 7 as an Informative Biomarker for Human Cervical Cancer. *Cancer Research* 2003;(63):8173–80.
111. Jabbar S, Strati K, Shin MK, Pitot HC LP. Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Act Synergistically to Cause Head and Neck Cancer in Mice. *Virology* 2010;407(1):60–7.
112. Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 2005;102(7):2490–5.
113. Chung SH, Wiedmeyer K, Shai A, Korach KS, Lambert PF. Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Research* 2008;68(23):9928–34.
114. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology* 2005;19(4):833–42.

115. Bigler LR, Tate Thigpen J, Blessing JA, Fiorica J, Monk BJ. Evaluation of tamoxifen in persistent or recurrent nonsquamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of The International Gynecological Cancer Society* 2004;14(5):871–4.
116. Polin SA, Ascher SM. The effect of tamoxifen on the genital tract. *Cancer Imaging* 2008;8(1):135–45.
117. Chung SH, Lambert PF. Prevention and treatment of cervical cancer in mice using estrogen receptor antagonists. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 2009;106(46):19467–72.
118. Castle PE. Do selective estrogen receptor modulators treat cervical precancer and cancer? Time to pool data from relevant trials. *International Journal of Cancer* 2011;128(4):997–8.
119. Lapidus RG, Nass SJ, Butash K a, et al. Mapping of ER Gene CpG Island Methylation by Methylation-specific Polymerase Chain Reaction. *Cancer Research* 1998;(58):2515–9.
120. Qiagen Sample & Assay Technologies. QIAamp ® DNA FFPE Tissue Handbook For Purification of Genomic DNA from Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues. 2010;(April):1–24.
121. Qiagen Sample & Assay Technologies. EpiTect ® Bisulfite Handbook For Complete Bisulfite Conversion and Cleanup of DNA for Methylation Analysis. 2009;(September):1–48.
122. Biosystems A. Relative Quantification, Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System. 2002;1–28.
123. Darst RP, Pardo CE, Ai L, Brown KD, Kladde MP. Bisulfite Sequencing of DNA. *Curr Protoc Mol Biol* 2010;Chapter 7(July).
124. Dennis Lo YM, Chio RWK ACK. Clinical Applications of PCR. Second Edition. *Methods in Molecular Biology* 2006;
125. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005;29:151–9.
126. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology* 2002;30(6):503–12.
127. Peters C E V. Die CpG-Insel-Methylierung des Ostrogenrezeptor Promotors in sporadischen kolorektalen Karzinomen : Nachweis von Mikrometastasen in Lymphknoten von Patienten im UICC Stadium I und II. 2007;
128. Margolis B, Tergas AI, Chen L, et al. Natural history and outcome of neuroendocrine carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology* 2016;S0090–8258.
129. Galic V, Herzog TJ, Lewin SN, et al. Prognostic significance of adenocarcinoma histology in women with cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2012;125(2):287–91.
130. Widschwendter A, Müller HM, Fiegl H, et al. DNA Methylation in Serum and Tumors of Cervical Cancer Patients DNA Methylation in Serum and Tumors of Cervical Cancer Patients. 2004;10:565–71.
131. Mani E, Medina LA, Isaac-Olive K, Duenas-Gonzalez A. Radiosensitization of cervical cancer cells with epigenetic drugs hydralazine and valproate. *European Journal of Gynaecological Oncology* 2014;35(2):140–2.

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AGC - atypical glandular cells
 AGC endocervical NOS - atypical glandular endocervical cells not other specified
 AIS - adenocarcinoma in situ
 ASC-H -atypical cells of undetermined significance cannot exclude HSIL
 ASC-US - atypical squamous cells of undetermined significance
 AWMF - Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
 CCRT - Simultane Radiochemotherapie (*Concurrent Chemoradiotherapy*)
 CDK - Cyclin-abhängige Kinase
 CIN - Zervikale intraepitheliale Neoplasie
 CIS - Carcinoma in situ
 DNMT - DNA-Methyltransferase
 ESR1, ER α - Östrogenrezeptor 1/ α
 FIGO - Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
 HAT - Histon-Acetyltransferase
 HDAC - Histon-Deacetylase
 HPV - Humanes Papilloma Virus
 HSIL - high-grade squamous intraepithelial lesion
 LCR - long control region im HPV-Genom
 LK - Lymphknoten
 LSIL - low-grade squamous intraepithelial lesion
 MBP - methyl cytosine binding protein
 MSP - Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion
 PCR - Polymerase-Kettenreaktion
 PKA, PKC - Proteinkinase A, Proteinkinase C
 rpm - repeats per minute (Wiederholungen pro Minute)
 RT-PCR - real-time polymerase chain reaction
 SERM - selective estrogen receptor modulator
 SSW - Schwangerschaftswoche
 STIKO - Ständige Impfkommission am Robert-Koch-Institut
 TF - Transkriptionsfaktor
 TMMR -Totale mesometriale Resektion
 VAIN - Vaginale intraepitheliale Neoplasie
 VIN - Vulväre intraepitheliale Neoplasie
 UICC - Union internationale contre le cancer

8 Danksagung

Besonderer Dank an meinen besten Freund M. F. und meine Eltern.

Ohne die Hilfe meiner Betreuer und vor allem die Unterstützung und Motivation durch Dr. Verena Kirn wäre diese wissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen – Danke dafür.

Eidesstattliche Versicherung

Zaharieva, Ivanka

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die CpG-Insel-Methylierung des Östrogenrezeptor-Promotors
im invasiven Zervixkarzinom**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

29.06.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand