

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Expression von Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x, Lewis y, Galectin-3,
Galectin-7, Stathmin-1 und p16 in Gewebeproben der zervikalen
Dysplasie**

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

vorgelegt von
Franziska Kraft
aus Passau
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Knösel
Prof. Dr. med. Reinhold Knitza

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Theresa Kolben

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2018

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Definition	3
1.2	Pathogenese	4
1.3	Risikofaktoren	5
1.4	Epidemiologie	6
1.5	Diagnostik	6
1.6	Behandlung	13
1.7	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Reagenzien	16
2.1.3	Antikörper	17
2.2	Datengewinnung	18
2.3	Patientinnen	18
2.3.1	Studiengruppen	18
2.3.2	Gesamtkollektiv	18
2.4	Immunhistochemische Verfahren	19
2.4.1	Fixation und Einbettung	19
2.4.2	Schneiden	19
2.5	Immunhistochemische Färbung	20
2.5.1	Antikörpernachweise	20
2.5.1.1	Nachweis von Sialyl Lewis a	20
2.5.1.2	Nachweis von Sialyl Lewis x	21
2.5.1.3	Nachweis von Sialyl Lewis y	22
2.5.1.4	Nachweis von Galectin-3	23
2.5.1.5	Nachweis von Galectin-7	24
2.5.1.6	Nachweis von Stathmin (D1Y5A)	25
2.5.1.7	Nachweis von p16	26
2.5.1.8	HE Färbung	26
2.5.2	Färbeprotokoll	26
2.6	Auswertung	28
2.7	Statistische Analyse	29

3	Ergebnisse	30
3.1	Ergebnisse der Dysplasiegrade	30
3.1.1	p16 Färbung	30
3.1.2	Stathmin-1	31
3.1.3	Sialyl Lewis a	33
3.1.4	Sialyl Lewis x	34
3.1.5	Lewis y	36
3.1.6	Galectin-3	37
3.1.7	Galectin-7	39
3.2	Ergebnisse der Progress- und Regressgruppe	42
3.2.1	Sialyl Lewis a	43
3.2.2	Lewis y	46
3.2.3	Galectin-3	47
3.3	Korrelationsanalyse	48
4	Diskussion	49
4.1	p16 Färbung	49
4.2	Stathmin-1 Färbung	50
4.3	Galectin-3 und Galectin-7 Färbung	51
4.4	Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x und Lewis y Färbung	53
4.5	Progress- und Regressgruppe	55
5	Zusammenfassung	56
	Anhang	59
	Literaturverzeichnis	69
	Tabellenverzeichnis	74
	Abbildungsverzeichnis	76
	Danksagung	77
	Eidesstattliche Versicherung	78

1 Einleitung

1.1 Definition

Die zervikale intraepitheliale Neoplasie ist eine Vorstufe des Plattenepithelkarzinoms des Gebärmutterhalses. Eine erste Einteilung 1953 unterschied zunächst eine milde, eine moderate und eine starke Form der Dysplasie voneinander [1]. 1969 wurde der Begriff der zervikalen intraepithelialen Neoplasie eingeführt, wobei wieder drei Schweregrade der CIN voneinander abgegrenzt wurden, die CIN I (mild), CIN II (moderat) sowie die CIN III (stark) [2].

Die Einteilung der CIN erfolgt dabei in Abhängigkeit der Proliferation atypischer Basalzellen in drei Stufen. Ist nur das unterste Drittel von einer Proliferation der Basalzellen betroffen, so spricht man von einer CIN I, reicht die Proliferation bis zum mittleren Drittel handelt es sich um eine CIN II. Erstreckt sich die Proliferation über das gesamte Epithel, liegt eine CIN III vor [3].

Die Dysplasie entwickelt sich dabei meist in der Transformationszone der Zervix. Diese besteht in der Fetalperiode aus Zylinderepithel. Durch den mütterlichen Östrogeneinfluss verändert sich bereits zum Zeitpunkt der Geburt der vaginale pH. Durch diesen Stimulus beginnt sich durch Metaplasie das Zylinderepithel in Plattenepithel umzuwandeln. Mit dem Eintreten der Pubertät verändert sich der vaginale pH erneut und die Metaplasie wird fortgesetzt [31].

2001 wurde international eine neue Terminologie für die Einteilung der CIN eingeführt, das Bethesda System. Darin werden zwei Kategorien voneinander unterschieden. Die CIN I wird den *low grade squamous intraepithelial lesions* (LSIL) zugeteilt, wohingegen die CIN II, die CIN III sowie das Carcinoma in situ zu den *high grade squamous intraepithelial lesions* (HSIL) gezählt werden [4].

Histopathologisch zeigt sich bei den LSIL eine gesteigerte Kern-Zytoplasma-Relation, ein hyperchromatischer Kern, Unregelmäßigkeiten der Kernmembran sowie Koilozyten. Koilozyten entstehen in Folge einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus und besitzen um den Zellkern eine Vakuolisierung (halo). Sie wirken dadurch leer und erscheinen meist im oberen Drittel des Epithels. An der Epitheloberfläche zeigen sich darüber hinaus häufig Parakeratosen

und Hyperkeratosen. Auch bei den HSIL lassen sich eine gesteigerte Kerngröße, unregelmäßige Kernmembranen und eine gesteigerte Kern-Zytoplasma-Relation nachweisen. Des Weiteren zeigen sich verschiedene Mitosestadien und gesteigerte Mitoseraten, die bis in die oberen Drittel des Epithels reichen [5].

Dysplasie/Ca in situ Histologie	CIN-System Histologie	Münchener Nomenklatur II Zytologie	Bethesda Zytologie	Münchener Nomenklatur III Zytologie
Leichte Dysplasie	CIN I	IIID	LSIL	IIID1
Mäßige Dysplasie	CIN II	IIID	HSIL	IIID2
Schwere Dysplasie	CIN III	IVa	HSIL	IVa-p
Carcinoma in situ	CIN III	IVa	HSIL	IVa-p

Tabelle 1: Intraepitheliale Läsionen des Plattenepithels in verschiedenen Befundsystemen [6]

1.2 Pathogenese

Eine CIN entsteht durch die Infektion mit den Hochrisikotypen des humanen Papillomavirus (HPV). Diese gehören zur Gruppe der Papillomaviridae und bestehen aus doppelsträngiger DNA. Bisher sind etwa 200 verschiedene, beim Menschen vorkommende Typen bekannt [7]. Man unterscheidet die Hochrisikotypen von den Niedrigrisikotypen. Bei einer Infektion mit den Niedrigrisikotypen, wie beispielsweise 6 und 11, können sich Genitalwarzen, sogenannte Condylome, bilden. Zu den Hochrisikotypen zählen unter anderem die Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68. Die Typen 16 und 18 sind für die Entstehung von 70 % aller Zervixkarzinome verantwortlich [8]. Die meisten HPV Infektionen verlaufen asymptomatisch und heilen innerhalb von 2 Jahren aus [9].

Das HPV Genom kann in drei Regionen unterteilt werden. Man unterscheidet eine nicht kodierende *long control region*, welche DNA Elemente für die virale Transkription und Replikation enthält sowie zwei kodierende Regionen. Diese unterteilen sich wiederum in *early* (E) und *late* (L) genes, wobei die *early genes* Proteine kodieren, die für die virale Genomreplikation notwendig sind und die *late genes* für virale Kapside kodieren.

Die viralen Onkogene E6 und E7 gehören zu den *early genes* und kodieren Proteine, welche mit den Tumorsuppressor-Proteinen Retinoblastom (pRB) und p53 interagieren. Das HPV E7

Onkogen bindet an pRB und an den cdk Inhibitor p21^{cip1}. Dies führt zu einer unkontrollierten E2F-vermittelten Gentranskription, welche für die S-Phase benötigt wird. Das Onkoprotein E6 beschleunigt den Abbau von p53 und verhindert somit eine Apoptose geschädigter Zellen. Diese Mechanismen führen zu einer erhöhten Proliferation und durch die Verhinderung der Apoptose geschädigter Zellen zu einer Häufung genetischer Aberrationen. Bei einer chronischen Infektion mit HPV ist somit das Auftreten von Dysplasien und folglich Karzinomen begünstigt (Abb. 1) [10] - [21].

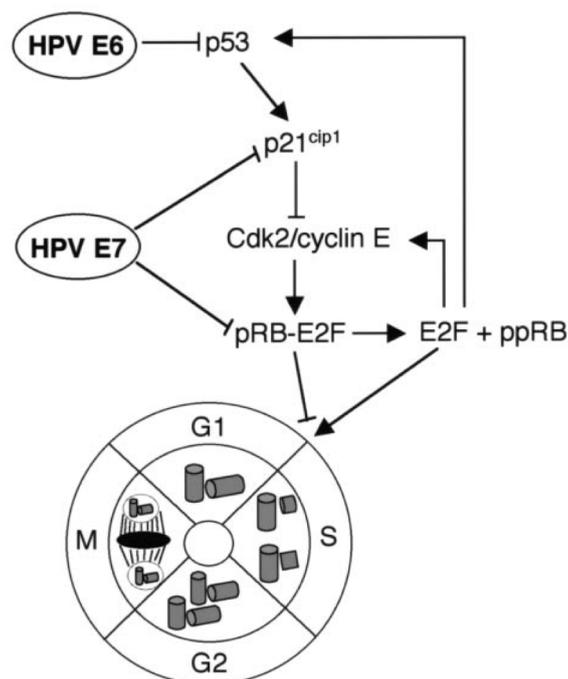


Abbildung 1: Störung des Zellzyklus durch die HPV Onkoproteine E6 und E7 [10]

1.3 Risikofaktoren

Frühe sexuelle Aktivität, wechselnde Geschlechtspartner, Rauchen sowie Immunsuppression sind Risikofaktoren für eine HPV Infektion [22]. Ein erhöhtes Risiko für eine chronische Infektion mit Hochrisiko HPV Typen weisen auch Frauen auf, die in ihrer Vorgeschichte bereits Condylome hatten. Darüber hinaus erhöhen auch der Gebrauch von systemischen Glukokortikoiden sowie orale Kontrazeptiva das Risiko [23].

1.4 Epidemiologie

Eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus ist die häufigste sexuell übertragene Infektion [24]. Es konnte gezeigt werden, dass in einigen Populationen der Anteil an HPV Infektionen bei sexuell aktiven Frauen 20-40% beträgt, wobei die Prävalenz mit dem Alter abnimmt [25]. Zu chronischen HPV Infektionen neigen am meisten die HPV Typen 16, 31 und 45 [26].

In den USA liegt die Inzidenz einer CIN I bei 0,12%, für eine CIN II bei 0,08% für eine CIN III bei 0,07%. Die höchste Inzidenzrate weisen Frauen im Alter von 20-24 mit 0,5% auf. Bei CIN II und CIN III liegt die höchste Inzidenzrate bei Frauen zwischen 25-29 Jahren mit 0,38% bei CIN II und 0,41% bei CIN III [27].

Low grade squamous intraepithelial lesions haben eine hohe Tendenz zur spontanen Regression. Nach 12 Monaten beträgt die Wahrscheinlichkeit eines Regresses 61% und nach 36 Monaten 91%. Lediglich 3% zeigen einen Progress [28]. Die Rate einer spontanen Regression einer CIN II oder CIN III liegt bei 28% [29].

1.5 Diagnostik

In Deutschland kann jede Frau ab dem 20. Lebensjahr eine Krebsvorsorgeuntersuchung durchführen lassen. Diese Leistung wird von der Krankenkasse übernommen. Dabei wird unter anderem ein Abstrich zur Zellgewinnung von der Portio sowie aus dem Zervixkanal genommen. Der Abstrich wird mit Alkohol auf einem Objektträger fixiert und im Labor mittels Papanicolaou-Färbung behandelt. Im Anschluss daran kann das Präparat unter dem Mikroskop befundet werden. Mit Hilfe der Münchner Nomenklatur (Tabelle 3, Tabelle 4) wird der Befund eingeordnet und bei Auffälligkeiten erfolgt weitere Diagnostik. Zur besseren Qualität des Abstrichs sollte dieser nicht während der Menstruation, nicht nach Geschlechtsverkehr sowie nicht direkt nach dem Waschen vorgenommen werden [30].

Zeigen sich im Abstrich Auffälligkeiten, so kann der Abstrich zunächst wiederholt werden. Da das Zervixepithel Zeit zur Regeneration benötigt, sollte der Abstrich frühestens nach 3 Monaten wiederholt werden. Bestand aufgrund des ersten Abstrichs der Verdacht auf eine Infektion, sollte vor einem erneuten Abstrich eine antimikrobiologische Therapie erfolgen. War die Aussa-

gekraft des ersten Abstrichs aufgrund von atrophem Epithels eingeschränkt, sollte eine topische Therapie mit Östrogenen vor einem erneuten Abstrich vorgenommen werden.

Darüber hinaus kann ein HPV Test durchgeführt werden, um Frauen mit einem positiven Testergebnis weiterer Diagnostik zuzuführen.

Die Kolposkopie stellt einen nächsten Schritt in der Diagnostik der CIN dar, welche zum Ziel hat, die genaue Lokalisation der Dysplasie festzustellen und gegebenenfalls eine histologische Sicherung durchzuführen. Auch Verlaufskontrollen bei Vorliegen einer CIN können unter anderem kolposkopisch durchgeführt werden.

Hierbei wird nach SpekulumEinstellung 3- oder 5%-ige Essigsäurelösung auf die Zervix aufgetragen. Essigsäure löst ein Gewebsödem aus und führt zur Gerinnung von Proteinen, außerdem wird die Transparenz des Epithels vermindert, wodurch Gefäße schwerer sichtbar sind und das Epithel selbst weiß erscheint. Da dysplastisches Epithel einen höheren Proteingehalt aufweist, grenzt es sich in Form einer stärkeren essigweißen Reaktion von gesundem Epithel ab. Dabei gilt es zu beachten, dass die Spezifität der Untersuchung gering ist, da eine Weißfärbung nicht nur bei Dysplasien zu beobachten ist. Unter anderem kann diese auch bei einer Metaplasie oder einer alleinigen HPV Infektion ohne Vorliegen einer Dysplasie auftreten.

Neben der Untersuchung mit Essigsäure kann auch der Schilling-Test durchgeführt werden. Dazu wird Iod auf die Zervix aufgetragen und gesundes, normales Epithel färbt sich braun. Der Grund für die Braunfärbung ist Glykogen, welches in gesunden Zellen reichlich vorhanden ist. In dysplastisch veränderten Zellen variiert der Glykogengehalt, weshalb verändertes Gewebe weniger deutlich und ungleichmäßig gefärbt ist. Wie bereits bei der Essigprobe ist auch die Spezifität dieser Untersuchung eingeschränkt, da auch in diesem Fall andere Ursachen, wie beispielsweise ein sich gerade regenerierendes Epithel oder das Vorliegen einer Infektion, für eine geringere Färbung verantwortlich sein können.

Die kolposkopische Beurteilung einer Dysplasie erfolgt anhand diverser Kriterien, wie dem Vorliegen von groben oder feinen Mosaiken, Punktierungen, abnormen Gefäßen, der Essigreaktion sowie der Randbegrenzung (Tabelle 2).

Als nächster Schritt der Diagnosesicherung sollte unter kolposkopischer Sicht eine Gewebebi-

opsie der auffälligen Stellen entnommen werden. Um genaue Aussagen über die Invasionstiefe der Dysplasie treffen zu können, sollte unbedingt sowohl Epithel als auch darunterliegendes Stromagewebe bei der Biopsie entnommen werden [31].

IFCPC 2011	Rio de Janeiro	Kolposkopische Nomenklatur für die Zervix uteri
Grundsätzliches		<ul style="list-style-type: none"> • adäquat/inadäquat: Begründung: z.B.: Entzündung, Blutung, Narben • Zylinder-Plattenepithel-Grenze (ZPG): vollständig/teilweise/nicht einsehbar • Transformationszone (Typ 1, 2, 3)
Normale Befunde		<p>Originäres Plattenepithel</p> <ul style="list-style-type: none"> • reif • atroph <p>Zylinderepithel</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ektopie <p>Metaplastisches Plattenepithel</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ovula Nabothii • Drüsenausführungsgänge
Abnorme Befunde	Grundsätzliches	<p>Lokalisation der Läsion:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Innerhalb oder außerhalb der TZ <p>Größe der Läsion:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anzahl der betroffenen Quadranten • Prozent der Zervix
	Grad 1 minor changes	<ul style="list-style-type: none"> • zartes essigweißes Epithel • zartes Mosaik, zarte Punktierung
	Grad 2 major changes	<ul style="list-style-type: none"> • intensiv essigweißes Epithel • grobes Mosaik, grobe Punktierung • prominente Drüsenausführungsgänge • scharfe Grenzen • „inner border sign“, „ridge sign“ • rasche Essigsäurewirkung
	nicht spezifisch	<ul style="list-style-type: none"> • Leukoplakie (Keratose, Hyperkeratose) • Erosion • Lugol'sche Probe (Schiller-Test)
Verdacht auf Invasion		<ul style="list-style-type: none"> • Atypische Gefäße • Zusätzliche Befunde: auf Berührung blutende Gefäße, unregelmäßige Oberfläche, exophytische Läsion, Nekrose, Ulkus, Tumor
Verschiedene Befunde		<ul style="list-style-type: none"> • kongenitale Transformationszone (KTZ), kongenitale Anomalie • Kondylome (Papillome) • Endometriose • Polypen (ektozervikal, endozervikal) • Entzündung • Stenose • postoperative Veränderung • (vernarbte Portio, Scheidenblindsack)

Tabelle 2: Colposcopic nomenclature for cervix uteri (IFCPC 2011) [32]

Gruppe	Begriffsdefinition der Gruppen
I	Normales Zellbild, dem Alter entsprechend, einschließlich leichter entzündlicher und degenerativer Veränderungen sowie akterieller Zytolyse.
II	Deutlich entzündliche Veränderungen an Zellen des Platten- und zervikalen Zylinderepithels, Zellen aus Regenerationsepithel, unreife Metaplasiezellen, stärkere degenerative Zellveränderungen, Para- und Hyperkeratosezellen. Normale Endometriumzellen, auch nach der Menopause. Ferner spezielle Zellbilder wie folliculäre Zervizitis, Zellveränderungen bei IUP, Zeichen einer HPV-Infektion ohne wesentliche Kernveränderungen, Zeichen einer Herpes- oder Zytomegalievirusinfektion.
I+II	Empfehlungen: Gegebenenfalls zytologische Kontrolle, Zeitabstand je nach klinischem Befund - eventuell nach vorheriger Entzündungsbehandlung oder nach Aufhellung durch Hormongaben.
III	Unklarer Befund: Schwere entzündliche, degenerative oder iatrogene Zellveränderungen, die eine sichere Beurteilung zwischen gut und bösartig nicht zulassen. Auffällige Zellen eines Drüsenepithels, deren Herkunft aus einem Karzinom nicht sicher auszuschließen ist, möglichst mit Hinweis, ob die Zellen endometrialen, endozervixialen oder extrauterinen Ursprungs sind. Empfehlungen: Je nach klinischem und kolposkopischem Befund kurzfristige zytologische Kontrolle oder sofortige histologische Abklärung.
IID	Zellen einer Dysplasie leichten bis mittleren Grades. (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden) Empfehlung: Kolposkopisch-zytologische Kontrolle in 3 Monaten.
IVA	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Ca-in-situ. (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden). Empfehlung: Kolposkopisch-zytologische Kontrolle und histologische Klärung.
IVB	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Ca-in-situ, Zellen eines invasiven Karzinoms nicht auszuschließen.
V	Zellen eines malignen Tumors. (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, sonstiger maligner Tumor) Empfehlung: Kolposkopisch-zytologische Kontrolle und histologische Klärung.

Tabelle 3: Münchner Nomenklatur II - Klassifikation zytologischer Befunde (gültig bis Juli 2014) [33]

Gruppe	Definition	Korrelat im Bethesda-System
0	Unzureichendes Material → <i>Abstrich-Wiederholung</i>	Unsatisfactory for evaluation
I	Unauffällige und unzureichende Befunde → <i>Abstrich im Vorsorgeintervall</i>	NILM
II-a	Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese → <i>ggf. zytologische Kontrolle wegen auffälliger Anamnese (zytologischer/histologischer/kolposkopischer/klinischer Befund)</i>	NILM
II	Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert	
II-p	Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN 1, auch mit koilozytärem Zytoplasma/Parakeratose → <i>ggf. zytologische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund (evtl. nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung; in besonderen Fällen additive Methoden und/oder Kolposkopie)</i>	ASC-US
II-g	Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen → <i>ggf. zytologische Kontrolle in Abhängigkeit von Anamnese und klinischem Befund (evtl. nach Entzündungsbehandlung; in besonderen Fällen additive Methoden und/oder Kolposkopie)</i>	AGC endocervical NOS
II-e	Endometriumzellen bei Frauen > 40. Lebensjahr in der zweiten Zyklushälfte → <i>Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund</i>	Endometrial cells
III	Unklare bzw. zweifelhafte Befunde	
III-p	CIN 2/3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen → <i>Differenzialkolposkopie, ggf. additive Methoden, evtl. kurzfristige zytologische Kontrolle nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung</i>	ASC-H
III-g	Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen → <i>Differenzialkolposkopie, ggf. additive Methoden</i>	AGC endocervical favor neoplastic
III-e	Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal) → <i>Weiterführende klinische Diagnostik, ggf. mit histologischer Klärung</i>	AGC endometrial
III-x	Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs → <i>Weiterführende Diagnostik (z. B. fraktionierte Abrasio; ggf. additive Methoden/Differenzialkolposkopie)</i>	AGC favor neoplastic
IIID	Dysplasie-Befunde mit größerer Regressionsneigung	
IIID1	Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN 1 → <i>Zytologische Kontrolle in 6 Monaten, bei Persistenz > 1 Jahr: ggf. additive Methoden/Differenzialkolposkopie</i>	LSIL
IIID2	Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN 2 → <i>Zytologische Kontrolle in 3 Monaten, bei Persistenz > 6 Monate: Differenzialkolposkopie, ggf. additive Methoden</i>	HSIL

Gruppe	Definition	Korrelat im Bethesda-System
IV	Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms → <i>Differenzialkolposkopie und Therapie</i>	
IVa-p	Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog CIN 3	HSIL
IVa-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ	AIS
IVb-p	Zellbild einer CIN 3, Invasion nicht auszuschließen	HSIL with features suspicious for invasion
IVb-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen	AIS with features suspicious for invasion
V	Malignome → <i>Weiterführende Diagnostik mit Histologie und Therapie</i>	
V-p	Plattenepithelkarzinom	Squamous cell carcinoma
V-g	Endozervikales Adenokarzinom	Endocervical adenocarcinoma
V-e	Endometriales Adenokarzinom	Endometrial adenocarcinoma
V-x	Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs	Other malignant neoplasms

NILM = negative for intraepithelial lesion or malignancy

CIN 1/2/3 = Cervikale Intraepitheliale Neoplasie Grad 1/2/3

ASC-US = atypical squamous cells of undetermined significance

AGC endocervical NOS = atypical glandular endocervical cells not otherwise specified

ASC-H = atypical squamous cells of undetermined significance cannot exclude HSIL

AGC endocervical, favor neoplastic = atypical glandular endocervical cells favor neoplastic

AGC endometrial: Atypical glandular endometrial cells

AGC favor neoplastic = atypical glandular cells favor neoplastic

LSIL = low-grade squamous intraepithelial lesion

HSIL = high-grade squamous intraepithelial lesion

AIS = Adenocarcinoma in situ

Tabelle 4: Münchner Nomenklatur III mit Hauptgruppen und korrelierenden Begriffen des Bethesda Systems (gültig ab 1.7.2014) [34]

1.6 Behandlung

Wird histologisch eine CIN gesichert, hängt das weitere Procedere vom Ausprägungsgrad der Dysplasie ab.

Wurde eine CIN I histologisch gesichert, sollte zunächst ein konservatives Vorgehen gewählt werden. Dazu wird nach 12 Monaten sowie nach 24 Monaten eine erneute Zytologie empfohlen, beziehungsweise eine high risk HPV Testung nach 12 Monaten. Eine erneute Kolposkopie wird empfohlen, wenn sich in der Zytologie weiterhin Auffälligkeiten ergeben oder der HPV Test positiv ist [35]. Sowohl europäische Richtlinien, als auch die *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* (ASCCP) Richtlinien empfehlen ein konservatives Vorgehen bei Vorliegen einer CIN I [31] [35] [36].

Ein chirurgisches Vorgehen sollte bei Frauen mit einer histologisch gesicherten CIN III empfohlen werden. Dies entspricht dem weltweiten Behandlungsstandard. Eine CIN II wird in den meisten Ländern wie eine CIN III behandelt, eindeutige Daten hierzu fehlen jedoch [37]. Ein chirurgisches Vorgehen wird unter anderem unterstützt vom Bethesda System sowie der Nomenklatur des *Lower Anogenital Squamous Terminology Project* [38]. Vor allem für jüngere Frauen mit noch nicht abgeschlossener Familienplanung wird bei Vorliegen einer CIN II jedoch immer häufiger, wenn möglich, ein konservatives Vorgehen vorgezogen [39].

Grundsätzlich können verschiedene operative Behandlungsmöglichkeiten erwogen werden.

Eine Möglichkeit ist die Exzision der Läsion. Ziel ist es dabei, die Dysplasie komplett zu entfernen. Verschiedene Techniken zur Durchführung einer Exzision sind möglich.

Bei der Exzision mittels cold knife wird mit einem Skalpell ein kegelförmiger Konus herausgeschnitten.

Bei der Laser Konisation wird mittels eines CO₂ Lasers verändertes Gewebe entfernt.

Bei der large loop excision of transformation zone (LLETZ) oder auch loop electrosurgical excision procedure (LEEP) genannt, wird Gewebe mit einer Stromschlinge entfernt.

Darüber hinaus gibt es noch die Möglichkeit, das Gewebe mit einem Diathermie Draht zu entfernen (needle excision of the transformation zone, NETZ). Alle Techniken sollten unter kolposkopischer Sicht durchgeführt werden.

Als weitere Behandlungsmöglichkeiten erweisen sich lokal destruktive Therapien. Dazu zählen die radical diathermy, die Diathermiekoagulation, die Laservaporisation, die Kryotherapie und die cold coagulation. Bei der radical diathermy wird mit einer elektrischen Nadel Gewebe bis zu einer Tiefe von einem Zentimeter zerstört. Mittels Hitze wird bei der Diathermiekoagulation Gewebe bis zu 3 mm zerstört. Aufgrund der nur oberflächlichen Behandlung ohne histologische Sicherung wird diese Therapie nicht primär empfohlen. Mittels CO₂ Laser wird bei der Laservaporisation das Wasser in den Zellen verdampft und diese dadurch zerstört. Im Gegensatz dazu wird bei der Kryotherapie Gewebe durch Gefrierung entfernt. Auch diese Methode dringt nur 3-4 mm ein und ist daher sehr oberflächlich. Bei der cold coagulation wird das Gewebe auf 100°C erhitzt und dadurch zerstört. Der Nachteil dieser lokalen Therapien ist, dass das Gewebe direkt zerstört wird und somit nicht für weitere Diagnostik verwendet werden kann. Die chirurgische Behandlung der CIN weist neben allgemeinen Operationsrisiken wie Infektionen, Blutungen und Schädigungen umliegender Strukturen vor allem auch Risiken bezüglich der Fertilität sowie einer Schwangerschaft auf. Dies erweist sich insbesondere daher als relevant, da eine Konisation häufiger bei jüngeren Frauen durchgeführt wird, welche die Familienplanung noch nicht abgeschlossen haben.

Bezüglich der Risiken einer Schwangerschaft ist vor allem die Zervixinsuffizienz zu nennen. Verbunden damit ergeben sich ein signifikant erhöhtes Risiko für Frühgeburten sowie Fehlgeburten, niedriges Geburtsgewicht sowie vorzeitigen Blasensprung [40] [41] [42]. Es zeigte sich beispielsweise, dass das relative Risiko für perinatale Mortalität nach einer Cold Knife Konisation bei 2.87 (95%-Konfidenzintervall 1.42 - 5.81), das für Frühgeburten bei 2.78 (95%-Konfidenzintervall 1.72 - 4.51) liegt [38]. Auch bei der LEEP beträgt das relative Risiko für Frühgeburten 1.98 (95%-Konfidenzintervall 1.31 - 2.98) [40].

1.7 Fragestellung

Vor allem aufgrund der aufgeführten Risiken in Zusammenhang mit einer Konisation und - damit verbunden - um die Zahl an Konisation zu senken, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Marker zu bestimmen, die eine Vorhersage zu Progress oder Regress der einzelnen

CIN Gruppen erlauben. Dies wäre vor allem wünschenswert im Hinblick auf die Behandlung beziehungsweise das klinische Vorgehen bei Patientinnen, bei denen eine CIN II diagnostiziert wurde.

Da bei der Konisation neben allgemeinen Operationsrisiken wie Blutungen oder Infektionen vor allem das Risiko einer Zervixinsuffizienz vorliegt und somit ein erhöhtes Risiko für eine Frühgeburt besteht, hätte eine Prognose bezüglich eines Progresses oder Regresses große klinische Relevanz für Frauen mit noch nicht abgeschlossener Familienplanung.

Hierzu wurden Gewebeproben von Zervixbiopsien unterschiedlichen Dysplasiegrades mit den Antikörpern Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x, Lewis y, Galectin-3, Galectin-7, Stathmin-1 und p16 gefärbt. Die verschiedenen CIN Gruppen wurden anhand ihres Färbeverhaltens miteinander verglichen, um Unterschiede in der Ausprägung ihrer Färbung festzustellen, welche auf einen etwaigen Progress oder Regress hinweisen könnte.

Ziel war es, in Zukunft Patientinnen eine bessere Therapieempfehlung bezüglich eines konservativen oder chirurgischen Vorgehens anbieten zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Objekt	Hersteller
Pipetten	Eppendorf AG; Hamburg
Objektträger	Menzel-Gläser GmbH & Co. KG; Saarbrücken
Brutschrank	Heraeus; Hanau
Kamera	JVC
Kochfeld	Rommelsbacher; Dinkelsbühl
Schnellkochtopf	Fissler GmbH
Schlittenmikrotom	Reichert-Jung; Leica; Wetzlar
Pipettenspitzen	Schubert und Weiss Omnilab GmbH & Co. KG; München
Deckgläser	Menzel-Gläser GmbH & Co. KG; Saarbrücken
Mikroskop	Leitz; Wetzlar

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Materialien

2.1.2 Reagenzien

Für den Vorgang des Entparaffinierens der Paraffinschnitte wurde Xylol der Firma Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde 30% Wasserstoffperoxid der Firma VWR International S.A.S. (Briare, Frankreich) genutzt. Dieses wurde mit Methanol der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) gemischt.

Das destillierte Wasser, welches regelmäßig zwischen den verschiedenen Schritten zum Waschen der Schnitte verwendet wurde, stammte von der Firma Noll Karl W. Wasserdestillation (München, Deutschland).

Die Alkohole für die auf- und absteigenden Alkoholreihen wurden aus der Apotheke der

Innenstadt der LMU München geliefert. Die Schnitte wurden regelmäßig mit PBS-Puffer (Phosphate-Borate-Saline) der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) gewaschen.

Je nach Färbeprotokoll wurden die Schnitte hitzevorbehandelt. Dazu wurde ein Natrium-Citratpuffer hergestellt. Sowohl die dafür verwendete Zitronensäure als auch das Natrium-Citrat stammten von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland).

Als Detektionssystem dienten Vectastain ABC KIT Mouse-IgG der Firma Vector Laboratories (Burlingame, USA) und das Zytochem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) der Firma Zytomed (Berlin, Deutschland). Für die Sialyl Lewis x Färbung wurde außerdem 5% Rinderalbumin der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, USA) genutzt.

Die Sekundärantikörper stammten von der Firma Vector Laboratories (Burlingame, USA).

Zur Substratfärbung wurde DAB (3,3 Diaminobenzidin) und Chromogen von Dako North America Inc. (Caripinteria, USA) verwendet. Von dort stammte ebenso das Dako-Verdünnungsmedium.

Zur Gegenfärbung wurde Hämalau aus der Apotheke der LMU genutzt. Abschließend wurde zum Eindecken der Schnitte Eukitt der Firma Kindler (Düsseldorf, Deutschland) verwendet.

2.1.3 Antikörper

Antigen	Antikörper	Isotyp	Firma	Peroxidase Färbung
Sialyl Lewis a	KM231	Mouse IgG	Calbiochem	30 Sekunden
Sialyl Lewis x	KM93	Mouse IgM	Calbiochem	2 Minuten
Lewis Y	CD174	Mouse IgM	Glycotope GmbH	4 Minuten
Stathmin-1	D1Y5A	Rabbit IgG	Cell Signaling	1 Minute
P16	E6H4	-	Ventana	Vollautomat
Galectin-3	9C4	Mouse IgG	Vovocastra	2 Minuten
Galectin-7	-	Rabbit IgG	Abcam	90 Sekunden

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Antikörper

2.2 Datengewinnung

Nach Erhalt der Zustimmung durch die Ethikkommission (Nummer 167-14) wurden die Patientendaten im zytologischen Labor der Frauenklinik Großhadern der Universität München gesammelt. Insgesamt wurden für diese Studie 128 archivierte Gewebeproben von an zervikaler intraepithelialer Neoplasie Grad I-III erkrankten Patientinnen ausgewählt. In diese Studie eingeschlossen wurden nur Patientinnen, die mindestens zwei histologische Sicherungen einer zervikalen intraepithelialen Dysplasie vorwiesen. Dabei musste entweder ein Progress oder ein Regress stattgefunden haben. Ausgeschlossen wurden Patientinnen, die während der Biopsientnahme schwanger oder immunsupprimiert waren. Die Biopsie ist bei allen Patientinnen aus der Portio entnommen worden.

Die Patientinnen in der Kontrollgruppe wiesen keine dysplastischen Veränderungen auf.

2.3 Patientinnen

2.3.1 Studiengruppen

Die Patientinnen wurden entsprechend ihres Dysplasiegrades in verschiedene Gruppen eingeteilt. Es gab eine CIN I, eine CIN II und eine CIN III Gruppe sowie eine Kontrollgruppe, die aus Patientinnen ohne Dysplasie bestand. Die CIN II Gruppe wurde außerdem zusätzlich in Progress und Regress unterteilt.

2.3.2 Gesamtkollektiv

Insgesamt untersucht wurden 140 Gewebeproben. 128 davon wiesen eine Dysplasie auf. In der CIN I Gruppe waren 33 Patientinnen, in der CIN II Gruppe 58, davon 31 Regresspatientinnen und 27 Patientinnen mit Progress, in der CIN III Gruppe 37 Patientinnen und in der Kontrollgruppe 12 Patientinnen.

2.4 Immunhistochemische Verfahren

2.4.1 Fixation und Einbettung

Um das Gewebe, welches den Patientinnen im Rahmen der Biopsie entnommen wurde, haltbar zu machen, wurde dieses in 4-prozentigem, neutral-gepufferten Formalin fixiert, um eine Autolyse zu verhindern. Dabei kommt es zu einer Vernetzung der Eiweißmoleküle untereinander. Ein Formaldehydmolekül lagert sich an ein Eiweißmolekül an und es bildet sich ein starres Gitternetz. Durch diesen Vorgang werden die Proteine kaum denaturiert. Je größer das Gewebe ist, desto länger dauert eine Fixierung. Für kleine Gewebe, wie in dieser Studie, reichen etwa 24 Stunden. Im Anschluss an die Fixation wird das Fixationsmittel mit Leitungswasser herausgewaschen.

Zur Einbettung der Gewebeproben wird flüssiges Paraffin verwendet. Es lagert sich überall an, wo sich im Gewebe Wasser befindet. Das Wasser wird beim Einbettvorgang entfernt. Dazu wird ein organisches Lösungsmittel, welches eine hohe Affinität zu Wasser hat, verwendet. Das Gewebe durchläuft hierzu eine aufsteigende Alkoholreihe sowie am Ende Xylol. Dieses wäscht den letzten Rest des Wassers heraus und dient gleichzeitig als Intermedium. Das Einbettungsmittel wird auf 60°C erhitzt und dringt in das Gewebe ein, nach Abkühlen wandelt es sich in einen festen Stoff um. Die Vorgänge der Fixation und des Einbettens können in einem Automaten durchgeführt werden. Das Gewebe kann im Anschluss entnommen und in einen Block gegossen werden.

2.4.2 Schneiden

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms werden 2-3 μm dünne Schnitte geschnitten und auf speziell beschichtete Objektträger aufgezogen. In dieser Studie wurden Superfrost Plus Objektträger verwendet. Diese sorgen aufgrund eines besonderen Beschichtungsverfahrens für einen besseren Halt der Schnitte.

2.5 Immunhistochemische Färbung

2.5.1 Antikörpernachweise

2.5.1.1 Nachweis von Sialyl Lewis a

Zum Nachweis von Sialyl Lewis a wurde der Klon KM231 der Firma Calbiochem verwendet. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Mouse IgG1 Antikörper. Dieser wurde 1:80 in PBS verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Detektionssystem wurde ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) der Firma Zytomed verwendet. Sowohl für die Positivkontrolle als auch für die Isotypkontrolle wurden Schnitte von Mammakarzinomen verwendet.

Sialyl Lewis a	
Klon	KM231
Firma	Calbiochem
Antikörper	Monoklonaler Mouse IgG1
Verdünnung	1:80
Verdünnungsmedium	PBS
Inkubationszeit	60 Minuten
Temperatur	Raumtemperatur
Detektionssystem	ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit), Zytomed
Positivkontrolle	Mammakarzinome
Isotypenkontrolle	Mammakarzinome

Tabelle 7: Übersicht Nachweis Sialyl Lewis a

2.5.1.2 Nachweis von Sialyl Lewis x

Zur Darstellung von Sialyl Lewis x diente der Klon KM93 der Firma Calbiochem, welcher ein monoklonaler Mouse IgM Antikörper ist. Der Antikörper wurde 1:200 in PBS verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Detektionssystem wurde Vectastain Elite Mouse-Kit verwendet. Mammakarzinome dienten als Positiv- und Isotypenkontrollen.

Sialyl Lewis x	
Klon	KM93
Firma	Calbiochem
Antikörper	Monoklonaler Mouse IgM
Verdünnung	1:200
Verdünnungsmedium	PBS
Inkubationszeit	60 Minuten
Temperatur	Raumtemperatur
Detektionssystem	Vectastain Elite Mouse-Kit
Positivkontrolle	Mammakarzinome
Isotypenkontrolle	Mammakarzinome

Tabelle 8: Übersicht Nachweis Sialyl Lewis x

2.5.1.3 Nachweis von Sialyl Lewis y

Lewis y wurde mit dem monoklonalem Mouse IgM Antikörper des Klons CD174 der Firma Glycotope nachgewiesen. Dieser wurde 1:60 in Dako-Verdünnungsmedium verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Als Detektionssystem diente das Vectastain Elite Mouse-Kit. Die Positivkontrolle sowie die Isotypenkontrolle wurden an Mammakarzinomen durchgeführt.

Sialyl Lewis y	
Klon	CD174
Firma	Glycotype
Antikörper	Monoklonaler Mouse IgM
Verdünnung	1:60
Verdünnungsmedium	Dako-Verdünnungsmedium
Inkubationszeit	60 Minuten
Temperatur	Raumtemperatur
Detektionssystem	Vectastain Elite Mouse-Kit
Positivkontrolle	Mammakarzinome
Isotypenkontrolle	Mammakarzinome

Tabelle 9: Übersicht Nachweis Sialyl Lewis y

2.5.1.4 Nachweis von Galectin-3

Der Nachweis von Galectin-3 erfolgte mit dem Klon 9C4 der Firma Vovocastra. Dabei handelt es sich wiederum um einen monoklonalen Mouse IgG Antikörper. Dieser wurde 1:1000 in PBS verdünnt und 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Erneut wurde als Detektionssystem das Vectastain Elite Mouse-Kit verwendet. Als Positivkontrolle sowie auch als Isotypenkontrolle diente Plazenta.

Galectin-3	
Klon	9C4
Firma	Vovocastra
Antikörper	Monoklonaler Mouse IgG
Verdünnung	1:1000
Verdünnungsmedium	PBS
Inkubationszeit	16 Stunden
Temperatur	4°C
Detektionssystem	Vectastain Elite Mouse-Kit
Positivkontrolle	Plazenta
Isotypenkontrolle	Plazenta

Tabelle 10: Übersicht Nachweis Galectin-3

2.5.1.5 Nachweis von Galectin-7

Für die Darstellung von Galectin-7 wurde der polyklonale Rabbit IgG Antikörper der Firma Abcam verwendet. Dieser wurde 1:700 in PBS verdünnt und für 16 Stunden bei 4°C aufgetragen. Als Detektionssystem diente ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit). Die Gewebsspositivkontrolle erfolgte an Plazenta, die Isotypenkontrolle ebenso an Plazenta und die Negativkontrolle an Leber.

Galectin-7	
Klon	Nicht bekannt
Firma	Abcam
Antikörper	Polyklonaler Rabbit IgG
Verdünnung	1:700
Verdünnungsmedium	PBS
Inkubationszeit	16 Stunden
Temperatur	4°C
Detektionssystem	ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit)
Positivkontrolle	Plazenta
Isotypenkontrolle	Plazenta
Negativkontrolle	Leber

Tabelle 11: Übersicht Nachweis Galectin-7

2.5.1.6 Nachweis von Stathmin (D1Y5A)

Zum Nachweis von Stathmin-1 wurde der monoklonale Rabbit IgG Antikörper der Firma Cell Signaling genutzt. Bei einer Verdünnung von 1:500 in PBS wurde dieser für 16 Stunden bei 4°C aufgetragen. Das ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) diente als Detektionssystem. Zur Durchführung der Positivkontrollen sowie der Isotypenkontrolle wurde Plazenta verwendet.

Stathmin-1	
Klon	Nicht bekannt
Firma	Cell Signaling
Antikörper	Monoklonaler Rabbit IgG
Verdünnung	1:500
Verdünnungsmedium	PBS
Inkubationszeit	16 Stunden
Temperatur	4°C
Detektionssystem	ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit)
Positivkontrolle	Plazenta
Isotypenkontrolle	Plazenta

Tabelle 12: Übersicht Nachweis Stathmin-1

2.5.1.7 Nachweis von p16

Die p16 Färbung wurde an einem Färbeautomaten des pathologischen Instituts der LMU München durchgeführt.

2.5.1.8 HE Färbung

Die HE Färbung wurde ebenfalls an einem Färbeautomaten des pathologischen Instituts der LMU München durchgeführt.

2.5.2 Färbeprotokoll

Zunächst wurden die Schnitte für 20 Minuten in Xylol entparaffiniert und im Anschluss in 100%-igem Ethanol dehydriert. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase der Schnitte durch eine 20-minütige Inkubation in 3%-igem H₂O₂ in Methanol. Im Anschluss wurden die Schnitte in 100%-igem Ethanol geschwenkt. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100%, 96%, 70%, 50%). Daraufhin wurden die Ethanolreste in Aqua dest. beseitigt.

Bei der Sialyl Lewis a, der Lewis Y sowie der Stathmin-1 Färbung wurde eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung durchgeführt. Dadurch können Antikörper auch an Epitope binden, welche zuvor durch Aldehydvernetzung maskiert waren. Die Schnitte wurden dafür in einem Natrium-Citratpuffer mit dem pH 6,0 für 5 Minuten gekocht. Der Puffer wurde aus 21,01 g 0,1 M + 1 l Aqua dest. haltiger Citronensäure (Lösung A) und 29,41 g 0,1 M Natrium-Citrat + 1 l Aqua dest. (Lösung B) hergestellt. Davon wurden 18ml der Lösung A und 82ml der Lösung B zum Kochen gebracht.

Im Anschluss wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült und 2 x 2 Minuten in PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Blockierungsserum aufgetragen. Dieses sättigt elektrostatische Ladungen im Gewebe ab und verhindert, dass Immunglobuline sich durch hydrophobe Bindung unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe binden.

Für die Lewis Y und die Galectin-3 Färbung wurde Blockierungsserum aus dem Vectastain Elite Mouse-Kit verwendet. Hierfür wurden 3 Tropfen des Normalserums zu 10ml PBS gegeben. Das Blockierungsserum wurde zum Nachweis von Lewis Y 20 Minuten und zum Nachweis von

Galectin-3 30 Minuten aufgetragen.

Bei der Sialyl Lewis y, der Galectin-7 sowie der Stathmin-1 Färbung wurde als Blockierungsserum Reagent 1 des ZytoChem Plus HRP Polymer Systems (Mouse/Rabbit) verwendet und für jeweils 5 Minuten aufgetragen.

Für die Sialyl Lewis x Färbung wurde als Blockierungsserum 5-prozentiges Rinderalbumin in PBS verwendet und für 30 Minuten aufgetragen.

Nach Abschütten des Blockierungsserums wurden im Anschluss die Primärantikörper aufgetragen.

Es folgte das Waschen der Schnitte für 2 x 2 Minuten in PBS.

Im Anschluss wurde bei der Sialyl Lewis a, der Galectin-7 und der Stathmin-1 Färbung als Post-Block die Reagenz 2 des ZytoChem Plus HRP Polymer Systems für jeweils 20 Minuten aufgetragen. Für die Sialyl Lewis x Färbung wurde als Sekundärantikörper Goat-anti-Mouse IgM (Verdünnung 1:200 in PBS), für die Lewis y Färbung Goat-anti-Mouse IgM (Verdünnung 1:200 in Dako-Verdünnungsmedium) und für die Galectin-3 Färbung anti-Mouse IgG (3 Tropfen Normalserum, 1 Tropfen anti-Mouse IgG und 10 ml steriles PBS) verwendet.

Wiederum wurden die Schnitte 2 x 2 Minuten in PBS gewaschen.

Es folgte die Detektion des gebundenen Primärantikörpers. Hierfür eignen sich verschiedene Nachweisverfahren. Zum Nachweis von Sialyl Lewis a, Galectin-7 sowie Stathmin-1 wurde die Reagenz 3 des ZytoChem Plus HRP Polymer Systems verwendet und für jeweils 30 Minuten aufgetragen. Für die übrigen Färbungen wurde der ABC-Komplex verwendet und für 30 Minuten aufgetragen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Affinität von Avidin zu Biotin. Das Tetramer Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Um unspezifische Reaktionen von Avidin zu vermeiden, wurde aus *Streptomyces avidinii* gentechnisch Streptavidin hergestellt, welches spezifischer ist. Für die ABC-Methode wurde biotinylierter Brückenantikörper verwendet, an welchen der ABC-Komplex binden kann. Dieser Komplex kann an drei von vier Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin binden. An den Komplex ist wiederum eine Peroxidase gekoppelt, welche nach Zugabe eines Substrats/Chromogenlösung eine chemische Reaktion startet, woraufhin sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein Farbnieder-

schlag bildet [43].

Erneut wurden die Schnitte 2 x 2 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit 3,3'-Diaminobenzidin (10 ml Substratpuffer + 10 Tropfen Chromogen) gefärbt.

Nach der Färbung wurden die Schnitte in Aqua dest. gewaschen und 2 Minuten mit saurem Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte 5 Minuten in Leitungswasser gebläut. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert und danach in Xylol aufgehellt.

Um die Präparate haltbar zu machen, wurden sie luftdicht in Eukitt eingeschlossen.

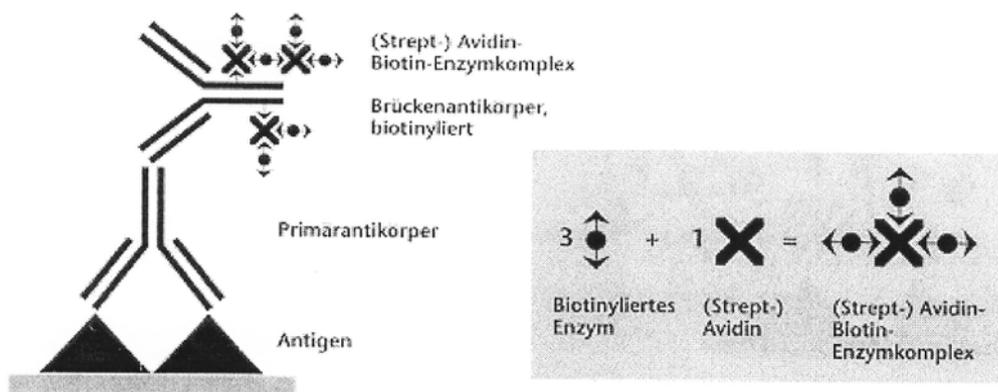


Abbildung 2: Strept-Avidin-Biotin-Komplex [43]

2.6 Auswertung

Alle Schnitte wurden an einem Zeiss Photomikroskop (Axiophot, Axiocam, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Zur Auswertung wurde der semiquantitative Score nach Remmele und Stegner, der Immunoreactive-Score (IRS-Score), verwendet. Dabei werden die Intensität der Färbung und der prozentuale Anteil der Färbung berücksichtigt. Die Intensität ist eingeteilt in *keine Färbung* (= 0), *schwache Färbung* (= 1), *moderate Färbung* (= 2) und *starke Färbung* (= 3). Der prozentuale Anteil wird eingeteilt in *keine Färbung* (= 0), *< 10% der Zellen gefärbt* (= 1), *10-50% der Zellen gefärbt* (= 2), *51-80% der Zellen gefärbt* (= 3) und *> 80% der Zellen gefärbt* (= 4). Die Werte der Intensität sowie des prozentualen Anteils der

Färbung werden miteinander multipliziert. Daraus ergibt sich der IRS-Score. Mit Ausnahme der p16 Färbung wurden alle Färbungen nach diesem Score ausgewertet. Die p16 Färbung wurde nach positiv und negativ ausgewertet. Positiv gewertet wurden dabei nur blocktypartig positiv gefärbte Schnitte.

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics 22.0 (PASW Statistic, SPSS Inc., IBM, Chicago, IL) durchgeführt. Zur Analyse der Tumormarkerexpression wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Abhängigkeit der einzelnen Marker untereinander wurde mit der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation berechnet. Dabei wurden alle Ergebnisse $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Dysplasiegrade

3.1.1 p16 Färbung

In der p16 Färbung konnte ein signifikanter Anstieg der positiv gewerteten Fälle entsprechend ihres Dysplasiegrades festgestellt werden. So zeigte sich in der CIN III Gruppe ein Anteil an positiven Färbungen von 77%, in der CIN II Gruppe von 45% und in der CIN I Gruppe von 21%. In der Kontrollgruppe waren keine positiv gefärbten Schnitte nachweisbar. Der Anteil an positiv gefärbten Fällen war signifikant höher in der CIN III Gruppe im Vergleich zur CIN II Gruppe ($p < 0,001$). Auch die CIN II Gruppe zeigte im Vergleich zur CIN I Gruppe einen signifikant höheren Anteil an p16 positiven Schnitten. Bezüglich der Progress und Regressgruppen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

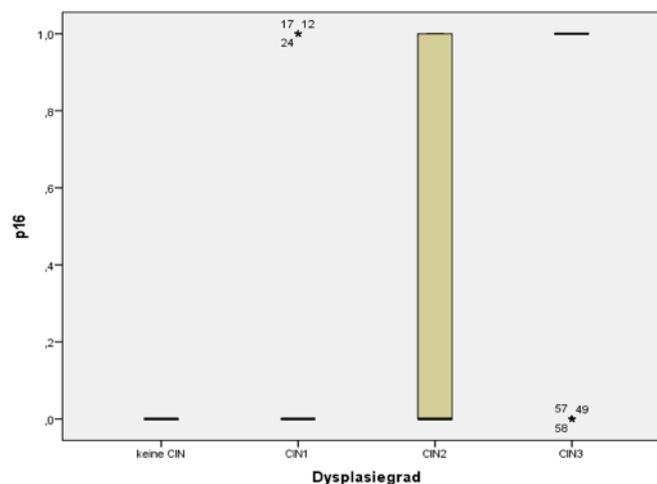


Abbildung 3: Färbeergebnisse p16

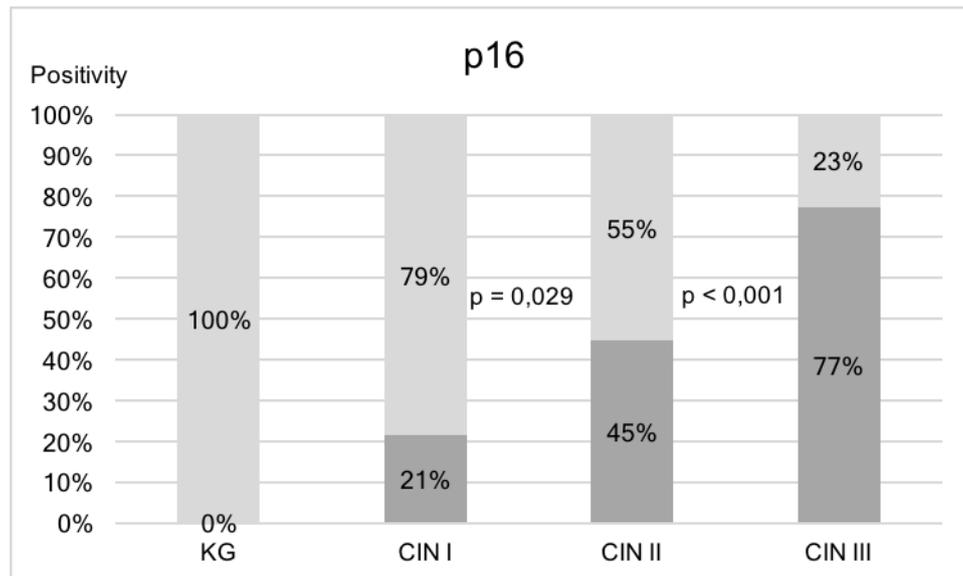


Abbildung 4: Färbeergebnisse p16 Mittelwerte

3.1.2 Stathmin-1

In der Auswertung der Stathmin-1 Färbung zeigte sich eine moderate Intensität der Kernfärbung in der CIN III Gruppe mit dem Mittelwert 1,5. Die Intensität der Färbung war dabei signifikant stärker in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe ($p = 0,010$). Die Färbeintensitäten der anderen Gruppen erwiesen sich allesamt schwach bis moderat. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CIN II und CIN I.

Auch der IRS-Score der Kernfärbung war signifikant höher in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe ($p = 0,007$). Die IRS-Scores der CIN I Gruppe sowie der Kontrollgruppe waren ebenfalls deutlich niedriger als in der CIN III Gruppe.

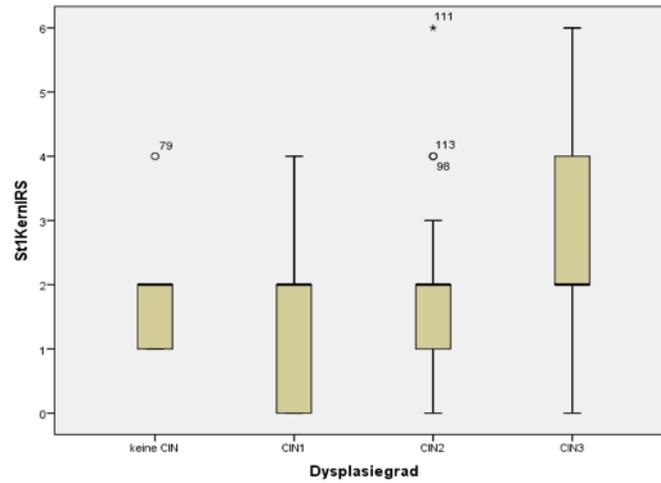


Abbildung 5: Färbergebnisse Stathmin-1 Kern IRS

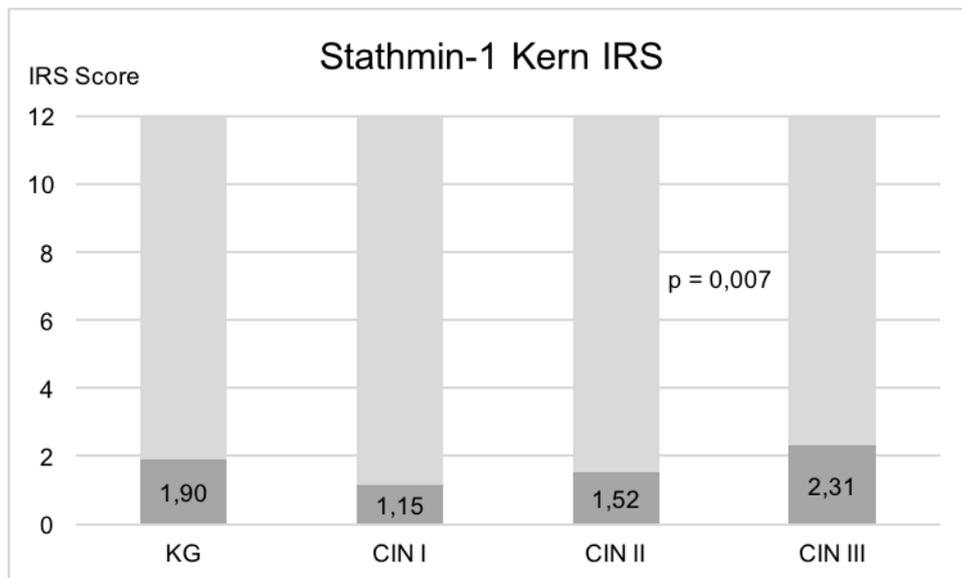


Abbildung 6: Färbergebnisse Stathmin-1 Kern IRS Mittelwerte

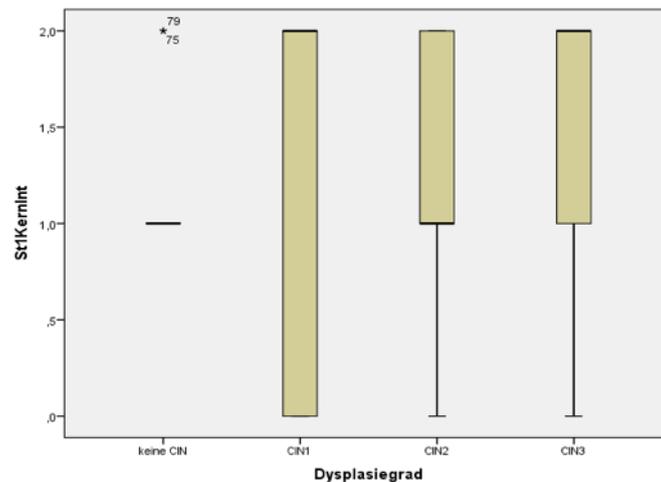


Abbildung 7: Färbeergebnisse Stathmin-1 Kern Intensität

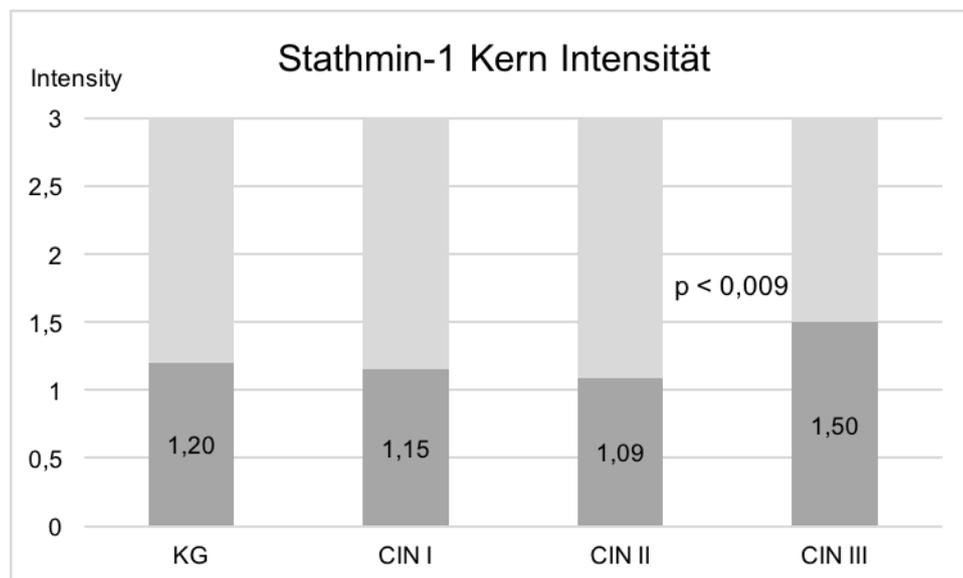


Abbildung 8: Färbeergebnisse Stathmin-1 Kern Intensität Mittelwerte

3.1.3 Sialyl Lewis a

Sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der CIN I und der CIN II Gruppe zeigte sich ein disseminiertes Färbeverhalten. So konnte eine Färbung in allen Teilen des Epithels nachgewiesen werden. In der CIN III Gruppe zeigte sich vor allem der apikale Teil des Epithels gefärbt, wohingegen die basalen Schichten kaum eine Expression von Sialyl Lewis a aufwiesen.

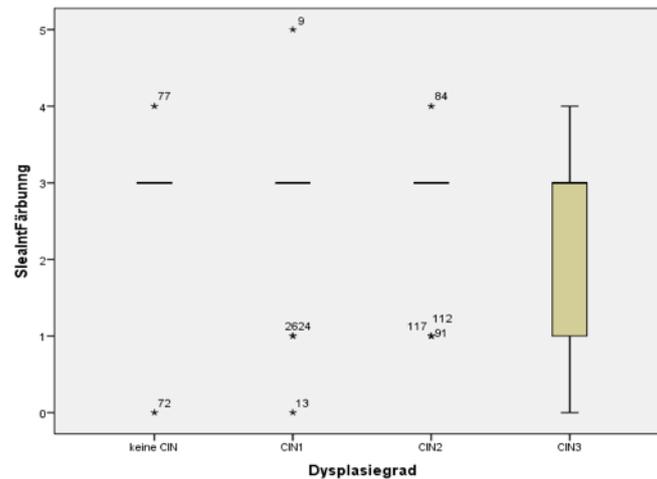


Abbildung 9: Färbeergebnisse Sialyl Lewis a

3.1.4 Sialyl Lewis x

Die Intensität der Membranfärbung war schwach ausgeprägt in der CIN III Gruppe, die Intensitäten der CIN II, der CIN I und der Kontrollgruppe hingegen waren moderat und zeigten keinen signifikanten Unterschied. Dabei war die Intensität der Membranfärbung der CIN III Gruppe signifikant schwächer als in der CIN II Gruppe ($p < 0,001$). Ebenso verhielt es sich auch mit dem IRS-Score. Dieser war signifikant geringer in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe ($p = 0,001$). Auch die IRS-Scores der CIN I sowie der Kontrollgruppe waren deutlich höher als in der CIN III Gruppe. Zwischen der CIN I und der CIN II waren weder bei der Intensität der Membranfärbung, noch beim IRS Score der Membranfärbung signifikante Unterschiede festzustellen.

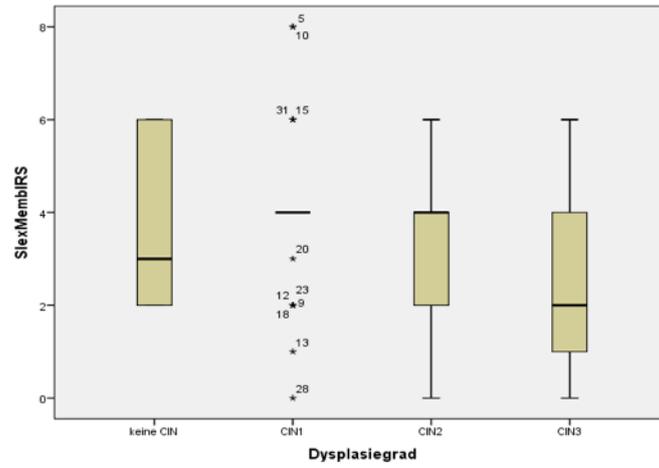


Abbildung 10: Färbergebnisse Sialyl Lewis x Membran IRS

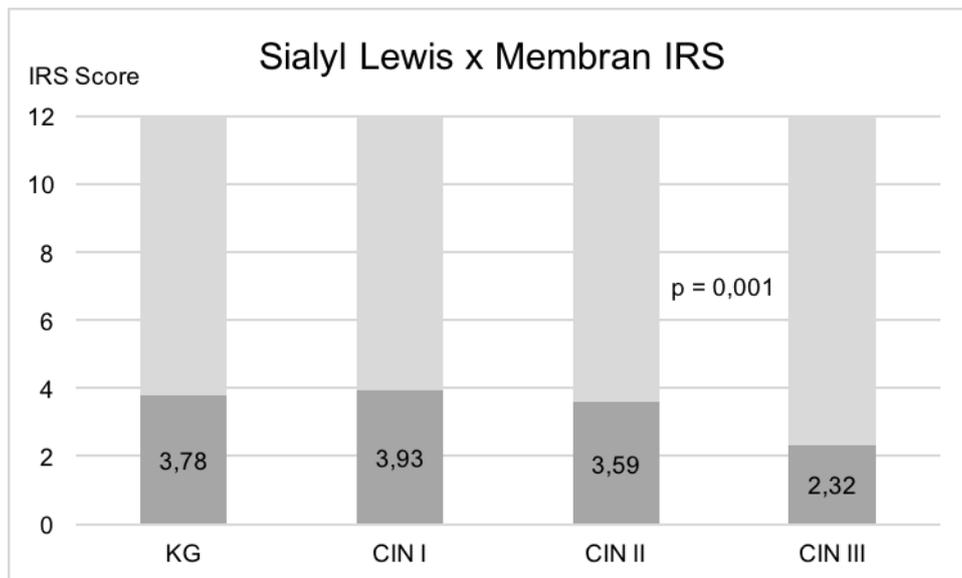


Abbildung 11: Färbergebnisse Sialyl Lewis x Membran IRS Mittelwerte

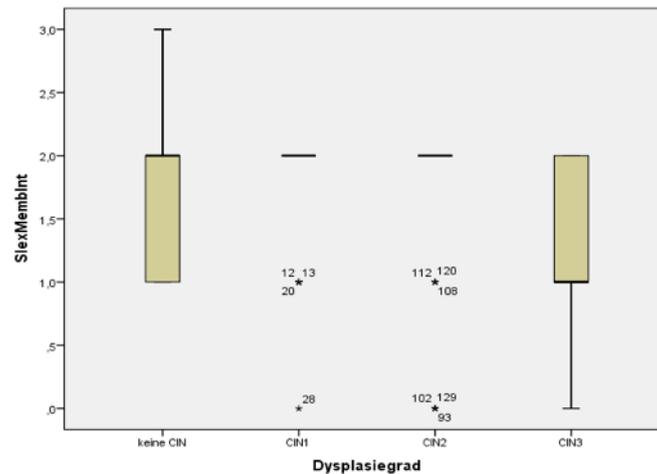


Abbildung 12: Färbeergebnisse Sialyl Lewis x Membran Intensität

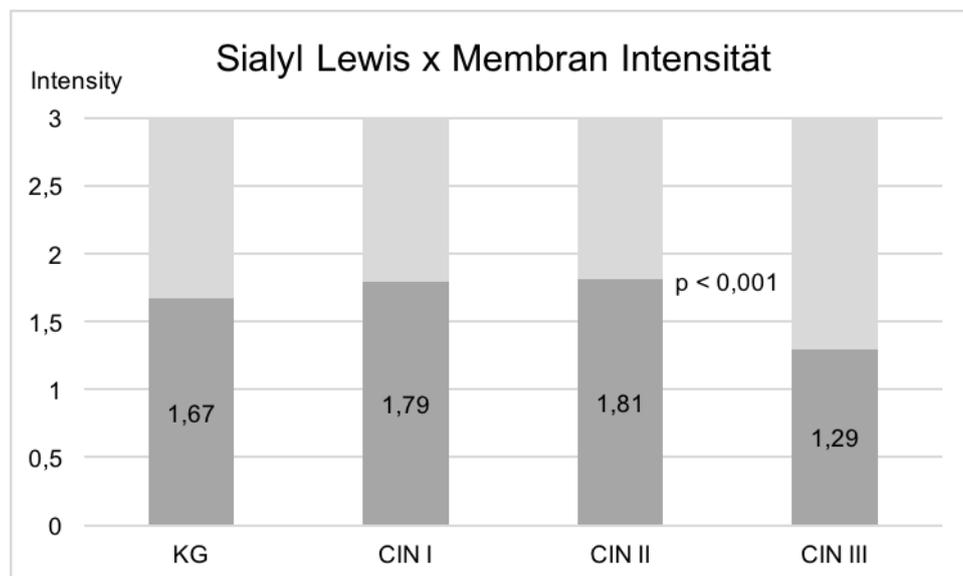


Abbildung 13: Färbeergebnisse Sialyl Lewis x Membran Intensität Mittelwerte

3.1.5 Lewis y

Zur Auswertung der Lewis y Färbung wurden wiederum die Zytosol-, die Membran- sowie die Kernfärbung differenziert ausgewertet. Weder bezüglich der Intensität der Färbung noch bezüglich des IRS Scores konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden. Vielmehr zeigte sich in allen CIN Gruppen ein ähnliches Färbeverhalten.

3.1.6 Galectin-3

Bei der Auswertung der Galectin Färbung wurde ebenfalls zwischen verschiedenen Kompartimenten unterschieden. Es wurden Zytosol-, Kern- und Membranfärbung getrennt ausgewertet. Bezüglich der Membranfärbung konnten keine signifikanten Ergebnisse festgestellt werden. Die Intensität der Zytosolfärbung hingegen war signifikant stärker in der CIN III Gruppe, als in der CIN II Gruppe ($p < 0,001$). Die Intensitäten der Zytosolfärbung der anderen Gruppen waren ebenfalls deutlich abgeschwächt im Vergleich zur CIN III Gruppe. Zwischen der CIN I und der CIN II konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Ebenfalls signifikant stärker in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe war die Intensität der Kernfärbung ($p = 0,009$). Der Mittelwert der CIN III Gruppe lag bei 1,35, der Mittelwert der CIN II Gruppe bei 1,09. Die Mittelwerte der anderen Gruppen zeigten einen ähnlichen Mittelwert wie die CIN III Gruppe. So war auch ein signifikanter Unterschied der Kernintensität zwischen der CIN II und der CIN I Gruppe festzustellen. Dabei war die Intensität der CIN I Gruppe signifikant stärker als in der CIN II Gruppe ($p = 0,014$).

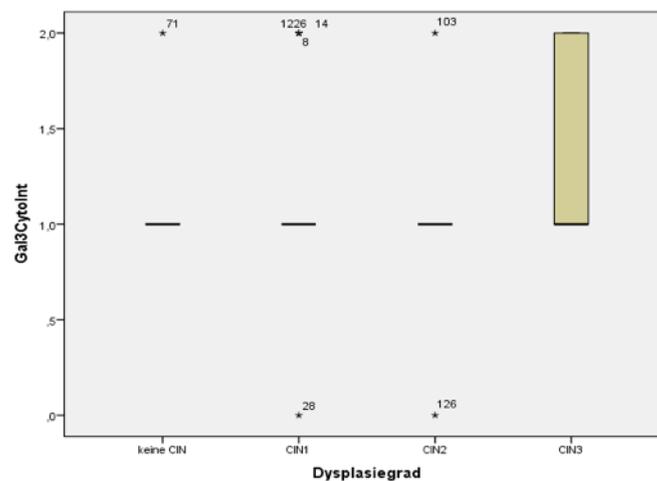


Abbildung 14: Färbeargebnisse Galectin-3 Zytosol Intensität

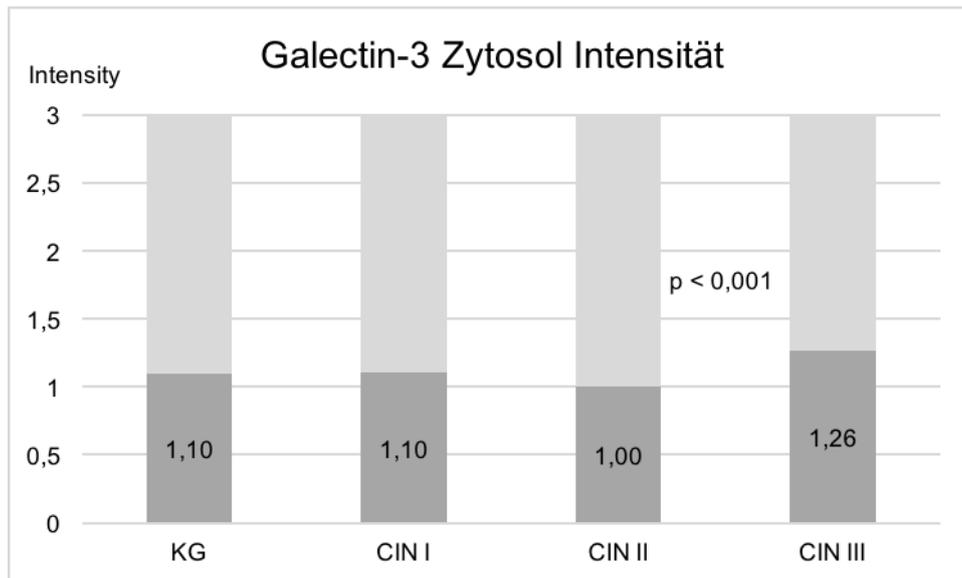


Abbildung 15: Färberegebnisse Galectin-3 Zytosol Intensität Mittelwerte

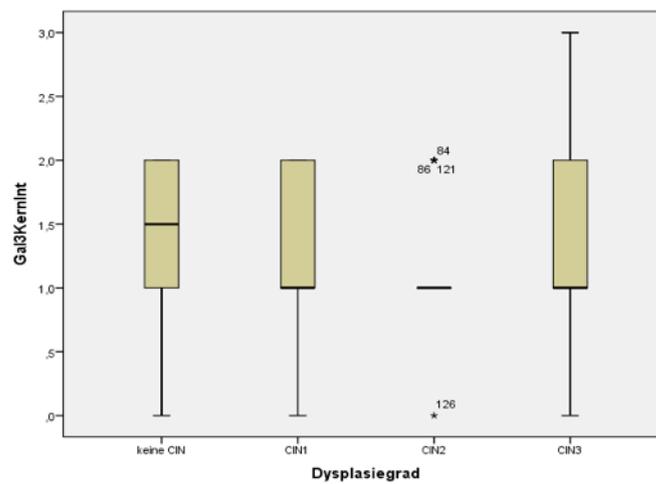


Abbildung 16: Färberegebnisse Galectin-3 Kern Intensität

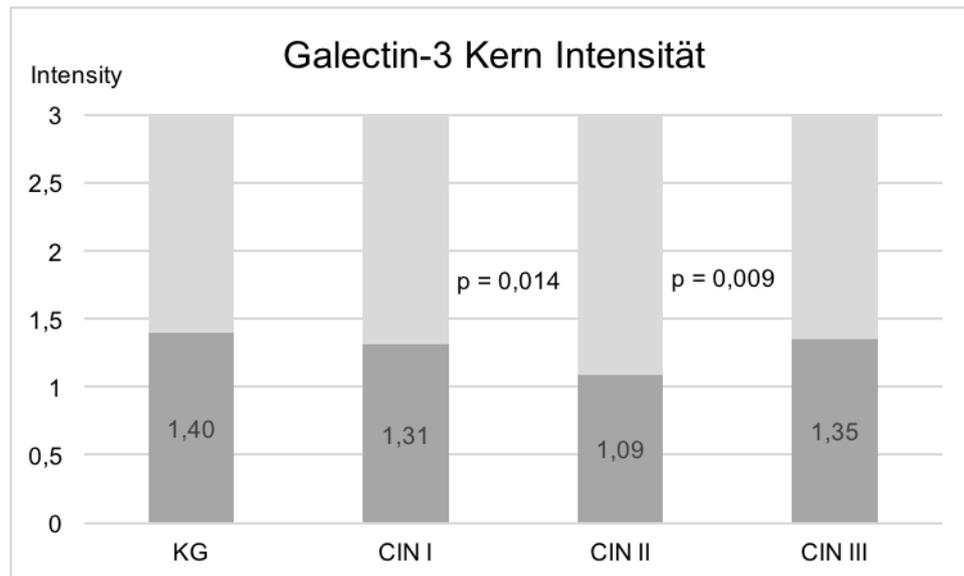


Abbildung 17: Färbeergebnisse Galectin-3 Kern Intensität Mittelwerte

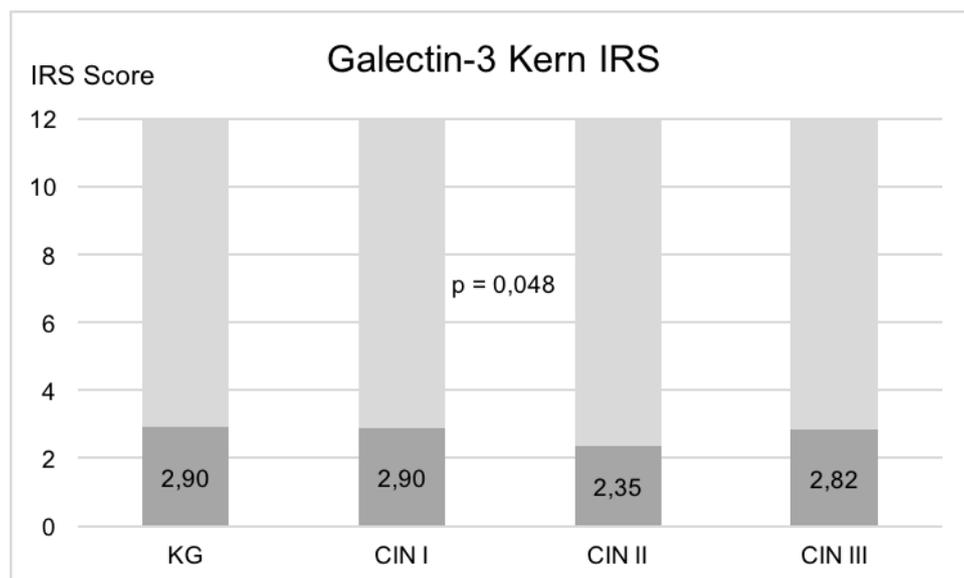


Abbildung 18: Färbeergebnisse Galectin-3 Kern IRS Mittelwerte

3.1.7 Galectin-7

Der Nachweis von Galectin-7 zeigte einen signifikant abgeschwächten IRS-Score der Zytosolfärbung in der CIN III Gruppe im Vergleich zur CIN II Gruppe ($p < 0,001$). Die IRS-Scores sowohl der CIN I als auch der Kontrollgruppe waren ähnlich des IRS-Scores der CIN II Gruppe moderat und zeigten untereinander keinen signifikanten Unterschied.

Auch in der Färbeintensität der Zytosolfärbung zeigte sich eine signifikant geringere Intensität in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe ($p = 0,029$). Die Intensitäten der CIN I und der Kontrollgruppe waren ebenfalls deutlich stärker ausgeprägt. Wiederum konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der CIN I und der CIN II Gruppe nachgewiesen werden.

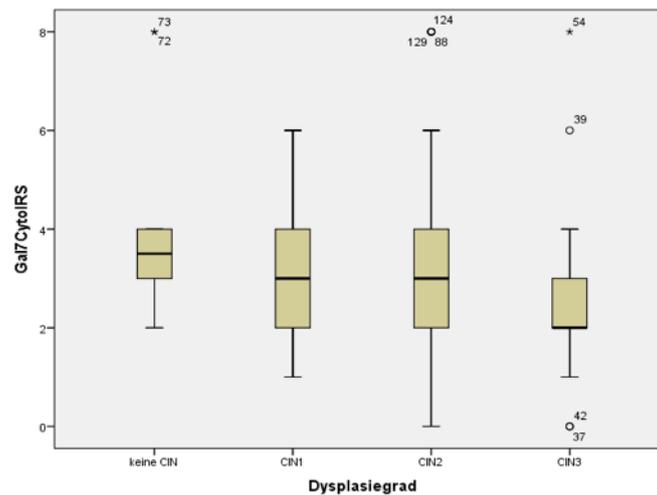


Abbildung 19: Färbergebnisse Galectin-7 Zytosol IRS

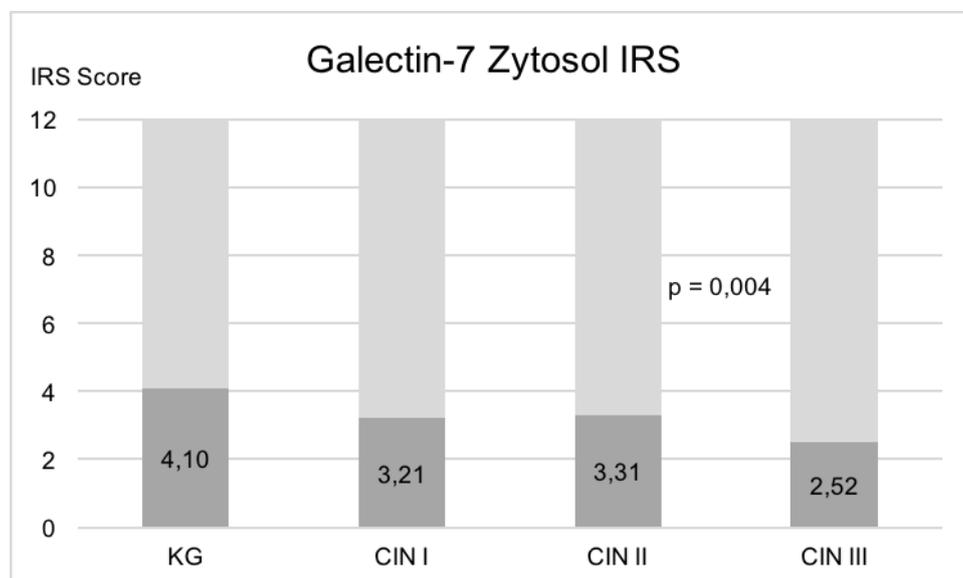


Abbildung 20: Färbergebnisse Galectin-7 Zytosol IRS Mittelwerte

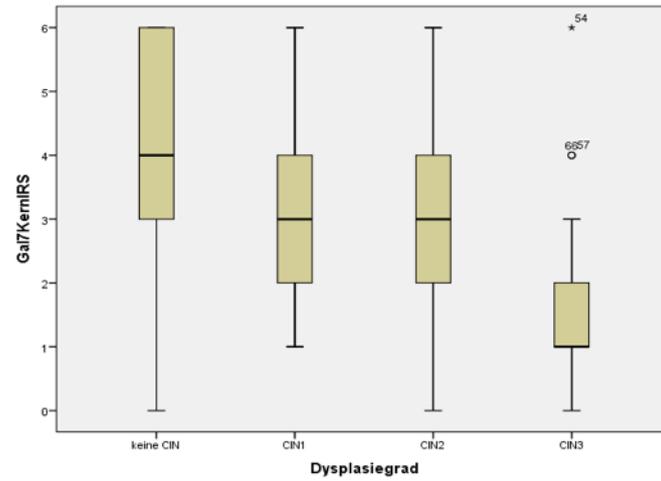


Abbildung 21: Färberegebnisse Galectin-7 Kern IRS

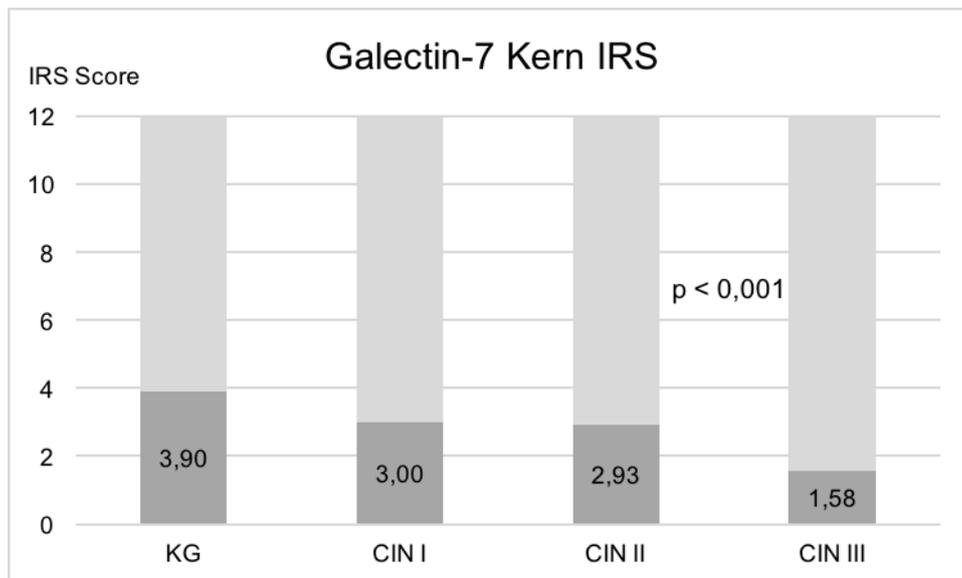


Abbildung 22: Färberegebnisse Galectin-7 Kern IRS Mittelwerte

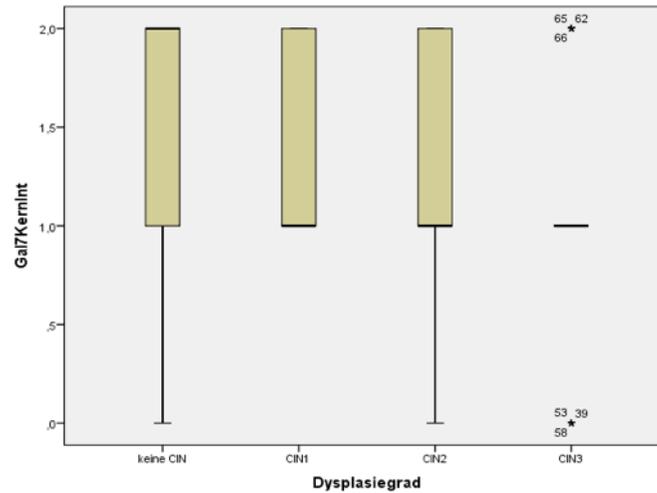


Abbildung 23: Färbeergebnisse Galectin-7 Kern Intensität

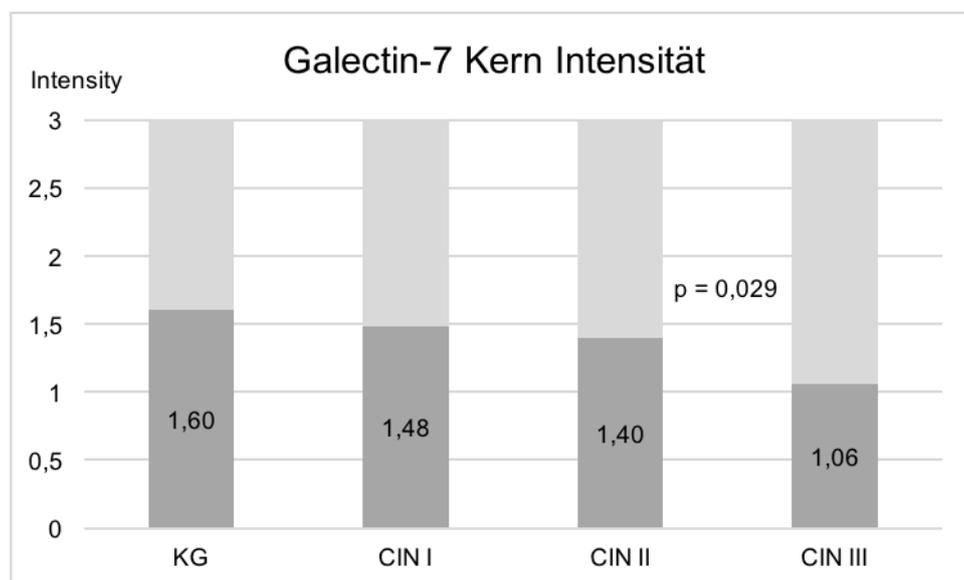


Abbildung 24: Färbeergebnisse Galectin-7 Kern Intensität Mittelwerte

3.2 Ergebnisse der Progress- und Regressgruppe

Die Patientinnen der CIN II Gruppe wurden unterteilt in eine Progress- und eine Regressgruppe, um Marker zur Vorhersage eines Progresses oder Regresses zu bestimmen. Alle Patientinnen hatten mindestens eine Vergleichsbiopsie im Verlauf. Um sicherzugehen, dass die CIN II Fälle tatsächlich eine CIN II vorwiesen, wurden diese von einem zweiten Pathologen verblindet

reevaluiert, da die Diagnose einer CIN II stark untersucherabhängig ist.

3.2.1 Sialyl Lewis a

Bei der Auswertung der Progress- und Regressgruppe der Patientinnen mit CIN II wurde zwischen verschiedenen Kompartimenten unterschieden. Dabei wurden die Zytosolfärbung, die Membranfärbung und die Kernfärbung differenziert betrachtet.

Der IRS-Score der Sialyl Lewis a Zytosolfärbung wies dabei einen signifikant geringeren Score bei Patientinnen mit Regress als bei Patientinnen mit Progress ($p = 0,044$) auf. Des Weiteren waren einige Trends ohne Erreichen einer Signifikanz zu erkennen. Sowohl der IRS-Score als auch die Intensität der Sialyl Lewis a Kernfärbung zeigten einen Trend, geringer bzw. weniger intensiv bei Patientinnen mit Regress als bei Patientinnen mit Progress ausgeprägt zu sein. Ebenso verhielt es sich mit der Intensität der Sialyl Lewis a Zytosolfärbung.

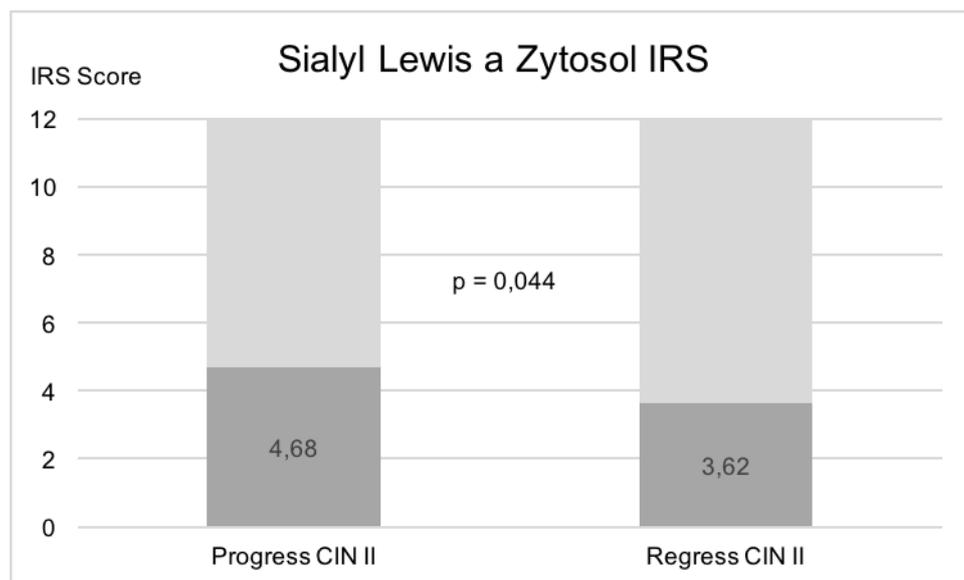


Abbildung 25: Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Zytosol IRS

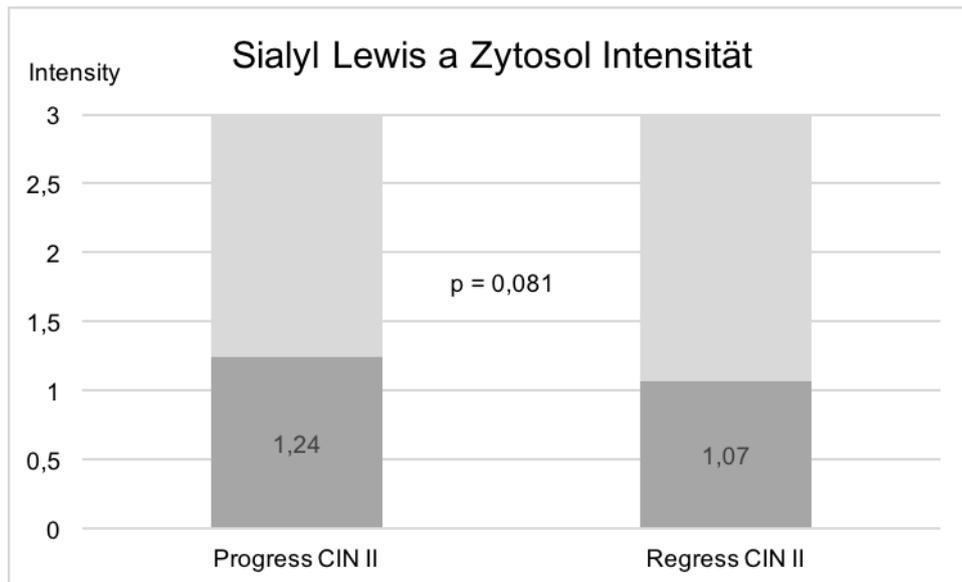


Abbildung 26: Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Zytosol Intensität

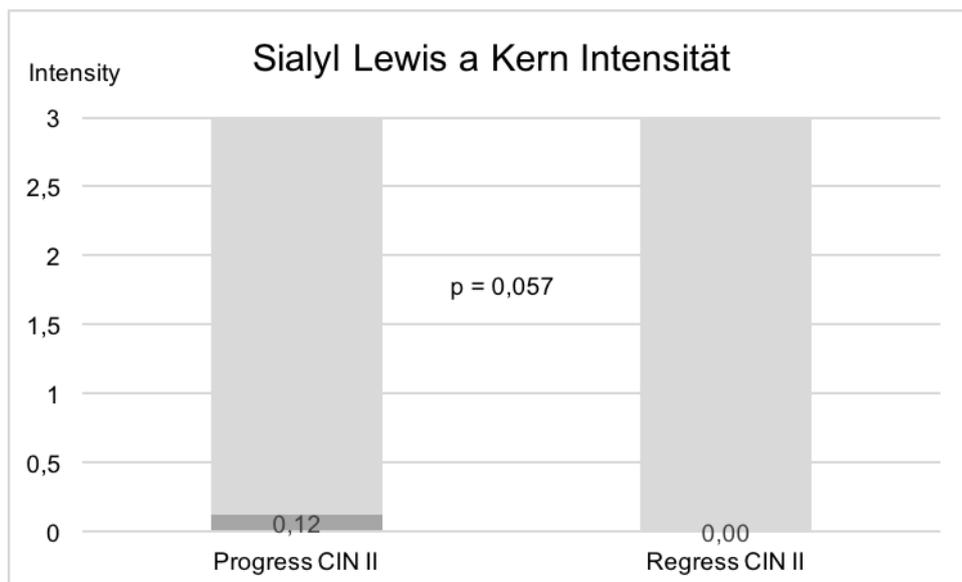


Abbildung 27: Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Kern Intensität

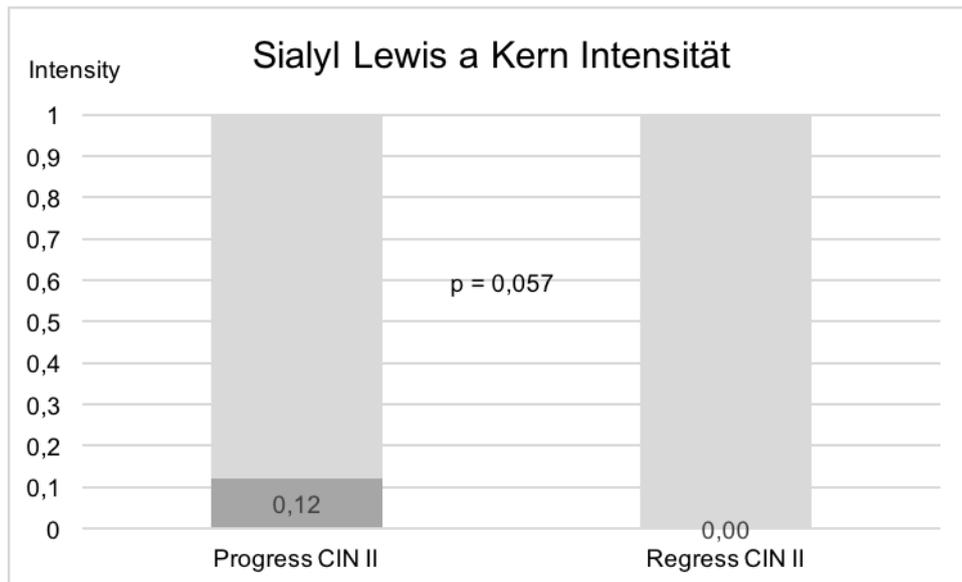


Abbildung 28: Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Kern Intensität (zur Verdeutlichung angepasste Skala)

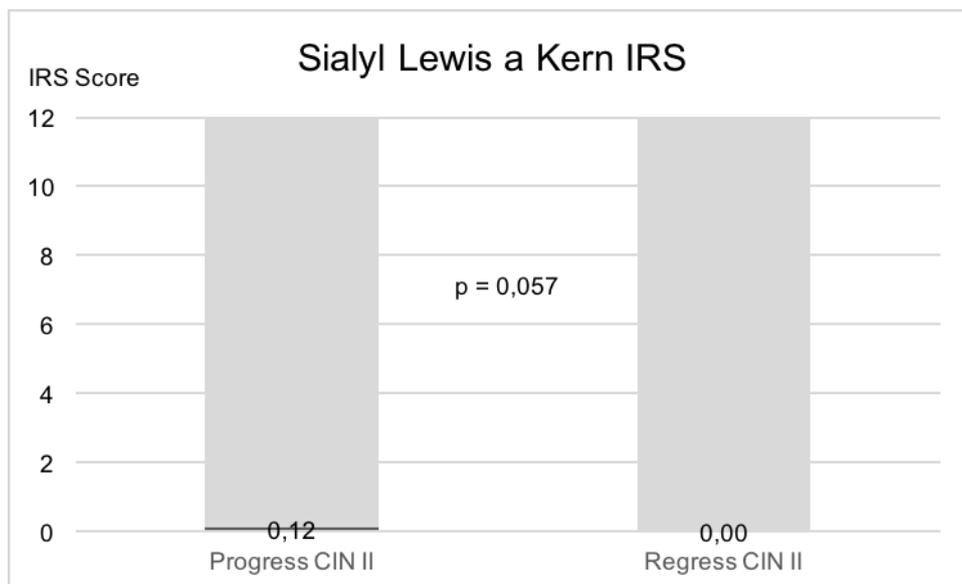


Abbildung 29: Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Kern IRS

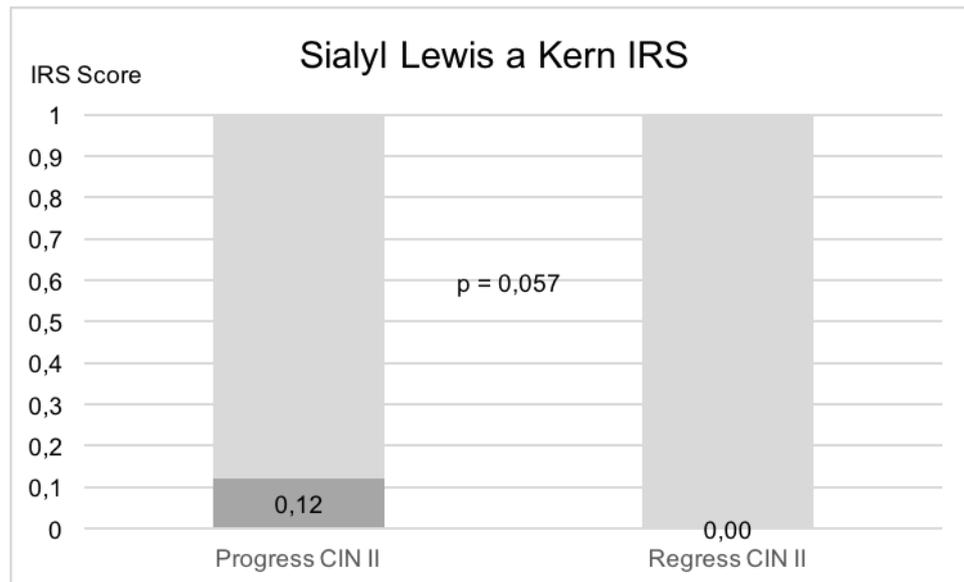


Abbildung 30: Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Kern IRS (zur Verdeutlichung angepasste Skala)

3.2.2 Lewis y

Auch bei der Lewis y Färbung wies die Regressgruppe einen deutlich niedrigeren IRS-Score auf als die Progressgruppe ($p = 0,077$).

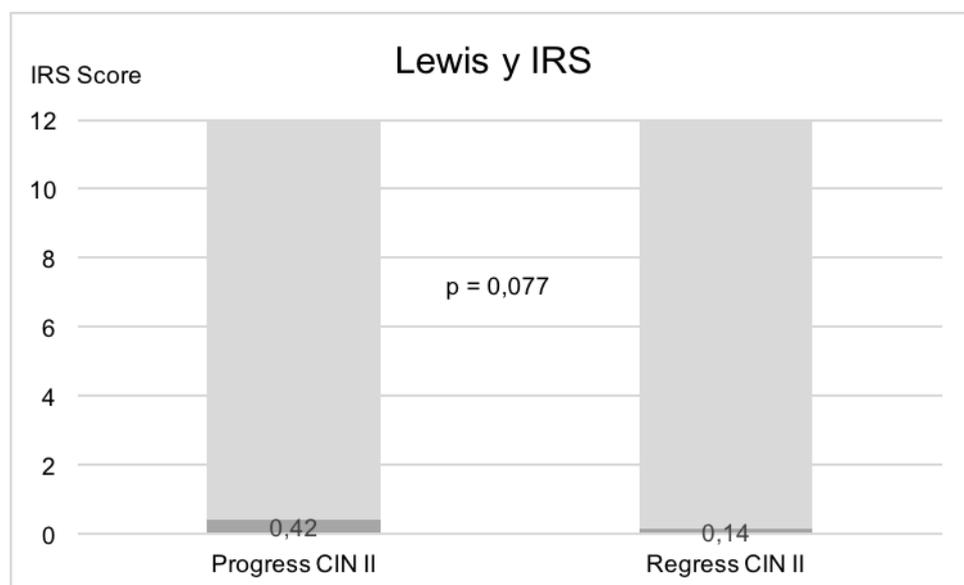


Abbildung 31: Färbeergebnisse Sialyl Lewis y IRS

3.2.3 Galectin-3

Auch bei der Galectin-3 Färbung wurde zwischen einzelnen Kompartimenten unterschieden. Differenziert betrachtet wurden hier die Zytosol-, die Membran- sowie die Kernfärbung. Bei der Galectin-3 Färbung waren erneut Trends zu erkennen. So wiesen Patientinnen der Regressgruppe einen geringeren IRS-Score der Zytosolfärbung sowie eine schwächere Intensität in der Kernfärbung im Vergleich zu Patientinnen mit Progress auf.

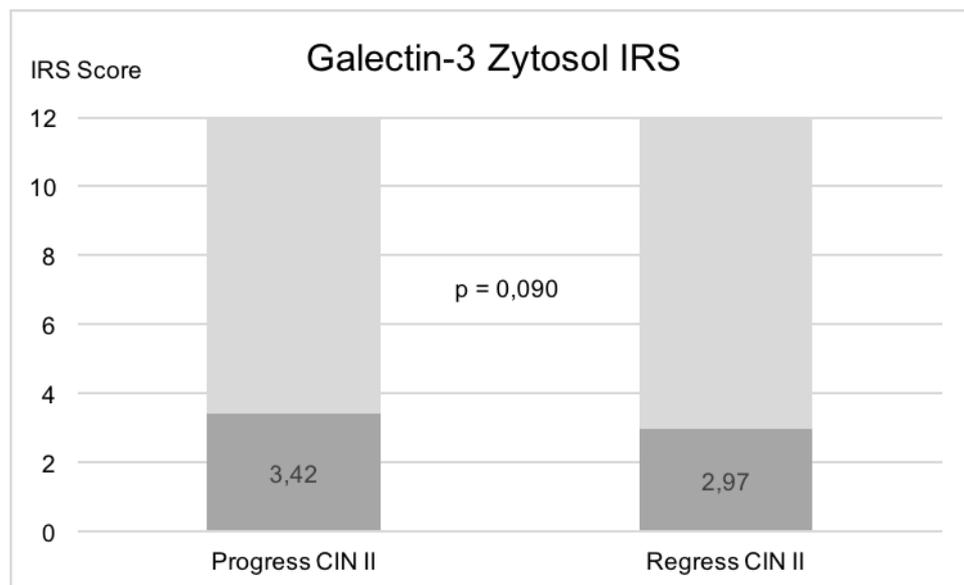


Abbildung 32: Färbeargebnisse Galectin-3 Zytosol IRS

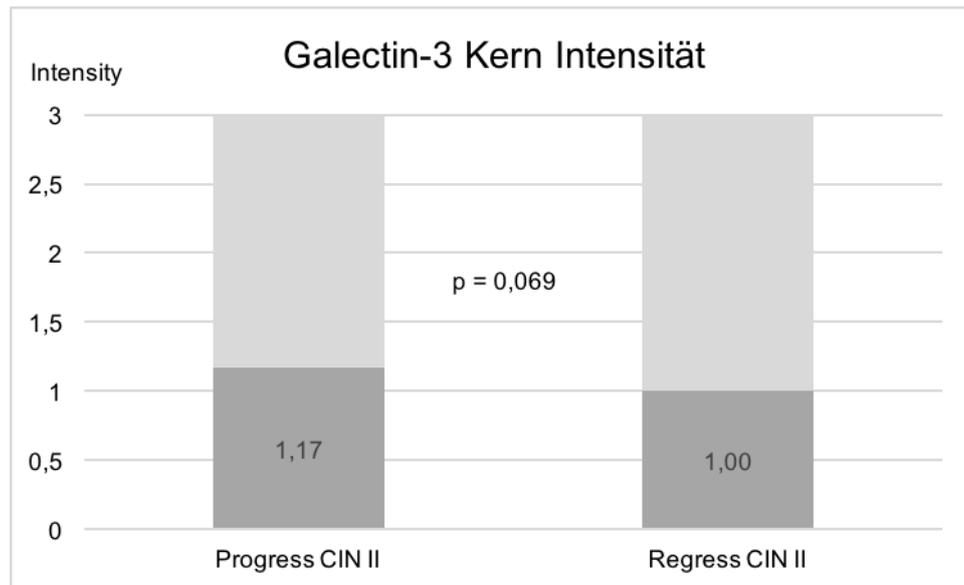


Abbildung 33: Färbeergebnisse Galectin-3 Kern Intensität

3.3 Korrelationsanalyse

Um eine Koexpression oder negative Korrelation der einzelnen Färbungen nachzuweisen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

Dabei war eine positive Korrelation der Galectin-3 Zytosolfärbung und der p16 Färbung festzustellen (Spearman correlation coefficient $r = 0,222$; $p = 0,015$). Des Weiteren zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Intensität der Galectin-3 Kernfärbung und der Intensität der Stathmin-1 Färbung (Spearman correlation coefficient $r = 0,356$; $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu fanden wir eine negative Korrelation zwischen dem Galectin-7 IRS-Score und der p16 Färbung (Spearman correlation coefficient $r = -0,0194$; $p = 0,034$).

Darüber hinaus war sowohl zwischen der Intensität der Stathmin-1 Färbung und dem Nachweis von p16 (Spearman correlation coefficient $r = 0,0215$; $p = 0,005$) sowie dem Stathmin-1 IRS-Score und der p16 Färbung (Spearman correlation coefficient $r = 0,254$; $p = 0,005$) eine positive Korrelation festzustellen.

4 Diskussion

Die Einteilung der zervikalen intraepithelialen Neoplasie sowie deren Behandlungsmöglichkeiten unterlagen in den letzten Jahren zahlreichen Veränderungen und Aktualisierungen. Heutzutage wird in Deutschland überwiegend das dreiteilige System der CIN I-III verwendet, wohingegen im angloamerikanischen Sprachraum entsprechend der Bethesda-Klassifikation lediglich zwischen LSIL und HSIL unterschieden wird.

Alle CIN Läsionen haben eine gewisse Tendenz zur spontanen Regression, wobei diese umso niedriger wird, je höher der Dysplasiegrad ist. Parallel dazu steigt die Wahrscheinlichkeit des Progresses. Dementsprechend stellt die CIN III laut nationalen und internationalen Empfehlungen eine Indikation zur Operation dar. Die CIN II wird aufgrund der mit einer Konisation assoziierten Frühgeburtslichkeit zunehmend konservativ behandelt, insbesondere, wenn es sich um eine junge Patientin mit noch nicht abgeschlossener Familienplanung handelt.

Um die Wahrscheinlichkeit eines Progresses bzw. Regresses besser einschätzen zu können, wurde in dieser Studie die Expression von p16, Galectin-3, Galectin-7, Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x, Lewis y und Stathmin-1 an Zervixdysplasien aller Stufen sowie an gesundem Gewebe untersucht.

In allen Färbungen, mit Ausnahme von Lewis y, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der CIN II und der CIN III. Zusätzlich zeigten sich nur in der p16 und der Galectin-3 Kernfärbung signifikante Unterschiede zwischen der CIN I und der CIN II.

4.1 p16 Färbung

Die p16 Färbung diente in dieser Studie als Kontrollfärbung, da bereits in zahlreichen Studien gezeigt wurde, dass p16 ein geeigneter Marker zur Einteilung von Dysplasien der Zervix ist [44] [45]. Darüber hinaus scheint p16 auch mit dem Grad der Dysplasie zu korrelieren [46] [47] [48].

p16 ist ein Cyclin abhängiger Kinase-Inhibitor (CDK-Inhibitor), der den Zellzyklus an der G1-S Kontrollstelle verlangsamt, indem es CDK-4 und CDK-6 inhibiert. Diese wiederum inaktivieren

durch Phosphorylierung des pRB. Bei einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus kommt es durch das E7 Protein des Virus zu einer Inaktivierung des pRB und zu einer gesteigerten Freisetzung von E2F Transkriptionsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von p16 abhängig ist von der Aktivität des pRB. Bei HPV Infektionen kommt es aufgrund eines negativen Feedbackmechanismus durch die Inaktivierung des pRB zu einer Überexpression des p16 [49].

Eine Expression von p16 zeigt sich meist als Antwort auf eine Infektion von Wirtszellen und normalerweise nicht in gesunden Zellen. Die Aufgabe von p16 als Regulierer der Zellproliferation geht bei einer HPV-Infektion verloren und Zellen können trotz einer hohen Expression von p16 proliferieren [44].

Auch in dieser Studie konnte ein signifikanter Unterschied aller Dysplasiestufen gezeigt werden. Darüber hinaus korrelierte auch die Expression von p16 mit dem Grad der Dysplasie.

4.2 Stathmin-1 Färbung

Die Intensität der Expression von Stathmin-1 im Kern erwies sich als signifikant stärker in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe. Sowohl in der CIN II als auch in der CIN I- sowie in der Kontrollgruppe war die Intensität schwach ausgeprägt. Ebenso verhielt es sich mit dem IRS Score der Kernfärbung. Dieser war in der CIN III Gruppe signifikant höher als in der CIN II Gruppe. Zwischen der CIN I und der CIN II Färbung konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Stathmin-1, auch bekannt als Onkoprotein 18, ist ein Phosphoprotein des Zytosols, welches ubiquitär vorhanden ist und eine wichtige Rolle bei der Regulation von Mitose und Interphase Mikrotubuli spielt. Dabei agiert es als Destabilisator von Mikrotubuli. Mikrotubuli bestehen aus α - und β -Tubulindimeren und bilden mit weiteren Filamenten das Zellskelett. Stathmin-1 sorgt für eine Depolymerisation der Mikrotubuli oder es destabilisiert Mikrotubuli, indem es freie $\alpha\beta$ -Tubuli Heterodimere in einen Komplex überführt, der diese von einer Polymerisation und somit dem Wachsen von Mikrotubuli abhält. Eine wichtige Rolle bei der Expression von Stathmin-1 scheinen Transkriptionsfaktoren der Familie E2F zu spielen. Eine vom pRB vermit-

telte Inhibierung von E2F führt zur Downregulation. Eine wichtige Rolle kommt Stathmin-1 auch bei der Zellteilung zu. Es wird während der Prophase der Mitose durch Phosphorylierung durch CDK1 inhibiert, wodurch sich der Spindelapparat korrekt ausbilden kann. Eine Überexpression oder zu geringe Expression von Stathmin-1 führt somit zu Störungen der Mitose. Darüber hinaus ist Stathmin-1 Ziel der Apoptose Signalkaskade der ASK1-p28 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) und der JNK Kinase. Weiterhin ist Stathmin-1 für die Migration der Zellen wichtig [50].

Es zeigte sich in vielen Studien, dass eine Vielzahl von Karzinomen eine Überexpression von Stathmin-1 aufweisen. Dazu zählen unter anderem Osteosarkome, Brustkrebs, Ovarialtumore, Lungenkarzinome, akute Leukämien sowie Zervixkarzinome. Eine Überexpression von Stathmin-1 scheint darüber hinaus mit einem schlechteren Outcome einherzugehen [51].

Eine Expression von Stathmin-1 bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie wurde bisher lediglich in einer Studie beschrieben. In dieser zeigte sich ein Anstieg der Stathmin-1 Expression abhängig vom Dysplasiegrad. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, jedoch zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression von der CIN II zur CIN III [52].

4.3 Galectin-3 und Galectin-7 Färbung

Neben der Expression von p16 und Stathmin-1 wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Expression von Galectin-3 und Galectin-7 untersucht.

Galectine sind eine eigene Untergruppe von Lectinen. Lectine sind Proteine, die spezielle Kohlehydratstrukturen binden und so bestimmte Glykokonjugate erkennen können.

Galectine wiederum zeichnen sich durch spezifische Eigenschaften aus. Zum einen durch charakteristische Aminosäuresequenzen, zum anderen durch ihre Bindungsspezifität von Galactosidase-Zuckern [53].

Bisher sind 15 Galectine bekannt, die unterteilt werden können in Galectine mit einer Bindungsstelle für Kohlehydrate und in Galectine mit zwei Bindungsstellen. Galectine kommen sowohl im Intra- als auch im Extrazellularraum vor. Ihre Expression variiert dabei während der Zelldif-

ferenzierung und der Entwicklung von Organismen und Gewebe. Im Extrazellulärraum binden Galectine an Glykoproteine der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Laminin, Fibronectin und Elastin. Darüber hinaus können sie an Glykokonjugate der Zelloberfläche binden und durch Querverbindungen (crosslinks) transmembranäre Signalkaskaden triggern. So spielen sie eine wichtige Rolle bei Vorgängen wie Mitose, Apoptose und im Zellzyklus. Intrazellulär pendeln Galectine zwischen Kern und Zytoplasma und sind auch hier an wichtigen Zellprozessen beteiligt. Dazu zählen pre-mRNA splicing, Zellwachstum, erneut Apoptose und der Zellzyklus, wobei die Mechanismen dafür nicht geklärt sind [54].

Galectin-3 ist eines der am besten untersuchten Galectine. In vielen Studien zeigte sich eine Überexpression des Proteins in verschiedensten Arten von Karzinomen. Ihm kommt dabei eine wichtige Funktion bei vielen biologischen Prozessen zu. Galectin-3 ist somit unter anderem an der Regulation des Tumorwachstums, Tumordinvasion, Angiogenese und der Verhinderung von Apoptose beteiligt. Gleichzeitig ist es dadurch aber auch ein mögliches Ziel für Tumorthera-pien und ein diagnostischer Marker [55] - [59]. Eine Überexpression von Galectin-3 wies in einigen Studien darüber hinaus auf ein aggressiveres Tumorverhalten hin [60] [61] [62]. Beim Zervixkarzinom zeigte sich eine schlechtere Überlebensrate und ein höheres Risiko für Lymphknotenmetastasierung bei Überexpression von Galectin-3 [63].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bezüglich der Expression von Galectin-3 eine signifikant stärkere Intensität der Zytosolfärbung in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe. Zwischen der CIN I und der CIN II Gruppe war kein signifikanter Unterschied erkennbar. Auch die Intensität der Kernfärbung war signifikant stärker in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe, jedoch zeigte sich auch zwischen der CIN I und der CIN II ein signifikanter Unterschied, wobei die Intensität der Kernfärbung in der CIN I signifikant stärker ausgeprägt war als in der CIN II Gruppe.

Galectin-7 zählt zu den bisher weniger gut untersuchten Galectinen. Im Gegensatz zu anderen Galectinen, kommt Galectin-7 hauptsächlich in Epithelzellen vor und wird kaum in anderen Zellen, wie Muskel- oder Nervenzellen exprimiert. Es scheint somit ein Marker für die Differen-

zierung von Epithel zu sein. Es zeigte sich, dass eine Expression von Galectin-7 beispielsweise bei Brustkrebs epithelialen Ursprungs nur bei aggressiveren Unterarten auftrat. Man fand jedoch auch, dass Zellen mit nur einer geringen bzw. kaum messbaren Expression von Galectin-7 ein gesteigertes Risiko für Lungen- und Knochenmetastasen sowie für größere osteolytische Läsionen aufwiesen.

Beim Ovarialkarzinom korrelierte die Expression von Galectin-7 mit einem schlechteren Gesamtüberleben. Außerdem war es in high-grade Tumoren und Metastasen vermehrt exprimiert [64].

Galectin-7 kann in bestimmten Tumorarten das Wachstum und die Entwicklung von Tumoren stimulieren, wohingegen es in anderen Tumorarten das Wachstum negativ beeinflusst. Es wird also vermutet, dass Galectin-7 abhängig von der Tumorart als dualer Regulator das Wachstum sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann [65] [66].

In der vorliegenden Arbeit war beim Nachweis von Galectin-7 ein signifikant abgeschwächter IRS-Score in der CIN III Gruppe sowohl in der Zytosol- als auch in der Kernfärbung im Vergleich zur CIN II Gruppe festzustellen. Auch die Intensität der CIN III Gruppe der Kernfärbung war signifikant schwächer als in der CIN II Gruppe. Zwischen der CIN I und der CIN II Gruppe konnte bezüglich der Galectin-7 Färbung kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dies entspricht auch den Ergebnissen einiger Studien, in denen bei Zervixkarzinomen sowie höheren Dysplasiegraden eine geringere Expression von Galectin-7 festzustellen war [65] [66].

4.4 Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x und Lewis y Färbung

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Sialyl Lewis a und Sialyl Lewis x untersucht.

Sialyl Lewis Antigenen kommt eine entscheidende Rolle als Liganden auf Tumorzellen zu. Sie können mit E-Selectin interagieren, auch bekannt als CD62 *antigen like family member E*. Dies wiederum ist ein Adhäsionsmolekül, welches durch Zytokine aktiviert wird und somit an Entzündungsreaktionen beteiligt ist [67].

Sialyl Lewis a sowie Sialyl Lewis x sind Kohlehydratketten, die als Liganden an verschiedenen

Zellen auftreten können. Dazu zählen Lymphozyten, Neutrophile, Monozyten sowie bereits erwähnt Tumorzellen. Das Anheften und Rollen am Endothel durch diese Liganden ist ein entscheidender Schritt zur Entstehung von Metastasen. Darüber hinaus dienen sie auch als diagnostische und prognostische Tumormarker. Weiterhin sind Sialyl Lewis a sowie Sialyl Lewis x auf einer Vielzahl von Glykoproteinen von Zelloberflächen, wie beispielsweise Muzinen, zu finden. Zur Synthese von Sialyl Lewis a und Sialyl Lewis x werden Glykosyltransferasen benötigt, wobei es vier Gruppen zu unterscheiden gilt: β 3GalT, β 4GalT, ST3Gal und FucT. Jedes dieser Enzyme besitzt wiederum Isoenzyme. Eines davon ist beispielsweise das Isoenzym β 3GalT-I, welches an der Synthese von Sialyl Lewis a und Sialyl Lewis x auf Mucin-1 beim Prostata- und Kolonkarzinom beteiligt ist [68].

Obwohl bekannt ist, dass Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x und Lewis y an der Adhäsion von Tumorzellen an Endothel beteiligt sind, blieb der genaue Mechanismus bisher unklar. Es zeigten sich signifikante Unterschiede der Expression der Antikörper bei verschiedenen Dysplasiestadien der Zervix beziehungsweise bei Zervixkarzinomen im Vergleich zu normalem Gewebe [69]. Auch in dieser Studie waren signifikante Unterschiede in der Expression der Antikörper festzustellen. Die Intensität der Membranfärbung der Sialyl Lewis x Färbung war jedoch signifikant schwächer ausgeprägt in der CIN III Gruppe als in der CIN II Gruppe. Ebenso war auch der IRS Score der Membranfärbung signifikant niedriger in der CIN III als in der CIN II Gruppe. Wiederum konnten zwischen der CIN I und der CIN II Gruppe keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Bezüglich der Sialyl Lewis a Färbung zeigte sich in der CIN III Gruppe hauptsächlich der apikale Teil des Epithels gefärbt, wohingegen in den anderen Gruppen das gesamte Epithel disseminiert gefärbt war.

Lewis y ist ein den Blutgruppen ähnliches Molekül bestehend aus difukolysierten Kohlehydraten gebunden an Proteine oder Lipide, wie beispielsweise CA125 und MUC1. Fucose ist ein Monosaccharid und eine essentielle Zuckerart, wichtig für Zell-Zell-Kommunikation. Lewis y wird nicht auf Erythrozyten exprimiert und kommt sowohl bei Blutgruppe Lewis a als auch Lewis b vor. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von Lewis y bei verschiedenen Tumoren

epithelialen Ursprungs zu finden ist. Zu nennen sind dabei unter anderem Ovarial-, Brust-, Lungen-, Kolon- und Prostatakarzinome. In gesundem Gewebe lässt sich eine nur geringe Expression feststellen [70].

Darüber hinaus steht die Expression von Lewis y in Zusammenhang von Apoptose in normalen Zellen und von programmiertem Zelltod in Tumorzellen [71]. Ihm scheint dabei eine wichtige Rolle als Onkogen zuzukommen, wobei seiner Oligosaccharidstruktur eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen zukommt [72].

In der vorliegenden Arbeit konnten bezüglich der Expression von Lewis y keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Dysplasiestufen festgestellt werden. Dies entspricht den Ergebnissen bereits durchgeführter Studien [70].

4.5 Progress- und Regressgruppe

Neben den signifikanten Unterschieden zwischen der CIN III und der CIN II Gruppe wurden auch signifikante Unterschiede zwischen der Progress- und der Regressgruppe festgestellt. Untersucht wurden dabei Gewebeproben von Patientinnen, die ausgehend von einer CIN II entweder einen Progress oder einen Regress aufwiesen.

Ein signifikant höherer IRS-Score war bei der Progressgruppe im Vergleich zur Regressgruppe bei der Sialyl Lewis a Zytosolfärbung zu erkennen. Darüber hinaus zeigten sich einige Trends bei der Sialyl Lewis a Färbung, unter anderem bei der Intensität der Zytosolfärbung sowie der Intensität und dem IRS-Score der Kernfärbung.

Ebenso verhielt es sich mit der Lewis y Färbung. Auch hier war ein Trend mit höherem IRS-Score in der Progressgruppe zu erkennen.

Weitere Trends zeigten sich bei der Galectin-3 Färbung beim IRS Score der Zytosolfärbung und der Intensität der Kernfärbung.

5 Zusammenfassung

Hintergrund und Fragestellung

Das Zervixkarzinom ist die dritthäufigste Krebsdiagnose sowie die vierthäufigste Todesursache bei Frauen weltweit. Vorstufe des Plattenepithelkarzinoms der Zervix uteri ist die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN), bei der drei Ausprägungsgrade unterschieden werden: die leichte (CIN I), mittelgradige (CIN II) und schwere Dysplasie (CIN III). Verglichen mit dem invasiven Zervixkarzinom ist das Auftreten von Präkanzerosen der Zervix uteri weitaus höher. Es wird geschätzt, dass jährlich etwa 100.000 Frauen in Deutschland an hochgradigen Dysplasien (CIN II/CIN III) erkranken. Voraussetzung für die Entstehung der überwiegenden Mehrheit an Zervixkarzinomen ist eine persistierende Infektion mit HPV (humane Papillomaviren) der sogenannten high risk Gruppe.

Liegt nach histologischer Sicherung eine CIN vor, hängt das weitere Prozedere vom Ausprägungsgrad der Dysplasie ab. Bei einer CIN III wird außerhalb einer Schwangerschaft die Indikation zur Konisation gestellt. Kann histologisch ein CIN I gesichert werden, ist aufgrund der statistisch hohen Regressionswahrscheinlichkeit keine Therapie indiziert und es erfolgt lediglich die regelmäßige Kontrolle. Liegt eine CIN II vor, hängt die weitere Therapieentscheidung (Konisation versus Kontrolle) von Zusatzfaktoren, wie dem Nachweis von high-risk HPV-Typen, Dauer der Befundpersistenz, Alter, Familienplanung und Compliance der Patientin ab. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Marker zur Vorhersage von Progression und Regression zu identifizieren, um dadurch direkte Rückschlüsse auf das weitere klinische Vorgehen ziehen zu können.

Methoden

Zunächst wurden Patientinnen identifiziert, die sich aufgrund eines auffälligen Abstrichs im Sinne eines Pap IIID, Pap IVa oder Pap IVb mindestens zweimal in der gynäkologischen Sprechstunde vorgestellt haben und die ausgehend von einer CIN II entweder einen Progress oder Regress aufwiesen. Außerdem musste in beiden Fällen eine histologische Sicherung durchgeführt worden sein. Diese Patientinnen wurden entsprechend der vorliegenden Histologie in

drei Gruppen geteilt (Regressionsgruppe und Progressionsgruppe sowie eine Kontrollgruppe). Die bereits routinemäßig angefertigten pathologischen Gewebeschnitte der Biopsiepräparate der eingeschlossenen Studienpatientinnen wurden erneut analysiert. Bei Vorliegen von dysplastischen Veränderungen wurden die archivierten Blöcke zur Anfertigung weiterer Schnitte angefordert. Die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen für p16, Stathmin-1 sowie die HE Färbung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der LMU München. Die immunhistochemischen Färbungen von Galectin-3, Galectin-7, Sialyl Lewis A und X sowie Lewis Y wurden nach den Protokollen der Frauenklinik der LMU durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Färbungen mikroskopisch ausgewertet.

Ergebnisse

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der CIN II und der CIN III Gruppe bei der p16 Färbung. Bei der Stathmin-1 Färbung waren signifikante Unterschiede bei der Kernfärbung sowohl bezüglich der Intensität und des IRS-Scores festzustellen. Ebenso ein Unterschied war bei der Sialyl Lewis x Membranfärbung zu erkennen. Darüber hinaus zeigten sich bei der Galectin-3 und Galectin-7 Färbung signifikante Unterschiede zwischen der CIN I und der CIN II Gruppe. Bei der Sialyl Lewis a Färbung war ein signifikant anderes Expressionsmuster der Färbung bei der CIN III Gruppe als bei der CIN II Gruppe feststellbar.

Signifikante Unterschiede bezüglich der Progress- und Regressgruppe zeigten sich bei der Sialyl-Lewis a. Bei der Galectin-3 Färbung und der Lewis y Färbung waren deutliche Trends zu erkennen.

Schlussfolgerung

Bei nahezu allen Färbungen waren signifikante Unterschiede zwischen der CIN II und der CIN III Gruppe festzustellen, jedoch aber nicht zwischen der CIN I und der CIN II Gruppe. Es zeigte sich also, dass die CIN II bezüglich des Färbeverhaltens der CIN I gleicht und nicht der CIN III. Dies unterstützt die dreistufige Einteilung der zervikalen intraepithelialen Neoplasie im Gegensatz zur zweistufigen Bethesda Einteilung.

Als prognostischer Marker zur Vorhersage eines potentiellen Regresses oder Progresses scheint

darüber hinaus Sialyl Lewis a geeignet zu sein.

Anhang

Positivkontrollen

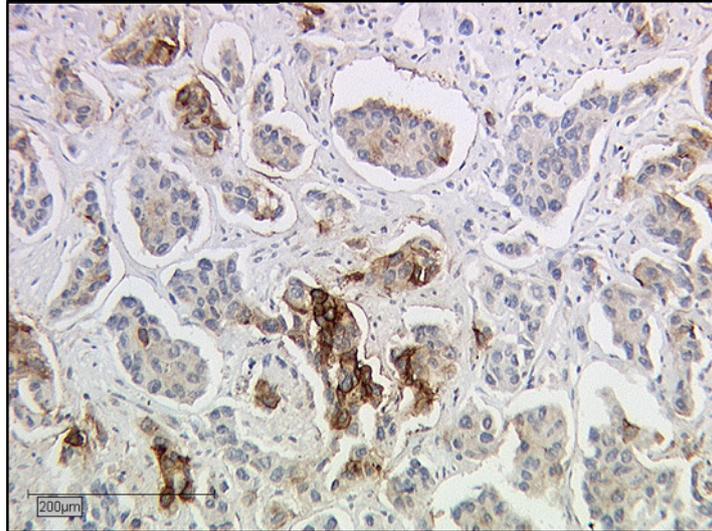


Abbildung 34: Positivkontrolle für die Sialyl Lewis a Färbung: Brustgewebe

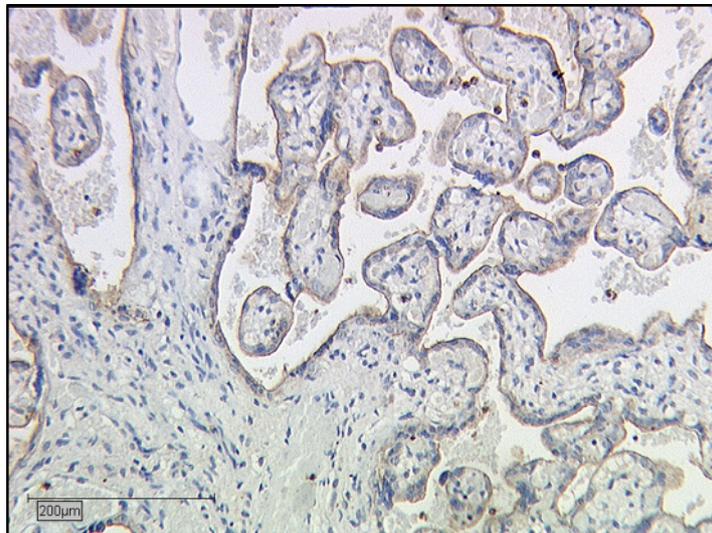


Abbildung 35: Positivkontrolle für die Sialyl Lewis x Färbung: Brustgewebe

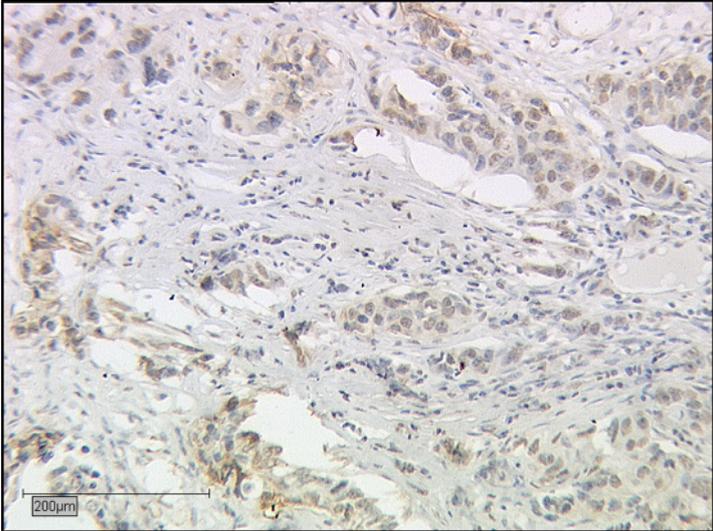


Abbildung 36: Positivkontrolle für die Lewis x Färbung: Brustgewebe

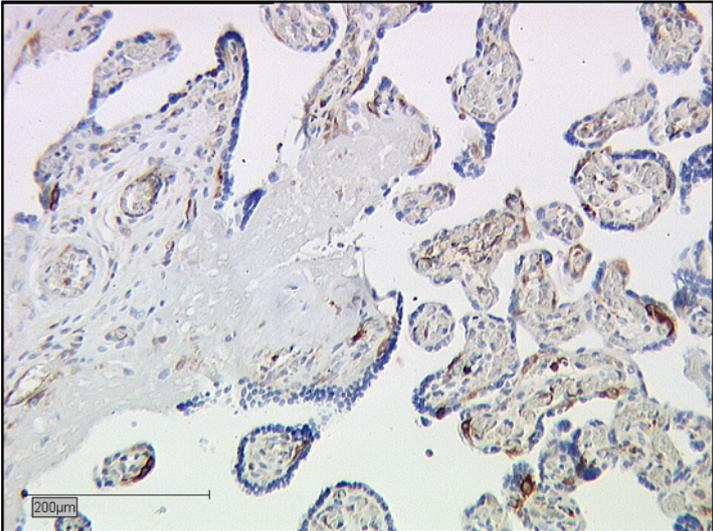


Abbildung 37: Positivkontrolle für die Stathmin-1 Färbung: Plazenta

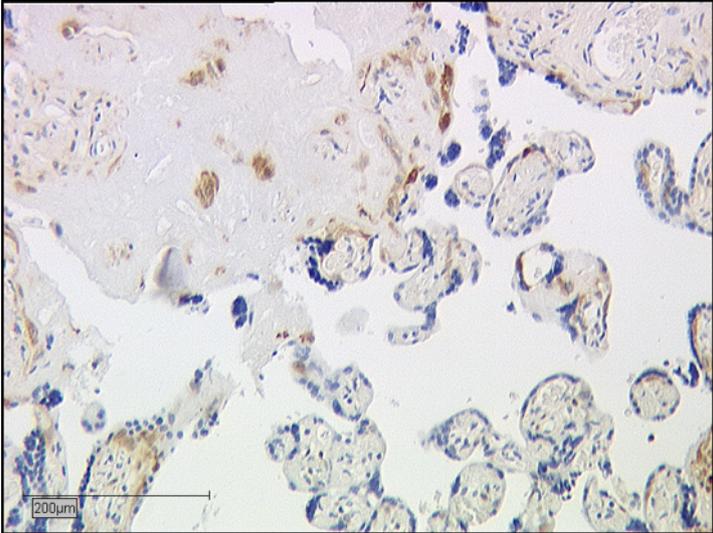


Abbildung 38: Positivkontrolle für die Galectin-3 Färbung: Kolon

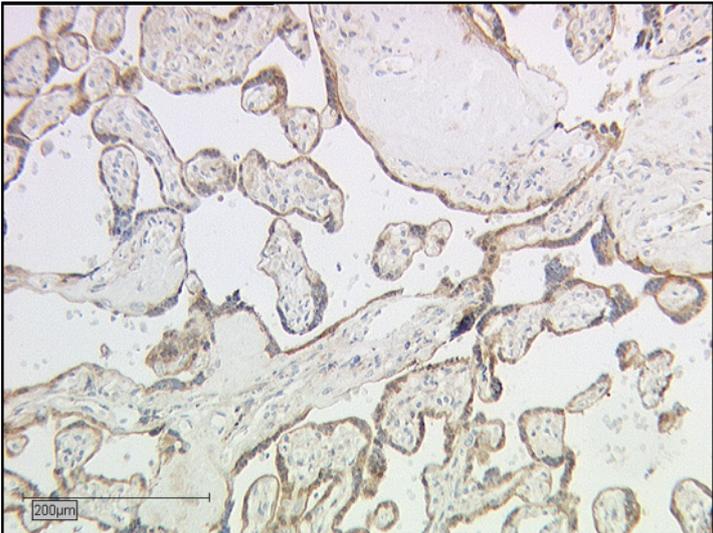
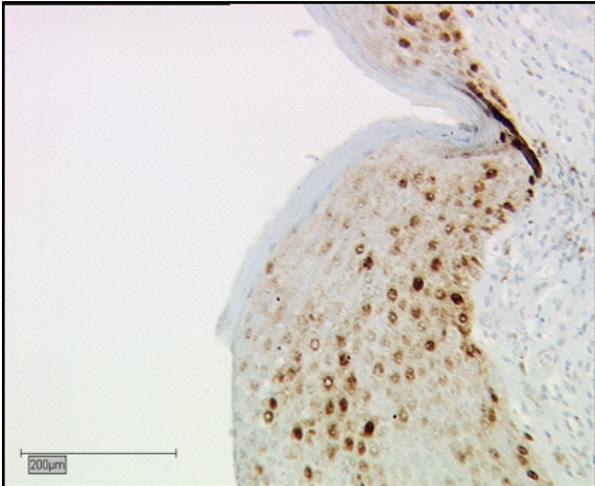
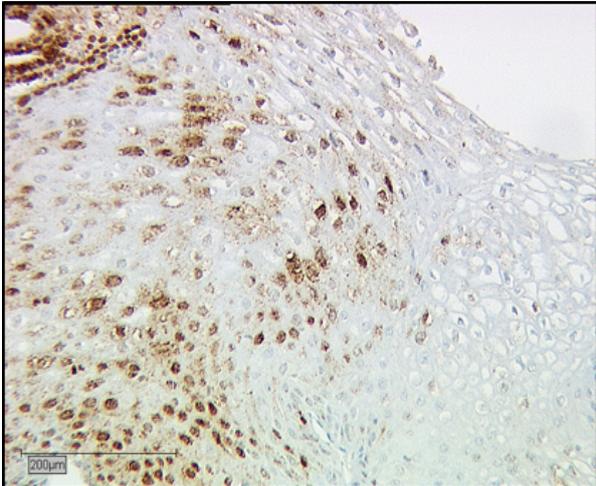


Abbildung 39: Positivkontrolle für die Galectin-7 Färbung: Plazenta

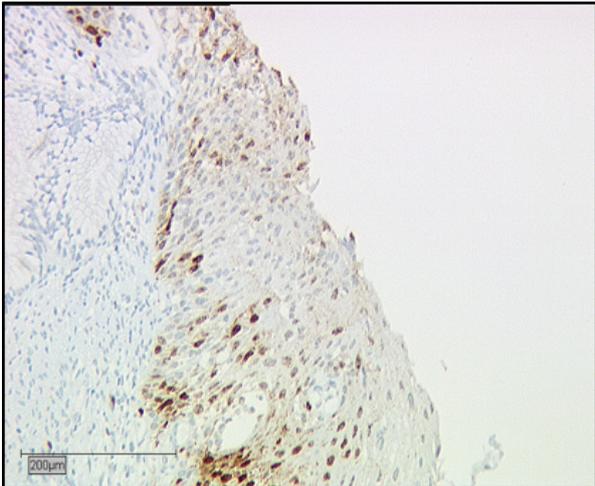
Fotos der Färbung p 16



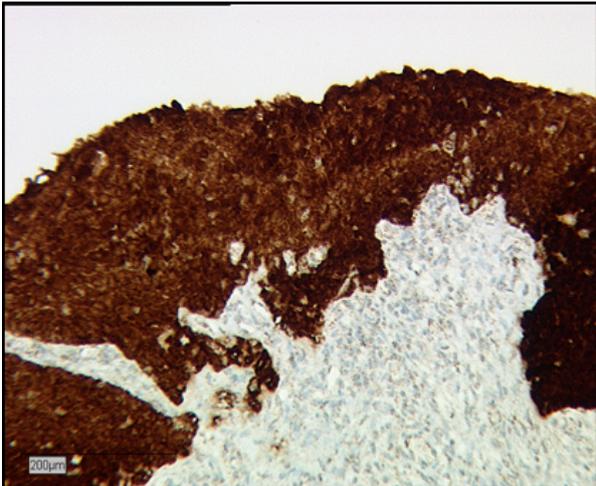
(a) p16 Färbung gesundes Gewebe



(b) p16 Färbung CIN I



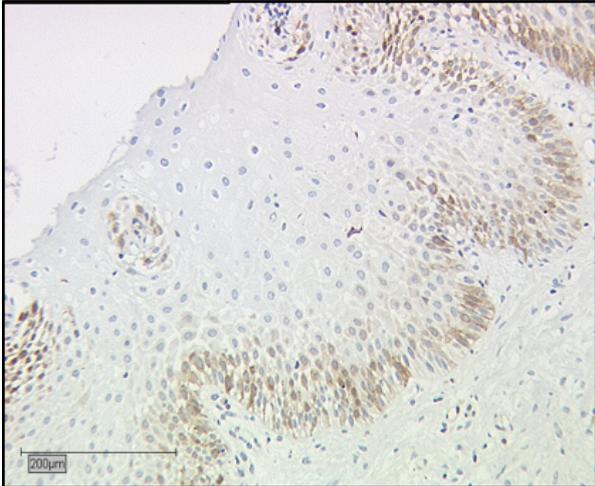
(c) p16 Färbung CIN II



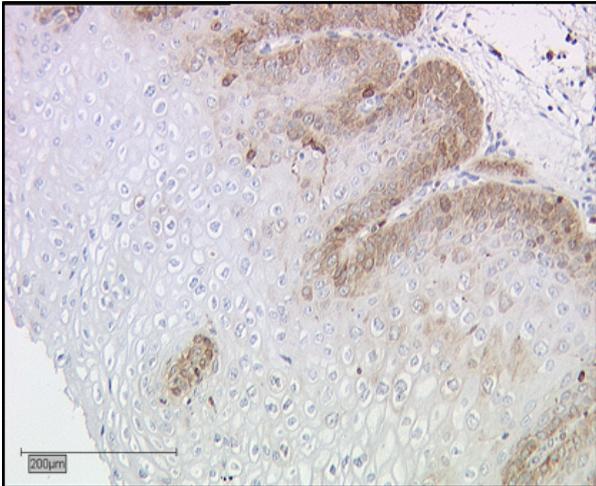
(d) p16 Färbung CIN III

Abbildung 40: Färbungen p16

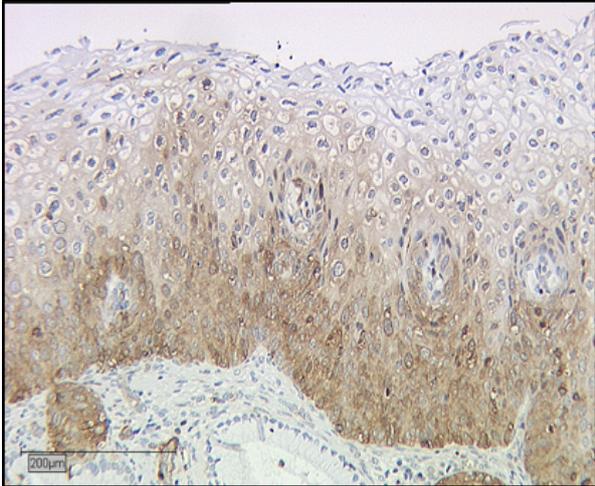
Fotos der Färbung Stathmin-1



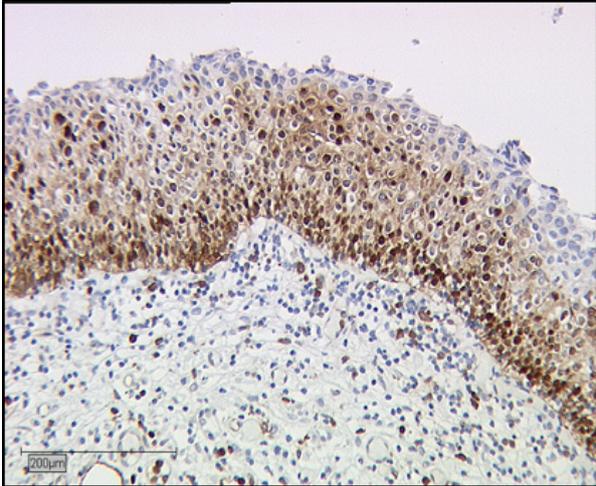
(a) Stathmin-1 Färbung gesundes Gewebe



(b) Stathmin-1 Färbung CIN I



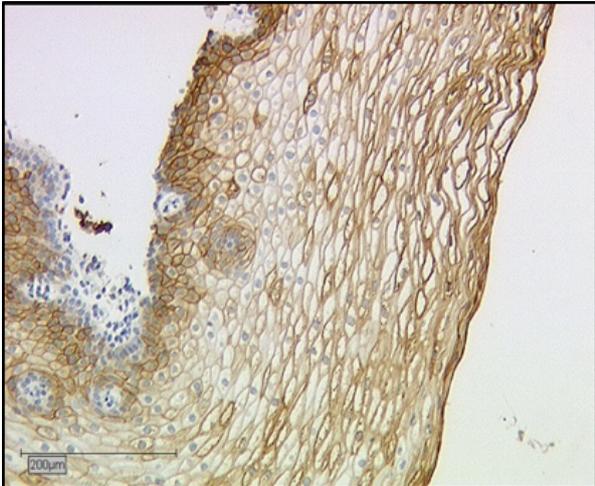
(c) Stathmin-1 Färbung CIN II



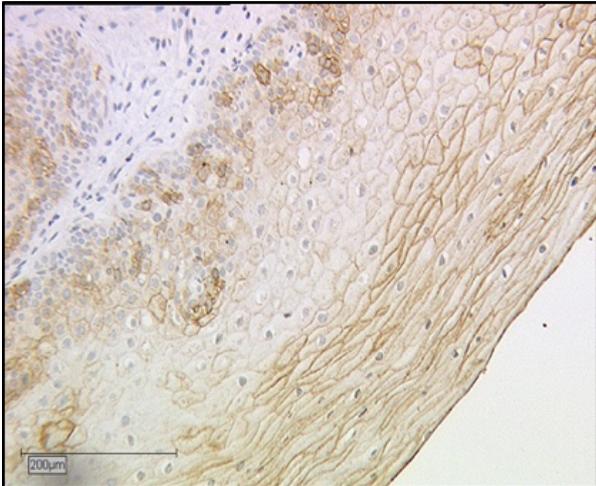
(d) Stathmin-1 Färbung CIN III

Abbildung 41: Färbungen Stathmin-1

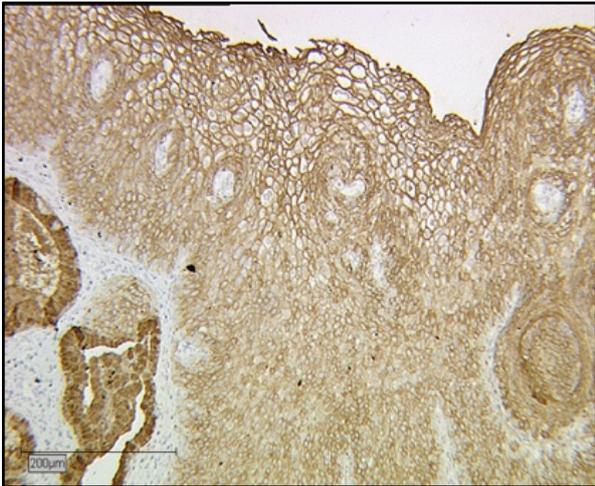
Fotos der Färbung Sialyl Lewis a



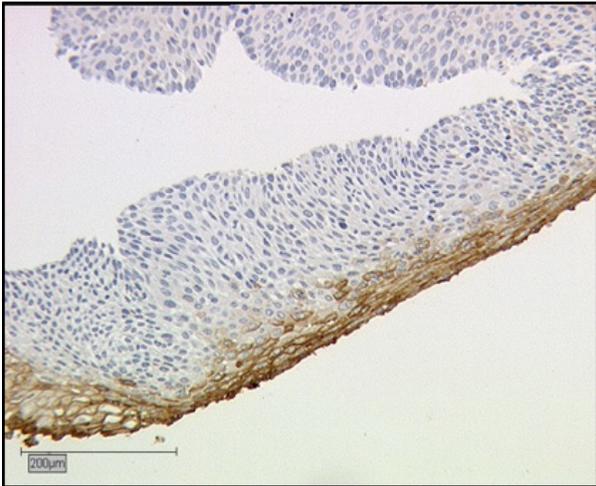
(a) Sialyl Lewis a Färbung gesundes Gewebe



(b) Sialyl Lewis a Färbung CIN I



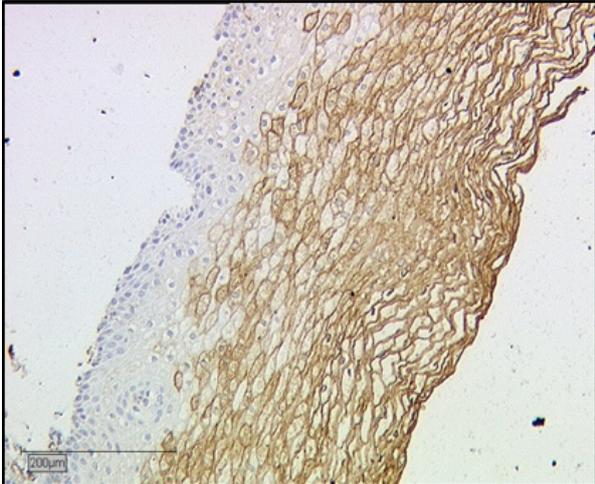
(c) Sialyl Lewis a Färbung CIN II



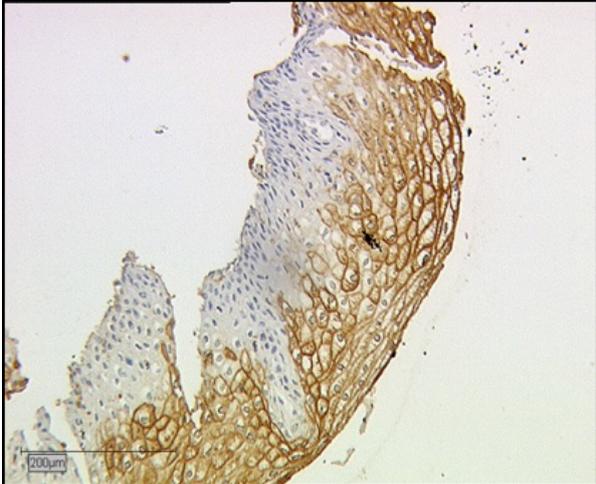
(d) Sialyl Lewis a Färbung CIN III

Abbildung 42: Färbungen Sialyl Lewis a

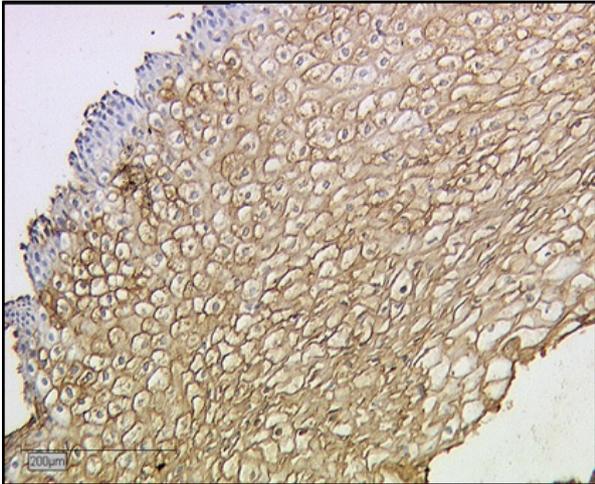
Fotos der Färbung Sialyl Lewis x



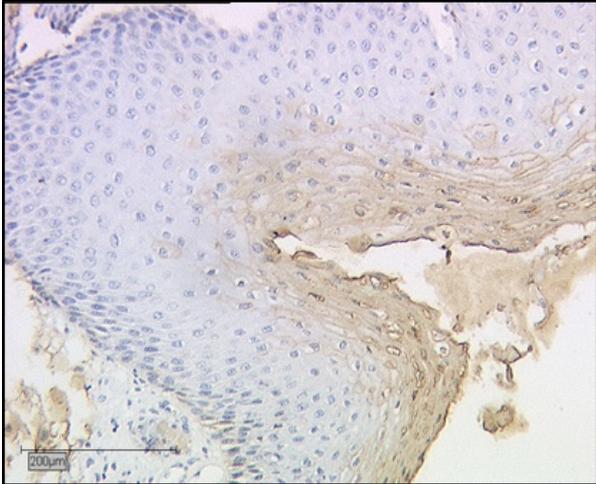
(a) Sialyl Lewis x Färbung gesundes Gewebe



(b) Sialyl Lewis x Färbung CIN I



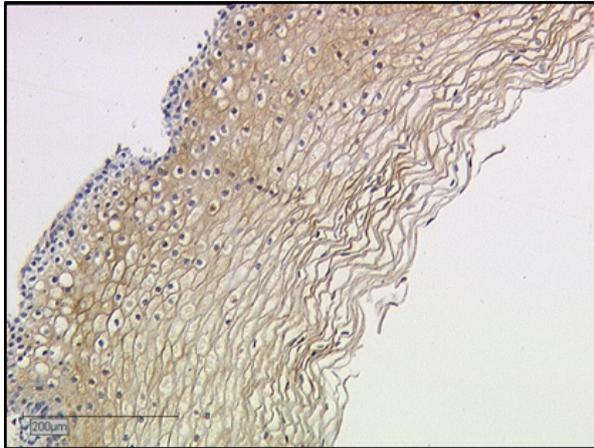
(c) Sialyl Lewis x Färbung CIN II



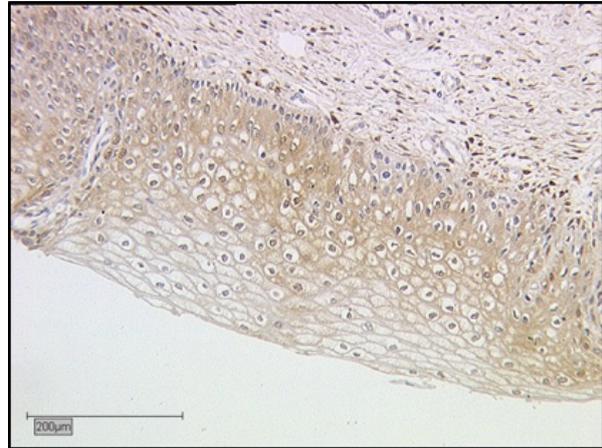
(d) Sialyl Lewis x Färbung CIN III

Abbildung 43: Färbungen Sialyl Lewis x

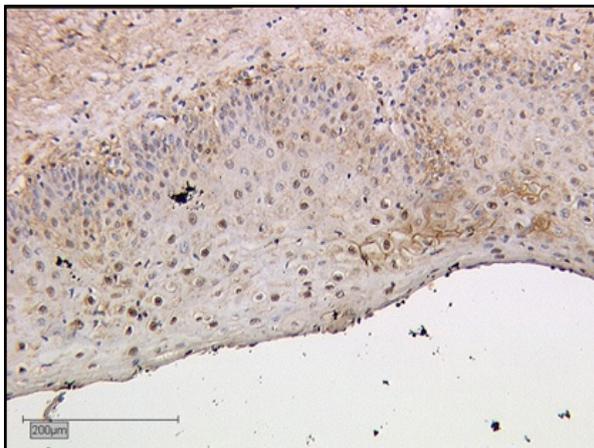
Fotos der Färbung Galectin-3



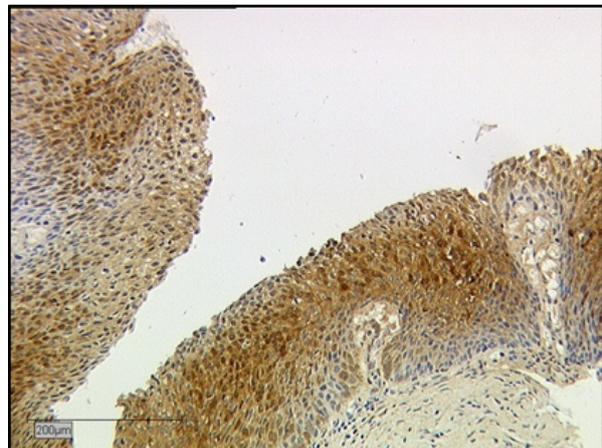
(a) Galectin-3 Färbung gesundes Gewebe (Zytosol)



(b) Galectin-3 Färbung CIN I (Zytosol)

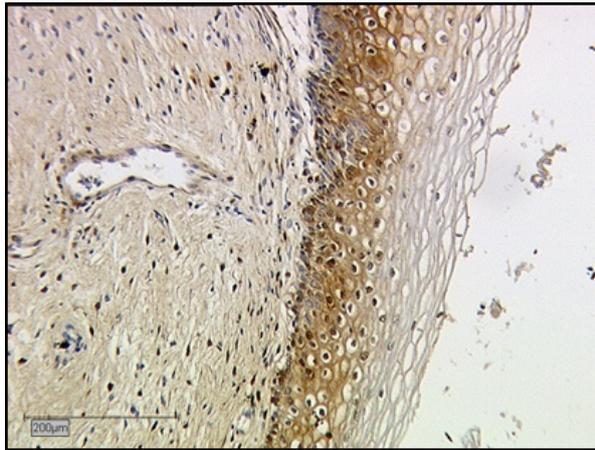


(c) Galectin-3 Färbung CIN II (Zytosol)

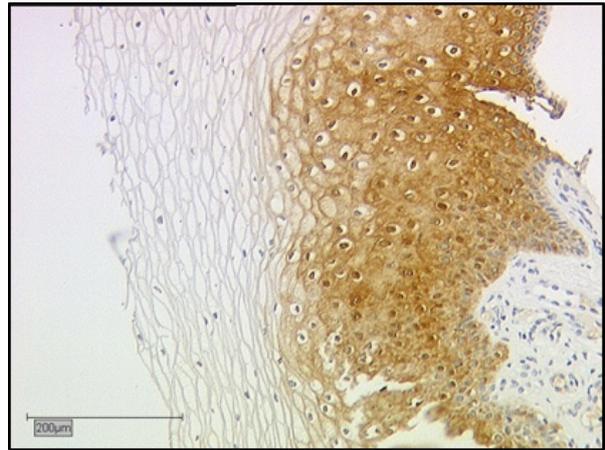


(d) Galectin-3 Färbung CIN III (Zytosol)

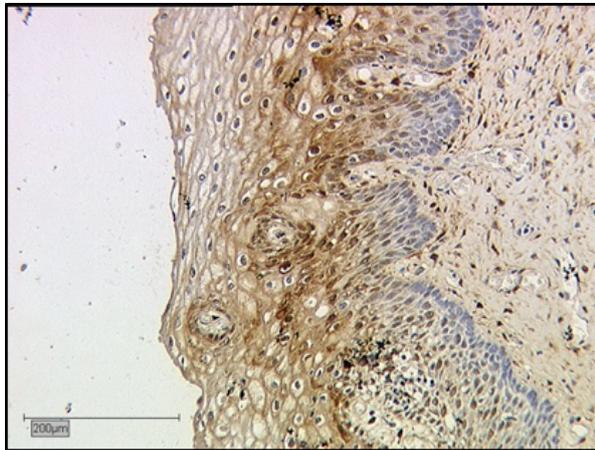
Abbildung 44: Färbungen Galectin-3 (Zytosol)



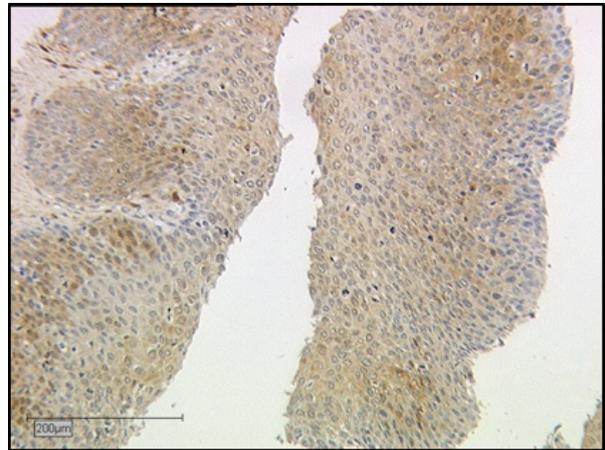
(a) Galectin-3 Färbung gesundes Gewebe (Kern)



(b) Galectin-3 Färbung CIN I (Kern)



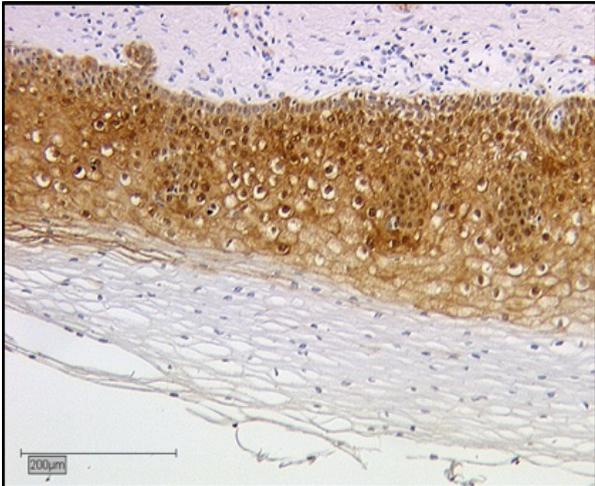
(c) Galectin-3 Färbung CIN II (Kern)



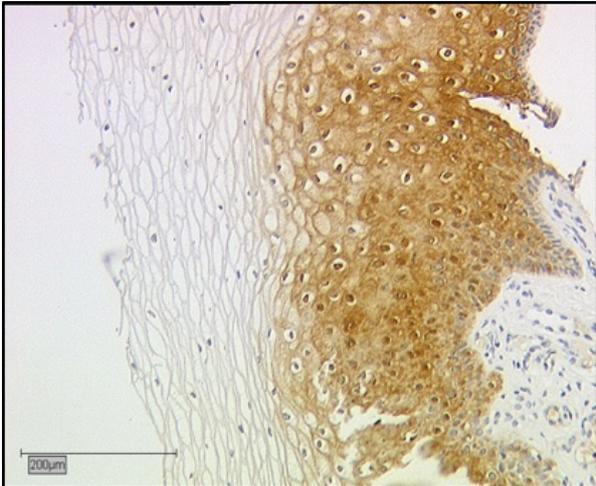
(d) Galectin-3 Färbung CIN III (Kern)

Abbildung 45: Färbungen Galectin-3 (Kern)

Fotos der Färbung Galectin-7



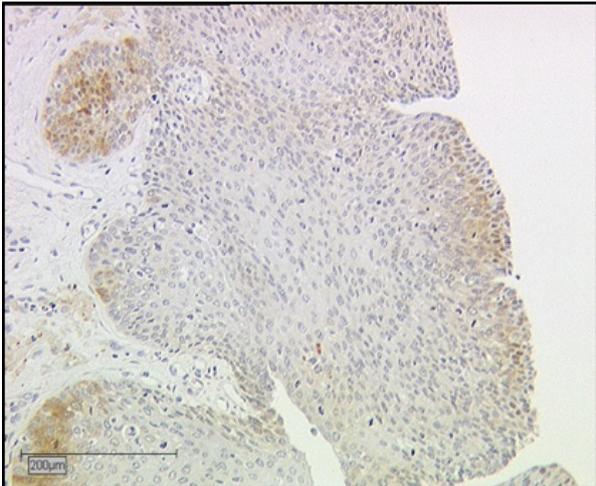
(a) Galectin-7 Färbung gesundes Gewebe



(b) Galectin-7 Färbung CIN I



(c) Galectin-7 Färbung CIN II



(d) Galectin-7 Färbung CIN III

Abbildung 46: Färbungen Galectin-7

Literaturverzeichnis

- [1] J. W. Reagon, I. L. Seidemann und Y. Saracusa, „The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix,“ *Cancer*, Bd. 6, Nr. 2, pp. 224-34, Mar 1953.
- [2] R. Richart und B. Barron , „A follow-up study of patients with cervical dysplasia“. *American journal of obstetrics and gyn.*
- [3] S. Lax, „Histopathology of cervical precursor lesions and cancer,“ *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, Bd. 20, Nr. 3, pp. 125-33, Sep 2011.
- [4] S. Mukhopadhyay, S. Ray, S. Dhar, R. Bandyopadhyay und S. K. Sinha, „Evaluation of the category high-grade squamous intraepithelial lesion in the Bethesda System for reporting cervical cytology,“ *Journal of cytology*, Bd. 30, Nr. 1, pp. 33-5, Jan 2013
- [5] M. Stoler, C. Bergeron, T. Colgan , A. Ferenczy, C. Herrington und K.-R. Kim , „Epithelial tumours, part of tumours of the uterine cervix, chapter 7,“ in *WHO classification of tumours of female reproductive organs* , 2014, pp. 172-98.
- [6] U. Schenck, B. Afheldt, F. Bergauer und T. Weyerstahl, „Neue Zytologische Klassifikation-Münchener Nomenklatur III: Was ist wichtig für die Praxis?,“ *gyne*, Nr. 6, pp. 21-27, 2014.
- [7] P. Lopukhov, N. Briko, A. Khaldin, N. Tsapkova und O. Lupashko, „PAPILLOMAVIRUS INFECTION: PRINCIPLE CHARACTERISTICS, CLINICAL MANIFESTATIONS, VACCINE PROPHYLAXIS,“ *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii ii immunobiologii*, Nr. 1, pp. 71-8, Jan-Feb 2016.
- [8] J. Gallwas und C. Dannecker, *Zervikale intraepitheliale Neoplasie: Prävention, Diagnostik und Therapie*, pp. 26-29.
- [9] F. Cutts, S. Franceschi, S. Goldie, X. Castellsague, S. de Sanjose , G. Garnett, W. Edmunds, P. Claeys, K. Goldenthal , D. Harper und L. Markowitz, „Human papillomavirus and HPV vaccines: a review,“ *Bulletin of the World Health Organization* , Bd. 85, Nr. 9, pp. 719-26, Sep 2007.
- [10] S. Duensing und K. Münger, „Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability,“ *Oncogene*, Bd. 21, Nr. 40, pp. 6241-8, Sep 2002.
- [11] S. Boyer, D. Wazer und V. Band, „E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway,“ *Cancer research*, Bd. 56, Nr. 20, pp. 4620-4, Oct 1996.
- [12] N. Dyson, P. Howley, K. Münger und E. Harlow, „The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product,“ *Science*, Bd. 243, Nr. 4893, pp. 934-7, Feb 1989.
- [13] J. Funk, S. Waga, J. Harry, E. Espling, B. Stillman und D. Galloway, „Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein,“ *Genes & development*, Bd. 11, Nr. 16, pp. 2090-100, Aug 1997.
- [14] D. Jones, R. Alani und K. Münger, „The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2,“ *Genes & development*, Bd. 11, Nr. 16, pp. 2101-11, Aug 1997.
- [15] L. Martin , G. Demers und D. Galloway, „Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E,“ *Journal of virology*, Bd. 72, Nr. 2, pp. 975-85, Feb 1998.
- [16] A. Schulze, B. Mannhardt, K. Zerfass-Thome, W. Zwerschke und P. Jansen-Dürr, „Anchorage-independent transcription of the cyclin A gene induced by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16,“ *Journal of virology*, Bd. 72, Nr. 3, pp. 2323-34, Mar 1998.

- [17] K. Zerfass, A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein und P. Jansen-Dürr, „Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation," *Journal of virology*, Bd. 69, Nr. 10, pp. 6389-99, Oct 1995.
- [18] K. Münger, J. Basile, S. Duensing, Eichten A, S. Gonzalez, M. Grace und V. Zacny, „Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein," *Oncogene*, Bd. 20, Nr. 54, pp. 7888-98, Nov 2001.
- [19] B. Vogelstein, D. Lane und A. Levine, „Surfing the p53 network," *Nature*, Bd. 408, Nr. 6810, pp. 307-10, Nov 2000.
- [20] M. Scheffner, B. Werness, J. Huibregste, A. Levine und P. Howley, „The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53," *Cell*, Bd. 63, Nr. 6, pp. 1129-36, Dec 1990.
- [21] B. Werness, A. Levine und HowleyPM, „Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53," *Science*, Bd. 248, Nr. 4951, pp. 76-9, Apr 1990.
- [22] „Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Fact sheet.WHO," 2016.
- [23] S. Stensen, S. Kjaer, S. Jensen, K. Frederiksen, J. Junge, T. Iftner und C. Munk, „Factors associated with type-specific persistence of high-risk human papillomavirus infection: A population-based study," *International journal of cancer*, Bd. 138, Nr. 2, pp. 361-8, Jan 2016.
- [24] F. Bosch, M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. Jansen, J. Peto, M. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman und K. Shah, „Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group," *Journal of the National Cancer Institute*, Bd. 87, Nr. 11, pp. 796-802, Jun 1995.
- [25] C. Ley, H. Bauer, A. Reingold, M. Schiffman , J. Chambers, C. Tashiro und M. Monos, „Determinants of genital human papillomavirus infection in young women," *Journal of the National Cancer Institute*, Bd. 83, Nr. 14, pp. 997-1003, Jul 1991.
- [26] O. Brummer, B. Hollwitz, G. Böhmer, H. Kühnle und K. Petry, „human papillomavirus-type persistence patterns predict the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia," *Gynecologic oncology*, Bd. 102, Nr. 3, pp. 517-22, Sep 2006.
- [27] R. Insinga, A. Glass und B. Rush , „Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Bd. 191, Nr. 1, pp. 105-13, Jul 2004.
- [28] A. Moscicki, S. Shiboski, N. Hills, K. Powell, N. Jay, E. Hanson, S. Miller, K. Canjura-Clayton, S. Farhat, J. Broering und T. Darragh, „Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women," *Lancet*, Bd. 364, Nr. 9446, pp. 1678-83, Nov 2004.
- [29] C. Trimble, S. Piantadosi, P. Gravitt, B. Ronnett, E. Pizer, A. Elko, B. Wilgus, W. Yutzy, R. Daniel , K. Shah, S. Peng, C. Hung, R. Roden, T. Wu und D. Pardoll, „Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype," *Clinical cancer research*, Bd. 11, Nr. 13, pp. 4717-23, Jul 2005.
- [30] P. Tsikouras, S. Zervoudis, B. Manav, E. Tomara, G. Iatrakis, C. Romanidis, A. Bothou und G. Galazios, „Cervical cancer: screening, diagnosis and staging," *Journal of B.U.O.N.*, Bd. 21, Nr. 2, pp. 320-5, Mar-Apr 2016.
- [31] J. Jordan, M. Arbyn, P. Martin-Hirsch, U. Schenck, J. Baldauf, D. Da Silva, A. Antila, P. Nieminen und W. Prendiville, „European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1.," *Cytopathology*, Bd. 19, Nr. 6, pp. 342-54, Dec 2008.
- [32] Girardi F., B. Frey Tirri, V. Küppers und et al., „Neue kolposkopische IFCCP-Nomenklatur der Cervix uteri (Rio de Janeiro 2011)," *Frauenarzt* , Bd. 53, pp. 1064-65, 2012.

- [33] P. Schomann, „Arbeitsgemeinschaft Zervixpathologie und Kolposkopie e.V. in der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe,“ Abeln internet company, [Online]. Available: <http://www.ag-cpc.de/pages/weiterbildung/muenchner-nomenklatur-ii.php>. [Zugriff am 2017].
- [34] H. Griesser, K. Marquardt, B. Jordan, W. Kühn, K. Neis, H. H. Neumann, R. Bollmann, B. Pöschel, M. Steiner und U. Schenck, „Münchener Nomenklatur III,“ *Frauenarzt*, Bd. 54, Nr. 11, pp. 1042-1049, Nov 2013.
- [35] J. Jordan, P. Martin-Hirsch, M. Arbyn, U. Schenck, J. Baldauf, D. Da Silva, A. Anttila, P. Nieminen und W. Prendiville, „European guidelines for clinical management of abnormal cervical cytology, part 2,“ *Cytopathology*, Bd. 20, Nr. 1, pp. 5-16, Feb 2009.
- [36] L. Massad, M. Einstein, W. Huh, H. Katki, W. Kinney, M. Schiffman, D. Solomon, N. Wentzensen und H. Lawson, „2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors,“ *Journal of lower genital tract disease*, Bd. 17, Nr. 5 Suppl 1, pp. 1-27, Apr 2013.
- [37] K. Petry, „Management options for cervical intraepithelial neoplasia,“ Best practice and research. *Clinical obstetrics and gynaecology*, Bd. 25, Nr. 5, pp. 641-51, Oct 2011.
- [38] T. Darragh, T. Colgan, J. Thomas Cox, D. Heller, M. Henry, R. Luff, T. McCalmont, R. Nayar, J. Palefsky, M. Stoler, E. Wilkinson, R. Zaino, D. Wilbur und Members of the LAST Project Groups., „The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology,“ *International Journal of gynecological pathology*, Bd. 32, Nr. 1, pp. 76-115, Jan 2013.
- [39] T. Wilkinson, P. Sykes, B. Simcock und S. Petrich, „Recurrence of high-grade cervical abnormalities following conservative management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2,“ *American journal of obstetrics and gynecology*, Bd. 212, Nr. 6, pp. 769.e1-7, Jun 2015.
- [40] M. Arbyn, M. Kyrgiou, C. Simoons, A. Raifu, G. Koliopoulos, P. Martin-Hirsch, W. Prendiville und E. Paraskevidis, „Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis,“ *BMJ*, Bd. 337, p. a1784, Sep 2008.
- [41] M. Kyrgiou, G. Koliopoulos, P. Martin-Hirsch, M. Arbyn, W. Prendiville und E. Paraskevidis, „Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis,“ *Lancet*, Bd. 367, Nr. 9509, pp. 489-98, Feb 2006.
- [42] G. Jin, Z. LanLan, C. Li und Z. Dan, „Pregnancy outcome following loop electrosurgical excision procedure (LEEP) a systematic review and meta-analysis,“ *Archives of gynecology and obstetrics*, Bd. 289, Nr. 1, pp. 85-99, Jan 2014.
- [43] S. Noll und S. Schaub-Kuhnen, Praxis der Immunhistochemie, H. Höfer und K. Müller, Hrsg., Urban & Fischer Verlag, 2000.
- [44] R. Klaes, T. Friedrich, D. Spitkovsky, R. Ridder, W. Rudy und U. Petry, „Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri,“ *International journal of cancer*, Bd. 92, Nr. 2, pp. 276-84, Apr 2001.
- [45] M. Dray, P. Russell, C. Dalrymple, N. Wallman, G. Angus und A. Leong, „p16INK4a as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies,“ *Pathology*, Bd. 37, Nr. 2, pp. 112-24, Apr 2005.
- [46] S. Agoff, P. Lin, J. Morihara, C. Mao, N. Kiviat und L. Koutsky, „p16(INK4A) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high risk HPV types,“ *Mod. Pathology*, Bd. 16, Nr. 7, pp. 665-73, Jul 2003.

- [47] G. Negri, F. Vittadello, F. Romano, A. Kasal, F. Rivasi und S. Girlando, „p16INK4A expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri,“ *Virchows Archiv*, Bd. 445, Nr. 6, pp. 616-20, Dec 2004.
- [48] I. Lesnikova, M. Lidang, S. Hamilton-Dutoit und J. Koch, „p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens,“ *Diagnostic pathology*, Jul 2009.
- [49] T. Sano, T. Oyama, K. Kashiwabara, T. Fukuda und T. Nakajima, „Expression Status of p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions,“ *The american journal of pathology*, Bd. 153, Nr. 6, pp. 1741-1748, Dec 1998.
- [50] B. Belletti und G. Baldassarre, „Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer,“ *Expert opinion on therapeutic targets*, Bd. 15, Nr. 11, pp. 1249-66, Nov 2011.
- [51] W. Xi, W. Rui, L. Fang, D. Ke, G. Ping und Z. Hui-Zhong, „Expression of stathmin/op18 as a significant prognostic factor for cervical carcinoma patients,“ *Journal of cancer research and clinical oncology*, Bd. 135, Nr. 6, pp. 837-46, Jun 2009.
- [52] B. Howitt, M. Nucci, R. Drapkin, C. Crum und M. Hirsch, „Stathmin-1 Expression as a Complement to p16 Helps Identify High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia With Increased Specificity,“ *The american journal of surgical pathology*, Bd. 37, Nr. 1, pp. 89-97, Jan 2013.
- [53] S. Barondes, D. Cooper, M. Gitt und H. Leffler, „Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins,“ *The journal of biological chemistry*, Bd. 269, Nr. 33, pp. 20807-10, Aug 1994.
- [54] F. Liu und G. Rabinovich, „Galectins as modulators of tumour progression.,“ *Nature reviews cancer*, Bd. 5, Nr. 1, pp. 29-41, Jan 2005.
- [55] Y. Song, T. Billiar und Y. Lee, „Role of galectin-3 in breast cancer metastasis: involvement of nitric oxide.,“ *American journal of pathology*, Bd. 160, Nr. 3, pp. 1069-75, Mar 2002.
- [56] H. Zhang, M. Luo, X. Liang, D. Wang, X. Gu, C. Duan, H. Gu, G. Chen, X. Zhao, Z. Zhao und C. Liu, „Galectin-3 as a marker and potential therapeutic target in breast cancer,“ *Public library of science*, Bd. 9, Nr. 9, Sep 2014.
- [57] W. Sun, L. Li, Q. Yang, W. Shan, Z. Zhang und Y. Huang, „G-3-C12 Peptide Reverses Galectin-3 from foe to friend for active targeting cancer treatment,“ *Mol.Pharm.*, Bd. 12, Nr. 11, pp. 4124-36, Sep 2015.
- [58] P. Truran, S. Johnson, R. Bliss, T. Lennard und S. Aspinall, „Parafibromin, galectin-3, PGP9.5, Ki67, and cyclin D1: using an immunohistochemical panel to aid in the diagnosis of parathyroid cancer.,“ *World journal of surgery*, Bd. 38, Nr. 11, pp. 2845-54, Nov 2014.
- [59] K. Tsuboi, T. Shimura, N. Masuda, M. Ide, S. Tsutsumi und S. Yamaguchi, „Galectin-3 expression in colorectal cancer: relation to invasion and metastasis.,“ *Anticancer Research*, Bd. 27, Nr. 4b, pp. 2289-96, Jul-Aug 2007.
- [60] S. Kim, S. Lee, H. Sung, I. Choi und B. Kim, „Increased serum 90K and Galectin-3 expression are associated with advanced stage and a worse prognosis in diffuse large B-cell lymphomas.,“ *Acta haematologica*, Bd. 120, Nr. 4, pp. 211-6, 2008.
- [61] L. Song, J. Tang, L. Owusu, M. Sun, J. Wu und J. Zhang, „Galectin-3 in cancer.,“ *Clin Chim Acta*, Bd. 431C, pp. 185-91, Feb 2014.
- [62] N. Liang, X. Song, J. Xie, D. Xu, F. Liu und X. Yu, „Effect of galectin-3 on the behaviour of Eca109 human esophageal cancer cells,“ *Molecular medicine reports*, Bd. 11, Nr. 2, pp. 896-902, Feb 2015.
- [63] Y.-q. Zhou, X.-k. Zhou, Y.-y. Kong C.-y. Song und X.-h. Wu, „Expression of galectin-3 in cervical cancer and its clinical significance“, *Tumor*, Bd. 31, Nr. 2, pp. 148-53, 2011.

- [64] M. Labrie, M. Vladioiu, A. Grosset, L. Gaboury und Y. St-Pierre, „Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer.“ *Oncotarget*, Bd. 5, Nr. 17, pp. 7705-21, Sep 2014.
- [65] H. Zhu, T. Wu, W. Chen, L. Zhou, Y. Wu und L. Zeng, „Roles of galectin-7 and S100A9 in cervical squamous carcinoma: Clinicopathological and in vitro evidence.“ *International journal of cancer*, Bd. 132, Nr. 5, pp. 1051-9, Mar 2013.
- [66] H. Zhu, L. Liu, H. Liu, T. Wu, Y. Wu und S. Zeng, „Expression of galectin-7 and S100A9 and development of cervical squamous carcinoma.“ *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, Bd. 38, Nr. 9, pp. 888-95, Sep 2013.
- [67] U. Jeschke, I. Mylonas, N. Shabani , C. Kunert-Keil, C. Schindlbeck , B. Gerber und K. Friese, „Expression of sialyl lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis.“ *Anticancer Research*, Bd. 25, Nr. 3A, pp. 1615-22, May-Jun 2005.
- [68] V. Chachadi, G. Bhat und P. Cheng, „Glycosyltransferases involved in the synthesis of MUC-associated metastasis-promoting selectin ligands.“ *Glycobiology*, Bd. 25, Nr. 9, pp. 963-975, Sep 2015.
- [69] V. Engelstaedter, B. Fluegel, S. Kunze, D. Mayr, K. Friese und U. Jeschke, „Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich Antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer.“ Bd. 27, pp. 507-14, 2012.
- [70] J. Westwood, W. Murray, M. Trivett, N. Haynes, B. Solomon, L. Mileskin, D. Ball, M. Michael , A. Burman, P. Mayura-Guru, J. Trapani, S. Peinert, D. Hönemann, H. Miles Prince, A. Scott, M. Smyth, P. Darcy und M. Kershaw, „The Lewis-Y carbohydrate antigen is expressed by many human tumors and can serve as a target for genetically redirected T cells despite the presence of soluble antigen in serum.“ *Journal of immunotherapy*, Bd. 32, Nr. 3, pp. 292-301, Apr 2009.
- [71] B. Yin, C. Finstad, K. Kitamura, M. Federici, M. Welshinger, V. Kudryashov, W. Hoskins, S. Welt und K. Lloyd , „Serological and immunochemical analysis of Lewis y (Ley) blood group antigen expression in epithelial ovarian cancer.“ *International journal of cancer*, Bd. 65, Nr. 4, pp. 406-12, Feb 1996.
- [72] V. Engelstaedter, B. Fluegel, S. Kunze, D. Mayr, K. Friese, U. Jeschke und F. Bergauer, „Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich Antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer.“ *Histology and Histopathology* , Bd. 27, Nr. 4, pp. 507-14, Apr 2012.

Tabellenverzeichnis

1	Intraepitheliale Läsionen des Plattenepithels in verschiedenen Befundsystemen [6]	4
2	Colposcopic nomenclature for cervix uteri (IFCPC 2011) [32]	9
3	Münchener Nomenklatur II - Klassifikation zytologischer Befunde (gültig bis Juli 2014) [33]	10
4	Münchener Nomenklatur III mit Hauptgruppen und korrelierenden Begriffen des Bethesda Systems (gültig ab 1.7.2014) [34]	12
5	Übersicht verwendeter Materialien	16
6	Übersicht verwendeter Antikörper	17
7	Übersicht Nachweis Sialyl Lewis a	20
8	Übersicht Nachweis Sialyl Lewis x	21
9	Übersicht Nachweis Sialyl Lewis y	22
10	Übersicht Nachweis Galectin-3	23
11	Übersicht Nachweis Galectin-7	24
12	Übersicht Nachweis Stathmin-1	25

Abbildungsverzeichnis

1	Störung des Zellzyklus durch die HPV Onkoproteine E6 und E7 [10]	5
2	Strept-Avidin-Biotin-Komplex [43]	28
3	Färbeergebnisse p16	30
4	Färbeergebnisse p16 Mittelwerte	31
5	Färbeergebnisse Stathmin-1 Kern IRS	32
6	Färbeergebnisse Stathmin-1 Kern IRS Mittelwerte	32
7	Färbeergebnisse Stathmin-1 Kern Intensität	33
8	Färbeergebnisse Stathmin-1 Kern Intensität Mittelwerte	33
9	Färbeergebnisse Sialyl Lewis a	34
10	Färbeergebnisse Sialyl Lewis x Membran IRS	35
11	Färbeergebnisse Sialyl Lewis x Membran IRS Mittelwerte	35
12	Färbeergebnisse Sialyl Lewis x Membran Intensität	36
13	Färbeergebnisse Sialyl Lewis x Membran Intensität Mittelwerte	36
14	Färbeergebnisse Galectin-3 Zytosol Intensität	37
15	Färbeergebnisse Galectin-3 Zytosol Intensität Mittelwerte	38
16	Färbeergebnisse Galectin-3 Kern Intensität	38
17	Färbeergebnisse Galectin-3 Kern Intensität Mittelwerte	39
18	Färbeergebnisse Galectin-3 Kern IRS Mittelwerte	39
19	Färbeergebnisse Galectin-7 Zytosol IRS	40
20	Färbeergebnisse Galectin-7 Zytosol IRS Mittelwerte	40
21	Färbeergebnisse Galectin-7 Kern IRS	41
22	Färbeergebnisse Galectin-7 Kern IRS Mittelwerte	41
23	Färbeergebnisse Galectin-7 Kern Intensität	42
24	Färbeergebnisse Galectin-7 Kern Intensität Mittelwerte	42
25	Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Zytosol IRS	43
26	Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Zytosol Intensität	44
27	Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Kern Intensität	44
28	Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Kern Intensität (zur Verdeutlichung angepasste Skala)	45
29	Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Kern IRS	45
30	Färbeergebnisse Sialyl Lewis a Kern IRS (zur Verdeutlichung angepasste Skala)	46
31	Färbeergebnisse Sialyl Lewis y IRS	46
32	Färbeergebnisse Galectin-3 Zytosol IRS	47
33	Färbeergebnisse Galectin-3 Kern Intensität	48
34	Positivkontrolle für die Sialyl Lewis a Färbung: Brustgewebe	59
35	Positivkontrolle für die Sialyl Lewis x Färbung: Brustgewebe	59

36	Positivkontrolle für die Lewis x Färbung: Brustgewebe	60
37	Positivkontrolle für die Stathmin-1 Färbung: Plazenta	60
38	Positivkontrolle für die Galectin-3 Färbung: Kolon	61
39	Positivkontrolle für die Galectin-7 Färbung: Plazenta	61
40	Färbungen p16	62
41	Färbungen Stathmin-1	63
42	Färbungen Sialyl Lewis a	64
43	Färbungen Sialyl Lewis x	65
44	Färbungen Galectin-3 (Zytosol)	66
45	Färbungen Galectin-3 (Kern)	67
46	Färbungen Galectin-7	68

Danksagung

Ich möchte mich zunächst von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke für die Überlassung des Themas bedanken. Für alle Fragen hatte er stets ein offenes Ohr und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Eine solche Betreuung ist nicht selbstverständlich. Darüber hinaus gilt mein größter Dank meiner wunderbaren Betreuerin PD Dr. Dr. med. Theresa Kolben. Sie hatte immer Zeit für sämtliche Fragen und war fortwährend eine große Unterstützung. Darüber hinaus hat sie mich stets motiviert. Sie hat die Ergebnisse dieser Arbeit in einem Paper veröffentlicht und ließ mich das Ergebnis auf dem DKGG in Stuttgart vorstellen.

Auch von ganzem Herzen bedanken möchte ich mich beim gesamten Team des Labors der Maistraße. Allen voran Christina Kuhn und Simone Hofmann. Eine bessere Betreuung konnte ich mir nicht wünschen. Frau Kuhn hat mir mit unendlicher Geduld alle Arbeitsschritte beigebracht und mich immer unterstützt. Sie hat das Labor zu einem zweiten Zuhause gemacht. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Mein weiterer Dank gilt meinem lieben Partner für seine Geduld und Motivation vor allem beim Formatieren und Schreiben dieser Arbeit.

Schlussendlich möchte ich meinen Eltern für Ihre immerwährende Unterstützung danken. Ihre Liebe und ihr Vertrauen haben mich vor allem durch die ersten Semester meines Studiums getragen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Eidesstattliche Versicherung

Kraft, Franziska

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Expression von Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x, Lewis y, Galectin-3, Galectin-7,
Stathmin-1 und p16 in Gewebeproben der zervikalen Dysplasie**

selbstständig 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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.12.2019

Ort, Datum

Franziska Kraft

Unterschrift Doktorandin/Doktorand