

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Sven Mahner

Immunhistochemische Untersuchung der Expression von H3K9ac, H3K4me3 und GR an Zervix-Karzinom- Präparaten sowie deren prognostische Analyse

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Susanne Beyer

aus

München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christian Schindlbeck Prof. Dr. Anne Krug Prof. Dr. Doris Mayr
Betreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Bernd Kost
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	12.03.2020

Für meine Familie.

Eidesstattliche Versicherung

Beyer, Susanne

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Immunhistochemische Untersuchung der Expression von H3K9ac, H3K4me3 und GR an Zervix-Karzinom-Präparaten sowie deren prognostische Analyse“

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 habe und ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, 12.03.2020

Ort, Datum

Susanne Beyer

Unterschrift Doktorandin Susanne Beyer

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	6
Publikationsliste	7
A Einleitung	8
1. Zervix-Karzinom.....	8
1.1 Epidemiologie.....	8
1.2 Risikofaktoren	8
1.3 Histologische Formen.....	9
1.4 Klinik und Stadien	10
1.5 Therapie	13
1.6 Prognose.....	13
2. Histonmodifikationen.....	14
2.1 Arten der Histonmodifikationen.....	14
2.2 Histonacetylierungen und die Bedeutung der H3ac-Modifikation in der Onkologie.....	15
2.3 Histonmethylierungen und die Bedeutung der H3me-Modifikation in der Onkologie.....	16
3. Glukokortikoid-Rezeptoren.....	18
3.1 Glukokortikoide – ein Überblick	18
3.2 Glukokortikoid-Rezeptor allgemein	18
3.3 Bedeutung in der Onkologie	20
4. Zielsetzung der Arbeit	22
B Zusammenfassung (Deutsch).....	23
C Zusammenfassung / Summary (English).....	25
D Publikationen	27
1. Publikation.....	27
2. Publikation.....	42
E Literaturverzeichnis	50
F Danksagung	58

Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
bp	Basenpaar
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
(n)GRE	(non) Glucocorticoid-responsive element
H3K4me3	Histon H3 tri-methyl K4
H3K9ac	Histon H3 acetyl K9
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HPV	Humanes Papillomavirus
Hsp70/90	Hitzeschock-Protein 70/90
NLS	Nuclear Location Signal
OS	Overall-survival/ Gesamtüberleben
RTx	Radiation therapy/ Strahlentherapie
SCC	Squamous cell carcinoma/ Plattenepithel-Karzinom
SEGRA	Selektiver Glukokortikoid-Rezeptor-Agonist
SEGRM	Selektiver Glukokortikoid-Rezeptor-Modulator

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1.</i>	Plattenepithel- und Adenokarzinom der Zervix	S. 14
<i>Abbildung 2.</i>	Nukleosomenstruktur	S. 18
<i>Abbildung 3.</i>	Schematische Illustration der Histonmodifikationen	S. 20
<i>Abbildung 4.</i>	Schematische Abbildung der GR-Wirkung	S. 23

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.</i>	Kodierende Regionen des HP-Virus	S. 13
<i>Tabelle 2.</i>	FIGO Klassifikation des Zervix-Karzinoms	S. 16
<i>Tabelle 3.</i>	UICC-Stadien des Zervix-Karzinoms	S. 16

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Grundlage dieser Arbeit sind die folgenden Publikationen:

Susanne Beyer, Junyan Zhu, Doris Mayr, Christina Kuhn, Sandra Schulze, Simone Hofmann, Christian Dannecker, Udo Jeschke and Bernd P. Kost

Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer

International Journal of Molecular Sciences 2017 Feb 23;18(3). pii: E477. doi: 10.3390/ijms18030477.

und

Bernd Peter Kost, Susanne Beyer, Lennard Schröder, Junyan Zhou, Doris Mayr, Christina Kuhn, Sandra Schulze, Simone Hofmann, Sven Mahner, Udo Jeschke, Helene Heidegger

Glucocorticoid receptor in cervical cancer: an immunohistochemical analysis

Archives of Gynecology and Obstetrics 2019 Jan;299(1):203-209. doi: 10.1007/s00404-018-4928-9. Epub 2018 Oct 10.

A Einleitung

1. Zervix-Karzinom

1.1 Epidemiologie

Weltweit stellt das Zervix-Karzinom mit 6,6% aller Karzinome die vierthäufigste maligne Erkrankung unter Frauen dar [1]. Häufiger sind lediglich das Mamma-, das Kolon- und das Lungen-Karzinom [1]. Für das Jahr 2018 registrierte die World Health Organisation (WHO) 570.000 Neuerkrankungen weltweit, wobei sich über 85% in Asien, Afrika und Lateinamerika fanden (entspricht ca. 490.000 Fällen) [2]. Somit war das Zervix-Karzinom in Afrika sogar der zweithäufigste Tumor der weiblichen Bevölkerung [3].

2018 starben weltweit 310.000 an einem Zervix-Karzinom, wobei mit 85-90% ebenfalls der größte Anteil in Afrika, Lateinamerika und Asien zu verzeichnen war [2]. Für Deutschland schätzt die WHO ca. 2.000 Sterbefälle im Jahr 2018 [4]. Die aufgezeigte Diskrepanz findet sich nicht nur weltweit, sondern auch innerhalb der europäischen Union, wo Rumänien und Serbien im Gegensatz zu Finnland die höchste Mortalität verzeichnen [5].

Während die Erkrankung in Deutschland im Jahr 1971 noch das häufigste Karzinom unter Frauen war, steht sie aktuell (2018) mit 1,6% (4.400 Neuerkrankungen) aller weiblichen Tumoren an 13. Stelle [6]. Mögliche Ursachen für die sinkende Inzidenz sind unter anderem eine verbesserte Genitalhygiene sowie die Einführung des Screenings zur Sekundärprävention (siehe 1.4). Ein möglicher Effekt der seit 2007 empfohlenen HPV-Impfung ist anhand dieser Zahlen noch nicht zu erkennen [7].

Im Gegensatz zur Entwicklung in Deutschland ist weltweit von einer ansteigenden Inzidenzrate von 12,7% (auf 642.000 Fälle) bis ins Jahr 2025 auszugehen [8]. Auch ein Anstieg der Todesfälle auf etwa 360.000 Fälle (+15,6%) wird prognostiziert [8]. Das mittlere Erkrankungsalter des Zervix-Karzinoms beträgt 53 Jahre (35 bis 60 Jahre). Damit betrifft das Zervix-Karzinom auch junge Patientinnen, die sich in der Familienplanung befinden und am Arbeitsleben teilnehmen, weshalb auch relevante wirtschaftliche Einbußen durch diese Erkrankung entstehen [7].

1.2 Risikofaktoren

Für das Zervix-Karzinom sind mehrere Risikofaktoren beschrieben, unter anderem die langjährige Einnahme von oralen Kontrazeptiva, Rauchen, hohe Parität, ein geringes Alter bei erstem sexuellen Kontakt, eine HIV und/oder HPV-Infektion und andere sexuell übertragbare Krankheiten [9-14]. Im wissenschaftlichen Fokus steht aktuell die Infektion mit humanen Papillomviren (HPV):

Derzeit sind in etwa 200 Subtypen bekannt [15], die in Abhängigkeit ihres malignen Potentials unterschieden werden in:

- low-risk: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
- probable high-risk: 26, 53, 66
- high-risk: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 [16].

Insgesamt finden sich in 99,7% aller Zervix-Karzinome high-risk-HP-Viren, wobei in über der Hälfte der Fälle entweder Typ 16 oder 18 nachweisbar ist [17, 18].

Bei dem Virus handelt es sich um ein doppelsträngiges DNA-Virus mit ca. 8.000 Basenpaaren [15]. Man unterscheidet zwischen nicht-kodierenden und kodierenden Regionen [15], wobei man letztere in sogenannte frühe (early; E) und späte (late; L) Regionen unterteilen kann (siehe Tabelle 1; [15]).

Region	Funktion
L1, L2	Bildung des viralen Kapsids
E1, E2	Modulation von Transkription und Replikation
E5	Transformationsprozess
E6, E7	Transformationsprozess, Reprogrammierung der Wirtszelle

Tabelle 1. Kodierende Regionen des HP-Virus.

Die viralen Proteine E6 und E7 sind durchgehend in high-risk HPV-assoziierten Tumorzellen exprimiert und haben onkogenetische Aktivität [15, 19]. Dabei bewirken E6 und E7 eine Veränderung im Zellstoffwechsel, außerdem eine erniedrigte Apoptose- und erhöhte Proliferationsrate, beispielsweise über Interaktionen mit CDK2 und pRB [15]. Über Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren kommt es unter anderem zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 durch Ubiquitylierung, Proteolyse, Mutation und Transkriptioninhibition [15, 20]. Neben diesen Veränderungen im Zellzyklus führen die viralen Proteine auch zu epigenetischen Veränderungen, unter anderem via Histondemethylasen [15, 19]. Für E7 wurde eine Interaktion mit Histonacetyltransferasen, beispielsweise p300, ebenso wie mit Histonacetyldetransferasen der Klasse I beschrieben. Des Weiteren sind Assoziationen zwischen den viralen Onkogenen und Histonmethyltransferasen beschrieben [21, 22].

Für den Weg von der HPV-Infektion zum invasiven Zervix-Karzinom sind mehrere Schritte nötig [23, 24].

Zunächst erfolgt die Infektion von Basalzellen des metaplastischen Epithels in der Transformationszone der Zervix, dort kommt es bei ca. 5-10% aller infizierten Frauen zur Viruspersistenz. Durch oben genannte Zellzyklus-Modifikationen führt die Infektion nach mehreren Jahren zur Entwicklung einer Präkanzerose. Die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) wird je nach Entdifferenzierung in 3 Grade (1-3) unterteilt und kann sich schließlich in ein Carcinoma in situ entwickeln. Nur bei 3% der infizierten Frauen kommt es nach einer Latenzzeit von 15-25 Jahren zu einer Durchbrechung der Basalmembran und damit zu einem invasiven Zervix-Karzinom [25].

1.3 Histologische Formen

Es werden verschiedene histologische Subtypen unterschieden, wobei das Plattenepithelkarzinom mit 80% aller Fälle den größten Anteil darstellt [26]. Hierbei unterscheidet man zwischen verhornenden und nicht-verhornenden Formen [27].

Gefolgt wird das Plattenepithelkarzinom vom Adenokarzinom (20%; siehe Abbildung 1) [26]. Seltenerer Formen sind unter anderen das adenosquamöse, das neuro-endokrine, das klarzellige, das seröse, das kleinzellige, das adenoid-zystische und das undifferenzierte Zervix-Karzinom [7, 28].

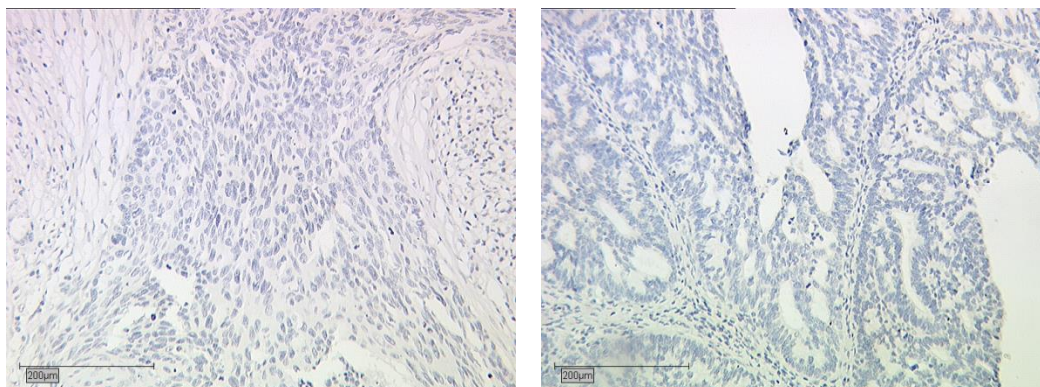


Abbildung 1. Plattenepithel- (links) und Adeno -Karzinom (rechts) der Zervix.

1.4 Klinik und Stadien

Vorsorge

Aufgrund der ausgedehnten Latenzzeit und der nicht-invasiven Vorstufen eines Zervix-Karzinoms ist die Prävention von zentraler Bedeutung. Hierbei werden zwei Strategien verfolgt:

1. Primärprävention: Hierbei soll die HPV-Impfung eine HPV-Infektion verhindern. Die Impfung richtet sich gegen verschiedene high-risk HPV-Typen (bivalenter Impfstoff gegen die Typen 16 und 18; quadrivalenter Impfstoff zusätzlich Typen 6 und 11; nonavalenter Impfstoff zusätzlich Typen 31, 33, 45, 52, 58) [27, 29] und ist durch die Ständige Impfkommission beim Robert-Koch-Institut für alle Mädchen zwischen 9 und 14 Jahren mit der Möglichkeit einer Nachholimpfung bis 17 Jahre empfohlen. Zudem ist die Impfung seit 2018 auch für Jungen empfohlen [30].
2. Sekundärprävention: Zur Früherkennung präkanzeröser Läsionen (CIN, siehe 1.2) werden von der FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) PAP-Abstrich, Kolposkopie und HPV-Testung – je nach Struktur des Gesundheitssystems – empfohlen [27]. Die AWMF empfiehlt ein Beginn des Screenings frühestens ab dem 20. Lebensjahr, spätestens jedoch ab dem 25. Lebensjahr in ein-jährigem Intervall [31]. Längere Intervalle sind im internationalen Vergleich üblich [32] und sollen im Verlauf in Deutschland nach einer Übergangsphase eingeführt werden [31]. Ab dem 35. Lebensjahr wird ein kombiniertes Screening, bestehend aus HPV-Testung und zytologischem Abstrich alle 3 Jahre angeboten [31]. Screening-ende in randomisiert kontrollierten Studien war das 65. Lebensjahr, sodass keine belastbaren Daten für einen Nutzen der HPV-Testung oberhalb dieser Altersgrenze vorliegen [31]. Frauen mit einem Alter >65 Jahre werden zu einer weiteren Teilnahme motiviert [31].

Symptome

Klassische Symptome eines Zervix-Karzinoms sind die vaginale Blutung, vermehrter oder veränderter Ausfluss sowie Dyspareunie. Im fortgeschrittenen Stadium kann es bedingt durch die Tumorausdehnung auch zu Hämaturie, Inkontinenz, Obstipation, Schmerzen im Bereich der Nieren oder des kleinen Beckens sowie zu einer B-Symptomatik kommen [33].

Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Zervix-Karzinoms ist vielfältig. Eine international gültige Einteilung erfolgt nach der überarbeiteten FIGO-Klassifikation von 2019 (siehe Tabelle 2), zudem kann eine Einteilung gemäß der TNM-Klassifikation vorgenommen werden. Die Leitlinie der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.) orientiert sich bezüglich des T-Stadiums an der FIGO-Klassifikation (siehe Tabelle 2) und unterscheidet den regionären Lymphknotenbefall (N; pelvine Lymphknoten) in

- N0 = keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 = regionäre Lymphknotenmetastasen [7].

Das Vorhandensein von Fernmetastasen (M, inklusive paraaortale Lymphknoten) wird beschrieben mit:

- cM0 = klinisch keine Fernmetastasen
- cM1 = klinisch Fernmetastasen nachweisbar
- pM1 = Fernmetastasen histologisch gesichert [7].

Weitere Klassifikationsmöglichkeiten nach Lymphgefäß-, Blutgefäß- und perineuraler Invasion sind möglich, jedoch aktuell noch ohne prognostische Relevanz [7, 34, 35].

Eine andere Beschreibung der Tumorausdehnung bezieht sich auf das Zusammenspiel zwischen Tumorgöße, Lymphknoten- und Fernmetastasen in der UICC-Einteilung von 2010 (siehe Tabelle 3; [36]).

Grading

Bezüglich des Gradings gilt die allgemein gültige Einteilung für Karzinome in

- G1 – gut differenziert
- G2 – mäßig differenziert
- G3 – schlecht differenziert/undifferenziert [27].

FIGO		T
I	Invasives Karzinom auf die Zervix uteri beschränkt	T1
IA	ausschließlich mikroskopisch identifiziert; Stromainvasion bis maximal 5,0 mm	T1a
IA1	gemessene Stromainvasion von max. 3,0 mm	T1a1
IA2	gemessene Stromainvasion zwischen 3,0 mm und 5,0 mm	T1a2
IB	Invasives Karzinom mit einer Tiefeninfiltration >5,0mm und auf die Zervix limitiert	
IB1	Invasives Karzinom mit einer Tiefeninfiltration >5,0mm und auf die Zervix limitiert und <2,0cm in der maximalen Ausdehnung	T1b1
IB2	Invasives Karzinom mit einer Tiefeninfiltration >5,0mm und auf die Zervix limitiert und >2,0cm und <4,0cm in der maximalen Ausdehnung	T1b2
IB3	Invasives Karzinom mit einer Tiefeninfiltration >5,0mm und auf die Zervix limitiert und >4,0cm in der maximalen Ausdehnung	
II	Infiltration jenseits des Uterus, jedoch nicht bis zur Beckenwand und nicht in das untere Drittel der Vagina	T2
IIA	Ausbreitung in die Scheide (proximales und/oder mittleres Drittel), keine Infiltration der Parametrien	T2a
IIA1	Makroskopische Läsion bis maximal 4,0 cm in der maximalen Ausdehnung	T2a1
IIA2	Makroskopische Läsion größer 4,0 cm in der maximalen Ausdehnung	T2a2
IIB	Infiltration der Parametrien, aber nicht bis zur Beckenwand	T2b
III	Ausbreitung bis zur Beckenwand und/oder Befall des unteren Drittels der Vagina und/oder Verursachung einer Hydronephrose oder einer stummen Niere und /oder Infiltration von pelvinen/paraaortalen Lymphknoten	T3
IIIA	Infiltration des unteren Drittels der Vagina ohne Befall der Beckenwand	T3a
IIIB	Ausbreitung bis zur Beckenwand und/oder Verursachung einer Hydronephrose oder einer stummen Niere	T3b
IIIC	Infiltration von pelvinen und/oder paraaortalen Lymphknoten, unabhängig von der Tumorgöße	
IIIC1	Ausschließlich pelvine Lymphknotenmetastasen	
IIIC2	Paraaortale Lymphknotenmetastasen	
IV	Infiltration der Schleimhaut von Blase oder Rektum oder Überschreitung der Grenze des kleinen Beckens	T4
IVA	Infiltration benachbarter Organe	
IVB	Infiltration entfernter Organe	

Tabelle 2. FIGO Klassifikation des Zervix-Karzinoms nach [36].

UICC	TNM	
1	T1 N0 M0	
2	T2 N0 M0	
3	T3 N0 M0	T1-3 N1 M0
4	T4 N0/1 M0	T1-4 N0/1 M1

Tabelle 3. UICC Stadien des Zervix-Karzinoms nach [36].

1.5 Therapie

Für die Therapie des Zervix-Karzinoms sind die FIGO-Klassifikation sowie das Vorhandensein von Risikofaktoren (Tumorausdehnung, Komorbiditäten der Patientin,...) entscheidend [7]. Die Therapie sollte individuell auf den Patienten abgestimmt werden, multimodale Therapien sind möglich. Hieraus ergeben sich komplexe Konzepte, sodass im Folgenden lediglich ein kurzer Einblick in die möglichen Therapien des Zervix-Karzinoms gegeben wird:

Für Frühstadien (FIGO I-IIA) gilt in Deutschland eine operative Therapie mittels Hysterektomie mit Mitentfernung der Parametrien und Lymphadenektomie der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten als Standard (Ausnahme bei Kinderwunsch und FIGO IA1: Konisation bzw. FIGO IA2/IB1: Trachelektomie) [7].

Hierbei kann sich eine adjuvante Radiochemotherapie anschließen, falls bestimmte Risikofaktoren (z.B. N1, M1, R1) vorhanden sind [37]. Ab Stadium IIB wird von der AWMF die primäre Radiochemotherapie mit Platin-haltigen Chemotherapeutika als Radiosensitizer empfohlen, wobei die Brachytherapie Bestandteil des Behandlungskonzeptes sein sollte [7]. Zusätzlich sind supportive Maßnahmen (antiemetische Therapie; Therapie der Anämie, der Lymphödeme, der radiogenen Zystitis und Proktitis; ...) indiziert und auf den Patienten abzustimmen [7]. Medikamentöse Therapien spielen aufgrund der geringen Ansprechraten des Zervix-Karzinoms aktuell eine untergeordnete Rolle [7]. In weit fortgeschrittenen Stadien ist eine palliativmedizinische Betreuung zum Erhalt der Lebensqualität anzubieten [7].

1.6 Prognose

2018 gab es geschätzt 311.000 Todesfälle [2]. Nur ein geringer Teil, etwa 2.000 Todesfälle beziehen sich auf Deutschland [4], wo die 5-Jahresüberlebensrate 69% und die 10-Jahresüberlebensrate 65% beträgt [38].

Als Faktoren mit Einfluss auf die Prognose gelten die Tumorgöße, Lymphknotenmetastasen, die Resektionsränder sowie der histologische Subtyp und der Lymphknotenstatus [39-42].

2. Histonmodifikationen

2.1 Arten der Histonmodifikationen

Zusätzlich zur HPV-Infektion sind epigenetische Veränderungen beschrieben, die bei der Entwicklung eines Zervix-Karzinoms bedeutend sind. Epigenetik umfasst alle meiotisch und mitotisch erblichen Vorgänge in der Genexpression, welche nicht über die DNA-Sequenz kodiert sind : hierzu gehören reversible Modifikationen an der DNA und deren Struktur, zum Beispiel DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und non-coding RNAs [43]. Im Folgenden soll auf Histone und deren Modifikationen eingegangen werden.

Histone sind als Proteine Bestandteil der Nukleosomen, einer „Verpackungseinheit“ der DNA. Dabei sind ca. 145-147 Basenpaare (bp) mit Histonen (je 2 Kopien von H2A, H2B, H3 und H4) in Oktameren organisiert (siehe Abbildung 2) [44]. Einzelne Nukleosomen werden untereinander durch das Histon H1 (sog. linker histone) stabilisiert [44]. Durch posttranslationale, reversible Modifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung [45-47], kommt es zu einer veränderten DNA-Zugänglichkeit und so zu Veränderungen in der Genregulation, sowohl im Sinne einer Aktivierung als auch einer Supprimierung der Transkription (zusammengefasst in [43]).

Veränderungen von Histonmodifikationen wurden bei verschiedenen Tumoren untersucht (siehe 2.2 und 2.3) und sind unter anderem beim Zervix-Karzinom relevant. Hier wurde in der Promotorregion der viralen Proteine E6 und E7 eine Acetylierung an Lysin 9 des Histon 3 (H3K9ac) sowie eine dreifache Methylierung am Lysin 4 des Histon 3 (H3K4me3) beobachtet [48]. In dieser Arbeit soll ihre Expression in Zervix-Karzinomen und ihr möglicher Zusammenhang mit klinischen Parametern untersucht werden.

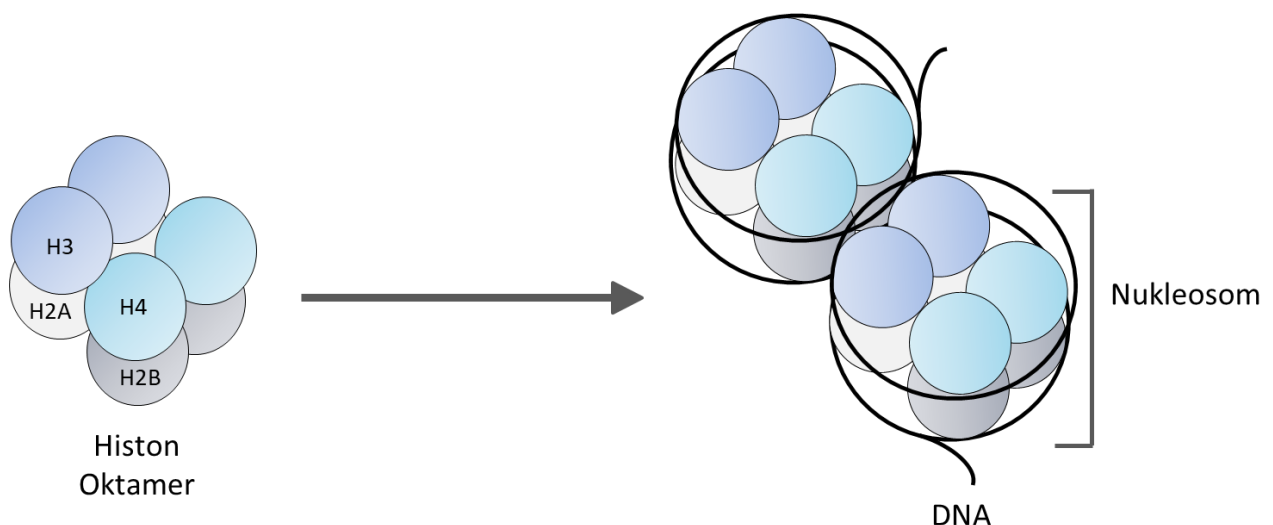


Abbildung 2. Nukleosomenstruktur. Ca. 147bp werden um ein Histon-Oktamer organisiert. Dieses besteht aus 2 Kopien der vier Core-Histone H2A, H2B, H3, H4.

2.2 Histonacetylierungen und die Bedeutung der H3ac-Modifikation in der Onkologie

Grundlagen

Die Acetylierung von Histonen findet am N-terminalen Ende der jeweiligen Aminosäuren statt [49]. Die Haupt-Acetylierungsstellen von H3 befinden sich an Lysinen der Position K9, K14, K18, K23, K27 und K36 (siehe Abbildung 3) [49-51].

Durch den Transfer einer neutralisierenden Acetylgruppe (-C(O)CH₃) wird die Wechselwirkung zwischen Histonen und DNA beeinflusst: es kommt zu einer Chromatin-Dekondensation mit vermehrter Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und somit zu einer Aktivierung der Transkription [52]. Im Gegensatz dazu geht eine Deacetylierung mit vermehrt kondensierten Chromatinstrukturen einher [53].

Die Regulierung des Acetylierungsstatus erfolgt über Histonacetyltransferasen und – Deacetylasen, wobei in der Tumorgenese oftmals deren Gleichgewicht gestört ist. Histonacetyltransferasen (HAT) übertragen die Acetylgruppe und sind in mehrere Familien klassifiziert: MYST (TIP60, MOZ/MYST3, MORF/MYST4, HBO1/MYST2, MOF/MYST1), p300/CBP (P300, CBP), und GNAT (GCN5, PCAF, ELP3) (zusammengefasst in [54]). Die Inhibition der Acetyltransferasen wird in der Onkologie als möglicher therapeutischer Angriffspunkt gesehen, unter anderem bei Lungenkarzinomen [55], Prostatakarzinomen [56] und Mammakarzinomen. Für den Acetyltransferase-Inhibitor Garcinol konnte beispielsweise bei Mammakarzinomen eine Inhibition der Proliferation gezeigt werden [57].

Den Gegenspieler der Histonacetyltransferasen stellen die Histondeacetylasen (HDAC) dar. Dabei handelt es sich um insgesamt 18 Enzyme, welche in vier Gruppen eingeteilt werden können (HDAC I, II (A und B), III, IV) (zusammengefasst in [58]). HDAC sind in Tumorzellen oftmals überexprimiert und bereits in der Frühphase der Karzinogenese relevant, wobei der genaue Wirkungsmechanismus komplex ist [59, 60]: so können HDAC der Gruppe IV (Sirtuine) in Anhängigkeit der Tumorentität sowohl als Tumorsuppressor als auch als Tumorpromotor wirken (zusammengefasst in [61]). Zusätzlich interagieren HDAC auch mit weiteren Proteinen, wie zum Beispiel p53, wobei die Deacetylierung von p53 zu einer Abnahme der Apoptoserate führt [62]. Die vielfältigen Effekte auf den Zellzyklus lassen HDAC zunehmend zum therapeutischen Angriffspunkt werden: So konnte durch Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) die Konzentration von H3K9ac erhöht werden, was zur Apoptose im Blasen-Karzinom führte [63]. Ein Wachstumsstillstand konnte außerdem zum Beispiel bei Neuroblastomen [64] und Gliomen [65] gezeigt werden. Beispiele aus der Gruppe der HDACi sind die Valproidsäure sowie Vorinostat, welches bereits durch die FDA bei T-Zell-Lymphomen zugelassen ist [66-69]. Studien konnten zeigen, dass die Kombination von Bortezomib, einem Proteasomen-Inhibitor und Vorinostat in Zervix-Karzinom-Zellen (HeLa Zellen) zu einer massiven Apoptose führte [70].

Für die Modifikation H3K9ac sind abhängig von der Tumorentität verschiedene Effekte beschrieben: so ist ein besseres Überleben bei Gliom-Patienten mit hoher H3K9ac-Konzentration zu beobachten [71], während Patienten mit NSCLC von niedrigen Konzentrationen profitieren [72]. Beim Ovarial-Karzinom ist H3K9ac in die

maligne Progression von PARP-1 involviert [73]. Bei diesen Tumoren erscheint eine Abnahme von H3K9ac in Zusammenhang mit dem Auftreten epithelialer Tumore zu stehen, eine höhere H3K9ac-Expression führt zu niedrigerem klinischem Stadium [74]. Inwieweit die medikamentöse Beeinflussung des Acetylierungsstatus für die genannten Beispiele eine Rolle für die Therapie und Prognose spielt ist noch nicht abschließend untersucht.

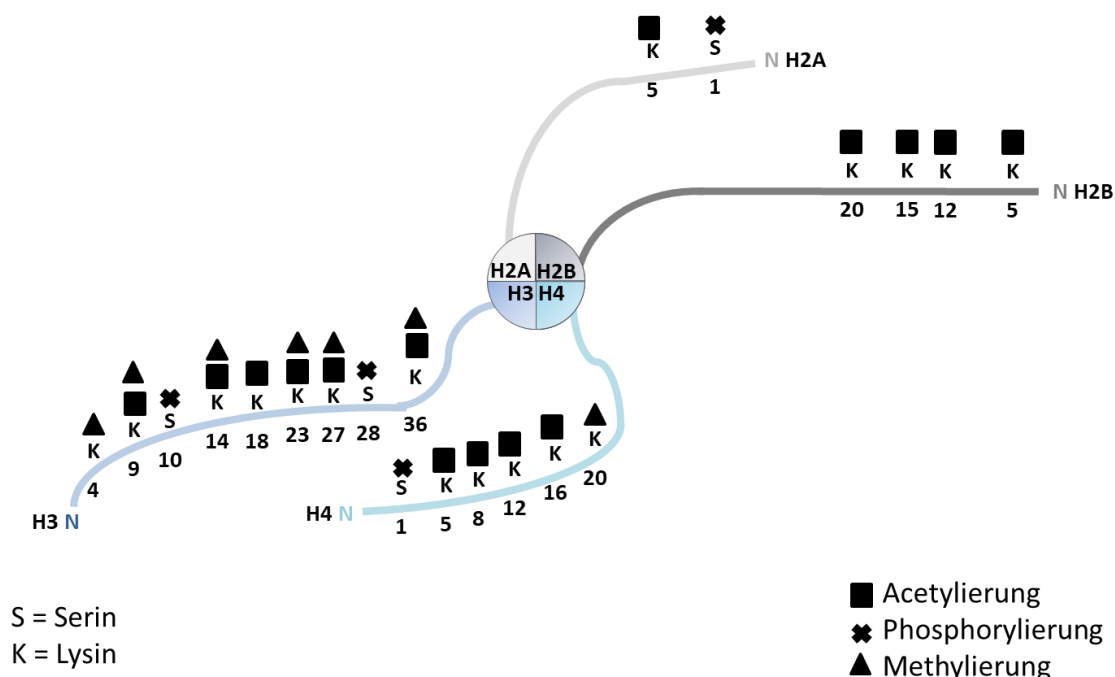


Abbildung 3. Schematische Illustration der Histonmodifikationen. Nach [75] und [49].

Bedeutung von Histonacetylierungen (insbesondere H3) beim Zervix-Karzinom

In HeLa-S3 Zellen mit integriertem HPV18-Genom war H3K9ac (und H3K4me3) vermehrt in Promotorregionen, insbesondere in der Promotor-Region von E6 und E7 nachweisbar [48]. Bezüglich HPV-Typ 16 korrelierte eine erhöhte Histonacetylierung mit einer vermehrten viralen Genexpression in Zervix-Karzinom-Zellen [76]. Assoziationen von E6 und E7 mit HAT und HDAC beeinflussen die Transkriptionsvorgänge in der Wirtszelle, wobei die Interaktionen von E6 und HAT bzw. E7 und HDAC die maligne Zelltransformation unterstützen [77, 78]. Für acetyliertes H3 ist eine Korrelation zum Progress von CIN I zu CIN II und CIN III beschrieben [79]. Zusammenfassend scheint die Histonacetylierung im Zervix-Karzinom mit einem Tumorprogress assoziiert zu sein.

2.3 Histonmethylierungen und die Bedeutung der H3me-Modifikation in der Onkologie

Grundlagen

Die Methylierung von Histonen findet ebenso wie die Acetylierung am N-terminalen Ende statt. Hauptmethylierungsstellen an H3 sind dabei die Positionen K4, K9, K14, K23, K27 und K36 (siehe Abbildung 3) [49, 80]. Der Effekt einer Methylierung von H3 ist abhängig vom Level (zum Beispiel: me, me2 oder me3) und der genauen Lokalisation [81, 82]. So ist die Konfiguration

H3K4me3 assoziiert mit aktiven, transkribierten Genen und deren Genexpression [78] und eine Veränderung des Methylierungsstatus in codierenden Regionen korreliert mit der Transkriptionsaktivität [83]. Die Methylierung von H3K4 wird reguliert über Methyltransferasen und Methylde-transferasen (zusammengefasst in [84-86]), wobei H3K4 methylierende Enzyme mit der Transkription assoziiert sind (zusammengefasst in [87], [88]). Ein Beispiel für H3K4 Methyltransferasen ist die Set1/COMPASS-family, zu den Vertretern der Methyl-demethylasen gehören KDM2B, KDM 6C, KDM 5B, und KDM5A–D/JARID1A–D (zusammengefasst in [81, 86]). Eine Fehlregulation der Lysin-Methylierung führt über veränderte DNA-Zugänglichkeiten und veränderte Transkription zur Karzinogenese (zusammengefasst in [86], [89]), weshalb auch hier Inhibitoren der Methyltransferasen und -de-transferasen eine therapeutische Strategie darstellen: Ein möglicher Inhibitor der Histonmethyltransferasen ist das Molekül *BIX01294*, für welches bereits eine Suppression der Angiogenese in hepato-zellulären-Karzinomzellen gezeigt wurde [90]. Der Inhibitor der Lysin-spezifischen Demethylase 1 *Bizine* konnte in vitro eine Reduktion der Proliferationsrate in Krebszelllinien herbeiführen (Prostata-Ca und NSCLC) [91].

Für H3K4me3 ist eine Interaktion mit der Tumorsuppressorfamilie ING (inhibitor of growth) beschrieben, wobei vor allem ING 2 an H3K4me3 bindet [92], was zu einer Transkriptionsaktivierung führt [93]. Dabei agiert ING abhängig vom Tumortyp entweder als Tumorsuppressor (z.B. bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich [94], Basalzellkarzinomen [95] und Melanomen [96]) oder als Onkogen (z.B. beim Kolon-Karzinom [97]). Für zuletzt genanntes Karzinom ist eine verminderte H3K4me3 Expression mit Lymphknoten- und Lebermetastasen sowie einem insgesamt schlechterem Gesamtüberleben assoziiert [98].

Bedeutung von Histon(de-)methylierungen (insbesondere H3) beim Zervix-Karzinom

Beim Zervix-Karzinom stehen Histonmethylierungen und -demethylierungen in engem Zusammenhang zur HPV-Protein-Expression:

So ist eine vermehrte Konzentration von H3K4me3 (ebenso wie H3K9ac) in HeLa-S3 Zellen mit integriertem HPV18-Genom in Promotorregionen nachgewiesen worden [48]. Ebenso werden die Promotorregionen E6 und E7 durch H3-Methylierungen aktiviert (H3K4me2) [99].

Die viralen Proteine E6 und E7 beeinflussen im Zervix-Karzinom auch verschiedene Histondemethyltransferasen: In einer Studie zu H3K4me3-spezifischen Demethylasen konnte gezeigt werden, dass das HPV-Protein E6 die Histondemethylase KDM5C destabilisiert. Diese supprimiert normalerweise über verschiedene Wechselwirkungen Onkogene wie EGFR und c-MET, sodass ein Ungleichgewicht zugunsten der Onkogene entsteht [100]. Außerdem ist die Konzentration von H3K27me3 in HPV-16 positiven, E7-exprimierenden Zellen verringert [19]. Ursächlich ist eine vermehrt exprimierte Histondemethylase KDM6B [19]. Deren Zusammenhang zu p16, einem Tumorsuppressor, scheint ebenfalls wichtig für das Überleben E7-positiver Zellen zu sein [101]. Die Überexpression einer weiteren Demethylase, KDM2B, scheint assoziiert mit einer high-risk HPV-Infektion in Zervix-Karzinom Zellen [102]. Ob die bekannten Zusammenhänge auch therapeutisch genutzt werden können, ist derzeit noch nicht abschließend geklärt.

3. Glukokortikoid-Rezeptoren

3.1 Glukokortikoide – ein Überblick

Glukokortikoide, beim Menschen überwiegend in Form von Cortisol vorliegend, sind Hormone mit zentraler Bedeutung für den Organismus: sie sind zentrale Mediatoren der Stress-Antwort und bei der Regulierung von Verhaltens- und Stoffwechselfvorgängen, ebenso wie bei Prozessen von Immunantwort, Immunsuppression und Inflammation beteiligt. Auch bei soliden Tumoren sind Glukokortikoide von zentraler Bedeutung (siehe 3.3). Ihre Produktion wird in circadianer Rhythmik über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse reguliert (zusammengefasst in [103]). 90% der Glukokortikoide liegen durch Bindung an Proteine, wie Albumin und Glukokortikoid-bindende Globuline als inaktive Form vor (zusammengefasst in [104]). In ungebundener Form sind die Hormone aktiv und können als hydrophobe Moleküle die Zellmembran eigenständig passieren [103].

Auf molekularer Ebene wirken Glukokortikoide über die Bindung an Glukokortikoid-Rezeptoren auf die Transkription aktivierend oder inhibierend (zusammengefasst in [103]). Diese Wirkungsmechanismen sind durch diverse Wechselwirkungen unter anderem mit Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren komplex (zusammengefasst in [105]). Außerdem können Glukokortikoide Histonmodifikationen, vor allem via Phosphorylierung oder Reduzierung der HAT hervorrufen [106].

Im medizinischen Bereich werden sie therapeutisch bei Autoimmunerkrankungen, malignen hämatogenen Neoplasien sowie supportiv in der gesamten Onkologie eingesetzt, wobei die Langzeit-Therapie mit vielen Nebenwirkungen, zum Beispiel Osteoporose, metabolischem Syndrom oder Cushing-Syndrom verbunden ist.

3.2 Glukokortikoid-Rezeptor allgemein

Aufbau des Glukokortikoid-Rezeptors

Der Glukokortikoid-Rezeptor (GR), auch NR3C1, gehört zur Kernrezeptorfamilie. Weitere Mitglieder der Familie stellen der Mineralocortikoid-, Progesteron- und Androgen-Rezeptor sowie der Thyroid-Rezeptor (TR) dar (zusammengefasst in [105]).

Der Glukokortikoid-Rezeptor dient der Bindung von Glukokortikoiden und der Übermittlung ihrer Signale: dabei binden Glukokortikoide an die Liganden-bindende Domäne am C-Terminus; am N-Terminus findet sich die DNA-bindende Domäne, an der es über den Zink-Finger zu Wechselwirkungen mit der DNA kommt. Außerdem finden sich am C- sowie am N-terminalen Ende des Rezeptors Domänen für die Transkriptionsaktivierung, an denen eine Interaktion mit verschiedenen weiteren Transkriptionsfaktoren stattfindet (zusammengefasst in [103]).

Wirkungsweise des GR

In seiner inaktiven Form ist der GR im Zytosol an verschiedene Proteine, z.B. Hsp 70 und Hsp 90, die den sogenannten Chaperonenkomplex bilden, gebunden (zusammengefasst in [103]). Durch Bindung von Glukokortikoiden an den GR löst sich der Rezeptor von seinem Chaperonenkomplex und legt somit das „Nuclear Location Signal“ (NLS) frei, es kommt zur Bildung von Homodimeren. Im nächsten Schritt erfolgt die Translokation in den Nucleus, wo über Zinkfinger die DNA-Bindung zu spezifischen Bindungssequenzen (GRE, Glucocorticoid response element) stattfindet: hier kommt es nun zur Transkription bzw. Modulation des Expressionslevels verlinkter Gene (zusammengefasst in [103]) (siehe Abbildung 4). Bemerkenswert ist, dass nicht jedes Gen mit GR-Induktion über funktionale GREs verfügt, weshalb auch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren durch den GR nötig ist: welches GRE angesteuert wird hängt unter anderem von DNA- und Histonmodifikationen ab [107].

Der Effekt der DNA-Bindung ist abhängig von der genauen GR/DNA-Bindungssequenz [108]. Ein positiver Effekt auf die Transkription wird über Gene mit „Glucocorticoid-responsive element“ (GRE) vermittelt, während durch „negative Glucocorticoid-responsive element“ (nGRE) die Transkription inhibiert wird. Zudem kann eine Inhibition durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren erfolgen (unter anderem NF- κ B, AP-1; zusammengefasst in [105]; siehe Abbildung 4). Beispielsweise kann es zwischen GR und NF- κ B zu einem negativen Cross-Talk kommen: GR inhibiert dessen Transkriptionswirkung auf pro-inflammatorische Gene über eine Verhinderung der NF- κ B-Translokation in den Kern (zusammengefasst in [103, 109]). Von der beschriebenen genomischen Wirkung unterscheidet man die nicht-genomische Wirkung, wobei beispielsweise GR-Effekte auf die Membran oder auf Kinasen im Rahmen der akuten antientzündlichen Glukokortikoid-Wirkung eine Rolle spielen (zusammengefasst in [103]).

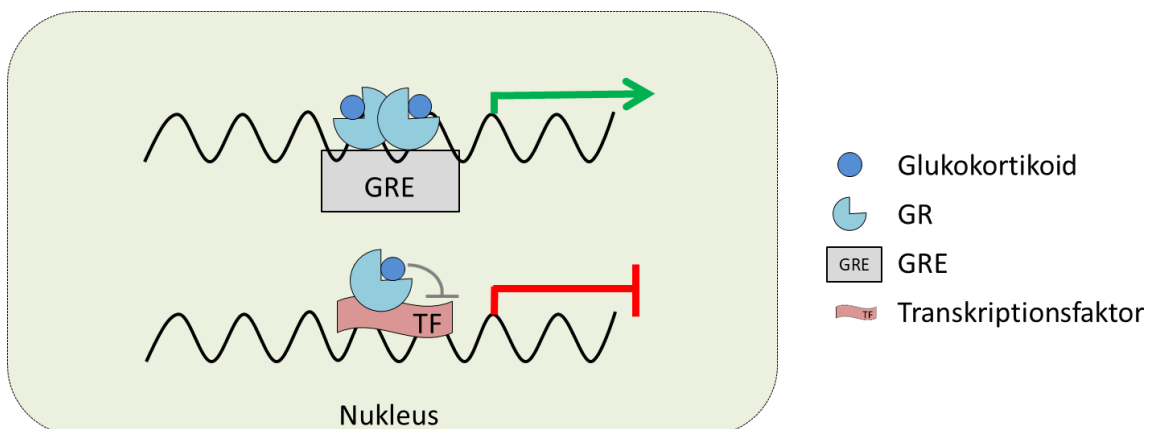


Abbildung 4. Schematische Abbildung der GR-Wirkung. Bindung von Cortisol an den GR, Dimerisation und Transkriptionsaktivierung durch Bindung des Komplexes an die GRE (oben) oder Inhibition der Transkription über Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren (unten). Modifiziert nach [110].

Wirkungsspezifität und -Regulierung

Der Glukokortikoid-Rezeptor kommt in allen Geweben vor, dennoch hat er sehr gewebespezifische Wirkungen. Dies ist den zahlreichen durch alternatives Splicing entstandenen GR-Isoformen zuzuschreiben (GR α , GR β , GR γ , GR-A, GR-P) (zusammengefasst in [103]).

Die Aktivität des Rezeptors wird über mehrere Mechanismen reguliert. Über Transkriptionsfaktoren (z.B. Glucocorticoid-responsive factor-1) kann die Transkription des GR direkt aktiviert oder inhibiert werden [111]. Zusätzlich spielen Glukokortikoid-Konzentrationen, Ligandenzugänglichkeit, sowie posttranslationale Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitylierung, Acetylierung und SUMOylierung am GR eine Rolle, ebenso wie Phosphatasen und Kinasen (zusammengefasst in [103]). Die Aktivität des GR kann auch medikamentös moduliert werden: Selektive GR-Modulatoren und -Agonisten (SEGRM, z.B. Compound A und SEGRA, z. B: RU-24858) bewirken möglichst spezifische Glukokortikoid-Rezeptor-Effekte mit geringem Nebenwirkungsprofil über komplexe Wechselwirkungen mit anderen Co-Faktoren (zusammengefasst in [103],[112, 113]. Eine natürliche Inhibierung der GR-Funktion findet über Östrogen-Agonisten statt [114].

3.3 Bedeutung in der Onkologie

Grundlagen

Ein direkter pro-apoptotischer Effekt der Glukokortikoide ist bei hämatogenen malignen Neoplasien bereits seit vielen Jahren nachgewiesen und wird dort als therapeutischer Angriffspunkt genutzt [115-117]. In Hinblick auf den Einfluss von Glukokortikoiden und deren Rezeptoren auf solide Tumore scheinen die Effekte sehr heterogen zu sein, weshalb nicht direkt auf einen kausalen Zusammenhang zwischen GR-Expression und der Wirkung von Glukokortikoiden auf den Tumor geschlossen werden kann [118]. Sowohl bei Prostata- als auch bei kolorektalen Karzinomen wurde unter Glukokortikoid-Einnahme im Sinne einer supportiven Therapie eine Zunahme der Behandlungsresistenz beobachtet, wobei als mögliche Ursache die immunsupprimierende Wirkung und das daraus folgende beschleunigte Karzinom-Wachstum sowie erhöhte Metastasierungsraten diskutiert werden [119-121]. Letzterer Effekt der Glukokortikoid-Therapie konnte auch beim Mamma-Karzinom beobachtet werden [122]. Die GR-Expression selbst ist hierbei abhängig vom Status des Östrogenrezeptors (positiv oder negativ) und mit einer schlechteren bzw. besseren Prognose assoziiert [123]. Block et al. konnten in Nierenzell-Karzinomen, in Sarkomen und Melanomen ebenso wie in Zervix-Karzinomen hohe Konzentrationen von GR nachweisen, im Gegensatz zu Kolon-, Magen- und Endometrium-Karzinomen [124], wobei insgesamt eine geringe zytosolische Expression beobachtet wurde [124]. Durch SEGRA/SEGRM wird der Glukokortikoid-Rezeptor für die Onkologie und Immunologie zum therapeutischen Angriffspunkt [125-127].

Bedeutung der Glukokortikoiden und des GR beim Zervix-Karzinom

Es konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide die Proliferation von Zervix-Karzinomzellen durch GR-vermittelte Aktivierung von HPV-Proteinen und Aktivierung beziehungsweise Suppression von bestimmten Zielgenen stimulieren [128, 129]. Zugrundeliegender Mechanismus sind die GREs in der „upstream regulatory region“ verschiedener HPV-Typen (incl. HPV 16 und HPV 18), wobei über die GR-Bindung die virale Promotoraktivität und der virale Zellzyklus reguliert werden [128]. Glukokortikoide können in HPV18 positiven Zellen so unter anderem die E6-Proteinsynthese stimulieren [130]. Hierdurch kommt es zu einer Downregulation von p53 und dem dadurch regulierten Tumorsuppressor miR145, was zu einer zunehmenden Chemoresistenz von Zervix-Karzinomzellen führt [20, 131]. Ebenso wurde unter Dexamethason-Therapie beim Zervix-Karzinom in verschiedenen Zelllinien eine erhöhte Bestrahlungsresistenz beobachtet [132]. Bei beiden beschriebenen Effekten ist die genaue Rolle des Rezeptors unklar. Im Gegensatz dazu konnten Lu et al. in SiHa-Zelllinien bei GR-positiven Zervix-Karzinomen eine erhöhte Cisplatin-Zytotoxizität aufgrund der daraus resultierenden NF- κ B -Supprimierung beobachten [133]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Wirkung der Glukokortikoide eng an den HPV-Zyklus gebunden ist. Jedoch bleibt die klinische Bedeutung aktuell unklar und es kann nicht direkt auf die Rolle und den Effekt der GR-Expression geschlossen werden [118].

4. Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der weltweit hohen Inzidenz des Zervix-Karzinoms steht dieses im Fokus zahlreicher Studien. Zunehmend werden epigenetische Veränderungen und Einflussfaktoren auf die Transkription, insbesondere in Zusammenhang mit dem HP-Virus, untersucht. Durch verbessertes Verständnis der Kanzerogenese sollen aus diesen Ergebnissen neue therapeutische Strategien entwickelt werden, die das Überleben der Patientinnen verbessern.

Zielsetzung der Arbeit war es, die Expression ausgewählter Proteine (H3K9ac, H3K4me3 und GR) im Zervix-Karzinom durch immunhistochemische Färbungen und mikroskopische Expressionsbeurteilung zu untersuchen, sowie einen möglichen Zusammenhang zu klinischen Daten und dem Patientenüberleben darzustellen. Die Ergebnisse wurden 2017 im *International Journal of Molecular Science (Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer [134])* sowie 2018 in den *Archives of Gynecology and Obstetrics (Glucocorticoid receptor in cervical cancer: an immunohistochemical analysis [135])* veröffentlicht. Die Autorin der Arbeit war dabei verantwortlich für das Design sowie die Durchführung der Experimente, ebenso wie für das Erstellen des Manuskriptes und hatte einen maßgeblichen Anteil an der Datenanalyse.

Aufbauend auf weitere Studien kann hieraus möglicherweise ein therapeutischer Angriffspunkt generiert werden.

B Zusammenfassung (Deutsch)

Das Zervix-Karzinom ist mit ca. 570.000 Neuerkrankungen weltweit das vierthäufigste Karzinom unter Frauen, wobei für die Zukunft eine ansteigende Inzidenz prognostiziert wird [2, 8]. Als essentieller Bestandteil der Tumorgenese gilt die Infektion mit high-risk humanen Papillomviren, wie Typ 16 oder 18. Kommt es zu einer persistierenden Infektion, entwickeln ca. 3% der Frauen nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren ein invasives Zervix-Karzinom [17, 18]. Hierbei kommt epigenetischen Veränderungen sowie den viralen Proteine E6 und E7 über herbeigeführte Veränderungen im Zellzyklus eine Schlüsselrolle zu. Die Aktivität und damit der Effekt der viralen Proteine sind auf verschiedenen Wegen modulierbar, unter anderem sind der Glukokortikoid-Rezeptor [128, 129] sowie die Histonmodifikationen H3K9ac und H3K4me3 relevant [48]. Die Expression dieser Modifikationen sowie ein möglicher Zusammenhang zu klinischen Parametern und dem Patientenüberleben wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht [134, 135]:

Hierzu wurden histologische Präparate von 250 Patientinnen mit Plattenepithel- oder Adenokarzinom der Zervix verwendet, die an der LMU-Frauenklinik am Campus Innenstadt in den Jahren 1993-2002 operiert wurden. Diese wurden immunhistochemisch mit Antikörpern für die genannten Moleküle bearbeitet. Die Expression wurde nach dem *Immun Reactive Score* (IRS) beurteilt, abschließend erfolgte die statistische Auswertung mittels SPSS (Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten, nicht parametrische Testverfahren sowie Kaplan-Meier Kurven, log-rank-Test und Cox Regression).

In der 2017 veröffentlichten Arbeit „Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer“ [134] konnte in 92,8% aller Proben eine nukleäre H3K9ac Expression nachgewiesen werden, wobei diese im Adenokarzinom im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom höher war ($p=0,013$). Eine vermehrtes Vorkommen von H3K9ac korrelierte signifikant mit niedrigem Grading ($p=0,004$), negativem Lymphknoten-Status ($p=0,001$), einer geringen Größe des Primärtumors ($p=0,035$) sowie einem niedrigen FIGO-Stadium ($p=0,016$) [134]. Die Modifikation H3K4me3 fand sich in 96,8% aller Präparate und war stets nukleär und in 43,6% der Fälle zusätzlich zytoplasmatisch nachweisbar, wobei letztere mit fortgeschrittenem T-Status korrelierte ($p=0,002$) [134]. Beide Histonmodifikationen waren mit dem Überleben assoziiert: eine erhöhte H3K9ac Expression korrelierte signifikant mit einer verminderten Gesamtüberlebensrate ($p=0,027$) und war ein unabhängiger Parameter für das Gesamtüberleben ($p=0,027$) [134]. Bezogen auf H3K4me3 war eine höheres nukleäres Vorkommen ebenfalls verbunden mit einer Tendenz zu einem verminderten Gesamtüberleben ($p=0,066$) [134]. Eine erhöhte zytoplasmatische Expression ging mit einem signifikant verkürztem Rezidiv-freiem Überleben einher ($p=0,025$) und zeigte sich hierfür als unabhängiger Parameter ($p=0,030$) [134].

In der zweiten Publikation „Glucocorticoid receptor in cervical cancer: an immunohistochemical analysis“, veröffentlicht 2018 [135], wurde der aktive, nukleär exprimierte Glukokortikoid-Rezeptor untersucht. Dieser fand sich in 92,4% der Proben, wobei eine erhöhte Expression mit niedrigem FIGO-Status korrelierte

($p=0,002$) und vermehrt in Plattenepithel-Karzinomen der Zervix detektiert wurde ($p=0,000$) [135]. Zudem zeigten sich bei erhöhter GR-Expression bessere Gesamtüberlebensraten ($p=0,045$), wobei sich diese auch als unabhängiger Prognose-Marker zeigte ($p=0,05$) [135].

Die Verwendung von Glukokortikoiden ist in der Onkologie weit verbreitet, insbesondere bei hämatogenen malignen Neoplasien. Die Expression des Glukokortikoid-Rezeptors ist abhängig von der Tumorentität, wobei bei soliden Tumoren sehr heterogene Wirkungseffekte gezeigt wurden [118]. In Hinblick auf das Zervix-Karzinom ist die Interaktion zwischen Glukokortikoiden, dem Glukokortikoid-Rezeptor und dem HP-Virus nicht abschließend geklärt. Über GR-vermittelte Aktivierung von HPV-Proteinen ist eine Stimulation des viralen Zellzyklus durch Glukokortikoide und eine damit einhergehende Proliferation der Zervix-Karzinomzellen beschrieben [128, 129]. Andererseits geht eine erhöhte GR-Expression in vitro mit verstärkter Chemotoxizität einher [20, 131], ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus für das in dieser Arbeit gezeigte verbesserte Gesamtüberleben. Es ist bisher jedoch ungeklärt, inwieweit andere Mechanismen den Effekt der Glukokortikoide und deren Rezeptoren beeinflussen. Nach aktuellem Wissensstand ist davon auszugehen, dass aufgrund der komplexen Wechselwirkungen nicht direkt auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Glukokortikoid-Rezeptorexpression und der Wirkung von Glukokortikoiden auf den Tumor geschlossen werden kann [118].

Durch post-translationale Modifikationen von Histonen wird die DNA-Zugänglichkeit für die Transkription beeinflusst, wobei sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressorgene davon betroffen sind [43]. Beide untersuchten Histon-Konfigurationen (H3K9ac und H3K4me3) sind assoziiert mit der Transkription. Dies konnte in Zellen mit integriertem HPV-Genom gezeigt werden: dort waren H3K9ac und H3K4me3 vermehrt in Promotorregionen, insbesondere in der Promotor-Region von E6 und E7, nachweisbar [48]. Dabei interagieren die viralen Proteine auch mit Histon-(de-) Acetylasen und -demethylasen und unterstützen so die maligne Zelltransformation. Die untersuchten Modifikationen führten jeweils zu einem höheren Metastasierungs-Potential des Tumors [77, 78, 100], was sich mit den Ergebnissen unserer Studie deckt, in der sich H3K9ac und H3K4me3 als negative Prognosefaktoren für das Überleben der Patientinnen herausstellte.

In klinischen Studien wird derzeit die medikamentöse Beeinflussung der Histonmodifikationen als neuer therapeutischer Angriffspunkt für das Zervix-Karzinom untersucht - ebenso wie die Modulation von Glukokortikoid-Rezeptoren bei soliden Tumoren [70, 125-127]. Weitere Erkenntnisse zur Rolle der epigenetischen Veränderungen in der Tumorgenese und dem Effekt des Glukokortikoid-Rezeptors können hierbei zu neuen Screening-Methoden und neuen therapeutischen Strategien führen.

C Zusammenfassung / Summary (English)

The cervical carcinoma is the fourth most common carcinoma in women worldwide with an incidence of ca. 570.000 [2]. Its incidence is increasing [8]. An infection with high-risk human papilloma virus, like type 16 or 18 is essential for tumorigenesis [17, 18]. In case of a persistent infection, about 3% of women develop an invasive carcinoma after several years [17, 18]. In this process, epigenetic modulations and the viral proteins E6 and E7 play an important role via alterations in the cell cycle. The activity of viral proteins is variable in different ways, glucocorticoid receptor [128, 129] and the histone modifications H3K9ac and H3K4me3 can be involved [48]. Their expression and correlation to clinical parameters as well as survival data were examined in this dissertation [134, 135]:

For this purpose, histological samples of 250 patients with SCC or adenocarcinoma of the cervix uteri were used. Patients underwent surgery at *LMU Frauenklinik Campus Innenstadt* between 1993 and 2002. The samples were stained with the antibodies for the mentioned molecules. Their expression was analyzed by the immunoreactive score (IRS). Statistical analysis was performed by SPSS (Spearman's rank correlation coefficient, non-parametric tests, Kaplan-Meier curves, log-rank-test and Cox-regression).

The publication „Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer“, published 2017 [134], a detection of H3K9ac is described in 92.8% of all samples in the nucleus with a higher expression in adenocarcinoma compared to SCC ($p=0.013$). An increased expression correlated significantly with low grading ($p=0.004$), negative lymph node status ($p=0.001$), small size of primary tumor (pT; $p=0.035$) and low FIGO stage ($p=0.016$) [134]. The modification H3K4me3 was detectable in 96.8% of all samples in the nucleus and in 43.6% of all cases additionally in the cytoplasm [134]. Cytoplasmic expression correlated with increased T-stage ($p=0.002$) [134]. Both histone modifications were correlated to survival: an increased expression of H3K9ac was associated with poorer overall survival ($p=0.027$) and was an independent prognostic marker ($p=0.027$) [134]. Regarding H3K4me3, patients with high nuclear expression tended to have a shorter overall survival ($p=0.066$) [134]. An increased cytoplasmic expression was significantly correlated to shorter progress-free survival ($p=0.025$) and was an independent prognostic marker for progress-free survival ($p=0.030$) [134].

In „Glucocorticoid receptor in cervical cancer: an immunohistochemical analysis“, published 2018 [135], we examined the active, nuclear expressed glucocorticoid receptor. It was detectable in 92.4% of all samples and an increased staining correlated to low FIGO stage ($p=0.002$) and squamous cell carcinoma ($p=0.000$) [135]. Additionally, increased GR expression correlated to better overall survival rates ($p=0.045$) and was an independent prognostic marker ($p=0.05$) [135].

The use of glucocorticoids is common in oncology, especially in hematologic neoplasia. The expression of the glucocorticoid receptor depends on the tumor

type, but its effect is very heterogenic in solid tumors [118]. Regarding the cervical carcinoma of the uteri the interaction between glucocorticoids, glucocorticoid receptor and the human papilloma virus is not finally clear yet. On the one hand, GR mediated activation of the HPV proteins leads to a stimulation of the viral cell cycle and finally to a proliferation of the cervical carcinoma cells [128, 129]. On the other hand, in vitro experiments showed that an increased GR expression correlated to higher chemo toxicity [20, 131]. This mechanism may explain the better survival rates detected in this work. Up to now it is unknown, how far other mechanisms affect glucocorticoids and their receptors. But according to current knowledge, we have to assume that there is no direct correlation between GR expression and the effect of glucocorticoids due to complex interactions [118].

The DNA-accessibility for the transcription process is influenced by post-translational modifications of histones. This affects oncogenes as well as tumor suppressor genes [43]. Both examined histone modifications (H3K9ac und H3K4me3) are associated with the transcription, which was shown in cells with integrated HPV-genome: H3K9ac and H3K4me3 were increased in the promotor region of E6 and E7 [48]. By interaction with histone (de)-acetylases and demethylases the viral proteins supported the malign cell transformation. The examined modifications lead to higher potential of metastasis [77, 78, 100], which is in accordance with the results of our study. We could show that H3K9ac and H3K4me3 were negative prognostic factors regarding survival.

Several clinical studies are currently examining the pharmacological influence of histone modifications as new therapeutic target in cervical carcinoma, as well as modulations of the glucocorticoid receptor in solid tumors. Further examinations regarding epigenetic modulations and the glucocorticoid receptor [70, 125-127] and their effect on tumorigenesis are necessary to develop new screening methods and new therapeutic strategies.

D Publikationen

1. Publikation - International Journal of Molecular Sciences: Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer

Eingereicht: 13. Dezember 2016

Akzeptiert: 15. Februar 2017

Veröffentlicht: 23. Februar 2017



Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer

Susanne Beyer ¹, Junyan Zhu ¹, Doris Mayr ², Christina Kuhn ¹, Sandra Schulze ¹, Simone Hofmann ¹, Christian Dannecker ¹, Udo Jeschke ^{1,*} and Bernd P. Kost ¹

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, 80337 Munich, Germany; sannebeyer@yahoo.de (S.B.); Junyan.Zhu@med.uni-muenchen.de (J.Z.); christina.kuhn@med.uni-muenchen.de (C.K.); Sandra.schulze@med.uni-muenchen.de (S.S.); simone.hofmann@med.uni-muenchen.de (S.H.); Christian.dannecker@med.uni-muenchen.de (C.D.); bernd.kost@med.uni-muenchen.de (B.P.K.)

² Department of Pathology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, 80337 Munich, Germany; doris.mayr@med.uni-muenchen.de

* Correspondence: udo.jeschke@med.uni-muenchen.de; Tel.: +49-89-4400-54240

Academic Editor: Nicoletta Sacchi

Received: 13 December 2016; Accepted: 15 February 2017; Published: 23 February 2017

Abstract: Chromatin remodeling alters gene expression in carcinoma tissue. Although cervical cancer is the fourth most common cancer in women worldwide, a systematic study about the prognostic value of specific changes in the chromatin structure, such as histone acetylation or histone methylation, is missing. In this study, the expression of histone H3 acetyl K9, which is known to denote active regions at enhancers and promoters, and histone H3 tri methyl K4, which preferentially identifies active gene promoters, were examined as both show high metastatic potential. A panel of patients with cervical cancer was selected and the importance of the histone modifications concerning survival-time (overall survival and relapse-free survival) was analyzed in 250 cases. Histone H3 acetyl K9 staining was correlated with low grading, low FIGO (TNM classification and the International Federation of Gynecology and Obstetrics) status, negative N-status and low T-status in cervical cancer, showing a higher expression in adenocarcinoma than in squamous cell carcinoma. Cytoplasmic expression of histone H3 tri methyl K4 in a cervical cancer specimen was correlated with advanced T-status and poor prognosis. While cytoplasmic H3K4me3 expression seemed to be a marker of relapse-free survival, nuclear expression showed a correlation to poor prognosis in overall survival. Within this study, we analyzed the chemical modification of two histone proteins that are connected to active gene expression. Histone H3 acetyl K9 was found to be an independent marker of overall survival. Histone H3 tri methyl K4 was correlated with poor prognosis and it was found to be an independent marker of relapse-free survival. Therefore, we could show that chromatin remodeling plays an important role in cervical cancer biology.

Keywords: cervical cancer; histone H3 acetyl K9; histone H3 tri methyl K4; epigenetics; chromatin modification; histone proteins; prognosis

1. Introduction

Cervical cancer is the fourth most frequent cancer in women worldwide (about 530,000 new cases in 2012, 7.5% of all female cancer deaths). The leading cause of cervical cancer is a persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) [1]. Specifically, the HPV subtypes 16 and 18 cause about 70% of all cancer cases [1,2]. A total of 170 HPV-types have been described currently [3]. The infection with 15 types of HPV most likely leads to cancer, which is why these 15 types are called

carcinogenic or high-risk types [4]. The genome of human papillomaviruses consists of approximately 8000 base pairs and contains six “early genes” (E6, E7, E1, E2, E4, E5) and two “late genes” (L1, L2) [5]. In case of replication of the viral gene E6, the E6 oncoprotein is expressed, which disturbs the cell cycle [6]. E6 oncoprotein and E6-associated protein (E6-AP) form a complex which binds to p53 and causes its proteolytic degradation [7].

During the different stages of cervical cancer development, there is an accumulation of epigenetic alterations that leads to changes in gene expression [8]. Altered mechanisms of epigenetic regulation in cervical cancer include DNA methylation and post-translational modifications of histone proteins [8]. It has been reported that histone modifying enzymes such as histone deacetylase (HDAC)-1 and HDAC2 are over-expressed in cervical dysplasia and invasive carcinoma [9]. These results suggest that the dysregulation of enzymes that modify histones in cervical cancer are of importance for the biology of this tumor entity.

HR-HPVs establish persistent infection by maintaining their genomes as extrachromosomal elements—the so-called episome—that replicate, together with host DNA, in infected cells [10]. By associating with the host chromatin, HR-HPV redirects the normal cellular control of chromatin to create a cellular environment that is beneficial for both the HR-HPV multiplication and malignant progression of the infected cell. Therefore, the investigation of HPV–host chromatin interaction will offer new insights into the importance of HPV-driven chromatin regulation in cervical cancer tissue [10].

The state of histone modifications that are connected to the early and late HPV viral promoters—modification by acetylation and methylation—were examined in a previous study in cell culture systems using chromatin immunoprecipitation assays: in undifferentiated cells, di-methylated forms of histone H3K4 as well as acetylated histone H3 and H4 were found [11]. Together with differentiation, the levels of di-methylated H3K4 and acetylated H3 are increased, while the acetylated H4 is also increased, which suggests that nucleosomes are activated through histone modifications to coordinate the HPV transcription during cell differentiation [11].

The already-mentioned studies and several other studies showed that histone protein modifications play a fundamental role in HPV driven oncogenesis. Because a systematic investigation of posttranslational changes in histone proteins, for their prognostic relevance in cervical cancer tissue, was lacking, the aim of this study was an expression analyses of histone H3 acetyl K9 (H3K9ac) and histone H3 tri methyl K4 (H3K4me3) in cervical cancer, examined in 250 cases by immunohistochemical methods and assessed by a semi-quantitative score.

2. Results

2.1. H3K9ac Staining in Cervical Carcinoma

To control the quality of our H3K9ac staining, we used normal (non-pathological) colon tissue, which showed strong nuclear expression in >80% of epithelial cells without a cytoplasmic expression (Figure 1A).

A total of 92.8% of all cervical cancer specimens showed only a nuclear expression of H3K9ac with a median Immune Reactive Score (IRS) of 4 (36%), while 7.2% of all samples did not express H3K9ac at all. Compared to 50.8% with low expression (IRS = 1–5), an enhanced staining (IRS \geq 6) was detected in 42.0% of samples.

In the following analyses, we examined the correlation between H3K9ac and several clinic pathological parameters such as histological subtype, grading, T-status, N-status and FIGO-classification by noticing the distribution of these parameters in our study group (Table 1).

Table 1. Clinic pathological variables of the patients included in this study.

Item	No./Total No.	%
Age, years		
<49	139/250	55.6
>49	111/250	44.4
Number of Positive Nodes		
0	151/250	60.4
≥1	97/250	38.8
Not available (NA's)	2/250	0.8
Tumor Size, pT		
pT1	110/250	44
pT2/3/4	137/250	54.8
Not available (NA's)	3/250	1.2
FIGO		
I	64/250	25.6
II/III/IV	92/250	36.8
Not available (NA's)	94/250	37.6
Tumor Grade		
I	21/250	8.4
II	143/250	57.2
III	78/250	31.2
Not available (NA's)	8/250	3.2
Tumor Subtype Squamous		
	202/250	80.8
Adenocarcinoma	48/250	19.2
Progression (over 235 months) None		
	210/250	84
At least one	21/250	11.6
Not available (NA's)	11/250	4.4
Survival (over 235 months) Right		
censored	190/250	76
Died	49/250	19.6
Not available (NA's)	11/250	4.4

Examining the histological subtype, squamous epithelial carcinomas (Figure 1B) with a median IRS of 4 showed a lower H3K9ac expression than adenocarcinoma tissue (Figure 1C) with a median IRS of 8, differing significantly from each other ($p = 0.013$; Figure 1D; Table 2).

Regarding the grading, low graded (G1) specimens did not show the general median IRS of 4 in the H3K9ac staining. They presented a median IRS of 8 in 31% of samples (Figure 1E), while the median IRS of 4 in intermediate graded (G2) and high graded (G3, Figure 1F) samples was represented by 35.0% and 41.0%, respectively. Thus, enhanced staining was highly significantly correlated with low grading ($p = 0.004$; $Rho = -0.209$ with $p = 0.001$; Figure 1G and Table 2).

Analysing the N-Status (involved lymph nodes), 86.1% of all patients without lymph-node metastasis (N-; Figure 1H) had an IRS of ≥ 4 compared to 66.0% of all patients with lymph-node positive status (N+; Figure 1I), while both presented the same median IRS of 4 (Figure 1K). An enhanced expression of H3K9ac was accompanied by lymph node-negative status, while low expression was accompanied by lymph node-positive status ($p = 0.001$; $Rho = -0.236$ with $p < 0.001$; Table 2).

All tumor sizes (T-stages) showed an equal IRS of 4 (Figure 1L), being represented in 34/110 cases (31.0%) in T1-stage patients, and 56/137 cases (40.9%) in T2/3/4-stage patients. Data showed a significant difference ($p = 0.035$) with an inversed correlation meaning that enhanced H3K9ac staining correlated with low T-Status ($Rho = -0.149$ with $p = 0.019$; Table 2). Although the correlation was highly significant, it was not detectable in the boxplot.

Regarding the FIGO status, patients with FIGO I had a median IRS of 8 in 17 patients in this subgroup (17/64; 26.6%), compared to patients with a FIGO status of II or more with a median IRS of 4 (32/92; 34.8%). We could show a significant correlation between FIGO status and H3acet expression ($p = 0.016$) with a negative spearman's-rank correlation ($Rho = -0.192$; $p = 0.016$), meaning that strong H3K9ac staining correlated with low FIGO status (Figure 1M).

In summary, we detected associations of H3K9ac regarding histological subtype ($p = 0.013$), grading ($p = 0.004$), N-status ($p = 0.001$), T-status ($p = 0.035$) and FIGO status ($p = 0.016$) by using non-parametric tests (Table 2). In particular, the negative correlation between H3acet staining on the one hand and FIGO, T- and N-status on the other hand seem to go well together, as FIGO status is defined by T and N-status.

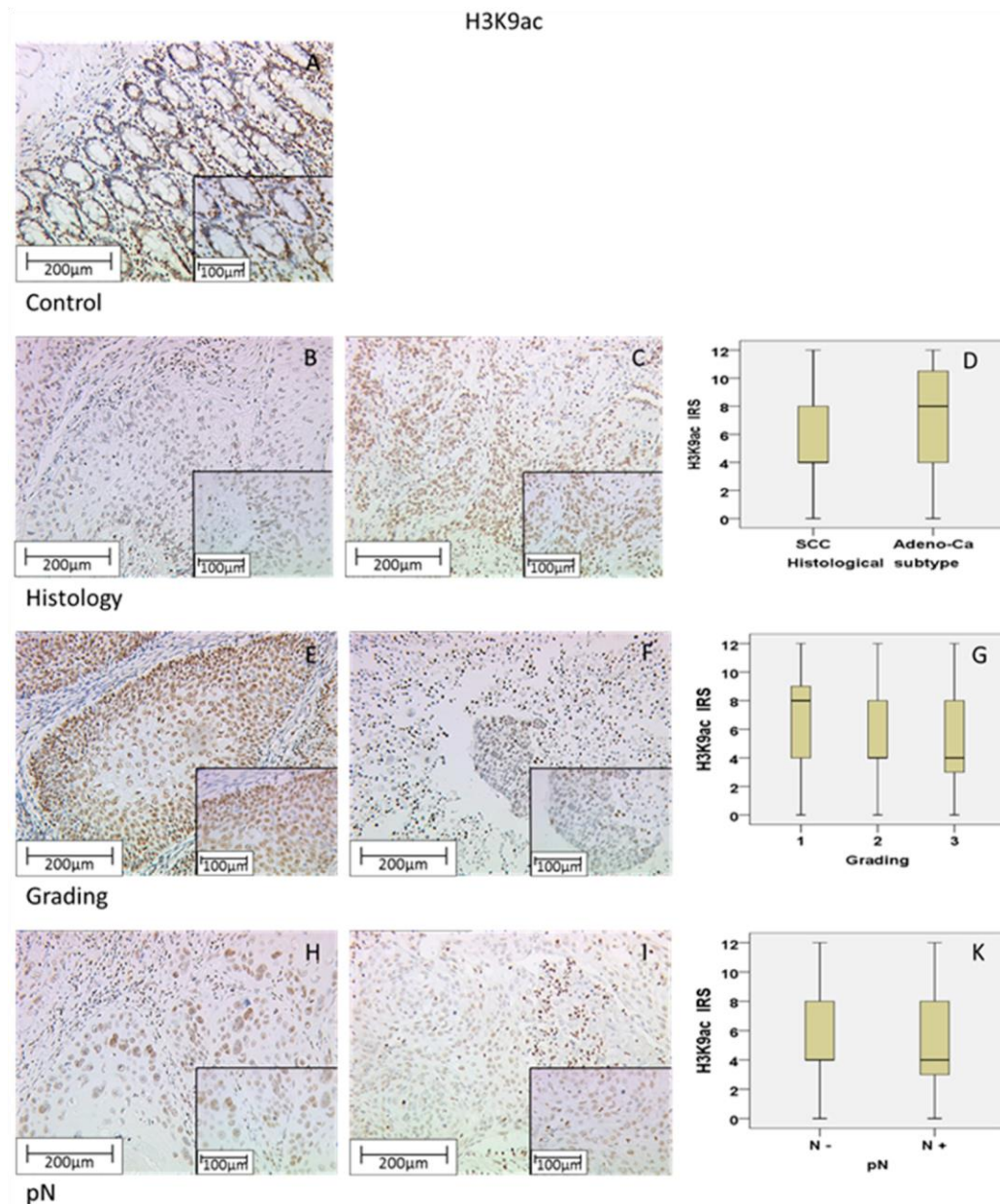


Figure 1. Cont.

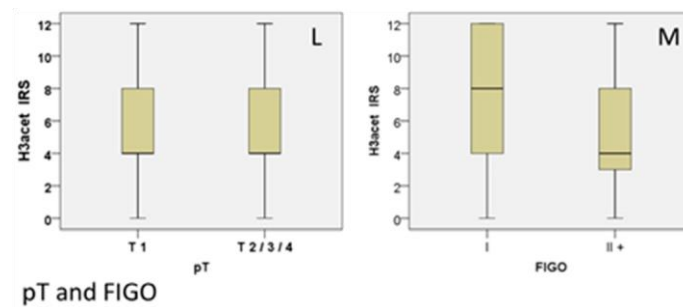


Figure 1. Positive control of H3K9ac staining in colon tissue with strong nuclear cytoplasmic expression and without cytoplasmic expression in epithelial cells (A). Squamous epithelial tissue (B) showed a median expression of H3K9ac, while adenocarcinoma tissue (C) showed significantly more intense H3K9ac staining; the summary regarding histological subtype is shown as a box plot (D). Grading: G1-stage tumors showed enhanced H3K9ac expression (E), G3-stage tumors (F) showed weak staining; the summary regarding grading is shown as a box plot (G). N-status: Negative N-status with high H3K9ac expression (H), positive N-status with low H3K9ac expression (I); the summary regarding N-status is shown as a box plot (K). T-status: The median Immune Reactive Score (IRS) is 4 for every T-status (L), although there is a strong correlation. TNM classification and the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO): Boxplot shows a different median IRS for FIGO-states (M). Scale bar 200 μ m, small pictures 100 μ m.

2.2. H3K4me3 Staining in Cervical Cancer

To evaluate the H3K4me3 staining, we used placenta tissue where a very strong expression in trophoblastic cells, in the nucleus as well as in the cytoplasm, was found (Figure 2A).

Of all the cervical cancer specimens, a total of 96.8% showed H3K4me3 expression, while 3.2% did not show any expression at all. H3K4me3 was found in the cytoplasm as well as in the nucleus, correlating significantly with each other ($Rho = 0.290$ with $p < 0.001$). All positive tested samples presented a nuclear expression with a median IRS of 8 (31%) compared to a median IRS of 0 (56.4%) in samples with cytoplasmic expression (Figure 2B). All in all, nuclear expression of H3K4me3 was detectable in 96.8% (negative: 3.2%) of patients, while cytoplasmic expression was only positive in 43.6% of all patients (negative: 56.4%). Nuclear H3K4me3 expression was enhanced (IRS = 4–12) in 88.4% of all cases compared to a low expression (IRS = 0–3) in 11.6%. Regarding cytoplasmic expression, 36.8% slides showed a high expression (IRS = 4–12) and 63.2% slides presented a weak expression (IRS = 0–3).

Examining the T-stage, T1-stage carcinoma tissues showed the general median of 0 in 30.4% of all cases in the cytoplasmic H3K4me3 staining (Figure 2C). In contrast, T2/3/4-stage samples showed an enhanced median IRS of 2 (Figure 2D) in 3.6% of all cases. Performing nonparametric-tests and Spearman's rank correlation, enhanced cytoplasmic expression of H3K4me3 was correlated with advanced T-Status ($p = 0.002$; $Rho = 0.191$ with $p = 0.003$; Table 2). This means that an advanced cytoplasmic H3K4me3 expression correlated with higher T-status (Figure 2E).

In summary, we found associations of cytoplasmic H3K4me3 expression regarding T-status ($p = 0.002$) by using non-parametric tests (Table 2). No significant difference was found for cytoplasmic expression among N-Status, FIGO or grading and there were no correlations detected between nuclear H3K4me3 expression and the described pathological parameters.

Table 2. Staining results and correlation analysis.

	H3K9ac				H3K4me3 (Cytoplasmic)				H3K4me3 (Nuclear)			
	Median IRS (+/-SD)	%	p (NPAR)	ρ	Median IRS (+/-SD)	%	p (NPAR)	ρ	Median IRS (+/-SD)	%	p (NPAR)	ρ
Histology												
SCC	4 (+/-3.45)	40.10%			0 (+/-2.67)	57.40%			8 (+/-3.56)	32.20%		
Adeno-Ca	8 (+/-3.78)	31.30%	0.013	-	0 (+/-3.35)	52.10%	0.296	-	8 (+/-3.58)	27.10%	0.603	-
Grade												
G1	8 (+/-3.51)	31.00%			0 (+/-2.94)	57.10%			8 (+/-3.66)	28.60%		
G2	4 (+/-3.57)	35.00%	0.004	-0.209 (p = 0.001)	0 (+/-3.08)	52.40%	0.197	0.082 (p > 0.05)	8 (+/-3.59)	31.50%	0.917	-0.017 (p > 0.05)
G3	4 (+/-3.26)	41.00%			0 (+/-2.24)	62.80%			8 (+/-3.55)	33.30%		
pN												
N-	4 (+/-3.55)	86.10%			0 (+/-3.02)	57.00%			8 (+/-3.50)	32.50%		
N+	4 (+/-3.33)	66.00%	0.001	-0.236 (p = 0.000)	0 (+/-2.43)	55.70%	0.981	-0.001 (p > 0.05)	8 (+/-3.69)	28.90%	0.695	0.025 (p > 0.05)
pT												
T1	4 (+/-3.52)	30.90%			0 (+/-2.34)	69.10%			8 (+/-3.49)	30.00%		
T2/3/4	4 (+/-3.49)	40.90%	0.035	-0.149 (p = 0.019)	2 (+/-2.93)	3.60%	0.002	0.191 (p = 0.003)	8 (+/-3.60)	32.10%	0.171	0.081 (p > 0.05)
FIGO												
I	8 (+/-3.91)	26.60%			0 (+/-2.45)	64.10%			8 (+/-3.37)	32.80%		
II+	4 (+/-3.44)	23.90%	0.016	-0.192 (p = 0.016)	2 (+/-2.66)	5.40%	0.324	0.070 (p = 0.384)	8 (+/-3.67)	30.40%	0.862	-0.005 (p = 0.948)
p16	-	-	-	0.047 (p > 0.05)	-	-	-	0.009 (p > 0.05)	-	-	-	0.144 (p = 0.027)

SD = standard deviation; % = percentage of the subgroup with median IRS; NPAR = non-parametric test; p = p-value; ρ = correlation coefficient; SCC = squamous cell carcinoma, pT = tumor size, FIGO = TNM classification and the International Federation of Gynecology and Obstetrics.

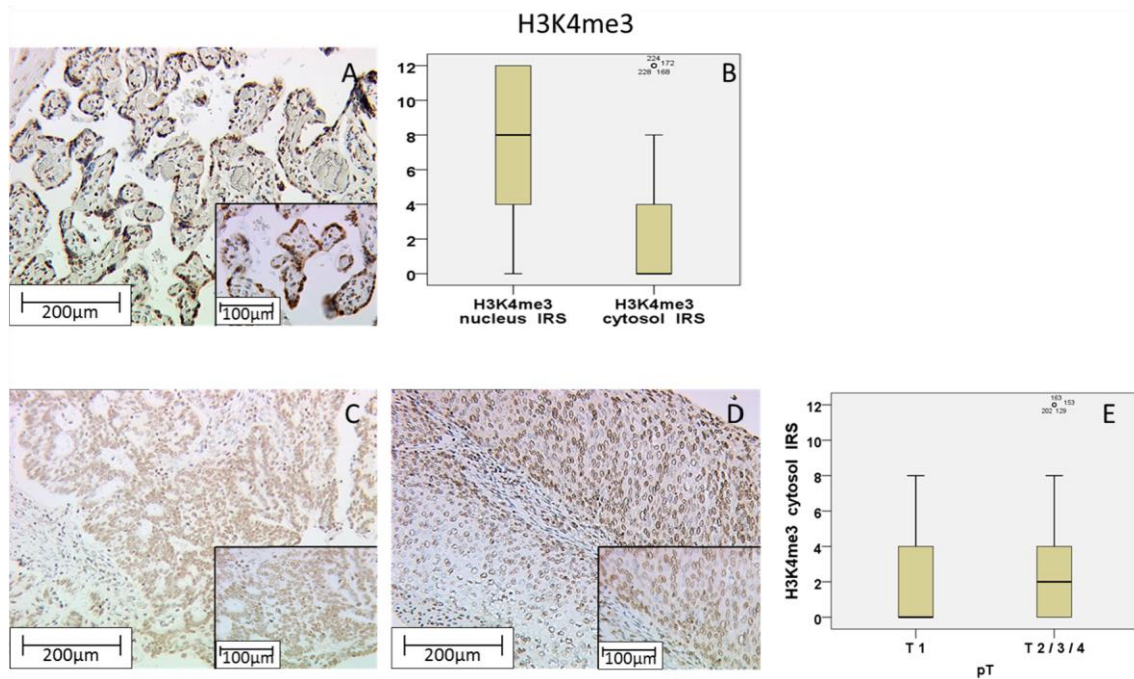


Figure 2. Positive control of H3K4me3 staining in placenta tissue with strong nuclear cytoplasmic expression and weak cytoplasmic expression in trophoblastic cells (A); H3K4me3 showed a higher expression in the nucleus than in the cytoplasm (B); T1-stage tumors (C) with significantly lower expression than T2/3/4-stage tumors (D); The summary regarding T-status is shown as a box plot (E). Scale bar 200 μm , small pictures 100 μm .

2.3. Correlation Analysis between H3K4me3 and p16 Oncoprotein

It is well known that the expression of p16 oncoprotein in cancer is not only associated with DNA methylation but also with histone modification [12]. By using recently published data by our institute [13,14], we looked for a similar association in cervical cancer. Analyses showed that a nuclear H3K4me3 expression was positively correlated with p16 expression ($\text{Rho} = 0.144$; $p = 0.027$; Table 2). No correlation was found regarding the cytoplasmic expression of H3K4me3 ($\text{Rho} = 0.009$; $p > 0.05$) or nuclear H3K9ac expression ($\text{Rho} = 0.047$; $p > 0.05$).

2.4. Role of H3K9ac and H3K4me3 for Overall Survival

Enhanced H3K9ac expression ($\text{IRS} \geq 6$) was—as well as H3K4me3 expression ($\text{IRS} \geq 4$)—associated with survival-time after diagnosis.

As shown in the Kaplan–Meier curve (Figure 3A), high expression of H3K9ac ($\text{IRS} \geq 6$) in cervical cancer patients was correlated with poor prognosis in overall survival rates ($p = 0.027$). This was in contrast to the correlation between H3K9ac staining and the described clinic pathological parameters (T-status, N-status, Grading and FIGO), where high H3K9ac expression was correlated with the low stage of these parameters.

In addition to H3K9ac, we examined the role of H3K4me3 for survival, where we found a similar correlation: advanced nuclear H3K4me3 expression was also correlated with poor prognosis concerning overall survival (Figure 3B, $p = 0.066$). For cytoplasmic H3K4me3 expression, there was no significance concerning overall survival.

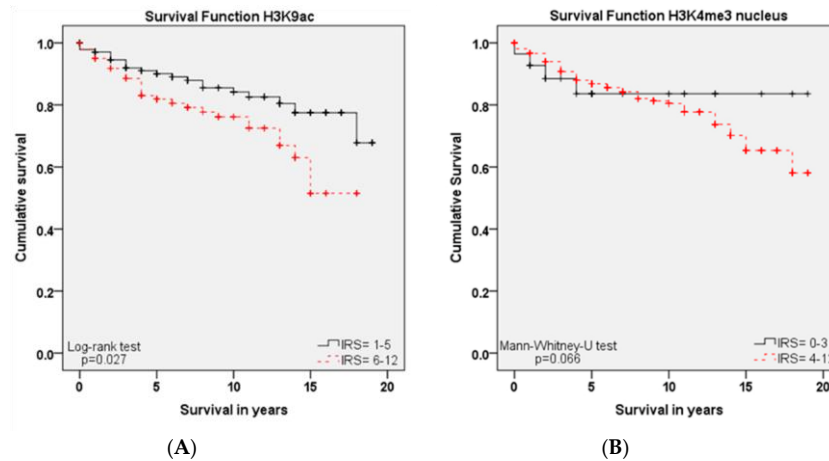


Figure 3. Kaplan–Meier analyses for overall survival: H3K9ac ($p = 0.027$; **A**) with high expression (IRS ≥ 6 ; red) compared to low expression (IRS ≤ 5 ; black); High nuclear H3K4me3 expression (IRS ≥ 4 ; red) compared to low expression (IRS ≤ 3 ; black) regarding overall survival ($p = 0.066$; **B**).

2.5. Role of H3K9ac and H3K4me3 for Progress-Free Survival

Although H3K9ac and nuclear H3K4me3 expressions showed significant differences regarding overall survival, their expressions showed no significant correlation for relapse-free survival ($p = 0.763$ and $p = 0.08$).

In contrast, cytoplasmic H3K4me3 expression, which was not a marker of overall survival, was significantly correlated with progress-free survival: high cytoplasmic expression of H3K4me3 (IRS ≥ 4) meant short relapse-free survival (Figure 4, $p = 0.025$), matching the correlation between high expression and advanced T-Status.

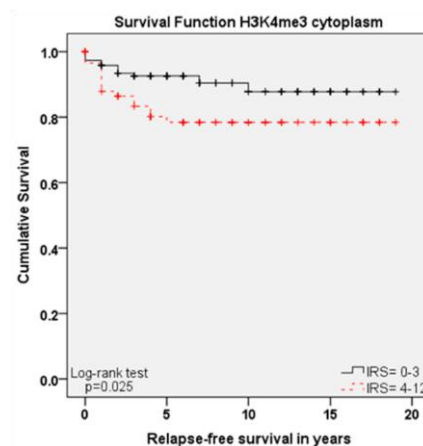


Figure 4. Kaplan–Meier analyses for relapse-free survival: high cytoplasmic H3K4me3 expression (IRS ≥ 4 ; red) compared to low expression (IRS ≤ 3 ; black) regarding relapse-free survival ($p = 0.025$).

2.6. Cox Regression of H3K9ac and H3K4me3 and Clinic Pathological Variables

The additionally performed multivariate cox-regression tested which histopathological parameters were independent prognosticators for survival in our study-group.

For overall survival, the histological subtype ($p = 0.040$), pN-status ($p = 0.003$), FIGO classification ($p = 0.012$), age at surgery ($p < 0.001$) and the expression of H3K9ac ($p = 0.027$) were independent prognosticators, but not the H3MK4me3 expression or other tested clinic pathological parameters (Table 3).

Regarding relapse-free survival, only FIGO status ($p = 0.044$) and cytoplasmic H3K4me3 expression ($p = 0.030$) turned out to be independent markers in multivariate cox-analysis (Table 4), but not H3K9ac expression, nuclear H3K4me3 expression or other described parameters.

Table 3. Cox regression of clinic pathological variables regarding overall survival.

Variable	Significance	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Histology	0.040	1.893	1.030	3.479
pT	0.751	0.910	0.509	1.626
pN	0.003	2.447	1.367	4.380
FIGO	0.012	3.181	1.287	7.863
Grading	0.198	1.360	0.852	2.170
Age at surgery	0.000	1.049	1.026	1.072
H3K9ac	0.027	1.900	1.076	3.356
H3K4me3 nucleus	0.708	1.216	0.436	3.389
H3K4me3 cytoplasm	0.159	1.503	0.853	2.651

Table 4. Cox regression of clinic pathological variables regarding progress-free survival.

Variable	Significance	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Histology	0.753	1.156	0.469	2.851
pT	0.760	0.890	0.423	1.875
pN	0.843	1.082	0.495	2.368
FIGO	0.044	3.085	1.031	9.235
Grading	0.521	1.228	0.656	2.299
Age at surgery	0.157	1.021	0.992	1.052
H3K9ac	0.763	0.890	0.417	1.900
H3K4me3 nucleus	0.476	0.681	0.236	1.963
H3K4me3 cytoplasm	0.030	2.278	1.084	4.790

3. Discussion

Within this study, we showed that the immunohistochemical evaluation of histone H3K9ac staining was correlated with low grading, low FIGO-classification, low T-status and negative N-status in cervical cancer. We could also find a higher expression of histone H3K9ac in adenocarcinoma compared to squamous cell carcinoma. Due to its correlation between expression and poor prognosis (overall survival), it could be used as an independent marker of prognosis. Cytoplasmic expression of histone H3K4me3 in a cervical cancer specimen was correlated with advanced T-status and poor prognosis. It seems to be a marker of relapse-free survival, while nuclear expression showed a correlation to poor prognosis without being an independent marker regarding cervical cancer.

Histone proteins give the genome the ability to pack very large amounts of DNA in a very small space, but at the same time they leave their N-terminal tails flexible [15]. The N-terminal tail of the histone proteins can undergo post-translational modification by enzymes, adding chemical modifications such as acetylation, methylation, phosphorylation and deamination that alter the structure of the DNA package and allow or prevent gene transcription [16]. It is already known that histone modifications at histone 3 lysine 9 acetylation (H3K9ac) denote active regions at enhancers as well as promoters, whereas the tri-methyl form, H3K4me3, preferentially identifies the gene promoters that are active [17,18]. In addition, it has been shown that epigenetic modulations of the genome involve histone modifications that alter the gene chromatin configuration. A decondensed ("open") configuration allows transcription factors access to binding sites, whereas a condensed ("closed") configuration blocks transcription binding sites, thereby regulating gene transcription [19,20]. Based on these findings, it has been shown that high metastatic potential had greater acetylation of histone H3 lysine 9 (H3K9ac) and tri-methylation of histone H3 lysine 4 (H3K4me3) [19]. Therefore, these two modifications that are correlated to enhanced gene activity and in addition show high metastatic potential were used in the present study as markers for the identification of the prognostic relevance of those histone modifications for cervical cancer survival.

It is already known that E6 oncoprotein and E6-associated protein (E6-AP) form a complex which binds to p53 and causes its proteolytic degradation [7]. P53 is a tumor suppressor, as it leads to cell cycle arrest or apoptosis in the case of DNA damage [21]. As E6 oncoprotein induces the degradation of p53, the function of this important cell cycle protein is disturbed [12] after HPV infection. The cell cycle regulation protein p16 is expressed at high levels in HPV-infected epithelial cells, which is why it acts as a marker for the diagnosis of a HPV associated carcinoma [22,23]. On the other hand, studies have shown that p16 expression is induced by an oncogene senescence-related mechanism that involves histone H3K27 demethylation by histone lysine demethylase, and that p16 expression is necessary for the survival of HPV-infected cells expressing E7 viral oncoprotein [24,25].

Unfortunately, p16 is not exclusively increased by E7 oncoprotein in carcinogenesis. Therefore, in a recent study, we established and published an immunohistochemical approach for the direct detection of E6 oncoprotein in uterine cervical cancer [14]. In addition, we found a very high mutation rate of TP53 in this cancer type where p53 is initially inactivated via E6 during the development of cervical cancer. An unexpected finding is the correlation of this mutation with better survival, possibly due to better response to therapy [13].

Because both H3K9ac and H3K4me3 are negative prognosticators for cervical cancer patients, the use of epigenetic drugs or the search for epigenetic targets could be a useful goal for cervical cancer treatment.

Recently, two main classes of epigenetic drugs—methylation inhibitors and HDAC inhibitors—are in clinical trials for the treatment of cervical cancer [26]. One of these potential new drugs could be valproic acid (VPA). VPA was found to be an effective inhibitor of histone deacetylases and has been shown to induce anti-tumor effects by modulating cellular pathways, including cell cycle arrest, apoptosis, angiogenesis, metastasis, differentiation, and senescence [27]. The antitumor effect of VPA in cervical cancer can be explained by either the hyper-acetylation of p53 protein, protecting it from degradation by E6 and increasing p53 activity; or via the inhibition of Akt1 and Akt2 expression, which results in apoptotic cell death [28,29]. Acetylation of p53 is a process that occurs in response to DNA damage and stress and is necessary for p53 transcriptional activity. Therefore, p53 was one of the first non-histone proteins that could be acetylated by histone acetyl transferases [30].

In addition, HDAC inhibitors also interfere with cervical cancer via non-histone targets. The HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis in HeLa cervical cancer cells in vitro with bortezomib by activating caspase-3 and increasing the ratio of bax/bcl-2 expression [31]. Epigenetic aberrations, such as histone protein modification have the ability to regulate the expression of oncogenes or repression of tumor suppressor genes. Therefore, these modified histone proteins are powerful candidates for the investigation of cancer pathogenesis and progression. For cervical cancer, for instance, Feng et al. [26] highlighted a number of genes that underwent epigenetic alteration at the level of DNA methylation, histone modification, or noncoding RNA action in this type of cancer.

Further investigation of these alterations and information about them could lead to new and reliable screening methods for women at high risk of cervical cancer and can help to establish new candidates for a better treatment of this disease.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Specimens

We used 250 paraffin-embedded cervical cancer samples obtained from patients having undergone surgery for cervical cancer in the Department of Obstetrics and Gynecology of the Ludwig-Maximilians-University of Munich between 1993 and 2002. The median age of the patients was 47.0 years (range 20–83 years), and overall median survival was 100.0 months. For distribution of clinic pathological variables see Table 1. Only patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma (SCC) of the cervix were included in our study, other histological subtypes were excluded

due to low number. As positive controls for immunohistochemically staining, we utilized colon tissue for histone H3 acetyl K9 and placenta tissue for histone H3 tri methyl K4; both received from the Department of Obstetrics and Gynecology of the Ludwig-Maximilians-University of Munich. Clinical and follow-up data for statistical analyses were provided by the Munich cancer registry and retrieved from medical records.

4.2. Ethics Approval

All cervical cancer specimens had originally been collected for histopathological diagnostics and were no longer used for clinical tests, when they were recruited for this survey. Patient data were totally anonymized and the authors were blinded for clinical information—including survival-time during experimental analyses. The study was conducted conforming to the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee of the Ludwig-Maximilians University of Munich (reference number 259-16, 2016).

4.3. Immunohistochemistry

The paraffin-embedded and formalin-fixed samples (3 µm) had been stored at room temperature and were first dewaxed in xylol. After rinsing the tissue in 100% ethanol and blocking the endogenous peroxidase with 3% methanol/H₂O₂, the samples were rehydrated in a descending alcohol series. To avoid heat-associated protein-agglomeration and to unmask the antigen, the slides were warmed up to 100 °C in a pressure cooker for 5 min, adding a trisodium citrate buffer solution with pH = 6. After having prepared the slides by washing them in distilled water and PBS-buffer, we added the suitable blocking solution to avoid unspecific (hydrophobic) bindings between immunoglobulins on the one side and cell membranes or fatty tissue on the other side by saturation of electrostatic charges. Afterwards, the samples were incubated at a temperature of +4 °C with the primary antibodies (Table 5).

After increasing the staining by the post-block-reagent and applying the HRP-polymer, the substrate-staining with DAB was performed and the counterstaining by haemalm (2 min) was carried out subsequently. More details concerning the suitable detection system and the following steps were defined exactly in Table 5. Finally, the samples were dehydrogenated in a rising alcohol series and covered. Colon tissue and placenta tissue were used for each staining as positive and negative controls for H3K9ac and H3K4me3.

The intensity of the expression was evaluated by the immunoreactive score (IRS). Well-established and applied in numerous other studies, this semi-quantitative score multiplies the intensity of the staining (0 = not stained; 1 = low intensity; 2 = moderate intensity; 3 = high intensity) and the percentage of stained cells (0 = 0%; 1 = 1%–10%; 2 = 11%–50%; 3 = 51%–80%; 4 ≥ 80%). Finally, we distinguished between 0 = no expression and 12 = very high expression of histones.

Table 5. Antibodies and chemicals used for the immunohistochemistry.

Histone H3 Acetyl K9 ¹	Histone H3 Tri Methyl K4 ²
Blocking solution ³ : 5 min	Blocking solution ³ : 5 min
primary antibody ¹ : 1:200 in PBS ⁵ , incubation: 16 h, 4 °C	primary antibody ² : 1:500 in PBS ⁵ , incubation: 16 h, 4 °C
PostBlock ³ : 20 min	PostBlock ³ : 20 min
HRP Polymer ³ : 30 min	HRP Polymer ³ : 30 min
chromogen: DAB ⁴ (0.5 min)	Chromogen: DAB ⁴ (1 min)

¹ Anti Histone H3 acetyl K9, clone Y28 (rabbit IgG), concentration: 0.059 mg/mL, company: Abcam (Cambridge, UK), order number: ab32129; ² Anti Histone H3 tri methyl K4, rabbit IgG polyclonal, concentration: 1 mg/mL, company: Abcam, order number: ab8580; ³ Zytocem Plus HRP Polymer Kit (Mouse/Rabbit) 3 × 100; company: Zytomed Systems (Berlin, Germany) Nr. POLHRP-100; ⁴ Liquid DAB + Substrate Chromogen System 1 mg/mL, DAKO; ⁵ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline.

4.4. Statistics

For statistical analyses, IBM SPSS Statistics version 23 (Armonk, NY, USA) was used. Bivariate correlations were calculated by Spearman's-rank-correlation coefficient and non-parametric tests (NPAR: Mann–Whitney U test, Kruskal–Wallis test) were employed to compare independent groups. To visualize differences concerning survival rates, Kaplan–Meier curves were created and afterwards compared by a log-rank test and—if necessary—Mann–Whitney-U test. Survival times are shown in years, but for more exact results they were calculated in months. To show statistical difference, p had to be <0.05 .

5. Conclusions

The expression of histone H3 acetyl K9 and histone H3 tri methyl K4 was examined in 250 cases of cervical cancer. Both histone protein modifications turned out to be independent negative prognosticators for the overall survival or the relapse-free survival of cervical cancer patients. For cervical cancer, it is the first study that showed a direct link between histone protein modification and survival in a large cohort of patients.

Acknowledgments: The study was supported by the “Heuer Stiftung” for Bernd P. Kost.

Author Contributions: Susanne Beyer, Bernd P. Kost and Christian Dannecker conceived and designed the experiments; Susanne Beyer, Christina Kuhn, Sandra Schulze and Simone Hofmann performed the experiments; Susanne Beyer, Junyan Zhu and Doris Mayr analyzed the data; Doris Mayr contributed analysis tools as gynecological pathologist; Susanne Beyer and Udo Jeschke wrote the paper. Bernd P. Kost finally approved the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

H3K9ac	histone H3 acetyl K9
H3K4me3	histone H3 tri methyl K4
SCC	squamous cell carcinoma

References

1. Chatterjee, S.; Chattopadhyay, A.; Samanta, L.; Panigrahi, P. HPV and cervical cancer epidemiology—Current status of HPV vaccination in India. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2016**, *17*, 3663–3673. [[PubMed](#)]
2. Schiffman, M.; Castle, P.E.; Jeronimo, J.; Rodriguez, A.C.; Wacholder, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* **2007**, *370*, 890–907. [[CrossRef](#)]
3. Wittekindt, C.; Wagner, S.; Mayer, C.S.; Klusmann, J.P. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *Laryngorhinootologie* **2012**, *91* (Suppl. 1), S1–S26. [[PubMed](#)]
4. Liu, X.M.; Pan, C.W.; Wang, G.D.; Cai, X.H.; Chen, L.; Meng, C.F.; Huang, J.C. Finite element analysis of the stability of combined plate internal fixation in posterior wall fractures of acetabulum. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 13393–13397. [[PubMed](#)]
5. Liu, J.; Cheng, Y.; He, M.; Yao, S. Vascular endothelial growth factor C enhances cervical cancer cell invasiveness via upregulation of galectin-3 protein. *Gynecol. Endocrinol.* **2014**, *30*, 461–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gupta, S.; Takhar, P.P.; Degenkolbe, R.; Koh, C.H.; Zimmermann, H.; Yang, C.M.; Guan Sim, K.; Hsu, S.I.; Bernard, H.U. The human papillomavirus type 11 and 16 E6 proteins modulate the cell-cycle regulator and transcription cofactor TRIP-Br1. *Virology* **2003**, *317*, 155–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Meng, C.F.; Su, B.; Li, W. DNA demethylation is superior to histone acetylation for reactivating cancer associated genes in ovarian cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **2011**, *4*, 1273–1278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Sandoval-Basilio, J.; Serafin-Higuera, N.; Reyes-Hernandez, O.D.; Serafin-Higuera, I.; Leija-Montoya, G.; Blanco-Morales, M.; Sierra-Martinez, M.; Ramos-Mondragon, R.; Garcia, S.; Lopez-Hernandez, L.B.; et al. Low proteolytic clipping of histone H3 in cervical cancer. *J. Cancer* **2016**, *7*, 1856–1860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Huang, B.H.; Laban, M.; Leung, C.H.; Lee, L.; Lee, C.K.; Salto-Tellez, M.; Raju, G.C.; Hooi, S.C. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 395–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. You, J. Papillomavirus interaction with cellular chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1799*, 192–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Wooldridge, T.R.; Laimins, L.A. Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. *Virology* **2008**, *374*, 371–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Meng, C.F.; Zhu, X.J.; Peng, G.; Dai, D.Q. Promoter histone H3 lysine 9 di-methylation is associated with DNA methylation and aberrant expression of p16 in gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* **2009**, *22*, 1221–1227. [[PubMed](#)]
13. Freier, C.P.; Stiasny, A.; Kuhn, C.; Mayr, D.; Alexiou, C.; Janko, C.; Wiest, I.; Jeschke, U.; Kost, B. Immunohistochemical evaluation of the role of p53 mutation in cervical cancer: Ser-20 p53-mutant correlates with better prognosis. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 3131–3137. [[PubMed](#)]
14. Stiasny, A.; Kuhn, C.; Mayr, D.; Alexiou, C.; Janko, C.; Wiest, I.; Jeschke, U.; Kost, B. Immunohistochemical evaluation of E6/E7 HPV oncoproteins staining in cervical cancer. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 3195–3198. [[PubMed](#)]
15. Iwasaki, W.; Miya, Y.; Horikoshi, A.; Taguchi, H.; Tachiwana, H.; Shibata, T.; Kagawa, W.; Kurumizaka, H. Contribution of histone N-terminals to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio* **2013**, *3*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Taverna, S.D.; Li, H.; Ruthenburg, A.J.; Allis, C.D.; Patel, D.J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: Lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1025–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yavartanoo, M.; Choi, J.K. Encode: A sourcebook of epigenomes and chromatin language. *Genom. Inform.* **2013**, *11*, 2–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wang, Z.; Zang, C.; Rosenfeld, J.A.; Schones, D.E.; Barski, A.; Cuddapah, S.; Cui, K.; Roh, T.Y.; Peng, W.; Zhang, M.Q.; et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 897–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Yu, Y.; Zeng, P.; Xiong, J.; Liu, Z.; Berger, S.L.; Merlino, G. Epigenetic drugs can stimulate metastasis through enhanced expression of the pro-metastatic ezrin gene. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Jaenisch, R.; Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 245–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Tang, D.; Wu, D.; Hirao, A.; Lahti, J.M.; Liu, L.; Mazza, B.; Kidd, V.J.; Mak, T.W.; Ingram, A.J. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12710–12717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mao, C.; Balasubramanian, A.; Yu, M.; Kiviat, N.; Ridder, R.; Reichert, A.; Herkert, M.; von Knebel Doeberitz, M.; Koutsky, L.A. Evaluation of a new p16(INK4a) ELISA test and a high-risk HPV DNA test for cervical cancer screening: Results from proof-of-concept study. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 2435–2438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Melkane, A.E.; Mirghani, H.; Auperin, A.; Saulnier, P.; Lacroix, L.; Vielh, P.; Casiraghi, O.; Griscelli, F.; Temam, S. HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinomas: A comparison between three diagnostic approaches. *Am. J. Otolaryngol.* **2014**, *35*, 25–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. McLaughlin-Drubin, M.E.; Crum, C.P.; Munger, K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 2130–2135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. McLaughlin-Drubin, M.E.; Park, D.; Munger, K. Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 16175–16180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fang, J.; Zhang, H.; Jin, S. Epigenetics and cervical cancer: From pathogenesis to therapy. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 5083–5093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Duenas-Gonzalez, A.; Lizano, M.; Candelaria, M.; Cetina, L.; Arce, C.; Cervera, E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol. Cancer* **2005**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. De la Cruz-Hernandez, E.; Perez-Cardenas, E.; Contreras-Paredes, A.; Cantu, D.; Mohar, A.; Lizano, M.; Duenas-Gonzalez, A. The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on human papillomavirus early gene expression in cervical cancer, an in vitro and clinical study. *Virology* **2007**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chen, J.; Ghazawi, F.M.; Bakkar, W.; Li, Q. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. *Mol. Cancer* **2006**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Brooks, C.L.; Gu, W. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell* **2011**, *2*, 456–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Jiang, Y.; Wang, Y.; Su, Z.; Yang, L.; Guo, W.; Liu, W.; Zuo, J. Synergistic induction of apoptosis in HeLa cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitor SAHA. *Mol. Med. Rep.* **2010**, *3*, 613–619. [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**2. Publikation - Archives of Gynecology and Obstetrics:
Glucocorticoid receptor in cervical cancer: an immunohistochemical
analysis**


Eingereicht: 18. Juni 2018

Akzeptiert: 01. Oktober 2018

Veröffentlicht: 10. Oktober 2018



Glucocorticoid receptor in cervical cancer: an immunohistochemical analysis

Bernd Peter Kost¹ · Susanne Beyer¹ · Lennard Schröder¹ · Junyan Zhou¹ · Doris Mayr² · Christina Kuhn¹ · Sandra Schulze¹ · Simone Hofmann¹ · Sven Mahner¹ · Udo Jeschke¹  · Helene Heidegger¹

Received: 18 June 2018 / Accepted: 1 October 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose Cervical cancer is one of the most frequent cancers in women worldwide. In most of all cases, a persistent HPV infection is the leading cause. HPV-specific sequences are able to bind glucocorticoid receptor (GR). Dexamethasone can increase the activity of early promoters in HPV16 and HPV18 interfering in transcription control of viral oncogenes. The aim of our study was to evaluate glucocorticoid receptor as transcriptional factor in its active form in the nucleus of in cervical cancer cells and to correlate the results with clinical patient specific parameters.

Methods A total of 250 paraffin-embedded cervical cancer samples obtained from patients having undergone surgery for cervical cancer were used for the study. The expression of GR was immunohistochemical examined and evaluated by a semi-quantitative scoring. SPSS software was used for the statistical evaluation of staining results and survival analysis of patients with cervical cancer.

Results GR is frequently expressed in cervical carcinoma tissue in favor of squamous cell carcinoma (SCC). An enhanced expression is correlated with rather small clinical stages. The expression of the GR is correlated with better overall survival and progression-free survival.

Conclusions The glucocorticoid receptor is frequently expressed in cervical carcinoma tissue in favor of squamous cell carcinoma. An enhanced expression is correlated with rather small clinical stages. The expression of the analyzed receptor is correlated with better overall survival. Further studies are needed to determine useful treatment targets for glucocorticoid receptor manipulation.

Keywords Cervical cancer · Glucocorticoid receptor · Survival

Introduction

Cervical cancer is one of the most frequent cancers in women worldwide. Regarding women's outcome, major prognostic factors are known as International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage, histological type or grade, tumor size, lymph node metastasis or rather lymphatics invasion. According to international guidelines,

patients are treated with surgery or radiotherapy depending on staging and individual risk assessment [1–3].

In most of all cases, a persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) is the reason for cervical cancer [1, 4]. A total of 170 HPV types are known [5, 6]. In the genome of human papillomaviruses, there are approximately 8000 base pairs and six “early genes” (E6, E7, E1, E2, E4, E5), two “late genes” (L1, L2) and noncoding regions [7]. Integration of HPV is a vector for cervical carcinogenesis resulting in a loss of a suppressive function on E6 and E7. In consequence, disturbance of cell cycle, uncontrolled cell proliferation and possible carcinogenesis occur [8–10]. Although viral-specific pathogenesis of cervical cancer is well known, additional mechanisms as cofactors are assumed to induce HPV-related carcinogenesis. The role of steroid hormones in the pathogenesis of HPV-related cervical cancer is under investigation [8, 11–14]

✉ Udo Jeschke
udo.jeschke@med.uni-muenchen.de

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, LMU Munich, University Hospital, Marchioninistrasse 15, 81377 Munich, Germany

² Klinikum Der Universität München, Pathologisches Institut, Munich, Germany

Materials and methods

Specimens

We used 250 paraffin-embedded cervical cancer samples. They were obtained from patients with a median age of 47.0 years (range 20–83 years), and an overall median survival of 100.0 months. Patients had undergone surgery for cervical cancer in the Department of Obstetrics and Gynecology of the LMU Munich between 1993 and 2002. Clinic pathological variables are described in Table 1. Only patients with the most frequent histological subtype (adenocarcinoma or squamous cell carcinoma) of the cervix were included in our study; due to low number, other histological subtypes were excluded. For positive and negative controls, placenta tissue received from the Department of Obstetrics and Gynecology of the LMU Munich was used. Clinical and follow-up data for statistical analyses were provided by The Munich Cancer Registry and recruited from medical records. We used, therefore, the original data. This means that we used the FIGO classification which was available for 2002—as patients underwent surgery between 1993 and 2002. In this classification, patients were also staged in FIGO IIIC, which means that they were FIGO III with positive lymph nodes.

Immunohistochemical staining

Specimens were formalin fixed and paraffin embedded, while stored at room temperature. Slides (3 μ m) were dewaxed in xylol and afterwards washed in 100% alcohol. After blocking the endogenous peroxidase by 3% methanol/H₂O₂, rehydration of the tissue took place in a descending alcohol series. Sections were cooked at 100 °C in a sodium citrate buffer solution with pH = 6 to unmask the antigen and to prevent heat-associated protein agglomeration. After washing the slides (aqua dist./PBS buffer), the following antibody was added on the tissue and incubation at + 4 °C for 16 h was performed (Table 2): Anti-GR (mouse IgG2a; clone 4H2; Novocastra, Wetzlar, Germany). Post-block reagent and HRP polymer were added to increase the staining. Finally, the tissue was dehydrated in a rising series of alcohol and finally covered. The power of the staining was evaluated by an optical microscope

Table 1 Clinic pathological parameters of the patients included in this study

	No./Total no.	%
Age, years		
< 49	139/250	55.6
> 49	111/250	44.4
No. of positive nodes		
0	151/250	60.4
≥ 1	097/250	38.8
NA's	002/250	00.8
pT		
pT1	111/250	44.4
pT2	129/250	51.6
pT3/4	009/250	03.6
NA's	001/250	0.04
FIGO		
I	64/250	25.6
II	49/250	19.6
III	37/250	14.8
IV	07/250	02.8
NA's	93/250	37.2
Tumor grade, G		
I	021/250	08.4
II	143/250	57.2
III	078/250	31.2
NA's	008/250	03.2
Tumor subtype		
Squamous	202/250	80.8
Adenocarcinoma	048/250	19.2
Progression(over 235 months)		
None	210/250	84.0
At least one	29/250	11.6
NA's	011/250	04.4
Survival (over 235 months)		
Right censored	190/250	76.0
Died	049/250	19.6
NA's	011/250	04.4

with the immunoreactivity score (IRS), where intensity (0 = not stained; 1 = low intensity; 2 = moderate intensity; 3 = high intensity) and percentage of stained cells (0 = 0%; 1 = 1–10%; 2 = 11–50%; 3 = 51–80%; 4 ≥ 80%) were multiplied. The higher the result, the more powerful the expression (0 = no expression, 12 = very high expression). The slides were examined by two independent persons.

In our study, we examined the function of the glucocorticoid receptor as transcription factor, which is the case if it is present in the nucleus as active form. In the cytoplasm, the receptor is present but not active as a transcription factor; so, it was not detected.

Table 2 Antibody and chemicals used for the immunohistochemistry

Glucocorticoid receptor (GR) ^a
Blocking solution ^b : 5 min
Primary antibody ^a : 1:30 in PBS ^d
incubation: 16 h, 4 °C
PostBlock ^b : 20 min
HRP Polymer ² : 30 min
Chromogen: DAB ^c (1 min)

^aAnti-GR, clone 4H2 (mouse IgG2a), company: Novocastra (Wetzlar, Germany), Order number: NCL-GCR

^bZytoChem Plus HRP Polymer Kit (Mouse/Rabbit) 3*100; company: Zytomed Systems (Germany) Nr. POLHRP-100

^cLiquid DAB + Substrate Chromogen System 1 mg/ml, DAKO

^dDulbecco's phosphate-buffered saline

Ethics approval

The study was approved by the ethics committee of the Ludwig-Maximilians University Munich (reference number 259-16) and considered the Declaration of Helsinki. Patient data were anonymized. During experimental and statistical analyses, the authors were blinded for clinic pathological parameters and information regarding survival. All used cancer tissue was no longer needed for clinical tests as it had initially been collected for histopathological diagnostics after surgery.

Statistics

SPSS Statistics data version 23 (IBM, Armonk, USA) was taken to perform statistical analyses. Non-parametric tests (Mann–Whitney *U* test and Kruskal–Wallis test) were used to compare independent groups and bivariate correlations were showed by Spearman's rho correlation coefficient. Survival analyses were plotted in Kaplan–Meier curves and boxplots; for significant differences regarding survival, log-rank test was used, or additionally Mann–Whitney *U* test. Cox analysis was performed to find independent markers for survival. If *p* was < 0.05, we considered the result to be statistically significant.

Results

GR staining in cervical carcinoma

To control the GR staining, we used normal (non-pathological) placenta tissue, which showed strong nuclear expression in > 80% of epithelial cells (Fig. 1a) without any cytoplasmic reaction.

A total of 92.4% of all cervical cancer specimens showed an expression of GR receptor with a median IRS of 4, represented

in 41.6% of all cases. In contrast, 7.6% did not show any expression at all. A low GR expression (IRS ≤ 3) was shown in 35.6% compared to an enhanced expression (IRS ≥ 4) in 64.4%.

GR staining in correlation with clinical parameters

Analyzing the histological subtype (Fig. 1b), squamous epithelial carcinomas showed a median IRS of 4 being represented in 45.0% of all cases (Fig. 1c), compared to a median IRS of 3 in 10.4% in adenocarcinoma tissue (Fig. 1d). The expression of the staining was significantly different between these two histological subtypes (*p*=0.000; Table 3).

Correlating the GR findings with FIGO classification, the median IRS varied between 0 and 8 (Fig. 1e). FIGO I showed a median IRS of 4 (Fig. 1f), compared to a median IRS of 8 in FIGO IIA (Fig. 1g) and 0 in FIGO IIIC (Fig. 1h). GR staining was significantly correlated with FIGO stage (*p*=0.002), whereas an enhanced staining was accompanied by a low FIGO stage (Rho = -0.174, *p*=0.030; Table 3).

No significant difference between GR staining and grading, T- and N-status was found

GR staining and survival

Kaplan–Meier analysis showed a significant correlation between GR expression (IRS ≥ 4) and overall survival (*p*=0.045): an advanced GR expression went along with significant better overall survival compared to low GR expression (IRS ≤ 3) in cervical cancer (Fig. 2a). Regarding release-free survival, an increased GR expression was also correlated with longer release-free survival (*p*=0.009; Fig. 2b). This fitted to the correlation between GR and the FIGO status, where high GR expression was correlated with a low FIGO state.

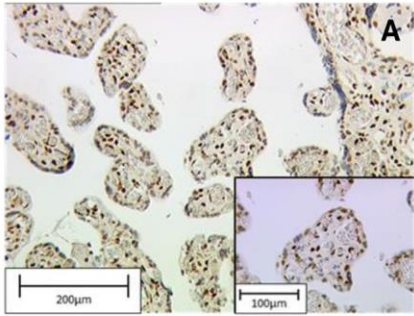
Cox regression was performed to find independent prognosticators concerning survival. Regarding overall survival, clinical parameters like histological subtype (*p*=0.038), N-status (*p*=0.002), FIGO classification (*p*=0.003) and age at surgery (*p* < 0.001) were independent prognosticators, as well as T-stage (*p*=0.003) but not grading. Expression of GR turned out to be an independent marker for overall survival being correlated with better overall survival (Table 4).

Regarding relapse-free survival, neither analyzed clinic pathological markers (histological subtype, T-status, N-stage, FIGO stage, grading or age at surgery) nor GR expression turned out to be significant.

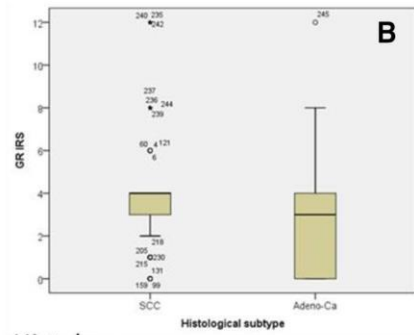
Discussion

Glucocorticoids are well-known substances in cancer treatment. They are used as co-medication to reduce side effects of cancer therapy or by effecting cell-cycle progression and

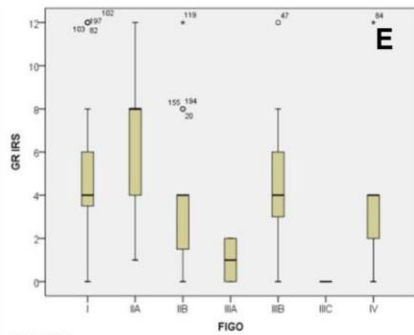
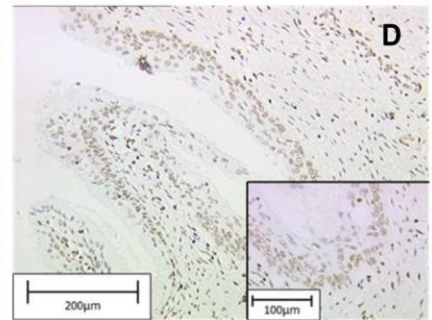
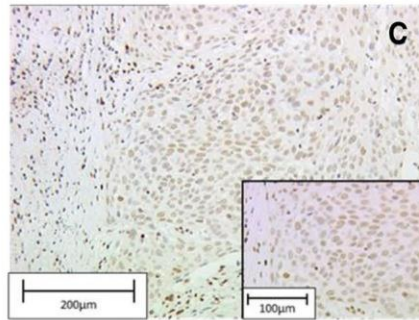
GR



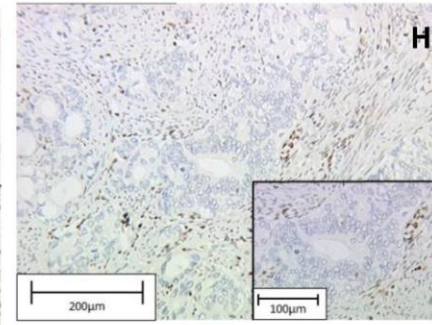
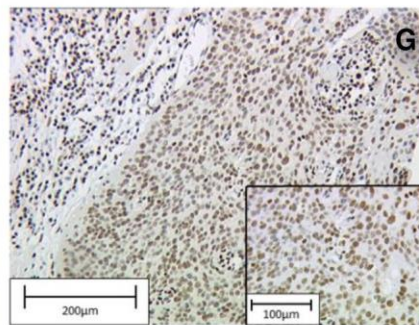
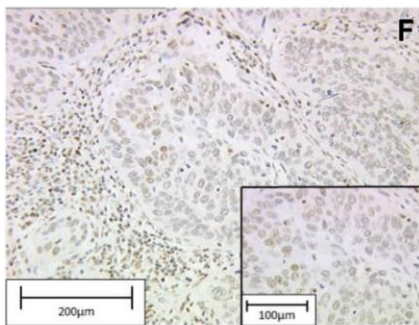
Control



Histology



FIGO



FIGO

Fig. 1 Positive control of GR staining in placenta tissue with strong nuclear expression (a). Correlation between GR expression and his- tological subtypes: (b). Median IRS of SCC was 4 (c), compared to the median IRS of Adeno-Ca of 3 (d). GR expression correlated with

FIGO status, as summarized in the boxplot (e). FIGO I staged patient showed an IRS of 4 (f), FIGO II staged patient, a median IRS of 8 (g) and FIGO III staged patient, an IRS of 0 (h). Scale bar 200 µm, small pictures 100 µm

Table 3 Staining results and correlation analysis for GR expression

	GR			
	Median IRS (+/-SD)	%	<i>p</i> (NPAR)	ρ
Histology				
SCC	4 (\pm 3.0)	45.0	0.000	–
Adeno-Ca	3 (\pm 2.7)	10.4		
FIGO				
I	4 (\pm 3.2)	48.4	0.002	–0.174
IIA	8 (\pm 3.4)	50.0		(<i>p</i> =0.030)
IIB	4 (\pm 2.5)	45.0		
IIIA	1 (\pm 1.4)	00.0		
IIIB	4 (\pm 2.7)	33.3		
IIIC	0 (\pm 0.0)	100		
IV	4 (\pm 3.8)	42.9		
pT				
T1	4 (\pm 3.1)	41.8	0.492	–0.068
T2	4 (\pm 2.9)	41.4		(<i>p</i> >0.05)
T3/4	4 (\pm 3.0)	44.4		

SD standard deviation, % percentage of the subgroup with median IRS, *NPAR* non-parametric test, *p* *p* value, ρ correlation coefficient

apoptosis to treat malignancy itself [18]. The effect of glucocorticoids and their corresponding receptor or the interaction with other pathogens like HPV on cervical carcinoma is not clear yet.

Altogether, there are limited data about GR expression in cervical carcinoma. In a study by Block et al., glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types was analyzed. 82% of the analyzed cervical cancer tissue in a small sample size was tested positive in their analysis [8]. Regarding our

study, >92% of the analyzed samples showed detectable GR expression in the nucleus with a high staining in > 64% of all cases. The study by Block et al. [19] indicated that GR expression varies by tumor subtype comparing different histological lung cancer types. Due to the low number of cervical carcinoma samples in their study, a sufficient analysis of histological subtypes was not done.

In favor of squamous epithelial carcinomas, a significant difference between squamous epithelial carcinoma and adenocarcinoma concerning GR expression was measured in our study. Differential expression of prognosis marker proteins in both carcinoma entities was described recently by our group. In cervical cancer, Histone H3 acetyl K9 staining was associated with low grading, low FIGO status, negative N-status and low T-status and showed a higher expression in adenocarcinoma compared to squamous cell carcinoma [23]. In addition, we found a positive correlation of the nuclear GR staining with p16 ($\rho = 0.301$, $p < 0.001$) and p53 ($\rho = 0.237$, $p < 0.001$), which were obtained from a former study [20]. The glucocorticoid receptor showed also a positive correlation with the G protein-coupled estrogen receptor (GPER, $\rho = 0.233$, $p < 0.001$), RIP140 ($\rho = 0.171$, $p = 0.008$) and Histone H3 Tri Methyl K4 ($\rho = 0.143$, $p = 0.023$) [21–23].

According to international guidelines, cervical cancer patients are treated with surgery or radiotherapy depending on individual staging and risk assessment. Risk assessment includes tumor size, stage, depths of tumor invasion, lymph node status, lympho-vascular space invasion and histological subtype. Regarding prognosis and risk assessment, there might be other biological markers in cervical cancer to assess individual therapy policy or prognosis [24–28].

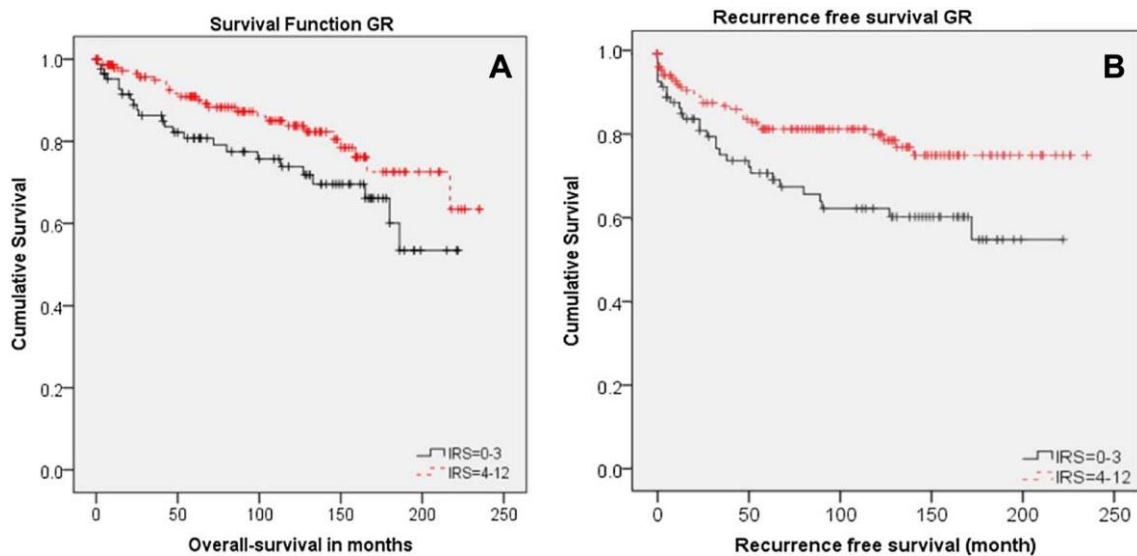


Fig. 2 Kaplan–Meier analysis regarding overall survival in cervical cancer: low GR expression (IRS ≤ 3) compared to high expression (IRS ≥ 4) regarding overall survival (a; $p = 0.045$) and recurrence-free survival (b; $p = 0.009$)

Table 4. Cox regression of clinic pathological variables regarding overall survival in cervical cancer

	Significance	Hazard ratio [Exp(B)]	Lower 95% CI of [Exp(B)]	Upper 95% CI of [Exp(B)]
Histology	0.038	1.905	1.036	3.500
pT	0.624	0.882	0.534	1.457
pN	0.002	2.465	1.378	4.412
FIGO	0.003	1.258	1.080	1.465
Grading	0.193	1.365	0.855	2.181
Age at surgery	0.000	1.049	1.026	1.072
GR	0.054	0.575	0.328	1.009

Significant results are shown in bold

In the present study, expression of GR was significantly correlated with survival: an advanced GR expression went along with significant better overall- and relapse-free survival compared to low GR expression in our analyzed cancer cells. In a study by Vanderbilt et al. [29], the effect of glucocorticoid growth arrest in lymphoid cell lines was proportional to GR content. Gehring et al. [30] showed a correlation between low-level GR expression with a poor treatment response or patient prognosis in ALL. Nevertheless, consistent with data in hematological malignancies, our data indicate a better prognosis of cervical cancer patients correlating with GR expression, fitting to the correlation between FIGO and GR expression. More data exist regarding mRNA expression of GR in cervical cancer. We think that it is not allowed to transfer these data one-to-one to our study design as we examined the active form of the glucocorticoid receptor with its expression in the nucleus. Interestingly, in a recent study, we could show that RIP140 as co-regulator of the glucocorticoid receptor is also an independent prognosticator for cervical cancer patients [22].

As therapeutic agents, glucocorticoids are effective in inducing apoptosis in many hematological malignancies. Besides positive effects of glucocorticoids in leukemia, different cancer cells seem to respond with increased resistance towards glucocorticoid induced apoptosis [31]. Limited data concerning the apoptotic effect of glucocorticoids in solid tumor cells exist from osteosarcoma or small-cell lung cancers. Their might be negative effects of glucocorticoids in solid tumors by causing faster growth or metastasis by providing a selection pressure [18].

Other studies identified the induction of glucocorticoid receptor as feature of drug resistance leading to worse survival rates, if GR is expressed [32]. These data seem to be in contrast to our results but they refer to special cases and mechanisms, for example, in prostate cancer. It is not clear if a one-to-one transfer to cervical cancer is possible.

Altogether, the wide range of mechanisms by which glucocorticoids are able to develop in different cell lines are not fully understood [31]. An ongoing clinical trial (NCT02762981) will provide initial data, if the glucocorticoid receptor can be targeted by the selective glucocorticoid receptor modulator CORT125134 in combination with nab-paclitaxel in different solid tumors [33, 34]. If the glucocorticoid effect on cervical carcinoma tissue is dependent on GR itself or other mechanisms has to be investigated.

Author contributions BPK: project development, data collection. SB: experiments, manuscript writing. LS: data collection, manuscript editing. JZ: data analyses. DM: supervision, data analyses. CK: experiments, methodology. SS: experiments, methodology. SH: experiments, methodology. SM: data analyses, supervision, funding. UJ: supervision. HH: manuscript edition, data analyses

Funding The study was supported by the “Heuer Stiftung” for Bernd P. Kost. The authors would like to thank Prof. Dr. med. Jutta Engel, M.P.H. and Max Wiedemann (The Munich Cancer Registry of the Tumorzentrum München [TZM—Munich Tumor Center]) for the follow-up data.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Informed consent The study was approved by the ethics committee of the Ludwig-Maximilians University Munich (reference number 259- 16). Patient data were anonymized.

References

- Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hamouda D, Shah KV, Meijer CJ (2004) Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 111:278–285
- Serrano-Olvera A, Cetina L, Coronel J, Duenas-Gonzalez A (2014) Follow-up consultations for cervical cancer patients in a mexican cancer center. Comparison with NCCN guidelines. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:8749–8752
- Horn LC, Beckmann MW, Follmann M, Koch MC, Mallmann P, Marnitz S, Schmidt D, German Cancer S (2015) s3 guidelines on diagnostics and treatment of cervical cancer: demands on pathology. *Pathologie* 36:585–593
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S (2007) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890–907
- Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klussmann JP (2012) basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *Laryngorhinootologie* 91(Suppl 1):S1–S26

6. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study G (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518–527
7. Liu J, Cheng Y, He M, Yao S (2014) Vascular endothelial growth factor c enhances cervical cancer cell invasiveness via upregulation of galectin-3 protein. *Gynecol Endocrinol* 30:461–465
8. Meng CF, Su B, Li W (2011) DNA demethylation is superior to histone acetylation for reactivating cancer-associated genes in ovarian cancer cells. *Mol Med Rep* 4:1273–1278
9. Gupta S, Takhar PP, Degenkolbe R, Koh CH, Zimmermann H, Yang CM, Guan Sim K, Hsu SI, Bernard HU (2003) The human papillomavirus type 11 and 16 e6 proteins modulate the cell-cycle regulator and transcription cofactor trip-br1. *Virology* 317:155–164
10. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The hpv-16 e6 and e6-ap complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495–505
11. Pittayakhajonwut D, Angeletti PC (2010) Viral trans-factor independent replication of human papillomavirus genomes. *Virol J* 7:123
12. Bromberg-White JL, Meyers C (2002) The upstream regulatory region of human papillomavirus type 31 is insensitive to glucocorticoid induction. *J Virol* 76:9702–9715
13. Chan WK, Klock G, Bernard HU (1989) Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* 63:3261–3269
14. Webster K, Taylor A, Gaston K (2001) Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 e2 and e7 proteins. *J Gen Virol* 82:201–213
15. Kwasniewska A, Postawski K, Gozdzicka-Jozefiak A, Kwasniewski W, Grywalska E, Zdunek M, Korobowicz E (2011) Estrogen and progesterone receptor expression in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinomas. *Oncol Rep* 26:153–160
16. Fonseca-Moutinho JA, Cruz E, Carvalho L, Prazeres HJ, de Lacerda MM, da Silva DP, Mota F, de Oliveira CF (2004) Estrogen receptor, progesterone receptor, and BCL-2 are markers with prognostic significance in cin iii. *Int J Gynecol Cancer* 14:911–920
17. Chen YH, Huang LH, Chen TM (1996) Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 224:651–659
18. Schlossmacher G, Stevens A, White A (2011) Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol* 211:17–25
19. Block TS, Murphy TI, Munster PN, Nguyen DP, Lynch FJ (2017) Glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types using immunohistochemistry assay. *Cancer Manag Res* 9:65–72. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S124475>
20. Stiasny A, Freier CP, Kuhn C, Schulze S, Mayr D, Alexiou C, Janko C, Wiest I, Dannecker C, Jeschke U et al (2017) The involvement of e6, p53, p16, mdm2 and gal-3 in the clinical outcome of patients with cervical cancer. *Oncol Lett* 14:4467–4476
21. Friese K, Kost B, Vattai A, Marme F, Kuhn C, Mahner S, Dannecker C, Jeschke U, Heublein S (2018) The g protein-coupled estrogen receptor (gper/gpr30) may serve as a prognostic marker in early-stage cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 144:13–19
22. Vattai A, Cavailles V, Sixou S, Beyer S, Kuhn C, Peryanova M, Heidegger H, Hermelink K, Mayr D, Mahner S et al (2017) Investigation of rip140 and lcor as independent markers for poor prognosis in cervical cancer. *Oncotarget* 8:105356–105371
23. Beyer S, Zhu J, Mayr D, Kuhn C, Schulze S, Hofmann S, Dannecker C, Jeschke U, Kost BP (2017) Histone h3 acetyl k9 and histone h3 tri methyl k4 as prognostic markers for patients with cervical cancer. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms18030477>
24. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Committee E G (2017) Cervical cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 28:iv72–iv83
25. Reich O, Regauer S, Marth C, Schmidt D, Horn LC, Dannecker C, Menton M, Beckmann MW (2015) Precancerous lesions of the cervix and vagina according to the 2014 who classification of tumors of the female genital tract. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 75:1018–1020
26. Freier CP, Stiasny A, Kuhn C, Mayr D, Alexiou C, Janko C, Wiest I, Jeschke U, Kost B (2016) Immunohistochemical evaluation of the role of p53 mutation in cervical cancer: Ser-20 p53-mutant correlates with better prognosis. *Anticancer Res* 36:3131–3137
27. Stiasny A, Kuhn C, Mayr D, Alexiou C, Janko C, Wiest I, Jeschke U, Kost B (2016) Immunohistochemical evaluation of e6/e7 hpv oncoproteins staining in cervical cancer. *Anticancer Res* 36:3195–3198
28. Kolben TM, Kraft F, Kolben T, Goess C, Semmlinger A, Dannecker C, Schmoeckel E, Mayr D, Sommer NN, Mahner S et al (2017) Expression of sialyl lewis a, sialyl lewis x, lewis y, gal-3, gal-7, stmn1 and p16 in cervical dysplasia. *Future Oncol* 13:145–157
29. Vanderbilt JN, Miesfeld R, Maler BA, Yamamoto KR (1987) Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. *Mol Endocrinol* 1:68–74
30. Gehring U, Mugele K, Ulrich J (1984) Cellular receptor levels and glucocorticoid responsiveness of lymphoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 36:107–113
31. Herr I, Buchler MW, Mattern J (2009) Glucocorticoid-mediated apoptosis resistance of solid tumors. *Results Probl Cell Differ* 49:191–218
32. Arora Vivek K, Schenkein Emily, Murali Rajmohan et al (2013) Glucocorticoid receptor confers resistance to anti-androgens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell* 155(6):1309–1322
33. Hunt H, Donaldson K, Strem M, Zann V, Leung P, Sweet S, Connor A, Combs D, Belanoff J (2017) Assessment of safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacological effect of orally administered cort125134: An adaptive, double-blind, randomized, placebo-controlled phase 1 clinical study. *Clin Pharmacol Drug Dev* 7(4):408–421. <https://doi.org/10.1002/cpdd.389>
34. Hunt HJ, Belanoff JK, Walters I, Gourdet B, Thomas J, Barton N, Unitt J, Phillips T, Swift D, Eaton E (2017) Identification of the clinical candidate (r)-(1-(4-fluorophenyl)-6-((1-methyl-1 h-pyrazol-4-yl)sulfonyl)-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-1 h-pyrazolo[3,4-g]isoquinolin-4a-yl)(4-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)methanone (cort125134): a selective glucocorticoid receptor (gr) antagonist. *J Med Chem* 60:3405–3421

E Literaturverzeichnis

1. WHO, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018. Estimated numbers of new cases, worldwide, 2018, all cancers, females, all ages. http://qco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=. 08.05.2019. 2018.
2. WHO, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018. Fact Sheet: Cervix uteri. <http://qco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf>. 08.05.2019. 2018.
3. WHO, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018. Estimated age-standardized incidence and mortality rates (Africa) in 2018, all cancers, females, all ages. http://qco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2018&mode=cancer&mode_population=regions&population=250&populations=903&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&dual_distribution=1&population1=903&population2=554&show_values=false&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=&type_sort=0; 08.05.2019. 2018.
4. WHO, International Agency for Research on Cancer. GLOBOAN 2018. Estimated number deaths Germany, females, all ages http://qco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=276&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=20&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Afalse%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id= 08.05.2019. 2019.
5. WHO, International Agency for Research on Cancer. Estimated age-standardized mortality rates (Europe) in 2018, cervix uteri, females, all ages GLOBOCAN 2018. http://qco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=23&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=5&rotate=%255B10%252C0%255D 08.05.2019. 2019.
6. WHO, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018. Estimated number of incident cases Germany, females, all ages. http://qco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=276&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=20&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&t

- [ype_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=](#) 08.05.2019. 2019.
7. AWMF, *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom, Langversion, 1.0, 2014, AWMF-Registernummer: 032/033OL.*
 8. WHO, International Agency for Research on Cancer. *GLOBOCAN 2018. Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, cervix uteri, females, all ages.*
https://qco.iarc.fr/tomorrow/graphic-line?type=0&population=900&mode=population&sex=2&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0 08.05.2019. 2019.
 9. Bosch, F.X. and S. de Sanjose, *The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer.* Dis Markers, 2007. **23**(4): p. 213-27.
 10. Brinton, L.A., et al., *Parity as a risk factor for cervical cancer.* Am J Epidemiol, 1989. **130**(3): p. 486-96.
 11. Kahesa, C., et al., *Association between invasive cancer of the cervix and HIV-1 infection in Tanzania: the need for dual screening.* BMC Public Health, 2008. **8**: p. 262.
 12. Louie, K.S., et al., *Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries.* Br J Cancer, 2009. **100**(7): p. 1191-7.
 13. Moreno, V., et al., *Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study.* Lancet, 2002. **359**(9312): p. 1085-92.
 14. Moreno, V., et al., *Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(5): p. 459-67.
 15. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Münger, *Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses.* Virus research, 2009. **143**(2): p. 195-208.
 16. Muñoz, N., et al., *Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer.* New England Journal of Medicine, 2003. **348**(6): p. 518-527.
 17. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.* J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
 18. Bosch, F.X., et al., *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group.* J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(11): p. 796-802.
 19. McLaughlin-Drubin, M.E., C.P. Crum, and K. Münger, *Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(5): p. 2130-2135.
 20. Shi, M., et al., *Glucocorticoid regulation of a novel HPV-E6-p53-miR-145 pathway modulates invasion and therapy resistance of cervical cancer cells.* The Journal of Pathology, 2012. **228**(2): p. 148-157.
 21. Bernat, A., et al., *Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300.* Oncogene, 2003. **22**(39): p. 7871-81.
 22. Holland, D., et al., *Activation of the enhancer of zeste homologue 2 gene by the human papillomavirus E7 oncoprotein.* Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9964-72.
 23. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer.* Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
 24. zur Hausen, H., *Papillomaviruses--to vaccination and beyond.* Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(5): p. 498-503.
 25. Schiffman, M., et al., *Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer.* JNCI Journal of the National Cancer Institute, 2011. **103**(5): p. 368-383.
 26. RKI, *Krebs in Deutschland 2009/2010.*
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_201

- [3/krebs_in_deutschland_2013.pdf;jsessionid=46DBFE3D158B3FAC7325A798CA3A803F.2_cid372?_blob=publicationFile](#). 04.09.2019. 2013.
27. Bhatla, N., et al., *Cancer of the cervix uteri*. Int J Gynaecol Obstet, 2018. **143** Suppl 2: p. 22-36.
 28. Bermudez, A., N. Bhatla, and E. Leung, *Cancer of the cervix uteri*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2015. **131**: p. S88-S95.
 29. Robert-Koch-Institut, *Mitteilung der Ständigen Impfkommision beim Robert Koch-Institut (RKI): Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) beim Robert Koch-Institut – 2016*. 2016.
 30. Robert-Koch-Institut, *Mitteilung der Ständigen Impfkommision beim Robert Koch-Institut (RKI): Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) beim Robert Koch-Institut – 2018/2019*.
 31. AWMF, *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms, Langversion, 1.0, 2014, AWMF-Registernummer: 015/027OL*. 2017
 32. Anttila, A. and G. Ronco, *Description of the national situation of cervical cancer screening in the member states of the European Union*. Eur J Cancer, 2009. **45**(15): p. 2685-708.
 33. *ACOG practice bulletin. Diagnosis and treatment of cervical carcinomas. Number 35, May 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists*. Int J Gynaecol Obstet, 2002. **78**(1): p. 79-91.
 34. Liebig, C., et al., *Perineural invasion in cancer: a review of the literature*. Cancer, 2009. **115**(15): p. 3379-91.
 35. Dunn, M., M.B. Morgan, and T.W. Beer, *Perineural invasion: identification, significance, and a standardized definition*. Dermatol Surg, 2009. **35**(2): p. 214-21.
 36. Wittekind, C.a.H.M., *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. Weilheim: Viley-VCH-Verlag. 2010.
 37. Peters, W.A., 3rd, et al., *Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix*. J Clin Oncol, 2000. **18**(8): p. 1606-13.
 38. Zervixkarzinom, Zentrum für Krebsregisterdaten. *Krebs in Deutschland*. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c53_gebaermutterhals.pdf?_blob=publicationFile. 04.09.2019. 2017.
 39. Ayhan, A., et al., *A comparison of prognoses of FIGO stage IB adenocarcinoma and squamous cell carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**(2): p. 279-85.
 40. Ho, C.M., et al., *Multivariate analysis of the prognostic factors and outcomes in early cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy*. Gynecol Oncol, 2004. **93**(2): p. 458-64.
 41. Kinney, W.K., et al., *Identification of a low-risk subset of patients with stage IB invasive squamous cancer of the cervix possibly suited to less radical surgical treatment*. Gynecol Oncol, 1995. **57**(1): p. 3-6.
 42. Takeda, N., et al., *Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2002. **81**(12): p. 1144-51.
 43. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
 44. McGhee, J.D. and G. Felsenfeld, *Nucleosome Structure*. Annual Review of Biochemistry, 1980. **49**(1): p. 1115-1156.
 45. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *Acetylation and Methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 786-94.
 46. Bradbury, E.M., *Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle*. Bioessays, 1992. **14**(1): p. 9-16.
 47. Murray, K., *The Occurrence of ϵ -N-Methyl Lysine in Histones*. Biochemistry, 1964. **3**(1): p. 10-15.

48. Johannsen, E. and P.F. Lambert, *Epigenetics of Human Papillomaviruses*. Virology, 2013. **445**(0): p. 10.1016/j.virol.2013.07.016.
49. Zhang, K., et al., *Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal Biochem, 2002. **306**(2): p. 259-69.
50. Morris, S.A., et al., *Identification of histone H3 lysine 36 acetylation as a highly conserved histone modification*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7632-40.
51. Wiren, M., et al., *Genomewide analysis of nucleosome density histone acetylation and HDAC function in fission yeast*. Embo j, 2005. **24**(16): p. 2906-18.
52. Hebbes, T.R., A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson, *A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin*. The EMBO Journal, 1988. **7**(5): p. 1395-1402.
53. Lee, D.Y., et al., *A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA*. Cell, 1993. **72**(1): p. 73-84.
54. Gadhia S, S.J., Meier JL, et al., *Histone Acetyltransferase Assays in Drug and Chemical Probe Discovery*. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. 2017 Jul 26 [Updated 2018 Jul 1].
55. Di Martile, M., et al., *Histone acetyltransferase inhibitor CPTH6 preferentially targets lung cancer stem-like cells*. Oncotarget, 2016. **7**(10): p. 11332-48.
56. Lasko, L.M., et al., *Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours*. Nature, 2017. **550**(7674): p. 128-132.
57. Ye, X., et al., *Garcinol, an acetyltransferase inhibitor, suppresses proliferation of breast cancer cell line MCF-7 promoted by 17beta-estradiol*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(12): p. 5001-7.
58. Singh, A.K., A. Bishayee, and A.K. Pandey, *Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy*. Nutrients, 2018. **10**(6): p. 731.
59. Huang, B.H., et al., *Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1*. Cell Death And Differentiation, 2005. **12**: p. 395.
60. Audia, J.E. and R.M. Campbell, *Histone Modifications and Cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(4): p. a019521.
61. Bosch-Presegué, L. and A. Vaquero, *The Dual Role of Sirtuins in Cancer*. Genes & Cancer, 2011. **2**(6): p. 648-662.
62. Jung, K.H., et al., *HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins*. J Cell Biochem, 2012. **113**(6): p. 2167-77.
63. Cao, Q.-f., et al., *TRPM2 Mediates Histone Deacetylase Inhibition-Induced Apoptosis in Bladder Cancer Cells*. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 2015. **30**(2): p. 87-93.
64. Rettig, I., et al., *Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1657.
65. Goncalves, R.M., et al., *Late autophagy inhibitor chloroquine improves efficacy of the histone deacetylase inhibitor SAHA and temozolomide in gliomas*. Biochem Pharmacol, 2019. **163**: p. 440-450.
66. Gao, M., et al., *Therapeutic potential and functional interaction of carfilzomib and vorinostat in T-cell leukemia/lymphoma*. Oncotarget, 2016. **7**(20): p. 29102-15.
67. Mann, B.S., et al., *FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. Oncologist, 2007. **12**(10): p. 1247-52.
68. Zhang, Z.H., et al., *Valproic acid inhibits tumor angiogenesis in mice transplanted with Kasumi1 leukemia cells*. Mol Med Rep, 2014. **9**(2): p. 443-9.

69. Marks, P.A. and R. Breslow, *Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug*. Nature Biotechnology, 2007. **25**: p. 84.
70. Jiang, Y., et al., *Synergistic induction of apoptosis in HeLa cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitor SAHA*. Mol Med Rep, 2010. **3**(4): p. 613-9.
71. Liu, B.-l., et al., *Global Histone Modification Patterns as Prognostic Markers to Classify Glioma Patients*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2010. **19**(11): p. 2888-2896.
72. Barlési, F., et al., *Global Histone Modifications Predict Prognosis of Resected Non–Small-Cell Lung Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(28): p. 4358-4364.
73. Li, D., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase 1 transcriptional regulation: A novel crosstalk between histone modification H3K9ac and ETS1 motif hypomethylation in BRCA1-mutated ovarian cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(1): p. 291-297.
74. Zhen, L., et al., *The Expression of H3K9Ac, H3K14Ac, and H4K20TriMe in Epithelial Ovarian Tumors and the Clinical Significance*. International Journal of Gynecological Cancer, 2010. **20**(1): p. 82-86.
75. Han, P., et al., *Chromatin remodeling in cardiovascular development and physiology*. Circulation research, 2011. **108**(3): p. 378-396.
76. Johansson, C., et al., *Acetylation of intragenic histones on HPV16 correlates with enhanced HPV16 gene expression*. Virology, 2015. **482**: p. 244-259.
77. Bernat, A., P. Massimi, and L. Banks, *Complementation of a p300/CBP defective-binding mutant of adenovirus E1a by human papillomavirus E6 proteins*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 4): p. 829-33.
78. Barski, A., et al., *High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-837.
79. Anton, M., et al., *Immunohistochemical detection of acetylation and phosphorylation of histone H3 in cervical smears*. Ceska Gynekol, 2004. **69**(1): p. 3-6.
80. Liu, H., et al., *Systematic identification of methyllysine-driven interactions for histone and nonhistone targets*. J Proteome Res, 2010. **9**(11): p. 5827-36.
81. Kimura, H., *Histone modifications for human epigenome analysis*. Journal Of Human Genetics, 2013. **58**: p. 439.
82. Vakoc, C.R., et al., *Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(24): p. 9185-95.
83. He, R. and B.L. Kidder, *H3K4 demethylase KDM5B regulates global dynamics of transcription elongation and alternative splicing in embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(11): p. 6427-6441.
84. Li, K.K., et al., *Chapter 17 - Histone Methyltransferase Inhibitors for Cancer Therapy*, in *Epigenetic Technological Applications*, Y.G. Zheng, Editor. 2015, Academic Press: Boston. p. 363-395.
85. Malik, S. and S.R. Bhaumik, *Mixed lineage leukemia: histone H3 lysine 4 methyltransferases from yeast to human*. The FEBS Journal, 2010. **277**(8): p. 1805-1821.
86. Blair, L.P., et al., *Epigenetic Regulation by Lysine Demethylase 5 (KDM5) Enzymes in Cancer*. Cancers (Basel), 2011. **3**(1): p. 1383-404.
87. Martin, C. and Y. Zhang, *The diverse functions of histone lysine methylation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005. **6**: p. 838.
88. Krogan, N.J., et al., *Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(12): p. 4207-18.
89. Zeng, J., et al., *The histone demethylase RBP2 Is overexpressed in gastric cancer and its inhibition triggers senescence of cancer cells*. Gastroenterology, 2010. **138**(3): p. 981-92.
90. Oh, S.Y., et al., *The Histone Methyltransferase Inhibitor BIX01294 Inhibits HIF-1alpha Stability and Angiogenesis*. Mol Cells, 2015. **38**(6): p. 528-34.
91. Prusevich, P., et al., *A Selective Phenelzine Analogue Inhibitor of Histone Demethylase LSD1*. ACS chemical biology, 2014. **9**(6): p. 1284-1293.

92. Shi, X., et al., *ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 96-9.
93. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 407-11.
94. Borkosky, S.S., et al., *Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(5): p. 703-13.
95. Sironi, E., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 4q32-35 in sporadic basal cell carcinomas: evidence for the involvement of p33ING2/ING1L and SAP30 genes*. J Cutan Pathol, 2004. **31**(4): p. 318-22.
96. Lu, F., et al., *Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas*. Br J Cancer, 2006. **95**(1): p. 80-6.
97. Piche, B. and G. Li, *Inhibitor of growth tumor suppressors in cancer progression*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. **67**(12): p. 1987-1999.
98. Liu, H., et al., *H3K4me3 and Wdr82 are associated with tumor progression and a favorable prognosis in human colorectal cancer*. Oncology Letters, 2018. **16**(2): p. 2125-2134.
99. Wooldridge, T.R. and L.A. Laimins, *Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding*. Virology, 2008. **374**(2): p. 371-380.
100. Chen, X., et al., *E6 Protein Expressed by High-Risk HPV Activates Super-Enhancers of the EGFR and c-MET Oncogenes by Destabilizing the Histone Demethylase KDM5C*. Cancer Research, 2018. **78**(6): p. 1418-1430.
101. McLaughlin-Drubin, M.E., D. Park, and K. Munger, *Tumor suppressor p16^{INK4A} is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(40): p. 16175-16180.
102. Peta, E., et al., *HPV16 E6 and E7 upregulate the histone lysine demethylase KDM2B through the c-MYC/miR-146a-5p axis*. Oncogene, 2018. **37**(12): p. 1654-1668.
103. Beck, I.M.E., et al., *Crosstalk in Inflammation: The Interplay of Glucocorticoid Receptor-Based Mechanisms and Kinases and Phosphatases*. Endocrine Reviews, 2009. **30**(7): p. 830-882.
104. Sundahl, N., et al., *Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds*. Pharmacology & Therapeutics, 2015. **152**: p. 28-41.
105. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, *The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- κ B or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression*. Endocrine Reviews, 2003. **24**(4): p. 488-522.
106. Li, X., et al., *Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(11): p. 3763-73.
107. Astrand, C., S. Belikov, and O. Wrange, *Histone acetylation characterizes chromatin presetting by NF1 and Oct1 and enhances glucocorticoid receptor binding to the MMTV promoter*. Exp Cell Res, 2009. **315**(15): p. 2604-15.
108. Meijsing, S.H., et al., *DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity*. Science, 2009. **324**(5925): p. 407.
109. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses*. Annual Review of Immunology, 1998. **16**(1): p. 225-260.
110. De Bosscher, K., et al., *Activation of the Glucocorticoid Receptor in Acute Inflammation: the SEDIGRAM Concept*. Trends in Pharmacological Sciences, 2016. **37**(1): p. 4-16.
111. LeClerc, S., et al., *Molecular cloning and characterization of a factor that binds the human glucocorticoid receptor gene and represses its expression*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17333-40.
112. Presman, D.M., et al., *Live Cell Imaging Unveils Multiple Domain Requirements for In Vivo Dimerization of the Glucocorticoid Receptor*. PLOS Biology, 2014. **12**(3): p. e1001813.

113. Vayssiere, B.M., et al., *Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(9): p. 1245-55.
114. Kinyamu, H.K. and T.K. Archer, *Estrogen Receptor-Dependent Proteasomal Degradation of the Glucocorticoid Receptor Is Coupled to an Increase in Mdm2 Protein Expression*. *Molecular and Cellular Biology*, 2003. **23**(16): p. 5867-5881.
115. Alexanian, R., B. Barlogie, and D. Dixon, *High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma*. *Ann Intern Med*, 1986. **105**(1): p. 8-11.
116. Distelhorst, C., *Glucocorticosteroids induce DNA fragmentation in human lymphoid leukemia cells*. *Blood*, 1988. **72**(4): p. 1305-1309.
117. AWMF, *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Akute lymphoblastische Leukämie – ALL - im Kindesalter. Langversion, 2016, AWMF-Registernummer: 025-014*. 2016.
118. Lu, Y.-S., et al., *Effects of glucocorticoids on the growth and chemosensitivity of carcinoma cells are heterogeneous and require high concentration of functional glucocorticoid receptors*. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2005. **11**(40): p. 6373-6380.
119. Sherlock, P. and W.H. Hartmann, *Adrenal Steroids and the Pattern of Metastases of Breast Cancer*. *JAMA*, 1962. **181**(4): p. 313-317.
120. Zhang, C., et al., *Dexamethasone desensitizes hepatocellular and colorectal tumours toward cytotoxic therapy*. *Cancer Letters*, 2006. **242**(1): p. 104-111.
121. Zhang, C., et al., *Corticosteroid-induced chemotherapy resistance in urological cancers*. *Cancer Biology & Therapy*, 2006. **5**(1): p. 59-64.
122. Iversen, H.-G. and G.H. Hjort, *The Influence of corticoid steroids on the frequency of spleen metastases in patients with breast cancer*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 1958. **44**(2): p. 205-212.
123. Pan, D., M. Kocherginsky, and S.D. Conzen, *Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer*. *Cancer research*, 2011. **71**(20): p. 6360-6370.
124. Block, T.S., et al., *Glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types using immunohistochemistry assay*. *Cancer Management and Research*, 2017. **9**: p. 65-72.
125. Drebert, Z., M. Bracke, and I.M. Beck, *Glucocorticoids and the non-steroidal selective glucocorticoid receptor modulator, compound A, differentially affect colon cancer-derived myofibroblasts*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015. **149**: p. 92-105.
126. Lesovaya, E., et al., *Combination of a selective activator of the glucocorticoid receptor Compound A with a proteasome inhibitor as a novel strategy for chemotherapy of hematologic malignancies*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(1): p. 133-44.
127. Lesovaya, E., et al., *Discovery of Compound A--a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity*. *Oncotarget*, 2015. **6**(31): p. 30730-44.
128. Bromberg-White, J.L. and C. Meyers, *Comparison of the basal and glucocorticoid-inducible activities of the upstream regulatory regions of HPV18 and HPV31 in multiple epithelial cell lines*. *Virology*, 2003. **306**(2): p. 197-202.
129. Gloss, B., et al., *The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones*. *The EMBO Journal*, 1987. **6**(12): p. 3735-3743.
130. von Knebel Doeberitz, M., et al., *Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991. **88**(4): p. 1411-1415.
131. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. *Cell*, 1990. **63**(6): p. 1129-1136.

132. Rutz, H.P., et al., *Dexamethasone-induced radioresistance occurring independent of human papilloma virus gene expression in cervical carcinoma cells*. *Strahlenther Onkol*, 1998. **174**(2): p. 71-4.
133. Lu, Y.S., et al., *Glucocorticoids enhance cytotoxicity of cisplatin via suppression of NF- κ B activation in the glucocorticoid receptor-rich human cervical carcinoma cell line SiHa*. *J Endocrinol*, 2006. **188**(2): p. 311-9.
134. Beyer, S., et al., *Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(3).
135. Kost, B.P., et al., *Glucocorticoid receptor in cervical cancer: an immunohistochemical analysis*. *Arch Gynecol Obstet*, 2019. **299**(1): p. 203-209.

F Danksagung

Es ist mir ein sehr großes Anliegen, mich an dieser Stelle bei allen Menschen zu bedanken, die das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

An erster Stelle möchte ich mich beim meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke bedanken. Er hat mir die Chance zu einer Promotion in seinem Labor gegeben, hat mich an das Thema herangeführt und stand bei Fragen unermüdlich zur Verfügung. Durch seine Expertise, seine Motivation zu Publikationen und seine konstruktive Kritik in den Besprechungen hat er mich maßgeblich bei dem Gelingen dieses Projektes unterstützt.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. med. Bernd Kost, der durch seine klinische Erfahrung meinen Horizont zu diesem Thema stets erweitert hat und daraus stets neue Ideen entwickelte. Zudem möchte ich Herr PD Dr. Thomas Kolben danken, der durch seine Unterstützung auch maßgeblich zur Vollendung der Dissertation beigetragen hat.

Allen dreien, Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke, Herrn Dr. med. Bernd Kost und PD Dr. Thomas Kolben möchte ich außerdem für die großartige Unterstützung zu Beginn meiner beruflichen Laufbahn herzlichst danken!

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Labors, für die freundliche Aufnahme und Betreuung. Mein Dank gilt insbesondere Frau Christina Kuhn und Simone Hofmann für die großartige Einweisung in die Immunhistochemie und die gute Betreuung. Bei der Durchführung der Experimente waren Sie immer hilfsbereit und sind mir bei Fragen und Problemen stets zur Seite gestanden.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, für ihre Motivation und Geduld, mit der sie mich durch diese Arbeit hindurch genauso wie über mein gesamtes Studium begleitet haben. Ohne ihre Unterstützung wäre das nicht möglich gewesen.

Vielen Dank!

