

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München



***Epigenetische Veränderungen am Zervixkarzinom
durch Lysin-spezifische Demethylase (LSD1) und Nuclear Re-
ceptor Co-Repressor (NCoR)***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Daniel Beilner

aus

Hanau

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Doris Mayr

Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Nina Ditsch

ggf. weitere Gutachter: _____

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Helene Hildegard Heidegger Steger

Dekan: Prof. Dr. med Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	9
1.1 Epidemiologie.....	9
1.2 Risikofaktoren	10
1.3 Prävention	11
1.4 Diagnostik und Therapie	12
1.5 Epigenetik	14
1.5.1 Lysin-spezifische Demethylase (LSD1)	16
1.5.2 Nuclear Receptor Co-Repressor (NCoR)	18
2 Zielsetzung.....	20
3 Methoden	21
3.1 Patientenkollektiv	21
3.2 Gewebeproben.....	23
3.3 Immunhistochemie	24
3.4 Statistik.....	29
4 Ergebnisse	30
4.1 LSD1	30
4.1.1 Allgemeine klinische & pathologische Parameter	30
4.1.2 Korrelationsanalysen	35
4.1.3 Cox Regression	36
4.1.4 Überlebensanalysen	37
4.2 NCoR	38
4.2.1 Allgemeine klinische und pathologische Parameter	38
4.2.2 Korrelationsanalysen	43
4.2.3 Cox Regression	44

4.2.4	Überlebensanalyse	45
5	Diskussion	46
6	Ausblick	56
7	Zusammenfassung.....	57
	Literaturverzeichnis	58
	Danksagung	67
	Lebenslauf	68
	Eidesstattliche Erklärung	69

Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
C	Celsius
Ca	Karzinom
COX-2	Cyclooxygenase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft e. V.
DKH	Deutsche Krebshilfe e. V.
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
FAD	Flavinadenindinucleotid-abhängige Aminooxidase
FDA	Amerikanische Food and Drug Administration
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GPER	G-Protein gekoppelter Östrogenrezeptor
HAT	Histon-Acetylase
HDAC	Histon-Deacetylase
HPV	Humane Papillomviren
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horse Radish Peroxidase)
IRS	Immunreaktiver Score
LCoR	Ligand-dependent-Corepressor
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LRX	Liver-X-Rezeptor
LSD1	Lysin-spezifische Demethylase 1
NCoR	Nuclear Receptor Corepressor

NSLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
Pap	Papanicolaou-Abstrich
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PPAR	Peroxisome-proliferator-activated-receptor-alpha
RIP140	Receptor-Interacting-Protein-140
RKI	Robert-Koch-Institut
STIKO	Ständige Impfkommission
T3	Thyroid-Hormon
TCP	Tranylcypromin
TMA	Tissue-Micro-Array
TSH	Thyreotropin
UICC	Union for International Cancer Control

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Steuerung der Transkription durch Histonmodifikation.....	15
Abbildung 2: Histon H3 Lysin 4 Demethylierung durch LSD1 nach Vorlage von Baron et al. (44)	16
Abbildung 3: Aufbau Objektträger	23
Abbildung 4: Berechnung Immunreaktiver Score	25
Abbildung 5: Schematischer Ablauf der immunhistochemischen Färbung	26
Abbildung 6:Boxplots pTStatus LSD1	30
Abbildung 7: Boxplots histologischer Subtyp.....	30
Abbildung 8: Boxplots Lymphknotenstatus.....	31
Abbildung 9: Boxplots FIGO und Grading (1).....	32
Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahmen LSD1 im Zervixkarzinom..	34
Abbildung 11: Kaplan-Meier Kurve zur Expression von LSD1 (1).....	37
Abbildung 12: Boxplots histologischer Subtyp NCoR.....	38
Abbildung 13: Boxplots pT-Status und pN-Status für NCoR.	39
Abbildung 14: Boxplots FIGO und Grading NCoR	40
Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahme NCoR im Zervixkarzinom.	42
Abbildung 16: Kaplan-Meier Kurve zur Expression von NCoR (2).....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM- und FIGO-Klassifikation nach AWMF S3-Leitline Zervixkarzinom (5)	13
Tabelle 2: Klinische und pathologische Parameter des Patientenkollektivs (1)	22
Tabelle 3: Übersicht der angewendeten Chemikalien und Lösungsmittel	27
Tabelle 4: Antikörper und Detektionssystem	27
Tabelle 5: Softwareanwendungen	28
Tabelle 6: Geräteübersicht	28
Tabelle 7: Weitere Materialien der immunhistochemischen Färbung	28
Tabelle 8: Klinische Parameter von LSD1 im Zervixkarzinom (1)	33
Tabelle 9: Korrelation LSD1 zu GPER, FIGO, LCoR, E6 und Galectin 3 (1)	35
Tabelle 10: Korrelation LSD1 zu mutierten p53, Prostaglandin E2 Rezeptor 3, p16 und methyliertem Histon H3	35
Tabelle 11: Cox Regression LSD1	36
Tabelle 12: Übersicht klinische Parameter NCoR (2)	41
Tabelle 13: Korrelationen NCoR zu Onkoprotein E6, FIGO, acetyliertes Histon H3 K9 und p53 (2)	43
Tabelle 14: Cox Regression zu NCoR (2)	44

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Mit etwa 570 000 neuen Fällen im Jahr 2018 ist das Zervixkarzinom die viert häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit (3). 2016 lag die Zahl an Neuerkrankungen in Deutschland bei 4380 Frauen (4). Das Robert-Koch-Institut (RKI) ermittelte das mittlere Erkrankungsalter für invasive Karzinome zu diesem Zeitpunkt bei 55 Jahren (4). Das in-situ Karzinom dagegen wurde im Mittel an circa 20 Jahre jüngeren Frauen in der Vorsorgeuntersuchung diagnostiziert (4). Durch die Einführung gesetzlicher Krebsfrüherkennungsprogramme hat die Inzidenz des Zervixkarzinoms in Deutschland in den letzten 30 Jahren dadurch deutlich abgenommen (5). Allerdings blieb in den letzten 10 Jahren trotz gesetzlicher Vorsorgeprogramme eine weitere deutliche Reduktion von Morbidität und Mortalität des Zervixkarzinoms aus (5). Trotz Fortschritte in Diagnostik und Therapie konnte bei der Anzahl an Sterbefällen nur eine kleine Reduktion erzielt werden (5). Das 5-Jahres-Überleben lag in Deutschland für Frauen über 15 Jahren zwischen 2000 bis 2007 bei 64% und somit über dem europäischen Durchschnitt von 62% (6). Vor allem im Vergleich zu osteuropäischen Ländern ist der Unterschied jedoch dramatisch (7). In Osteuropa liegt das 5-Jahres-Überleben bei 57% mit der niedrigsten Wahrscheinlichkeit in Bulgarien und Lettland mit lediglich etwa 51% (6).

Im weltweiten Vergleich zeigen sich jedoch noch deutlichere Unterschiede zwischen Wohlstandsländern und Entwicklungsländern (4, 8). Etwa 90% der Todesfälle durch das Zervixkarzinom sind in Entwicklungsländern (7). Aufgrund logistischer, kultureller und finanzieller Hindernisse fehlt es beispielsweise in einkommensschwachen Regionen Afrikas an einer flächendeckenden Vorsorge (8). Damit geht die Möglichkeit verloren präkanzeröse Läsionen frühzeitig zu entdecken und zu behandeln (7). Das Zervixkarzinom stellt in diesen Regionen die zweit häufigste Tumorerkrankung der Frau im Alter von 15 bis 44 Jahren dar (9). Es ist dabei die häufigste Krebstodesursache der Frau in Afrika (9). Insbesondere in einigen Ländern der afrikanischen Subsahararegion kommt das Zervixkarzinom häufiger als Brustkrebs vor und stellt dort die häufigste Krebserkrankung der Frau da (10). Für Frauen in Teilen Afrikas ist das Zervixkarzinom somit eine schwere Belastung (11). Weitere Untersuchungen zur Verbesserung von Vorsorge, Impfung und Therapie sind für diese Regionen von besonderer Bedeutung (11).

1.2 Risikofaktoren

Als Hauptursache für die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs gelten sexuell übertragene humane Papillomviren (HPV), die zu einer Infektion von zervikalen Epithelzellen führen (4). Über 100 HPV-Subtypen wurden bereits identifiziert (12). Davon ist bei über 30 bekannt, dass sie zu einer Infektion der Zervix führen können (13). In nahezu allen Fällen eines Zervixkarzinoms konnte die DNA eines Hochrisikosubtypen nachgewiesen werden (13). Insbesondere eine anhaltende Infektion mit den Hochrisikotypen HPV 16 und 18 kann zu einem Zervixkarzinom führen, wobei HPV 16 mit etwa 50% am häufigsten für die Entstehung verantwortlich ist (4, 13). Die HPV-Typen 31, 33, 35, 45, 52 sowie 58 kommen jedoch ebenfalls weltweit häufig vor (7).

Bei der Infektion kommt es zunächst zu einer Infizierung der sich teilenden Basalzellen in der zervikalen Schleimhaut (13). Das virale Erbgut wird dabei extrachromosomal, als Episom, in die Zelle integriert und führt zur Replikation viraler Proteine (13). Niedrigrisiko Subtypen sind nur sehr selten mit Zervixkarzinomen assoziiert, können jedoch zur Bildung von Genitalwarzen führen (13). Bei solch einer Infektion ist die virale Genexpression noch achtsam reguliert (13). Eine persistierende HPV-Infektion mit einem Hochrisikosubtyp kann zu einer deregulierten viralen Genexpression führen (14). In den infizierten Zellen kommt es zunehmend zu genetischen Schäden durch eine exzessive Zellproliferation und unzureichende DNA-Reparaturmechanismen (14). Bei Infizierten, die über einen langen Zeitraum keine Ausheilung der Infektion erzielen können, kann es somit zu einer malignen Entartung der Zellen kommen (13).

Für Frauen mit einer Immunschwäche besteht daher ein besonderes Risiko. Vor allem für Frauen mit einer positiven HIV-Infektion stellt sich diese Konstellation problematisch dar (15). Ebenso aber zählen auch andere sexuell übertragbare Erreger wie Chlamydia trachomatis oder Herpes-simplex Typ 2 als Risikofaktoren (16, 17). In der Zusammenschau sind für eine HPV-Infektion und die Entstehung eines Zervixkarzinoms das Sexualverhalten von herausragender Bedeutung (18).

Auch hormonelle Einflüsse konnten als Risikofaktoren identifiziert werden. Dazu zählt zum einen die Langzeittherapie mit hormoneller Kontrazeption (19). Im Zusammenhang mit einer HPV-Infektion konnte bei einer Therapiedauer von über zehn Jahren ein vierfach erhöhtes Risiko gemessen werden (20).

Als weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines Zervixkarzinoms hat sich daneben auch der Nikotinkonsum etabliert (21). Ebenso zeigt sich eine Korrelation zu einem niedrigen sozioökonomischen Status und niedrigem Bildungsniveau (22).

1.3 Prävention

Durch Prävention kann die Therapie des Zervixkarzinoms durch einfache Methoden entscheidend beeinflusst werden (23). Die Inzidenz der Erkrankung ist daher mit der medizinischen Infrastruktur und der Verfügbarkeit von Vorsorgeprogrammen entsprechend verbunden (23).

In primärer Instanz kann in den meisten Fällen durch eine HPV-Impfung ein Zervixkarzinom verhindert werden (24). Eine Impfung gegen HPV für Jungen und Mädchen im Alter vom 9 bis 14 Jahren mit 2 Impfdosen im Abstand von mindestens 5 Monaten wird von der Ständigen Impfkommission (STIKO) empfohlen (25). Zurzeit stehen drei HPV-Impfstoffe zur Verfügung, die alle einen Schutz gegen HPV 16 und 18 bieten (7). Die bundesweite Impfquote für 15-jährige Mädchen mit abgeschlossener Impfung lag 2011 jedoch nur bei 26,5% (26). Bis zum Jahr 2015 ist sie nur leicht auf 31,3% angestiegen (26). Auch nach einer erfolgreichen Immunisierung ist eine weitere zytologische Vorsorge jedoch nötig, da die Impfung nicht gegen alle onkogenen Subtypen schützt (24). Ein Impfprogramm gegen HPV steht in einigen afrikanischen Ländern jedoch noch nicht ausreichend zur Verfügung (11). Besonders dort fehlt es jedoch an medizinischen Vorsorgeeinrichtungen zur Früherkennung und die Mortalität des Zervixkarzinoms ist entsprechend hoch (27).

Die Sekundärprävention des Zervixkarzinom fußt auf zwei Säulen (28). Sie besteht zum einem aus der seit 1971 in Deutschland durchgeführten zytologischen Untersuchung der Zervix (29). Mit dem Papanicolaou-Abstrich (Pap) steht schon mehrere Jahre eine einfache und günstige zytologische Untersuchungsmethode zur Verfügung (23). Dadurch können präkanzeröse Läsionen nachgewiesen werden, um sie im Frühstadium zu therapieren (28). Die zweite Säule bildet der Nachweis einer HPV-Infektion (28). Dazu gibt es von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassene HPV-Tests (23). Dabei erfolgt der Test von HPV durch den Nachweis von HPV-DNA, HPV-RNA oder durch zelluläre Marker, die durch die maligne Veränderung der Zelle entstehen (23).

Im Screening Programm des gemeinsamen Bundesausschusses (G-BA) sollen seit 2020 Frauen mit 20 Jahren jährlich einen Pap-Abstrich in Deutschland durchführen lassen können (29). Ab 35 Jahren steht eine Kombinationsuntersuchung aus Pap-Abstrich und HPV-Testung zur Verfügung (29). Frauen sollen dazu regelmäßig durch ihre Krankenkasse informiert werden (29).

1.4 Diagnostik und Therapie

Bei Auffälligkeiten oder positivem HPV-Test besteht die Empfehlung zur Untersuchung der Zervix unter Lupenvergrößerung (Kolposkopie) und Biopsie (7). Die Einteilung des Zervixkarzinoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC) und der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) (7). Dazu gehört die Bestimmung der Tumorgroße, die Invasion von Blase, Rektum, Vagina oder Parametrien, sowie der Nachweis von Fernmetastasen (7). Die genaue Beschreibung zum entsprechenden UICC/TNM- und FIGO-Stadium zeigt Tabelle 1.

Für die Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms wurde eine S3-Leitlinie durch die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. (DKG) und der Deutschen Krebshilfe e. V. (DKH) entwickelt (5). Sie empfiehlt einen vaginalen Ultraschall zur Beurteilung der lokoregionären Tumorausbreitung (5). Ebenso ist ein Nierenscanschall obligat durchzuführen (5). Bei fortgeschrittenen Tumorstadium sollen ergänzende Bildgebungen durch MRT oder CT von Becken, Abdomen und Thorax erfolgen (5). Anhand des histologischen Tumorstadiums, operativen Stagings und interventioneller Diagnostik kann die Therapieplanung erfolgen (5). Bei Risikopatienten kann eine neoadjuvante Therapie nötig sein (5). Eine zusätzliche adjuvante Therapie wird anhand der postoperativen Situation entschieden. Eine derartige Empfehlung besteht bei unvollständiger Resektion, positiven Lymphknotenbefund oder mehr als 3 Risikofaktoren (5). Zu den Risikofaktoren zählt eine tiefe Stromainvasion, Tumorgroße über 4 cm oder die Invasion von Lymphgefäßen oder Venen (5). Dazu erfolgt eine Chemo- oder Radiochemotherapie mit Bestrahlung des betroffenen Lymphabflussgebietes (5). Beim Vorliegen von Fernmetastasen besteht die Empfehlung zur systemischen Chemotherapie (5). Mikroinvasive Karzinome können bei Kinderwunsch durch Konisation oder Trachelektomie fertilitätserhaltend operiert werden (5). Für Frauen im reproduktionsfähigen Alter besteht häufig der Wunsch nach einer fertilitätserhaltenden Therapie (7). Nach erfolgreicher Kinderplanung sollte jedoch die sekundäre Hysterektomie erfolgen (5). Bei größeren Karzinomen erfolgt standardmäßig in der Regel eine radikale Hysterektomie (5).

Die Therapie mit molekularen Markern für eine personalisierte Therapie ist noch nicht ausreichend fortgeschritten (7). Trotz Fortschritt in der Therapie haben sich die Überlebensdaten in den letzten Jahren wenig verbessert (30). Mit der Untersuchung weiterer Biomarker zur Tumorprogression könnte die Diagnostik und Therapie weiterentwickelt werden (31). Die Bedeutung von Medikamenten mit Auswirkung auf epigenetische Veränderungen ist beim Zervixkarzinom noch nicht eindeutig geklärt (30).

TNM	FIGO	Beschreibung
TX	-	Nicht beurteilbar
T0	-	Kein Nachweis für Primärtumor
Tis		Carcinoma in-situ
T1	I	Tumor auf Zervix beschränkt
>T1a	Ia	Mikroinvasives Karzinom bis maximal 5,0 mm Tiefe, gemessen von der Basis des Epithels und horizontaler Ausbreitung bis max. 7,0 mm
>T1a1	Ia1	Bis zu 3,0 mm Stromainvasion und bis zu 7,0 mm in horizontaler Ausbreitung
>T1a2	Ia2	3,0 mm bis 7,0 mm Stromainvasion mit horizontaler Ausbreitung bis zu 7,0 mm
T1b	Ib	Makroskopisch sichtbare Läsion, auf die Zervix beschränkt
>T1b1	Ib1	Makroskopisch sichtbare Läsion bis zu 4,0 cm in max. Ausdehnung
>T1b2	Ib2	Makroskopisch sichtbare Läsion von mehr als 4,0 cm in max. Ausdehnung
T2	II	Infiltration außerhalb des Uterus, aber nicht bis zur Beckenwand sowie nicht bis zum unteren Drittel der Vagina
>T2a	Ila	Tumorausbreitung in die Scheide (proximales und/oder mittleres Drittel), aber keine Infiltration des Parametriums
>T2a1	Ila1	Makroskopisch sichtbare Läsion bis zu 4,0 cm
>T2a2	IIA2	Makroskopische Läsion von über 4,0 cm in max. Ausdehnung
>T2b	IIB	Tumordinfiltration von Parametrium, jedoch nicht bis zur Beckenwand
T3	III	Ausbreitung bis zur Beckenwand oder Befall des unteren Drittels der Vagina oder Hydronephrose
>T3a	IIIA	Tumordinfiltration des unteren Vagina Drittels, jedoch keine Ausbreitung bis zur Beckenwand
>T3b	IIIB	Tumorausbreitung bis zur Beckenwand mit oder ohne Hydronephrose
T4	IV	Tumordinfiltration von Blase oder Rektum oder außerhalb des kleinen Beckens

Tabelle 1: TNM- und FIGO-Klassifikation nach AWMF S3-Leitlinie Zervixkarzinom (5)

1.5 Epigenetik

Für die Differenzierung von Zellen und Regulierung zellulärer Prozesse ist zum einem das Genom, in Form der DNA-Sequenz, als auch das Epigenom entscheidend beteiligt (32). Durch epigenetische Veränderungen können Genabschnitte aktiviert oder inhiert werden (33). Die dadurch regulierte Genexpression trägt maßgeblich zum physiologischen Erhalt zellulärer Funktionen bei (32). Eine Störung der epigenetischen Regulierungsmechanismen kann dagegen zu einer gestörten Zelldifferenzierung und malignen Entartung führen (32).

Die DNA und daran assoziierte Proteine bilden das Chromatin einer Zelle (34). Etwa die Hälfte der Chromatinmasse machen die Histon-Moleküle aus (34). Der DNA-Strang windet sich um ein Histonoktamer aus je zwei Histon-Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 (34). Durch die Umwindung der DNA-Helix um Proteine, wie Histon-Moleküle, wird der DNA-Strang kompakt gehalten (35). Diese dienen der Verdichtung und Organisation des DNA-Strangs (34). Ein Viertel der Histone besteht aus den Aminosäuren Lysin und Arginin (34). Diese sind positiv geladen und verstärken dadurch die Interaktion mit der negativ geladenen DNA (34). Dicht gepacktes Chromatin ist weniger empfindlich für Enzyme, die an der Genexpression mitwirken (34).

Zu einem der Hauptbestandteile epigenetischer Modifikationsmechanismen zählt die Histon-Modifikation (32). Mittlerweile sind eine Vielzahl an Histon-Modifikationen gefunden worden (36). Dazu zählt zum einen auch die Acetylierung von Histonen. Durch die Histon-Acetylierung kommt es zu einer Abnahme der positiven Ladung (36). Dadurch liegt das Chromatin wieder weniger kompakt vor und ist für Transkriptionsfaktoren leichter erreichbar (36). Im Gegensatz zur Acetylierung hat die Methylierung von Histonen keinen Einfluss auf die Ladung. Die Methylierung erfolgt dabei an den Aminosäuren Lysin und Arginin (36). Lysin kann ein-, zwei- und dreifach methyliert sein (37). Bei Arginin findet man dagegen eine ein- oder zweifache Methylierung, die symmetrisch oder asymmetrisch vorliegt (37). Diese methylierten Histone können von Enzymen erkannt werden, um sie für eine Bindung an die DNA zu nutzen (36). Abbildung 1 zeigt beispielhaft die Regulierung der Transkription durch Methylierung und Acetylierung von Histonen.

Am untersuchten Patientenkollektiv aus 250 Patientinnen mit Zervixkarzinom konnte aus vorherigen Untersuchungen bereits nachgewiesen werden, dass Veränderungen an der Chromatinstruktur eine wichtige Rolle beim Zervixkarzinom spielen (38). Unter anderem zeigte die Acetylierung und Methylierung von Histon H3 einen Einfluss auf das Gesamtüberleben und das Rezidiv-freie Überleben (38).

Die weitere Vielzahl an Modifikationsmöglichkeiten an Histonen ist komplex und diese stehen vermutlich miteinander in Verbindung zur Regulierung und Feinabstimmung des Chromatins (36). Dadurch unterliegt die Chromatinstruktur einer feinen Regulierung (36). Die meisten epigenetischen Veränderungen sind dabei reversibel und die medikamentöse Kontrolle daran beteiligter Enzyme somit vielversprechend (33).

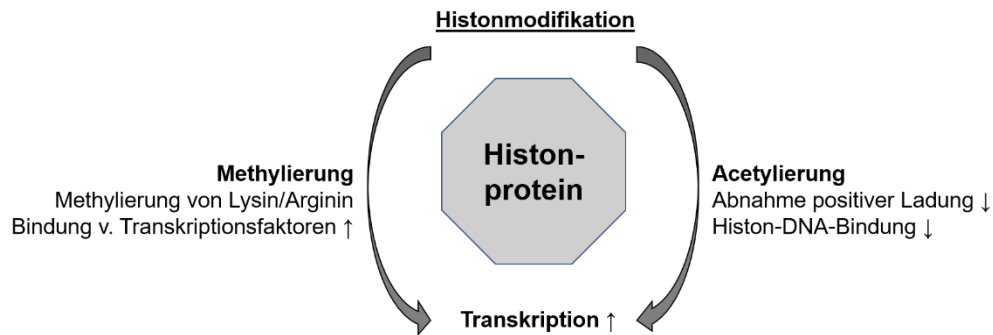


Abbildung 1: Steuerung der Transkription durch Histonmodifikation

1.5.1 Lysin-spezifische Demethylase (LSD1)

Veränderungen an der Chromatinstruktur durch Enzyme sind wichtige Bestandteile für eine korrekte Transkription und Zellregulation (39). Das Interesse an solchen Enzymen, die an der Modifikation der Chromatinstruktur beteiligt sind, war in den letzten Jahren daher sehr hoch (40).

Als erstes Enzym mit Funktion einer Histon-Demethylase wurde 2004 die Lysine-spezifische Demethylase (LSD1) beschrieben (41). Zuvor wurde bei der Methylierung von einer dauerhaften Veränderung ausgegangen (41). Man ging von der Hypothese aus, dass das ganze Histon-Molekül stattdessen ausgetauscht wurde (42). LSD1 gehört zu der Familie von Flavinadenindinucleotid-abhängigen (FAD) Aminooxidasen (39). Durch die Reduktion des Coenzym FAD erfolgt die Demethylierung der Aminosäure Lysin (43). Durch Sauerstoff erfolgt unmittelbar eine erneute Oxidation zu FAD (43). Das verbliebene Kation reagiert mit H_2O zu Formaldehyd und dem verblieben demethylierten Lysin (43). Im speziellen kann LSD1 vermutlich spezifisch mono- und dimethyliertes Lysin 4 von Histon H3 demethylieren, wie in Abbildung 2 dargestellt (41). Neben dem Coenzym FAD braucht LSD1 jedoch auch weitere Proteine, um seine Enzymaktivität ausüben zu können (39). Dazu zählt die Komplexbildung mit Histondeacetylasen und anderen Transkriptionsregressoren (39). Die Enzymaktivität von LSD1 führt insgesamt zu einer Hemmung der Transkriptionsaktivität (41). Mit den Erkenntnissen über die Funktionen von LSD1 ist bei der Methylierung von Histonen vermutlich von einem dynamischen Prozess auszugehen (41).

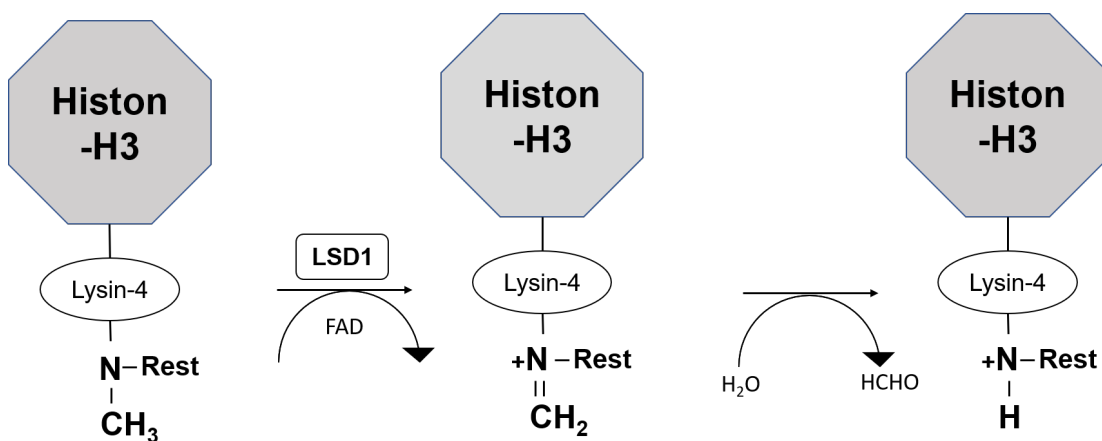


Abbildung 2: Histon H3 Lysin 4 Demethylierung durch LSD1 nach Vorlage von Baron et al. (44)

Eine Überexpression von LSD1 konnte bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen werden (45, 46). Beispielsweise konnten Analysen zum Neuroblastom eine Überexpression von LSD1 nachweisen (47). Bei der Untersuchung von Pankreaskarzinomen zeigten sich ebenfalls hohe LSD1 Expressionen des Tumorgewebes (48). Eine Hemmung von LSD1 führte beim Pankreaskarzinom des Weiteren zu einer inhibierten Proliferation (48). Auch beim hepatozellulären Karzinom zeigte sich eine signifikante Erhöhung von LSD1 (49). Bei Östrogen-negativen Brusttumoren führte eine Hemmung von LSD1 zur Inhibierung von Proliferationsgenen (50).

Zusammenfassend zeigt LSD1, mit den bereits bekannten enzymatischen Funktionen und nachgewiesener Überexpression in unterschiedlichen Karzinomen, ein bedeutsames onkogenes Potenzial (39). LSD1 stellt somit ein potenziell attraktives Zielmolekül für die Krebstherapie dar (46).

1.5.2 Nuclear Receptor Co-Repressor (NCoR)

Nukleäre Rezeptoren können durch Bindung eines Liganden die Genexpression beeinflussen (51). Zum einen besitzen sie eine DNA-bindende Domäne, sowie eine Domäne zur Bindung von Liganden (51). Liganden-gebundene nukleäre Rezeptoren können so als Transkriptionsfaktoren wirken (51). Bereits 49 nukleäre Rezeptoren wurden beschrieben, jedoch sind die Liganden bei einer Vielzahl noch unbekannt (51). Über die Liganden-bindende Domäne kann eine Interaktion mit Co-Repressoren und Co-Aktivatoren stattfinden (51). Dadurch kann ebenfalls eine Aktivierung und Inhibierung von Genabschnitten erfolgen (52). Zur Gruppe der Co-Repressoren zählt der Ligand-dependent-Corepressor (LCoR) und Receptor-Interacting-Protein-140 (RIP140) (53, 54). Am untersuchten Patientenkollektiv konnte in Vorarbeiten festgestellt werden, dass RIP140 und LCoR unabhängige Marker für ein schlechteres Überleben beim Zervixkarzinom sind (55).

Zu einem der erstbeschriebenen Co-Repressoren zählt NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) (56). Die Bedeutung von NCoR in zahlreichen physiologischen Vorgängen wurde bereits untersucht (57). Dazu zählt unter anderem der Einfluss auf metabolische Prozesse, wie im Muskelgewebe und Fettgewebe (58, 59). Aber auch in pathologischen Vorgängen, wie der Entstehung von Tumoren, zeigt die Untersuchung von NCoR Bedeutung (57, 60). Die Funktion von NCoR in der Regulierung von Genen ist komplex (57). Es zeichnet sich ab, dass NCoR als Gerüst zur Rekrutierung von Proteinen mit sehr unterschiedlichen Interaktionspartnern dient (61). Besonders interessant ist die Komplexbildung von NCoR mit Histon-Deacetylasen (HDAC), die hauptsächlich zur Inaktivierung von DNA-Abschnitten führen kann (57). Der Acetylierungsstatus durch HDAC und Histon-Acetylasen (HAT) zählt zu den bestbeschriebenen epigenetischen Modifikationen (62). NCoR besitzt eine Domäne mit der es spezifisch HDAC3 rekrutieren und aktivieren kann (63). Eine weitere Domäne kann direkt mit dem Histon-Molekül interagieren (64).

Zusätzlich zeigt NCoR eine Assoziation mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren (57). Dazu zählen die bereits erwähnten nukleären Rezeptoren, wie Vitamin-D-Rezeptor, Peroxisome-proliferator-activated-receptor-alpha (PPAR) oder Liver-X-Rezeptoren (LRX) als Beispiele (65-67). Daneben gibt es eine diverse Vielzahl an weiteren spezifischen Transkriptionsfaktoren, die in Interaktion mit NCoR treten können (68). Ein besonderes Augenmerk gilt der Interaktion von NCoR mit Hormonrezeptoren und der verbundenen Genaktivität (69). Nukleäre Hormonrezeptoren können nach Bindung des Liganden spezifisch die Expression einzelner Gene beeinflussen (34). NCoR kann durch die Bindung an Östrogen-Rezeptoren und Progesteron-Rezeptoren diese Aktivität mitmodulieren (70, 71). Bei der Hormontherapie des

Endometriumkarzinoms konnten beispielsweise eine erhöhte NCoR Expression festgestellt werden (72). Es besteht daher die Vermutung, dass NCoR dadurch auf die medikamentöse Wachstumshemmung mitwirkt (72). Ebenso wird der Einfluss von NCoR und Östrogen-Rezeptor beim Mammakarzinom diskutiert (73). Aber auch bei nicht gynäkologischen Tumorerkrankungen, wie bei Karzinomen des Ösophagus und der Prostata wurden Zusammenhänge mit NCoR gefunden (74, 75). In Verbindung mit der Casein Kinase 2 deuteten die Untersuchungsergebnisse auf ein onkogenes Potential von NCoR beim Ösophaguskarzinom hin (74). Beim Prostatakarzinom zeigte sich ebenfalls, dass die Casein Kinase 2 vermittelte Phosphorylierung von NCoR zu einem Nachteil im Überleben führt (75).

Insgesamt zeigt sich, dass NCoR einen Einfluss auf Malignitätskriterien bei Tumoren hat, dazu zählen wichtige Faktoren, wie Tumorwachstum oder Metastasierung (57, 60). Die komplexe Funktion von NCoR, insbesondere der Kontrolle epigenetischer Modifikationen, machen es als Marker für Diagnostik und Prognose in der Krebstherapie interessant (60).

2 Zielsetzung

Epigenetische Modifikationen zeigten in den Voruntersuchungen der 250 Patientinnen mit Zervixkarzinom eine herausragende Bedeutung. Dabei konnte bereits ein direkter Zusammenhang von Überleben und Histonmodifikation gezeigt werden (38). Insbesondere die Acetylierung und Methylierung von Histon H3 wurde in diesem Zusammenhang untersucht (38). Mit LCoR konnte dabei ebenfalls am Patientenkollektiv bereits ein Co-Repressor als Marker für das Überleben bestimmt werden (55). Mit Hilfe immunhistochemischer Färbung sollte die Expression von LSD1 und NCoR -unter der Hypothese, dass die epigenetischen Modifikationen durch LSD1 und NCoR einen bedeutsamen Einfluss auf das Zervixkarzinom haben- am bekannten Patientenkollektiv untersucht werden. Dazu sollte die Expressionsstärke beider Proteine im Zusammenhang mit klinischen und pathologischen Parametern, sowie dem Überleben gebracht werden. Sowohl LSD1 als auch NCoR könnten damit als potentielle Therapieziele identifiziert werden, um sie für eine spezialisierte Behandlung beim Zervixkarzinom nutzen zu können. Ebenso könnte man sich die Expression von beiden Proteinen als diagnostischen Faktor für die Identifizierung von Risikogruppen zu Nutze machen (1, 2).

3 Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 250 Patientinnen die zwischen 1993 und 2002 an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) an einem Zervixkarzinom behandelt wurden. Darunter waren 141 Patientinnen 50 Jahre alt oder jünger. Bei 105 Patientinnen lag das Alter über 50 (1).

In der pathologischen Aufarbeitung der Präparate zeigte sich in Bezug auf die Tumorgroße bei 111 Patientinnen ein T1-Tumor, bei 128 Patientinnen ein T2-Tumor und 9 Patientinnen einen T3- oder T4-Tumor. Des Weiteren wurde bei 97 Patientinnen ein positiver Lymphnotenbefall in der pathologischen Untersuchung festgestellt. Im restlichen Kollektiv waren die Lymphknoten negativ oder nicht verzeichnet (1).

Anhand der FIGO-Klassifikation wurden 64 Patientinnen nach FIGO I klassifiziert, 48 nach FIGO II, 37 nach FIGO III und 7 nach FIGO IV. Bei 94 Patientinnen war eine FIGO-Klassifikation unbekannt (1).

Im Grading zeigten 20 Patientinnen ein Grading der Stufe 1. Mit einer Anzahl von 143 hatten die meisten Patienten des Kollektivs ein G2 Grading. Bei 78 Patientinnen lag ein Grading G3 vor und bei 9 Patientinnen war kein Grading verfügbar (1).

In das Kollektiv wurden die beiden häufigsten histologischen Subtypen (Plattenepithel- und Adenokarzinom) eingeschlossen. Aufgrund der Seltenheit wurden andere Subtypen aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Mit 202 Patientinnen machte das Plattenepithelkarzinom den Großteil aus. 48 Patientinnen hatten ein Adenokarzinom (1).

Innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 235 Monaten zeigten 190 Patientinnen kein Rezidiv. Bei 58 Patientinnen wurde jedoch ein Rezidiv verzeichnet. Bei 2 Patientinnen war keine Angabe möglich (1).

Eine Übersicht über die aufgezählten Patientenparameter des untersuchten Kollektivs gibt Tabelle 2.

Parameter	Anzahl (n=250)	%
Alter		
≤50 Jahre	141	56,4
>50 Jahre	105	42,0
n/a	4	1,6
pT		
T1	111	44,4
T2	128	51,2
T3/T4	9	3,6
pN		
positiv	97	38,8
negativ	151	60,4
n/a	2	0,8
FIGO		
I	64	25,6
II	48	19,2
III	37	14,8
IV	7	2,8
n/a	94	37,6
Grading		
G1	20	8,0
G2	143	57,2
G3	78	32,2
n/a	9	3,6
Histologie		
Platten-Ca	202	80,8
Adeno-Ca	48	19,2
Rezidive		
Keine	190	76,0
≥1	58	23,2
n/a	2	0,8

Tabelle 2: Klinische und pathologische Parameter des Patientenkollektivs (1)

3.2 Gewebeproben

Die Gewebeproben der Patientinnen wurden, nachdem keine weitere klinische Verwendung nötig war, zunächst in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Bis zur weiteren Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung erfolgte eine lichtgeschützte Lagerung bei Raumtemperatur. Aus den Gewebeproben jeder Patientin wurden anschließend mit einer Hohlnadel drei Tumorstanzen mit einem Durchmesser von 1,0 mm entnommen. Die gewonnen Gewebestanzen wurden anschließend auf einen gemeinsamen Paraffinblock übertragen (Tissue-Micro-Array/TMA). Daraufhin wurden die fertiggestellten Paraffinblöcke geschnitten und auf Objektträger übertragen. Jeweils drei Stanzen pro Patientin wurden in einem Abstand von 1,5 mm zueinander platziert. Insgesamt enthielt ein Objektträger jeweils Tumorproben von bis zu 49 Patientinnen mit entsprechend drei unterschiedlichen Tumorstanzen. Der Abstand zwischen unterschiedlichen Patientenfällen betrug 2,5 mm. Insgesamt wurden somit 7 Objektträger erzeugt, mit jeweils drei Tumorstanzen der 250 Patientinnen. Der letzte Objektträger enthielt entsprechender Weise die restlich verbliebenen 15 Patientenfälle. Der schematische Aufbau des Objektträgers ist in Abbildung 3 dargestellt. Anhand der Gewebeproben auf dem Objektträger wurde die weitere immunhistochemische Färbung wie folgend beschrieben durchgeführt.

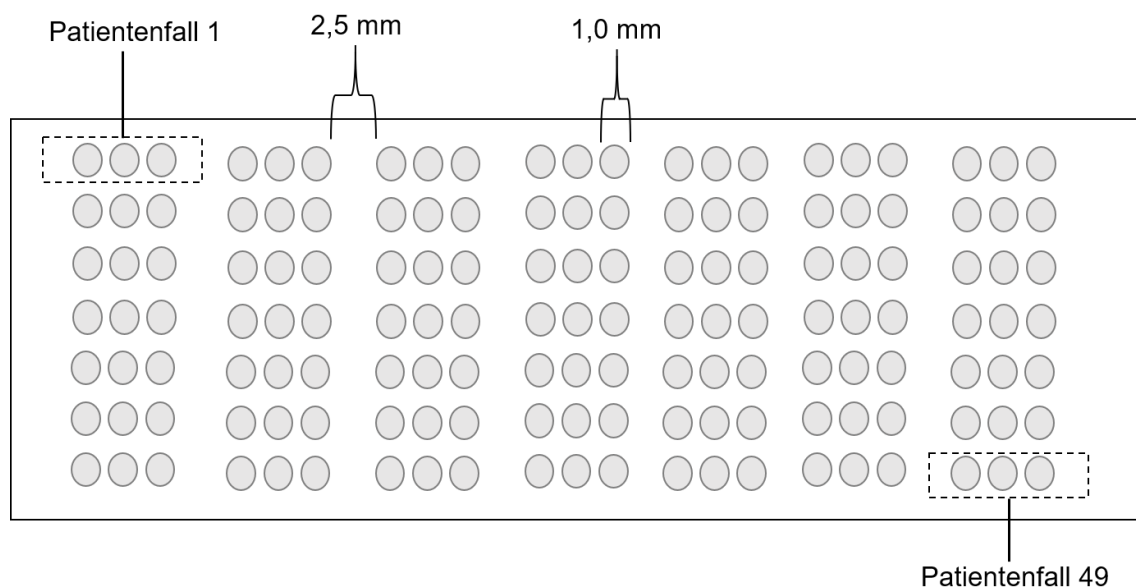


Abbildung 3: Aufbau Objektträger

3.3 Immunhistochemie

Im ersten Schritt wurden die Objektträger mit den Tumorproben für 20 Minuten in Roti-clear entparaffiniert. Danach wurden die Proben in 100% Ethanol getaucht. Anschließend folgte für 20 Minuten ein Bad in 3%iger H_2O_2 /Methanol-Lösung, um die endogene Peroxidase zu inhibieren. Im nächsten Schritt wurden die Proben in einer deszendierenden Alkoholreihe von 100% Ethanol, 70% Ethanol und 50% Ethanol nacheinander geschwenkt. Danach erfolgte eine Spülung in destilliertem Wasser (1).

Für die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte eine Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf. Hierzu erfolgte die Herstellung eines Natrium-Citrat-Puffers. Dieser setzte sich aus einer Lösung mit 21,01g Citronensäure in einem Liter destillierten Wasser (Lösung A) und 29,41g Natrium-Citrat in einem Liter destillierten Wasser (Lösung B) zusammen. Zum Erreichen eines pH-Puffers von 6,0 wurden 18 Milliliter der Lösung A mit 82 Milliliter der Lösung B und 900 Milliliter destillierten Wasser in den Dampfkochtopf gegeben. Der Puffer wurde anschließend zum Kochen gebracht und die Tumorproben darin für 5 Minuten unter Druck gekocht. Nach Öffnen des Dampfkochtopfes wurde der Puffer durch Zulauf von fließendem Leitungswasser langsam abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült und nochmals zwei Mal zwei Minuten in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen (1).

Als nächster Schritt erfolgte eine Blockierung der Ladungen auf den Gewebeproben, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Dazu wurden die Gewebeproben für fünf Minuten mit Power Block™ Universal Blocking Reagenz bedeckt. Danach wurde die Lösung abgekippt und der Objektträger vorsichtig mit einem Tuch gereinigt (1).

Es erfolgte anschließend die Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-NCoR und Anti-LSD1 für 16 Stunden bei 4°C im Kühlschrank. Dazu wurde ein polyklonaler Kaninchen-IgG-Antikörper der Firma Abcam für NCoR verwendet (Bestellnummer: ab3482; Lot.Nr: GR3193551-5; Konzentration 0,7 mg/ml). Für Anti-LSD1 wurde ein polyklonaler Kaninchen-IgG-Antikörper genutzt der Firma Novusbio (Bestellnummer: NB100-536; Lot.Nr.: A1; Konzentration 1mg/ml). Bei Anti-NCoR und Anti-LSD1 erfolgte eine Verdünnung der Konzentration in einem Verhältnis von 1 zu 500 in PBS (1).

Nach Ablauf von 16 Stunden wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Gewebeproben für zwei Mal zwei Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte eine weitere Inkubation mit Post-Block-Lösung für 20 Minuten. Anschließend wurden die Proben erneut in PBS für zwei Mal zwei Minuten gewaschen (1).

Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation der Gewebeproben mit Maus/Kaninchen-HRP-Polymer der Firma Zytomed (Nr. POLHRP-100) für 30 Minuten. Danach folgte ein erneuter Waschvorgang für zwei Mal zwei Minuten in PBS (1).

Darauf folgte die einminütige Substratfärbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) der Firma Dako (Bestellnummer: K3468). Diese setzte sich zusammen aus 1 Milliliter Substratpuffer und einem Tropfen DAB-Chromogen. Anschließend erfolgte zwei Mal zwei Minuten eine Waschung in destilliertem Wasser, um die Farbreaktion zu stoppen. Danach wurde eine Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer für zwei Minuten durchgeführt. Abschließend wurden die Gewebeproben für 5 Minuten in Leitungswasser gebläut, danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Roticlear getränkt. Abschließend wurden die Objektträger mit Roti-Mount eingedeckt (1).

Als Positivkontrolle der immunhistochemischen Färbung diente bei Anti-NCOR Plazenta-Gewebe mit Anfärbung der extravillösen Trophoblastenzellen. Ebenso zeigte jedoch auch Sigma-Gewebe positive Anfärbungen in Epithel, in Lamina Propria und Lymphfollikeln. Bei Anti-LSD1 diente die Anfärbung von extravillösen Trophoblasten im Plazentagewebe als Positivkontrolle.

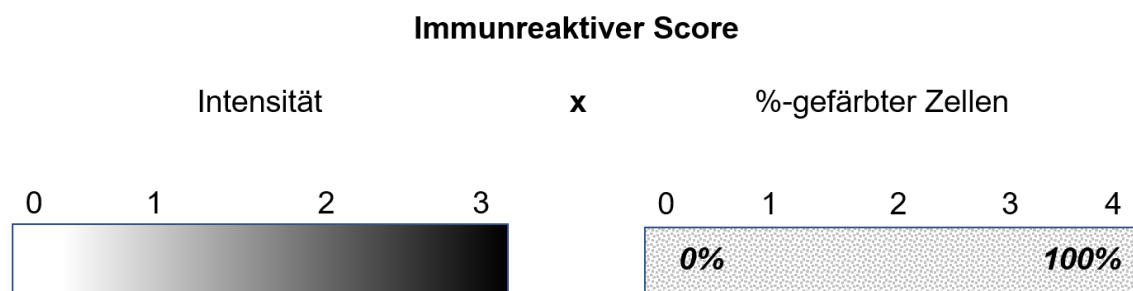


Abbildung 4: Berechnung Immunreaktiver Score

Nach der immunhistochemischen Färbung erfolgte die Evaluation der Färbung anhand des immunreaktiven Scores (IRS). Dazu wurde jede Gewebeprobe unter Lichtmikroskopie beurteilt. Berechnet wurde der Score zum einem aus der Intensität (0: keine Färbung, 1: niedrige Intensität, 2: mittlere Intensität, 3: hohe Intensität) und prozentualer Anteil gefärbter Tumorzellen (0: keine Färbung, 1: 1-10%, 2: 11-50%, 3: 51-80%, 4: über 80%). Beide Zahlenwerte wurden miteinander multipliziert. Die IRS Skala reichte somit von 0 für keine Expression bis 12 für eine sehr hohe Expression. Es wurde dabei jeweils separat ein IRS für den Zellkern und das Zytoplasma berechnet (1). In Abbildung 4 ist die Berechnung des IRS Scores illustriert.

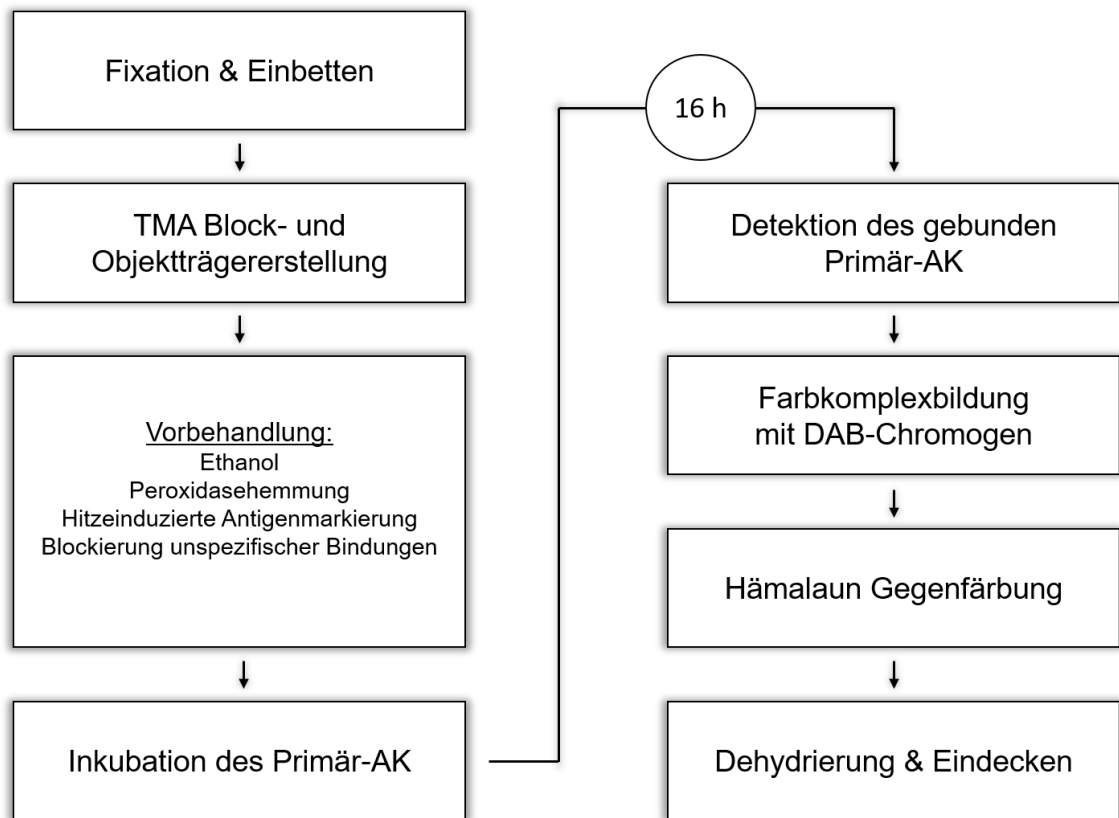


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Chemikalien/Lösungsmittel	
Ethanol	LMU-Apotheke München, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	VWR International West Chester, USA
Wasser (destilliert)	LMU-Apotheke München, Deutschland
Citronensäure Monohydrat	Merck Darmstadt, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck Darmstadt, Deutschland
PBS	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Post-Block-Lösung	Zytomed Systems GmbH Berlin, Deutschland
Power Block™ Universal Blocking Reagenz	BioGenex Fremont, USA
Roti®-Mount	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun Lösung	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht der angewendeten Chemikalien und Lösungsmittel

Antikörper/Detektionssystem	
HRP-Polymer Lösung	Zytomed Systems GmbH Berlin, Deutschland
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Nummer K3468)	Dako Carpinteria, USA
Anti-LSD1 polyklonaler Kaninchen-IgG (Nummer NB100-536)	Novusbio Littleton, USA
Anti-NCoR polyklonaler Kaninchen-IgG (Nummer ab3482)	Abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich

Tabelle 4: Antikörper und Detektionssystem

Software	
Statistik- und Analyse-Software (SPSS, Version 25)	IBM Statistics Amrok, USA
Bildverarbeitungsprogramm (Diskus, Version 4)	Hilgers Technisches Büro eK, Königswinter, Deutschland

Tabelle 5: Softwareanwendungen

Geräte	
Kühlschrank	Bosch GmbH Stuttgart, Deutschland
Dampfkochtopf vitafit®	Fissler GmbH Idar-Oberstein, Deutschland
Herdplatte (THL 2597)	Rommelsbacher Dinkelsbühl, Deutschland
Lichtmikroskop Leitz-Dioplan	Leitz Wetzlar, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Fotokamera (JVC KYF55BE)	JVC Yokohama, Japan

Tabelle 6: Geräteübersicht

Material	
Safe-Lock Röhrchen	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Objektträger-Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA

Tabelle 7: Weitere Materialien der immunhistochemischen Färbung

3.4 Statistik

Die gewonnenen Daten wurden tabellarisch gespeichert und für die Erstellung einer Datenbank für weitere Analysen genutzt. Dazu wurde die Software IBM Statistics Version 25 (Amrook, NY, USA) verwendet (1, 2).

Anhand der gespeicherten Daten wurde die Expression von LSD1 und NCoR für diverse klinische als auch pathologische Parameter analysiert. Zur Unterscheidung von Merkmalen wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Zu den entsprechenden klinischen Parametern wurden Boxplots erstellt. Desweiteren wurde für das Patientenkollektiv eine Cox Regression durchgeführt, um unabhängige Parameter für das Überleben zu analysieren (1, 2).

Das Gesamtüberleben und 10-Jahres-Überleben in Abhängigkeit zur LSD1 und NCoR Expression wurden bestimmt. Dazu wurde das Überleben in Abhängigkeit zur Expression von LSD1 und NCoR in Kaplan-Meier-Kurven graphisch dargestellt (1, 2).

Ebenso wurden die Korrelationen der LSD1 und NCoR Expressionen zu weiteren Parametern aus vorherigen Untersuchungen am Patientenkollektiv durchgeführt (1, 2)

Für alle signifikanten Ergebnisse galt dabei für $p \leq 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 LSD1

4.1.1 Allgemeine klinische & pathologische Parameter

Die Analyse von LSD1 zeigte einen medianen IRS von 12 im Zellkern und im Zytoplasma einen Median von 8. Bei 0,5% konnte kein Nachweis von LSD1 im Zellkern festgestellt werden. Im Vergleich zeigten 1,8% keine Expression im Zytoplasma. Im Zellkern hatten 93,4% eine hohe Expression ($\text{IRS} \geq 6$) von LSD1 und im Zytoplasma 72%. Eine niedrige Expression ($\text{IRS} < 6$) wurde bei 28% im Zytoplasma gemessen und im Zellkern mit einem Anteil von 6,6% (1).

In Bezug auf den histologischen Subtyp wurde für das Plattenepithelkarzinom ein medianer IRS von 12 im Zellkern gemessen. Der Median im Zytoplasma lag bei 8. Ebenso lag der mediane IRS für Patientinnen mit Adenokarzinom bei 8 im Zytoplasma. Im Zellkern zeigte sich dagegen ein medianer IRS von 12 für beide histologische Typen (1).

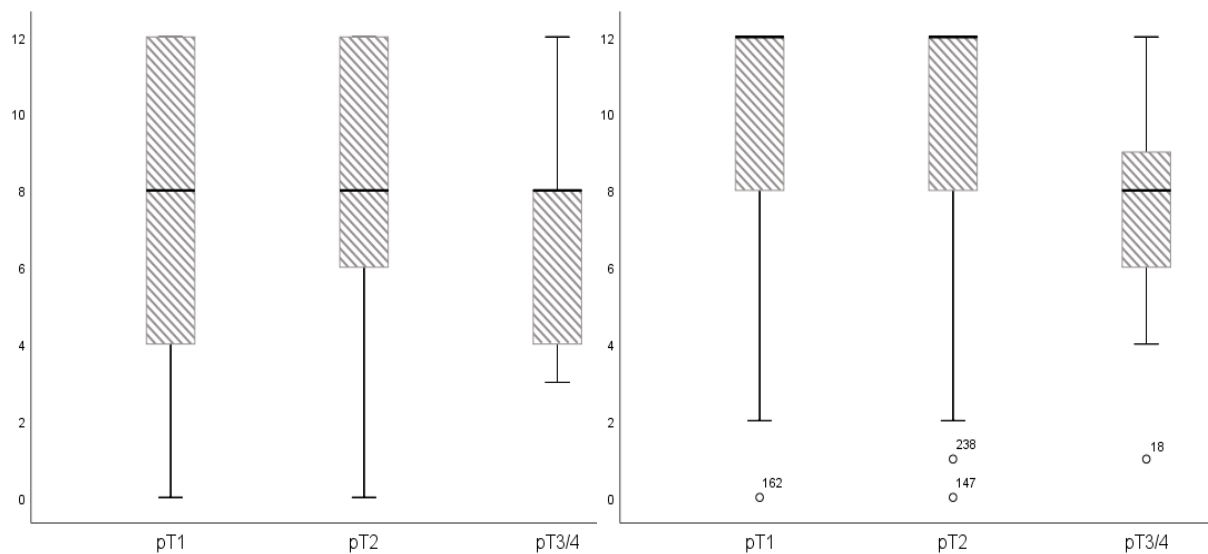


Abbildung 7: Boxplots pT-Status LSD1 (links Zytoplasma, rechts Zellkern)

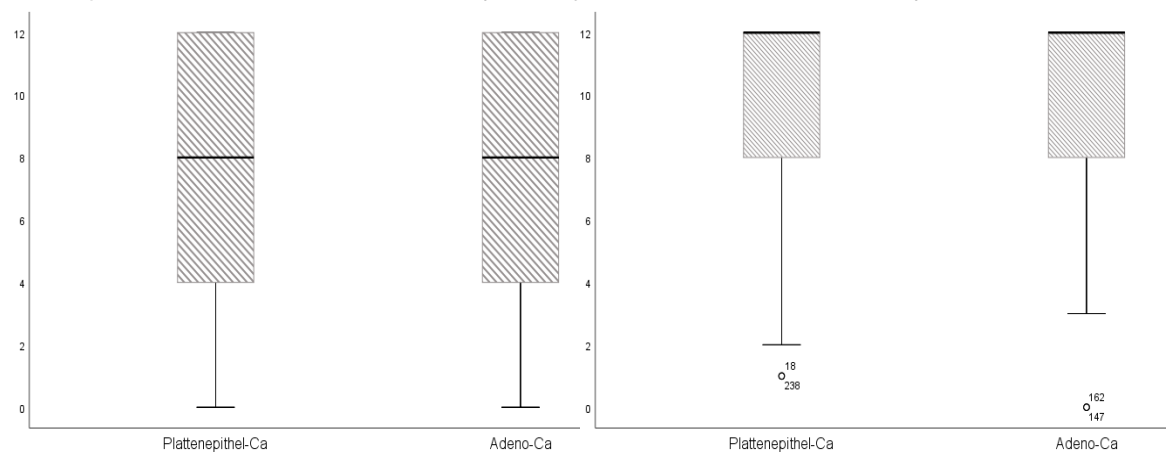


Abbildung 6: Boxplots histologischer Subtyp LSD1 (links Zytoplasma, rechts Zellkern)

Bei der Untersuchung des pT-Status zeigte sich für kleine Tumore T1 im Zytoplasma ein medianer IRS von 8 und im Zellkern von 12. Für T2 zeigte sich ebenfalls ein Median von 12 im Zellkern und 8 im Zytoplasma. Für Tumore der Kategorie T3/4 war der mediane IRS im Zellkern 8 und im Zytoplasma ebenfalls 8 (1).

Für Patienten mit positiven Lymphknoten lag der mediane IRS im Zellkern bei 12 und im Zytoplasma bei 8. Bei negativen Lymphknotenbefund lag der Median ebenfalls bei 12 im Zellkern und 8 im Zytoplasma (1).

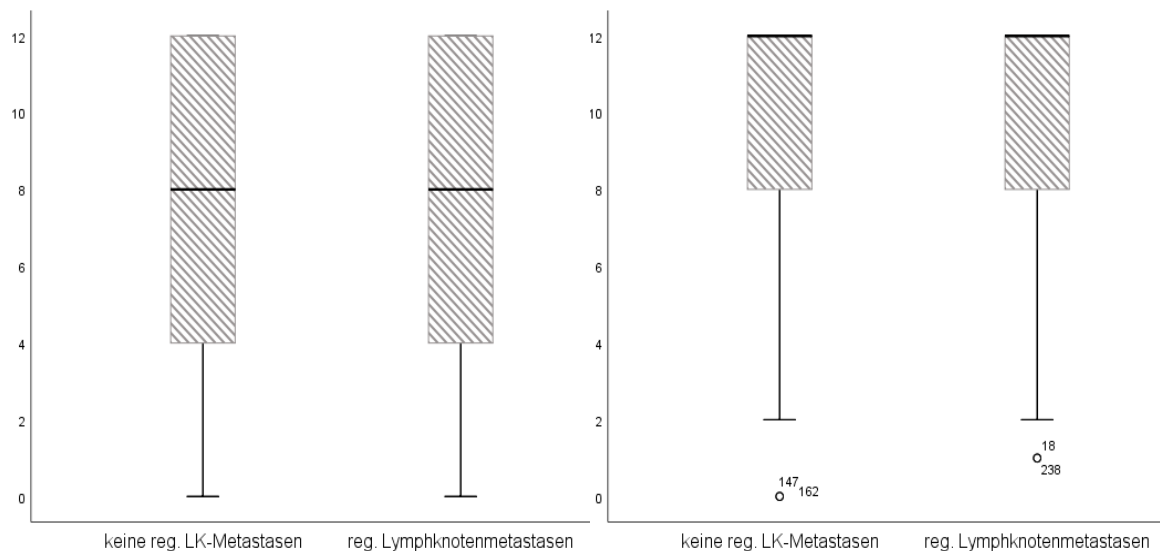


Abbildung 8: Boxplots Lymphknotenstatus (links Zytoplasma, rechts Zellkern)

In Bezug auf das FIGO Stadium lag bei FIGO I der IRS im Zytoplasma bei 8 und im Zellkern bei 12. Für FIGO II ebenfalls bei 8 im Zytoplasma und 12 im Zellkern. Unverändert blieb auch bei FIGO III der Median im Zytoplasma bei 8 und im Zellkern bei 12. Bei FIGO IV zeigte sich jedoch ein Median von 4 im Zytoplasma und 12 im Zellkern (1).

Zuletzt zeigte sich im Zusammenhang des Gradings bei Tumoren der Kategorie G1 ein IRS von 9 im Zytoplasma und 12 im Zellkern. Für G2 zeigte die Analyse einen Median von 8 im Zytoplasma und 12 im Zellkern. Abschließend wurde für Karzinome der Stufe G3 ein medianer IRS von 8 im Zytoplasma und 12 im Zellkern gefunden (1).

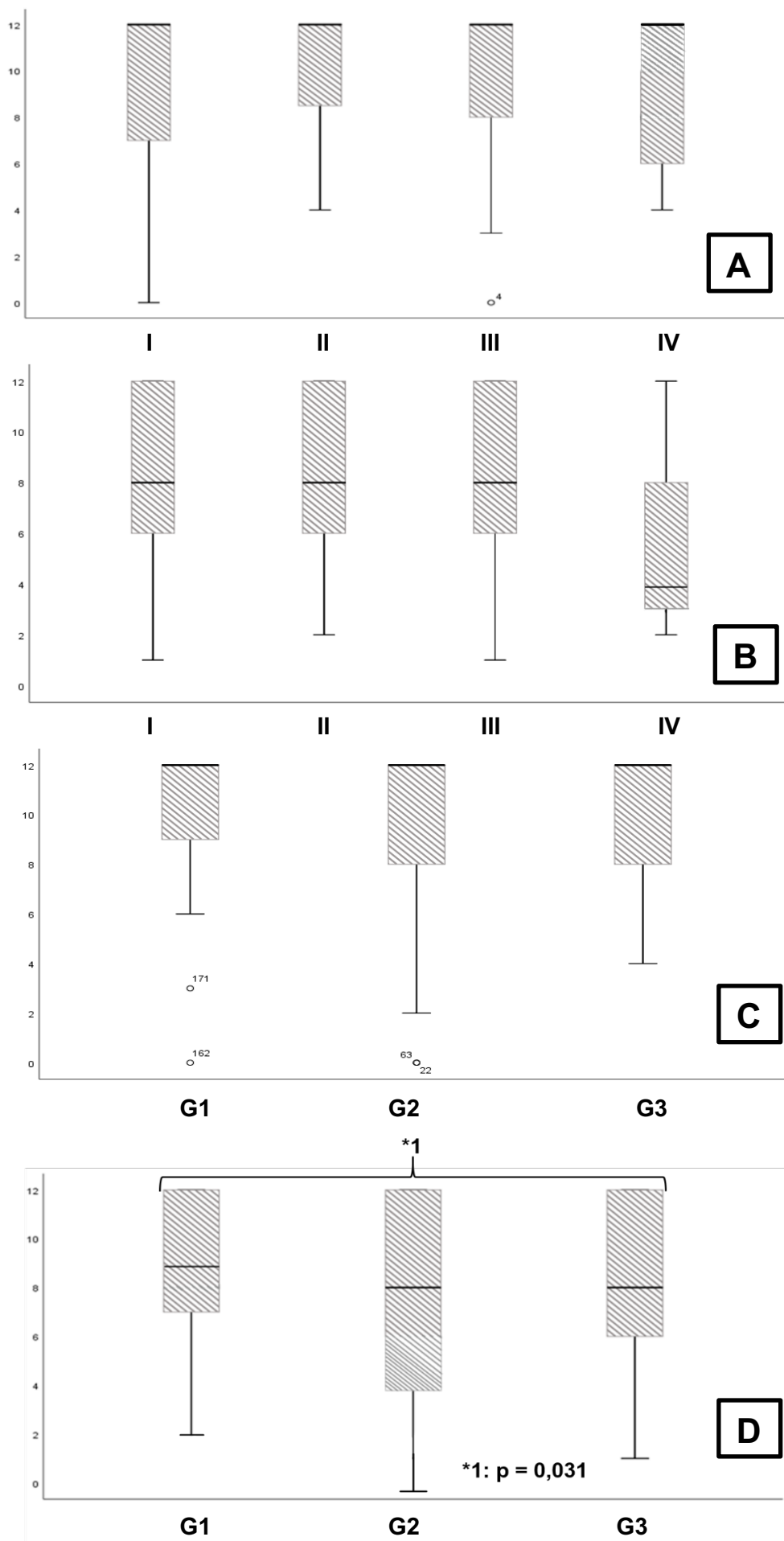


Abbildung 9: Boxplots FIGO (A: Zellkern, B: Zytoplasma) und Grading (C: Zellkern, D: Zytoplasma) (1)

	Zytoplasma	Zellkern
Medianer IRS	8	12
Expression		
keine	1,8%	0,5%
IRS 1-5	28,0%	6,6%
IRS 6-12	72,0%	93,4%
Histologischer Typ		
Plattenepithel-Ca	8	12
Adeno-Ca	8	12
T-Status		
T1	8	12
T2	8	12
T3/4	8	8
N-Status		
N(-)	8	12
N(+)	8	12
FIGO		
I	8	12
II	8	12
III	8	12
IV	4	12
Grading		
G1	9	12
G2	8	12
G3	8	12

Tabelle 8: Klinische Parameter von LSD1 im Zervixkarzinom (1)

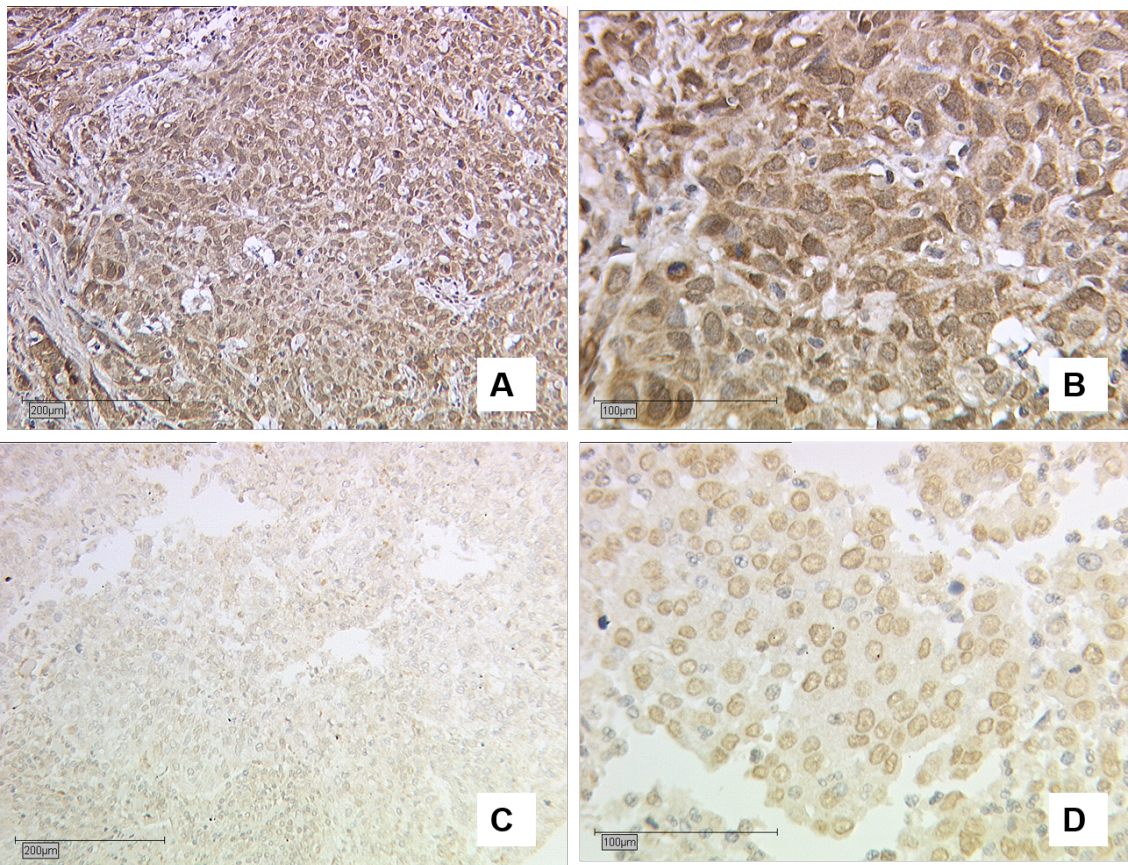


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahmen LSD1 im Zervixkarzinom. A und B: IRS Zellkern = 12, Zytoplasma = 8. C und D: IRS Zellkern 8 und Zytoplasma 4.

4.1.2 Korrelationsanalysen

In der Untersuchung zur Expression von LSD1 bei Patientinnen mit Zervixkarzinom wurden Korrelationsanalysen mit bestimmten Parametern durchgeführt. Dabei konnte eine negative Korrelation der Expression von LSD1 und G-Protein gekoppelten Östrogenrezeptor (GPER) nachgewiesen werden ($p=0,009$) (1). Ebenso zeigte die LSD1 Expression eine negative Korrelation zu FIGO ($p = 0,037$), LCoR ($p = 0,035$), HPV Onkoprotein E6 ($p = 0,026$), Galectin 3 ($p = 0,007$), mutierten Tumorsuppressor p53 ($p = 0,044$) und Prostaglandin-E2-Rezeptor 3 ($p = 0,035$). Eine positive Korrelation zeigte sich dagegen zu Protein p16 ($p = 0,020$) und methyliertem Histon H3 ($p=0,006$).

	GPER	FIGO	LCoR	E6	Galectin 3
Korrelation	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Signifikanz (p-Wert)	0,009	0,037	0,035	0,026	0,007

Tabelle 9: Korrelation LSD1 zu GPER, FIGO, LCoR, E6 und Galectin 3 (1)

	Mut. p53	Prostaglandin-E2-Rezeptor 3	p16	Methyl. Histon H3
Korrelation	negativ	negativ	positiv	positiv
Signifikanz (p-Wert)	0,044	0,035	0,020	0,006

Tabelle 10: Korrelation LSD1 zu mutierten p53, Prostaglandin E2 Rezeptor 3, p16 und methyliertem Histon H3

4.1.3 Cox Regression

In der weiteren Untersuchung wurde anhand der erhobenen Daten eine Cox Regression durchgeführt, um unabhängige Parameter für das Überleben ausfindig zu machen. Dabei zeigten sich die LSD1 Expression, histologischer Subtyp und pN-Status als unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben (1).

	Signifikanz (p-Wert)	Hazard Ratio von Exp (B)	Untere 95% CI of Exp (B)	Obere 95% CI of Exp (B)
Histologie	0,001	3,212	1,579	6,532
pN	0,009	2,593	1,275	5,275
FIGO	0,689	1,015	0,945	1,089
Grading	0,095	1,611	0,920	2,821
LSD1 (Zytoplasma IRS = 12)	0,037	2,071	1,046	4,099

Tabelle 11: Cox Regression LSD1

4.1.4 Überlebensanalysen

Bezüglich des Überlebens zeigte sich bei Patientinnen mit einem hohen IRS (IRS = 12) im Zytoplasma ein Nachteil im 10-Jahres-Überleben. Dieser Überlebensnachteil zeigte sich bei Betrachtung der Expression von LSD1 im Zytoplasma der Karzinomzellen. Innerhalb von 10 Jahren starben bei der Gruppe von Frauen mit einem IRS von 12 etwa 10 Prozent mehr als bei Frauen mit einem niedrigerem IRS. Ein hoher IRS verkürzte die Lebenszeit um etwa 9,4 Monate. Der Altersmedian des Patientenkollektivs lag bei 47 Jahren. Die mediane Überlebenszeit lag bei 100 Monaten (1).

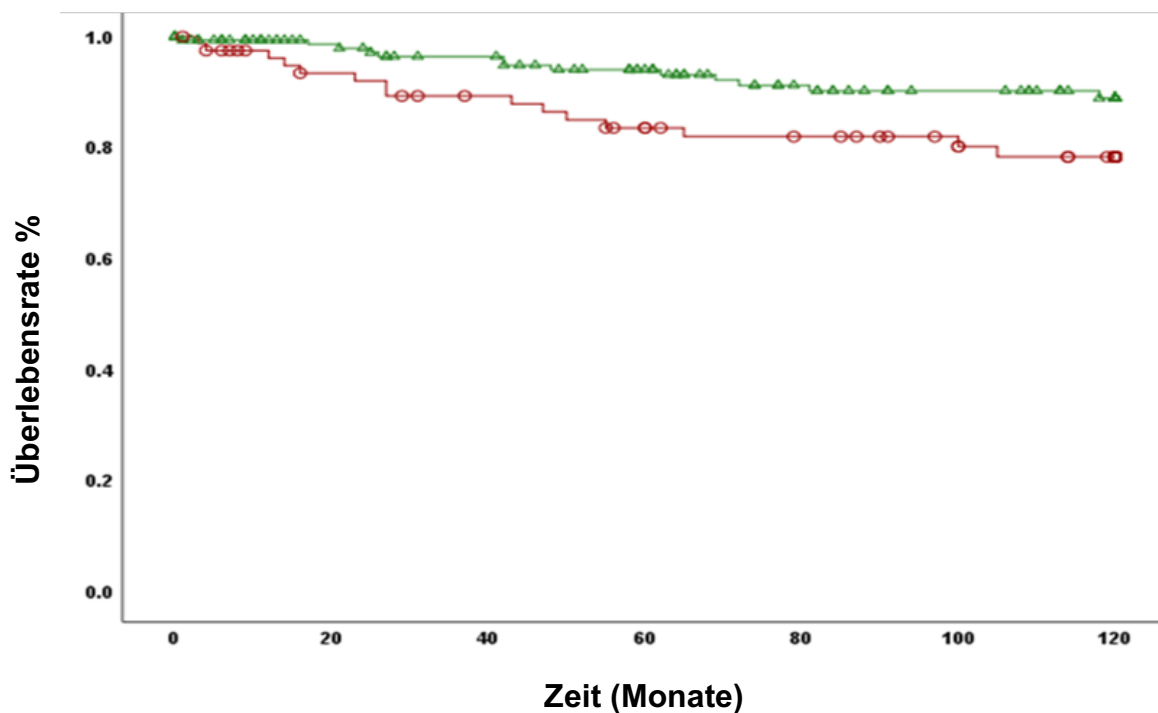


Abbildung 11: Kaplan-Meier Kurve zur Expression von LSD1. Grün IRS < 12, Rot IRS = 12 (1)

4.2 NCoR

4.2.1 Allgemeine klinische und pathologische Parameter

Für jede Gewebeprobe wurde ein IRS für den Zellkern und das Zytoplasma bestimmt. Dabei lag der Median bei einem IRS von 12 für das Zytoplasma. Die Zellkerne hatten dagegen einen Median von 8 (2).

Von einer niedrigen Expression war bei einem IRS von 1 bis 5 auszugehen. Dazu gehörten 10,3% der zytoplasmatischen Auswertungen und 17,8% der ausgewerteten Zellkerne. Von einer hohen Expression war ab einem IRS von 6 bis 12 auszugehen. Dazu gehörten 89,7% der Beobachtungen im Zytoplasma und 82,2% der ausgewerteten Zellkerne. Nur 0,4% der ausgewerteten Zellkerne hatten keine nachweisliche NCoR Expression. Der Wert für Gewebeproben ohne Nachweis von NCoR lag im Zytoplasma etwas höher bei 1,7% (2).

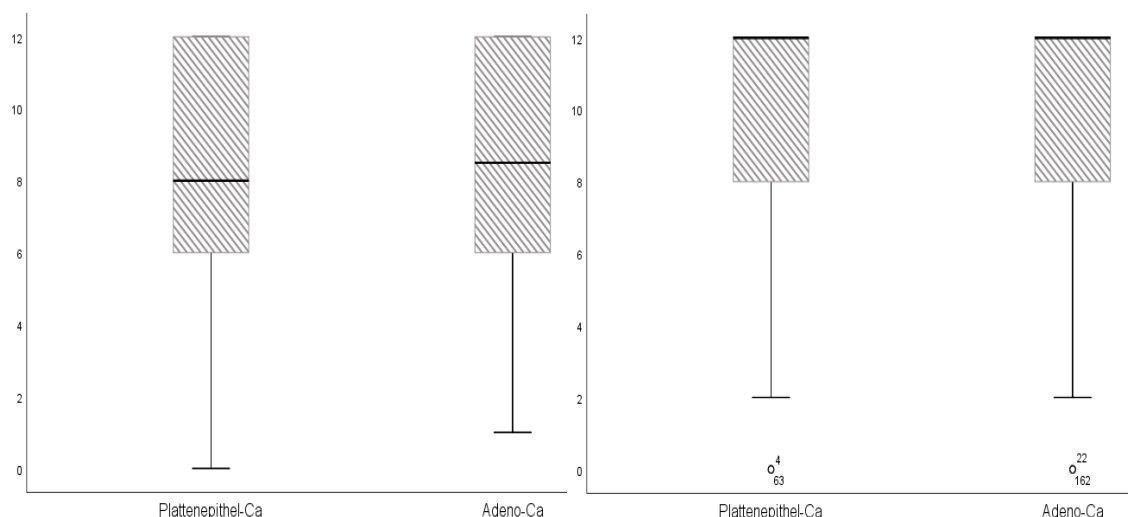


Abbildung 12: Boxplots histologischer Subtyp NCoR (links Zellkern, rechts Zytoplasma)

In der Begutachtung des histologischen Subtyps lag der mediane IRS für Patientinnen mit einem Adenokarzinom bei 8 im Zellkern. Patientinnen mit einem Plattenepithelkarzinom hatten ebenso einen IRS von 8 im Zellkern. Im Zytoplasma lag für beide histologische Subtypen der Median bei jeweils 12 (2).

In Bezug auf das Grading wurde bei allen drei Grading Stufen ein medianer IRS von 8 im Zellkern berechnet. Bei Betrachtung des Zytoplasmas lag der Median bei 12 (2).

In Bezug auf die Tumorgroße lag der mediane IRS im Zytoplasma bei T1 und T2 bei einem IRS von 12 und für größere Tumore bei 8. Im Zellkern lag der Median bei 8 für T1 und T2. Für T3 und T4 lag der mediane IRS bei 6 (2).

Patientinnen mit einem Lymphknotenbefall hatten einen Median von 12 im Zytoplasma und einen medianen IRS von 8 in der Analyse der Zellkerne. Ebenso verhielt sich der IRS auch bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall (2).

Eine Analyse erfolgte ebenfalls anhand der bekannten FIGO-Klassifikation der Patientinnen. Dabei zeigte sich bei FIGO I, II und III im Zytoplasma ein Median von 12, während für FIGO IV ein medianer IRS von 8 berechnet wurde. Im Zellkern lag der Median bei FIGO I bis III bei 8. Für FIGO IV lag der IRS im Zellkern bei 3 (2).

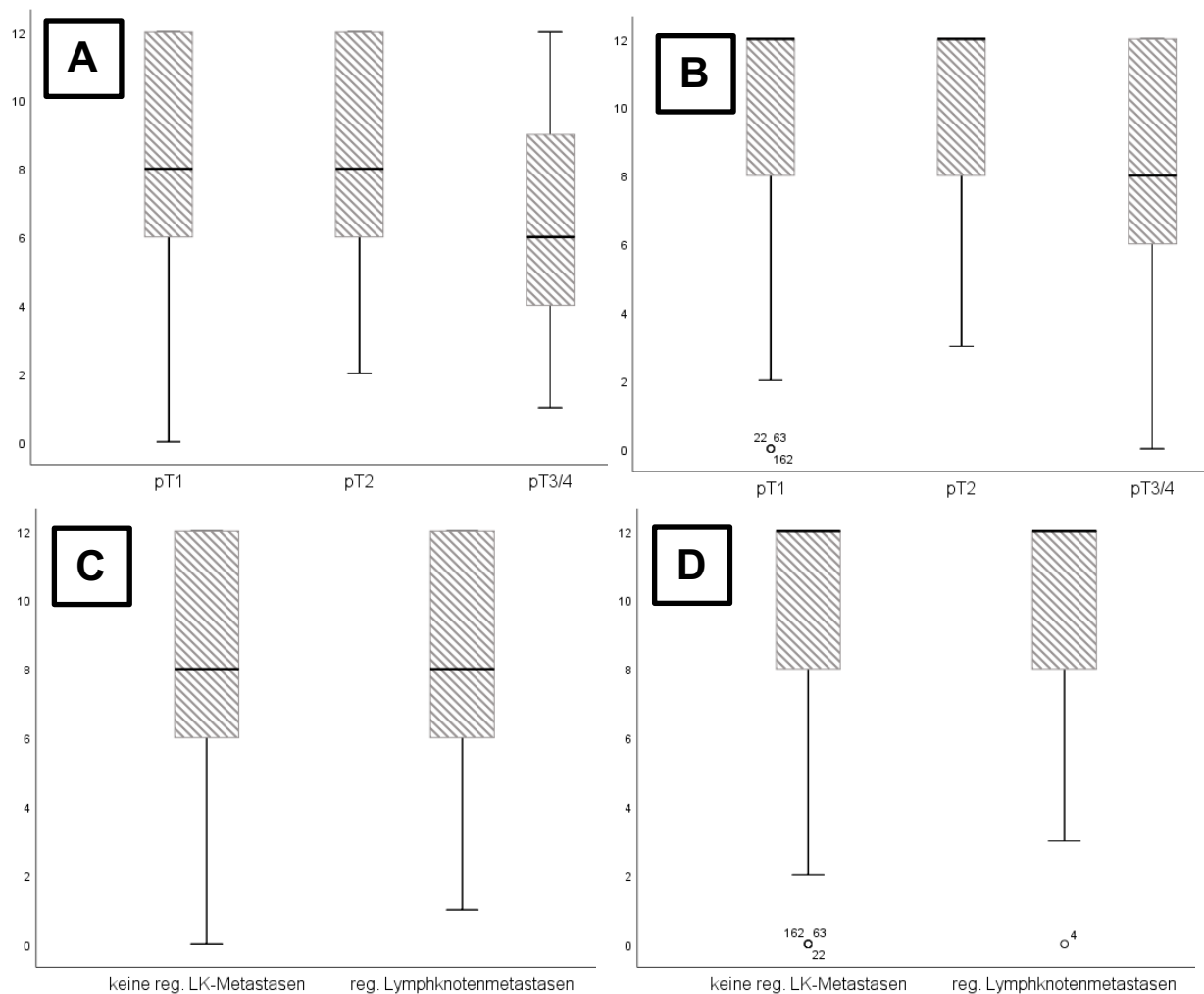


Abbildung 13: Boxplots pT-Status und IRS für NCoR (A: Zellkern, B: Zytoplasma), sowie für pN-Status und IRS für NCoR (C: Zellkern, D: Zytoplasma).

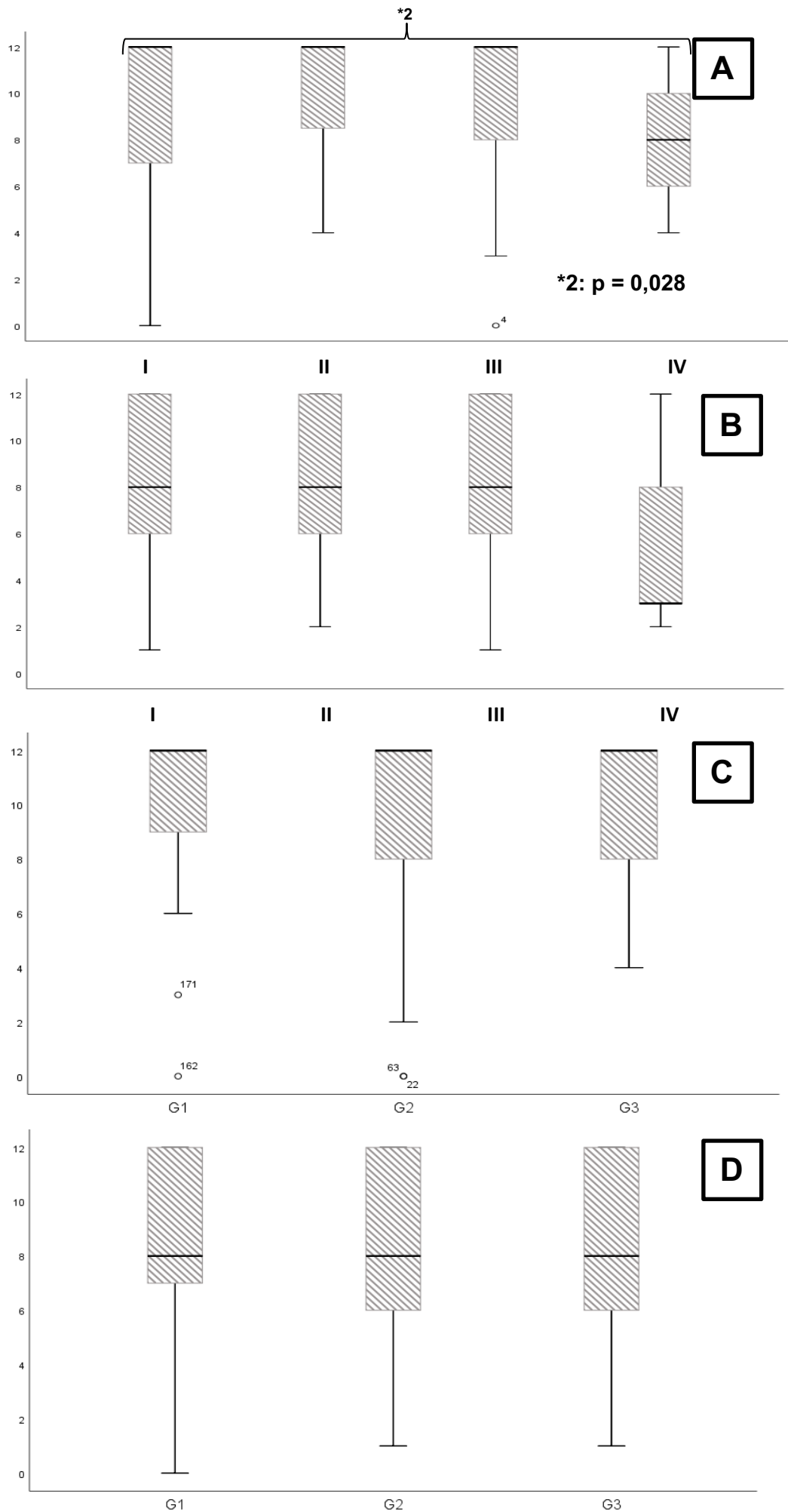


Abbildung 14: Boxplots zu NCOR IRS und FIGO (A: Zytoplasma, B: Zellkern) (2), sowie Grading (C: Zytoplasma, D: Zellkern)

	Zytoplasma	Zellkern
Medianer IRS	12	8
Expression		
keine	1,7%	0,4%
IRS 1-5	10,3%	17,8%
IRS 6-12	89,7%	82,2%
Histologischer Subtyp		
Plattenepithel-Ca	12	8
Adeno-Ca	12	8
pT-status		
T1	12	8
T2	12	8
T3/4	8	6
pN-status		
N(-)	12	8
N(+)	12	8
FIGO		
I	12	8
II	12	8
III	12	8
IV	8	3
Grading		
G1	12	8
G2	12	8
G3	12	8

Tabelle 12: Übersicht klinische Parameter NCoR (2)

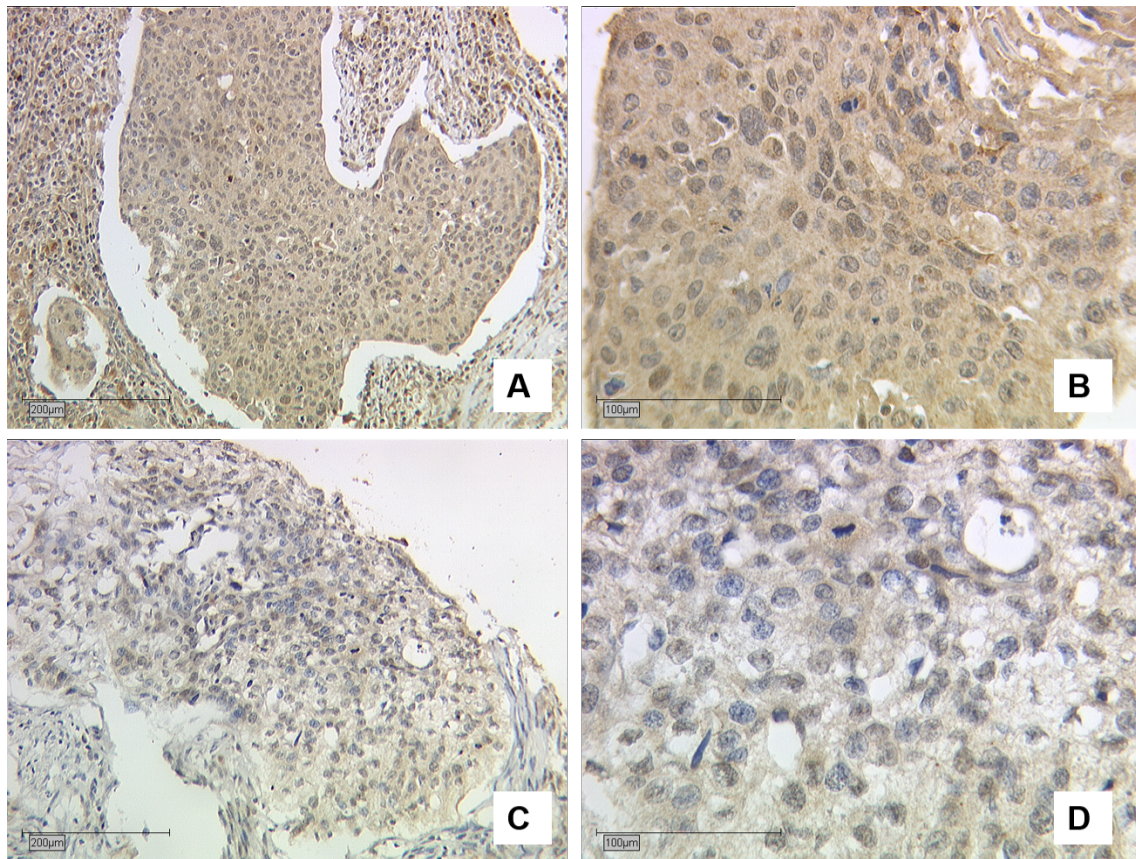


Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahme NCoR im Zervixkarzinom. A und B: IRS Zellkern = 12, Zytoplasma = 12. C und D: IRS Zellkern 4 und Zytoplasma 4

4.2.2 Korrelationsanalysen

Am Patientenkollektiv wurde in Vorarbeiten ebenfalls durch immunhistochemische Färbung die Expression von unterschiedlichen Parametern durchgeführt. Mit den Ergebnissen aus diesen Voruntersuchungen wurden Korrelationsanalysen zu den Färberegebnissen von NCoR und LSD1 vollführt. Dabei wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen NCoR und dem Onkoprotein E6 ($p=0,003$) festgestellt. Daneben wurde ebenfalls eine negative signifikante Korrelation von NCoR zum FIGO Stadium der Patientinnen gefunden. Außerdem gab es zu acetylierten Histon H3 eine negative Korrelation ($p=0,003$). Eine positive Korrelation wurde dagegen zwischen NCoR und dem Protein p53 berechnet ($p=0,01$) (2).

	E6	FIGO	Acetyliertes Histon H3 K9	p53
Korrelation	negativ	negativ	negativ	positiv
Signifikanz (p-Wert)	0,003	0,004	0,003	0,010

Tabelle 13: Korrelationen NCoR zu Onkoprotein E6, FIGO, acetyliertes Histon H3 K9 und p53 (2).

4.2.3 Cox Regression

Zur Bestimmung unabhängiger histologischer Parameter für das Überleben wurde in Zusammenhang mit der Expression von NCoR eine Cox Regression durchgeführt. Die Analyse führte zu dem Ergebnis, dass für das Gesamtüberleben die Expression von NCoR im Zellkern, der histologische Subtyp und der pT-Status unabhängige Prognosefaktoren darstellen (2).

	Signifikanz (p-Wert)	Hazard Ratio von Exp (B)	Obere 95% CI von Exp (B)	Untere 95% CI von Exp (B)
Histologie	0,007	3,618	1,413	9,266
pT	0,016	3,311	1,252	8,753
pN	0,858	0,990	0,883	1,109
FIGO	0,718	0,880	0,439	1,763
Grading	0,369	1,435	0,652	3,155
NCoR Zellkern, (IRS > 4)	0,010	0,279	0,106	0,735

Tabelle 14: Cox Regression zu NCoR (2)

4.2.4 Überlebensanalyse

In der Untersuchung erfolgte ebenfalls die Untersuchung der NCoR Expression im Zusammenhang mit der Überlebenszeit der Patientinnen. Dabei zeigte eine niedrige Expression von NCoR im Zellkern (mit einem IRS kleiner oder gleich vier) einen signifikanten Nachteil im Gesamtüberleben ($p=0,003$) (2).

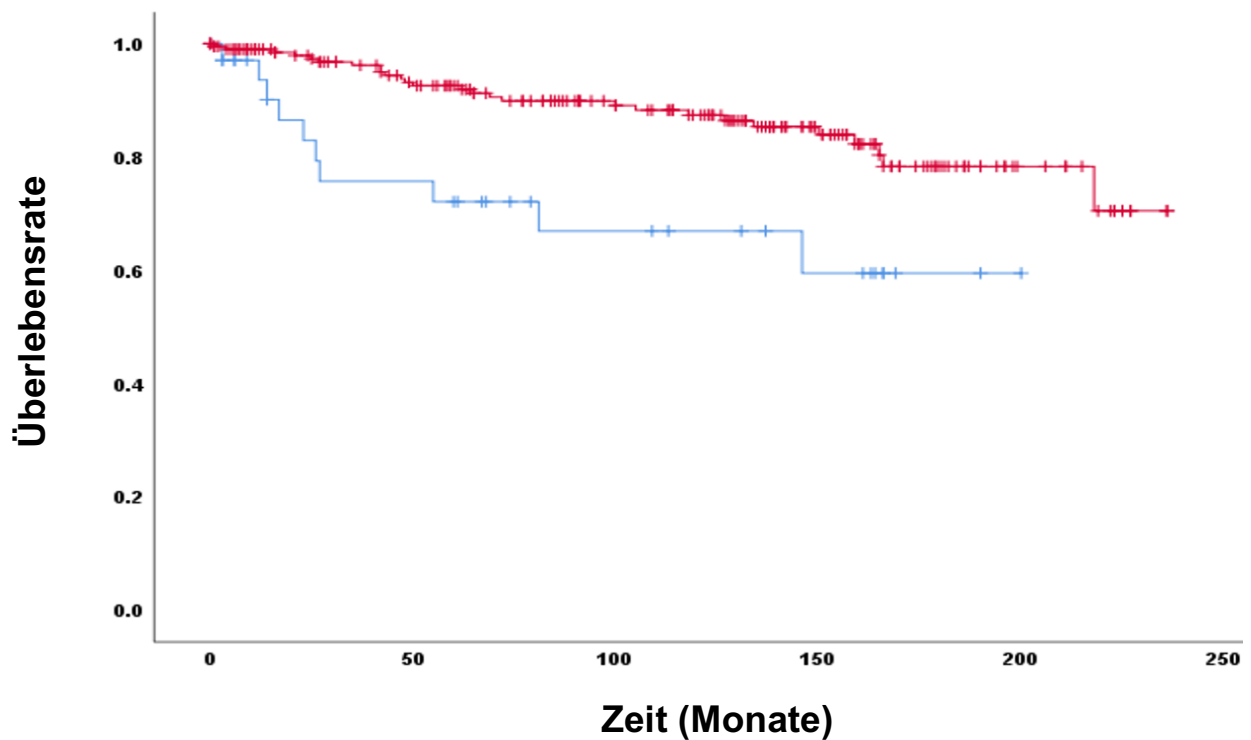


Abbildung 16: Kaplan-Meier Kurve zur Expression von NCoR. (Rot IRS > 4, blau IRS ≤ 4) (2)

5 Diskussion

Die Gewebeproben von 250 Patientinnen mit Zervixkarzinom wurden durch immunhistochemische Färbung mit Anti-LSD1 und Anti-NCoR auf die Expression von LSD1 und NCoR untersucht. Zur Evaluierung der Expressionsstärke diente der IRS der Proteine im Zellkern und separat im Zytoplasma.

Eine hohe Expression von LSD1 im Zytoplasma zeigte im Patientenkollektiv einen signifikanten Nachteil im 10-Jahres-Überleben. Des Weiteren zeigte sich in Bezug auf die Expression von LSD1 eine negative Korrelation zum G-Protein gekoppelten Östrogenrezeptor (GPER) (1).

Bei der Untersuchung von NCoR zeigte dagegen eine niedrige Expression von NCoR im Zellkern einen signifikanten Nachteil im Gesamtüberleben. Außerdem zeigte die Expression von NCoR eine negative Korrelation zu Onkoprotein E6, FIGO Klassifikation und acetylierten Histon H3K9. Eine positive Korrelation zeigte die Analyse der Expression von NCoR zum Tumorsuppressor p53 (2).

Für die Untersuchung wurden Gewebeproben von 250 Patientinnen verwendet, die an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU an einem Zervixkarzinom operiert wurden. Die Sammlung erfolgte zwischen 1993 und 2002 mit einem abgeschlossenen Kollektiv (1, 2).

Der Zeitraum für diese Sammlung beträgt etwa 10 Jahre und die ersten gewonnenen Gewebeproben waren zum Versuchsstart zum Teil 25 Jahre alt. Die Weiterentwicklungen in Therapie und Diagnostik waren in den vergangenen Jahren rapide. Ein Einfluss dieses Fortschrittes im Zusammenhang für Patientinnen mit der Diagnose eines Zervixkarzinoms konnte nicht weiter aufgeschlüsselt werden. Auch die durchgeführte Therapie und deren Auswirkung auf das Überleben war nicht bekannt. Insgesamt enthält das Kollektiv vor allem Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Zervixkarzinom und es fehlen dadurch Informationen zu den wichtigen präkanzerösen Läsionen. Diese wären für das Verständnis für die Entstehung der Zervixkarzinoms im Zusammenhang mit NCoR und LSD1 von Interesse.

Über die Zeit konnte dieses Kollektiv jedoch über einen langen Zeitraum beobachtet werden. Dadurch bietet es insbesondere wichtige Informationen zum Überleben und dem Auftreten von Rezidiven. Zusätzlich konnten über diesen Zeitraum Gewebeproben des Kollektivs auf unterschiedliche Parameter untersucht und deren Ergebnisse

zueinander analysiert werden. Dadurch konnten Ergebnisse zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, um mögliche Zusammenhänge herzustellen.

Zur Aufnahme in das Kollektiv wurden ebenfalls nur die beiden häufigsten histologischen Subtypen (Plattenepithel- und Adenokarzinom) ausgewählt. Eine Verzerrung durch andere eher selten vorkommende Subtypen wurde dadurch verhindert. Außerdem enthält die Sammlung nur Patientinnen ohne HPV-Impfung (1, 2).

Während der Versuchsdurchführung kann es beginnend bei der Fixation und Einbettung der Gewebeproben zu einem Einfluss auf die Antigenstrukturen kommen (76). Diese sind für die Antikörperbindung von entscheidender Bedeutung. Für die Färbung wurden dann anschließend Tumorstanzen aus dem Karzinomgewebe entnommen. Mit einer Größe von 1,0 mm konnte mit Hilfe eines Lichtmikroskops so die gesamte Gewebeprobe in einer Einstellung begutachtet werden. Dadurch kann insbesondere der Anteil angefärbter und nicht angefärbter Strukturen besser ausgewertet werden. Jedoch handelt es sich nur um einen Ausschnitt des Tumors und andere Tumoranteile könnten ein anderes Färbemuster enthalten.

Bei der späteren immunhistochemischen Färbung wurden polyklonal hergestellte Antikörper verwendet, die spezifisch gegen Strukturen von LSD1 oder NCoR waren. Die Detektion dieses Primärantikörpers erfolgte über ein HRP-Polymer (Horse Radish Peroxidase, HRP) zum Nachweis von Primärantikörpern aus Maus und Kaninchen Seren. Im Unterschied zu ebenfalls geläufigen Nachweisteknik auf Basis von Streptavidin-Biotin-Prinzip eine verfälschende Färbung durch endogenes Biotin in der Gewebeprobe verhindert (77, 78). Präzision im Umgang mit den Materialien ist entscheidend für die späteren Ergebnisse und ein möglicher Angriffspunkt für Fehler. Zur Qualitätskontrolle erfolgte bei jedem Färbevorgang eine Positivkontrolle mit Plazentagewebe (1, 2).

Zur Bewertung der Expressionsstärke von LSD1 wurde der IRS für LSD1 und NCoR für den Zellkern und das Zytoplasma separat bestimmt. Ursprünglich wurde dazu der IRS zur Evaluation der Expressionsstärke von Östrogenrezeptoren beim Mammakarzinom entwickelt (79, 80). Dieser setzt sich aus der Intensität und dem prozentualen Anteil gefärbter Zellen zusammen. Mit der Erhebung des IRS konnte somit einfach und praktikabel die Intensität und Quantität des Färbeergebnisses für verschiedene Zellbestandteile bestimmt werden.

Die Erhebung der jeweiligen Punkte erfolgte dabei nur nach subjektiver Entscheidung durch einen Untersucher.

In der Untersuchung von LSD1 bei Patientinnen mit Zervixkarzinom wurde der Zusammenhang der Expression mit unterschiedlichen klinischen und pathologischen Parametern untersucht. Dabei zeigte sich bei Patientinnen mit einem höheren Grading eine niedrigere Expression von LSD1 (1).

Anhand von Kernpolymorphismen und mitotischer Aktivität lassen sich typischerweise Zervixkarzinome in drei Grading Stufen einteilen: G1 (hoch differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3 (niedrig differenziert) (81, 82). Für das Zervixkarzinom liegen jedoch international keine einheitlichen Kriterien zur Bestimmung des Gradings vor (5). Ein Vergleich von Studien aus unterschiedlichen Instituten macht eine Beurteilung schwer. Vor allem da nicht bei allen Studien aufgeschlüsselt wurde, welchen Kriterien unterschiedliche Grading Stufen unterliegen (81). Zur Einteilung könnte die schwerste Dysplasie oder die vom Anteil her häufigste dysplastische Zellform ausgewählt werden (81). Untersuchungen durch *Kristensen et al.* konnten beispielsweise beim Plattenepithelkarzinom der Zervix das Grading als einer der Hauptprognosefaktoren nachweisen (83). Ebenso zeigte auch *Delgado et al.* eine Auswirkung des Gradings auf das Rezidiv-freie Überleben (84). *Sing et Arif* beschrieben neben dem Grading auch die Gefäßinvasion, histologischen Subtyp, Invasionsmuster und Invasionstiefe als individuelle Prognosefaktoren (81). Dagegen fand *Stock et al.* keine Korrelation des histologischen Gradings zur Prognose (85). In der aktuellen Leitlinie wird das Grading daher nicht als Prognosefaktor berücksichtigt (5).

Es wurde beschrieben, dass epigenetische Regulationsmechanismen einen essentiellen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von embryonalen Stammzellen haben können (86). Hierzu zeigten Untersuchungen hohe LSD1 Level bei undifferenzierten embryonalen Stammzellen (87). Es wird davon ausgegangen, dass dadurch der undifferenzierte Status der Zellen erhalten werden konnte (87). Grund dafür sei die enge Kontrolle der Methylierung von Histon H3K4 durch LSD1 an Genabschnitten zur Regulierung der Zelldifferenzierung (87). Ebenso ist auch von einem möglichen Einfluss auf Krebsstammzellen auszugehen (86). Für das Zervixkarzinom konnten jedoch zervikale Krebsstammzellen noch nicht eindeutig identifiziert und beschrieben werden (88).

Auch bei anderen Karzinomen konnten Zusammenhänge von LSD1 mit der Zelldifferenzierung beschrieben werden. Konkret zeigten Untersuchungen von *Lan et al.* am Blasenkarzinom Unterschiede bei der Expression von LSD1 in der immunhistochemischen Färbung (86). Hier zeigte sich eine hohe Expression von LSD1 vor allem bei high-grade Blasenkarzinomen (86). In unserer Untersuchung zum Zervixkarzinom wurde eine hohe Expression von LSD1 mit einem niedrigen Grading beschrieben (1). Damit auch zu besser differenzierten Karzinomzellen.

LSD1 zeigte einen schlechten Einfluss auf das Überleben und auch auf das Grading (1). Auch wenn nicht alle Studien das Grading als einen Prognosefaktor beim Zervixkarzinom identifizieren konnten, zeigte sich bei diesem Kollektiv ein negativer Einfluss (1). Die Demethylase Funktion von LSD1 führt zwar zu einer Transkriptionshemmung (41), jedoch zeigt sich in der Zusammenfassung der Ergebnisse die Expression von LSD1 als ein negativer Faktor (1). Insbesondere scheint eine niedrige Expression von LSD1 mit schlechter differenzierten Karzinomzellen in Verbindung zu stehen (1).

In Bezug auf den histologischen Subtyp, pT-Status und pN-Status konnte kein relevanter Einfluss der LSD1 Expression festgestellt werden (1).

Die Untersuchung des Patientenkollektivs zeigte bei der Auswertung eine negative Korrelation der LSD1 Expression zur GPER Expression (1). Steroidhormone wie Östrogen sind wichtig bei der Behandlung von Krankheiten, aber auch schon bereits für den Erhalt physiologischer Körpervorgänge (89). Die zyklische Freisetzung ist wichtig für die Zelldifferenzierung, Wachstum und Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale (90). Aber auch bei der Entstehung und Progression von Krebserkrankungen unterschiedlicher Identitäten ist ein Einfluss von Östrogen nachgewiesen worden (1, 91, 92). Die Wirkung des Östrogens erfolgt zum einem, mit einer gewissen Zeitverzögerung, über die Bindung an Liganden-gesteuerte Transkriptionsfaktoren am Genom (89). Daneben gibt es auch eine schnell vermittelte Hormonantwort über GPER (89). Bei GPER handelt es sich um ein Transmembranprotein mit Guanin-bindender Funktion (89). Dadurch erfolgt über Kinase-Aktivierung, Nitrit-Oxid Produktion oder durch Kalziummobilisation die Stimulation von Effektorproteinen (89).

Bei der Untersuchung von GPER in Zusammenhang mit Krebserkrankungen zeigte sich beim Granulosazelltumor des Ovars ein Nachteil für Patientinnen (93). Ein starker immunhistochemischer Nachweis von GPER zeigte dort ein reduziertes Gesamtüberleben (93). In einer weiteren Untersuchung von GPER im Ovarialkarzinom präsentierte sich GPER jedoch als Tumorsuppressor (94). Hierbei zeigte sich zum einem ein positiver Einfluss auf das Überleben, sowie auch eine höhere Expression von GPER bei Karzinomen mit guter Differenzierung (94). Die Therapie mit GPER-Agonisten zeigte zusätzlich eine Hemmung der Proliferation in vitro (94).

Bei der Untersuchung des Zervixkarzinoms wurde ein immunhistologischer Nachweis von GPER ebenfalls als positiver Prognostikator beschrieben (95). Dies galt für Patientinnen mit frühem Zervixkarzinom des FIGO I Stadiums (95). *Zhang et al.* beschrieb in diesem Zusammenhang eine Hemmung des Zellzyklus durch Aktivierung von GPER

(96). In Zervixkarzinomzellen führte GPER zur Aktivierung der Extracellular-signal Regulated Kinase, dadurch erfolgte ein Stopp im Zellzyklus und die Inhibierung der Proliferation (1, 96).

Bei Beobachtungen von GPER im Kolonkarzinom zeigte sich ebenfalls ein interessanter Zusammenhang: Epigenetische Veränderungen führten hier zu einer Hemmung der GPER Funktion (97). Auf der einen Seite wurde nachgewiesen, dass GPER in Kolonkarzinomzellen erniedrigt war und diese Zellen vermehrt deacetyliertes Histon H3 enthielten, zum anderen zeigten Zellen mit einer niedrigen Expression von GPER eine höhere Methylierung der Promotorregion von GPER (97). Abschließend zeigte auch hier die Therapie mit GPER Agonisten eine Hemmung von Wachstum und Progression in Kolonkarzinomzellen (97).

Neben Untersuchungen in Zervix-, Ovar- und Kolonkarzinom war GPER auch beim triple-negativen Mammakarzinom als Tumorsuppressor beschrieben worden (98). In der Zusammenschau der aktuellen Literatur ist daher vermutlich bei GPER von einem eher positiven Faktor für Patientinnen bei den meisten Krebserkrankungen auszugehen (94-98). Interessant ist daher die negative Korrelation von LSD1 zu GPER, da LSD1 im Zervixkarzinom ein vermutlich negativer Faktor für Patientinnen zu sein scheint (1).

Die aus unserer Untersuchung beschriebene negative Korrelation von LSD1 zu GPER lässt uns vermuten, dass eine Verbindung zwischen beiden Enzymen besteht (1). Ob es dabei letztendlich zu einer direkten Regulierung von GPER durch LSD1 am Genom kommt ist eine mögliche Hypothese. Ebenso ist auch ein indirekter Zusammenhang möglich. Bei einer Vielzahl an Enzymen zur Genregulierung ist ein direkter Nachweis eine interessante Herausforderung.

Zur Hemmung von LSD1 sind bereits viele Inhibitoren bekannt (99). Da LSD1 jedoch auch in einer Vielzahl von Kaskaden involviert zu sein scheint, ist die Kombination mit unterschiedlichen Zielmolekülen attraktiv (99). Die Therapie von LSD1-Antagonisten und GPER-Agonisten ist eine mögliche profitable Untersuchung (1).

In der Analyse der LSD1 Expression unseres Patientenkollektivs zeigte eine hohe Expression von LSD1 einen Nachteil im 10-Jahres-Überleben. *Wu et al.* beschrieb in einer Metaanalyse die Überexpression von LSD1 in diversen Karzinomen (100). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von LSD1 beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSLC) eine Zunahme von Proliferation, Invasion und Migration der Tumorzellen darstellt und somit auch eine schlechte Prognose bei NSLC zeigt (101). Auch beim hepatozellulären Karzinom konnten hohen Level an LSD1

beschrieben werden (102). Ebenso konnte bei dieser Karzinomart eine schlechtere Prognose bei LSD1 Überexpression und niedriger E-Cadherin Expression nachgewiesen werden (102). Plattenepithelkarzinome des Ösophagus zeigten ebenfalls eine schlechte Prognose im Zusammenhang mit einer hohen LSD1 Expression (103). Auch beim Zungenkarzinom zeigte sich ein ähnliches Bild in diesem Zusammenhang. Dort konnte gezeigt werden, dass LSD1 einen Einfluss auf die Prognose und wichtige pathologische Parameter hat (104). Zuletzt zeigten auch Analysen beim Mammakarzinom eine LSD1 Überexpression als Nachteil im Überleben (105). Dazu wurde insbesondere die kombinierte Expression von LSD1 und HDAC untersucht (105). Diese Ergebnisse deuteten auf eine Bedeutung der Histonmodifikation in der Entstehung von Krebs hin (105). Die Ergebnisse zur LSD1 Expression aus unserem Patientenkollektiv zum Zervixkarzinom passen somit gut zu den Ergebnissen aus den bekannten Voruntersuchungen von LSD1 bei anderen Karzinomarten (1).

Nichts destotrotz fanden *Liu et al.* keinen statistisch signifikanten Unterschied der LSD1 Expression bei Patientinnen mit Zervixkarzinom in Bezug auf das Überleben (106). Stattdessen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass LSD1 beim Zervixkarzinom entscheidend auf Malignitätskriterien einwirken kann (106). Dazu zählt zum einen, dass die ektopische Expression von LSD1 mit Invasion und Metastasierung in Verbindung gebracht werden konnte (106). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Epithelmarker E-Cadherin gesunken und der Mesenchymalzellmarker Vimentin gestiegen ist (106). Dies galt als Hinweis der Beteiligung von LSD1 bei der Epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) (106). *Liu et al.* zeigten dazu weitere Hinweise auf eine Hemmung von LSD1 durch HPV 16 Onkoprotein E7. Dadurch wurde die Methylierung von Histon H3K4 am Promoter von Vimentin verhindert und entsprechend konnte der Genabschnitt dadurch besser aktiviert werden (106). Diese Ergebnisse unterstützen somit ebenfalls die onkogenen Eigenschaften von LSD1 im Hinblick auf Patientinnen mit einem Zervixkarzinom (1).

LSD1-Inhibitoren waren daher schon mehrfach im Interesse von Untersuchungen (1). Dazu zählt der MAO-Inhibitor Tranylcypromin (TCP). TCP bindet kovalent an den Flavinring von LSD1 und führt dadurch zur Inhibierung des Enzyms (107). TCP befindet sich dazu in der klinischen Erprobung bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und myelodysplastischen Syndrom (MDS) (99).

Weitere LSD1-Inhibitoren werden zurzeit getestet (99). Dazu gehören ORY-1001, GSK2879552, INCB059872, IMG-7289, CC-90011 und ORY-2001 (99). Aktuell stehen zahlreiche Untersuchungen insbesondere im Bereich der AML, MDS, kleinzelligen

Lungenkarzinom und fortgeschrittenen Malignomen im Vordergrund (99). Die Ergebnisse dieser Studien sind mit Spannung zu erwarten.

Die Untersuchung des Patientenkollektivs zeigte eine negative Korrelation der NCoR Expression zum FIGO Stadium (2). Die FIGO Klassifikation ist die weltweit geläufigste Staging Einteilung für das Zervixkarzinom (108). Anhand des entsprechenden Stadiums können Tumoreigenschaften beschrieben, sowie Rückschlüsse auf das Überleben eingeteilt werden (109). Des Weiteren bildet es die Grundlage für die Therapieentscheidung (109). Die Ergebnisse des Kollektivs präsentieren NCoR als einen positiven Faktor für das Zervixkarzinom (2). Eine entsprechende negative Korrelation zum FIGO Stadium scheint damit eingängig (2). Insbesondere da NCoR auch einen positiven Einfluss auf das Überleben im Kollektiv zeigen konnte (2). Ungünstigerweise konnte das vollständige FIGO Stadium nicht bei allen Patienten erfasst werden. Im Detail konnte bei 94 Patientinnen leider kein FIGO Stadium erfasst werden. Das Ergebnis enthält somit nicht die vollumfängliche Aussagekraft für das gesamte Kollektiv von 250 Patientinnen. Alledem entspricht das Ergebnis jedoch der Hypothese, das NCoR auch beim Zervixkarzinom einen Einfluss auf entscheidende Parameter wie das FIGO Stadium zu haben scheint (2).

Für Tumorgroße, Infiltration von Lymphknoten, Grading und histologischen Subtyp konnten keine signifikanten Unterschiede beschrieben werden.

Das Patientenkollektiv unserer Studie wurde zuvor bereits von *Stiasny et al.* auf das virale HPV Onkoprotein E6 untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung von E6 bei Patientinnen mit fortgeschrittenem FIGO Stadium und erhöhtem pT-Status (110). In der Analyse der Ergebnisse von E6 zu LSD1 zeigte sich eine negative Korrelation beider Proteine zueinander.

Die dauerhafte Expression von Onkoproteinen zählt zu den Hauptfaktoren für die Entartung von HPV-infizierten Zervixzellen (111). Die HPV-DNA enthält den Code für sechs frühe und zwei späte Proteine (112). Die Onkoproteine E5, E6 und E7 der Hochrisiko HPV-Typen besitzen Mechanismen die zur Entartung von Zellen führen können (112). Auch wenn E6 keine enzymatische Aktivität besitzt, kann es durch die Bildung von Komplexen mit anderen Zellbestandteilen zu dramatischen Zellschäden führen (111). Die Bindung mit dem Tumorsuppressor p53 scheint dabei eine besonders wichtige Rolle zu spielen (112). Dadurch kann es zu einem Verlust des Zellzyklus kommen (112). Wichtiger Teil dieser Verbindung stellte ebenfalls das E6-assoziierte Protein dar

(113). Daneben sind noch weitere Bindungen zum Calcium-Binding-Protein ERC 55, zur Tyrosin-Protein-Kinase-BLK oder zum Adhäsionsprotein Paxillin beschrieben worden (114-116). Auch gibt es noch eine Vielzahl an Interaktionen, deren genaue Bedeutung noch nicht bekannt ist (111).

Subbaramaiah et Dannenberg beschrieben auch einen Zusammenhang zwischen NCoR und E6 in vitro. In ihrer Untersuchung inhibierten E6 und E7 die Bindung von NCoR am Promoter der Cyclooxygenase (COX-2) (117). Die Wirkung des Co-Repressors im Komplex mit HDAC3 wird dadurch inhibiert und führt zur gesteigerten Transkription von COX-2 (117). Die Erhöhung von COX-2 wird ebenfalls mit der Karzinomentstehung in Zusammenhang gebracht (117). Auch beim Zervixkarzinom ist eine Überexpression nachgewiesen worden (118).

Diese Beobachtungen lassen sich gut mit den Ergebnissen aus der Untersuchung zu NCoR in Einklang bringen. Sie verdeutlichen zum einen den positiven Einfluss von NCoR als Tumorsuppressor und bestätigen ebenfalls einen möglichen Zusammenhang zwischen den Funktionen beider Moleküle beim Zervixkarzinom (2). Denn ein Einfluss auch auf andere epigenetische Modifikationen durch die viralen Onkoproteine konnte bereits gefunden werden. Dazu zählten insbesondere Histon-modifizierende Enzyme und DNA-Methyltransferasen (119).

In der Korrelationsanalyse zeigte sich eine positive Korrelation von NCoR zum Tumorsuppressor p53 (2). Zusätzlich konnte *Stiasny et al.* am selben Patientenkollektiv signifikant eine höhere Expression von p53 im Plattenepithelkarzinom als im Adenokarzinom feststellen (110). Bei der Analyse von NCoR zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den histologischen Subtyp (2). Wichtige Funktion in der Regulierung der Genexpression, DNA Reparatur und Zelltod werden mit p53 in Verbindung gebracht (120).

Ein Verlust der Schutzwirkung von p53, entweder durch direkte Mutation oder durch Veränderungen in einem Regulationsmechanismus von p53 sind häufige Beobachtungen bei unterschiedlichen Karzinomen (121). In Untersuchungen zum Mammakarzinom wurde nachgewiesen, dass Östrogenrezeptoren durch die Rekrutierung von HDACs und NCoR zu einer Inhibierung von p53 führen können (122). Es gab dabei starke Hinweise für einen gemeinsamen Komplex bestehend aus NCoR, p53, HDAC und Östrogenrezeptor (122). Ebenso wurde nachgewiesen, dass die Bindung von Anti-östrogenen wie Tamoxifen am Östrogenrezeptor zu einer Rekrutierung von NCoR und HDACs führt (122). Als Ergebnis wurde die Transkriptionsaktivität inhibiert (122).

Ferner wurde bei HPV positiven Tumoren beschrieben, dass die Expression von Onkoprotein E6 zur proteolytischen Degradierung von p53 führt (111). In einer Formation aus Onkoprotein E6, E6-assoziierten Protein und p53 kann es somit zum Verlust der Schutzwirkung von p53 kommen (111). Die in der Korrelationsanalyse festgestellte Verbindung zwischen NCoR und p53 wirkt in der Zusammenschau nachvollziehbar (2). Zum einen da beide Proteine einen positiven Einfluss auf die Verhinderung von Tumorerkrankungen haben, sowie zum anderen nachweislich ein Zusammenspiel zwischen beiden Enzymen über weitere Zwischenmoleküle beschrieben werden konnte (111) (122).

In unserer durchgeführten Untersuchung zeigte sich ebenfalls eine negative Korrelation der NCoR Expression zur acetylierten Histon H3K9 (2). In der Untersuchung am selben Patientenkollektiv konnten *Beyer et al.* dabei feststellen, dass acetyliertes Histon H3K9 ebenfalls eine negative Korrelation zum pN-Status besitzt (38). Außerdem zeigte sich eine Korrelation zu einem geringeren Grading, niedrigeren pT-Status und kleineren FIGO Stadium (38). Interessanterweise zeigte acetyliertes Histon H3K9 eine schlechtere Prognose im Gesamtüberleben (38). Daneben zeigte sich zuletzt eine höhere Expression von acetylierten Histon H3K9 bei Patientinnen mit Adenokarzinom als beim Plattenepithelkarzinom (38).

Es ist bekannt, dass NCoR über HDAC an der Deacetylierung von Histonen mitwirkt (57). Dazu besitzt NCoR zum einen eine Domäne, mit der es spezifisch HDAC3 rekrutieren und aktivieren kann (63). Sowie zum anderen eine zusätzliche Domäne, die direkt mit dem Histon-Molekül interagieren kann (64). Auf den ersten Blick wirkt eine negative Korrelation von NCoR zu acetylierten Histon H3K9 nicht überraschend, weil NCoR eine Interaktionsfläche mit HDAC zu bieten scheint (2).

Beobachtungen in Zusammenhang mit Thyreotropin (TSH) zeigten ähnliche Ergebnisse (123). Überexpression von HDAC3 und NCoR waren mit der Verringerung von acetylierten Histon H3 assoziiert (123). In derselben Untersuchung konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass eine Histonacetylierung nicht immer zu einer Transkriptionssteigerung führte (123). Je nach Zielgen konnte eine positive oder negative Regulierung der Transkription resultieren (123). In der Untersuchung zeigte sich eine Acetylierung des TSH Promoters vermittelt über Thyroid-Hormon (T3) (123). T3 löste den Komplex bestehend unter anderem aus HDAC und NCoR am TSH-alpha Promoter auf. Darauf folgte eine Steigerung der Acetylierung, gleichfalls wurde jedoch auch eine Abnahme der Transkription beobachtet (123).

Abschließend zeigte sich auch bei unserem Kollektiv zum Zervixkarzinom eine potentiell wichtige Verbindung von NCoR zum Modifikationsstatus bestimmter Histonanteile.

Es unterstützt die Hypothese, dass NCoR eine bedeutsame Rolle in Bezug auf epigenetische Veränderungen auch beim Zervixkarzinom besitzt (2).

Ebenso zeigte sich abschließend in der Analyse eine Bedeutung der NCoR Expression für das Gesamtüberleben der Patientinnen. Eine hohe Expression von NCoR zeigte einen Überlebensvorteil beim Patientenkollektiv (2).

Ähnliche Ergebnisse zeigen Untersuchungen beim Prostatakarzinom (75). Die Inhibierung von NCoR zeigte insbesondere bei androgen-unabhängigen Prostatakarzinomen eine Zunahme des Tumorwachstums (75). Ebenso zeigte die Inhibierung von NCoR eine signifikante Verschlechterung im Überleben beim Prostatakarzinom (75).

Ähnliche Beobachtungen konnte man auch bei Untersuchungen zu NCoR im Kolonkarzinoms feststellen (124). Eine erniedrigte Expression von NCoR zeigte ein schlechteres Rezidiv-freies Überleben (124). Ebenso konnte beim Kolonkarzinom die NCoR Expression in der Cox Regression als unabhängiger Vorhersagewert für das Rezidiv-freie Überleben ermittelt werden (124). Zusätzlich zeigte beim Kolonkarzinom eine Senkung von NCoR eine Assoziation zu einem schlechteren Überleben (124).

Untersuchungen am Schilddrüsenkarzinom zeigten ebenfalls wichtige Erkenntnisse bezüglich des Überlebens (125). Auch hier zeigte sich NCoR als positiver Einfluss bei Schilddrüsenkarzinomen (125). Ebenso zeigte sich eine Assoziation von NCoR mit gut differenzierten Tumoren und nicht-anaplastischen Tumoren (125). Dagegen war NCoR negativ mit der Tumordinvasion assoziiert (125). Anaplastische Tumore zeigten dagegen sogar keine Expression von NCoR (125).

In weiteren Untersuchungen zu NCoR bei Patienten mit Mammakarzinom konnte NCoR als Prognosefaktor für das Rezidiv-freie Überleben und auch für das Ansprechen auf eine Therapie mit Tamoxifen identifiziert werden (126). In einer anderen Studie zum Mammakarzinom konnte der Einfluss von NCoR auf das Gesamtüberleben jedoch nicht nachgewiesen werden (127).

Im abschließenden Vergleich zeigten die Ergebnisse aus unserem Patientenkollektiv zum Zervixkarzinom die ebenfalls hohe Bedeutung von NCoR für das Überleben beim Zervixkarzinom. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Voruntersuchungen von NCoR bei anderen Tumoridentitäten vereinen (2).

6 Ausblick

In unseren Untersuchungen zeigte die Expression von NCoR und LSD1 einen bedeutsamen Einfluss für Patientinnen mit einem Zervixkarzinom (1, 2). Sowohl mit Hinblick auf das Überleben als auch zu weiteren bedeutsamen klinischen Parametern konnten Verbindungen zu NCoR und LSD1 beschrieben werden (1, 2). Die Ergebnisse aus diesem Patientenkollektiv laden somit zu einer weiteren Analyse ein (1, 2). Insbesondere die Erprobung von LSD1 als Zielstruktur besitzt ein vielversprechendes Potential (1). Die Erprobung von LSD1 Inhibitoren wird bereits an anderen Tumoridentitäten untersucht (99). Des Weiteren sind Untersuchungen von LSD1 am Zervixkarzinom als Prognosemarker oder zur Identifizierung von Hochrisikogruppen eine Aufgabe für zukünftige Analysen (1). Patientinnen mit einer sehr hohen Expression von LSD1 zeigten im untersuchten Patientenkollektiv ein signifikant schlechteres 10-Jahres-Überleben (1). Diese Patienten könnten von der Erprobung von LSD1 Inhibitoren besonders profitieren, sowie von einer weiter individuell angepassten Therapie Gebrauch machen (1). Ebenso zeigten auch die Ergebnisse von NCoR einen wichtigen Beitrag des Proteins beim Zervixkarzinoms (2). In diesem Zusammenhang sollten weitere Studien den Nutzen von NCoR als Therapieziel und als Erweiterung der Diagnostik beim Zervixkarzinom untersucht werden (2).

Die Untersuchung von weiteren epigenetischen Modifikationsmechanismen und deren Auswirkung bei Patientinnen mit Zervixkarzinom stellt ebenfalls eine Aufgabe für zukünftige Analysen dar. Sie geben, wie für NCoR und LSD1 beschrieben wurde, die Möglichkeit einen weiteren Fortschritt in Therapie und Diagnostik beim Zervixkarzinom zu erzielen.

7 Zusammenfassung

Weltweit zählt das Zervixkarzinom zu den vier häufigsten Krebserkrankungen der Frau (3). Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung zählt die Infektion mit einem Hochrisiko HPV-Subtyp (4). Voruntersuchungen am Patientenkollektiv konnten bereits erste Hinweise für den Einfluss von epigenetischen Modifikationen beim Zervixkarzinom beschreiben (38, 55). LSD1 wurde als erste Histon-Demethylase beschrieben (41). Auch für NCoR wurde durch Komplexbildung mit Histondeacetylasen ein Einfluss auf epigenetische Regulationsmechanismen beschrieben (57).

Mit dieser Untersuchung sollte die Bedeutung von LSD1 und NCoR bei Patientinnen mit einem Zervixkarzinom untersucht werden. Augenmerk wurde auf epigenetische Modifikationen und deren Auswirkung auf das Überleben, sowie klinische und pathologische Parameter gelegt (1, 2).

Es erfolgte dazu eine immunhistochemische Färbung von Tumorstanzen von insgesamt 250 Patientinnen mit einem Zervixkarzinom. Diese Patientinnen wurden zwischen 1993 und 2002 an der Klinik für Frauenheilkunde der LMU an einem Zervixkarzinom therapiert. Anhand des IRS erfolgte eine Beurteilung des Färbeergebnisses für das Zytoplasma und den Zellkern durch Lichtmikroskopie. Die Ergebnisse wurden in einer Datenbank erfasst und statistisch ausgewertet. Für signifikante Ergebnisse galt $p \leq 0,05$ (1, 2).

Bei der Untersuchung von LSD1 zeigte eine starke Expression im Zytoplasma einen Nachteil für Patienten im 10-Jahres Überleben ($p = 0,032$). Daneben zeigte sich ebenfalls interessanterweise eine signifikante negative Korrelation von LSD1 zu GPER ($p = 0,009$). Bei der Analyse von NCoR stellte eine hohe Expression einen Vorteil im Gesamtüberleben der Patientinnen dar ($p = 0,003$). Auch für NCoR konnten Korrelationen im Kollektiv beschrieben werden. Dazu zählten eine negative Korrelation zum Onkoprotein E6 ($p = 0,003$), FIGO ($p = 0,004$) und acetylierten Histon H3K9 ($p = 0,003$). Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation der NCoR Expression zum Tumorsuppressor p53 ($p = 0,010$) (1, 2).

Die Ergebnisse aus dem Patientenkollektiv deuten eine vielversprechende Bedeutung von LSD1 sowie von NCoR bei Patientinnen mit Zervixkarzinom an. Insbesondere in Bezug auf das Überleben, aber auch für klinische Parameter des Zervixkarzinoms zeigen LSD1 und NCoR ein vielversprechendes Potential als zukünftige Therapieziele (1, 2).

Literaturverzeichnis

1. Beilner D, Kuhn C, Kost BP, Jückstock J, Mayr D, Schmoeckel E, et al. Lysine-specific histone demethylase 1A (LSD1) in cervical cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2020;146(11):2843-50.
2. Beilner D, Kuhn C, Kost BP, Vilsmaier T, Vattai A, Kaltofen T, et al. Nuclear receptor corepressor (NCoR) is a positive prognosticator for cervical cancer. Archives of Gynecology and Obstetrics. 2021.
3. World-Health-Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer 2020 [02.12.2020]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer).
4. Robert-Koch-Institut. Zentrum-für-Krebsregisterdaten, Krebs in Deutschland für 2015/2016 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c53_gebaermutterhals.pdf?__blob=publicationFile.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom, Kurzversion 1.0, 2014, AWMF Registernummer: 032/033OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, (02.12.2020).
6. ECIS - European Cancer Information System. Aus <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>, Zugriff am 10.12.2020 © European Union, 2020.
7. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2017;28:iv72-iv83.
8. De Vuyst H, Alemany L, Lacey C, Chibwesha CJ, Sahasrabuddhe V, Banura C, et al. The burden of human papillomavirus infections and related diseases in sub-Saharan Africa. Vaccine. 2013;31 Suppl 5(0 5):F32-46.
9. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. [07.12.2020]; <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XFX.pdf>. [
10. Black E, Richmond R. Prevention of Cervical Cancer in Sub-Saharan Africa: The Advantages and Challenges of HPV Vaccination. Vaccines (Basel). 2018;6(3).
11. Finocchiaro-Kessler S, Wexler C, Maloba M, Mabachi N, Ndikum-Moffor F, Bukusi E. Cervical cancer prevention and treatment research in Africa: a systematic review from a public health perspective. BMC Womens Health. 2016;16:29.
12. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol. 2005;32 Suppl 1:S1-6.
13. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond). 2006;110(5):525-41.
14. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. 2012;30 Suppl 5:F55-70.

15. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(18):1500-10.
16. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer.* 2004;111(3):431-9.
17. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(21):1604-13.
18. Bosch FX, Castellsagué X, Muñoz N, de Sanjosé S, Ghaffari AM, González LC, et al. Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(15):1060-7.
19. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet.* 2003;361(9364):1159-67.
20. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, 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):1085-92.
21. Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2006;118(6):1481-95.
22. Karadag Arli S, Bakan AB, Aslan G. Distribution of cervical and breast cancer risk factors in women and their screening behaviours. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2019;28(2):e12960.
23. Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer. *Bmj.* 2015;350:h2372.
24. Wang R, Pan W, Jin L, Huang W, Li Y, Wu D, et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 2020;471:88-102.
25. Robert-Koch-Institut. Schutzimpfung gegen Humane Papillomviren (HPV). Faktenblatt zur HPV Impfung [03.12.2020]. Available from: <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/ImpfungenAZ/HPV/HPV.html>.
26. Rieck T, Feig M, Siedler A, Wichmann O: Aktuelles aus der KV-Impfsurveillance – Impfquoten ausgewählter Schutzimpfungen in Deutschland. *Epid. Bull.* 2018;1:1 – 14 | DOI 10.17886/EpiBull-2018-001.3.
27. Sankaranarayanan R, Anorlu R, Sangwa-Lugoma G, Denny LA. Infrastructure requirements for human papillomavirus vaccination and cervical cancer screening in sub-Saharan Africa. *Vaccine.* 2013;31 Suppl 5:F47-52.
28. Tsikouras P, Zervoudis S, Manav B, Tomara E, Iatrakis G, Romanidis C, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J buon.* 2016;21(2):320-5.

29. Bujan Rivera J, Klug SJ. [Cervical cancer screening in Germany]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2018;61(12):1528-35.
30. Eskander RN. The Epigenetic Landscape in the Treatment of Gynecologic Malignancies. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2018;38:480-7.
31. Fang J, Zhang H, Jin S. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. Tumour Biol. 2014;35(6):5083-93.
32. Kelly AD, Issa JJ. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. Curr Opin Genet Dev. 2017;42:68-77.
33. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. Nat Rev Genet. 2016;17(8):487-500.
34. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ und Stryer L (2018) Stryer Biochemie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8>.
35. Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell. 1999;98(3):285-94.
36. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 2011;21(3):381-95.
37. Turner BM. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. Nat Struct Mol Biol. 2005;12(2):110-2.
38. Beyer S, Zhu J, Mayr D, Kuhn C, Schulze S, Hofmann 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).
39. Maiques-Diaz A, Somervaille TC. LSD1: biologic roles and therapeutic targeting. Epigenomics. 2016;8(8):1103-16.
40. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007;128(4):693-705.
41. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell. 2004;119(7):941-53.
42. Ahmad K, Henikoff S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. Mol Cell. 2002;9(6):1191-200.
43. Stavropoulos P, Blobel G, Hoelz A. Crystal structure and mechanism of human lysine-specific demethylase-1. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(7):626-32.
44. Baron R, Binda C, Tortorici M, McCammon JA, Mattevi A. Molecular mimicry and ligand recognition in binding and catalysis by the histone demethylase LSD1-CoREST complex. Structure. 2011;19(2):212-20.
45. Serce N, Gnatzy A, Steiner S, Lorenzen H, Kirfel J, Buettner R. Elevated expression of LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) during tumour progression from pre-invasive to invasive ductal carcinoma of the breast. BMC Clin Pathol. 2012;12:13.

46. Yang GJ, Lei PM, Wong SY, Ma DL, Leung CH. Pharmacological Inhibition of LSD1 for Cancer Treatment. *Molecules*. 2018;23(12).
47. Pajtlér KW, Weingarten C, Thor T, Künkele A, Heukamp LC, Büttner R, et al. The KDM1A histone demethylase is a promising new target for the epigenetic therapy of medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2013;1:19.
48. Qin Y, Zhu W, Xu W, Zhang B, Shi S, Ji S, et al. LSD1 sustains pancreatic cancer growth via maintaining HIF1 α -dependent glycolytic process. *Cancer Lett*. 2014;347(2):225-32.
49. Zhao ZK, Dong P, Gu J, Chen L, Zhuang M, Lu WJ, et al. Overexpression of LSD1 in hepatocellular carcinoma: a latent target for the diagnosis and therapy of hepatoma. *Tumour Biol*. 2013;34(1):173-80.
50. Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schüle R, Buettner R, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):512-20.
51. Schierle S, Merk D. Development of Nuclear Receptor Modulators. *Methods Mol Biol*. 2018;1824:245-60.
52. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. 2000;14(2):121-41.
53. Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, et al. Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell*. 2003;11(1):139-50.
54. Castet A, Boulahtouf A, Versini G, Bonnet S, Augereau P, Vignon F, et al. Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(6):1957-66.
55. Vattai A, Cavailles V, Sixou S, Beyer S, Kuhn C, Peryanova M, et al. Investigation of RIP140 and LCoR as independent markers for poor prognosis in cervical cancer. *Oncotarget*. 2017;8(62):105356-71.
56. Hörlein AJ, Näär AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 1995;377(6548):397-404.
57. Martínez-Iglesias O, Alonso-Merino E, Aranda A. Tumor suppressive actions of the nuclear receptor corepressor 1. *Pharmacol Res*. 2016;108:75-9.
58. Yamamoto H, Williams EG, Mouchiroud L, Cantó C, Fan W, Downes M, et al. NCoR1 is a conserved physiological modulator of muscle mass and oxidative function. *Cell*. 2011;147(4):827-39.
59. Li P, Fan W, Xu J, Lu M, Yamamoto H, Auwerx J, et al. Adipocyte NCoR knockout decreases PPAR γ phosphorylation and enhances PPAR γ activity and insulin sensitivity. *Cell*. 2011;147(4):815-26.
60. Martínez-Iglesias OA, Alonso-Merino E, Gómez-Rey S, Velasco-Martín JP, Martín Orozco R, Luengo E, et al. Autoregulatory loop of nuclear corepressor 1 expression controls invasion, tumor growth, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(3):E328-37.

61. Watson PJ, Fairall L, Schwabe JW. Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;348(2):440-9.
62. Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo j.* 2000;19(6):1176-9.
63. Codina A, Love JD, Li Y, Lazar MA, Neuhaus D, Schwabe JW. Structural insights into the interaction and activation of histone deacetylase 3 by nuclear receptor corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(17):6009-14.
64. Hartman HB, Yu J, Alenghat T, Ishizuka T, Lazar MA. The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. *EMBO Rep.* 2005;6(5):445-51.
65. Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M. Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem.* 1999;274(22):15901-7.
66. Dwivedi PP, Muscat GE, Bailey PJ, Omdahl JL, May BK. Repression of basal transcription by vitamin D receptor: evidence for interaction of unliganded vitamin D receptor with two receptor interaction domains in RIP13delta1. *J Mol Endocrinol.* 1998;20(3):327-35.
67. Wagner BL, Valledor AF, Shao G, Daige CL, Bischoff ED, Petrowski M, et al. Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol Cell Biol.* 2003;23(16):5780-9.
68. Jepsen K, Rosenfeld MG. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 4):689-98.
69. Dobrzycka KM, Townson SM, Jiang S, Oesterreich S. Estrogen receptor corepressors -- a role in human breast cancer? *Endocr Relat Cancer.* 2003;10(4):517-36.
70. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell.* 2000;103(6):843-52.
71. Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK. A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 1998;12(4):513-24.
72. Kashima H, Horiuchi A, Uchikawa J, Miyamoto T, Suzuki A, Ashida T, et al. Up-regulation of nuclear receptor corepressor (NCoR) in progestin-induced growth suppression of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1023-9.
73. Chien PY, Ito M, Park Y, Tagami T, Gehm BD, Jameson JL. A fusion protein of the estrogen receptor (ER) and nuclear receptor corepressor (NCoR) strongly inhibits estrogen-dependent responses in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 1999;13(12):2122-36.
74. Yoo JY, Choi HK, Choi KC, Park SY, Ota I, Yook JI, et al. Nuclear hormone receptor corepressor promotes esophageal cancer cell invasion by transcriptional repression of interferon- γ -inducible protein 10 in a casein kinase 2-dependent manner. *Mol Biol Cell.* 2012;23(15):2943-54.

75. Yoo JY, Lim BJ, Choi HK, Hong SW, Jang HS, Kim C, et al. CK2-NCoR signaling cascade promotes prostate tumorigenesis. *Oncotarget*. 2013;4(7):972-83.
76. Hofman FM, Taylor CR. Immunohistochemistry. *Curr Protoc Immunol*. 2013;103:21.4.1-4.6.
77. Grahek M, Ptak A, Kalyuzhny AE. High-Sensitivity IHC Detection of Phosphorylated p27/Kip1 in Human Tissues Using Secondary Antibody Conjugated to Polymer-HRP. *Methods Mol Biol*. 2017;1554:211-8.
78. Zytomed Systems. ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (19.12.2020). Abrufbar unter <https://www.zytomed-systems.de/storage/uploads/datasheets/de/POLHRP.pdf> [
79. Kaemmerer D, Peter L, Lupp A, Schulz S, Sanger J, Baum RP, et al. Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(3):187-94.
80. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
81. Singh N, Arif S. Histopathologic parameters of prognosis in cervical cancer--a review. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14(5):741-50.
82. Brandt WD, Matsui W, Rosenberg JE, He X, Ling S, Schaeffer EM, et al. Urothelial carcinoma: stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(3-4):291-304.
83. Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Trop C, Bryne M. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1999;74(2):245-51.
84. Delgado G, Bundy B, Zaino R, Sevin BU, Creasman WT, Major F. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 1990;38(3):352-7.
85. Stock RJ, Zaino R, Bundy BN, Askin FB, Woodward J, Fetter B, et al. Evaluation and comparison of histopathologic grading systems of epithelial carcinoma of the uterine cervix: Gynecologic Oncology Group studies. *Int J Gynecol Pathol*. 1994;13(2):99-108.
86. Lan W, Zhang D, Jiang J. The roles of LSD1-mediated epigenetic modifications in maintaining the pluripotency of bladder cancer stem cells. *Med Hypotheses*. 2013;81(5):823-5.
87. Adamo A, Ses B, Boue S, Castao J, Paramonov I, Barrero MJ, et al. LSD1 regulates the balance between self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2011;13(6):652-9.
88. Yao T, Lu R, Zhang Y, Zhang Y, Zhao C, Lin R, et al. Cervical cancer stem cells. *Cell Prolif*. 2015;48(6):611-25.
89. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:165-90.

90. Molina L, Figueroa CD, Bhoola KD, Ehrenfeld P. GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(8):755-66.
91. Chan KKL, Siu MKY, Jiang YX, Wang JJ, Wang Y, Leung THY, et al. Differential expression of estrogen receptor subtypes and variants in ovarian cancer: effects on cell invasion, proliferation and prognosis. *BMC Cancer*. 2017;17(1):606.
92. Hsu LH, Chu NM, Kao SH. Estrogen, Estrogen Receptor and Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
93. Heublein S, Mayr D, Friese K, Jarrin-Franco MC, Lenhard M, Mayerhofer A, et al. The G-protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in ovarian granulosa cell tumors. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):15161-72.
94. Ignatov T, Modl S, Thulig M, Weißenborn C, Treeck O, Ortmann O, et al. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2013;6(1):51.
95. Friese K, Kost B, Vattai A, Marmé F, Kuhn C, Mahner S, et al. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) may serve as a prognostic marker in early-stage cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(1):13-9.
96. Zhang Q, Wu YZ, Zhang YM, Ji XH, Hao Q. Activation of G-protein coupled estrogen receptor inhibits the proliferation of cervical cancer cells via sustained activation of ERK1/2. *Cell Biochem Funct*. 2015;33(3):134-42.
97. Liu Q, Chen Z, Jiang G, Zhou Y, Yang X, Huang H, et al. Epigenetic down regulation of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) functions as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):87.
98. Weißenborn C, Ignatov T, Ochel HJ, Costa SD, Zenclussen AC, Ignatova Z, et al. GPER functions as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(5):713-23.
99. Fang Y, Liao G, Yu B. LSD1/KDM1A inhibitors in clinical trials: advances and prospects. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):129.
100. Wu J, Hu L, Du Y, Kong F, Pan Y. Prognostic role of LSD1 in various cancers: evidence from a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2015;8:2565-70.
101. Lv T, Yuan D, Miao X, Lv Y, Zhan P, Shen X, et al. Over-expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2012;7(4):e35065.
102. Jie D, Zhongmin Z, Guoqing L, Sheng L, Yi Z, Jing W, et al. Positive expression of LSD1 and negative expression of E-cadherin correlate with metastasis and poor prognosis of colon cancer. *Dig Dis Sci*. 2013;58(6):1581-9.
103. Yu Y, Wang B, Zhang K, Lei Z, Guo Y, Xiao H, et al. High expression of lysine-specific demethylase 1 correlates with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437(2):192-8.
104. Yuan C, Li Z, Qi B, Zhang W, Cheng J, Wang Y. High expression of the histone demethylase LSD1 associates with cancer cell proliferation and unfavorable prognosis in tongue cancer. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(2):159-65.
105. Derr RS, van Hoesel AQ, Benard A, Goossens-Beumer IJ, Sajet A, Dekker-Ensink NG, et al. High nuclear expression levels of histone-modifying enzymes LSD1,

HDAC2 and SIRT1 in tumor cells correlate with decreased survival and increased relapse in breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2014;14:604.

106. Liu Y, Wang Y, Chen C, Zhang J, Qian W, Dong Y, et al. LSD1 binds to HPV16 E7 and promotes the epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer by demethylating histones at the Vimentin promoter. *Oncotarget*. 2017;8(7):11329-42.

107. Binda C, Valente S, Romanenghi M, Pilotto S, Cirilli R, Karytinios A, et al. Biochemical, structural, and biological evaluation of tranylcypromine derivatives as inhibitors of histone demethylases LSD1 and LSD2. *J Am Chem Soc*. 2010;132(19):6827-33.

108. Kraljević Z, Visković K, Ledinsky M, Zadravec D, Grbavac I, Bilandzija M, et al. Primary uterine cervical cancer: correlation of preoperative magnetic resonance imaging and clinical staging (FIGO) with histopathology findings. *Coll Antropol*. 2013;37(2):561-8.

109. Matsuo K, Machida H, Mandelbaum RS, Konishi I, Mikami M. Validation of the 2018 FIGO cervical cancer staging system. *Gynecol Oncol*. 2019;152(1):87-93.

110. Stiasny A, Freier CP, Kuhn C, Schulze S, Mayr D, Alexiou C, et al. The involvement of E6, p53, p16, MDM2 and Gal-3 in the clinical outcome of patients with cervical cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(4):4467-76.

111. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol*. 2018;26(2):158-68.

112. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):690-8.

113. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993;75(3):495-505.

114. Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*. 1995;269(5223):529-31.

115. Oda H, Kumar S, Howley PM. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9557-62.

116. Tong X, Howley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(9):4412-7.

117. Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res*. 2007;67(8):3976-85.

118. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(2):429-34.

119. Durzynska J, Lesniewicz K, Poreba E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;772:36-50.

120. Lacroix M, Riscal R, Arena G, Linares LK, Le Cam L. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Mol Metab.* 2020;33:2-22.
121. Joerger AC, Fersht AR. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu Rev Biochem.* 2016;85:375-404.
122. Konduri SD, Medisetty R, Liu W, Kaiparettu BA, Srivastava P, Brauch H, et al. Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15081-6.
123. Wang D, Xia X, Liu Y, Oetting A, Walker RL, Zhu Y, et al. Negative regulation of TSHalpha target gene by thyroid hormone involves histone acetylation and corepressor complex dissociation. *Mol Endocrinol.* 2009;23(5):600-9.
124. Tzelepi V, Grivas P, Kefalopoulou Z, Kalofonos H, Varakis JN, Sotiropoulou-Bonikou G. Expression of estrogen receptor co-regulators NCoR and PELP1 in epithelial cells and myofibroblasts of colorectal carcinomas: cytoplasmic translocation of NCoR in epithelial cells correlates with better [corrected] prognosis. *Virchows Arch.* 2009;454(1):41-53.
125. Kavanagh DO, McIlroy M, Myers E, Bane F, Crotty TB, McDermott E, et al. The role of oestrogen receptor {alpha} in human thyroid cancer: contributions from coregulatory proteins and the tyrosine kinase receptor HER2. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(1):255-64.
126. Girault I, Lerebours F, Amarir S, Tozlu S, Tubiana-Hulin M, Lidereau R, et al. Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res.* 2003;9(4):1259-66.
127. Harigopal M, Heymann J, Ghosh S, Anagnostou V, Camp RL, Rimm DL. Estrogen receptor co-activator (AIB1) protein expression by automated quantitative analysis (AQUA) in a breast cancer tissue microarray and association with patient outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115(1):77-85.

Danksagung

Ich danke zunächst Helene Heidegger Steger und Udo Jeschke für die Überlassung des Themas und der fachlichen Unterstützung während der gesamten Arbeit. Insbesondere für das Erlernen von wissenschaftlichen Arbeitstechniken, der Teilnahme an Kongressen, sowie der Möglichkeit schriftliche Arbeiten zu verfassen und gemeinsam zu publizieren. Ich bedanke mich ebenfalls für die Zusammenarbeit mit Christina Kuhn im Labor, insbesondere für die praktische Einarbeitung in die Immunhistochemie, sowie für ihre sehr freundschaftliche Betreuung.

Ebenso gilt mein Dank meiner Familie für die starke Unterstützung während meines gesamten Studiums, sowie in anderen Lebensabschnitten.

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Daniel Beilner
Geburtsdatum: 9. März 1994
Geburtsort: Hanau, Hessen, Deutschland

Ausbildung

2004-2010 Otto-Hahn-Schule Hanau
2010-2013 Kaufmännische Schule Hanau
2013-2020 Ludwig-Maximilians-Universität

Berufliche Erfahrung

Famulaturen (2015-2018) Klinik für Hämatologie und Onkologie, Klinikum Hanau
Allgemeinmedizin Praxis Dres. Klement & Koch, Mainaschaff
Neurologische Notaufnahme, Klinikum Hanau
Chirurgie, Shanghai East Hospital, Tongji University, China
Gynäkologie & Geburtshilfe, Harper University Hospital, Detroit, USA

Praktisches Jahr (2019-2020) Gynäkologie & Geburtshilfe, Klinikum Großhadern, München
Chirurgie, Marienkrankenhaus, Hamburg
Innere Medizin, Klinikum am Urban, Berlin

Publikationen

Lysine-specific histone demethylase 1A (LSD1) in cervical cancer.

Beilner D, Kuhn C, Kost BP, Jückstock J, Mayr D, Schmoeckel E, Dannecker C, Mahner S, Jeschke U, Heidegger HH.

J Cancer Res Clin Oncol. 2020 Nov;146(11):2843-2850. doi: 10.1007/s00432-020-03338-z.

Nuclear receptor corepressor (NCoR) is a positive prognosticator for cervical cancer.

Beilner D, Kuhn C, Kost BP, Vilsmaier T, Vattai A, Kaltofen T, Mahner S, Schmoeckel E, Dannecker C, Jückstock J, Mayr D, Jeschke U, Heidegger HH.

Arch Gynecol Obstet. 2021 Apr 16. doi: 10.1007/s00404-021-06053-3.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre Ich, Daniel Beilner, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Epigenetische Veränderungen am Zervixkarzinom
durch Lysin-spezifische Demethylase (LSD1) und Nuclear Receptor
Co-Repressor (NCoR)

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

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

Berlin, 19.03.2022

Daniel Beilner

Ort, Datum

Unterschrift