

Aus der
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Immunhistochemische Analyse der Expression von
Galektin-8, Galektin-9, H3K9ac, H3K4me3 und dem
Glukokortikoidrezeptor im Zervix- und
Endometriumkarzinom**

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

vorgelegt von
Maya Wehrmann

aus
Pinneberg

2024

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

Erstes Gutachten:	Prof. Dr. Thomas Kolben
Zweites Gutachten:	Prof. Dr. Dr. Stefanie Corradini
Drittes Gutachten:	Prof. Dr. Doris Mayr
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	19.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	3
Abstract.....	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	12
1.1 Bedeutung des Zervixkarzinoms	12
1.2 Bedeutung des Endometriumkarzinoms	14
1.3 Galektine.....	18
1.4 Histonmodifikationen	21
1.5 Glukokortikoidrezeptor	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.2 Methoden	28
3 Ergebnisse	32
3.1 Analyse des Zervixkarzinom-Kollektivs	32
3.2 Analyse des Endometriumkarzinom-Kollektivs	34
3.3 Galektin-8-Färbung im Zervixkarzinom.....	35
3.4 Galektin-9-Färbung im Zervixkarzinom.....	40
3.5 Galektin-8-Färbung im Endometriumkarzinom	45
3.6 Galektin-9-Färbung im Endometriumkarzinom	51
3.7 H3K9ac-Färbung im Endometriumkarzinom.....	56
3.8 H3K4me3-Färbung im Endometriumkarzinom	61
3.9 Glukokortikoidrezeptor-Färbung im Endometriumkarzinom.....	66
4 Diskussion	72
4.1 Galektin-8 als prognostischer Marker für Patientinnen mit Zervix- oder Endometriumkarzinom	72
4.2 Galektin-9 als prognostischer Marker für Patientinnen mit Zervix- oder Endometriumkarzinom	73
4.3 Galektin-8 und -9 als diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte für Patientinnen mit Zervix- oder Endometriumkarzinom	75
4.4 H3K9ac und H3K4me3 als prognostische Marker für Patientinnen mit Endometriumkarzinom	75

4.5	<i>H3K9ac und H3K4me3 als therapeutische Ansatzpunkte für Patientinnen mit Endometriumkarzinom</i>	78
4.6	<i>Der Glukokortikoidrezeptor als prognostischer Marker für Patientinnen mit Endometriumkarzinom</i>	79
4.7	<i>Der Glukokortikoidrezeptor als therapeutischer Ansatzpunkt für Patientinnen mit Endometriumkarzinom</i>	81
	Literaturverzeichnis	82
	Danksagung	94
	Affidavit	95
	Publikationsliste	96

Zusammenfassung

Sowohl das Zervix- als auch das Endometriumkarzinom sind häufige gynäkologische Tumoreititäten. 2020 verstarben ca. 440.000 Frauen weltweit an diesen Erkrankungen [1]. Das Zervixkarzinom stellt eine Tumorerkrankung der jungen Frau dar. Die Inzidenz und Mortalität konnten in Deutschland in den letzten Jahren erheblich gesenkt werden. In Entwicklungsländern bleibt das Zervixkarzinom aber eine der führenden Todesursachen unter Frauen [2, 3]. Das Endometriumkarzinom ist ein Tumor des Alters, mit steigender Inzidenz und Mortalität in der westlichen Welt [4]. Gemein ist beiden Tumoreititäten die Stellung als bleibendes globales Gesundheitsproblem. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoreititäten haben sich die Überlebensraten bei Patientinnen mit Zervix- und Endometriumkarzinomen seit 1970 nicht wesentlich verbessert [5]. Dies spiegelt die limitierten therapeutischen Optionen, vor allem bei Patientinnen mit fortgeschrittener oder rezidivierter Erkrankung, wider [6]. Die genaue Untersuchung potenziell kanzerogener Mechanismen ist Grundlage für die Entwicklung weiterer prognostischer Faktoren und therapeutischer Zielpunkte und daher von großer Bedeutung. Galektin-8 und Galektin-9, die Histonmodifikationen H3K9ac und H3K4me3 sowie der Glukokortikoidrezeptor sind in den Prozess der Karzinogenese involviert und wurden bereits für verschiedene Tumoreititäten als prognostische Faktoren identifiziert [7-10].

Daher wurden in dieser Arbeit die Marker in Kollektiven von 244 Zervixkarzinom- und 225 Endometriumkarzinomproben immunhistochemisch untersucht. Im Zervixkarzinomkollektiv wurden plattenepitheliale, glanduläre und adenosquamöse Subtypen eingeschlossen, im Endometriumkarzinomkollektiv ausschließlich endometrioiden Adenokarzinome. Die Proben entstammen Patientinnen, die in der Frauenklinik der LMU von 1993 – 2002 (Zervixkarzinom) bzw. 1990 – 2002 (Endometriumkarzinom) operiert wurden. Das Gewebe wurde immunhistochemisch gefärbt und anschließend mithilfe eines semiquantitativen Scores lichtmikroskopisch ausgewertet. Anschließend wurden die Färbeargebnisse mit histopathologischen Parametern der Tumore und Überlebensdaten der Patientinnen korreliert. Die statistische Auswertung wurde mithilfe von SPSS durchgeführt.

Galektin-8 wurde im Zervixkarzinom ausschließlich zytosolisch exprimiert, im Endometriumkarzinom zeigte sich eine zytoplasmatische und nukleäre Expression von Galektin-8. Sowohl im Zervix-, als auch im Endometriumkarzinom konnte Galektin-8 als positiv prognostischer Marker identifiziert werden. Im Zervixkarzinom korrelierte eine erhöhte Galektin-8-Expression mit einem negativen Nodalstatus ($p = 0,004$) und einem niedrigeren FIGO-Stadium ($p = 0,008$). Außerdem zeigte Galektin-8 in der Gruppe der plattenepithelialen Karzinome einen positiven Einfluss auf das rezidivfreie Überleben ($\chi^2 = 4,394$ mit $p = 0,036$). Im Endometriumkarzinom war die zytosolische Galektin-8-Expression invers mit dem Grading korreliert ($p = 0,029$). Eine höhere Expression von Galektin-8 war ein positiv prognostischer Marker für das Gesamtüberleben der Patientinnen, wobei die zytosolische Galektin-8-Expression als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert wurde. Galektin-9 zeigte das gleiche Expressionsmuster wie Galektin-8 und lag im Zervixkarzinom nur zytosolisch, im Endometriumkarzinom auch nukleär vor. Für den Nodalstatus pN zeigte sich eine negative Korrelation mit Galektin-9 ($p = 0,024$), ebenso wie für das FIGO-Stadium (nur in der Gruppe der plattenepithelialen Karzinome; $p = 0,002$) und dem Grading ($p = 0,048$). Eine höhere Galektin-9-Expression war ebenfalls mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert ($\chi^2 = 4,519$ mit $p = 0,034$). Im Endometriumkarzinomkollektiv war eine höhere zytosolische Galektin-9-Expression assoziiert mit niedrigerem Grading ($p < 0,001$). Passend dazu beeinflusste das zytosolische Galektin-9 das Gesamtüberleben von Patientinnen mit Endometriumkarzinom positiv ($\chi^2 = 4,608$ mit $p = 0,032$). Insgesamt

konnten Galektin-8 und -9 als positiv prognostische Marker für das Zervix- und Endometriumkarzinom identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2022 unter dem Titel „Galectin-8 and -9 as prognostic factors for cervical cancer“ publiziert [11].

Galektine können über die Erkennung von Glykokonjugaten Signalwege aktivieren und so verschiedene tumorbiologisch relevante Prozesse regulieren. Galektin-8 und -9 modulieren beispielsweise Angiogenese, Apoptose, Metastasierung und die tumoröse Immunantwort [7]. Für Galektin-8 wurden ambivalente Effekte beschrieben, jedoch konnte der positiv prognostische Wert von Galektin-8 z.B. im Ovarial- und Mammakarzinom nachgewiesen werden [8, 12, 13]. Galektin-9 hingegen zeigt in den meisten Tumoretitäten einen tumorsuppressiven Effekt, der mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Einklang steht [14, 15]. In der histopathologischen Diagnostik kann besonders die kombinierte Untersuchung aller tumorbiologisch relevanten Galektine am Tumor Aufschluss über das Tumorstadium und die Prognose geben. Als therapeutische Zielpunkte werden Galektine mit onkogener Wirkung in ersten klinischen Studien mittels spezifischen Galektin-Inhibitoren supprimiert [16]. Um die Funktion Galektin-8 und -9 in der Tumorbiologie noch besser verstehen sowie diagnostisch und therapeutisch nutzen zu können, sind weitere Studien, vor allem hinsichtlich der Wirkung verschiedener Isoformen und der subzellulären Lokalisation sinnvoll und notwendig.

Die Analyse der Expression von H3K9ac im Endometriumkarzinom zeigte eine starke Anfärbung in den Nuklei. Die Tumorausdehnung pT korrelierte invers mit der nukleären H3K9ac-Expression ($p = 0,020$), genauso wie der Nodalstatus pN ($p = 0,042$) und das FIGO-Stadium ($p = 0,021$). Jedoch war eine starke zytosolische Expression von H3K9ac mit einem positive Lymphknotenstatus pN1 assoziiert ($p = 0,024$). Die nukleäre Expression von H3K4me3 war invers mit der Tumorausdehnung pT ($p = 0,011$) und dem FIGO-Stadium korreliert ($p = 0,012$). Insgesamt konnten die aktivierenden Histonmodifikationen H3K9ac und H3K4me3 ebenfalls als positiv prognostische Faktoren für das Endometriumkarzinom identifiziert werden.

Histonmodifikationen regulieren als epigenetische Modifikationen die Zugänglichkeit der DNA für die Transkription und können so die Expression von Tumorsuppressor- oder Onkogenen aktivieren. Eine Häufung von H3K9ac und H3K4me3 an Tumorsuppressorgenen sind vorteilhaft und ein global erhöhtes Level der aktivierenden Histonmodifikationen führt zu einer besseren Prognose für Patientinnen mit Endometriumkarzinom [17-20]. Reduzierte Level von H3K4me3 und H3K9ac sind Hinweise für vorliegende DNA-Schäden [21, 22]. Diese Ergebnisse passen zu dem positiv prognostischen Wert, der für die Modifikationen in dieser Arbeit ermittelt werden konnte. Daher können H3K4me3 und H3K9ac diagnostisch wertvolle Marker sein und Hinweise auf den Nutzen im Einsatz von Histondeacetylase- und Lysindemethylase-Inhibitoren geben.

Der Glukokortikoidrezeptor wurde im tumor-assoziierten Stroma sowie im Tumor selbst im Endometriumkarzinomkollektiv evaluiert. Die Glukokortikoidrezeptor-Expression im Stroma korrelierte signifikant invers mit der Tumorausdehnung pT ($p = 0,009$). Dasselbe konnte für das FIGO-Stadium beobachtet werden ($p = 0,013$).

Als nukleärer Rezeptor reguliert der Glukokortikoidrezeptor die Transkription verschiedener Gene und kann dabei je nach Isoform transaktivierend oder -repressiv wirken [23, 24]. Zusätzlich sind auch nicht-genomische Effekte des Glukokortikoidrezeptors bekannt [25]. Vor allem in hormonabhängigen Karzinomen scheint der Glukokortikoidrezeptor eine wichtige Rolle zu spielen, da er mit den Funktionen anderer nukleärer Rezeptoren wie dem Östrogenrezeptor im Mammakarzinom interagiert [26, 27]. In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Glukokortikoidrezeptor-Expression im Tumor und prognostischem Wert für

die Patientinnen ermittelt werden. Jedoch war die Expression des Glukokortikoidrezeptors im tumor-assoziierten Stroma verbunden mit einem niedrigerem Tumorstadium. Während im Endometriumkarzinom selbst bisher gegensätzliche Effekte des Glukokortikoidrezeptors beschrieben wurden, gibt es noch keine Studien zur Wirkung desselben im Stroma [28, 29]. In anderen Tumorentitäten, wie dem Kolonkarzinom, konnte der Glukokortikoidrezeptor als Transkriptionsfaktor Onkogene regulieren und so eine tumorsuppressive Wirkung entfalten [30].

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit fünf verschiedene Parameter am Zervix- und/oder Endometriumkarzinom untersucht, wobei sich alle davon als positiv prognostisch für die Patientinnen darstellten. Die Ergebnisse dienen als erste Orientierung inwieweit sich Galektine, Histonmodifikationen und der Glukokortikoidrezeptor auf das Outcome von Patientinnen mit Endometrium- und Zervixkarzinom auswirken. In dieser Studie wird die Expression der molekularen Marker untersucht, es bedarf jedoch noch weiteren Untersuchungen in Hinblick auf die zugrunde liegenden Mechanismen. Darauf basierend können neue Diagnoseverfahren, prognostische Einteilungen und Therapieansätze entwickelt werden.

Abstract

Both cervical and endometrial cancer are common gynecological tumor entities. Altogether approximately 440.000 women died worldwide from these diseases in 2020 [1]. Cervical carcinoma represents a tumor disease of rather young women and the incidence as well as mortality could be significantly reduced in Germany during the last years. However, it remains one of the leading causes of death among women in developing countries [2, 3]. Endometrial cancer is a disease of mainly older women, with incidence and mortality continuously rising in the western world [4]. A similarity of both carcinomas is their position as an enduring global major health issue. In contrast to many other tumor entities, survival rates of patients with cervical or endometrial cancer have not improved significantly since the 1970s [5]. This reflects the limited therapeutical options especially for patients with advanced or recurrent disease [6]. The exact investigation of potentially cancerogenic mechanism is the basis for the development of further diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. As they are implicated in carcinogenesis, galectin-8 and -9, the histone modifications H3K9ac and H3K4me3 and the glucocorticoid receptor, were identified as prognostic markers in gynecological tumors [7-10].

Therefore, these proteins were immunohistochemically examined in collectives of 244 cervical and 225 endometrial carcinoma specimens. The cervical carcinoma collective included squamous, glandular, and adenosquamous subtypes, the endometrial carcinoma collective comprised endometrioid adenocarcinomas only. These samples originated from patients which underwent surgery in the Department of Gynecology and Obstetrics, LMU Munich in the period of 1993 – 2002 (cervical cancer) respectively 1990 – 2002 (endometrial cancer).

The tissue was immunohistochemically stained, followed by a microscopical analysis using a semiquantitative score. The staining results were statistically correlated with histopathological features of the tumors and survival time data of the patients. Statistical analysis was performed using SPSS.

In cervical cancer, galectin-8 was solely expressed in the cytoplasm. Squamous cell carcinomas showed significantly more galectin-8 than adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas ($p = 0,024$). The expression of galectin-8 in the nucleus and cytoplasm was evaluated separately in endometrial cancer. Both in cervical and

endometrial cancer, galectin-8 was identified as a positive prognostic marker. In cervical cancer, galectin-8 expression correlated with negative nodal status pN0 ($p = 0,004$) and lower FIGO stage ($p = 0,008$). In addition, in the group of squamous cell carcinoma, galectin-8 showed a positive impact on relapse-free survival ($p = 0,036$). In endometrial cancer, cytosolic galectin-8 expression correlated inversely with grading ($p = 0,029$). Higher expression of cytosolic and nuclear galectin-8 expression turned out to be a positive prognostic marker for overall patient survival, with cytosolic galectin-8 being an independent prognostic factor. Galectin-9 showed the same expression pattern as galectin-8 (only cytosolic in cervical, but both cytosolic and nuclear in endometrial cancer). Regarding the nodal status in cervical cancer, a negative correlation was seen ($p = 0,024$), as well as for FIGO stage (only in squamous cell carcinomas, $p = 0,002$) and grading ($p = 0,048$). Concerning the overall survival, galectin-9-expression turned out to be beneficial ($p = 0,034$). In endometrial cancer, higher cytosolic galectin-9 expression was associated with lower grading ($p < 0,001$) and prolonged overall survival ($p = 0,032$). Altogether, galectin-8 and -9 could be identified as positive prognostic markers for cervical and endometrial cancer. The results of this study were published in 2022 under the title „Galectin-8 and -9 as prognostic factors for cervical cancer“ [11].

Galectins can activate signal pathways via glycoconjugate recognition and thus regulate tumor biologic processes. For galectin-8 and -9 these processes compromise angiogenesis, apoptosis, metastasis and the tumoral immune response [7]. Ambivalent effects have been described for galectin-8, but the positive prognostic value of this lectin has been demonstrated in e.g. ovarian and breast cancer, as well as in this study [8, 12, 13]. In contrary, galectin-9 shows a tumor suppressive effect in most studies, which could be confirmed in this thesis [14, 15]. In histopathological diagnostics, especially the combined investigation of all relevant galectins in the tumor, can provide information about tumor stage and patient prognosis. As therapeutic targets, galectins with mainly oncogenic activity are suppressed in primal clinical trials by specific galectin inhibitors [16]. However, the therapeutic efficacy of galectin-8 and -9 in cervical and endometrial cancer remains to be elucidated. To understand their function in tumor biology even better, further studies, especially regarding different isoforms and subcellular localization, are necessary.

Analysis of H3K9ac expression in endometrial cancer showed, as expected, strong staining in the nuclei. Tumor extent pT correlated inversely with nuclear H3K9ac expression ($p = 0,021$), as did nodal status pN ($p = 0,042$) and FIGO stage ($p = 0,021$). However, strong cytosolic H3K9ac expression was associated with a positive lymph node status ($p = 0,024$). H3K4me3 was expressed in the nucleus in 85,4% and cytoplasmic in 85,8% of the specimens. Nuclear H3K4me3 expression was inversely correlated with tumor extent ($p = 0,011$) and FIGO stage ($p = 0,012$). In summary, the activating histone modifications H3K4me3 and H3K9ac are positive prognostic factors for endometrial cancer.

Histone modifications like H3K4me3 and H3K9ac regulate the accessibility of DNA for transcription and can thus alter the expression of genes. An accumulation of H3K9ac and H3K4me3 at tumor suppressor genes are beneficial and a globally increased level of activating histone modifications leads to a better prognosis for patients with endometrial cancer [17-20]. On the contrary, reduced expression of H3K4me3 and H3K9ac is indicative of DNA damage [21, 22]. These results are matching with the positive prognostic value of those modifications identified in this study. Therefore, H3K4me3 and H3K9ac can be diagnostically valuable markers and provide evidence for benefit in the use of histone deacetylase inhibitors and lysine demethylase inhibitors in endometrial cancer.

The glucocorticoid receptor was evaluated in tumor-associated stroma as well as in the tumor itself. There was a significant correlation with lower tumor extent pT ($p = 0,009$) and higher glucocorticoid receptor expression, the same coherence could be found for

FIGO stage ($p = 0,013$). As a nuclear receptor, the glucocorticoid receptor regulates transcription of various genes and can act transactivating or transrepressing [23, 24]. Additionally, non-genomic effects of the glucocorticoid receptor are known [25]. The glucocorticoid receptor seems to play an important role especially in hormone dependent carcinomas by interacting with other nuclear receptors like androgen or estrogen receptors [26, 27]. In this study, no coherence between glucocorticoid receptor expression the tumor and prognostic value for patients was determined. However, the expression of the glucocorticoid receptor in tumor-associated stroma correlated with a lower tumor stage. While opposing effects of the glucocorticoid receptor in endometrial cancer have been previously described, so far there have been no studies on the impact of glucocorticoid receptor in the tumoral stroma [28, 29]. In other tumor entities like colon carcinoma, the glucocorticoid receptor in the stroma was able to regulate oncogenes and thus exert tumor suppressive effects [30].

In summary, in this study five different markers were investigated in cervical and/or endometrial cancer. All of them were found to be positively prognostic for the patients. These results serve as a first orientation to what extent galectins, histone modifications and the glucocorticoid receptor affect the outcome of patients with cervical or endometrial cancer. In this study, only the expression of the molecular markers was evaluated, but there is a need for further investigation of the underlying mechanisms. Based on these findings, new diagnostic procedures, prognostic classifications, and possibly therapeutic approaches can be developed.

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Galektin-Arten</i>	18
<i>Abbildung 2: Aufbau eines Nukleosoms</i>	22
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung von Histonacetylierungen und -methylierungen</i>	22
<i>Abbildung 4: Genomischer Aufbau des GR und Struktur des GR-Proteins</i>	24
<i>Abbildung 5: Wirkmechanismus des GR</i>	25
<i>Abbildung 6: Positivkontrolle Gal-8 (Kolon)</i>	30
<i>Abbildung 7: Positivkontrolle H3K4me3 (Plazenta)</i>	30
<i>Abbildung 8: Verteilungshäufigkeit des Alters bei Diagnosestellung im Zervixkarzinomkollektiv</i> .	32
<i>Abbildung 9: Verteilungshäufigkeit des Alters bei Diagnosestellung im Endometriumkarzinomkollektiv</i>	34
<i>Abbildung 10: Korrelation zwischen Gal-8-Expression und histologischem Subtyp im Zervixkarzinom</i>	37
<i>Abbildung 11: Plattenepithelkarzinom mit medianer Gal-8-Expression (IRS = 4)</i>	37
<i>Abbildung 12: Adenokarzinom mit niedriger Gal-8-Expression (IRS = 2)</i>	37
<i>Abbildung 13: Zervixkarzinom mit positivem N-Status und niedriger Gal-8-Expression (IRS = 2)</i> ...	38
<i>Abbildung 14: Zervixkarzinom mit pN0 und medianer Gal-8-Expression (IRS = 4)</i>	38
<i>Abbildung 15: Korrelation zwischen Gal-8-Expression und Nodalstatus im Zervixkarzinom</i>	38
<i>Abbildung 16: Korrelation zwischen Gal-8-Expression und FIGO-Stadium im Zervixkarzinom</i>	38
<i>Abbildung 17: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-8 im Zervixkarzinom</i>	39
<i>Abbildung 18: Kaplan-Meier-Analyse für das RFS in Hinblick auf Gal-8 im Zervixkarzinom</i>	40

<i>Abbildung 19: Korrelation zwischen zytosolischer Gal-9-Expression und Nodalstatus im Zervixkarzinom.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 20: Korrelation zwischen zytosolischer Gal-9-Expression und FIGO-Stadium im Zervixkarzinom (nur SCC).....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 21: Korrelation zwischen zytosolischer Gal-9-Expression und Grading im Zervixkarzinom</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 22: G1-Zervixkarzinom mit höherer Gal-9-Expression (IRS = 4)</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 23: G3-Zervixkarzinom mit niedriger Gal-9-Expression (IRS = 1)</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 24: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-9 im Zervixkarzinom</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 25: Kaplan-Meier-Analyse für das RFS in Hinblick auf Gal-9 im Zervixkarzinom</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 26: Korrelation zwischen Gal-8 cyt und FIGO-Stadium im Endometriumkarzinom</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 27: Korrelation zwischen Gal-8 cyt und Grading im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 28: Hohe zytosolische Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom (IRS = 12).....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 29: Niedrige zytosolische Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom (IRS = 2).....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 30: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-8 cyt im Endometriumkarzinom</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 31: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-8 nuc im Endometriumkarzinom</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 32: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf Gal-8 cyt im Endometriumkarzinom</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 33: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf Gal-8 nuc im Endometriumkarzinom</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 34: Korrelation zwischen Gal-9 cyt und Grading im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 35: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-9 cyt im Endometriumkarzinom</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 36: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-9 nuc im Endometriumkarzinom</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 37: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf Gal-9 cyt im Endometriumkarzinom</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 38: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf Gal-9 nuc im Endometriumkarzinom</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 39: Korrelation zwischen H3K9ac nuc und Tumorausdehnung im Endometriumkarzinom</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 40: Korrelation zwischen H3K9ac nuc und Nodalstatus im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 41: H3K9ac nuc im pN0-Endometriumkarzinom (IRS = 8).....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 42: H3K9ac nuc im pN1-Endometriumkarzinom (IRS = 6).....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 43: Korrelation zwischen H3K9ac nuc und FIGO-Stadium im Endometriumkarzinom... </i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 44: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf H3K9ac nuc im Endometriumkarzinom</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 45: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf H3K9ac cyt im Endometriumkarzinom</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 46: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf H3K9ac nuc im Endometriumkarzinom</i>	<i>61</i>

Abbildung 47: Korrelation zwischen H3K4me3 nuc und Tumorausdehnung im Endometriumkarzinom	62
Abbildung 48: pT1-Endometriumkarzinom mit H3K4me3 nuc (IRS = 8)	64
Abbildung 49: pT2-Endometriumkarzinom mit H3K4me3 nuc (IRS = 6).	64
Abbildung 50: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf H3K4me3 cyt im Endometriumkarzinom	64
Abbildung 51: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf H3K4me3 nuc im Endometriumkarzinom	65
Abbildung 52: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf H3K4me3 cyt im Endometriumkarzinom	66
Abbildung 53: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf H3K4me3 nuc im Endometriumkarzinom	66
Abbildung 54: Korrelation zwischen GR-Expression im Stroma und Tumorausdehnung im Endometriumkarzinom.	67
Abbildung 55: pT4-Endometriumkarzinom mit niedriger GR-Expression im Stroma (IRS = 0)	69
Abbildung 56: pT1-Tumor mit höherer GR-Expression im Stroma (IRS = 3)	69
Abbildung 57: Korrelation zwischen Glukokortikoidrezeptor-Expression im Stroma und FIGO-Stadium im Endometriumkarzinom.	69
Abbildung 58: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS In Hinblick auf die GR-Expression im Endometriumkarzinom	70
Abbildung 59: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf die GR-Expression im Stroma. ..	70
Abbildung 60: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS und GR-Expression im Endometriumkarzinom .	71
Abbildung 61: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS und GR-Expression im Stroma des Endometriumkarzinoms.....	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zum Modell der dualistischen Pathogenese nach Bokhman	16
Tabelle 2: TNM- und FIGO-Klassifikation des Endometriumkarzinoms.....	17
Tabelle 3: Verdünnung und Inkubationsbedingungen der verschiedenen Antikörper	29
Tabelle 4: Eigenschaften der verwendeten Antikörper	31
Tabelle 5: Weitere verwendete Materialien	31
Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Gal-8-Färbung im Zervixkarzinom	35
Tabelle 7: Korrelationen histopathologischer Parameter mit der Gal-8- und -9-Expression im Zervixkarzinom.....	36
Tabelle 8: Cox-Regression bezogen auf das OAS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-8-Expression im Zervixkarzinom.....	39
Tabelle 9: Cox-Regression bezogen auf das RFS hinsichtlich histopathologischer Parametern und der Gal-8-Expression im SCC	40
Tabelle 10: Deskriptive Statistik der Gal-9-Färbung im Zervixkarzinom	40
Tabelle 11: Cox-Regression bezogen auf das OAS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-9-Expression im Zervixkarzinom.....	44
Tabelle 12: Cox-Regression bezogen auf das RFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-9-Expression im Zervixkarzinom.....	44

<i>Tabelle 13: Deskriptive Statistik der Gal-8-Färbung im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 14: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 15: Cox-Regression bezogen auf das OAS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 16: Cox-Regression bezogen auf das PFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 17: Deskriptive Statistik der Gal-9-Färbung im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 18: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der Gal-9-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 19: Cox-Regression bezogen auf das OAS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-9-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 20: Cox-Regression bezogen auf das PFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-9-Expression im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 21: Deskriptive Statistik der H3K9ac-Färbung im Endometriumkarzinom</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 22: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der H3K9ac-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 23: Cox-Regression bezogen auf das Gesamtüberleben hinsichtlich histopathologischer Parameter und der H3K9ac-Expression im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 24: Cox-Regression bezogen auf das RFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der H3K9ac-Expression im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 25: Deskriptive Statistik der H3K4me3-Färbung im Endometriumkarzinom</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 26: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der H3K4me3-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 27: Cox-Regression bezogen auf das Gesamtüberleben hinsichtlich histopathologischer Parameter und der H3K4me3-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 28: Cox-Regression bezogen auf das PFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der H3K4me3-Expression im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 29: Deskriptive Statistik der GR-Färbung im Endometriumkarzinom.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 30: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der GR-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 31: Cox-Regression bezogen auf das Gesamtüberleben hinsichtlich histopathologischer Parameter und der GR-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>70</i>
<i>Tabelle 32: Cox-Regression bezogen auf das PFS hinsichtlich histopathologischen Parameter und der GR-Expression im Endometriumkarzinom</i>	<i>71</i>

Abkürzungsverzeichnis

AF	Activation Function
CAF	Cancer-associated fibroblasts
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
cyt	Zytosolische Expression
DAB	3'3'-Diaminobenzidin

DBD	DNA-bindende Domäne
ER	Östrogenrezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
Gal	Galektine
GC	Glukokortikoide
GLCE	D-gluconyl C5-epimerase
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid response element
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitoren
H3K4me3	Histon H3 tri-methyl K4
H3K9ac	Histon H3 acetyl K9
HPV	Humane Papillomviren
HRP	Horseradish-Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunoreaktiver Score
kDa	Kilodalton
KDM	Lysindemethylase
KDMi	Lysindemethylaseinhibitoren
KMT	Lysinmethyltransferase
LBD	Liganden-bindende Domäne
MMR	Mismatch-Repair
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MW	Mittelwert
NTD	N-terminale Domäne
nuc	Nukleäre Expression
OAS	Overall survival (Gesamtüberleben)
PBS	Phosphate-buffered saline
PFS	Progression-free survival (progressionsfreies Überleben)
PR	Progesteronrezeptor
RChT	Radiochemotherapie
RFS	Relapse-free survival (Rezidivfreies Überleben)
RIZ1	Retinoblastoma-Interacting Zinc Finger Gen 1
SCC	Squamous cell carcinoma (plattenepitheliales Karzinom)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
TIM-3	T cell immunoglobulin and mucin domain 3
TMA	Tissue Microarray
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Zervixkarzinoms

1.1.1 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom steht weltweit an vierter Stelle der häufigsten Karzinome und ist die vierthäufigste Krebstodesursache der Frau. Im Jahr 2020 wurden weltweit 604.000 neue Erkrankungen registriert, 342.000 Frauen starben daran [1]. Die Inzidenz des Zervixkarzinoms ist von großen geographischen Unterschieden geprägt [2]. Während die niedrigste Inzidenzrate mit 4 Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Frauen im westlichen Asien liegt, ist das Zervixkarzinom in Afrika die zweithäufigste Krebserkrankung nach Brustkrebs. Auffällig ist außerdem die inverse Korrelation der Inzidenz mit dem Human Development Index. 85% aller Fälle des Zervixkarzinoms und 88% der Zervixkarzinom-assoziierten Todesfälle traten 2018 in Entwicklungsländern auf [2]. In Industrienationen hat die Inzidenz in den letzten Jahrzehnten stark abgenommen. Bezüglich der Inzidenz und Mortalität in Europa gibt es jedoch noch immer große geographische Unterschiede. Vor allem in osteuropäischen Ländern ist die Inzidenzrate 5-fach höher als z.B. in der Schweiz [2]. In Deutschland wurde 2020 bei etwa 4.640 Frauen ein Zervixkarzinom neu diagnostiziert. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 64% hat die Erkrankung eine relativ gute Prognose bei einem mittleren Erkrankungsalter von 53 Jahren [3]. Häufig jedoch wird die Vorstufe eines in-situ-Karzinoms im Rahmen der Früherkennungsuntersuchung bei vielen Frauen schon mit ca. 35 Jahren entdeckt [3].

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Für das Zervixkarzinom ist von einer multifaktoriellen Ätiologie auszugehen. Als Hauptrisikofaktor gilt eine persistente Infektion mit humanen Papillomviren (HPV), aber auch Nikotinabusus, eine genetische Prädisposition, Immunsuppression oder hohe Parität sind bekannte Risikofaktoren [31-34]. Eine HPV-Infektion ist die häufigste sexuell übertragbare Infektion weltweit und nahezu alle sexuell aktiven Menschen werden einmal im Leben mit HPV infiziert [35]. Die höchste Infektionsprävalenz liegt bei Frauen im Alter von 20-24 Jahren, mit steigendem Alter nimmt sie wieder ab [36, 37].

Bisher konnten 170 Typen von humanen Papillomviren identifiziert werden [38]. Die HPV werden auf Grundlage ihrer Karzinogenität in high- und low-risk Typen unterteilt. Low-risk Typen (z.B. 6, 11, 40 und 42) können benigne Hauterkrankungen wie Condylomata accuminata verursachen [39]. High-risk Typen sind verantwortlich für die Entstehung von zervikalen intraepithelilalen Neoplasien (CIN) und anogenitalen malignen Tumore. Zu ihnen zählen unter anderem die Typen 16, 18, 31, 33 und 35 [40]. Humane Papillomviren sind in 99,7% aller Zervixkarzinome nachweisbar, am häufigsten die HPV-Typen 16 (57%), 18 (16%), 33,45 und 58 (je 5%) [41, 42].

Humane Papillomviren sind unbehüllte doppelsträngige DNA-Viren mit einem Durchmesser von 50-60 nm. Das Genom ist funktionell in zwei kodierende Regionen und eine regulatorische Region unterteilt [43, 44]. Die frühe bzw. early region kodiert unter anderem für zwei regulatorische Proteine, E1 und E2, sowie drei Onkogene, E5, E6 und E7 [45, 46]. Das Überleben und die Reproduktion von HPV hängt von der Differenzierung und Replikationsmaschinerie der Wirtszellen ab. Das Virus infiziert über Mikrotraumen die Basalschicht des Epithels an der Transformationszone zwischen Endo- und Ektozervix [47]. Um die Replikation viraler DNA in oberflächlichen Epithelzellen zu ermöglichen, kodiert das virale Genom für die Onkoproteine E6 und E7, welche den Zellzyklus der infizierten Zellen modifizieren [46]. E6 und E7 werden dauerhaft in mit high-risk-HPV assoziierten

Karzinomen exprimiert und tragen durch beispielsweise die Interaktion mit Tumorsuppressoren wie dem Retinoblastom-Protein maßgeblich zur Initiation und Progression der Karzinogenese bei [48, 49]. Zusätzlich wird durch E6/E7 ein tumoröses Mikroenvironment geschaffen, das sich der natürlichen Immunabwehr entzieht [50].

Entscheidend für die Ätiologie des Zervixkarzinoms ist die Dauer der Infektion. Über 90% der neuen HPV-Infektionen sind transient und innerhalb der folgenden 6-18 Monate nicht mehr nachweisbar, eine persistierende Infektion ist jedoch prädisponierend für die Entstehung eines Zervixkarzinoms [51]. Begünstigt wird die Persistenz der Infektion durch oben beschriebene Risikofaktoren [52-54]. Nach mehreren Jahren der Infektion kommt es zur Entstehung einer CIN, welche sich zu einer CIN III bzw. einem Carcinoma in situ und schließlich zu einem Zervixkarzinom weiterentwickeln kann [55, 56].

1.1.3 Prävention und Screening

Seit 2016 erfolgt ein organisiertes Screeningprogramm für Frauen im Alter von 20 bis 60 Jahren. In mehreren randomisiert kontrollierten Studien wurde der Nutzen einer zusätzlichen HPV-Testung im Vergleich zu einer alleinigen zytologischen Untersuchung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein kombiniertes Screening im Abstand von 3-5 Jahren bei Frauen über 30 Jahren durch die frühere Erkennung von Krebsvorstufen zu einer signifikanten Senkung der Neuerkrankungen an CIN III oder einem Zervixkarzinom führt [57, 58]. Daher wird ab dem Alter von 35 Jahren den Patientinnen alle drei Jahre eine Kombinationsuntersuchung angeboten. Frauen zwischen 20 und 35 Jahren haben Anspruch auf eine jährliche zytologische Untersuchung [59]. Der Nutzen eines organisierten Screenings ab dem Alter von 65 Jahren ist nicht belegt. Patientinnen über 65 Jahre sollten dennoch weiter zur Teilnahme an Krebsfrüherkennungsprogrammen motiviert werden [60].

Mit einer Impfung gegen verschiedene HPV-Typen kann eine Infektion und die Entstehung von Krebsvorstufen vorgebeugt werden. In den Jahren 2006 und 2007 erfolgte die Zulassung eines quadrivalenten (gegen HPV 6, 11, 16 und 18) und eines bivalenten Impfstoffes (gegen HPV 16 und 18). Im Juni 2012 wurde ein nonavalenter Impfstoff mit einem erweiterten Wirkspektrum gegen die Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58 zugelassen. Damit werden jene HPV-Typen abgedeckt, die mit 85% aller CIN III und 90% aller Zervixkarzinome assoziiert sind [61]. Die ständige Impfkommission empfiehlt, alle Mädchen ab 9-14 Jahren zu impfen, seit 2018 gilt die Empfehlung auch für Jungen im gleichen Alter [62].

1.1.4 Histologische Subtypen

Das Zervixkarzinom wird anhand des Ausgangsgewebes in verschiedene histologische Subtypen unterteilt. Das Plattenepithelkarzinom geht meist vom Plattenepithel der Portio uteri aus und stellt mit ca. 80% den Großteil aller Fälle dar. Das Adenokarzinom (ca. 13%) entsteht aus dem Zylinderepithel des Zervixkanals und das adenosquamöse Karzinom (ca. 6%) weist glanduläre und plattenepitheliale Anteile auf [63]. Während die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms in den letzten Jahrzehnten zurückgegangen ist, stieg die Fallzahl der Adeno- und adenosquamösen Karzinome eher an. Das hängt zum einen mit der verbesserten histopathologischen Klassifizierung zusammen, andererseits sind bestimmte Risikofaktoren wie Adipositas und orale Kontrazeptiva mit der Entstehung von Adenokarzinomen assoziiert [64, 65]. Seltener auftretende Subtypen sind klarzellige, neuroendokrine und serös-papilläre Karzinome [66].

1.1.5 Klinik, Stadieneinteilung, Diagnostik

Das Zervixkarzinom ist im Frühstadium meist a- bis oligosymptomatisch. Ein ausgedehnter Tumorbefund kann von vaginalen Zwischen- und Kontaktblutungen bis zur Hämaturie und Hydronephrose führen. Bei unheilbarer Erkrankung leiden die Patientinnen häufig an gastrointestinalen Symptomen und dem Fatigue-Syndrom [66]. Die Tumoretätigkeit des Zervixkarzinoms wird nach der Klassifikation der World Health Organisation von 2020 eingestuft, die Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM- und FIGO-Klassifikation (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) [66-68]. Mithilfe der TNM-Klassifikation werden Tumore durch Tumorausdehnung (T), Metastasierung in regionäre Lymphknoten (N) und Auftreten von Fernmetastasen (M) in verschiedene Stadien eingeteilt [67]. Neben TNM-Klassifikation und FIGO-Stadium wird das Grading bestimmt. Bei der postoperativen histologischen Befundung sollten bei Feststellung eines invasiven Tumors auch Angaben zu Lymph-, Blutgefäß- und Perineuralscheideninvasion gemacht werden. Prognostisch bedeutsam sind Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen, Resektionsränder und die Tumorgröße [66].

Zusätzlich zur histologischen Tumorbeurteilung können weitere diagnostische Maßnahmen wie Bildgebung, Zysto- oder Rektoskopie durchgeführt werden. Auch wenn das Stadium des Zervixkarzinoms überwiegend klinisch klassifiziert wird, können laut der überarbeiteten FIGO-Klassifikation von 2019 auch Biopsieergebnisse und Schnittbildbefunde in das Staging mit einbezogen werden [68].

1.1.6 Therapie

Die geeignete Therapiemodalität des Zervixkarzinoms sollte in interdisziplinärer Zusammenarbeit von gynäkologischen Onkologen, Pathologen und Strahlentherapeuten festgelegt werden. Faktoren wie z.B. ein möglicher Kinderwunsch, der Menopausenstatus und Allgemeinzustand sind mit in die Entscheidung einzubeziehen [66].

Die zentralen Therapiesäulen sind das operative Vorgehen und die Radiochemotherapie (RChT). In den Frühstadien (FIGO I-IIA) wird je nach Kinderwunsch und Risikofaktoren der Patientin eine Konisation, Trachelektomie oder radikale Hysterektomie durchgeführt [66]. Von großer Bedeutung ist bei der Therapiewahl das operative Staging, bei dem unter anderem Sentinellymphknoten und weitere pelvine bzw. paraaortale Lymphknoten reseziert und im Schnellschnitt auf Tumorbefall oder Metastasen untersucht werden. Bei histologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen ist eine adjuvante RChT indiziert [66]. Ab Stadium III gilt die simultane RChT als Goldstandard und wird perkutan mit Cisplatin als Radiosensitizer durchgeführt. Eine sich anschließende vaginale Brachytherapie wird z.B. bei knappen Resektionsrändern oder initialem Vaginalbefall empfohlen [66]. Beim Lokalrezidiv, im metastasierenden Stadium oder in der palliativen Situation kommen neben einer operativen bzw. lokoregionären Radiotherapie auch medikamentöse Chemotherapien und Immuncheckpointinhibitoren zum Einsatz [66].

1.2 Bedeutung des Endometriumkarzinoms

1.2.1 Epidemiologie

Das Endometriumkarzinom ist das am sechsthäufigsten auftretende Karzinom der Frau mit ca. 417.400 Neuerkrankungen und über 97.000 Todesfällen im Jahr 2020 weltweit. Im Gegensatz zum Zervixkarzinom ist das Endometriumkarzinom eine Erkrankung der Industriestaaten und stellt dort das häufigste Karzinom der weiblichen Genitalorgane dar [1]. In Deutschland erkrankten 2020 etwa 10.870 Patientinnen neu, damit stand das

Endometriumkarzinom an fünfter Stelle der Krebserkrankungen bei Frauen und war die häufigste Tumorerkrankung der weiblichen Genitalorgane [4]. Etwa 2.760 Frauen starben in Deutschland im Jahr 2020 an der Erkrankung [4]. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 78% hat das Endometriumkarzinom eine gute Prognose. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 70. und 74. Lebensjahr und das mittlere Erkrankungsalter bei 67 Jahren [4].

1.2.2 Risikofaktoren, Pathogenese und Prävention

Es wurde eine Vielzahl an Faktoren ausgemacht, die das Risiko für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms beeinflussen. Die verstärkte Exposition der Uterusschleimhaut gegenüber Östrogen gilt als Hauptrisikofaktor [69]. Das Hormon hat eine mitogene Wirkung auf die Uterusschleimhaut und ist für das Wachstum der Functionalis in der Follikelphase des Menstruationszyklus verantwortlich [70]. Gleichzeitig führen genotoxische Abbauprodukte des Östrogens zu genetischer Instabilität [69]. Eine Langzeithormontherapie ohne Gestagenschutz steigert das Risiko für das Auftreten des hormonabhängigen Typ-I Endometriumkarzinoms [71, 72]. Der proliferative Effekt des Östrogens kann durch simultane Anwendung eines Gestagens antagonisiert werden [73, 74].

Auch hohe Serumspiegel körpereigener Östrogene, beispielsweise durch eine frühe Menarche oder Nulliparität, sind mit einem höheren Risiko für ein Endometriumkarzinom assoziiert [75]. Ein hoher Body Mass Index führt nachweislich zu einer Risikoerhöhung für ein Endometriumkarzinom [75-77]. Grund dafür ist die Produktion des Enzyms Aromatase in viszeralen Adipozyten, sowie die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Adipokine [78, 79]. Ungefähr 5% der Endometriumkarzinome sind durch erbliche Faktoren, wie z.B. dem Lynch-Syndrom, bedingt [80].

Das Erkrankungsrisiko wird durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva und die Anwendung von Intrauterinpressaren gesenkt [81, 82]. Ein allgemeines Screeningverfahren bei asymptomatischen Frauen ohne erhöhtes Risiko für ein Endometriumkarzinom wird aktuell nicht empfohlen [83].

1.2.3 Histologische Einteilung

Die histologische Tumortypisierung besitzt eine große Relevanz für die Therapieentscheidung und die Prognose. Ursprünglich erfolgte die histologische Einteilung des Endometriumkarzinoms nach Bokhman in einen östrogen-abhängigen (Typ I) und östrogen-unabhängigen Typ (Typ II; **Tabelle 1**) [84].

Endometrioides Adenokarzinome vom Typ I machen 70-80% aller Karzinome aus. Plattenepitheliale Differenzierungen sind mit 10-25% relativ häufig, seltener sind sekretorische, villoglanduläre und muzinöse Varianten [67]. Sobald ein Karzinom über 50% muzinöse Anteile aufweist, wird es als eigene Entität, dem muzinösen Karzinom, gewertet [67]. Zu den Typ-II-Karzinomen werden dedifferenzierte Karzinome gezählt, seröse Adenokarzinome sind in dieser Gruppe am häufigsten und können papillär, drüsig oder solide gebaut sein [85]. Als gemischte Karzinome werden Tumore mit zwei oder mehr verschiedenen histologischen Anteilen gezählt, wobei mindestens einer den Typ-II-Karzinomen zugeordnet wird und der Anteil im Tumor größer 5% sein muss [67]. Weitere seltene Subtypen sind undifferenzierte Karzinome, Karzinosarkome (Maligne Müllersche MischTumore) und neuroendokrine Karzinome [67].

Tabelle 1: Übersicht zum Modell der dualistischen Pathogenese nach Bokhman [84].

	Typ I	Typ II
Metabolische Risikofaktoren	häufig vorhanden	nicht vorhanden
Altersgipfel	55 – 65 Jahre	65 – 75 Jahre
Endometriale Vorstufe	Hyperplasie	Atrophie
Histologischer Subtyp	endometrioid, muzinös	serös, klarzellig, undifferenziert, neuroendokrin, Karzinosarkom
Hormonrezeptor-Status	positiv	negativ
Prognose	günstig	ungünstig
Stadium	FIGO I	FIGO II – IV
Grading	G1/G2	G2/G3
Metastasierung	selten	häufig
Myometrane Invasion	oberflächlich	tief
Lymphovaskuläre Invasion	selten	häufig
Molekulare Alterationen	PTEN, MSI, PI3K/AKT, K-RAS, Wnt/ β -Catenin	TP53, PI3KCA, PP2R1A, ARID1A, ERBB2

Angesichts der komplexen molekularbiologischen Muster wurde 2013 von dem Cancer Genome Atlas Research Network ein neuer Ansatz zur Gruppierung der Endometriumkarzinome publiziert [86-88]. Vier molekulare Subgruppen können unterschieden werden: Die POLE ultramutated Gruppe umfasst endometrioiden Karzinome und ist durch eine Mutation in der exonukleären Domäne der Polymerase ϵ (POLE) gekennzeichnet. Sie hat eine hervorragende Prognose [89]. Das Cluster mit der schlechtesten Prognose (Copy-number high, serous-like) umfasst meist seröse und zusätzlich high-grade endometrioiden Karzinome. Die erhöhte Expression verschiedener zellzyklusregulierender Onkogene und eine p53-Mutation erklärt das schlechte progressions-freie Überleben in dieser Gruppe [88, 89]. Als intermediäre Gruppen werden die ebenfalls endometrioiden Karzinome mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Copy-number low (mikrosatellitenstabil, p53 unauffällig) bezeichnet [88].

1.2.4 Klinik, Diagnostik und Stadieneinteilung

Das wegweisende, frühe und häufigste Symptom eines Endometriumkarzinoms ist die vaginale postmenopausale Blutung. Ca. 75% der Endometriumkarzinome können so im Stadium FIGO I diagnostiziert werden [90]. Bei prämenopausalen Patientinnen sind Menorrhagien und Metrorrhagien ein mögliches Symptom. In späteren Stadien können abdominelle Schmerzen sowie eine Pyo- oder Hämatometra auftreten [90, 91]. Die postmenopausale Blutung sollte zunächst mittels einer transvaginalen Sonographie abgeklärt werden. Je nach Dicke, Homogenität und Begrenzung des Endometriums ist eine Hysteroskopie mit fraktioneller Abrasio indiziert [90, 92]. Bei prämenopausalen abnormen uterinen Blutungen beträgt die Wahrscheinlichkeit für ein Endometriumkarzinom unter 1,5% [93]. Eine Hysteroskopie sollte daher nur in Erwägung gezogen werden, wenn ein suspekter Sonographiebefund oder Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes oder ein Lynch-Syndrom vorliegen [90]. Bestätigt sich in der histopathologischen Untersuchung der Verdacht auf ein Karzinom, sollte zunächst ein präoperatives Staging erfolgen [94]. Für die zusätzliche Diagnostik kommen ggf. MRT, CT oder PET-CT zur Anwendung. Anschließend wird eine Hysterektomie mit intraoperativem

Staging durchgeführt. Dabei erfolgen bei postmenopausalen Frauen obligat eine Adnexektomie und gegebenenfalls eine Lymphonodektomie [90].

Tabelle 2: TNM- und FIGO-Klassifikation des Endometriumkarzinoms (nach [67] und [95]).

TNM-Kategorie	FIGO-Stadium	Definition
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Corpus uteri
T1a	IA	Tumor begrenzt auf Endometrium oder weniger als die Hälfte des Myometriums
T1b	IB	Tumor infiltriert die Hälfte oder mehr des Myometriums
T2	II	Tumor infiltriert das Stroma der Zervix, breitet sich jedoch nicht jenseits des Uterus aus
T3 und/oder N1	III	Lokal und/oder regionäre Ausbreitung des Tumors
T3a	IIIA	Tumor infiltriert die Serosa des Uterus und/oder der Adnexe
T3b	IIIB	Vaginal- oder Parametrienbefall
N1	IIIC	Metastasen in pelvinen und/oder paraaortalen Lymphknoten
	IIIC1	Metastasen in pelvinen Lymphknoten
	IIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten
T4	IVA	Befall der Blasen- oder Rektumschleimhaut und/oder Fernmetastasen
M1	IVB	Fernmetastasen, einschließlich intraabdomineller Metastasen oder inguinaler Lymphknotenmetastasen

Die postoperative Stadieneinteilung anhand des Hysterektomiepräparates erfolgt ebenso wie beim Zervixkarzinom nach der aktuellen TNM- und FIGO-Klassifikation (Tabelle 2) [67, 95]. Weitere erhobene Marker sind Lymphgefäßinfiltration (L), Veneninvasion (V), und Grading (G). Das Grading ist beim Endometriumkarzinom von prognostischer sowie therapeutischer Relevanz [90]. Ein Tumor mit einem Anteil von weniger als 5% nicht-plattenepithelialer Areale wird als gut differenzierter G1-Tumor klassifiziert, G2-Karzinome enthalten zwischen 6% und 50%, und G3-Karzinome mehr als 50% plattenepitheliale Anteile [67]. Histologische Faktoren für eine Tumorerkrankung mit schlechter Prognose sind unter anderem non-endometrioide Histologie, Lymphknotenmetastasen (N1), schlechte Differenzierung (G3), Lymphgefäßinvasion (L1), und zervikale Stromainfiltration, sowie p53-Mutation [90, 96, 97].

1.2.5 Therapie

Das intraoperative Staging stellt auch die primäre Therapie des Endometriumkarzinoms dar. Empfohlen werden eine operativ offene einfache Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie [90]. Bei prämenopausalen Frauen und frühem Stadium kann ein Erhalt der Ovarien nach entsprechender Aufklärung in Betracht gezogen werden [90, 98]. Im Rahmen des Stagings erfolgt die abdominelle Exploration. Je nach Tumorstadium wird die Operation durch eine sentinel-gestützte Lymphonodektomie ergänzt [90]. Die Durchführung der adjuvanten Therapie ist abhängig vom histologischen Subtyp, der molekularen Klassifikation sowie dem FIGO-Stadium. Mögliche Modalitäten sind eine perkutane pelvine Radiatio, eine vaginale Brachytherapie oder eine adjuvante Chemotherapie [90, 99, 100]. Je nach klinischer Situation kann auch die Anwendung von Immuncheckpointinhibitoren geprüft werden [101].

1.3

1.3 Galektine

1.3.1 Übersicht über die Gruppe der Galektine

Galektine (Gal) sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, mit der Gemeinsamkeit einer hochkonservierten Sequenz aus 130 Aminosäuren und einer Bindungsstelle für β -Galaktosidzucker, der carbohydrate recognition domain (CRD) [102]. Die für die CRD kodierenden Gensequenzen liegen auf drei Exons, wobei das mittlere Exon für den Großteil der konservierten Galektinstruktur sowie den kohlenhydratbindenden Anteil kodiert [103, 104].

Die Einteilung der 15 humanen Galektine erfolgt anhand der molekularen Struktur in drei Gruppen: Die „Prototyp“-Galektine (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15) besitzen eine CRD und liegen als Homodimer vor. In der Subgruppe der „Tandem-repeat“-Galektine (Gal-4, -6, -8, -9 und -12) sind zwei homologe CRDs über ein Linker-Peptid verbunden [104]. Der dritten Gruppe gehört Gal-3 an, ein „chimeres“ Galektin, bei dem die C-terminale CRD mit einer nicht-lektinartigen N-terminalen Domäne verbunden ist [105] (**Abbildung 1**).

Galektine werden im Zytosol an freien Polysomen synthetisiert und anschließend über den atypischen Sekretionsweg externalisiert. Sie können sich an der äußeren Zelloberfläche, in der extrazellulären Matrix oder im Zellkern befinden, aber auch im Zytosol verbleiben [106, 107]. Das Bindungsverhalten von Galektinen ist komplex. Ein Epitop (Glycotop) eines β -Galaktosids wird schwach von dem Zentrum der CRD gebunden. Die Affinität für Glykokonjugate wird durch die Interaktion von Saccharid-, Lipid- oder Peptidresten mit peripheren Bindungsstellen der CRD erhöht [106]. Extrazellulär lokalisierte Galektine binden Glykoproteine und -lipide auf der Zellmembran und formen Quervernetzungen, was Signalkaskaden im Zellinneren induziert und den Transport von intravesikulären Glykoproteinen reguliert [108-110]. Galektine können zytosolisch oder nukleär vorliegen, wobei die intrazelluläre Lokalisation unter anderem von dem Proliferationsstadium der Zelle abhängt und sich dementsprechend ändern kann [111].

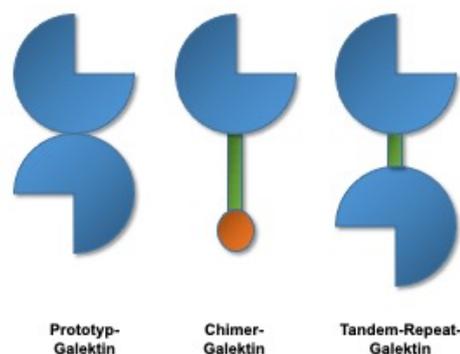


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Galektin-Arten: Prototyp-Galektine (z.B. Gal-1, Gal-5); Chimer-Galektine (Gal-3) und Tandem-Repeat-Galektine (z.B. Gal-8, Gal-9). CRDs in blau, Linker-Peptid grün und N-Terminale Domäne in orange. Abbildung modifiziert nach Barondes et al. [104].

Im Organismus kommen Galektine ubiquitär vor [104, 106]. Sie sind an der Zelldifferenzierung und Geweberegeneration genauso beteiligt wie an der Regulation von Immunantwort und Entzündungsvorgängen [112]. Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungsweise in der Tumorbologie haben Galektine in den letzten Jahrzehnten an

großer Bedeutung in der onkologischen Forschung gewonnen. Verschiedene Galektine werden von Tumorzellen und tumor-assoziierten Stromazellen exprimiert. Sie können die von Hanahan und Weinberg postulierten „Hallmarks of Cancer“ auf unterschiedliche Art und Weise modulieren [113, 114]. Im Folgenden werden die beiden Tandem-Repeat-Galektine Galektin-8 und -9 genauer beleuchtet, vor allem in Hinblick auf ihre Bedeutung in der Onkologie.

1.3.2 Galektin-8

a) Bedeutung von Galektin-8 allgemein

Galektin-8 (Gal-8) wurde erstmals 1995 aus der cDNA einer Rattenleber geklont. Es besitzt zwei homologe Domänen mit jeweils 140 Aminosäuren, verbunden durch ein Linker-Peptid [115]. Das humane LGALS8-Gen kodiert für sieben verschiedene mRNA-Isoformen, die durch alternatives Splicing entstehen [116, 117]. Drei der Isoformen kodieren für ein Tandem-repeat-Galektin, alle anderen für Prototyp-Galektine, wobei auf Proteinebene bisher nur die erste Variante detektiert werden konnte. Die Tandem-Repeat-Isoformen werden je nach Länge des Linkerpeptids in small Gal-8, medium Gal-8, und long Gal-8 eingeteilt [116-119]. Gemeinsam mit der heterogenen Affinität der beiden CRDs beeinflusst die Länge des Linkerpeptids die Effekte von Gal-8 [120, 121].

Gal-8 kann sowohl als matrizelluläres, als auch als lösliches Protein durch Interaktion mit Integrinen die Zelladhäsion an der Extrazellulären Matrix (EZM) regulieren. Außerdem beeinflusst Gal-8 die Zellmigration [122]. Für Endothelzellen wurde ein promigratorischer, Glykan-abhängiger Effekt von Gal-8 gezeigt [118]. Gal-8 reguliert auch das Targeting von Glykoproteinen, die z.B. essentiell für die Entstehung und Aufrechterhaltung von apikal-basaler Polarität sein können [123].

In der angeborenen und erworbenen Immunantwort sowie bei Entzündungsvorgängen und Autoimmunerkrankungen gilt Gal-8 als bedeutsamer Mediator: einerseits hat Gal-8 einen stimulatorischen und proliferativen Effekt und verstärkt Signale am T-Zell-Rezeptor, andererseits limitiert es die Immunantwort durch anti-proliferative und pro-apoptotische Signale an aktivierten T-Zellen [124, 125].

Insgesamt wirkt Gal-8 als Mediator und Modulator in physiologischen Vorgängen des Organismus und wird im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert. Damit einher geht die Bedeutung des Proteins in der Pathophysiologie verschiedenster Krankheitsbilder, wie z.B. neurodegenerative, autoimmune oder Krebserkrankungen [126-128].

b) Bedeutung von Galektin-8 in der Onkologie

Gal-8 moduliert unterschiedliche Mechanismen der Karzinogenese. Es wird je nach Tumorexpression über- oder unterexprimiert und von Tumorzellen sezerniert [129-132].

Wird Gal-8 in epithelialen Zellen überexprimiert, aktiviert es über die Interaktion mit Integrinen die epithelial-mesenchymale Transition, welche mit einem Verlust von E-Cadherin und verstärkter β -Catenin-Aktivität einhergeht [133]. Außerdem wird eine Proteasom-Überaktivität beobachtet. Beide Phänomene sind charakteristisch für Krebszellen und zeigen den Einfluss von Gal-8 auf die onkogene Transformation gesunder Zellen [133]. Zusätzlich bewirkt Gal-8 in einigen Tumorzellen einen anti-apoptotischen Effekt [134]. Von Tumorzellen sekretiertes Gal-8 fördert die Sekretion von Zyto- und Chemokinen in das umgebende Mikroenvironment, was einerseits das Tumorstadium stimuliert, andererseits auch die Metastasierung vorantreibt [135].

Gal-8 spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Endothelzellen exprimieren Gal-8, ebenso lymphoendotheliale Zellen [118]. Das Lektin interagiert mit

dem vascular endothelial growth factor (VEGF), Podoplanin und Integrinen und steigert so Migration von lymphoendothelialen Zellen, welche essenziell für die lymphatische Metastasierung sind [136, 137]. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte nachgewiesen werden, dass Gal-8 die Ausbildung von kapillären Netzwerken aus makrovaskulären Gefäßen stimuliert, ähnlich wie der VEGF [118].

Allerdings ist die Wirkung von Gal-8 je nach Zelltyp auch tumorsuppressiv. In Bronchialkarzinomzellen führte eine Überexpression von Gal-8 zu verringertem Wachstum. In Neuroblastom-, Kolonkarzinom- und myelischen Leukämiezellen wies Gal-8 einen anti-proliferativen Effekt auf [138]. Zur Unterexpression von Gal-8 in Tumoren liegen nur wenige Daten vor. Eine Unterexpression von Gal-8 war jedoch assoziiert mit einem verkürzten Gesamtüberleben (OAS) bei Patientinnen mit Mammakarzinom [13]. Auch bei Patient*innen mit Magenkarzinom war eine Unterexpression von Gal-8 mit einer schlechteren Prognose verbunden [139]. Die Datenlage ist also nicht eindeutig. Eine mögliche Erklärung für ein tumorsuppressives Potenzial von Gal-8 ist die Rolle als Regulator von interzellulärer Stabilität, welche bei Unterexpression von Gal-8 in einem Tumor verloren geht [140].

1.3.3 Galektin-9

a) Bedeutung von Galektin-9 allgemein

Galektin 9 (Gal-9) wurde 1997 erstmals aus einer embryonalen murinen Niere geklont und wenig später in humanen Hodgkin-Lymphomzellen per Immunscreening identifiziert [141, 142]. Das Tandem-Repeat-Galektin besitzt zwei nicht-homologe Domänen, verbunden durch ein Linkerpeptid [141, 142]. Das Galektin-9-Gen, LGALS9, liegt auf dem Chromosom 17q11.2 und besteht aus elf Exons. Für den Menschen sind zwei zusätzliche ähnliche Gene, LGALS9B und LGALS9C, beschrieben [143].

Durch posttranslationales Splicing entstehen verschiedene Gal-9-mRNA-Isoformen. Splicing des Exons 5 verändert die Länge des Linkerpeptids, sodass, analog zu Gal-8, die unterschiedlich langen Gal-9 long (Gal-9-L), medium (M) oder small (S) entstehen [144, 145]. Die Varianten weisen einen Unterschied in der Affinität für verschiedene Glykokonjugate auf [146]. Im Zytoplasma reguliert Gal-9 die Zellaggregation über die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten, nukleäres Gal-9 kann die Expression von Zytokinen wie IL-1 α verstärken [147, 148]. Gal-9 wird von verschiedenen Zelltypen externalisiert [144, 149]. Über die extrazelluläre Oligomerisierung mit Glykokonjugaten kann Gal-9 mit seinen CRDs komplexe Quervernetzungen bilden. Dadurch werden beispielsweise Zelladhäsion, -migration und Endozytose reguliert [147, 150].

Gal-9 fungiert als zuckerregulierter Urat-Transporter in renalen Epithelzellen [149]. Ecalectin (Gal-9 medium), ein chemotaktischer Faktor aus T_H2-Lymphozyten, führt zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten bei allergischen Reaktionen [151]. Außerdem wird Gal-9 in Thymusepithelzellen stark exprimiert und induziert die Apoptose von Thymozyten während der Thymopoese [152]. Das Glykoprotein T-Zell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3) ist einer der wichtigsten Bindungspartner und reguliert gemeinsam mit Gal-9 die T_H1-Immunität [153]. Generell spielt Gal-9 in immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle und ist daher bedeutsam bei Erkrankungen wie im systemischen Lupus erythematodes, Typ-I-Diabetes oder rheumatoider Arthritis. Weiterhin beeinflusst Gal-9 auch den Verlauf von Infektionen mit z.B. HIV oder HSV [147].

b) Bedeutung von Galektin-9 in der Onkologie

Die Identifizierung als Tumorantigen aus Hodgkin-Lymphomzellen implizierte erstmals eine Bedeutung von Gal-9 in malignen Zellen [142]. In den letzten Jahrzehnten wurde der

Einfluss auf verschiedene Mechanismen der Karzinogenese intensiv erforscht. Zahlreiche Gewebe und Organe exprimieren Gal-9, z.B. Lunge, Niere, Prostata, Haut, Brust oder Ovar, aber auch Endothel- und Immunzellen. Entarten diese Gewebe maligne, so wird in vielen Neoplasien eine Abnahme der Gal-9-Expression beschrieben [154]. Im oralen Plattenepithel- und Pankreaskarzinom sowie in Leukämie- und Kolonkarzinomzellen wurde hingegen ein Anstieg von Gal-9 beobachtet [154-156]. Im Gegensatz zu Gal-8 wirkt Gal-9 hauptsächlich als tumorsuppressiver Faktor und ein Verlust des Galektins ist mit der Aggressivität und Invasivität des Tumors assoziiert [146].

Gal-9 ist entscheidend an der Modulation der Apoptose beteiligt und zeigt in einigen Tumoren eine pro-apoptotische Wirkung [146]. Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus unterdrückt Gal-9 das Tumorzellwachstum durch die Aktivierung des intrinsischen Weges der Apoptose [157-159]. Gal-9 beeinflusst außerdem die Adhäsion und Aggregation von Tumorzellen und darüber auch die Metastasierung [146]. Kageshita et al. beschrieben erstmals einen Zusammenhang zwischen exogenem Gal-9 und verstärkter Zellaggregation in Melanomzellen. Zusätzlich waren höhere zytoplasmatische Level von Gal-9 in den Tumorzellen mit reduzierter Metastasierung vergesellschaftet [160]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass exogenes Gal-9 die Interaktion zwischen den Oberflächenrezeptoren der Tumorzellen und Liganden von Endothelzellen oder extrazellulärer Matrix inhibiert [161, 162].

Maligne Zellen entziehen sich der natürlichen Immunantwort, indem sie inhibitorische Liganden sezernieren, die zur Aktivierung von tumorspezifischen Immunzellen und nachfolgender Abwehr einer anti-tumorösen Immunantwort führen. Gal-9 in Tumor- und Endothelzellen wirkt auf eben diese Immunzellen, die das Tumor-Microenvironment infiltrieren [146]. Die Interaktion von Gal-9 mit TIM-3 bewirkt eine Reduktion der natürlichen, antitumorösen T-Zellantwort [163]. Außerdem wird die Funktionsfähigkeit von natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) beeinträchtigt [164]. All dies führt zur Förderung eines tumorsupportiven Mikroenvironments [165, 166].

1.4 Histonmodifikationen

1.4.1 Epigenetik und Histonmodifikationen im Allgemeinen

Der Begriff Epigenetik beschreibt alle Veränderungen der DNA, die nicht den Genotyp verändern, aber trotzdem Auswirkungen auf den Phänotyp haben [167]. Zu den epigenetischen Mechanismen zählen unter anderem DNA-Methylierungen, kovalente Histonmodifikationen, Chromatin-Remodeling und Effekte durch nicht-kodierende microRNA [168-171]. Die dadurch entstehende Änderung der Chromatinstruktur hat direkte Auswirkungen auf die Transkription. Eine Dysregulation der Mechanismen kann die Expression von Zielgenen beeinflussen, welche wiederum Zellzyklus, -wachstum, -proliferation oder DNA-Reparatur regulieren [172, 173]. Die DNA im Zellkern liegt kondensiert als Chromatin vor, welches aus mehreren Nukleosomen besteht. Ein Nukleosom wird gebildet durch ein Histonoktamer mit jeweils Duplikaten der Histone H2A, H2B, H3 und H4 [174, 175]. Der Histon-Komplex wird von ca. 146 Basenpaaren DNA umwickelt, und der dadurch entstehende Nukleosom-Core-Partikel wiederholt sich alle 200 Basenpaare [175, 176]. Das Linker-Histon H1 liegt gemeinsam mit der Linker-DNA zwischen den Nukleosomen und stabilisiert die dichtere Kondensierung des Chromatins in eine Faser mit ca. 30 nm Durchmesser (Solenoid), siehe **Abbildung 2** [177]. Posttranslationale Histonmodifikationen verändern die Ladung der basischen Histone und damit die elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen DNA, wodurch die Zugänglichkeit der DNA für Transkription bzw. Genexpression beeinflusst wird [173]. Am

N- bzw. C-Terminus der Histonseitenarme werden Aminosäuren wie Lysin oder Arginin kovalent und potenziell reversibel modifiziert. Dazu zählen beispielsweise Acetylierung, Methylierung oder ADP-Ribosylierung [173]. Im Folgenden soll genauer auf Histonacetylierungen und -methylierungen eingegangen werden.

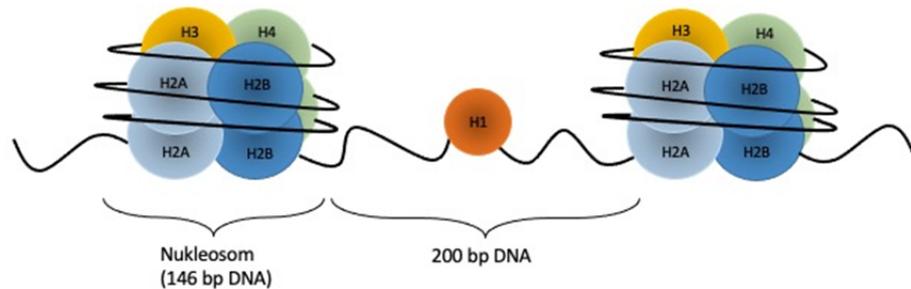


Abbildung 2: Aufbau eines Nucleosoms.

1.4.2 Histonacetylierungen und Bedeutung von H3K9ac in der Onkologie

Acetylierungen finden hauptsächlich an N-terminalen Lysinresten statt und werden durch Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) reguliert (**Abbildung 3**) [178-180]. Die kovalente Bindung einer Acetylgruppe neutralisiert die positive Ladung des Histons und schwächt somit die Interaktion mit der DNA. Dies führt zu einer verbesserten Zugänglichkeit für Transkriptionsprozesse [172, 181].

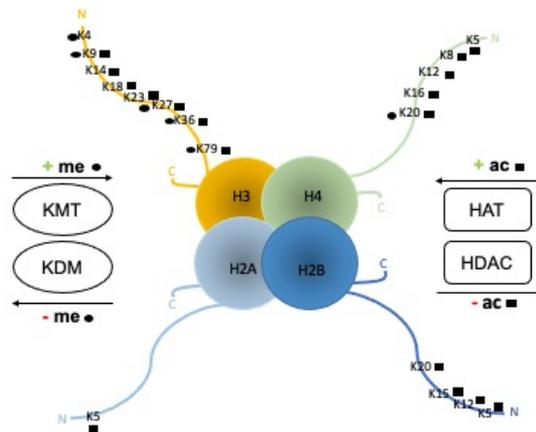


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Histonacetylierungen und -methylierungen. Die Modifikationen erfolgen durch spezifische Enzyme, HAT und KMT. HDAC und KDM deacetylieren bzw. demethylieren die Lysinreste. Abbildung modifiziert nach Davie [182].

Insgesamt sind Histonacetylierungen Ausdruck aktiver Genexpression und gehäuft an Enhancern, Promotern und Transkriptionsstartgenen zu finden [183]. Für eine adäquate Genexpression und -regulation ist das Zusammenspiel von HAT und HDAC essentiell [184]. Ist dieses Gleichgewicht gestört, wie es in Tumoren häufig der Fall ist, können Zellzyklus, Apoptose und Proliferation verändert werden. Kanzerogene Mechanismen sind beispielsweise die Hypoacetylierung von Tumorsuppressorgenen durch verstärkte

Rekrutierung von HDAC oder die Hyperacetylierung von Onkogenen durch Mutationen in den HAT-Genen [185]. HDAC sind daher ein therapeutischer Ansatzpunkt für die medikamentöse Krebstherapie. HDAC-Inhibitoren (HDACi) sind Gegenstand extensiver Studien für die Therapie verschiedene Tumorentitäten [186]. Die Acetylierung des Histons H3 erfolgt hauptsächlich an den Lysin-Positionen 9, 14, 18, 23, 27 und 36 und ist als Marker aktiver Gentranskription bekannt [187]. Die Aktivierung des onkogenen Ras-ERK1/2-Signalweges supprimiert in kolorektalen Karzinomzellen die Acetylierung von H3K9 (H3K9ac), worüber die Transkription von tumorsuppressiven Genen reduziert und Zellwachstum und -migration gesteigert werden [188]. In BRCA-mutierten Ovarialkarzinomen wird H3K9ac überexprimiert und steigert die PARP-1-Transkription, welche mit einem Tumorprogress assoziiert ist [189]. Im Zervixkarzinom ist die Expression von H3K9ac assoziiert mit einem niedrigen TNM- bzw. FIGO-Stadium und Grading, jedoch einem verkürzten Gesamtüberleben [190]. Je nachdem, welche Zielgene durch die Änderung der H3K9ac-Konzentration transkribiert werden, kann die Modifikation eine onkogene oder tumorsuppressive Wirkung entfalten.

1.4.3 Histonmethylierungen und Bedeutung von H3K4me3 in der Onkologie

Histonmethylierungen erfolgen an Arginin- oder Lysinresten. Methylierungen können abhängig von Ort und Grad der Methylierung aktivierend oder repressiv auf die Gentranskription wirken [191, 192]. Die Methylierung von H3K4 ist mit aktiver Transkription assoziiert und sowohl Mono-, Di- und Trimethylierung (me1, me2 und me3) markieren Regionen von aktiven Genen (zusammengefasst in [191]). Die Methylierung von Histonen wird von Lysin-Methyltransferasen (KMT) vorgenommen (**Abbildung 3**) [193, 194]. Der Gegenpart der KMT sind die Lysinmethyldemethylasen (KDM), welche in zwei große Gruppen eingeteilt werden: Die FAD-abhängige Monaminoxidasen (z.B. LSD1) und KDM mit Jumonji C-Domäne [195, 196]. Im Gegensatz zur Acetylierung hat die Methylierung keine Auswirkung auf die elektrostatische Wechselwirkung des Histons mit der DNA, sondern reguliert die Genexpression über die Rekrutierung verschiedener transkriptionelle Coaktivatoren, sogenannter „Reader“ [197]. Eine Überexpression, Mutation oder Dysregulation von KMT und KDM wurde für verschiedene Tumorentitäten beschrieben [198-200]. Die für H3K4me3 spezifische KMT SYMD3 ist beispielsweise in kolorektalen, hepatozellulären und Mammakarzinomen überexprimiert [198]. Die KDM5-Familie demethyliert speziell H3K4me3 und ist unter anderem in die Entstehung und Tumorbilogie des Glioblastoms, hepatozellulären Karzinoms und Mammakarzinoms involviert [199]. Durch die Entfernung der aktivierenden Modifikation wird die Expression von Tumorsuppressorgenen inhibiert und die Entstehung von Chemoresistenzen gegenüber Medikamenten gefördert [199]. In Magenkarzinomzellen ist KDM5A überexprimiert und bindet an die Promoter der cyclin-abhängigen Kinasen-Inhibitoren p16, p21 und p27, was die reguläre Zellalterung inhibiert [200]. Die Expression von H3K4me3 im Zytoplasma von Zervixkarzinomen ist assoziiert mit einem höheren T-Stadium und kürzerem rezidivfreien Überleben (RFS), sowohl die nukleäre Expression von H3K9ac als auch H3K4me3 sind negativ prognostische Marker für das OAS. [190].

1.5 Glukokortikoidrezeptor

1.5.1 Glukokortikoide und der Glukokortikoidrezeptor

Glukokortikoide (GC) sind Steroidhormone, die in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet werden. Die Sekretion von Cortisol, dem menschlichen

Glukokortikoid, erfolgt unter Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse pulsatil und in einem zirkadianen Rhythmus [201]. Als Stresshormon dient es der Aufrechterhaltung der Homöostase und reguliert eine Vielzahl an biologischen Prozessen [202]. Neben dem Glukosemetabolismus werden unter anderem das Immunsystem, Zellproliferation und Apoptose, Kognition, Verhalten und embryonale Entwicklung von GC beeinflusst [203]. Aufgrund ihrer anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung werden synthetische GC zur Behandlung akut und chronisch entzündlicher Erkrankungen eingesetzt [204]. In der Therapie von Tumorerkrankungen werden die anti-angiogenen und -proliferativen Eigenschaften genutzt [205]. Nicht zuletzt dienen GC auch der Reduktion von Chemotherapie-induzierten Nebenwirkungen [206].

Die Effekte von GC auf den Organismus werden auf zellulärer Ebene von dem Glukokortikoidrezeptor (GR) vermittelt. Der GR ist ein liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor und gehört der Superfamilie der nukleären Rezeptoren an, zu welchen neben Steroid- auch Sterol-, Retinoid- und Thyroidrezeptoren gezählt werden [207, 208]. Der GR hat einen modularen Aufbau. Am N-terminalen Ende befindet sich eine Domäne (NTD) mit transaktivierender Funktion (Activation Function 1, AF-1). AF-1 ist maßgeblich an der Initiation der Transkription beteiligt und kann unter anderem Coaktivatoren und basale Transkriptionsfaktoren wie die RNA-Polymerase II rekrutieren [209]. Die DNA-bindende Domäne (DBD) ist gemeinsam mit der Hinge-Region zentral gelegen und besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven, welche an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte „glucocorticoid response elements“ (GRE) binden. Am C-terminalen Ende befindet sich die Liganden-bindende Domäne (LBD). Diese interagiert mit GC und besitzt zusätzlich eine transaktivierende Funktion (AF-2). Die nukleären Lokalisationssignale (NL-1 und -2) sind jeweils an DBD und LBD gelegen [202, 209] (**Abbildung 4**)

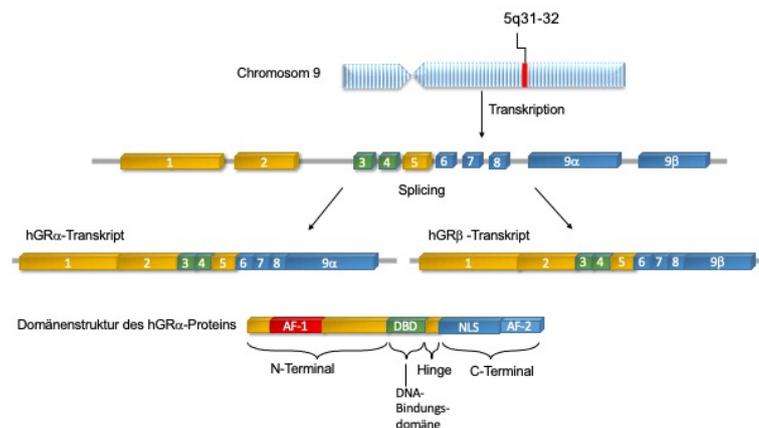


Abbildung 4: Genomischer Aufbau des GR und Struktur des GR-Proteins. Abbildung modifiziert nach Kadmiel et al [202].

1.5.2 Wirkungsmechanismus des Glukokortikoidrezeptors

Im Zytosol ist der GR an einen Chaperonkomplex gebunden, der unter anderem Hitzeschockproteine (z.B. Hsp70 und -90) enthält und die hohe Bindungsaffinität des Rezeptors für Cortisol gewährleistet [210].

Wenn der GR einen Liganden bindet, dissoziiert der Rezeptor von dem Chaperonkomplex. Es kommt zur Konformationsänderung und die nukleären Lokalisationssignale werden freigelegt, sodass der GR in den Zellkern transloziert [211]. Im Zellkern bindet der GR als Homodimer über die DBD an GRE und aktiviert die Transkription der entsprechenden

Zielgene, indem er Coaktivatoren und Chromatin-Modulatoren an die Promoter rekrutiert [209]. Diese Coaktivatoren besitzen eine intrinsische Histonacetyltransferase-Aktivität und lockern die Chromatinstruktur auf, sodass weitere Transkriptionsfaktoren leichter an die DNA binden können [23]. Transrepressive Effekte des GR werden über die Bindung an „negative glucocorticoid response elements“ vermittelt [24]. Die indirekten Effekte des GR erfolgen entweder über die Assoziation mit Transkriptionsfaktoren an Promotern ohne GRE („Tethering“) oder an solchen mit GRE („Composite promoters“) [212]. Neben der Wirkung von GC auf die Genexpression wurden auch nicht-genomische, schnell einsetzende Effekte beobachtet, die über die Interaktion mit zytosolischen oder membranständigen GR stattfinden [25]. Diese sind in **Abbildung 5** schematisch dargestellt.

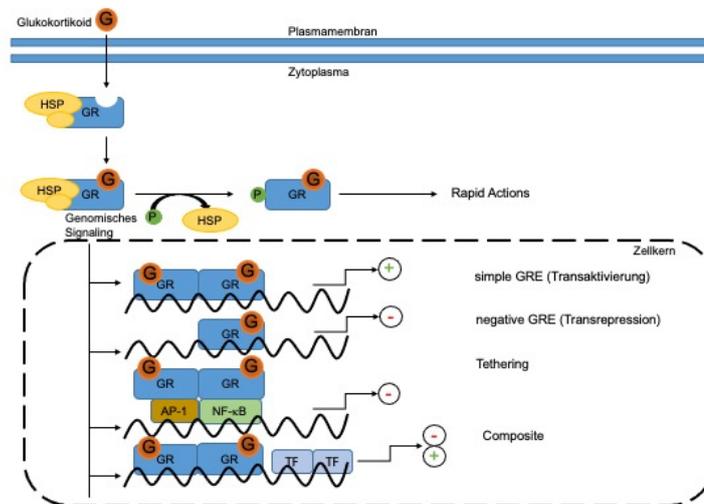


Abbildung 5: Wirkmechanismus des GR: Im Zytoplasma kann GR non-genomische, schnell einsetzende Effekte vermitteln oder wird in den Nukleus importiert. Dort wirkt er über verschiedene genomische Mechanismen. Abbildung modifiziert nach Kadmiel et al. [202].

1.5.3 Glukokortikoidrezeptor-Isoformen und posttranslationale Modifikationen

Das NRC1-Gen, welches für den GR kodiert, liegt auf Chromosom 5 und besteht aus neun Exons [212]. Durch alternatives Splicing entstehen zwei Isoformen, GR α und GR β , die sich in Anzahl der Aminosäuren und Wirkweise unterscheiden. GR α liegt im Zytosol vor, bindet Liganden und übt nach Translokation in den Zellkern genomische Effekte aus, wie oben beschrieben [212]. Aufgrund einer veränderten LBD kann GR β hingegen keine GC binden und verbleibt konstant im Zellkern. Dort reguliert er zwar nicht direkt GRE, wirkt aber antagonistisch auf von GR α induzierte Effekte [213]. Unabhängig davon besitzt GR β intrinsische Transkriptionsaktivität und kontrolliert eine Vielzahl von Genen [214]. Die Komplexität der Wirkung des GR kommt auch durch verschiedene weitere Isoformen zustande, welche aus alternativem Splicing hervorgehen (GR-A, -P, - δ und - γ). Sie unterscheiden sich in der GC-Bindungsaffinität ebenso wie in ihrer Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung [212]. Zusätzlich entstehen durch alternative Translation acht weitere Subtypen von GR α [215]. Für die Komplexität der GR-Wirkung spielen außerdem posttranslationale Modifikationen eine große Rolle, welche die Stabilität, subzelluläre Lokalisation und Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen [216]. Neben klassischen GC können auch selektive GR-Agonisten und -Modulatoren an den GR binden. Sie sollen gezielt wirken und systemische Nebenwirkungen von GC minimieren [202]. Die

Wirkungsspezifität des GR wird durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, Isoformen, Liganden und posttranslationalen Modifikationen gesteuert, welches die variablen Effekte des GR je nach Gewebe, Organ oder Zellzyklusabschnitt erklärt [217].

1.5.4 Die Bedeutung des Glukokortikoidrezeptors in der Onkologie

Der GR wird ubiquitär im menschlichen Organismus exprimiert und Glukokortikoide wirken dementsprechend auf alle Gewebe bzw. Organe [212]. Eine Dysregulation der Glukokortikoidsynthese und -wirkung ist daher unter anderem mit metabolischen und immunologischen Pathologien verbunden [202]. Auch in der Kanzerogenese spielt der Glukokortikoidrezeptor eine Rolle. Der pro-apoptische Effekt von GR-Agonisten in hämatologischen Malignomen ist gut erforscht und der Einsatz von Dexamethason oder Prednison in Kombination mit Zytostatika ein bewährtes Therapiekonzept für Leukämien oder Lymphome. Teilweise kann der Effekt durch die Regulation der Gene von pro- und antiapoptischen Proteinen wie BIM oder BCL2 erklärt werden [218]. Mutationen im NR3C1-Gen sind mit soliden Tumoren wie kolorektalen, Mamma- oder Magenkarzinomen assoziiert [219]. Im Prostata-Karzinom wurde der GR als tumorsuppressiver Faktor identifiziert, der mit zunehmender malignen Transformation der Zellen vermindert exprimiert wird [220]. Auch im Zervixkarzinom ist die GR-Expression mit einem niedrigeren FIGO-Stadium sowie einem längeren OAS und RFS assoziiert [221]. Für das Mamma-Karzinom sind je nach Hormonrezeptorstatus unterschiedliche Rollen des GR beschrieben. In ER α -positiven Karzinomen ist eine GR-Aktivierung mit der Inhibierung verschiedener Wachstumsfaktoren und verminderter Proliferation verbunden [222, 223]. Eine zunehmende Dedifferenzierung des Mammakarzinoms ist mit einer verminderten nukleären Expression von GR assoziiert [224]. In ER α -negativen Karzinomen hingegen zeigt der GR eine onkogene Funktion, die den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition fördert und Proliferation und Metastasierungsrate steigert [10].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Zusammenhang zwischen histopathologischen Daten mit der Expression epigenetischer Modifikationen und tumorbiologisch relevanten Proteinen im Zervix- und Endometriumkarzinom evaluiert werden. Gal-8 und -9, die Histonmodifikationen H3K9ac und H3K4me3 sowie der GR wurden in zahlreichen anderen Tumorentitäten bereits hinsichtlich ihrer Rolle in der Tumorbiologie und ihres prognostischen Wertes für Patient*innen untersucht. Daten in Hinblick auf das Endometrium- und Zervixkarzinom fehlen jedoch teilweise. Trotz der Etablierung neuer, zielgerichteter Therapien, wie zum Beispiel Checkpointinhibitoren, bleiben die therapeutischen Optionen in fortgeschrittenen Fällen bei beiden Entitäten limitiert. Außerdem gilt es, die Therapie weiter zu präzisieren und individualisieren. Insbesondere bezüglich des Endometriumkarzinoms hat die therapeutische Entwicklung in den letzten Jahren die Bedeutung molekularer Marker verdeutlicht, weshalb die oben genannten für die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt wurden. Die Ergebnisse des Projekts können als Grundlage für die Entwicklung klinisch angewandter prognostischer Marker sowie neuer Therapiekonzepte dienen. Mit Blick auf die bereits vorhandenen Kenntnisse werden Gal -8 und -9 im Zervixkarzinom, Gal-8 und -9, H3K4me3, H3K9ac und der GR im Endometriumkarzinom immunhistochemisch analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewinnung und Aufbereitung des Primärtumorgewebes

Die für die Arbeit verwendeten Tumorproben entstammen aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München, Campus Innenstadt. Die Gewebeprobe wurden intraoperativ gewonnen und nach der histopathologischen Untersuchung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend erfolgte die Verarbeitung der Proben zu Tissue Microarrays (TMA) im Pathologischen Institut der LMU München. Für die Erstellung der TMAs wurden zunächst die Paraffinblöcke mit den Tumoren, die im Array enthalten sein sollen, ausgewählt. Dies erfolgte nach den in 2.1.2 und 2.1.3 aufgeführten Merkmalen. Die zugehörigen archivierten Hämatoxylin-/Eosin-gefärbten Schnitte dienten als Anhaltspunkt für das zu markierende Areal auf dem Paraffinblock. Anschließend erfolgte die Verarbeitung der Proben im Pathologischen Institut der LMU München. Dazu wurde mit einer Hohlnadel ein Gewebezyylinder aus dem Paraffinblock im markierten Areal ausgestanzt und dieser in eine vorgestanzte Stelle in einen leeren Paraffinblock eingesetzt. Bei einer Nadel mit 0,6 mm Durchmesser können bis zu 1000 Proben auf einen Empfängerblock übertragen werden. Die TMA-Blöcke wurden am Mikrotom mit einer Dicke von 4-8 Mikrometer geschnitten und auf Objektträger übertragen. In diesem Fall wurden speziell für die Immunhistochemie beschichtete Objektträger („Superfrost Plus“) verwendet, dessen positiv geladene Oberfläche für eine bessere Haftung des Schnittes sorgt. Die Präsenz eines Proteins kann in den verschiedenen Malignomen erfasst und verglichen werden, sodass Assoziationen zwischen beispielsweise Differenzierungsgrad und Expression gezeigt werden können [225].

2.1.2 Zusammenstellung des Zervixkarzinom-Kollektivs

Die in dieser Arbeit untersuchten Zervixkarzinomproben wurden von 1993 bis 2002 von Patientinnen gewonnen, die sich in diesem Zeitraum einer entsprechenden Operation an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU unterzogen haben. Ein Kollektiv von 244 Gewebeprobe wurde zusammengestellt, wobei alle Proben eingeschlossen wurden, die den histologischen Subtyp eines plattenepithelialen, Adeno- oder adenosquamösen Karzinoms aufwiesen. Die histopathologischen Daten (TNM, Grading, Subtyp) konnten aus den pathologischen Befunden im Archiv der Frauenklinik der LMU sowie dem Tumorregister München entnommen werden. Zu den Tumorproben liegen außerdem die Daten zu Geburts- und Diagnosedatum, Datum des letzten Follow-Ups sowie OAS und RFS der Patientinnen vor. Diese Daten konnten durch eine Abfrage des Tumorregisters München am 15. April 2020 ergänzt bzw. verifiziert werden.

2.1.3 Zusammenstellung des Endometriumkarzinom-Kollektivs

Das für die Arbeit verwendete Kollektiv umfasst 225 Endometriumkarzinomproben, die ebenfalls von Patientinnen der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU stammen. Hier handelt es sich um gewonnene Proben im Zeitraum von 1990 bis 2002. Eingeschlossen wurden ausschließlich endometriale Adenokarzinome. Andere histologische Subtypen, wie zum Beispiel das klarzellige Endometriumkarzinom, wurden aufgrund von niedrigen Fallzahlen ausgeschlossen. Nach der Klassifikation von Bokhman liegen damit ausschließlich Typ-I-Karzinome im Kollektiv vor, eine molekulare Typisierung

zur Einordnung nach dem The Cancer Genome Atlas Project wurde noch nicht vorgenommen. Die Proben des Panels wurden bezüglich histologischen Subtyps und Gradings durch das Pathologische Institut der LMU München analysiert. Die histopathologischen Daten zur TNM-Klassifikation wurden nach der operativen Gewinnung des Gewebes erhoben und im Tumorregister gesammelt. Aufgrund der damals angewandten und inzwischen veralteten TNM-Klassifikation waren entsprechende Anpassungen an die neue TNM-Klassifikation aus dem Jahr 2010 vorzunehmen. Die FIGO-Klassifikation für das Endometriumkarzinom stammt ebenso wie die TNM-Klassifikation aus dem Jahr 2010 und wurde anhand der Daten zu T, N und M für die Tumorpräparate erhoben. Durch eine Abfrage des Tumorregisters München am 15. Januar 2020 konnten Daten zu Geburts-, Diagnose- und gegebenenfalls Todesdatum, Datum des letzten Follow-Ups, Datum einer möglichen Progression, sowie OAS und progressionsfreie Überlebenszeit (PFS) ermittelt beziehungsweise aktualisiert werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemische Untersuchung der Proteinexpression

Die Methode der Immunhistochemie (IHC) beruht auf dem Nachweis von Antigenen im Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebetteten Gewebe durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen. Der primäre Antikörper bindet zunächst an das Epitop des Antigens und wird im zweiten Schritt durch ein direktes oder indirektes Detektionssystem sichtbar gemacht, welches ein lichtmikroskopisch sichtbares Farbsignal erzeugt. Mithilfe der IHC kann eine effiziente Phänotypisierung verschiedener Gewebe erfolgen, weshalb sie eine grundlegende Rolle in der Tumordiagnostik spielt [226].

a) Vorbehandlung

Zu Beginn einer immunhistochemischen Färbung steht zunächst das Herauslösen des Paraffins aus den Gewebsschnitten. Das Entparaffinieren erfolgte für alle TMAs für 20 Minuten in Roticlear®, einem Xylol-Ersatzmedium, welches eine höhere Aufnahmekapazität für Paraffin besitzt als Xylol. Anschließend wurde das Roticlear® durch einmaliges Schwenken in 100%igem Ethanol entfernt. Es folgte die Inkubation der Schnitte für 20 Minuten in einer 3%igen Verdünnung von Wasserstoffperoxid in Methanol. Dieser Schritt dient der Inaktivierung der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidase. Die spätere Farbreaktion zur Detektion eines Antigens nutzt ebenfalls eine Peroxidase zur Substratumsetzung. Eine Aktivität der endogenen Peroxidase kann zu unspezifischen Färbeergebnissen führen. Die Proben wurden erneut in 100%igem, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe mit 70- und 50%igem Ethanol geschwenkt. Zur Entfernung der Ethanolreste erfolgte eine Spülung in destilliertem Wasser. Durch die Formaldehydfixierung kommt es zur Veränderung der tertiären Proteinstruktur, sodass die Epitope von den Antikörpern nicht erkannt werden können (Antigenmaskierung). Ein Verfahren zur Wiederherstellung der Tertiärstruktur ist das sogenannte „Heat Induced Epitope Retrieval“ [226]. Diese Antigendemaskierung erfolgte durch das Erhitzen der Gewebsschnitte in mit destilliertem Wasser verdünnten Natriumcitratpuffer (pH = 6). Die Flüssigkeit wurde durch Mischen von 18 ml einer Zitronensäure-Lösung (210,1 mol/l) und 82 ml einer Natriumcitrat-Lösung (294,1 mol/l) mit 900 ml destilliertem Wasser hergestellt. Der Puffer wurde dann in einem Schnellkochtopf erhitzt und die Schnitte nach Erreichen des Siedepunktes hineingegeben. Die Schnitte kühlten anschließend weitere fünf Minuten ab, bevor der Deckel des Topfes geöffnet und kühles Leitungswasser hinzugefügt wurde. Zur Entfernung des Puffers

wurden die Schnitte anschließend in destilliertem Wasser und zwei mal zwei Minuten in Phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate-Buffered Saline, PBS) gewaschen.

b) Färbevorgang zur Antigenerkennung

Nach der Vorbehandlung erfolgt die eigentliche Anfärbung der Antigene. Zunächst wurde eine Blockier-Lösung für fünf Minuten auf die Schnitte aufgetragen, um unspezifischen Farbreaktionen vorzubeugen. Das Blockier-Medium sättigt elektrostatische Ladungen im Gewebe ab und verhindert, dass sich die Antikörper durch hydrophobe Bindungen an Fettgewebe oder Zellmembranen anlagern. Im Anschluss folgte die Inkubation der Gewebeprobe mit den jeweiligen Antikörpern bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank. Für die genaue Verdünnung und Inkubationszeit der Antikörper siehe **Tabelle 3**. Verdünnungen und Inkubationszeiten wurden zuvor an Kontrollschnitten geprüft. Die Antikörperlösung wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch Waschen der Schnitte in PBS für zweimal zwei Minuten entfernt. Durch Einwirken des Post-Block-Reagenz für 20 Minuten wird das später auftretende Farbsignal amplifiziert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurde schließlich das HRP-Polymer (Horseradish-Peroxidase-Polymer) aufgetragen und für 30 Minuten auf den Proben belassen. Nach Entfernung des HRP-Polymers durch Waschen in PBS wurde das Substrat mittels 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) angefärbt. Zu diesem Zwecke wurde das DAB verdünnt (1 Tropfen auf 1 ml Substratpuffer) und konnte je nach Gewebe und Antikörper zwischen 30 Sekunden und zwei Minuten auf den Schnitten einwirken (**Tabelle 3**). Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Schnitte in destilliertes Wasser getaucht und anschließend je zwei mal zwei Minuten gründlich gewaschen.

Tabelle 3: Verdünnung und Inkubationsbedingungen der verschiedenen Antikörper

Antikörper	Galektin-8	Galektin-9	H3K4me3	H3K9ac	GR
Verdünnung	1:150 in PBS	1:300 in PBS	1:100 in PBS	1:200 in PBS	1:400 in PBS
Inkubationszeit und -temperatur	1 h bei Raumtemperatur	16 h bei 4°C			
Einwirkzeit DAB	1 min	1 min	1 min	30 sec	2 min

c) Gegenfärbung

Für die Beurteilung des gesamten Gewebes und als Kontrast zur braunen Farbgebung der Antigene durch DAB ist die Gegenfärbung der Präparate essenziell. Sie erfolgte mit saurem Hämalaun nach Mayer, welcher ein basischer Farbstofflack in saurer Lösung ist (pH ca. 4,5). Der basische, positiv geladene Farbstoff färbt besonders stark die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und damit die Zellkerne an. Die Schnitte verblieben für zwei Minuten im Hämalaun und wurden danach mit Leitungswasser abgespült. Das Spülen der Schnitte im alkalischen Milieu mithilfe von Leitungswasser (pH ca. 7,7) dient zum einen dem Auswaschen der Säurereste und vermittelt über die Anhebung des pH-Wertes den Farbumschlag von Rot zu blau-violett.

d) Dehydrierung und Eindecken

Nach der Gegenfärbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iges, 96%iges und absolutes Ethanol) entwässert. Dieser Schritt ist aufgrund der Hydrophobie des Eindeckmediums notwendig. Am Ende der Alkoholreihe steht Roticlear®, in welchem die Schnitte vor dem finalen Schritt des Eindeckens gespült werden. Das Eindeckmedium RotiMount® verschließt die Präparate luftdicht, schützt sie vor Ausbleichen und macht sie für Jahre haltbar. Für die Auswertung der Färbung ist

außerdem wichtig, dass der Brechungsindex des Eindeckmediums und des Deckglases derselbe ist, was bei der Nutzung RotiMount® gegeben ist (ca. 1,43 – 1,46).

e) Kontrollfärbungen

Um den korrekten Ablauf der Färbung sicherzustellen, wurden bei jedem Färbedurchgang Positiv-Kontrollen mitgeführt. Diese Kontrollen untersuchen Gewebe, die das zu detektierende Antigen sicher enthalten. Bei Anfärbung der Kontrollen ist garantiert, dass die Färbung auch an den anderen Schnitten gelungen ist. Für die verschiedenen Färbungen wurden jeweils geeignete Gewebe ausgewählt und mitgefärbt. Für jeden Färbedurchgang zeigten sich die Kontrollen positiv, sodass für alle Schnitte von einer ordnungsgemäßen Durchführung der Färbungen auszugehen ist. Beispielhaft sind in **Abbildung 6** und **Abbildung 7** Positivkontrollen für Gal-8 und H3K4me3 gezeigt.

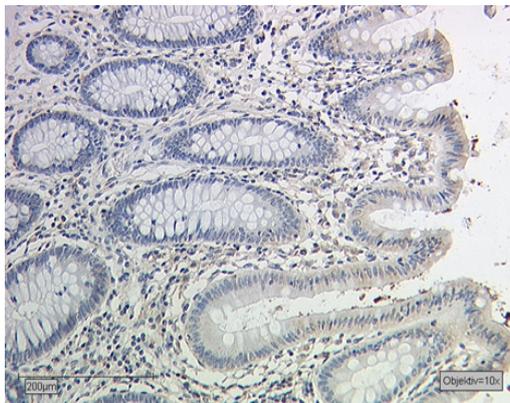


Abbildung 6: Positivkontrolle Gal-8 (Kolon).

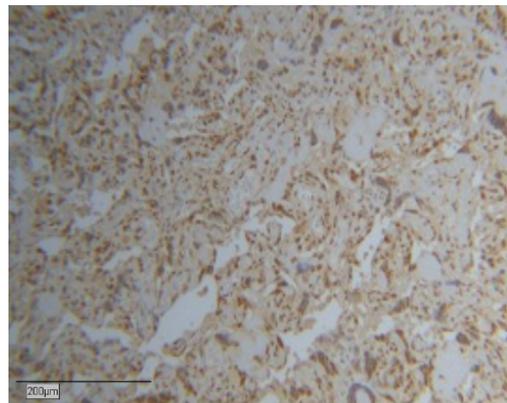


Abbildung 7: Positivkontrolle H3K4me3 (Plazenta).

2.2.2 Liste verwendeter Antikörper und Materialien

Für die Färbungen wurden spezifische Antikörper gegen Gal-8 und -9 sowie gegen H3K4me3, H3K9ac und den GR verwendet. Hierbei wurden für Gal-8 und -9, GR sowie H3K9ac monoklonale Antikörper verwendet. Für H3K4me3 wurde ein polyklonaler Antikörper angewandt. Für eine genaue Übersicht über die Eigenschaften und Hersteller der verwendeten Antikörper sowie weitere Materialien siehe **Tabelle 4** und **Tabelle 5**.

2.2.3 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Präparate wurden im Anschluss an die immunhistochemische Färbung beurteilt. Hierzu erfolgte eine Betrachtung der TMA's unter dem Lichtmikroskop (Diaplan Leitz, Wetzlar, Deutschland) zunächst in 10-facher Vergrößerung, um einen Überblick über die Ausprägung der Färbung zu gewinnen. Anschließend wurden die einzelnen Präparate in 25- und 40-facher Vergrößerung mikroskopiert. Um das Ausmaß der Expression der untersuchten Marker zu evaluieren, wurde der Immunoreaktive Score (IRS) berechnet. Dieser semiquantitative Score besteht aus zwei Skalen, der Färbeintensität und dem Anteil der gefärbten Zellen auf dem Schnitt. Die Färbeintensität wird graduiert in: 0 = keine Färbung, 1 = leichte Färbeintensität, 2 = mittlere Färbeintensität, 3 = starke Färbeintensität und der Prozentanteil der gefärbten Zellen in: 0 = 0%, 1 = 1-10%, 2 = 11-50%, 3 = 51-80% und 4 \geq 80%). Die beiden Parameter werden einzeln bestimmt und die Punktwerte anschließend miteinander multipliziert, sodass sich ein Wert zwischen IRS = 0 (keine Expression) und IRS = 12 (sehr starke Expression) ergibt [227]. So kann die

Expression des Antigens im Gewebe mithilfe der immunhistochemischen Färbung und lichtmikroskopischen Auswertung objektiviert werden. Bei der Auswertung wurde je nach verwendetem Antikörper zwischen zytosolischer oder nukleärer Färbung von Tumorzellen (Galektine, Histone, GR) oder Anfärbung von Stromazellen (GR) differenziert.

Tabelle 4: Eigenschaften der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Galektin-8	Galektin-9	H3K4me3	H3K9ac	GR
Firma	Abcam	Abcam	Abcam	Abcam	Cell Signaling
Tier	Hase	Hase	Hase	Hase	Hase
Isotyp	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
Klonalität	Monoklonal	Monoklonal	Polyklonal	Monoklonal	Monoklonal
Klon	EPR4857	---	---	Y28	D6H2L
Konzentration	k.A.	1mg/ml	0,2 mg/ml	0,059 mg/ml	k.A.
Bestellnummer	ab109519	ab69630	ab8580	ab32129	12041
Lot	GR265068-8	GR2330394-2	GR3263891-1	YE1217012	3
Reaktionsmuster	zytoplasmatisch, z.T. kernständig	zytoplasmatisch, z.T. kernständig	kernständig	kernständig	kernständig
Kontrollfärbungen	Colon, Plazenta	Plazenta, Sigma	Plazenta	Plazenta	Plazenta, Dünndarm

Tabelle 5: Weitere verwendete Materialien.

Materialbezeichnung	Firma
Adhäsionsobjektträger Super Frost Plus®, Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific
Deckgläser 24x24 mm; Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific
Roticlear®	Carl Roth GmbH
Rotimount®	Carl Roth GmbH
Ethanol 100%	SAV Liquid Production GmbH
Methanol	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH
Zitronensäure	Merck KGaA
Natriumcitrat	Merck KGaA
Gibco Dulbeccos Phosphate Bufferd Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific
ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit), Nr. POLHRP-100	Zytomed Systems GmbH
Liquid DAB + Substrate Chromogen-System	Dako, BestNR. K3468

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics, Version 26.0.0 (NY, USA). Die Daten wurden zunächst mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft, wobei bei einem Signifikanzniveau $p > 0,05$ eine Normalverteilung angenommen wurde. Für die Berechnung bivariater Korrelationen wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient angewandt. Aufgrund der nicht-gegebenen Normalverteilung aller weiteren Daten wurden nicht-parametrische Tests für die Beschreibung des Zusammenhangs zweier Gruppen angewandt. Für den Vergleich zweier Gruppen mit zwei Merkmalsausprägungen wurde der Mann-Whitney-U-Test, für

Gruppen mit mehreren Merkmalsausprägungen der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Das OAS und RFS bzw. PFS der Patientinnen im Hinblick auf die Expression der untersuchten Marker wurde mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven und dem Log-Rank-Test (Mantel-Cox) analysiert. Schließlich wurde die Cox-Regression angewandt, um eine mögliche von anderen Faktoren unabhängige prognostische Aussagekraft der Marker zu identifizieren. Alle Tests wurden bei einem $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Zervixkarzinom-Kollektivs

3.1.1 Altersverteilung

Das Alter der Patientinnen bei der Diagnosestellung in dem Kollektiv umfasst eine Spannweite von 62,9 Jahren, wobei die jüngste Patientin bei Diagnose 20,4 Jahre, die älteste 83,3 Jahre war. Das mittlere Alter liegt bei 48,9 Jahren und deckt sich ungefähr mit dem medianen Alter (47 Jahre), dies spricht für eine annähernd symmetrische Verteilung der Altersstufen (**Abbildung 8**). Der Mittelwert bzw. Median des Alters im Kollektiv ist insgesamt etwas niedriger als das mittlere Erkrankungsalter für das Zervixkarzinom in Deutschland (55 Jahre), die Altersverteilung kann aber dennoch als repräsentativ angesehen werden [228].

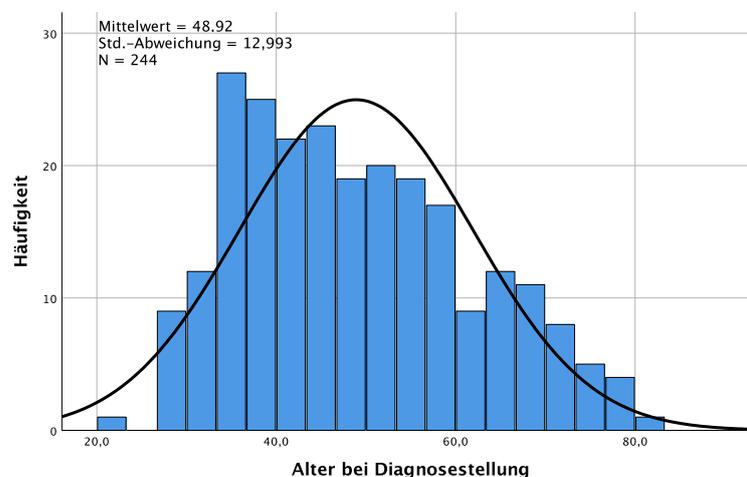


Abbildung 8: Verteilungshäufigkeit des Alters bei Diagnosestellung im Zervixkarzinomkollektiv.

3.1.2 Histologischer Subtyp

Insgesamt wiesen 174 Karzinome den squamösen Subtyp (SCC) auf (77,6%), 34 Tumore waren Adenokarzinome (13,6%), 15 adenosquamöse Karzinome wurden eingeschlossen (6,0%). Bei sieben Tumoren (2,8%) konnte kein eindeutiger histologischer Subtyp bestimmt werden, weshalb diese aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Die Verteilung der histologischen Subtypen im Kollektiv entspricht dem Auftreten der verschiedenen Subtypen in der Klinik, bei dem die SCC 80%, Adenokarzinome 13% und adenosquamöse Karzinome 6% ausmachen [63].

3.1.3 TNM-Klassifikation und FIGO

Das Kollektiv umfasst mehrheitlich Tumore (51,9%, 126 Präparate) mit dem T-Stadium pT2. Tumore, welche lediglich auf die Zervix begrenzt waren (pT1), machen 43,9% des Kollektivs aus (107 Fälle). Neun Tumore sind pT3-Tumore (3,7%). Ein Fall ist ein pT4-Zervixkarzinom. Für ein Tumorpräparat (0,4%) konnte kein pT-Stadium angegeben werden, weshalb dieses in entsprechenden Analysen ausgeschlossen wurde.

Bei der Mehrheit der Patientinnen (n = 145; 59,4%) wurden keine Metastasen in den regionalen Lymphknoten gefunden (pN0), 98 Patientinnen (40,2%) wiesen einen Befall regionaler Lymphknoten auf (pN1). Für eine Patientin (0,4%) konnte kein N-Status angegeben werden, sodass diese aus den Analysen ausgeschlossen wurde.

Der Fernmetastasenstatus konnte für lediglich neun Patientinnen (3,7%) erhoben werden, wovon zwei keine Fernmetastasen zeigten (pM0), bei sieben Patientinnen wurden Fernmetastasen nachgewiesen (pM1; 2,9%). Für die restlichen 235 Patientinnen waren keine Daten zu Fernmetastasen vorhanden (pMX), sodass dieser Parameter nicht in die Analysen miteingeschlossen wurde.

Anhand der vorliegenden Daten zu pT-, pN- und pM-Status wurden die FIGO-Stadien zusätzlich bestimmt. Dabei zeigten 79 Patientinnen ein FIGO-Stadium I (32,4%), 26,2% der Tumorpräparate wurden FIGO II eingestuft (n = 64), FIGO III wiesen 93 Patientinnen auf (38,3%) und nur sieben Karzinome waren FIGO IV (2,9%). Entsprechend des fehlenden T-Status bei einer Patientin konnte hier kein FIGO-Stadium bestimmt werden (n = 1; 0,4%).

3.1.4 Grading

Das Grading wurde ebenfalls aus den Daten des Tumorregisters übernommen und in einzelnen diesbezüglich fraglichen Fällen durch das Pathologische Institut der LMU München verifiziert. Die Mehrzahl der Tumore (n= 143; 58,6%) sind G2-Tumore mit mittelgradig differenzierten Zellen und im Falle des SCC einzelnen Verhornungsherden. Karzinome mit G3, also schlecht differenzierte Tumore ohne Verhornungsareale, sind zu 32,0% (n = 78) vertreten. Gut differenzierte Tumore mit klar erkennbaren verhornten Anteilen waren in 8,6% (n= 7) zu finden. In zwei Fällen (0,8%) konnte kein eindeutiger Differenzierungsgrad festgestellt werden.

3.1.5 Daten zu Gesamt- und rezidivfreiem Überleben

Das mittlere Überleben der Patientinnen im Kollektiv betrug nach Diagnosestellung 136 Monate, der Median liegt bei 139 Monaten. Zum Zeitpunkt der Abfrage der Daten im Tumorregister München waren tumorabhängig 33 Patientinnen verstorben, das entspricht 13,2%. 84,4% der Patientinnen waren als lebend registriert oder wurden im Verlauf zensiert. Zu sechs Patientinnen lagen keine Daten zum Lebensstatus vor. Insgesamt beträgt das mittlere RFS der Patientinnen im Kollektiv 131 Monate, der Median liegt bei 128 Monaten. Zum Zeitpunkt der Abfrage hatten 63 Patientinnen (25,2%) ein Rezidiv. 180 Patientinnen (72,0%) wiesen kein Rezidiv auf. Zu sieben Patientinnen lagen keine Daten zum RFS vor.

3.2 Analyse des Endometriumkarzinom-Kollektivs

3.2.1 Altersverteilung

Im Kollektiv sind hauptsächlich ältere, mutmaßlich postmenopausale Patientinnen vertreten, das mittlere Alter liegt bei 64,7 Jahren, der Median bei 66 Jahren. Die jüngste Patientin war bei Diagnosestellung 35,5 Jahre, die älteste 85,1 Jahre alt (Spannweite 49,6 Jahre). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung deckt sich annähernd mit dem mittleren Erkrankungsalter für das Endometriumkarzinom in Deutschland (68 Jahre). Nur 7,1% der Patientinnen im Kollektiv waren bei der Diagnosestellung jünger als 51 Jahre, dem durchschnittlichen Alter für das Eintreten der Menopause [229].

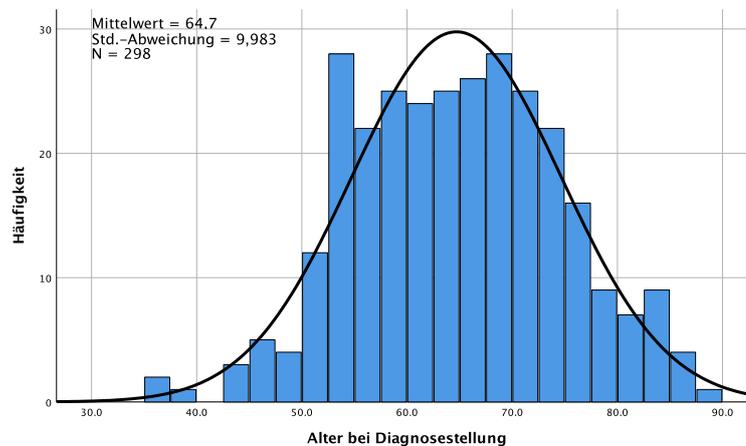


Abbildung 9: Verteilungshäufigkeit des Alters bei Diagnosestellung im Endometriumkarzinomkollektiv.

3.2.2 TNM-Klassifikation und FIGO

Der Großteil der Tumore im Kollektiv zeigte eine kleine Tumorausdehnung mit Begrenzung auf das Corpus uteri (pT1, n = 175; 77,8%). Eine Infiltration der Zervix (pT2) wurde bei 16 Präparaten (7,1%) festgestellt, 30 Proben (13,3%) zeigten ein pT3 Stadium und ein pT4-Stadium wurde in lediglich 3 Fällen (1,3%) vergeben [230]. Für ein Karzinom konnte kein pT-Stadium angegeben werden (0,4%), weshalb dieses in den Analysen ausgeschlossen wurde.

In 63,1% der Fälle (n = 142) konnten keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (pN0). Nur 9,3% der Patientinnen (n= 21) zeigten Lymphknotenmetastasen (pN1). Für 62 Patientinnen (27,6%) konnte der Lymphknotenstatus nicht erhoben werden (pNX).

Der Fernmetastasenstatus konnte für 114 Patientinnen (50,6%) erfasst werden, wovon lediglich fünf Patientinnen Fernmetastasen aufwiesen (pM1).

167 Patientinnen zeigten ein FIGO-I-Stadium. Dieser Anteil von 74,2% des Kollektivs deckt sich mit der Angabe, dass in der Praxis ca. 75% der Endometriumkarzinome im Stadium FIGO I diagnostiziert werden können [231]. 15 Präparate wurden als FIGO-II-Tumore eingestuft (6,7%), 36 Tumore hatten FIGO-Stadium III (16,0%) und sechs Tumore zeigten das FIGO Stadium IV (2,7%). Für ein Präparat konnte kein FIGO-Stadium erhoben werden.

3.2.3 Grading

Das Grading wurde für alle Präparate von Mitarbeitenden des Pathologischen Instituts der LMU München beurteilt. 56,4% der Präparate (n= 127) zeigten ein G1, 77 Tumore waren G2-Karzinome (34,2%) und 20 Tumore G3-Karzinome (8,9%). Für ein Tumorpräparat (0,4%) konnte keine Angabe zum Grading gemacht werden.

3.2.4 Daten zu Gesamt- und progressionsfreiem Überleben

Das mittlere OAS nach der Diagnose liegt im Kollektiv bei 131,0 Monaten, der Median bei 130,6 Monaten. Insgesamt waren zum Zeitpunkt der Abfrage des Tumorregisters im Januar 2020 132 Patientinnen verstorben (58,7%), 93 Patientinnen waren als lebend registriert (41,3%). Für das PFS betrug der Mittelwert im Kollektiv 124,7 Monate, der Median war 122,9 Monate. Hier hatten zum Zeitpunkt der Abfrage 20% der Patientinnen (n = 45) eine Progression gezeigt. 145 Patientinnen wiesen keine Progression auf.

3.3 Galektin-8-Färbung im Zervixkarzinom

3.3.1 Deskriptive Statistik

Galektin-8 (Gal-8) wurde ausschließlich im Zytoplasma exprimiert. 77,9% der Proben zeigten eine Anfärbung, 9,4% der Tumore exprimierten kein Gal-8 (IRS = 0). 12,7% (n = 31) der Proben konnten nicht ausgewertet werden. 58,2% der Proben wiesen eine verstärkte Expression auf (IRS \geq 4; **Tabelle 6**).

Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Gal-8-Färbung im Zervixkarzinom.

	Gültig	Fehlend	Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum
Gal-8 IRS	--	--	4,65	4,00	3,241	0	12
n; %	213; 87,3%	31; 12,7%	--	40; 16,4%	--	23; 9,4%	8; 3,3%

3.3.2 Alter bei Diagnose

Da die Daten zum Alter bei Diagnose nicht normalverteilt waren (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p = 0,040$), wurde für die Berechnung des Zusammenhangs zwischen Alter und Gal-8-Expression der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Hier konnte keine Assoziation festgestellt werden ($p = 0,169$).

3.3.3 Histologischer Subtyp

Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich in der Expression von Gal-8 in den drei verschiedenen histopathologischen Subtypen ($p = 0,024$; $\rho = -0,208$ mit $p = 0,002$; **Abbildung 10** und **Tabelle 7**). Dabei wiesen SCC einen medianen IRS von 4, Adenokarzinome einen IRS von 2 und adenosquamöse Karzinome einen IRS von 2,5 auf (**Abbildung 11** und **Abbildung 12**).

Tabelle 7: Korrelationen histopathologischer Parameter mit der Gal-8- und -9-Expression im Zervixkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

	Gal-8 (IRS +/- SD)	%	p (NPAR)	ρ (Rho)	Gal-9 (IRS +/- SD)	%	p (NPAR)	ρ (Rho)
Histologie			0,024	-0,208 ($p=0,002$)			0,588	-
SCC	4 (+/- 3,23)	18,3			2 (+/- 2,39)	20,8		
Adenokarzinom	2 (+/- 3,28)	20,7			4 (+/- 2,77)	31		
Adenosquamöses Karzinom	2,5 (+/- 2,50)	n.a.			2 (+/- 2,71)	15,4		
Andere	4 (+/- 0,00)	100,0			3 (+/- 0,00)	100		
pT			0,687				0,36	-
T1	4 (+/- 3,24)	19,4			3 (+/- 2,43)	17,8		
T2	4 (+/- 3,10)	18,6			2 (+/- 2,44)	22,1		
T3	2,5 (+/- 4,92)	n.a.			0,5 (+/- 3,25)	n.a.		
T4	2 (+/- 0,00)	100			6 (+/- 0,00)	100		
pN			0,004	-0,277 ($p < 0,001$)			0,024	-0,157 ($p = 0,023$)
N-	4 (+/- 3,28)	16,5			3 (+/- 2,27)	17,7		
N+	3 (+/- 3,03)	10,6			2 (+/- 2,68)	18,6		
FIGO			0,008	-0,165 ($p = 0,016$)			0,067	-
FIGO I	4 (+/- 3,45)	16,2			3 (+/- 2,41)	15,2		
FIGO II	6 (+/- 3,06)	8,5			3 (+/- 2,13)	21,1		
FIGO III/IV	3 (+/- 3,03)	10,5			2 (+/- 2,71)	18,4		
FIGO (nur SCC)							0,002	-0,470 ($p = 0,001$)
FIGO I					3 (+/- 2,30)	19,6		
FIGO II					3 (+/- 2,46)	26,7		
FIGO III/IV					1 (+/- 2,40)	19,7		
Grading			0,865				0,048	- 0,159 ($p = 0,040$)
G1	4 (+/- 3,79)	5,3			4 (+/- 2,59)	22,2		
G2	4 (+/- 3,18)	19,7			2 (+/- 2,26)	23,1		
G3	4 (+/- 3,24)	20,0			2 (+/- 2,69)	15,5	0,067	-

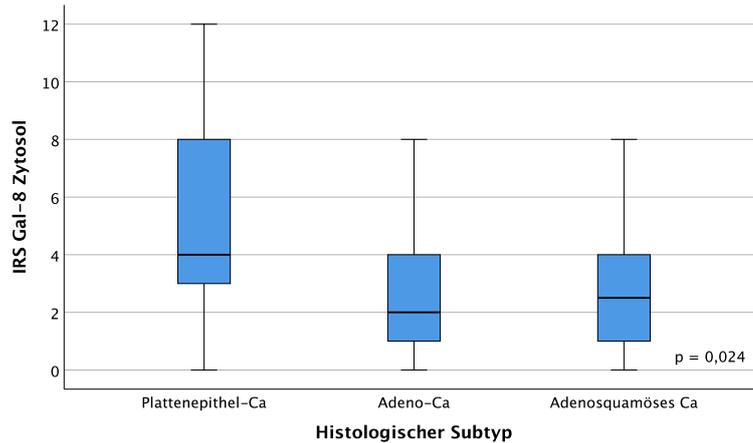


Abbildung 10: Korrelation zwischen Gal-8-Expression und histologischem Subtyp im Zervixkarzinom.

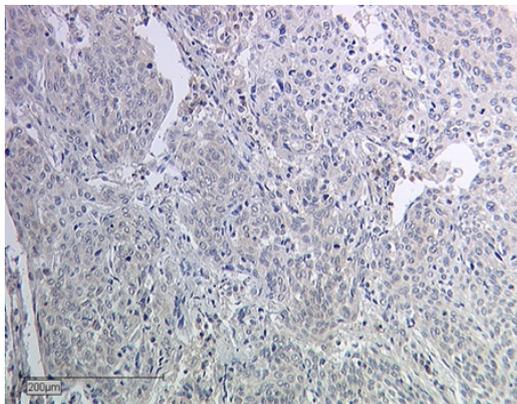


Abbildung 11: Plattenepithelkarzinom mit medianer Gal-8-Expression (IRS = 4).

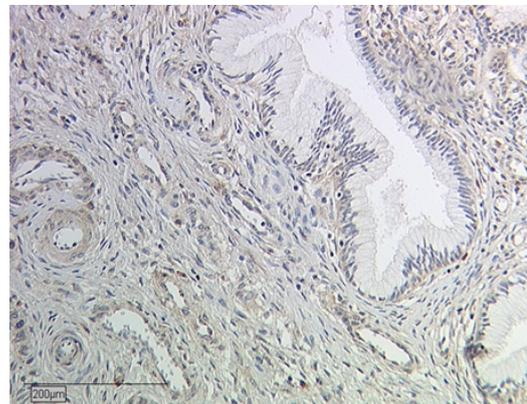


Abbildung 12: Adenokarzinom mit niedriger Gal-8-Expression (IRS = 2).

3.3.4 TNM- und FIGO-Klassifikation

Die Tumorausdehnung pT war nicht mit der Gal-8-Expression assoziiert ($p = 0,687$). Eine inverse Korrelation zeigte sich für den Nodalstatus: Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen (pN1) zeigten einen medianen IRS von 2 (**Abbildung 13**), während Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus (pN0) einen medianen IRS von 4 aufwiesen (**Abbildung 14**); $p = 0,004$; $\rho = -0,277$ mit $p < 0,001$; **Abbildung 15**). Für den Fernmetastasenstatus wurde aufgrund fehlender verfügbarer Daten keine Analyse durchgeführt. Für die Analyse des FIGO-Stadiums im Zusammenhang mit Gal-8 wurden die beiden höchsten FIGO-Stadien (III und IV) zusammengefasst betrachtet, um eine möglichst ähnliche Gruppengröße zu gewährleisten. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen FIGO-Status und der Gal-8-Expression konnte gezeigt werden ($p = 0,008$; $\rho = -0,165$ mit $p = 0,016$; **Abbildung 16** und **Tabelle 7**). FIGO-I-Tumore zeigten einen medianen IRS von 4, welcher in 16,2% der Fälle erhoben wurde. Verglichen dazu war der Median von Tumore im FIGO-Stadium II IRS = 6. Die höheren FIGO-Stadien hatten einen medianen IRS = 3.

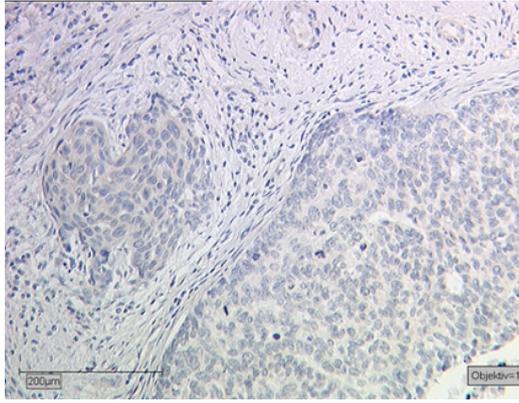


Abbildung 13: Zervixkarzinom mit positivem N-Status und niedriger Gal-8-Expression (IRS = 2).

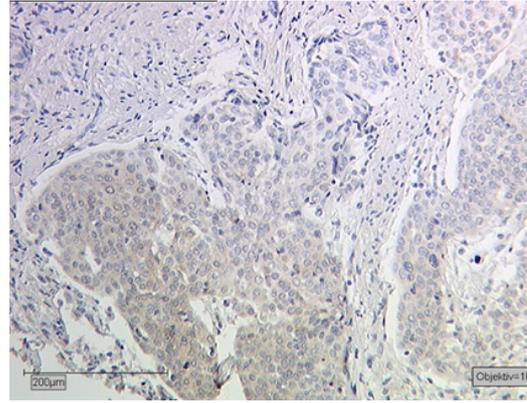


Abbildung 14: Zervixkarzinom mit pN0 und medianer Gal-8-Expression (IRS = 4).

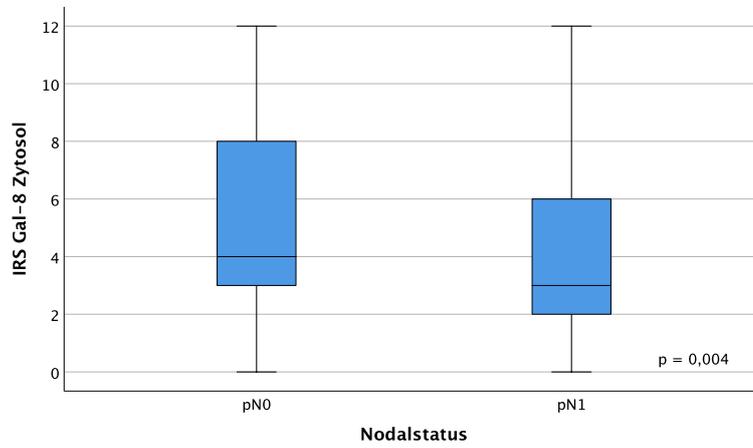


Abbildung 15: Korrelation zwischen Gal-8-Expression und Nodalstatus im Zervixkarzinom.

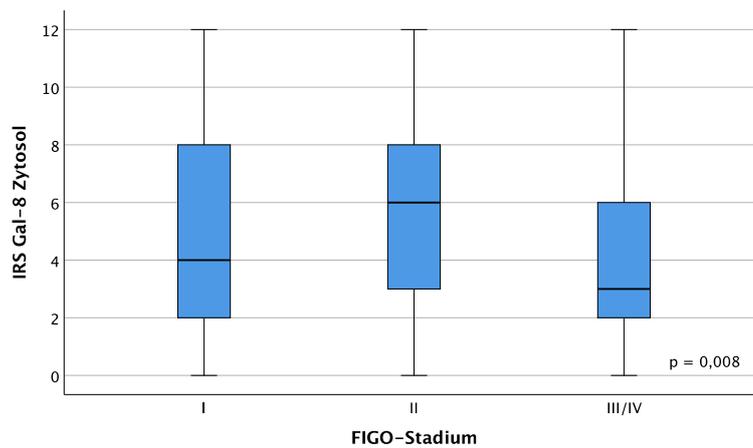


Abbildung 16: Korrelation zwischen Gal-8-Expression und FIGO-Stadium im Zervixkarzinom.

3.3.5 Grading

Der mediane IRS war in allen Gruppen gleich ausgeprägt (IRS = 4), sodass keine Assoziation von Gal-8 mit dem Grading gezeigt werden konnte ($p = 0,865$; **Tabelle 7**).

3.3.6 Gesamtüberleben

Für die Analyse des OAS wurde ein IRS-Wert als Cut-off anhand des Medianwertes der Gal-8-Färbung (IRS = 4) festgelegt und das Kollektiv in Tumore mit hoher und niedriger Gal-8-Expression aufgeteilt. Für Gal-8 wurde der Cut-off nach dem medianen IRS von 4 festgelegt. Dies bedeutet, alle Tumore mit einem IRS von 0-3 wurden als niedrig exprimierend, alle darüber als hoch exprimierend eingestuft. Es konnte allerdings kein signifikanter Zusammenhang von Gal-8 auf das OAS gezeigt werden ($p = 0,823$; **Abbildung 17**). In der durchgeführten Cox-Regression konnten der histologische Subtyp ($p = 0,038$) und pT ($p = 0,034$) als unabhängige Marker für das OAS identifiziert werden (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Cox-Regression bezogen auf das OAS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-8-Expression im Zervixkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Variable	Signifikanz (p =)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,780	0,995	0,962	1,029
Histologischer Subtyp	0,038	1,781	1,033	3,072
pT	0,034	2,608	1,073	6,336
pN	0,950	0,949	0,183	4,929
Grading	0,836	0,986	0,860	1,130
FIGO-Stadium	0,382	1,822	0,462	7,183
Gal-8 (IRS < 4 vs. IRS ≥ 4)	0,843	1,086	0,480	2,454

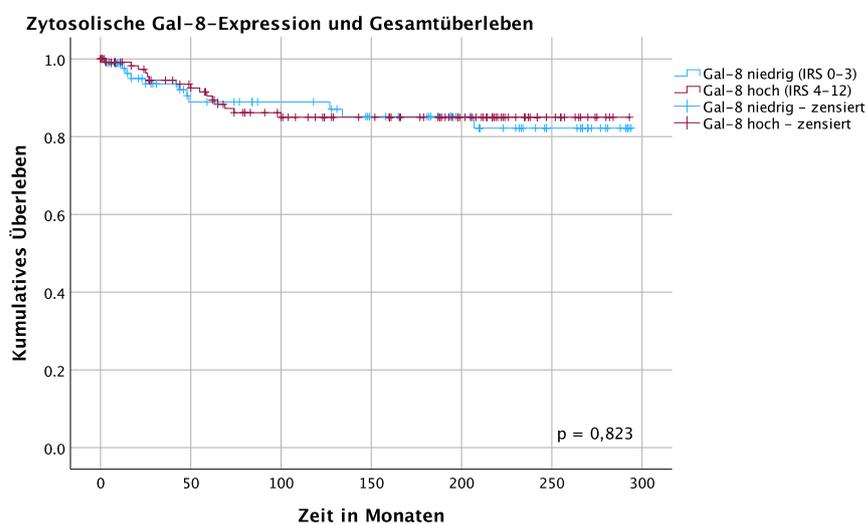


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-8 im Zervixkarzinom: Niedrige zytosolische Gal-8-Expression (IRS < 4) verglichen mit hoher Gal-8-Expression (IRS ≥ 4; $p = 0,823$).

3.3.7 Rezidivfreies Überleben

Ein Zusammenhang zwischen der Gal-8-Expression und dem RFS der Patientinnen bestand nicht ($p = 0,191$). In der Subgruppenanalyse ging in der Gruppe der SCC eine erhöhte Gal-8-Expression einher mit einem verlängerten RFS ($p = 0,036$; **Abbildung 18**). Die Cox-

Regression wurde ebenfalls nur für Patientinnen mit SCC durchgeführt. Hier zeigten sich keine der eingeschlossenen Parameter als unabhängig für das RFS (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: Cox-Regression bezogen auf das RFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-8-Expression im SCC.

Variable	Signifikanz (p =)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,997	1,000	0,973	1,027
pT	0,306	1,450	0,712	2,951
pN	0,699	0,700	0,116	4,247
Grading	0,883	0,992	0,895	1,100
FIGO-Stadium	0,257	2,167	0,569	8,250
Gal-8 Cyt (IRS < 4 vs. IRS ≥ 4)	0,147	0,598	0,299	1,197

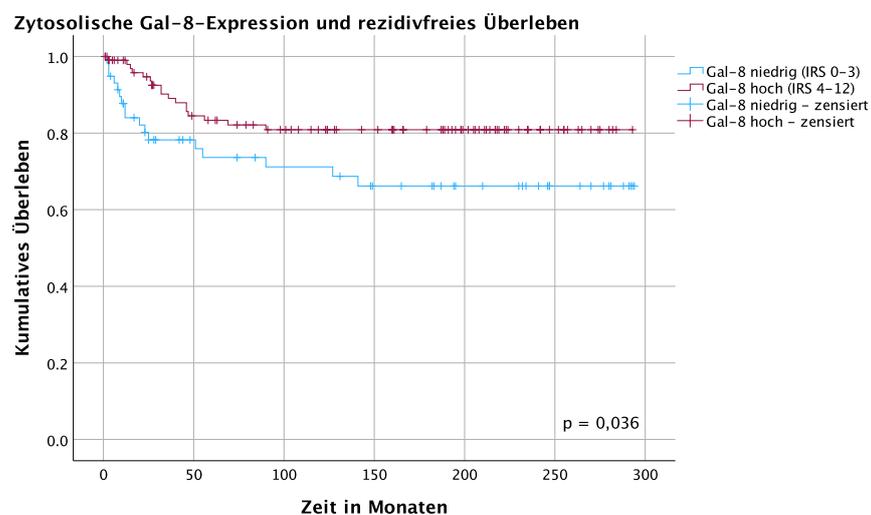


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Analyse für das RFS in Hinblick auf Gal-8 im Zervixkarzinom: Niedrige zytoplasmatische Gal-8-Expression (IRS < 4) verglichen mit hoher Gal-8-Expression (IRS ≥ 4) bei Patientinnen mit SCC (p = 0,036).

3.4 Galektin-9-Färbung im Zervixkarzinom

3.4.1 Deskriptive Statistik

Wie auch Gal-8 zeigte Gal-9 eine rein zytoplasmatische Expression in allen Tumorproben. Eine Anfärbung war in 69,3% der Proben zu sehen, während 17,2% der Tumore Gal-9 nicht exprimierten (IRS = 0). 33 Proben bzw. 13,5% waren aufgrund von fehlendem Tumorgewebe nicht auswertbar. Für 16,8% der Proben wurde der mediane IRS-Score von 2 vergeben.

Tabelle 10: Deskriptive Statistik der Gal-9-Färbung im Zervixkarzinom.

	Gültig	Fehlend	Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum
Gal-9 IRS	--	--	2,87	2,00	2,4571	0	9
n; %	212 86,5%	33; 13,5%	--	41; 16,8%	--	43, 17,2%	6; 2,5%

3.4.2 Alter bei Diagnose

Da die Daten zum Alter bei Diagnose nicht normalverteilt waren (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p = 0,040$), wurde für die Berechnung des Zusammenhangs zwischen Gal-9-Expression und Alter der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden ($p = 0,648$).

3.4.3 Histologischer Subtyp

Die Expression von Gal-9 in den drei verschiedenen histopathologischen Subtypen unterschied sich nicht statistisch signifikant ($p = 0,402$; **Tabelle 7**). Dabei wiesen die SCC einen medianen IRS = 2, die Adenokarzinome einen IRS = 4 und adenosquamöse Karzinome einen IRS von 2 auf.

3.4.4 TNM-Klassifikation und FIGO

Für die Tumorausdehnung konnte keine Korrelation mit der Gal-9-Expression gefunden werden. Im Kruskal-Wallis-H-Test ergab sich ein p-Wert von 0,360 (**Tabelle 7**). Für den Nodalstatus konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Gal-9-Expression detektiert werden. Tumore von Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) hatten im Median einen IRS von 3, während pN1-Tumore einen medianen IRS von 2 präsentierten. Eine höhere Gal-9-Expression ging mit einem negativen Nodalstatus einher ($p = 0,024$; $\rho = -0,157$ mit $p = 0,023$; **Abbildung 19**).

Bezüglich der FIGO-Klassifikation konnte keine signifikante Korrelation von Gal-9 und dem FIGO-Stadium festgestellt werden ($p = 0,067$; **Tabelle 7**). Der durchschnittliche IRS-Score war in allen Gruppen ähnlich, mit einem medianen IRS von 3 in den FIGO Gruppen I und II und einem IRS von 2 in der zusammengefassten Gruppe von FIGO III und IV. In der Gruppe der SCC zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen niedrigerem FIGO-Status und höherer Gal-9-Expression ($p = 0,002$; $\rho = -0,247$; $p = 0,001$; **Abbildung 20**).

3.4.5 Grading

Die Gal-9-Expression zeigte eine statistisch signifikante inverse Korrelation mit dem Differenzierungsgrad der Tumore ($p = 0,048$; $\rho = -0,159$ mit $p = 0,040$; **Abbildung 21**). Gut differenzierte Tumore (G1) wiesen im Durchschnitt einen höheren IRS von 4 auf, während für weniger differenzierte Tumore (G2, G3) im Median ein IRS von 2 vergeben wurde (**Abbildung 22** und **Abbildung 23**).

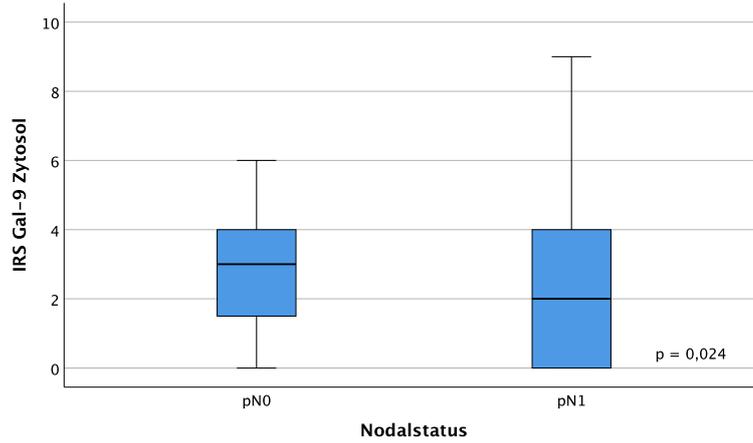


Abbildung 19: Korrelation zwischen zytosolischer Gal-9-Expression und Nodalstatus im Zervixkarzinom.

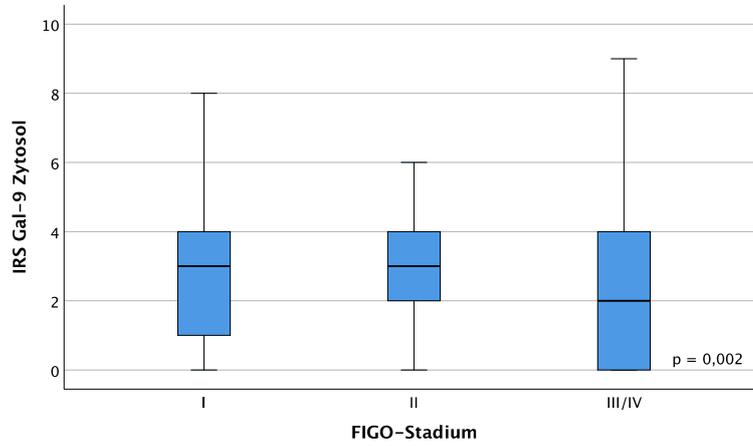


Abbildung 20: Korrelation zwischen zytosolischer Gal-9-Expression und FIGO-Stadium im Zervixkarzinom (nur SCC).

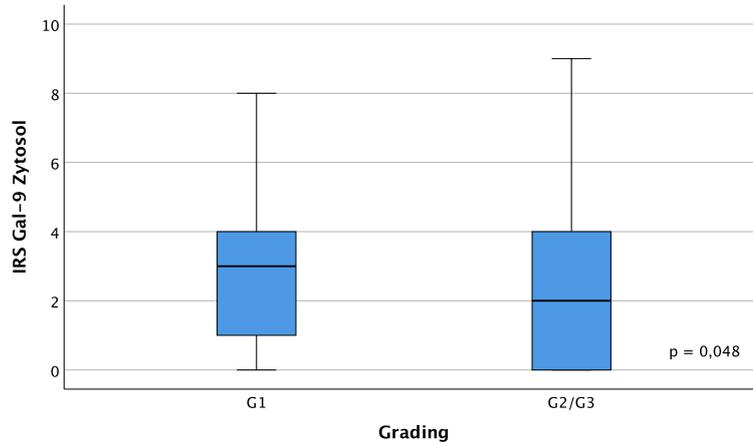


Abbildung 21: Korrelation zwischen zytosolischer Gal-9-Expression und Grading im Zervixkarzinom.

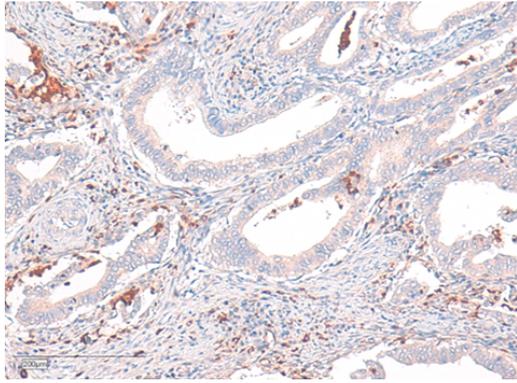


Abbildung 22: G1-Zervixkarzinom mit höherer Gal-9-Expression (IRS = 4).

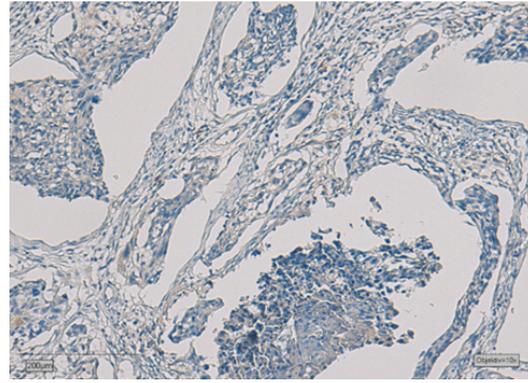


Abbildung 23: G3-Zervixkarzinom mit niedriger Gal-9-Expression (IRS = 1).

3.4.6 Gesamtüberleben

Die Analyse des OAS in Hinblick auf Gal-9 erfolgte anhand der Betrachtung von Tumoren ohne jegliche Expression (IRS = 0) im Vergleich zu Tumoren mit Gal-9-Expression (IRS \geq 1). Hier zeigte sich ein positiver Einfluss von Gal-9 auf das OAS ($\chi^2 = 4,519$ mit $p = 0,034$; **Abbildung 24**). Patientinnen ohne Gal-9-Expression hatten eine mittlere Überlebenszeit von 224 Monaten, Patientinnen mit Gal-9-Expression hingegen 260 Monate. Histologischer Subtyp ($p = 0,011$) und pT ($p = 0,024$) zeigten sich in der Cox-Regression als unabhängige prognostische Faktoren jedoch zeigte auch die zytosolische Gal-9-Expression eine Tendenz zur Unabhängigkeit ($p = 0,055$; **Tabelle 11**).

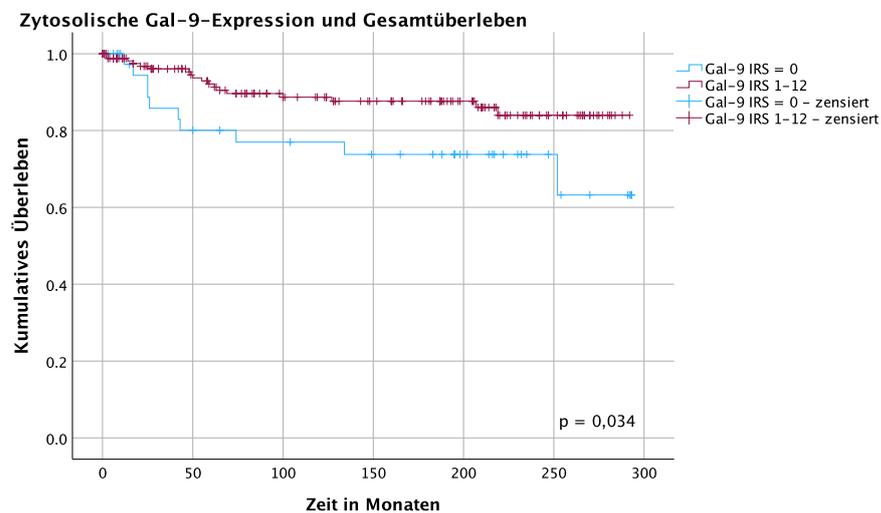


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-9 im Zervixkarzinom: Keine zytoplasmatische Gal-9-Expression (IRS = 0) verglichen mit Gal-9-Expression (IRS \geq 1; $p = 0,034$).

Tabelle 11: Cox-Regression bezogen auf das OAS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-9-Expression im Zervixkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Variable	Signifikanz (p =)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,790	1,004	0,972	1,038
Histologischer Subtyp	0,027	1,828	1,073	3,117
pT	0,024	2,727	1,141	6,515
pN	0,928	1,079	0,210	5,548
Grading	0,894	0,990	0,855	1,146
FIGO-Stadium	0,689	1,303	0,356	4,764
Gal-9 (IRS 0 vs. IRS ≥ 1)	0,055	0,433	0,185	1,017

3.4.7 Rezidivfreies Überleben

Für die Gal-9-Expression konnte kein signifikanter Effekt auf das RFS der Patientinnen festgestellt werden ($p = 0,188$; **Abbildung 25**). Patientinnen mit Tumore ohne jegliche Gal-9-Expression hatten im Mittel ein RFS von 196 Monaten, bei Patientinnen mit Gal-9-Expression war das mittlere RFS 225 Monate lang. Die Cox-Regression identifizierte keinen der Marker als unabhängig (**Tabelle 12**).

Tabelle 12: Cox-Regression bezogen auf das RFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-9-Expression im Zervixkarzinom.

Variable	Signifikanz (p =)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,477	1,009	0,985	1,033
Histologischer Subtyp	0,085	1,439	0,950	2,179
pT	0,164	1,557	0,835	2,903
pN	0,582	1,462	0,378	5,646
Grading	0,806	0,988	0,899	1,086
FIGO-Stadium	0,538	1,367	0,505	3,700
Gal-9 (IRS 0 vs. IRS ≥ 1)	0,446	0,766	0,386	1,520

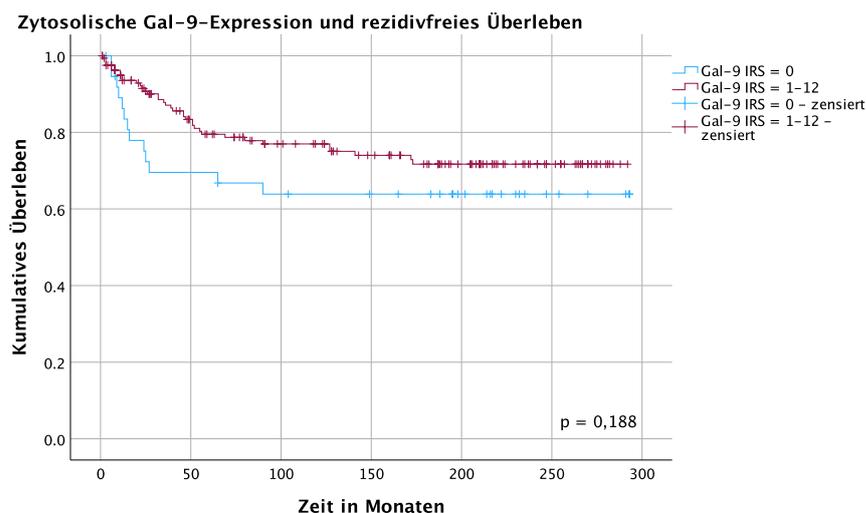


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Analyse für das RFS in Hinblick auf Gal-9 im Zervixkarzinom: Keine zytoplasmatische Gal-9-Expression (IRS = 0) verglichen mit Gal-9-Expression (IRS ≥ 1; $p = 0,188$).

3.5 Galektin-8-Färbung im Endometriumkarzinom

3.5.1 Deskriptive Statistik

Gal-8 zeigte im Endometriumkarzinom sowohl eine zytoplasmatische als auch nukleäre Anfärbung. Diese beiden Färbungen wurden getrennt beurteilt und ausgewertet. In 77,8% der Proben konnte eine zytoplasmatische Anfärbung (Gal-8 cyt) detektiert werden, mit einem medianen IRS von 4 (17,3%). 9,3% der Tumore exprimierten kein Gal-8 (IRS = 0) und 6,6% zeigten eine verstärkte zytoplasmatische Expression (IRS \geq 9). Die Auswertung der nukleären Expression von Gal-8 (Gal-8 nuc) ergab einen medianen IRS von 2 (13,8%) und insgesamt 54,6% der Proben zeigten eine nukleären Anfärbung von Gal-8. 43,5% der Proben präsentierten eine verstärkte Anfärbung (IRS \geq 2) und 32,4% exprimierten kein Gal-8 (IRS = 0). In 118 Tumorproben (52,4%) konnte eine simultane zytoplasmatische und nukleäre Gal-8-Färbung detektiert werden. 12,9% (n = 29) der Proben konnten nicht evaluiert werden (**Tabelle 13**).

Tabelle 13: Deskriptive Statistik der Gal-8-Färbung im Endometriumkarzinom.

	Gültig	Fehlend	MW	Median	SD	Minimum	Maximum
Gal-8 cyt IRS	--	--	4,79	4,00	3,256	0	12
n; %	196; 87,1%	29; 12,9%	--	39; 17,3%	--	21; 9,3%	10; 4,4%
Gal-8 nuc IRS	--	--	2,33	2,00	2,716	0	12
n; %	196; 87,1%;	29; 12,9%	--	31; 13,8%	--	73; 32,4%	2; 0,9%

3.5.2 TNM- und FIGO-Klassifikation

Gal-8-Expression und Tumorstadium pT zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang (Gal-8 cyt: $p = 0,217$; Gal-8 nuc: $p = 0,509$). Die Analyse der Assoziation mit dichotomer Einteilung des T-Stadiums (pT1 vs. pT2/3/4) zeigte eine Tendenz zum Zusammenhang zwischen höherer Gal-8 cyt und niedrigerem pT-Stadium ($p = 0,084$; $\rho = -0,129$ mit $p = 0,071$; **Tabelle 14**). Für die Betrachtung von Gal-8 nuc betrug $p = 0,239$. Auch für den Lymphknotenstatus zeigte sich keine signifikante Korrelation (Gal-8 cyt: $p = 0,266$; Gal-8 nuc: $p = 0,251$; **Tabelle 14**). Für den Fernmetastasenstatus wurde aufgrund unzureichender Daten keine Analyse durchgeführt.

Die Expression von Gal-8 war nicht mit dem FIGO-Stadium assoziiert (Gal-8 cyt: $p = 0,146$; Gal-8 nuc: $p = 0,204$), auch nicht in zusammengefassten Stadien (FIGO I vs. II+). Hier konnte jedoch analog zum pT-Stadium eine Tendenz zu höherer Gal-8 cyt und niedrigerem FIGO-Stadium ($p = 0,065$; $\rho = -0,132$ mit $p = 0,065$; **Abbildung 26**) detektiert werden.

3.5.3 Grading

Für die Analyse des Zusammenhangs zwischen Gal-8-Expression und Grading wurde zugunsten einer einheitlichen Gruppengröße eine dichotome Einteilung der Tumore hinsichtlich des Gradings vorgenommen (G1: n = 112, G2 und G3: n = 84). Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen niedrigerem Grading und höherer Gal-8 cyt ($p = 0,029$; $\rho = -0,132$ mit $p = 0,065$; **Abbildung 27**). Für Gal-8 nuc zeigte sich die gleiche Tendenz wie für Gal-8 cyt, allerdings ohne statistische Signifikanz ($p = 0,077$).

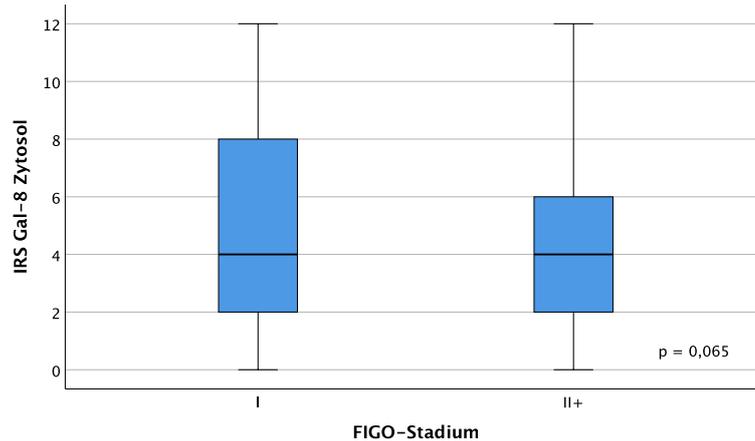


Abbildung 26: Korrelation zwischen Gal-8 cyt und FIGO-Stadium im Endometriumkarzinom

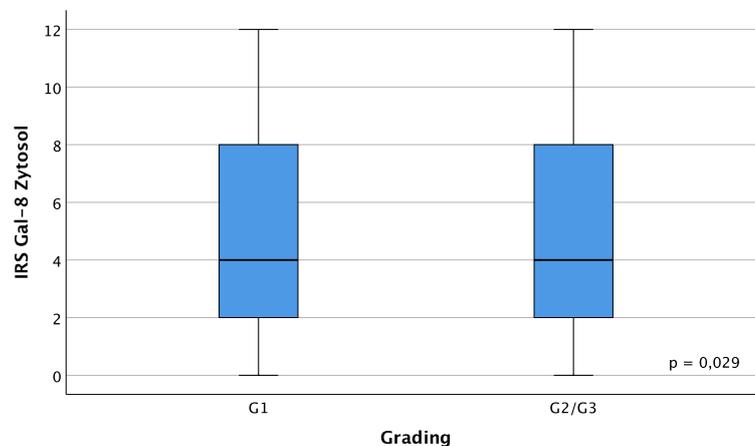


Abbildung 27: Korrelation zwischen Gal-8 cyt und Grading im Endometriumkarzinom.

3.5.4 Gesamtüberleben

Für die Analyse des OAS wurden Tumore mit hoher Gal-8-Expression (IRS ≥ 9 ; **Abbildung 28**), Tumore mit niedriger Expression (IRS 0-8; **Abbildung 29**) gegenübergestellt. Sowohl Gal-8 cyt ($p = 0,008$, $\chi^2 = 6,998$; **Abbildung 30**) als auch Gal-8 nuc ($p = 0,041$; $\chi^2 = 4,171$; **Abbildung 31**) waren positive prognostische Marker für das OAS der Patientinnen. Patientinnen mit Tumoren, die wenig Gal-8 zytosolisch exprimierten, überlebten im Durchschnitt 160 Monate, Patientinnen mit hoher Gal-8 cyt 249 Monate. Patientinnen mit höherer nukleärer Gal-8-Expression (IRS ≥ 2) überlebten durchschnittlich 182 Monate, Patientinnen mit niedrigerer Expression nur 147 Monate. Gal-8 cyt konnte für das Endometriumkarzinom als unabhängiger prognostischer Parameter für das OAS identifiziert werden ($p = 0,017$). Das Alter bei Diagnose ($p < 0,001$) und das Grading ($p = 0,042$) waren ebenfalls unabhängige prognostische Marker (**Tabelle 15**).

Tabelle 14: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

	Gal-8 cyt				Gal-8 nuc			
	IRS Median (+/- SD)	%	<i>p</i> (NPAR)	ρ (Rho)	IRS Median (+/- SD)	%	<i>p</i> (NPAR)	ρ (Rho)
pT			0,217	-			0,509	-
T1	4 (+/- 3,32)	15,4			2 (+/- 2,77)	13,7		
T2	4 (+/- 2,75)	25,0			2 (+/- 1,77)	25,0		
T3	4 (+/- 3,03)	13,3			0 (+/- 2,852)	46,7		
T4	0 (+/- 3,46)	66,7			0 (+/- 3,46)	66,7		
pN			0,266	-			0,251	-
N-	4 (+/- 3,37)	16,2			2 (+/- 2,81)	13,4		
N+	4 (+/- 2,55)	23,8			1 (+/- 3,12)	14,3		
FIGO			0,146	-			0,204	-
FIGO I	4 (+/- 3,38)	13,8			2 (+/- 2,81)	13,2		
FIGO II	4 (+/- 2,63)	26,7			2 (+/- 1,44)	28,6		
FIGO III	4 (+/- 2,80)	11,1			1 (+/- 2,72)	13,9		
FIGO IV	2 (+/- 2,67)	n.a.			0 (+/- 2,45)	83,3		
FIGO dichotom			0,065	-			0,104	-
FIGO I	4 (+/- 3,38)	13,8			2 (+/- 2,81)	13,2		
FIGO II+	4 (+/-2,77)	28,1			1 (+/- 2,40)	8,8		
Grading dichotom			0,029	-0,132 (<i>p</i> = 0,065)			0,077	-
G1	4 (+/-3,18)	17,3			2 (+/- 2,55)	11,0		
G2/G3	4 (+/- 3,29)	15,0			1 (+/- 2,92)	5,2		

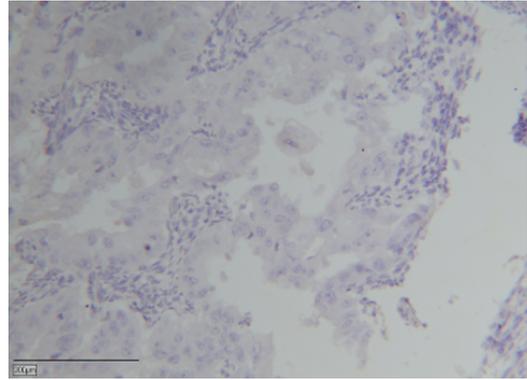
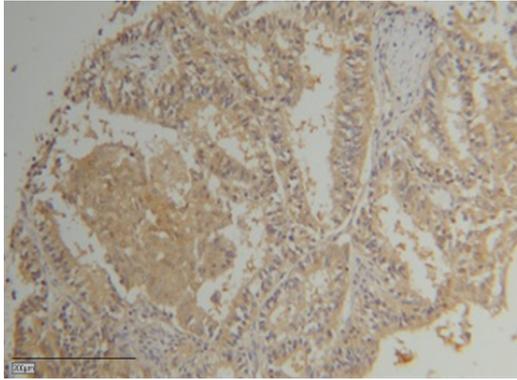


Abbildung 28: Hohe zytosolische Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom (IRS = 12).

Abbildung 29: Niedrige zytosolische Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom (IRS = 2).

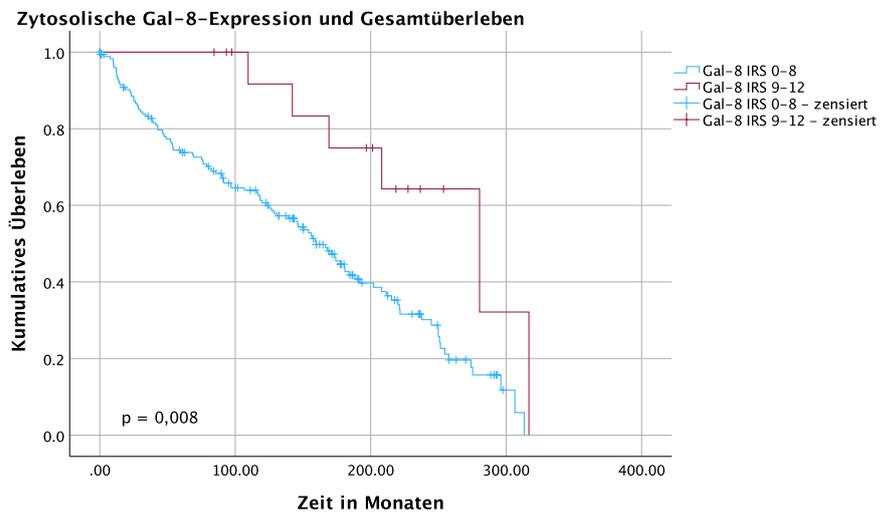


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-8 cyt im Endometriumkarzinom. Niedrige und mittlere zytosolische Galektin-8-Expression (IRS 0-8) verglichen mit höherer zytosolischer Galektin-8-Expression (IRS \geq 9; $p = 0,008$).

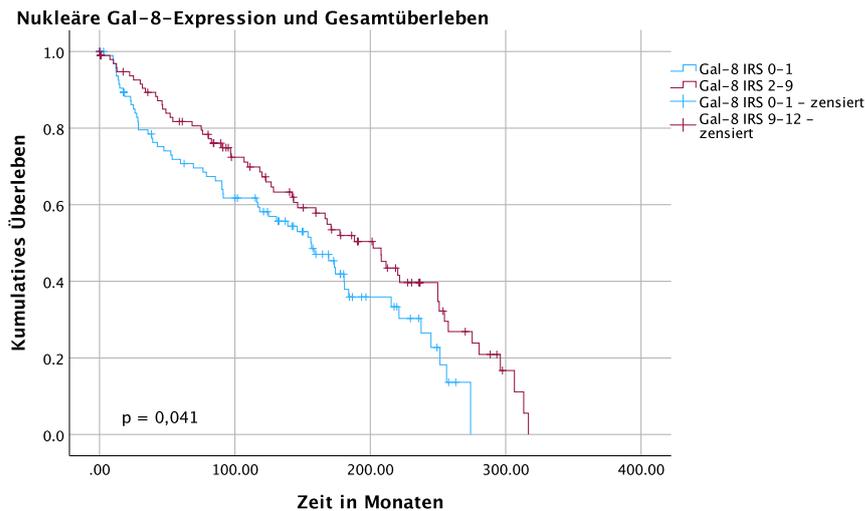


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-8 nuc im Endometriumkarzinom. Niedrige nukleäre Gal-8-Expression (IRS 0-1) verglichen mit höherer nukleärer Gal-8-Expression (IRS ≥ 2 ; $p = 0,041$).

Tabelle 15: Cox-Regression bezogen auf das OAS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Variable	Signifikanz ($p =$)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	< 0,001	1,074	1,037	1,113
pT	0,187	1,631	0,789	3,373
pN	0,808	1,123	0,441	2,865
Grading	0,042	1,503	1,041	2,229
FIGO-Stadium	0,992	0,996	0,447	2,220
Gal-8 cyt (IRS < 9 vs. IRS ≥ 9)	0,017	0,224	0,066	0,763
Gal-8 nuc (IRS < 2 vs. IRS ≥ 2)	0,413	0,799	0,467	1,368

3.5.5 Progressionsfreies Überleben

Patientinnen mit Tumoren, die eine sehr starke Gal-8-Expression im Zytosol zeigten (IRS ≥ 9), hatten im Vergleich zu Tumoren mit niedrigerer Gal-8-Expression ein verbessertes PFS ($p = 0,041$). Allerdings konnten keine medianen Überlebenszeiten in den Gruppen berechnet werden, da alle Fälle zensiert wurden (**Abbildung 32**). Die nukleäre Expression von Galektin-8 war hingegen nicht mit dem progressionsfreiem Überleben assoziiert ($p = 0,089$ mit $\chi^2 = 2,894$ bei Vergleich der Gruppen IRS < 2 und IRS ≥ 2 ; **Abbildung 33**). In der Cox-Regression konnte kein histopathologischer Parameter als unabhängiger Marker für das PFS identifiziert werden (siehe **Tabelle 16**).

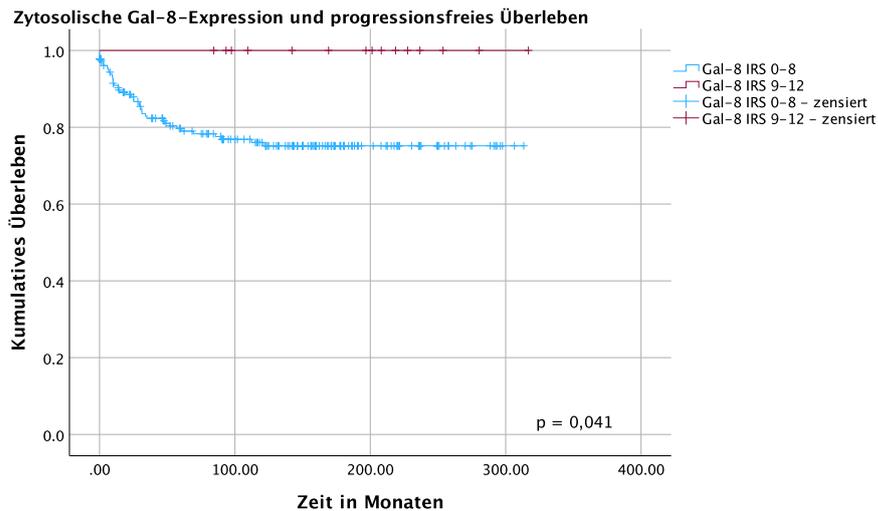


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf Gal-8 cyt im Endometriumkarzinom: Niedrige zytoplasmatische Gal-8-Expression (IRS < 9) verglichen mit hoher zytoplasmatischer Gal-8-Expression (IRS ≥ 9; p = 0,041).

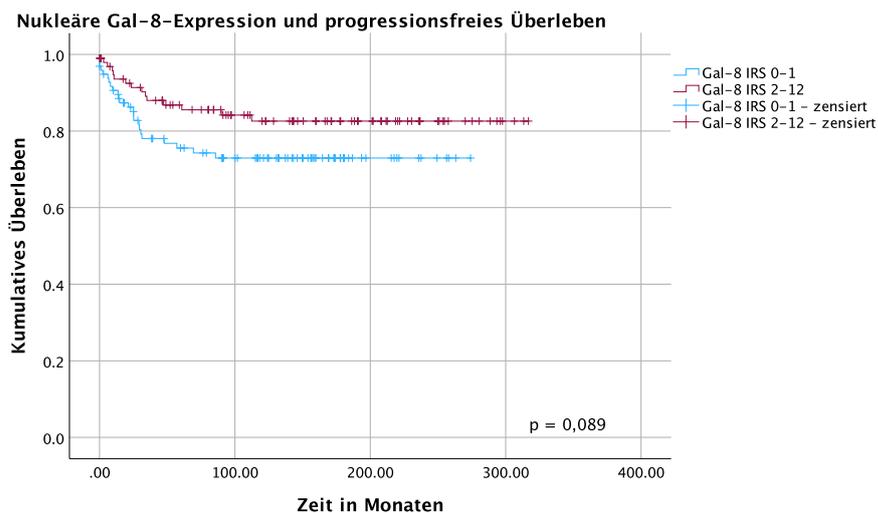


Abbildung 33: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf Gal-8 nuc im Endometriumkarzinom: Niedrige nukleäre Galektin-8-Expression (IRS < 2) verglichen mit hoher nukleärer Galektin-8-Expression (IRS ≥ 2; p = 0,089).

Tabelle 16: Cox-Regression bezogen auf das PFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-8-Expression im Endometriumkarzinom.

Variable	Signifikanz (p =)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,235	1,035	0,978	1,096
pT	0,341	1,487	0,657	3,364
pN	0,874	0,906	0,266	3,089
Grading	0,464	1,279	0,662	2,472
FIGO-Stadium	0,153	2,007	0,772	5,219
Gal-8 cyt (IRS < 9 vs. IRS ≥ 9)	0,977	0,000	0,000	---

Gal-8 nuc (IRS < 2 vs. IRS ≥ 2)	0,866	1,079	0,447	2,606
---------------------------------	-------	-------	-------	-------

3.6 Galektin-9-Färbung im Endometriumkarzinom

3.6.1 Deskriptive Statistik

Gal-9 war im Endometriumkarzinom sowohl zytosolisch als auch nukleär vertreten und beide Färbungen wurden getrennt evaluiert. In 188 Tumoren konnte eine zytosolische Färbung (Gal-9 cyt) detektiert werden, 28 Proben (12,4%) zeigten eine nukleäre Gal-9-Expression (Gal-9 nuc). 80% der Tumoren exprimierten nukleär kein Gal-9 ($n = 180$), eine fehlende zytosolische Expression lag nur in 4% ($n = 9$) der Proben vor. Den medianen IRS der zytosolischen Färbung von 4 präsentierten 19,6% der Tumoren und eine erhöhte zytosolische Expression ($IRS \geq 3$) lag in 71,1% der Fälle vor. Eine simultane zytosolische und nukleäre Färbung zeigte sich in 25 Proben (11,1%). 12,4% der Tumoren konnten nicht ausgewertet werden.

Tabelle 17: Deskriptive Statistik der Gal-9-Färbung im Endometriumkarzinom.

	Gültig	Fehlend	MW	Median	SD	Min	Max
Gal-9 cyt IRS	--	--	5,26	4,00	2,995	0	12
n; %	197; 87,6%	28; 12,4%	--	39; 17,3%	--	9; 4,0%	11; 4,9%
Gal-9 nuc IRS	--	--	0,25	0,00	0,757	0	6
n, %	208; 92,4%;	17; 7,6%	--	31; 13,8%	--	180; 80,0%	1; 0,4%

3.6.2 Alter bei Diagnose

Die Assoziation zwischen Alter bei Diagnose und Gal-9-Expression im Endometriumkarzinom wurde mithilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson analysiert. Für Gal-9 cyt ergab sich ein Koeffizient von -0,006 ($p = 0,935$), für Gal-9 nuc ein Koeffizient von 0,051 ($p = 0,466$). Damit war das Alter bei Diagnose nicht signifikant mit der Gal-9-Expression im Endometriumkarzinom verbunden.

3.6.3 TNM-Klassifikation und FIGO

Die Gal-9-Expression war nicht mit dem pT-Stadium assoziiert (Gal-9 cyt: $p = 0,516$; Gal-9 nuc: $p = 0,474$). Für den Lymphknotenstatus pN konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Gal-9-Expression detektiert werden. Allerdings zeigte sich eine Tendenz zwischen verstärkter nukleärer Expression und pN (Gal-9 cyt: $p = 0,227$, Gal-9 nuc: $p = 0,057$; $p = -0,159$ mit $p = 0,022$). Für den Fernmetastasenstatus (M) wurde aufgrund unzureichender Daten keine Analyse durchgeführt.

Weder zytosolische noch nukleäre Gal-9-Expression korrelierten statistisch signifikant mit dem FIGO-Stadium (Gal-9 cyt: $p = 0,367$; Gal-9 nuc: $p = 0,602$). Auch die Analyse mit gruppierten FIGO-Stadien (FIGO I vs. II+) zeigte keine Assoziation (Gal-9 cyt: $p = 0,389$; Gal-9 nuc: $p = 0,672$; **Tabelle 18**).

3.6.4 Grading

Gal-9 war signifikant mit dem Differenzierungsgrad des Tumors assoziiert. Dabei präsentierten G1-Tumoren einen medianen IRS von 6,00 (19,7%; $n = 25$). G2-Tumoren hatten einen medianen IRS von 4 (26,0%; $n = 20$). In der Gruppe der schlecht differenzierten Tumoren war der mediane IRS 2 (35,0%; $n = 7$) ($p < 0,001$; $p = -0,237$ mit $p < 0,001$;

Abbildung 34 und Tabelle 18). Für die nukleäre Expression von Gal-9 und Grading konnte kein Zusammenhang detektiert werden ($p = 0,599$).

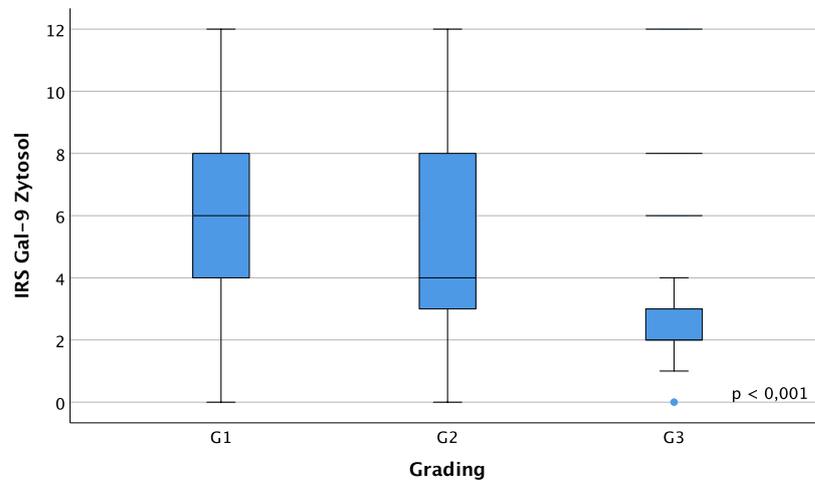


Abbildung 34: Korrelation zwischen Gal-9 cyt und Grading im Endometriumkarzinom.

3.6.5 Gesamtüberleben

Im Log-Rank-Test zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Gal-9 cyt und OAS ($p = 0,032$; $\chi^2 = 4,608$; **Abbildung 35**). Patientinnen mit Tumoren, die wenig Gal-9 exprimierten (IRS 0-2), lebten im Mittel 135 Monate. Hingegen hatten Patientinnen mit verstärkter Gal-9-Expression (IRS ≥ 3) ein durchschnittliches OAS von 175 Monaten. Für die Gal-9 nuc konnte ein solcher Effekt nicht festgestellt werden ($p = 0,211$ und $\chi^2 = 1,566$; **Abbildung 36**). In der Cox-Regression zeigte sich lediglich das Alter bei Diagnose ($p < 0,001$) als unabhängiger Faktor (**Tabelle 19**).

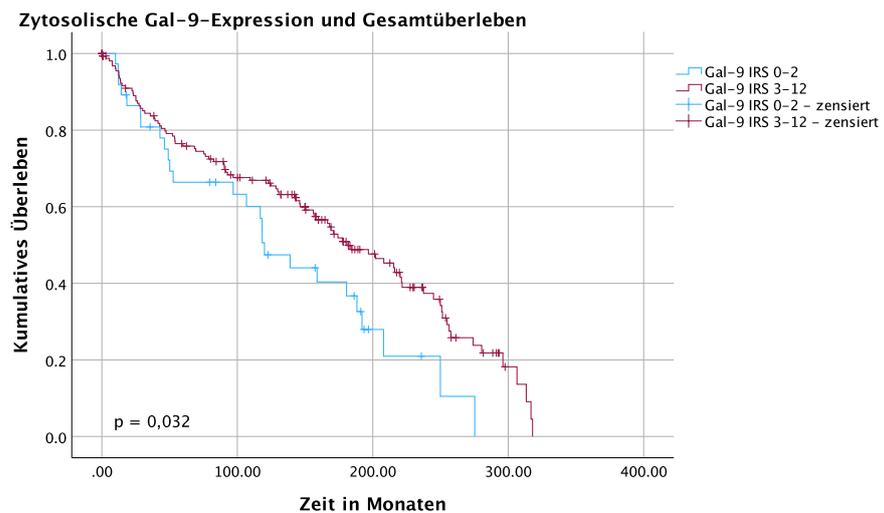


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-9 cyt im Endometriumkarzinom: Niedrige zytosolische Galektin-9-Expression (IRS < 3) verglichen mit höherer zytosolischer Galektin-9-Expression (IRS ≥ 3) ($p = 0,032$).

Tabelle 18: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der Gal-9-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

	Gal-9 cyt				Gal-9 nuc			
	IRS Median (+/- SD)	%	p (NPAR)	ρ (Rho)	IRS Median (+/- SD)	%	p (NPAR)	ρ (Rho)
pT			0,516	-			0,509	-
T1	4 (+/- 2,92)	20,0			0 (+/- 0,66)	79,4		
T2	6 (+/- 3,09)	18,8			0 (+/- 0,72)	75,0		
T3	4 (+/- 3,37)	16,7			0 (+/- 1,22)	83,3		
T4	2 (+/- 2,31)	66,7			0 (+/- 0,00)	100,0		
pN			0,227	-			0,057	-
N-	4 (+/- 2,93)	20,4			0 (+/- 0,72)	76,1		
N+	4 (+/- 3,28)	14,3			0 (+/- 0,00)	81,0		
FIGO			0,367	-			0,602	-
FIGO I	4 (+/- 2,90)	19,2			0 (+/- 0,67)	79,0		
FIGO II	6 (+/- 3,09)	20,0			0 (+/- 0,72)	80,0		
FIGO III	4 (+/- 3,50)	19,4			0 (+/- 1,15)	80,6		
FIGO IV	3,5 (+/- 2,40)	n.a.			0 (+/- 0,00)	100,0		
FIGO dichotom			0,389				0,672	-
FIGO I	4 (+/- 2,90)	19,2			0 (+/- 0,67)	79,0		
FIGO II+	4 (+/- 3,28)	19,3			0 (+/- 0,97)	8,8		
Grading			< 0,001	-0,237 ($p = 0,001$)			0,599	-
G1	6 (+/- 2,85)	19,7			0 (+/- 0,97)	82,5		
G2	4 (+/- 2,99)	26,0			0 (+/- 0,65)	76,6		
G3	2 (+/- 2,92)	35,0			0 (+/- 1,38)	10,0		

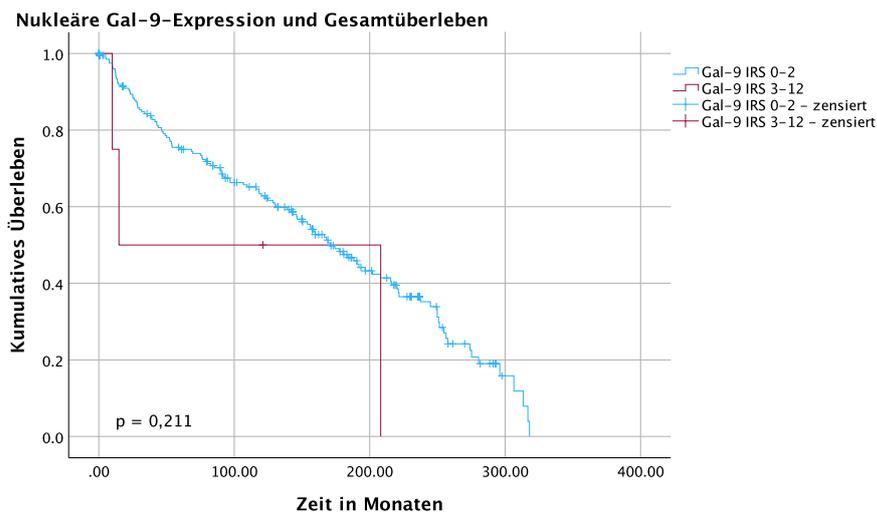


Abbildung 36: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf Gal-9 nuc im Endometriumkarzinom: Niedrige nukleäre Galektin-9-Expression (IRS < 3) verglichen mit höherer nukleärer Galektin-9-Expression (IRS ≥ 3; p = 0,211).

Tabelle 19: Cox-Regression bezogen auf das OAS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-9-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Variable	Signifikanz (p =)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	< 0,001	1,080	1,041	1,120
pT	0,254	1,622	0,707	3,723
pN	0,131	2,156	0,795	5,844
Grading	0,076	1,431	0,963	2,126
FIGO-Stadium	0,573	0,774	0,318	1,884
Gal-9 cyt	0,074	0,550	0,286	1,059
Gal-9 nuc	0,914	0,895	0,119	6,723

3.6.6 Progressionsfreies Überleben

Das PFS der Patientinnen wurde weder durch Gal-9 cyt noch durch Gal-9 nuc beeinflusst. Im Log-Rank-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im PFS für den Vergleich der Gruppen mit IRS < 3 und IRS ≥ 3 (Gal-9 cyt: $\chi^2 = 1,347$ mit $p = 0,246$; **Abbildung 37**; Gal-9 nuc: $\chi^2 = 2,560$ mit $p = 0,110$; **Abbildung 38**). In der Cox-Regression wurde kein Parameter als unabhängiger Marker für das PFS identifiziert (**Tabelle 20**).

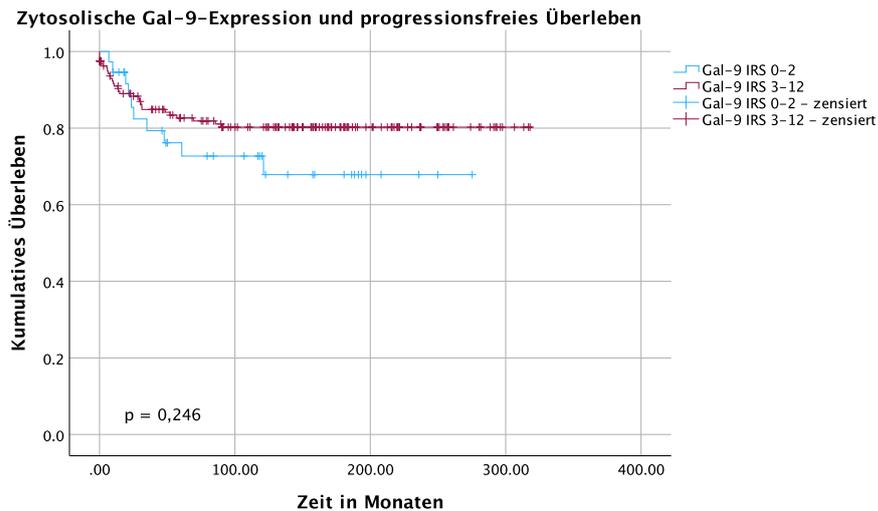


Abbildung 37: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf Gal-9 cyt im Endometriumkarzinom: Niedrige zytosolische Gal-9-Expression (IRS < 3) verglichen mit hoher zytosolischer Gal-9-Expression (IRS ≥ 3; p = 0,246).

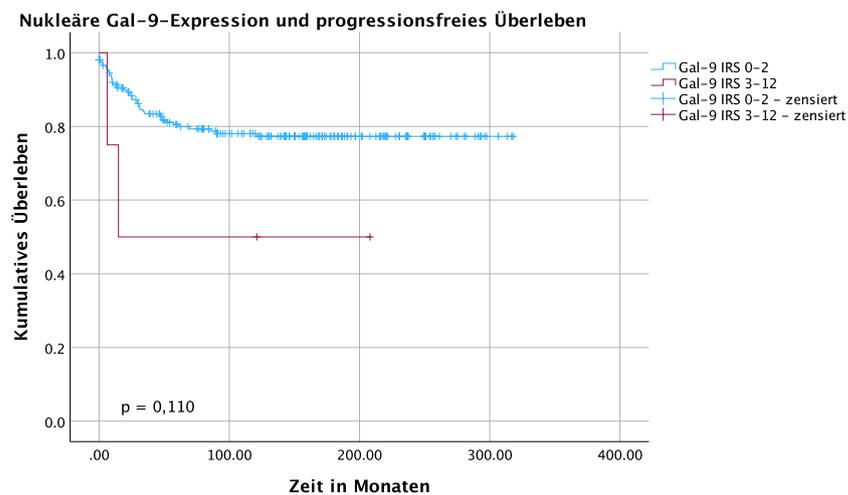


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf Gal-9 nuc im Endometriumkarzinom: Niedrige nukleäre Gal-9-Expression (IRS < 3) verglichen mit hoher nukleärer Gal-9-Expression (IRS ≥ 3; p = 0,110).

Tabelle 20: Cox-Regression bezogen auf das PFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der Gal-9-Expression im Endometriumkarzinom.

Variable	Signifikanz (p =)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,687	1,011	0,959	1,066
pT	0,654	1,236	0,489	3,126
pN	0,964	1,036	0,282	3,769
Grading	0,180	1,564	0,814	3,005
FIGO-Stadium	0,236	1,855	0,668	5,153
Gal-9 cyt (IRS < 3 vs. IRS IRS ≥ 3)	0,606	0,762	0,271	2,143
Gal-9 nuc (IRS < 3 vs. IRS ≥ 3)	0,986	0,000	0,000	---

3.7 H3K9ac-Färbung im Endometriumkarzinom

3.7.1 Deskriptive Statistik

In 90,3% der Tumore war H3K9ac nukleär exprimiert (H3K9ac nuc), nur 1,3% zeigten keine nukleäre Anfärbung und erhielten daher den IRS = 0. Der mediane IRS von 8 wurde für 28,9% (n = 65) vergeben. Eine verstärkte Expression (IRS > 8) zeigten 32% der Tumore. Im Kontrast dazu steht die zytosolische Färbung von H3K9ac (H3K9ac cyt), die nur in 8,7% der Fälle detektierbar war (IRS > 0). Die meisten Tumorproben zeigten keine Expression von H3K9ac im Zytosol. Der mediane IRS lag aus diesem Grund bei 0 und wurde von 78,7% der Tumore präsentiert (n = 177). 8,4% der Proben konnten nicht bewertet werden (**Tabelle 21**).

Tabelle 21: Deskriptive Statistik der H3K9ac-Färbung im Endometriumkarzinom.

	Gültig	Fehlend	MW	Median	SD	Min	Max
H3K9ac cyt IRS	--	--	0,27	0,00	0,883	0	6
n; %	196; 87,1%	29; 12,9%	--	177; 78,7%	--	177; 78,7%	1; 0,4%
H3K9ac nuc IRS	--	--	7,65	8,00	2,786	0	12
n, %	206; 91,6%;	19; 8,4%	--	65; 28,9%	--	3; 1,3%	32; 14,2%

3.7.2 Alter bei Diagnose

Die Expression von H3K9ac korrelierte nicht mit dem Alter der Patientinnen bei Diagnose. In der Korrelationsanalyse war der Koeffizient nach Pearson für die zytosolische Expression 0,069 mit $p = 0,325$ und für die nukleäre Expression 0,090 mit $p = 0,210$.

3.7.3 TNM-Klassifikation und FIGO

Die Tumorausdehnung war statistisch signifikant assoziiert mit der H3K9ac nuc-Expression. In der Analyse der Tumorausdehnung (pT1 vs. pT2+) zeigte sich, dass eine erhöhte nukleäre H3K9ac-Expression mit einem niedrigerem T-Stadium assoziiert war ($p = 0,020$; $\rho = -0,160$ mit $p = 0,022$; **Abbildung 39** und **Tabelle 22**). Die zytosolische Expression von H3K9ac korrelierte nicht mit dem pT-Stadium ($p = 0,405$). In Hinblick auf den Lymphknotenstatus pN zeigte sich ein gegensätzlicher Effekt von zytosolischer und nukleärer Expression. Höhere zytosolische Expression ging mit pN1 einher ($p = 0,024$; $\rho = 0,240$ mit $p = 0,001$), während eine verstärkte nukleäre Expression eher mit pN0 assoziiert war ($p = 0,042$; $\rho = -0,136$ mit $p = 0,051$; **Abbildung 40** und **Tabelle 22**). Repräsentative mikroskopische Bilder sind in **Abbildung 41** und **Abbildung 42** zu sehen. Für den Fernmetastasenstatus wurde aufgrund unzureichender Daten keine Analyse durchgeführt.

Die Berechnung des Kruskal-Wallis-Tests bezüglich H3K9ac und des FIGO-Stadiums ergab keine Signifikanzen (H3K9ac cyt: $p = 0,925$; H3K9ac nuc: $p = 0,140$). Jedoch zeigte sich in der Analyse der dichotomen FIGO-Gruppierung (FIGO I vs. II+) eine positive Korrelation der nukleären H3K9ac-Expression auf das FIGO-Stadium ($p = 0,021$; $\rho = -0,160$ mit $p = 0,022$; **Abbildung 43**). Diese Beobachtung wurde bei H3K9ac cyt nicht gemacht ($p = 0,976$).

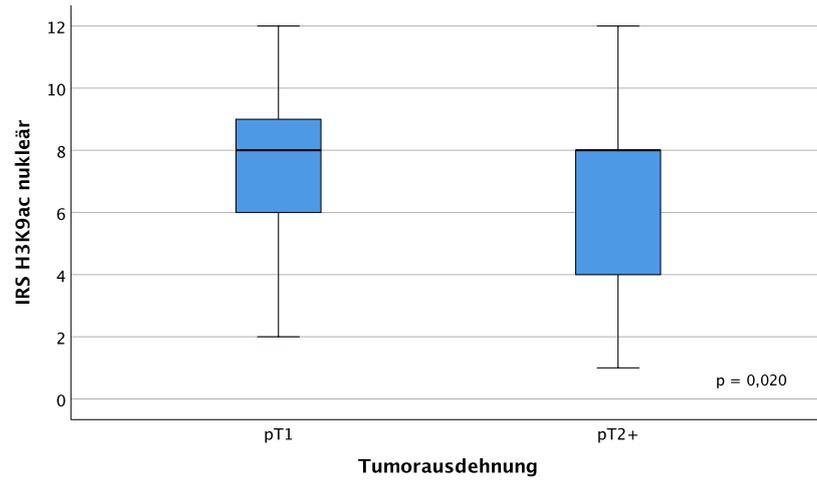


Abbildung 39: Korrelation zwischen H3K9ac nuc und Tumorausdehnung im Endometriumkarzinom.

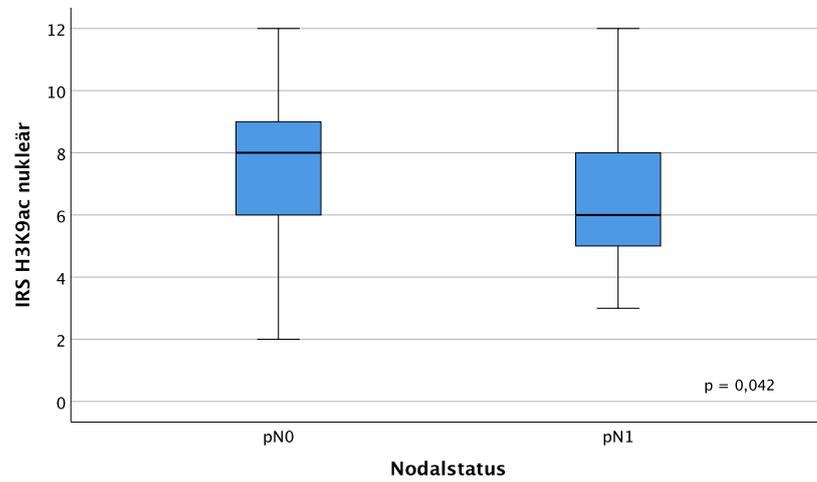


Abbildung 40: Korrelation zwischen H3K9ac nuc und Nodalstatus im Endometriumkarzinom.



Abbildung 41: H3K9ac nuc im pN0-Endometriumkarzinom (IRS = 8).

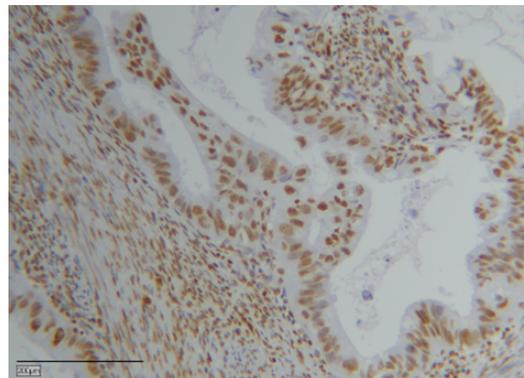


Abbildung 42: H3K9ac nuc im pN1-Endometriumkarzinom (IRS = 6).

Tabelle 22: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der H3K9ac-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

	H3K9ac cyt				H3K9ac nuc			
	IRS Median (+/- SD)	%	p (NPAR)	ρ (Rho)	IRS Median (+/- SD)	%	p (NPAR)	ρ (Rho)
pT			0,309	-			0,136	-
T1	0 (+/- 0,93)	76,0			8 (+/- 2,74)	27,4		
T2	0 (+/- 0,78)	87,5			7 (+/- 2,87)	n.a.		
T3	0 (+/- 0,56)	93,3			8 (+/- 2,73)	40,0		
T4	0 (+/- 1,73)	66,7			4 (+/- 4,62)	66,7		
pT dichotom			0,405				0,020	-0,160 ($p = 0,022$)
T1	0 (+/- 0,93)	76,0			8 (+/- 2,74)	27,4		
T2+	0 (+/- 0,74)	89,8			8 (+/- 2,83)	32,7		
pN			0,024	0,240 ($p = 0,001$)			0,042	-0,136 ($p = 0,051$)
N-	0 (+/- 0,79)	81,7			8 (+/- 2,79)	24,6		
N+	0 (+/- 1,35)	76,2			6 (+/- 3,39)	28,6		
FIGO			0,925	-			0,140	-
FIGO I	0 (+/- 0,86)	76,6			8 (+/- 2,75)	28,1		
FIGO II	0 (+/- 0,80)	86,7			8 (+/- 2,98)	26,7		
FIGO III	0 (+/- 0,97)	86,1			8 (+/- 2,82)	30,6		
FIGO IV	0 (+/- 1,23)	83,3			7 (+/- 3,03)	n.a.		
FIGO dichotom			0,976	-			0,021	-0,160 ($p = 0,022$)
FIGO I	0 (+/- 0,86)	76,6			8 (+/- 2,75)	28,1		
FIGO II+	0 (+/- 0,94)	86,0			8 (+/- 2,83)	29,8		
Grading			0,976	-			0,983	-
G1	0 (+/- 0,86)	75,6			8 (+/- 2,90)	25,2		
G2	0 (+/- 0,96)	81,8			8 (+/- 2,75)	31,2		
G3	0 (+/- 0,79)	90,0			8 (+/- 2,31)	45,0		

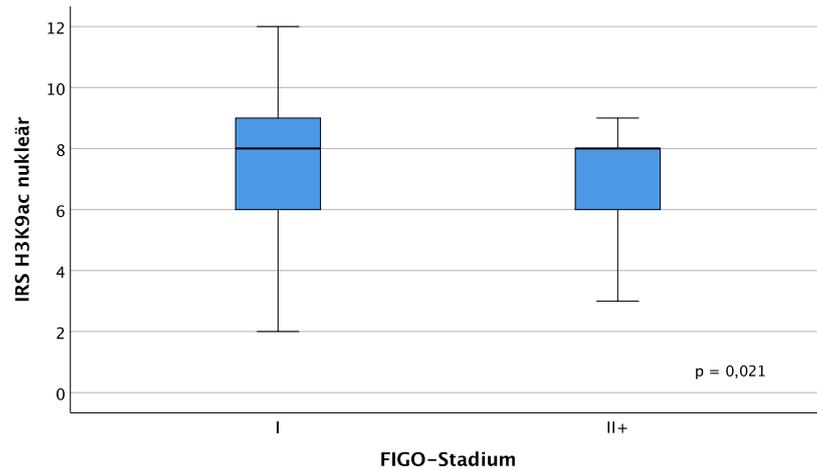


Abbildung 43: Korrelation zwischen H3K9ac nuc und FIGO-Stadium im Endometriumkarzinom.

3.7.4 Grading

Das Grading der Tumore war nicht mit der Expression von H3K9ac assoziiert. Der Kruskal-Wallis-Test ergab für die zytosolische Expression $p = 0,976$ und für die nukleäre Expression $p = 0,983$.

3.7.5 Gesamtüberleben

Der Cutoff-Wert wurde ebenfalls anhand des medianen IRS der H3K9ac-Färbung festgelegt. Es konnten keine Unterschiede der Überlebenskurven detektiert werden (H3K9ac nuc: $p = 0,405$; **Abbildung 44**; H3K9ac cyt: $p = 0,153$; **Abbildung 45**). Für das OAS erwiesen sich in der Cox-Regression nur Alter bei Diagnose ($p < 0,001$) und Lymphknotenstatus ($p = 0,040$) als unabhängige Faktoren (**Tabelle 23**).

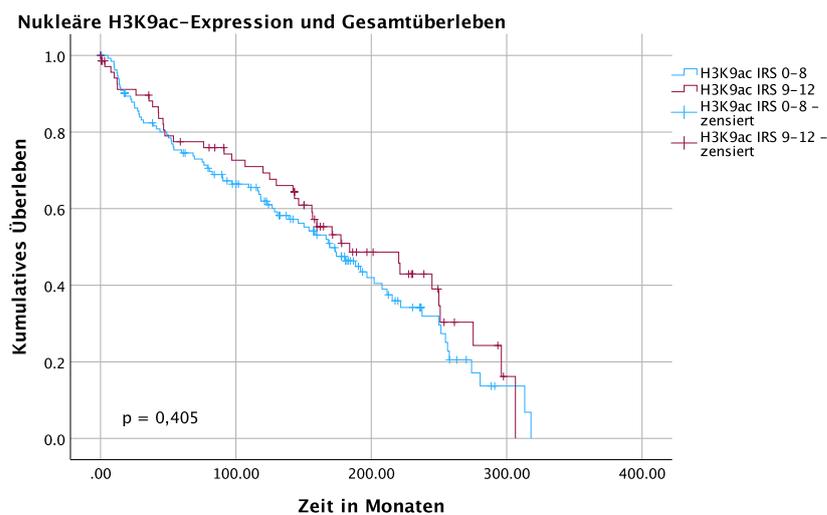


Abbildung 44: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf H3K9ac nuc im Endometriumkarzinom: Niedrige (IRS 0-8) verglichen mit höherer -Expression (IRS ≥ 9 ; $p = 0,405$).

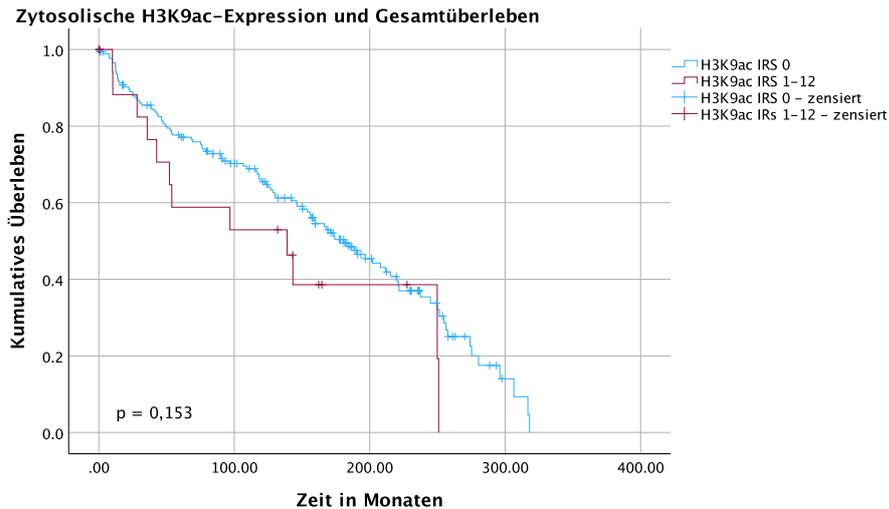


Abbildung 45: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf H3K9ac cyt im Endometriumkarzinom: Keine Expression (IRS 0) verglichen mit zytosolischer H3K9ac-Expression (IRS ≥ 1 ; $p = 0,153$).

Tabelle 23: Cox-Regression bezogen auf das Gesamtüberleben hinsichtlich histopathologischer Parameter und der H3K9ac-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Variable	Signifikanz ($p =$)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	< 0,001	1,060	1,026	1,096
pT	0,138	1,789	0,829	3,861
pN	0,040	2,489	1,043	5,942
Grading	0,082	1,409	0,957	2,074
FIGO-Stadium	0,482	0,747	0,331	1,685
H3K9ac cyt (IRS 0 vs. IRS ≥ 1)	0,461	1,228	0,711	2,121
H3K9ac nuc (IRS < 9 vs. IRS ≥ 9)	0,553	1,371	0,483	3,890

3.7.6 Progressionsfreies Überleben

Der Vergleich der beiden Gruppen in Hinblick auf das PFS zeigte nahezu identische Überlebenskurven mit einem $\chi^2 = 0,000$ ($p = 0,989$; **Abbildung 46**). Für die zytosolische Färbung konnte aufgrund der großen Anzahl der Tumore ohne jegliche H3K9ac-Expression keine Überlebenszeitanalyse durchgeführt werden. In der Cox-Regression konnte keine der getesteten Marker als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden (**Tabelle 24**).

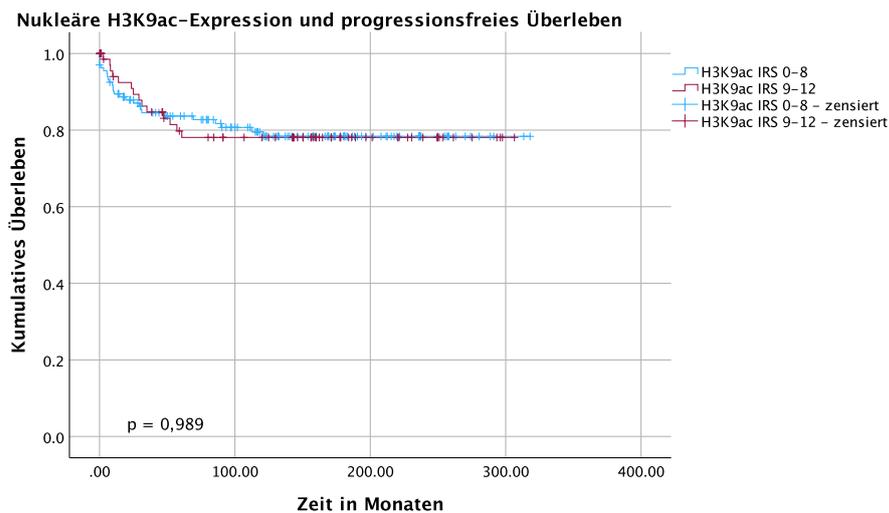


Abbildung 46: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf H3K9ac nuc im Endometriumkarzinom: Niedrige Expression (IRS 0-8) verglichen mit hoher H3K9ac-Expression (IRS \geq 9; $p = 0,989$).

Tabelle 24: Cox-Regression bezogen auf das RFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der H3K9ac-Expression im Endometriumkarzinom.

Variable	Signifikanz ($p =$)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,881	0,996	0,947	1,048
pT	0,413	1,412	0,618	3,225
pN	0,511	1,505	0,445	5,096
Grading	0,192	1,505	0,814	2,782
FIGO-Stadium	0,174	1,923	0,750	4,935
H3K9ac nuc (IRS < 9 vs. IRS \geq 9)	0,233	1,749	0,698	4,383

3.8 H3K4me3-Färbung im Endometriumkarzinom

3.8.1 Deskriptive Statistik

Für H3K4me3 war eine starke nukleäre Färbung zu erkennen (H3K4me3 nuc), mit einem medianen IRS = 8, der in 17,8% aller Tumorproben repräsentiert wurde. Das Zytosol zeigte ebenfalls eine kräftige Färbung (H3K4me3 cyt; medianer IRS = 6; 20,0%). Eine verstärkte Färbung (IRS > 6) zeigten zytoplastisch 35,1% der Proben und nukleär 53,4%. 12,9% der Proben ($n = 28$) konnten nicht bearbeitet werden.

Tabelle 25: Deskriptive Statistik der H3K4me3-Färbung im Endometriumkarzinom.

	Gültig	Fehlend	MW	Median	SD	Min	Max
H3K4me3 cyt IRS	--	--	6,02	6,00	2,404	0	12
n; %	196; 87,1%	29; 12,9%	--	177; 78,7%	--	3; 1,3%	4; 1,8%
H3K4me3 nuc IRS	--	--	7,58	8,00	3,000	1	12
n; %	197; 87,6%	28; 12,4%	--	40; 17,8%	--	5; 2,2%	36; 16,0%

3.8.2 Alter bei Diagnose

Das Alter bei Diagnose stand in keinem Zusammenhang mit H3K4me3 cyt oder nuc der Tumore. Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug $-0,115$ mit $p = 0,109$ für die zytosolische und $p = 0,058$ mit $p = 0,421$ für die nukleäre Expression.

3.8.3 TNM-Klassifikation und FIGO

H3K4me3 nuc korrelierte statistisch signifikant mit der Tumorgöße pT. Tumore mit höherer H3K4me3-Expression zeigten tendenziell eine geringere Größe ($p = 0,011$; $\rho = -0,163$ mit $p = 0,022$; **Abbildung 47**). Der mediane IRS lag in der Gruppe der pT1-Tumore bei 8 (**Abbildung 48**), in der Gruppe pT2 war der mediane IRS = 6 (**Abbildung 49**), pT3-Tumore hatten einen medianen IRS von 8 und pT4-Tumore von 9. Für die zytosolische Expression von H3K4me3 konnte keine Assoziation gefunden werden ($p = 0,348$). Auch wurde kein Zusammenhang zwischen N-Status und H3K4me3 detektiert (H3K4me3 cyt: $p = 0,096$; H3K4me3 nuc: $p = 0,893$; **Tabelle 26**). Es wurde aufgrund unzureichender Daten keine Analyse zu H3K4me3 und dem Fernmetastasenstatus durchgeführt.

H3K4me3 nuc korrelierte signifikant mit dem FIGO-Stadium ($p = 0,012$; $\rho = -0,113$ mit $p = 0,114$). Eine höhere nukleäre H3K4me3-Expression war assoziiert mit einem niedrigerem FIGO-Stadium. Der IRS-Median in der Gruppe der Tumore mit FIGO Stadium I lag bei 8, der mediane IRS in der Gruppe der Tumore mit FIGO IV bei 9 (siehe **Tabelle 26**).

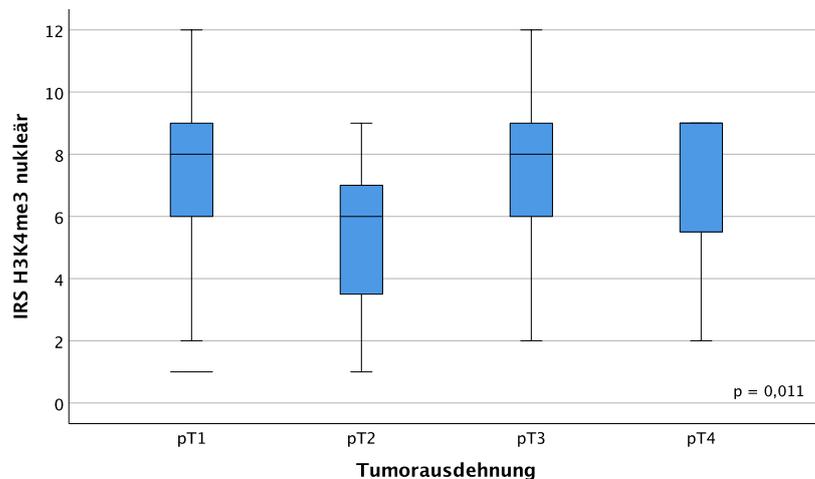


Abbildung 47: Korrelation zwischen H3K4me3 nuc und Tumorausdehnung im Endometriumkarzinom.

Tabelle 26: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der H3K4me3-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

	H3K4me3 cyt				H3K4me3 nuc			
	IRS Median (+/- SD)	%	<i>p</i> (NPAR)	<i>ρ</i> (Rho)	IRS Median (+/- SD)	%	<i>p</i> (NPAR)	<i>ρ</i> (Rho)
pT			0,348	-			0,011	-0,163 (<i>p</i> = 0,022)
T1	6 (+/- 2,45)	20,6			8 (+/- 3,02)	18,3		
T2	4 (+/- 2,03)	37,5			6 (+/- 2,52)	31,3		
T3	6 (+/- 2,41)	23,3			8 (+/- 2,55)	23,3		
T4	4 (+/- 1,53)	33,3			9 (+/- 4,04)	66,7		
pN			0,096	-			0,893	-
N-	6 (+/- 2,31)	19,0			8 (+/- 3,18)	19,0		
N+	8 (+/- 1,92)	28,6			8 (+/- 1,87)	14,3		
FIGO			0,553	-			0,012	-0,113 (<i>p</i> = 0,114)
FIGO I	6 (+/- 2,42)	21,0			8 (+/- 3,04)	19,2		
FIGO II	4 (+/- 1,97)	40,0			6 (+/- 2,50)	33,3		
FIGO III	6 (+/- 2,35)	19,4			8 (+/- 2,32)	16,7		
FIGO IV	6 (+/- 3,33)	33,3			9 (+/- 4,17)	50,0		
Grading			0,731	-			0,211	-
G1	6 (+/- 2,42)	21,3			8 (+/- 3,10)	18,9		
G2	6 (+/- 2,50)	16,9			8 (+/- 2,94)	11,7		
G3	4,5 (+/- 1,91)	n.a.			8 (+/- 2,72)	35,0		

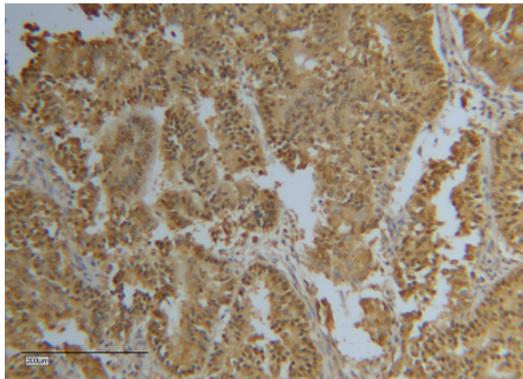


Abbildung 48: pT1-Endometriumkarzinom mit H3K4me3 nuc (IRS = 8).

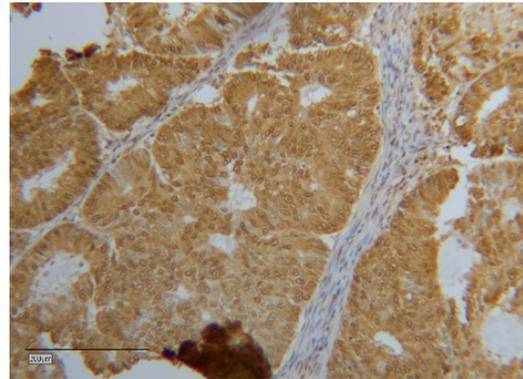


Abbildung 49: pT2-Endometriumkarzinom mit H3K4me3 nuc (IRS = 6).

3.8.4 Grading

Die H3K4me3-Expression im Endometriumkarzinom war nicht mit dem Differenzierungsgrad assoziiert (H3K4me3 nuc: $p = 0,211$; H3K4me3 cyt: $p = 0,731$).

3.8.5 Gesamtüberleben

Die H3K4me3-Expression war kein prognostischer Marker für das OAS (H3K4me3 cyt: $p = 0,294$; **Abbildung 50**; H3K4me3 nuc: $p = 0,053$; **Abbildung 51**). Die nukleäre Expression von H3K4me3 konnte als ein tendenziell negativer Faktor für das OAS der Patientinnen identifiziert werden. Patientinnen mit Tumoren, die in der Gruppe von IRS 0-6 waren, hatten ein durchschnittliches OAS von 180,47 Monaten, Patientinnen mit Tumoren, die H3K4me3 stärker exprimierten, überlebten im Durchschnitt nur 149,32 Monate. In der Cox-Regression zeigten sich für das OAS neben dem Alter bei Diagnose ($p < 0,001$) und Grading ($p = 0,029$) auch die zytosolische sowie nukleäre Expression von H3K4me3 als unabhängige prognostische Marker (siehe **Tabelle 27**).

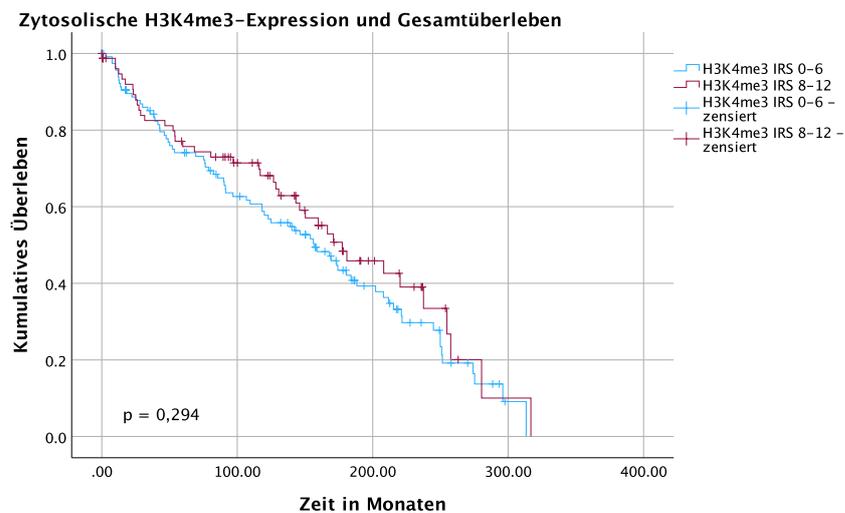


Abbildung 50: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf H3K4me3 cyt im Endometriumkarzinom: Niedrige zytosolische H3K4me3-Expression (IRS 0-6) verglichen mit höherer zytosolischer H3K4me3-Expression (IRS > 8; $p = 0,294$).

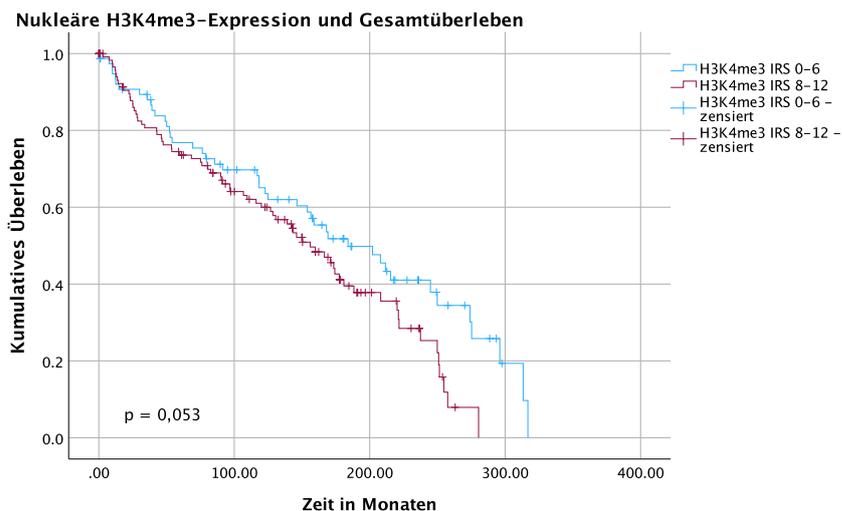


Abbildung 51: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf H3K4me3 nuc im Endometriumkarzinom: Niedrige nukleäre H3K4me3-Expression (IRS 0-6) verglichen mit höherer nukleärer H3K4me3-Expression (IRS > 6) bezüglich des OAS ($p = 0,053$).

Tabelle 27: Cox-Regression bezogen auf das Gesamtüberleben hinsichtlich histopathologischer Parameter und der H3K4me3-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Variable	Signifikanz ($p =$)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,002	1,054	1,020	1,089
pT	0,208	1,591	0,772	3,278
pN	0,261	1,689	0,678	4,205
Grading	0,029	1,515	1,044	2,200
FIGO-Stadium	0,815	0,909	0,409	2,018
H3K4me3 cyt (IRS ≤ 6 vs. IRS > 6)	0,025	0,506	0,279	0,918
H3K4me3 nuc (IRS ≤ 6 vs. IRS > 6)	0,003	2,558	1,366	4,790

3.8.6 Progressionsfreies Überleben

Das PFS korrelierte weder mit der zytosolischen ($p = 0,453$; **Abbildung 52**) noch mit der nukleären Expression ($p = 0,179$; **Abbildung 53**). In der Cox-Regression zeigten sich jedoch überraschenderweise sowohl zytosolische als auch nukleäre H3K4me3-Expression als unabhängige prognostische Marker für das PFS (**Tabelle 28**).

Tabelle 28: Cox-Regression bezogen auf das PFS hinsichtlich histopathologischer Parameter und der H3K4me3-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Variable	Signifikanz ($p =$)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,619	1,013	0,962	1,067
pT	0,347	1,462	0,662	3,229
pN	0,785	1,172	0,374	3,671
Grading	0,183	1,476	0,832	2,620
FIGO-Stadium	0,165	1,929	0,762	4,880
H3K4me3 cyt (IRS ≤ 6 vs. IRS > 6)	0,046	0,390	0,155	0,985
H3K4me3 nuc (IRS ≤ 6 vs. IRS > 6)	0,007	3,966	1,460	10,770

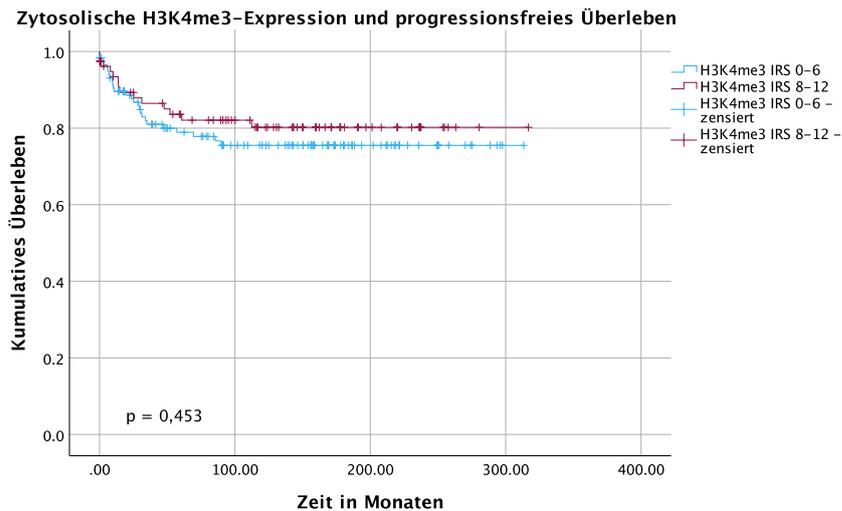


Abbildung 52: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf H3K4me3 cyt im Endometriumkarzinom: Niedrige zytoplasmatische H3K4me3-Expression (IRS 0-6) verglichen mit höherer zytoplasmatischer H3K4me3-Expression (IRS > 6; $p = 0,453$).

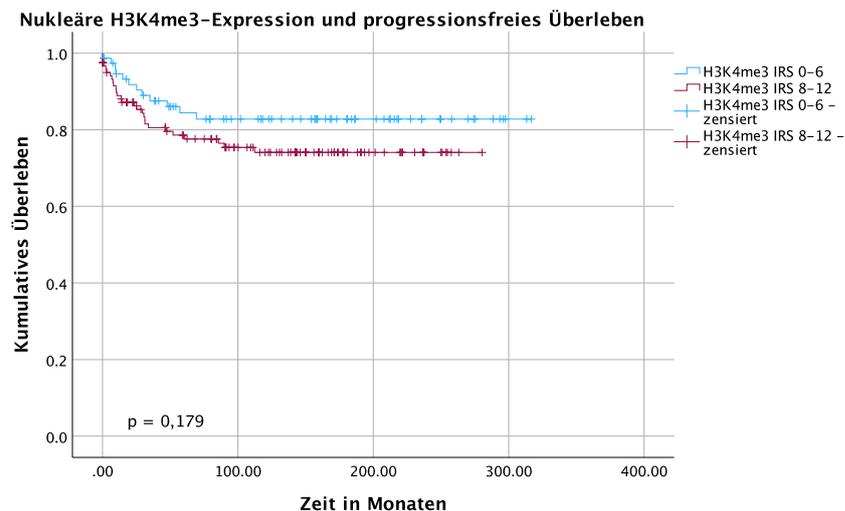


Abbildung 53: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS in Hinblick auf H3K4me3 nuc im Endometriumkarzinom: Niedrige nukleäre H3K4me3-Expression (IRS 0-6) verglichen mit höherer nukleärer H3K4me3-Expression (IRS > 6; $p = 0,179$).

3.9 Glukokortikoidrezeptor-Färbung im Endometriumkarzinom

3.9.1 Deskriptive Statistik

Die Färbung des Glukokortikoidrezeptors im Endometriumkarzinom wurde separat für das umgebende Tumor-Stroma und Tumor selbst evaluiert, wobei vorwiegend Nuclei angefärbt waren. Das Stroma konnte in 96,9% der Fälle beurteilt werden, der Tumor nur in 86,2%. Diese Diskrepanz erklärt sich durch technische Schwierigkeiten bei der Erstellung der TMAs. Insgesamt waren Stroma und Tumor nur sehr schwach angefärbt. Der mediane IRS war im Stroma 1, vertreten durch 16,4% der Proben, in den Tumoren 0 ($n = 151$; 67,1%; **Tabelle 29**).

Tabelle 29: Deskriptive Statistik der GR-Färbung im Endometriumkarzinom.

	Gültig	Fehlend	MW	Median	SD	Min	Max
GR Stroma IRS	--	--	2,25	1,00	2,719	0	12
n; %	218; 96,9%	7; 3,1%	--	177; 78,7%	--	81; 36,0%	2; 0,9%
GR Tumor IRS	--	--	0,55	0,00	1,547	0	12
n;%	194; 86,2%	28; 12,4%	--	40; 17,8%	--	151, 67,1%	2, 09%

3.9.2 Alter bei Diagnose

Auch der GR hatte weder im Stroma noch im Tumor selbst eine Korrelation zum Alter bei Diagnose. Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug in Hinblick auf Stroma-Expression und Alter 0,83 ($p = 0,224$) und bezüglich der Expression im Tumor 0,063 ($p = 0,386$).

3.9.3 TNM-Klassifikation und FIGO

Die Expression des GR im Stroma korrelierte signifikant mit dem pT-Stadium ($p = 0,009$; $\rho = -0,203$ mit $p = 0,003$; **Abbildung 54**). Tumore mit niedrigem pT-Stadium zeigten eher eine höhere GR-Expression im umgebenden Stroma (**Abbildung 55** und **Abbildung 56**). Für die tumoröse Expression konnte keine signifikante Assoziation mit dem T-Stadium detektiert werden ($p = 0,646$), ebenso wie mit pN (Stroma: $p = 0,508$; Tumor: $p = 0,412$). Es wurde keine Analyse zu der GR-Expression und dem Fernmetastasenstatus durchgeführt. Auch das FIGO-Stadium war mit der Expression des GR im Stroma assoziiert ($p = 0,013$; $\rho = -0,163$ mit $p = 0,016$, **Abbildung 57** und **Tabelle 30**). Die Expression im Tumor hatte hingegen keine Korrelation zum FIGO-Stadium ($p = 0,588$).

3.9.4 Grading

Grading und GR-Expression wiesen keine signifikante Korrelation auf. Für die Expression im Stroma betrug der p-Wert im Kruskal-Wallis-Test 0,570; für die Expression im Tumor war $p = 0,202$. Einen Überblick über die Korrelationen zwischen GR-Expression und histopathologischen Parametern zeigt **Tabelle 30**.

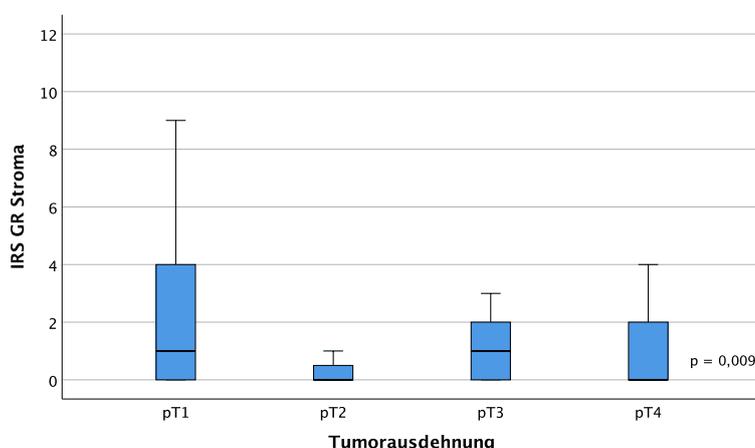


Abbildung 54: Korrelation zwischen GR-Expression im Stroma und Tumorausdehnung im Endometriumkarzinom.

Tabelle 30: Korrelationen der histopathologischen Marker mit der GR-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

	GR Stroma				GR Tumor (nukleär)			
	IRS Median (+/- SD)	%	<i>p</i> (NPAR)	<i>ρ</i> (Rho)	IRS Median (+/- SD)	%	<i>p</i> (NPAR)	<i>ρ</i> (Rho)
pT			0,009	-0,203 (<i>p</i> = 0,003)			0,646	-
T1	1 (+/- 2,72)	16,4			0 (+/- 1,55)	67,1		
T2	0 (+/- 1,65)	75,0			0 (+/- 1,05)	81,3		
T3	1 (+/- 2,37)	16,7			0 (+/-2,51)	66,7		
T4	0 (+/- 2,31)	66,7			0 (+/- 0,0)	100,0		
pN			0,508	-			0,412	-
N-	1 (+/- 2,71)	18,3			0 (+/- 1,09)	67,6		
N+	1 (+/- 2,36)	23,8			0 (+/- 2,87)	61,9		
FIGO			0,013	-0,163 (<i>p</i> = 0,016)			0,588	-
FIGO I	1 (+/- 2,84)	18,0			0 (+/- 1,40)	66,5		
FIGO II	0 (+/- 1,71)	80,0			0 (+/- 1,07)	86,7		
FIGO III	1 (+/- 2,40)	19,4			0 (+/- 2,31)	63,9		
FIGO IV	0 (+/- 2,07)	66,7			0 (+/- 0,89)	66,7		
Grading			0,570	-			0,202	-
G1	1 (+/- 2,67)	35,4			0 (+/-1,00)	70,9		
G2	1 (+/- 2,93)	16,9			0 (+/-2,23)	61,0		
G3	1 (+/- 2,16)	15,0			0 (+/- 1,06)	70,0		

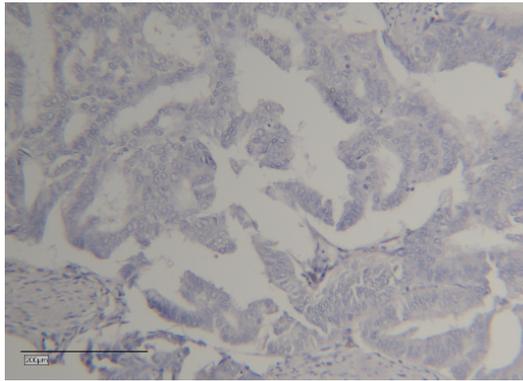


Abbildung 55: pT4-Endometriumkarzinom mit niedriger GR-Expression im Stroma (IRS = 0).

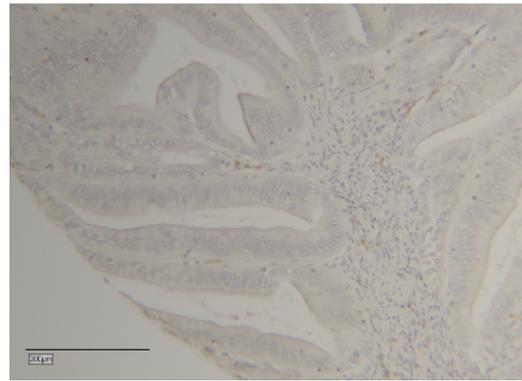


Abbildung 56: pT1-Tumor mit höherer GR-Expression im Stroma (IRS = 3).

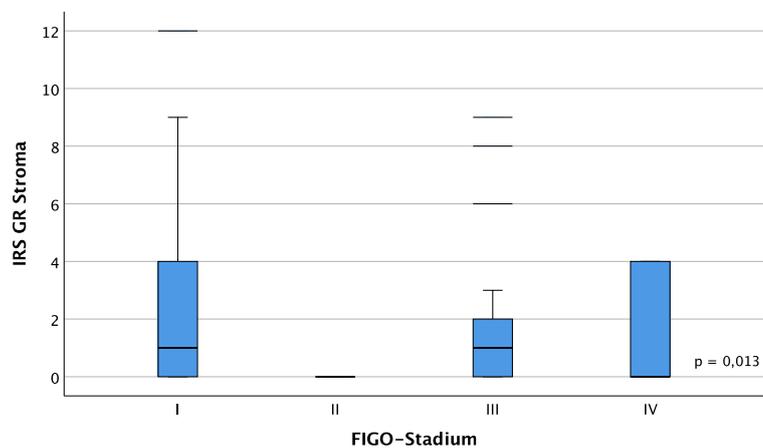


Abbildung 57: Korrelation zwischen Glukokortikoidrezeptor-Expression im Stroma und FIGO-Stadium im Endometriumkarzinom.

3.9.5 Gesamtüberleben

Das OAS unterschied sich in den Gruppen mit keiner (IRS = 0) gegenüber der Gruppe mit GR-Expression im Tumor (IRS \geq 1) nicht ($\chi^2 = 0,042$ mit $p = 0,838$). Auch die GR-Expression im Stroma zeigte keinen Unterschied in den Gruppen (IRS 0-1 vs. 2-12; $\chi^2 = 0,38$ mit $p = 0,845$). Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven sind in **Abbildung 58** und **Abbildung 59** zu sehen. Die nachfolgend durchgeführte Cox-Regression identifizierte für das OAS das Alter bei Diagnose ($p < 0,001$) und das Grading ($p = 0,043$) als unabhängigen prognostischen Parameter (**Tabelle 31**).

3.9.6 Progressionsfreies Überleben

Es konnte keine Auswirkung der GR-Expression im Tumor oder Stroma auf das RFS beobachtet werden (Tumor: $\chi^2 = 2,083$; $p = 0,149$; Stroma: $\chi^2 = 1,884$; $p = 0,170$; **Abbildung 60** und **61**). Das PFS wurde unabhängig durch Lymphknotenstatus ($p = 0,049$) und FIGO-Stadium ($p = 0,004$) bestimmt. Keiner der in der Cox-Regression getesteten Parameter zeigten sich als unabhängige prognostische Faktoren für das PFS (siehe **Tabelle 32**).

Tabelle 31: Cox-Regression bezogen auf das Gesamtüberleben hinsichtlich histopathologischen Parametern und der GR-Expression im Endometriumkarzinom. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Variable	Signifikanz (p =)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	< 0,001	1,083	1,046	1,120
pT	0,250	1,542	0,737	3,224
pN	0,215	1,786	0,714	4,464
Grading	0,043	1,495	1,013	2,206
FIGO-Stadium	0,812	0,907	0,406	2,027
GR Stroma (IRS ≤1 vs. IRS > 1)	0,789	0,924	0,519	1,647
GR Tumor (IRS 0 vs. IRS ≥ 1)	0,491	0,786	0,396	1,560

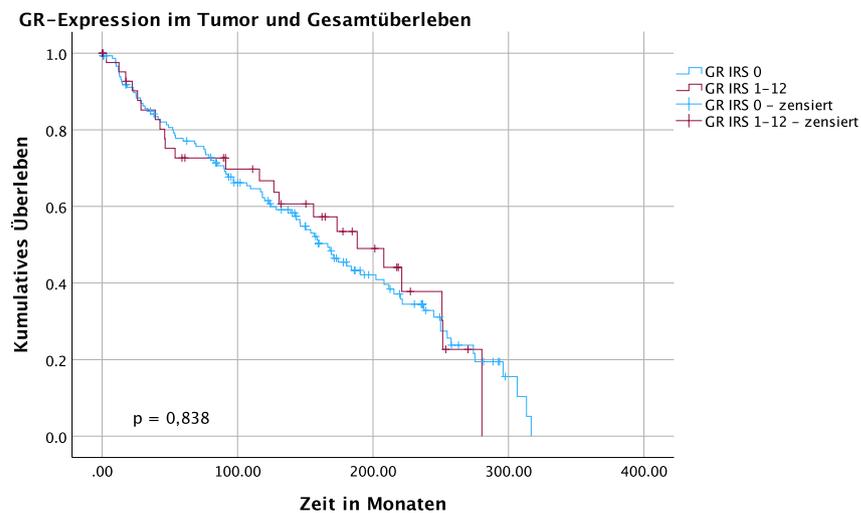


Abbildung 58: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf die GR-Expression im Endometriumkarzinom: Keine tumoröse GR-Expression (IRS 0) verglichen mit tumoröse GR-Expression (IRS ≥ 1) bezüglich des OAS (p = 0,838).

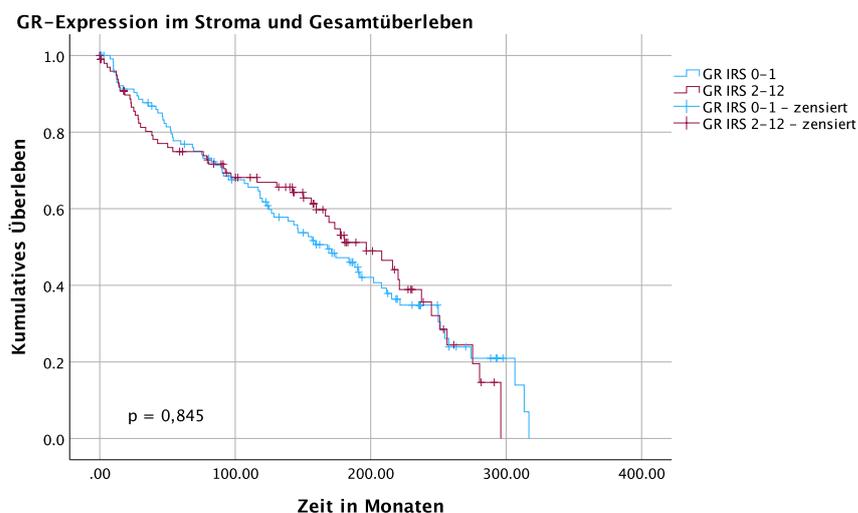


Abbildung 59: Kaplan-Meier-Analyse für das OAS in Hinblick auf die GR-Expression im Stroma: Niedrige (IRS < 2) verglichen mit hoher GR-Expression (IRS ≥ 2) bezüglich des OAS (p = 0,845).

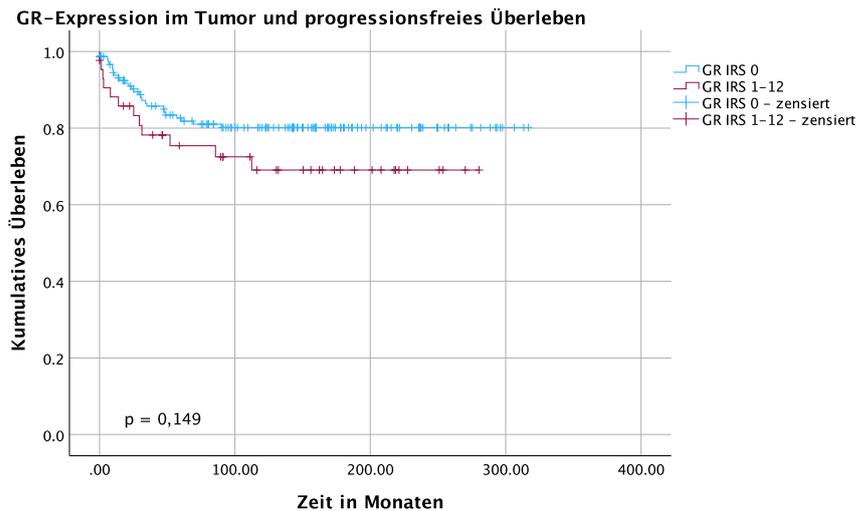


Abbildung 60: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS und GR-Expression im Endometriumkarzinom: Keine tumoröse GR-Expression (IRS 0) verglichen mit tumoröser GR-Expression (IRS ≥ 1) bezüglich des PFS ($p = 0,149$).

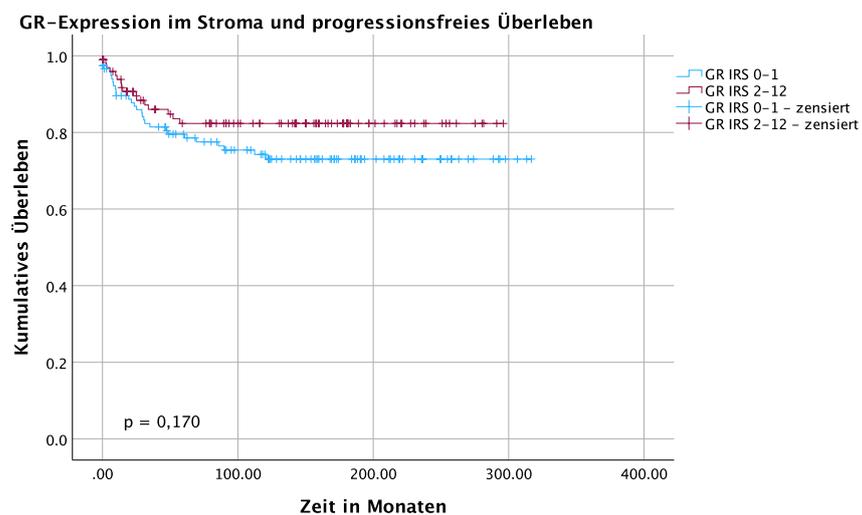


Abbildung 61: Kaplan-Meier-Analyse für das PFS und GR-Expression im Stroma des Endometriumkarzinoms: Niedrige GR-Expression (IRS 0-1) verglichen mit hoher GR-Expression im Stroma (IRS ≥ 2) bezüglich des RFS ($p = 0,170$).

Tabelle 32: Cox-Regression bezogen auf das PFS hinsichtlich histopathologischer Parametern und der GR-Expression im Endometriumkarzinom.

Variable	Signifikanz ($p =$)	Hazard Ratio of Exp(B)	Lower 95% CI of Exp(B)	Upper 95% CI of Exp(B)
Alter bei Diagnose	0,203	1,036	0,981	1,093
pT	0,546	1,301	0,554	3,056
pN	0,969	1,025	0,291	3,604
Grading	0,316	1,368	0,741	2,525
FIGO-Stadium	0,165	2,018	0,749	5,435
GR Stroma (IRS ≤ 1 vs. IRS > 1)	0,136	0,458	0,164	1,279
GR Tumor (IRS 0 vs. IRS ≥ 1)	0,265	1,789	0,641	5,043

4 Diskussion

In dieser Dissertation wurde die Expression von Gal-8 und -9 im Zervixkarzinom und von Gal-8, Gal-9, H3K4me3 und H3K9ac sowie dem GR im Endometriumkarzinom immunhistochemisch untersucht und mit histopathologischen und klinischen Daten korreliert. Obwohl die erwähnten Proteine in anderen Tumoreititäten sowohl hinsichtlich ihres prognostischen als auch ihres diagnostischen und therapeutischen Wertes teilweise sehr umfassend untersucht wurden, ist die Datenlage zu deren Relevanz im Zervix- und Endometriumkarzinom begrenzt. Ziel der Arbeit war eine Evaluation des Stellenwertes von Gal-8 und -9, GR und der Histonmodifikationen als mögliche prognostische Marker. Nachfolgend werden die Ergebnisse unter Einbezug bereits publizierter Forschungsergebnisse diskutiert.

4.1 Galektin-8 als prognostischer Marker für Patientinnen mit Zervix- oder Endometriumkarzinom

Die Entstehung von Tumoren geht einher mit einem stark veränderten Glykosylierungsmuster der Zellen. Galektine können durch die Erkennung dieser Glykokonjugate Signalwege aktivieren [7]. Gal-8 wurde 1996 erstmals als Tumormarker im Prostatakarzinom (PTCA-1) identifiziert und seither in verschiedenen Neoplasien als prognostischer Faktor untersucht [232]. Im Zervix- und Endometriumkarzinom wurden bis dato vor allem Gal-1,-3, und -7 erforscht [233, 234]. Es liegen jedoch bisher kaum bzw. keine publizierten Daten zur prognostischen Wertigkeit bei Gal-8 bzw. -9 vor [235].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine stärkere Gal-8-Expression im Zervixkarzinom mit einem negativen N-Status und niedrigerem FIGO-Stadium der Tumore verbunden ist. Zusätzlich korrelierte Gal-8 mit dem histologischen Subtyp. Eine erhöhte Gal-8-Expression war bei Patientinnen mit plattenepitheliales Zervixkarzinom außerdem mit einem verlängerten RFS assoziiert. Im Endometriumkarzinom war eine stärkere zytosolische Gal-8-Expression verbunden mit einem niedrigen FIGO-Stadium und Grading. Sowohl die zytosolische als auch nukleäre Expression zeigten einen positiven Einfluss auf das OAS. Patientinnen mit hoher zytosolischer Expression von Gal-8 im Tumor zeigten außerdem ein verlängertes PFS auf. Gal-8 konnte daher als positiver prognostischer Marker für Patientinnen mit Zervix- oder Endometriumkarzinom identifiziert werden.

Wie zu Beginn der Arbeit bereits beschrieben, wurden Gal-8 in der Vergangenheit häufig mit onkogenen Eigenschaften in Verbindung gebracht. So steigert beispielsweise eine hohe Expression von Gal-8 in Prostatakarzinomzellen die Metastasierungsrate, indem Zellmigration und -aggregation zunehmen und die Apoptoserate sinkt [12].

Einige Forschungsergebnisse belegen jedoch den prognostisch vorteilhaften Effekt von Gal-8. Schulz et al. untersuchten den prognostischen Wert des Lektins im Ovarialkarzinom. Hier zeigte sich eine inverse Korrelation der Gal-8-Expression mit dem Lymphknotenstatus und FIGO-Stadium. Gal-8 erwies sich als unabhängiger positiver Marker für das OAS und das krankheitsfreie Überleben [8]. In Mammakarzinomen wurde eine Abnahme der nukleären Gal-8-Expression mit höherem Grading beobachtet. Tumore mit positivem ER-Status zeigten ebenfalls eine höhere Gal-8-Expression. Außerdem war die zytosolische Gal-8-Expression in Tumoren mit HER2-positivem Status signifikant erhöht. Insgesamt wurde Gal-8 als positiver prognostischer Faktor für das OAS von Patientinnen mit Mammakarzinom identifiziert [13]. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der

hier durchgeführten Studie und deutet darauf hin, dass Gal-8 in gynäkologischen Tumoren als Tumorsuppressor fungiert.

Ein Faktor, der die vielfältigen Effekte des Lektins auf die Tumorbio­logie erklären kann, ist die subzelluläre Lokalisation. Nagy et al. beschrieben in benignem Kolongewebe sowohl eine zytosolische als auch nukleäre Expression von Gal-8, während in malignem Gewebe nur eine zytosolische Lokalisation gesehen wurde. Zudem konnte Gal-8 als extrazellulär bindendes Lektin die Zellmigration hemmen. Die Expression korrelierte invers mit der Zellproliferation [132]. Eine ähnliche Dynamik der subzellulären Lokalisation wurde auch in Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion sowie Pankreas- und hepatozellulären Karzinomen festgestellt [140, 236]. Da in den Zellmembranen des gesunden Plattenepithels Gal-8 stark exprimiert wurde, schlossen die Autoren darauf, dass ein Verlust von Gal-8 mit einem Verlust der Zellpolarität und Integrität des Zellverbandes einhergeht und so die maligne Transformation fördert [140].

Diese Ergebnisse harmonisieren mit der Beobachtung, dass eine höhere Gal-8-Expression sowohl im Zervix- als auch im Endometriumkarzinom mit einem niedrigeren Tumorstadium und einer verbesserten Prognose assoziiert ist. Es ist denkbar, dass sich die subzelluläre Lokalisation von Gal-8 während der Karzinogenese ändert und damit auch dessen Funktion in der Tumorbio­logie.

Hinzu kommen die Isoformen von Gal-8, welche auf mRNA- und Proteinebene existieren [117-119]. Bisher konnten verschiedene Effekte dieser Varianten noch nicht genügend differenziert werden, möglich wäre jedoch, dass Gal-8 auch deshalb auf verschiedene Tumoretäten und -stadien unterschiedlichen Einfluss nimmt. Um die Funktion von Gal-8 in der Tumorbio­logie noch besser verstehen und therapeutisch nutzen zu können, sind weitere, tiefergehende Studien, vor allem im Hinblick auf die Wirkweise der verschiedenen Isoformen, der subzellulären Lokalisation und verschiedener Bindungspartner, notwendig.

Zusammenfassend übt Gal-8 komplexe Effekte auf die Tumorbio­logie aus und kann sich positiv auf die Prognose onkologischer Patient*innen auswirken. Denkbar wäre, dass ein Verlust von Gal-8 in der Tumorentwicklung die maligne Entartung der Zellen fördert, indem der Zellzyklus enthemmt und die Apoptoserate gesenkt wird. Außerdem könnte es durch die Reduktion von Zellpolarität und -integrität zu einer Desorganisation des Zellverbandes und damit zu fortschreitender Invasivität des Tumors kommen. Da in dieser Arbeit nur malignes und kein gesundes Gewebe untersucht wurde, bleibt ungeklärt, ob Gal-8 einen Anteil an der initialen malignen Transformation hat oder ob die Reduktion des Lektins in Tumorzellen erst im Rahmen der Tumorprogression auftritt.

4.2 Galektin-9 als prognostischer Marker für Patientinnen mit Zervix- oder Endometriumkarzinom

Seit der Klonierung der cDNA von Gal-9 im Hodgkin-Lymphom 1997 sind eine Vielzahl an Effekten in der Zell- und Tumorbio­logie erforscht worden [142]. Auch der prognostische Wert für Tumorerkrankungen wurde bereits umfassend evaluiert. In den meisten Studien zeigte sich das tumorsuppressive Potential von Gal-9. Im Urothelkarzinom war ein Verlust der Expression von Gal-9 mit Lymphangiomas carcinomatosa, frühem Rezidiv und einem verkürzten krankheitsspezifischen Überleben assoziiert [237]. Bei Patienten mit Magen-, Mamma- und Leberzellkarzinom zeigte sich ein ähnlicher positiver Effekt von Gal-9 auf Tumorprogression und Überleben [14, 15, 238].

Die zugeschriebenen tumorsuppressiven Eigenschaften werden auch in den Ergebnissen dieser Arbeit widergespiegelt, in der Gal-9 als positiv prognostischer Faktor identifiziert werden konnte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Punt et al., in der eine Gal-9-Expression im plattenepithelialen Zervixkarzinom tendenziell mit einem verbesserten OAS verbunden war [233]. Sun et al. untersuchten Gal-9 in Proben von atypischen Hyperplasien und Endometriumkarzinomen und zeigten ebenfalls, dass die Expression von Gal-9 mit Veränderungen im frühen Tumorstadium einhergeht, konnten aber keine Aussage zum prognostischen Wert hinsichtlich des Überlebens der Patientinnen treffen [239].

Wie kann der positiv prognostische Wert von Gal-9 für die Patientinnen nun auf zellbiologischer Ebene erklärt werden? In der immunhistologischen Analyse von Mammakarzinomen zeigten vor allem Tumore, welche mit Fernmetastasen assoziiert waren, keine Gal-9-Expression. Außerdem ging eine erhöhte Gal-9-Expression mit einem signifikant längeren Fernmetastasen-freien Überleben einher. Die Transfektion von Gal-9 in MCF-7-Zellen führte zu einer Aggregation der Tumorzellen in vivo und reduzierte außerdem die Adhäsion an Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Die Autoren nahmen daher an, dass Gal-9 die Metastasierung und Tumorerinvasion durch Förderung von Zellaggregation- und Adhäsion hindert [15]. In dieser Arbeit konnte der Fernmetastasenstatus der Patientinnen aufgrund unzureichender Daten diesbezüglich nicht analysiert werden, jedoch war Gal-9 ein Marker für einen negativen Lymphknotenstatus und längeres OAS, sowohl im Zervix- als auch im Endometriumkarzinom. Dies wiederum spricht für eine verzögerte Metastasierung im Zusammenhang mit Gal-9. Interessanterweise haben die Isoformen von Gal-9 unterschiedliche Einflüsse auf die Zelladhäsion. Eine transiente Expression von Gal-9-L in Kolonkarzinomzellen führte zu einer verringerten, die Expression von Gal-9-M und -S jedoch zu einer gesteigerten E-Selectin-Expression [240]. Die Splicingvarianten von Gal-9 haben auch differenzierte Effekte auf die endotheliale Funktion, Proliferation und Migration, wie sie in der Angiogenese von Bedeutung ist. Insgesamt bewirken aber alle Gal-9-Isoformen eine Inhibition der Angiogenese in vivo [241]. Ein Verlust von Gal-9 im Rahmen der Tumorprogression könnte zu einer Steigerung der tumorösen Blutversorgung führen und damit wachstumsfördernd wirken, was wiederum mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Rolle von Gal-9 als potenter Induktor der Apoptose ist eine weitere Erklärung für die tumorsuppressiven Eigenschaften. In hämatologischen Neoplasien konnte dieser Effekt ebenso nachgewiesen werden wie in soliden Tumoren [242, 243]. Über die Dysregulation der mitochondrialen Balance mit nachfolgender Ausschüttung proapoptotischer Faktoren und anschließender Aktivierung von Effektorcaspasen aktiviert Gal-9 in ösophagealen Tumorzellen den intrinsischen Weg der Apoptose. [244]. In humanen Pankreaszellen konnte Gal-9 durch die Induktion der Apoptose die Zellproliferation und das Tumorwachstum inhibieren [245].

Angesichts des positiven Effektes von Gal-9 in verschiedensten Tumorentitäten und der Ergebnisse dieser Arbeit ist anzunehmen, dass Gal-9 auch im Zervix- und Endometriumkarzinom tumorsuppressiv wirkt und daher als therapeutischer Angriffspunkt dienen könnte. Ähnlich wie bei Gal-8 gilt jedoch auch bei Gal-9: Die Diversität der Isoformen führt zu unterschiedlichen Wirkweisen in der Tumorbiologie. Dieses Phänomen muss noch weiter erforscht werden, um die diagnostische und prognostische Spezifität zu erhöhen.

4.3 Galektin-8 und -9 als diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte für Patientinnen mit Zervix- oder Endometriumkarzinom

Für die histopathologische Diagnostik können Gal-8 und -9 im Zervix- und Endometriumkarzinom als potenzielle Marker dienen, die Hinweise auf das Tumorstadium und die Prognose der Erkrankung geben. In dieser Arbeit konnten Gal-8 und -9 als positiv prognostische Faktoren für das Zervix- oder Endometriumkarzinom ermittelt werden. Andere häufig untersuchten Galektine in gynäkologischen Karzinomen zeigen im Gegensatz zu Gal-8 und -9 eher negative Auswirkungen auf die onkologische Erkrankung. Der onkogene und negativ prognostische Effekt von Gal-1 konnte sowohl für das Ovarial- als auch für das Zervix- und Endometriumkarzinom bestätigt werden [239, 246-248]. Gal-3 war im Zervixkarzinom im Vergleich zu gesundem Gewebe stärker exprimiert und korrelierte positiv mit Markern einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung sowie einem verkürzten OAS [249, 250]. Auch im Endometriumkarzinom wurde Gal-3 als negativ prognostischer Marker identifiziert [251]. In Zusammenschau der prognostischen Werte einzelner Galektine in gynäkologischen Tumoren könnte vor allem die kombinierte Untersuchung von Gal-8 und -9 mit weiteren Galektinen die diagnostische und prognostische Aussagekraft einer histopathologischen Untersuchung erhöhen.

Galektine stehen auch im Interesse als Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien in der Onkologie. Für Gal-1 und Gal-3 wurden bereits erste Therapieversuche mit spezifischen Galektininhibitoren unternommen. In Ovarialkarzinomzellen führte dies zu positiven Effekten auf Zellwachstum, -viabilität, -invasion und Chemoresistenz [252, 253]. Auch in klinischen Studien werden aktuell spezifische Gal-1- oder -3-Inhibitoren getestet, wobei diese in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil oder Checkpointinhibitoren eingesetzt werden [16]. Abschließende Ergebnisse zur Wirksamkeit sind jedoch noch ausstehend [16]. Vor allem die Interaktion von Gal-9 mit TIM-3 und anderen Rezeptoren auf Immunzellen ist ein interessantes therapeutisches Ziel, da diese Signalwege die onkogenen Effekte des Lektins vermitteln. Eine Behandlung von T-Zellen mit einem anti-Gal-9-Antikörper *in vitro* konnte die Apoptoserate reduzieren [254]. Yang et al. inhibierten daher Gal-9 und PD-L1 im Mausmodell und erzielten damit im Vergleich längere Überlebenszeiten als mit der alleinigen PD-L1-Blockade [255]. Dieses Erkenntnis steht mit dem in dieser Studie ermittelten positiv prognostischen Wert von Gal-9 im Zervix- und Endometriumkarzinom zwar im Gegensatz – es konnte jedoch gezeigt werden, dass Gal-9 durch proinflammatorische Zytokine wie $\text{INF}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ in Tumorzellen zwar vermehrt sekretiert, aber weniger zytosolisch oder nukleär exprimiert wird [255]. Dies passt wiederum mit den Ergebnissen dieser Arbeit zusammen, dass fortgeschrittene Tumore im Zytosol weniger Gal-9 exprimieren. Eine gezielte Gal-9-TIM-3-Blockade könnte also einen positiv therapeutischen Effekt vor allem auf fortgeschrittene Tumore haben. Allerdings sind bisher wenige Galektin-Inhibitoren in klinischen Studien getestet worden. Das breite Spektrum an Prozessen, auf die die Galektine Einfluss nehmen, erschwert zudem eine gezielte Therapie ohne unerwünschte Wirkungen. Daher bedarf es noch weiteren Studien, um den klinischen Nutzen und die eventuellen Nebenwirkungen genau zu evaluieren.

4.4 H3K9ac und H3K4me3 als prognostische Marker für Patientinnen mit Endometriumkarzinom

Neben der Östrogen-Abhängigkeit vieler Endometriumkarzinome gelten genetische Alterationen wie Mutationen in einzelnen Onkogenen als wichtige Faktoren, die zur

Entstehung eines Endometriumkarzinoms führen. Auch die Akkumulation epigenetischer Veränderungen können zur Kanzerogenese beitragen. Von besonderer Bedeutung sind Inaktivierungen in MMR-Genen durch eine Hypermethylierung der zugehörigen Promoterregionen mit nachfolgender MSI und vermehrten Mutationen in Tumorsuppressorgenen [256, 257]. Für das Endometriumkarzinom spielen unter anderem die Hypermethylierung der Gene hMLH1, hMSH2, APC, CHFR und CASP8 eine Rolle [256, 257].

Histonmodifikationen regulieren als epigenetischer Mechanismus die Zugänglichkeit des Chromatins und damit die Kontrolle der Transkription von Genen. Eine Dysbalance kann potenziell die maligne Transformation von Zellen und kanzerogene Mechanismen fördern [185, 189]. In dieser Arbeit wurde ein positiver Effekt von H3K9ac auf die Prognose von Patientinnen mit Endometriumkarzinom gezeigt. Sowohl Tumorausdehnung als auch Lymphknotenstatus und FIGO-Stadium standen mit einer verstärkten nukleären H3K9ac-Expression in Zusammenhang. Je höher jedoch das zytoplasmische H3K9ac-Level, desto häufiger lagen Lymphknotenmetastasen vor. Für das OAS, RFS und PFS konnte H3K9ac nicht als signifikanter prognostischer Marker identifiziert werden. H3K4me3 zeigte einen positiv prognostischen Wert: Einerseits war H3K4me3 mit einer geringen Tumorgroße sowie einem niedrigeren FIGO-Stadium assoziiert. In Hinblick auf das OAS, RFS oder PFS konnte jedoch ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit hoher und niedriger H3K4me3-Expression detektiert werden.

Die verstärkte Expression von H3K9ac wurde in der Literatur bis dato eher im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für onkologische Patient*innen beschrieben. In epithelialen Ovarialtumoren war eine Häufung von H3K9ac mit höherem Grading und Staging sowie einer schlechteren Prognose assoziiert [258]. Auch Patientinnen mit Mamma- oder Zervixkarzinomen wiesen bei höherer H3K9ac-Konzentration der Tumore eine schlechtere Prognose auf [9, 190]. Wie die H3K9ac-Modifikation, ist auch die Expression von H3K4me3 ein prognostischer Marker für Tumorpatienten. Im Ösophaguskarzinom war ein hohes Level von H3K4me3 mit einer verstärkten Zellproliferation, -invasion und Metastasierung assoziiert, einhergehend mit höherem Tumorstadium und kürzerem Fünf-Jahres-Überleben [259]. Eine Untersuchung von H3K4me3 im Kolonkarzinom identifizierte H3K4me3 als vorteilhaft bezüglich Lymphknoten- und Fernmetastasierung sowie dem OAS [260]. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Endometriumkarzinome mit verstärkter H3K4me3-Expression ein niedrigeres Stadium aufweisen. Patientinnen mit Zervixkarzinom und hoher Expression von H3K4me3 hatten ein höheres T-Stadium sowie eine schlechtere Prognose [190]. Jedoch unterscheiden sich Zervix- und Endometriumkarzinom in Karzinogenese und Tumorbiologie, sodass eine unterschiedliche Wirkung von einzelnen Histonmodifikationen durchaus plausibel ist.

Qing et al. führten eine immunhistochemische Analyse von H3K27me3, H3K4me2 und H3K4me3 in gesunden Endometriumproben, präkanzerösen Vorstufen und Endometriumkarzinomen durch. Hier war H3K4me3 im glandulären Epithel in Karzinomen sowohl im Vergleich zu normalen Endometrium als auch zu präkanzerösen Läsionen verstärkt exprimiert. Jedoch konnten keine signifikanten Korrelationen mit den untersuchten histopathologischen Parametern gefunden werden [261]. In der vorliegenden Arbeit war eine höhere Expression von H3K4me3 mit einem niedrigeren Tumorstadium assoziiert, was zunächst konträr zu den Ergebnissen von Qing et al. zu sein scheint. Allerdings ist es denkbar, dass H3K4me3 zu Beginn der Kanzerogenese verstärkt exprimiert wird und die Expression mit dem Tumorprogress abnimmt. Außerdem wurde in der hier vorliegenden Arbeit kein gesundes Gewebe untersucht, sodass ein Vergleich mit den Expressionslevel der Karzinome nicht möglich war.

Eine Häufung von H3K9ac und H3K4me3 an den Promotern kann sich tumorsuppressiv auswirken, wenn die Überexpression an einem entsprechenden Gen lokalisiert ist. Eine Arbeit von Chen et al. zeigte mithilfe einer genomweiten epigenetischen Analyse von über 8200 Tumorproben, dass eine Anreicherung von H3K4me3 über eine besonders lange Strecke (> 4 Kilobasenpaare) vor allem an Tumorsuppressorgenen zu finden ist. Eine Abnahme von H3K4me3 an Tumorsuppressoren in Krebszellen ist mit einer reduzierten Expression assoziiert. Die gehäufte und breite Verteilung von H3K4me3 konnte als epigenetische Signatur zur Lokalisierung von Tumorsuppressorgenen genutzt werden [262]. Diese Ergebnisse passen als molekularbiologisches Korrelat zu den Erkenntnissen, die in dieser Dissertation gewonnen werden konnten.

In vitro wurde das Level von H3K9ac und H3K4me3 am Promoter durch Behandlung der Zellen mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A und einem demethylierenden Agens hochreguliert. Dies führte zu einer gesteigerten Transkription des Tumorsuppressorgens D-glucoronoyl C5-epimerase (GLCE) [17]. Das GLCE-Gen wird in einigen Tumortypen, unter anderem dem Mamma- und Lungenkarzinom, unterexprimiert [17]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das GLCE-Gen im Endometriumkarzinom im Vergleich zum gesunden Gewebe ebenfalls reduziert exprimiert wird und Patientinnen mit einer höheren Expression von GLCE eine bessere Prognose aufweisen [18]. Auch das tumorsuppressive Retinoblastoma-Interacting Zinc Finger Gen (RIZ1) unterliegt einer epigenetischen Kontrolle und wird im Endometriumkarzinom vermindert exprimiert [20]. Höhere nukleäre Level von H3K9ac und H3K4me3 könnten zu einer Aktivierung von Tumorsuppressorgenen führen, was die Korrelation mit einem niedrigerem Tumorstadium, so wie es in dieser Arbeit gezeigt wurde, erklären kann. Im Kontrast dazu steht die Annahme, dass die zytosolische Expression von H3K9ac mit einem positiven Lymphknotenstatus assoziiert ist. Es ist bekannt, dass neu synthetisierte Histone noch im Zytoplasma acetyliert und anschließend in den Nukleus importiert werden. Wie diese genau im Zytoplasma agieren, ist jedoch bisher ungeklärt [263].

H3K9ac beeinflusst jedoch nicht nur die Transkription, sondern steht auch im Zusammenhang mit DNA-Schäden. Tjeertes et al. zeigten, dass das globale Level von H3K9ac mit dem Auftreten von geschädigter DNA sowohl an zellzyklusregulierenden als auch anderen aktiven Genen abnimmt [21]. In der Entstehung des Endometriumkarzinoms spielen unter anderen Mutationen in DNA-Reparaturgenen wie MSH2 oder MLH1 eine Schlüsselrolle. Mikrosatelliten-Instabilität, Aneuploidie und DNA-Schäden in Kombination mit gestörten Reparaturmechanismen sind bedeutsame Faktoren, die sich auch in der Einteilung des Endometriumkarzinoms durch den Cancer Genome Atlas widerspiegeln [88]. Eine Erniedrigung von H3K9ac kann ein Hinweis auf DNA-Schädigungen, Mutationen in Reparaturgenen sowie Mikrosatelliteninstabilität sein [22]. Auch H3K4me3 wurde mit einer DNA-Damage-Response in Verbindung gebracht. So konnte an einer HCT116-Zelllinie gezeigt werden, dass sich H3K4me3 als Antwort auf eine DNA-Schädigung am Promoter des Cyclinkinase-Inhibitors p21 anreichert [264]. Die Ergebnisse dieser Arbeit harmonisieren mit diesen Erkenntnissen insofern, dass höhere Level von H3K4me3 nuc und H3K9ac nuc mit niedrigerem Tumor- und FIGO-Stadium sowie Lymphknotenstatus einhergehen. Wenn diese Histonmodifikationen in aggressiveren Tumoren weniger stark exprimiert werden, so kann dies auf Mikrosatelliteninstabilität oder geschädigte DNA hindeuten. Die immunhistochemische Evaluation von H3K4me3 und insbesondere H3K9ac könnte das bisher angewandte diagnostische Panel in der Diagnostik des Endometriumkarzinoms daher ergänzen [22].

Insgesamt bleibt die Rolle von H3K9ac und H3K4me3 im Endometriumkarzinom weiter zu evaluieren. Zum einen, weil diese aktivierenden Modifikationen sowohl für eine Überexpression von Onko- als auch Tumorsuppressorgenen verantwortlich sein können.

Hinzu kommt, dass die für die Karzinogenese relevanten Gene nicht durch eine einzige Histonmodifikation, sondern von einer ganzen epigenetischen Maschinerie kontrolliert werden. Zu dieser zählt unter anderem die Gesamtheit des Histon-Codes inklusive repressiver und aktiver Histonmodifikationen sowie DNA-Methylierungen. Ein limitierender Faktor in dieser Arbeit ist zudem, dass ausschließlich endometrioides Endometriumkarzinome untersucht wurden. Eine Analyse des Stellenwertes von H3K9ac und H3K4me3 in nicht-endometrioiden Endometriumkarzinomen wäre ebenfalls interessant.

4.5 H3K9ac und H3K4me3 als therapeutische Ansatzpunkte für Patientinnen mit Endometriumkarzinom

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bezüglich einer verbesserten Prognose bei erhöhter H3K9ac-Expression stützen bereits bekannte Ergebnisse der therapeutischen Wirksamkeit von HDAC-Inhibitoren (HDACi) im Endometriumkarzinom. Die Wirkung von HDACi wurde in zahlreichen Tumorentitäten erforscht [265]. HDACi steigern die Histonacetylierung in Zellen und können so einen Zellzyklusarrest, mitotischen Zelltod, Apoptose und Zelldifferenzierung bewirken sowie Angiogenese und Wachstum inhibieren. Die Behandlung von Kolonkarzinomzellen mit einer Kombination der HDACi Valproinsäure und Vorinostat führte zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums und einer Steigerung der Apoptoserate [266]. Vorinostat wurde bereits 2006 von der FDA für die Therapie des fortgeschrittenen kutanen T-Zell-Lymphom zugelassen [267], darauf folgte die Zulassung von Romidepsin, Belinostat und Panobinostat für bestimmte hämatologische Neoplasien [268-270]. Für solide Tumore befinden sich HDACi noch in klinischen Studien [271].

Verschiedene anti-kanzerogene Effekte der HDACi wurden *in vitro* in Endometriumkarzinom-Zelllinien nachgewiesen. Acetyliertes H3 und H4, sowie p21 und E-Cadherin wurden nach der Behandlung mit HDACi vermehrt exprimiert und zellzyklustreibende Elemente wie Cyclin A und CKD2 gesenkt [272]. Vorinostat bewirkte apoptotische und antiproliferative Effekte in Endometriumkarzinomzellen, außerdem eine Inhibition der Zellzyklusprogression, Zellmigration und Koloniebildung [272]. Besonders von Bedeutung für hormonabhängige Typ-I-Endometriumkarzinome ist die Wirkung von Natriumbutyrat auf den Östrogenrezeptor (ER) α , dessen Transkription durch diesen HDACi inhibiert wird [273]. Ebenso konnten im Endometriumkarzinom *in vitro* durch die Behandlung Valproat, Panobinostat, Trichostatin A weitere positive Effekte auf die Östrogen- oder Progesteronrezeptoren (PR) im Sinne einer nachfolgenden Wachstumsinhibition gezeigt werden. Insbesondere in Kombination mit anderen Therapeutika scheinen HDACi vielversprechende positive Effekte für Patientinnen mit Endometriumkarzinom zu haben. *In vitro* führte die kombinierte Anwendung von Trichostatin A mit einem DNA-Methyltransferase-Inhibitor zu einer Hochregulation der PR β -Expression und die synergistische Behandlung mit Paclitaxel stimulierte die Apoptose [274]. Weiterhin können HDACi die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber einer Strahlentherapie erhöhen [275, 276]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass fortgeschrittene Tumore weniger H3K9ac exprimieren als Tumore in einem niedrigeren Stadium. Dies weist darauf hin, dass Patientinnen von einer Behandlung mit HDACi profitieren könnten.

In Tumore ist die Balance zwischen KDM und KMT häufig gestört. Eine gesteigerte LSD1-Expression in einem murinen Leukämiemodell potenzierte die Transkription des Onkogens Myc und assoziierten embryonischen Stammzellgenen. Die Überexpression von

KDM5B führte zu einer Suppression von Genom-stabilisierenden Genen wie BRCA1. KDM sind also vielversprechende therapeutische Zielpunkte [277]. Lysin-Demethylase-Inhibitoren (KDMi) wirken analog den HDACi und haben zum Ziel, das Gleichgewicht der Methylierung und Demethylierung in Krebszellen wiederherzustellen. Der Fokus der bisherigen Forschung lag auf Inhibitoren von LSD1. Spezifische LSD1-Inhibitoren konnten die Proliferation von Zervix- und Kolonkarzinomzellen mindern und das Überleben von Mäusen mit Promyelozytenleukämie verlängern [278, 279].

In Bezug auf den hier untersuchten Marker H3K4me3 sind vor allem Inhibitoren der KDM5A-D und NO66 interessant, da diese Proteine H3K4me3 als Substrat demethylieren können [199, 280]. KDM5A zeigt erhöhte Expressionslevel und eine Beteiligung an Angiogenese, Metastasierung, Proliferation und Chemoresistenz in verschiedenen Tumoren, so zum Beispiel im Mamma- und Ovarialkarzinom [281]. NO66 interagiert mit dem onkogenen Transkriptionsfaktor MYC und ist im nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom überexprimiert [282]. Es wurden bereits Inhibitoren von KDM5A-D entwickelt, welche in vitro antikanzerogene Effekte zeigten. JARID1B (KDM5B) wurde im Mausmodell inhibiert, was zu höheren Leveln von H3K4me3 und einer Wachstumsreduktion der Krebszellen führte [283]. In dieser Arbeit waren höhere H3K4me3-Level im Endometriumkarzinom ebenfalls mit einem niedrigerem Tumorstadium assoziiert, was darauf hindeutet, dass eine Steigerung von H3K4me3 durch KDMi auch im Endometriumkarzinom von Vorteil sein könnte.

Die Wirkungsmechanismen von KDM sind ebenso wie die der HDAC komplex und noch nicht vollständig geklärt. HDACi sind anti-kanzerogene Agenzien, die auf zahlreichen Ebenen in das Tumorgeschehen eingreifen und das aktuell angewandte Therapieregime beim Endometriumkarzinom ergänzen könnten. Trotz vielversprechender Ergebnisse von KDMi in vitro und in Mausmodellen gibt es zum heutigen Zeitpunkt aufgrund von hoher Toxizität und schlechter Selektivität noch keine Anwendung in klinischen Studien [281]. Vor allem Patientinnen mit fortgeschrittenen Karzinomen, welche zusätzlich zur Hysterektomie mit Chemo- und Radiotherapie behandelt werden, könnten aufgrund der oben genannten Erkenntnisse von einer Therapie mit HDACi und eventuell auch KDMi profitieren. In diesem Zusammenhang könnten H3K9ac und H3K4me3 als histopathologische Marker dienen, da reduzierte H3K9ac- und H3K4me3-Level mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind und auf einen möglichen Nutzen einer Therapie mit KDMi und HDACi hindeuten könnten.

4.6 Der Glukokortikoidrezeptor als prognostischer Marker für Patientinnen mit Endometriumkarzinom

Der GR ist in zusammen mit seinen Liganden an der Regulation physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt und spielt in Tumoren eine wichtige Rolle bei der Regulation von Apoptose, Invasivität, Migration, Angiogenese und Proliferation [202]. Insbesondere für hormon-abhängige Tumoren ist der GR und seine Aktivität von Bedeutung, da er mit den anderen Rezeptoren seiner Familie interagiert und diese sich gegenseitig regulieren können [208]. Eine Interaktion des ER mit dem GR wurde auch für das Endometriumkarzinom beschrieben [28]. In soliden Tumoren ist die Rolle des GR noch nicht eindeutig geklärt und ist abhängig von Entität, Kontext und Behandlung. Im ER α -positiven Mammakarzinom scheint der GR die Tumorphiliferation durch Inhibition von Wachstumsfaktoren und Interaktion mit dem ER zu reduzieren und war assoziiert mit einem niedrigen Tumorstadium sowie -grading [27, 284]. Auch in weiteren Tumorentitäten ist die Expression des GR ein positiver Faktor für Patient*innen. Niedrige GR-

Expressionslevel sind beispielsweise im Blasenkarzinom ein Marker für ein schlechtes Outcome [285]. Ähnliche Effekte konnten für das Zervixkarzinom gezeigt werden, in dem höhere GR-Expressionslevel mit niedrigem Staging und längerem Überleben einhergingen [221].

Da das tumorumgebende Stroma bzw. Tumormicroenvironment bedeutsam für die Tumorentwicklung und -dynamik ist, wurde in dieser Arbeit sowohl die GR-Expression im Tumor als auch im Stroma analysiert. Insgesamt zeigte sich eine sehr schwache bis keine Expression mit einem medianen IRS im Stroma von 1 und im Tumor von 0. Die Tumorausdehnung pT und das FIGO-Stadium korrelierten invers mit der GR-Expression im Stroma. Die GR-Expression im Stroma konnte also als prognostisch positiver Marker für das Endometriumkarzinom identifiziert werden. Die nukleäre GR-Expression korrelierte nicht mit einem der geprüften Parameter oder dem Gesamt- und rezidivfreiem Überleben. Vahrenkamp et al. zeigten jedoch, dass die GR-Expression mit einem verschlechterten Outcome und höhergradigen endometrioiden Endometriumkarzinomen assoziiert ist. Die Autoren postulierten, dass die Expression von GR vor allem in Tumoren mit hoher ER-Expression die Aggressivität steigert [28]. Tangen et al. beschrieben einen Effekt des GR auf das Endometriumkarzinom in eine ähnliche Richtung. Eine erhöhte GR-Expression war ein Marker für eine aggressivere Erkrankung mit signifikant verschlechtertem Überleben, jedoch vor allem für Patientinnen mit nicht-endometrioiden, Hormonrezeptor-negativen Karzinomen [286]. Die bisher postulierte negative Wirkung des GR für Patientinnen mit Endometriumkarzinom konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In beiden oben genannten Studien wurde aber ausschließlich die nukleäre Expression des GR im Tumor, nicht jedoch im tumorumgebenden Stroma untersucht, was die divergierenden Effekte erklären könnte.

Die hier beobachtete niedrige Expression von GR passt wiederum zu den Ergebnissen von Tangen et al., welche in endometrioiden Adenokarzinomen eine deutlich niedrigere Expression als in nicht-endometrioiden Tumoren beschrieben [286]. Auch in einer weiteren Studie, die 20 verschiedene solide Tumortypen immunhistochemisch untersuchte, wurden die Färbintensität des GR in Endometriumkarzinomproben als sehr niedrig beschrieben, jedoch ohne genauer auf histologische Subtypen einzugehen [287]. Bamberger et al. beschrieben ebenso, dass der GR in normalen Endometriumproben hauptsächlich im umgebenden Stroma, jedoch nicht im glandulären Kompartiment exprimiert sei [288].

In den letzten Jahren ist das peritumoröse Stroma im Hinblick auf immunologische und parakrine Funktionen als wichtiger Faktor in der Entstehung und Progression auch von Endometriumkarzinomen immer mehr in den Fokus gerückt. Der GR spielt eine wichtige Rolle in der Antwort des Tumors auf das umgebende Microenvironment und scheint in soliden Tumoren unter anderem an der Entstehung von Chemoresistenzen beteiligt zu sein [289]. Die Expression des GR wurde in tumorumgebenden Fibroblasten (cancer-associated fibroblasts, CAF) im Mammakarzinom untersucht. Dort zeigte sich eine positive Korrelation mit dem Tumorgrading und Ki-67-Index und die Häufigkeit der GR-positiven CAF unterschied sich in den verschiedenen histologischen Subtypen [290]. Eine Studie an CAF im Kolonkarzinom zeigte, dass die Modulation des GR durch die Behandlung mit Dexamethason die Expression von onkogenen Faktoren in den CAF supprimierte. So wurde beispielsweise die Sekretion von Matrix-metalloproteinase-2 reduziert, die Proliferation und Invasivität der Karzinomzellen nahm ab [30]. Weiterhin wurden mit der Signaltransduktion des aktiven GR auch anti-angiogene Eigenschaften in Verbindung gebracht [291]. Trotz der eher pro-karzinogenen Wirkung, die dem GR in soliden Tumoren in der Literatur zugeschrieben wird, sind diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass der GR im Stroma einen vorteilhaften Effekt im Sinne eines Tumorsuppressors ausüben kann, was mit dem ermittelten positiv prognostischen Wert des GR in dieser Arbeit zusammenpasst.

Die Effekte des GR auf tumorbiologischer Ebene sind mannigfaltig und werden weiterhin kontrovers diskutiert. Zum einen ist der GR in einigen Tumorentitäten als positiv prognostischer Faktor identifiziert worden, wie auch in dieser Arbeit, und scheint tumorsuppressive Eigenschaften zu haben. Andererseits wurden onkogene Prozesse beschrieben [219]. Diese Ambivalenz lässt sich unter anderem mit den vielen verschiedenen Formen erklären, in denen der GR agiert. Zum einen gibt es, wie in der Einleitung erwähnt, verschiedene Isoformen des GR, andererseits scheint auch die subzelluläre Lokalisation eine Rolle zu spielen. So kann der zytosolische GR durch eine Translokation in den Nucleus dort genomische Effekte ausüben, non-genomische Effekte werden hingegen durch zwei verschiedene membranständige GR bewirkt [292]. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die nukleäre Expression von GR evaluiert, da eine zytoplasmatische und membranöse Expression nicht erkennbar war. Weiterhin wurden in diesem Kollektiv ausschließlich endometrioiden Adenokarzinome von überwiegend niedrigem Tumorstadium und Grading untersucht. Zudem war die GR-Expression sowohl im Stroma als auch im Tumor sehr niedrig ausgeprägt, sodass der hier ermittelte prognostische Wert kritisch betrachtet werden muss.

4.7 Der Glukokortikoidrezeptor als therapeutischer Ansatzpunkt für Patientinnen mit Endometriumkarzinom

Trotzdem ergibt sich angesichts des positiv prognostischen Wertes einer erhöhten GR-Expression im tumor-assoziierten Stroma die Frage nach einer möglichen therapeutischen Wirksamkeit von applizierten GC bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom. Die Aktivierung des GR durch synthetische GC stellt in der Behandlung von vor allem hämatologischen Neoplasien, wie bereits erwähnt, eine wichtige Therapiesäule dar [293]. Auch wenn die Effekte des GR in soliden Tumoren nicht eindeutig in eine Richtung weisen, so konnte eine tumorsuppressive Wirkung durch die Applikation von GC beispielsweise für das Mamma-, Pankreas-, und Bronchialkarzinom gezeigt werden [219]. Der GR im gesunden Endometrium scheint die Wirkung des ER α zu antagonisieren, was sich durch eine Reduktion des Uteruswachstums bei Applikation von Dexamethason zeigt [294]. Eine Behandlung von Ishikawa-Zellen mit Dexamethason führte zur Hochregulation einer Reihe von Genen, die für die Tumorsuppression verantwortlich sind, so zum Beispiel der antiproliferative Faktor USF-2 und N-Cadherin [29]. Die genaue Wirkung von GC auf das Endometriumkarzinom bleibt weiterhin ungeklärt. Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit wäre es von besonderem Interesse zu eruieren, inwieweit GC Prozesse im Tumorstroma beeinflussen und wie sich dies wiederum auf den Tumor selbst auswirkt. Zusammenfassend ist der GR ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt. In der Onkologie werden selektive Glukokortikoidrezeptoragonisten und -modulatoren bereits mit dem Ziel eingesetzt, nur spezifische Signalwege, die für die Tumorsuppression von Vorteil sein können, zu aktivieren und GC-induzierte Nebenwirkungen, wie eine Chemoresistenz, zu reduzieren [295]. Womöglich könnten diese auch für Patientinnen mit Endometriumkarzinom eine sinnvolle Therapieergänzung sein.

Literaturverzeichnis

1. Sung, H., et al., *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2021.
2. Arbyn, M., et al., *Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis*. Lancet Glob Health, 2020. **8**(2): p. e191-e203.
3. Robert-Koch.Institut. *Krebsregisterdaten Gebärmutterhalskrebs*. 2023 07.12.2023 [cited 2023 30.12.2023]; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2023/kid_2023_c53_gebaermutterhals.pdf?blob=publicationFile.
4. Robert-Koch.Institut. *Krebs in Deutschland - Gebärmutterkörperkrebs*. Krebsregisterdaten 2023 07.12.2023 [cited 2023 30.12.2023].
5. Jemal, A., et al., *Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival*. J Natl Cancer Inst, 2017. **109**(9).
6. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2020*. CA Cancer J Clin, 2020. **70**(1): p. 7-30.
7. Girotti, M.R., et al., *Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression*. J Exp Med, 2020. **217**(2).
8. Schulz, H., et al., *Overall Survival of Ovarian Cancer Patients Is Determined by Expression of Galectins-8 and -9*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
9. Berger, L., et al., *Expression of H3K4me3 and H3K9ac in breast cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2020. **146**(8): p. 2017-2027.
10. Pan, D., M. Kocherginsky, and S.D. Conzen, *Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(20): p. 6360-70.
11. Beyer, S., et al., *Galectin-8 and -9 as prognostic factors for cervical cancer*. Arch Gynecol Obstet, 2022.
12. Gentilini, L.D., et al., *Stable and high expression of Galectin-8 tightly controls metastatic progression of prostate cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(27): p. 44654-44668.
13. Trebo, A., et al., *High Galectin-7 and Low Galectin-8 Expression and the Combination of both are Negative Prognosticators for Breast Cancer Patients*. Cancers (Basel), 2020. **12**(4).
14. Choi, S.I., et al., *Prognostic value of tumoral expression of galectin-9 in gastric cancer*. Turk J Gastroenterol, 2017. **28**(3): p. 166-170.
15. Yamauchi, A., et al., *Galectin-9, a novel prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer*. Breast J, 2006. **12**(5 Suppl 2): p. S196-200.
16. *ClinicalTrials.gov*. 20. Oktober 2021]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=galectin+inhibitors&cntry=&state=&city=&dist=>.
17. Mostovich, L.A., et al., *The TCF4/ β -catenin pathway and chromatin structure cooperate to regulate D-glucuronyl C5-epimerase expression in breast cancer*. Epigenetics, 2012. **7**(8): p. 930-9.
18. Li, Y., et al., *LncRNA MONC suppresses the malignant phenotype of Endometrial Cancer Stem Cells and Endometrial Carcinoma Cells by regulating the MiR-636/GLCE axis*. Cancer Cell Int, 2021. **21**(1): p. 331.
19. Zhang, C., et al., *Epigenetic inactivation of the tumor suppressor gene RIZ1 in hepatocellular carcinoma involves both DNA methylation and histone modifications*. J Hepatol, 2010. **53**(5): p. 889-95.
20. Yang, T., et al., *RIZ1 is regulated by estrogen and suppresses tumor progression in endometrial cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **489**(2): p. 96-102.
21. Tjeertes, J.V., K.M. Miller, and S.P. Jackson, *Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells*. Embo j, 2009. **28**(13): p. 1878-89.
22. Yen, Y.T., et al., *Protein phosphatase 2A inactivation induces microsatellite instability, neoantigen production and immune response*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 7297.
23. McKenna, N.J., R.B. Lanz, and B.W. O'Malley, *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 321-44.

24. Surjit, M., et al., *Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor*. Cell, 2011. **145**(2): p. 224-41.
25. Panettieri, R.A., et al., *Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View*. Trends Pharmacol Sci, 2019. **40**(1): p. 38-49.
26. Xie, N., et al., *The expression of glucocorticoid receptor is negatively regulated by active androgen receptor signaling in prostate tumors*. Int J Cancer, 2015. **136**(4): p. E27-38.
27. Abduljabbar, R., et al., *Clinical and biological significance of glucocorticoid receptor (GR) expression in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **150**(2): p. 335-46.
28. Vahrenkamp, J.M., et al., *Clinical and Genomic Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Estrogen Receptor alpha In Endometrial Cancer*. Cell Rep, 2018. **22**(11): p. 2995-3005.
29. Davies, S., et al., *Gene regulation profiles by progesterone and dexamethasone in human endometrial cancer Ishikawa H cells*. Gynecol Oncol, 2006. **101**(1): p. 62-70.
30. Drebert, Z., et al., *Glucocorticoids indirectly decrease colon cancer cell proliferation and invasion via effects on cancer-associated fibroblasts*. Exp Cell Res, 2018. **362**(2): p. 332-342.
31. Burd, E.M., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(1): p. 1-17.
32. Zoodsma, M., et al., *Analysis of the entire HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study*. J Med Genet, 2005. **42**(8): p. e49.
33. Natphopsuk, S., et al., *Risk factors for cervical cancer in northeastern Thailand: detailed analyses of sexual and smoking behavior*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(11): p. 5489-95.
34. Ahdieh, L., et al., *Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women*. J Infect Dis, 2001. **184**(6): p. 682-90.
35. Baseman, J.G. and L.A. Koutsky, *The epidemiology of human papillomavirus infections*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S16-24.
36. Dunne, E.F., et al., *Prevalence of HPV infection among females in the United States*. Jama, 2007. **297**(8): p. 813-9.
37. de Sanjosé, S., et al., *Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(7): p. 453-9.
38. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
39. Majewski, S. and S. Jablonska, *Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa*. J Am Acad Dermatol, 1997. **36**(5 Pt 1): p. 659-85; quiz 686-8.
40. Muñoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
41. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
42. Li, N., et al., *Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication*. Int J Cancer, 2011. **128**(4): p. 927-35.
43. Favre, M., *Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses*. J Virol, 1975. **15**(5): p. 1239-47.
44. Danos, O., *Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae*. Embo j, 1982. **1**(4): p. 517.
45. Tsao, Y.P., et al., *Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sd1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7535-9.
46. Cheng, S., et al., *Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes*. Genes Dev, 1995. **9**(19): p. 2335-49.
47. Herfs, M., et al., *A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10516-21.
48. Schwarz, E., et al., *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells*. Nature, 1985. **314**(6006): p. 111-4.
49. Baker, C.C., et al., *Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines*. J Virol, 1987. **61**(4): p. 962-71.

50. Piersma, S.J., *Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients*. *Cancer Microenviron*, 2011. **4**(3): p. 361-75.
51. Castle, P.E., et al., *Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study*. *Bmj*, 2009. **339**: p. b2569.
52. Oh, H.Y., et al., *Synergistic effect of viral load and alcohol consumption on the risk of persistent high-risk human papillomavirus infection*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e104374.
53. Giuliano, A.R., et al., *Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States)*. *Cancer Causes Control*, 2002. **13**(9): p. 839-46.
54. Wang, S.S., et al., *Common genetic variants and risk for HPV persistence and progression to cervical cancer*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8667.
55. Crosbie, E.J., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. *Lancet*, 2013. **382**(9895): p. 889-99.
56. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. *Lancet*, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
57. Ronco, G., et al., *Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(3): p. 249-57.
58. Rijkaart, D.C., et al., *Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(1): p. 78-88.
59. Bundesausschuss, G. *Beschluss über eine Änderung der Beauftragung des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen: zur Erstellung von Einladungsschreiben und Versicherteninformation zum Zervixkarzinom*. 2016 15.09.2020]; Available from: https://www.g-ba.de/downloads/39-261-2713/2016-09-15_Aenderung_Beauftragung-IQWiG_Einladung_Zervixkarzinom-Screening_vom-2015-03-19.pdf.
60. Hillemanns, P., et al., *Prevention of Cervical Cancer: Guideline of the DGGG and the DKG (S3 Level, AWMF Register Number 015/0270L, December 2017) - Part 1 with Introduction, Screening and the Pathology of Cervical Dysplasia*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2019. **79**(2): p. 148-159.
61. Joura, E.A., et al., *A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(8): p. 711-23.
62. Institut, R.K. *Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren*. 2018 [cited 2020 10.09.2020]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/26_18.pdf?__blob=publicationFile.
63. Look, K.Y., et al., *An analysis of cell type in patients with surgically staged stage IB carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study*. *Gynecol Oncol*, 1996. **63**(3): p. 304-11.
64. Vinh-Hung, V., et al., *Prognostic value of histopathology and trends in cervical cancer: a SEER population study*. *BMC Cancer*, 2007. **7**: p. 164.
65. Lacey, J.V., Jr., et al., *Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix*. *Cancer*, 2003. **98**(4): p. 814-21.
66. AWMF, *AWMF S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom*. Leitlinien Programm Onkologie, 2022. **2.2**.
67. Höhn, A.K., et al., *2020 WHO Classification of Female Genital Tumors*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2021. **81**(10): p. 1145-1153.
68. Horn, L.C., et al., *[The 2019 FIGO classification for cervical carcinoma-what's new?]*. *Pathologe*, 2019. **40**(6): p. 629-635.
69. Cavalieri, E. and E. Rogan, *The molecular etiology and prevention of estrogen-initiated cancers: Ockham's Razor: Pluralitas non est ponenda sine necessitate. Plurality should not be posited without necessity*. *Mol Aspects Med*, 2014. **36**: p. 1-55.
70. Groothuis, P.G., et al., *Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human*. *Hum Reprod Update*, 2007. **13**(4): p. 405-17.
71. Beral, V., D. Bull, and G. Reeves, *Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. *Lancet*, 2005. **365**(9470): p. 1543-51.

72. Allen, N.E., et al., *Menopausal hormone therapy and risk of endometrial carcinoma among postmenopausal women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition*. *Am J Epidemiol*, 2010. **172**(12): p. 1394-403.
73. Chlebowski, R.T., et al., *Continuous Combined Estrogen Plus Progestin and Endometrial Cancer: The Women's Health Initiative Randomized Trial*. *J Natl Cancer Inst*, 2016. **108**(3).
74. Fournier, A., et al., *Risks of endometrial cancer associated with different hormone replacement therapies in the E3N cohort, 1992-2008*. *Am J Epidemiol*, 2014. **180**(5): p. 508-17.
75. Crosbie, E.J., et al., *Body mass index, hormone replacement therapy, and endometrial cancer risk: a meta-analysis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(12): p. 3119-30.
76. Ward, K.K., et al., *The risk of uterine malignancy is linearly associated with body mass index in a cohort of US women*. *Am J Obstet Gynecol*, 2013. **209**(6): p. 579.e1-5.
77. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. *Lancet*, 2008. **371**(9612): p. 569-78.
78. Klopp, A.H., et al., *Omental adipose tissue-derived stromal cells promote vascularization and growth of endometrial tumors*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(3): p. 771-82.
79. Longcope, C., R. Baker, and C.C. Johnston, Jr., *Androgen and estrogen metabolism: relationship to obesity*. *Metabolism*, 1986. **35**(3): p. 235-7.
80. Gruber, S.B. and W.D. Thompson, *A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women*. *Cancer and Steroid Hormone Study Group*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996. **5**(6): p. 411-7.
81. Gierisch, J.M., et al., *Oral contraceptive use and risk of breast, cervical, colorectal, and endometrial cancers: a systematic review*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(11): p. 1931-43.
82. Felix, A.S., et al., *Intrauterine devices and endometrial cancer risk: a pooled analysis of the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E410-22.
83. AWMF, *S3-Leitlinie Endometriumkarzinom, Langversion 2.0*. 2022.
84. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 1983. **15**(1): p. 10-7.
85. Sherman, M.E., et al., *Uterine serous carcinoma. A morphologically diverse neoplasm with unifying clinicopathologic features*. *Am J Surg Pathol*, 1992. **16**(6): p. 600-10.
86. Brinton, L.A., et al., *Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial*. *Gynecol Oncol*, 2013. **129**(2): p. 277-84.
87. Zannoni, G.F., et al., *Does high-grade endometrioid carcinoma (grade 3 FIGO) belong to type I or type II endometrial cancer? A clinical-pathological and immunohistochemical study*. *Virchows Arch*, 2010. **457**(1): p. 27-34.
88. Kandath, C., et al., *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma*. *Nature*, 2013. **497**(7447): p. 67-73.
89. León-Castillo, A., et al., *Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy*. *J Clin Oncol*, 2020. **38**(29): p. 3388-3397.
90. AWMF. *S3-Leitlinie Endometriumkarzinom*. 2022 16.09.2022 [cited 2023 28.05.2023]; 5.0:[Available from: https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-034OLI_S3_Endometriumkarzinom_2022-09.pdf].
91. Morice, P., et al., *Endometrial cancer*. *Lancet*, 2016. **387**(10023): p. 1094-1108.
92. Wong, A.S., et al., *Reappraisal of endometrial thickness for the detection of endometrial cancer in postmenopausal bleeding: a retrospective cohort study*. *Bjog*, 2016. **123**(3): p. 439-46.
93. Pennant, M.E., et al., *Premenopausal abnormal uterine bleeding and risk of endometrial cancer*. *Bjog*, 2017. **124**(3): p. 404-411.
94. Savelli, L., et al., *Preoperative local staging of endometrial cancer: transvaginal sonography vs. magnetic resonance imaging*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2008. **31**(5): p. 560-6.
95. Koskas, M., et al., *Cancer of the corpus uteri: 2021 update*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2021. **155 Suppl 1**(Suppl 1): p. 45-60.
96. Amant, F., et al., *Cancer of the corpus uteri*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2018. **143 Suppl 2**: p. 37-50.

97. Brett, M.A., et al., *Equivalent Survival of p53 Mutated Endometrial Endometrioid Carcinoma Grade 3 and Endometrial Serous Carcinoma*. Int J Gynecol Pathol, 2021. **40**(2): p. 116-123.
98. Koskas, M., et al., *Safety of uterine and/or ovarian preservation in young women with grade 1 intramucous endometrial adenocarcinoma: a comparison of survival according to the extent of surgery*. Fertil Steril, 2012. **98**(5): p. 1229-35.
99. Ørtoft, G., E.S. Hansen, and K. Bertelsen, *Omitting adjuvant radiotherapy in endometrial cancer increases the rate of locoregional recurrences but has no effect on long-term survival: the Danish Endometrial Cancer Study*. Int J Gynecol Cancer, 2013. **23**(8): p. 1429-37.
100. Nout, R.A., et al., *Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, non-inferiority, randomised trial*. Lancet, 2010. **375**(9717): p. 816-23.
101. Pölcher, M. *Zervix- und Endometriumkarzinom: Den Überblick behalten*. 2021. 173-174 DOI: <https://doi.org/10.1159/000521050>.
102. Barondes, S.H., et al., *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins*. Cell, 1994. **76**(4): p. 597-8.
103. Gitt, M.A. and S.H. Barondes, *Genomic sequence and organization of two members of a human lectin gene family*. Biochemistry, 1991. **30**(1): p. 82-9.
104. Barondes, S.H., et al., *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 20807-10.
105. Hirabayashi, J. and K. Kasai, *The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution*. Glycobiology, 1993. **3**(4): p. 297-304.
106. Cummings, R.D., F.T. Liu, and G.R. Vasta, *Galectins*, in *Essentials of Glycobiology*, rd, et al., Editors. 2015, Cold Spring Harbor Laboratory Press
Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.: Cold Spring Harbor (NY). p. 469-480.
107. Hughes, R.C., *Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): p. 172-85.
108. Johannes, L., C. Wunder, and M. Shafaq-Zadah, *Glycolipids and Lectins in Endocytic Uptake Processes*. J Mol Biol, 2016.
109. Kamili, N.A., et al., *Key regulators of galectin-glycan interactions*. Proteomics, 2016. **16**(24): p. 3111-3125.
110. Carlsson, M.C., et al., *Galectin-3 guides intracellular trafficking of some human serotransferrin glycoforms*. J Biol Chem, 2013. **288**(39): p. 28398-408.
111. Moutsatsos, I.K., et al., *Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(18): p. 6452-6.
112. Arthur, C.M., et al., *Evolving mechanistic insights into galectin functions*. Methods Mol Biol, 2015. **1207**: p. 1-35.
113. Liu, F.T. and G.A. Rabinovich, *Galectins as modulators of tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(1): p. 29-41.
114. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
115. Hadari, Y.R., et al., *Galectin-8. A new rat lectin, related to galectin-4*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 3447-53.
116. Gopalkrishnan, R.V., et al., *Molecular characterization of prostate carcinoma tumor antigen-1, PCTA-1, a human galectin-8 related gene*. Oncogene, 2000. **19**(38): p. 4405-16.
117. Bidon-Wagner, N. and J.P. Le Pennec, *Human galectin-8 isoforms and cancer*. Glycoconj J, 2002. **19**(7-9): p. 557-63.
118. Troncoso, M.F., et al., *Galectin-8: a matricellular lectin with key roles in angiogenesis*. Glycobiology, 2014. **24**(10): p. 907-14.
119. Ahmed, H., P.P. Banerjee, and G.R. Vasta, *Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(1): p. 241-6.
120. Ideo, H., et al., *Galectin-8-N-domain recognition mechanism for sialylated and sulfated glycans*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11346-55.

121. Levy, Y., et al., *It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin*. Glycobiology, 2006. **16**(6): p. 463-76.
122. Levy, Y., et al., *Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31285-95.
123. Lim, H., C.Y. Yu, and T.S. Jou, *Galectin-8 regulates targeting of Gp135/podocalyxin and lumen formation at the apical surface of renal epithelial cells*. Faseb j, 2017. **31**(11): p. 4917-4927.
124. Tribulatti, M.V., et al., *Galectin-8 in the onset of the immune response and inflammation*. Glycobiology, 2019.
125. Prato, C.A., et al., *Galectin-8 Enhances T cell Response by Promotion of Antigen Internalization and Processing*. iScience, 2020. **23**(7): p. 101278.
126. Vinik, Y., et al., *Ablation of the mammalian lectin galectin-8 induces bone defects in mice*. Faseb j, 2018. **32**(5): p. 2366-2380.
127. Falcon, B., et al., *Galectin-8-mediated selective autophagy protects against seeded tau aggregation*. J Biol Chem, 2018. **293**(7): p. 2438-2451.
128. Pardo, E., et al., *Galectin-8 as an immunosuppressor in experimental autoimmune encephalomyelitis and a target of human early prognostic antibodies in multiple sclerosis*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0177472.
129. Thijssen, V.L., et al., *Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1855**(2): p. 235-47.
130. Cludts, S., et al., *Galectin-8 up-regulation during hypopharyngeal and laryngeal tumor progression and comparison with galectin-1, -3 and -7*. Anticancer Res, 2009. **29**(12): p. 4933-40.
131. Kramer, M.W., et al., *Decreased galectin-8 is a strong marker for recurrence in urothelial carcinoma of the bladder*. Urol Int, 2011. **87**(2): p. 143-50.
132. Nagy, N., et al., *Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor*. Gut, 2002. **50**(3): p. 392-401.
133. Oyanadel, C., et al., *Galectin-8 induces partial epithelial-mesenchymal transition with invasive tumorigenic capabilities involving a FAK/EGFR/proteasome pathway in Madin-Darby canine kidney cells*. Mol Biol Cell, 2018. **29**(5): p. 557-574.
134. Metz, C., et al., *Galectin-8 promotes migration and proliferation and prevents apoptosis in U87 glioblastoma cells*. Biol Res, 2016. **49**(1): p. 33.
135. Shatz-Azoulay, H., et al., *The Animal Lectin Galectin-8 Promotes Cytokine Expression and Metastatic Tumor Growth in Mice*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 7375.
136. Chen, W.S., et al., *Pathological lymphangiogenesis is modulated by galectin-8-dependent crosstalk between podoplanin and integrin-associated VEGFR-3*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11302.
137. Pepper, M.S., et al., *Lymphangiogenesis and tumor metastasis*. Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 167-77.
138. Ruiz, F.M., et al., *Natural single amino acid polymorphism (F19Y) in human galectin-8: detection of structural alterations and increased growth-regulatory activity on tumor cells*. Febs j, 2014. **281**(5): p. 1446-64.
139. Wu, S., et al., *Galectin-8 is associated with recurrence and survival of patients with non-metastatic gastric cancer after surgery*. Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 12635-12642.
140. Ghasemi, M., et al., *Reduced Expression of Galectin-8 May Contribute in Carcinogenic Pathway of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Iran J Pathol, 2021. **16**(2): p. 195-204.
141. Wada, J. and Y.S. Kanwar, *Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 6078-86.
142. Tureci, O., et al., *Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6416-22.
143. Leffler, H., et al., *Introduction to galectins*. Glycoconj J, 2002. **19**(7-9): p. 433-40.
144. Chabot, S., et al., *Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells*. Glycobiology, 2002. **12**(2): p. 111-8.
145. Heusschen, R., et al., *Profiling Lgals9 splice variant expression at the fetal-maternal interface: implications in normal and pathological human pregnancy*. Biol Reprod, 2013. **88**(1): p. 22.

146. Heusschen, R., A.W. Griffioen, and V.L. Thijssen, *Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1836**(1): p. 177-85.
147. John, S. and R. Mishra, *Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics*. *J Biosci*, 2016. **41**(3): p. 507-34.
148. Matsuura, A., et al., *Intracellular galectin-9 activates inflammatory cytokines in monocytes*. *Genes Cells*, 2009. **14**(4): p. 511-21.
149. Lipkowitz, M.S., et al., *Functional reconstitution, membrane targeting, genomic structure, and chromosomal localization of a human urate transporter*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(9): p. 1103-15.
150. Hirashima, M., et al., *Galectin-9 in physiological and pathological conditions*. *Glycoconj J*, 2002. **19**(7-9): p. 593-600.
151. Matsumoto, R., et al., *Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(27): p. 16976-84.
152. Wada, J., et al., *Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(10): p. 2452-61.
153. Zhu, C., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
154. Lahm, H., et al., *Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001. **127**(6): p. 375-86.
155. Chan, S.W., T.G. Kallarakkal, and M.T. Abraham, *Changed expression of E-cadherin and galectin-9 in oral squamous cell carcinomas but lack of potential as prognostic markers*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(5): p. 2145-52.
156. Terris, B., et al., *Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(5): p. 1745-54.
157. Wiersma, V.R., et al., *The glycan-binding protein galectin-9 has direct apoptotic activity toward melanoma cells*. *J Invest Dermatol*, 2012. **132**(9): p. 2302-5.
158. Jafari, S.M., et al., *Galectin-9 induces apoptosis in OVCAR-3 ovarian cancer cell through mitochondrial pathway*. *Res Pharm Sci*, 2018. **13**(6): p. 557-565.
159. Fujita, K., et al., *Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo*. *Int J Oncol*, 2015. **46**(6): p. 2419-30.
160. Kageshita, T., et al., *Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance*. *Int J Cancer*, 2002. **99**(6): p. 809-16.
161. Nobumoto, A., et al., *Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices*. *Glycobiology*, 2008. **18**(9): p. 735-44.
162. Katoh, S., et al., *Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(1): p. 27-35.
163. Li, H., et al., *Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2012. **56**(4): p. 1342-51.
164. Gonçalves Silva, I., et al., *The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells*. *EBioMedicine*, 2017. **22**: p. 44-57.
165. Enninga, E.A.L., et al., *CD206-positive myeloid cells bind galectin-9 and promote a tumor-supportive microenvironment*. *J Pathol*, 2018. **245**(4): p. 468-477.
166. Daley, D., et al., *Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance*. *Nat Med*, 2017. **23**(5): p. 556-567.
167. Waddington, C.H., *The epigenotype*. 1942. *Int J Epidemiol*, 2012. **41**(1): p. 10-3.
168. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. *Science*, 1975. **187**(4173): p. 226-32.
169. Nanney, D.L., *EPIGENETIC CONTROL SYSTEMS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1958. **44**(7): p. 712-7.
170. Riggs, A.D., *X inactivation, differentiation, and DNA methylation*. *Cytogenet Cell Genet*, 1975. **14**(1): p. 9-25.
171. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1964. **51**(5): p. 786-94.

172. Pogo, B.G., V.G. Allfrey, and A.E. Mirsky, *RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **55**(4): p. 805-12.
173. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
174. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
175. McGhee, J.D. and G. Felsenfeld, *Nucleosome structure*. Annu Rev Biochem, 1980. **49**: p. 1115-56.
176. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
177. Thoma, F., T. Koller, and A. Klug, *Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin*. J Cell Biol, 1979. **83**(2 Pt 1): p. 403-27.
178. Johns, E.W., et al., *The electrophoresis of histones and histone fractions on starch gel*. Biochem J, 1961. **80**(1): p. 189-93.
179. Inoue, A. and D. Fujimoto, *Histone deacetylase from calf thymus*. Biochim Biophys Acta, 1970. **220**(2): p. 307-16.
180. Gallwitz, D. and I. Sures, *Histone acetylation. Purification and properties of three histone-specific acetyltransferases from rat thymus nuclei*. Biochim Biophys Acta, 1972. **263**(2): p. 315-28.
181. Lee, D.Y., et al., *A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA*. Cell, 1993. **72**(1): p. 73-84.
182. Davie, J.R., *Histone modifications, chromatin structure, and the nuclear matrix*. J Cell Biochem, 1996. **62**(2): p. 149-57.
183. Ernst, J., et al., *Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types*. Nature, 2011. **473**(7345): p. 43-9.
184. Wang, Z., et al., *Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes*. Cell, 2009. **138**(5): p. 1019-31.
185. Di Cerbo, V. and R. Schneider, *Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation*. Brief Funct Genomics, 2013. **12**(3): p. 231-43.
186. Ho, T.C.S., A.H.Y. Chan, and A. Ganesan, *Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight*. J Med Chem, 2020. **63**(21): p. 12460-12484.
187. Wang, Z., et al., *Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome*. Nat Genet, 2008. **40**(7): p. 897-903.
188. Tian, P., et al., *Ras-ERK1/2 signaling contributes to the development of colorectal cancer via regulating H3K9ac*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 1286.
189. Li, D., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase 1 transcriptional regulation: a novel crosstalk between histone modification H3K9ac and ETS1 motif hypomethylation in BRCA1-mutated ovarian cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(1): p. 291-7.
190. Beyer, S., et al., *Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(3).
191. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
192. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
193. Shilatifard, A., *The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 65-95.
194. Gallwitz, D., *Histone methylation. Partial purification of two histone-specific methyltransferases from rat thymus nuclei preferentially methylating histones F2a 1 and F3*. Arch Biochem Biophys, 1971. **145**(2): p. 650-7.
195. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. **119**(7): p. 941-53.
196. Tsukada, Y., et al., *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
197. Wysocka, J., et al., *A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 86-90.

198. Tsuge, M., et al., *A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers*. Nat Genet, 2005. **37**(10): p. 1104-7.
199. Plch, J., J. Hrabeta, and T. Eckschlager, *KDM5 demethylases and their role in cancer cell chemoresistance*. Int J Cancer, 2019. **144**(2): p. 221-231.
200. Zeng, J., et al., *The histone demethylase RBP2 is overexpressed in gastric cancer and its inhibition triggers senescence of cancer cells*. Gastroenterology, 2010. **138**(3): p. 981-92.
201. Balsalobre, A., et al., *Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling*. Science, 2000. **289**(5488): p. 2344-7.
202. Kadmiel, M. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(9): p. 518-30.
203. Sapolsky, R.M., L.M. Romero, and A.U. Munck, *How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions*. Endocr Rev, 2000. **21**(1): p. 55-89.
204. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms*. Clin Sci (Lond), 1998. **94**(6): p. 557-72.
205. Vilasco, M., et al., *Glucocorticoid receptor and breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **130**(1): p. 1-10.
206. Chu, C.C., et al., *The cellular mechanisms of the antiemetic action of dexamethasone and related glucocorticoids against vomiting*. Eur J Pharmacol, 2014. **722**: p. 48-54.
207. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
208. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. Science, 1988. **240**(4854): p. 889-95.
209. Kumar, R. and E.B. Thompson, *Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **94**(5): p. 383-94.
210. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones*. Endocr Rev, 1997. **18**(3): p. 306-60.
211. Freedman, N.D. and K.R. Yamamoto, *Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(5): p. 2276-86.
212. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3177-84.
213. Oakley, R.H., et al., *The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27857-66.
214. Kino, T., et al., *Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(4): p. 671-5.
215. Lu, N.Z. and J.A. Cidlowski, *Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 331-42.
216. Vandevyver, S., L. Dejager, and C. Libert, *Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor*. Endocr Rev, 2014. **35**(4): p. 671-93.
217. Hsu, S.C. and D.B. DeFranco, *Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 3359-64.
218. Jing, D., et al., *Opposing regulation of BIM and BCL2 controls glucocorticoid-induced apoptosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia cells*. Blood, 2015. **125**(2): p. 273-83.
219. Mayayo-Peralta, I., W. Zwart, and S. Prekovic, *Duality of glucocorticoid action in cancer: tumor-suppressor or oncogene?* Endocr Relat Cancer, 2021.
220. Yemelyanov, A., et al., *Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate*. Oncogene, 2007. **26**(13): p. 1885-96.
221. Kost, B.P., et al., *Glucocorticoid receptor in cervical cancer: an immunohistochemical analysis*. Arch Gynecol Obstet, 2019. **299**(1): p. 203-209.
222. Osborne, C.K., et al., *Direct inhibition of growth and antagonism of insulin action by glucocorticoids in human breast cancer cells in culture*. Cancer Res, 1979. **39**(7 Pt 1): p. 2422-8.

223. Ewing, T.M., et al., *Regulation of epidermal growth factor receptor by progestins and glucocorticoids in human breast cancer cell lines*. *Int J Cancer*, 1989. **44**(4): p. 744-52.
224. Buxant, F., C. Engohan-Aloghe, and J.C. Noël, *Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2010. **18**(3): p. 254-7.
225. Kuefer, R., et al., [Tissue microarrays. High-throughput procedures to verify potential biomarkers]. *Urologe A*, 2004. **43**(6): p. 659-67.
226. Hantschke, M.P., G. *Immunhistologische Techniken*. 16.05.2021]; Available from: https://www.springermedizin.de/emedpedia/histopathologie-der-haut/immunhistologische-techniken?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-44367-5_2.
227. Remmele, W. and H.E. Stegner, [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 1987. **8**(3): p. 138-40.
228. Krebsregisterdaten, Z.f. 2020 12.06.2020 [cited 2020 10.08.2020]; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterhalskrebs/gebauer Mutterhalskrebs_node.html.
229. Sung, S. and A. Abramovitz, *Postmenopausal Bleeding*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
230. Wittekind, C., [2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]. *Pathologe*, 2010. **31**(5): p. 331-2.
231. AWMF, *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom*. 2018.
232. Su, Z.Z., et al., *Surface-epitope masking and expression cloning identifies the human prostate carcinoma tumor antigen gene PCTA-1 a member of the galectin gene family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(14): p. 7252-7.
233. Punt, S., et al., *Galectin-1, -3 and -9 Expression and Clinical Significance in Squamous Cervical Cancer*. *PLoS ONE*, 2015. **10**(6): p. 1-13.
234. Zhu, H., et al., *Roles of galectin-7 and S100A9 in cervical squamous carcinoma: Clinicopathological and in vitro evidence*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(5): p. 1051-9.
235. Liang, M., et al., *Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008. **134**(8): p. 899-907.
236. Danguy, A., et al., *Immunohistochemical profile of galectin-8 expression in benign and malignant tumors of epithelial, mesenchymatous and adipous origins, and of the nervous system*. *Histol Histopathol*, 2001. **16**(3): p. 861-8.
237. Liu, Y., et al., *Galectin-9 as a prognostic and predictive biomarker in bladder urothelial carcinoma*. *Urol Oncol*, 2017. **35**(6): p. 349-355.
238. Zhang, Z.Y., et al., *Galectin-9 acts as a prognostic factor with antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012. **13**(6): p. 2503-9.
239. Sun, X.F. and S.Y. Dai, *The Significance of Galectin-1 and Galectin-9 Expression in Endometrial Carcinoma*. *Gynecol Obstet Invest*, 2020. **85**(1): p. 34-40.
240. Zhang, F., et al., *Different roles of galectin-9 isoforms in modulating E-selectin expression and adhesion function in LoVo colon carcinoma cells*. *Mol Biol Rep*, 2009. **36**(5): p. 823-30.
241. Aanhane, E., et al., *Different angioregulatory activity of monovalent galectin-9 isoforms*. *Angiogenesis*, 2018. **21**(3): p. 545-555.
242. Kobayashi, T., et al., *Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways*. *Leukemia*, 2010. **24**(4): p. 843-50.
243. Lu, L.H., et al., *Characterization of galectin-9-induced death of Jurkat T cells*. *J Biochem*, 2007. **141**(2): p. 157-72.
244. Chiyo, T., et al., *Galectin-9 Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis of Esophageal Cancer In Vitro and In Vivo in a Xenograft Mouse Model*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(11).
245. Okura, R., et al., *MicroRNA profiles during galectin-9-induced apoptosis of pancreatic cancer cells*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(1): p. 407-414.
246. Huang, E.Y., et al., *Galectin-1 is an independent prognostic factor for local recurrence and survival after definitive radiation therapy for patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013. **87**(5): p. 975-82.
247. Kohrenhagen, N., et al., *Increased expression of galectin-1 during the progression of cervical neoplasia*. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. **16**(6): p. 2018-22.

248. Schulz, H., et al., *Galectins-1, -3, and -7 Are Prognostic Markers for Survival of Ovarian Cancer Patients*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(6).
249. Stiasny, A., et al., *The involvement of E6, p53, p16, MDM2 and Gal-3 in the clinical outcome of patients with cervical cancer*. *Oncology Letters*, 2017. **14**(4): p. 4467-4476.
250. Li, M., Y.M. Feng, and S.Q. Fang, *Overexpression of ezrin and galectin-3 as predictors of poor prognosis of cervical cancer*. *Braz J Med Biol Res*, 2017. **50**(4): p. e5356.
251. Lambropoulou, M., et al., *Co-expression of galectin-3 and CRIP-1 in endometrial cancer: prognostic value and patient survival*. *Med Oncol*, 2016. **33**(1): p. 8.
252. Mirandola, L., et al., *Galectin-3 inhibition suppresses drug resistance, motility, invasion and angiogenic potential in ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2014. **135**(3): p. 573-9.
253. Kim, H.J., et al., *High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion*. *Eur J Cancer*, 2012. **48**(12): p. 1914-21.
254. Fukushima, A., et al., *Roles of galectin-9 in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008. **146**(1): p. 36-43.
255. Yang, R., et al., *Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 832.
256. Banno, K., et al., *Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics*. *J Obstet Gynaecol Res*, 2014. **40**(8): p. 1957-67.
257. Muraki, Y., et al., *Epigenetic DNA hypermethylation: clinical applications in endometrial cancer (Review)*. *Oncol Rep*, 2009. **22**(5): p. 967-72.
258. Zhen, L., et al., *The expression of H3K9Ac, H3K14Ac, and H4K20TriMe in epithelial ovarian tumors and the clinical significance*. *Int J Gynecol Cancer*, 2010. **20**(1): p. 82-6.
259. Ye, X.D., et al., *High level of H3K4 tri-methylation modification predicts poor prognosis in esophageal cancer*. *J Cancer*, 2020. **11**(11): p. 3256-3263.
260. Liu, H., et al., *H3K4me3 and Wdr82 are associated with tumor progression and a favorable prognosis in human colorectal cancer*. *Oncol Lett*, 2018. **16**(2): p. 2125-2134.
261. Li, Q., et al., *The expression and significance of histone lysine methylation in endometrial cancer*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(5): p. 6210-6216.
262. Chen, K., et al., *Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes*. *Nat Genet*, 2015. **47**(10): p. 1149-57.
263. Parthun, M.R., J. Widom, and D.E. Gottschling, *The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism*. *Cell*, 1996. **87**(1): p. 85-94.
264. Tang, Z., et al., *SET1 and p300 act synergistically, through coupled histone modifications, in transcriptional activation by p53*. *Cell*, 2013. **154**(2): p. 297-310.
265. Archer, S.Y. and R.A. Hodin, *Histone acetylation and cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 1999. **9**(2): p. 171-4.
266. Sanaei, M., F. Kavooosi, and O. Mansoori, *Effect of valproic acid in comparison with vorinostat on cell growth inhibition and apoptosis induction in the human colon cancer SW48 cells in vitro*. *Exp Oncol*, 2018. **40**(2): p. 95-100.
267. Mann, B.S., et al., *FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. *Oncologist*, 2007. **12**(10): p. 1247-52.
268. VanderMolen, K.M., et al., *Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR901228, FK228, depsipeptide): a natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma*. *J Antibiot (Tokyo)*, 2011. **64**(8): p. 525-31.
269. Poole, R.M., *Belinostat: first global approval*. *Drugs*, 2014. **74**(13): p. 1543-54.
270. *Panobinostat approved for multiple myeloma*. *Cancer Discov*, 2015. **5**(5): p. Of4.
271. Vigushin, D.M. and R.C. Coombes, *Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment*. *Anticancer Drugs*, 2002. **13**(1): p. 1-13.
272. Sarfstein, R., et al., *The mechanism of action of the histone deacetylase inhibitor vorinostat involves interaction with the insulin-like growth factor signaling pathway*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24468.
273. Rocha, W., et al., *Opposite effects of histone deacetylase inhibitors on glucocorticoid and estrogen signaling in human endometrial Ishikawa cells*. *Mol Pharmacol*, 2005. **68**(6): p. 1852-62.
274. Psilopatis, I., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors: A Promising Therapeutic Alternative for Endometrial Carcinoma*. *Dis Markers*, 2021. **2021**: p. 7850688.

275. Ree, A.H., et al., *Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, combined with pelvic palliative radiotherapy for gastrointestinal carcinoma: the Pelvic Radiation and Vorinostat (PRAVO) phase 1 study*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(5): p. 459-64.
276. Banuelos, C.A., et al., *Radiosensitization by the histone deacetylase inhibitor PCI-24781*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(22 Pt 1): p. 6816-26.
277. Jambhekar, A., J.N. Anastas, and Y. Shi, *Histone Lysine Demethylase Inhibitors*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017. **7**(1).
278. Li, Y., et al., *ZY0511, a novel, potent and selective LSD1 inhibitor, exhibits anticancer activity against solid tumors via the DDIT4/mTOR pathway*. *Cancer Lett*, 2019. **454**: p. 179-190.
279. Trifirò, P., et al., *Novel potent inhibitors of the histone demethylase KDM1A (LSD1), orally active in a murine promyelocytic leukemia model*. *Future Med Chem*, 2017. **9**(11): p. 1161-1174.
280. Sinha, K.M., et al., *Regulation of the osteoblast-specific transcription factor Osterix by NO66, a Jumonji family histone demethylase*. *Embo j*, 2010. **29**(1): p. 68-79.
281. Yang, G.J., et al., *The emerging role of KDM5A in human cancer*. *J Hematol Oncol*, 2021. **14**(1): p. 30.
282. Suzuki, C., et al., *Identification of Myc-associated protein with JmjC domain as a novel therapeutic target oncogene for lung cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(2): p. 542-51.
283. Højfeldt, J.W., K. Agger, and K. Helin, *Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2013. **12**(12): p. 917-30.
284. Severson, T.M., et al., *Characterizing steroid hormone receptor chromatin binding landscapes in male and female breast cancer*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 482.
285. Ishiguro, H., et al., *Reduced glucocorticoid receptor expression predicts bladder tumor recurrence and progression*. *Am J Clin Pathol*, 2014. **142**(2): p. 157-64.
286. Tangen, I.L., et al., *Expression of glucocorticoid receptor is associated with aggressive primary endometrial cancer and increases from primary to metastatic lesions*. *Gynecol Oncol*, 2017. **147**(3): p. 672-677.
287. Block, T.S., et al., *Glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types using immunohistochemistry assay*. *Cancer Manag Res*, 2017. **9**: p. 65-72.
288. Bamberger, A.M., et al., *The glucocorticoid receptor is specifically expressed in the stromal compartment of the human endometrium*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(10): p. 5071-4.
289. Isikbay, M., et al., *Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer*. *Horm Cancer*, 2014. **5**(2): p. 72-89.
290. Catteau, X., et al., *Expression of the glucocorticoid receptor in breast cancer-associated fibroblasts*. *Mol Clin Oncol*, 2016. **5**(4): p. 372-376.
291. Liu, B., et al., *Loss of endothelial glucocorticoid receptor promotes angiogenesis via upregulation of Wnt/ β -catenin pathway*. *Angiogenesis*, 2021. **24**(3): p. 631-645.
292. Mitre-Aguilar, I.B., A.J. Cabrera-Quintero, and A. Zentella-Dehesa, *Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(1): p. 1-10.
293. Inaba, H. and C.H. Pui, *Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(11): p. 1096-106.
294. Rhen, T., et al., *Dexamethasone blocks the rapid biological effects of 17 β -estradiol in the rat uterus without antagonizing its global genomic actions*. *Faseb j*, 2003. **17**(13): p. 1849-70.
295. Meijer, O.C., L.L. Koorneef, and J. Kroon, *Glucocorticoid receptor modulators*. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2018. **79**(3): p. 107-111.

Danksagung

Eine Doktorarbeit zu schreiben, kann einem manchmal wie ein Marathonlauf vorkommen. Dass ich trotzdem am Ziel angelangt bin, habe ich auch vielen kompetenten und wunderbaren Menschen zu verdanken.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Kolben für die freundliche Überlassung des Themas und seine hervorragende Unterstützung auf allen Ebenen der Projektdurchführung.

Auch gebührt mein großer Dank meiner wissenschaftlichen Betreuerin, Frau PD Dr. med. Susanne Beyer. Sie hatte stets ein offenes Ohr für alle meine Fragen. Außerdem stand sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und unterstützte mich bei allen kleinen und großen Schwierigkeiten.

Frau PD Dr. med. Elisa Schmoeckel möchte ich ebenfalls meinen Dank für Ihre Unterstützung hinsichtlich den pathologischen Anteilen dieser Arbeit aussprechen. Und ebenso Frau Andrea Sendelhofert für die Aufarbeitung des Gewebes und Erstellung der TMAs.

Außerdem gilt mein herzlicher Dank Christina Kuhn, die mich mit ihrer liebevollen Art und Kompetenz in die Laborarbeit einführte. Nicht zu vergessen sind dabei auch meine Mit-Doktorandinnen, vor allem Mareike und Sophie, die mich ebenfalls immer unterstützt haben.

Mein größter Dank geht an meine wundervollen Eltern, die mich in jeder Lebens- und Gefühlslage unterstützt haben und immer noch unterstützen. Danke, dass Ihr mich immer wieder neu motiviert und mir bei der Erfüllung meiner Träume stets bedingungslos zur Seite steht. Tausend Dank auch an meine einzigartige Schwester, die mich immer zum Lachen bringt und mich immer wieder aufbaut und angespornt hat. Und zu guter Letzt danke an meine großartigen Freundinnen und Freunde, die mich mit viel Humor und Liebe immer wieder zurück an die Arbeit gebracht haben.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Wehrmann, Maya

—

Name, Vorname

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

Immunhistochemische Analyse der Expression von Galektin-8, Galektin-9, H3K9ac, H3K4me3 und Glukokortikoidrezeptor im Zervix- und Endometriumkarzinom

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

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

München, den 01.12.2024

Maya Wehrmann

—

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

S. Beyer, M. Wehrmann, S. Meister, T.M. Kolben, F. Trillsch, A. Burges, B. Czogalla, E. Schmoeckel, S. Mahner, U. Jeschke, T. Kolben, *Galectin-8 and -9 as prognostic factors in cervical cancer* Arch Gynecol Obstet. Okt 2022 **306**(4).

S. Beyer, M. Wehrmann, S. Meister, F. Trillsch, F. Ganster, E. Schmoeckel, S. Corradini, S. Mahner, U. Jeschke, M. Kessler, A. Burges, T. Kolben, *Expression of Intracellular Galectin-8 and-9 in Endometrial Cancer*. Int J Mol Sci. Jun 2024. **25**(13).