

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



**Marker zur Vorhersage der Pro- und
Regressionswahrscheinlichkeit der zervikalen
intraepithelialen Neoplasie**

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

vorgelegt von
Larissa Ulrike Magdalena Ostertag

aus
München

Jahr
2025

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

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Thomas Kolben

Zweites Gutachten: Priv. Doz. Dr. Elisa Schmoeckel

Drittes Gutachten: Prof. Dr. Björn Lampe

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2025

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	7
Abstract (English):.....	11
Abbildungsverzeichnis	15
Tabellenverzeichnis	18
Abkürzungsverzeichnis	20
1. Einleitung	24
1.1 Überblick: Das Zervixkarzinom und die zervikalen intraepithelialen Neoplasien	24
1.2 Epigenetische Regulationsmechanismen	27
1.2.1 DNA-Methylierungsprozesse beim Zervixkarzinom und seinen Vorstufen.....	28
1.2.2 Histonmodifikationen als Mediatoren der Genexpression beim Zervixkarzinom und seiner Vorstufen	30
1.2.2.1 H3K4me3 und H3K9ac	32
1.3 Immunmodulatorische Prozesse beim Zervixkarzinom und seiner Vorstufen	34
1.3.1 Die Koordination und die Steuerung zellulärer Immunprozesse durch Chemokine.....	36
1.3.1.1 CCR4 in der Onkogenese und im Zervixkarzinom.....	39
1.3.2 Galektine und ihre Rolle als prognostische Marker zervikaler Neoplasien	40
1.3.2.1 Galektin 8 in der Tumorbiologie.....	42
1.3.2.2 Galektin 9 als potentieller Prognosemarker	44
1.4 Der Stand der Forschung zur zervikalen intraepithelialen Neoplasie ..	47
2. Material und Methoden.....	50
2.1 Material	50
2.1.1 Patientenkollektiv	50
2.1.2 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial	52
2.1.3 Protokolle für Puffer und Lösungen	54
2.1.4 Primärantikörper	55
2.1.5 Software	57
2.2 Methoden.....	57
2.2.1 Aufbereitung des Patientenmaterials	57
2.2.2 Färbeprotokoll	58

2.2.3 Auswertung	61
2.2.4 Statistikanalyse	62
3. Ergebnisse	64
3.1 Verwertbare Schnitte	64
3.2 H3K4me3 in der zervikalen Dysplasie	65
3.2.1 H3K4me3 in der CIN II	69
3.3 H3K9ac in der zervikalen Dysplasie	70
3.3.1 H3K9ac in der CIN II	73
3.4 CCR4 in der zervikalen Dysplasie	74
3.4.1 CCR4 im Stromaepithel der CIN I bis CIN III	75
3.4.1.1 CCR4 im Stromaepithel der CIN II	77
3.4.2 CCR4 im dysplastischen Plattenepithel von CIN I bis CIN III	78
3.4.2.1 CCR4 im dysplastischen Plattenepithel der CIN II	80
3.5 Galektin 8 in der zervikalen Dysplasie	81
3.5.1 Galektin 8 in der CIN II	84
3.6 Galektin 9 in der zervikalen Dysplasie	85
3.6.1 Galektin 9 in der CIN II	87
3.7 Korrelationsanalysen der untersuchten Marker in der zervikalen Dysplasie	88
4. Diskussion	91
4.1 Patientenkollektiv	91
4.2 Histonmodifikationen in der zervikalen Dysplasie	91
4.2.1 H3K4me3 in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II	91
4.2.2 H3K9ac in der zervikalen Dysplasie und der CIN II	93
4.2.3 Korrelation von H3K4me3 und H3K9ac	94
4.3 CCR4 in der zervikalen Dysplasie	95
4.3.1 CCR4 im umgebenden Stromaepithel in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II	95
4.3.1.1 Korrelation CCR4-positiven Zellen im Stroma und der Histonmodifikation H3K4me3	98
4.3.2 CCR4 im dysplastischen Epithel in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II	99
4.4 Galektine in der zervikalen Dysplasie	101
4.4.1 Galektin 8 in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II	101
4.4.2 Galektin 9 in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II	103

4.4.2.1 Korrelation von Galektin 9 mit H3K9ac	105
4.5 Abschließender Ausblick.....	106
Literaturverzeichnis.....	109
Danksagung	118
Affidavit.....	119
Publikationsliste.....	120
Übereinstimmungserklärung.....	121

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation werden prognostische Marker zur Verbesserung der Prognose und des Therapiemanagements zervikaler intraepithelialer Neoplasien (CIN) vorgestellt und bewertet. CIN sind Gewebeveränderungen der Zervix, welche zytologisch und histologisch in drei Schweregrade unterteilt werden. Veränderungen treten meist im Rahmen einer Infektion mit dem humanem Papillomvirus (HPV) auf sowie durch das akkumulierte Vorliegen verschiedener weiterer Risikofaktoren. Zudem konnte bisher eine Korrelation des Schweregrads und der Progredienz in eine maligne Entartung festgestellt werden (AWMF et al., 2022b). Entsprechend richten sich die Therapiemaßnahmen nach dem Schweregrad von engmaschigen Kontrolluntersuchungen bis zur chirurgischen Abtragung der Neoplasie. Zum aktuellen Stand der Wissenschaft konnten keine Prognosemarker durch klinische Studien gesichert werden, jedoch erwiesen sich bestimmte Marker mit einem möglichen Potential (Arip et al., 2022). Prognostische Marker sind von wesentlicher Bedeutung zur Verbesserung der Therapieentscheidung und prognostischen Vorhersage der Patientinnen. Insbesondere in der CIN II wären diese von Vorteil, um das Therapiemanagement zu verbessern, Übertherapien zu vermeiden und Progressionen frühzeitig zu erkennen. Sie bieten die Möglichkeit allgemein bestimmt zu werden, non-invasiv getestet und vorausblickend durch die Korrelation von Markern mit Tumorprogredienz als Ansätze für zukünftige zielgerichtete Therapien eingesetzt zu werden.

Im Rahmen dieser Studie werden fünf Marker auf ihre Eignung als Pro- oder Regressionsmarker untersucht. Hierfür wurden histologische Schnitte von CIN I bis CIN III untersucht sowie CIN II Präparate mit einem zugehörigen follow-up, welches entweder eine Regression zu einer CIN I oder eine Progression zur CIN III aufwies, ausgewertet. Alle Marker wurden bereits in Vorstudien untersucht und zeigten mögliches Potential als prognostische Vorhersagemarker in der CIN und im Zervixkarzinom.

Zu den untersuchten Markern gehören die Histonmodifikationen trimethyliertes Histon-3 an Lysin K4 (H3K4me3) und acetyliertes Histon 3 an Lysin 9 (H3K9ac). H3K4me3 und H3K9ac verändern die DNA-Transkription, Zellproliferation und

Apoptose und konnten in der CIN und im Zervixkarzinom mit ungünstigem Verlauf korreliert werden (Anton et al., 2004), (Beyer et al., 2017). Außerdem wurde der Chemokinrezeptor 4 (CCR4) untersucht, welcher als Rezeptor für die chemotaktischen Zytokine Chemokinligand 22 (CCL22) und Chemokinligand 17 (CCL17) dient. CCL22 und CCL17 sind an Entzündungs- und Autoimmunprozessen sowie in der antitumoralen Immunantwort beteiligt (Lupancu et al., 2023), (Röhrle et al., 2020a). Im Zervixkarzinom konnte eine verstärkte CCR4 Expression in der Tumorumgebung, in infiltrierenden Makrophagen und regulatorischen T-Zellen (Tregs) sowie in den Tumorzellen selbst gefunden werden (Zhao et al., 2017), (Slettenaar et al., 2006). Zusätzlich wurden die Galektine 8 (Gal 8) und 9 (Gal 9) untersucht. Beide Galektine sind an vielfältigen Funktionen in der Zellphysiologie beteiligt und wurden im Zervixkarzinom bisher als positiv prognostisch für das Gesamtüberleben und der Tumorprogression korreliert (Beyer et al., 2022).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von H3K4me3 bei fortschreitender Dysplasie zunimmt. Dieser Trend konnte vor allem bei höhergradigen Veränderungen beobachtet werden. So nahm das Expressionsniveau im Verlauf einer CIN II mit anschließender Progression im follow-up zu, während zwischen einer CIN I und einer CIN II mit anschließender Regression kein signifikanter Unterschied messbar war. H3K4me3 zeigt großes Potential, als prognostischer Marker zum Einsatz zu kommen, vor allem bei stark fortschreitenden Dysplasien.

Ein verstärktes Vorhandensein von H3K9ac konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Hier nahm die Expression vor allem bei Progression von CIN I zu CIN II zu, was für eine vermehrte Expression in der frühen Entwicklung der Dysplasie spricht. Zudem konnte ein signifikant höheres Expressionsniveau zwischen CIN II mit anschließender Progression zu CIN II mit anschließender Regression beobachtet werden. H3K9ac zeigte also eine mögliche prognostische Relevanz in der Entwicklung einer CIN II, vor allem in frühen Stadien.

Die Einwanderung CCR4-positiver Zellen wurde einmal im Stroma der Dysplasie sowie einmal im umliegenden Epithelgewebe getrennt voneinander untersucht.

Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg an CCR4-positiven Zellen bei Fortschreiten der Dysplasie im Stroma. Kein Unterschied wurde bei der Untersuchung auf prognostisches Potential innerhalb der CIN II gefunden. CIN II Präparate mit anschließender Regression zeigten ein ähnliches Zellbild wie CIN II Präparate mit anschließender Progression.

CCR4-positive Zellen im dysplastischen Epithel waren insgesamt schwächer ausgeprägt als im umliegenden Stroma und zeigten sich vorwiegend in der Basalzellreihe. CIN II Präparate zeigten im Vergleich zu CIN I und CIN III Schnitten eine geringere Anzahl CCR4-positiver Zellen. CIN I und CIN III Schnitte zeigten keinen Unterschied in der Zellanzahl. Die Einwanderung CCR4-positiver Zellen ins Stroma eignet sich vermutlich als histologischer Marker zur Bestimmung der CIN Stufe.

Galektin 8 zeigte eine homogene Expression über alle CIN Stufen hinweg mit höchster Expression in der CIN I. Diese war jedoch nicht signifikant. Eine signifikante Abnahme von Gal 8 positiven Zellen konnte nur im Vergleich von CIN I zu CIN II Präparaten mit anschließender Regression und CIN II Präparaten mit anschließender Progression zu CIN III Präparaten gezeigt werden. Innerhalb der Analyse auf prognostisches Potential zeigte sich kein Unterschied zwischen CIN II Präparaten mit anschließender Regression zu CIN II Präparaten mit anschließender Progression. Galektin 8 zeigte innerhalb dieser Arbeit kein Potential auf einen Prognosemarker in der zervikalen Dysplasie.

Galektin 9 zeigte wie Galektin 8 über alle CIN Stufen eine homogene Expression ohne signifikante Veränderungen. Auch im Vergleich von CIN II mit anschließender Regression zu CIN II mit anschließender Progression zeigte sich keine statistisch relevante Veränderung. Wie Galektin 8 konnte auch für Galektin 9 keine prognostische Bedeutung für die CIN beobachtet werden.

Neben der statistischen Analyse der einzelnen Marker wurde zudem eine Korrelationsanalyse zwischen dem Auftreten aller Marker und dem Fortschreiten der CIN durchgeführt. Ein signifikant positiver Zusammenhang konnte zwischen der Expression von H3K4me3, H3K9ac sowie CCR4-positive Zellen im Stroma und steigendem Dysplasiegrad nachgewiesen werden. Auch das gleichzeitige

Ansteigen von H3K4me3 mit H3K9ac zeigte eine signifikante Tendenz mit höhergradigen Dysplasien. Gal 9 und H3K9ac waren dagegen zusammen mit dem Voranschreiten der CIN negativ korreliert.

Zusammenfassend stützt die Arbeit die Annahme, dass die Expression von H3K4me3, H3K9ac und die CCR4-Expression im Stroma mit einer Progression der CIN einhergehen und decken sich damit mit dem aktuellen Forschungsstand (Paul et al., 2021), (Anton et al., 2004), (Wang et al., 2019b). Hingegen für die Galektine 8 und 9 konnte hier der wissenschaftliche Stand als prognostisch relevante Marker für die Progression der CIN, vor allem innerhalb der CIN II, nicht reproduziert werden. Dies gibt Anlass, diesen Ansatz in weiteren Studien erneut zu untersuchen. Vor allem H3K4me3 und H3K9ac konnten für die CIN und die CIN II zukünftig als Biomarker zum Vorhersagewert innerhalb der zervikalen Dysplasie dienen und darüber hinaus Angriffspunkte für mögliche zielgerichtete Therapien darstellen. CCR4 wurde bisher noch wenig untersucht, stellt aber in Zusammenhang mit dem positiven Ergebnis in dieser Arbeit einen guten Grundstein für weitere Untersuchungen.

Abstract (English):

This thesis presents and discusses five prognostic markers to improve the prognosis and therapeutic management of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). CIN are tissue changes in the cervix that are cytologically and histologically divided into three grades. Changes usually occur as a result of an infection with the human papilloma virus (HPV) and the accumulated presence of various other risk factors. In addition, a correlation between the severity and progression to malignant degeneration has been found so far (AWMF et al., 2022). Accordingly, the therapeutic measures depend on the severity, from close check-ups to surgical removal of the neoplasm. At the current state of science, no prognostic markers could be confirmed by clinical studies, but certain markers have been shown to have potential (Arip et al., 2022). Prognostic markers are essential for improving treatment decisions and prognostic prediction of patients. These would be particularly advantageous in CIN II in order to improve therapy management, avoid overtreatment and detect progressions early. They offer the possibility of being generally determined, tested non-invasively and used prospectively by correlating markers with tumor progression as approaches for future targeted therapies.

As part of this study, five markers were examined for their suitability as markers for progression or regression. For this purpose, histological sections from CIN I to CIN III were examined as well as CIN II specimens with an associated follow-up, which showed either regression to CIN I or progression to CIN III. All markers have already been examined in preliminary studies and showed potential as prognostic markers in CIN and cervical cancer.

The markers examined include the histone modifications trimethylated histone 3 on lysine K4 (H3K4me3) and acetylated histone 3 on lysine 9 (H3K9ac). H3K4me3 and H3K9ac alter DNA transcription, cell proliferation and apoptosis and could be correlated with unfavorable outcomes in CIN and cervical cancer (Anton et al., 2004), (Beyer et al., 2017). In addition, the chemokine receptor 4 (CCR4) was examined, which serves as a receptor for the chemotactic cytokines chemokine ligand 22 (CCL22) and chemokine ligand 17 (CCL17). CCL22 and CCL17 are involved in inflammatory and autoimmune processes and in the antitumor immune response (Lupancu et al., 2023), (Röhrle et al., 2020a). In

cervical carcinoma, increased CCR4 expression was found in the tumor environment, in infiltrating macrophages and regulatory T cells (Tregs) as well as in the tumor cells themselves (Zhao et al., 2017), (Slettenaar et al., 2006). Additionally, galectins 8 (Gal 8) and galectin 9 (Gal 9) were examined. Both galectins are involved in a variety of functions in cell physiology and have so far been found to be positively prognostic for overall survival and tumor progression in cervical cancer (Beyer et al., 2022).

In this work it was shown that the expression of H3K4me3 increases as dysplasia progresses. This trend was particularly observed with higher-degree changes. The expression level increased in the course of CIN II with subsequent progression in follow-up, while no significant difference was measurable between CIN I and CIN II with subsequent regression. H3K4me3 shows great potential to be used as a prognostic marker, especially in severely progressive dysplasia.

An increased presence of H3K9ac could also be detected. Here the expression increased especially with progression from CIN I to CIN II, which suggests increased expression in the early development of the dysplasia. In addition, a significantly higher expression level was observed between CIN II with subsequent progression to CIN II with subsequent regression. H3K9ac therefore showed a possible prognostic relevance in the development of CIN II, especially in early stages.

The immigration of CCR4-positive cells was examined separately, in the stroma of the dysplasia and in the surrounding epithelial tissue. There was a significant increase in CCR4-positive cells as the dysplasia progressed in the stroma. No difference was found when examining prognostic potential within CIN II. CIN II preparations with subsequent regression showed a similar cell picture to CIN II preparations with subsequent progression.

Overall, CCR4-positive cells in the dysplastic epithelium were weaker than in the surrounding stroma and were predominantly found in the basal cell series. CIN II preparations showed in comparison to CIN I and CIN III sections a lower number of CCR4-positive cells. CIN I and CIN III sections showed no difference in cell

number. The migration of CCR4-positive cells into the stroma is probably suitable as a histological marker for determining the CIN stage.

Galectin 8 showed homogeneous expression across all CIN stages with highest expression in CIN I. However, this was not significant. A significant decrease in Gal 8 positive cells could only be shown in the comparison of CIN I to CIN II preparations with subsequent regression and CIN II preparations with subsequent progression to CIN III. Within the analysis for prognostic potential, there was no difference between CIN II with subsequent regression and CIN II with subsequent progression. In this work, galectin 8 did not show any potential as a prognostic marker in cervical dysplasia.

Like galectin 8, galectin 9 showed homogeneous expression across all CIN stages without significant changes. There was also no statistically relevant change in the comparison of CIN II with subsequent regression to CIN II with subsequent progression. Like galectin 8, no prognostic significance for CIN could be observed for galectin 9.

In addition to the statistical analysis of the individual markers, a correlation analysis between the occurrence of all markers and the progression of CIN was also carried out. A significant positive connection could be demonstrated between the expression of H3K4me3, H3K9ac and CCR4-positive cells in the stroma and increasing grades of dysplasia. The simultaneous increase in H3K4me3 with H3K9ac also showed a significant tendency with higher-grade dysplasia. In contrast, Gal 9 and H3K9ac were negatively correlated with the progression of CIN.

In summary, this work supports the assumption that H3K4me3, H3K9ac and CCR4 expression in the stroma are associated with progression of CIN and is therefore consistent with the current state of research (Paul et al., 2021), (Anton et al., 2004), (Wang et al., 2019b). However, for galectins 8 and 9, the scientific status as prognostically relevant markers for the progression of CIN, especially within CIN II, could not be reproduced. This gives reason to re-examine this approach in further studies. In particular, H3K4me3 and H3K9ac could serve as

biomarkers for the predictive value of cervical dysplasia for CIN and CIN II in the future and also represent points of attack for possible target therapies. CCR4 has not been investigated much to date, but in connection with the positive result in this work it represents a good foundation for further investigations.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histonoktamer	31
Abbildung 2: Galektine gruppiert anhand ihrer CRD Abbildung in Anlehnung an (Wang et al., 2019c).	41
Abbildung 3: Auszug verschiedener Funktion durch Galektin 8 Abbildung in Anlehnung an (Mielczarek-palacz et al., 2022)	44
Abbildung 4: H3K4me3 Expression in CIN I bis CIN III in zehnfacher Vergrößerung.	67
Abbildung 5: H3K9ac-Expression in den CIN-Stufen CIN I bis III in zehnfacher Vergrößerung.	71
Abbildung 6: CCR4-positive Zellen in der CIN I bis CIN III.	75
Abbildung 7: Beispiel für die Infiltration von CCR4-positiven Zellen in das dysplastische Epithel der CIN III	79
Abbildung 8: Gal 8-Expression in CIN I bis CIN III.	82
Abbildung 9: Galektin 9-Expression in CIN I bis CIN III.	86

Grafikverzeichnis

Grafik 1: Mann-Whitney-U Test zur H3K4-Expression in den einzelnen CIN-Stufen	57
Grafik 2: Mann-Whitney-U Test zu H3K4-Expression in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung in der CIN II Gruppe	58
Grafik 3: Mann-Whitney-U Test zu H3K9-Expression in den einzelnen CIN-Stufen	61
Grafik 4: Mann-Whitney-U Test zu H3K9-Expression in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung innerhalb der CIN II Gruppe nach Re- und Progression	62
Grafik 5: Mann-Whitney-U Test zu CCR4-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen	65
Grafik 6: Mann-Whitney-U Test zu CCR4-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung der einzelnen CIN-Stufen in Re- und Progression	66
Grafik 7: Mann-Whitney-U Test zu CCR4-Expression im dysplastischen Epithel in den einzelnen CIN-Stufen	69
Grafik 8: Mann-Whitney-U Test zu CCR4-Expression im dysplastischen Epithel in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung der einzelnen CIN-Stufen in Re- und Progression	69
Grafik 9: Mann-Whitney-U Test zu Gal8-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen	72
Grafik 10: Mann-Whitney-U Test zu Gal8-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung der einzelnen CIN-Stufen in Re- und Progression	73
Grafik 11: Mann-Whitney-U Test zu Gal9-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen	76

Grafik 12: Mann-Whitney-U Test zu Gal9-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung der einzelnen CIN-Stufen in Re- und Progression

76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung nach Münchener Nomenklatur.	26
Tabelle 2: Klassifikation der CIN	27
Tabelle 3: Auszug ausgewählter Chemokine mit ihrer Veränderung bei Gebärmutterhalskrebs.	38
Tabelle 4: Übersicht zu Funktionen und vermittelter Signaltransduktionen zu Galektin 9.	46
Tabelle 5: Patientenkollektiv	51
Tabelle 6: Liste verwendeter Chemikalien	53
Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte und Materialien	54
Tabelle 8: Hergestellte Lösungen	55
Tabelle 9: Verwendete Antikörper	57
Tabelle 10: Verwendete Software	57
Tabelle 11: Färbeprotokoll	61
Tabelle 12: Immunreaktiver Score Quelle: Lothar Thomas: Labor und Diagnose (Lothar Thomas, 2005)	61
Tabelle 13: Anzahl ausgewerteter Schnitte für untersuchte Marker.	65
Tabelle 14: Deskriptive Statistik zu H3K4me3.	66
Tabelle 15: Deskriptive Statistik zu H3K4me3 in der CIN II.	70
Tabelle 16: Deskriptive Statistik zu H3K9ac. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.	70
Tabelle 17: Deskriptive Statistik zu H3K9ac in der CIN II.	74
Tabelle 18: Deskriptive Statistik zur Expression von CCR4 im Stromaepithel der CIN-Stufen. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte basierend auf der Auszählung von drei Gesichtsfeldern in 10-facher Vergrößerung.	75
Tabelle 19: Deskriptive Statistik zu CCR4 positiven Zellen im Stromaepithel der CIN II. Die angegebene Werte sind gerundete Mittelwerte basierend auf der Auszählung von drei Gesichtsfeldern in 10-facher Vergrößerung.	78
Tabelle 20: Deskriptive Statistik zur Expression von CCR4 in dysplastischen Epithel der CIN-Stufen. Angegebene Werte sind gerundete Mittelwerte basierend auf der Auszählung von drei Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung.	78
Tabelle 21: Deskriptive Statistik zur Expression von CCR4 in dysplastischen Epithel der CIN-Stufen. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte	

basierend auf der Auszählung von drei Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung.	81
Tabelle 22: Deskriptive Statistik zu Galektin 8 in CIN I bis CIN II. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.	82
Tabelle 23: Deskriptive Statistik zu Gal 8 in der CIN II. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.	85
Tabelle 24: Deskriptive Statistik zu Gal 9 in CIN I bis CIN III. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.	85
Tabelle 25: Deskriptive Statistik zu Gal 9 in der CIN II. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.	88
Tabelle 26: Übersicht zu den signifikanten Ergebnissen aus der Spearman-Korrelationsanalyse aller untersuchten Marker und den CIN Stufen CIN I, CIN II reg, CIN II pro und CIN III. n: Anzahl CCR4 d: CCR4 positive Zellen in der Dysplasie CCR4 s: CCR4 positive Zellen im Stroma *: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. **: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.	89

Abkürzungsverzeichnis

A

APC Adenomatous-polyposis-colı-Protein
APCs antigenpräsentierenden-Zellen
Aqua dest. Destilliertes Wasser
ATP Adenosintriphosphat

C

CC Zervixkarzinom
CCL17 Chemokinligand 17
CCL2 Chemokinligand 2
CCL20 Chemokinligand 20
CCL22 Chemokinligand 22
CCL8 Chemokinligand 8
CCR2 Chemokinrezeptor 2
CCR2B Chemokinrezeptor 2B
CCR4 Chemokinrezeptor 4
CCR6 Chemokinrezeptor 6
Cfp1 CPG-bindendes Protein
CIN Cervikale intraepitheliale Neoplasie
c-MET Hepatocyte growth factor receptor
CpG-Dinukleotids 5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
CRD Kohlenhydraterkennungsdomäne
CRP C-reaktives Protein

D

DAPK death-associated protein kinase
DC dendritische Zellen
DNA Desoxyribonukleinsäure
DNMT-1 DNA-Methyltransferase 1
DNMTs DNA-Methyltransferasen

E

E2F Elongationsfaktor 2
E6 onkogenes Protein 6 des humanen Papillomvirus 16
E7 onkogenes Protein 7 des humanen Papillomvirus 16
ECM Extrazelluläre Matrix
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
ELP3 Elongatorkomplex 3
ERK extracellular-signal regulated kinases

F

FAK fokale Adhäsionkinase
FoxP3 Forkhead-Box-Protein P3

G

Gal Galektin
GCN5 gcn5-related n-acetyltransferase
G-CSF Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor
GNAT Gcn5 N-Acetyltransferasen
GPIb Glykoprotein Ib

H

H1 Histon H1 / Linker DNA
H2A Histonprotein 2A
H2B Histonprotein 2B
H3 Histonprotein 3
H3K4me3 Trimethyliertes Histon H3 an Lysinrest 4
H3K9ac Acetylierung am 9. Lysinrest des Histon-H3-Proteins
H4 Histonprotein 3
HATs Histonacetylaser, Histonacetyltransferasen
HBO1/MYST2 HAT bound to replication origin recognition complex 1 / MYST 2
HDACs Histondeacetylaser, Histon-Deacetylaser
HeLa-Zellen Henrietta-Lacks-Zellen
HMTs Histonmethyltransferasen
HPV Humanes Papillomvirus, Humanes Papillomvirus

I

INF Interferon
IRS immunreaktiver Score

J

JNK c-Jun-n-terminale Kinase 5, C-Jun-N-terminale Kinase, Januskinase

K

KDM2B Lysin-spezifische Demethylase 2B
KDM5A Lysin-spezifische Demethylase 5A
KDM5A-D/JARID1A-D Lysine-spezifische Demethylase 5A
KDM5C Lysin-spezifische Demethylase 5C, Lysin-spezifische Demethylase 5C, Lysin-spezifische Demethylase 5C

L

LC Langerhans-Zellen
LCK Thyrosinkinase LCK
LCR Long control region
LGALS8-AS1/miR-125b-5p/SOX12 Galektin-8-antisense-RNA-1/ microRNA-125b-5p/ SRY-Box Transcription Factor 12
LRP1 Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
LYN Tyrosinkinase Lyn

M

MAPK MAP-Kinase
MDC Macrophage-derived chemokine
MDSC myeloische Suppressorzellen

MGMT O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase
MHC Haupthistokompatibilitätskomplex
MLL1-4 mixed lineage leukemia Gene 1-4
moDCs von Monozyten abgeleitete dendritischen Zellen
MOF/MYST1 male absent on the first / MYST 1
MORF/MYST4 MOZ-related factor / MYST 4
MOZ/MYST3 monocytic leukemia zinc finger protein (MYST 3)
MRC2 Mannose Receptor C Type 2
MYST MYST-Genfamilie

N

NAD Nikotinadenosindinukleotid
NF-κB Nukleärer Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen
NK-Zellen natürliche Killerzellen

P

p16 Protein 16
p21 Protein 21
p300 Protein 300
p53 Protein 53
PAK2 p21-aktivierte Kinase 2
PAK3 p21-aktivierte Kinase 3
PAP Papanicolaou-Abstrichtests
PBS phosphate-buffered saline
PCAF P300/CBP-associated factor, P300/CBP-associated factor
PDPN Podoplanin
PI3K Phosphatidylinositol-3-Kinase
pRB Riboblastomprotein
PTMs posttranskriptionale Modifikationen

R

RANKL RANK-Ligand
RELA REL-assoziiertes Protein / p65
RNA- Ribonukleinsäure

S

SDF-1 stromal cell-derived factor 1 / CXCL12
SEC Superelongationskomplexe
Set1 Histonmethyltransferase Set1
Set1/COMPASS Proteinkomplex assoziiert mit Set 1 (Histonmethyltransferase)
SP1 Transkriptionsfaktor SP1 (specificity protein 1)
STAT5 Signal transducer and activator of transcription 5, Signal transducer and activator of transcription 5
STING Stimulator-für-Interferon-Gene

T

TAM tumorassoziierte Makrophagen
TARC thymusaktivitätsreguliertes Chemokin
TGF-β1 tumor growth factor beta 1
TIM-3 Hepatitis-A-Virus-Zellrezeptor 2

TIP60 Tat interacting protein of 60 kDa

TME Tumormikroumgebung

Tregs regulatorische T-Zellen

TSSs Transkriptionsstartstellen

V

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

A

α M β 2/Mac1 Macrophage-1 Antigen

1. Einleitung

1.1 Überblick: Das Zervixkarzinom und die zervikalen intraepithelialen Neoplasien

Weltweit ist das invasive Zervixkarzinom (CC) nach dem Mamma-, Kolon- und Bronchialkarzinom das vierhäufigste Karzinom der Frau. In Deutschland liegt die Inzidenz bei 8,6 pro 100.000 Frauen und ist damit die 13.-häufigste Tumorentität (WHO et al., 2020). 2018 erkrankten in Deutschland 4320 Frauen an Gebärmutterhalskrebs mit mittlerem Erkrankungsalter bei Erstdiagnose von 55 Jahren (Robert Koch-Institut (Hrsg) et al., 2021). Ein Hauptrisikofaktor ist die Infektion mit dem humanen Papillomvirus (HPV), insbesondere der high-risk Typen 16 und 18 (Walboomers et al., 1999). Ein sehr geringer Anteil der Zervixkarzinome weist HPV-Negativität auf (Xing et al., 2020). Weitere Hauptrisikofaktoren sind das Vorliegen von prämalignen Läsionen (Präkanzerosen) sowie genetische und nicht-genetische Co-Faktoren wie Rauchen, früher Sexualkontakt und Promiskuität, eine hohe Geburtenzahl und die Langzeiteinnahme von Kontrazeptiva (AWMF et al., 2022b).

Insgesamt ist die Inzidenz für das Zervixkarzinom innerhalb der letzten Jahrzehnte rückläufig. Der Rückgang ist auf eine bessere Inanspruchnahme der Krebsvorsorge durch die Bevölkerung zurückzuführen, wodurch Vorstadien früher erkannt und therapiert werden können (Seifert et al., 2014). Die Einführung des flächendeckenden Impfangebots gegen das Humane Papillomvirus (HPV) kann aktuell den Rückgang der Inzidenz noch nicht erklären, Studien weisen aber stark auf einen positiven Zusammenhang zwischen der Impfung und dem Rückgang der Erkrankungsrate hin (Drolet et al., 2015), (Lei et al., 2020). Entsprechend ist dafür die Inzidenz an Präkanzerosen bei Frauen zwischen 25 und 35 Jahren gestiegen (Beckmann et al., 2005).

Die Therapie des Zervixkarzinoms sollte stets unimodal und individuell verlaufen und dabei das jeweilige Staging, den histologischen Befund, den Lymphknotenstatus und den Wunsch der Patientinnen berücksichtigen. Die Einteilung erfolgt nach FIGO-Stadium. Frühe Stadien ohne Risikofaktoren sollten primär operativ behandelt werden. Bei fortgeschrittenen Stadien und Risiken wird

die simultane Radio-Chemotherapie empfohlen. Bei metastasierten Tumoren wird zu einer simultanen Chemo- mit Antikörper- oder Checkpoint-Inhibitor-Therapie geraten (AWMF et al., 2022c).

Die zervikale Neoplasie stellt die Präkanzerose für das Zervixkarzinom dar. Sie stellt eine metaplastische, nichtinvasive Veränderung des Zylinderepithels im Bereich der Transformationszone dar. Die Einteilung der dysplastischen Veränderungen erfolgt anhand zwei verschiedener Methoden: anhand des zytologischen Papanicolaou-Abstrichtests (PAP) wird nach der Münchener Nomenklatur III die Dysplasie in fünf Grade (PAP 0 – PAP V) und anhand des histologischen Befunds in CIN I – III eingeteilt. Ein weiteres zytologisches Bewertungssystem stellen die Bethesda-Kriterien dar, welche vorwiegend im anglo-amerikanischen Raum Verwendung finden, jedoch auch in Deutschland angewendet werden. Die Einteilung anhand des PAP-Abstrichs beinhaltet auch physiologische Befunde und schließt Risikofaktoren aus der Anamnese mit ein. In den folgenden Tabellen 1 und 2 sind die Einteilung nach Münchener Nomenklatur sowie nach Histologie dargestellt.

Klassifikation	Bedeutung	Zytologischer Befund
Pap 0	Material nicht ausreichend für Befundung	Nicht möglich
Pap I	Physiologischer Befund	Unauffälliger Befund
Pap II	Physiologischer Befund mit Einschränkung und grenzwertig auffälligem zytologischen Befund	Pap II-a: Unauffälliger Befund (Pap I) mit Risikoanamnese Pap II-e: Endometriumzellen bei Patientinnenalter >40 J. Pap II-g: Veränderte zervikale Drüsenzellen Pap II-p: Geringgradig kernveränderte Plattenepithelzellen (<CIN 1)
Pap III	Unklarer Befund	Pap III-e: Abnorme endometriale Zellen (insb. in der Postmenopause) Pap III-g: Ausgeprägte Zellatypien des Drüsengewebes, Adenocarcinoma in situ der Zervix/Adenokarzinom möglich

		Pap III-x: Zweifelhafte Drüsenzellen unklaren Ursprungs
		Pap III-p: CIN 2, CIN 3 oder Plattenepithelkarzinom möglich
Pap IIID	Dysplasie mit größerer Neigung zur Rückbildung	Pap IIID1: Leichte Dysplasie (analog CIN 1)
		Pap IIID2: Mäßige Dysplasie (analog CIN 2)
Pap IV	Karzinomvorstufe	Pap IVa-p: Schwere Dysplasie oder Carcinoma in situ (analog CIN 3) Pap IVa-g: Zellbild eines Adenocarcinoma in situ der Zervix Pap IVb-p: Zellbild einer CIN 3, Invasion nicht auszuschließen Pap IVb-g: Zellbild eines Adenocarcinoma in situ der Zervix, Invasion nicht auszuschließen
Pap V	Malignom	Pap V-e: Endometriales Adenokarzinom Pap V-g: Endozervikales Adenokarzinom Pap V-p: Plattenepithelkarzinom Pap V-x: Sonstiges Malignom

Tabelle 1: Einteilung nach Münchener Nomenklatur.

Zusatzbezeichnungen: **a**: Anamnestische Auffälligkeiten, **p**: Veränderungen des Plattenepithels, **g**: Glanduläre Veränderungen, **e**: Endometrium miterfasst, **x**: Unklarer Ursprung

Quelle: mit freundlicher Genehmigung von AMBOSS GmbH (AMBOSS.)

CIN-Klassifikation (Histologie)	Dysplasiegrad	Bethesda-System (Zytologie)
CIN 1	Leichte Dysplasie Epithelschichtung weitgehend erhalten Polaritätsstörungen und Mitosen im unteren Drittel des Epithels Evtl. Koilozyten	LSIL
CIN 2	Mäßige Dysplasie Aufhebung der Epithelschichtung bis in das mittlere Drittel des Epithels Evtl. Koilozyten	HSIL
CIN 3	Schwere Dysplasie oder Carcinoma in situ (CIS) Typische Epithelschichtung weitgehend aufgehoben	HSIL

	<p>Kernatypien und Mitosen reichen bis in Epitheloberfläche</p> <p>Basalmembran ist nicht durchbrochen</p> <p>Evtl. Koilozyten</p> <p>Assoziation mit Pap IVa/b</p>	
--	---	--

Tabelle 2: Klassifikation der CIN

Quelle: mit freundlicher Genehmigung von AMBOSS GmbH (AMBOSS.)

Entsprechend dem Schweregrad erfolgen gemäß der aktuellen Leitlinie individuelle Therapieansätze bzw. Kontrollschemata je nach Alter, Risikoprofil und Patientenwunsch. Bei einer CIN I wird eine Kontrolle in 6 Monaten empfohlen. Bei einer CIN II kann ein konservatives Abwarten und Kontrollieren in 6 Monaten oder eine chirurgische Abtragung durchgeführt werden. Eine CIN III sollte chirurgisch entfernt werden (AWMF et al., 2022c).

1.2 Epigenetische Regulationsmechanismen

Epigenetische Veränderungen modifizieren die Genaktivität ohne die grundlegende Sequenz der DNA zu verändern, wie es beispielsweise durch Mutationen geschieht. Dazu zählen die DNA-Methylierung, enzymatische Modifikationen von Histonen und der Chromatinstruktur sowie Veränderungen an nichtkodierenden RNA-Abschnitten. Durch diese Vorgänge können Genexpressionsmuster gezielt aktiviert oder inaktiviert werden, um physiologische Prozesse spezifisch den aktuellen Anforderungen anzupassen und die Zellidentität zu determinieren. Unterschiedliche Modifikationen laufen dabei meist in einem engen, dynamischen Zusammenspiel miteinander ab und sind potentiell reversibel (Allis et al., 2016), (Cedar et al., 2009), (Eissenberg et al., 2010). Durch dieses Verständnis der Epigenetik könnte auch der Zusammenhang von Umweltfaktoren, Ernährungsgewohnheiten, Lebensstil und Stressoren in Bezug auf das Krankheitsrisiko, die Tumorgenese und die psychologische Gesundheit erklärt werden (Allis et al., 2007). Insbesondere zum Verständnis der Ätiologie und der Tumorgenese werden epigenetische Veränderungen als ergänzender Ansatz zu den bereits bekannten Mechanismen

der Onkogenese untersucht (Hanahan et al., 2011). Fehlgeschlagene oder durch äußere Faktoren bzw. Infektionskrankheiten hervorgerufene fehlerhafte, epigenetische Regulationen können zu dysfunktionalen Genexpressionsmustern führen und die genomische Stabilität gefährden (Baylin et al., 2016). Die genauen Mechanismen, welche zu epigenetischen Veränderungen führen und welche funktionellen Konsequenzen sich daraus ergeben, sind noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand der aktuellen Forschung. Im Bereich des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen wurden bisher vor allem DNA-Methylierungsprozesse und Histonmodifikation untersucht (Szalmás et al., 2009).

1.2.1 DNA-Methylierungsprozesse beim Zervixkarzinom und seinen Vorstufen

DNA-Methylierung bezeichnet die kovalente Bindung einer Methylgruppe (-CH₃) an die Basen Cytosin oder Adenin. Der Methylierungsgrad entscheidet über die Anbindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren, Enhancer- und Repressorproteinen an die DNA sowie über die RNA-Transkription. Damit wird spezifisch die Genaktivität, Zellidentität und -alterung sowie das Imprinting gesteuert (Arnemann, 2019). Die DNA-Methylierung wird enzymatisch durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und Demethylasen an Methylierungszentren und -schutzzentren angepasst (Dueñas-González et al., 2005). Die Methylgruppe S-Adenosylmethionin stammt dabei aus einer Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) mit der Aminosäure Methionin und wird an der 5'-Position des Cytosins ergänzt. (Ivanova et al., 2007). In vergangenen Arbeiten wurde vor allem die Methylierung von CpG-Inseln untersucht. Dies sind DNA-Abschnitte, welche oft Genpromotoren oder Exons beinhalten und normalerweise in demethylierten Zustand, also inaktiviert, vorliegen. Ca. 1% der DNA besteht aus CpG-Inseln (Issa, 2004). Kommt es zur enzymatischen Methylierung des Desoxycytosins innerhalb des CpG-Dinukleotids, folgt eine veränderte Transkription. Verschiedene Tumorentitäten zeigen eine spezifische Methylierung und erklären zum Teil ihre Karzinogenese (Board et al., 2008), (Costello et al., 2000). Da Methylierungen durch ihre enzymatische Kontrolle reversibel sind, bieten sie einen guten Ansatz in der Therapieforschung.

Veränderte DNA-Methylierungsgrade beim Zervixkarzinom und seiner Vorstufen führen zu Veränderungen im Zellzyklus, in DNA-Reparaturmechanismen, in der Zelldifferenzierung, -proliferation und -adhäsion sowie der Zellsignalisierung und bei Stoffwechselprozessen (Fang et al., 2014b). Spezifische Hypermethylierungen wurden unter anderem im Bereich des Zellapoptose-Mediators DAPK (death-associated protein kinase), des DNA-Reparaturproteins MGMT (O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase) und der Promotorregionen der Tumorsuppressorgene APC (Adenomatous-polyposis-colı-Protein) und p16 (Protein 16) gefunden (Yang et al., 2004), (Henken et al., 2007), (Wisman et al., 2006). Hypomethylierungen zeigten sich dabei interessanterweise fortschreitend in der Entwicklung von Vorstufen zu Karzinomen und legen ein Zusammenspiel zwischen hypermethylierten Genpromotorabschnitten und globaler Hypomethylierung nahe (de Capoa et al., 2003), (Kim et al., 1994). Auch eine Infektion mit HPV verändert die DNA-Methylierung vielfältig (Johannsen et al., 2013). Die HPV-Onkoproteine E6 und E7 binden unter anderem an DNMT-1 (DNA-Methyltransferase 1) und aktivieren die Transkription zur Zellteilung durch Unterdrückung von p53 (Protein 53) und Aktivierung von pRB/E2F (Retinoblastom-Protein/Elogationsfaktor 2). Gleichzeitig wird die Expression von E-Cadherin unterdrückt und damit insgesamt die Zelladhäsion reduziert (Soto et al., 2017). Untersucht wurde auch die HPV Kontrollregion LCR (long controll region), welche die Promotorregion für die Onkogene E6 und E7 enthält und dessen Methylierung oft bei HPV-assoziierten Neoplasien gefunden wird (Johannsen et al., 2013). Die Nachbarregion, die 3'-Region des L1-Gens ist ebenfalls in methylierten Zustand mit Fortschreiten des Karzinoms assoziiert. Interessanterweise konnte innerhalb der CIN eine Korrelation zwischen der Progression von CIN-Stufen zum invasiven Karzinom und dem Methylierungsgrad von L1 gezeigt werden (Kalantari et al., 2004), (Johannsen et al., 2013). Damit könnte der Methylierungsgrad als potentieller prognostischer Marker untersucht und als zielgerichteter Therapieansatz genutzt werden.

1.2.2 Histonmodifikationen als Mediatoren der Genexpression beim Zervixkarzinom und seiner Vorstufen

Außerhalb der Zellteilung liegt die DNA in kondensierter Form als Chromatin im Zellkern vor. Chromatin besteht aus DNA, Histon und speziellen, DNA-assozierten Proteinen. Ein Histon gliedert sich dabei in ein Histonoktamer (sog. core-particel), bestehend aus einem zentralen Hetereotetramer aus je zwei H3- und H4-Molekülen sowie zwei Heterodimeren aus je zwei H2A- und H2B-Molekülen. Zusammen mit der Linker-DNA (Histon H1) bilden sie das Nukleosom (Rassow et al., 2022). Die Bindung der DNA an die Histone kommt durch ionische Wechselwirkungen der negativen Ladungen der DNA an die positiven Ladungen der Histone zustande. Für die DNA-Replikation, die DNA-Transkription oder für Reparaturprozesse muss die Zugänglichkeit der DNA koordiniert werden, damit diese Prozesse ablaufen können. Hierfür werden die Histone durch enzymatische, posttranskriptionale Modifikationen (PTMs) verändert oder durch Chromatin-Umbauprozesse verdrängt, um den Zugang zur DNA zu ermöglichen (Annunziato A., 2008). PTMs treten in der Regel am terminalen Ende des Histon-Schwanzes auf. Bisher sind acht unterschiedliche Modifikationen bekannt, die am besten verstandenen sind die der Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung (Kouzarides, 2007). Der durch Histonmodifikation ausgelöste Effekt kommt dabei allerdings vermutlich nicht direkt durch die PTMs zustande, sondern mit durch die Bindung von Nicht-Histon-Proteinen und weiteren Wechselwirkungen (Peterson et al., 2004). PTMs werden über verschiedene Klassen von Chromatin-Remodeling-Enzymen gesteuert, beispielsweise wird der Acetylierungsgrad reversibel durch Histonacetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) angepasst (Zhang et al., 2005). Welche Effekte genau dabei resultieren, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Kouzarides zeigte in seiner Übersichtsarbeit einen detaillierten Überblick über die Komplexität und die Auswirkungen von Histonmodifikationen (Kouzarides, 2007). Zusammengefasst konnte ein Zusammenhang zwischen der Rekrutierung von HATs durch Transkriptionsaktivatoren und HDACs mit Repressoren assoziiert werden (Di Gennaro et al., 2004). Eine Überexpression, Mutationen oder Amplifikationen in

HAT-Genen konnte in der Onkogenese verschiedener pädiatrischer, hämatologischer und epithelialer Tumore gefunden werden. Hingegen konnten Aberrationen von HDACs mit der Ausschaltung verschiedener Tumorsuppressorgene wie p21 (Protein 21) in Verbindung gebracht werden (Gibbons, 2005). Entsprechend ist ein Gleichgewicht zwischen HATs und HDACs essentiell für eine kontrollierte Zellproliferation und Apoptose.

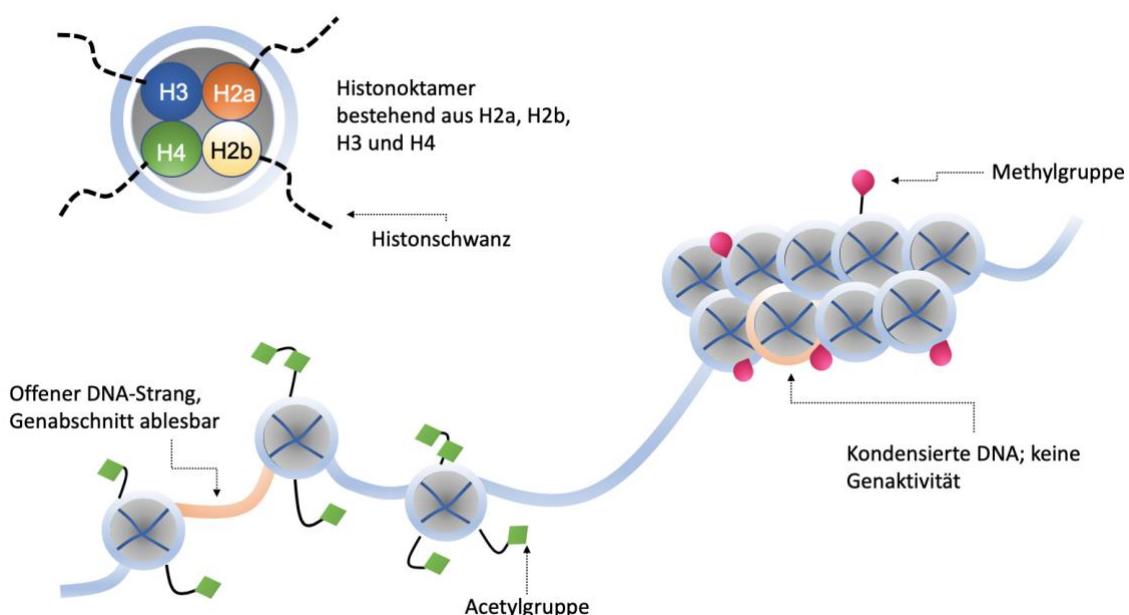


Abbildung 1: Histonoktamer

Bildliche Darstellung der offenen und geschlossenen Chromatinstruktur abhängig vom epigenetischen Status der Histone. Epigenetische Veränderungen sind reversibel und steuern so das Ablesen oder Stummschalten bestimmter Genabschnitte.

Bild in Anlehnung an Epigentek (Epigentek).

Beim Zervixkarzinom kommt es durch eine Infektion mit HPV durch Interaktion der Onkoproteine E6 und E7 mit HATs und HDACs zu einer Störung dieses Gleichgewichts zugunsten einer unkontrollierten Zellproliferation (Da Silva et al., 2021). Huang et al. konnten eine Überexpression von HDACs1 und HDACs2 zeigen, welche mit der Progression von CIN-Stufen zum Karzinom korreliert (Huang et al., 2005). Paul et al. untersuchten in einer aktuellen Studie von 2021 die chromatin-modifizierenden Gene in der Kanzerogenese des Gebärmutterhalskrebs und CIN-Stufen. Insgesamt wurden 57 Gene gefunden,

welche einzigartig verändert waren, davon zwölf Gene zur Histonphosphorylierung, neun Chromatinmodifikatoren und zwölf weitere Histonmodifikationen. Alle zeigten eine positive Korrelation mit schlechterem Gesamtüberleben. Interessanterweise zeigten sich die aberranten Expressionsmuster nicht in der CIN I, weshalb es möglich erscheint, dass Chromatin-Regulationen eher mit der Tumorprogression als der Tumorinitiation einhergehen (Paul et al., 2021). Unterstützende Ergebnisse liefert die Übersichtsarbeit von Plesa et al., die die Auswirkungen von HPV auf Histonmodifikationen, insbesondere auf HATs und HDACs zusammenfasst und gleichzeitig auch das Potential als mögliche Progressionsmarker unterstreicht (Plesa et al., 2016).

1.2.2.1 H3K4me3 und H3K9ac

Histon H3 ist eines der vier Core-Proteine des Histonoktamers. Katalysiert über spezielle Enzyme können am zugänglichen langen, n-terminalen Ende des Histon-Schwanzes an Lysin-Resten Methylgruppen gebunden oder entfernt werden. Entsprechend dem Methylierungsgrad spricht man von mono-, di- oder trimethyliertem H3 (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3) (Collins et al., 2019). Hauptmethylierungsstellen sind die Lysine K4, K9, K14, K23, K27 und K36. H3K4me3 beschreibt einen tri-methylierten Zustand am Lysin 4. Der Methylierungsgrad und die Position der Methylgruppe korrelieren mit dem Grad der Transkriptionsaktivierung. H3K4me3 ist assoziiert mit der Initiierung der Gentranskription unter anderem durch seine Anreicherung an Transkriptionsstartstellen (TSSs) sowie durch Anreicherung am 5'-Ende aktiver Gene und Interaktion mit RNA-Polymerase-II (Okitsu et al., 2010), (Sadakierska-Chudy et al., 2015). Zur Methylierung werden Methyltransferasen aktiviert, wie beispielsweise Proteine aus der Set1/COMPASS-Gruppe (Proteinkomplex assoziiert mit Set 1) und MLL1-4 (mixed lineage leukemia Gene 1-4). Die Demethylierung wird über Enzyme wie KDM5A-D/JARID1A-D (Lysine-spezifische Demethylase 5A) katalysiert (Kimura, 2013). Eine Übersichtsarbeit von Deb et al. zeigt, wie Aberrationen des H3K4-Methylierungsgrads mit der Karzinogenese und Initiation verschiedener Tumor korrelieren (Deb et al., 2014).

Histon H3 kann ebenfalls enzymatisch katalysiert an Lysinresten acetyliert werden. Acetylierungen finden vorwiegend an Position K9, K14, K18, K23 und K27 statt. Die Acetylierung von Histonen erfolgt mit dem Co-Enzym Acetyl-CoA über Histonacetylaser (HATs). Die Acetylierung geht mit dem Verlust einer positiven Ladung des Lysins am Histon-Schwanz einher, was die Chromatinstruktur relaxiert (Sadakierska-Chudy et al., 2015). HATs können in mehrere Familien gegliedert werden, unter anderem p300/CBP (protein300/CREB-binding-protein), p300 (Protein 300), TIP60 (interacting-protein-of-60-kDa), die MYST-Genfamilie (MYST) mit verschiedenen Proteinen (MOF/MYST1 (male-absent-on-the-first/MYST1), MOZ/MYST3 (monocytic-leukemia-zinc-finger-protein/MYST3), HAT1/MYST3 (HAT-bound-to-replication-origin-recognition-complex-1/MYST3), 2HBO1/MYST2 (HAT-bound-to-replication-origin-recognition complex-1/MYST2), MORF/MYST4 (OZ-related factor/MYST4)) und Gcn5-N-Acetyltransferasen (GNAT) wie PCAF (P300/CBP-associated-factor), Gcn5-N-Acetyltransferasen-5 (GCN5) und Elongatorkomplex 3 (ELP3) (Gadhia et al., 2004). Die Deacetylierung erfolgt durch Histondeacetylaser (HDACs). Inzwischen sind vier Hauptklassen bekannt: Klasse I, II und IV mit Zinkoxid (Zn^{2+}) als Co-Faktor und die Nikotinadenosindinukleotid (NAD) abhängige Klasse III / Sirtuine (Audia et al., 2016). Die dynamische Acetylierung reguliert die Genexpression und steht sowohl in Zusammenhang mit vielen physiologischen Prozessen, als auch mit onkogenen Prozessen (Grunstein, 1997).

Beide Histonmodifikationen lokalisieren auf benachbarten Genpromotoren und sind durch ihre Lage in der Nähe von TSSs und Enhancern mit erhöhter Genexpression assoziiert (Karmadiya et al., 2012). H3K4me3 trägt zur Transkriptionsinitiation bei, während H3K9ac durch Rekrutierung des Superelongationskomplexes (SEC) und Freisetzung der RNA-Polymerase II (pol II) die Elongation fördert (Gates et al., 2017).

Im Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom konnten bei der HPV-Infektion spezielle H3K4me3-Transferasenaberrationen gefunden werden. E7 verursacht eine Hochregulation der Methyltransferase Set7 (Histone-lysine N-methyltransferase SETD7) und der Demethylasen KDM5A (Lysin-spezifische Demethylase 5A). E6 und E7 überregulieren die Demethylase KDM2B (Lysin-

spezifische Demethylase 2B) und E6 forciert die proteasomale Degradation von KDM5C (Lysin-spezifische Demethylase 5C) (Ghiani et al., 2022). Zhang et al. zeigten eine Zusammenhang zwischen der Steigerung der Histonacetylierung durch HPV16 E7 (Zhang et al., 2004). HPV 16 E7 induziert das gemeinsame Auftreten von überexprimierten H3K4me3 und H3K9ac an E2F-Genen, welche den Zellzyklus aktivieren (Rajagopalan et al., 2018). Auch HeLa-Zellen, menschliche Epithelzellen aus dem Zervixkarzinom, mit integriertem HPV 18 Genom zeigten eine H3K4me3 und H3K9ac Überexpression an Promotorregionen (Johannsen et al., 2013).

Anton et al. konnten darüber hinaus bei Präkanzerosen eine Progression und Assoziation von modifizierten Histon H3 mit CIN II- und CIN III-Stufen in Verbindungen bringen (Anton et al., 2004). Beyer et al. zeigten eine signifikante Korrelation von H3K4me3 und H3K9ac als negativ prognostische Marker beim Zervixkarzinom (Beyer et al., 2017).

Diese zusammengefassten Beobachtungen initiierte die Hypothese zur weiteren Untersuchung der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9ac als prognostische Marker in der Vorstufe CIN II.

1.3 Immunmodulatorische Prozesse beim Zervixkarzinom und seiner Vorstufen

Ein funktionierendes Immunsystem muss einerseits Selbsttoleranz und Homöostase, andererseits die Erkennung und Eliminierung pathogener Moleküle und Tumorzellen leisten. Durch Umwelteinflüsse, Infektionen oder Mutationen können Zellen Transformationen unterliegen, die zur Entwicklung zur Tumorzelle führen. Zellen des Immunsystems können entsprechende Zellen erkennen und eliminieren. Die Erkennung und Zerstörung der Immunzellen über Cytokine, MHC-Proteine oder andere Mechanismen wird als Eliminierungsphase bezeichnet. Tumorzellen sind jedoch prinzipiell instabil. Dadurch, und gesteigert durch den Selektionsdruck durch die Immunreaktion, kommt es zu Mutationen, um dem Immunsystem zu entgehen. Es folgt die Gleichgewichtsphase, in der

ständig ablaufenden Prozesse die Tumorzelleigenschaften verändern, um ihr Überleben weiter zu sichern. In der Entkommensphase haben die Zellen dann einen endgültig stabilen Zustand erreicht dem Immunsystem zu entgehen und sich unkontrolliert zu proliferieren (Kenneth Murphy et al., 2018). Insbesondere chronische Entzündungen spielen in der Onkogenese eine wichtige Rolle, da sie unter anderem zytokingesteuert die Zellproliferation und -adhäsion sowie die Angiogenese moderieren und damit die Immunflucht unterstützen. Tumorzellen interagieren ständig mit ihrer Umgebung und entwickeln im Verlauf eine eigene Tumormikroumgebung (tumor micro environment, TME), welche spezielle Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen, Immunzellen, extrazellulärer Matrix und Blutgefäßen bildet und durch komplexe Signalnetzwerke die Proliferation, Metastasierung und Immunflucht des Tumorgewebes aufrecht erhält (Anderson et al., 2020).

Beim Zervixkarzinom ist HPV als entzündlicher Risikofaktor gut bekannt. Manzo-Manza-Marino et al. fasst in seiner Arbeit umfassend die kritischen Punkte der Immunregulationsstörung durch eine HPV-Infektion zusammen. Durch Mikroläsionen kann das HPV in die Zellen der Zervix eindringen und umgeht damit die erste Stufe der mechanischen und chemischen Immunabwehr. Die zytokinvermittelte Entzündungsreaktion des angeborenen Immunsystems über natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen (DC) und Langerhans-Zellen (LC) bleibt durch die Hemmung der Genexpression der dazu erforderlichen Interferone über E6 und E7 aus (Manzo-Merino et al., 2020). Ohne Zytokinaktivierung wird keine T-Lymphozyten-vermittelte zytotoxische Reaktion eingeleitet (Patel et al., 2009). Es kommt zur Immunflucht. Dieses Verständnis über die genauen Mechanismen der HPV-Infektion und Tumorinduktion verhalf zur Entwicklung des Impfstoffs, der Antikörpertiter gegen das Capsidprotein L1 induziert und so eine Infektion mit HPV verhindert (Kenneth Murphy et al., 2018).

Das Verständnis über die unterschiedlichen Einflüsse und Auswirkungen auf das Immunsystem bietet Anhaltspunkte zur Suche nach neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen, wie Checkpointinhibitoren und Prognosemarkerbestimmungen (Taniguchi et al., 2014). Die TME des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen wird aktuell erforscht. Es existieren

Übersichtsarbeiten zu Chemokinen und Zytokinen im CC und Studien zu genauen Mechanismen von Immunzellen, Liganden und Mediatoren.

1.3.1 Die Koordination und die Steuerung zellulärer Immunprozesse durch Chemokine

Chemokine sind chemotaktisch aktive Zytokine, welche vor allem in der Frühphase einer Entzündungsreaktion die Migration und Invasion von Leukozyten und Lymphozyten zum Entzündungsort koordinieren. Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren. Die Bindung von Chemokinen an ihren Rezeptor löst eine intrazelluläre Signalkaskaden aus, welche eine Veränderung des Zellzytoskeletts und der Zelladhäsion nach sich ziehen, um eine gerichtete Bewegung der Immunzellen zu induzieren, die Angiogenese zu fördern und eine bestimmte Immunreaktion auszulösen. Chemokine werden als Reaktion auf endo- und exogene Reize von vielen unterschiedlichen Zellen exprimiert und moderieren sowohl Immunabwehrmechanismen, als auch immunsupprimierende Prozesse zur Erhaltung der Selbsttoleranz (Kenneth Murphy et al., 2018). Zudem spielen sie eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen.

Zum aktuellen Wissensstand sind 50 verschiedene Chemokine bekannt, welche in zwei Gruppen eingeteilt werden können. CC-Chemokine mit zwei benachbarten Cysteinresten am Aminoterminal sowie CXC-Chemokine, bei denen die Cysteine durch eine andere Aminosäure getrennt dastehen (Barnes et al., 2012).

Chemokine spielen eine entscheidende Rolle in der TME (88). Bei einem entsprechenden Reiz rekrutieren sie antitumorale Effektorzellen wie $\gamma\delta$ -T-Zellen und CD4 + - bzw. CD8 + -T-Zellen zur Zellzerstörung. Tumorzellen können das Chemokinprofil ihrer TME zu ihren Gunsten verändern und immunsupprimierende Immunzellen wie regulatorische T-Zellen (Tregs), tumorassoziierte Makrophagen (TAM) sowie myeloische Suppressorzellen (MDSC) anlocken, welche die Effektorzellen unterdrücken (Chow et al., 2014). Das Expressionsprofil der TME beim Zervixkarzinom und bei HPV-infizierten

Zellen wird derzeit untersucht. Garrido et al. stellen in einem Übersichtsartikel verschiedene Chemokine auf ihre Rolle als Prognosemarker und in der Karzinogenese des CC vor (Garrido et al., 2021). Auszüge aus dem Zusammenhang zwischen Chemokinen und dem Zervixkarzinom ist in der folgenden Tabelle 3 dargestellt.

Chemokin	Rezeptor	Wirkung	Im Zervixkarzinom	Verweis
CCL2 (MCP-1)	CCR2B	Aktiviert Makrophagen, fördert Th2-Immunität	Verminderte Expression während CIN-Progression, fördert Tumorprogress	(Kleine-Lowinski et al., 1999)
CCL8	CCR2	rekrutiert Makrophagen über CCR2-NF-κB-Weg (Aktiviert durch ZEB1)	Erhöhte Spiegel als unabhängiger Prognosefaktor	(Chen et al., 2019)
CCL17	CCR4	Reguliert Th2-Antwort über selektives Anlocken von CCR4 ⁺ Th2-Gedächtnis-/Effektor-T-Zellen	Erhöhte Spiegel fördern Zellproliferation über JNK- und STAT5-Signalwege	(Liu et al., 2015)
CCL20	CCR6	Chemotaxis von Tregs und Th17-Zellen (Untergruppe)	Hemmung durch HPV E6 und E7 führt zur Immunflucht	(Jiang et al., 2015)

		von Interleukin- IL-17- produzierenden CD4 ⁺ T-Zellen)		
CCL22	CCR4	Rekrutiert Treg-Zellen	Höhere Expression korreliert mit schlechterem Gesamtüberleben	(Wang et al., 2019b)

Tabelle 3: Auszug ausgewählter Chemokine mit ihrer Veränderung bei Gebärmutterhalskrebs.

Tabelle in Anlehnung an Tabellen aus (Garrido et al., 2021) und (Kenneth Murphy et al., 2018).

Auch CXC-Chemokine wurden von Kong et al. auf ihr prognostisches Potential und ihren Einfluss im Rahmen des CC untersucht. CXCL 1 bis CXCL 5 und CXCL 8 korrelierten dabei mit einer positiven Prognose und CXCL 9 bis CXCL11 mit der Rekrutierung einer antitumoralen Antwort durch Leukozyten. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren waren dabei der nukleäre Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen (NF-κB), das REL-assoziertes Protein / p65 (RELA) und der Transkriptionsfaktor „specificity protein 1“ (SP1) mit den assoziierten Kinasen p21-aktivierte-Kinase 2 und 3 (PAK2, PAK3) sowie die Tyrosinkinasen Lyn und LCK (LYN, LCK) (Kong et al., 2021).

Chemokine selbst werden durch bestimmte Zytokine aktiviert, die die Immunzellen sezernieren und so in gegenseitiger Wechselbeziehung stehen. Entsprechend wurde auch das Zytokinprofil beim CC untersucht. Carrero et al. beschrieben tumorprogressive Zytokine wie die Interleukine 1, 6, 8, 10, 17, 32 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-32) und die Chemokin-Liganden 2 und 5 (CCL2 und CCL5), daneben auch tumorsupprimierende Zytokine wie die Interleukine 2, 12, 21, 10, 32, 37 (IL-2, IL-12, IL-21, IL-10, IL-32, IL-37) und Interferon Gamma (INF-γ). Interessanterweise gibt es auch hybride Zytokine wie tumor-growth-factor-beta-1 (TGF-β1), die in sowohl pro- als auch antitumorale Effekte zeigen. TGF-β1 wirkt inhibierend auf die Karzinogenese in präkanzerösen Vorstufen,

jedoch tumorprogressiv in höhergradigen Dysplasien und im CC (Carrero et al., 2021).

1.3.1.1 CCR4 in der Onkogenese und im Zervixkarzinom

CCR4 ist der Chemokin-Rezeptor-4, welcher die Liganden CCL22 und CCL17 bindet und wird von regulatorischen T-Zellen produziert wird (Rapp et al., 2019). Es bindet die Chemokine CCL22 und CCL17. CCL22/MDC (Macrophage-derived chemokine) wird von dendritischen Zellen (DC-Zellen), Makrophagen und B- bzw. T-Zellen exprimiert und durch Interleukin-4, Interleukin-13 und T-Zellen induziert. Es sorgt für die Migration von CCR4+-Treg Zellen in das Gewebe (Rapp et al., 2019). CCL17/TARC (thymusaktivitätsreguliertes Chemokin) wird von Basophilen, NK-Zellen und Th2-Zellen exprimiert und rekrutiert CCR4+ Th2-Zellen (Liu et al., 2015). CCL17 induziert über unterschiedliche Signalwege die Zellproliferation im Zervixkarzinom (Liu et al., 2015). Die erhöhte Anzahl von CCR4+ Treg Zellen durch CCL22 führt zur Immunflucht der Tumorzellen. Tregs werden oft in Tumorgewebe gefunden. Sie exprimieren Zytokine wie TNF-β oder IL-10 und unterdrücken direkt die Th1-Zell-Antwort (Kenneth Murphy et al., 2018). FoxP3 (Forkhead-Box-Protein P3) ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor von Treg-Zellen.

Im Rahmen des Ovarialkarzinoms wurden eine Überexpression der intratumoralen Zytokine CCL22 und CCL28 entdeckt, welche CCR4+- und CCR10+-Tregs anziehen und über VEGF (vascular endothelial growth factor) die Angiogenese verstärken (Curiel et al., 2004). CCR4+-Tregs sind auch für die Bildung von Lungenmetastasen bei Brustkrebs verantwortlich, indem sie die Apoptose von NK-Zellen induzieren (Olkhanud et al., 2009). Liu et al. konnten unter anderem zeigen, dass die Expression von CCL17 in zervikalen Dysplasien durch Hypoxie angeregt wird und eine Zellproliferation über JNK- (c-Jun-N-terminale Kinasen) und STAT5- (signal transducer and activator of transcription 5) Signalwege induziert. Daneben untersuchten sie CCL22 als rekrutierendes Chemokin für Treg-Zellen und korrelierten die Expression mit einem niedrigeren Gesamtüberleben (Liu et al., 2015). Zhao et al. untersuchten

ebenfalls die immunsupprimierenden Faktoren FoxP3, CCL22 und CCR4. In der Tumorumgebung konnte eine signifikant stärkere Expression als in gesunden Zervixepithel gezeigt werden und die Konzentration korrelierte zudem mit einer Zunahme des Dedifferenzierungsgrads. Darüber hinaus konnten sie feststellen, dass die Faktoren untereinander ihre mRNA-Expression verstärkten. Die Korrelation war stärker in HPV-positiven als in HPV-negativen Zellen (Zhao et al., 2017). Slettenaar et al. zeigte eine Expression von CCR4 in infiltrierenden Makrophagen, regulatorischen T-Zellen in dysplastisch verändertem Gewebe der Zervix und in Tumorzellen. Gesundes Gewebe hingegen zeigte kaum eine Expression von CCR4+ Makrophagen oder Tregs (Slettenaar et al., 2006). Ob die CCR4 Expression auch mit dem Fortschreiten beziehungsweise Regress der CIN II korreliert, war Gegenstand dieser Forschungsarbeit.

1.3.2 Galektine und ihre Rolle als prognostische Marker zervikaler Neoplasien

Galektine (Gal) sind Proteine aus der Lektin-Familie mit Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) für beta-Galaktoside, welche an glykolierte Liganden binden und Signaltransduktionen auslösen können (Rabinovich et al., 2007). Sie werden im Zellkern gebildet und zytosolisch sezerniert, eine extrazelluläre Sekretion findet aufgrund der fehlenden Signalsequenz Golgi-Apparat-unabhängig statt (Varki et al., 2015). Die funktionellen Wirkungen finden sowohl intra- als auch extrazellulär bei der Interaktion mit Glykoproteinen und -lipiden bzw. mit nukleären und zytoplasmatischen Proteinen statt. Anhand der CRDs werden Galektine in drei Gruppen eingeteilt (Yang et al., 2008). Diese werden in folgender Abbildung dargestellt.

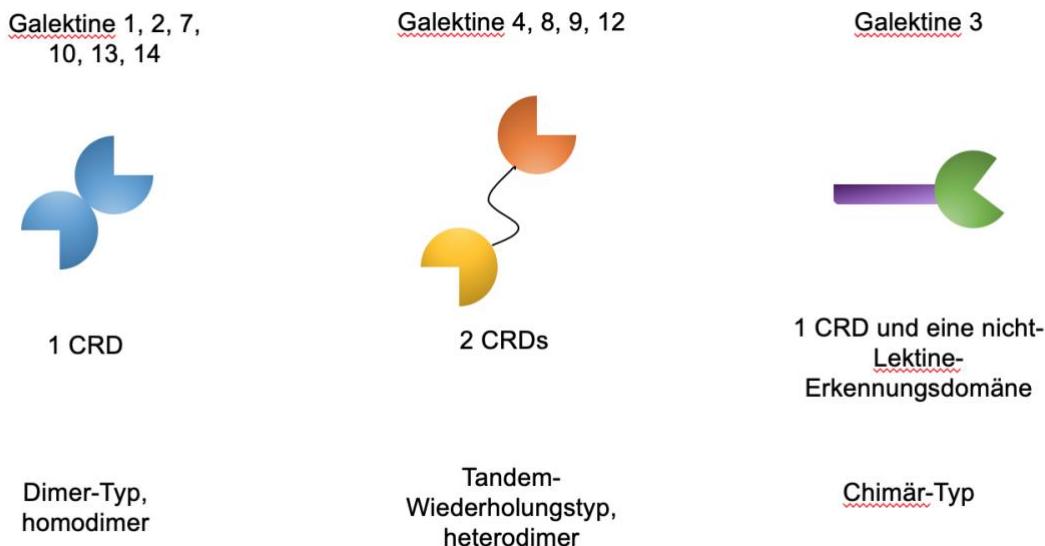


Abbildung 2: Galektine gruppiert anhand ihrer CRD

Abbildung in Anlehnung an (Wang et al., 2019c).

Galektine üben vielfältige Funktionen aus. Durch die Bindung von Kohlenhydraten induzieren sie Signalwege, welche unter anderem die Zellproliferation und die Apoptose, immunologische Signalwege und Entzündungsprozesse regulieren (Yang et al., 2008). Sie wirken damit als Moderatoren zwischen intrazellulären und extrazellulären Signalen auf die Zelle. Die Bindung findet dabei interessanterweise für jedes Galektin an spezifischen Oligosacchariden statt (Leffler et al., 2002). Liu et al. fassten die Rolle von Galektinen bei der Tumorentwicklung und -progression sowie der Metastasierung zusammen und beschrieben vielfältige Effekte von Dysregulation des Zellzyklus, der Zellproliferation, der Apoptose, der Zelladhäsion und -invasion, innerhalb der Angiogenese und der Hypoxieinduktion sowie die Umgehung der Immunregulation (Liu et al., 2005). Dabei ist darauf hinzuweisen, dass dasselbe Galektin interessanterweise bei unterschiedlichen Tumoren abweichende und zum Teil gegenteilige Effekte hervorrufen kann (Wang et al., 2018b).

Beim Zervixkarzinoms wurden Galektine aufgrund ihrer verzweigten, teils spezifischen Funktionen auf ihr Potential als Prognosemarker und auf neue Therapieansätze hin untersucht. Es zeigte sich, dass vermehrtes Galektin-1 mit dem CIN-Status korreliert (Kohrenhagen et al., 2006). Für Galektin-3 hingegen

konnte eine starke Expression im physiologischen Epithel der Zervix festgestellt werden und eine Abnahme bei zunehmenden CIN-Stufen (Lee et al., 2006). Ebenfalls ging eine verminderte Expression von Galektin 7 mit einem verbesserten FIGO-Status, einem längeren Überleben und der Lymphknotenmetastasierung im Zervixkarzinom einher (Zhu et al., 2013). Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression vor einer Strahlentherapie mit einem verbesserten Therapieansprechen korreliert (Tsai et al., 2013). Diese Arbeit konzentriert sich auf die Galektine 8 und 9.

1.3.2.1 Galektin 8 in der Tumorbiologie

Durch Alternatives mRNA Spleißen sind sechs verschiedene Isoformen von Galektin 8 (Gal 8) bekannt. Interessanterweise zeigen die CRDs von Gal 8 Affinitäten zu unterschiedlichen Oligosacchariden. Die C-terminalen Enden binden bevorzugt zu N-Glykan-Typ verzweigten Zuckern, während die N-terminalen Enden stärker an α 2-3- sialylierte oder 3'-sulfatierte β -Galactoside binden (Mielczarek-Palacz et al., 2022). Galektin 8 zeigt ein weites Spektrum an induzierten Signalkaskaden durch Wechselwirkungen mit glykolierten Liganden oder zuckerunabhängig durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, welche im Detail noch nicht verstanden sind (Hsu et al., 2002).

Gal 8 induziert seine modulatorische Funktion meist über Änderungen des Expressionsniveaus von Zytokinen und Chemokinen, beispielsweise Rank-Ligand (RANKL), Interleukin 6 und 1-beta (IL-6, IL-1 β), CXCL12 (stromal cell-derived factor 1) und CCL2 (Zick, 2022). Dafür interagiert Gal 8 mit Zelloberflächenproteinen wie Integrinen. Integrine sind Adhäsionsmoleküle, welche als glykolierte Rezeptoren auf der extrazellulären Membranseite integriert sind (Alberts B. et al., 2002). Weitere Bindungspartner sind CD44 und Rezeptorkomplexe wie Mannose Receptor C Type 2 (MRC2), der Urokinase-Rezeptor (uPAR) und der low-density-lipoprotein-receptor-related-protein-1 (LRP1). Ziel ist die Aktivierung von Signalkaskaden zur Änderung der Zellphysiologie (Zick, 2022).

Beispielsweise wird durch Bindung an Integrine $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ die Tyrosinphosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin induziert, mit einer down-stream Aktivierung der Ras-MAP-Kinase- (MAPK-) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Wege. Dadurch verringert sich die Zelladhäsion (Hadari et al., 2000), (Levy et al., 2018), (Levy et al., 2006).

Durch Induktion der Expression von Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF), CCL2 und Chemokin CXC aus Endothelzellen, kann Gal 8 seine Funktion auf die Angiogenese, Metastasierung und Endotheladhäsion selbst verstärken (Zick, 2022).

Bei Entzündungen kann Gal 8 Thrombozyten durch Bindung an dessen Integrine $\alpha IIb\beta 3$ und Glykoprotein Ib (GPIb) aktivieren und die Adhäsion und Migration von Neutrophilen durch Bindung von Integrin Mac1 (macrophage-1 antigen) verstärken. Generell fördert es die erhöhte Expression antigenunabhängiger CD+T-Zellen. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch scheint Gal 8 einerseits mit antigenpräsentierenden-Zellen (APCs) zu binden und andererseits durch einen zweiten Mechanismus die Präsentation von Antigenen über APCs zu beschleunigen (Prato et al., 2020).

Die Sekretion von Gal 8 wird dabei vermutlich durch ausgeschüttete Zytokine von aktivierten dendritischen Zellen und B-Zellen unterstützt, gleichzeitig fördert es aber auch die Sekretion von Zytokinen wie SDF-1 und CCL2, welche die Zellmigration und die Metastasierung fördern (Mielczarek-Palacz et al., 2022).

Es folgt über Bildung eines uPAR/LRP1/Integrin-Komplex die Induktionen der ERK- (extracellular-signal regulated kinases), Akt- und JNK (C-Jun-N-terminale Kinase-) Signalwegen, mit Förderung der Expression von NF- κ B, welche wiederum die Zytokinproduktion weiter steigern (Zick, 2022), (Shatz-Azoulay et al., 2020).

Der Effekt auf die Zelladhäsion ist dabei interessanterweise abhängig vom Löslichkeitsgrad von Gal 8. Lösliches Gal 8 erhöht die Adhäsionseigenschaften, während integriertes Gal 8 diese herunterreguliert (Hadari et al., 2000). Dies könnte erklären, warum Chen et al. eine erhöhte Serumkonzentration von Gal 8 mit verstärkter Tumor-Endothel-Adhäsion bei Kolon- und Mammakarzinomen zeigten (Chen et al., 2014).

Beyer et. al untersuchten sowohl Gal 8 und Gal 9 hinsichtlich ihres Potential als prognostische Marker im CC und zeigten, dass die Expression beider Marker umgekehrt mit dem Überleben und dem Tumorprogress korrelierten (Beyer et al., 2022). Aufbauend aus diesen Ergebnissen wird in der folgenden Arbeit das Prognosepotential von Gal 8 und Gal 9 bei der CIN II untersucht.

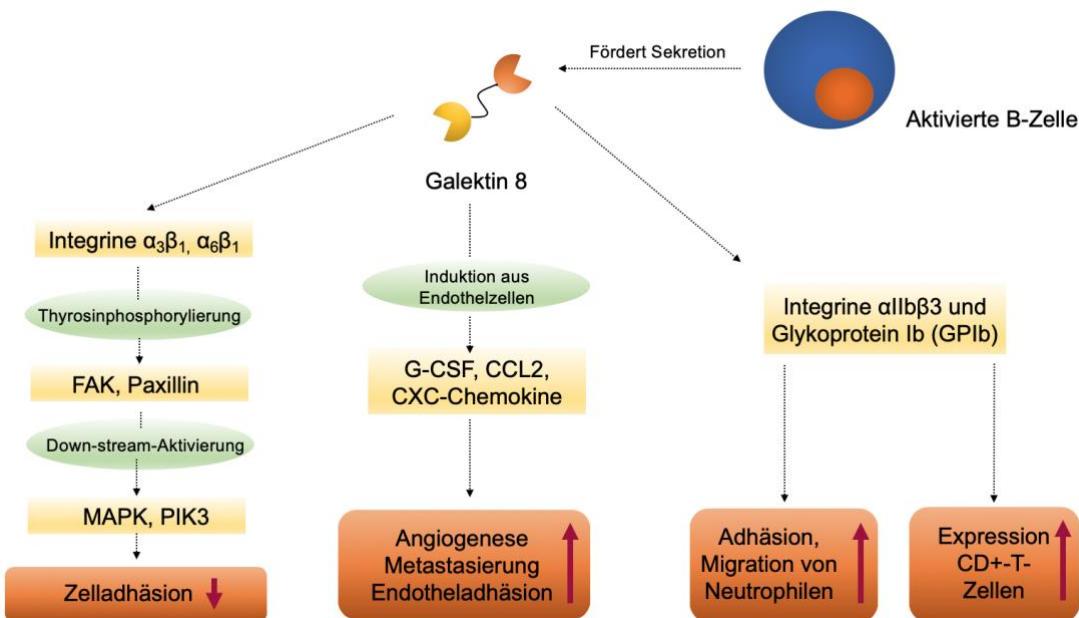


Abbildung 3: Auszug verschiedener Funktion durch Galektin 8
Abbildung in Anlehnung an (Mielczarek-palacz et al., 2022)

1.3.2.2 Galektin 9 als potentieller Prognosemarker

Galektin 9 (Gal 9) ist ähnlich zu Gal 8 ein Heterodimer mit Expression sowohl im Zytosol als auch nukleär, in der extrazellulären Matrix und auf Zelloberflächen. Es beeinflusst zahlreiche physiologische Funktionen wie die Zelladhäsion, die Zellproliferation, die Apoptose und die Zellsignalisierung (Hirashima et al., 2002). Gleichzeitig ist es ein wichtiger Einflussfaktor für viele immunologische Prozesse, welche auszugsweise in Tabelle 4 aufgeführt sind. Eine erhöhte Gal 9 Expression wurde auch bei weiteren Pathologien gemessen, unter anderem Infektionen mit Viren oder Parasiten, autoimmunen und gynäkologischen Erkrankungen, Diabetes Typ-2, koronarer Herzkrankheit, chronischem Nierenleiden oder Infertilität (Moar et al., 2021). Entsprechend spielt Gal 9 eine wichtige Rolle in der

Tumorbiologie (Lv et al., 2022). Zudem ist anzunehmen, dass Galektin 9 auch wichtige Rollen in der Embryogenese sowie in der immunologischen Zellselektion im Thymus spielt (Wada et al., 1997). Die Effekte von Galektin 9 können in Abhängigkeit von seinem Bindungspartner sowohl positive als auch negative Konsequenzen nach sich ziehen. Eine Übersicht ist in Tabelle 4 dargestellt.

Ligand	Zielzelle	Funktion	Konsequenz	Verweis
TIM-3	T-Zelle	Induktion T-Zell-Apoptose	Immunsuppression in der TME	(Yang et al., 2022)
Dectin-1	Makrophagen	Immunsuppression durch M2-Polarisierung von Makrophagen	Reduktion der Anti-Tumor-Antwort durch das Immunsystem	(Yang et al., 2022), (Chiba et al., 2014)
Todesrezeptor 3	Tregs	Fördert Treg-Expansion	Unterdrückung von Entzündungsreaktionen	(Yang et al., 2022)
4-1BB	DC NK T-Zellen	Funktionssteigerung durch erleichterte Signalübertragung	immunregulatorischer Kontrollpunkt	(Madireddi et al., 2014)
PD-1	T-Zellen	Hemmung der Gal-9/TIM-3-induzierten T-Zell-Apoptose	Schwächt Gal-9/TIM-3-induzierten Zelltod	(Yang et al., 2021)
IgE	Mastzellen / Basophile	blockiert IgE/Ag-Komplexbildung hemmt IgE/Ag-vermittelte Degranulation	Schwächt allergische Immunreaktionen ab; Mastzellstabilisierung	(Niki et al., 2009)

CD206	Makrophagen	Förderung der Angiogenese und Chemokinproduktion	Fördert das Tumorwachstum	(Enning a et al., 2018)
CD40	T-Zellen	Proliferationshemmung und Zelltodinduktion	Modulation von Autoimmunreaktionen	(Vaitaitis et al., 2012)
CD44	Treg	Fördert Differenzierung und Stabilität der Tregs durch Aktivierung des Smad3 und Foxp3	Aufrechterhaltung und Differenzierung induzierter regulatorischer T-Zellen	(Wu et al., 2014)
PDI	T-Zellen	Erhöhte Zellmigration von Th2-Zellen	Erhöhte Anfälligkeit von T-Zellen auf HIV-Infektion	(Bi et al., 2011)

Tabelle 4: Übersicht zu Funktionen und vermittelter Signaltransduktionen zu Galektin 9.

TIM 3: -Zell-Immunglobulin-Domäne und Mucin-Domänenprotein 3; **Tregs:** regulatorische T-Zellen; **4-1BB:** 4-1BB Ligand; **DC:** dendritische Zellen; **NK:** natürliche Killerzellen; **IgE:** Immunglobulin E; **Ag:** Antigen; **FoxP3:** Forkhead Box Protein P3; **PD-1:** programmed cell death protein 1; **PDI:** Proteindisulfidisomerase; **Th2:** T-Helferzelle-2

Durch seine zahlreichen Funktionen kann Gal 9 sowohl prognostisch günstig, als auch ungünstig in Abhängigkeit von der Tumorart korreliert werden. Pankreaskarzinome, die akute myeloische Leukämie und Glioblastome korrelierten negativ mit der Prognose während in einer Metaanalyse Gal 9 als potentieller positiver Prognosemarker bei soliden Tumoren quantifiziert wurde

und als potentielles Ziel für neue Therapieansätze gesehen wird (Yang et al., 2021), (Zhou et al., 2018).

Der TIM-3/Galektin-9-Signalweg wurde auch bei HPV-positiven Zervixkarzinomen untersucht. TIM-3 ist ein Immun-Checkpointinhibitor, welcher von Interferon- γ -produzierenden T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und FoxP3+-Treg-Zellen exprimiert wird und die T-Zell-Antwort hemmt (Das et al., 2017). Hohe Gal 9 und TIM-3 Spiegel korrelierten mit der Progression der Erkrankung des Zervixkarzinoms. Es wird vermutet, dass durch TIM-3/Gal 9 die Immunflucht durch Anregung von Treg-Zellen unterstützt, welche die Th1- und CD8+-T-Zellen hemmen (Chen et al., 2021).

Galektin-9 (Gal 9) konnte mehrfach als prognostischer Marker für die CIN identifiziert werden, sowohl korrelierte in der Serumspiegel bei Patientinnen mit Zervixkarzinom positiv als auch Stroma von Plattenepithelkarzinomen in CD163+ Zellen (Liang et al., 2008b), (Punt et al., 2015). Chetry et al. und Liang et al. Bestätigten unabhängig voneinander die Ergebnisse, dass eine hohe Gal 9 Expression mit in niedrigen CIN-Stufen und gesunden Epithelzellen und eine signifikante Abnahme mit höheren CIN-Stufen und bei Gebärmutterhalskrebszellen korreliert (Chetry et al., 2018), (Liang et al., 2008a).

1.4 Der Stand der Forschung zur zervikalen intraepithelialen Neoplasie

Die Inzidenz der CIN wurde in einer amerikanischen Studie an 150.000 Frauen untersucht. Die jährliche Inzidenz der CIN I betrug 1,2 pro 1000, für die CIN II und CIN III 1,5 pro 1000. Die CIN I trat dabei am häufigsten im Alter von 20 bis 24 Jahren auf, die CIN II und III etwas später im Bereich von 25 bis 29 Jahren. (Insinga et al., 2004). Die Prognose der CIN wurde in einer Meta-Analyse von Loopik et al. aus dem Jahr 2021 untersucht. Die meisten CIN I und CIN II Läsionen zeigten dabei eine spontane Regression innerhalb von 2 Jahren,

insbesondere bei HPV-negativen Patientinnen. Die Regressionsrate bei CIN III lag bei 28% (Loopik et al., 2021).

Da die CIN als nicht obligate Präkanzerose behandelbar und gut diagnostizierbar ist, gilt das Augenmerk der Forschung hier vor allem auf einem effektiven Therapiemanagement und der Untersuchung möglicher medikamentöser Therapieoptionen. Insbesondere im Stadium der CIN II konnte sich bisher kein international einheitlicher Konsens bezüglich des optimalen Therapievorgehens etablieren. Ziel ist es, Übertherapien zu vermeiden, da chirurgischer Exzisionen zu Risiken wie Frühgeburtlichkeit und Zervixstenosen führen können, aber gleichzeitig die mögliche Progressionen in ein invasives Karzinom zu verhindern (Bevis et al., 2011).

Entsprechend liegt der Forschungsfokus aktuell auf der intensiven Untersuchung von HPV sowie anderer immunologischer Mechanismen, genetischen Faktoren und epigenetischen Regulationsmechanismen, um die Ätiologie, Pathogenese und Progression der CIN und des Zervixkarzinoms besser zu verstehen und neue non-invasive Therapieverfahren und Screening-Methoden zu etablieren. Bisher konnten sich noch keine Biomarker durchsetzen (Klaes et al., 2002, Schmidt, 2016). Eine protektive Wirkung konnte bei verschiedener Ernährungsfaktoren, Nichtraucherstatus und Vermeidung genitaler Infektionen sowie die Einlage eines intrauterine device (IUD) zugeschrieben werden (AWMF et al., 2022a), (Cortessis et al., 2017). Auch das zervikale mikrobielle Milieu ist Gegenstand der Untersuchung. Hier konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Besiedelung mit zervikovaginalen Laktobazillen und einer verminderten Inzidenz von HPV-Infektionen korreliert werden (Wang et al., 2019a).

Ziel ist es, neue prognostische Biomarker für die Entstehung sowie zur Prognose einer Pro- bzw. Regression der CIN oder des Karzinoms anzeigen, und, da diese partiell potentiell reversibel sind, sie als therapeutische Ziele zu nutzen. Einzelne Marker sind aktuell nicht sensitiv genug, um eine aussagekräftige Prognose zu gewährleisten, weshalb es vorrangig gilt das gemeinsame Auftreten unterschiedlicher, spezifischer Marker zusammen für eine prognostische Tendenz zu betrachten. Im Rahmen dieser Studie wurden fünf spezifische

Biomarker untersucht, welche sich in Vorstudien als potentielle Marker herausgestellt haben und auf ihr Potential als Pro- oder Regressmarker in der CIN II getestet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Zur Erhebung dieser Studie wurden insgesamt 120 Patientinnen aus dem Datenarchiv der Dysplasiesprechstunde zwischen 2009 und 2020 aus der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München eingeschlossen. Zu den Einschlusskriterien gehörten alle Stufen der CIN I bis CIN III unabhängig von Alter, PAP-Test Ergebnis, HPV-Status bzw. Vakzinierung und Schwangerschaft. Es wurde eine homogene Gruppenverteilung pro CIN-Stufe angestrebt. Jede Patientin erhielt nach drei bis sechs Monaten mindestens eine beobachtete Folgeuntersuchung, welche einen PAP- und einen HPV-Test beinhaltete.

Das Patientenkollektiv umfasst $n = 118$ Patientinnen, davon $n = 38$ mit histologisch gesicherter CIN I, $n = 40$ mit histologisch gesicherter CIN II. Diese unterteilte sich in $n = 16$ mit anschließend gesicherter Regression und $n = 24$ mit anschließend gesicherter Progression. Außerdem enthielt das Patientinnenkollektiv $n = 40$ mit histologisch gesicherter CIN III. Die Einteilung des CIN-Grades erfolgte durch mindestens zwei unterschiedliche Pathologen des Instituts für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München anhand histologischer Untersuchung. Ein Progress wurde definiert als eine fortschreitende Dysplasie um mindestens eine CIN-Stufe, ein Regress als eine Rückbildung des Dysplasiegrades um mindestens eine Stufe. Das mittlere Intervall zur dynamischen Veränderung betrug in der CIN I 167 Tage (± 637), in der CIN II mit Regression 249 Tage (± 613) Tage, in der CIN II mit Progression 193 Tage (± 505) sowie innerhalb der CIN III 157 Tage (± 813). Patientinnen mit Zervixkarzinom wurden nicht in die Studie eingeschlossen (siehe Tabelle 5).

Des Weiteren wurden der HPV-Status, das Ergebnis des PAP-Test bei Erstvorstellung sowie der Status bezüglich des Rauchens, der Impfung gegen HPV, der Verhütungsmethode und des Alkoholkonsum aus dem Datenarchiv erhoben. Die Datenlage zu den Faktoren Rauchen, Alkoholkonsum, Impfstatus

und Verhütungsstatus waren unzureichend dokumentiert, weshalb diese nicht zur weiteren Datenanalyse herangezogen werden konnten.

Eine Genehmigung durch die institutionelle Ethikkommission der LMU zum geplanten Studiendesign wurde fristgerecht eingereicht und liegt vor (Referenznummer: 167- 14). Es erfolgte eine ausführliche Aufklärung Patientinnen sowie die Erhebung des schriftlichen Einverständnisses zur Studienteilnahme. Auf die Einhaltung aller ethischen Standards des institutionellen und/oder nationalen Forschungsausschusses und der Helsinki-Erklärung von 1964 sowie ihren späteren Änderungen oder vergleichbaren ethischen Standards wurden bei allen Verfahren mit menschlichen Teilnehmern geachtet. Das Patientenkollektiv ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Dysplasiegrad	Anzahl	Mittleres Erkrankungsalter (Jahre)	Mittlerer Abstand zum nächsten Untersuchungstermin (Tage)	HPV-Status (+ = positiv getestet, - = negativ getestet)
CIN I	n = 38	35	167 (± 637)	n + = 33 n - = 5
CIN II mit Regression	n = 16	32	249 (± 613)	n + = 16 n - = 0
CIN II mit Progression	n = 24	35	193 (± 505)	n + = 19 n - = 5
CIN III	n = 40	35	157 (± 813)	n + = 36 n - = 2 n = 2 ohne Angabe

Tabelle 5: Patientenkollektiv

2.1.2 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

In folgender Tabelle 6 ist eine Auflistung der verwendeten Chemikalien beschrieben. Die Chemikalien wurden über die Frauenklinik der LMU München Maistraße bestellt und regelmäßig auf Verbrauchsdatum und Nutzungsfähigkeit getestet. Chromogen DAB+ und das Detektionssystem wurden im Kühlschrank gelagert, die restlichen Chemikalien bei Raumtemperatur.

Chemikalie	Firma
Aqua dest.	H. Kerndl GmbH (Weissenfeld, Deutschland)
Chromogen-Substrat-Lösung Liquid DAB+ substrate chromogen system	Agilent Technologies Inc. (Glostrup, Dänemark; Manufactured in Santa Clara, USA)
Detektionssystem ZyoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit, Blocking Solution, HRP-Polymer, Post Block)	Zytomed Systems GmbH (Berlin, Deutschland)
Ethanol (50%, 70%, 100%)	50%: Apotheke Klinikum Universität München (München, Deutschland) 70%: CLN GmbH (Niederhummel, Deutschland) 100%: Sav Liquid Production (Flintsbach a. Inn, Deutschland)
EDTA	Sigma Aldrich Inc (St. Louis, USA)
Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Roticlear	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Rotimount	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Saures Hämalaun	Waldeck GmbH (Münster, Deutschland)

TrisBase	Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kanada)
Wasserstoffperoxid H2O2	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin	Microcos
Parafin	Thermo Fisher

Tabelle 6: Liste verwendeter Chemikalien

In folgender Tabelle 7 werden eine Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien aufgelistet. Die Geräte befanden sich zum Zeitpunkt der Studie im Labor der Frauenklinikum LMU Maistraße in München und wurden regelmäßig technisch verifiziert.

Gerät/Material	Firma
Abzug	SR Medizintechnik GmbH (München, Deutschland)
Beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus)	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland)
Dampfgarer Vitacuisine Compact Tefal	Tefal
Deckgläser Menzel	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Deckgläser Medite Medizintechnik	Medite Gesellschaft für Medizintechnik mbH (Burgdorf, Deutschland)
Deckgläser epredia	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Drehfisch	/
Drehfischplatte IKA-Combimag Ret	Janke & Kunkel GmbH u. Co KG (Staufen, Deutschland)
Einbettungsautomat	Shandon Pathcenter
Dosierpipetten	Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
Glasflaschen	Schott Duran
Küvetten	Karl Hecht

DELL Computer Kamerasytem	Dell
Färbeschaukeln	Roth
Färbegläser	Karl Hecht
Eisfach -20°C	Robert Bosch GmbH (Stuttgart, Deutschland)
Eisfach -20° (2)	Siemens
Feuchtkammern	Karl Hecht
Kamera - Immunhistochemie (Flexacam C1)	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Kühlschrank -4°	Robert Bosch GmbH (Stuttgart, Deutschland)
Kühlschrank -4° (2)	Siemens
Mikroskop - Immunhistochemie	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
pH-Meter HI 2210 pH Meter	Hanna Instruments
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Schlittenmikrotom	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Schüttler Vibromix 301 EVT	Tehniuca
Waage Kern 572 (0,01g)	Kern DKB-Labor (Balingen-Frommern, Deutschland)
Fettstift Liquid Block Super pap pen	ScienceServices.de
Handschuhe Vasco Nitril blue Cat III	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Handschuhe SHIELDskin™ orange nitrile™ 260 Cat III	SHIELD Scientific B.V. (Bennekom, Niederlande)

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte und Materialien

2.1.3 Protokolle für Puffer und Lösungen

In Tabelle 8 werden die Herstellungsprotokolle der verwendeten Puffer und Lösungen beschrieben. Diese wurden selbstständig hergestellt und regelmäßig erneuert.

Protokoll: Zur Herstellung aller Lösungen wurden geeignete Rezepturen aus dem institutionellen immunhistochemischen Labor verwendet. Es erfolgte die Berechnung auf das erforderliche Volumen. Nach Abwiegen der Chemikalien erfolgte die Lösung im vorgesehenen Lösungsmittel. Mittels pH-Meter erfolgte die exakte Einstellung des erforderlichen pH-Werts auf zwei Kommastellen. Bei Bedarf wurden die Lösungen auf ein Zielvolumen aufgefüllt. Die Lösungen wurden in gesäuberte Gefäße abgefüllt und beschriftet. Alle Lösungen wurden unter Berücksichtigung strenger Hygienevorschriften zur Verhinderung von Kontaminationen hergestellt.

Substanz	Herstellungsprotokoll
3%iges H₂O₂ in Methanol H₂O₂	20ml 30 %iges H ₂ O ₂ + 180ml Methanol
6%iges H₂O₂ in Methanol H₂O₂	40ml 30 %iges H ₂ O ₂ + 160ml Methanol
PBS	Zielvolumen: 200ml PBS + 1800ml Aqua dest. Ziel ph-Wert:
TRIS-EDTA	1,21 g TRIS + 0,37g EDTA + 1000ml Aqua dest.; Ziel pH-Wert: 9,0

Tabelle 8: Hergestellte Lösungen

2.1.4 Primärantikörper

In folgender Tabelle 9 sind die verwendeten Antikörper aufgelistet. Alle Antikörper wurden im zugelassenen Verfallszeitraum verwendet und bei -21 °C tiefgefroren gelagert.

Antikörper	Spezies	Firma	Bestellnummer	Konzentration	Verdünnung	DAB +
Anti-Histon H3 tri	Rabbit IgG, polyclonal	Abca m	Ab213224	0,49 mg/ml	1:500	60 sek.

methyl K4	Conc.: 0,2mg/ml; Lot: GR32638 91-1					
Anti- Histon H3 acetyl K9	Rabbit IgG, monoclon al Clon: Y28 Conc.: 0,059mg/ ml; Lot: GR13810 4-3	Abca m	Ab32129	0,059 mg/ml	1:200	30 sek.
Galectin e 8	Rabbit IgG monoclon al Clon: EPR4857	Abca m	Ab109519	0,476 mg/ml	1:150	120 sek.
Galectin e 9	Rabbit IgG polyclonal ; Conc.: 1 mg/ml; Lot: GR23039 4-2	Abca m	Ab69630	1 mg /ml	1:300	120 sek.
CCR4	Rabbit IgG polyclonal	Sigm a- Aldric h	HPA031613	0,03 mg/ml	1:100	45 sek.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper

2.1.5 Software

Tabelle 10 informiert über die verwendete Software. Die Lizenzen wurden freundlicherweise von der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München zur Verfügung gestellt.

Software	Firma
Microsoft Office 2018	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SPSS 28	PASW Statistic, SPSS Inc., IBM, IL, USA

Tabelle 10: Verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung des Patientenmaterials

Die Gewebeproben wurden freundlicherweise durch fachspezifische Kollegen des pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München nach Protokoll hergestellt.

Nach bioptischer Entnahme fand die Fixation in 4% Formalin bei Raumtemperatur für 24 Stunden mit anschließender Dehydratation durch Schwenken in aufsteigenden Alkohollösungen und Xylol statt. Zur Verhinderung von Autolyse erfolgte die Einbettung in 60° heißem Paraffin mit abschließender Kühlung auf einer geeigneten Kühlplatte. Die Gewebeblöcke wurden im institutseigenem Archiv gemäß Standards archiviert. Zur Aufbereitung auf die Objektträger wurden die Blöcke mit einem Mikrotom auf 1 µm zugeschnitten und im Wasserbad auf Objektträger aufgefangen. Danach folgte eine Inkubation für 20 Minuten bei 60° im Brutschrank.

2.2.2 Färbeprotokoll

Eine Zusammenfassung des Färbeprotokolls befindet sich am Ende des Absatzes in Tabelle 11. Für alle Antikörper wurde ein etabliertes Standardprotokoll aus dem institutseigenen Labor angewendet. Unterschiedliche Längen der Einwirkzeiten sind im Protokoll verzeichnet. Im Folgenden wird der Verlauf der Färbung im Allgemeinen beschrieben.

Zunächst erfolgte zur Entparaffinierung eine Aufbereitung der Schnitte in umgekehrter Reihenfolge zur Paraffinierung für 25 min in Roticlear und 15 Minuten in 100% Ethanol. Zur Blockade der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 20 Minuten in 3%-igem beziehungsweise 6%-igem H₂O₂ in Methanol gestellt. Zur Rehydratation wurden die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe für je drei Minuten (100%, 70%, 50%) gestellt. Nach Spülen in Aqua dest. für fünf Minuten fand eine Hitzedemaskierung im Dampfgarer mit Aqua dest. für 30 Minuten in TRIS-EDTA Lösung (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Ethylenediamintetraessigsäure Lösung) statt. Danach wurden auf eine Abkühlung auf Raumtemperatur von 21°C gewartet. Es erfolgte eine weitere Spülung in Aqua dest. für fünf Minuten unter Einsatz des Schüttlers sowie je zweimal Waschen für 5 Minuten in PBS (phosphate-buffered saline). Zur präzisen Auftragung und gegen ein Ablaufen der Lösungen wurde das Gewebe auf allen Objektträger mittels eines Fettstifts markiert. Danach fand die Absättigung gewebeeigener elektrostatischer Ladungen durch Inkubation mit Blocking Solution 1 von fünf Minuten bzw. zehn Minuten statt. Dies verhindert eine unspezifische, hydrophobe Bindung der Immunglobuline an Membranen und Fettgewebe, welche zu einer ungenauen und verfälschten Hintergrundfärbung des Primärantikörpers oder des Sekundärantikörpers im Verlauf führt. Es durchliefen die Schnitte erneutes Waschen in PBS für zwei Minuten und anschließendes Pipettieren von je 100 µl Antikörperlösung in PBS auf die Objektträger. Die Einwirkzeit des Primärantikörpers betrug 16 Stunden bei 4°C im Kühlschrank in Feuchtkammern.

Nach dem Einwirken des Primärantikörpers wurden die Schnitte zweimalig in PBS für je fünf Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Zur besseren Visualisierung der Antikörperbindung wurde nun eine Verstärkerreagenz (Post Block) für 20 Minuten aufgetragen. Die Präparate wurden erneut in PBS für je

zweimal fünf Minuten gewaschen. Um die bekannte Problematik der Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindungen bei der Streptavidin-Biotin Methoden zu umgehen, wurde mit Meerrettich-Peroxidase Polymer (Horse Radish Peroxidase, HRP) gearbeitet. Zur Enzym-Substrat-Bindung wurde diese für 30 Minuten belassen. Zum Waschen wurden die Schnitte erneut für je zweimal fünf Minuten in PBS eingestellt. Zum Starten der enzymatischen Peroxidasereaktion wurde die Substrat-Chromogen-Lösung DAB+ (Diaminobenzidin) aufgetragen, welche später als mikroskopisch sichtbarer Farbniederschlag die spezifische Bindung des Primärantikörpers mit dem Gewebe anzeigt. Zum Stoppen der Farbreaktion und Verhindern übermäßiger Farbintensität oder unspezifischer Bindungen wurden die Präparate in Aqua dest. für je zweimal zwei Minuten eingestellt und gewaschen. Im Anschluss wurde die Gegenfärbung zur Verstärkung des Kontrasts mit dem ungefärbten Gewebe für zwei Minuten in gesäuertem Hämalaun und anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten durchgeführt. Es erfolgte erneutes Dehydrieren in Alkohol in aufsteigender Reihenfolge (50%, 70%, 100%) für jeweils 3 Minuten. Abschließend wurden die Präparate in Roticlear eingestellt. Zum Eidecken wurden Eindeckgläser in entsprechender Größe mittels Rotimount verwendet.

Bei jeder Färbereihe wurde eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Auf regelmäßiges Austauschen der Waschsubstanzen, Puffer und Lösungen wurde geachtet. Auf mögliche Fehler und Störfaktoren im Färbeprotokoll wird in der Diskussion eingegangen.

Arbeitsschritt	Substanz	Zeit
Entparaffinieren	Roticlear	25 min
	100 % Ethanol	15 min
Blockade endogene Peroxidase	H ₂ O ₂ in Methanol - 3%iges: H3K4, H3K9, Gal 8, Gal 9 - 6%iges: CCR4	20 min
Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe	100% / 70% / 50% Ethanol	je 3 min

Spülen	Aqua dest.	5 min
Hitzeinduzierte Demaskierung	Dampfgarer in TRIS-EDTA	30 min
Abkühlen auf Raumtemperatur		ca. 20 min (abh. Von RT)
Spülen	Aqua dest.	5 min
Waschen	PBS	2 x 5 min
Blockade unspezifischer Hintergrundfärbung	Blocking Solution 1	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min: H3K4me3, H3K9ac, Gal8, Gal 9 - 10 min: CCR4
Waschen	PBS	1 x 2 min
Inkubation mit Primärantikörper	Primärantikörper verdünnt in PBS (100 µl pro Schnitt) <ul style="list-style-type: none"> - H3K4me3: 1:500 - H3K9ac: 1:200 - Gal 8: 1:150 - Gal 9: 1:300 - CCR4: 1:100 	16h im Kühlschrank (4°C) in Feuchtkammer
Waschen	PBS	2 x 5 min
Verstärkung der enzymatischen Antikörperbindung	Post Block	20 min
Waschen	PBS	2 x 5 min
Blockade unspezifischer Hintergrundfärbung	HPR-Polymer	30 min
Waschen	PBS	2 x 5 min
Substratfärbung	DAB+	<ul style="list-style-type: none"> - H3K4me3: 60 sek. - H3K9ac: 30 sek.

		<ul style="list-style-type: none"> - Gal 8: 120 sek. - Gal 9: 120 sek. - CCR4: 45 sek.
Stopp der Farbreaktion	Aqua dest.	2 x 2 min
Verstärken des Hintergrundkontrasts durch Gegenfärbung	saures Hämalaun	2 min
Bläuen	Leitungswasser	5 min
Hydrierung in aufsteigender Alkoholreihe	50% / 70% / 100% Ethanol	je 3 min
Fixation	Roticlear	3 min
Eindecken	Eindeckgläschchen und Rotimount	

Tabelle 11: Färbeprotokoll

2.2.3 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte anhand des semiquantitativen immunreaktiven Scores (IRS) für Antikörper H3K4me3, H3K9ac, Gal 8 und Gal 9. Hierbei wird das Produkt aus dem Anteil der positiv gefärbten Zellen mit der Intensität der Färbung gebildet. Der IRS ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Anteil positiver Zellen (A)	Intensität der Färbung (I)	IRS = A*I
0 = keine positiven Zellen	0 = keine Färbung	
1 = < 10%	1 = schwache Färbung	
2 = 10-50%	2 = mäßige Färbung	
3 = 51-80%	3 = starke Färbung	
4 = > 80%	-	

Tabelle 12: Immunreaktiver Score

Quelle: Lothar Thomas: Labor und Diagnose (Lothar Thomas, 2005)

Der Minimalwert entspricht 0, der Maximalwert 12. Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe mit einem Leitz-Mikroskop (Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Fotos wurden mit einer Immunhistochemie Flexcam C1 von Leica Microsystem (Wetzlar, Deutschland) erstellt. Für den Anteil der positiven Zellen wurde je nach Fragestellung entweder der Mittelwert aus den gezählten, positiven Zellen in drei Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung oder der positiv gefärbte, mittlere Anteil aus drei Gesichtsfeldern gewählt.

Für den Antikörper CCR4 konnte sowohl im Stroma als auch im umliegenden dysplastischen Epithel keine Unterscheidung in der Färbeintensität beobachtet werden. Entsprechend wurde hier zur Analyse die mittlere Anzahl positiver Zellen aus drei repräsentativen Gesichtsfeldern in 10-facher Vergrößerung erhoben.

2.2.4 Statistikanalyse

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 28 und Excel Microsoft 2016 durchgeführt. Für die Fragestellung, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression des untersuchten Markers (IRS) und einer CIN-Stufe existiert, wurde zunächst der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben zur Ermittlung signifikanter Gruppenunterschiede verwendet. Die Teststatistik gilt als asymptotisch Chi-Quadrat verteilt, da mehr als drei Variablen mit je mehr als neun Parametern vorlagen. Für die Fragestellung, ob es auch einen Unterschied in der zentralen Tendenz innerhalb der einzelnen CIN-Stufen zueinander gibt, wurde ebenfalls der nichtparametrischen Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben angewendet. Verglichen wurden dabei jeweils CIN I, mit CIN II mit anschließend gesicherter Regression, mit CIN II und anschließender Progression und mit CIN III.

Bei der CIN II stellen sich zudem die Fragen nach dem richtigen Therapiemanagement zwischen abwartendem Vorgehen und oder der

Durchführung einer chirurgischen Intervention, nach Prognose und nach der Sicherheit der Diagnose. Ob sich die untersuchten Marker dieser Studie als Prognose- beziehungsweise Diagnosemarker eignen könnten, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf signifikante Unterschiede im Verlauf der CIN II mit anschließend gesicherter Progression und einer CIN II mit anschließend gesicherter Regression über zwei Messwerte durchgeführt. Dies soll zum Verständnis verhelfen, welche zentrale Tendenz die Prognose annehmen könnte und ob es bei „interrater bias“ beziehungsweise der Unsicherheit über die CIN-Stufe ein zusätzliches Messinstrument zur Ermittlung der Dysplasiestufe geben könnte.

Zuletzt wurde zur Untersuchung der Korrelation zwischen der Expression der Marker und CIN eine Spearman Korrelationsanalyse über alle Marker durchgeführt.

Für alle Teststatistiken galt ein Wert $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Verwertbare Schnitte

Insgesamt wurden 158 Präparate gefärbt. Die Anzahl der CIN I betrug n = 38, die Anzahl der CIN mit anschließender Regression (CIN II reg) n = 16 mit follow up, die Anzahl der CIN II mit anschließender Progression (CIN II pro) betrug n = 24 mit follow up und die Anzahl der CIN III betrug n = 40. Präparate, welche zu wenig oder kein Material nach dem Färbevorgang aufwiesen, wurden aus dem Kollektiv entfernt. Der Verlust zeigte sich für die einzelnen Marker relativ homogen. Präparate, welche keine Expression aufwiesen, traten nur bei dem Marker CCR4 auf. Diese sind in Kapitel „4.3 CCR4 in der zervikalen Dysplasie“ aufgeführt.

Innerhalb der CIN II mit Re- bzw. Progression wurden je zwei Zeitpunkte untersucht, der erste Termin stellt die Erstdiagnose dar, der zweite Termin die Kontrolluntersuchung innerhalb von drei bis sechs Monaten. In Tabelle 13 wird die Anzahl der untersuchten Schnitte zu diesen beiden Zeitpunkten mit einem Querstrich voneinander getrennt dargestellt (n = erster Termin / n = zweiter Termin).

CIN-Stufe	H3K4	H3K9
CIN I	n = 34 (Verlust = 4)	n = 34 (Verlust = 4)
CIN II reg	n = 15 / 15 (Verlust n = 1 / 1)	n = 14 / 15 (Verlust = 2 / 1)
CIN II pro	n = 19 / 23 (Verlust n = 5 / 1)	n = 20 / 23 (Verlust n = 4 / 1)
CIN III	n = 36 (Verlust n = 4)	n = 37 (Verlust n = 3)

CIN-Stufe	CCR4 Stroma	CCR4 Dysplasie
CIN I	n = 33	n = 35

	(Verlust = 5)	(Verlust = 3)
CIN II reg	n = 13 / 14 (Verlust = 3 / 2)	n = 13 / 14 (Verlust = 3 / 2)
CIN II pro	n = 18 / 21 (Verlust n = 6 / 3)	n = 18 / 21 (Verlust n = 6 / 3)
CIN III	n = 35 (Verlust n = 5)	n = 38 (Verlust n = 2)

CIN-Stufe	Gal 8	Gal 9
CIN I	n = 34 (Verlust = 4)	n = 34 (Verlust = 4)
CIN II reg	n = 15 / 15 (Verlust n = 1 / 1)	n = 14 / 15 (Verlust = 2 / 1)
CIN II pro	n = 21 / 23 (Verlust n = 3 / 1)	n = 21 / 23 (Verlust n = 3 / 1)
CIN III	n = 37 (Verlust n = 3)	n = 37 (Verlust n = 3)

Tabelle 13: Anzahl ausgewerteter Schnitte für untersuchte Marker.

3.2 H3K4me3 in der zervikalen Dysplasie

Histonmodifikationen konnten bereits in vielen Tumoren identifiziert werden, auch im Zervixkarzinom (Audia et al., 2016), (Paul et al., 2021). Interessanterweise zeigten sich Veränderungen an Histon H3 signifikant in der Korrelation zwischen Fortschreiten der CIN-Stufe und im Gebärmutterhalskrebs (Anton et al., 2004), (Beyer et al., 2017).

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung sollte beobachtet werden, ob sich diese Ergebnisse reproduzieren lassen und ob es einen signifikanten Unterschied zwischen der Expression von trimethylierten Histon-3 an Lysinrest-4 (H3K4me3) in CIN II-Präparaten mit anschließender Progression zu CIN II-Fällen mit Regression gibt. Die folgende Tabelle 14 gibt Auskunft über die für diese Studie ausgewählten histologischen Schnitte zur Untersuchung auf methyliertes Histon 3 und die mittleren IRS-Werte.

CIN-Stufe	Anzahl	IRS
CIN I	n = 34	7 ($\sigma = 2,83$)
CIN II	n = 34	8 ($\sigma = 2,75$)
- CIN II reg	n = 15	6 ($\sigma = 2,82$)
- CIN II pro	n = 19	9 ($\sigma = 2,05$)
CIN III	n = 36	10 ($\sigma = 1,98$)

Tabelle 14: Deskriptive Statistik zu H3K4me3.

Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.

CIN II reg = CIN II mit anschließend gesicherter Regression, CIN II pro = CIN II mit anschließend gesicherter Progression.

H3K4me3 wird nuklear exprimiert und war vorwiegend in Basalzellen zu finden. Mit fortschreitender CIN-Stufe nahm die Expression in epithelialen Zellen zu. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass in geringeren Dysplasiestufen nicht alle Basalzellen positiv gefärbt waren. In CIN II-Präparaten mit anschließender Progression fand sich zudem ein heterogenes Bild aus Gesichtsfeldern mit bis zu über 80% angefärbten Zellen und Gesichtsfeldern mit teilweise weniger als 50%. In allen Schnitten zeigte sich eine Expression von H3K4me3. Exemplarisch sind die Färbeergebnisse in Abbildung 4 dargestellt. Bei Fortschreiten der CIN Stufe zeigte sich eine ansteigende braune Färbeintensität und zunehmende Anzahl an H3K4me3-positiv gefärbten Zellen. Zum Vergleich sind Positiv- und Negativkontrollen beigelegt.

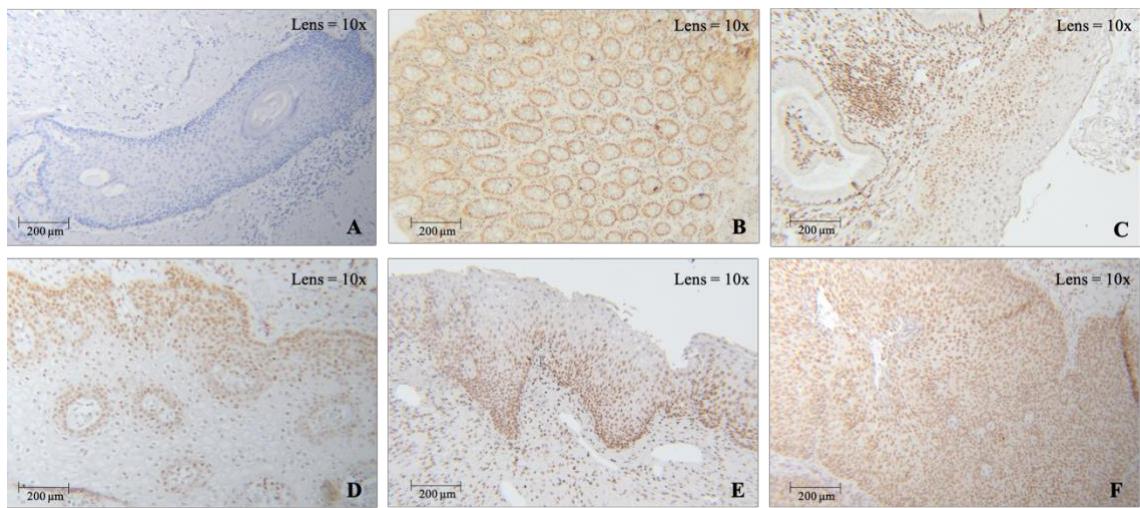
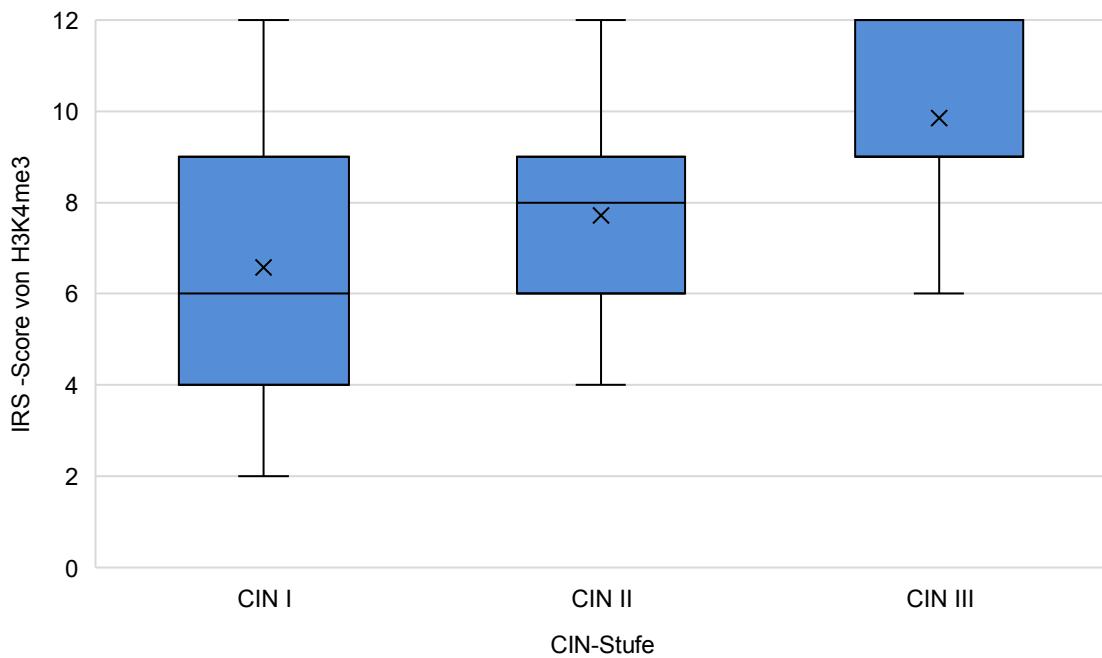


Abbildung 4: H3K4me3 Expression in CIN I bis CIN III in zehnfacher Vergrößerung.

A: Negativkontrolle (Vulva); **B:** Positivkontrolle (Kolon); **C:** CIN I; **D:** CIN II reg.; **E:** CIN II pro.; **F:** CIN III

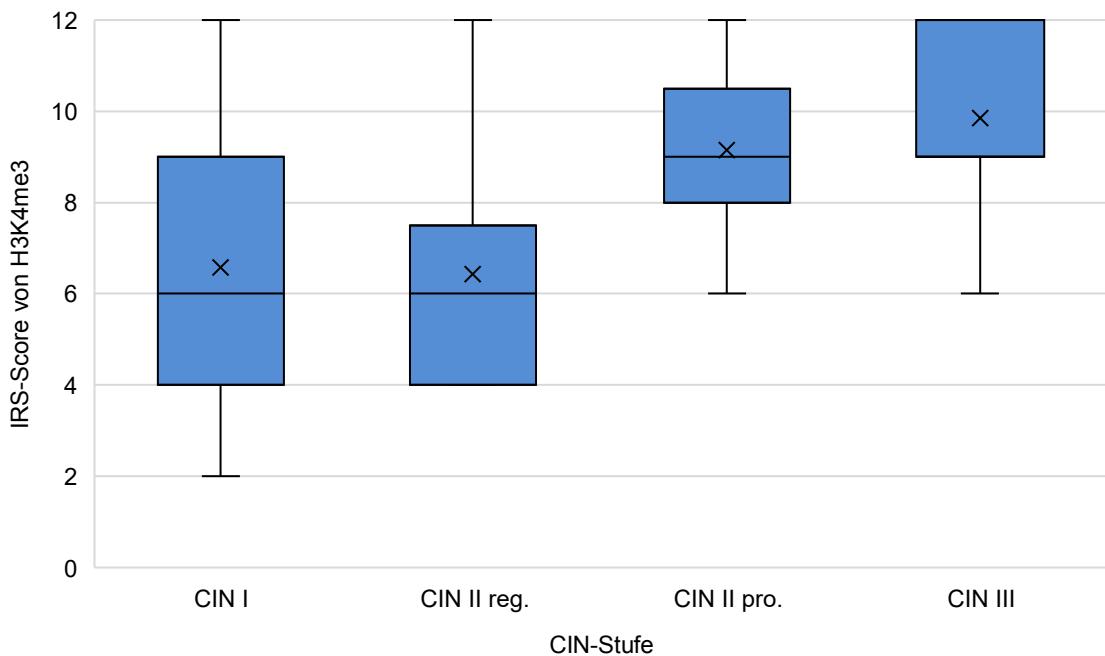
Für die statistische Analyse wurden zunächst die CIN II-Präparate als eine gemeinsame Gruppe gewertet. In einer Detailanalyse wurden diese weiter auf Unterschiede innerhalb der unterschiedlichen CIN II-Gruppen untersucht.

Für den Vergleich der Gruppen wurde der Mann-Whitney-U Test zur Ermittlung zentraler Rangunterschiede für nicht-parametrisch, ungebundene Stichproben gewählt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CIN I zu CIN II ($p = 0,0911$), jedoch signifikante Gruppenunterschiede zwischen CIN II zu CIN III und CIN I zu CIN III (beide $p < 0,001$). Die Ergebnisse sind in der folgenden Grafik 1 veranschaulicht.



Grafik 5: Mann-Whitney-U Test zur H3K4-Expression in den einzelnen CIN-Stufen

In der statistischen Auswertung zeigte sich im Mann-Whitney-U Test kein signifikantes Ergebnis im Vergleich von CIN I zu CIN II reg. ($p = 0,705$). Signifikante Ergebnisse zeigten sich jedoch im Vergleich von CIN I zu CIN II pro ($p = 0,004$), CIN II reg zu CIN III ($p = < 0,001$), CIN II pro zu CIN III ($p = 0,043$) und CIN I zu CIN III ($p = < 0,001$). Die Ergebnisse sind in der folgenden Grafik 2 veranschaulicht.



Grafik 6: Mann-Whitney-U Test zu H3K4-Expression in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung in der CIN II-Gruppe

3.2.1 H3K4me3 in der CIN II

Hinsichtlich des prognostischen Werts des Markers H3K4me3 in der CIN II Stufe wurde zunächst der Mann-Whitney-U Test zwischen Präparaten mit CIN II und gesicherter Regression zu CIN II und gesicherter Progression verglichen, um zu prüfen, ob ein Unterschied bezüglich der Expression innerhalb von CIN II-Stufen existiert. Es zeigte sich ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,004$). Daraufhin wurde der Wilcoxon-Test für verbundene nicht-parametrische Tests zwischen zwei Messterminen innerhalb der CIN II vorgenommen. Der erste Termin entspricht der Diagnose CIN II, der zweite Messtermin entsprach entweder einer Regression um mindestens eine CIN-Stufe bzw. einer Progression um mindestens eine CIN-Stufe. Es zeigte sich kein signifikantes Ergebnis zwischen CIN II mit Regression zu leichteren Dysplasiestufen ($p = 0,860$), jedoch ein signifikantes Ergebnis im Verlauf der CIN II mit Progress ($p = 0,017$). Die folgende Tabelle 15 gibt Auskunft über die für diese Studie ausgewählten histologischen Schnitte zur Untersuchung auf methyliertes Histon 3 innerhalb der Pro- bzw. Regression von CIN II Stufen initial und im follow-up sowie die zugehörigen IRS-Werte.

CIN-Stufe	Anzahl	IRS
CIN II reg.	n = 15	6 ($\sigma = 2,82$)
CIN II reg. (2. Termin)	n = 15	6 ($\sigma = 2,53$)
CIN II pro.	n = 19	9 ($\sigma = 2,05$)
CIN II pro. (2. Termin)	n = 23	11 ($\sigma = 1,50$)

Tabelle 15: Deskriptive Statistik zu H3K4me3 in der CIN II.

3.3 H3K9ac in der zervikalen Dysplasie

Acetyliertes Histon-3 an Lysinrest-9 wird im Zusammenhang mit H3K4me3 und anderen Histonmodifikationen als wichtiges Element in der Transkription beobachtet und wies sich als potentieller Prognosemarker im Zervixkarzinom (Gates et al., 2017), (Beyer et al., 2017) aus. H3K9ac wurde immunhistochemisch auf signifikante Unterschiede in der Expression von zervikalen Vorstufen untersucht. Die folgende Tabelle 16 gibt Auskunft über die für diese Studie ausgewählten histologischen Schnitte zur Untersuchung auf acetyliertes Histon 3 sowie die dazugehörigen mittleren IRS-Werte pro CIN Stufe.

CIN-Stufe	Anzahl	IRS
CIN I	n = 34	8 ($\sigma = 2,68$)
CIN I	n = 34	10 ($\sigma = 2,28$)
- CIN II reg	n = 14	10 ($\sigma = 2,41$)
- CIN II pro	n = 20	10 ($\sigma = 1,93$)
CIN III	n = 37	9 ($\sigma = 2,7$)

Tabelle 16: Deskriptive Statistik zu H3K9ac.

Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.

H3K9ac wird wie H3K4me3 nuklear exprimiert und hatte gleichermaßen eine starke Expression in den Basalzellen, welche mit zunehmender Dysplasie auch in apikalen Plattenepithelzellen vorkam. Auch die Beobachtung einer inhomogenen Verteilung in der CIN II mit Progression war analog zu H3K4me3

zu erkennen. Gesichtsfelder, welche noch eine CIN II zeigten, wiesen eine geringere Expression als Gesichtsfelder mit bereits fortgeschrittener Dysplasie und Anteilen einer CIN III, wenn das Präparat insgesamt als CIN III gewertet wurde. In Abbildung 5 sind die Färbeergebnisse dargestellt. Bei Progress der CIN konnte eine ansteigende braune Färbeintensität und zunehmende Anzahl an gefärbten Zellen von H3K9ac-positiven Zellen festgestellt werden. Positiv- und Negativkontrollen sind zum Vergleich beigefügt. Es wurde eine zehnfache Vergrößerung gewählt.

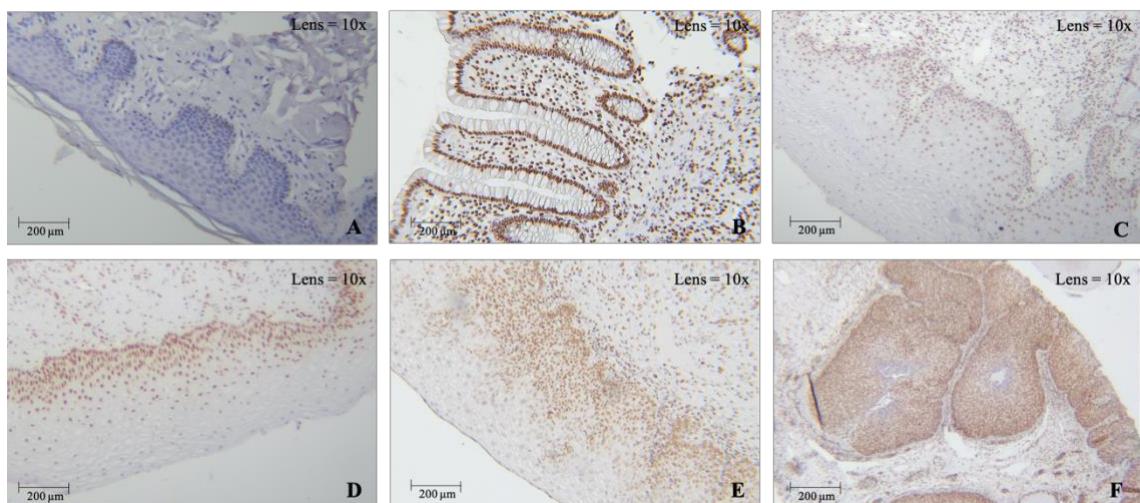
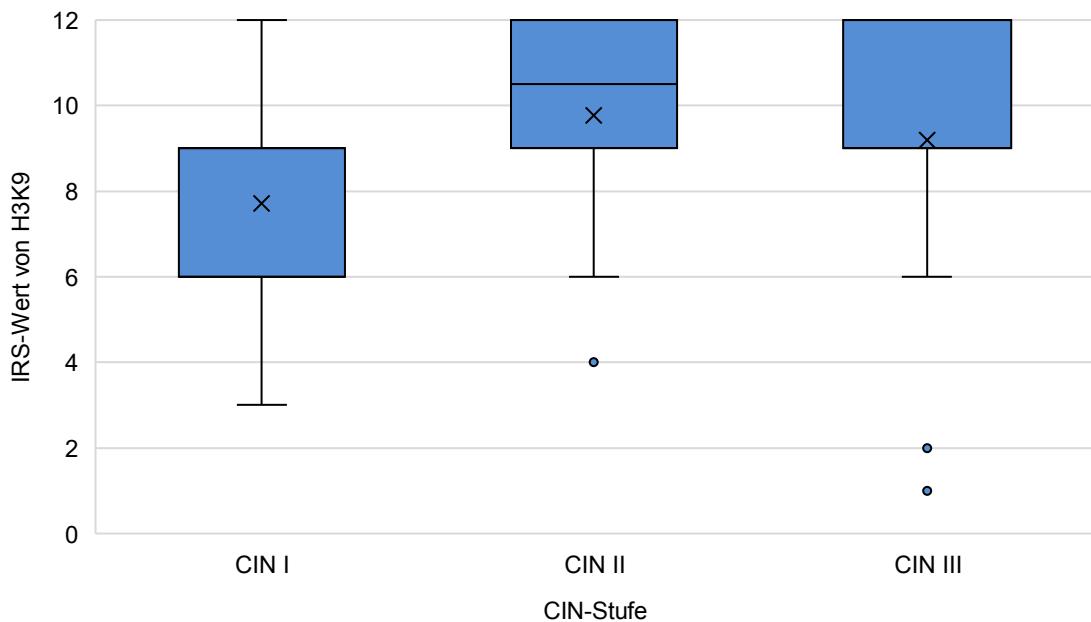


Abbildung 5: H3K9ac-Expression in den CIN-Stufen CIN I bis III in zehnfacher Vergrößerung.

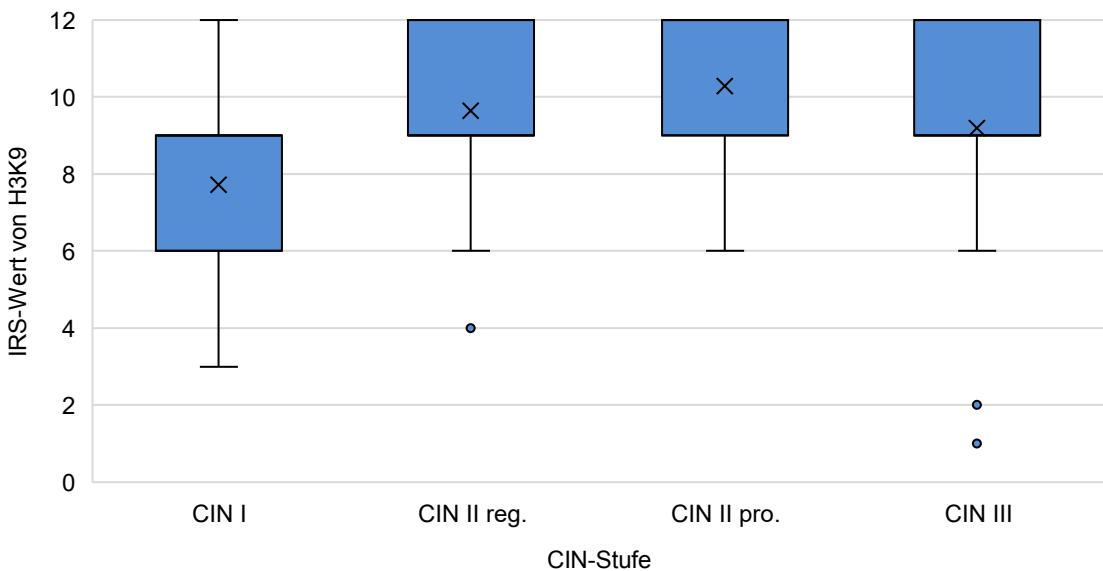
A: Negativkontrolle (Vulva); **B:** Positivkontrolle (Kolon); **C:** CIN I; **D:** CIN II reg.; **E:** CIN II prog.; **F:** CIN III

In der Gesamtanalyse zeigte der Mann-Whitney-U-Test keine Signifikanz auf Unterschiede innerhalb einer CIN II zu einer CIN III ($p = 0,316$), jedoch signifikante Ergebnisse für eine CIN I zu einer CIN II ($p = 0,001$) und von einer CIN I zu einer CIN III ($p = 0,011$).



Grafik 7: Mann-Whitney-U Test der H3K9-Expression in den einzelnen CIN-Stufen.

Der Mann-Whitney-U-Test wies im Anschluss in der Detailanalyse keine signifikanten Ergebnisse im Unterschied von einer CIN I zu einer CIN II reg ($p = 0,056$), einer CIN II reg zu einer CIN III ($p = 0,837$) und einer CIN II pro zu einer CIN III ($p = 0,195$) auf. Signifikante Unterschiede konnten zwischen einer CIN I zu einer CIN II pro ($p = 0,001$) sowie einer CIN I und einer CIN III ($p = 0,011$) beobachtet werden. Die Grafik 4 veranschaulicht die Ergebnisse der H3K9ac-Expression in den einzelnen CIN-Stufen als Boxplot-Diagramm.



Grafik 8: Mann-Whitney-U Test der H3K9-Expression in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung innerhalb der CIN II Gruppe nach Regression und Progression.

3.3.1 H3K9ac in der CIN II

In der weiteren Untersuchung wurde geprüft, ob es einen Unterschied in der zentralen Tendenz zwischen CIN II-Stufen mit Regression beziehungsweise Progression gibt. Hierfür wurde Mann-Whitney-U-Test angewendet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen einer CIN II reg zu einer CIN II pro ($p = 0,457$). Im Anschluss wurde geprüft, ob es innerhalb der Entwicklung der CIN II zu einer gesicherten Regression beziehungsweise Progression einen signifikanten Unterschied in der Expression von H3K9ac gibt. Der Wilcoxon-Test zeigte bei der CIN II reg eine signifikante Entwicklung mit einem p -Wert von $p = 0,012$ und einem Korrelationswert $r = 0,69$, jedoch keinen Unterschied innerhalb der CIN II pro ($p = 0,190$). Tabelle 17 gibt einen Überblick über die Anzahl der untersuchten Schnitte pro CIN-Stufe und die mittleren IRS-Werte.

CIN-Stufe	Anzahl	IRS
CIN II reg.	n = 14	10 ($\sigma = 2,68$)
CIN II reg. (2. Termin)	n = 15	6 ($\sigma = 3,54$)

CIN II pro.	n = 20	10 ($\sigma = 1,93$)
CIN II pro (2. Termin)	n = 23	11 ($\sigma = 1,49$)

Tabelle 17: Deskriptive Statistik zu H3K9ac in der CIN II.

Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.

3.4 CCR4 in der zervikalen Dysplasie

Der Chemokin-Rezeptor-4 (CCR4) wurde zusammen mit seinen Liganden CCL22 und CCL17 bereits in mehreren Studien in Zusammenhang mit einer vermehrter Expression und einem schlechterem Outcome beim Zervixkarzinom beziehungsweise bei einer progressiven Expression in Korrelation mit Dysplasiegraden beschrieben (Liu et al., 2015), (Zhao et al., 2017), (Slettenaar et al., 2006). CCR4 wird überwiegend von T-Zellen (Th2-Zellen, Tregs) exprimiert (Yoshie et al., 2014). In der immunhistochemischen Untersuchung wird geprüft, ob es ein Unterschied in der Expression von CCR4 Zellen in der Dysplasie beziehungsweise im umliegenden Stroma bei unterschiedlichen CIN-Stufen vorliegt sowie ob sich ein prognostischer Wert innerhalb der CIN II beschreiben lässt. Die Zellzahl bezieht sich auf den Mittelwert aus drei ausgezählten Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung. Eine Abstufung innerhalb der Färbeintensität konnte nicht beobachtet werden. Zur Analyse wurde die Anzahl der Zellen als Referenz gewertet anstelle des IRS-Scores.

CCR4 positive Zellen waren sowohl in der Dysplasie selbst als auch im umliegenden Stroma lokalisiert. Dabei waren deutlich mehr CCR4-positive Zellen im Stroma als in der Dysplasie vorhanden und die Einwanderung in das dysplastische Epithel erfolgte erwartungsgemäß von den Basalzellen aus nach peripher. Am wenigsten CCR4-positive Zellen waren im dysplastischen Epithel innerhalb der CIN II zu beobachten. Interessanterweise konnten viele CCR4-positive Zellen in der Umgebung von Drüsenzellen beobachtet werden.

3.4.1 CCR4 im Stromaepithel der CIN I bis CIN III

CCR-positive Zellen wiesen eine deutliche Expression im Stroma auf und zeigten eine ansteigende Anzahl mit fortschreitender Dysplasie. Vier Schnittpräparate waren CCR4-negativ, was einem positiven Expressionsanteil von 95,95% entspricht. In Tabelle 18 sind die errechneten Mittelwerte CCR4-positiver Zellen in jeder CIN-Stufe aufgelistet. Die Auszählung erfolgte in drei repräsentativen Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung. Abbildung 6 zeigte die immunhistochemischen Bilder verschiedener CIN-Stufen sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle der Färbung mit CCR4. Die Bilder sind in zehnfacher Vergrößerung aufgenommen. Eine braune Einfärbung entspricht einem positivem Färbeergebnis.

CIN-Stufe	Anzahl	Zellen pro Gesichtsfeld
CIN I	n = 33	45 ($\sigma = 45,46$)
CIN I	n = 31	67 ($\sigma = 34,34$)
- CIN II reg	n = 13	58 ($\sigma = 29,34$)
- CIN II pro	n = 18	72 ($\sigma = 37,21$)
CIN III	n = 35	83 ($\sigma = 34,90$)

Tabelle 18: Deskriptive Statistik zur Expression von CCR4 im Stromaepithel der CIN-Stufen. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte basierend auf der Auszählung von drei Gesichtsfeldern in 10-facher Vergrößerung.

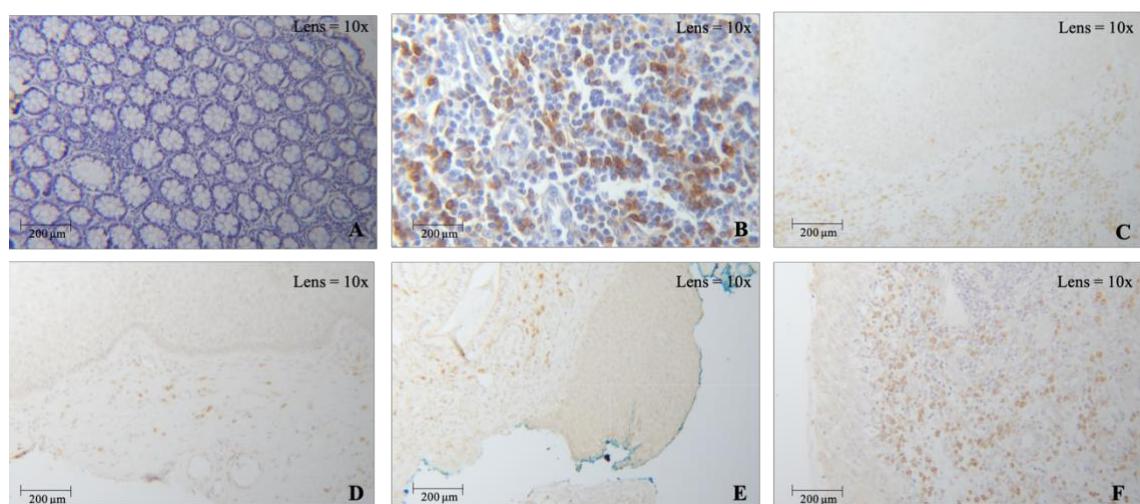
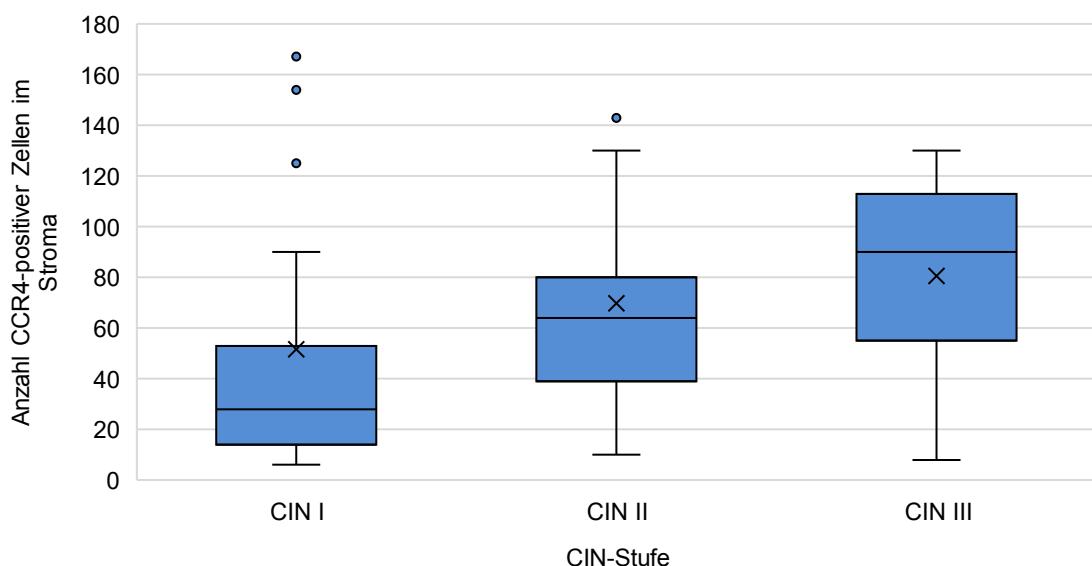


Abbildung 6: CCR4-positive Zellen in der CIN I bis CIN III.

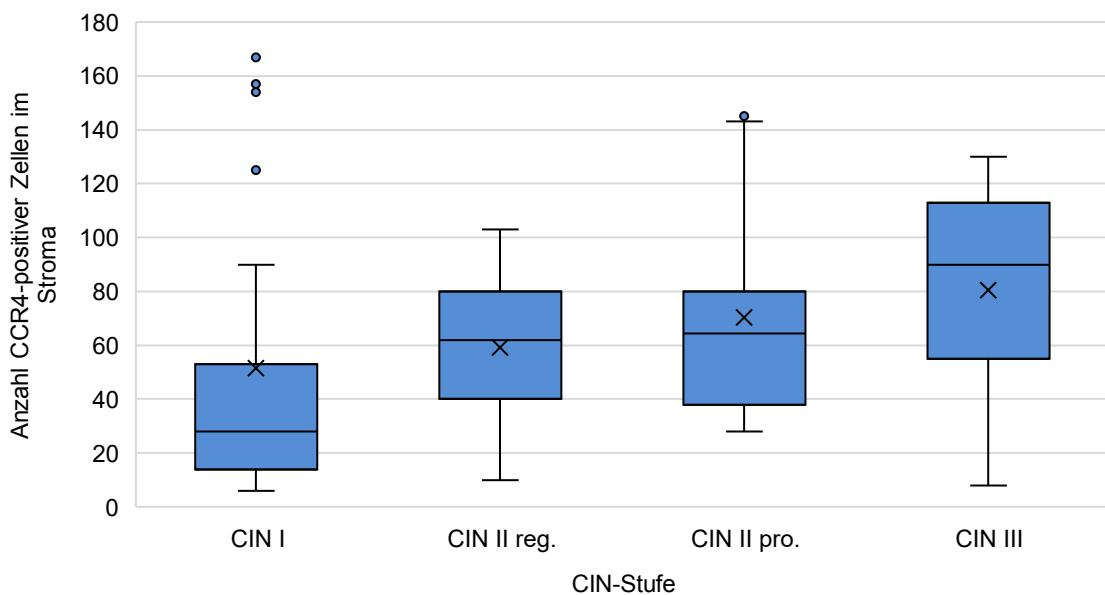
A: Negativkontrolle (Kolon); **B:** Positivkontrolle (Lymphknoten); **C:** CIN I; **D:** CIN II reg.; **E:** CIN II pro.; **F:** CIN III

In der Gesamtanalyse zeigte der Mann-Whitney-U-Test ausschließlich signifikante Ergebnisse an (CIN I vs. CIN II: $p = 0,003$, CIN II vs. CIN III: $p = 0,048$ und CIN I vs. CIN III: $p < 0,001$). Grafik 5 veranschaulicht die statistischen Ergebnisse. Die vertikale Achse spiegelt den Mittelwert CCR4-positiver Zellen in drei Gesichtsfeldern in jedem Schnittpräparat wider. Einzelne Ausreißer sind als Punkte markiert.



Grafik 5: Mann-Whitney-U Test zu CCR4-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen.

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte eine Signifikanz im Unterschied der Gruppen CIN I und CIN II pro ($p = 0,005$), CIN II reg zu CIN III ($p = 0,026$) sowie CIN I und CIN III ($p < 0,001$). Keine signifikanten Unterschiede konnten hinsichtlich CIN I und CIN II reg ($p = 0,073$) sowie CIN II pro gegenüber CIN III ($p = 0,280$) festgestellt werden. Grafik 6 zeigt die Ergebnisse als Boxplots. Die vertikale Achse entspricht wieder dem Mittelwert CCR4-positiver Zellen im Stroma in drei Gesichtsfeldern in jedem Schnittpräparat. Einzelne Ausreißer sind als Punkte markiert.



Grafik 6: Mann-Whitney-U Test zu CCR4-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung der CIN-Stufen in Regression und Progression.

3.4.1.1 CCR4 im Stromaepithel der CIN II

Um das Prognosepotential von CCR4 zu testen, wurde der U-Test zwischen den CIN II-Stufen mit gesicherter Regression bzw. Progression durchgeführt. Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der zentralen Tendenz aufgezeigt werden (Mann-Whitney-U-Test $p = 0,465$). Für die Fragestellung, ob es einen Unterschied im Verlauf der CIN Regression und Progression gibt, wurden die Präparate der CIN II zu zwei Messzeitpunkten untersucht: zum Zeitpunkt der histologischen Sicherung der CIN II und zum Zeitpunkt der histologisch gesicherten Auf- bzw. Abstufung um eine CIN-Stufe. Der Wilcoxon-Test auf Signifikanz zeigte kein statistisch aussagekräftiges Ergebnis innerhalb der CIN II mit Regression ($p = 0,182$) als auch innerhalb der CIN II mit Progression ($p = 0,995$). Tabelle 19 zeigt einen Überblick zur Anzahl der ausgewerteten Schnitte pro CIN-Stufe und den mittleren Anteil positiver Zellen bei Auszählung von drei Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung.

CIN-Stufe	Anzahl	Zellen pro Gesichtsfeld
CIN II reg.	n = 13	58 ($\sigma = 29,34$)
CIN II reg. (2. Termin)	n = 15	40 ($\sigma = 25,54$)

CIN II pro. (1. Termin)	n = 18	72 ($\sigma = 37,21$)
CIN II pro. (2. Termin)	n = 21	75 ($\sigma = 31,13$)

Tabelle 19: Deskriptive Statistik zu CCR4 positiven Zellen im Stromaepithel der CIN II. Die angegebene Werte sind gerundete Mittelwerte basierend auf der Auszählung von drei Gesichtsfeldern in 10-facher Vergrößerung.

3.4.2 CCR4 im dysplastischen Plattenepithel von CIN I bis CIN III

CCR4-positive Zellen im dysplastischen Epithel waren nur vereinzelt ausgeprägt. Es war auffällig, dass vorwiegend der Bereich der Basalzellreihe CCR4-positive Zellen aufwies und die apikalen Abschnitte eine geringe Ausprägung CCR4-positiver Zellen abbildeten. Außerdem zeigte sich, dass die Expression innerhalb der CIN II abnimmt und in der CIN I und CIN III sehr ähnlich ausgeprägt war. Fünf Präparate zeigten keine Expression, was einem Expressionsanteil von 94,94% entspricht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Zur Veranschaulichung der Färbeergebnisse sind in Abbildung 7 Beispiele für die Infiltration von CCR4-positiven Zellen im Epithel in der CIN III beigefügt. Eine bräunliche Färbung entspricht einer positiven Zellreaktion (siehe Pfeile). Die Bilder sind in zehnfacher Vergrößerung aufgenommen.

CIN-Stufe	Anzahl	Zellen pro Gesichtsfeld
CIN I	n = 33	18 ($\sigma = 17,69$)
CIN I	n = 32	9 ($\sigma = 9,09$)
- CIN II reg	n = 14	9 ($\sigma = 8,81$)
- CIN II pro	n = 18	10 ($\sigma = 9,54$)
CIN III	n = 34	18 ($\sigma = 12,38$)

Tabelle 20: Deskriptive Statistik zur Expression von CCR4 in dysplastischen Epithel der CIN-Stufen. Angegebene Werte sind gerundete Mittelwerte basierend auf der Auszählung von drei Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung.

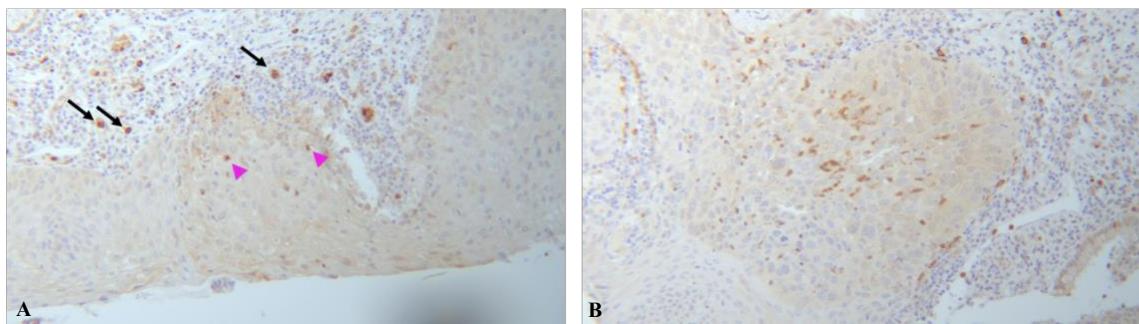


Abbildung 7: Beispiel für die Infiltration von CCR4-positiven Zellen in das dysplastische Epithel der CIN III

Abbildung A:

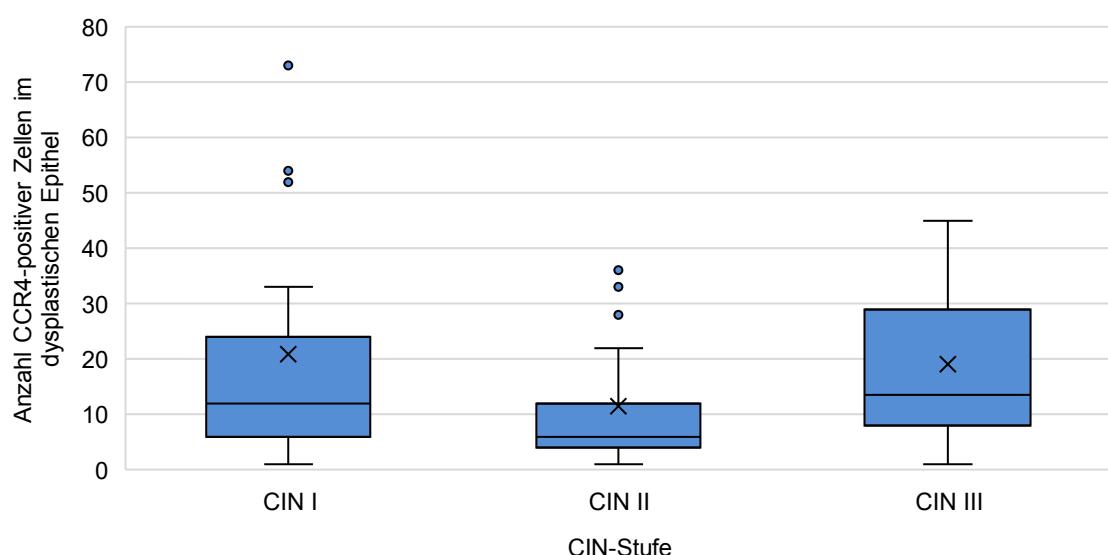
schwarze Pfeile: CCR4-positive Zellen im umgebenden Stroma.

pinke Pfeilspitzen: CCR4-positive Zellen in der Dysplasie.

Abbildung B:

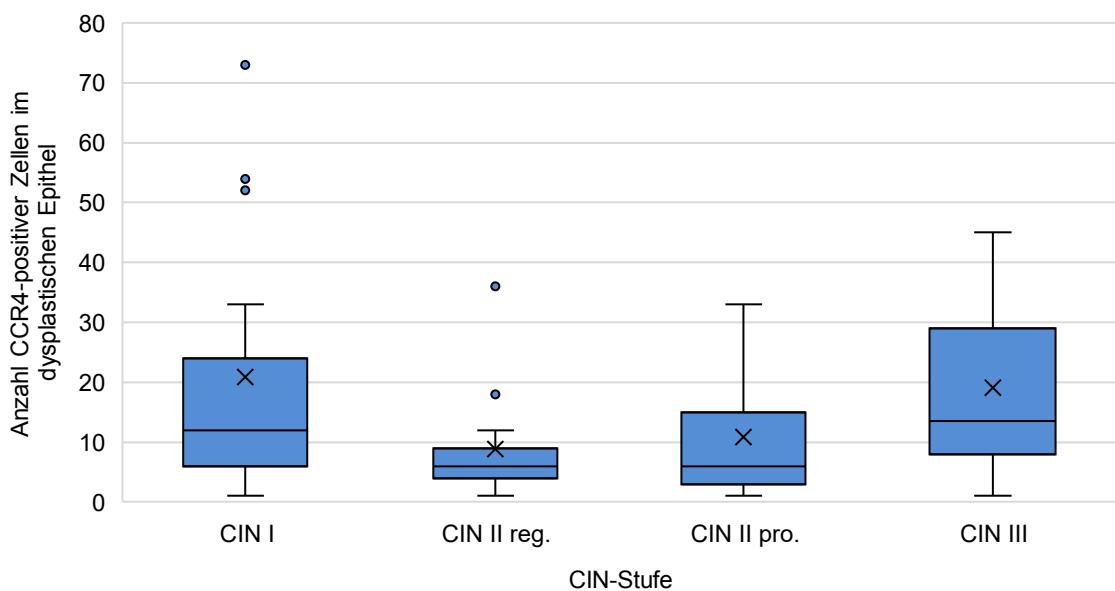
Beispiel für eine starke Infiltration in der Dysplasie.

Zur Überprüfung der zentralen Gruppentendenzen wurde der Mann-Whitney-U Test angewandt. In der Gesamtanalyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CIN I und CIN III ($p = 0,522$), jedoch aussagekräftige Unterschiede zwischen den Gruppen CIN I und CIN II ($p = 0,018$) und CIN II zu CIN III ($p < 0,001$). Grafik 7 veranschaulicht die Ergebnisse des Tests. Die vertikale Achse entspricht der Auszählung positiver Zellen in drei Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung.



Grafik 7: Mann-Whitney-U Test zu CCR4-Expression im dysplastischen Epithel in den einzelnen CIN-Stufen.

In der detaillierten Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen CIN I und CIN II reg ($p = 0,073$) und zwischen CIN I und CIN III ($p = 0,522$). Hingegen konnten signifikante Tendenzen zwischen CIN I und CIN II pro ($p = 0,043$), CIN II reg und CIN III ($p = 0,005$) sowie zwischen CIN II pro und CIN III ($p = 0,004$) verzeichnet werden. Die Expression der CCR4-positiven Zellen sind in Grafik 8 gezeigt. Die x-Achse repräsentiert die Anzahl der gefärbten Zellen als Mittelwert über drei Gesichtsfelder in zehnfacher Vergrößerung. Ausreißer sind als Punkte markiert.



Grafik 8: Mann-Whitney-U Test zu CCR4-Expression im dysplastischen Epithel in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung der einzelnen CIN-Stufen in Regression und Progression.

3.4.2.1 CCR4 im dysplastischen Plattenepithel der CIN II

Zur genaueren Untersuchung der CIN II -Gruppe auf das Regressions- bzw. Progressionspotential von CCR4 als Biomarker wurde zunächst der Mann-Whitney-U-Test zum Testen auf zentrale Unterschiede zwischen den Gruppen der CIN II mit Regression gegenüber der CIN II mit Progression angewandt. Es

zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied ($p = 0,694$). Tabelle 21 zeigt die deskriptive Statistik der untersuchten CIN-Schnitte mit CCR4-Färbung.

CIN-Stufe	Anzahl	Zellen pro Gesichtsfeld
CIN II reg.	n = 14	9 ($\sigma = 8,81$)
CIN II reg. (2. Termin)	n = 15	6 ($\sigma = 2,63$)
CIN II pro. (1. Termin)	n = 18	10 ($\sigma = 9,54$)
CIN II pro. (2. Termin)	n = 21	18 ($\sigma = 12,38$)

Tabelle 21: Deskriptive Statistik zur Expression von CCR4 in dysplastischen Epithel der CIN-Stufen. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte basierend auf der Auszählung von drei Gesichtsfeldern in zehnfacher Vergrößerung.

Zur weiteren Analyse wurde der Wilcoxon-Test für nicht-parametrische abhängige Stichproben angewandt und untersucht, ob es im Verlauf der CIN II-Gruppen einen Unterschied in der Expression von CCR4 gibt. Der Ersttermin bezieht sich auf den Zeitpunkt der Diagnosestellung der CIN II, der zweite Termin auf den Zeitpunkt der histologischen Sicherung eines Regresses bzw. Progresses um mindestens eine CIN-Stufe. Es zeigte sich sowohl für CIN II-Präparate mit Regress als auch mit Progress kein signifikanter Unterschied ($p = 0,281$, $p = 0,917$).

3.5 Galektin 8 in der zervikalen Dysplasie

Galektin 8 (Gal 8) wurde bereits in mehrere Tumorentitäten als negativer Einflussfaktor beschrieben, unter anderem bei Brust-, Kolon-, Blasen-, Nieren- und Prostatakrebs. Es reguliert die Zelladhäsion und -migration, beeinflusst somit die Metastasierung und interagiert mit vielen Immunantworten (Vinik et al., 2018). In Bezug auf das Zervixkarzinom und seiner Vorstufen wurde es als potentieller prognostischer Marker identifiziert (Beyer et al., 2022).

In der immunhistochemischen Testung wurde untersucht, ob sich ein signifikanter Unterschied in der Expression von Gal 8 in zervikalen

Präkanzerosen nachvollziehen lässt. Es zeigten sich gleichmäßige Ergebnisse in allen CIN-Gruppen. Tabelle 22 fasst die ausgewählten Schnitte, welche zur Untersuchung für Gal 8 genommen wurden, zusammen. Abbildung 8 zeigt ausgewählte Ausschnitte zur Gal 8 Färbung über alle CIN-Stufen sowie Positiv- und Negativkontrollen. Es wurde eine zehnfache Vergrößerung gewählt. Mit zunehmendem Dysplasiegrad stieg auf die Färbeintensität und Anzahl der positiven Zellen als braune Anfärbung.

CIN-Stufe	Anzahl	IRS
CIN I	n = 34	9 ($\sigma = 2,78$)
CIN II	n = 36	8 ($\sigma = 2,23$)
- CIN II reg	n = 15	7 ($\sigma = 1,90$)
- CIN II pro	n = 21	9 ($\sigma = 1,99$)
CIN III	n = 37	8 ($\sigma = 3,00$)

Tabelle 22: Deskriptive Statistik zu Galektin 8 in CIN I bis CIN II. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.

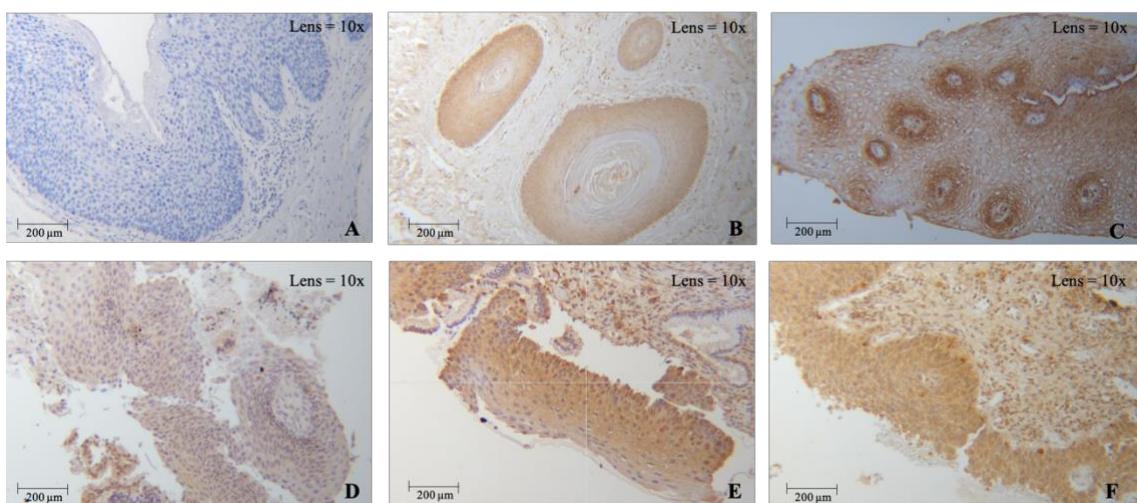
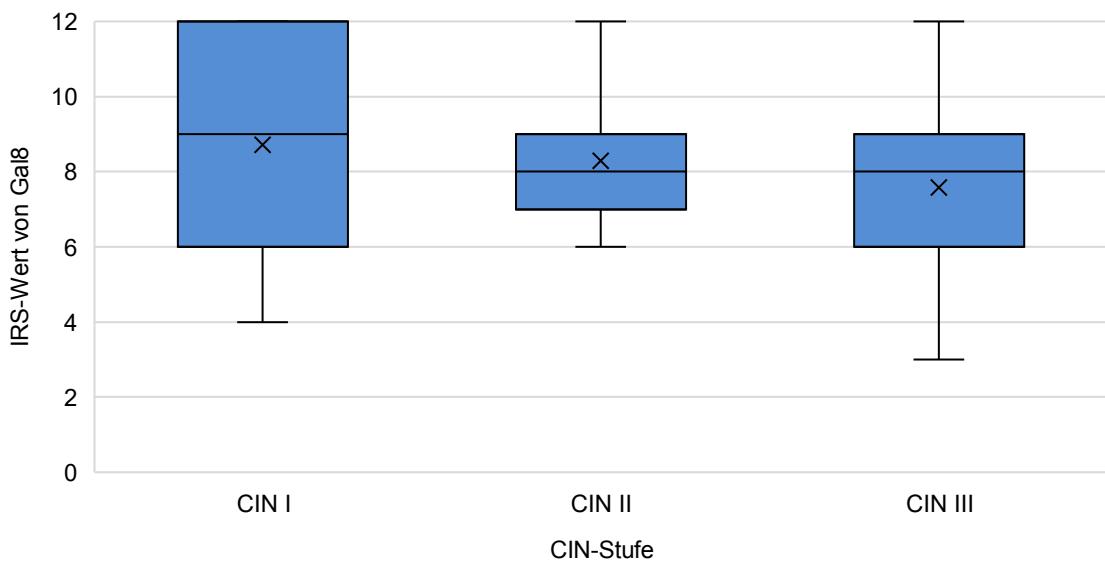


Abbildung 8: Gal 8-Expression in CIN I bis CIN III.

A: Negativkontrolle (Vulva); **B:** Positivkontrolle (Vulva); **C:** CIN I; **D:** CIN II reg.; **E:** CIN II pro.; **F:** CIN III

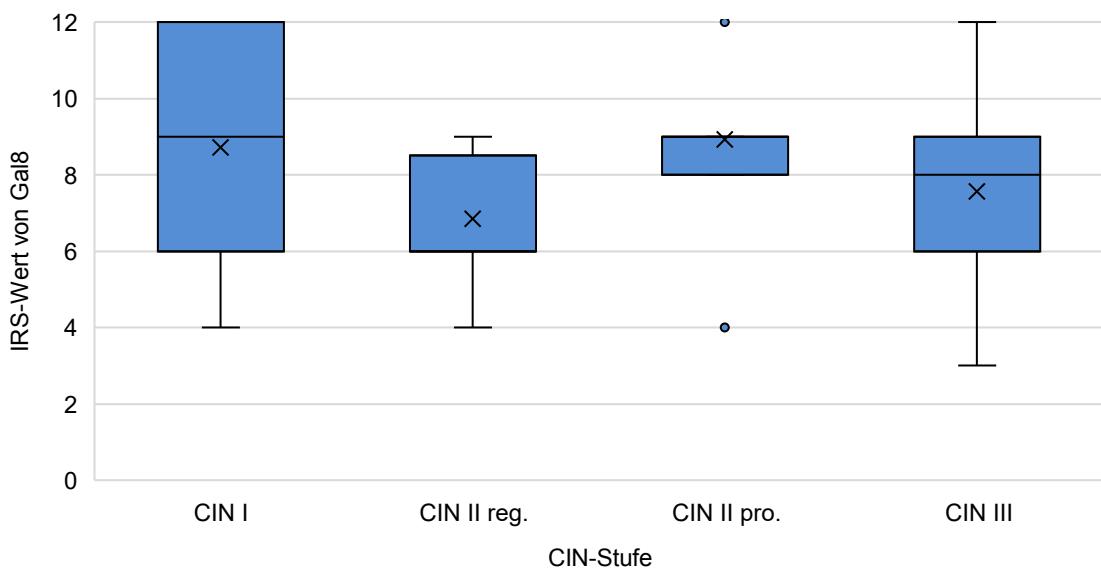
In der Gruppenanalyse zu zentralen Unterschieden in den Gruppen CIN I bis CIN III ergaben sich im Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen CIN II und CIN III ($p = 0,216$), aber signifikante Ergebnisse im Vergleich

von CIN I und CIN II ($p = 0,045$) und CIN I zu CIN III ($p = 0,015$). Die entsprechenden IRS-Werte sind in Grafik 9 repräsentiert.



Grafik 9: Mann-Whitney-U Test zu Gal 8-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen.

Der angewendete Mann-Whitney-U-Test in der Detailanalyse zeigte keine signifikanten Ergebnisse auf Unterschiede zwischen den CIN-Gruppen CIN I vs. CIN II pro ($p = 0,500$) und CIN III ($p = 0,842$) sowie zwischen CIN II reg vs. CIN III ($p = 0,606$). Signifikante Unterschiede konnten zwischen CIN I und CIN II reg ($p = 0,004$) bzw. zwischen CIN II pro und CIN III ($p = 0,025$) verzeichnet werden. Grafik 10 fasst die statistische Auswertung zu Gal 8 zusammen.



Grafik 10: Mann-Whitney-U Test zu Gal8-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung der einzelnen CIN-Stufen in Regression und Progression.

3.5.1 Galektin 8 in der CIN II

Des Weiteren wurde innerhalb der CIN II-Gruppe Gal 8 als prognostischen Marker untersucht. Zunächst wurde der Mann-Whitney-U-Test zwischen CIN II-Präparaten mit anschließend gesicherter Regression bzw. Progression auf zentrale Gruppenunterschiede angewandt. Es zeigte sich ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,007$). Anschließend wurden Unterschiede mit dem Wilcoxon-Test überprüft. Hierfür wurden zwei Messtermine innerhalb der CIN II mit Regression bzw. Progression verglichen. Der zweite Wert entsprach dem histologischen Befund einer Regression bzw. Progression um eine CIN-Stufe. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Gal 8 Expression über die Zeit in beiden Gruppen. (CIN II reg $p = 0,953$, CIN II pro $p = 0,085$). Tabelle 23 zeigt die Anzahl der untersuchten Schnitte pro CIN II mit anschließender Regression und CIN II mit anschließender Progression.

CIN-Stufe	Anzahl	IRS
CIN II reg.	$n = 15$	7 ($\sigma = 1,90$)
CIN II reg. (2. Termin)	$n = 15$	7 ($\sigma = 1,75$)

CIN II pro. (1. Termin)	n = 21	9 ($\sigma = 1,99$)
CIN II pro (2. Termin)	n = 23	8 ($\sigma = 1,82$)

Tabelle 23: Deskriptive Statistik zu Gal 8 in der CIN II. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.

3.6 Galektin 9 in der zervikalen Dysplasie

Galektin 9 (Gal 9) spielt eine wichtige regulatorische Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen, insbesondere in der Immunmodulation und entsprechend auch in der Tumorbioologie (Lv et al., 2022). Es hat sich in Studien zu unterschiedlichen Tumoren schon sowohl als negativer als auch als positiver Prognosemarker gezeigt (Yang et al., 2021), (Zhou et al., 2018). Entsprechend wird in der vorliegenden Arbeit in der immunhistochemischen Analyse die Rolle von Gal 9 in Bezug auf zervikale Dysplasien getestet. Tabelle 24 fasst die Anzahl der untersuchten Schnitte, welche mit Gal 9 gefärbt wurden, zusammen. Beispielhafte Ausschnitte zum Färbeergebnis mit Gal 9 über die einzelnen Dysplasiegrade sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Bilder sind in zehnfacher Vergrößerung fotografiert worden. Eine bräunliche Färbung zeigt ein positives Ergebnis auf Gal 9 an. Positiv- und Negativkontrollen sind beigefügt.

CIN-Stufe	Anzahl	IRS
CIN I	n = 33	5 ($\sigma = 1,77$)
CIN II	n = 36	6 ($\sigma = 2,30$)
- CIN II reg	n = 15	6 ($\sigma = 2,56$)
- CIN II pro	n = 21	6 ($\sigma = 2,06$)
CIN III	n = 36	6 ($\sigma = 2,51$)

Tabelle 24: Deskriptive Statistik zu Gal 9 in CIN I bis CIN III. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.

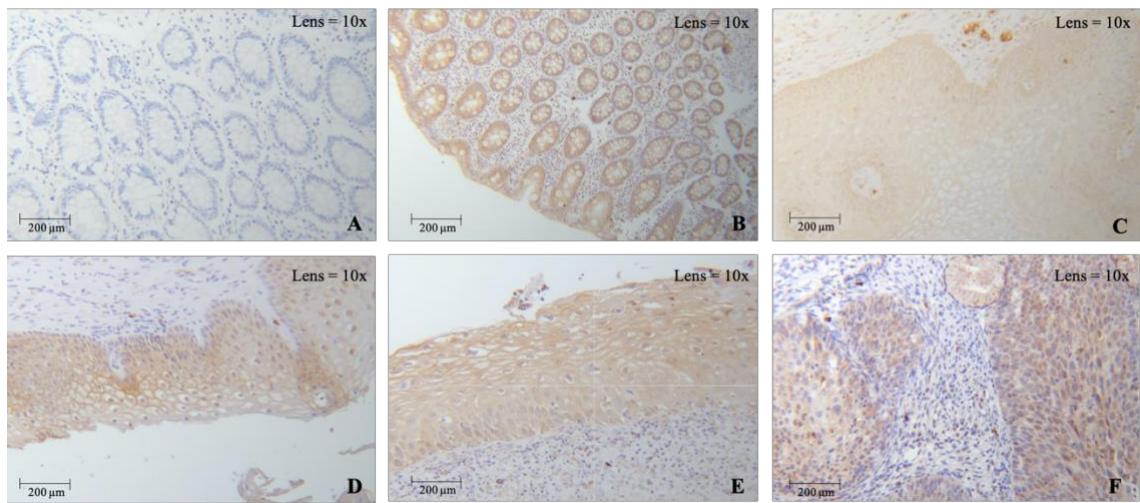
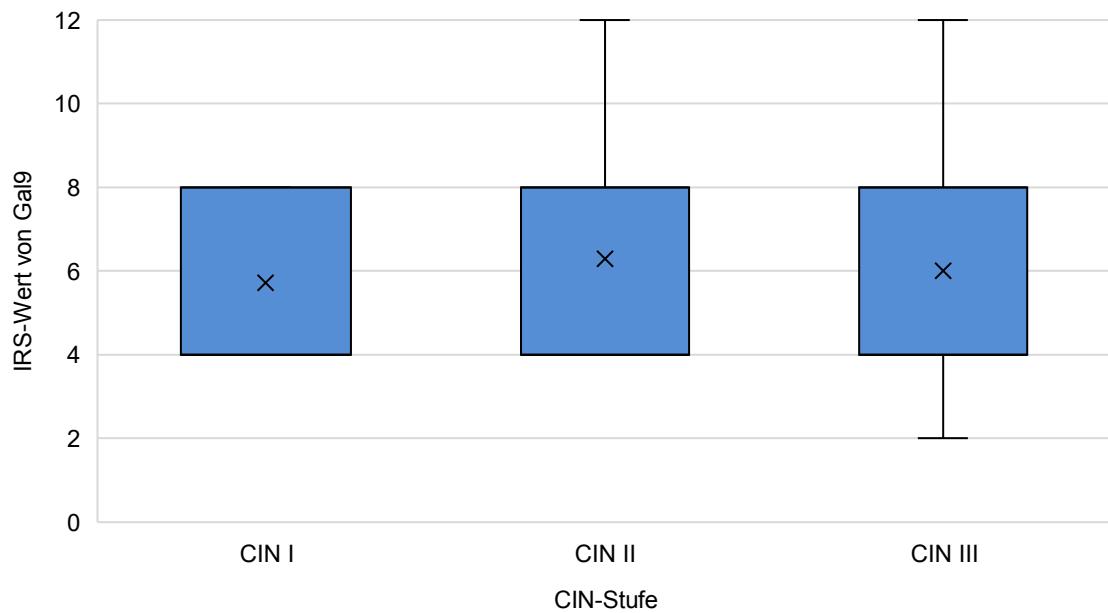


Abbildung 9: Galektin 9-Expression in CIN I bis CIN III.

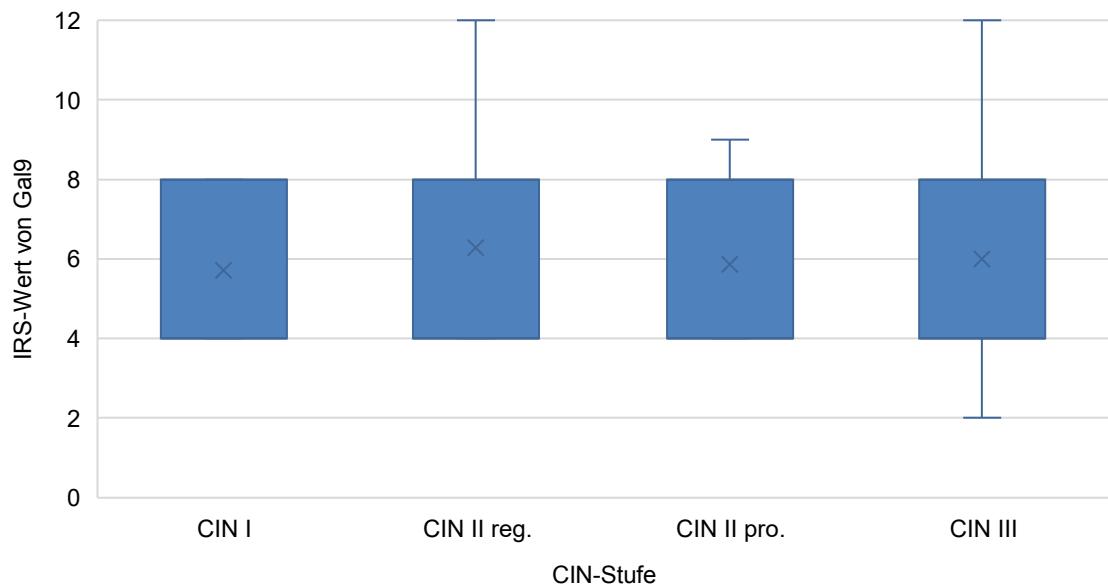
A: Negativkontrolle (Kolon); **B:** Positivkontrolle (Kolon); **C:** CIN I; **D:** CIN II reg.; **E:** CIN II prog.; **F:** CIN III

In der Gesamtanalyse mittels Mann-Whitney-U-Test war kein signifikantes Ergebnis für zentrale Gruppenunterschiede zu ermitteln. (CIN I vs. CIN II: $p = 0,752$, CIN II zu CIN III: $p = 0,635$, CIN I vs. CIN III: $p = 0,842$) und auch keine signifikanten Ergebnisse für Analysen innerhalb der Unterteilung der CIN II-Stufen (CIN I vs. CIN II reg ($p = 0,733$), CIN II pro ($p = 0,847$) und CIN III ($p = 0,842$); CIN II reg vs. CIN III ($p = 0,647$), CIN II pro vs. CIN III ($p = 0,746$)).

Insgesamt zeigte sich eine schwache, konstante Expression innerhalb aller Stufen und die insgesamt niedrigsten IRS-Werte innerhalb der untersuchten Biomarker. Grafik 11 zeigt das Ergebnis als Boxplot-Diagramm für die Dysplasiegrade CIN I bis CIN III. Eine statistische Auswertung über den Vergleich zwischen CIN II Präparaten mit anschließender Regression und CIN II Präparaten mit anschließender Progression ist in Grafik 12 zu sehen. Die homogene Verteilung der Färbeergebnisse über alle CIN Stufen ist hier deutlich erkennbar.



Grafik 11: Mann-Whitney-U Test zu Gal 9-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen.



Grafik 12: Mann-Whitney-U Test zu Gal9-Expression im Stroma in den einzelnen CIN-Stufen mit Unterteilung der einzelnen CIN-Stufen in Regression und Progression.

3.6.1 Galektin 9 in der CIN II

Für die Fragestellung, ob sich Gal 9 auch als prognostischer Marker in der CINII erweisen könnte, wurde der Mann-Whitney-U-Test zwischen CIN II-Präparaten mit anschließender Regression gegenüber Präparaten mit CIN II und

anschließender Progression angewandt. Das Ergebnis war mit $p = 0,899$ nicht signifikant. Darüber hinaus wurden die CIN II-Präparate zweimalig im Verlauf immunhistochemisch untersucht, zum ersten Messtermin mit der Diagnosestellung der CIN II und zu einem zweiten Messtermin nach stattgehabter Veränderung der Dysplasie um mindestens eine Stufe. Es wurde der Wilcoxon-Test für nicht-parametrische verbundene Stichproben angewendet zur Testung auf Unterschiede im Verlauf der CIN II. Es zeigte sich für sowohl für die CIN II mit Regression als auch für die CIN II mit Progression kein Unterschied im Verlauf in Bezug auf den IRS (CIN II reg: $p = 0,391$, CIN II pro: $p = 0,579$). In Tabelle 25 sind die Anzahl der Schnitte und der durchschnittliche IRS-Wert für Gal 9 zusammengefasst.

CIN-Stufe	Anzahl	IRS
CIN II reg. (1. Termin)	$n = 34$	$9 (\sigma = 2,78)$
CIN II reg. (2. Termin)	$n = 15$	$7 (\sigma = 1,75)$
CIN II pro. (1. Termin)	$n = 21$	$9 (\sigma = 1,99)$
CIN II pro (2. Termin)	$n = 23$	$8 (\sigma = 1,82)$

Tabelle 25: Deskriptive Statistik zu Gal 9 in der CIN II. Die angegebenen Werte sind gerundete Mittelwerte.

3.7 Korrelationsanalysen der untersuchten Marker in der zervikalen Dysplasie

Für die Fragestellung, ob es einen Zusammenhang zwischen den gemessenen IRS-Werten bzw. der Zellanzahl und der CIN-Stufe gibt, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman für unverbundene, nicht-parametrische Tests angewendet. Außerdem wurde aufbauend auf vorhergehenden Arbeiten, welche einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Marker H3K4me3 und H3K9ac (Sadakierska-Chudy et al., 2015) sowie H3K9ac und LGAL9 (Armenta-Castro et al., 2020) aufzeigten, eine Spearman Korrelation für alle untersuchten Biomarker zueinander und im Zusammenhang mit der CIN-Stufe durchgeführt. Signifikante Ergebnisse sind in Tabelle 25 aufgeführt. Für die

Einteilung der CIN-Stufe wurde eine Unterteilung in CIN I, CIN II mit Regression, CIN II mit Progression und CIN III gewählt. Eine Übersicht mit allen Korrelationsanalysen ist in Tabelle 26 zu sehen.

		CIN	H3K4me3	H3K9ac	CCR4 s
CIN	Pearson-Korrelation	1	0,541**	0,243*	0,383**
	sig. (2-seitig)		< 0,001	0,012	< 0,001
	n	107	103	105	99
H3K4me3		0,541**	1	0,398**	0,217*
	sig. (2-seitig)	< 0,001		< 0,001	0,033
	n	103	103	101	97
H3K9ac		0,243*	0,398**	1	
	sig. (2-seitig)	0,012	< 0,001		
	n	105	101	105	
Gal 9				- 0,230	
	sig. (2-seitig)			0,019	
	n			103	
CCR4 d					0,212*
	sig. (2-seitig)				0,039
	n				95

Tabelle 26: Übersicht zu den signifikanten Ergebnissen aus der Spearman-Korrelationsanalyse aller untersuchten Marker und den CIN Stufen CIN I, CIN II reg, CIN II pro und CIN III.

n: Anzahl

CCR4 d: CCR4 positive Zellen in der Dysplasie

CCR4 s: CCR4 positive Zellen im Stroma

*: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

**: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Es zeigte sich ein deutlicher, positiver Zusammenhang zwischen der Progression der CIN-Stufe und der Expression von H3K4me3, H3K9ac sowie CCR4-positive Zellen im Stroma. Zusätzlich zeigte sich ein stark signifikanter positiver Zusammenhang zwischen den IRS der Expression der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9ac. Auch ein positiver Zusammenhang konnte zwischen

dem Auftreten von CCR4-positiven Zellen im Stroma mit Auftreten in der Dysplasie festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen den Markern Gal 9 und H3K9ac.

4. Diskussion

4.1 Patientenkollektiv

Die eingeschlossene Patientinnengruppe zeigte ein sehr heterogenes Verhalten im Wahrnehmen von Nachuntersuchungen. Die Spannweite in der CIN I lag bei 637 Tagen, in der CIN II bei 614 Tagen und in der CIN III sogar bei 813 Tagen bis zum nächsten Termin. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, ob die Patientinnen zwischenzeitlich auswertig einen Vorsorgertermin wahrgenommen haben. Zudem wiesen die meisten Patientinnen einen HPV-positiven Status auf ($n = 105$), was einem Anteil von 88,9 % entspricht. Bei zwei Patientinnen war kein HPV-Status dokumentiert. Im Verlauf zum Nachsorgertermin reduzierte sich der Anteil HPV-positiv Getesteter auf $n = 84$ (71,2) und der Anteil auf HPV-negativer Getesteter auf $n = 23$ (19,5%). Nicht dokumentiert war der Status bei $n = 11$ Patientinnen (9,3%). In den meisten Fällen war der HPV-Rückgang auch mit einem Rückgang der Dysplasie verbunden ($n = 16$, 69,6%).

4.2 Histonmodifikationen in der zervikalen Dysplasie

4.2.1 H3K4me3 in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression H3K4me3 im dysplastischen Epithel der Zervix mit fortschreitender Dysplasie zunimmt. Zum einen konnte ein signifikanter Rangunterschied in der Analyse der CIN-Gruppen zwischen CIN I und CIN III als auch zwischen CIN II und CIN III gemessen werden. Lediglich der Unterschied zwischen CIN I und II war nicht signifikant. Weitere Detailanalysen zeigten zudem einen signifikant messbaren Rangunterschied zwischen CIN II Präparaten mit anschließend gesicherter Regression zu CIN II-Präparaten mit anschließend gesicherter Progression. Eine

abschließenden Korrelationsanalyse zeigte auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen CIN-Stufe und H3K4me3-Expression.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus der aktuellen Literatur. Histonmodifikationen sind hier in verschiedenen Tumorentitäten bereits als wichtige Einflussfaktoren identifiziert worden, beispielsweise beim Brust- und Darmkrebs sowie innerhalb von Leukämien (Audia et al., 2016). Beim Zervixkarzinom zeigten Ghiani et al. Zusammenhänge zwischen Interaktionen von Protoonkogenen E6 und E7 mit up- und down-Regulation wichtiger Methylasen und Demethylasen von H3K4, welche eine verstärkte Transkription nach sich führten (Ghiani et al., 2022). Beyer et al. korrelierten signifikant eine erhöhte nukleäre Expression von H3K4me3 mit fortgeschrittenen Karzinomstufen und schlechter Prognose (Beyer et al., 2017). Chen et al. zeigten eine Interaktion von HPV 16 E6 Onkogen mit der spezifischen H3K4-Demethylase KDM5C (Lysin-spezifische Demethylase 5C). Durch Bindung von E6 an KDM5C stabilisiert sich ein E6–E6AP-KDM5C-Komplex (Onkogen-E6-ubiquitin-ligase-E6AP-Lysin-spezifische-Demethylase-5C-Komplex), welcher die KDM5C abbaut. Infolgedessen kommt es zur Hochregulation der Superenhancer der Protoonkogene EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) und c-MET (Hepatocyte growth factor receptor) mit konsequenter Induktion des Zellwachstums (Chen et al., 2018).

Paul et al. konnten Chromatinveränderungen im Zervixkarzinom aufzeigen, welche in CIN III stärker hochreguliert waren als in der CIN II und interessanterweise nicht in der CIN I auftraten (Paul et al., 2021). Dies deckt sich mit der nicht signifikanten Ranganalysen zwischen CIN I und CIN II und unterstützt die Annahme, dass Chromatinveränderungen mit einer Progression der Dysplasie als mit Tumorinitiation interferieren und auch, dass H3K4me3 nicht direkt kausal mit der Genexpressionsaktivierung, sondern mit modulatorischen Prozessen und Transkriptionsgedächtnis bzw. -konsistenz verbunden sind (Howe et al., 2017). Zudem stimmt dies auch mit der Wilcoxon-Verlaufsanalyse überein, welche eine signifikante Gruppenunterscheidung für den Progress der CIN II aufzeigte, jedoch nicht für den Regress.

Insgesamt lässt dies darauf schließen, dass H3K4me3 als Progressmarker für zervikale Dysplasien geeignet erscheint. In weiteren Studien muss untersucht werden, ob die Hypothese, dass eine Überexpression von H3K4me3 mit einer Progressstendenz in der CIN und vor allem innerhalb der CIN II einhergeht in einer noch größeren Anzahl untersucht werden.

4.2.2 H3K9ac in der zervikalen Dysplasie und der CIN II

Die Analysen der Studienergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied für geringe Dysplasiestufen mit Fortschreiten der Neoplasie (CIN I zu CIN II und CIN I zu CIN III). Innerhalb eines Progresses konnte kein Unterschied in der Expression von H3K9ac in der zervikalen Dysplasie festgestellt werden. Auch konnte eine signifikante Abnahme der Expression in CIN II-Stufen bei Regression im Verlauf gemessen werden. Insgesamt korrelierte die H3K9ac-Expression positiv mit dem Grad der CIN-Stufe.

Daraus lässt sich schließen, dass eine niedrige Expression von H3K9ac mit einer geringgradigen Dysplasie korreliert. Aktuelle Angaben in der Literatur unterstreichen diese Hypothese, jedoch ergeben sich Inkongruenzen bezüglich des Expressionsniveaus. Gleiche Ergebnisse zeigten Zhang et al., welche eine vermehrte Acetylierung von Histon 3 an Lysin 9 durch das Onkogen E7 von HPV16 mit gesteigerter Expression zellzyklusfördernder Gene und Progress assoziierten. Anton et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen und korrelierten acetyliertes Histon H3 in zytologischen Abstrichen mit einer Progression von CIN I zu CIN II und CIN III (Zhang et al., 2004), (Anton et al., 2004). Einige unabhängige Studien konnten HPV-induzierte Veränderungen an HATs und HDACs mit einer Progression im Zervixkarzinom assoziieren und beschrieben diese Veränderungen als mögliche Prognosemarker (Da Silva et al., 2021), (Huang et al., 2005), (Plesa et al., 2016). Beispielsweise zeigten Bernat et al., dass das Onkogen E6 unterschiedlicher HPV Typen an HAT p300 (Protein 300) binden kann und die E6-induzierte Zelltransformation begünstigt (Bernat et al., 2002). Hingegen unterschiedliche Ergebnisse erhielten Beyer et al., welche eine vermehrte Expression von H3K9ac mit niedrigem Tumorstadium und negativer

Lymphknotenbefall jedoch auch mit schlechterem Gesamtüberleben korrelieren konnten (Beyer et al., 2017).

Diese inkongruenten Ergebnisse zeigen, dass die Prozesse zur Initiation und die Auswirkungen von modifizierten Histonen noch nicht vollständig verstanden sind. Eine ausgewählte Veränderung kann je nach Zustand und Gewebe teilweise umgekehrte Konsequenzen haben, von einer Aktivierung bis zu einer Inhibition für die Genstimulation (Peterson et al., 2004). Diese unterschiedlichen Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass H3K9ac vermutlich in keinem kausalen Zusammenhang mit der zervikalen Dysplasie bzw. dem Zervixkarzinom steht, sondern mit weiteren Prozessen interagiert, welche die Expression regulieren und mit der Progression des Tumors in Verbindung stehen. Weitere Untersuchungen zu H3K9ac sind notwendig, um ein besseres Verständnis über die genauen Regulationsmechanismen zu dieser Histonmodifikation zu erhalten und das Potential als potentieller Prognosemarker in der Dysplasie zu nutzen.

4.2.3 Die Korrelation von H3K4me3 und H3K9ac

Ein Zusammenspiel von H3K4me3 und H3K9ac liegt nahe. Beide Histonmodifikationen liegen in enger Lokalisation zueinander und stehen in Zusammenhang mit vermehrter Zellproliferation (Karmadiya et al., 2012). Dies bestätigt sich auch im Rahmen dieser Studie. Beide Marker stehen sowohl in Korrelation mit dem Grad der Dysplasie als auch gegenseitig in stark signifikanter positiver Korrelation zueinander.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der aktuellen Literatur. In mehreren unabhängigen Studien wird von einer Co-Abhängigkeit der beiden Histonmodifikationen gesprochen. In embryonalen Stammzellen konnte die genomische Methylierung von H3K4 durch die Histonmethyltransferase Set 1 (Set1) über die spezifische Set1 Domäne CxxC Fingerprotein (Cfp1) mit einer nachgeschalteten Aktivierung der Acetylierung von H3K9 gezeigt werden (Clouaire et al., 2014). Ähnliches zeigten Edmunds et al., welche eine

Acetylierungsdynamik von K9 auf zuvor trimethylierten H3-Schwänzen messen konnten (Edmunds et al., 2008).

Im Zervixkarzinom konnten in unabhängigen Studien eine Überexpression von H3K4me3 und H3K9ac durch HPV 16 E7 und durch HeLa Zellen mit integriertem HPV 18 gemessen werden und mit aktiver Gentranskription und vermehrten Zellproliferation korreliert werden (Johannsen et al., 2013), (Zhang et al., 2004), (Beyer et al., 2017). Vermutlich kann HPV E7 Histondeacetylase (HDACs) verdrängen und somit einerseits die Acetylierung aufrechterhalten und gleichzeitig die kompetitive Hemmung auf Substrat H3 für Histonmethyltransferasen (HMTs) aufheben. Überexprimiertes H3K9ac auf Promotoren der Transkriptionsfaktoren-Familie E2F erhöht synergetisch mit H3K4me3 die Zellproliferation indem es vermehrt den G1-S-Übergangsphase-Zustands in Zellen aufrechterhält (Zhang et al., 2004).

Dies lässt die Hypothese aufstellen, dass beide Marker in engen Zusammenhang stehen und gemeinsam die Transkriptionsdynamik regulieren. Entsprechend könnte man über eine multiple Korrelationsanalyse die Hypothese untersuchen, ob sich ein prognostischer Score aus allen drei Komponenten für die CIN II etablieren lässt.

4.3 CCR4 in der zervikalen Dysplasie

4.3.1 CCR4 im umgebenden Stromaepithel in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II

In der Studie konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den CIN-Gruppen gezeigt werden. Mit zunehmender Dysplasie nahm auch die Anzahl CCR4-positiver Zellen im Stroma zu. Insgesamt korrelierte der CIN-Status hoch signifikante mit der Anzahl der CCR4-positiven Zellen im Stroma und mit der Anzahl positiver Zellen in der Dysplasie. Interessanterweise konnte auch eine

signifikante Korrelation zwischen CCR4-positiven Zellen in der Dysplasie und im Stroma mit der Histonmodifikation H3K4me3 festgestellt werden.

Diese Tendenz zeigte sich jedoch nicht innerhalb der nach Progress und Regress aufgeteilten CIN II-Gruppen und auch nicht zwischen CIN I zu CIN II reg und CIN II pro zu CIN III.

Diese Ergebnisse passen zu denen in der aktuellen Literatur. Chemokine werden aufgrund ihrer zahlreichen Effekte auf immunmodulatorische Prozesse, Homing und Zellmigration im Zusammenhang mit der Tumormikroumgebung und Autoimmunerkrankungen untersucht. CCR4 ist ein Chemokinrezeptor für die Chemokinliganden CCL17 und CCL22 und interagiert mit Th2-Zellen (T-Helfer-Zelle 2), Tregs (regulatorische T-Zellen) und CLA-positiven T-Zellen (kutanes Lymphozyten-Antigen), welche in die Haut einwandern (Yoshie et al., 2014). Entsprechend wird CCR4 in Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis und T-Zell-Erkrankungen wie der adulte T-Zell-Leukämie und kutanen T-Zell-Lymphomen beschrieben (DeFea, 2018), (Sugaya et al., 2015), (Remer et al., 2014). Allerdings ergeben sich Widersprüche bei der Beschreibung des prognostischen Potentials von CCR4 und seiner Liganden: CCL22 wurde als negativer Prädiktor für Plattenepithelkarzinome der Zunge jedoch positiv im Rahmen des Lungenkarzinoms beschrieben. CCL17 wurde als positiver Prognosemarker bei Melanomen beobachtet, korreliert jedoch mit einem Tumorprogress beim Mammakarzinom (Kimura et al., 2019), (Nakanishi et al., 2006), (Weide et al., 2015), (Li et al., 2013).

Im Rahmen des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen sind bisher wenige Studien zu CCR4 und seinen Liganden bekannt. Es konnte ein Zusammenhang zwischen hoher Expression von CCL17 und dem Wachstum von HeLa und SiHa-Tumorzellreihen gemessen werden. CCL17 induziert dabei über die JNK- (c-Jun-n-terminale Kinase 5) und Transkriptions-5-Signalwege die Zellproliferation. Hypoxie verstärkte diesen Effekt. JNK-Inhibitoren und STAT5-Inhibitoren (Signal transducer and activator of transcription 5 Inhibitoren) hatten dagegen hemmenden Einfluss auf CCL17 und die Zellproliferation (Liu et al., 2015). In einer Untersuchung von Stimulator-für-Interferon-Genen (STING) in der HPV-

Karzinogenese wurde festgestellt, dass HPV über STING aktiv die Rekrutierung von Tregs durch CCL22 induziert, um so vor dem Immunsystem zu flüchten (Liang et al., 2015). Insgesamt konnte eine positive Korrelation zwischen CCL22 und FoxP3-Zellen (Forkhead-Box-Protein 3) und Progression des Zervixkarzinoms beobachtet werden und CCL22 zeigte sich als potentielles therapeutisches Ziel im Zervixkarzinom (Wang et al., 2019b), (Wang et al., 2022), (Zeng et al., 2012).

Aufgrund der Interaktion mit T-Zellen erregten CCR4-Inhibitoren in der hämatologischen Tumorforschung bereits Aufmerksamkeit und es konnte eine Antikörpertherapie mit Mogamulizumab zur Behandlung von rezidivierenden bzw. therapierefraktären adulten T-Zell-Leukämien/Lymphomen (ATL) und kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCLs) entwickelt werden (Yoshie et al., 2014). Allerdings hat CCR4 durch seine Wirkung auf Tregs auch wichtige physiologische Funktionen in der Selbsttoleranz, welche bei Abweichungen zu schweren Haut- und Lungenentzündungen führen können (Sather et al., 2007). Dieser Effekt lässt sich jedoch auch umgekehrt positiv nutzen, beispielsweise um die Impfantwort zu erhöhen. Pere et al. zeigten, dass sie simultane Gabe von CCR4-Antagonisten mit Impfstoffen die Anti-Selbst-CD8+-T-Zell-Antwort erhöht (Pere et al., 2011).

Die unterschiedlichen Ergebnisse hängen mit den vielen Funktionen von CCR4 und seinen Bindungspartnern zusammen. Genaue Untersuchungen sind wichtig, um nachzuvollziehen, ob negative Prozesse wie die Immunflucht durch Tregs und die Down-Regulation von Anti-Tumor-Th2-Zellen oder protektive Mechanismen wie eine hochregulierte Th2-Antwort in der untersuchten Tumorentität vordergründig durch CCR4 induziert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Zusammenhang mit denen aus der aktuellen Literatur lassen vermuten, dass es einen engen Gesamtzusammenhang zwischen der Expression CCR4-positiver Zellen im umgebenden Stroma und fortschreitendem Dysplasiegrad gibt. Zur Differenzierung des Prognosepotentials innerhalb der CIN II eignet sich CCR4 jedoch vermutlich nicht. Dennoch rechtfertigt der aktuelle Forschungsstand zur Wechselwirkung zwischen CCR4 und dem Immunsystem weitere Untersuchungen in zervikalen intraepithelialen Neoplasien. Veränderte immunologischen Prozesse, welche durch CCR4 beeinflusst werden, könnten innerhalb der Onkogenese von zervikalen Neoplasien zum Vollbild des

Zervixkarzinoms als Progressmarker für die CIN und das Zervixkarzinom eine Rolle spielen. Eine Untersuchung zu CCR4 zusammen mit CCL22, CCL17 und den Immunzellen Th2, Treg und dem Transkriptionsfaktor FoxP3 könnte weitere Erkenntnisse zu den genauen Mechanismen und zeitlichen Abläufen der Immunreaktion durch CCR4 und seine Liganden zeigen. Dies könnte einen Beitrag zum Verständnis der immunmolatorischen Prozesse beim Zervixkarzinom und seiner Vorstufen im Rahmen von akuten Entzündungen bis zur Entwicklung eines invasiven Tumors und seiner TME (tumor microenvironment) leisten. Therapeutisch bietet CCR4 zwar ein mögliches Target an, jedoch mit systemischen Nebenwirkungen. Eine Kopplung von CCR4 und HPV-Impfung für Patientinnen nach stattgehabter Infektion könnte ebenfalls ein interessanter Forschungsansatz sein, genauso wie eine Clusterung von CCR4/CCL22/CC17 als Marker für eine prognostische Einschätzung und das Therapiemanagement.

4.3.1.1 Korrelation CCR4-positiven Zellen im Stroma und der Histonmodifikation H3K4me3

Neben einer Korrelation mit der CIN-Stufe und der Anzahl CCR4-positiver Zellen in der Dysplasie zeigte sich auch eine Korrelation mit der Histonmodifikation H3K4me3. Da die Tri-Methylierung von Histon-3 an Lysin 4 mit einer Induktion der Gentranskription für Zellproliferation einhergeht und CCR4-Positivität die Th2-Zell-Antworten und die Selbsttoleranz induziert, ergaben sich verschiedene weiterführende Fragestellungen: Erstens, ob die Methylierung von H3K4 auch an Promotorregionen für Immunzellen oder der Chemokine CCL12 / CCL22 auftritt; zweitens, ob eine durch H3K4me3 induzierte Zellproliferation einen Reiz auf das Immunsystem darstellt oder drittens die Korrelation auf einen anderen Co-Faktor zurückgeht (Okitsu et al., 2010). H3K4me3 wurde bereits in Promotorregionen von angeborenen Immunzellen (Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen) sowie in Promotorregionen von CD4- und CD8-positiven Zellen in embryonalen Stammzellen gefunden. Es wurde eine funktionelle Korrelation von H3K4me3 und der Genexpression für dendritischen Zellen und für aus Monozyten stammende Makrophagen gefunden (Tserel et al., 2010). Auch für

die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen durch von Monozyten abgeleitete dendritischen Zellen (moDCs) konnte H3K4me3 als Induktor identifiziert werden (Huang et al., 2012). CCL22 wird von dendritischen Zellen sezerniert und reguliert die Treg-Migration durch Bindung an CCR4 (Röhrle et al., 2020b). CCL22 produzierende moDCs konnten zudem bereits mit der Krankheitsaktivität bei der atopischen Dermatitis assoziiert werden (Hashimoto et al., 2006). Es wäre also möglich, dass hochreguliertes H3K4me3 in der CIN bzw. im Zervixkarzinom die moDC Produktion von CCL22 induziert und durch die damit verbundene Treg-Migration in das dysplastische Gewebe zur Immunflucht der Tumorzellen bzw. entzündeter Zellen verhilft. Dazu sind bisher keine Forschungsergebnisse bekannt und bietet daher eine Grundlage für diese Hypothese in einer aufbauenden Studie zu untersuchen.

4.3.2 CCR4 im dysplastischen Epithel in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II

CCR4 war im umliegenden Stroma und im dysplastischen Plattenepithel zu finden. Die Ausprägung war hier deutlich über alle CIN-Stufen geringer. Signifikante Unterschiede konnten für die Gruppen CIN I zu CIN II und CIN I zu CIN III gezeigt werden, jedoch war die Expression in CIN I und CIN III ähnlich hoch und nicht signifikant. Die Detailuntersuchung zeigte zudem teils deutliche Unterschiede in der Expression von CIN I zu CIN II pro, CIN II reg zu CIN III und CIN II pro und CIN III. Keine Unterschiede konnten im Verlauf der CIN II Stufen von CIN II zu gesicherter Re- bzw. Progression um eine CIN-Stufe sowie in den Gruppen CIN II reg zu CIN II pro gemessen werden. Die Korrelationsanalyse zeigte jedoch einen Zusammenhang für CCR4-positive Zellen im Stroma und Epithel.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass je mehr CCR4-positive Zellen im Stroma zu messen waren, diese auch vermehrt im Epithel nachweisbar waren. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch die aktuelle Literatur. Die Lokalisation von CCL22, Treg und FoxP3 wurde im Ovarialkarzinom untersucht und es konnte eine vermehrte Expression von CCL22 im tumorumgebenden Stroma und

weniger in den eigentlichen Tumorzellen gemessen werden. Faget et al. untersuchten CCR4/CCL22/CCL17 und Treg bzw. die Th2-Infiltration im Brusttumor und korrelierten eine hohe stromale CCL22 Expression sowohl im gesunden Gewebe, als auch vermehrt im umliegenden Gewebe zum Tumor. Sie postulierten einen Zusammenhang von einer tumorinduzierter CCL22 Induktion zur Rekrutierung von Treg-Zellen, welche zur Immunflucht bei Brustkrebs verhelfen. Interessanterweise konnten sie keine Erhöhung der CCL17 und damit verbundener Th2-Antitumor-Antwort messen und führten damit die CCL22 Infiltration als negativ prognostischen Marker auf (Faget et al., 2011). Zhang et al. konnten bereits einen Zusammenhang zwischen hochregulierten FoxP3, CCL22 und CCR4 im TME und dem Tumorprogress des Zervixkarzinoms korrelieren (Zhao et al., 2017). CCR4 wurde auch als Progressmarker für die CIN und das Zervixkarzinom durch Slettenaar et al. mehrfach identifiziert (Slettenaar et al., 2006), (Slettenaar et al., 2005). Vattai et al. konnten einen Zusammenhang für hochreguliertes CCL22 mit FoxP3 und beide Marker in Zusammenhang mit CIN-Progress korrelieren (Vattai et al., 2023).

Interessant wäre es weiter zu untersuchen, ob die CCR4-positiven Zellen in der Dysplasie besser mit CCL22 oder CCL17 bzw. FoxP3 positiv korrelieren. Damit hätte man ein vollständigeres Bild, ob die tumorinfiltrierenden CCR4-positiven Zellen bevorzugt an Tregs oder an Th2-Zellen binden, erhalten. Je nach dem wäre eine CCR4-Infiltration einer pro- oder antitumor-Antwort zuzuordnen und entweder ein prognostisch günstiger oder ungünstiger Marker Prognosemarker.

Insgesamt lassen die Ergebnisse zu dem Schluss kommen, dass entzündliche Reize zunächst im umgebenen Stromaepithel Immunzellen zur Dysplasie leiten, welche im Anschluss ins Gewebe migrieren. Die ähnlich hohe Zellzahl zwischen CIN I und CIN III könnte bedeuten, dass in der CIN I vorwiegend ein durch Entzündung induzierter Reiz zur Bekämpfung der veränderten Zellen ausgelöst wird, während in der CIN III der Mechanismus der Immunflucht durch Tregs mit Hilfe eines veränderten Chemokin- und Zytokinexpressionsprofil in der Mikroumgebung der Zellen der Grund für die CCR4-Expression ist. Interessant dazu waren auch die Ergebnisse der Standardabweichung, welche für alle Gruppen sehr hoch war. Es lässt die Hypothese vermuten, dass das

Expressionsprofil und die Immunantwort auf entzündliche oder infektiöse Reize sehr individuell ist und von mehreren Co-Faktoren abhängt.

4.4 Galektine in der zervikalen Dysplasie

4.4.1 Galektin 8 in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II

Im Rahmen der Studie konnte ein signifikanter Rangunterschied zwischen CIN I und CIN II bzw. zwischen CIN I und CIN III gemessen werden. Dabei war die vermehrte Expression von Galektin 8 in niedrigen Dysplasien geringer als in höhergradigen Stufen. Interessanterweise weicht dieser Rangunterschied in der detaillierten Analyse der CIN II in Pro- und Regressgruppen voneinander ab. Die CIN II mit anschließender Regression zeigte sowohl im Vergleich mit der CIN II und anschließender Progression als auch im Vergleich zur CIN III eine geringere Expression auf. Im Vergleich der CIN II-Stufen zueinander zeigte sich ein ebenfalls signifikanter Unterschied mit geringerer Expression innerhalb der CIN II mit anschließender Regression zu CIN II-Stufen mit anschließender Progression. Eine Verlaufsanalyse der CIN II-Stufen mit ihrem korrespondierenden Verlaufswert zeigte keine signifikanten Ergebnisse. In der abschließenden Korrelationsanalyse konnte somit auch kein Zusammenhang zwischen der CIN-Stufe und der Gal 8-Expression und auch keine Korrelation von Gal 8 zu den anderen untersuchten Markern gefunden werden.

Um diese entgegengesetzten Ergebnisse bessere zu verstehen, wurde die CIN I Gruppe nochmal genauer betrachtet und es konnte der mögliche Einflussfaktor Progression bzw. Regression im Verlauf auf die Expression beobachtet werden. Die $n = 6$ Patientinnen, welche im Verlauf eine Regression zu einem normalen Plattenepithel zeigten, wiesen einen deutlich geringeren Expressionswert für Gal 8 auf als die Progressionsgruppe (IRS bei Regression = 6, IRS bei Progression = 10). Dies könnte das widersprüchliche Ergebnis bezüglich des Expressionsniveaus und des Dysplasiegrads erklären und eine niedrige

Expression mit Regressionsverhalten wieder in Einklang bringen. Leider war die untersuchte Regressgruppe mit $n = 6$ zu klein, um eine allgemeine Aussage zu diesem Zusammenhang weiter zu untersuchen. Daher ist es sinnvoll, Gal 8 nochmals in einer Studie mit allen CIN-Stufen genauer zu analysieren, um das Potential für die vermehrte Gal 8-Expression als Progressionsmaker für CIN I bis CIN III zu untersuchen.

In der aktuellen Literatur wird Gal 8 als Regulator der Zelladhäsion, Tumormetasierung und Angiogenese beschrieben. In der Membran integriert fungiert es über die Bindung an ECM-Proteine (extrazelluläre Matrix) zur Clusterbildung und Adhäsion des Zellkomplexes. In gelöster Form hat es den gegenteiligen Effekt der Zellmigration (Zick et al., 2002). Über Bindungen an CD166 induziert es vermutlich die endotheliale Angiogenese und durch Podoplanin (PDPN) diejenige in lymphatischen Gefäßen (Troncoso et al., 2014). In der Onkobiologie wurden unterschiedliche Ergebnisse zur Gal 8 veröffentlicht. Eine erhöhte Expression wurde mit besserem Gesamtüberleben bei Ovarialkarzinom gezeigt (Jiang et al., 2021). Bei Brustkrebs jedoch ist die erhöhte Expression mit einem schlechterem Outcome und einer Metastasierungstendenz über die LGALS8-AS1/miR-125b-5p/SOX12 Signaltransduktion (Galektin-8-antisense-RNA-1/ microRNA-125b-5p/ SRY-Box Transcription Factor 12) verbunden (Zhai et al., 2021). Hinsichtlich des prognostischen Werts wurde Gal 8 bei Patienten mit nicht-metastasiertem Magenkrebs nach chirurgischer Intervention untersucht und es konnte eine hohe Expression mit positiver Prognose für das Überleben und die Remission korreliert werden (Wu et al., 2016). Beyer et al. untersuchten erstmalig Gal 8 im Zervixkarzinom und zeigten eine positive Korrelation von Gal 8-Expression und rezidivfreiem Überleben (Beyer et al., 2022).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Gal 8 weitreichende unterschiedliche Funktionen erfüllt und für jedes Gewebe und in jeden Zusammenhang einzeln untersucht werden muss. Im Bereich des Zervixkarzinoms sind nicht viele Studien zu Galektin 8 bekannt. Hier konnte die Hypothese, dass Gal 8 in Zusammenhang mit Re- oder Progression innerhalb der CIN II weder konkret bestätigen noch ausgeschlossen werden. Es lässt sich jedoch vermuten, dass

die Gal 8-Expression eine Progressionstendenz anzeigt. Eventuell sorgt die niedrige Expression durch Induktion der Erkennung durch das Immunsystem und vereinfachter bzw. beschleunigter Migration der Immunzellen durch die Membran in hohen Dysplasiestufen zu einer geringeren Zelladhäsion und sorgt damit für eine höhere Entzündungs- und damit Abwehrreaktion des Organismus. Daher liegt nahe, Gal 8 in weiteren Studien zu untersuchen, unter Berücksichtigung die CIN-Stufen in Re- und Progressgruppen zu unterteilen und die Expression von Gal 8 im Verlauf zu beobachten.

4.4.2 Galektin 9 in der zervikalen Dysplasie und in der CIN II

Galektin 9 konnte im Rahmen dieser Studie mit keinem signifikanten Gruppenunterschied assoziiert werden, weder in der Gruppenanalyse zwischen CIN I bis CIN III, noch in der detaillierten Analyse mit Unterteilung der CIN II in Re- und Progressionsgruppen. Das Expressionsniveau lag stets in allen CIN-Gruppen gleichmäßig niedrig. In der Verlaufsanalyse konnte auch kein Effekt durch einen Re- bzw. Progress innerhalb der CIN II gemessen werden. Interessanterweise korreliert jedoch das Expressionsniveau von Gal 9 umgekehrt mit der Expression von H3K9ac.

Diese Ergebnisse lassen sich leider nicht ganz mit dem aktuellen Kenntnisstand in Übereinstimmung bringen. Gal 9 wurde in mehreren Karzinomen getestet und teilweise als prognostisch günstig, teilweise als negativer Marker signifikant eingestuft. Im Magenkarzinom korrelierten eine hohe Expression negativ mit Gesamtüberleben (Wang et al., 2018c). Im Rahmen des Kolonkarzinoms konnte Gal 9 mit einer Unterdrückung des Tumorzellwachstums korreliert werden (Morishita et al., 2021). Hinsichtlich des prognostischen Werts von Gal 9 wurde eine Metaanalyse für solide Tumore durchgeführt. Wang et al. konnten abschließend Gal 9 als prognostisch günstigen und wichtigen Marker für das tumorspezifische Gesamtüberleben unabhängig von der Tumorentität ermitteln, betonten jedoch, dass insgesamt heterogene Ergebnisse vorlagen (Wang et al., 2018a). Diese gegensätzlichen Ergebnisse hängen stark mit der Funktion von

Gal 9 und seinen Bindungspartner zusammen (Lv et al., 2022). Beispielsweise wird durch Bindung an seinen Liganden TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3) die Immunflucht des Tumorgewebes erleichtert. TIM-3 wird auf der Oberfläche von Th1-Zellen und anderen Immunzellen exprimiert und induziert bei Bindung von Gal 9 unter anderem die Th1-Zell Apoptose (Zhu et al., 2005), (Freeman et al., 2010). Eine hohe TIM-3 Expression konnte in einer Metaanalyse entsprechend mit schlechterem Gesamtüberleben korreliert werden (Zhang et al., 2017).

Auch beim Zervixkarzinom wurden Gal 9 und seine Bindungspartner untersucht. Hohe Gal 9 Serumspiegel korrelierten dabei mit mehr Tumorgewebe und höheren zervikalen Vorstufen zusammen mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und dem C-reaktiven Protein (CRP) im Serum (Liang et al., 2008b). Liang et al. untersuchten Gal 9 und E-Cadherin in der CIN und dem Zervixkarzinom und zeigten einen Zusammenhang zwischen niedrigen Gal 9-Werten und CIN- bzw. Karzinomzellen (Liang et al., 2008a).

Cao et al. konnten eine hohe TIM-3 Expression in Tumorzellen messen und als unabhängigen Prognosefaktor für Gebärmutterhalskrebs und Metastasierungstendenz korrelieren (Cao et al., 2013). Curley et al. untersuchten TIM-3/Gal9 sowie den PD-1/PD-L1-Signalweg (Programmed cell death protein 1/programmed cell death ligand-1-Signalweg) in der zervikalen Neoplasien und dem Zervixkarzinom und konnten signifikant erhöhte Werte im Tumorgewebe messen, jedoch nur begrenzt in dessen Vorstufen, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt (Curley et al., 2020).

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen mit denen aus der Literatur, dass die Effekte von Gal 9 im Rahmen des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen noch nicht vollständig verstanden sind. Es könnte sein, dass die Effekte von Gal 9 abhängig sind von dessen Lokalisation, Löslichkeit oder Spleißvarianten oder erst bzw. nur in Zusammenhang mit einem bestimmten Liganden aussagekräftig werden. Zusammen mit den Beobachtungen aus der aktuellen Literatur empfiehlt es sich, in Bezug auf das Zervixkarzinom und der CIN die genauen Prozesse von Gal 9 weiter zu untersuchen. Insbesondere Studien zu TIM3/Gal9 könnten Aufschluss geben. Eine Korrelation zwischen dem TIM3/Gal9-Signalweg und der

CIN bzw. dem Zervixkarzinom wäre insofern interessant, da bereits therapeutische Ansätze zur Behandlung von Tumoren mit TIM3/Gal9-Überexpression beschrieben wurden, unter anderem mit dem Zucker Laktose (Bailly et al., 2021). Eine α -Laktose Behandlung führte bei Mäusen durch Unterdrückung des TIM3/Gal9 Wegs auch zur besseren Viruskontrolle bei Herpes simplex und besserer T-Zell-Antwort (Sehrawat et al., 2010). Dies könnte im Rahmen der CIN und des Zervixkarzinoms besonders interessant sein, da hier mit HPV oft auch eine Virusinfektion zu Grunde liegt. Dies wirft die Frage auf, ob eine lokale Therapie mit α -Laktose als Behandlung dient und die Impfantwort verbessern und die Tumorgenese verhindern kann.

4.4.2.1 Korrelation von Galektin 9 mit H3K9ac

Armenta-Castro et al. untersuchten Parameter, welche für die Expression von Gal 9 beim Gebärmutterhalskrebs verantwortlich sein könnten. Untersucht wurden DNA-CpG-Hypermethylierungen und Histonacetylierungen von H3K9 und H3K14 am LGALS9-Promotor (Galektin 9 Promotor). Interessanterweise kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Tumorzellreihen insgesamt weniger Genexpression von Gal 9 aufwiesen als die nicht-Tumor-Zellreihen und unterstützen die Annahme, dass die Gal 9-Expression umgekehrt mit dem Tumorwachstum zusammenhängt. Gleichzeitig konnten sie keinen Zusammenhang mit der CpG-Hypermethylierung und Gal 9-Expression messen, jedoch einen Zusammenhang für die Histonacetylierung (Armenta-Castro et al., 2020). Dies unterstreicht die Ergebnisse in der vorliegenden Studie, die ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen Gal 9 und H3K9ac gemessen haben, wenn auch einen negativen. H3K9ac wurde in niedrigen Stufen mehr exprimiert und zeichnete sich als Regressmarker aus. Gal 9 war durchschnittlich niedrig exprimiert, jedoch leicht höher in höheren CIN-Stufen. Weitere Untersuchungen zum Zusammenspiel dieses Regulationsmechanismus sind notwendig, um eine präzise Aussage über einen Zusammenhang dieser beiden Marker und ihrer Signaltransduktionswege stellen zu können.

4.5 Abschließender Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung fünf unterschiedlicher Biomarker auf ihr Potential als Re- bzw. Progressmarker in der zervikalen intraepithealien Neoplasie. Insgesamt konnten dabei mehrere signifikante Ergebnisse der untersuchten Biomarker mit der zervikalen Dysplasie erzielt werden.

Beide untersuchten Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9ac erzielten signifikante Ergebnisse für die CIN und korrelierten sowohl positiv mit der Dysplasiestufe als auch positiv untereinander. H3K4me3 war bei zunehmendem Progress hochreguliert und zeigte signifikante Unterschiede in CIN II Stufen mit anschließender gesicherter Regression gegenüber CIN II Präparaten mit anschließend gesicherter Progression. Auch in der Verlaufsanalyse dieser CIN II Gruppen konnte nach Regression bzw. Progression ein signifikanter Anstieg im Progress bzw. down-Regulation im Regress gezeigt werden. H3K9ac zeigte eine signifikante, niedrige Expression in der CIN I und Hochregulation in höheren Dysplasiestufen. H3K4me3 könnte ein potentieller Progressmarker für die CIN II darstellen und H3K9ac ein möglicher Regressmarker für zervikale Neoplasien im Allgemeinen.

Signifikante Ergebnisse von verstärkter Expression von CCR4 als Chemorezeptor für CCL22 und CCL17 in der zervikalen Neoplasie lassen auf das Vorliegen grundlegender immunologischer Prozesse in der Pathophysiologie der CIN und Tumorprogress schließen. CCR4+ Zellen im umliegenden Stromaepithel waren signifikant mehr ausgeprägt in höheren Dysplasiestufen. Mit zunehmender stromaler Expression nahm auch diejenige im dysplastischen Epithel zu. Insgesamt lagen sowohl in der CIN I als auch in der CIN II ähnlich viele CCR4+ Zellen vor. Dies könnte auf die unterschiedlichen Auswirkungen von CCR4 und seinen Liganden zurückgehen. Innerhalb der CIN II waren weniger Zellen in der Dysplasiezählbar jedoch ohne Signifikanz und es konnte kein direkter Zusammenhang für die CIN II geschlossen werden. Weitere Studie unter Berücksichtigung potentieller Interakteure mit CCR4 könnten jedoch einen guten Ansatz zum besseren Verständnis dieses Rezeptors beitragen und lassen Potential für ein Re- oder Progressmarker zu.

Die untersuchten β -Galactose-bindenden Galektine 8 und 9 zeigten heterogene Ergebnisse. Weitere Studien sind sinnvoll, um die genauen Prozesse hinter der Expression und Ligandenbindung dieser Proteine zu verstehen. Gal 8 zeigte eher Hinweise auf Regressionstendenz, während die Gal 9 Expression keine weiteren Aussagen zum Verlauf der CIN zuließ.

Die Korrelation der Marker H3K4me3 mit H3K9ac, sowie der positive Zusammenhang von H3K4me3 mit der CCR4-Expression im tumorumgebenden Stroma untereinander könnte Ausdruck für ein Zusammenspiel der Marker sein. Gleichzeitig lässt sich daraus auch die Hypothese aufstellen, dass sowohl immunologische Prozesse als auch epigenetische Dysregulationen auf DNA-Ebene verantwortlich für den Progress der CIN sind. Die negative Korrelation zwischen Gal 9 und H3K9ac müsste in weiteren Studien vertiefter untersucht werden, um festzustellen, inwieweit die Effekte von Gal 9 durch die Acetylierung H3K9ac beeinträchtigt werden und welche Konsequenz das für den Verlauf der CIN darstellt.

Diese Erkenntnisse sind für weitere Untersuchungen sehr wertvoll. Aktuell existiert kein einheitlich etablierter Marker zur Vorhersage in der CIN. Speziell in der CIN II stellt dies ein Problem dar. Das Problem der Übertherapie und den damit verbundenen Nebenwirkungen und Langzeitfolgen ist genauso wie eine verzögerte Therapie und Progress bis zum Karzinom Diskussionsthemen bei der Behandlung der CIN II und es herrscht international kein Konsens zur optimalen Behandlungsstrategie. Zudem sind aktuell keine spezifischen medikamentösen Prophylaxen oder Therapien bei CIN bzw. CIN II bekannt, abgesehen von der HPV-Impfung. Die untersuchten Marker in dieser Studie könnten sich dafür etablieren bzw. in Frage kommen. Dies ist insbesondere wichtig, da beispielsweise Histonmodifikationen reversibel ablaufen und damit Heilungschancen bieten. Im Bereich des Zervixkarzinoms konnte hierbei bereits erste positive Ergebnisse mit dem HDAC-Inhibitor Valproat erzielt werden (Fang et al., 2014a). Auch eine einfach lokale Behandlung bei signifikanter Korrelation von Gal 9 und CIN II mit α -Laktose könnte eine Option werden. Auch könnten

sich Inhibitoren von CCR4 zu Verstärkung des Impfschutzes zur Prävention der CIN beitragen.

Es bleibt offen, ob ein Marker alleine für eine sichere Abschätzung der Pro- bzw. Regressstendenz ausreichen ist. Entsprechend wäre eine multiple Korrelationsanalyse aus mehreren Markern, aufbauend auf den Ergebnissen dieser Studie und denen in der Literatur, eine Möglichkeit, ein Zusammenspiel der Marker besser zu berücksichtigen und darauf aufbauend einen Prognose-Score für die CIN-II zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

- ALBERTS B., et al. 2002. *Integrins*, New York, Garland Science.
- ALLIS, C. D., et al. 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, 17, 487-500.
- ALLIS, C. D., et al. 2007. *Epigenetics*, CSHL Press.
- AMBOSS., G. *Kapitel Diagnostik in der Gynäkologie, Sektion Abstrichdiagnostik, Kapitel zuletzt aktualisiert am: 19.03.2024* [Online]. Available: <https://next.amboss.com/de/article/SN0y0q> [Accessed Kapitel zitiert am: 21.03.24 um 11:00 Uhr].
- AMBOSS., G. *Kapitel: Zervixkarzinom, Sektion: Präinvasive Läsionen des Zervixkarzinoms, Kapitel zuletzt aktualisiert am: 12.03.2024* [Online]. Available: <https://next.amboss.com/de/article/Z00ZIT> [Accessed Kapitel zitiert am: 21.03.24 um 13:00 Uhr].
- ANDERSON, N. M., et al. 2020. The tumor microenvironment. *Curr Biol*, 30, R921-r925.
- ANNUNZIATO A. 2008. DNA packaging: Nucleosomes and chromatin. *Nature Education* 1.
- ANTON, M., et al. 2004. Immunohistochemical detection of acetylation and phosphorylation of histone H3 in cervical smears. *Ceska Gynekol*, 69, 3-6.
- ARIP, M., et al. 2022. Exploration of biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of cervical cancer: a review. *Discov Oncol*, 13, 91.
- ARMENTA-CASTRO, E., et al. 2020. Histone H3K9 and H3K14 acetylation at the promoter of the LGALS9 gene is associated with mRNA levels in cervical cancer cells. *FEBS Open Bio*, 10, 2305-2315.
- ARNEMANN, J. 2019. DNA-Methylierung. In: GRESSNER, A. M., et al. (eds.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- AUDIA, J. E., et al. 2016. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, a019521.
- AWMF, et al. 2022a. Leitlinienprogramm Onkologie: Prävention des Zervixkarzinoms, Langversion 1.1, 2020, AWMF Registernummer: 015/027OL.
- AWMF, et al. 2022b. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom, Kurzversion, 2.2, 2022, AWMF-Registernummer: 032/033OL. *Leitlinienprogramm Onkologie*.
- AWMF, et al. 2022c. Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom, Langversion, 2.2, 2022, AWMF-Registernummer: 032/033OL.
- BAILLY, C., et al. 2021. Modulation of the Gal-9/TIM-3 Immune Checkpoint with α -Lactose. Does Anomery of Lactose Matter? *Cancers (Basel)*, 13.
- BARNES, P. J., et al. 2012. 6 - Biology and Assessment of Airway Inflammation. In: WILMOTT, R. W., et al. (eds.) *Kendig & Chernick's Disorders of the Respiratory Tract in Children (Eighth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders.
- BAYLIN, S. B., et al. 2016. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8, a019505.
- BECKMANN, M. W., et al. 2005. Therapiefortschritte beim primären Zervixkarzinom. *Dtsch Arztebl International*, Jg. 102, Heft 14, 979-.

- BERNAT, A., et al. 2002. Complementation of a p300/CBP defective-binding mutant of adenovirus E1a by human papillomavirus E6 proteins. *J Gen Virol*, 83, 829-833.
- BEVIS, K. S., et al. 2011. Cervical conization and the risk of preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 205, 19-27.
- BEYER, S., et al. 2022. Galectin-8 and -9 as prognostic factors for cervical cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*.
- BEYER, S., et al. 2017. Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer. *Int J Mol Sci*, 18.
- BI, S., et al. 2011. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 10650-5.
- BOARD, R. E., et al. 2008. DNA methylation in circulating tumour DNA as a biomarker for cancer. *Biomark Insights*, 2, 307-19.
- CAO, Y., et al. 2013. Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis. *PLoS One*, 8, e53834.
- CARRERO, Y. N., et al. 2021. In situ immunopathological events in human cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: Review. *Translational Oncology*, 14, 101058.
- CEDAR, H., et al. 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, 10, 295-304.
- CHEN, C., et al. 2014. Circulating galectins -2, -4 and -8 in cancer patients make important contributions to the increased circulation of several cytokines and chemokines that promote angiogenesis and metastasis. *British journal of cancer*, 110, 741-752.
- CHEN, X., et al. 2018. E6 Protein Expressed by High-Risk HPV Activates Super-Enhancers of the EGFR and c-MET Oncogenes by Destabilizing the Histone Demethylase KDM5C. *Cancer Res*, 78, 1418-1430.
- CHEN, X. J., et al. 2019. Hypoxia-induced ZEB1 promotes cervical cancer progression via CCL8-dependent tumour-associated macrophage recruitment. *Cell Death Dis*, 10, 508.
- CHEN, Z., et al. 2021. The role of Tim-3/Galectin-9 pathway in T-cell function and prognosis of patients with human papilloma virus-associated cervical carcinoma. *Faseb j*, 35, e21401.
- CHETRY, M., et al. 2018. The Role of Galectins in Tumor Progression, Treatment and Prognosis of Gynecological Cancers. *Journal of Cancer*, 9, 4742-4755.
- CHIBA, S., et al. 2014. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *Elife*, 3, e04177.
- CHOW, M. T., et al. 2014. Chemokines in cancer. *Cancer Immunol Res*, 2, 1125-31.
- CLOUAIRO, T., et al. 2014. Cfp1 is required for gene expression-dependent H3K4 trimethylation and H3K9 acetylation in embryonic stem cells. *Genome Biol*, 15, 451.
- COLLINS, B. E., et al. 2019. Histone H3 lysine K4 methylation and its role in learning and memory. *Epigenetics & Chromatin*, 12, 7.
- CORTESSIS, V. K., et al. 2017. Intrauterine Device Use and Cervical Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 130, 1226-1236.
- COSTELLO, J. F., et al. 2000. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genetics*, 24, 132-138.

- CURIEL, T. J., et al. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10, 942-949.
- CURLEY, J., et al. 2020. Looking past PD-L1: expression of immune checkpoint TIM-3 and its ligand galectin-9 in cervical and vulvar squamous neoplasia. *Modern Pathology*, 33, 1182-1192.
- DA SILVA, M. L. R., et al. 2021. The role of HPV-induced epigenetic changes in cervical carcinogenesis (Review). *Biomed Rep*, 15, 60.
- DAS, M., et al. 2017. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev*, 276, 97-111.
- DE CAPOA, A., et al. 2003. DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncol Rep*, 10, 545-9.
- DEB, M., et al. 2014. Chromatin dynamics: H3K4 methylation and H3 variant replacement during development and in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 3439-3463.
- DEFEA, K. 2018. Arresting CCR4: A New Look at an Old Approach to Combating Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 58, 673-675.
- DI GENNARO, E., et al. 2004. Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: review article. *Amino Acids*, 26, 435-41.
- DROLET, M., et al. 2015. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 15, 565-80.
- DUEÑAS-GONZÁLEZ, A., et al. 2005. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer*, 4, 38.
- EDMUNDS, J. W., et al. 2008. Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *Embo J*, 27, 406-20.
- EISSENBERG, J. C., et al. 2010. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol*, 339, 240-9.
- ENNINGA, E. A. L., et al. 2018. CD206-positive myeloid cells bind galectin-9 and promote a tumor-supportive microenvironment. *The Journal of pathology*, 245, 468-477.
- EPIGENTEK.
- Antibodies for Histone Modifications* [Online]. Available: <https://www.epigentek.com/catalog/antibodies-for-histone-modifications-ip-49.html> [Accessed 22.03.2024].
- FAGET, J., et al. 2011. Early Detection of Tumor Cells by Innate Immune Cells Leads to Treg Recruitment through CCL22 Production by Tumor Cells. *Cancer Research*, 71, 6143-6152.
- FANG, J., et al. 2014a. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumor Biology*, 35, 5083-5093.
- FANG, J., et al. 2014b. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumour Biol*, 35, 5083-93.
- FREEMAN, G. J., et al. 2010. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 235, 172-89.
- GADHIA, S., et al. 2004. Histone Acetyltransferase Assays in Drug and Chemical Probe Discovery. In: MARKOSSIAN, S., et al. (eds.) *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

- GARRIDO, F., et al. 2021. The Role of Chemokines in Cervical Cancers. *Medicina (Kaunas)*, 57.
- GATES, L. A., et al. 2017. Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *The Journal of biological chemistry*, 292, 14456-14472.
- GHIANI, L., et al. 2022. High Risk-Human Papillomavirus in HNSCC: Present and Future Challenges for Epigenetic Therapies. *Int J Mol Sci*, 23.
- GIBBONS, R. J. 2005. Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Human Molecular Genetics*, 14, R85-R92.
- GRUNSTEIN, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-52.
- HADARI, Y. R., et al. 2000. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci*, 113 (Pt 13), 2385-97.
- HANAHAN, D., et al. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HASHIMOTO, S., et al. 2006. Macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 produced by monocyte derived dendritic cells reflects the disease activity in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 44, 93-9.
- HENKEN, F. E., et al. 2007. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer*, 97, 1457-64.
- HIRASHIMA, M., et al. 2002. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconj J*, 19, 593-600.
- HOWE, F. S., et al. 2017. Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *BioEssays*, 39, e201600095.
- HSU, D. K., et al. 2002. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J*, 19, 507-15.
- HUANG, B. H., et al. 2005. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ*, 12, 395-404.
- HUANG, Y., et al. 2012. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals chromatin state-based regulation of human monocyte-derived dendritic cells in different environments. *Genes & Immunity*, 13, 311-320.
- INSINGA, R. P., et al. 2004. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*, 191, 105-13.
- ISSA, J.-P. 2004. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4, 988-993.
- IVANOVA, T. A., et al. 2007. Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16 INK4ain HPV-positive cervical carcinomas. *BMC Cancer*, 7, 47.
- JIANG, B., et al. 2015. Correlation of E6 and E7 levels in high-risk HPV16 type cervical lesions with CCL20 and Langerhans cells. *Genet Mol Res*, 14, 10473-81.
- JIANG, W., et al. 2021. Overexpression of Galectin10 Predicts a Better Prognosis in Human Ovarian Cancer. *J Cancer*, 12, 2654-2664.
- JOHANNSEN, E., et al. 2013. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology*, 445, 205-12.
- KALANTARI, M., et al. 2004. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol*, 78, 12762-72.

- KARMOIDIYA, K., et al. 2012. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics*, 13, 424.
- KENNETH MURPHY, et al. 2018. *Janeway Immunologie*, Springer Spektrum.
- KIM, Y. I., et al. 1994. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, 74, 893-9.
- KIMURA, H. 2013. Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*, 58, 439-445.
- KIMURA, S., et al. 2019. Macrophage CCL22 expression in the tumor microenvironment and implications for survival in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 48, 677-685.
- KLAES, R., et al. 2002. p16INK4a Immunohistochemistry Improves Interobserver Agreement in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *The american journal of surgical pathology* 26, 1389-1399.
- KLEINE-LOWINSKI, K., et al. 1999. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *Int J Cancer*, 82, 6-11.
- KOHRENHAGEN, N., et al. 2006. Increased expression of galectin-1 during the progression of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*, 16, 2018-22.
- KONG, W., et al. 2021. Analysis of therapeutic targets and prognostic biomarkers of CXC chemokines in cervical cancer microenvironment. *Cancer Cell International*, 21, 399.
- KOUZARIDES, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.
- LEE, J. W., et al. 2006. Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 132, 241-7.
- LEFFLER, H., et al. 2002. Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal*, 19, 433-440.
- LEI, J., et al. 2020. HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *N Engl J Med*, 383, 1340-1348.
- LEVY, Y., et al. 2006. It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology*, 16, 463-476.
- LEVY, Y., et al. 2018. Sustained induction of ERK, protein kinase B, and p70 S6 kinase regulates cell spreading and formation of F-actin microspikes upon ligation of integrins by galectin-8, a mammalian lectin. *J Biol Chem*, 293, 7265.
- LI, Y.-Q., et al. 2013. Tumor Secretion of CCL22 Activates Intratumoral Treg Infiltration and Is Independent Prognostic Predictor of Breast Cancer. *PLOS ONE*, 8, e76379.
- LIANG, D., et al. 2015. Activated STING enhances Tregs infiltration in the HPV-related carcinogenesis of tongue squamous cells via the c-jun/CCL22 signal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852, 2494-2503.
- LIANG, M., et al. 2008a. Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 134, 899-907.
- LIANG, M.-Y., et al. 2008b. Serum galectin-9 in cervical cancer. *Zhonghua yi xue za zhi*, 88, 2783-5.

- LIU, F.-T., et al. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 5, 29-41.
- LIU, L. B., et al. 2015. Chemokine CCL17 induced by hypoxia promotes the proliferation of cervical cancer cell. *Am J Cancer Res*, 5, 3072-84.
- LOOPIK, D. L., et al. 2021. The Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grades 1, 2, and 3: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Low Genit Tract Dis*, 25, 221-231.
- LOTHAR THOMAS 2005. *Labor und Diagnose*, Frankfurt, Th-Books.
- LUPANCU, T. J., et al. 2023. CCL17/TARC in autoimmunity and inflammation-not just a T-cell chemokine. *Immunol Cell Biol*, 101, 600-609.
- LV, Y., et al. 2022. A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). *Genes & Diseases*.
- MADIREDDI, S., et al. 2014. Galectin-9 controls the therapeutic activity of 4-1BB-targeting antibodies. *J Exp Med*, 211, 1433-48.
- MANZO-MERINO, J., et al. 2020. IMMUNOLOGY OF CERVICAL CANCER. *Rev Invest Clin*, 72, 188-197.
- MIELCZAREK-PALACZ, A., et al. 2022. The role of galectins-1, 3, 7, 8 and 9 as potential diagnostic and therapeutic markers in ovarian cancer (Review). *Mol Med Rep*, 25.
- MIELCZAREK-PALACZ, A., et al. 2022. The role of galectins-1, 3, 7, 8 and 9 as potential diagnostic and therapeutic markers in ovarian cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, 25.
- MOAR, P., et al. 2021. Galectin-9 as a biomarker of disease severity. *Cellular Immunology*, 361, 104287.
- MORISHITA, A., et al. 2021. Galectin-9 suppresses the tumor growth of colon cancer in vitro and in vivo. *Oncology reports*, 45, 105.
- NAKANISHI, T., et al. 2006. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 in human lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55, 1320-1329.
- NIKI, T., et al. 2009. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem*, 284, 32344-52.
- OKITSU, C. Y., et al. 2010. Transcriptional activity affects the H3K4me3 level and distribution in the coding region. *Mol Cell Biol*, 30, 2933-46.
- OLKHANUD, P. B., et al. 2009. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res*, 69, 5996-6004.
- PATEL, S., et al. 2009. Host immune responses to cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 21, 54-9.
- PAUL, A. M., et al. 2021. Prognostic Significance of Dysregulated Epigenomic and Chromatin Modifiers in Cervical Cancer. *Cells*, 10.
- PERE, H., et al. 2011. A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood*, 118, 4853-4862.
- PETERSON, C. L., et al. 2004. Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 14, R546-51.
- PLESA, A., et al. 2016. *The Involvement of Epigenetic Mechanisms in HPV-Induced Cervical Cancer* [Online]. IntechOpen. Available: <https://www.intechopen.com/chapters/50425> [Accessed].
- PRATO, C. A., et al. 2020. Galectin-8 Enhances T cell Response by Promotion of Antigen Internalization and Processing. *iScience*, 23, 101278.

- PUNT, S., et al. 2015. Galectin-1, -3 and -9 Expression and Clinical Significance in Squamous Cervical Cancer. *PLoS One*, 10, e0129119.
- RABINOVICH, G. A., et al. 2007. An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66, 143-158.
- RAJAGOPALAN, D., et al. 2018. An epi(c)genetic war: Pathogens, cancer and human genome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1869, 333-345.
- RAPP, M., et al. 2019. CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med*, 216, 1170-1181.
- RASSOW, J., et al. 2022. *Duale Reihe Biochemie*, Thieme.
- REMER, M., et al. 2014. Mogamulizumab and the treatment of CCR4-positive T-cell lymphomas. *Immunotherapy*, 6, 1187-206.
- ROBERT KOCH-INSTITUT (HRSG), et al. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe.
- RÖHRLE, N., et al. 2020a. CCL22 Signaling in the Tumor Environment. *Adv Exp Med Biol*, 1231, 79-96.
- RÖHRLE, N., et al. 2020b. CCL22 Signaling in the Tumor Environment. In: BIRBRAIR, A. (ed.) *Tumor Microenvironment: The Role of Chemokines – Part A*. Cham: Springer International Publishing.
- SADAKIERSKA-CHUDY, A., et al. 2015. A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs. *Neurotoxicity Research*, 27, 172-197.
- SATHER, B. D., et al. 2007. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med*, 204, 1335-47.
- SCHMIDT, D. 2016. Moderne Biomarker bei Präkanzerosen der Cervix uteri. *Der Pathologe*, 37, 534-541.
- SEHRAWAT, S., et al. 2010. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog*, 6, e1000882.
- SEIFERT, U., et al. 2014. Early detection of cervical cancer in Germany: evidence and implementation. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 57, 294-301.
- SHATZ-AZOULAY, H., et al. 2020. The Animal Lectin Galectin-8 Promotes Cytokine Expression and Metastatic Tumor Growth in Mice. *Sci Rep*, 10, 7375.
- SLETTENAAR, V. I. F., et al. 2005. Chemokine expression profiles of normal and malignant human cervical epithelium. *Cancer Research*, 65, 1108-1108.
- SLETTENAAR, V. I. F., et al. 2006. The chemokine network in normal and malignant cervix: CCR4 expression by malignant human cervical epithelial cells. *Cancer Research*, 66, 660-660.
- SOTO, D., et al. 2017. Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. *Viruses*, 9.
- SUGAYA, M., et al. 2015. CCR4 is expressed on infiltrating cells in lesional skin of early mycosis fungoides and atopic dermatitis. *J Dermatol*, 42, 613-5.
- SZALMÁS, A., et al. 2009. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19, 144-152.
- TANIGUCHI, K., et al. 2014. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*, 26, 54-74.

- TRONCOSO, M. F., et al. 2014. Galectin-8: a matricellular lectin with key roles in angiogenesis. *Glycobiology*, 24, 907-14.
- TSAI, C. J., et al. 2013. Galectin-7 levels predict radiation response in squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*, 131, 645-9.
- TSEREL, L., et al. 2010. Genome-wide promoter analysis of histone modifications in human monocyte-derived antigen presenting cells. *BMC genomics*, 11, 642-642.
- VAITAITIS, G. M., et al. 2012. Galectin-9 controls CD40 signaling through a Tim-3 independent mechanism and redirects the cytokine profile of pathogenic T cells in autoimmunity. *PLoS one*, 7, e38708.
- VARKI, A., et al. 2015. Galectins. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.
- VATTAI, A., et al. 2023. Increase of the T-reg-recruiting chemokine CCL22 expression in a progressive course of cervical dysplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 149, 6613-6623.
- VINIK, Y., et al. 2018. Molecular Mechanisms Underlying the Role of Galectin-8 as a Regulator of Cancer Growth and Metastasis. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 30, SE119-SE128.
- WADA, J., et al. 1997. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem*, 272, 6078-86.
- WALBOOMERS, J. M. M., et al. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189, 12-19.
- WANG, H., et al. 2019a. Associations of Cervicovaginal Lactobacilli With High-Risk Human Papillomavirus Infection, Cervical Intraepithelial Neoplasia, and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 220, 1243-1254.
- WANG, K., et al. 2018a. Prognostic Role of High Gal-9 Expression in Solid Tumours: a Meta-Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45, 993-1002.
- WANG, L., et al. 2018b. The Role of Galectins in Cervical Cancer Biology and Progression. *BioMed research international*, 2018, 2175927-2175927.
- WANG, Q., et al. 2019b. Higher CCL22+ Cell Infiltration is Associated with Poor Prognosis in Cervical Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, 11.
- WANG, Q., et al. 2022. CCL22-Polarized TAMs to M2a Macrophages in Cervical Cancer In Vitro Model. *Cells*, 11.
- WANG, W.-H., et al. 2019c. The Role of Galectins in Virus Infection - A Systemic Literature Review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53.
- WANG, Y., et al. 2018c. Association between Tim-3 and Gal-9 expression and gastric cancer prognosis. *Oncol Rep*, 40, 2115-2126.
- WEIDE, B., et al. 2015. Increased CCL17 serum levels are associated with improved survival in advanced melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64, 1075-1082.
- WHO, et al. 2020. Global Cancer Observatory: Cancer Today.
- WISMAN, G. B., et al. 2006. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. *Int J Cancer*, 119, 1908-14.
- WU, C., et al. 2014. Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells. *Immunity*, 41, 270-282.

- WU, S., et al. 2016. Galectin-8 is associated with recurrence and survival of patients with non-metastatic gastric cancer after surgery. *Tumour Biol*, 37, 12635-12642.
- XING, B., et al. 2020. Human Papillomavirus-Negative Cervical Cancer: A Comprehensive Review. *Front Oncol*, 10, 606335.
- YANG, H. J., et al. 2004. Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 93, 435-40.
- YANG, R., et al. 2022. Development and characterization of anti-galectin-9 antibodies that protect T cells from galectin-9-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 298, 101821.
- YANG, R., et al. 2021. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nature Communications*, 12, 832.
- YANG, R.-Y., et al. 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10, e17.
- YOSHIE, O., et al. 2014. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *International Immunology*, 27, 11-20.
- ZENG, C., et al. 2012. Up-regulation of Foxp3 participates in progression of cervical cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 62.
- ZHAI, D., et al. 2021. LncRNA LGALS8-AS1 Promotes Breast Cancer Metastasis Through miR-125b-5p/SOX12 Feedback Regulatory Network. *Frontiers in Oncology*, 11.
- ZHANG, B., et al. 2004. Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology*, 329, 189-198.
- ZHANG, K., et al. 2005. Histone modifying enzymes and cancer: going beyond histones. *J Cell Biochem*, 96, 1137-48.
- ZHANG, Y., et al. 2017. TIM-3 is a potential prognostic marker for patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8, 31705-31713.
- ZHAO, M., et al. 2017. Negative immune factors might predominate local tumor immune status and promote carcinogenesis in cervical carcinoma. *Virol J*, 14, 5.
- ZHOU, X., et al. 2018. Galectin-9 Expression Predicts Favorable Clinical Outcome in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Physiology*, 9.
- ZHU, C., et al. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*, 6, 1245-52.
- ZHU, H., et al. 2013. [Expression of galectin-7 and S100A9 and development of cervical squamous carcinoma]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 38, 888-95.
- ZICK, Y. 2022. Galectin-8, cytokines, and the storm. *Biochem Soc Trans*, 50, 135-149.
- ZICK, Y., et al. 2002. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconjugate Journal*, 19, 517-526.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an alle beteiligten Personen aussprechen, welche mich bei der Anfertigung meiner Dissertation von Anfang bis zum Ende unterstützt haben.

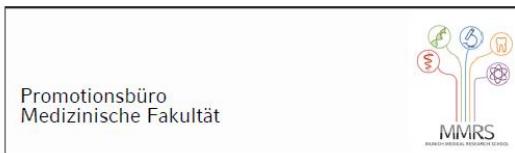
Zunächst gilt mein Dank der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. med. Sven Mahner, welche es mir ermöglichen diese wissenschaftliche Arbeit zu erstellen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Kolben bedanken, auf den die Idee zu dieser Arbeit zurückgeht und welcher mich jederzeit geduldig und kompetent bei allen Fragen und Hindernissen begleitete.

Außerdem möchte ich mich Frau Prof. Dr. Schmoeckel erwähnen, welcher ich die großzügige Bereitstellung der Materialien verdanke. Zudem gilt mein Dank Dr. rer. nat. Mirjana Kessler, welche als head of lab stets umfassende Hilfe und Beistand bei der Durchführung der immunhistochemischen Methoden leistete.

Mein besonderer Dank gilt der großartigen Betreuung durch Dr. Christina Seifert, welche enorme Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung des gesamten Projekts geleistet hat und mir bei allen Fragen und Problemen zur Seite stand. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden. Vielen Dank.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

LARISSA ULRIKE MAGDALENA OSTERTAG

Name, Vorname

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

Marker zur Vorhersage der Pro- und Regressionswahrscheinlichkeit der zervikalen intraepithelialen Neoplasie

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.

Stephanskirchen, 10.11.2025

Ostertag, Larissa Ulrike Magdalena

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Publikationsliste



**Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation
mit der elektronischen Fassung**

Ostertag, Larissa Ulrike Magdalena

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Marker zur Vorhersage der Pro- und Regressionswahrscheinlichkeit der
zervikalen intraepithelialen Neoplasie**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Stephanskirchen, 10.11.2025

Ort, Datum

Ostertag, Larissa Ulrike Magdalena

Unterschrift Larissa Ulrike Magdalena Ostertag