

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Rody

Expression von Bridge-1/PSMD9 in Zervixkarzinomen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Lisa Sauer

aus Hünfeld

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Constanze Banz-Jansen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Schwandner
Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.03.2022
Promotionskommission der Sektion Medizin

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Zervixkarzinom	1
1.1.1	Ätiologie und Prävention des Zervixkarzinoms	1
1.1.2	Pathologie und Histopathologie	2
1.1.3	Früherkennung, Diagnostik	3
1.1.4	FIGO-und TNM-Stadien	4
1.1.5	Symptomatik	5
1.1.6	Therapie	6
1.2	Der Transkriptionscoaktivator Bridge-1	8
1.2.1	Bridge-1 und Krebs	9
1.2.2	Der Bridge-1/Activin A-Signalweg	10
1.3	Fragestellung	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Patientinnen	14
2.2	Ethik	14
2.3	Zelllinien	14
2.4	Material	15
2.4.1	Geräte	15
2.4.2	Allgemeine Labormaterialien:	16
2.4.3	Kits	17
2.4.4	Chemikalien und Reagenzien	17
2.4.5	Puffer und Lösungen	18
2.4.6	Zellkulturmaterialien	18
2.5	Methoden	19
2.5.1	Zellkultur	19
2.5.2	Zählen der Zellen	19
2.5.3	In-vitro-Proliferationsassay	20
2.5.4	Proteinextraktion aus Zellkulturen	20
2.5.5	Western Blot	21
2.5.6	Herstellung der Tissue-Microarrays (TMAs)	22
2.5.7	Immunhistochemische Färbung	22
2.5.8	Auswertung des Immunreaktiven Scores (IRS)	23
2.6	Statistische Analysen	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Detektion von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe und peritumoralem Stroma	25
3.2	Korrelation der Expression von Bridge-1 mit klinischen Patientinnendaten	26
3.2.1	Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe und peritumoralem Stroma	27

3.2.2	Korrelation von Bridge-1 und Alter	27
3.2.3	Expression von Bridge-1 in verschiedenen T-Stadien	28
3.2.4	Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe von Patientinnen mit positivem versus negativem Lymphknotenstatus	29
3.2.5	Expression von Bridge-1 bei Patientinnen mit/ohne Metastasierung	29
3.2.6	Expression von Bridge-1 und das Auftreten von <i>Lymphangiosis carcinomatosa</i>	30
3.2.7	Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Gradings	30
3.2.8	Expression von Bridge-1 bei Tumorpatientinnen mit verschiedenen FIGO-Stadien	31
3.2.9	Die Expression von Bridge-1 korreliert mit dem Proliferationsmarker MIB-1	32
3.2.10	Korrelation von Bridge-1 und Nikotinabusus	32
3.2.11	Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe in Abhängigkeit des postoperativen Verlaufs	33
3.2.12	Überlebenszeitanalyse	36
3.3	Bridge-1-Proteinexpression in Zervixkarzinomzelllinien	36
3.4	Einfluss von Activin A auf das Wachstum von Zervixkarzinomzelllinien	37
3.5	Einfluss von Activin A und TGF-β1 auf die Expression von Bridge-1	38
3.6	TGF-β1 und Activin A aktivieren Smad2	40
4	DISKUSSION	42
4.1	Patientinnenkollektiv	42
4.2	Diskussion der Ergebnisse	43
4.2.1	Korrelation der Expression von Bridge-1 mit klinischen Patientinnendaten	43
4.2.1.1	Bridge-1 (PSMD9) als regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms	47
4.2.1.2	Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe in Abhängigkeit des postoperativen Verlaufs	49
4.2.2	Bridge-1-Proteinexpression in Zervixkarzinomzelllinien	51
4.2.3	Einfluss von Activin A auf das Wachstum von Zervixkarzinomzelllinien	51
4.2.4	Einfluss von Activin A auf die Expression von Bridge-1 und Aktivierung von Smad2	52
4.2.5	Bridge-1 als Co-Transkriptionsfaktor	52
5	ZUSAMMENFASSUNG	54
6	LITERATURVERZEICHNIS	55
7	ANHANG	72
8	DANKSAGUNGEN	73

I. Abkürzungsverzeichnis

CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIS	in situ Karzinom (<i>carcinoma in situ</i>)
CP	<i>core particle</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
FCS	fetales Kälberserum
FDR	Falscherkennungsrate (<i>false discovery rate</i>)
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
HPV	humanes Papilloma-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase
IRS	Immunreaktiver Score
I-Smads	inhibitorische Smads
LK	Lymphknoten
M-Stadium	Metastasen-Stadium, Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen
n	Stichprobengröße
N-Stadium	Nodus-Stadium, Vorhandensein oder Fehlen von regionärem Lymphknotenbefall
Pap-Abstrich	Abstrich nach Papanicolaou
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PP	Prozentsatz der positiven Zellen
r_s	Korrelationskoeffizient nach Spearman
R-Smads	rezeptorregulierte Smads
RAC	<i>RP Assembly Chaperone</i>
RP	<i>regulatory particle</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SI	Farbintensität (<i>staining intensity</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STIKO	Ständige Impfkommission
TMA	<i>Tissue-Microarray</i>
T-Stadium	Tumor-Stadium, Verhalten und Ausdehnung des Primarius
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
UPS	<i>ubiquitin-proteasome system</i>
V	Vorkommen einer <i>Hämangiosis carcinomatos</i>

1 Einleitung

1.1 Das Zervixkarzinom

Weltweit wurde 2018 bei ca. 570.000 Frauen ein Zervixkarzinom erstdiagnostiziert und 311.000 Patientinnen starben an einem Zervixkarzinom. Damit ist das Zervixkarzinom die vierthäufigste Krebserkrankung der Frau und hat weltweit die vierthöchste Mortalität aller Tumorerkrankungen der Frau [3, 119]. In Deutschland erkrankten 2016 ca. 4.380 Frauen an einem Zervixkarzinom [119]. Durch die Einführung jährlicher Früherkennungsmaßnahmen ist die Inzidenz des invasiven Zervixkarzinoms seit den 70er Jahren in Deutschland stark gesunken. Während das Zervixkarzinom 1971 noch die häufigste Krebserkrankung der Frau war, ist es heute mit 1,9 % an dreizehnter Stelle [75, 119]. Das mittlere Erkrankungsalter für die invasive Form liegt bei 53 Jahren und für das *in-situ*-Karzinom bei einem Alter von 34 Jahren. Seit 1980 hat sich die Prognose bei einer Erkrankung an einem Zervixkarzinom stetig verbessert. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt heute bei 67 % [119].

Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über Ätiologie, Prävention, Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms.

1.1.1 Ätiologie und Prävention des Zervixkarzinoms

Eine Infektion mit dem humanen Papilloma-Virus (HPV) ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Zervixkarzinoms. Eine persistierende HPV-Infektion alleine reicht meist jedoch nicht für die Entstehung eines Zervixkarzinoms. Man geht davon aus, dass eine Vielzahl an genetischen Mutationen und epigenetischen Variationen eine Rolle spielen [24]. Zudem sind Alter, Rauchen (mehr als 15 Zigaretten pro Tag), Immunsuppression und Multiparität weitere Risikofaktoren. Auch ein niedriger sozioökonomischer Status, eine hohe Anzahl an Sexualpartnern und frühzeitig begonnener Geschlechtsverkehr (< 14 Jahren) erhöhen das Risiko für die Entstehung eines Zervixkarzinoms. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva über einen Zeitraum von mindestens 5 Jahren wird außerdem als Risikofaktor diskutiert [24, 54].

Es sind mehr als 200 verschiedene HPV-Typen bekannt, von denen allerdings nicht alle kanzerogen sind. Man unterteilt die Zervixkarzinom verursachenden Formen in high-risk und low-risk Typen. HPV Typ 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 und 70 gehören in die high-risk-Gruppe, während 6, 11, 42, 43 und 44 zur low-risk-Gruppe gehören [12]. In fast allen Zervixkarzinomen ist HPV-DNA nachzuweisen, am häufigsten

die des HPV-Typ 16 [24]. Die Viren werden über Hautkontakt mit infizierten Stellen übertragen. Außerdem sind die Viren sehr austrocknungsresistent, weshalb eine Schmierinfektion über kontaminierte Oberflächen möglich ist [37].

Sexuell aktive Frauen zwischen 20 und 25 Jahren sind am häufigsten von einer Infektion betroffen, die jedoch meist inapparent verläuft [24]. Das Risiko, eine Präkanzerose (CIN, zervikale intraepitheliale Neoplasie) zu entwickeln, liegt für Frauen, die sich mit HPV 16 oder 18 infiziert haben, elfmal höher, als für nicht infizierte Frauen [69]. Mehr als die Hälfte aller Präkanzerosen bilden sich aber spontan zurück, das Risiko für die Entstehung eines Zervixkarzinoms liegt bei 1,4 % [93, 156]. Die Dauer bzw. die Persistenz der Infektion steht in Zusammenhang mit dem Risiko für die Entstehung einer schwergradigen Präkanzerose, welche sich zum invasiven Karzinom weiterentwickeln kann [24].

Die Ständige Impfkommission (STIKO) empfiehlt seit 2007 zur Prävention eines Zervixkarzinoms eine Schutzimpfung gegen die HPV-Genotypen 16 und 18. Idealerweise sollten Mädchen bereits im Alter von 9-14 Jahren gegen HPV geimpft werden, da in diesem Alter eine bessere Immunantwort erreicht werden kann und die Zahl der Mädchen, die bereits Geschlechtsverkehr hatten, ab einem Alter von 14 Jahren ansteigt. Ziel ist es, den Impfschutz vor dem ersten Geschlechtsverkehr zu vervollständigen [127].

Eine HPV-Infektion kann nicht nur die Entstehung des Zervixkarzinoms verursachen, sondern auch die eines Penis-, Anal- oder Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle oder des Rachens. Daher ist im Impfkalender der STIKO seit 2018 empfohlen auch Jungen zu impfen [67].

1.1.2 Pathologie und Histopathologie

Invasive Zervixkarzinome sind zu 90 % Plattenepithelkarzinome und lassen sich in verhornte und unverhornte Plattenepithelkarzinome unterteilen. Zu den restlichen 10 % zählen Adenokarzinome und sehr selten kleinzellige (neuroendokrine) Karzinome oder Lymphome [11]. Zervixkarzinome wachsen kontinuierlich infiltrierend zuerst in die Zervixwand und anschließend die Parametrien ein. Sie metastasieren in die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten sowie in die Leber und Lunge. Neuroendokrine Karzinome haben eine besonders schlechte Prognose [149].

Eine Prädilektionsstelle für die Karzinomentstehung ist die Transformationszone im Bereich des Überganges von Zervix in Portio. In dieser Zone gibt es viele Mitosen, Zelldifferenzierungs- und -reifungsprozesse, die sie besonders anfällig für kanzerogene Schädigungen machen [6].

1.1.3 Früherkennung, Diagnostik

Im Rahmen der Krebsvorsorgeuntersuchungen können Frauen ab einem Alter von 20 Jahren, neben einer klinischen Untersuchung des äußeren und inneren Genitales, jährlich einen Pap-Abstrich durchführen lassen [30]. Ergänzend dazu kann mit einem HPV-Test bereits die Infektion mit HPV detektiert werden. Ab einem Alter von 35 Jahren können Frauen alternativ alle 3 Jahre einen mit dem Pap-Abstrich kombinierten HPV-Test wählen [30].

Für den Pap-Abstrich werden mit Hilfe einer Bürste oder einem Spatel Zellen aus dem Endozervixkanal und von der Portiooberfläche entnommen. Diese werden anschließend zytologisch untersucht und anhand ihrer Morphologie nach der Münchener Nomenklatur III eingeteilt (s. Tabelle 1) [35].

Tabelle 1: Einteilung nach Papanicolaou.

Nach Werner Böcker u. a., Pathologie, 5. Aufl. (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2012), S. 778f [11] und nach der Münchner Nomenklatur III [35]

PAP	CIN	Histologischer Befund
I		Normal
II-a		Normal, auffällige Anamnese
II-p		Plattenepithelzellkerne mit geringgradigen Veränderungen
II-g		Anomalien zervikaler Drüsenzellen
II-e		Nachweis von Endometriumzellen in der 2. Zyklushälfte bei Frauen älter als 40 Jahre
III-p	CIN II/III	Unklarere Befund, Plattenepithelkarzinom nicht sicher auszuschließen
III-g		Unklarer Befund, ausgeprägte Dysplasie der Drüsenzellen, Adenokarzinom nicht sicher auszuschließen
III-e		Dysplastische endometriale Zellen (insbesond. postmenopausal)
IIID1	CIN I	geringgradige Dysplasie
IIID2	CIN II	mittelgradige oder mäßige Dysplasie
IVa-p	CIN III	hochgradige/schwere Dysplasie bzw. Carcinoma in situ
IVa-g		Adenokarzinom in situ
IVb-p	CIN III	Schwere Dysplasie, Invasion nicht sicher auszuschließen
IV-g		Adenokarzinom in situ, Invasion nicht sicher auszuschließen
V	Invasives Karzinom	Invasives Karzinom
V-p		Plattenepithelkarzinom
V-g		Endozervikales Adenokarzinom
V-e		Endometriales Adenokarzinom

Die zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) werden in drei Schweregrade CIN I bis III eingeteilt. Die hierbei vorliegenden atypischen Zellen haben Merkmale maligner Tumorzellen und verdrängen das normale Plattenepithel [11]. CIN I stellt die histologische

Einleitung

Manifestation der HPV-Infektion dar und ist häufig mit high-risk HPV-Typen assoziiert [88]. Bei immunkompetenten Frauen bildet sich eine CIN I-Läsion oft spontan wieder zurück, eine Progression zu CIN II oder III ist selten. CIN II kann sich ebenfalls noch zurückbilden [88]. Dahingegen stellt CIN III eine obligate Präkanzerose dar und entspricht damit einem Carcinoma in situ (CIS) (siehe Tabelle 1) [11].

Bei auffälligem Pap-Abstrich erfolgt in Abhängigkeit des Schweregrades entweder zunächst ein Test auf eine high-risk HPV-Infektion mit gegebenenfalls anschließender Kolposkopie oder direkt eine Kolposkopie [14, 19, 132].

Liegt ein positiver HPV-Test vor, sollte eine zytologische Abklärung erfolgen. Bei einem Nachweis von HPV-16/-18 oder einem positiven HPV-Test und gleichzeitig einem PAP von mindestens II-p ist zudem eine kolposkopische Diagnostik empfohlen [22].

Ist das Zervixkarzinom histologisch gesichert, ist ein gynäkologischer Ultraschall sowie eine sonographische Untersuchung der Nieren obligat. Zur genaueren Bildgebung sollte ab einem FIGO-Stadium IB2 ein MRT des Beckens und zum Staging ein CT des Abdomens und des Thorax durchgeführt werden [10, 50]. Bei einem ausgedehnten Zervixkarzinom sollte vor einer kombinierten Radiochemotherapie ein operatives Staging zur Beurteilung der Lymphknotensituation durchgeführt werden [85, 86].

Tumormarker, die eine Diagnostik oder Verlaufskontrolle erleichtern könnten, sind bisher noch nicht bekannt [134].

1.1.4 FIGO-und TNM-Stadien

Die Einteilung des Zervixkarzinoms in Stadien erfolgt anhand der TNM-Klassifikation (s. Tabelle 2) der allgemeinen Tumorklassifikation der WHO. Die Therapieentscheidung wird jedoch anhand der FIGO-Klassifikation (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) getroffen (s. Tabelle 2).

Einleitung

Tabelle 2: Vergleich TNM- und FIGO-Stadium.

Nach Horn und Kolleg*innen (2019) FIGO-Klassifikation für das Zervixkarzinom 2019 – was ist neu?
Der Pathologe 40:629–635. [48]

TNM	FIGO	Ausbreitungsgrad
TX		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		Kein Hinweis auf Primärtumor
Tis	0	Carcinoma in situ
T1	I	Tumor auf Zervix begrenzt
T1a	IA	ausschließlich mikroskopisch diagnostiziertes invasives Karzinom, Stromainvasion ≤ 5 mm Tiefe, horizontale Ausbreitung irrelevant
T1a1	IA1	Stromainvasion ≤ 3 mm
T1a2	IA2	Stromainvasion ≥ 3 mm und ≤ 5 mm
T1b	IB	Invasives Karzinom, auf Zervix begrenzt, Stromainvasion > 5 mm
T1b1	IB1	Karzinom auf Zervix begrenzt, Stromainvasion > 5 mm und ≤ 2 cm max. Tumorgröße
T1b2	IB2	größte Ausdehnung > 4 cm
T2	II	Tumorausdehnung jenseits des Uterus, aber nicht bis zur Beckenwand und nicht bis zum unteren Drittel der Vagina
T2a	IIA	Ausbreitung in proximales/mittleres Drittel der Vagina, nicht aber in Parametrien
T2a1	IIA1	Maximale Ausdehnung ≤ 4 cm
T2a2	IIA2	Maximale Ausdehnung ≥ 4 cm
T2b	IIB	Infiltration des Parametriums mit/ohne Infiltration der oberen 2/3 der Vagina
T3	III	Tumorausbreitung bis zur Beckenwand und/oder Infiltration des distalen Drittels der Vagina und/oder tumorbedingte Hydronephrose /funktionslose Niere und/oder Metastasen in pelvinen/paraaortalen Lymphknoten
T3a	IIIA	Ausbreitung bis ins untere Drittel der Vagina, keine Infiltration der Beckenwand
T3b	IIIB	Ausbreitung bis Beckenwand und/oder tumorbedingte Hydronephrose /funktionslose Niere
N1	IIIC	pelvine/paraaortale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIC1	Nur pelvine Lymphknotenmetastasen
N1b	IIIC2	Paraaortale Lymphknotenmetastasen (unabhängig von mögl. pelvinen Metastasen)
	IV	Tumor wächst über das kleine Becken hinaus, infiltriert Schleimhaut der Harnblase/des Rektums
T4	IVA	Infiltration von Organen des kleinen Beckens
M1	IVB	Fernmetastasen

1.1.5 Symptomatik

In einem frühen Stadium ist das Zervixkarzinom meist klinisch asymptomatisch. Falls zum Diagnosezeitpunkt doch schon Symptome auftreten, handelt es sich meist um übelriechenden, gelblichen vaginalen Ausfluss. Dieser kann auch blutig sein. Darüber hinaus

berichten Patientinnen von diffusen hypogastrischen Schmerzen oder Schmerzen während des Geschlechtsverkehrs [32].

In weiter fortgeschrittenen Stadien können lumbale Schmerzen, vaginale Blutungen, Miktionsbeschwerden, Hämaturie oder ein Harnstau (FIGO III) auftreten [32].

1.1.6 Therapie

Die Therapieentscheidung wird anhand des FIGO-Stadiums getroffen. Der histopathologische Subtyp spielt bei der Therapiewahl keine Rolle. Stattdessen muss die Lebenssituation der jeweiligen Patientin mitbeurteilt werden. So ist zum Beispiel bei jungen Patientinnen ein eventuell bestehender Kinderwunsch zu beachten und bei prämenopausalen Patientinnen gegebenenfalls der Erhalt der Ovarien zur intrinsischen Hormonbildung [51].

In den frühen Stadien FIGO 0 - IIA und bei einem lokal begrenztem Zervixkarzinom wird eine Operation bevorzugt, ab Stadium IIB erweist sich ein operatives Staging mit anschließender Radiochemotherapie als empfehlenswert [34, 83, 152].

Die laparoskopische Hysterektomie stellt eine Alternative zu der offenen Operation dar, ist jedoch in mehreren Studien mit einem schlechteren Outcome assoziiert [92, 116]. Weiterhin kann nervensparend oder supraradikal (erweitertes parazervikales Resektionsgebiet, zusätzliche Lymphadenektomie [46]) operiert werden. Bei Kinderwunsch stehen die Konisation oder die Trachelektomie als fertilitätserhaltende Operationsmethoden zur Wahl [17, 73, 91, 129].

Laut der Klassifikation von Piver und Kolleg*innen können fünf verschiedene Stufen der radikalen Hysterektomie unterschieden werden. So wird bei einer Hysterektomie nach Piver I nur der Uterus entfernt, während bei Piver V Uterus, Parametrien und die oberen $\frac{3}{4}$ der Vagina *en bloc*, sowie die A. vesicalis superior und distale Ureteranteile und befallene Anteile der Harnblase reseziert werden [112].

Ab einem FIGO-Stadium IB1 sollte eine offene Hysterektomie erfolgen, über die Radikalität der Operation wird in Abhängigkeit des Stadiums und einer ggf. bereits eingetretenen Menopause entschieden [116]. Ab FIGO-Stadium IA1 kann bei bereits abgeschlossener Familienplanung und Vorliegen von histopathologischen Risikofaktoren (z.B. nicht tumorfreie Resektionsränder nach primärer Konisation (R1), Grading) gegebenenfalls schon eine Hysterektomie erfolgen [73, 135].

Liegen bei einem Zervixkarzinom bis zu einem FIGO-Stadium IB1 keine Risikofaktoren vor, sollte eine Sentinel-Lymphonodektomie angeboten werden. Dies gilt ebenso für das Stadium FIGO IA1, L1 [128].

Einleitung

Bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorbefund (ab FIGO Stadium III oder Stadium IB2 bei histopathologischen Risikofaktoren) sollte eine primäre Radiochemotherapie nach operativem Staging erfolgen [34]. Sobald pelvine oder paraaortale Lymphknoten makroskopisch sichtbar von Tumorgewebe befallen sind, ist die Radiochemotherapie ebenfalls die Therapie der Wahl. Die befallenen Lymphknoten sollten zuvor operativ entfernt werden [95]. Tumor, pelvine sowie ggf. paraaortale Lymphknoten werden bei gleichzeitiger cisplatinhaltiger Chemotherapie bestrahlt. Cisplatin dient dabei als Radiosensitizer [34, 152]. Im Anschluss folgt dann die Brachytherapie [39, 97, 98]. In Abhängigkeit des Patientinnenwunsches und der jeweiligen Lebenssituation kann auch eine alleinige Strahlentherapie erfolgen.

Eine neoadjuvante Chemotherapie ist kein Therapiestandard, jedoch haben Studien gezeigt, dass die Rate an operablen Befunden nach neoadjuvanter Therapie erhöht sein kann [65, 121]. Bei einigen Patientengruppen konnte zudem ein signifikanter Effekt auf das Gesamtüberleben und auf das progressionsfreie Überleben beobachtet werden [121].

Für den Erfolg einer adjuvanten Therapie sind die postoperativen Befunde und das postoperative TNM-Stadium entscheidend [75]. Liegt nach einer Operation eine R0-Resektion (tumorfreier Resektionsrand) vor, bestehen keine histopathologischen Risikofaktoren und sind die Lymphknoten nicht befallen, kann auf eine adjuvante Therapie verzichtet werden. Als Risikofaktoren zählen eine tiefe Stromainvasion, eine Tumorgroße > 4 cm, ein Nachweis von Tumorzellen in den Lymphgefäßen der Tumorregion (L1) und eine mikroskopisch nachweisbare Invasion von Tumorzellen in venöse Gefäße. Bestehen ein bis zwei dieser Risikofaktoren, kann je nach der individuellen Situation, eine adjuvante Therapie durchgeführt werden. Ab drei vorhandenen Risikofaktoren, einer R1-Resektion oder pelvinen Lymphknotenmetastasen, ist eine adjuvante Therapie in jedem Fall indiziert [33, 74, 75].

Liegt eine isolierte Fernmetastase vor (M1), kann eine Operation oder lokale Bestrahlung erwogen werden [27]. Bei disseminierten Fernmetastasen wird chemotherapeutisch (mit Cisplatin und Topotecan oder Carboplatin und Paclitaxel) behandelt [66, 81, 125].

Im palliativen Setting konnten außerdem einen Überlebensvorteil bei einer Kombination von Cisplatin/Paclitaxel oder Topotecan/Cisplatin mit Bevacizumab (VEGF-Inhibitor) festgestellt werden [138]. Im Rahmen einer Zweitlinientherapie von Patientinnen mit metastasiertem Zervixkarzinom und positivem PDL1-Status sind Checkpointinhibitoren, wie Pembrolizumab, eine weitere Therapieoption [29].

1.2 Der Transkriptionscoaktivator Bridge-1

Bridge-1 wurde 1999 von Thomas und Kolleg*innen in der Ratte als Cofaktor des Transkriptionsaktivators im Komplex mit E12 entdeckt [140]. Das identische Protein war bereits als proteasome 26S subunit, non-ATPase 9 (PSMD9) beschrieben. Es fungiert als regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms [45, 143].

Bridge-1 wurde in seiner Funktion als Coaktivator der Transkription insbesondere in verschiedenen endokrinen Geweben des Menschen untersucht, unter anderem im Pankreas, im Hoden, in den Mammae, in der Schilddrüse, in der Nebennierenrinde sowie in Granulosazellen [7, 8]. In Ratten wurde Bridge-1 als Bindeprotein und Coaktivator von E12, einem Aktivator der Transkription von Genen des Insulinstoffwechsels, von Thomas und Kolleg*innen entdeckt [8, 140, 153]. In Tierexperimenten konnten gezeigt werden, dass E12 als Teil der E2A-Familie in einem Komplex mit Bridge-1 unter anderem Glucose-sensible Enhancer-Regionen im Insulinpromotor aktiviert und somit Gene exprimiert werden, die die Insulinproduktion steigern [139, 140]. Niedrige Insulinspiegel fördern wiederum die Expression von Bridge-1 [60].

Bridge-1 interagiert mit PDX-1, einem Transkriptionsfaktor, der einen regulierenden Einfluss auf den Glukosemetabolismus, die Entwicklung des Pankreas und die Funktion der Betazellen im Pankreas hat. Bridge-1 fördert die Transkription von PDX-1-Zielgenen. Bei bestimmten erblichen Formen des Diabetes mellitus kommt es durch eine Mutation von PDX-1 zu einer stärkeren Bindung mit Bridge-1. Damit kann Bridge-1 nicht mehr regulierend auf die Genexpression wirken [139].

Volinic und Kolleg*innen fanden in Mäuseexperimenten, dass eine Überexpression von Bridge-1 die Expression des Insulins reduziert und damit einen Insulinmangel und Diabetes verursacht. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den oben angeführten Studien von Thomas und Kolleg*innen, die eine Förderung der Expression von Genen des Insulinstoffwechsels beschrieben [150]. Außerdem fand man bei diesen Mäusen weniger Betazellen im Pankreas. Da Bridge-1 die Expression antiapoptotischer Proteine reguliert, kam es durch die Überexpression zu einer vermehrten Apoptose in Betazellen [139]. Im Gegensatz dazu kam es zu einer vermehrten Expression von Glukagon-produzierenden Alphazellen [150]. Zudem fördert Bridge-1 die hepatische Liponeogenese, sodass eine Überexpression auch zu einer Hyperlipidämie führen kann [108].

Bridge-1 enthält eine PDZ-artige Domäne, über die es mit anderen Proteinen interagiert [7]. Der Name der Domäne ist eine Kombination der Anfangsbuchstaben der Namen der ersten drei Proteine, in denen eine PDZ-artige Domäne gefunden wurde (PSD-95, Discs-large,

ZO-1) [40, 140]. Typischerweise ermöglichen Proteine mit dieser Domäne ein Zusammenlagern verschiedener Proteine, sodass sie häufig eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion oder im Ionentransport einnehmen [122]. PDZD2, ein weiteres Protein mit PDZ-Domäne wird zum Beispiel mit einer Hemmung des Zellwachstums in Prostatakarzinomzellen in Verbindung gebracht [136]. Mutationen dieser Domäne verändern die Bindungsaffinität des gesamten Proteins. Diese Eigenschaften machen PDZ-Domänen-haltige Proteine, wie z. B. Bridge-1, zu interessanten Angriffspunkten für Medikamente [40].

In seiner ursprünglich bekannten Funktion ist PSMD9 alias Bridge-1 eine regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms. Dieses System dient zum Abbau fehlerhafter Proteine, erfüllt damit andererseits aber auch regulatorische Funktionen. Abzubauen Proteine werden mit Ubiquitin markiert und dann zum Proteasom transportiert [45, 143]. Es gibt verschiedene Proteasome, von denen das 26S-Proteasom das größte ist. Es besteht aus einem 20S *core particle* (CP) und einem 19S *regulatory particle* (RP). Aufgabe des RPs ist das Binden des abzubauen Proteins, das Entfernen des Ubiquitins, sowie das Protein zu entfalten, in das CP zu transportieren und das CP durch die Öffnung des Deckels zu aktivieren. Es besteht aus mindestens 19 Untereinheiten. Aufgabe von PSMD9 ist es, als eines der *RP Assembly Chaperones* (RACs), beim Zusammenlagern dieser Untereinheiten zur Basis der 19S-Untereinheit zu helfen. Im vollständig zusammengelagertem 26S-Proteasom ist PSMD9 nicht mehr nachzuweisen [87, 123, 143].

In unserer Arbeit wollen wir insbesondere die Funktion von Bridge-1 als Transkriptionskoaktivator von Onkogenen und seine regulatorischen Funktionen in Zervixkarzinomzellen untersuchen.

1.2.1 Bridge-1 und Krebs

Immunhistochemische Färbungen konnten zeigen, dass Bridge-1 in Mammakarzinomzellen stärker im Nucleus und weniger stark im Zytoplasma exprimiert wird. Ein Zusammenhang der Expression von Bridge-1 mit Alter, Tumorgröße, Tumor-, Rezeptor- oder Lymphknotenstatus der Patientinnen konnte nicht gezeigt werden [70].

Die Funktion von Bridge-1 als Transkriptionskoaktivator wird unter anderem durch Histone und deren Modifikation reguliert. Dies geschieht durch die Acetyltransferase p300, die dosisabhängig die Aktivität von Bridge-1 verstärkt [72].

Die Strahlentherapie stellt einen wichtigen Bestandteil der Therapiemöglichkeiten des Zervixkarzinoms dar. Patientinnen sprechen jedoch unterschiedlich auf die Therapie an. Es

gibt verschiedene Marker, die die Sensitivität eines Tumors, auf die Strahlentherapie zu reagieren, anzeigen. Das 26S-Proteasom ist ein solcher Marker. PSMD9 ist an das regulatorische 19S-Partikel des 26S-Proteasom assoziiert und könnte damit als weiterer Marker dienen. Bei Mammakarzinom-Patientinnen, die strahlentherapeutisch behandelt wurden, war eine erhöhte Rate lokaler Tumorrezidive zu beobachten, wenn in den Tumorzellen Bridge-1 exprimiert wurde. Nach Restriktion der PSMD9-DNA in Zellkulturversuchen, reduzierte sich die Anzahl überlebender Zellen um bis zu 10 % [70]. Die PSMD9-Expression korreliert mit dem Outcome von Patientinnen, die strahlentherapeutisch behandelt wurden. Daher kann PSMD9 ein prognostischer Marker sein, aber nicht für die generelle Prognose eines Tumors dienen [70]. Ob PSMD9 auch ein prognostischer Marker für das Outcome von strahlentherapeutisch behandelten Zervixkarzinompatientinnen sein könnte, wurde bisher noch nicht untersucht.

1.2.2 Der Bridge-1/Activin A-Signalweg

Activin ist ein Glykoproteinormon aus der Familie der *transforming growth factors-beta* (TGF- β). Das Protein ist ein Homodimer, dessen Untereinheiten durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Es gibt vier Isoformen der Untereinheiten (β_A , β_B , β_C , β_E), je nach Kombination entstehen daher verschiedene Formen des Activins. Die Benennung des Proteins erfolgt entsprechend dieser Kombination, Activin A besteht zum Beispiel aus zwei β_A -Untereinheiten [13, 104, 126]. Activin A reguliert unter anderem Zellwachstum und -differenzierung [7], sowie die Transkription von Bridge-1 [8].

Activin A bindet an den Activin-Rezeptor Typ II (ActR-II), der sich daraufhin mit dem Activin-A-Rezeptor Typ I zusammenlagert. Beide Rezeptoren sind transmembranäre Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren [4, 20, 21]. Die Bindung von Activin A und die Dimerisierung der Rezeptoren führt zu einer Transphosphorylierung des Activin-Rezeptor Typ I durch den Activin-Rezeptor Typ II. Aktivierte Typ-I-Rezeptoren phosphorylieren daraufhin zwei Serinreste am C-terminalen Ende rezeptorregulierter Smads (R-Smads), Smad2 und Smad3 [21, 71, 90, 157].

Smads sind eine Familie von intrazellulären Signalmolekülen des TGF- β -Signalweges, die man in drei Subgruppen unterteilen kann: R-Smads, Co-Smads und inhibitorische Smads (I-Smads) [5, 43]. Sobald die R-Smads durch die Kinase des Rezeptors phosphoryliert wurden, bilden sie einen Komplex mit Smad4 [57, 144].

Sowohl die R-Smads als auch Smad4 können mit Transkriptionsfaktoren interagieren und DNA binden. Einzig Smad2 besitzt keine Fähigkeit zur DNA-Bindung [21, 80].

Einleitung

Sowohl Smad2 und 3, als auch Smad4 pendeln im inaktivierten Zustand ständig zwischen Nucleus und Zytoplasma. Wird der Activin A-Signalweg aktiviert, reichert sich Smad4 im Nucleus an. Möglicherweise wird durch die Komplexbildung mit den R-Smads der Export verhindert [53, 102, 111, 133]. Der Komplex aus Smad4 und R-Smads transloziert in den Nucleus, wo er entweder durch direkte Interaktion oder mit Hilfe DNA-bindender Transkriptionsfaktoren die Transkription verschiedener Gene reguliert [7, 8, 13, 21, 71]. Anschließend werden Smad2 und Smad3 dephosphoryliert und spalten sich von dem Komplex mit Smad4 ab. Sie werden nun mit Hilfe eines aktiven Transports zurück ins Zellplasma gebracht. Der Export von Smad4 erfolgt unabhängig von den R-Smads. Sind die Activin A-Rezeptoren noch aktiv, werden die R-Smads im Zytoplasma erneut phosphoryliert, lagern sich mit Smad4 zusammen und translozieren in den Nucleus. Werden die Activin-Rezeptoren nicht mehr stimuliert, sammeln sich dephosphorylierte R-Smads im Zytoplasma an [53, 71].

Smad7 gehört zu der Gruppe der inhibitorischen Smads (I-Smads). Sie hemmen die Signaltransduktion durch R-Smads, indem sie mittels ihrer MH2-Domäne an den Typ I-Rezeptor binden und deren Phosphorylierung durch die Kinase des Typ I-Rezeptors verhindern [21, 41, 89]. Die Expression von Smad7 wird durch Activin A via Smad3/4 stimuliert, sodass es als negativer Feedback-Mechanismus wirkt [99].

Gegenspieler des Activins ist das Inhibin, welches ebenfalls ein Teil der TGF- β -Superfamilie ist. Das Protein ist, genauso wie Activin, ein Homodimer, bestehend aus je einer α - und einer β -Untereinheit. Man unterscheidet Inhibin A ($\alpha\beta_A$) und Inhibin B ($\alpha\beta_B$). Follistatin ist als Activin bindendes Protein ein weiterer Gegenspieler von Activin. Je zwei Follistatinmoleküle binden ein Activin irreversibel und verhindern damit die Signaltransduktion [101, 104, 126].

Über den Activin A-Signalweg werden regulatorische Proteine des Zellzyklus modifiziert, sodass Activin A inhibierend in das Zellwachstum eingreift [13]. Der Zellzyklus wird unter anderem durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) kontrolliert, die zusammen mit Cyclinen an den Restriktionspunkten des Zellzyklus wirken [13]. Smad3 induziert die Transkription von p15 und p21, zwei CDK-Inhibitoren [13, 96]. Dies hat zu Folge, dass der Zellzyklus am G₁-Restriktionspunkt gestoppt wird [96]. Das Retinoblastom-Protein bleibt dephosphoryliert und somit wird der Übergang in die S-Phase nicht initiiert. Die Zelle arretiert am G₁-Restriktionspunkt, das Zellwachstum wird inhibiert [13].

Activin A kann in vielen verschiedenen Zellarten die Apoptose induzieren und wirkt in manchen Gewebetypen als Tumorsuppressor, indem es das Tumorwachstum und die

Einleitung

Vaskularisierung reduziert [62, 105]. Im Gegensatz dazu stimuliert Activin A die Proliferation von Granulosazellen [115].

Activin A-Rezeptoren und die dazugehörigen Signalmoleküle kommen in menschlichen Brustgewebe sowie in Mammakarzinomzelllinien vor [13, 126]. Activin A konnte in allen Entitäten des Mammakarzinoms nachgewiesen werden, unabhängig vom Grading. Jedoch ist die Expression von Activin B und Activin Rezeptoren Typ II bei aggressiveren Tumorentitäten vermindert und die Smads (Smad2, Smad3 und Smad4) sind vor allem in Zytoplasma zu finden [59]. Activin A scheint als Tumorsuppressor zu wirken, indem es das Zellwachstum hemmt und die Apoptose einleitet [13, 142]. Im Gegensatz dazu findet man bei postmenopausalen Brustkrebspatientinnen sowohl eine vermehrte Activin A-Expression im Gewebe als auch erhöhte Activin A-Serumspiegel [117]. Auch bei Zervixkarzinompatientinnen können erhöhte Serum-Activin A-Spiegel festgestellt werden [110], während Pankreas- und Hypophysentumoren Mutationen im Activin A-Rezeptor mit assoziiert sind [13].

Activin A kann sowohl als Tumorsuppressor als auch onkogen wirken [82].

Activin A stimulierte die Expression von Bridge-1 in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 [8]. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Granulosazellen beobachtet [7]. Darüber hinaus konnte nach Activin A Behandlung eine verstärkte Expression von Smad2, Smad3 und Smad4 in MCF-7-Zellen nachgewiesen werden [8]. Bei verminderter Expression von Bridge-1 wurde die Expression von Smad2, Smad3 und Smad4 reduziert. Daraus kann geschlossen werden, dass Bridge-1 Teil der Activin A-Signalkaskade ist und an der Regulation der Expression von Smads beteiligt ist [8].

Die Rolle von Bridge-1 und der Activin A-Signalkaskade in Zervixkarzinom ist noch unklar und soll mit dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.3 Fragestellung

Das Zervixkarzinom ist weltweit die vierthäufigste Krebserkrankung der Frau [3]. Tumormarker, die bei der Diagnostik und Therapie helfen, gibt es bisher nicht.

Bridge-1 (PSMD9) ist ein Coaktivator des Insulinstoffwechsels, der eine PDZ-artige Domäne enthält [139, 140]. Proteine mit dieser Domäne spielen häufig eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion [122]. In seiner Funktion als regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms nimmt Bridge-1 zudem Einfluss auf das *ubiquitin-proteasome system* (UPS) und damit auf den Abbau fehlerhafter Proteine oder auf regulatorische Prozesse in der Zelle [45, 87, 123, 143]. Diese Eigenschaften machen Bridge-1 zu einem interessanten möglichen Angriffspunkt für eine spezifische Tumorthherapie.

Langlands und Kolleg*innen konnten zeigen, dass Mammakarzinompatientinnen, deren Tumore vermehrt Bridge-1 exprimierten, häufiger ein Rezidiv nach Radiatio erlitten als Patientinnen mit einer geringeren Bridge-1-Expression [70]. Damit wäre Bridge-1 ein ausgezeichneter Marker für die Vorhersage der Erfolgswahrscheinlichkeit einer Radiatio. Bisher gab es keine Studien, die untersuchen, ob Bridge-1 ebenfalls in Zervixkarzinomzellen exprimiert wird.

Andere Studien konnten zeigen, dass Bridge-1 ein Teil der Activin A-Signalkaskade ist [8]. Activin A hat als Mitglied der TGF- β -Superfamilie Einfluss auf das Zellwachstum [13, 115].

Daher stellen sich folgenden Fragen:

- Wird Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe exprimiert?
- Ist Bridge-1 in Tumorzellen und im peritumoralen Stroma unterschiedlich stark exprimiert?
- Korreliert die Expression von Bridge-1 mit klinischen Merkmalen von Zervixkarzinompatientinnen?
- Ist Bridge-1 als prognostischer und/oder prädiktiver Marker für Zervixkarzinome geeignet?
- Exprimieren Zervixkarzinomzelllinien Bridge-1?
- Beeinflusst Activin A als indirekter Ligand von Bridge-1 die Proliferation von Zervixkarziomzellen?
- Beeinflussen Activin A oder TGF- β die Expression von Bridge-1?

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnen

In die Studie wurden 118 Patientinnen eingeschlossen, die sich in dem Zeitraum zwischen 2003 und 2011 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck, einer radikalen Hysterektomie unterzogen. Bei 7 in die Studie eingeschlossenen Patientinnen (FIGO-Stadium III oder IV) war das Karzinom erst sekundär nach erfolgter Hysterektomie mit Lymphknotenentnahme diagnostiziert worden.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patientinnen mit Adenokarzinom, sowie solche, die eine neoadjuvante Bestrahlung oder Chemotherapie erhielten. Aufgrund von fehlenden Daten aus der Krankenakte oder nicht auswertbaren Gewebeproben mussten im Nachhinein einzelne Patientinnen von entsprechenden Auswertungen ausgenommen werden.

Die Gewebeproben wurden während der operativen Tumorresektion entnommen und vom Institut für Pathologie des UKSH, Campus Lübeck in Paraffin eingebettet.

Retrospektiv wurden aus den Krankenakten der Patientinnen, patientinnenspezifische Daten, sowie Daten bezüglich Diagnose und adjuvanter Therapie analysiert. Aus den histopathologischen Befunden wurden TNM-, FIGO-Stadium und eine gegebenenfalls bestehende *Lymphangiosis carcinomatosa* entnommen.

2.2 Ethik

Alle Patientinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis für eine retrospektive, anonymisierte Analyse der Daten und Gewebe.

Vor Beginn der Analysen wurde ein Votum des Ethikrats der Universität zu Lübeck eingeholt. Der Ethikrat genehmigte in seiner Sitzung vom 09. Juni 2015 das Studienprotokoll mit dem Aktenzeichen 15-134 (siehe Anhang).

2.3 Zelllinien

Die verwendeten Zervixkarzinomzelllinien HeLa, Ca Ski und SiHa sind in Tabelle 3 aufgelistet. Sie bilden die häufigsten Zervixkarzinomentitäten ab.

Tabelle 3: Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Karzinom	Hersteller/Vertrieb
HeLa (ATCC® CCL-2)	Epithelzellen	Adenokarzinom	LGC Standards GmbH, Wesel
Ca Ski (ATCC® CRL-1550)	Epithelzellen	Plattenepithelkarzinom	
SiHa (ATCC® HTB-35)	Epithelzellen	Plattenepithelkarzinom	

2.4 Material

2.4.1 Geräte

Tabelle 4: Geräte.

Gerät	Name	Hersteller/Vertrieb
Feinwaage	Scaltec SBC 21	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Flockeneisbereiter	Icematic F80C	Icematic Deutschland, Düsseldorf
Horizontalschüttler	Vibrax VXR S15	IKA Labortechnik, Staufen
Immunhistochemie-Färbeautomat	BOND-MAX	Leica Biosystems, Wetzlar
Kühlzentrifuge	Biofuge® fresco	Heraeus, Hanau
Laborwaage	Sartorius basic BA310S	Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer	MR82	Heidolph Instruments, Schwabach
Mehrkanalpipette	Multipette® plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Mikroplattenphotometer	<i>Multiplate-Reader</i> , MRX	Dynatech Laboratories, Burlington, USA
Mikroskop	Axiovert 135M	Carl Zeiss, Göttingen
Mikroskop	Nikon Eclipse TS100 LED-NV	Nikon GmbH Microscope Solutions, Düsseldorf
Mikroskop	Wilovert A	Hund, Wetzlar
Mikroskopkamera	Mikroskopkamera DS-Vi1	Nikon GmbH Microscope Solutions, Düsseldorf
Mikroskopzubehör	DS-U3 Camera Control Unit	
Mikrozentrifuge	MC6	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrozentrifuge	Rotilabo®	Roth, Karlsruhe
Orbitalschüttler	Shaker S4	ELMI Lab. Equipment, Riga, Lettland
pH-Meter	pH526 MultiCal®	WTW, Weilheim

Material und Methoden

Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Stromgeber	PowerPac 200	Bio-Rad, München
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Trockenschrank		Heraeus, Hanau
UV-Photometer	Helios Gamma	Unicam, Cambridge
UV-Transilluminator	TI 1	Biometra GmbH, Göttingen
Variable Einkanalpipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf Research®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Vortex	REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge	Universal 32	Hettich, Tuttlingen
Western Blot		
Elektrophorese-Gelkammer	Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad, München
Elektrophorese-Kammer	Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, München
<i>Semi-Dry Blotter</i>	Hoefer Semi Dry Transfer Unit TE 70	GE Healthcare, München
Tankblot		Bio-Rad, München
PCR		
<i>real-time PCR detection system</i>	DNA Engine Opticon 2	Biozym, Oldendorf
Thermocycler/PCR-Block	Biometra Thermocycler TPersonal 48	Biometra GmbH, Göttingen
Zellkultur		
Absaugpumpe	Gel Pump GP110	Savant, New York, USA
Brutschrank	CO ₂ -Inkubator Binder CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen
Pipettierhilfe	accu-jet	Brand GmbH, Wertheim
Pipettierhilfe	pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Wasserbad		Memmert, Lübeck

2.4.2 Allgemeine Labormaterialien:

Tabelle 5: allgemeine Labormaterialien.

Material	Hersteller/Vertrieb
Elektrophorese-Trenngel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel)	Bio-Rad, München
Filmkassette	Amersham, GE Healthcare, München
Filterpapier (Chromatographie Papier)	Whatman, GE Healthcare, München
Kryogefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Nitrozellulosetransfermembran	Whatman, GE Healthcare, München
Reaktionsgefäße (Safe Lock Tubes) (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Biochrom AG, Berlin
Zentrifugenröhrchen (Plastik, 50 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.4.3 Kits

Tabelle 6: Kits.

Name	Hersteller/Vertrieb
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn
Bond Polymer Refine Detection Kit	Leica Biosystems, Wetzlar
DAB-Kit	Leica Biosystems, Wetzlar
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Merck KGaA, Darmstadt,

2.4.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien.

Substanz	Hersteller/Vertrieb
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Essigsäure 100 % (Eisessig)	
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proliferationsassay	
MTT-Lösung	Baker Chemikalien, Groß-Gerau
MTT-Stopplösung	5 mg/ml Methylthiozolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) + PBS
Natriumchlorid	50 % N,N-Dimethylformamid (pH 4,7, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn) + 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS, Serva Electrophoresis, Heidelberg)
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma, Deisenhofen

Material und Methoden

Western Blot	
2-Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Hyperfilm ECL	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Amersham, GE Healthcare, München
Natrium Orthovanadat	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Re-Blot Plus	Bio-Rad, München
Röntgen Entwickler-Konzentrat	Chemicon International, Hofheim
Röntgen Fixierer-Konzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach

2.4.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Puffer und Lösungen.

Substanz	Hersteller/Vertrieb/Rezept
BSA (bovines Serum-Albumin, A9647)	Merck KGaA, Darmstadt
Mammalian Protein Extraction Buffer (Organic Buffer + 10 mM NaCl + Detergent, pH 7,5)	GE Healthcare, München
Milchpulver (Blotting Grade)	Roth, Karlsruhe
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	VWR International GmbH Germany, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
TBS	100 mM Tris + 1 M NaCl + 0,1 % Tween 20, pH 7,4
Proteinextraktion	
Protease-Inhibitor-Cocktail, P8340	Merck, KGaA, Darmstadt
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2, P5726	
RIPA-Puffer	1 x PBS + 1 % Igepal CA-630 + 0,5 % Natrium Deoxycholat + 0,1 % SDS

2.4.6 Zellkulturmaterialien

Tabelle 9: Zellkulturmaterialien.

Substanz	Hersteller/Vertrieb/Rezept
fetalem Kälberserum 10 % (FCS)	Laboratories GmbH, Cölbe
Gewebekulturflaschen (T75, T175 mit Filter)	Sarstedt Nümbrecht
Gewebekulturplatte 96; -6-well	Sarstedt Nümbrecht
1 % Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI-1640	Invitrogen, Karlsruhe

Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

2.5 Methoden

2.5.1 Zellkultur

Die Zervixkarzinomzelllinien HeLa (ATCC® CCL-2, LGC Standards GmbH, Wesel), Ca Ski (ATCC® CRL-1550, LGC Standards GmbH, Wesel), SiHa (ATCC® HTB-35, LGC Standards GmbH, Wesel) wurden in Gewebekulturflaschen (T75, T175 mit Filter; Sarstedt Nümbrecht) bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (Binder CB 150, Binder GmbH, Tuttlingen) in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde RPMI-1640 (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS; PAA Laboratories GmbH, Cölbe) und 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10 mg/ml; PAA Laboratories GmbH, Cölbe) verwendet.

Die bei -80 °C gelagerten Zellen wurden im Wärmebad bei 37 °C aufgetaut, in Medium suspensiert und 5 min bei 340 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden resuspensiert und kultiviert.

Vor dem Erreichen von Konfluenz wurden die Kulturen passagiert oder für Versuche verwendet. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (*phosphate buffered saline*, VWR International GmbH Germany, Darmstadt) gespült und mit 5 ml Trypsin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) für 5-10 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit FCS-haltigem Medium verdünnt, in ein Röhrchen überführt und für 5 min bei 340 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10 ml Medium resuspensiert. Ein Fünftel der Suspension wurde passagiert.

2.5.2 Zählen der Zellen

Die resuspensierten Zellen wurden mit einem automatischen Zellzähler (TC20, *Automated Cell Counter*, Bio-Rad, München) gezählt.

Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich, Steinheim) gemischt, in eine Zählkammer pipettiert und maschinell ausgewertet. Trypanblau wird von lebenden Zellen ausgeschlossen und färbt demnach nur tote Zellen blau. Mit dieser Methode wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

2.5.3 In-vitro-Proliferationsassay

Auf eine 96-*well* Platte wurden 500 oder 1000 SiHa-Zellen pro *well* in 100 µl Wachstumsmedium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch 100 µl FCS-freies Medium ersetzt und weitere 24 h kultiviert. Am nächsten Tag wurden 50 µl der Testsubstanzen (in FCS-freiem Medium) in dreifacher Konzentration zu den Kulturen gegeben, sodass diese mit den bereits vorhandenen 100 µl Medium auf eine einfache Konzentration der Testsubstanz verdünnt wurde.

Nach 24 h Inkubation mit der Testsubstanz wurde der MTT-Tetrazolium-Assay durchgeführt. In dem Test wird der Metabolismus von Tetrazolium in blau-violett gefärbte, Formazankristalle gemessen. Zur Herstellung der MTT-Lösung wurden 5 mg/ml Methylthizolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT, Sigma, Deisenhofen) in PBS (*phosphate buffered saline*, VWR International GmbH Germany, Darmstadt) gelöst. Für den Assay wurde das Medium abgesaugt, die MTT-Lösung 1:10 mit Phenolrot-freiem DMEM-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt und 100 µl pro *well* auf die Zellen gegeben. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank waren Präzipitate sichtbar und die Umwandlung wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung 50 % N,N-Dimethylformamid, pH 4,7 (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn) 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS, Serva Electrophoresis, Heidelberg) gestoppt und die Formazankristalle über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln gelöst. Die Farbintensitäten wurden mit einem Mikroplattenphotometer (Multiplate-Reader, MRX, Dynatech Laboratories, Burlington, USA) bei 595 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Da die Umwandlung von Tetrazolium in Formazankristalle in allen lebenden Zellen erfolgt, sind die photometrisch gemessenen Absorptionen proportional zur Menge metabolisch aktiver Zellen.

2.5.4 Proteinextraktion aus Zellkulturen

Auf eine 6-*well* Platte wurden 200 000 Zellen pro *well* in 2 ml Wachstumsmedium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch FCS-freies Medium ersetzt und weitere 24 h kultiviert. Dann wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml der Testsubstanzen weitere 24 h inkubiert.

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen in 1,5 ml RIPA-Puffer (1 x PBS, 1 % Igepal CA-630, 0,5 % Natrium Deoxycholat, 0,1 % SDS) mit je 15 µl Protease-Inhibitor-Cocktail und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2 (Merck, KGaA, Darmstadt) lysiert. Nach 10 min Zentrifugation mit 10 000 x g bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen, der das Protein enthält.

Im BCA-Protein-Assay (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn) wurde der Proteingehalt des Lysats ermittelt.

2.5.5 Western Blot

In einem Polyacrylamid-Trenngel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad, München) wurden pro Spur 12 µg der Proteinlysate bei 160 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurden 7 µl Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, München) verwendet. Bei 20 V und 140 mA wurden die Proteine anschließend in der Blottingapparatur (Hoefer Semi Dry Transfer Unit TE 70, GE Healthcare, München; Stromgeber: Pharmacia Biotech EPS 200, GE Healthcare, München) für 40 min horizontal auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman, GE Healthcare, München) übertragen. Danach wurde die Membran für 1 h in Blockinglösung (5 % fettfreies Milchpulver, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe in TBS-T (*Tris-buffered saline with Tween20*; 100 mM Tris, 1 M NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,4) geblockt und dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen.

Zur Immundetektion wurde die Membran über Nacht mit einem Primärantikörper bei 4 °C in TBS-T mit 5 % BSA oder 5 % fettfreiem Milchpulver inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot dreimal für je 5 min in TBS-T gewaschen und anschließend mit einem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran nochmals dreimal für 15 min in TBS-T gewaschen.

Tabelle 10: Antikörper und Verdünnungen.

Primärantikörper	Verdünnung
anti-Phospho-Smad2-Antikörper (<i>rabbit</i> , Ser 465/467, Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main)	1:1000, in 5 %igem BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i> , A9647, Merck KGaA, Darmstadt)
Bridge-1-Antikörper (<i>mouse</i> , 612458, BD Transduction Laboratories, Heidelberg)	1:1000 in 5 %iger Milchlösung in TBS-T
Smad-2-Antikörper (<i>mouse</i> , ab71109, Abcam, Berlin)	1:2000 in 5 %iger Milchlösung in TBS-T
β-Actin (<i>mouse</i> , A2228, Merck KGaA, Darmstadt)	1:20 000 in 5 %iger Milchlösung in TBS-T
Sekundärantikörper	Verdünnung
<i>anti-rabbit</i> -IgG (GENA934-1ML, Merck KGaA, Darmstadt)	1:5000 in 5 %igem BSA
<i>anti-mouse</i> -IgG (NA931V, Amersham, GE Healthcarre, München)	1: 4000 in 5 %iger Milchlösung in TBS-T

Die Detektion der Antikörper-gebundenen Proteinbanden erfolgte in ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck KGaA, Darmstadt). Anschließend wurden die Banden auf einer Autoradiografie dargestellt.

Bridge-1-, Smad-2-, sowie β -Actin-Antikörper wurden in den oben angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

2.5.6 Herstellung der Tissue-Microarrays (TMAs)

Aus den intraoperativ entnommenen Gewebeproben wurden unmittelbar nach einer Operation im Institut für Pathologie Paraffinblöcke gegossen.

Für die Herstellung von *tissue-microarrays* (TMAs) wurden zunächst Tumorgewebe und peritumorales Stroma in den Gewebeproben identifiziert. Hierfür wurden am Mikrotom 4 μ m dicke Schnitte von den Blöcken hergestellt und für die Identifikation von Tumorgewebe und peritumoralem Stroma mit *Mayer's Haematoxylin and Eosin* (H&E) gefärbt. Anschließend wurde aus Tumorgewebe und Stroma jeweils eine Probe ausgestanzt und in Paraffinblöcke eingebettet. Die Anordnung der Proben verschiedener Patientinnen erfolgte dabei willkürlich, sodass bei der späteren Auswertung keine Rückschlüsse von der Lokalisation der Probe auf den Befund geschlossen werden konnte. Jeder Patientin wurde eine Nummer zugewiesen und die Lokalisation der Proben mit Hilfe dieser Nummer auf einer schematischen Darstellung des TMAs vermerkt, um nach der mikroskopischen Auswertung die verschiedenen Stenzen der jeweiligen Patientin wieder zuordnen zu können. Zur besseren Orientierung wurden die Proben asymmetrisch angeordnet und/oder eine zusätzliche Probe mit Leber-oder Plazentagewebe eingefügt.

Insgesamt wurden 4 TMA mit Hilfe eines halb-automatischen *TMArrayer* (*Pathology Devices, Inc., Westminster, MD, USA*) hergestellt.

Die Blöcke wurden anschließend 12 h bei 37 °C im Brutschrank gewärmt und dann bei Raumtemperatur vorsichtig gepresst. Anschließend wurden die Blöcke erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte anschließend bei 4 °C.

Mit einem Mikrotom wurden pro TMA mehrere 4 μ m dicke Schnitte aus dem gekühlten Block hergestellt und auf Objektträger aufgezogen [103].

2.5.7 Immunhistochemische Färbung

Um die Expression von Bridge-1 in den Geweben zu analysieren, wurden die TMAs immunhistochemisch gefärbt.

Zuerst wurde eine Antigendemaskierung in 1:10 verdünnter, auf 100 °C erhitzter *Epitope Retrieval Solution* (RE7119-CE, Epitope Ret Soln pH 9, Leica Biosystems, Wetzlar) durchgeführt. Für die Färbung wurde ein Immunhistochemie-Färbeautomat (BOND-MAX, Leica Biosystems, Wetzlar) und ein polymeres Meerrettichperoxidase (HRP) -Linker-Antikörper-Konjugatsystem (Bond Polymer Refine Detection Kit, Leica Biosystems, Wetzlar) zum Nachweis des Antikörpers verwendet. Um eine endogene Peroxidasaktivität zu blockieren, wurden die Präparate mit 3-4 %igem Wasserstoffperoxid präinkubiert. Der Bridge-1-Antikörper (612458, BD Transduction Laboratories, Heidelberg) wurde in einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen. Die Meerrettichperoxidase bewirkt die Umwandlung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, DAB-Kit, Leica Biosystems, Wetzlar) in ein braunes Endprodukt, das die Antikörperkomplexe sichtbar macht.

2.5.8 Auswertung des Immunreaktiven Scores (IRS)

Der IRS wurde ursprünglich entwickelt, um Östrogenrezeptoren immunhistochemisch im Mammakarzinomgewebe zu quantifizieren [118]. Hier wird er auf die immunhistochemische Quantifizierung von Bridge-1 im Zervixkarzinomgewebe übertragen (Mikroskop Nikon Eclipse TS100 LED-NV, Nikon GmbH Microscope Solutions, Düsseldorf). Dabei wurden Fotoaufnahmen mit der Mikroskopkamera (DSVi1, Nikon GmbH Microscope Solutions, Düsseldorf; Bildgebungssoftware Nis-Elements Documentation) angefertigt.

Der IRS wurde aus den Parametern in Tabelle 11 errechnet. Die ermittelten Werte für Färbintensität (*Staining Intensity*, SI) und den Prozentsatz der positiven Zellen (PP) wurden miteinander multipliziert ($IRS = SI \times PP$). Ein IRS zwischen 0 und 2 wurde als negativ und ein $IRS \geq 3$ als positiv bewertet. Der so für die jeweilige Probe errechnete Wert des IRS wurde anschließend der jeweiligen Patientin zugeordnet.

Tabelle 11: Parameter zur Berechnung des IRS

Nach Remmele und Stegner (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. Der Pathologe 8:138–14 [118].

Färbeintensität	
0	negativ
1	schwach positiv
2	mäßig positiv
3	stark positiv
Prozentsatz positiver Zellen	
0	negativ
1	< 10 % positive Zellkerne
2	10-50 % positive Zellkerne
3	51-80 % positive Zellkerne
4	> 80 % positive Zellkerne

Färbeintensität (*Staining Intensity*, SI) und Prozentsatz der positiven Zellen (PP).

2.6 Statistische Analysen

Der IRS in peritumoralem Stroma und Tumorgewebe wurde mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Korrelationen des IRS zu TNM-Stadien, Grading, FIGO-Stadien, Lymphknotenbefall und MIB-1-Expression mit der Rangkorrelation nach Spearman analysiert.

Durch wiederholtes Testen am gleichen Patientinnenkollektiv erhöht sich das Risiko, dass ein Ergebnis fälschlicherweise statistisch signifikant ist und eine Nullhypothese damit fälschlicherweise abgelehnt wird. Die Anzahl der zu erwartenden fälschlicherweise abgelehnten Nullhypothesen wird durch die „*false discovery rate*“ (FDR) beschrieben. Zur Überprüfung der FDR wurde daher im Anschluss der Test nach Benjamini-Hochberg durchgeführt.

Zur Analyse der Ergebnisse aus Proliferationsassays sowie der Expression von Bridge-1 und Smad-2 *in vitro* wurde der Kruskal-Wallis-Test („H-Test“) mit dem Post-hoc-Test nach Dunn verwendet.

Die Überlebenszeit wurde mit einer Kaplan-Meier-Kurve graphisch dargestellt und anschließend mit dem Log-Rank-Test verglichen.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 8 bzw. 9 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe und peritumoralem Stroma

Bridge-1 konnte in Gewebeproben von Zervixkarzinompatientinnen immunhistochemisch detektiert werden. Dies ist in Abbildung 1 beispielhaft dargestellt.

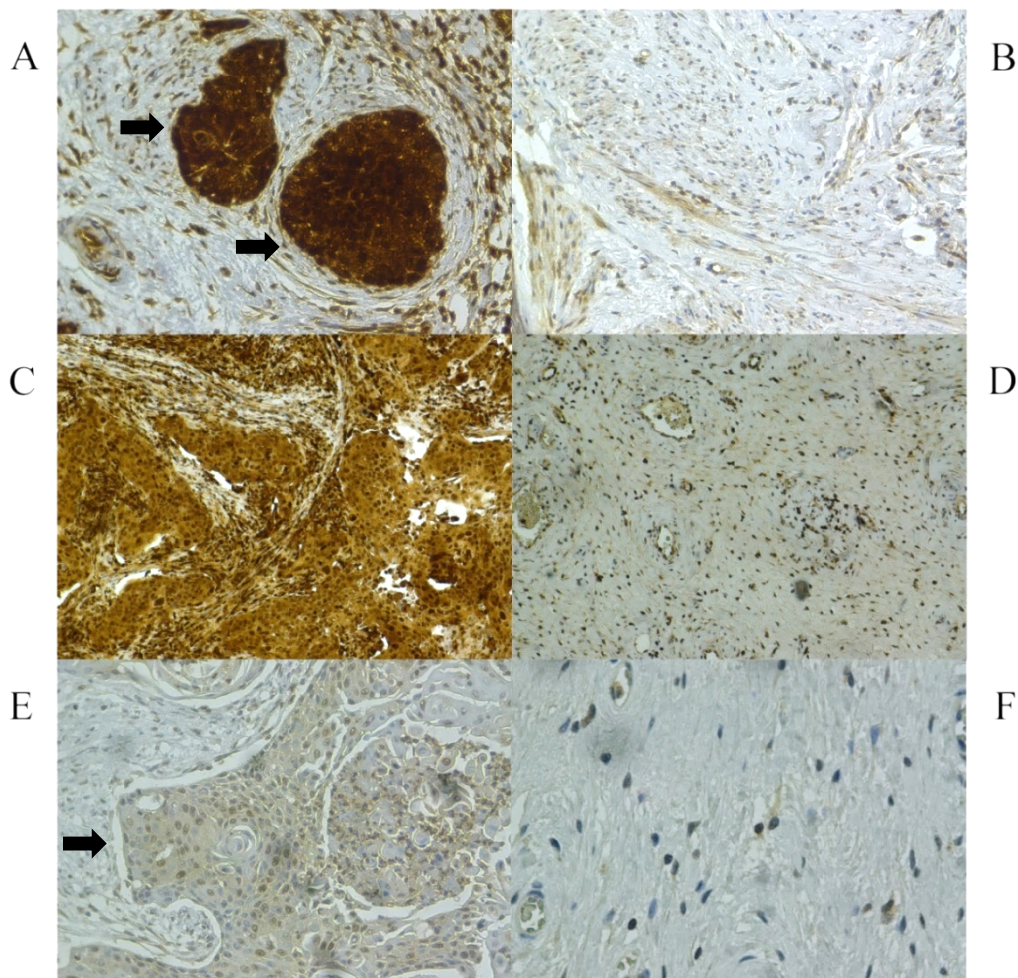


Abbildung 1: Immunhistochemische Färbung von Zervixgewebe mit Bridge-1 Antikörper. Dargestellt sind Beispiele für unterschiedliche IRS. A) Tumor (s. Pfeile); IRS 12 (PP 4, SI 3); 20-fache Vergrößerung. B) Peritumorales Stroma; IRS 2 (PP 2, SI 1); 20-fache Vergrößerung. C) Tumor; IRS 8 (PP 4, SI 2); 10-fache Vergrößerung. D) Peritumorales Stroma; IRS 3 (PP 3, SI 1); 10-fache Vergrößerung. E) Tumor (s. Pfeil); IRS 4 (PP 4, SI 1); 20-fache Vergrößerung. F) Peritumorales Stroma; IRS 1 (PP 1, SI 1); 40-fache Vergrößerung.

Ein $IRS \geq 3$ wurde als positiver Nachweis von Bridge-1 gewertet. Von 96 der eingeschlossenen Patientinnen waren Proben sowohl von Tumorgewebe als auch Stroma

Ergebnisse

vorhanden. Insgesamt konnte in 95 der 96 Zervixkarzinomproben eine Bridge-1-Expression nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu war Bridge-1 nur in 77 Proben des peritumoralen Stromas positiv.

3.2 Korrelation der Expression von Bridge-1 mit klinischen Patientinnendaten

Die Expression von Bridge-1 wurde anhand des IRS quantifiziert und mit den klinischen Daten der Patientinnen korreliert. Anschließend erfolgte eine Korrektur der FDR im Benjamini-Hochberg-Verfahren. In Tabelle 12 ist die Expression von Bridge-1 im Zervixkarzinomgewebe mit Patientinnendaten korreliert. Die einzelnen Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten detailliert dargestellt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Analyse von Gewebeproben von 118 Patientinnen in Bezug auf Bridge-1. IRS: immunreaktiver Score; n: Stichprobe; KI: Konfidenzintervall; SD: *standard deviation* (Standardabweichung); FDR: *false discovery rate*.

Gewebe	Patientinnen [n]	IRS (Mittelwert ± SD)	p-Wert	FDR
Zervixkarzinomgewebe	96			
Zervixkarzinomgewebe	96	8,48 ± 1,9	p ≤ 0,0001 ***	p = 0,0013 **
peritumorales Stroma	96	3,18 ± 0,81		
Alter	103	95 %-KI		
rs	0,03926	-0,1611 bis 0,2365	p = 0,3469	p = 0,3758
T-Stadium	101	IRS (Mittelwert ± SD)		
T1	62	8,71 ± 2,02	p = 0,0568	p = 0,1231
T2	34	8,18 ± 1,42		
T3	3	9,33 ± 2,31		
T4	2	6,00 ± 2,83		
rs	-0,1584	95%-KI -0,3483 bis 0,0441		
N-Stadium	93	IRS (Mittelwert ± SD)		
N0	69	8,44 ± 1,94	p = 0,2755	p = 0,3582
N1	24	8,17 ± 1,44		
rs	-0,06263	95%-KI -0,2687 bis 0,1489		
M-Stadium	102	IRS (Mittelwert ± SD)		
M0	97	8,56 ± 1,95	p = 0,2524	p = 0,3582
M1	5	8,00 ± 0		
rs	-0,06678	95 %-KI -0,2633 bis 0,1351		
Lymphangiosis carcinomatosa	58	IRS (Mittelwert ± SD)		
L0	38	8,58 ± 1,8	p = 0,3058	p = 0,3614
L1	20	8,80 ± 2,09		
rs	0,06806	95 %-KI -0,2011 bis 0,3277		
Grading (UICC)	99	IRS (Mittelwert ± SD)		
G1	2	8,00	p = 0,4384	p = 0,4384
G2	47	8,6 ± 1,86		
G3	50	8,48 ± 1,96		
		95 %-KI		

Ergebnisse

rs	-0,01579	-0,2182 bis 0,1879		
FIGO Stadium	102	IRS (Mittelwert ± SD)		
FIGO I	62	8,71 ± 2,02	p = 0,0904	p = 0,1469
FIGO II	34	8,29 ± 1,57		
FIGO III	3	9,33 ± 2,31		
FIGO IV	3	6,67 ± 2,31		
rs	-0,1336	95 %-KI		
		-0,3250 bis 0,06832		
MIB-1	103	95 %-KI		
rs	0,2866	0,09278 bis 0,4595	p = 0,0017 **	p = 0,011 *
Raucherstatus	103	IRS (Mittelwert ± SD)		
Raucherinnen	41	8,24 ± 1,69	p = 0,0904	p = 0,1469
Nichtraucherinnen	62	8,71 ± 2,02		
rs	-0,1329	95 %-KI		
		-0,3234 bis 0,0680		

3.2.1 Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe und peritumoralem Stroma

Der IRS-Mittelwert der Bridge-1 Expression für alle Patientinnen lag im Zervixkarzinomgewebe mit 8,48 und einer Standardabweichung (SD) von $\pm 1,9$ signifikant über dem Mittelwert im peritumoralem Stroma mit 3,18 (SD $\pm 0,81$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: $p < 0,0001$; FDR: $p = 0,0013$; Tabelle 12) In Abbildung 2 ist der Median von 8,0 für Tumorgewebe und der Median von 3,0 für peritumorales Stroma dargestellt.

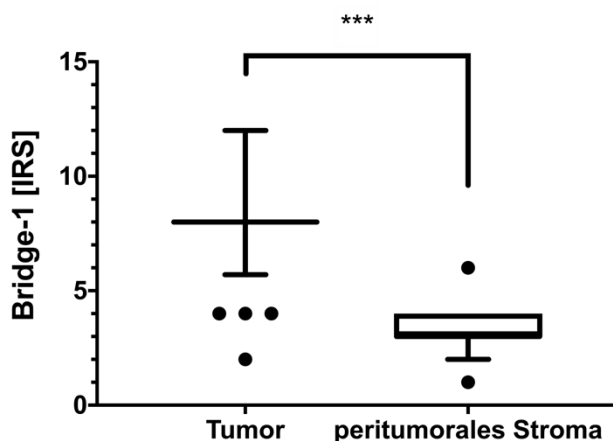


Abbildung 2: Bridge-1-Expression in Zervixkarzinomgewebe und peritumoralem Stroma.

IRS: Immunreaktiver Score; Signifikanz: *** $p < 0,001$; FDR: $p = 0,0013$.

3.2.2 Korrelation von Bridge-1 und Alter

Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation hatte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Expression von Bridge-1 ($r_s = 0,03926$; $p = 0,3469$; FDR: $p = 0,3758$). Das mittlere Alter zum OP-Zeitpunkt betrug $53,13 \pm 12,41$ Jahre (Abbildung 3; Tabelle 12).

Ergebnisse

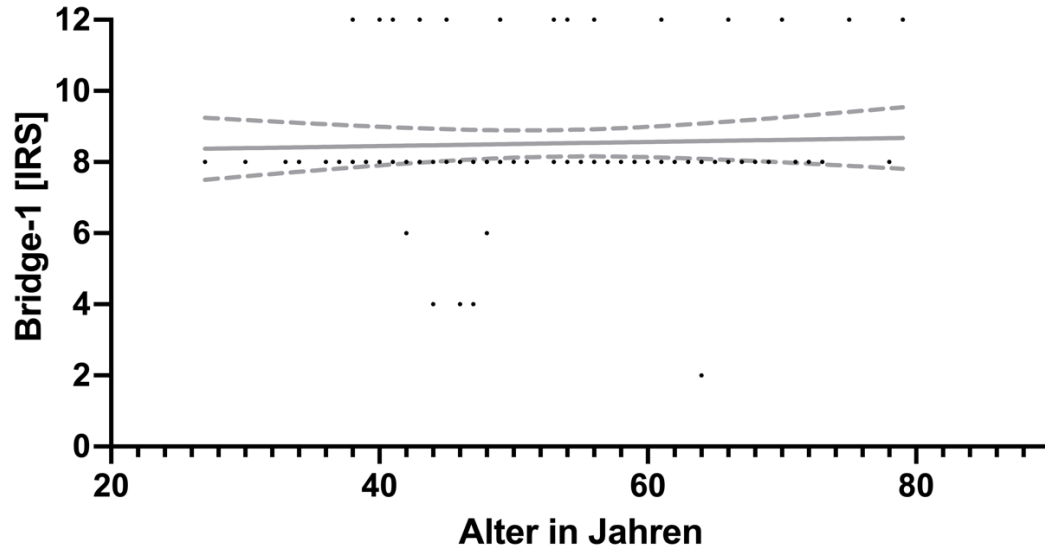


Abbildung 3: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Alters.
Zur Orientierung wurde eine Ausgleichsgerade mit 95 %-Konfidenzintervall in die Abbildung gelegt.

IRS: immunreaktiver Score.

3.2.3 Expression von Bridge-1 in verschiedenen T-Stadien

Das Zervixkarzinoms wird in der TNM-Klassifikation nach Größe und Ausdehnung des Tumors in verschiedene T-Stadien eingeteilt. Der Mittelwert des IRS für Bridge-1 variierte in den verschiedenen T-Stadien (T1: $8,71 \pm 2,02$; $n = 62$; T2: $8,18 \pm 1,42$ ($n = 34$); T3: $9,33 \pm 2,31$; $n = 3$; T4: $6,00 \pm 2,83$; $n = 2$). Mit steigendem T-Stadium, mit Ausnahme des Stadiums T3, ist eine fallende Tendenz des Mittelwertes ohne statistische Signifikanz zu beobachten ($p = 0,0568$; FDR: $p = 0,123$; $r_s = -0,1584$, s. Tabelle 12 und Abbildung 4).

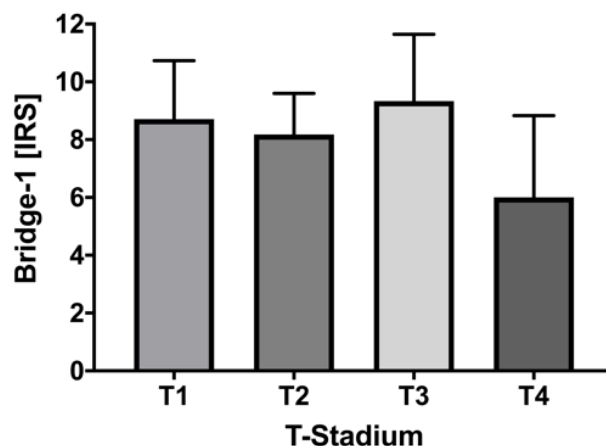


Abbildung 4: Bridge-1-Expression in den verschiedenen T-Stadien.

IRS: Immunreaktiver Score; T-Stadium: Tumor-Stadium.

3.2.4 Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe von Patientinnen mit positivem versus negativem Lymphknotenstatus

Von 93 Patientinnen, deren Zervixkarzinomgewebepräparate untersucht wurden, hatten 24 Lymphknotenmetastasen (N1). Für das Gewebe von Patientinnen mit Lymphknotenbefall beträgt der Mittelwert des IRS für Bridge-1 8,17 ($\pm 1,44$; $n = 25$) und ohne Tumorbefall der Lymphknoten 8,44 ($\pm 1,94$; $n = 69$). Der Lymphknotenstatus korreliert nicht mit dem IRS für Bridge-1 (Rangkorrelation nach Spearman: $r_s = -0,1063$; $p = 0,1403$; FDR: $p = 0,3582$), s. Tabelle 12, Abbildung 5.

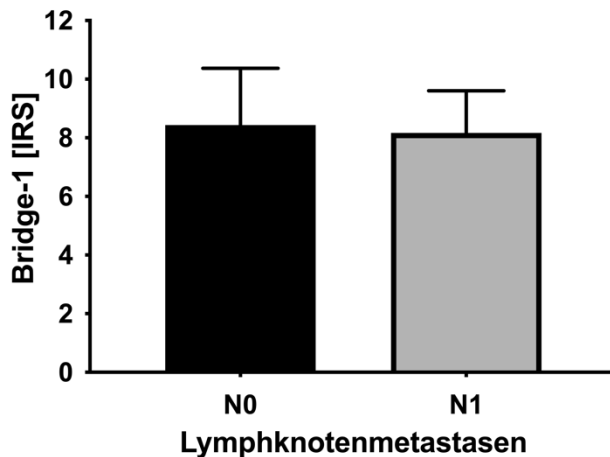


Abbildung 5: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus. IRS: Immunreaktiver Score; N0: kein regionärer Lymphknotenbefall; N1: regionärer Lymphknotenbefall.

3.2.5 Expression von Bridge-1 bei Patientinnen mit/ohne Metastasierung

Bei 102 Patientinnen korrelierte die Expression von Bridge-1 nicht mit dem Vorkommen von Fernmetastasen (Rangkorrelation nach Spearman $r_s = -0,06678$, $p = 0,2524$; FDR: $p = 0,3582$). In 97 Fällen konnten keine Metastasen festgestellt werden, der Mittelwert des IRS für Bridge-1 betrug 8,56 ($\pm 1,95$). In der Gruppe der Patientinnen mit Fernmetastasen war der Mittelwert geringfügig niedriger ($8,00 \pm 0$; $n = 5$; Tabelle 12, Abbildung 6).

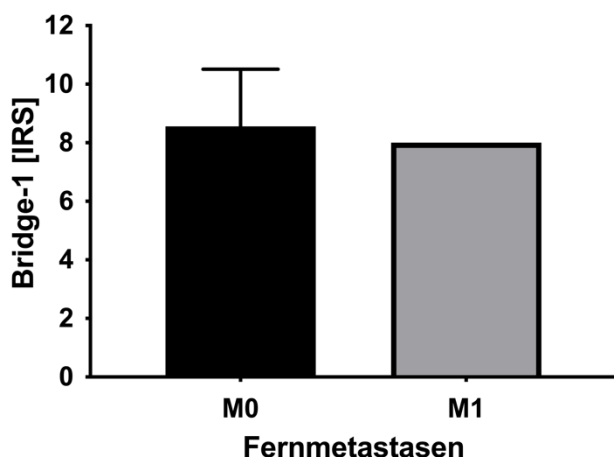


Abbildung 6: Expression von Bridge-1 bei Patientinnen ohne (M0) und mit (M1) Fernmetastasierung.

3.2.6 Expression von Bridge-1 und das Auftreten von *Lymphangiosis carcinomatosa*

Zwischen dem Auftreten einer *Lymphangiosis carcinomatosa* und der Expression von Bridge-1 konnte bei den diesbezüglich untersuchten Patientinnen keine Korrelation nachgewiesen werden ($r_s = 0,06806$, $p = 0,3058$; FDR: $p = 0,3614$; $n = 58$). Der Mittelwert des IRS für Bridge-1 betrug mit Invasion der Lymphgefäße $8,80 (\pm 2,09; n = 20)$ und ohne $8,58 (\pm 1,8; n = 38)$ (siehe Tabelle 12; Abbildung 7).

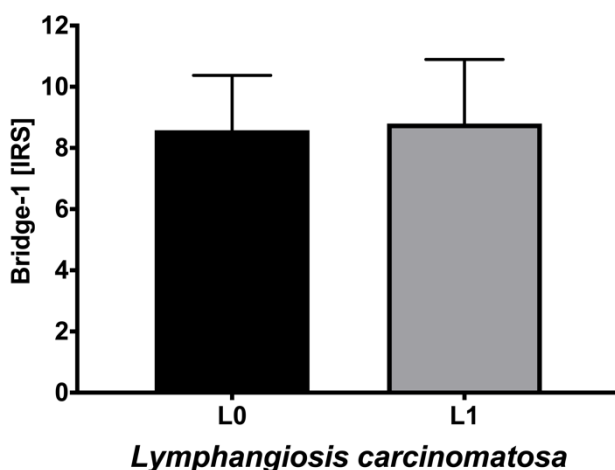


Abbildung 7: Expression von Bridge-1 in Bezug auf Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa. IRS: Immunreaktiver Score. *Lymphangiosis carcinomatosa*. L0: keine Invasion der Lymphgefäße; L1: Invasion der Lymphgefäße.

3.2.7 Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Gradings

Die Mittelwerte des IRS für Bridge-1 im Zervixkarzinomgewebe korrelierten bei 99 untersuchten Patientinnen nicht mit dem Grading nach UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) (G1: $8,00; n = 2$, G2: $8,6 \pm 1,86, n = 47$ und G3: $8,48 \pm 1,96; n = 50$; $r_s = -0,01579$, $p = 0,4384$; FDR: $p = 0,43849$ siehe Tabelle 12 und Abbildung 8).

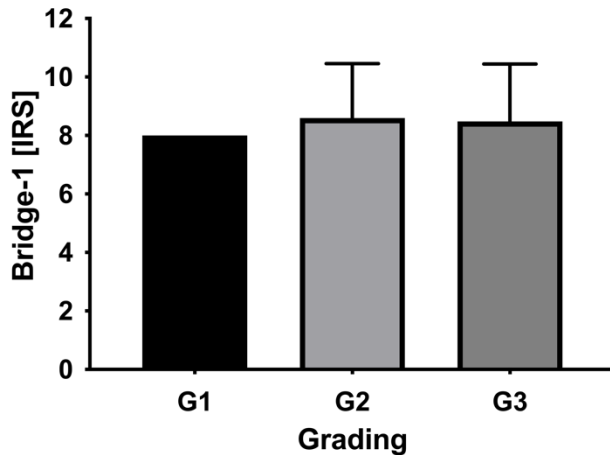


Abbildung 8: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Gradings nach UICC. IRS: Immunreaktiver Score.

3.2.8 Expression von Bridge-1 bei Tumorpatientinnen mit verschiedenen FIGO-Stadien

Bei 102 Patientinnen korrelierte die Bridge-1-Expression (IRS) in den Karzinomgewebeprobe nach der Rangkorrelation nach Spearman nicht mit dem FIGO-Stadium des Tumors ($r_s = -0,1336$, p-Wert = 0,0904; FDR: $p = 0,1469$; siehe Tabelle 12, Abb. 9).

Die IRS-Mittelwerte in den jeweiligen Stadien zeigen eine fallende Tendenz (FIGO I: $8,71 \pm 2,02$, $n = 62$; FIGO II: $8,29 \pm 1,57$, $n = 34$; FIGO III: $9,33 \pm 2,31$, $n = 3$), mit einem im Vergleich niedrigeren Wert für das Stadium FIGO IV ($6,67 \pm 2,31$, $n = 3$). Jedoch waren die Stichproben der FIGO-Stadien III und IV mit jeweils 3 Patienten sehr klein.

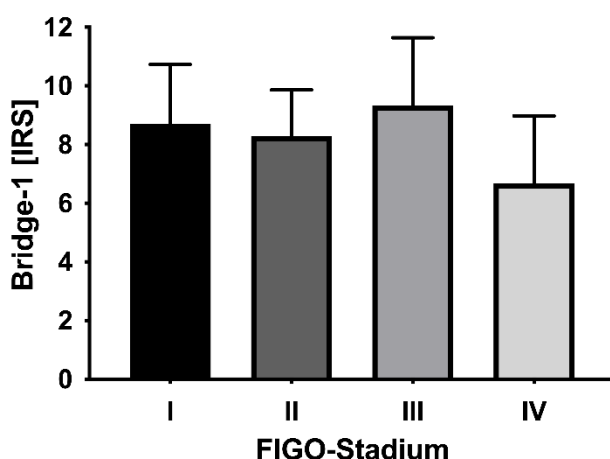


Abbildung 9: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des FIGO-Stadiums. IRS: Immunreaktiver Score; FIGO: Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique.

3.2.9 Die Expression von Bridge-1 korreliert mit dem Proliferationsmarker MIB-1

Die Expression von Bridge-1 wurde in 103 Zervixkarzinompräparaten mit dem Proliferationsmarker MIB-1 („*Molecular Immunology Borstel-1*“) korreliert. Die Rangkorrelation nach Spearman war bei mittlerer Effektstärke statistisch signifikant und blieb es auch nach Kontrolle der FDR ($r_s = 0,2866$; $p = 0,0017$, FDR: $p = 0,011$; Tabelle 12). Abbildung 10 stellt den Proliferationsmarker in Abhängigkeit zur Bridge-1-Expression dar.

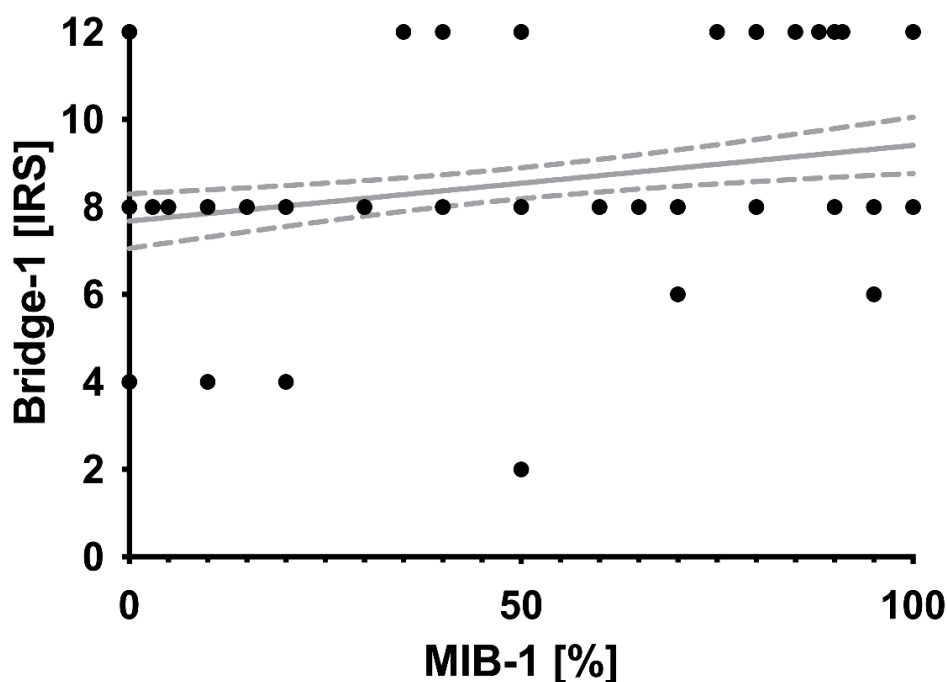


Abbildung 10: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Proliferationsmarkers MIB-1 in Prozent. Zur Orientierung wurde eine Ausgleichsgerade mit 95 %-Konfidenzintervall in die Abbildung gelegt. IRS: immunreaktiver Score; MIB-1: *Molecular Immunology Borstel-1*.

3.2.10 Korrelation von Bridge-1 und Nikotinabusus

Der Zusammenhang von Rauchen und dem IRS von Bridge-1 wurde bei 103 Patientinnen untersucht. Es konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden ($p = 0,0904$; FDR: $p = 0,1469$; $r_s = -0,1329$; Abbildung 11, Tabelle 12).

Von allen 103 Patientinnen waren 41 Raucherinnen. Der Mittelwert des IRS für Bridge-1 für diese Präparate lag bei $8,24 (\pm 1,69)$ und unterschied sich kaum von dem Wert der Nichtraucherinnen ($8,71 \pm 2,02$).

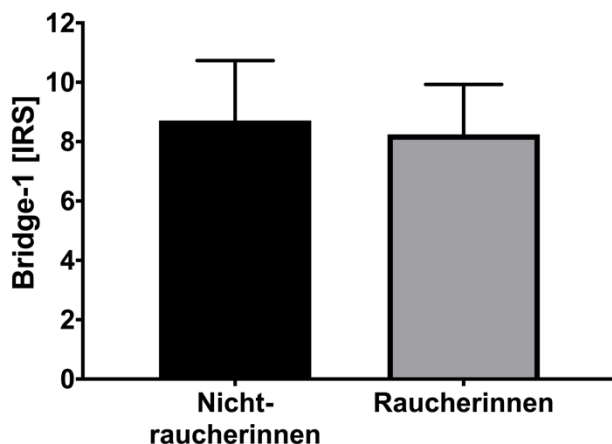


Abbildung 11: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Nikotinabusus. IRS: immunreaktiver Score.

3.2.11 Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe in Abhängigkeit des postoperativen Verlaufs

Der IRS für Bridge-1 war bei 18 Patientinnen, die ein Tumorrezidiv erlitten, $9,33 \pm 1,94$ und bei 84 Patientinnen ohne Tumorrezidiv $8,36 \pm 1,87$. Der IRS für Bridge-1 korrelierte bei geringer Effektstärke ($r_s = 0,1990$; $p = 0,0225$) mit dem Auftreten eines Tumorrezidivs. Diese Signifikanz blieb nach Korrektur der FDR ($p = 0,0585$) nicht erhalten (Tabelle 13, Abbildung 12).

Tabelle 13: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des postoperativen Verlaufs.

IRS: immunreaktiver Score; n: Stichprobe; KI: Konfidenzintervall; SD: *standard deviation* (Standardabweichung); FDR: *false discovery rate*.

Verlauf	Patientinnen [n]	IRS (Mittelwert \pm SD)	p-Wert	FDR
insgesamt	102			
Rezidiv	18	$9,33 \pm 1,94$	p = 0,0225	p = 0,0585
rezidivfrei	84	$8,36 \pm 1,87$		
rs	0,1990	95 %-KI -0,0011 bis 0,3838	*	
nach Bestrahlung	62	IRS (Mittelwert \pm SD)		
Rezidiv	13	$8,92 \pm 1,75$	p = 0,0043	p = 0,0186
rezidivfrei	49	$7,84 \pm 1,07$		
rs	0,3308	95 %-KI 0,0809 bis 0,5416	**	*
nach Radiochemotherapie	47	IRS (Mittelwert \pm SD)		
Rezidiv	7	$9,14 \pm 1,95$	p = 0,0177	p = 0,0575
rezidivfrei	40	$7,85 \pm 1,15$		
rs	0,3445	95 %-KI -0,0636 bis 0,5748	*	

Ergebnisse

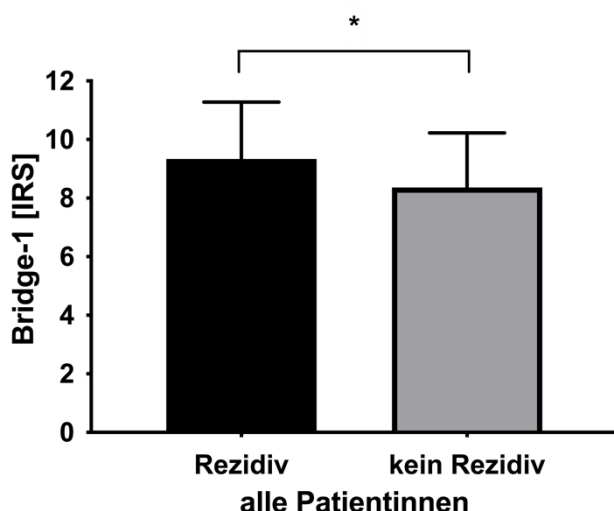


Abbildung 12: Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe in Abhängigkeit des Rezidivstatus. IRS: Immunreaktiver Score. Signifikanz: * $p < 0,05$; $p = 0,0225$; FDR: $p = 0,0585$

Das mittlere Alter der Patientinnen, die ein Rezidiv erlitten, lag bei 52,89 Jahre, für Patientinnen ohne Rezidiv bei 53,37 Jahren. Hier bestand nach Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,9013$; Tabelle 14).

Tabelle 14: Altersverteilung der Patientinnen in Abhängigkeit des postoperativen Verlaufs. Angeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

	Patientinnen [n]	Alter (Mittelwerte \pm SD)	p-Wert
Verlauf	102		
Rezidiv	18	52,89 (\pm 13,89)	$p = 0,9013$
rezidivfrei	84	53,37 (\pm 12,10)	
Verlauf nach Bestrahlung	62		
Rezidiv	13	54,77 (\pm 14,60)	$p = 0,4382$
rezidivfrei	49	51,39 (\pm 11,24)	
Verlauf nach Radiochemotherapie	47		
Rezidiv	7	55,71 (\pm 15,03)	$p = 0,3578$
rezidivfrei	40	50,40 (\pm 10,97)	

In Zervixkarzinompräparaten von 62 strahlentherapeutisch behandelten Patientinnen wurde die Expression von Bridge-1 untersucht. Dabei erlitten 13 Patientinnen nach Bestrahlung ein Tumorrezidiv. Der Mittelwert des IRS für Bridge-1 betrug hier 8,92 (\pm 1,75). Bei 49 rezidivfreien Patientinnen war der IRS für Bridge-1 niedriger (7,84 \pm 1,07). Die Rangkorrelation nach Spearman war bei mittlerer Effektstärke statistisch signifikant ($p = 0,0043$, $r_s = 0,3308$). Diese Signifikanz blieb auch nach einer Korrektur der FDR erhalten (FDR: $p = 0,0186$; Tabelle 13, Abbildung 13).

Ergebnisse

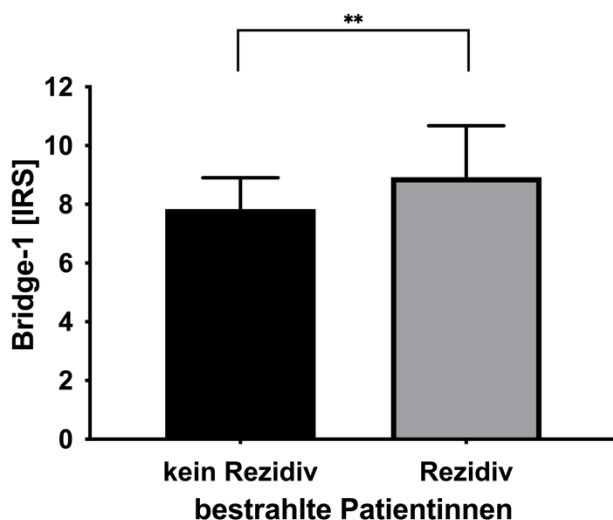


Abbildung 13: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Rezidivstatus nach Bestrahlung.

IRS: Immunreaktiver Score.

Signifikanz: ** $p < 0,01$; $p = 0,0043$;

FDR: $p = 0,0186$

Bestrahlte Patientinnen, die ein Rezidiv erlitten, waren im Mittel $54,77 (\pm 14,60)$ Jahre alt, rezidivfreie Patientinnen $51,39 (\pm 11,24)$ Jahre. Nach Mann-Whitney-U-Test bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Auftreten von Rezidiven ($p = 0,4382$; Tabelle 14).

Von den 62 strahlentherapeutisch behandelten Patientinnen erhielten 47 zusätzlich eine Chemotherapie. 40 dieser 47 Patientinnen blieben im weiteren Verlauf rezidivfrei. Der Mittelwert des IRS für Bridge-1 war in dieser Gruppe niedriger ($7,85 \pm 1,15$) als bei den radiochemotherapierten Patientinnen, die ein Rezidiv erlitten ($9,14 \pm 1,95$; s. Tabelle 13 und Abbildung 14). Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation mittlerer Effektstärke zwischen dem Rezidivstatus radiochemotherapierter Patientinnen und dem IRS für Bridge-1 ($p = 0,0177$, $r_s = 0,3445$). Nach Kontrolle der FDR blieb die Signifikanz nicht bestehen ($p = 0,0575$).

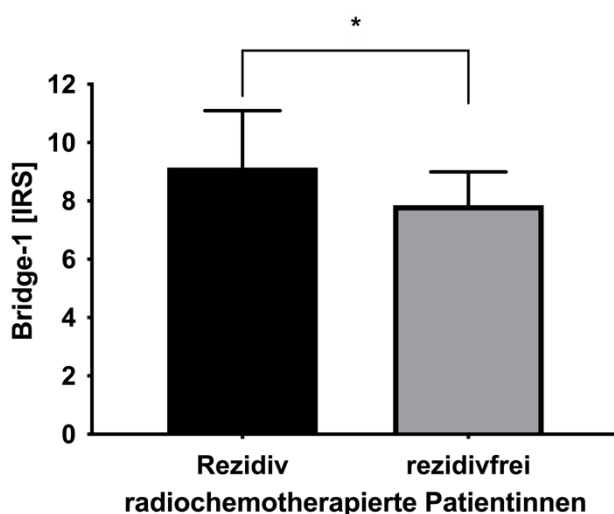


Abbildung 14: Expression von Bridge-1 in Abhängigkeit des Rezidivstatus nach Radiochemotherapie.

IRS: Immunreaktiver Score.

Signifikanz: * $p < 0,05$, $p = 0,0177$;

FDR: $p = 0,0575$

Ergebnisse

Die radiochemotherapierten Patientinnen, die rezidivfrei blieben, waren im Mittel 50,40 ($\pm 10,97$) Jahre alt. Radiochemotherapierte Patientinnen, die ein Rezidiv erlitten, waren 55,71 ($\pm 15,03$) Jahre alt. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen Alter und Rezidiv war in dieser Gruppe nicht vorhanden ($p = 0,3578$; Tabelle 14).

3.2.12 Überlebenszeitanalyse

Die rezidivfreie Überlebenszeit von 97 Patientinnen wurde mit Kaplan-Meier-Kurve (Abbildung 15) dargestellt. Das Auftreten eines Rezidivs oder der Tod einer Patientin wurden dabei als Endpunkt gewertet. Der Log-Rank-Test zeigte keinen Unterschied zwischen der Kurve von Patientinnen, deren IRS im Zervixkarzinomgewebe < 12 war und Patientinnen mit einem IRS von 12 ($p = 0,8829$).

In der Gruppe der Patientinnen mit einem IRS < 12 traten 22 Endpunkte ein, 57 Beobachtungen wurden zensiert. Die Gruppe von Patientinnen mit einem IRS von 12 enthält im Beobachtungszeitraum 6 Ereignisse, 12 Verläufe wurden zensiert.

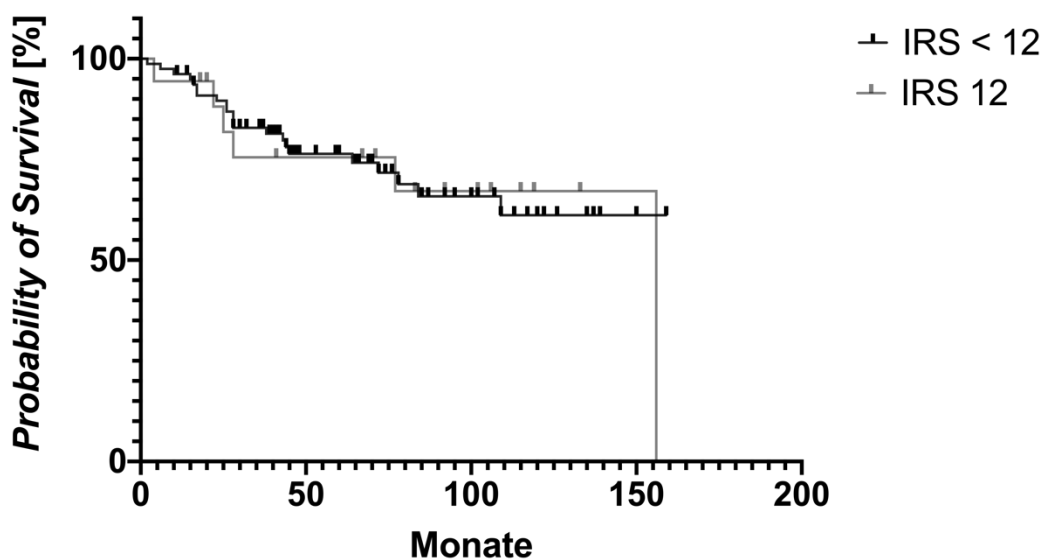


Abbildung 15: Kaplan-Meier für Patientinnen mit einem IRS von 12 oder < 12 . Überlebenszeit in Monaten nach primärer OP.
IRS: Immunreaktiver Score.

3.3 Bridge-1-Proteinexpression in Zervixkarzinomzelllinien

Die Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomzelllinien wurde im Western-Blot untersucht und ist in Abbildung 16 dargestellt.

Ergebnisse

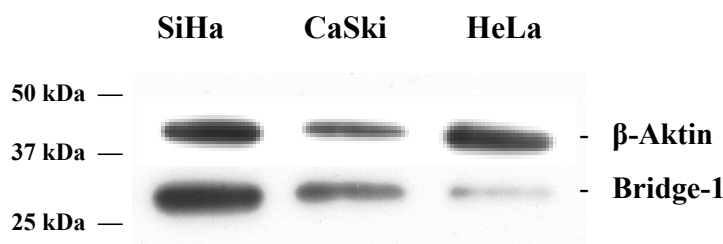


Abbildung 16: Nachweis der Bridge-1-Proteinexpression in den Zelllinien SiHa, CaSki und HeLa. Ladekontrolle mit β -Aktin.

Bridge-1 wurde von allen verwendeten Zelllinien exprimiert. Das immunchemische Signal von Bridge-1 wurde auf der zu erwartenden Lauflänge von 28 kDa detektiert. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien war bei der Adenokarzinomzelllinie HeLa eine schwächere Expression zu beobachten.

3.4 Einfluss von Activin A auf das Wachstum von Zervixkarzinomzelllinien

Activin A hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Wachstum von Zervixkarzinomzellen. Tendenziell war eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation zu beobachten.

Nach 24 h Inkubation von 1.000 Zellen pro well mit 20 ng/ml Activin A war die proliferative Aktivität der SiHa-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nur tendenziell vermindert (89,86 %, p-Wert = 0.2176). 10 ng/ml Activin A verringerte die Proliferation um 5 % ($p > 0,9999$) und 5 ng/ml Activin A um 1,75 % ($p > 0,9999$). Bei 500 Zellen/well konnten auch keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Angegeben sind die adjustierten p-Werte nach Dunn (Tabelle 15; Abbildung 17)

Tabelle 15: Proliferation von SiHa-Zellen nach 24 h Behandlung mit Activin A.

Angegeben sind die Proliferation in Bezug auf die Kontrolle nach Behandlung sowie der p-Wert (nach Dunn-Bonferroni).

	Kontrolle	5 ng/ml Activin A (p-Wert)	10 ng/ml Activin A (p-Wert)	20 ng/ml Activin A (p-Wert)
1000 Zellen/well	100 %	98,25 % ($> 0,9999$)	94,56 % ($> 0,9999$)	89,86 % (0,2176)
500 Zellen/well	100 %	98,65 % ($> 0,9999$)	94,44 % ($> 0,9999$)	91,91 % (0,8642)

Ergebnisse

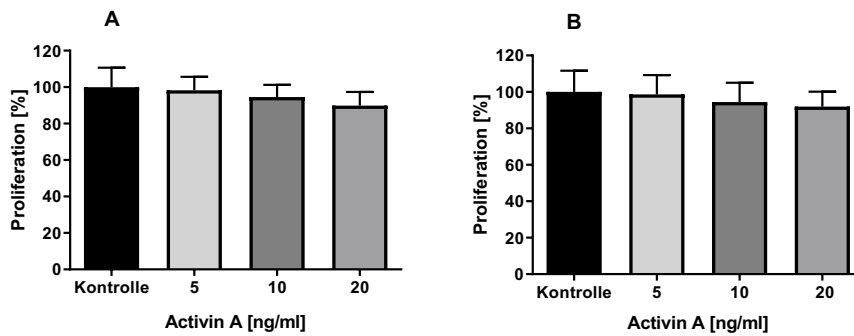


Abbildung 17: Proliferation von SiHa-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Activin A. A) 1000 SiHa-Zellen/well, B) 500 SiHa-Zellen/well. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von 3 Wiederholungen. Der Fehlerindikator zeigt die Varianz aus $n = 6$ wells. Statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$.

3.5 Einfluss von Activin A und TGF- β 1 auf die Expression von Bridge-1

Die Behandlung der Zervixkarzinomzelllinie SiHa mit Activin A veränderte die Expression von Bridge-1 nicht signifikant, wie im Western Blot in Abbildung 18 und in Tabelle 16 zu sehen ist. Nach 24 h Behandlung mit 12,5 ng/ml Activin A war die Expression von Bridge-1 mit 96,82 %, wie auch nach Behandlung mit 6,25 ng/ml Activin A (90,25 %) und mit 4 ng/ml Activin A (106,63 %), nicht signifikant verändert.

Ergebnisse

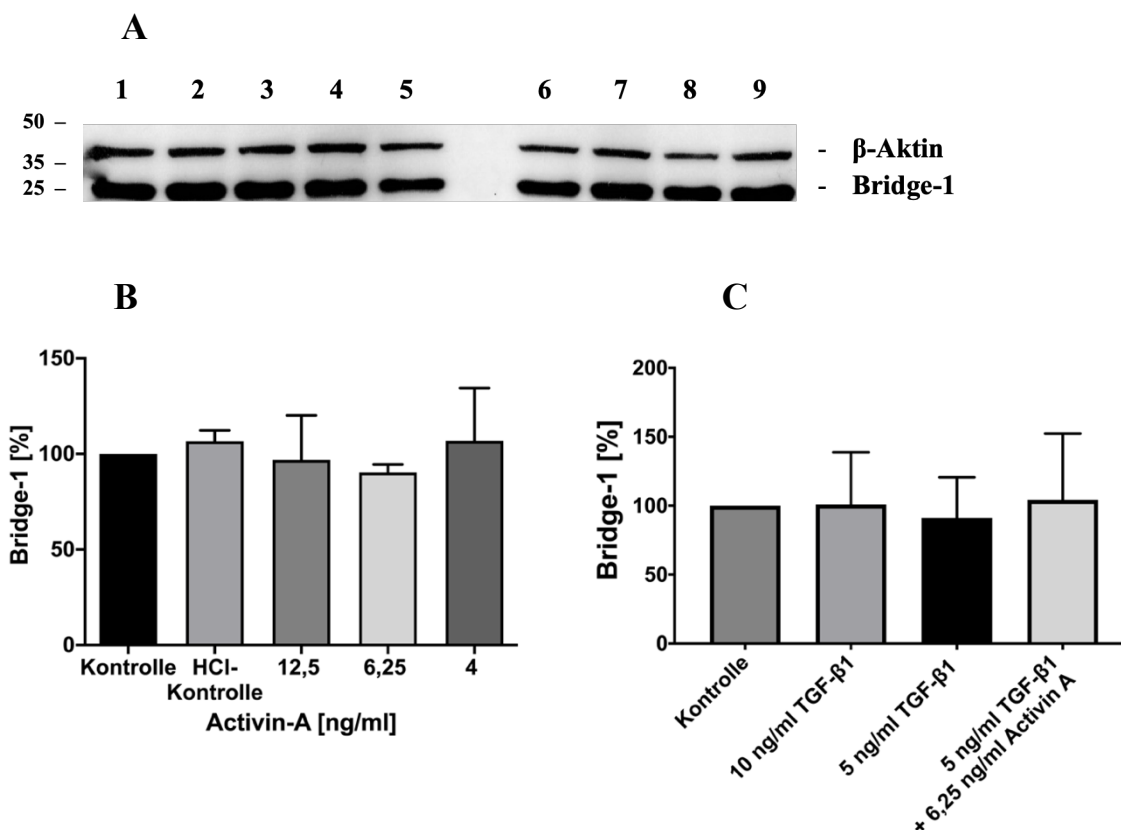


Abbildung 18:

A) Western-Blot der mit Activin A behandelten SiHa-Zellen zum Nachweis von Bridge-1.

1: Kontrolle, 2: HCl-Kontrolle (0,5 μ M HCl), 3: 12,5 ng/ml Activin A, 4: 6,25 ng/ml Activin A, 5: 4 ng/ml Activin A, 6: Kontrolle, 7: TGF β 10 ng/ml, 8: TGF β 5 ng/ml, 9: TGF β 5 ng/ml + 6,25 ng/ml Activin A. HCl: Salzsäure.

B) Expression von Bridge-1 nach Behandlung mit Activin A; dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent zur Kontrolle.

C) Expression von Bridge-1 nach Behandlung mit Activin A und TGF- β 1; dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent zur Kontrolle.

In Tabelle 16 und in Abbildung 18 ist gezeigt, dass die Inkubation der Zellen mit 5 μ g/ml TGF- β 1 die Expression von Bridge-1 nicht beeinflusste ($p = 0,99$). Nach Inkubation mit 5 ng/ml TGF- β und zusätzlich 6,25 ng/ml Activin A wurde die verringerte Expression von Bridge-1 wieder leicht revidiert aber ohne Signifikanz (p -Wert $> 0,9999$, $\alpha = 0,05\%$).

Ergebnisse

Tabelle 16: Expression von Bridge-1 nach Behandlung mit TGF- β und Activin A.

SiHa-Zellen wurden mit 10 ng/ml TGF- β , 5 ng/ml TGF- β oder 5 ng/ml TGF- β + 6,25 ng/ml Activin A behandelt. Angegeben sind die Mittelwerte in %, sowie die Standardabweichung (SD) und der p-Wert im Bezug auf die Kontrolle. $\alpha = 0,05$.

	Kontrolle (\pm SD)	10 ng/ml TGF- β 1 (\pm SD)	5 ng/ml TGF- β 1	5 ng/ml TGF- β 1 + 6,25 ng/ml Activin A (\pm SD)	p-Wert	
Bridge-1 [%]	100 (\pm 0)	100,87 (\pm 37,90)	91,11 (\pm 29,59)	104,21 (\pm 48,13)	0,9905	
p-Wert		>0,9999	>0,9999	>0,9999		
	Kontrolle	HCl- Kontrolle (\pm SD)	12,5 ng/ml Activin A (\pm SD)	6,25 ng/ml Activin A (\pm SD)	4 ng/ml Activin A (\pm SD)	p-Wert
Bridge-1 [%]	100	106,63 (\pm 5,68)	96,82 (\pm 23,35)	90,25 (\pm 4,23)	106,8 (\pm 27,62)	0,7228

3.6 TGF- β 1 und Activin A aktivieren Smad2

Im Vergleich zur Behandlung mit TGF- β 1 alleine konnte nach Behandlung der Zelllinie SiHa mit TGF- β 1 und Activin A ein erhöhter Anteil von phosphoryliertem Smad2 festgestellt werden. Dies ist im Western Blot in den Abbildungen 20 und in der Grafik in Abbildung 19 zu sehen. Die Zellen wurden mit TGF- β 1 und Activin A behandelt und anschließend wurden Smad2 und pSmad2 im Western Blot quantifiziert. Nach 15 min und 1 h Inkubation mit TGF- β 1 konnte in Relation zu den unbehandelten Zellen eine vermehrte Phosphorylierung und damit Aktivierung von Smad2 festgestellt werden. Die zusätzliche Gabe von Activin A führte im Vergleich zu der Behandlung mit 5 ng/ml TGF- β 1 alleine zu einer stärkeren Erhöhung des Anteils von pSmad2 (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Phosphorylierung von Smad2 nach Behandlung mit TGF- β 1 und Activin A.

SiHa-Zellen wurden mit 5 ng/ml TGF- β 1 oder 5 ng/ml TGF- β + 12,5 ng/ml Activin A behandelt. Angegeben sind die Mittelwerte als pSmad2/Smad2 in %, sowie die Standardabweichung (SD: *standard deviation*) und der p-Wert.

pSmad2/Smad2 [%]	un- behandelt (\pm SD)	HCl- Kontrolle (\pm SD)	5 ng/ml TGF- β 1 (Kontrolle)	5 ng/ml TGF- β 1 + 12,5ng/ml Activin A (\pm SD)	p-Wert
nach 15 min	7,59 (\pm 2,42)	3,95 (\pm 4,45)	100	127,7 (\pm 26,65)	0,0381
	p > 0,9999	p = 0,9183		p > 0,9999	
nach 60 min	1,04 (\pm 0,5)	5,91 (\pm 2,96)	100	131,1 (\pm 1,32)	0,0095
	p = 0,6025	p > 0,9999		p > 0,9999	

Ergebnisse

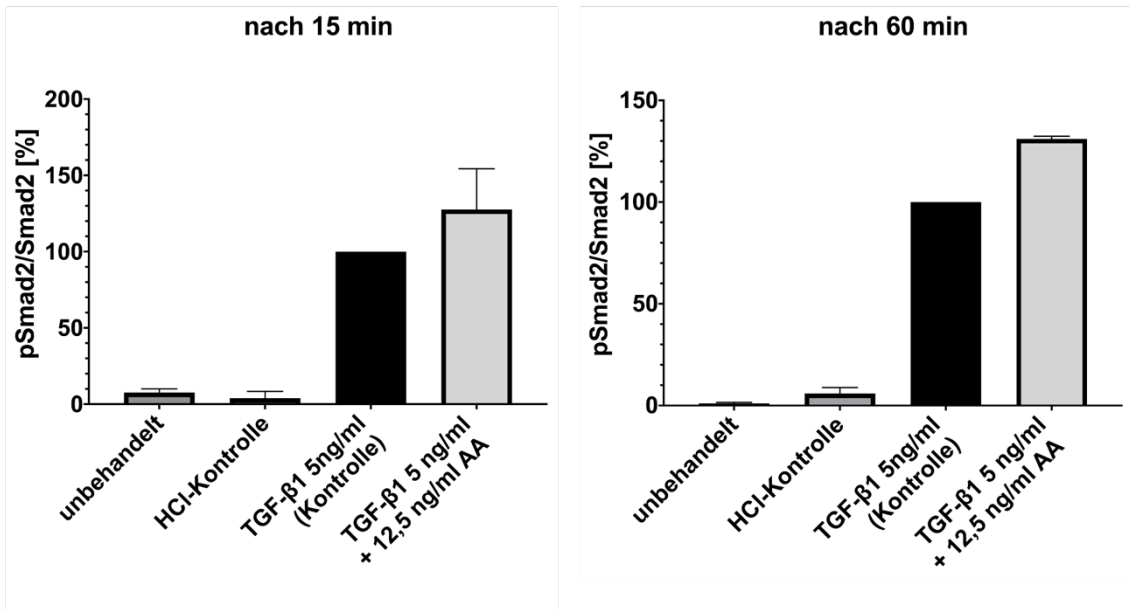


Abbildung 19: Gesteigerte Phosphorylierung von Smad2 nach Behandlung mit TGF-β1 und Activin A. Dargestellt sind die Mittelwerte in Bezug auf die Behandlung mit 5 ng/ml TGF-β1. HCl: Salzsäure. TGF-β1: *transforming growth factor beta 1*. AA: Activin A. Signifikanz: * = $p < 0,05$

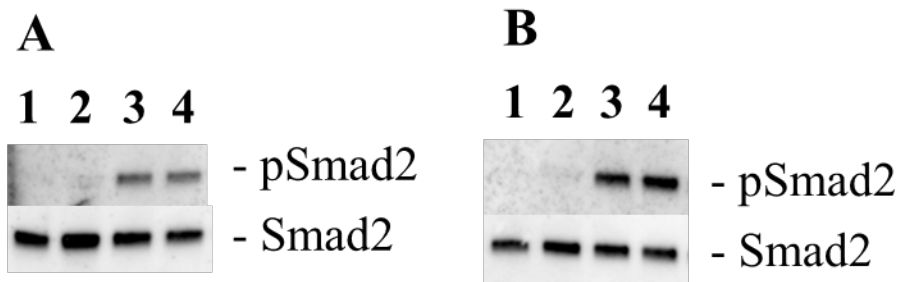


Abbildung 20: Phosphorylierung von Smad2 nach Behandlung mit TGF-β1 und Activin A. **A)** 15 min Inkubation. 1: Kontrolle, 2: HCl-Kontrolle (0,5 μM HCl), 3: TGF-β1 5 ng/ml, 4: TGF-β1 5 ng/ml + 12,5 ng/ml Activin A. **B)** 60 min Inkubation. 1: Kontrolle, 2: HCl-Kontrolle (0,5 μM HCl), 3: TGF-β1 5 ng/ml, 4: TGF-β1 5 ng/ml + 12,5 ng/ml Activin A.

4 Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden zunächst unsere Einschlusskriterien, anschließend die Ergebnisse der analysierten Gewebeprobe sowie im Folgenden der Einfluss von Bridge-1 auf die Activin A-Signalkaskade diskutiert.

4.1 Patientinnenkollektiv

In unserer Studie wurden Gewebeproben von 118 Patientinnen analysiert. Alle Patientinnen waren an einem Plattenepithelkarzinom der Zervix erkrankt und hatten sich laut unserer Einschlusskriterien einer primären Hysterektomie unterzogen. Neoadjuvant therapierte Patientinnen wurden von unserer Studie ausgeschlossen.

Da wir nur perioperativ gewonnene Gewebeproben analysiert haben, wurden fortgeschrittene FIGO-Stadien, die nicht mehr operativ behandelt werden konnten, ausgeschlossen. Mit steigendem Stadium verschlechtert sich die Prognose des Zervixkarzinoms [158]. Die Korrelation von FIGO-Stadium und Bridge-1 hätte aussagekräftiger sein können, wenn wir mehr Patientinnen mit höherem FIGO-Stadium hätten einschließen können (FIGO I: n = 62, FIGO IV: n = 3). Des Weiteren konnten Moreira und Kolleg*innen in ihrer Studie zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen dem FIGO-Stadium nach der 2009er-Klassifikation und dem Auftreten von Rezidiven besteht [94]. Daher wäre eventuell die Korrelation von Bridge-1 und dem Auftreten von Rezidiven aussagekräftiger, wenn wir mehr Patientinnen mit höherem FIGO-Stadium eingeschlossen hätten. Jedoch fanden Weigert und Kolleg*innen in ihrer Studie, dass die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen von Portio-Biopsien nur in 57,9% der Fälle denen des entsprechenden Konisats gleichen. In 37,2% der Fälle war ein *up-grading* nötig [154]. Damit wäre es möglich, dass unsere Gewebeproben von einer besseren Qualität waren, als etwaige Biopsien gewesen wären. Dies ist ein Vorteil unserer Einschlusskriterien, auch wenn durch Biopsien mehr Patientinnen mit hohem FIGO-Stadium hätten eingeschlossen werden können.

Alle in diese Studie eingeschlossenen Patientinnen waren an einem Plattenepithelkarzinom der Zervix erkrankt. Dies ist die häufigste Entität des Zervixkarzinoms. Mögliche Unterschiede zwischen Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom der Zervix wurden in anderen Studien kontrovers diskutiert. Zhou und Kolleg*innen fanden, dass

Adenokarzinome eine schlechtere Prognose hätten als Plattenepithelkarzinome und schlechter auf eine simultane Radiochemotherapie ansprechen würden. Jedoch traten Adenokarzinome im Schnitt bei älteren Frauen auf und waren besser differenziert als bei Plattenepithelkarzinompatientinnen [161]. Im Vergleich zu Zhou und Kolleg*innen fanden Teke und Kolleg*innen keine Unterschiede im Überleben, der klinischen oder histopathologischen Ausprägung für Patientinnen mit FIGO-Stadium IA bis IIB [137]. Folglich verzichteten wir auf einen Einschluss von Patientinnen mit Adenokarzinom, um einer möglichen Verzerrung der Ergebnisse hinsichtlich der Prognose einer Radiochemotherapie zu verhindern.

Neoadjuvant therapierte Patientinnen wurden von unserer Studie ausgeschlossen. Laut Leitlinie ist die Rate postoperativer Komplikationen nach neoadjuvanter Radiochemotherapie erhöht, sodass diese nur im Rahmen von klinischen Studien empfohlen wird [26, 84, 155]. Kong und Kolleg*innen resümierten, dass Patientinnen, die auf eine neoadjuvante Chemotherapie ansprachen, eine höhere Rezidiv-freie Überlebensrate erreichten [68]. Gupta und Kolleg*innen zeigten im Gegensatz dazu, dass eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit Paclitaxel und Carboplatin und anschließender radikaler Hysterektomie im Vergleich zu einer Radiochemotherapie mit Cisplatin ohne anschließende Operation ein schlechteres Outcome hatte [38]. Aufgrund dieser unklaren Datenlage und da eine neoadjuvante Therapie noch kein Standard ist, haben wir die betroffenen Patientinnen nicht in unsere Studie inkludiert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Korrelation der Expression von Bridge-1 mit klinischen Patientinnendaten

Das mittlere Patientinnenalter unseres Patientinnenkollektives zum OP-Zeitpunkt betrug 53,12 (\pm 12,42) Jahre. Das mittlere Erkrankungsalter von Zervixkarzinompatientinnen lag 2016 in Deutschland bei 55 Jahren [119]. Fox und Kolleg*innen konnten in ihrer Studie zeigen, dass bei älteren Frauen häufig bei Erstdiagnose bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium vorlag [28]. Zu ähnlichen Ergebnissen sind auch Ioka und Kolleg*innen in ihrer Studie gekommen. Sie konnten für die Altersgruppe von 55 bis 64 Jahren zeigen, dass bei Erstdiagnose das Tumorstadium im Vergleich zu der Altersgruppe der Frauen zwischen 30 und 54 Jahren weiter fortgeschritten war. Bei Frauen über 65 Jahre verschlechterten andere Vorerkrankungen und eine damit einhergehende Einschränkung der

Diskussion

Therapiefähigkeit die Prognose zusätzlich [55]. Die Altersstruktur unseres Patientinnenkollektivs ist sehr heterogen und bildet damit einen guten Querschnitt durch die Altersstrukturen möglicher Zervixkarzinompatientinnen. Eine Korrelation des Alters mit der Expression von Bridge-1 konnten wir nicht feststellen. Damit scheint Bridge-1 ein vom Alter unabhängiger Tumormarker zu sein.

Die Prognose einer Patientin mit Zervixkarzinom wird mit der Klassifikation des TNM- oder FIGO-Stadiums abgeschätzt. Das TNM-Stadium setzt sich aus Tumorgröße, Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von Metastasen zusammen. Studien haben gezeigt, dass für Patientinnen, die alleinig operativ mittels radikaler Hysterektomie und Lymphadenektomie oder alleinig strahlentherapeutisch behandelt wurden, die Tumorgröße ein wichtiger Prognosefaktor ist. Grigsby und Kolleg*innen konnten in ihrer Studie bestätigen, dass die 5-Jahresüberlebensrate nach kombinierter Hysterektomie, Lymphadenektomie und Strahlentherapie in Abhängigkeit des Tumorstadiums variiert. So liegt die 5-Jahresüberlebensrate für Patientinnen mit Stadium Ib bei 80 % und im Stadium IIa bei 63 %. Jedoch konnten Grigsby und seine Arbeitsgruppe keine Unterschiede bezüglich der Prognose nach radikaler Hysterektomie und Radiatio in Abhängigkeit von der Tumorgröße feststellen [36]. Im Gegensatz dazu stellten Eifel und Kolleg*innen fest, dass für Patientinnen, deren Primarius größer als 5 cm war, ein höheres Risiko für ein Rezidiv nach Strahlentherapie besteht als für Patientinnen mit einem Primarius kleiner als 5 cm [25]. Li und Kolleg*innen definierten sogar eine Tumorgröße von mehr als 4 cm als Risikofaktor [77]. Damit scheint die Tumorgröße in Abhängigkeit der Therapieform einen Einfluss die Prognose der Patientin zu haben. Die Expression von Bridge-1 korrelierte in unserer Studie nicht dem T-Stadium der TNM-Klassifikation und damit auch nicht mit der Ausdehnung des Primarius. Somit kann Bridge-1 als Tumormarker keinen Aufschluss über die Größe des Primarius und die damit zusammenhängende Prognose geben.

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Prognose ist der Lymphknotenstatus einer Patientin. Jeong und Kolleg*innen konnten in ihrer Studie zeigen, dass Lymphknotenmetastasen vor allem in frühen Stadien eine entscheidende prognostische Rolle spielen. Interessanterweise ist dies erst bei großen Tumoren (> 4 cm) signifikant [58]. Park und Bae zeigten ebenfalls, dass Lymphknotenmetastasen ein unabhängiger Prognosefaktor für das Zervixkarzinom sind, Li und Kolleg*innen sehen diese sogar als den wichtigsten Prognosefaktor an [106]. Würde die Expression von Bridge-1 mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korrelieren, so könnte Bridge-1 ein wichtiger Prognosemarker

für Zervixkarzinompatientinnen sein. In unserer Studie konnten wir keinen Zusammenhang zwischen einem Tumorbefall der Lymphknoten und der Bridge-1-Expression feststellen. Hoellen und Kolleg*innen verwendeten für ihre Studie zur Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) bei Zervixkarzinompatientinnen dasselbe Kollektiv wie in dieser vorliegenden Arbeit. Sie fanden einen Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression in Zervixkarzinomzellen und dem Auftreten einer Lymphangiosis. Ein gleichzeitiges Auftreten einer *Lymphangiosis carcinomatosa* und einer COX-2-Expression war mit einem häufigerem Entstehen von Lymphknotenmetastasen assoziiert [47]. Wir haben in unserer Studie untersucht, ob Bridge-1 ein weiterer prognostischer Marker für die Entstehung einer *Lymphangiosis carcinomatosa* bei Zervixkarzinompatientinnen sein könnte. Der Befall von Lymphbahnen ist ein entscheidender Schritt für die Entstehung von Lymphknotenmetastasen und wird mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [124]. Aus diesem Grund wäre es interessant, einen verlässlichen prognostischen Marker zu finden. Unsere Studie erbrachte keine Hinweise dafür, dass Bridge-1 ein solcher Marker sein könnte. Jedoch war auch hier das Patientinnenkollektiv zu klein, um eine verlässliche Aussage treffen zu können (L0: n = 38, L1: n = 20). Man sollte die Studie an einem größeren Kollektiv wiederholen.

MIB-1 ist ein Antikörper, der an das Ki-67-Antigen (Kiel-67-Antigen) bindet, welches verstärkt in proliferierenden Zellen exprimiert wird. Damit dient MIB-1 der Bestimmung der Proliferationsrate von Tumorzellen [9, 15]. Außerdem ist MIB-1 ein hilfreicher Marker, um zwischen einem Melanom und benignen Veränderungen der Haut zu differenzieren sowie ein wichtiger Parameter für die Wahl der Therapie eines Mammakarzinoms [79, 148]. Wir konnten in unserer Studie eine Korrelation zwischen der Expression von Bridge-1 und MIB-1 feststellen, was darauf hindeutet, dass schnell proliferierende Zellen Bridge-1 vermehrt exprimieren. Dies ist ein Hinweis, dass Bridge-1 mit der Zellteilung assoziiert sein könnte und als Proliferationsmarker in Frage käme. Aleskandarany und Kolleg*innen konnten außerdem zeigen, dass die Gruppe der mit dem Entdifferenzierungsgrad G2 klassifizierten Mammakarzinome anhand der MIB-1/Ki-67-Expression in weitere Subgruppen unterteilt werden kann. Das Outcome dieser beiden Gruppen unterschied sich signifikant. In der Gruppe mit einer geringeren Proliferationsfraktion konnte ein besseres Outcome beobachtet werden als in der Gruppe mit hoher Proliferationsfraktion [2]. Die Korrelation von MIB-1 und Bridge-1 könnte bedeuten, dass auch Bridge-1 ein zusätzlicher Marker für das Outcome von Patientinnen gleichen histologischen Gradings sein könnte.

Diskussion

Mit Hilfe des histopathologischen Gradings wird das Ausmaß der Dedifferenzierung der Tumorzellen im Vergleich zu physiologischen Zervixzellen sowie die Zellteilungsrate beschrieben. Wir haben keine Korrelation zwischen Bridge-1 und dem histopathologischen Grading der Tumoren festgestellt. Die untersuchten Gewebeproben wiesen allerdings in der Mehrzahl ein Grading von G3 auf. Somit ist unser Patientinnenkollektiv eventuell nicht repräsentativ für diese Fragestellung. Dazu müsste die Studie mit einem breiter gewählten Kollektiv wiederholt werden.

Nikotinabusus ist ein wichtiger unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung des Zervixkarzinoms. Insbesondere das Risiko für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms ist für mit HPV 16 oder HPV 18 infizierten Frauen bei chronischem Nikotinabusus doppelt so hoch wie für Nichtraucherinnen. Außerdem erhöht sich das Risiko dosisabhängig, bei einem Beginn des Nikotinabusus in jungem Alter, sowie mit dem Alter bei Erstdiagnose [64]. Ursächlich könnte eine Schwächung des Immunsystems durch das Rauchen sein, wodurch die kanzerogenen Effekte einer HPV-Infektion verstärkt werden können [131]. Dies könnte zum Beispiel durch eine Hemmung von Interferon- γ oder *tumor necrosis factor α* (TNF- α), und somit zu einer Hemmung der Apoptose durch den Nikotinkonsum vermittelt werden [64]. Außerdem beeinflusst Benzo[*a*]pyren, ein kanzerogener Kohlenwasserstoff, der bei der Verbrennung von Tabak entsteht, in hohen Dosen den Infektionszyklus von HPV. So fördert es unter anderem die Bildung von neuen Virionen in HPV-infizierten Zellen [1]. Zudem konnten Studien zeigen, dass Benzo[*a*]pyren vor allem in mit HPV 16 infizierten Zellen DNA-Schäden verursacht, die wiederum eine Kanzerogenese fördern [44]. Wir konnten in unserer Studie keine Korrelation zwischen der Expression von Bridge-1 in Plattenepithelkarzinomzellen der Zervix und dem Nikotinabusus der Patientinnen feststellen. Damit scheint Bridge-1 ein vom Rauchen unabhängiger Tumormarker zu sein.

Die Infektion mit HPV ist der entscheidende Risikofaktor für die Entstehung eines Zervixkarzioms. In unserer Studie haben wir den Zusammenhang einer Expression von Bridge-1 und einer HPV-Infektion nicht untersucht, da in der retrospektiven Analyse nicht genügend Daten zu HPV-Infektionen verfügbar waren. Levovitz und Kolleg*innen konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine Mutation von Molekülen der TGF- β -Signalkaskade eine wichtige Rolle in der Entstehung eines Zervixkarzinomes bei bestehender HPV-Infektion spielt [76]. Auch bei anderen HPV-assoziierten Tumoren, wie zum Beispiel dem Oropharynxkarzinom, spielen diese Mutationen eine wichtige Rolle. Bridge-1 ist möglicherweise ein Bestandteil der Activin A/TGF- β -Signalkaskade [8]. Somit wäre es

interessant, einen möglichen Zusammenhang zwischen Bridge-1 und einer HPV-Infektion zu untersuchen. Außerdem konnten verschiedene Studien zeigen, dass eine HPV-Infektion auch Einfluss auf die NF κ B-Signalkaskade (*nuclear factor κ B*) nimmt [113, 146]. Auch hier könnte ein Zusammenhang zur Bridge-1-Expression bestehen.

4.2.1.1 Bridge-1 (PSMD9) als regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms

Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass Bridge-1 in Tumorzellen deutlich stärker exprimiert wird als im peritumoralem Stroma. In Mammakarzinomzellen ist laut Chen und Kolleg*innen die Aktivität von Proteasomen im Vergleich peritumoralem Stroma erhöht [16]. Bridge-1 (PSMD9) ist als regulatorische Untereinheit dem 26S-Proteasom angelagert und nimmt im Rahmen des Prozesses des Zusammenlagerns der 19S-Untereinheit eine entscheidende Rolle ein [143]. Ohne Bridge-1 kommt es zu einer fehlerhaften Zusammenlagerung der 19S-Untereinheit. Zwar ist das Proteasom dann weiterhin funktionsfähig, jedoch kommt es zu einer Minderung der Peptidaseaktivität um 20-35 % [63]. Vor allem schnell proliferierende Zellen, wie zum Beispiel Tumorzellen, sind auf eine effizientes Proteasom angewiesen. Für diese Effizienz sind RACs, wie Bridge-1, unabkömmlich. Die vermehrte Expression von Bridge-1 in Tumorzellen könnte daher darauf hinweisen, dass in schnell proliferierenden Tumorzellen eine höhere Anzahl an effizienten Proteasomen vorhanden sind, als im langsamer wachsenden peritumoralem Stroma. Durch eine medikamentöse Hemmung von Bridge-1 könnte man dies verhindern und so die Proliferation von Tumorzellen hemmen. Damit könnte sich Bridge-1 als Zielprotein einer medikamentösen Tumorthherapie ähnlich der Proteaseinhibitoren erweisen.

Das 26S-Proteasom ist zudem für die Aktivierung des NF κ B-Signalweges von Bedeutung [31]. NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl im Rahmen von Entzündungsreaktionen als auch bei Immunreaktionen und in der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielt. Er wird durch I κ B (*inhibitory κ B*) gebunden und inhibiert. Kommt es zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalweges, wird I κ B durch das 26S-Proteasom abgebaut [31]. Es gibt sechs verschiedene I κ B-Subtypen, von denen I κ B α am besten untersucht ist. Eine Aktivierung des Signalweges, zum Beispiel durch *tumor necrosis factor α* (TNF- α), Interleukin-1 α oder γ -Strahlung, führt zu einer Phosphorylierung und anschließender Ubiquitinierung von I κ B α . Ubiquitiniertes I κ B α wird dann durch das Proteasom abgebaut. Damit kann das vorher gebundene NF κ B in den Nucleus translozieren und dort die Transkription verschiedener Zielgene beeinflussen [42, 122]. NF κ B wird durch verschieden Mechanismen reguliert, es wird unter anderem im

Nucleus von neu synthetisiertem I κ B α gebunden und ins Cytosol transportiert [42]. In Tumorzellen sind diese Regulationsmechanismen des NF κ B-Signalweges typischerweise gestört, sodass die Aktivität von NF κ B konstant erhöht ist. Dies ist zum Beispiel für die T-Zell-Leukämie, aber auch für Plattenepithelkarzinome der Haut und für das Zervixkarzinom bekannt [23, 100]. Durch eine vermehrte Aktivität von NF κ B wird die Apoptose verhindert und die Expression von regulatorischen Proteinen des Zellzyklus, wie Cyclinen, induziert. Sahu und Kolleg*innen konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine vermehrte Expression von Bridge-1 die NF κ B-Aktivität erhöht, indem es den Abbau von I κ B α fördert [122]. In unserer Studie konnten wir beobachten, dass die Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomzellen höher ist als im peritumoralem Stroma. Folglich könnte in diesen Zellen durch eine erhöhte Aktivität des Proteasoms vermehrt I κ B α abgebaut werden und somit der NF κ B-Signalweg konstant aktiviert sein [141]. Nair und Kolleg*innen konnten in ihrer Studie zeigen, dass in Zervixkarzinomzellen tatsächlich ein geringerer I κ B-Spiegel bei gleicher Expressionsrate vorhanden ist [100]. Damit könnte Bridge-1 als regulatorische Untereinheit des Proteasoms eine wichtige Funktion bei der Tumorentstehung in Zervixkarzinomzellen haben. Ein ähnlicher Mechanismus wurde unter anderem bei der Pathogenese von Prostata-, Ovarial- oder Brustkrebs gefunden. Dort kommt es durch ein fehlerhaftes I κ B zu einer erhöhten NF κ B-Aktivität [23]. Eine Hemmung von Bridge-1 könnte damit wiederum die Apoptose von Tumorzellen fördern und somit könnte Bridge-1 ein *target* zur medikamentösen Tumorthherapie des Zervixkarzinoms sein.

Zudem fördert NF κ B die Invasion von Tumorzellen in umliegende Gewebe und die Entstehung von Metastasen [23, 100]. Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte I κ B-Konzentration die Entstehung von Metastasen hemmt [100]. Bridge-1 fördert den Abbau von I κ B, was wiederum zu einem höheren NF κ B-Spiegel führt [122]. Damit wäre es wahrscheinlich, dass eine vermehrte Expression von Bridge-1 mit Fernmetastasen einhergeht. Dies konnten wir in unserer Studie nicht beobachten. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Anzahl an Patientinnen mit Fernmetastasen in unserem Kollektiv sehr gering war (M1: n = 5). Damit ist unsere Analyse bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zwischen Bridge-1-Expression und Fernmetastasierung kaum aussagekräftig und sollte an einem größeren Patientinnenkollektiv wiederholt werden.

4.2.1.2 Expression von Bridge-1 in Zervixkarzinomgewebe in Abhängigkeit des postoperativen Verlaufs

Wir konnten in unseren Studien feststellen, dass Patientinnen, die nach einer Hysterektomie mit Radiochemotherapie behandelt wurden und trotzdem an einem Rezidiv ihres Zervixkarzinoms erkrankten, eine erhöhte Expression von Bridge-1 im Tumorgewebe aufwiesen. Dieses Ergebnis war allerdings nach einer Korrektur der Falscherkennungsrate nach Benjamini-Hochberg nicht mehr signifikant. Beobachtet man in diesem Kollektiv die Untergruppe der Patientinnen, die nach der Operation nur eine Bestrahlung erhielten, so korreliert eine erhöhte Expression von Bridge-1 in dieser Gruppe auch nach Korrektur der Falscherkennungsrate signifikant mit dem Auftreten eines Tumorrezidivs. Auch Langlands und Kolleg*innen konnten bei Mammakarzinompatientinnen beobachten, dass eine vermehrte Bridge-1/PSMD9-Expression mit einem vermehrten Auftreten von Rezidiven einherging. Des Weiteren führte eine Hemmung der PSMD9-Expression mit *small interfering* RNA (siRNA) in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 zu einer verbesserten Effektivität der Radiatio [70]. Ursächlich für die erhöhte Anzahl von Rezidiven bei einer vermehrten Expression von Bridge-1 könnte eine erhöhte Aktivität von NFκB sein. Auch in anderen Studien konnte bei Tumoren mit einer erhöhten NFκB-Aktivität eine Tendenz zur Chemo- bzw. Strahlentherapieresistenz beobachtet werden. So aktiviert NFκB zum Beispiel COX-2, welche wiederum mit einer niedrigeren Apoptoserate nach Bestrahlung und mit einer Chemotherapieresistenz von z.B. Larynx- und Mammakarzinomen in Verbindung gebracht wird [56, 78, 141]. Zudem konnte durch medikamentöse Hemmung von NFκB die Effektivität einer Radiatio gesteigert werden [23]. Russo und Kolleg*innen konnten außerdem zeigen, dass NFκB nach Bestrahlung von kolorektalen Tumorzellen aktiviert wird. Bei einer Hemmung des Proteasoms oder des Abbaus von IκB kam es nach Bestrahlung zur Erhöhung der Apoptoserate in Tumorzellen, sowie zur Reduktion des Zellwachstums [120]. Dies lässt darauf schließen, dass NFκB die Effektivität einer Radiatio vermindert. Die Autoren konnten zudem zeigen, dass die Hemmung des Proteasoms oder des Abbaus von IκB eine Aktivierung von NFκB durch die Radiatio verhindern kann [120]. Bridge-1 fördert in seiner Funktion als *RAC* das Zusammenlagern neuer Proteasomen. Eine vermehrte Expression von Bridge-1 begünstigt den Abbau von IκBα somit Aktivierung von NFκB [122]. Dies könnte erklären, warum wir in unserer Studie eine Korrelation zwischen einer starken Expression von Bridge-1 und dem Auftreten eines Rezidivs nach Radiatio feststellen konnten.

Diskussion

Ob eine besonders hohe PSMD9-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht als eine niedrige PSMD9-Expression, haben Langlands und Kolleg*innen nicht untersucht [70]. Wir haben in einer Überlebenszeitanalyse keinen Unterschied gefunden.

NFκB kann auch bei der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapie eine Rolle spielen. Cisplatin, ein häufig für die Therapie von Zervixkarzinomen genutztes Chemotherapeutikum, führt in Tumorzellen ähnlich wie eine Radiatio zur Aktivierung von NFκB und hemmt damit die Apoptose [61]. In nicht entarteten Zervixzellen konnte im Gegensatz dazu keine Aktivierung von NFκB durch Inkubation mit Cisplatin festgestellt werden. Die Aktivierung des NFκB-Signalweges scheint damit ein Resistenzmechanismus der Tumorzellen zu sein [147], was Bridge-1 zu einem *target* für eine Sensibilisierung für eine Radiochemotherapie macht, da Bridge-1 den Abbau von IκBα fördert und somit NFκB aktiviert. Hier könnte eine weitere Erklärungsmöglichkeit dafür liegen, dass wir bei Patientinnen mit hoher Bridge-1-Expression häufiger das Auftreten eines Tumorrezidivs beobachten konnten. Auch bei Ovarial-, Prostata- und Mammakarzinomen konnte eine erhöhte Chemosensibilität der Tumorzellen nach medikamentöser Inhibierung des NFκB-Signalweges festgestellt werden [78].

Wie Venkatraman und Kolleg*innen berichteten, verstärkte interessanterweise eine Hemmung von NFκB den zytotoxischen Effekt von Cisplatin in SiHa-Zellen deutlich mehr als in HeLa-Zellen, obwohl SiHa-Zellen im Vergleich zu HeLa weniger Cisplatin-sensitiv sind [147]. HeLa-Zellen sind HPV 18 positiv, während SiHa-Zellen mit HPV 16 infiziert sind [147]. Es scheint somit einen Zusammenhang zwischen der Infektion durch unterschiedliche HP-Viren und dem NFκB-Signalweg zu geben. Wir haben in unserer Studie die Expression von Bridge-1 nicht in den Zusammenhang mit dem HPV-Status unserer Patientinnen gesetzt. Dies wäre aber ein interessanter Ansatz, um eine auf die jeweilige Patientin individuell zugeschnittene und damit optimal wirksame Therapie zu entwickeln.

Einen Altersunterschied zum Diagnosezeitpunkt zwischen den rezidivfreien Patientinnen und denen, die nach Radiochemotherapie ein Rezidiv erlitten, konnten wir nicht feststellen. Hou und Kolleg*innen konnten in ihrer Studie zeigen, dass ein höheres Patientinnenalter zum Diagnosezeitpunkt mit einer schlechteren Prognose einherging. Der Einfluss des Alters auf die Prognose in Abhängigkeit der Therapieform wurde jedoch nicht untersucht [49]. Im Gegensatz dazu konnten Vale und Kolleg*innen keinen Unterschied in der Effektivität einer Radiochemotherapie bei Patientinnen verschiedener Altersgruppen feststellen [145].

4.2.2 Bridge-1-Proteinexpression in Zervixkarzinomzelllinien

Bridge-1 wird in Zervixkarzinomzelllinien exprimiert. Dies konnten wir nachweisen, indem wir Bridge-1 im Western Blot in den Zelllinien SiHa, HeLa und CaSki detektierten. Zudem konnten wir zeigen, dass Bridge-1 in den drei Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert wird. So wies die Plattenepithelkarzinomzelllinie SiHa eine deutlich stärkere Bridge-1-Expression als die Adenokarzinomzelllinie HeLa auf. Dies weist darauf hin, dass sich das Vorkommen von Bridge-1 in verschiedenen Zelltypen unterscheiden könnte.

In Studien konnte auch in Mammakarzinomzellen die Expression von Bridge-1 sowohl mit immunhistochemischer Färbung von Mammakarzinomgewebe als auch mit Hilfe eines Western Blots in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nachgewiesen werden. Jedoch wurde bisher nicht untersucht, ob sich verschiedene Mammakarzinomsubtypen in ihrer Bridge-1-Expression unterscheiden [8].

4.2.3 Einfluss von Activin A auf das Wachstum von Zervixkarzinomzelllinien

Bridge-1 wird in vielen endokrinen Geweben exprimiert, so auch in Mammakarzinomzellen und in den Granulosazellen des Ovars. Eine Stimulation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit Activin A verstärkte die Expression von Bridge-1 [8]. Ein Zusammenhang zwischen dem Activin A-Signalweg und Bridge-1 konnte passend zu den Erkenntnissen in Mammakarzinomzellen [8] auch in Ovarialzellen nachgewiesen werden [7]. Studien konnten zeigen, dass Activin A das Wachstum von Granulosazellen dosisabhängig stimuliert, mit einer maximalen Proliferationsrate ab einer Activin A-Dosis von 100 ng/ml. Die halbmaximale Wirkstärke lag bei einer Activin A-Konzentration von 15 ng/ml [115]. In unseren Versuchen konnte im Gegensatz dazu tendenziell eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation von Zervixkarzinomzellen nach dreitägiger Inkubation mit Activin A beobachtet werden. Jedoch war diese nicht statistisch signifikant. Auch eine fünftägige Inkubation mit Activin A oder eine Inkubation mit einer höheren Konzentration von Activin A führte nicht zu statistisch signifikanten Ergebnissen. Passend zu unseren Ergebnissen konnten Liu und Kollge*innen zeigen, dass Activin A dosisabhängig das Wachstum von Mammakarzinomzellen hemmt. 1 ng/ml Activin A reduzierte die Proliferation von MCF-7-Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 20 %, eine höhere Konzentration von Activin A reduzierte die Proliferation um bis zu 60 % [159]. Der maximale inhibitorische Effekt konnte mit 10 ng/ml Activin A beobachtet werden. Diese Wachstumshemmung wird durch eine Arretierung des Zellzyklus in G₁-Stadium erreicht. Die MCF-7-Zellen wurden für 8 Tage mit Activin A inkubiert [159]. Dies ist deutlich länger

als in der Studie von Rabinovici und Kolleg*innen, die über einen schwächeren Effekt nach nur für fünf Tage Inkubation mit Activin A berichteten [115]. In Anbetracht der Studie von Liu und Kolleg*innen ist es möglich, dass in unserer Studie eine statistische Signifikanz der Tendenz erst nach 8 Tagen Inkubation zu erwarten gewesen wäre. Dies sollte in weiteren Studien überprüft werden.

4.2.4 Einfluss von Activin A auf die Expression von Bridge-1 und Aktivierung von Smad2

Laut Banz und Kolleg*innen kam es in Granulosazellen nach Stimulation mit Activin A zu einer vermehrten Expression von Bridge-1 [7]. Eine Herunterregulation von Bridge-1 mit siRNA führte bei der Brustkrebszelllinie MCF7 zu einer verringerten Expression von Smad2, 3 und 4 [8]. Diese Ergebnisse legten nahe, dass Bridge-1 den Activin A-Signalweg beeinflusst. Activin A wird dem TGF- β -Signalweg zugeordnet.

Wir konnten in unseren Versuchen am Beispiel von SiHa zeigen, dass die Stimulation von Zervixkarzinomzellen zur Aktivierung von Smad2 führte. So war nach Behandlung der Zellkulturen mit Activin A der Anteil von phosphoryliertem Smad2 erhöht. Als Referenz diente die Aktivierung von Smad2 durch TGF- β 1, die mit zusätzlicher Activin A-Gabe noch gesteigert werden konnte. Daher ist anzunehmen, dass Smad-Proteine in den TGF- β - oder Activin A-Signalweg in Zervixkarzinomzellen involviert sind, wie bereits für Granulosazellen beschrieben [7]. Daher kann vermutet werden, dass Bridge-1 auch in Zervixkarzinomzellen ein Teil des Activin A-Signalwegs ist. Fraglich bleibt, warum Activin A in unseren Versuchen keine alleinige Wirkung auf die Bridge-1-Expression hat. Hier könnten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.2.5 Bridge-1 als Co-Transkriptionsfaktor

Bridge-1 wurde als Co-Transkriptionsfaktor unter anderem für die Transkriptionsfaktoren E12 und E47 beschrieben. Thomas und Kolleg*innen konnten zeigen, dass Bridge-1 den aktivierenden Effekt von E12 und E47 auf Enhancer des Insulins verstärkt [139, 140].

Hwang-Verslues und Kolleg*innen fanden in Mammakarzinom-Stammzellen, dass die microRNA miR-495 mit der Tumorgenese assoziiert ist. Die Expression von miR-495 wird durch E12 und E47 fast verdoppelt [52]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Bridge-1 als Coaktivator von E12/E47 über die Expression von miR-495 onkogene Wirkung haben könnte. Zudem kommt der E2A-Komplex aus E12 und E47 laut Patel und Chaudhary im Prostatakarzinomgewebe signifikant häufiger vor als im tumorfreien Prostatagewebe und im

Diskussion

Gewebe der benignen Prostatahyperplasie. Eine Unterdrückung der Genexpression führte zu einer verminderten Proliferation und einem Arrest des Zellzyklus am G₁-Restriktionspunkt [109]. Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass Bridge-1 im Zervixkarzinomgewebe signifikant stärker exprimiert wurde als im peritumoralen Stroma. Die Transkriptionsfaktoren E12 und E47 sowie der Coaktivator Bridge-1 könnten gemeinsam regulatorischen Einfluss auf die Proliferation und die Tumorgenese haben.

Zhao und Kolleg*innen konnten jedoch für das kolorektale Karzinom zeigen, dass E12 und E47 über den Wnt/ β -catenin-Signalweg die Tumorentstehung hemmen [160]. Singh und Kolleg*innen konnten zudem für das Melanom zeigen, dass E12 das Wachstum von Melanomzellen hemmt [130]. Prabhu und Kolleg*innen fanden, dass E47 unter anderem in HeLa-Zellen die Transkription des CDK-Inhibitors p21 aktiviert und somit die Zellteilung blockiert [114]. Dies würde der Auffassung widersprechen, dass Bridge-1 als Coaktivator von E12 und E47 einen onkogenen Effekt vermittelt. Allerdings hängt oft von der Zusammensetzung der Transkriptionskomplexe ab, ob sie eine pro- oder antiproliferative Wirkung haben [107, 109].

Die Acetyltransferase p300 kann die Aktivität des Transkriptionscoaktivators Bridge-1 verstärken [72]. P300 reguliert viele Transkriptionsfaktoren und kann in dieser Funktion die Tumorentstehung sowohl fördern als auch hemmen [151]. Debes und Kolleg*innen konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Expression von p300 in Prostatakarzinomzellen mit der Expression des Proliferationsmarkers MIB-1 korreliert. Zudem konnten sie feststellen, dass die Proliferationsrate der Prostatakarzinomzellen nach Herunterregulation von p300 mit siRNA geringer war [18]. Wir fanden in unserer Studie eine Korrelation zwischen Bridge-1-Expression und MIB-1. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Proliferation in Zervixkarzinomzellen durch die Interaktion von Bridge-1 und p300 gefördert wird. Eine Herunterregulation von Bridge-1 könnte in zukünftigen Studien genaueren Aufschluss über die Wirkung von Bridge-1 auf das Zellwachstum in Zervixkarzinomen geben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bridge-1 sowohl in seiner Funktion als Coaktivator von Transkriptionsfaktoren als auch in seiner Funktion als regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms Einfluss auf die Entstehung von Zervixkarzinome haben könnte. Die vorliegenden Ergebnisse und die Diskussion im Zusammenhang mit Daten aus der Literatur erlauben es, beide Funktionen in Betracht zu ziehen.

5 Zusammenfassung

Das Zervixkarzinom ist weltweit die vierthäufigste Krebserkrankung der Frau [3, 52, 60]. Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung ist eine Infektion mit HPV [20]. Tumormarker, die Diagnostik und Therapie erleichtern würden, sind bisher wenig untersucht. Bridge-1 ist als Transkriptionscoaktivator des Insulinstoffwechsels bekannt [109]. Es wurde zuerst in seiner Funktion als regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms beschrieben und PSMD9 benannt. Eine Studie erkannte einen Zusammenhang zwischen der PSMD9-Expression in Mammakarzinomgewebe und dem Auftreten von Rezidiven nach Radiatio [57].

In dieser retrospektiven Studie wurden Tissue Microarrays mit Zervixkarzinomgewebe und peritumoralem Stroma von 118 Patientinnen immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Bridge-1 gefärbt. In Zellkulturen wurden die proliferativen Eigenschaften sowie die Expression von Bridge-1 mit einem Western Blot in den Zervixkarzinomzelllinien SiHa, CaSki und HeLa untersucht. Wir verwendeten Activin A als indirekten Liganden zur Aktivierung der Signalkaskade, die mit Bridge-1 in Zusammenhang gebracht wurde [7, 8]. Die immunhistochemische Färbung der Zervixkarzinomgewebe ergab, dass Bridge-1 in Zervixkarzinomzellen stärker exprimiert wird als im Stroma. Die Bridge-1-Expression korrelierte außerdem mit dem Auftreten von Tumorrezidiven nach Hysterektomie. Dies ließ sich ebenfalls in der Subgruppe der Patientinnen, die eine adjuvante Radiochemotherapie erhielten, beobachten. Nur in der Subgruppe der Patientinnen, die eine adjuvante Radiatio erhielten, zeigte sich auch nach Kontrolle der *false discovery rate* eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Bridge-1 und dem Auftreten eines Rezidivs. In Zellkulturen gelang der Nachweis von Bridge-1 in den Zervixkarzinomzelllinien SiHa, CaSki und HeLa. In Proliferationsassays zeigte sich nach Inkubation mit Activin A tendenziell eine Proliferationshemmung. Es zeigte sich auch keine Regulation von Bridge-1 nach 24 h Inkubation mit Activin A. Eine Inkubation mit TGF- β 1 und Activin A führte im Vergleich zur Behandlung mit TGF- β 1 allein zu einer nicht signifikant erhöhten Expression von phosphoryliertem Smad2. Eine Veränderung der Bridge-1-Expression ließ sich nicht feststellen.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass Bridge-1 als Tumormarker und Prognosemarker für den Therapieerfolg einer adjuvanten Bestrahlung in Frage kommen könnte. Einen Einfluss von Activin A auf Bridge-1-Expression konnten wir nicht feststellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Alam S, Conway MJ, Chen H-S, Meyers C (2008) The Cigarette Smoke Carcinogen Benzo[a]pyrene Enhances Human Papillomavirus Synthesis. *Journal of Virology* 82:1053–1058.
2. Aleskandarany MA, Rakha EA, Macmillan RD, Powe DG, Ellis IO, Green AR (2011) MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Research and Treatment* 127:591–599.
3. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, Bray F (2020) Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet Global Health* 8:e191–e203.
4. Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FMB, Massagué J, Wrana JL (1993) Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671–680.
5. Attisano L, Wrana JL (2000) Smads as transcriptional co-modulators. *Current Opinion in Cell Biology* 12:235–243.
6. Baltzer J, Meerpohl HG, Bahnsen J, Delbrück H, Schuth W, Ulsenheimer K (2000) *Praxis der gynäkologischen Onkologie*, 2., aktualis. Aufl. Thieme, Stuttgart u.a.:162.
7. Banz C, Münchow B, Diedrich K (2010) Bridge-1 is expressed in human granulosa cells and is involved in the activin A signaling cascade. *Fertility and Sterility* 93:1349–1352.
8. Banz-Jansen C, Münchow B, Diedrich K, Finas D (2011) Bridge-1 is expressed in human breast carcinomas: silencing of Bridge-1 decreases Smad2, Smad3 and Smad4 expression in MCF-7 cells, a human breast cancer cell line. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 284:1543–1549.
9. Barbareschi M, Girlando S, Mauri FM, Forti S, Eccher C, Mauri FA, Togni R, Palma PD, Doglioni C (1994) Quantitative Growth Fraction Evaluation with MIB1 and Ki67 Antibodies in Breast Carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology* 102:171–175.
10. Bipat S, Glas AS, van der Velden J, Zwinderman AH, Bossuyt PMM, Stoker J (2003) Computed tomography and magnetic resonance imaging in staging of uterine cervical carcinoma: a systematic review. *Gynecologic Oncology* 91:59–66.
11. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H (2012) *Pathologie*, 5.

Literaturverzeichnis

- Aufl. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH:131, 779.
12. Burd EM (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 16:1–17.
 13. Burdette JE, Jeruss JS, Kurley SJ, Lee EJ, Woodruff TK (2005) Activin A Mediates Growth Inhibition and Cell Cycle Arrest through Smads in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 65:7968–7975.
 14. Castle PE, Fetterman B, Thomas Cox J, Shaber R, Poitras N, Lorey T, Kinney W (2010) The age-specific relationships of abnormal cytology and human papillomavirus DNA results to the risk of cervical precancer and cancer. *Obstetrics and Gynecology* 116:76–84.
 15. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüuter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *The Journal of Pathology* 168:357–363.
 16. Chen L, Madura K (2005) Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Research* 65:5599–5606.
 17. Cibula D, Pötter R, Planchamp F, Avall-Lundqvist E, Fischerova D, Haie-Meder C, Köhler C, Landoni F, Lax S, Lindegaard JC, Mahantshetty U, Mathevet P, McCluggage WG, McCormack M, Naik R, Nout R, Pignata S, Ponce J, Querleu D, Raspagliesi F, Rodolakis A, Tamussino K, Wimberger P, Raspollini MR (2018) The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology Guidelines for the Management of Patients with Cervical Cancer. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 472:919–936.
 18. Debes JD, Sebo TJ, Lohse CM, Murphy LM, Haugen DAL, Tindall DJ (2003) p300 in Prostate Cancer Proliferation and Progression. *Cancer Research* 63:7638–7640
 19. Denise Zielinski G, Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Runsink AP, de Schipper FA, Meijer CJ (2001) High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis: long-term follow-up data and clinical relevance. *The Journal of Pathology* 195:300–306.
 20. Derynck R, Feng X-H (1997) TGF- β receptor signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1333:F105–F150.
 21. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in

- TGF- β family signalling. *Nature* 425:577–584.
22. Dijkstra MG, van Niekerk D, Rijkaart DC, van Kemenade FJ, Heideman DAM, Snijders PJF, Meijer CJLM, Berkhof J (2014) Primary hrHPV DNA testing in cervical cancer screening: how to manage screen-positive women? A POBASCAM trial substudy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23:55–63.
 23. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X (2005) NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv* 446:475–482.
 24. Dürst M, Backsch C, Kaufmann AM, Schneider A (2003) Ätiologie und Pathogenese des Zervixkarzinoms. *Gynäkologie* 36:282–288.
 25. Eifel PJ, Morris M, Taylor Wharton J, Oswald MJ (1994) The influence of tumor size and morphology on the outcome of patients with figo stage IB squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 29:9–16.
 26. Ferrandina G, Legge F, Fagotti A, Fanfani F, Distefano M, Morganti A, Cellini N, Scambia G (2007) Preoperative concomitant chemoradiotherapy in locally advanced cervical cancer: safety, outcome, and prognostic measures. *Gynecologic Oncology* 107:S127-132.
 27. Fleisch MC, Pantke P, Beckmann MW, Schnuerch HG, Ackermann R, Grimm MO, Bender HG, Dall P (2007) Predictors for long-term survival after interdisciplinary salvage surgery for advanced or recurrent gynecologic cancers. *Journal of Surgical Oncology* 95:476–484.
 28. Fox KV, Shah CA, Swisher EM, Garcia RL, Mandel LS, Gray HJ, Swensen RE, Goff BA (2008) An evaluation of cervical cancer in women age sixty and over. *Gynecologic Oncology* 109:53–58.
 29. Frenel J-S, Le Tourneau C, O’Neil B, Ott PA, Piha-Paul SA, Gomez-Roca C, van Brummelen EMJ, Rugo HS, Thomas S, Saraf S, Rangwala R, Varga A (2017) Safety and Efficacy of Pembrolizumab in Advanced, Programmed Death Ligand 1-Positive Cervical Cancer: Results From the Phase Ib KEYNOTE-028 Trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35:4035–4041.
 30. Gemeinsamer Bundesausschuss (2016) Beschluss über eine Änderung der Beauftragung des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen:

Literaturverzeichnis

- zur Erstellung von Einladungsschreiben und Versicherteninformation zum Zervixkarzinomscreening. Berlin:1-2.
31. Goldberg AL (2007) Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochemical Society Transactions* 35:12–17.
 32. Gonçalves CV, Duarte G, Costa JSD da, Marcolin AC, Bianchi MS, Dias D, Lima LC de V e (2009) Diagnosis and treatment of cervical cancer during pregnancy. *Sao Paulo Medical Journal* 127:359–365.
 33. Gouy S, Morice P, Narducci F, Uzan C, Martinez A, Rey A, Bentivegna E, Pautier P, Deandreis D, Querleu D, Haie-Meder C, Leblanc E (2013) Prospective multicenter study evaluating the survival of patients with locally advanced cervical cancer undergoing laparoscopic para-aortic lymphadenectomy before chemoradiotherapy in the era of positron emission tomography imaging. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31:3026–3033.
 34. Green J, Kirwan J, Tierney J, Vale C, Symonds P, Fresco L, Williams C, Collingwood M (2005) Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* Art. No.: CD002225.
 35. Griesser H, Marquardt K, Jordan B, Kühn W, Neis K, Neumann HH, Bollmann R, Pöschel B, Steiner M, Schenk U (2013) Münchner Nomenklatur III. *Frauenarzt* 54:1042–1048.
 36. Grigsby PW, Perez CA, Chao KSC, Elbendary A, Herzog TJ, Rader JS, Mutch DG (1999) Lack of effect of tumor size on the prognosis of carcinoma of the uterine cervix stage IB and IIA treated with preoperative irradiation and surgery. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 45:645–651.
 37. Gross GE, Wieland U, Werner RN (2020) Evidenz-und konsensbasierte S3-Leitlinie Impfprävention HPV-assoziierter Neoplasien-Langfassung -AWMF-Register Nr.: 082-002, 2020:4. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-0021_S3_Impfpraevention-HPV-assoziierter-Neoplasien_2020-07_01.pdf, abgerufen am 09.02.21.
 38. Gupta S, Maheshwari A, Parab P, Mahantshetty U, Hawaldar R, Sastri Chopra S, Kerkar R, Engineer R, Tongaonkar H, Ghosh J, Gulia S, Kumar N, Shylasree TS, Gawade R, Kembhavi Y, Gaikar M, Menon S, Thakur M, Shrivastava S, Badwe R (2018) Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Radical Surgery Versus Concomitant Chemotherapy and Radiotherapy in Patients With Stage IB2, IIA, or

- IIB Squamous Cervical Cancer: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36:1548–1555.
39. Han K, Milosevic M, Fyles A, Pintilie M, Viswanathan AN (2013) Trends in the utilization of brachytherapy in cervical cancer in the United States. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 87:111–119.
 40. Harish M, Kannan S, Puttagunta S, Pradhan MR, Verma CS, Venkatraman P (2019) A Novel Determinant of PSMD9 PDZ Binding Guides the Evolution of the First Generation of Super Binding Peptides. *Biochemistry* 58:3422–3433.
 41. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu Y-Y, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Wrana JL, Falb D (1997) The MAD-Related Protein Smad7 Associates with the TGF β Receptor and Functions as an Antagonist of TGF β Signaling. *Cell* 89:1165–1173.
 42. Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF- κ B. *Genes & Development* 18:2195–2224.
 43. Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465–471.
 44. Hellberg D, Stendahl U (2005) The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer. *Anticancer Research* 25:3041–3046.
 45. Hochstrasser M (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual Review of Genetics* 30:405–439.
 46. Höckel M, Dornhöfer N (2007) Neue Prinzipien und Techniken in der operativen Therapie des Zervixkarzinoms: Aktuelle systematische Übersicht. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 67:1203–1216.
 47. Hoellen F, Waldmann A, Banz-Jansen C, Rody A, Heide M, Köster F, Ribbat-Idel J, Thorns C, Gebhard M, Oberländer M, Habermann JK, Thill M (2016) Expression of cyclooxygenase-2 in cervical cancer is associated with lymphovascular invasion. *Oncology Letters* 12:2351–2356.
 48. Horn L-C, Brambs CE, Opitz S, Ulrich UA, Höhn AK (2019) FIGO-Klassifikation für das Zervixkarzinom 2019 – was ist neu? *Der Pathologe* 40:629–635.
 49. Hou Y, Guo S, Lyu J, Lu Z, Yang Z, Liu D, Chen Z (2019) Prognostic factors in Asian and white American patients with cervical cancer, considering competing risks. *Current Oncology* 26:e277–e285.

Literaturverzeichnis

50. Hricak H, Mendelson E, Böhm-Vélez M, Bree R, Finberg H, Fishman EK, Laing F, Sartoris D, Thurmond A, Goldstein S (2000) Role of imaging in cancer of the cervix. American College of Radiology. ACR Appropriateness Criteria. *Radiology* 215 Suppl:925–930.
51. Hwang JH, Yoo HJ, Park SH, Lim MC, Seo S-S, Kang S, Kim J-Y, Park S-Y (2012) Association between the location of transposed ovary and ovarian function in patients with uterine cervical cancer treated with (postoperative or primary) pelvic radiotherapy. *Fertility and Sterility* 97:1387-1393.e1–2.
52. Hwang-Verslues WW, Chang P-H, Wei P-C, Yang C-Y, Huang C-K, Kuo W-H, Shew J-Y, Chang K-J, Lee EY-HP, Lee W-H (2011) miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1. *Oncogene* 30:2463–2474.
53. Inman GJ, Nicolás FJ, Hill CS (2002) Nucleocytoplasmic Shuttling of Smads 2, 3, and 4 Permits Sensing of TGF- β Receptor Activity. *Molecular Cell* 10:283–294.
54. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, Green J, Peto J, Plummer M, Sweetland S (2007) Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 370:1609–1621.
55. Ioka A, Tsukuma H, Ajiki W, Oshima A (2005) Influence of age on cervical cancer survival in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 35:464–469.
56. Ishikawa H, Ohno T, Kato S, Wakatsuki M, Iwakawa M, Ohta T, Imai T, Mitsuhashi N, Noda S-E, Nakano T, Tsujii H (2006) Cyclooxygenase-2 impairs treatment effects of radiotherapy for cervical cancer by inhibition of radiation-induced apoptosis. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 66:1347–1355.
57. Itoh S, Itoh F, Goumans M-J, Dijke P ten (2000) Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *European Journal of Biochemistry* 267:6954–6967.
58. Jeong SY, Park H, Kim MS, Kang JH, Paik ES, Lee Y-Y, Kim TJ, Lee JW, Kim B-G, Bae DS, Choi CH (2020) Pretreatment Lymph Node Metastasis as a Prognostic Significance in Cervical Cancer: Comparison between Disease Status. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association* 52:516–523.

Literaturverzeichnis

59. Jeruss JS, Sturgis CD, Rademaker AW, Woodruff TK (2003) Down-Regulation of Activin, Activin Receptors, and Smads in High-Grade Breast Cancer. *Cancer Research* 63:3783–3790.
60. Johnson JD, Bernal-Mizrachi E, Alejandro EU, Han Z, Kalynyak TB, Li H, Beith JL, Gross J, Warnock GL, Townsend RR, Permutt MA, Polonsky KS (2006) Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:19575–19580.
61. Kamer S, Ren Q, Dicker AP (2009) Differential radiation sensitization of human cervical cancer cell lines by the proteasome inhibitor velcade (bortezomib, PS-341). *Archives of Gynecology and Obstetrics* 279:41–46.
62. Kaneda H, Arao T, Matsumoto K, De Velasco MA, Tamura D, Aomatsu K, Kudo K, Sakai K, Nagai T, Fujita Y, Tanaka K, Yanagihara K, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K (2011) Activin A inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumour angiogenesis in gastric cancer. *British Journal of Cancer* 105:1210–1217.
63. Kaneko T, Hamazaki J, Iemura S, Sasaki K, Furuyama K, Natsume T, Tanaka K, Murata S (2009) Assembly Pathway of the Mammalian Proteasome Base Subcomplex Is Mediated by Multiple Specific Chaperones. *Cell* 137:914–925.
64. Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, Lenner P, Löve A, Mahlamaki E, Thoresen S, Tryggvadóttir L, Wadell G, Youngman L, Lehtinen M (2009) Is Smoking an Independent Risk Factor for Invasive Cervical Cancer? A Nested Case-Control Study Within Nordic Biobanks. *American Journal of Epidemiology* 169:480–488.
65. Kim HS, Sardi JE, Katsumata N, Ryu HS, Nam JH, Chung HH, Park NH, Song YS, Behtash N, Kamura T, Cai HB, Kim JW (2013) Efficacy of neoadjuvant chemotherapy in patients with FIGO stage IB1 to IIA cervical cancer: an international collaborative meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 39:115–124.
66. Kitagawa R, Katsumata N, Shibata T, Kamura T, Kasamatsu T, Nakanishi T, Nishimura S, Ushijima K, Takano M, Satoh T, Yoshikawa H (2015) Paclitaxel Plus Carboplatin Versus Paclitaxel Plus Cisplatin in Metastatic or Recurrent Cervical Cancer: The Open-Label Randomized Phase III Trial JCOG0505. *Journal of Clinical*

- Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 33:2129–2135.
67. Klug S, Meerpohl J, Terhardt M, Röbl-Mathieu M, van der Sande M, Zepp F, Takla A, Wiese-Posselt M, Harder T, Wichmann O (2018) Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren. *Epidemiologisches Bulletin*:233–250.
 68. Kong S, Huang K, Zeng C, Ma X, Wang S (2018) The association between short-term response and long-term survival for cervical cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy: a system review and meta-analysis. *Scientific Reports* 8:1–8.
 69. Koutsky LA, Holmes KK, Crichtlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB (1992) A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *The New England Journal of Medicine* 327:1272–1278.
 70. Langlands FE, Dodwell D, Hanby AM, Horgan K, Millican-Slater RA, Speirs V, Verghese ET, Smith L, Hughes TA (2014) PSMD9 expression predicts radiotherapy response in breast cancer. *Molecular Cancer* 13:73.
 71. Larsson J, Karlsson S (2005) The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24:5676–5692.
 72. Lee JH, Volinic JL, Banz C, Yao K-M, Thomas MK (2005) Interactions with p300 enhance transcriptional activation by the PDZ-domain coactivator Bridge-1. *Journal of Endocrinology* 187:283–292.
 73. Lee SW, Kim Y-M, Son W-S, You H-J, Kim D-Y, Kim J-H, Kim Y-T, Nam J-H (2009) The efficacy of conservative management after conization in patients with stage IA1 microinvasive cervical carcinoma. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* 88:209–215.
 74. Lee Y-J, Kim D-Y, Lee S-W, Park J-Y, Suh D-S, Kim J-H, Kim Y-M, Kim Y-T, Nam J-H (2017) A postoperative scoring system for distant recurrence in node-positive cervical cancer patients after radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection with para-aortic lymph node sampling or dissection. *Gynecologic Oncology* 144:536–540.
 75. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2021) S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom, Langversion, 2.1, AWMF-Registernummer: 032/033OL: 24, 120.

https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-033OLk_S3_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_Zervixkarzinom_2021-05.pdf,
abgerufen am 12.09.2021.

76. Levovitz C, Chen D, Ivansson E, Gyllensten U, Finnigan JP, Alshawish S, Zhang W, Schadt EE, Posner MR, Genden EM, Boffetta P, Sikora AG (2014) TGF β Receptor 1: An Immune Susceptibility Gene in HPV-Associated Cancer. *Cancer research* 74:6833.
77. Li D, Xu X, Yan D, Yuan S, Ni J, Lou H (2019) Prognostic factors affecting survival and recurrence in patients with early cervical squamous cell cancer following radical hysterectomy. *Journal of International Medical Research* 0300060519889741.
78. Li F, Sethi G (2010) Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1805:167–180.
79. Li L-X, Crotty K, McCarthy S, Palmer A, Kril J (2000) A Zonal Comparison of MIB1-Ki67 Immunoreactivity in Benign and Malignant Melanocytic Lesions. *The American Journal of Dermatopathology* 22:489–495
80. Liu F, Pouponnot C, Massagué J (1997) Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF β -inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* 11:3157–3167
81. Long HJ, Bundy BN, Grendys EC, Benda JA, McMeekin DS, Sorosky J, Miller DS, Eaton LA, Fiorica JV, Gynecologic Oncology Group Study (2005) Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23:4626–4633.
82. Loomans HA, Andl CD (2014) Intertwining of Activin A and TGF β Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion. *Cancers (Basel)* 7:70–91.
83. Lukka H, Hirte H, Fyles A, Thomas G, Elit L, Johnston M, Fung MFK, Browman G, Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Gynecology Disease Site Group (2002) Concurrent cisplatin-based chemotherapy plus radiotherapy for cervical cancer-a meta-analysis. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 14:203–212.
84. Mariagrazia D, Anna F, Gabriella F, Francesco F, Daniela S, Giuseppe D, Alessio M, Giovanni S (2005) Preoperative chemoradiotherapy in locally advanced cervical cancer: long-term outcome and complications. *Gynecologic Oncology* 99:S166-170.
85. Marnitz S, Köhler C, Roth C, Füller J, Bischoff A, Wendt T, Schneider A, Budach V

- (2007) Stage-adjusted chemoradiation in cervical cancer after transperitoneal laparoscopic staging. *Strahlentherapie Und Onkologie: Organ Der Deutschen Röntgengesellschaft*. [et Al] 183:473–478.
86. Marnitz S, Köhler C, Roth C, Füller J, Hinkelbein W, Schneider A (2005) Is there a benefit of pretreatment laparoscopic transperitoneal surgical staging in patients with advanced cervical cancer? *Gynecologic Oncology* 99:536–544.
 87. Marshall RS, Vierstra RD (2019) Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Frontiers in Molecular Biosciences* 6:40.
 88. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW, 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference (2013) 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstetrics and Gynecology* 121:829–846.
 89. Massagué J (1998) TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry* 67:753–791.
 90. Mathews LS, Vale WW (1993) Characterization of type II activin receptors. Binding, processing, and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 268:19013–19018.
 91. Mehlhorn G, Lanowska M, Thiel F, Köhler C, Beckmann MW (2008) Organerhaltende operative Methoden im Bereich der Cervix uteri. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 68:R121–R144.
 92. Melamed A, Margul DJ, Chen L, Keating NL, Del Carmen MG, Yang J, Seagle B-LL, Alexander A, Barber EL, Rice LW, Wright JD, Kocherginsky M, Shahabi S, Rauh-Hain JA (2018) Survival after Minimally Invasive Radical Hysterectomy for Early-Stage Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine* 379:1905–1914.
 93. Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D (1994) The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 3:619–626.
 94. Moreira ASL, Cunha TM, Esteves S (2020) Cervical cancer recurrence – can we predict the type of recurrence? *Diagnostic and Interventional Radiology* 26:403–410.
 95. Mota F (2003) Microinvasive squamous carcinoma of the cervix: treatment modalities. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* 82:505–509.
 96. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin C-H (2002) Mechanisms of TGF- β signaling

- in regulation of cell growth and differentiation. *Immunology Letters* 82:85–91.
97. Nag S, Chao C, Erickson B, Fowler J, Gupta N, Martinez A, Thomadsen B, American Brachytherapy Society (2002) The American Brachytherapy Society recommendations for low-dose-rate brachytherapy for carcinoma of the cervix. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 52:33–48.
 98. Nag S, Erickson B, Thomadsen B, Orton C, Demanes JD, Petereit D (2000) The American Brachytherapy Society recommendations for high-dose-rate brachytherapy for carcinoma of the cervix. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 48:201–211.
 99. Nagarajan RP, Zhang J, Li W, Chen Y (1999) Regulation of Smad7 Promoter by Direct Association with Smad3 and Smad4. *Journal of Biological Chemistry* 274:33412–33418.
 100. Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B, Karunagaran D (2003) NF- κ B is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 22:50–58.
 101. Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247:836–838.
 102. Nicolás FJ, De Bosscher K, Schmierer B, Hill CS (2004) Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *Journal of Cell Science* 117:4113–4125.
 103. Oberländer M, Alkemade H, Bünger S, Ernst F, Thorns C, Braunschweig T, Habermann JK (2014) A “waterfall” transfer-based workflow for improved quality of tissue microarray construction and processing in breast cancer research. *Pathology oncology research: POR* 20:719–726.
 104. Pangas SA, Woodruff TK (2000) Activin Signal Transduction Pathways. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11:309–314.
 105. Panopoulou E, Murphy C, Rasmussen H, Bagli E, Rofstad EK, Fotsis T (2005) Activin A Suppresses Neuroblastoma Xenograft Tumor Growth via Antimitotic and Antiangiogenic Mechanisms. *Cancer Research* 65:1877–1886.
 106. Park J-W, Bae JW (2016) Prognostic significance of positive lymph node number in early cervical cancer. *Molecular and Clinical Oncology* 4:1052–1056.
 107. Park ST, Nolan GP, Sun X-H (1999) Growth Inhibition and Apoptosis Due to Restoration of E2A Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 189:501–508.
 108. Parker BL, Calkin AC, Seldin MM, Keating MF, Tarling EJ, Yang P, Moody SC,

Literaturverzeichnis

- Liu Y, Zerenturk EJ, Needham EJ, Miller ML, Clifford BL, Morand P, Watt MJ, Meex RCR, Peng K-Y, Lee R, Jayawardana K, Pan C, Mellett NA, Weir JM, Lazarus R, Lusic AJ, Meikle PJ, James DE, de Aguiar Vallim TQ, Drew BG (2019) An integrative systems genetic analysis of mammalian lipid metabolism. *Nature* 567:187–193.
109. Patel D, Chaudhary J (2012) Increased expression of bHLH Transcription Factor E2A (TCF3) in prostate cancer promotes proliferation and confers resistance to doxorubicin induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422:146–151.
110. Petraglia F, Florio P, Luisi S, Gallo R, Gadducci A, Viganò P, Di Blasio AM, Genazzani AR, Vale W (1998) Expression and Secretion of Inhibin and Activin in Normal and Neoplastic Uterine Tissues. High Levels of Serum Activin A in Women with Endometrial and Cervical Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83:1194–1200.
111. Pierreux CE, Nicolás FJ, Hill CS (2000) Transforming Growth Factor β -Independent Shuttling of Smad4 between the Cytoplasm and Nucleus. *Molecular and Cellular Biology* 20:9041–9054.
112. Piver, M. Steven MD, Rutledge, Felix MD, Smith, Julian P. MD (1974) Five Classes of Extended Hysterectomy for Women With Cervical Cancer. *Obstetrics and Gynecology* 44:265–272.
113. Prabhavathy D, Vijayalakshmi R, Kanchana MP, Karunakaran D (2014) HPV16 E2 enhances the expression of NF- κ B and STAT3 target genes and potentiates NF- κ B activation by inflammatory mediators. *Cellular Immunology* 292:70–77.
114. Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH (1997) Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Molecular and Cellular Biology* 17:5888–5896.
115. Rabinovici J, Spencer SJ, Jaffe RB (1990) Recombinant human activin-A promotes proliferation of human luteinized preovulatory granulosa cells in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 71:1396–1398.
116. Ramirez PT, Frumovitz M, Pareja R, Lopez A, Vieira M, Ribeiro R, Buda A, Yan X, Shuzhong Y, Chetty N, Isla D, Tamura M, Zhu T, Robledo KP, Gebiski V, Asher R, Behan V, Nicklin JL, Coleman RL, Obermair A (2018) Minimally Invasive versus Abdominal Radical Hysterectomy for Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine* 379:1895–1904.

Literaturverzeichnis

117. Reis FM, Cobellis L, Tameirão LC, Anania G, Luisi S, Silva ISB, Gioffrè W, di Blasio AM, Petraglia F (2002) Serum and Tissue Expression of Activin A in Postmenopausal Women with Breast Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87:2277–2282.
118. Remmele W, Stegner HE (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Der Pathologe* 8:138–140.
119. Robert Koch Insitut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019) Krebs in Deutschland für 2015/2016:17, 86–89.
120. Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, Liu R, Adams J, Elliott P, Cusack JC (2001) Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: Implications for a role of NF- κ B. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 50:183–193.
121. Rydzewska L, Tierney J, Vale CL, Symonds PR (2012) Neoadjuvant chemotherapy plus surgery versus surgery for cervical cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 12:CD007406.
122. Sahu I, Sangith N, Ramteke M, Gadre R, Venkatraman P (2014) A novel role for the proteasomal chaperone PSMD9 and hnRNPA1 in enhancing I κ B α degradation and NF- κ B activation – functional relevance of predicted PDZ domain–motif interaction. *The FEBS Journal* 281:2688–2709.
123. Satoh T, Saeki Y, Hiromoto T, Wang Y-H, Uekusa Y, Yagi H, Yoshihara H, Yagi-Utsumi M, Mizushima T, Tanaka K, Kato K (2014) Structural Basis for Proteasome Formation Controlled by an Assembly Chaperone Nas2. *Structure* 22:731–743.
124. Sauer G, Windisch J, Kurzeder C, Heilmann V, Kreienberg R, Deissler H (2003) Progression of Cervical Carcinomas Is Associated with Down-Regulation of CD9 But Strong Local Re-expression at Sites of Transendothelial Invasion. *Clinical Cancer Research* 9:6426–6431.
125. Scatchard K, Forrest JL, Flubacher M, Cornes P, Williams C (2012) Chemotherapy for metastatic and recurrent cervical cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 10:CD006469.
126. Seachrist DD, Keri RA (2019) The Activin Social Network: Activin, Inhibin and Follistatin in Breast Development and Cancer. *Endocrinology* 160:1097–1110.
127. Seedat J, Marcus U, Smolinski F, Fehrmann S, Petschelt J (2014) Neuerungen in den aktuellen Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am RKI vom

- August 2014. *Epidemiologisches Bulletin* 35/2014:341–350.
128. Selman TJ, Mann C, Zamora J, Appleyard T-L, Khan K (2008) Diagnostic accuracy of tests for lymph node status in primary cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 178:855–862.
 129. Shim S-H, Lim MC, Kim HJ, Lee M, Nam EJ, Lee JY, Lee Y-Y, Lee KB, Park JY, Kim YH, Ki KD, Song YJ, Chung HH, Kim S, Lee J-W, Kim J-W, Bae D-S, Lee J-M (2018) Can simple trachelectomy or conization show comparable survival rate compared with radical trachelectomy in IA1 cervical cancer patients with lymphovascular space invasion who wish to save fertility? A systematic review and guideline recommendation. *PLoS One* 13:e0189847.
 130. Singh K, Baird M, Fischer R, Chaitankar V, Seifuddin F, Chen Y-C, Tunc I, Waterman CM, Pirooznia M (2020) Misregulation of ELK1, AP1, and E12 Transcription Factor Networks Is Associated with Melanoma Progression. *Cancers* 12:458.
 131. Siokos AG, Siokou-Siova O, Tzafetas I (2019) Correlation between cervical carcinogenesis and tobacco use by sexual partners. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine* 22 Suppl 2:184–190.
 132. Solomon D, Schiffman M, Tarone R, ALTS Study group (2001) Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute* 93:293–299.
 133. Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K (1997) Exportin 1 (Crm1p) Is an Essential Nuclear Export Factor. *Cell* 90:1041–1050.
 134. Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, Lamerz R, Fritsche HA, Gaarenstroom K, Bonfrer J, Ecke TH, Grossman HB, Hayes P, Hoffmann R-T, Lerner SP, Löhe F, Louhimo J, Sawczuk I, Taketa K, Diamandis EP, National Academy of Clinical Biochemistry (2010) National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers. *Clinical Chemistry* 56:e1-48.
 135. Suri A, Frumovitz M, Milam MR, dos Reis R, Ramirez PT (2009) Preoperative pathologic findings associated with residual disease at radical hysterectomy in women with stage IA2 cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 112:110–113.
 136. Tam CW, Cheng AS, Ma RYM, Yao K-M, Shiu SYW (2006) Inhibition of Prostate

- Cancer Cell Growth by Human Secreted PDZ Domain-Containing Protein 2, a Potential Autocrine Prostate Tumor Suppressor. *Endocrinology* 147:5023–5033.
137. Teke F, Yoney A, Teke M, Inal A, Urakci Z, Eren B, Zincircioglu SB, Buyukpolat MY, Ozer A, Isikdogan A, Unsal M (2014) Lack of any impact of histopathology type on prognosis in patients with early-stage adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 15:2815–2819.
 138. Tewari KS, Sill MW, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, Landrum LM, Oaknin A, Reid TJ, Leitao MM, Michael HE, DiSaia PJ, Copeland LJ, Creasman WT, Stehman FB, Brady MF, Burger RA, Thigpen JT, Birrer MJ, Waggoner SE, Moore DH, Look KY, Koh W-J, Monk BJ (2017) Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240). *Lancet* 390:1654–1663.
 139. Thomas M, Tsang S, Yeung M-L, Leung P, Yao K-M (2009) The Roles of the PDZ-containing Proteins Bridge-1 and PDZD2 in the Regulation of Insulin Production and Pancreatic Beta-Cell Mass. *Current Protein & Peptide Science* 10:30–36.
 140. Thomas MK, Yao K-M, Tenser MS, Wong GG, Habener JF (1999) Bridge-1, a Novel PDZ-Domain Coactivator of E2A-Mediated Regulation of Insulin Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 19:8492–8504.
 141. Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, Arias D, Rolfo C, Trinh XB, van Dam PA (2017) The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 120:141–150.
 142. Togashi Y, Kogita A, Sakamoto H, Hayashi H, Terashima M, de Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Tomida S, Kitano M, Okuno K, Kudo M, Nishio K (2015) Activin signal promotes cancer progression and is involved in cachexia in a subset of pancreatic cancer. *Cancer Letters* 356:819–827.
 143. Tomko RJ, Hochstrasser M (2013) Molecular Architecture and Assembly of the Eukaryotic Proteasome. *Annual review of biochemistry* 82:415–445.
 144. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL (1998) SARA, a FYVE Domain Protein that Recruits Smad2 to the TGF β Receptor. *Cell* 95:779–791.
 145. Vale C, Tierney JF, Stewart LA, Brady M, Dinshaw K, Jakobsen A, Parmar MKB, Thomas G, Trimble T (2008) Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of

- individual patient data from 18 randomized trials. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26:5802–5812.
146. Vandermark ER, Deluca KA, Gardner CR, Marker DF, Schreiner CN, Strickland DA, Wilton KM, Mondal S, Woodworth CD (2012) Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF- κ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- κ B promotes cell growth and immortalization. *Virology* 425:53–60.
 147. Venkatraman M, Anto RJ, Nair A, Varghese M, Karunagaran D (2005) Biological and chemical inhibitors of NF- κ B sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Molecular Carcinogenesis* 44:51–59.
 148. Viale G (2011) Pathological work up of the primary tumor: getting the proper information out of it. *Breast* 20 Suppl 3:S82-86.
 149. Viswanathan AN, Deavers MT, Jhingran A, Ramirez PT, Levenback C, Eifel PJ (2004) Small cell neuroendocrine carcinoma of the cervix: outcome and patterns of recurrence. *Gynecologic Oncology* 93:27–33.
 150. Volinic JL, Lee JH, Eto K, Kaur V, Thomas MK (2006) Overexpression of the coactivator bridge-1 results in insulin deficiency and diabetes. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)* 20:167–182.
 151. Wang F, Marshall CB, Ikura M (2013) Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70:3989–4008.
 152. Wang N, Guan Q-L, Wang K, Zhou X, Gao C, Yang H-T, Ni T-G (2011) Radiochemotherapy versus radiotherapy in locally advanced cervical cancer: a meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 283:103–108.
 153. Watanabe TK, Saito A, Suzuki M, Fujiwara T, Takahashi E, Slaughter CA, DeMartino GN, Hendil KB, Chung CH, Tanahashi N, Tanaka K (1998) cDNA cloning and characterization of a human proteasomal modulator subunit, p27 (PSMD9). *Genomics* 50:241–250.
 154. Weigert M, Sevelde P, Pokieser W, Weigl G, Schuller B (2009) Histologische Korrelation von Portio-Biopsie und Konus in der klinischen Praxis: 2001–2008. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 69:A20.
 155. Wen H, Wu X, Li Z, Wang H, Zang R, Sun M, Huang X, Zhang Z, Cai S (2012) A prospective randomized controlled study on multiple neoadjuvant treatments for patients with stage IB2 to IIA cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 22:296–

- 302.
156. Wentzensen N, Klug SJ (2008) Früherkennung des Zervixkarzinoms. Deutsches Ärzteblatt 105(37):617–622.
 157. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J (1994) Mechanism of activation of the TGF- β receptor. Nature 370:341.
 158. Yan D-D, Tang Q, Chen J-H, Tu Y-Q, Lv X-J (2019) Prognostic value of the 2018 FIGO staging system for cervical cancer patients with surgical risk factors. Cancer Management and Research 11:5473–5480.
 159. Yan Liu Q, Niranjana B, Gomes P, Gomm J, Davies D, Charles Coombes R, Buluwela L (1996) Inhibitory Effects of Activin on the Growth and Morphogenesis of Primary and Transformed Mammary Epithelial Cells. Cancer research 56:1155–63
 160. Zhao H, Zhao C, Li H, Zhang D, Liu G (2019) E2A attenuates tumor-initiating capacity of colorectal cancer cells via the Wnt/beta-catenin pathway. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR 38:1–11.
 161. Zhou J, Zhang W-W, Wu S-G, He Z-Y, Sun J-Y, Yang G-F, Li F-Y (2017) The prognostic value of histologic subtype in node-positive early-stage cervical cancer after hysterectomy and adjuvant radiotherapy. International Journal of Surgery 44:1–6.

7 Anhang



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck

Frau
PD Dr. med. Banz-Jansen
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

im Hause

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Rody, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Frau Lisa Sauer, Steinrader Weg 58 in 23558 Lübeck

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 15-134

Datum: 09. Juni 2015

Sitzung der Ethik-Kommission am 04. Juni 2015

Antragsteller: Frau Dr. Banz-Jansen

Titel: Expression und Verteilung von Bridge-1/PSMD9 in Zervixkarzinomzellen

Sehr geehrte Frau Dr. Banz-Jansen,
der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung der folgenden **Hinweise** keine Bedenken: Unter 3.2 im Basisformular wird von einer erteilten Einwilligung zur Verwendung des Biomaterials zu Forschungszwecken gesprochen, diese wurde aber nicht vorgelegt. Eine Einwilligung ist für die pseudonymisierte Verwendung jedoch vorzusetzen; anderenfalls müssen die Daten unmittelbar an der Quelle anonymisiert werden. Eine statistische Beratung ist angeraten, u.a. um die vorgesehene statistische Analyse durch einseitige Tests auf Korrelationskoeffizienten zu verbessern und die Genauigkeit der zu schätzenden Abhängigkeitsmaße anzugeben.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.

Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.drks.de). Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

Prof. Dr. Katalinic
(Soz.med./Epidemiologie, Vorsitzender)
 Herr Prof. Dr. Gieseler
(Med. Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
Herr Dr. Bausch
(Chirurgie)
 Herr Prof. Dr. Borck
(Med. u. Wiss.geschichte)
Frau A. Farries
(Richterin am Amtsgericht Lübeck)
Frau B. Jacobs
(Pflege, PIZ)

Frau PD Dr. Jauch-Chara
(Psychiatrie)
Herr PD Lauten
(Kinder- und Jugendmedizin)
 Herr Prof. Moser
(Neurologie)
Herr Prof. Rehmann-Sutter
(Med. u. Wiss.geschichte)
 Herr H. Schneider
(Vizepräsident am Landgericht Lübeck)

Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Prof. Dr. Schwaninger
(Pharmakologie)
Frau Prof. E. Stubbe
(Theologin)
 Herr Dr. R. Vonthein
(Zentrum für Klinische Studien)
 Frau Prof. Zühlke
(Humangenetik)

8 Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Achim Rody, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, für die Möglichkeit, an seiner Klinik zu promovieren und die dazugehörigen Forschungsarbeiten durchzuführen.

Frau Prof. Dr. med. Constanze Banz-Jansen gilt mein großer Dank für die Idee zu dieser Arbeit sowie für die stetige Unterstützung. Ihre wissenschaftliche Erfahrung war mir eine wertvolle Hilfe.

Gleichermaßen danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Frank Köster. Sein stetiges Interesse an der Arbeit, seine konstruktiven Ideen und sein immer offenes Ohr haben einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Frau PD Dr. med. Friederike Hoellen danke ich für die Bereitstellung der TMAs und der Patientinnendaten.

Frau Dr. med. Julika Ribbat-Idel danke ich für die Zusammenarbeit bei der Auswertung der TMAs.

Herrn Dr. rer. hum. biol. Markus Scheinhardt danke ich für die statistische Beratung.

Frau Dr. rer. nat. Karen Bräutigam danke ich für die hilfreiche Zusammenarbeit sowie die Unterstützung bei der Korrektur der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Stephan Polack für die schöne Zusammenarbeit sowie für die wertvolle Anleitung bei der Durchführung der Versuche.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlich für all die Ermutigungen, technischen Hilfestellung und euren unerschütterlichen Rückhalt.