

## 4 Diskussion

Es wurde die Expression von CR-1, erbB-2 und TGF $\alpha$  an 17 Normalepithelien, 27 CIN III Präparaten und 112 Plattenepithelkarzinomen der Zervix der FIGO-Stadien I-IV untersucht.

### 4.1 Das Kollektiv und das Überleben ohne Berücksichtigung der untersuchten Antigene

Der Median des Alters der eingebrachten Patientinnen lag bei 51 Jahren und somit dicht an dem im Annual Report der FIGO angegebenen mittleren 52,2 Jahren<sup>4</sup>. Für die FIGO I Patientinnen lag im vorliegenden Kollektiv der Altersmedian bei 47 Jahren (Annual Report: Mittelwert je nach Stadium 44,4 – 49 Jahre), für die FIGO II Patientinnen bei 49 Jahren (Annual Report Mittelwert 53,8-55,8 Jahre), für die FIGO III Patientinnen bei 62 Jahren (Annual Report Mittelwert 56,2-62,8 Jahre) und für die FIGO IV Patientinnen bei 65 Jahren (Annual Report 58,3- 60,5 Jahre)<sup>4</sup>. Die geringfügigen Abweichungen in unserem Kollektiv von den im Annual Report angegebenen Durchschnittsaltern sind sicherlich durch die geringe Fallzahl bedingt. Deutlich wird, daß sich der Median des Alters und der 50% Streubereich um den Median in unserem Kollektiv mit höherem Tumorstadium zu einem höheren Alter hin verschiebt, worin zum Ausdruck kommt, daß von der mutmaßlichen Entstehung des Karzinoms bis zur Diagnose bei den höheren Stadien bereits mehr Zeit verfließen ist (*Abbildung 2*).

Die Therapie des Zervixkarzinoms ist stadienabhängig (*Tabelle 1*) und besteht in erster Linie aus den Optionen Operation und Bestrahlung bzw. Radiochemotherapie<sup>128</sup>. Während bei allen Stadien eine Bestrahlung erfolgen kann (perkutan oder durch Afterloading, evtl. auch Kombination), sind der chirurgischen Therapie im allgemeinen nur die frühen Stadien bis zum FIGO IIa, maximal FIGO IIb zugänglich<sup>128</sup>. Dabei finden im wesentlichen die abdominale Hysterektomie nach Wertheim mit pelviner und/oder paraaortaler Lymphonodektomie oder die vaginale Hysterektomie nach Schauta in Verbindung mit einer laparoskopischen abdominalen Lymphadenektomie Verwendung<sup>134</sup>, wobei ersteres Verfahren das verbreitetere ist.

## Diskussion

Abhängig vom Ausmaß der Resektion der Parametrien kann die OP Technik nach Piver noch weiter unterteilt werden<sup>135</sup>. Mikrokarzinome können eventuell auch fertilitätserhaltend operiert werden, wobei im Stadium FIGO 1A1 eine Konisation (später nach erfülltem Kinderwunsch sollte eine Hysterektomie erfolgen) erfolgt, im Stadium IA2 oder IB1 eine sogenannte Trachelektomie, d.h. eine Blockresektion der Zervix mit Teilen der Parametrien unter Erhalt des inneren Muttermundes, ggf. mit begleitender pelviner und parametraner Lymphonodektomie im Einzelfall erwogen werden kann<sup>136</sup>.

Bei Vorliegen von R1 Resektion, positiven pelvinen Lymphknoten (bei mehr als 4, Kapseldurchbruch, positiven Iliaca communis Lymphknoten obligat), Blut oder Lymphgefäßeinbruch (V1,L1), Adeno- oder Klarzellkarzinom, parametraner Infiltration, Grading 3, Tumordurchmesser über 4 cm und endometrialer Stromainvasion ist eine postoperative adjuvante Strahlen oder Radiochemotherapie indiziert; ebenso wie bei den höheren Stadien ab IIB ist hier die simultane cisplatinhaltige Radiochemotherapie der alleinigen Bestrahlung überlegen<sup>137, 138, 139, 140, 141</sup>.

Eine Chemotherapie kann mit palliativer Zielsetzung, bei fortgeschrittenen Karzinomen, bei Rezidiven und Metastasen oder auch zum Downstaging in Erwägung gezogen werden<sup>142</sup>.

Für postoperative Lokalrezidive gibt es die Möglichkeit einer Strahlentherapie in Verbindung mit einer Chemotherapie<sup>143</sup>, ansonsten besteht neben der Metastasen- bzw. Rezidivchirurgie auch die Möglichkeit einer palliativen Chemotherapie.

Das stadienabhängige 5-Jahresüberleben lag in unserem Kollektiv (*Tabelle 8*) für die FIGO I Patientinnen bei 85,1% (Annual Report 80-95%), für die FIGO II Patientinnen bei 63,6 % (Annual Report 63,5-66,3%), für die FIGO III Patientinnen bei 13% ( Annual Report 33,3-38,7%) und für die FIGO IV Patientinnen bei 37,5% (Annual Report 9,4-17,1%). Während also die relativ großen Teilkollektive der FIGO I und II Patientinnen recht gut im internationalen Durchschnitt liegen, kommt es bei den kleineren Kollektiven der FIGO III und IV Patientinnen zu deutlichen Abweichungen, welche bei den FIGO IV Patientinnen in der Fallzahl begründet sein dürften. Das 5-Jahresüberleben des Gesamtkollektivs dieser Untersuchung lag bei

## Diskussion

60,4% gegenüber im Annual Report angegebenen 65,4%, worin sich auch das relativ schlechte Abschneiden der FIGO III Patientinnen widerspiegelt.

Das 5-Jahresüberleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus lag bei den operierten Patientinnen im untersuchten Kollektiv bei 93,6% (Annual Report 88,4%) für die nodal-negativen und 64,3% (Annual Report 57,1%) für die nodal positiven Patientinnen (*Tabelle 11*). Hier liegt das untersuchte Kollektiv offensichtlich etwas besser als der internationale Durchschnitt. Betrachtet man das Überleben in Abhängigkeit vom festgestellten Lymphknotenstatus (3.1.4), so bestätigt sich, daß ein positiver Lymphknotenstatus ein eigenständiger Prognosefaktor ist.

Betrachtet man das 5-Jahresüberleben in Abhängigkeit von der erfolgten Primärtherapie (*Tabelle 10*), so überlebten im untersuchten Kollektiv von den primär bestrahlten Patientinnen 21,4% (Annual Report 55,3%), von den primär operierten 87,9% (Annual Report 76,2 - 90,3% je nach Risikofaktoren). Während die primär operativ behandelten Patienten hier wieder relativ gut abschneiden, liegen die primär strahlentherapierten Patienten wieder deutlich unter dem internationalen Durchschnitt. Möglicherweise drückt sich hier eine Negativselektion der an einer Universitätsklinik behandelten Patientinnen aus.

Auffällig am untersuchten Kollektiv ist, daß die relativ wenigen gut differenzierten Karzinome alle frühen Tumorstadien entsprechen (3 FIGO 1a1, 1 FIGO 1a2, 1 FIGO1). Der Grund dafür ist vermutlich darin zu suchen, daß die Tumore im Laufe ihres Wachstums zu einer weiteren Entdifferenzierung neigen, da entdifferenzierte Klone schneller wachsen und somit über einen Selektionsvorteil verfügen. Aus demselben Grund lag das Durchschnittsalter der mäßig bzw. schlecht differenzierten Karzinome höher (2.3.3). Hinsichtlich des Überlebens lagen die schlecht differenzierten etwas über den mäßig differenzierten Karzinomen (3.1.2); eine mögliche Erklärung wäre, daß die schlecht differenzierten Karzinome besser auf die (Strahlen-)Therapie ansprechen. Undifferenzierte Gewebe sind für radioaktive Strahlung wesentlich empfindlicher als weiter differenzierte. Betrachtet man das Überleben in Abhängigkeit von den FIGO-Stadien, so fällt ins Auge, daß es innerhalb

der beiden Gruppen FIGO-Stadium I und II sowie III und IV keine großen Unterschiede gibt (3.1.1). Dazu ist zu sagen, daß die FIGO-Stadien bis IIA ja noch weitestgehend operiert werden; allgemein kann zugrunde gelegt werden, daß der Therapieansatz hier noch stärker kurativ ist als in den Stadien III und IV, wo eine immer stärkere palliative Komponente hinzukommt. Dieser Erklärungsansatz wird auch durch die Überlebenskurven in Abhängigkeit von den erfolgten Therapien gestützt (3.1.3). Die geringen Unterschiede zwischen FIGO-Stadium III und IV sind zudem sicherlich durch die geringen Fallzahlen und dadurch bedingte Unsicherheiten in der Aussage beeinflusst; trotz fortgeschrittenen Karzinoms kam es auch bei 3 der 8 FIGO-IV-Karzinome zur Heilung unter Strahlentherapie.

## 4.2 CR-1

Im normalen Plattenepithel der Zervix fand sich CR-1 vor allem im Bereich der Endozervix in den basalen Epithelanteilen mit einem zytoplasmatischen Muster, welches sich zur Epitheloberfläche hin zusehends in Richtung eines membranartigen Musters verschob (3.2.1.1). Auf die Tendenz von CR-1 zur Assoziation mit Membranen ist früher hingewiesen worden<sup>67</sup>. Interessanterweise ist CR-1 bislang beim erwachsenen Menschen insbesondere auch in prämaligen, entzündlichen oder malignen Veränderungen stärker exprimiert als im Normalgewebe nachgewiesen worden<sup>55</sup>. Der Nachweis im Bereich der Endozervix und damit angrenzend an die Transformationszone, welche der bevorzugte Entstehungsort von Karzinomen ist, unterstreicht diese Daten. Das teilweise membranartige Färbemuster passt gut zu der Tatsache, dass für CR-1 sowohl membrangebundene als auch sezernierte Formen beschrieben worden sind<sup>144</sup>. Der Übergang der basal noch zytoplasmatischen Färbung in die Membranfärbung der höheren Schichten ließe sich auch so erklären, daß CR-1 in den basalen Zellschichten noch im Zytoplasma produziert wird und sich dann präsekretorisch in der Membran anreichert. Sobald dann in einem weiteren Differenzierungsstadium die Produktion im Zytoplasma schwächer wird, wandern die dort vorhandenen Reste in die Zellmembran und verursachen dort ein zunehmendes Membranfärbungsmuster. Ebenfalls teilweise membranartig war das in den CIN I-II nachgewiesene Färbemuster; der Nachweis

## Diskussion

hier ist möglicherweise ein Hinweis, daß es Interaktionen zwischen der CR-1-Expression und einer HPV-Infektion gibt. In den fortgeschrittenen Dysplasien (CIN III, 3.2.1.2) als auch im Karzinom (3.2.1.3) fand sich CR-1 zytoplasmatisch exprimiert. Im Karzinom wurde CR-1 dabei gegenüber CIN III und Normalgewebe wesentlich stärker exprimiert (*Abbildung 8*). Die zu einer malignen Transformation der Zelle führenden Mechanismen scheinen also mit einer Veränderung der CR-1-Expression sowie des Expressionsmusters einherzugehen. Die CR-1-Expression stand jedoch in keinem Zusammenhang zu klinischen Parametern wie Tumorstadium, Lymphknotenstatus oder Grading (3.2.1.5) oder dem Überleben der Patientinnen (3.2.1.5.4).

Eine Arbeitsgruppe, welche die mRNA von Liganden der EGF Familie und auch die von CR-1 im endometrialen Gewebe untersuchte, konnte CR-1 mRNA nicht im Epithel der Ektozervix, wohl aber in tieferen Anteilen der Portio, welche von der Arbeitsgruppe als „Stroma“ definiert wurden, nachweisen<sup>145</sup>. Dies deckt sich insofern mit den Ergebnissen dieser Arbeit, als hier ebenfalls CR-1 nicht im normalen Epithel der Ektozervix exprimiert gefunden wurde, wohl aber dagegen im Plattenepithel der Endozervix, also laut Beschreibung der Materialgewinnung in dem besagten Artikel dem als „Stroma“ definierten Teil.

Ertoy et al (2000) berichteten in ihrer Studie über eine Korrelation der CR-1-Expression zu Tumorgroße, Lymphgefäßinvasion und Parametrienbeteiligung. Auch in Lymphknotenmetastasen war in dieser Untersuchung CR-1 verstärkt nachweisbar. Bezüglich Rezidivhäufigkeit, Überleben und Fernmetastasen sahen sie eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose bei CR-1-Expression, diese waren jedoch nicht signifikant. In einigen Fällen fanden sie CR-1 insbesondere an der Invasionsfront und in tieferen Tumoranteilen exprimiert<sup>91</sup>. In der vorliegenden Untersuchung fand sich ebenfalls eine signifikant stärkere Expression von CR-1 im Karzinom verglichen mit Normalgewebe und CIN, was gut mit einer erhöhten Migrations- und Proliferationsfähigkeit der CR-1 exprimierenden Zellen zusammenpassen würde (*Abbildung 8*). Allerdings blieb CR-1 auch in der vorliegenden Untersuchung ohne signifikanten Einfluß auf die Prognose (3.2.1.5.4). Auch fand sich kein erhöhtes Auftreten von Lymphknotenmetastasen innerhalb der CR-1 positiven Gruppe

## Diskussion

(3.2.1.5.3). Wenngleich an einzelnen Präparaten auch eine stärkere CR-1-Expression in der Invasionsfront gefunden werden konnte, war dies nicht das vorherrschende Färbemuster (3.2.1.3).

Die in dieser Untersuchung Cripto exprimierende Transformationszone, also die Region des sekundären Plattenepithels, ist auch Zielregion der mit der Karzinomentstehung verbundenen Hochrisiko-HPV-Untertypen. HPV-Viren sind kleine DNA-Viren, welche Plattenepithelzellen befallen und an der Zervix uteri je nach Untertyp zu verschiedenen gutartigen oder bösartigen Neoplasien führen können. Zu den Untertypen mit einem niedrigen onkogenen Potential, welche eher mit gutartigen Läsionen wie Condylomata acuminata, Condylomata plana und Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions (CIN I) in Verbindung gebracht werden gehören insbesondere die HPV-Subtypen 6 und 11, aber auch Typ 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 nach einer jüngeren epidemiologischen Untersuchung<sup>5</sup>. Dagegen lassen sich die HPV-Subtypen mit einem hohen onkogenen Potential wie insbesondere Typ 16 und 18, aber auch nach einer neueren Untersuchung die früher mit mittlerem onkogenen Potential eingestuft Typen 31, 33, 35 sowie 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 besonders in High Grade Squamous Intraepithelial Lesions (CIN II-III) und invasiven Zervixkarzinomen nachweisen<sup>5</sup>. Zielzelle der Infektion ist der basale Keratinozyt; HPV-Viren mit hohem onkogenen Potential scheinen sich besonders gegen die Keratinozyten der Transformationszone zu richten, wo auch die meisten Zervixkarzinome entstehen. Für gewöhnlich liegt die virale DNA dabei episomal, das heißt als extrachromosomale plasmidförmige DNA vor; besonders bei den Hochrisikotypen kommt es jedoch auch zu einer Integration der viralen DNA in das Genom des Wirtes, wobei die virale DNA fast immer fragmentiert integriert wird und es zum Verlust von Regulationsgenen kommt (Abbildung 42). Insgesamt läßt sich HPV-DNA in über 90% aller Zervixkarzinome nachweisen<sup>5</sup>. Die Empfindlichkeit für die virale Infektion scheint HLA-abhängig zu sein<sup>9</sup>. Je nach Immunlage des Wirtes kann es zu latenten oder aktiven Infektionen kommen. Bei der Progression der Infektion zu einem invasiven Karzinom scheint dabei auch eine Downregulation der MHC I Moleküle zu erfolgen, wodurch die Zellen möglicherweise dem Immunsystem des Wirtes entgehen können<sup>146</sup>.

Karzinomrisiko	Bevorzugter CIN-Typ	HPV-Typ
Geringes Risiko	CIN I	6,11,42,43,44
Mittleres Risiko	CIN II-III, Karzinom	31,33,35,51,52,58
Hohes Risiko	Karzinom und CIN III	16, 18, 45, 56

*Tabelle 16: Überblick über das Karzinomrisiko bei verschiedenen HPV-Viren*

Im Genom der Viren unterscheidet man regulatorische Einheiten, Abschnitte, die früh exprimiert werden (**Early**, E 1-E7) und die den Zellstoffwechsel entsprechend der Bedürfnisse des Virus transformieren und späte Bereiche (**Late**, L1 und L2), welche für die Hülle des freien Virus kodieren und deren Expression an eine terminale Differenzierung der Epithelzellen gebunden ist, so daß sie nur in den oberen Epithelschichten erfolgt. Im folgenden soll näher auf die Genprodukte E1-E7 eingegangen werden, da ihre Expression für die Transformation der Wirtszelle entscheidend zu sein scheint. Die Gene E 1 und E 2 steuern die Virusgenomreplikation und Transkriptionskontrolle. E 4 scheint das Intermediärfilamentnetzwerk der Zelle in den oberen Epithelschichten zu stören und so die Virusfreisetzung zu erleichtern<sup>147</sup>. Das E 5 Gen kodiert für ein hydrophobes Polypeptid, welches sich in die Zellmembran einlagert und dort mit anderen membrangebundenen Proteinen wie z.B. dem EGF-Rezeptor interagiert und deren Funktion moduliert<sup>148</sup>. Häufig wird es jedoch bei der Integration der Virus-DNA in das Zellgenom deletiert. E 6 und E 7, welche als entscheidend für die Immortalisierung der Zielzelle und die subsequente Karzinomentstehung angesehen werden, nehmen Einfluß auf eine Anzahl an Steuerungsmechanismen für die Progression des Zellzyklus und werden insbesondere durch E 2 reguliert; durch die häufige Deletion von E 2 bei der Integration der Virus-DNA in die des Wirtes kann es dann zu einer unkontrollierten Proliferation kommen. Ein wichtiger Mechanismus dazu ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F und damit die Aktivierung zahlreicher von

## Diskussion

diesem anhängiger Gene, bezüglich dessen E 6 und E 7 synergistisch wirken. E2F wird durch an ihn gebundenes Rb-Protein inaktiviert (Abbildung 43); E 7 bindet sich nun an Rb und vermag so E2F freizusetzen und zu aktivieren. E 6 wiederum bindet sich an p53 und bewirkt so den schnellen Abbau dieses Proteins. Dadurch wird die Aktivierung p53 abhängiger Gene wie des p21waf-1, eines Cyclinkinaseinhibitors, verhindert. Es kommt damit zu einem Anstieg der aktiven Cyclinkinasen, welche wiederum Rb inhibieren und damit E2F freisetzen. Weitere Effekte von E 6 und E 7 sind ein Anstieg der Phosphorylierung des Replikationsfaktors PCNA durch cyclinabhängige Kinasen<sup>149, 150</sup> sowie via eines wohl zumindest zum Teil p53 unabhängigen Pathways die Verhinderung der Einleitung der Apoptose<sup>151</sup> und die Aktivierung einer Telomerase<sup>152</sup>; diese wiederum ist wichtig für die Synthese von telomeren Repeat-Sequenzen, welche für die Immortalization der Zelle wichtig sind und charakteristisch für viele Tumoren. E 7 wiederum scheint auch durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der AP-1/ATF Familie die Transkription aktivieren zu können<sup>153</sup>. Kürzlich konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das E7 Genprodukt den inhibitorischen Einfluß von TGF $\beta$  auf DNA Synthese in Zervixzellen durch Interaktion mit den Second Messenger Smad 2, 3 und 4 Proteinen, namentlich durch Inhibition der Smad 3 DNA Bindung, blockieren kann und somit einen weiteren proliferationsinduzierenden Einfluß haben kann<sup>154</sup>.

Smad-2, -3 und -4 Proteine besitzen in so fern eine Bedeutung für CR-1, als sie als Second Messenger aktiviert werden, nachdem O-fucosyliertes CR-1 an den Alk4 Rezeptor gebunden hat und im Komplex mit diesem einen Kofaktor für die Aktivierung des ActIIb Rezeptors durch das Nodal Protein bildet<sup>65, 74, 79</sup>. Neben dieser Nodal-vermittelten Aktivierung des ActIIb-Rezeptors konnte aber auch gezeigt werden, daß CR-1 durch Komplexbildung mit dem ActII/IIb-Rezeptoren und Activin die Bindung eines Activin Typ-1-Rezeptors wie Alk4 an diesen Komplex verhindert<sup>76</sup>. Durch diese fehlende Bindung eines Typ 1 Rezeptors an den Rezeptorkomplex wird die nachfolgende Aktivierung eines Second Messenger Pathways nach Activinbindung verhindert. Activin hat auf viele Tumorzellen eine proliferationshemmende und zum Teil auch apoptoseregulierende Funktion und wirkt damit der Karzinogenese entgegen<sup>155</sup>. So lassen sich Mutationen in Activinrezeptoren gehäuft in Colon- und Pankreaskarzinomen nachweisen<sup>156</sup>. Durch Inhibition dieses karzinogenesehemmenden Einflusses könnte CR-1 ebenfalls die



## Diskussion

maligne Transformation vorantreiben. Activin als auch seine Rezeptoren ActII/IIb werden von Zervixkarzinomen exprimiert<sup>157</sup>.

Ebert et al (1999) konnten an HPV 16 und 6 E 6 und E 7 transformierten Keratinozyten zeigen, daß durch die eingeschleusten E 6 und E 7 Gene die CR-1-Expression der Zellen angeschaltet wird<sup>158</sup>. Da E 6 und E 7 insbesondere den Eintritt der Zelle in die S-Phase im Rahmen des Zellzyklus regeln, könnte dies ein Hinweis sein, daß CR-1 möglicherweise eine Funktion bei der Steuerung des Zellzyklus haben könnte. Da das E7 Genprodukt aber auch durch Smad3 Bindung einen Second-Messenger Pathway von CR-1 blockiert, könnte die verstärkte CR-1-Expression nach Transfektion mit dem E7 Gen möglicherweise aber auch eine Reaktion der Zelle auf die Blockade dieses Second Messenger Pathways sein.

Kritisch muß gesehen werden, dass in der vorliegenden Arbeit die Aspekte einer HPV-Infektion bzw. einer vorliegenden Subtypisierung nicht untersucht wurden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß CR-1 imstande ist, den erbB-4 Rezeptor indirekt zu aktivieren<sup>81</sup>, d.h. einen Rezeptor der EGF-R Familie, der sowohl in den basalen Anteilen des normalen Epithels als auch in der CIN und im Plattenepithelkarzinom exprimiert wird; im Plattenepithelkarzinom konnte dabei eine Koexpression des erbB-4 Rezeptors mit dem EGF-Rezeptor (erbB-1) aufgezeigt werden<sup>159</sup>. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass die Expression des HPV 16

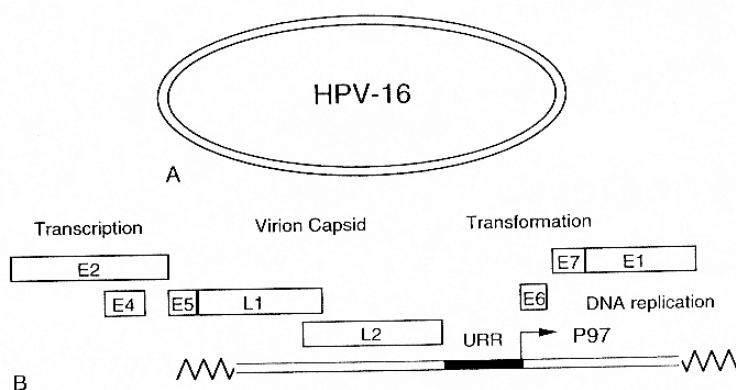


Abbildung 42: Genom von HPV-Viren. A: Normalerweise liegt die HPV-DNA episomal vor, d.h. als kreisförmige, nicht in das Wirtsgenom integrierte DNA. B: Kommt es jedoch zur Integration in die Wirts-DNA wie häufiger bei Hochrisiko-HPV-Typen, so deletieren dabei oft die Bereiche für E 1, E 2, E 4 sowie E 5, wodurch die Regulation der Gene für E 6 und E 7 durch E 2 entfällt. URR steht für Upstream Regulatory Region und hat ebenfalls eine Steuerfunktion.<sup>160</sup>

## Diskussion

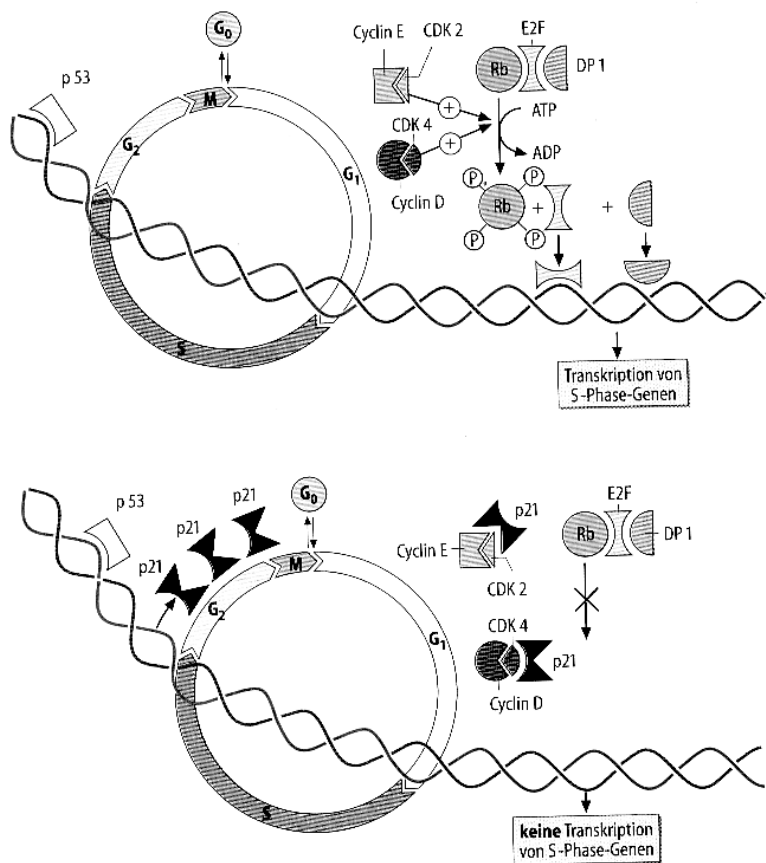


Abbildung 43: Dargestellt ist die Funktion von p53 und Rb, der Hauptangriffspunkte der E 6 und E 7 HPV-Genprodukte bei der Kontrolle des Zellzyklus. Im oberen Teil ist gezeigt, wie Rb mit E2F und einem weiteren Protein, DP 1, einen Komplex bildet. Durch Komplexe von Cyclinen (E und D) kann Rb phosphoryliert werden, wodurch E2F freigesetzt wird und die Transkription von S-Phase Genen beginnen kann. Im unteren Teil der Zeichnung ist dann die Funktion von p53 wiedergegeben, eines sogenannten Tumorsuppressorgenes, welches z.B. bei DNA Schädigungen freigesetzt wird, um eine Replikation der Zelle zu verhindern. p53 promotet die Expression von p21, welches als Cyclin-dependent-Kinase Inhibitor wirkt, indem es Komplexe mit Cyclin E und D und den entsprechenden Cyclin-dependent-Kinasen bildet und diese somit von der Phosphorylierung von Rb abhält; dadurch kann E2F nicht freigesetzt werden und es erfolgt keine Transkription von S-Phase Genen<sup>175</sup>. Das E 7 Genprodukt der HPV-Viren kann E2F durch Bindung an Rb freisetzen, das E 6 Genprodukt bindet sich an p53 und bewirkt einen schnelleren Abbau desselben und unterstützt dadurch die Transkription von S-Phase Genen.

Genproduktes bei Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri mit einer Expression von erbB-1 oder erbB-4 einhergeht<sup>161</sup>. Über die indirekte Aktivierung von erbB-4 kann CR-1 zu einer Aktivierung des ref/ras/MEK/MAPK Pathways und damit via Transkriptionsfaktoren zu einem Proliferationsreiz für die Zelle führen<sup>162, 81</sup>. Andererseits konnte in Kulturen von menschlichen Zervixkarzinomzelllinien nachgewiesen werden, daß CR-1 auch über einen PI-3 Kinase/AKT/GSK3 $\beta$  abhängigen Pathway in der Lage ist, antiapoptotisch zu wirken<sup>83</sup>. Auch in Zellkulturen von murinen Mammaepithelzelllinien (Eph4, NmuMG, TAC-2) ließ sich durch Transfektion mit CR-1 eine erhöhte Proliferationsrate und Migrationsfähigkeit erzielen<sup>163</sup>; diese Umwandlung von epithelialen Zellen in eher mesenchymal anmutende Zellformen (die sogenannte „epithelial to mesenchym transition“) wird in

## Diskussion

der embryonalen Organogenese wie auch in Prozessen der Wundheilung angetroffen und ist beim Erwachsenen eng mit der Metastasierung von epithelialen Tumoren verbunden, wobei ja auch eine erhöhte Migrationsfähigkeit und Proliferation entscheidend sind. Die Transfektion der besagten Zelllinien ging mit einer erhöhten Phosphorylierungsrate von MAPK und GSK3  $\beta$  als Bestandteilen der Second-Messenger Kaskade einher; die nachfolgende Phosphorylierung von beta-Catenin scheint dabei einer der Effektorwege zur Herabsetzung der Zell-Zell-Adhäsion zu sein<sup>164</sup>.

In der Aufklärung des Mechanismus der Aktivierung des MAPK- und AKT-Pathways durch CR-1 ist man kürzlich ein bedeutendes Stück vorangekommen, indem gezeigt werden konnte, dass CR-1 nach Bindung an das membranständige Heparansulfatproteoglykan Glypikan-1 die cytoplasmatische Proteinkinase c-Src zu aktivieren und damit den MAPK- und den AKT- Pathway zu triggern vermag<sup>82</sup>. Dabei handelt es sich offensichtlich um einen bisher unbekanntes Nodal/ALK4-unabhängigen Pathway. c-Src als intrazelluläre Proteinkinase ist an der Steuerung des Zytoskelets und der Zell-Matrix-Interaktion mittels Adhäsionsproteinen beteiligt und wird insbesondere auch mit einer erhöhten Migrationsfähigkeit von Tumorzellen in Verbindung gebracht<sup>165</sup>.

In einer weiteren menschlichen Zervixkarzinomzelllinie (Caski) ließ sich durch CR-1 die die Vimentinexpression und die Migrationsfähigkeit der Zellen steigern<sup>166</sup>. Im Karzinom ließ Vimentin sich in Zellclustern und in versprengt liegenden Zellen nachweisen, wobei es besonders in invasiven Grenzzonen des Karzinoms exprimiert wird<sup>167</sup>.

Hypothetisch denkbar erschiene beispielsweise, dass eine durch HPV-vermittelte CR-1-Expression durch Steigerung der Migrations- und Proliferationsfähigkeit zur Karzinogenese beitragen könnte. Interessanterweise scheint die Überexpression von CR-1 in Mammakarzinomen ein Frühmarker der malignen Transformation zu sein, ohne dass sich jedoch eine Korrelation zu klinischen Prognosefaktoren ergeben hätte<sup>86, 168, 169</sup>.

Auffällig ist aber auch, dass die CR-1 codierende Region Chromosom 3p21 ein Bereich ist, der bei fortgeschrittenen Zervixkarzinomen oftmals Veränderungen aufweist<sup>24</sup>. Möglicherweise drückt sich in der stärkeren Expression von CR-1 im

## Diskussion

Karzinom eine Schädigung in für diesen Genabschnitt bestimmenden Kontrollsequenzen aus.

Durch seine Funktion in den MAPK, AKT, c-Src und als Effektoren von Nodal und Aktivin SMAD vermittelten Pathways erscheint es einfach vorstellbar, dass CR-1 eine Schlüsselrolle beim Übergang von der Dysplasie zum Karzinom an der Cervix uteri einnimmt, beispielsweise dadurch, dass nach HPV-vermittelter SMAD-Blockade die CR-1-Expression hochgeregelt werden würde und es dann zu einer verstärkten c-Src-, MAPK- und AKT-Pathway Aktivierung kommen könnte.

### 4.3 TGF $\alpha$

TGF $\alpha$  ist ein Ligand der EGF Superfamilie, der an den EGF-Rezeptor (erbB-1) bindet und diesen aktiviert<sup>92</sup>. Der EGF Rezeptor findet sich im normalen Zervixepithel in den basalen Epithelschichten, wird im CIN verstärkt exprimiert und in 70-80% der Plattenepithelkarzinome der Zervix überexprimiert<sup>159, 170, 171, 172</sup>.

In dieser Untersuchung fand sich TGF $\alpha$  im normalen Epithel nur schwach (3.2.2.1), stärker dagegen in CIN I bis II exprimiert (3.2.2.2). Im CIN III fand sich TGF $\alpha$  nur schwach ausgeprägt (3.2.2.2), im Karzinom (3.2.1.3) fand sich jedoch eine wesentlich stärkere Expression als im Normalgewebe und CIN III (3.2.2.4). Dabei schien die TGF $\alpha$ -Expression keine Auswirkung auf den Lymphknotenstatus zu haben. Bezüglich Grading und FIGO- Stadien gab es eine Tendenz zur stärkeren TGF $\alpha$ -Expression bei höheren FIGO- Stadien (3.2.2.5) und einen höheren Anteil TGF $\alpha$  positiver Karzinome in besser differenzierten Karzinomen (*Abbildung 18*). Eine TGF $\alpha$ -Expression war bei den lediglich strahlentherapeutisch behandelten Patientinnen mit einem schlechteren Überleben signifikant korreliert, nicht jedoch bei den operativ behandelten Patientinnen und über das Gesamtkollektiv betrachtet (3.2.2.5.4).

Konishi et al (1994) fanden bei ihren Untersuchungen der TGF $\alpha$ -Expression an normalen Zervix sowie benignen und malignen Läsionen der Zervix uteri ebenfalls TGF $\alpha$  im normalen Epithel lediglich in Reservezellen und metaplastischen Zellen der

## Diskussion

Transformationszone, in einem Drittel der CIN I-II Läsionen, teilweise in flachen Kondylomen schwach und in den CIN III aber überhaupt nicht ausgeprägt. In wesentlich stärkerem Maß fand sich TGF $\alpha$  in 48,6% der Plattenepithelkarzinome der Zervix Uteri, wobei sich eine stärkere Anfärbung in klinisch weiter fortgeschrittenen Karzinomen fand<sup>101</sup>. Stroma und endocervikale Mukosazellen waren negativ für TGF $\alpha$ . Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zum Verhornungsgrad der Karzinome.

Die Färbeergebnisse der vorliegenden Untersuchung entsprechen soweit den von Konishi gefundenen. Auch hier fand sich eine Zunahme der TGF $\alpha$  positiven Karzinome mit höherem klinischen Stadium. Diese Untersuchung zeigte daneben eine Tendenz zu einer stärkeren Positivität mit höherer Differenzierung, die aber nicht signifikant war. Darüberhinaus konnte in Ergänzung zu Konishis Ergebnissen aufgezeigt werden, daß der mit einer TGF $\alpha$ -Expression verbundene Wachstumsvorteil zu einer schlechteren Prognose der TGF $\alpha$  positiven Karzinome führt.

Ueda et al (1997) fanden an Zellkulturexperimenten an der Zervixkarzinomzelllinie SKG-IIIB, daß TGF $\alpha$  in der Lage ist, dosisabhängig über die Stimulation der Expression von Matrixmetalloproteinasen das invasive und metastatische Potential dieser Zelllinie zu vergrößern<sup>59</sup>. Der Abbau der Interzellulärmatrix und von Basalmembranen ist entscheidend für das invasive und metastatische Potential von Tumorzellen. In der vorliegenden Untersuchung, welche allerdings durch die geringe Menge metastasierter Karzinome nur eingeschränkt aussagefähig ist, war die Expression von TGF $\alpha$  jedoch nicht in signifikanter Weise mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen verknüpft. Auch konnte in dem operierten Kollektiv kein signifikanter Einfluß von TGF $\alpha$  auf das Überleben festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass eine in vitro nachweisbare erhöhte Migrationsfähigkeit TGF $\alpha$  positiver Zellen in vivo keine Relevanz hat.

Pillai et al (1998) untersuchten die Relevanz einer TGF $\alpha$ -Expression für das Auftreten von Rezidiven bei 152 strahlentherapeutisch behandelten FIGO IIB und FIGO III Karzinompatientinnen und fand dabei eine signifikant bessere Prognose bei

## Diskussion

den Patientinnen, deren Tumor prätherapeutisch TGF $\alpha$  exprimierte<sup>173</sup>. Dagegen war die Expression von EGF und noch stärker EGF-R, an den ja TGF $\alpha$  ebenfalls bindet, signifikant höher in der Gruppe mit Rezidiven.

TGF $\alpha$  scheint jedoch auch wesentlich für die Steuerung des Zellzyklus zu sein, da durch TGF $\alpha$  die Cyclin D 1 Produktion der Zelle gesteuert werden kann und somit der für die Zellteilung wichtige Übergang der Zelle von der G0 in die G1 Phase des Zellzyklus<sup>174</sup>. Als sogenannter Kompetenzfaktor für den Übergang der Zelle in die G1 Phase muß TGF $\alpha$  eine Zeitlang auf die Zelle einwirken; in einer späteren Phase von G1 müssen diese dann nach und nach durch sogenannte Progressionsfaktoren ergänzt und ersetzt werden<sup>175</sup>. Dies macht verständlich, daß es bei Tumoren, die sowohl TGF $\alpha$  sezernieren als auch über seinen Rezeptor erbB-1 (EGF-R) verfügen, zu einer Ausbildung eines autokrinen Loops und somit zu einem Wachstumsvorteil kommen kann. Ein solcher Loop ist bereits für verschiedene Tumoren beschrieben wurden<sup>100, 176, 177, 178</sup>. Dabei war die Expression von erbB-1 und TGF $\alpha$  bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge und Blasenkarzinomen mit einer schlechteren Prognose korreliert<sup>179, 180, 99</sup>. Interessanterweise fand sich im Blasenkarzinom auch eine stärkere Ausprägung von TGF $\alpha$  in besser differenzierteren Karzinomen<sup>176</sup>, wie sie sich auch in unserem Kollektiv andeutet.

Auch in dem untersuchten Kollektiv scheint die Ausprägung von TGF $\alpha$  zu einem schnelleren Wachstum der Tumoren und somit einer schlechteren Prognose beizutragen, da die Prognose von nicht mehr operierten sondern strahlentherapierten Patientinnen, deren Tumoren TGF $\alpha$  exprimierten signifikant schlechter war. Dieser Wachstumsvorteil könnte auch die Tendenz erklären, weshalb der Anteil TGF $\alpha$  positiver Karzinome in den höheren FIGO-Stadien zunimmt, da es sich dabei auch um einen Selektionsvorteil handelt. Allerdings stehen diese Ergebnisse in Widerspruch zu denen von Pillai et al, welche ja eine geringere Rate von Rezidiven innerhalb der ersten 16 Monate bei Patientinnen mit TGF $\alpha$  exprimierenden Tumoren gefunden haben<sup>173</sup>. Kritisch muß man anmerken, dass Pillai et al keine Aufschlüsselung in FIGO IIB und III Patientinnen geben. Ein weiterer Unterschied könnte in den in dieser Untersuchung längeren Nachbeobachtungszeiträumen und den unterschiedlichen Endpunkten (Rezidiv bei Pillai et al, in dieser Untersuchung Überleben) liegen. Letztendlich kann nicht

ausgeschlossen werden, dass sich in den unterschiedlichen Ergebnissen die mit einer relativ kleinen Fallzahl verbundene Unsicherheit ausdrückt.

Straight et al (1993) haben zeigen können, daß durch die über 90 % der Zervixkarzinome nachzuweisenden HPV-Viren durch Beeinflussung des Abbaus und des Recyclings des EGF Rezeptors in infizierten Zellen die Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche erhöhen können<sup>181</sup>. Eine weitere Arbeitsgruppe fand an 40 HPV 16 positiven cervikalen intraepithelialen Neoplasien eine Assoziation des HPV 16 E5 Genproduktes mit der Expression von erbB-1 und erbB-4<sup>161</sup>. Möglicherweise bietet ein autokriner Loop ein weiteres Werkzeug zur Ausbreitung der HPV-Viren.

### **4.4 erbB-2**

In dieser Untersuchung fand sich erbB-2 im normalen Epithel nur in geringen Mengen (3.2.3.1), etwas verstärkt in leichten Dysplasien und Koilozyten (3.2.3.2). Im Karzinom (3.2.3.3) fand sich der Rezeptor insbesondere ebenfalls um Verhornungspierlen herum und in clusterhafter Anordnung.

Die Expression von erbB-2 in östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinien ist östrogenabhängig, da die erbB-2 Transkription durch einen östrogenabhängigen Promoter inhibiert werden kann<sup>182</sup>. In Zervixkarzinomen lassen sich in ca. 40-80% Östrogen oder Progesteronrezeptoren oder beide nachweisen, wobei diese unabhängig vom prä- oder postmenopausalem Status der Patientinnen zu sein scheinen und die Östrogenrezeptoren im Karzinom weniger als im normalen Epithel exprimiert werden<sup>183, 184</sup>. Die Expression von Östrogenrezeptoren im Epithel der Zervix lässt sich in normalem Plattenepithel in den basalen Schichten nachweisen<sup>185</sup>. Eine Arbeitsgruppe fand Progesteronrezeptoren in neoplastische Veränderungen im Gegensatz zu Östrogenrezeptoren stärker ausgeprägt<sup>186</sup>. Im Mammaepithel findet sich eine stärkere Expression von erbB-1 und erbB-2 während der Lutealphase verglichen mit der folliculären Phase des Zyklus<sup>187</sup>. Dies lässt es möglich erscheinen, dass die Expression im Normalgewebe des Zervikalkanals zyklusabhängig ist. Bedeutsam könnte dies vor allem für die Kontrollgruppen-patientinnen und CIN III Patientinnen sein, da diese bezüglich des Alters weiter im prämenopausalem Bereich liegen. Für den EGF Rezeptor ist eine verstärkte Expression nach

## Diskussion

Östrogenstimulation an einer Zervixkarzinomzelllinie beschrieben worden<sup>188</sup>. Am vorliegenden Material kann dazu keine Aussage getroffen werden, da weder Hormonrezeptoren regelhaft bestimmt wurden noch der Zyklustag der Patientinnen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme festgehalten wurde.

Golijow et al (2001) fanden in einer Untersuchung an 84 Abstrichpräparaten prämaligener HPV 6, 16 oder 18 positiver CIN eine Assoziation von erbB-2 Gen Amplifikation mit HPV-6-Nachweis und damit einhergehenden CIN I<sup>189</sup>. Auch eine andere Arbeitsgruppe berichtet über häufige Genamplifikation von erbB-2 in HPV 6 positiven CIN<sup>190</sup>. Diese beschriebene Amplifikation insbesondere in Koilozyten würde sich gut mit der von uns gefundenen Expression in CIN I und Koilozyten decken.

Wir fanden in dieser Untersuchung in den CIN I und Koilozyten teilweise ein membranäres Färbemuster, in den fortgeschrittenen Dysplasien und dem Karzinom dagegen ein zytoplasmatisches Färbemuster. In der Diagnostik des Mammakarzinoms wird bei der Erhebung des erbB-2 Status nur ein membranöses Färbemuster bewertet, da die Membran der Zielort des Rezeptors ist, hier der Angriffspunkt für den therapeutisch eingesetzten Antikörper liegt. Zudem zeigte eine Membranfärbung beim Mammakarzinom eine bessere prognostische Relevanz. Während beim Mamma-<sup>191</sup>, Ovarial- und Magenkarzinomen<sup>192</sup> dabei die Überexpression von erbB-2 in erster Linie Folge einer Genamplifikation ist, lässt sich bei anderen Tumoren wie Ösophaguskarzinomen<sup>193</sup>, nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen<sup>194</sup> und auch Zervixkarzinomen<sup>221</sup> nicht unbedingt ein klarer Zusammenhang zwischen Amplifikation und Überexpression zeigen was dazu geführt hat, dass man von weiteren transkriptionellen oder posttranskriptionellen Regulationsmechanismen ausgeht<sup>195</sup>. Ein solcher Regulationsmechanismus scheint beispielsweise die verstärkte Promoteraktivierung durch Transkriptionsfaktoren zu sein<sup>196</sup>.

Eine Arbeitsgruppe zeigte an Mammakarzinomzellen, dass hier eine zytoplasmatische Färbung im Gegensatz zu einer Membranfärbung in der überwiegenden Anzahl der Fälle nicht mit erhöhten mRNA Levels für erbB-2 einherging<sup>197</sup>, wiewohl in einer älteren Arbeit eine Korrelation zwischen zytoplasmatischem Färbemuster und Genamplifikation beschrieben worden ist<sup>198</sup>. In Mammakarzinomen konnte dabei eine gute Korrelation zwischen erbB-2 Überexpression in der Zellmembran und Genamplifikation für erbB-2 gefunden



## Diskussion

werden<sup>199</sup>. Eine mögliche Erklärung für zytoplasmatische Färbemuster wäre, dass alternative Splicing Produkte der mRNA des erbB-2 Rezeptors trunkeerte Rezeptorteile entstehen lässt, welche dem extrazellulärem Anteil des Rezeptors entsprechen und im Zytoplasma verweilen können<sup>200, 201</sup>.

Durch den verwendeten Antikörper als auch durch einen, gegen den intrazellulären Anteil des Rezeptors gerichteten Antikörper wird neben dem 185 kD Protein des membranständigen Rezeptors ein zytoplasmatisches Protein von 155 kD erkannt, dessen Bedeutung lange unklar war und für eine unspezifische Färbereaktion gehalten wurde<sup>202</sup>. Dieses Protein wird von mindestens vier weiteren Antikörpern gegen unterschiedliche Zielregionen des Rezeptors ebenfalls erkannt und ist beim Transitionalzellkarzinom der Blase ebenso wie das 185 kD Protein mit erhöhtem RNA Gehalt der Zellen und Genamplifikation assoziiert<sup>203</sup>. Dabei war die zytoplasmatische Färbung mit einer erhöhten Rezidivrate verbunden<sup>204</sup>. Tatsächlich liess sich zeigen, dass die Blockierung der N-ständigen Glykosylierung durch Tunikamycin an erbB-2 exprimierenden Zellen ein 155-160 kD grosses Protein entstehen lässt, so dass es sich wahrscheinlich um ein Vorläuferprotein des Rezeptor handelt<sup>205</sup>. Die Funktion dieses Proteins bleibt jedoch noch unklar. Auch beim Zervixkarzinom liess sich zeigen, dass ein rein zytoplasmatischer Nachweis von erbB-2 mit einer Erhöhung des mRNA Gehalts für erbB-2 der Zellen einherging<sup>219</sup>. In Kolonkarzinomen ließ sich der Rezeptor, dessen zytoplasmatische Expression mit einer schlechten Prognose einherging, sowohl auf der Zellmembran als auch zytoplasmatisch nachweisen<sup>206</sup>. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte den Rezeptor nach Stimulation sowohl im Zytoplasma als auch im Kern nachweisen, wo der Rezeptor eine transkriptionsaktivierende Wirkung zeigte<sup>207</sup>; eine Wirkung als Transkriptionsfaktor nach Translokation in den Kern ist auch für den EGF-Rezeptor bereits beschrieben<sup>208</sup>.

Da der Rezeptor vor Integration in die Zellmembran das Zytoplasma durchlaufen muß und zudem die Endocytose im Zusammenhang mit einem Recycling des Rezeptors ein Downregulationsmechanismus der Zelle ist, der ja auch als einer der Wirkungsmechanismen des erbB-2 Antikörpers Trastuzumab angesehen wird<sup>209, 210</sup>, ist das Auftreten einer zytoplasmatische Färbung naheliegend. Möglicherweise könnte die beim Mammakarzinom gefundene höhere prognostische Relevanz einer Membranfärbung Ausdruck von versagenden oder überlasteten Downregulations-

## Diskussion

vorgängen sein. Andererseits gibt es für den EGF-Rezeptor Berichte, wonach beim Plattenepithelkarzinomen der Lunge gerade in einer zytoplasmatischen Färbung sich eine prognostische Relevanz zeigt was dabei als Ausdruck der Aktivierung nach Rezeptorbindung und möglichen Rezeptorreyclings gewertet wurde<sup>99</sup>.

Wenngleich die nachgewiesenen Expressionswerte von der CIN hin zum Karzinom zunahmen, unterschieden sich die Gewebe in der medianen Färbeintensität jedoch nur gering und statistisch nicht signifikant (3.2.3.3). Ebenfalls bemerkenswert, wenngleich nicht signifikant, war die Tatsache, daß mit niedrigerer Differenzierung der Anteil der erbB-2 positiven Karzinome sank, was gut zur Positivität im Bereich von Verhornungsperlen passen würde (3.2.3.5.2). Im Gegensatz zu diesem Färbemuster am Karzinom fällt allerdings auf, dass sich der Rezeptor sich an den Stellen, wo er im normalen Plattenepithel nachweisbar war, in den basalen und parabasalen Zellen nachweisen ließ (3.2.3.1). Zwischen FIGO-Stadium und erbB-2 ergab sich insofern ein Zusammenhang, als der Anteil erbB-2 positiver Karzinome mit höherem FIGO-Stadium anstieg (3.2.3.5.1); diese Tendenz war aber nicht signifikant. Bei den lymphknotenpositiven Karzinomen war der Anteil an erbB-2 positiven höher als bei den lymphknotennegativen Karzinomen, wenngleich dieser Zusammenhang ebenfalls nicht signifikant war (3.2.3.5.3). Die Expression von erbB-2 blieb sowohl im gesamten Kollektiv als auch in den Untergruppen der primär operierten und der primär bestrahlten Patientinnen ohne signifikanten Einfluß auf das Überleben (3.2.3.5.4).

Der erbB-2 Rezeptor nimmt eine Sonderstellung innerhalb der Familie der erbB Rezeptoren ein, da er nicht direkt über einen Liganden aktiviert wird, sondern durch Heterodimerisierung mit den anderen Rezeptoren der erbB-Gruppe; er bildet dabei für die anderen Rezeptoren den bevorzugten Heterodimerisierungspartner<sup>109</sup>. Seine Wirkung beinhaltet daher in erster Linie eine Wirkungsmodifikation der anderen Rezeptoren. Insbesondere beim Mammakarzinom ist die Rolle des erbB-2 Rezeptors, der hier mit einer schlechten Prognose korreliert, recht weit erforscht. Die Heterodimerisierung von erbB-2 mit anderen erbB Rezeptoren steigert deren Tyrosinkinaseaktivität<sup>211</sup>, wobei die Mechanismen dafür einerseits in einer verzögerten Internalisierung der Dimerkomplexe<sup>223</sup>, andererseits in einer festeren Ligandenbindung<sup>212</sup> zu liegen scheinen. Wenngleich erbB-2 keinen Liganden hat, geht die Überexpression dieses Rezeptors doch mit einer Steigerung seiner

## Diskussion

intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität einher<sup>213</sup>. Über seinen intracellulären second messenger pathway (ras-pathway) vermochte erbB-2 die Expression der Gene für Integrine und Ecadherin, welche für die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion wichtig sind zu beeinflussen<sup>214</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß der erbB-2 Rezeptor mit Plakoglobin und beta Catenin, welches das zellmembrangebundene E-Cadherin mit dem Zytoskelett verbindet und einen wichtigen Regulator der Ecadherin Funktion bildet, Komplexe bildet<sup>215</sup>. Neben Wachstumsfaktoren spielen solche Adhäsionsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Steuerung der Proliferation und Differenzierung von Gewebe; beide beeinflussen sich dabei gegenseitig<sup>53</sup>. Diese Zusammenhänge könnten möglicherweise den, wenngleich nicht signifikanten, höheren Anteil erbB-2 positiver Präparate in der Gruppe der lymphknotenpositiven Karzinome erklären. Um hier Klarheit bezüglich der klinischen Relevanz zu erlangen, sind vermutlich noch Untersuchungen an einem größeren Kollektiv vonnöten.

Interessanterweise ließ sich eine Genamplifikation für erbB-2 bei Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri in einer Untersuchung bei 7 von 50 Karzinomen nachweisen, wobei 6 der 7 Karzinome mit Genamplifikation gut differenzierte Karzinome waren<sup>216</sup>. Dies würde gut zu der in dieser Arbeit beobachteten Positivität im Bereich von Verhornungspierlen und der Tendenz zu einer stärkeren Positivität von besser differenzierten Karzinomen passen.

Berchuck et al (1990) untersuchten den Rezeptor an Normalgewebe und neoplastischen Läsionen der Zervix und fanden den Rezeptor dabei am stärksten in den basalen Keratinozyten des normalen Epithels ausgeprägt; im CIN fanden sie den Rezeptor in der ganzen Epithelbreite durch undifferenzierte Keratinozyten ausgeprägt, in den untersuchten Karzinomen dominierte eine leichte Ausprägung mit Ausnahme eines Falles, der eine starke Ausprägung aufwies und der einzige Fall mit hämatogenen Fernmetastasen war. Darüberhinaus ließ erbB-2 sich in den Zervixdrüsen nachweisen<sup>217</sup>. Tervahauta et al (1994) fanden den Rezeptor in allen Epithelschichten und etwas verstärkt in HPV-Läsionen<sup>218</sup>. Hale et al (1992) fanden erbB-2 in 38% der Plattenepithelkarzinome ausgeprägt, wobei die Ausprägung bei lymphknotennegativen Karzinomen mit einer schlechteren Prognose einherging<sup>110</sup>. Brumm et al (1990) fanden den Rezeptor ebenso im basalen normalen Plattenepithel sowie verstärkt in CIN III, wesentlich geringer allerdings in CIN I-II. Sie fanden ebenfalls eine Ausprägung in den basalen Bereichen der Mukosazellen der

## Diskussion

Transformationszone. In 8 untersuchten Karzinomen ließ sich der Rezeptor immunhistochemisch in 6 Fällen nachweisen. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, die meistens auf ein membranäres Färbemuster abstellten, fanden sie dabei ein weitestgehend zytoplasmatisches Färbemuster, wiesen aber darauf hin, daß sich auch bei rein zytoplasmatischem Färbemuster eine Erhöhung des Transkriptionslevels finden lässt; bei in ihrer Untersuchung ebenfalls mituntersuchten Uterusmetastasen von Mammakarzinomen ließ sich bei rein zytoplasmatischem Färbemuster eine bis zu 50 fache Erhöhung der mRNA von erbB-2 nachweisen, so daß die Färbecharakteristik im wesentlichen vom verwendeten Antikörper abzuhängen scheint<sup>219</sup>.

In dieser Arbeit ließ sich der Rezeptor nicht regelhaft in den basalen Epithelschichten nachweisen, wiewohl andere Arbeitsgruppen dies berichten; lediglich in einzelnen Präparaten fand er sich in den basalen Schichten des Epithels im Bereich des Zervikalkanals exprimiert. Jedoch scheint sich der Rezeptor hier meist nur schwach nachweisen zu lassen; möglicherweise sind diese Unterschiede daher methodisch bedingt und in einer zu geringen Empfindlichkeit des verwendeten Antikörpers bedingt; die von uns nach Herstellerempfehlung und Vorversuchen verwendete Konzentration von 2,5 µg/ml liegt um ein mehrfaches über der von anderen Arbeitsgruppen mit anderen Antikörpern verwendeten (Berchuck et al: 0,5µg/ml), was dafür spricht, daß der Antikörper eine geringere Empfindlichkeit für den erbB-2 Nachweis hat. Möglicherweise liegt der regelhafte erbB-2 Nachweis in den basalen Epithelschichten einfach unterhalb unserer Nachweisgrenze.

Kristensen et al (1996) fanden in einer Analyse der prognostischen Relevanz von erbB-2 an 132 FIGO IB Karzinompatientinnen keinen Zusammenhang zwischen der erbB-2-Expression und klinischen Parametern oder Gesamtüberleben<sup>112</sup>.

Dagegen fanden Oka et al (1994) bei 192 FIGO III Patientinnen, die eine Strahlentherapie erhielten, eine signifikant schlechtere Prognose der erbB-2 positiven Patientinnen<sup>111</sup>.

## Diskussion

Chang et al (1999) stellten bei ihrer Untersuchung an 56 Plattenepithelkarzinomen eine signifikante Korrelation zwischen erbB-2-Expression und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen fest<sup>159</sup>.

Mandai et al (1995) fanden bei ihrer immunhistochemischen Untersuchung an jeweils 39 Plattenepithel und Adenokarzinomen, dass die erbB-2-Expression zwar bei Adenokarzinomen, nicht jedoch bei Plattenepithelkarzinomen einen Einfluß auf die Prognose hat<sup>220</sup>.

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte die Expression des EGF und erbB-2 Rezeptors an 101 Plattenepithelkarzinomen (51 Stadium Ib/IIA, 50 Patienten höhere Tumorstadien) der Zervix und fand dabei den EGF Rezeptor in 74,2 %, den erbB-2 Rezeptor in 19,8% der Karzinome exprimiert<sup>221</sup>. Lediglich 25% der immunhistochemisch erbB-2 positiven Karzinome zeigten dabei eine Amplifikation für c-erbB-2, in lediglich 2% der untersuchten Tumorpräparate fand sich eine RNA Überexpression, wobei diese mit Amplifikation und Proteinüberexpression korrelierte. Eine Korrelation zwischen HPV-Status und Nachweis von EGF oder erbB-2 liess sich dabei nicht nachweisen. Weder die Expression des EGF Rezeptor noch die Expression von erbB-2 hatte dabei einen Einfluß auf die Prognose.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Literaturdaten in Verbindung mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann man festhalten, dass die Expression von erbB-2 allenfalls in höheren Stadien einen geringen Einfluß auf die Prognose haben könnte. So fand sich im untersuchten Kollektiv eine, wenngleich nicht signifikante, Zunahme der erbB-2 positiven Tumoren in höheren Tumorstadien. Erklärt werden könnte dieses mit einem Proliferationsvorteil erbB-2 positiver Tumoren, was auch eine schlechtere Prognose in den höheren Tumorstadien erklären könnte; dies würde die Ergebnisse von Oka et al an ihrem relativ großen Kollektiv erklären können, die auf den ersten Blick im Gegensatz zu den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen stehen. Eine weitere mögliche Ursache für die Unterschiede bezüglich der prognostischen Relevanz in den in der Literatur und in dieser Untersuchung untersuchten Kollektiven könnte darin liegen, daß in einem frühen Stadium, wo noch

operiert wird, für das Überleben der Patientinnen weniger die zellbiologischen Charakteristika des Tumorgewebes sondern vielmehr eine adäquate Ausbreitungsdiagnostik und eine gute Operationstechnik entscheidend sind.

#### **4.5 Koexpression von TGF $\alpha$ und erbB-2**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Expression von TGF $\alpha$  Einfluß auf die Prognose haben kann. Darüberhinaus ließ sich aber auch eine Koexpression von TGF $\alpha$  und erbB-2 im Karzinom aufzeigen. Dies erscheint ein überaus interessanter Aspekt zu sein; TGF $\alpha$  bindet, wie oben ausgeführt, primär an den EGF Rezeptor erbB-1.

Kokai et al (1989) zeigten, daß ein Heterodimer aus erbB-1 und erbB-2 ein stärkeres Proliferationsignal setzt als ein Homodimer<sup>222</sup>. Die Art des Heterodimers, welche von erbB Rezeptoren gebildet wird, hängt insbesondere vom bindenden Liganden ab. Yarden et al weisen darauf hin, daß TGF $\alpha$  an erbB-1/erbB-2 Dimeren die stärkste Aktivität entfaltet<sup>109</sup>. Jedoch ist die Wirkungsverstärkung durch ein erbB-2/erbB-1 Dimer gegenüber einem erbB-1 Homodimer bei TGF $\alpha$  als Liganden weit weniger stark ausgeprägt als bei EGF als Liganden. Die Ursache dafür sieht man darin, dass ein EGF/erbB-1 Komplex internalisiert und abgebaut wird, während ein TGF $\alpha$ /erbB-1 Komplex kurz nach der Internalisierung pH vermittelt wieder auseinanderfällt und es zu einem Recycling des Rezeptors kommt; eine Heterodimerisierung von erbB-1 mit erbB-2 kann ebenfalls zu einem Rezeptorrecycling führen, andererseits aber auch eine verzögerte Internalisierung zur Folge haben<sup>223, 224</sup>. Diese Signalmodifikationen nach Ligandenbindung über unterschiedlich gesteuerte Downregulationsvorgänge wird mittlerweile als einer der wesentlichen Wirkungsmodifikationsmechanismen für Rezeptoren der EGF Wachstumsfaktor-familie angesehen.

In dieser Arbeit hatten die Tumorpatientinnen welche TGF $\alpha$  und erbB-2 exprimierten, ein schlechteres Überleben als diejenigen, welche nur eines der Antigene exprimierten, wenngleich dieser Unterschied nicht signifikant war. Ob die Ursache dafür allerdings tatsächlich in einer möglichen Modifikation der Effektormechanismen für TGF $\alpha$  liegt oder ob es sich um einen additiven Effekt beispielsweise durch Wechselwirkungen von erbB-2 mit anderen Rezeptoren der EGF Familie handelt,

## Diskussion

kann diese Untersuchung nicht klären. Die Bedeutung dieser Koexpression sollte an einem größeren Kollektiv nochmals untersucht werden.