Aus der Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt gynäkologische Onkologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Real-Time PCR basierte diagnostische und prognostische Assays zur Früherkennung des Zervixkarzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Helmut Graf von Keyserling

aus Brombach/Schmitten

Gutachter/in:

1. Dr. PD Andreas M Kaufmann

Seite 2

- 2. PD Dr. Ingeborg Zehbe
- 3. Prof. Dr. Peter Öhlschläger

Datum der Promotion: 25.10.2012

Inhalt

1.0	Zusammenfassung	4
2.0	Einführung	5
2.	.1 Zielstellung	7
3.0	Ergebnisse	7
3.	.1 Publikation 1: <i>p16^{INK4a}</i> and <i>p14^{ARF}</i> mRNA expression in PAP smears is age-related	7
	3.1.1 Weiterführende unpublizierte Daten	8
3. dy	.2 Publikation 2: Analysis of 4 Single-Nucleotide Polymorphisms in relation to cervi ysplasia and cancer development using a high-throughput Ligation-Detection Reaction rocedure	cal on 8
P	3.2.1 Weiterführende unpublizierte Daten	9
3.	.3 Publikation 3: The use of melting curves as a novel approach for validation of re	al-
tir	me PCR instruments	10
4.0	Diskussion	11
5.0	Material und Methoden	17
5.	.1 Probenasservierung	17
5.	.2 Klassifizierung des Patientenmaterials	17
5.	.3 Real-Time PCR Assay - Entwicklung	17
5.4	.4 Zellkultur von Zervixkarzinom-Zelllinien	18
5.	.5 HPV-Typisierung (Luminex)	19
5.	.6 Nukleinsäureextraktion aus Pap-Abstrichen und Gefrierschnitten	19
5.	.7 Qualitätsanalyse von Nukleinsäuren	19
5.3	.8 cDNA Synthese	19
5.9	.9 Multiplex-Ligationsreaktion und Genotypisierung	19
5.	.10 DNA-Sequenzierung	19
5.	.11 Klonierung der Standardplasmide	20
5.	.12 Anreicherung von Low-Input DNA	20
5.	.13 Datenextraktion und Analyse	20
6.0	Abkürzungsverzeichnis	21
7.0	Anhang	22
8.0	Referenzen	26
9.0	Anteilserklärung (Helmut Graf von Keyserling)	29
10.0) Lebenslauf, Helmut Graf von Keyserling	30
Der l	Lebenslauf ist in der Online Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten	30
11.0) komplette Publikationsliste	31
12.0) Selbständigkeitserklärung	34
13.0) Danksagung	35

Real-Time PCR basierte diagnostische und prognostische Assays zur Früherkennung des Zervixkarzinoms

Dissertation zum Dr. rer. medic. von Helmut Graf von Keyserling

1.0 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine objektive Methodik für die Früherkennung des Zervixkarzinoms zu entwickeln und klinisch zu validieren. Dabei wurden diagnostische und prognostische Ansätze mit Real-Time PCR verfolgt.

Es konnten basierend auf verschiedenen viralen und humanen Genen zwei mRNA basierte diagnostische Tests entwickelt werden, die gegenüber der herkömmlichen Zytologie deutlich spezifischer und sensitiver den Krankheitsstatus anzeigen. Dabei wurden bei der klinischen Validierung Grundlagendaten zur altersbedingten Regulation der zellzyklussteuernden Proteine *P14*^{ARF} und *P16*^{INK4A} gewonnen die von hoher Relevanz in der Zervixdiagnostik sind (1).

Für die Identifikation prognostischer Marker wurde eine Real-Time PCR basierte high-thoughput Plattform für die klinische Validierung von Single Nucleotide Polymorphismen in der Zervixdiagnostik aufgebaut. Mit dieser Plattform wurden vier SNPs anhand des Patientenmaterials von 749 Frauen validiert. Dabei wurde eine sehr seltene Genmutation des zell-detoxifizierenden Proteins *CYP1A1* identifiziert, die ein fast neunfach höheres Risiko vermittelt (*2*). Dasselbe Verfahren konnte abgewandelt auch auf Gendeletionen angewendet werden. Bei der Validierung der Gendeletionen *GSTM1* und *GSTT1* konnten signifikante Gen-Umweltinteraktionen über Multiplex-PCRs durch anschließende Schmelzkurvenauslesung nachgewiesen werden.

Aus diesen Schmelzkurvendaten konnte zusätzlich eine Methode entwickelt werden, welche theoretisch die Evaluierung und ggf. Korrektur von HRM-Analysen (High Resolution Melting Curve – Analysen) erlaubt (*3*). Die effiziente HRM-basierte Auslesung von SNPs oder Methylierungsereignissen hat große Vorteile, setzt aber eine tadellose Gerätegenauigkeit voraus. Mit unserer neu entwickelten Methode wurde zum ersten Mal eine lückenlose und umfangreiche Gerätetemperaturüberprüfung unter Realbedingungen entwickelt. Darüber hinaus ist diese Kontrolle in behördlich regulierten Diagnostiklaboren von großem Interesse. Aus der zum Patent angemeldeten Methode geht das Charité-Spin-Off Spreelabs hervor.

4

2.0 Einführung

Die Inzidenz des Zervixkarzinoms konnte zwischen 1970 und 2000 in Deutschland um 65% und die Mortalität um 60% gesenkt werden (4). Das wurde durch zytologisches Screening mit dem von Papanicolaou in den 1950er Jahren entwickelten Pap-Test erreicht (5). Dennoch liegt die Inzidenz von 14,1 pro 100.000 und die Mortalitätsrate von 7,1 pro 100.000 in Deutschland vergleichsweise hoch (4, 6). Die zytologische Identifizierung von Cervikalen Intraepithelialen Neoplasien (CIN), ist unzureichend: Der Pap-Test ist aufgrund der subjektiven Beurteilung hinsichtlich seiner Spezifität und Sensitivität stark verbesserungswürdig (4), dies gilt auch für die Histologie, welche als Goldstandard gerade bei leichten bis mittelschweren Dysplasien eine unzureichende Reproduzierbarkeit aufweist (7).

Infektionen mit humanen Papillomviren sind die Voraussetzung für die Entwicklung des Zervixkarzinoms. Ein PCR basierter multiplex HPV-DNA Test weist jedoch aufgrund der hohen HPV Prävalenz bei jüngeren Frauen eine zu geringe Spezifität auf (*8*).

Die Detektion von HPV Proteinen und mRNA Transkripten z. B. der viralen Onkogene E6 und E7, die sich während der Tumorgenese ändern, könnten als Biomarker bessere Ergebnisse erzielen, erfordern aber ebenfalls Multiplex-Anwendungen, welche möglicherweise die Assay-Stabilität beeinflussen. Aus humanen Biomarkern, welche durch die HPV getriebene maligne Transformation geändert werden, könnten dagegen einfache spezifische Tests abgeleitet werden, vorausgesetzt sie halten der klinischen Validierung stand.

Über den Einsatz mRNA-basierter viraler oder humaner Biomarker in der Zervixdiagnostik gibt es bislang nur wenige Daten, obwohl die mRNA Expression wertvolle Informationen über Veränderungen im Zervixgewebe liefern kann. Sicherlich stand mRNA in der Vergangenheit als instabileres Molekül nicht im Vordergrund. Neue Transportmedien und Aufarbeitungsprotokolle vereinfachen heute jedoch die Arbeit mit mRNA, sodass dieses Material auch für die Zervixdiagnostik evaluiert werden kann. Der große Vorteil gegenüber immunhistochemischer Färbung von Gewebeschnitten ist, dass die Messung der mRNA Expression mittels qPCR eine Datenerhebung ohne subjektive Probenbeurteilung erlaubt.

Wir haben die Expression von $p16^{lnk4a}$ und $p14^{ARF}$ gemessen, da im Gegensatz zur betreffenden mRNA eine Vielzahl von Arbeiten auf Protein-Ebene existieren. Der etablierte Biomarker $p16^{lnk4a}$ hat sich in sehr vielen immunhistochemischen Studien gut geeignet bestätigt, doch liegt in der inkonsistenten Anwendung immunhistochemischer Färbungen eine Fehlerquelle (9) die unter Umständen mittels qPCR verkleinert werden könnte. Mit $p16^{lnk4a}$ mRNA könnte eine Referenz geschaffen werden, anhand derer andere mRNA-basierte Biomarker verglichen werden können.

In diesem Zusammenhang haben wir die Expression des neuronalen Transkriptionsfaktors *Brn3a* gemessen. *Brn3a* Expression wurde von Ndsang et *al.* mehrfach als Biomarker für HPV-assoziierte

5

Läsionen und Karzinome beschrieben und soll in direkter Beziehung zur HPVE6 Expression stehen (10, 11). Da diese Daten alle auf semiquantitativer, densitometrischer Auswertung der mRNA beruhen, wollten wir hier erstmals Real-Time PCR –Daten zeigen und mit der Expression des Onkogens HPV16 E6 vergleichen.

Wir haben darüber hinaus die Expression des viralen Hüllproteins HPV16 L1 untersucht, da verschiedene Autoren die Herunterregulierung dieses Proteins mit maligner Transformation in Verbindung gebracht haben (*12, 13*). Da es wenige bzw. keine Daten auf mRNA Ebene gab, sollten diese evaluiert werden.

Verwandtschaftsstudien zeigten, dass auch genetische Prädispositionen an der Entstehung des Zervixkarzinoms beteiligt sind (14). In der Literatur finden sich auch Hinweise für Umweltfaktoren bzw. Gen-Umweltinteraktionen (15, 16). Neben der Verfügbarkeit von geeigneten Biomarkern, die eine objektivere Beurteilung und einen spezifischen Nachweis des Infektionsstadiums ermöglichen, besteht dringender Bedarf an genetischen Markern, welche Auskunft über das Progressionspotenzial von bereits erkrankten Patientinnen geben können, wobei entsprechende Umweltfaktoren bei der Risikoabschätzung evaluiert werden müssen. Das erfordert jedoch sehr große Datenmengen und Studienkohorten, welche durch i) die Vereinheitlichung unterschiedlicher Diagnosenomenklaturen durch einen Severity-Index (SI) nach(17), ii) durch Erschließung von genetischem Material durch Pre-Amplifikation und iii) durch kostengünstige Hochdurchsatz-Analysen (Multiplex Ligation Detection Reaction (LDR)) erzielt werden können.

Die Auswahl der von uns untersuchten single-nucleotide Polimorphismen (SNPs) haben wir in (2) ausführlich beschrieben. Wir haben allen voran die Mutation rs1042522 in *TP53* untersucht, die in bislang 49 meist kleineren Studien äußerst kontroverse Ergebnisse zeigte(*18*). Außerdem lassen sich in der Hälfte aller humanen Karzinome Mutationen in *TP53* nachweisen (*19*).

Die Mutation rs1801133 in *MTHFR* hat uns interessiert, weil sie die Expression des an DNA-Methylierung und Synthese beteiligten Enzyms reduziert. Auch hier ist die Datenlage unklar (*20-22*). Die Rolle der Mutationen rs4646903 und rs3813867 in *CYP1A1* bzw. *CYP2E1* sind ebenfalls unklar in Bezug auf Krebsentstehung, jedoch sind diese Enzyme maßgeblich an der Metabolisierung kanzerogener Xenobiotika beteiligt (*23*).

Nikotinabusus begünstigt die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs (24). Die Glutathion S-Transferasen *GSTT1* und *GSTM1* nehmen eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung von Karzinogenen aus Zigarettenrauch ein und entsprechende Gen-Deletionen beeinflussen den Abbau von Karzinogenen und somit wahrscheinlich die Entstehung von Krebs. Nachgewiesene Karzinogene aus Zigarettenrauch, z.B. Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) oder das Nitrosamin 4methylnitrosamin-1-3-pyridyl-1-butanon wurden in der Zervixschleimhaut mit viel höherer Konzentration bei Raucherinnen nachgewiesen als bei Nichtraucherinnen (25). Deletionen in den Glutathione S–Transferasen (GST) *M1* und theta *T1* konnten bereits in Zusammenhang mit der Zervixkarzinomentstehung gebracht werden, wobei auch hier die Datenlage recht widersprüchlich ist (26-30). GSTT1 und GSTM1 sind recht häufig deletiert, sodass genügend Daten für entsprechende Gen-Umwelt-Analysen zu erwarten sind. Uns hat insbesondere interessiert, wie sich das durch Zigarettenrauch vermittelte Risiko ändert, wenn man entsprechende Gendeletionen trägt.

2.1 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten zum Einen verschiedene virale und humane mRNA basierte Biomarker identifiziert und klinischen validiert werden. Ziel war es auch, die Nutzung von mRNA in der Zervixdiagnostik zu evaluieren. Dabei sollten insbesondere die humanen Biomarker $p16^{lnk4a}$ und $p14^{ARF}$ beleuchtet werden.

Zum Zweiten sollte ein Plattformprozedere entwickelt werden, welches die Erschließung, Messung und Auswertung großer Patientenkohorten hinsichtlich genetischer und des Weiteren epigenetischer Faktoren erlaubt. Mit dieser high-thoughput Plattform sollten diverse SNPs und Umweltfaktoren identifiziert werden. Neben der Entwicklung und Validierung eines "one reaction, many loci" Assays (Abb. 1) war die Erhebung eines großen SNP-Datensatzes damit geplant. Die SNP-Daten sollten mit den dazugehörigen klinischen Daten ausgewertet werden. Diese klinischen Daten wiederum sollten mit einer neuen numerischen Einordnung (scoring) bzw. mittels eines Programms zur semantischen Integration generiert werden um größere Fallzahlen zu erschliessen. Darüber hinaus sollten Assays zur Erhebung von Daten zur Deletion von *GSTT1* und *GSTM1* entwickelt werden, die ebenfalls mit der entsprechenden Auswertung insbesondere auf Gen-Umwelt-Interaktionen hin analysiert werden sollten.

Drittens sollte ein neues Messverfahren entwickelt werden, das die Temperaturverteilung und Performance auf Real-Time PCR Geräten erlaubt, um günstigere Verfahren wie z.B. High Resolution Melting Curve Auslesung für SNPs zu ermöglichen. Die Machbarkeit auf unserem zur Verfügung stehenden Gerät sollte evaluiert werden, um zukünftig gegebenenfalls aus den erhobenen Daten entsprechende Tm Korrekturen vorzunehmen zu können.

3.0 Ergebnisse

3.1 Publikation 1: *p16^{INK4a}* and *p14^{ARF}* mRNA expression in PAP smears is agerelated

Die Ergebnisse der krankheitsbedingten Hoch-Regulation von $p16^{lnk4a}$ und $p14^{ARF}$ wurden ausführlich in unserer Publikation beschrieben (1). Beide Transkripte konnten trotz der zum Teil stark degradierten mRNA aus Patientenmaterial verlässlich analysiert werden. $p16^{INK4a}$ hatte dabei eine Sensitivität von 79% (95% CI = 65–88%) und eine Spezifität von 83% (95% CI=67–92%) bezogen auf die Erkennung von hochgradigen Krebsvorstufen (HSIL Diagnosen). Für $p14^{ARF}$ war die Sensitivität, HSIL–diagnostizierte Patientinnen zu erkennen, bei 74% (95% CI= 60–84%) und die Spezifität ebenfalls bei 83% (95% CI= 67–93%). Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der auf Proteinebene sehr weit verbreitet genutze Marker $p16^{Ink4a}$ durch das Patientenalter koreguliert wird. Dies trifft ebenfalls auf das weniger bekannte Protein $p14^{ARF}$ zu. Diese altersbedingte Koregulation beläuft sich auf den Faktor 1,9- 2,9 und kann die Interpretation des Ergebnisses beeinflussen.

3.1.1 Weiterführende unpublizierte Daten

Neben dieser Analyse wurde ein generisches *p16^{lnk4a}* und *p14^{ARF}* überspannendes *CDKN2A/B* Transkript untersucht und an weitaus mehr Patientinnen getestet in der Erwartung, einen entsprechend sensitiveren und spezifischeren Assay zu erhalten (unpubliziert, siehe Anhang und Diskussion). Dabei konnten (5'-Fam, 3'-Tamra)-Taqman-Sonden verwendet und entsprechende Plasmid Standards für die relative Kopienzahl-Bestimmung eingesetzt werden. Für als zytologisch normal diagnostizierte Frauen hatte der *CDKN2A/B* Test eine Sensitivität von 71,2% [Cl(95%) 56,7 -82,5] und eine Spezifität von 74,1% [Cl(95%) 63,3 -82,7]. Für mit niedriggradige Krebsvorstufen (LSIL) diagnostizierte Frauen hatte der Test eine Sensitivität von 63,5% [Cl(95%) 48,9 -76,03] und eine Spezifität von 83,8%[Cl(95%) 67,3-93,2]. Dabei wurde als Grenzwert der Median der Expression bei gesunden Frauen plus eine halbe Standardabweichung herangezogen. Analog zu (1) wurde ebenfalls ein altersbedingter Einfluss gefunden. Neben *CDKN2A/B* wurde der humane Biomarker *Brn3a* und die viralen HPV16 Transkripte *E6* und *L1* untersucht (unpubliziert, siehe Diskussion und Anhang).

3.2 Publikation 2: Analysis of 4 Single-Nucleotide Polymorphisms in relation to cervical dysplasia and cancer development using a high-throughput Ligation-Detection Reaction procedure

Die Suche nach SNP-spezifischen, prognostischen Markern führte zur Identifizierung von rs4646903, einem sehr seltenen SNP im Gen *CYP1A1*, welcher bei Patientinnen mit hochgradigen Dysplasien und Karzinomen 8,9-fach höher im Vergleich zur Kontrollgruppe vorlag (*2*). Der Pubmed SNP Analysis Blast (n=58) ergab für die kaukasische Bevölkerung 0% für den entsprechenden CC Polymorphismus. Unserer große Analyse mit 749 untersuchten Personen hingegen ergab 1,5% (n=11). Von diesen Patientinnen waren 10 in der invasiven Karzinom-Gruppe und nur eine in der Kontrollgruppe. Innerhalb dieser 11 Patientinnen war nur eine Raucherin, was eine Gen-Umwelt-Interaktionsanalyse unmöglich machte.

Signifikante Ergebnisse wurden bei Heterozygotie des Methylentetrahydrofolat–Reduktasegens gefunden, die sich in der bi-allelischen Mutation rs18001133 nicht wiederfinden ließen. Darüber

hinaus wurde ein stark erhöhtes Risiko für eine HSIL bei Raucherinnen gefunden. Weniger ausgeprägt wurden Schwangerschaften als Risikofaktor identifiziert (2).

Das wichtigste und allgemeine Ergebnis dieser Studien ist die Machbarkeit des Vorgehens, welches die retrospektive Hochdurchsatzanalyse von SNPs und Gendeletionen hinsichtlich der Zervixdysplasie erlaubt. Hierbei haben wir Patientenmaterial erschlossen, welches normalerweise unbrauchbar gewesen wäre, jedoch sehr häufig in gynäkologischen Kliniken anfällt (z.B. HPV-Typisierung). Dazu haben wir eine Ligation Detection Reaction entwickelt, welche "multiplexed" als "one reaction, many loci" in diesem Zusammenhang erfolgreich verwendet wurde (Siehe Abb. 1). Mit diesem Verfahren konnte eine Plattform geschaffen werden, mit der weitere SNPs und theoretisch auch DNA-Methylierungsergebnisse (*31*) in Zervixabstrichen und Biopsien untersucht werden könnten.



Abb. 1 Ligation Detection Reaction Prozeder (LDR). Diese vereinfachte Darstellung zeigt das Prinzip anhand einer Einzelreaktion. In unserem Falle erlaubt die LDR die Parallelanalysen von vier Loci innerhalb einer Reaktion. (Bild mit freundlicher Genehmigung von Thomas Bergmann).

3.2.1 Weiterführende unpublizierte Daten

Glutathion-S-Transferasen sind ebenso wie *CYP1A1* am Abbau xenobiotischer Substanzen wie polyaromatischen Kohlenwasserstoffen aus Zigarettenrauch beteiligt (*32*). Deletionen sind in den zwei Genen *GSTT1* und *GSTM1* recht häufig, sodass sich Gen-Umweltinteraktionen leichter

analysieren lassen. Unser gynäkologisches Plattform-Procedere konnten für diese Analysen vollzogen werden (Manuskript in Vorbereitung). Der Vergleich zwischen Patientinnen gegenüber Dysplasien und Karzinomen ergab neben einer signifikanten Beteiligung an der *GSTM1* Deletion vor allem ein sehr stark erhöhtes Risiko durch Zigarettenrauch in Kombination mit einer *GSTT1* Deletion (siehe Tabelle 1). Die Multiplex-Auslesung von *GSTM1, GSTT1* und der Kontrolle ß-Globin konnte anhand von EvaGreen-Schmelzkurven gut ausgewertet werden, da die Tm-Werte der einzelnen PCR Produkte weit auseinander lagen. *GSTM1* hatte einen Median-Tm von 83,5°C, der Tm-Wert von *GSTT1* lag bei 90,8°C und der von ß-Globin bei 88°C (Abb.2a).

3.3 Publikation 3: The use of melting curves as a novel approach for validation of real-time PCR instruments

Die vielen Tm-Werte aus der Auswertung der *GSTM1* und *GSTT1* PCR unterlagen einer maximalen Schwankung von etwa ± 0,8°C. Die Tm-Abweichungen der Messungen von *GSTT1* konnten in einem Nebenprojekt ausgenutzt werden, um zum ersten Mal die Temperaturhomogenität eines Thermocycler-Heizblockes unter Realbedingungen zu ermitteln, wobei der gesamte Heizblock an jeder Einzelposition gemessen werden konnte (*3*). In Abb. 2b ist gezeigt, dass die Fluoreszenzkurve die Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur darstellt. Unter exakt gleichen Bedingungen reflektiert damit die Links-Verschiebung der Fluoreszenzkurve einen zu heißen Block und die Rechtsverschiebung reflektiert eine unzureichende Heizleistung (Abb. 2c).



Abb.2: Richtige und abweichende Schmelzkurven, Fluoreszenzintensität versus Temperaturanstieg. A: Schmelzkurven: Blau = *GSTM1* nach Singleplex-PCR, grün= *GSTT1* nach Singleplex-PCR, rot = ß-Globin nach Singleplex-PCR, gelb = *GSTM1-GSTT1-*ß-Globin nach Multiplex-PCR. braun = No Template Control nach Multiplex-PCR. B: Schmelzkurven des *GSTT1* Fragments an verschiedenen Positionen mit zulässigen kleinen Abweichungen. C: Deutlich abweichende Tm-Werte des *GSTT1* Fragments durch Temperaturabweichungen im Heizblock: Schmilzt das Fragment zu früh, war der Block zu heiß, schmilzt er zu spät, war er an der entsprechenden Position zu kalt.

Diese Abweichungen können in einem Flächendiagramm dargestellt werden (Abb. 3). Die daraus entwickelte Methode korrelierte mit der herkömmlichen MTAS Methode, die nach dem amerikanischen National Institute of Standard and Technology zertifiziert ist jedoch nur 16 Positionen berücksichtigt ($R^2 = 0.93$). Dabei waren die Varianzen zwischen den einzelnen Messungen mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0.95$ sehr reproduzierbar.



Abb. 3 Reproduzierbarkeit der 96 Well Messungen mittels Schmelzkurven: In zwei unabhängigen Messversuchen wichen die Ergebnisse pro well um maximal 0,2°C voneinander ab. Die graue Fläche repräsentiert den 96 Well Heizblock.

4.0 Diskussion

In Deutschland werden etwa 4% der zytologischen Abstriche als auffällig befundet (>Pap IIw, Pap III) und sollten leitliniengerecht wiederholt werden. Bei einem Pap-Ergebnis von \geq Pap IIID erfolgt in der Regel die Abklärung durch Kolposkopie und Biopsie. Weil die zytologischen Präparate des Pap –Tests subjektiv beurteilt werden und keine adäquate Qualitätskontrolle in der Abstrichtechnik durchgeführt wird, ist der einmalige Pap-Test mit einer Spezifität von nur 50 % unzureichend. Auch gibt es keine Evidenz für eine Verbesserung durch die Verwendung der Dünnschichtzytologie (*33*). Gleiches gilt auch für histologische Befunde, die besonders bei leichten und mittelschweren Dysplasien oft nicht reproduzierbar sind (*7*).

Der Nachweis von HPV-DNA wird oft begleitend zur Histologie/Zytologie gemacht. Ein hochsensitiver HPV-DNA-Nachweis erfolgt über GP5+/6+ Konsensus-PCR mit anschließender Genotypisierung (*34*, *35*). Aus einer Metaanalyse mit 60.000 Frauen ging hervor, dass der HPV-Nachweis zur Identifikation von Frauen mit > CIN 2 im Vergleich mit der Screening bedingten Zytologie deutlich sensitiver (96,1 vs. 53.0%) und nur etwas weniger spezifisch (90,7 vs. 96,3%) ist (*36, 37*). Der Nachweis einer HPV-Infektion ist aufgrund der hohen Prävalenz bei jüngeren Frauen (unter 30 Jahren) zu unspezifisch und wird erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium oder für Frauen mit Zustand nach Konisation spezifisch genug (*38*). In Deutschland wird deshalb erst bei Vorliegen von atypischem Pap-Ergebnis, auffälliger Kolposkopie oder bei Zustand nach Konisation der HPV-Nachweis in den S2-Leitlinien empfohlen.

Theoretisch können HPV mRNA-Transkripte den aktiven Infektionsstatus besser anzeigen als von HPV DNA, da sich das Expressionsmuster im Krankheitsverlauf ändert (*39*). Zu viralen und humanen mRNA Biomarkern gibt es nur wenige Daten zur diagnostischen Brauchbarkeit. Dabei sind die mRNA basierten HPV-Biomarker ein sehr direkter Weg zur Prüfung des Infektionsstatus.

Wir haben in Vorexperimenten die zwei HPV Transkripte HPV16 *E6* und *L1* exemplarisch in HPV16 positiven Frauen untersucht und erwartungsgemäß eine starke Überexpression von HPV16 *E6* in HSIL diagnostizierten Frauen nachgewiesen (Siehe Anhang, Abb. 4a, Tab. 2). Interessanterweise stieg die Expression von HPV16 *L1* mRNA mit fortschreitender Krankheit an und ist selbst in Zervixkarzinomen zu finden (Anhang, Abb. 4b, Tab. 2). Das Konzept, welches die Abwesenheit von L1-Protein als Marker für die Krankheitsprogression interpretiert (*12, 13*) scheint auf mRNA-Ebene nicht zu funktionieren. Passend dazu konnte Cumming et al. zeigen, dass die stark differenzierungsabhängige HPV L1 Expression auf posttranskriptioneller Ebene durch den RNA–Stability Regulator HuR gesteuert wird (*40*). Die Ursache für die stark restriktive *L1* Expression in Abhängigkeit von Differenzierung ermöglicht, dass das stark immunogene *L1* vom Immunsystem nicht als Antigen erkannt wird, so es erst in den obersten Epithelschichten exprimiert wird. Ein hochspezifischer Test zur Detektion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen (*41*) soll die Frage beantworten, ob zytotoxische T-Zellen eine L1 gerichtete Lyse verursachen.

Die Messung von HPV mRNA Transkripten in der Diagnostik/Prognostik erfordert komplizierte Multiplexansätze, um die etwa 18 verschiedenen high-risk HPV Typen gleichermaßen zu detektieren. Humane Zielmoleküle, welche sich in ihrer Expression auf Grund von HPV-induzierter maligner Transformation im Vergleich zu normalen Patienten unterscheiden, erfordern diesen Umstand nicht. Deshalb wurden immunhistochemisch gut charakterisierte humane Biomarker untersucht, die aufgrund der HPV-Onkogene hochreguliert werden. Einer der am Weitesten verbreitete humane Biomarker ist die Antikörperfärbung von histologischen Schnitten oder zytologischen Abstrichen mit $p16^{INK4a}$ (*CDKN2A*), denn dieses Protein wird indirekt durch high-risk -HPV E7 hochreguliert. Das auf dem gleichen Gen befindliche und durch einen alternativen Readingframe codierte p14^{ARF} (*CDKN2B*) wurde auch gemessen, da es ebenfalls durch HPV *E6* und *E7* beeinflusst wird. Die mRNA-Messung von $p16^{INK4a}$ ist auch interessant, weil man damit auch andere mRNA basierte Biomarker vergleichen kann, wie z.B. *Brn3a*.

 $p16^{INK4a}$ hat normalerweise seine Funktion in der vom Retinoblastomprotein (pRb) vermittelten Kontrolle des G1-S-Übergangs des Zellzyklus. Dabei unterdrückt es das Fortschreiten des Zellzyklus durch die Bindung von CDK 4 und 6 und der Inhibierung von Cyklin D. Durch die von $p16^{ink4a}$ verursachte Inhibierung der Phosphorylierung des Rb wird die Formierung des Rb-E2F Komplexes

12

begünstigt. Dieser transkriptionsrepressive Komplex unterdrückt die Progression des Zellzyklus am G₁-S Punkt (*42, 43*). Beim Zervixkarzinom wurde eine starke *p16^{INK4a}* Überexpression in Paraffin- und Gefrierschnitten festgestellt. Das liegt an der Bindung der high-risk-HPV E7 Proteine an phosphoryliertes Rb. Diese Bindung verursacht die Freisetzung von E2F, was wiederum die unkontrollierte Zellteilung anschiebt. Dabei führt ein entsprechender positiver Feedback-Kontrollmechanismus zur Überexpression von p16^{INK4a}. Ein ganz ähnliches Protein ist p14^{ARF}, welches vom selben Gen wie *p16^{ink4a}* kodiert wird, aber durch einen alternativen Reading Frame translatiert wird. Durch die Inhibierung von mdm2 wird der mdm2-p53 Komplex blockiert, was die mdm2 induzierte p53 Degradation unterbindet. Das p14^{ARF} wird durch E2F positiv reguliert. Dadurch das HPV E7 an Rb bindet wird E2F frei, sodass p14^{ARF} hochreguliert wird. Die negative p14^{ARF} Regulierung durch p53 führt bei HPV E6 induzierter p53 Runterregulierung zu einer Heraufregulierung von p14^{ARF} (*42, 44, 45*).

Wir haben *p16^{INK4a}* (*CDKN2A*) und p14^{ARF} (*CDKN2B*) auf mRNA Ebene relativ zu *ACTB* hinsichtlich der Brauchbarkeit in der Diagnose des Zervixkarzinoms untersucht. Denn auch zu diesen Untersuchungen gibt es nur sehr wenige Daten jedoch interessante Chancen in der Diagnoseabstufung und Automatisierbarkeit.

Mit der Untersuchung von *p16^{ink4a}* und *p14^{ARF}* konnte ein spezifischerer Test im Vergleich zur Zytologie entwickelt werden. Jedoch konnten wir zum ersten mal zeigen, dass dieser wichtige Biomarker im Pap-Abstrich auch einer altersbedingten Hintergrundexpression unterliegt (*1*). Ältere Frauen hatten bei diesen Daten einen etwa 2-3-fach höheren Wert als jüngere Frauen.

Zusätzlich haben wir ein TaqMan-basiertes (generisches) CDKN2A/B Transkript in der Erwartung untersucht, robustere Ergebnisse zu erzielen. Diese fielen jedoch nur geringfügig besser aus (unveröffentlicht, siehe Anhang, Tab. 3). Hier konnte interessanterweise kein signifikanter Unterschied in der CDKN2A/B Expression zwischen high-risk-HPV positiven und negativen Patientinnen festgestellt werden, die zytologisch als normal getestet wurden (Abb. 5a). Das trägt zur erhöhten Spezifität dieser Marker für Dysplasien gegenüber der HPV PCR bei. Wohl aber konnte in HPV positiven und negativen Frauen ohne auffälligen Befund eine altersbedingte Hochregulierung festgestellt werden (Abb. 5b und 5c). In der LSIL Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der altersbedingten CDKN2A/B Expression verzeichnet werden, (Abb. 5d) allerdings war die jüngere Hälfte der LSIL- Patienten zu 100% HPV positiv und die ältere Hälfte nur zu 61%, was das Ergebnis unter Umständen verwischt hat. In der HSIL Gruppe wurde eine altersbedingte Hintergrundexpression für die CDKN2A/B Expression gemessen (Abb. 5e). In der Zervixkarzinomgruppe (Material aus Biopsien) lag die jüngere Gruppe der Patientinnen zwar höher in der Expression als die ältere, jedoch ohne Signifikanz im Kruskal-Walis Test zu erreichen. Hier war sowohl die Expression als auch die Streuung höher. Die Gruppe älterer Zervixkarzinom-Patientinnen waren zu 7% HPV-negativ getestet (Abb. 5F, Tab.4).

Die Mediane des Referenzgens *ACTB* weisen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 6a). Die sieben untersuchten Zervixkarzinom-Zelllinien haben materialbedingt einen sehr viel höheren Median an *ACTB* von 9,58 x10⁶.

Patientinnen mit HSIL Befund hatten einen signifikannten, etwa 7,25 fach höheren *CDKN2A/B* Wert gegenüber zytologisch normale Frauen in diesem TaqMan-Assay. Gegenüber der LSIL Patientinnen lag der Wert bei HSIL Befunden 4,7-fach höher (Abb. 6b). Im Gegensatz dazu lieferte unser *Brn3a* Assay (*POU4F1*) zwar auch signifikante Unterschiede (Abb. 6c) jedoch befinden sich die C(p) Werte der Real-Time PCR im Median oberhalb von 30 Zyklen, was nur wenigen Kopien *Brn3a* pro Probe entspricht (Tab.3 und 5). Diese Kleinstmengen machten eine Aussage zu Unterschieden zwischen den Gruppen aufgrund der Poisson–Verteilung nicht möglich (siehe Abb. 7 und 8). Diese Daten sind nicht konsistent zur Datenlage in der Vielzahl von Veröffentlichungen durch Ndsang et *al.*, der eine starke HPV *E6* vermittelte (*10, 11*) Überexpression von *Brn3a* verzeichnet. Selbst stark HPV16 *E6* und gleichzeitig *CDKN2A/B* exprimierendes Abstrichmaterial hatte in dem von TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) entworfenen TaqMan-System kaum eine nennenswerte *Brn3a* Expression (Abb. 7,8). Ndsang et *al.* verwendete jedoch ausschließlich quantitative Northern blots mit densitometrischer (semiquantitativer) Auswertung. Dies könnte eine Erklärung für seine Fehlinterpretation sein.

Die Infektion mit High-Risk Papillomviren ist nötig, aber nicht ausreichend für die Entstehung des Zervixkarzinoms. Die zusätzlichen Faktoren, welche darüber entscheiden ob sich ein Karzinom entwickelt oder nicht, sind bis heute nur ansatzweise aufgeklärt. Der von Magnussen et *al.* gezeigte genetische Zusammenhang (*14*) wird heute um Gen-Umwelt-Interaktionen erweitert (*15, 16*). Neben der Verfügbarkeit von geeigneten Biomarkern, die eine objektivere Beurteilung und einen besseren Nachweis des Infektionsstadiums ermöglichen, besteht dringender Bedarf an genetischen Markern, die Auskunft über das Progressionspotenzial von bereits erkrankten Frauen geben können. Denn nur etwa 12% der als "hochgradig dysplastisch" (CINIII) eingeschätzten Epithelveränderungen des Gebärmutterhalses und Kanals würden zu invasiven Karzinomen progredieren, während der weitaus überwiegende Anteil persistieren und etwa 33% abheilen würde (*46*).

Genetische Faktoren welche die Entwicklung zum invasiven Karzinom begünstigen, liegen auf unterschiedlichen Loci und müssen sorgsam evaluiert werden. Mögliche Kandidaten liegen z.B. in der Steuerung des Zellzyklus, in DNA-Reparaturmechanismen oder der Zellentgiftung. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür Mutationen in den Genen *TP53*, *MTHFR*, *CYP1A1* und *CYP2E1* untersucht.

14

Für die Evaluierung genetischer Faktoren waren sehr große Studienkollektive notwendig, die erst durch eine einheitliche Klassifizierung und Erschließung des Patientenmaterials ermöglicht wurden. Wir bedienten uns hierzu eines neuen Verfahrens, das mittels semantischer Integration zytologische, kolposkopische und histologische Befunde nach ihrer Verfügbarkeit und Qualität gewichtet (*17*). Im Prinzip wurden dabei histologische den kolposkopischen und diese wiederum den zytologischen Daten von der Aussagekraft her übergeordnet, wobei die entsprechende Verfügbarkeit berücksichtigt wurde. Daraus wurde ein "Severity-Index" (SI) abgeleitet (siehe Material und Methoden).

Dann entwickelten wir ein Verfahren zur Anreicherung von DNA-Extrakten aus Pap-Abstrichen, welche gewöhnlich sehr niedrige DNA Konzentrationen aufweisen. Auf diese Weise wurde Patientenmaterial für genetische Analysen erschlossen, welches in vielen gynäkologischen Laboren durch die HPV Typisierung anfällt. Zusammen mit dem Ligation Detection Reaction Assay (Hier spezifisch für *TP53*, *MTHFR*, *CYP1A1* und *CYP2E1*) wurde ein Plattform-Prozedere entwickelt, welches beliebige genetische Mutationen in Relation zur Zervixkarzinomentstehung erlaubt. Darüber hinaus konnten unsere Kooperationspartner zeigen, dass das Ligation Detection Reaction procedure auch für die Detektion von DNA-Methylierung geeignet ist (*31*). Somit ließe sich dieses Prozedere theoretisch auch auf DNA-Methylierung übertragen, so die entsprechende Probenvorbereitung und die Anwendung des SI erfolgt.

Unsere Ergebnisse sind kohärent zu großen Metaanalysen. Der zurecht als Tumorsupressor bezeichnete Transkriptionsfaktor *TP53* greift abhängig von DNA Reparaturmechanismen in den Zellzyklus ein und steuert die Zelle in den programmierten Zelltod, wenn diese DNA Reparaturmechanismen versagen. Eine Metaanalyse die 49 Studien umfasst, kommt zum nahezu identischen Ergebnis wie wir (*2, 18*). Unsere widersprüchlichen Ergebnisse für *MTHFR* reflektieren ebenfalls die Literatur, wie ausführlich in (*2*) diskutiert. Allerdings konnten Daten zum Folatstatus retrospektiv nicht erhoben werden, spielen aber offenbar eine wichtige Rolle in der Untersuchung dieses SNPs (*47*). Eine gerade erschiene Metaanalyse bestätigt den Zusammenhang von Gebärmutterhalskrebs und *CYP1A1* (*48*). Das in der Vergangenheit vergleichsweise weniger untersuchte SNP in *CYP2E1* zeigte bei unseren Daten eine protektive Tendenz wie in (*49*) beschrieben.

Zusätzlich haben wir ein Protokoll entwickelt, welches auch die Detektion von Gen-Deletionen im Agarosegel-freien Multiplex PCR Verfahren erlaubt und haben auch hier den SI herangezogen. Als Kandidaten wählten wir die sehr häufig deletierten Gluthadion-S-Transferasen *GSTT1* und *GSTM1*, da sie an der Detoxizifierung beteiligt sind und viele Zellgifte wie z.B. polyzyklische Hydrokarbone (PAH's) aus Zigarettenrauch entgiften. Mit dieser Studie haben wir Gen/Umweltinteraktionen hinsichtlich Gluthadion-S-Transferasen und Zigarettenrauch gesucht, wie sie bereits in Krebsentitäten

15

der oberen Atemwege postuliert wurden (*50*). Wir haben im gleichen Patientenkollektiv bei den 30-70 jährigen Frauen *mit GSTM1* Deletion ein marginal erhöhtes Risiko gefunden eine leichte bis schwere Dysplasie oder ein Karzinom zu entwickeln. Das hoch signifikante durch Zigarettenrauch vermittelte Risiko (OR=4,67) war interessanterweise mehr als doppelt so hoch bei Frauen mit *GSTT1* Deletion (OR = 8,27, Manuskript in Vorbereitung). Somit konnte eine Gen/Umweltinteraktion hinsichtlich des Gebärmutterhalskrebses belegt werden.

Die Messung der Temperaturgenauigkeit unseres Real-Time PCR Gerätes sollte zunächst die Machbarkeit von SNP-Genotypisierungs-PCRs über HRM evaluieren. Die Gerätevalidierung mittels des standardkonformen Prüfgerätes MTAS ergab Abweichungen, die gerade noch innerhalb der Gerätespezifikationen lagen, jedoch inadäquat für HRM Analysen waren. Anhand hunderter Schmelzkurven der triplex–PCRs aus dem *GSTT1/GSTM1* Projekt wurde beobachtet, dass die Schmelzkurven einer gewissen Schwankung unterlagen. Aus diesen Schwankungen wurde ein Verfahren abgeleitet, welches Temperaturvarianzen in Real-Time-PCR Maschinen detektiert und somit einen wertvollen Beitrag zur Qualitätskontrolle in der PCR Diagnostik liefert (*3*). Der Vorteil zu bestehenden Systemen ist die Messung mit geschlossenem Heizdeckel und somit der Berücksichtigung des Temperatur-Crosstalks, welcher durch den Heizdeckel verursacht werden kann. Ein weiterer sehr wichtiger Vorteil ist die Messung *aller* 96 Positionen bzw. die Adaptierbarkeit auf andere Formate (wie z.B. das immer häufiger verwendete 386 Format). Der dritte Vorteil besteht darin, dass das einfache Verfahren keiner Geräteinvestitionen bedarf (mehrere Tausend Euro). Theoretisch könnten die mit unserer Methode aufgespürten Temperaturfehler dazu verwendet werden, HRM Daten zu korrigieren, sodass auch ältere Geräte für diese Technik zugänglich wären.

Zusammenfassend haben wir neue spezifischere Assays für die Früherkennung von Zervixdysplasien entwickelt und einen Grundstein gelegt, der interessante Optionen für die Verwendung mRNAbasierter Biomarker aufzeigt. Da HPV mRNA im Gegensatz zur HPV-DNA Informationen zum Infektionsstatus liefern kann, sind multiplex Real-Time PCR Ansätze von mRNA der HPV Onkogene ein interessanter Weg. Humane mRNAs wie *p16^{INK4a}* und *p14^{ARF}* sind unter der Berücksichtigung des Alters der Patientinnen ebenfalls eine interessante Option. Hier wurde zum ersten Mal die altersbedingte Hochregulierung dieser RNAs in klinisch relevantem Material gezeigt. Somit wurde die auf dem Nagermodell basierte Arbeit von Krishnamurti et. *Al. (51)* zum ersten mal klinisch bestätigt. Dann konnten wir eine Hochdurchsatz-Plattform zur Detektion von SNPs aufbauen, welche die Korrelation zu zervikalen Befunden erlaubt. Unsere Validierung von SNPs in einer der bislang größten Studien zeigte klare Ergebniskohärenz zu anderen Metaanalysen wie ausführlich beschrieben (*2*). Somit leistet unser Plattform-Prozedere einen wesentlichen Beitrag zur Auffindung von z.B. SNP- Mustern, DNA-Methylierungen oder auch Gen/Umwelt-Interaktionen, die eine Prognose zulassen könnten und die Früherkennung des Zervixkarzinoms deutlich verbessern würden.

Zuletzt haben wir eine neue Technologie entwickelt, welche die Real-Time PCR robuster macht. Diese Methode ist von großem Interesse in behördlich überwachten Laboratorien, deren Ergebnisse wichtige medizinische, rechtliche und wirtschaftliche Entscheidungen nach sich ziehen. Vor allem aber kann diese Technik dazu dienlich sein, kostengünstigere und einfachere Assays zu entwickeln.

5.0 Material und Methoden

5.1 Probenasservierung

Die anonymisierte Verwendung des Patientenmaterials erfolgte nach Einverständniserklärung durch die Patientinnen, sowie durch Ethikvotum EA4/044/05 und EA4/217/20. Die Entnahme und Lagerung der Pap-Abstriche ist in (1) beschrieben. Biopsien wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -80°C gelagert.

5.2 Klassifizierung des Patientenmaterials

Histologische, zytologische und kolposkopische klinische Diagnosen erfolgten leitlinienkonform. Die anamnestischen Daten und HPV Befunde wurden aus Krankenakten und Datenbanken extrahiert. Die herkömmliche diagnostische Einordnung des Patientenmaterials für die SNP Analysen wurde mittels semantischer Integration in numerische Werte vollzogen. Der dabei verwendete Algorithmus nach Agorastos et al. war wie folgt:

BEGIN IF examination result of <Histology> OR <Colposcopy> OR <Cytology> available THEN IF two or more diagnostic test results exist AND difference between any two results > 2 THEN <Severity Index> is defined as the greatest index among the results ELSE IF <Histology> definition available THEN use <Histology> as >Severity Index> definition ELSE IF <Colposcopy> definition available THEN use <Colposcopy> as <Severity Index> definition ELSE use <Cytology> definition as <Severity Index> definition ENDIF ENDIF ELSE<Severity Index> may not be defined ENDIF END

5.3 Real-Time PCR Assay - Entwicklung

Alle Temperaturprotokolle für die mRNA-Quantifizierung erfolgten über Temperaturgradienten im Primer-annealing-bereich zwischen 58 und 62°C. Die Zusammensetzung und Temperaturprofile für die SYBR-Green-basierten $p14^{ARF}$, $p16^{INK4a}$ und ACTB qPCR's wurden von (52) und (53) übernommen und angepasst wie in (1) beschrieben.

Die Primer und Sonden Für *ACTB* hatten die Sequenz Fwd = 5'-agcctcgcctttgccga-3', reverse = 5'ctggtgcctggggcg-3' und 5'FAM-ccgccgcccgtccacacccgcc-3' TAMRA und wurden zu je 30 mM in 10 μ l 2x TaqMan Mastermix (Applied Biosystems) eingesetzt. Je 2 μ l cDNA wurden verwendet und mit H₂O auf 20 μl aufgefüllt. Nach einer initialen Inkubation bei 95°C für 10 min. folgten 40 Zyklen a 94°C für 20 sec., 54°C für 10 sec. und 65°C für 30 sec. Die Messung erfolgete 2x im Triplet.

Die Primer und Sonden für *CDKN2A/B* hatten die Sequenz Fwd = 5'-cttcctggacacgctggt-3', Rev = 5'ttctttcaatcggggatgtc-3', 5'FAM-accagaggcagtaaccatgc-3'BHQ1 und wurden zu je 30 mM in 10 μ l 2x TaqMan Mastermix (Applied Biosystems) eingesetzt. Je 2 μ l cDNA wurden verwendet und mit H₂O auf 20 μ l aufgefüllt. Nach einer initialen Inkubation bei 95°C für 15 min. folgten 40 Zyklen a 95°C für 15 sec und 60°C, 1 min. Die Messung erfolgete 2x im Triplet.

Die Primer und Sonden Für *Brn3a* hatten die Sequenz Fwd = 5'-catcaagctgggcgtgac-3', reverse = 5'agagctcaggcttgttcattttctc-3', 5'-FAM-ttgttgtgcgagagcgtgagcga—BHQ1. und wurden zu je 20 mM in 10µl 2x TaqMan Mastermix (Applied Biosystems) eingesetzt. Je 2 µl cDNA wurden eingesetzt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Nach einer initialen Inkubation bei 95°C für 15 min. folgten 40 Zyklen a 95°C für 30 sec., 58°C für 30 sec. und 60°C für 30 sec. Die Messung erfolgete 2x im Triplet.

Die Primer und Sonden Für HPV16 *L1* hatten die Sequenz Fwd = 5'-gatgacacagaaaatgctagtgctt-3', reverse = 5'-gacaatcacctggatttactgcaac-3', 5'FAM-tgttcccctataggtggtttgcaacca-3'BHQ1 und wurden zu je 30 mM in 10 μ l 2x TaqMan Mastermix (Applied Biosystems) eingesetzt. Je 2 μ l cDNA wurden verwendet und mit H₂O auf 20 μ l aufgefüllt. Nach einer initialen Inkubation bei 94°C für 10 min. folgten 40 Zyklen a 94°C für 20 sec., 60°C für 10 sec. und 65°C für 30 sec. Die Messung erfolgete 2x im Triplet.

Die Primer und Sonden Für HPV16 *E6* hatten die Sequenz Fwd = 5'-caagcaacagttactgcgacg -3', reverse = 5'-cacaacggtttgttgtattgctg -3',, 5'FAM-agagatgggaatccatatgcagtgtgtgat-3'BHQ1 und wurden zu 40mM in 2µl 10x PCR Mastermix (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eingesetzt und mit 1 U Taq-Polymerase (Eppendorf) versehen. Je 2 µl cDNA wurden eingesetzt, 1 µl 25mM MgSO₄ zugefügt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Nach einer initialen Inkubation bei 94°C für 2 min. folgten 40 Zyklen a 94°C für 20 sec., 60°C für 10 sec. und 65°C für 30 sec. Die Messung erfolgete 2x im Triplet.

5.4 Zellkultur von Zervixkarzinom-Zelllinien

Die Zelllinien CaSki (ATTC CRL-1550, HPV16), SiHa (ATTC HTB-35, HPV16), HeLa (ATTC CCL-2.2, HPV18), MS751 (HPV 45), C33a (ATCC CRM-HTB-31, HPV neg.), Goe (AG Kaufmann, HPV16) und Marq (AG Kaufmann, HPV16) wurden in D-MEM Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) unter Zugabe von 10% FKS und 0,1% PS in 10 cm Zellkultur-Petrischalen kultiviert. Dabei wurden 10⁶ eingefrorene Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 15 ml D-MEM gewaschen und anschließend in 8 ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bei 37°C inkubiert bis 70% Konfluenz erreicht wurden. Die Zelllinien wurden zu Ernte 3-5 Minuten lang trypsiniert, in 10 ml PBS gewaschen und bei -80°C bis zur RNA-Extraktion gelagert. Eingefroren wurden Aliquots von 10⁶

Zellen in D-MEM Medium unter Zugabe von 10% DMSO. Dabei wurden sie bei -80°C in Isopropanolenthaltenen Einfrierboxen heruntergekühlt und für die Langzeitlagerung bei -150°C weggefroren.

5.5 HPV-Typisierung (Luminex)

Die HPV-Typisierung erfolgte nach (35) durch die GP5+/6+ PCR mit Auslesung mittels Luminex Suspension Array (Bio-Rad, Hercules CA, USA). Die in (54) beschriebene ß-Globin-PCR wurde zur Qualitätskontrolle für die erfolgreiche DNA Extraktion anhand eines 2%igen Agarosegels sichtbar gemacht.

5.6 Nukleinsäureextraktion aus Pap-Abstrichen und Gefrierschnitten

Genomische DNA-Extraktion erfolgte im Standard-Protokoll mittels QiaAmp Minikits (Qiagen, Hilden, Deutschland). Plasmid-Präparationen erfolgten über Plasmid-Minipreps bzw. Maxiprep Kits von Qiagen ebenfalls nach Standardprotokoll. Die mRNA-Extraktion aus Pap-Abstrichen wurde nach umfangreicher Optimierung in (1) ausführlich beschrieben. Die RNA aus Zervixkarzinomen wurde aus Gefrierschnitten gewonnen, wobei nach HE-Färbung der entsprechende Anschnitt gewählt wurde. Dabei wurden zwanzig 12 µm dicke Gefrierschnitte in einem 1,5 ml Eppendorftube gesammelt und bis zur Extraktion bei -80°C gelagert, wobei dieses Gewebe im Anschluss (ab der Zelllyse) wie die Pap-Abstriche weiterverarbeitet wurden.

5.7 Qualitätsanalyse von Nukleinsäuren

Die DNA und RNA-Konzentration sowie die Reinheit der Extrakte wurde photometrisch am Nanodrop (PaqLab, Erlangen, Deutschland) gemessen, wobei pro Messung 2 µl DNA- oder RNA-Lösung eingesetzt wurden. Die RNA Integrität wurde mittels Agilent Bioanalyzer 2010 (Agilent, Santa Clara, USA) nach Standardprotokoll gemessen.

5.8 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem Qiagen Quantitect Kit (Qiagen) unter der Verwendung eines RNAse Inhibitors wie beschrieben in (1). Dabei wurden je nach RNA-Konzentration bis zu 2 μ g RNA eingesetzt.

5.9 Multiplex-Ligationsreaktion und Genotypisierung

Die SNP-abhängige Ligationsreaktion im Multiplexverfahren sowie die Auslesung am ABI7900HT (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) wurde in (2) detailliert beschrieben. Dabei wurden aus verschiedenen Oligos anhand der Patienten-DNA-Matrize SNP-spezifische Templates zusammen ligiert, die als Template mittels TaqMan-PCR ausgelesen wurden.

5.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte kommerziell durch Eurofins MWG-Operon (Eurofins, Ebersberg, Deutschland) nach einem Standard-Sanger Sequenzierungsprotokoll.

5.11 Klonierung der Standardplasmide

Die Plasmide für HPV16 *L1* und *E6* wurden standardmässig mittels PCR, Restriktionsverdau und Ligation hergestellt. Alle anderen Plasmide wurden mittels Topo-Klonierung (Invitrogen) nach Herstellerangaben kloniert. Die Konstrukte wurden in chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien (TOP10, Invitrogen) mittels standard Heat-shock Methode transfiziert.

5.12 Anreicherung von Low-Input DNA

Eine Multiplex-PCR zur Anreicherung von *TP53, MTHFR, CYP1A1* und *CYP2E1* wurde etabliert, getestet und wie ausführlich in (2) beschrieben mit dem Qiagen Multiplex Mastermix unter Verwendung von 1x EvaGreen (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) im Opticon Chromo4 Real-Time PCR Gerät (Bio-Rad) gemessen.

5.13 Datenextraktion und Analyse

Die RNA-Expression der spezifischen *p14^{ARF}* und *p16^{Ink4a}* Transkripte wurde im delta-delta-C(p) Verfahren ausgewertet (*55*). Dazu wurde der paarweise fixierte Reallokations-Randomisationtest verwendet, der mit der Qiagen REST 2009 Software, V2.0.13 errechnet wurde (*56*). Alle anderen mRNA Transkripte wurden direkt mittels eines Plasmidstandards zwischen 10² und 10⁸ Kopien quantifiziert. Hierzu wurden die mRNA Transkripte der entsprechenden Zielsequenzen Patient für Patient und reziprok zu *ACTB* mit dem Faktor 10⁶ angegeben, um Kopienzahl per Millionen *ACTB* – Kopien zu erhalten. Die Daten wurden im Whisker blot dargestellt und die Signifikanz der Mediane mittels Man-Whitney U–Test mittels SPSS (Version 18, PASW, SPSS, Chicago, II, USA) ausgewertet. Die Auswertung der SNP-Analysen erfolgte über die Cluster-Analysis Software Vs 2.2.1 (Live Technologies). Die Daten wurden mittels logistischer Regression unter Einbeziehung des Alters, der Schwangerschaften und des Nikotinabusus mit SPSS ausgewertet, wie ausführlich beschrieben (*2*).

Die Multiplex-PCR-Daten zur Glutathion-S-Transferase wurden mittels der Opticon Monitor Software (Bio-Rad) generiert und entsprechende EvaGreen-Schmelzkurven visuell ausgewertet. Die Datenanalyse erfolgte ebenfalls über logistische Regression unter Einbeziehung des Alters, der Schwangerschaften und des Zigarettenkonsums mit SPSS. Hier wurden allerdings Frauen unter 30 aufgrund der geringen Indikation des Zervixkarzinoms ausgeschlossen. Die über 70 jährigen wurden aufgrund des niedrigen Zigarettenkonsums ebenfalls ausgeschlossen. Die Datenauswertung zur Validierung von Real-Time PCR-Geräten erfolgte über Microsoft Excel wie ausführlich beschrieben in (3).

6.0 Abkürzungsverzeichnis

АСТВ	ß-Actin
ATCC	American Type Culture Collection
CxCa	engl. Cervical Cancer (Zervixkarzinom)
CDK	Cycline Dependent Kinase
cDNA	Copied DNA
CI	Confidence Intervall
CIN	Cervical Intraepitelial Neoplasia
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagel Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FKS	Fötales Kälberserum
GOI	Gene of Interest
HE	Hämalaun Eosin
HRM	High Resolution Melting
HSIL	High Squamous Intraepitelial Lesion
LSIL	Low Squamous Intraepitelial Lesion
LR	Low Risk
mRNA	messenger RNA
MTAS	Mobile Temperature Acquisition System
N/A	Not Analyzed
NR	Nichtraucher
Р	P-Value (Significance)
РАН	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
Pap Test	Papanicolaou Test
PASW	Predictive Analysis Software
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
P/S	Penicillin/Streptomycin
qPCR	quantitative Polimerase Chain Reaction
R	Raucher
RNA	Ribonukleinsäure
SI	Severity Index
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Tm	Temperature Melting Point

7.0 Anhang

Faktor	Faktor Fälle n (%)		OR	95% CI	Р
GSTT1+	307 (76,9)	142 (78,9)	1	Referenz	Referenz
GSTT1 -	92 (23,1)	38 (21,1)	1,2030	0,76-1,903	0,43
GSTM1 +	189 (47,25)	100 (55,60)	1	Referenz	Referenz
GSTM1 -	211 (52,75)	80 (44,4)	1,589	1,087-2,320	0,017
Schwanger nie	202 (48,6)	103 (56,3)	1	Referenz	Referenz
Schwanger je	214 (51,4)	80 (43,7)	1,587	1,077-2,338	0,02
NR (alle)	329 (80,2)	170 (95,0)	1	Referenz	Referenz
R (alle)	81 (19,8)	9 (5,0)	4,523	2,111-9,688	<0,001
a) NR (<i>GSTM -</i>)	171 (82,6)	73 (96,1)	1	Referenz	Referenz
R (<i>GSTM-</i>)	36 (17,4)	3 (3,9)	4,674	1,378-15,861	0,013
NR (<i>GSTT</i> -)	72 (80,9)	34 (97,1)	1	Referenz	Referenz
R (<i>GSTT</i> -)	17 (19,1)	1 (2,9)	8,277	1,012-67,72	0,049
NR (<i>GSTM/T -</i>)	36 (87,8)	15 (100%)	1	Referenz	Referenz
R (<i>GSTM/</i> T -)	5 (12,2%)	0 (0%)	N/A	N/A	N/A

Tab 1: GSTT1/ GSTM1 Deletion, Schwangerschaften und Rauchen in Korrelation zu Zervixdysplasien undGebärmutterhalskrebs.

NR, Nichtraucher; R, Raucher; P, Signifkanz; CI, Konfidenzintervall. a) Im dritten Tabellenabschnitt wurden Zigarettenkonsum und Gendeletionen in Kombination analysiert.

Transkript	Befundgruppen	high-risk -HPV (%)	Median Alter (von-bis)	n	Median RCN ¹	P-value by KWT ²
HPV 16 <i>E6</i>	Normal	100%	35 (20-73)	17	,00,	Ref.
HPV 16 <i>E6</i>	LSIL	100%	29,5 (17-73)	16	1856,15	<0,001
HPV 16 <i>E6</i>	HSIL	100%	37 (22-63)	19	95797,31	<0,001
HPV 16 <i>E6</i>	CxCa	100%	55 (30-80)	21	56972,78	<0,001
HPV 16 <i>E6</i>	Cell Lines	100%	х	4	156154,12	<0,001
HPV 16 <i>L1</i>	Normal	100%	35 (20-73)	17	10,8	Ref.
HPV 16 <i>L1</i>	LSIL	100%	29,5 (17-73)	16	248,1	0,17
HPV 16 <i>L1</i>	HSIL	100%	36 (22-63)	21	949,55	0,014
HPV 16 <i>L1</i>	CxCa	100%	55 (30-80)	21	10,05	0,283
HPV 16 <i>L1</i>	Cell Lines	100%	х	4	32,54	0,419

Tab. 2: Auswertung der viralen HPV16 Transcripte E6 und und L1

¹P –Wert mit Kruskal Wallis Test. ²Median der relativen Kopienzahl (Relative Copy Number: Kopien des Gene of Interest pro Mio Kopien *ACTB*). CxCa = Zervixkarzinom.

Transkript	Befundgruppen	high-risk -HPV (%)	Median-alter (von-bis)	n	Median RCN ¹	P (KWT ²)
CDKN2A/B	Normal	37,65	38 (20-83)	85	2333,60	Ref.
CDKN2A/B	LSIL	83,78	33 (17-78)	37	3605,31	0,316
CDKN2A/B	HSIL	96,15	35 (21-66)	52	16914,64	<0,001
CDKN2A/B	CxCa	93,34	53,5 (30-80)	30	21894,17	<0,001
CDKN2A/B	Cell Lines	85,71	х	7	27026,45	<0,001
Brn3a	Normal	46,37	37 (20-83)	69	143,69	Ref.
Brn3a	LSIL	83,3	33 (17-78)	36	497,72	0,026
Brn3a	HSIL	91,83	36 (22-66)	49	348,87	0,028
Brn3a	CxCa	85,71	50,5 (30-80)	26	91,10	0,009
Brn3a	Cell Lines	85,71	х	7	8,41	0,002

Tab. 3: Auswertung der humanen Transkripte *Brn3a* und das das *p16* und *p14* überspannende CDKN2A/B Transkript

¹Median der relativen Kopienzahl; RCN, Relative Copy Number: Kopien des Gene of Interest pro Mio. Kopien *ACTB*; P –Wert mit Kruskal Wallis Test². CxCa = Zervixkarzinom.

Tab. 4: Auswertung des CDKN2A/B Transkripts nach Patientenalter

Patients	Ν	% high-risk HPV	Altersmedian	Median RCN ¹	P (KWT ²)	Fold change
CxCa Young	15	100	66	37973	1	1,0
CxCa Old	15	93	43	18316	0,152	0,5
HSIL Young	27	93	43	27310	1	1,0
HSIL Old	25	92	28	8911	<0,001	3,1
LSIL Young	20	100	25	4055	1	1,0
LSIL Old	17	61	38	3257	0,583	0,8
Normal Young	16	100	29	816	1	1,0
Normal Old	16	100	38	5187	0,118	6,4
Normal Young	29	0	36	1492	1	1,0
Normal Old	24	0	55	3873	0,036	2,6

¹Median der relativen Kopienzahl (RCN = Relative Copy Number: Kopien des Gene of Interest pro Mio. Kopien *ACTB*); ²P –Wert mit Kruskal Wallis Test. CxCa = Zervixkarzinom.

Tab. 5: Vergleich zwischen CDKN2A/B, HPV16 E6 und Brn3a (Siehe auch Abb. 8)

			Median RCN		Median RCN		Median RCN	
Befund	Ν	Median Age	CDKN2A/B	Р	HPV16 E6	Р	Brn3A	Р
Normal	10	31,5	348	Ref.	0	Ref.	273	Ref.
HSIL	10	38	38561	<0,000	398499	<0,000	115	0,880
CxCa	10	46	52102	<0,000	1664805	<0,000	152	0,871
ZK	4	х	25771	<0,000	152204	<0,000	5	0,288

¹P –Wert mit Kruskal Wallis Test. ²Median der Relativen Kopienzahl (Relative Copy Number: Kopien des Gene of Interest pro Mio Kopien *ACTB*). CxCa = Zervixkarzinom.



Abb. 4: Whisker-Blots der HPV16 *E6* und *L1* mRNA Transkripte bei verschiedenen zervikalen Befunden. *ACTB* wurde als Referenz zu Normalisierung verwendet. Dabei wurde die Kopienzahl pro Millionen *ACTB* Kopien angegeben. CxCa = Zervixkarzinom



Abbildung 5: CDKN2A/B . mRNA Transkripte nach HPV Befund und Patientenalter.

A: Der *CDKN2A/B* Wert wird in als normal diagnostizierten Patientinnen durch die HPV-Infektion nicht beeinflusst. B-F: Die altersbedingte Koregulation zeigt sich auch im TaqMan-Assay weitestgehend so wie in (1). Zu beachten ist die höhere Skalierung in den Zervixkarzinom- Proben. CxCa = Zervixkarzinom.



Abb. 6: *ACTB*-Kopien und relativ dazu *CDKN2A/B* und *BRN3a*.

A: ACTB-Kopien in den einzelnen Befundsgruppen, B: CDKN2A/B pro mio. ACTB- Kopien, C: Brn3a pro mio. ACTB- Kopien. CxCa = Zervixkarzinom.



Abb. 7: Biomarker CDKN2A/B, HPV16 E6 und Brn3a im Vergleich

Jeweils 10 HPV16 positiv getestete Patienten mit unterschiedlichen Befunden wurden exemplarisch miteinander verglichen. Dabei wurde *CDKN2A/B* als Referenz gewählt: Es wurden nur Patientinnen in diese Auswahl genommen die als zytologisch "normal" getestet einen *CDKN2A/B* Wert unter 10⁴ Kopien per mio. *ACTB* hatten. In die Gruppe der hochgradig getesteten Patientinnen (HSIL und Zervixkarzinom) wurden nur Patientinnen aufgenommen, die einen *CDKN2A/B* Wert über 10⁴ Kopien per mio. *ACTB* hatten. Somit wurden zytologische bzw. histologische Befunde zusätzlich unterstützend durch den *CDKN2A/B* Wert getrennt. Dann wurde der Vergleich mit HPV *E6* und *Brn3a* gemacht und man sieht, dass die Daten stark mit HPV *E6* korrelieren, im Gegensatz zu *Brn3a*, die überhaupt keine Ergebniskohärenz aufweisen und darüber hinaus nur sehr geringe Kopienzahlen aufweisen. GOI = Gene of Interest. CxCa = Zervixkarzinom.



Abb. 8: Brn3a Expression in exemplarischen Real-Time PCR Läufen.

Als schwarz dargestellt sind Standardläufe von *Brn3a* zwischen 10⁸ und 10² Kopien (Plasmid-DNA). Grau dargestellt sind die Patientenproben. Man sieht, dass die Patientenproben unterhalb von 1000 Kopien liegen.

8.0 Referenzen

- 1. von Keyserling H, Kuhn W, Schneider A, Bergmann T, Kaufmann AM. p16(INK4a) and p14(ARF) mRNA expression in Pap smears is age-related. *Mod Pathol* Epub 2011 Nov 11. Mar;25(3):465-70
- von Keyserling H, Bergmann T, Schuetz M, et al. Analysis of 4 Single-Nucleotide Polymorphisms in Relation to Cervical Dysplasia and Cancer Development Using a High-Throughput Ligation-Detection Reaction Procedure. Int J Gynecol Cancer 2011 Sep 2. Dec;21(9):1664-71
- 3. von Keyserling H, Bergmann T, Wiesel M, Kaufmann AM. The use of melting curves as a novel approach for validation of real-time PCR instruments. *Biotechniques* 2011 Sep; 51(3): 179-84.
- 4. Schneider A vK-DM, Muth C, Kühn W, von Keyserling H, Glastetter E. Früherkennung des Zervixkarzinoms. *Der Onkologe* 2008; 14(DOI 10.1007/s00761-007-1310-0): 147-55.
- 5. Papanicolaou GN. A New Procedure for Staining Vaginal Smears. Science 1942 Apr 24; 95(2469): 438-9.
- Schneider A vK-DM, Muth C, Kühn W, von Keyserling H, Kaufmann AM. Sekundäre Prävention des Zervixkarzinoms - Aktueller Stand der Diagnostik. *Onkologe* 2007 2007; 13(DOI 10.1007/s00761-007-1218-8): 549-58.
- 7. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001 Mar 21; 285(11): 1500-5.
- 8. Gyllensten U, Sanner K, Gustavsson I, *et al.* Short-time repeat high-risk HPV testing by self-sampling for screening of cervical cancer. *Br J Cancer* 2011 Aug 23; 105(5): 694-7.
- 9. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, *et al.* p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2009 May; 35(3): 210-20.
- 10. Sindos M, Ndisang D, Pisal N, *et al.* Measurement of Brn-3a levels in Pap smears provides a novel diagnostic marker for the detection of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2003 Aug; 90(2): 366-71.
- 11. Ndisang D, Faulkes DJ, Gascoyne D, *et al.* Differential regulation of different human papilloma virus variants by the POU family transcription factor Brn-3a. *Oncogene* 2006 Jan 5; 25(1): 51-60.
- 12. Sarmadi S, Izadi-Mood N, Pourlashkari M, Yarandi F, Sanii S. HPV L1 capsid protein expression in squamous intraepithelial lesions of cervix uteri and its relevance to disease outcome. *Arch Gynecol Obstet* 2011 Jul 26; 285(3):779-84
- 13. Griesser H, Sander H, Hilfrich R, Moser B, Schenck U. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 2004 Oct; 26(5): 241-5.
- 14. Magnusson PK, Sparen P, Gyllensten UB. Genetic link to cervical tumours. *Nature* 1999 Jul 1; 400(6739): 29-30.
- 15. Sobti RC, Kaur S, Kaur P, *et al.* Interaction of passive smoking with GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) genotypes in the risk of cervical cancer in India. *Cancer Genet Cytogenet* 2006 Apr 15; 166(2): 117-23.
- 16. Juarez-Cedillo T, Vallejo M, Fragoso JM, *et al.* The risk of developing cervical cancer in Mexican women is associated to CYP1A1 Mspl polymorphism. *Eur J Cancer* 2007 Jul; 43(10): 1590-5.
- 17. Agorastos T, Koutkias V, Falelakis M, *et al.* Semantic integration of cervical cancer data repositories to facilitate multicenter association studies: the ASSIST approach. *Cancer Inform* 2009; 8: 31-44.
- 18. Klug SJ, Ressing M, Koenig J, *et al.* TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *Lancet Oncol* 2009 Aug; 10(8): 772-84.
- 19. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997 Feb 7; 88(3): 323-31.
- 20. Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, *et al.* Distribution of p53, GST, and MTHFR polymorphisms and risk of cervical intraepithelial lesions in sicily. *Int J Gynecol Cancer 2010* Jan; 20(1): 141-6.

- 21. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, *et al.* Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001 Dec; 10(12): 1275-80.
- 22. Delgado-Enciso I, Martinez-Garza SG, Rojas-Martinez A, et al. [The effect of MTHFR polymorphisms, pregnancy and first intercourse on cervical cancer in a population from the Northeastern Mexico]. *Rev Invest Clin* 2006 Sep-Oct; 58(5): 462-9.
- 23. Bozina N, Bradamante V, Lovric M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009 Jun; 60(2): 217-42.
- 24. Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, *et al.* Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006 Mar 15; 118(6): 1481-95.
- 25. Melikian AA, Sun P, Prokopczyk B, *et al.* Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Lett* 1999 Nov 15; 146(2): 127-34.
- 26. Nishino K, Sekine M, Kodama S, *et al.* Cigarette smoking and glutathione S-transferase M1 polymorphism associated with risk for uterine cervical cancer. *J Obstet Gynaecol Res* 2008 Dec; 34(6): 994-1001.
- 27. Agorastos T, Papadopoulos N, Lambropoulos AF, *et al.* Glutathione-S-transferase M1 and T1 and cytochrome P1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to cervical intraepithelial neoplasia in Greek women. *Eur J Cancer Prev* 2007 Dec; 16(6): 498-504.
- 28. de Carvalho CR, da Silva ID, Pereira JS, *et al.* Polymorphisms of p53, GSTM1 and GSTT1, and HPV in uterine cervix adenocarcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008; 29(6): 590-3.
- Singh H, Sachan R, Devi S, Pandey SN, Mittal B. Association of GSTM1, GSTT1, and GSTM3 gene polymorphisms and susceptibility to cervical cancer in a North Indian population. *Am J Obstet Gynecol* 2008 Mar; 198(3): 303 e1-6.
- 30. Ueda M, Hung YC, Terai Y, *et al.* Glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and p53 codon 72 polymorphisms in human tumor cells. *Hum Cell* 2003 Dec; 16(4): 241-51.
- 31. Bormann F, Sers C, Seliger B, *et al.* Methylation-specific ligation detection reaction (msLDR): a new approach for multiplex evaluation of methylation patterns. *Mol Genet Genomics* 2011 Oct; 286(3-4): 279-91.
- 32. Garte S, Taioli E, Popov T, *et al.* Role of GSTT1 deletion in DNA oxidative damage by exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in humans. *Int J Cancer* 2007 Jun 1; 120(11): 2499-503.
- 33. Siebert U MC, Scroczynski G et Al. Dünnschichtpräparationen und computergestützte Untersuchungen von Zervixabstrichen im Rahmen der Krebsfrüherkennung. . *Schriftenreihe des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information* 2003; Bd 35 Bd 35. Asgard, Sankt Augustin
- 34. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, *et al.* A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997 Mar; 35(3): 791-5.
- Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 2008 Mar; 46(3): 1050-9.
- 36. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, *et al.* Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006 Sep 1; 119(5): 1095-101.
- 37. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, *et al.* Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol* 2007 Jan; 104(1): 232-46.
- 38. von Keyserling H, Kaufmann AM, Schneider A. HPV testing in the follow-up after treatment of women with CIN. *Gynecol Oncol* 2007 Oct; 107(1 Suppl 1): S5-7.

- 39. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, *et al.* The HPV16 transcriptome in cervical lesions of different grades. *Mol Cell Probes* 2011 Oct-Dec; 25(5-6): 260-5.
- 40. Cumming SA, Chuen-Im T, Zhang J, Graham SV. The RNA stability regulator HuR regulates L1 protein expression in vivo in differentiating cervical epithelial cells. *Virology* 2009 Jan 5; 383(1): 142-9.
- 41. Stanke J, Hoffmann C, Erben U, et al. A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8+ T cells by their cytolytic function. J Immunol Methods 2010 Aug 31; 360(1-2): 56-65.
- 42. Zhang HS, Postigo AA, Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell* 1999 Apr 2; 97(1): 53-61.
- 43. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993 Dec 16; 366(6456): 704-7.
- 44. Wang JL, Zheng BY, Li XD, *et al.* Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004 Apr 1; 10(7): 2407-14.
- 45. Stott FJ, Bates S, James MC, *et al.* The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998 Sep 1; 17(17): 5001-14.
- 46. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993 Apr; 12(2): 186-92.
- 47. Piyathilake CJ, Azrad M, Macaluso M, *et al.* Protective association of MTHFR polymorphism on cervical intraepithelial neoplasia is modified by riboflavin status. *Nutrition* 2007 Mar; 23(3): 229-35.
- 48. Sergentanis TN, Economopoulos KP, Choussein S, Vlahos NF. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012 Feb 1. In Press.
- 49. Ferreira PM, Catarino R, Pereira D, *et al.* Cervical cancer and CYP2E1 polymorphisms: implications for molecular epidemiology. *Eur J Clin Pharmacol* 2006 Jan; 62(1): 15-21.
- 50. Sam SS, Thomas V, Reddy KS, Surianarayanan G, Chandrasekaran A. Gene-environment interactions associated with CYP1A1 Mspl and GST polymorphisms and the risk of upper aerodigestive tract cancers in an Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009 Jun; 136(6): 945-51.
- 51. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. J Clin Invest 2004 Nov; 114(9): 1299-307.
- 52. Kanellou P, Zaravinos A, Zioga M, *et al.* Genomic instability, mutations and expression analysis of the tumour suppressor genes p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and p53 in actinic keratosis. *Cancer Lett* 2008 Jun 8; 264(1): 145-61.
- 53. Kreuzer KA, Lass U, Landt O, *et al.* Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. *Clin Chem* 1999 Feb; 45(2): 297-300.
- 54. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995 Apr; 76 (Pt 4): 1057-62.
- 55. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec; 25(4): 402-8.
- 56. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002 May 1; 30(9): e36.

9.0 Anteilserklärung (Helmut Graf von Keyserling)

Ich hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Helmut von Keyserling, Wolfgang Kühn, Achim Schneider, Thomas Bergmann and Andreas M Kaufmann. $p16^{INK4a}$ and $p14^{ARF}$ mRNA expression in Pap smears is age-related. Modern Pathology, 2011, Anteil = 80%

Beitrag im Einzelnen: Der Anteil für Probenasservierung, Aufarbeitung, Planung und Durchführung der molekularbiologischen Experimente, sowie die statistische Auswertung erfolgte zu 80% durch mich. Die schriftliche Erstellung und Einreichung der Publikationssschrift erfolgte zu 80% durch mich.

Publikation 2: <u>Helmut von Keyserling, Thomas Bergmann, Miriam Schuetz, Ursula Schiller, Jonas</u> <u>Stanke, Corinna Hoffmann, Achim Schneider, Hans Lehrach, Andreas Dahl and Andreas M Kaufmann.</u> Analysis of 4 Single-Nucleotide Polymorphisms in Relation to Cervical Dysplasia and Cancer Development Using a High-Throughput Ligation-Detection Reaction Procedure. International Journal of Gynecological Cancer, 2011, Anteil = 75%

Geschätzte 75 Prozent

Ich habe die molekularbiologischen Arbeiten zu 50% durchgeführt. Die sehr komplexe Datenanalyse und statistische Auswertung erfolgte zu 90% durch mich. Die Publikationsschrift wurde zu etwa 70 % von mir geleistet.

Publikation 3: <u>Helmut von Keyserling</u>, Thomas Bergmann, Moritz Wiesel, and Andreas M Kaufmann The use of melting curves as a novel approach for validation of real-time PCR instruments. Biotechniques, 2011, Anteil = 90%

Geschätzte 90 Prozent

Ich habe die experimentellen Arbeiten zu 100% geplant, durchgeführt und ausgewertet. Das Verfassen der Publikation erfolgte zu etwa 60% durch mich.

Unterschrift Helmut Graf von Keyserling

10.0 Lebenslauf, Helmut Graf von Keyserling

Der Lebenslauf ist in der Online Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

11.0 komplette Publikationsliste

Publikationen

- p16(INK4a) and p14(ARF) mRNA expression in Pap smears is age-related.
 von Keyserling H, Kühn W, Schneider A, Bergmann T, Kaufmann AM.
 Mod Pathol. 2012 Mar;25(3):465-70. doi: 10.1038/modpathol.2011.179. Epub 2011 Nov 11. PMID:22080060
- <u>The use of melting curves as a novel approach for validation of real-time PCR instruments.</u>
 von Keyserling H, Bergmann T, Wiesel M, Kaufmann AM.
 Biotechniques. 2011 Sep;51(3):179-84. PMID:21906039
- Analysis of 4 single-nucleotide polymorphisms in relation to cervical dysplasia and cancer development using a high-throughput ligation-detection reaction procedure.
 von Keyserling H, Bergmann T, Schuetz M, Schiller U, Stanke J, Hoffmann C, Schneider A, Lehrach H, Dahl A, Kaufmann AM.
 Int J Gynecol Cancer. 2011 Dec;21(9):1664-71. PMID:21897271
- A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8+ T cells by their cytolytic function.
 Stanke J, Hoffmann C, Erben U, von Keyserling H, Stevanovic S, Cichon G, Schneider A, Kaufmann AM.
 J Immunol Methods. 2010 Aug 31;360(1-2):56-65. Epub 2010 Jun 15. PMID:20558172
- 5 <u>HPV testing in the follow-up after treatment of women with CIN.</u>
 von Keyserling H, Kaufmann AM, Schneider A.
 Gynecol Oncol. 2007 Oct;107(1 Suppl 1):S5-7. Epub 2007 Aug 31. No abstract available. PMID:17764728
- <u>Sekundäre Prävention des Zervixkarzinoms, Aktueller Stand der Diagnostik.</u>
 A Schneider, M von Knebel-Doeberitz, C Muth, W Kühn, **H von Keyserling**, AM Kaufmann
 Der Onkologe 2007, 13:549–558, DOI 101007/s00761-007-1218-8

Posterpräsentationen

- <u>Next -Generation -Sequencing enables high-throughput HPV genotyping for Epidemiology</u> and Clinical Screening
 Florian Mertens, **Helmut von Keyserling**, Andreas M Kaufmann, Martin Kerrick, Andreas
 Dahl, Hans Lehrrach.
 27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop; Berlin, September 16-22, 2011
- <u>Single-Nucleotide Polymorphisms in Relation to Cervical Dysplasia and Cancer Development.</u>
 von Keyserling H, Bergmann T, Schuetz M, Schiller U, Stanke J, Hoffmann C, Schneider A,
 Lehrach H, Dahl A, Kaufmann AM.
 27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop; Berlin, September 16-22, 2011

31

- <u>Quantification of cyclin-dependent kinase inhibitor 2AB gene expression contributes to cytological findings and is co-elevated by age</u>
 Helmut von Keyserling, Wolfgang Kühn, Achim Schneider, Andreas M Kaufmann..
 Sth European Congress of the European Federation for Colposcopy and Cervical Pathology, 27 29 May Berlin 2010.
- <u>Cyclin dependent kinase inhibitor CDKN2A mRNA levels measured by TaqMan-PCR correlate to cytological diagnosis.</u>
 Helmut von Keyserling, Esther Glastetter, Achim Schneider, Wolfgang Kühn, Ireen Schröder, Andreas M Kaufmann.
 Sth International HPV & Skin Cancer Conference, Heidelberg 2008
- <u>Differential Expression of HPV16 L1 and E6 as Determined by Real-Time PCR on Clinical Samples.</u>
 Helmut von Keyserling, Alexandra Coumbos, Dorothee Grund, Achim Schneider, Andreas M

Kaufmann. International Cervical Cancer Conference, Prague 2006

 <u>Integrated metabolic engineering: DNA microarray analysis for improved isoleucine</u> production in *Corynebacterium glutamicum*.
 AC Loos, C Glanemann, PA Lessard, LB Willis, N Gorret, X O'Brien, **H von Keyserling** and AJ Sinskey.
 Massachusetts Institute of Technology, Dep. of Biology Annual Retreat, Falmouth, Massachusetts, April 2002

Vorträge

- <u>Genetische Faktoren des Zervixkarzinoms.</u>
 Helmut von Keyserling, Wolfgang Kühn, Achim Schneider, Andreas M Kaufmann. 21. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Zervixpathologie und Kolposkopie, Berlin 2011
- 2 <u>Age elevates CDKN2AB transcripts in cervical smears measured by quantitative TaqMan-PCR</u> Helmut von Keyserling, Wolfgang Kühn, Achim Schneider, Andreas M Kaufmann.._20 Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Zervixpathologie und Kolposkopie, Dresden 2009
- Molekulare Grundlagen der HPV-Infektion
 Andreas M Kaufmann, Helmut von Keyserling.
 20. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Zervixpathologie und Kolposkopie, Dresden 2009
- Pathway engineering and expression profiling <u>AJ Sinskey, N Gorret, S Guillouet, C Glanemann, AC Loos, LB Willis, PA Lessard, XM OBrien, A</u> <u>Rodal and H von Keyserling.</u> MIT BioMicro Center Opening Day Symposium, Cambridge, Massachusetts, January 2002
- <u>Gene expression response to isoleucine overproduction in Corynebacterium.</u>
 <u>PA Lessard, LB Willis, AC Loos, N Gorret, H von Keyserling, C Glanemann, S Viswanathan and AJ Sinskey.</u>

Metabolic Engineering IV conference, Barga, Italy, October 2002

Patente

<u>Temperaturreferenzplatte und Verfahren zur Bestimmung der Temperaturverteilung in</u> <u>einem Heizblock eines PCR-Gerätes</u> Helmut von Keyserling, Thomas Bergmann, Moritz Wiesel: (Submitted March 2011)

Grants

Exist Gründerstipendium 2010-2011 (03EGSBE129)

Preise

- 1 <u>Gewinner Businessplan Berlin Brandenburg Wettbewerb 2011,</u> Helmut von Keyserling, Thomas Bergmann, Moritz Wiesel: Platz 5 (Konzeptphase) Platz 3 (Endphase)
- 2 <u>Gewinner Science4Life Venture Cup 2011,</u> Helmut von Keyserling, Thomas Bergmann, Moritz Wiesel: (Konzeptphase) Platz 4 (Endphase)

12.0 Selbständigkeitserklärung

"Ich, Helmut Graf von Keyserling, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Real-Time PCR basierte diagnostische und prognostische Assays zur Früherkennung des Zervixkarzinoms" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

25.10.2012

Helmut Graf von Keyserling

13.0 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Andreas M Kaufmann für seine kompetente, geduldige und freundliche Hilfe. Seine stets offene Tür, und seine offene Haltung zu Kooperation und Austausch auch mit anderen Gruppen und Institutionen ermöglichten mir ein hochinteressantes, kreatives Umfeld.

Ich danke Prof. Achim Schneider für sein Vertrauen und seine Loyalität zur Wissenschaft. Viele Hürden konnten durch seine unkomplizierten, direkten Lösungen genommen werden. Insbesondere danke ich für die hervorragende Einarbeitung in das Gebiet. Prof. Wolfgang Kühn und Dr. Günter Cichon danke ich für die rege Zusammenarbeit bei der Erhebung und Bereitstellung von zytologischen Daten sowie der kompetenten Beratung. In diesem Sinne danke ich auch dem gesamten Team der Berliner Frauenklinik an der Charité.

Ich danke Dr. Andreas Dahl und Dr. Michal Schweiger für die tolle Unterstützung am Max-Plank-Institut für Molekulare Genetik. Ich danke Jonas, Coco, Tina, und Thomas und dem ganzen Laborpersonal für die vielen gemeinsamen arbeitsreichen Tage und Nächte im Labor.

Ich danke jedoch insbesondere meiner Frau Kristina und meinem Sohn Richard, von denen ich so viel Geduld abfordern musste und die immer hinter mir standen. Ich danke meinen Eltern Rodica und Hans sowie auch meinen Freunden für diese schöne Zeit.