

Stefan Mathias Wörner  
Dr. med.

## **Untersuchung varianter Transkripte des Zelladhäsionsmoleküls CD44 und von Integraten humaner Papillomviren (HPV) als Progressions- bzw. Dignitätskriterium prämaligener und maligner Läsionen der Zervix uteri**

Geboren am 08.04.1970 in Stuttgart  
Reifeprüfung am 03.05.1989 in Stuttgart  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989/90 bis WS 1996/97  
Physikum am 28.08.1991 an der Universität Tübingen  
Klinisches Studium in Tübingen und Mannheim  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 28.05.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. M. von Knebel Doeberitz

Ziel dieser Arbeit war es, einen molekularbiologischen Marker zu finden, der geeignet ist, aus sehr kleinen klinischen Proben eine valide diagnostische Beurteilung in Bezug auf Malignität oder Progression machen zu können. Damit sollten mehrere Probleme des bisherigen diagnostischen Vorgehens umgangen werden: die Probenentnahme sollte auf eine invasive Vorgehensweise verzichten (Komplikationen, Non-Compliance). Die Probenaufarbeitung und -beurteilung sollte streng standardisierbar, möglichst frei von individuellen Einflüssen und damit objektiv sein. Das Verfahren sollte möglichst sensitiv und spezifisch sein (geringe Mengen an Probenmaterial, diagnostische Trennschärfe). Zur Umsetzung dieser Fragestellung sind zwei molekularbiologische Phänomene auf ihre Eignung als Progressions- bzw. Dignitätskriterium untersucht worden: zum einen das Auftreten varianter Formen des Zelladhäsionsmoleküls CD44 und zum zweiten die Integration humaner Papillomviren.

Die Expression von CD44 und seiner Varianten wurde an einem Kollektiv von neun Proben mit normaler Histologie, zwei Proben mit kondylomatösen Veränderungen, zwei Proben mit dysplastischen Veränderungen sowie elf Proben von Zervixkarzinomen verschiedener Stadien und verschiedener Differenzierungsgrade über Immunfluoreszenz und exon-spezifische RT-PCR untersucht. Zudem wurden sechs Zelllinien aus Zervixtumoren bzw. -metastasen analysiert. Dabei zeigte sich, daß sowohl im Normalgewebe, in den histologisch auffälligen benignen Veränderungen wie auch in den malignen Geweben und Karzinomzelllinien jedes untersuchte, variante Epitop nachweisbar war. Zudem waren in allen untersuchten Geweben und Zelllinien auch die Transkripte nachweisbar, die für diese Epitope kodieren. Somit konnte kein relevanter Unterschied im CD44-Expressionsmuster zwischen Normalgewebe, dysplastisch verändertem Gewebe und maligne entarteten Zellen gefunden werden. Vielmehr erschien das Expressionsmuster von CD44 gewebespezifisch. In anderen Untersuchungen wurden in anderen Geweben auch andere Transkriptmuster und Epitope gefunden. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz decken sich mit denen der von uns etablierten exon-spezifischen RT-PCR für CD44. Somit ist weder der Nachweis von CD44-Standard noch der varianter Transkripte von CD44 ein geeigneter Parameter zur Dignitätsbestimmung an der Zervix uteri. Daher haben wir uns einem weiteren Kandidaten zur Lösung unserer Fragestellung zugewendet.

Um den Integrationsstatus von Humanen Papillomviren der Typen 16 und 18 zu untersuchen, wurde eine nested HPV-3' RACE von uns an sechs Zelllinien aus Zervixtumoren bzw. -

metastasen etabliert und optimiert. Der Integrationsstatus wurde an einer Sammlung von 80 klinischen Proben und 40 Abstrichproben der Zervix uteri untersucht. Unter den Biopsien waren von 36 Karzinomproben 32 positiv für HPV 16 oder 18. Unter den HPV-positiven Proben wiederum zeigten 86,6 % HPV-Fusionstranskripte, d. h. eine Integration von HPV-DNA in das Wirtszellgenom hatte stattgefunden. Hingegen zeigten alle neun HPV 16-positiven CIN-Läsionen (von insgesamt 38) ausschließlich das episomale Transkript, d. h. es liegt in den CIN-Läsionen kein Hinweis auf eine HPV-Integration vor. Alle sechs untersuchten Normalgewebe waren negativ für HPV 16 und 18. Die Mehrzahl der erhaltenen Amplimere sind sequenziert und damit der Integrationsstatus bestätigt worden.

Die Detektion von HPV-Fusionstranskripten scheint damit ganz klar ein Nachweis für ein invasives Zervixkarzinom zu sein. Auch die Ergebnisse der inzwischen durchgeführten größeren Studie mit 155 Proben erhalten diese Schlußfolgerung aufrecht. Daß ein kleiner Anteil von ca. 15 % der CIN III-Läsionen ebenfalls Integratranskripte zeigt, und sich dieser Anteil größenordnungsmäßig mit den epidemiologischen Daten von Nachsorge- und histologischen Nachuntersuchungsstudien deckt, unterstützt die unsere Schlüsse: der hier etablierte Test scheint zur Dignitätsbeurteilung an der Zervix uteri geeignet.

Um auch aus relativ kleinen Zellmengen (Abstrich) ein auswertbares Ergebnis zu erzielen, ohne dabei an diagnostischer Spezifität zu verlieren, wurde dieses Nachweisverfahren auf maximale Sensitivität hin optimiert. In neun parallel gewonnen Abstrichproben von Karzinomen sowie in den parallel gewonnen Abstrichproben der CIN-Läsionen waren identische Transkripte nachweisbar wie in der jeweiligen Biopsie. Damit ist das etablierte Verfahren hochsensitiv und spezifisch.

Nun können Patientinnen mit einem hohen Risiko für ein Zervixkarzinom mit einem leicht objektivierbaren, wenn auch aufwendigen, molekularbiologischen Verfahren regelmäßig untersucht werden. Dabei ist von besonderer Bedeutung auch der Umstand, daß auf eine invasive Vorgehensweise verzichtet werden kann, und damit Komplikationen sowie Non-Compliance vermieden werden können.

Die Wertigkeit unseres Verfahrens wird z. Zt. in einer prospektiven klinischen Studie, für die in drei gynäkologischen Zentren Patientinnen rekrutiert werden, untersucht. Aus den Ergebnissen dieser Studie erhoffen wir uns, weitere und genauere Aussagen über die Patientenzielgruppe sowie den sinnvollen Umfang der Therapie dieser Patientinnen machen zu können.