

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Tumorbilogie

Prof. Dr. med. Klaus Pantel

**Liquid Biopsy-Methylierungsanalysen der Tumorsuppressorgene  
CADM1 und MAL am Beispiel des Zervixkarzinoms**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Markus Leffers  
aus Münster

Hamburg 2023

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.11.2024**

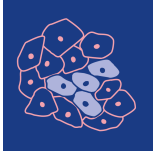
**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Thorsten Rieckmann**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher**

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Promotionsbezogene Publikation .....	1
2. Zusammenfassende Darstellung der Originalarbeit.....	13
2.1 Einleitung .....	13
2.2 Material und Methoden.....	15
2.2.1 Patientinnenkohorte .....	15
2.2.2 Probenverarbeitung .....	17
2.2.3 Quantitative methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion.....	17
2.2.4 Statistische Auswertung.....	18
2.3 Ergebnisse .....	18
2.3.1 Evaluation des angepassten qMSP-Assays an der CIN-Kohorte .....	18
2.3.2 qMSP an cfDNA-Proben der Karzinom- und HD-Kohorten.....	19
2.3.3 Follow-up .....	19
2.4 Diskussion .....	20
3. Zusammenfassung .....	25
4. Abkürzungsverzeichnis .....	27
5. Literaturverzeichnis.....	28
6. Erklärung des Eigenanteils .....	32
7. Danksagung.....	33
8. Lebenslauf .....	34
9. Eidesstattliche Versicherung.....	35



Article

---

# Combined Liquid Biopsy Methylation Analysis of CADM1 and MAL in Cervical Cancer Patients

---

Markus Leffers, Johanna Herbst, Jolanthe Kropidlowski, Katharina Prieske, Anna Lena Bohnen, Sven Peine, Anna Jaeger, Leticia Oliveira-Ferrer, Yvonne Goy, Barbara Schmalfeldt et al.

## Special Issue

Therapies in Cervical Cancer





Edited by

Dr. Raj Naik, Dr. Nick Wood, Dr. Antonios Anagnostopoulos and Dr. Dennis Yiannakis



## Article

# Combined Liquid Biopsy Methylation Analysis of CADM1 and MAL in Cervical Cancer Patients

Markus Leffers <sup>1</sup>, Johanna Herbst <sup>1</sup> , Jolanthe Kropidlowski <sup>1</sup>, Katharina Prieske <sup>2</sup>, Anna Lena Bohnen <sup>2</sup>, Sven Peine <sup>3</sup>, Anna Jaeger <sup>2</sup> , Leticia Oliveira-Ferrer <sup>2</sup>, Yvonne Goy <sup>4</sup>, Barbara Schmalfeldt <sup>2</sup>, Klaus Pantel <sup>1</sup> , Linn Wölber <sup>2</sup>, Katharina Effenberger <sup>1,†</sup> and Harriet Wikman <sup>1,\*,†</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

<sup>2</sup> Department of Gynecology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

<sup>3</sup> Department of Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

<sup>4</sup> Department of Radiotherapy and Radio-Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

\* Correspondence: h.wikman@uke.de

† These authors contributed equally to this work.

**Simple Summary:** In cervical neoplasia, tissue methylation of CADM1 and MAL has been identified as a promising triage tool for HPV-positive women. Here, we performed an exploratory study on the potential of the methylated genes as combined markers for the analysis of cervical smears and peripheral blood samples in cervical cancer patients. The combination of both markers in liquid biopsy resulted in a sensitivity of 83.3% and specificity of 95.5% for discrimination of cervical cancer from healthy controls. The robustness of the assay was proven by a respectably high sensitivity in stage I-II patients.

**Abstract:** Cervical cancer is the fourth most common cancer in women, which is associated in >95% with a high-risk human papillomavirus (HPV) infection. Methylation of specific genes has been closely associated with the progress of cervical high-grade dysplastic lesions to invasive carcinomas. Therefore, DNA methylation has been proposed as a triage for women infected with high-risk HPV. Methylation analyses of cervical cancer tissue have shown that cell adhesion molecule 1 (CADM1) and myelin and lymphocyte protein (MAL) methylation are present in over 90% of all cervical high-grade neoplasias and invasive cervical cancers. Here, we established a liquid biopsy-based assay to detect MAL and CADM1 methylation in cell free (cf)DNA of cervical cancer. Methylation of the target gene was validated on bisulfite converted smear-DNA from cervical dysplasia patients and afterward applied to cfDNA using quantitative real-time PCR. In 52 smears, a combined analysis of CADM1 and/or MAL (CADM1/MAL) showed methylation in 86.5% of the cases. In cfDNA samples of 24 cervical cancer patients, CADM1/MAL methylation was detected in 83.3% of the cases. CADM1/MAL methylation was detected already in 81.8% of stage I-II patients showing the high sensitivity of this liquid biopsy assay. In combination with a specificity of 95.5% towards healthy donors (HD) and an area under the curve (AUC) of 0.872 in the receiver operating characteristic (ROC) analysis, CADM1/MAL cfDNA methylation detection might represent a novel and promising liquid biopsy marker in cervical cancer.

**Keywords:** liquid biopsy; methylation; CADM1; MAL; cervical cancer



**Citation:** Leffers, M.; Herbst, J.; Kropidlowski, J.; Prieske, K.; Bohnen, A.L.; Peine, S.; Jaeger, A.; Oliveira-Ferrer, L.; Goy, Y.; Schmalfeldt, B.; et al. Combined Liquid Biopsy Methylation Analysis of CADM1 and MAL in Cervical Cancer Patients. *Cancers* **2022**, *14*, 3954. <https://doi.org/10.3390/cancers14163954>

Academic Editors: Raj Naik, Nick Wood, Antonios Anagnostopoulos and Dennis Yiannakis

Received: 8 July 2022

Accepted: 12 August 2022

Published: 16 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cervical cancer is the most common cause of cancer-related death in many less developed countries, and worldwide the fourth most common malignancy among women. In 2020, over 340,000 women died of cervical cancer [1]. High-risk human papillomavirus (hrHPV) infection is by far the greatest risk factor for the development of cervical cancer,

with >95% of patients being HPV-positive [2]. Although the introduction of HPV vaccines has had a huge impact on hrHPV infection rates, a large part of the human population still has not received the vaccination [3–5]. Therefore, longitudinal screening is essential for early detection and surveillance for more effective treatment planning. For this, different liquid biopsy approaches, such as cell free (cf)DNA analyses, have shown great promise as an easily obtainable minimally invasive tool for early detection and disease monitoring [6,7]. In virus-associated cancer, such as Epstein-Barr-virus-related nasopharyngeal carcinomas, the detection of viral DNA fragments in blood has been shown to be a highly specific and sensitive liquid biopsy tool [8,9]. In addition to the detection of circulating HPV-DNA, epigenetic changes can also serve as highly sensitive liquid biopsy biomarkers not hampered by the confounding effects of clonal hematopoiesis [10]. In cervical cancer, specific promoter methylations have been identified as important enabling mediators of how high-grade dysplastic lesions (HSIL/CIN2-3) can progress to invasive carcinomas [11]. Especially, the promoter methylation of the genes cell adhesion molecule 1 (CADM1) and myelin and lymphocyte protein (MAL) has been extensively studied in cervical tissue and smears and could frequently be observed in the development of cervical cancer [12,13]. CADM1 is known as a tumor suppressor gene and is involved in cell-cell interactions and adhesion [14,15]. MAL is also defined as a tumor suppressor gene in many cancers. MAL is implicated in apical sorting and raft stabilization [16]. Diagnostically, combined detection of methylation of both genes in cfDNA could prove to be an easily obtainable potential alternative molecular monitoring tool for hrHPV-positive women in the future [17–20]. To our knowledge, this is the first liquid biopsy-based study on a combined CADM1 and MAL analysis in cancer patients. The aim of this work was to establish a combined CADM1 and MAL methylation assay suitable for smears and liquid biopsy and to investigate whether this methylation pattern remains carcinoma-specific in cfDNA compared to healthy donors (HD). Furthermore, the first evidence on sensitivity and significance in relation to clinical characteristics as tumor stage has been collected.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients and Clinical Characteristics

To validate the methylation assay, cervical smears from 52 patients with an indication for cervical conization were collected and tested (Table S1). In 42 patients this was due to CIN 3, in 10 due to CIN 2. The average age of the patients was 39.6 years. Thirty-seven (71.2%) patients had previous cytologic findings of Pap IIID2 or more suspicious. Twenty-one (40.4%) patients were positive for one HPV type, twenty-eight (53.8%) for multiple HPV types, and three (5.8%) were HPV negative. HPV type 16 was present in 46.2% of cases, HPV 18 in 9.6%, and HPV 31 in 7.7%. For the evaluation of a liquid biopsy assay, EDTA blood was collected from 30 HD and from 24 cervical cancer patients between May 2019 and March 2021 (Table S2). Follow-up samples were collected from three cervical cancer patients. The HD group ( $n = 30$ ) included all female blood donors acquired through the Transfusion Medicine of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. The average age of the HD was 38.2 years, and the average age of cervical cancer patients was 46.2 years at the time of blood draw. For standardization, all tumor stages were adjusted to the FIGO classification renewed in 2019 [21]. Four patients were in stage FIGO IA, five in IB, two in IIB, nine in IIIC, and four in IVB. Blood samples were collected in relation to therapy, either before or during therapy. Twelve patients were already receiving tumor therapy at the time of blood collection; of these, ten were receiving chemotherapy or radio-chemotherapy; two had already completed tumor surgery in the therapy regimen and were about to start radio-chemotherapy. Twelve blood samples were drawn from patients before starting therapy. Of these, nine patients were diagnosed for the first time (two of them received their diagnosis during a performed conization) and three patients were about to start a new chemotherapy for progressive disease. Histologically, 22 carcinomas were squamous cell carcinomas and two were adenocarcinomas. In 17 patients, HPV infection was recorded in patient files, one patient was HPV negative, and in six no information was available. All

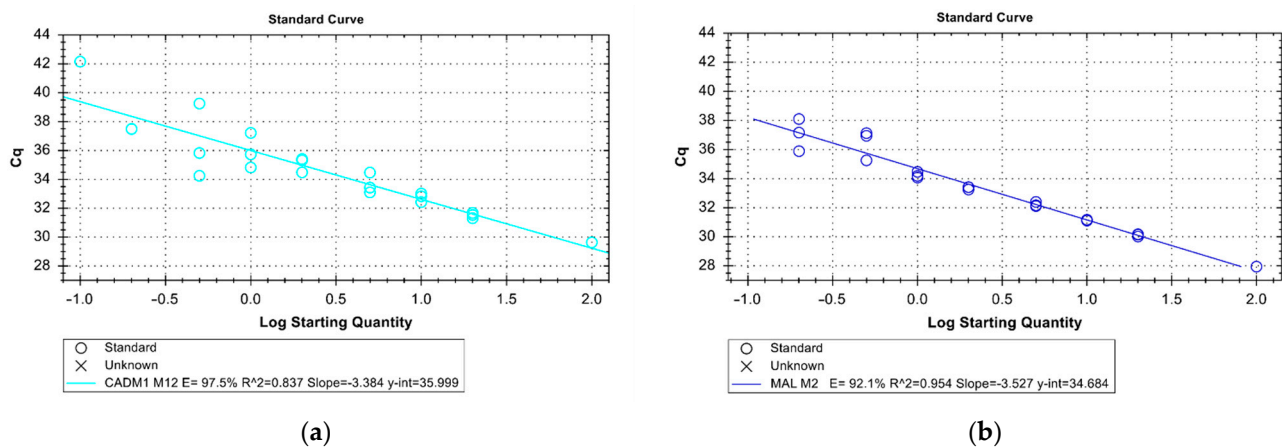
participants gave their written informed consent which was approved by the local ethical committee (No. PV-5392, 06/12/2016, Ärztekammer Hamburg).

### 2.2. Plasma Isolation and DNA Extraction

Plasma was extracted from EDTA blood using a two-stage centrifugation protocol (10 min at  $300\times g$ , followed by 10 min at  $1800\times g$ ) and was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further processing. Two 7.5 ml tubes were collected from cancer patients whereas 1 tube was obtained from HD. All plasma from the blood samples was used for DNA extraction. Extraction was performed using the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described in the manufacturer's protocol. DNA from the smears collected in SurePath smear emulsion was isolated directly on the day of sample collection. DNA extraction was performed using the QIAamp MinElute Media Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The protocol was scaled up to double the volumes for higher DNA yield, allowing 500  $\mu\text{L}$  of SurePath smear emulsion to be used for DNA isolation. DNA concentrations were determined using Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further use.

### 2.3. Bisulfite Conversion and Quantitative Methylation Specific PCR (qMSP)

Bisulfite conversion of the extracted DNA was performed using the EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Based on the highest sensitivity for cervical cancer tissue in literature, the methylation site M12 for CADM1 and the methylation site M2 for MAL were analyzed using the qMSP primers and TaqMan probe sequences as described by Overmeer et al. [22]. As internal reference control, beta-actin (ACTB) was used with primers and the TaqMan [22]. To enable d4uplex analysis, the probes for CADM1-M12 and MAL-M2 were linked with FAM as fluorophore at the 5'-end and BHQ1 as the quencher at the 3'-end; the ACTB probe with 5'-Cy5 and 3'-BBQ (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). Fully methylated and bisulfite-converted DNA at all CpG sites served as a positive control; DNA was isolated from MDA-MB-231 cells and modified with the methyltransferase M.SssI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's protocol [23]. For CADM1-M12, DNA isolated from CAMA-1 cells served as a negative control [24], and for MAL-M2 DNA isolated from primary human keratinocytes [22,25], both bisulfites converted. Non-bisulfite converted MDA-MB-231 DNA treated with M.SssI and a no-template control served as the additional negative controls in each run. The EpiTect MethyLight PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for PCR. The reaction mixture with a total volume of 20  $\mu\text{L}$  contained 10  $\mu\text{L}$  EpiTect MethyLight Master Mix, 2  $\mu\text{L}$  Primer/Probe Mix (CADM1-M12 or MAL-M2 and ACTB; 0.4  $\mu\text{M}$  per primer and 0.2  $\mu\text{M}$  per probe), and 10 ng template DNA. Amplification was performed in a 45-fold, 2-step cycle with an initial activation step at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 min; followed by 5 s  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturation and 60 s annealing and extension at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for CADM1-M12 analyses and at  $59\text{ }^{\circ}\text{C}$  for MAL-M2 analyses. The BioRad CFX96 C1000 Touch (BioRad, Hercules, CA, USA) was used. At 10 ng total DNA input, the dilution series showed a sensitivity of 0.1% for CADM1-M12-qMSP and a sensitivity of 0.2% for MAL-M2-qMSP for a ratio of methylated DNA to non-methylated DNA with an efficiency of 97.5% and 92.1% for CADM1 and MAL, respectively (Figure 1). Each patient sample was tested at least in duplicates, or if possible, in triplicates. The HD samples were tested once (eight samples only for CADM1, twenty only for MAL, and two for CADM1 and MAL) due to the low amount of cfDNA. Only results with an ACTB Ct value less than 33 were included in the analyses. The  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method was used for relative quantification. Samples with a  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  higher than the 90% confidence interval of the control group were defined as positive as it defined the best specificity and sensitivity.



**Figure 1.** Dilution series of the CADM1 (a) and the MAL (b) qMSP for assessing the sensitivity and efficiency of the assay. The  $x$ -axis indicates the starting concentration of fully methylated DNA diluted in unmethylated DNA in percent on a logarithmic scale by a total DNA input of 10 ng. Triplicate analyses were performed for each dilution except for 100%. The  $y$ -axis shows the  $C_t$  at which the threshold value was exceeded ( $C_t$ -value). For CADM1, an efficiency of PCR of 97.5%, detection of methylated DNA down to 0.1% is possible. For MAL an efficiency of PCR of 92.1%, detection of methylated DNA down to 0.2% is ensured.

#### 2.4. Statistical Analyses

The final statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 27. The  $\chi^2$ -test with a two-sided significance level of  $p < 0.05$  was used to determine significant differences between different patient groups in relation to the frequency of methylation. Correlations in ordinal variables (FIGO stage and tumor grade for the cervical cancer cohort; CIN status and Pap-status for the cervical dysplasia cohort) and metric variables (age) to the frequency of methylation were tested using the Spearman-Rho test. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed for CADM1 and/or MAL (CADM1/MAL) as a combined marker with  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  value as a test variable to differentiate cervical cancer patients and healthy donors in liquid biopsy samples.

### 3. Results

#### 3.1. CADM1 and MAL Methylation Status of Smear DNA from Cervical Dysplasia Patients

To validate the methylation assay, 52 smear samples from cervical dysplasia patients were analyzed first. CADM1 methylation was detected in 38 (73.1%) and MAL methylation in 25 (48.1%) across all cervical dysplasia patients. A combined analysis of CADM1/MAL showed methylation in 45 (86.5%) cases. Classification for the underlying diagnosis and indication for conization (Table 1) resulted in the division into two groups. Ten patients with biopsy-confirmed CIN 2 showed in 60% CADM1, in 40% MAL, and in 90% CADM1/MAL methylation. Forty-two patients with biopsy-confirmed CIN 3 showed in 76.2% CADM1, in 50% MAL, and in 85.7% CADM1/MAL methylation. In this cohort, no significant correlation to clinic pathological factors was found except for Pap-status in MAL (correlation coefficient = 0.309;  $p = 0.026$ ).

#### 3.2. Methylation Status of cfDNA Isolated from Blood from Cervical Cancer Patients and Healthy Donors

CADM1 methylation was detected in 18/24 (75%) of the cervical cancer plasma samples, MAL methylation in 10/24 (41.7%), and CADM1/MAL methylation in 20/24 (83.3%) of the samples (Table 2). To verify the absence of CADM1 methylation in HD, ten HD cfDNA samples were tested to underline the previous results published by Rong et al. [26]. None of these samples were positive. Twenty-two HD samples were tested for MAL methylation, and one (4.5%) was positive. The HPV status of this donor was not recorded. In the case of CADM1, the significance level was  $p < 0.001$ ; in case of MAL,  $p = 0.003$  ( $\chi^2$ -test). ROC



analysis for CADM1/MAL as a combined marker resulted in a significant area under the curve (AUC) of 0.872 (95% confidence interval: 0.743–1.000) for differentiation of cervical cancer patients and healthy donors.

**Table 1.** CADM1, MAL, and CADM1 and/or MAL methylation status of smear samples from 52 cervical dysplasia patients in relation to the severity of dysplasia.

	Diagnosis for Surgery Indication			
	CIN 2		CIN 3	
	Count (N = 10)	%	Count (N = 42)	%
CADM1	6	60.0%	32	76.2%
MAL	4	40.0%	21	50.0%
CADM1 and/or MAL	9	90.0%	36	85.7%

**Table 2.** CADM1 and MAL methylation status in blood samples from healthy donors and cervical cancer patients.

		Healthy Donor		Cervical Cancer	
		Count	%	Count	%
CADM1	Negative	10	100.0%	6	25.0%
	Positive	0	0.0%	18	75.0%
MAL	Negative	21	95.5%	14	58.3%
	Positive	1	4.5%	10	41.7%

### 3.3. cfDNA Methylation Status of Cervical Cancer Patients in Relation to Clinical Characteristics

CADM1 and MAL methylation was detected in seven (63.6%) and three (27.3%) of the 11 non-metastatic cervical cancer patients (FIGO IA-IIB), respectively; nine (81.8%) patients were positive for either MAL and/or CADM1. In this group, 4/11 patients were FIGO stage IA1, and even in these samples methylation of CADM1 and MAL could be detected in the cfDNA (CADM1: 3/4, MAL: 2/4, CADM1/MAL: 4/4). In nine lymph node metastasized patients (FIGO IIIC), CADM1 methylation was detected in 8/9 samples (88.9%), MAL methylation in 5/9 (55.6%), and methylation in CADM1/MAL in 8/9 (88.9%). In four distant metastatic patients (FIGO IVB), 3/4 were positive for CADM1, 2/4 for MAL, and 3/4 for CADM1/MAL (Table 3). Regarding tumor histology, 86.4% of the 19 squamous cell carcinomas were positive for CADM1 and /or MAL (Table S3). Comparing the methylation rate between patients who were under ongoing therapy and those who were before therapy, 91.7% (11/12) of the “before therapy” group and 75% (9/12) of the “under ongoing therapy” group tested positive for CADM1/MAL (Table 4). In addition, methylation of CADM1/MAL was detected in 50% (1/2), 78.6% (11/14), and 100% (6/6) of the patients with grade 1, 2, and 3 tumors, respectively (Table S4). The majority of our patients were HPV-positive (17/24), and 94.1% showed CADM1 and/or MAL methylation in their blood (Table S5). In this small study cohort, no significant correlation to clinic pathological factors was found except for age and MAL (correlation coefficient = 0.476;  $p = 0.019$ ).

**Table 3.** CADM1, MAL, and CADM1 and/or MAL methylation status of blood samples from 24 cervical cancer patients in relation to tumor stage (FIGO classification 2019).

	FIGO Stage					
	IA-IIIB		IIIC		IVB	
	Count (N = 11)	%	Count (N = 9)	%	Count (N = 4)	%
CADM1	7	63.6%	8	88.9%	3	75.0%
MAL	3	27.3%	5	55.6%	2	50.0%
CADM1 and/or MAL	9	81.8%	8	88.9%	3	75.0%

**Table 4.** CADM1, MAL, and CADM1 and/or MAL methylation status of blood samples from 24 cervical cancer patients in relation to point of blood sampling.

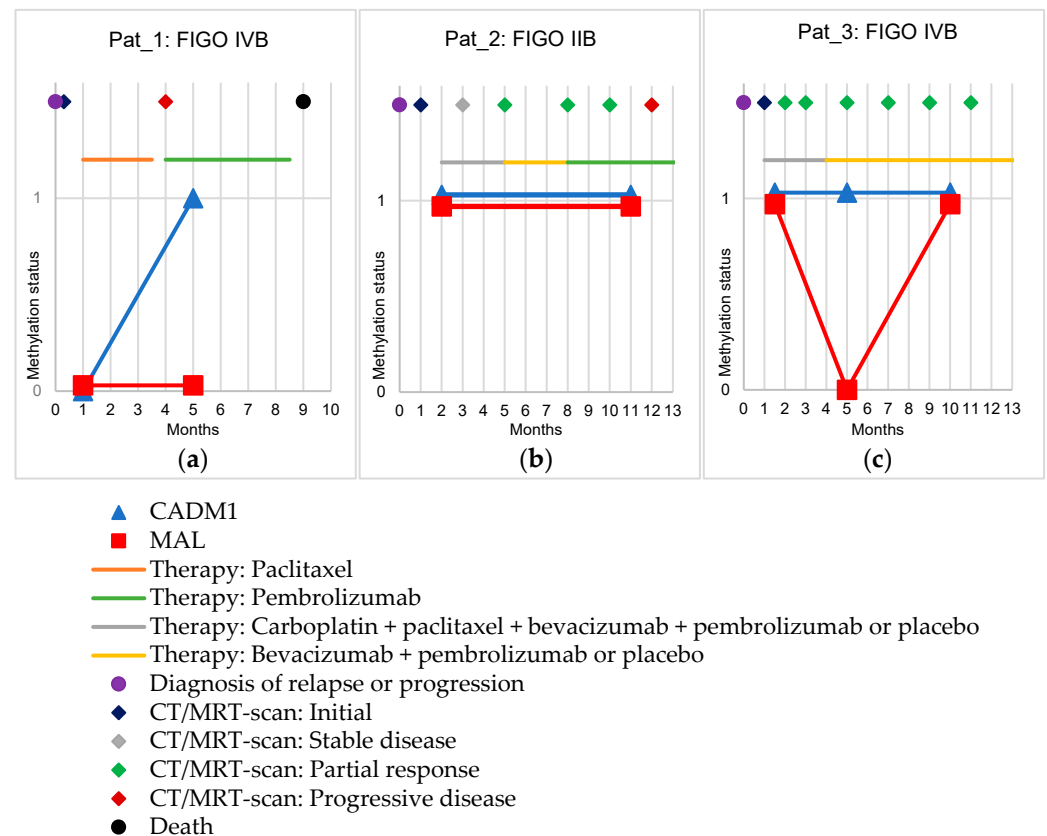
	Point of Blood Sampling			
	Before Therapy <sup>a</sup>		Under Ongoing Therapy <sup>b</sup>	
	Count (N = 12)	%	Count (N = 12)	%
CADM1	9	75.0%	9	75.0%
MAL	6	50.0%	4	33.3%
CADM1 and/or MAL	11	91.7%	9	75.0%

<sup>a</sup> Seven initial diagnoses, two initial diagnoses after conization (local R1), and three relapse diagnoses. <sup>b</sup> Five under radiochemotherapy, five under chemotherapy, and two between tumor surgery (local R0) and radiochemotherapy.

### 3.4. Follow-Up of Cervical Cancer Patients

Exemplarily, follow-up samples were collected from three cervical cancer patients and tested for CADM1 and MAL methylation (Figure 2). The first patient (Pat\_1) (Figure 2a) suffered from a fulminant course of the disease within nine months after diagnosis with progression of osseous metastases ending with the patient's death. Before starting a new chemotherapy with paclitaxel one month after diagnosis of progression, the first blood sample was obtained. Here, no methylation of CADM1 or MAL could be detected in the cfDNA. Four months after diagnosis, a progression of the disease was detected by CT scan, therapy was switched to pembrolizumab, and a second blood sample was obtained one month after the start of therapy. CADM1 methylation was detectable, MAL remained negative.

The second patient (Pat\_2) (Figure 2b) was diagnosed with local relapse, after which this patient was enrolled in the Keynote-826 study [27]. Prior to initiation of therapy with carboplatin, paclitaxel, bevacizumab, and pembrolizumab or placebo, the first blood sample was obtained. Here, both CADM1 and MAL methylation was detectable. MRI scans performed during the course every two months initially showed stable disease, followed by seven months under partial response. Under this, at month five, therapy was changed by protocol to bevacizumab plus pembrolizumab or placebo. Upon the occurrence of a complication, therapy was changed to solely pembrolizumab. Eleven months after diagnosis of a relapse, a second blood sample was obtained. Here, the methylation status remained unchanged, i.e., positive for CADM1 and MAL methylation. In the subsequent MRI scan at month 12 after diagnosis, progressive disease was stated, and the tumor was regrowing, indicating a constant tumor lead.



**Figure 2.** Methylation status of CADM1 and MAL (shown by the y-axis: 0 means negative, 1 means positive) in follow-up samples of three cervical cancer patients. The x-axis shows the time in months. In addition, therapies (lines) and disease progression (dots and diamonds) are shown. (a): Shows the follow-up of a patient in FIGO stage IVB with the progression of osseous metastases. (b): Shows the follow-up of a patient in FIGO stage IIB with a local relapse. (c): Shows the follow-up of a patient in FIGO stage IVB with a relapse in the form of newly appeared distant lymph node metastases.

The third patient (Pat\_3) was also included in the Keynote-826 study on the new-onset distant metastases in lymph nodes of the neck (Figure 2c) [27]. One and a half months after diagnosis (under ongoing chemotherapy with carboplatin, paclitaxel, bevacizumab, and pembrolizumab or placebo), the first blood sample was obtained and both MAL and CADM1 methylation were detectable. During the first 11 months after diagnosis, a tumor status of partial response determined by CT scan was steadily present. Five months after diagnosis (one month after the end of chemotherapy and switch to maintenance therapy with bevacizumab and pembrolizumab or placebo), CADM1 methylation was detectable whereas MAL methylation was no longer detectable. Ten months after diagnosis, both CADM1 and MAL methylation were again detectable in the third blood sample.

#### 4. Discussion

Methylation analyses of cervical cancer tissue have shown that CADM1/MAL methylations are present in up to 99% of all squamous cell carcinomas and 92% of all adenocarcinomas [12,22,28]. Furthermore, methylation of both these genes in tumor tissue has been published for several other tumor entities making these highly interesting liquid biopsy markers in general [16,29–33]. Therefore, the main aim of this work was to establish and investigate the combined use of CADM1 and MAL promoter methylation as liquid biopsy markers in cervical cancer with the following goals: (a) to provide the possibility to make a qualitative statement as to whether the sample is methylated or not methylated; (b) to achieve the highest possible sensitivity, and (c) to be specific towards HD samples. To our knowledge, this is the first study showing results on a combined liquid biopsy

CADM1 and MAL assay in cancer patients. For assaying cfDNA in plasma, the available amount of circulating tumor (ct)DNA is a major critical limiting factor. Numerous studies have shown that both the total amount of cfDNA as well as ctDNA varies greatly among patients, depending on factors such as age or disease stage [7]. Therefore, we first tested the sensitivity of our liquid biopsy assay using a dilution series starting with 10 ng DNA input, respecting the fact that the five-fold input amount was published before by Overmeer et al. for this assay developed for smear and tissue samples [22]. Overmeer et al. achieved a sensitivity of 0.1% methylated DNA against a background of unmethylated DNA in their dilution series for CADM1 and MAL methylation using qMSP [22]. We achieved a sensitivity for cfDNA-based qMSP of 0.1% and 0.2% for CADM1 and MAL, respectively.

Going into patient material, we chose smears from CIN 2 and 3 patients, to investigate whether the downscaled assay remained similarly sensitive in a patient group comparable to the previously published study [22]. In smears of our CIN 3 patient group, 76.2% were positive for CADM1 and 50.0% were positive for MAL, which is comparable to 66.7% and 53.3% in the previous study [22]. The  $\chi^2$ -test did not identify a significant difference between the methylation rates between these two cohorts. From these results, it could be concluded that the assay scaled down to 10 ng DNA input is reliable and sensitive and thus suitable for liquid biopsy approaches.

Our pilot methylation analysis in carcinoma patient plasma shows that a high positivity rate of 83.3% is achieved across all tumor stages by combining both markers. No significant differences in the frequency of methylation with respect to tumor stages were observed. Obviously, more samples are needed to test whether any clinical correlation may exist. Even in very small microinvasive tumors (FIGO IA1) and in patients who were already under therapy, a positive methylation status could be detected in cfDNA. Specificity to cfDNA samples from HD was also shown. Only one HD out of 30 showed positive methylation for MAL (specificity of CADM1 100%; of MAL 95.5%). In a previous study of MAL methylation in liquid biopsies, a 100% specificity was also not achieved [34].

In general, our calculated sensitivity for MAL methylation in plasma alone for the detection of cervical cancer is 41.7%. Guerrero-Preston et al. reported a sensitivity of 94.1% and a specificity of 73.3% in a small set of samples including 17 breast cancer patients and 15 HD [34]; Agostini et al. reported a 13% sensitivity and 100% specificity among 39 breast cancer patients and 49 healthy donors [35]. These results show that a wide range of sensitivity and not necessarily 100% specificity to healthy controls can be obtained, depending on the method used, and the clinical, pathological, and geographical characteristics of the samples analyzed.

For CADM1, one study in cfDNA in cervical cancer has been published [26]. With a cut-off of  $1.81 \times 10^4$  methylated copies/mL, Rong et al. were able to achieve a sensitivity of 53.6% and a specificity of 91.4% regarding the prediction of metastasis in 14 metastatic and 176 non-metastatic cervical cancer plasma samples [26]. Our calculated sensitivity for CADM1 methylation in plasma alone for the detection of cervical cancer is 75%; the specificity to healthy controls is 100%. In contrast to our study, the previous study found significant differences between lymph node positive and negative as well as metastatic and non-metastatic stages. We could show that CADM1 is already commonly methylated in early-stage tumors. Although a slightly lower level of methylation was found for stage I-II (63%) compared to  $\geq$ stage III patients (85%), no significance was obtained ( $p = 0.855$ ). Obviously larger studies are needed to verify these results.

We were able to monitor the treatment of three progressive cervical cancer patients. The results show that although the assay is very robust on its own, the use of the combination of the two methylation markers succeeds over one alone. This was primarily seen for both markers in Pat\_2 and Pat\_3 while in Pat\_1, only one of the markers (CADM1) came up. Missing detection of methylated ctDNA at this “non-tumor-free” disease stage may most likely be caused by a ctDNA amount below our detection limit potentially due to ongoing therapy effects. These promising findings need to be validated in a larger follow-up cohort.

By combining both markers, our assay achieved a sensitivity of 83.3% in detecting cervical cancer while maintaining a high specificity of 95.5% towards HD. Other methylation analyses already performed in liquid biopsy on cervical cancer show similar results compared to ours. Human maternally expressed gene 3 (MEG3) reached a sensitivity of 90.5%; E-cadherin (CDH1) of 42% [36,37]. Regarding the results from methylation analyses, it is worthwhile to compare them also with those of other types of liquid biopsy analyses in cervical cancer. To date, these have mainly involved the analysis of tumor-specific mutations. An analysis of two phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA) mutations by digital droplet PCR yielded a sensitivity of 22.2% [38]; further analyses by next generation sequencing (NGS) yielded sensitivities ranging between 31–35% for different mutations [39]. In another study, not correcting for possible clonal hematopoiesis mutation rates, up to 83% was reported [40]. The comparison shows that in terms of sensitivity, methylation analyses may be superior to ctDNA mutation analyses. As a limitation of our study, the small and heterogeneous group of cervical cancer patients should be mentioned. Nevertheless, our study shows that the assay seems feasible for multiple stages of this disease. Moreover, further analyses including patients with precancerous lesions should also be performed as methylation of these markers has been shown to also be relevant in pre-cancer stages.

## 5. Conclusions

We have successfully been able to carry out a combined marker methylation analysis in liquid biopsy of cervical cancer patients. With detection limits down to 0.1% (CADM1) and 0.2% (MAL), these markers have the potential to serve as sensitive additional and easily applicable tools in cervical cancer management. Further in-depth and larger studies will be necessary to fully explore the capability of these markers in liquid biopsy in different clinical settings. Monitoring disease progress and therapy response by a simple blood draw seem within reach by subsequent CADM1/MAL methylation marker analysis. This may support gynecologic care of cervical cancer in the future.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14163954/s1>, Table S1: Clinical characteristics of cervical dysplasia patients; Table S2: Clinical characteristics of cervical cancer patients; Table S3: CADM1, MAL, and CADM1 and/or MAL methylation status of blood samples from 24 cervical cancer patients in relation to histological type; Table S4: CADM1, MAL, and CADM1 and/or MAL methylation status of blood samples from 24 cervical cancer patients in relation to tumor grade; Table S5: CADM1, MAL, and CADM1 and/or MAL methylation status of blood samples from 24 cervical cancer patients in relation to HPV status. Reference [41] is cited in Supplementary Materials.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.L., L.W., K.E. and H.W.; methodology, M.L., J.H. and J.K.; validation, M.L., J.H., H.W. and K.E.; formal analysis, M.L., H.W., K.E. and J.H.; investigation, M.L., L.W. and A.L.B.; resources, L.W., K.P. (Katharina Prieske), A.J., L.O.-F., Y.G., A.L.B. and S.P.; data curation, M.L., H.W., K.E. and L.W.; writing—original draft preparation, M.L., K.E. and H.W.; writing—review and editing, all authors; visualization, M.L.; supervision, H.W., K.E., K.P. (Klaus Pantel) and B.S.; project administration, K.E. and H.W.; funding acquisition, K.E. and H.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by AiF GmbH, a hypothecated project-executing organization of the BMBF, Germany (K.E. and H.W.), #ZF4665601SB8, and Werner Otto Stiftung (J.H.), Promotionstipendium.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Ärztekammer Hamburg (No. PV-5392, 6 December 2016).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** All methods and data have been presented in the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Available online: <https://gco.iarc.fr/today> (accessed on 6 July 2022).
2. Bosch, F.X.; Lorincz, A.; Muñoz, N.; Meijer, C.J.; Shah, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* **2002**, *55*, 244–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Arbyn, M.; Bryant, A.; Beutels, P.; Martin-Hirsch, P.P.; Paraskeva, E.; Van Hoof, E.; Steben, M.; Qiao, Y.; Zhao, F.H.; Schneider, A.; et al. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2011**, *5*, CD009069. [[CrossRef](#)]
4. Bruni, L.; Saura-Lázaro, A.; Montoliu, A.; Brotons, M.; Alemany, L.; Diallo, M.S.; Afsar, O.Z.; LaMontagne, D.S.; Mosina, L.; Contreras, M.; et al. HPV vaccination introduction worldwide and WHO and UNICEF estimates of national HPV immunization coverage 2010–2019. *Prev. Med.* **2021**, *144*, 106399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. World Health Organization. *Global Strategy to Accelerate the Elimination of Cervical Cancer as a Public Health Problem*; WHO: Geneva, Switzerland, 2020.
6. Heitzer, E.; Perakis, S.; Geigl, J.B.; Speicher, M.R. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. *NPJ Precis. Oncol.* **2017**, *1*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Keller, L.; Belloum, Y.; Wikman, H.; Pantel, K. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: Mutation detection and beyond. *Br. J. Cancer* **2021**, *124*, 345–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Chan, K.C.A.; Woo, J.K.S.; King, A.; Zee, B.C.Y.; Lam, W.K.J.; Chan, S.L.; Chu, S.W.I.; Mak, C.; Tse, I.O.L.; Leung, S.Y.M.; et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 513–522. [[CrossRef](#)]
9. Herbst, J.; Pantel, K.; Effenberger, K.; Wikman, H. Clinical applications and utility of cell-free DNA-based liquid biopsy analyses in cervical cancer and its precursor lesions. *Br. J. Cancer*, **2022**, *online ahead of print*. [[CrossRef](#)]
10. Liu, M.C.; Oxnard, G.R.; Klein, E.A.; Swanton, C.; Seiden, M.V. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 745–759. [[CrossRef](#)]
11. Fang, J.; Zhang, H.; Jin, S. Epigenetics and cervical cancer: From pathogenesis to therapy. *Tumour. Biol.* **2014**, *35*, 5083–5093. [[CrossRef](#)]
12. El Aliani, A.; El-Abid, H.; El Mallali, Y.; Attaleb, M.; Ennaji, M.M.; El Mzibri, M. Association between Gene Promoter Methylation and Cervical Cancer Development: Global Distribution and A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2021**, *30*, 450–459. [[CrossRef](#)]
13. Kelly, H.; Benavente, Y.; Pavon, M.A.; De Sanjose, S.; Mayaud, P.; Lorincz, A.T. Performance of DNA methylation assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Cancer* **2019**, *121*, 954–965. [[CrossRef](#)]
14. Kuramochi, M.; Fukuhara, H.; Nobukuni, T.; Kanbe, T.; Maruyama, T.; Ghosh, H.P.; Pletcher, M.; Isomura, M.; Onizuka, M.; Kitamura, T.; et al. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 427–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Takai, Y.; Miyoshi, J.; Ikeda, W.; Ogita, H. Nectins and nectin-like molecules: Roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 603–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lara-Lemus, R. On The Role of Myelin and Lymphocyte Protein (MAL) In Cancer: A Puzzle With Two Faces. *J. Cancer* **2019**, *10*, 2312–2318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hesselink, A.T.; Heideman, D.A.; Steenbergen, R.D.; Coupé, V.M.; Overmeer, R.M.; Rijkaart, D.; Berkhof, J.; Meijer, C.J.; Snijders, P.J. Combined promoter methylation analysis of CADM1 and MAL: An objective triage tool for high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2459–2465. [[CrossRef](#)]
18. Del Pino, M.; Sierra, A.; Marimon, L.; Martí Delgado, C.; Rodríguez-Trujillo, A.; Barnadas, E.; Saco, A.; Torné, A.; Ordi, J. CADM1, MAL, and miR124 Promoter Methylation as Biomarkers of Transforming Cervical Intraepithelial Lesions. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2262. [[CrossRef](#)]
19. Holubekova, V.; Mersakova, S.; Grendar, M.; Snahnicanova, Z.; Kudela, E.; Kalman, M.; Lasabova, Z.; Danko, J.; Zubor, P. The Role of CADM1 and MAL Promoter Methylation in Inflammation and Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Genet. Test Mol. Biomark.* **2020**, *24*, 256–263. [[CrossRef](#)]
20. Salta, S.; Maia-Moço, L.; Estevão-Pereira, H.; Sequeira, J.P.; Vieira, R.; Bartosch, C.; Petronilho, S.; Monteiro, P.; Sousa, A.; Baldaque, I.; et al. Performance of DNA methylation-based biomarkers in the cervical cancer screening program of northern Portugal: A feasibility study. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 1916–1925. [[CrossRef](#)]
21. Bhatla, N.; Aoki, D.; Sharma, D.N.; Sankaranarayanan, R. Cancer of the cervix uteri. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2018**, *143*, 22–36. [[CrossRef](#)]
22. Overmeer, R.M.; Louwers, J.A.; Meijer, C.J.; van Kemenade, F.J.; Hesselink, A.T.; Daalmeijer, N.F.; Wilting, S.M.; Heideman, D.A.; Verheijen, R.H.; Zaal, A.; et al. Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-)malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 2218–2225. [[CrossRef](#)]
23. Cailleau, R.; Young, R.; Olivé, M.; Reeves, W.J., Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* **1974**, *53*, 661–674. [[CrossRef](#)]
24. Fogh, J.; Wright, W.C.; Loveless, J.D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1977**, *58*, 209–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Rheinwald, J.G.; Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **1975**, *6*, 331–343. [[CrossRef](#)]
26. Rong, G.; Zhang, M.; Xia, W.; Li, D.; Miao, J.; Wang, H. Plasma CADM1 promoter hypermethylation and D-dimer as novel metastasis predictors of cervical cancer. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2019**, *45*, 1251–1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Colombo, N.; Dubot, C.; Lorusso, D.; Caceres, M.V.; Hasegawa, K.; Shapira-Frommer, R.; Tewari, K.S.; Salman, P.; Hoyos Usta, E.; Yañez, E.; et al. Pembrolizumab for Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1856–1867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zummeren, M.V.; Kremer, W.W.; Leeman, A.; Bleeker, M.C.G.; Jenkins, D.; Sandt, M.V.; Doorbar, J.; Heideman, D.A.M.; Steenbergen, R.D.M.; Snijders, P.J.F.; et al. HPV E4 expression and DNA hypermethylation of CADM1, MAL, and miR124-2 genes in cervical cancer and precursor lesions. *Mod. Pathol.* **2018**, *31*, 1842–1850. [[CrossRef](#)]
29. Heller, G.; Fong, K.M.; Girard, L.; Seidl, S.; End-Pfützenreuter, A.; Lang, G.; Gazdar, A.F.; Minna, J.D.; Zielinski, C.C.; Zöchbauer-Müller, S. Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene* **2006**, *25*, 959–968. [[CrossRef](#)]
30. Heller, G.; Geradts, J.; Ziegler, B.; Newsham, I.; Filipits, M.; Markis-Ritzinger, E.M.; Kandioler, D.; Berger, W.; Stiglbauer, W.; Depisch, D.; et al. Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* **2007**, *103*, 283–291. [[CrossRef](#)]
31. Chen, K.; Wang, G.; Peng, L.; Liu, S.; Fu, X.; Zhou, Y.; Yu, H.; Li, A.; Li, J.; Zhang, S.; et al. CADM1/TSLC1 inactivation by promoter hypermethylation is a frequent event in colorectal carcinogenesis and correlates with late stages of the disease. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 266–273. [[CrossRef](#)]
32. Jansen, M.; Fukushima, N.; Rosty, C.; Walter, K.; Altink, R.; Heek, T.V.; Hruban, R.; Offerhaus, J.G.; Goggins, M. Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. *Cancer Biol. Ther.* **2002**, *1*, 293–296. [[CrossRef](#)]
33. Fukuhara, H.; Kuramochi, M.; Fukami, T.; Kasahara, K.; Furuhashi, M.; Nobukuni, T.; Maruyama, T.; Isogai, K.; Sekiya, T.; Shuin, T.; et al. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jpn J. Cancer Res.* **2002**, *93*, 605–609. [[CrossRef](#)]
34. Guerrero-Preston, R.; Hadar, T.; Ostrow, K.L.; Soudry, E.; Echenique, M.; Ili-Gangas, C.; Pérez, G.; Perez, J.; Brebi-Mieville, P.; Deschamps, J.; et al. Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 505–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Agostini, M.; Enzo, M.V.; Bedin, C.; Belardinelli, V.; Goldin, E.; Del Bianco, P.; Maschietto, E.; D'Angelo, E.; Izzi, L.; Saccani, A.; et al. Circulating cell-free DNA: A promising marker of regional lymphonode metastasis in breast cancer patients. *Cancer Biomark.* **2012**, *11*, 89–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zhang, J.; Yao, T.; Lin, Z.; Gao, Y. Aberrant Methylation of MEG3 Functions as a Potential Plasma-Based Biomarker for Cervical Cancer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Widschwendter, A.; Ivarsson, L.; Blassnig, A.; Müller, H.M.; Fiegl, H.; Wiedemair, A.; Müller-Holzner, E.; Goebel, G.; Marth, C.; Widschwendter, M. CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. *Int. J. Cancer* **2004**, *109*, 163–166. [[CrossRef](#)]
38. Chung, T.K.H.; Cheung, T.H.; Yim, S.F.; Yu, M.Y.; Chiu, R.W.K.; Lo, K.W.K.; Lee, I.P.C.; Wong, R.R.Y.; Lau, K.K.M.; Wang, V.W.; et al. Liquid biopsy of PIK3CA mutations in cervical cancer in Hong Kong Chinese women. *Gynecol. Oncol.* **2017**, *146*, 334–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tian, X.; Ge, D.; Zhang, F.; Zhang, B.; Bai, W.; Xu, X.; Li, Z.; Cao, Y.; Li, P.; Zou, K.; et al. Dynamic analysis of circulating tumor DNA to predict prognosis and monitor therapeutic response in metastatic relapsed cervical cancer. *Int. J. Cancer* **2021**, *148*, 921–931. [[CrossRef](#)]
40. Lee, S.Y.; Chae, D.K.; Lee, S.H.; Lim, Y.; An, J.; Chae, C.H.; Kim, B.C.; Bhak, J.; Bolser, D.; Cho, D.H. Efficient mutation screening for cervical cancers from circulating tumor DNA in blood. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 694. [[CrossRef](#)]
41. Barnes, B.; Kraywinkel, K.; Nowossadeck, E.; Schönfeld, I.; Starker, A.; Wienecke, A.; Wolf, U. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*; Robert Koch-Institut: Berlin, Germany, 2016.

## 2. Zusammenfassende Darstellung der Originalarbeit

### 2.1 Einleitung

Das Zervixkarzinom ist der fünfthäufigste maligne Tumor bei Frauen in Deutschland. 2018 erkrankten hier 4.320 Frauen an diesem Karzinom; 1.612 verstarben (Erdmann et al., 2021). In insgesamt 41 Entwicklungs- und Schwellenländern Afrikas, Asiens, Nord- und Südamerikas ist das Zervixkarzinom die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau (Ferlay et al., 2020).

Bei Beginn der Datenerhebung in Deutschland durch ein bundesweites Krebsregister 1980 lag die Anzahl an Neuerkrankungen in Deutschland noch bei circa 9.500 Patientinnen (Bertz et al., 2010). Dieser zu beobachtende Rückgang ist zum Großteil auf das in den 1970er Jahren eingeführte Früherkennungsprogramm im Sinne einer Sekundärprävention mittels Abstrich nach Papanicolaou (Pap-Abstrich) zurückzuführen (Bertz et al., 2010). Bei Frauen über 35 wird der Pap-Abstrich inzwischen durch eine Testung auf eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) ergänzt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF), 2020). Über 95% der Zervixkarzinome stehen in direkter Assoziation zu einer HPV-Infektion mit HPV *high-risk* Typen (Bosch et al., 2002). Somit stellt eine entsprechende Infektion mit Abstand den größten Risikofaktor dar. In Bezug auf die Inzidenz wird zudem die Primärprävention der Erkrankung durch eine Impfung gegen HPV voraussichtlich an Relevanz zunehmen. Im Jahr 2007 erfolgte durch die Ständige Impfkommission in Deutschland die Impfempfehlung für Mädchen zwischen zwölf und 17 Jahren (STIKO, 2007). Damals erstmalig geimpfte Frauen sind 2023 zwischen 28 und 33 Jahren alt und erreichen damit in zwei bis sechs Jahren die Altersgruppe mit der 2018 höchsten Inzidenz; 18,1 pro 100.000 Einwohner\*innen im Alter zwischen 35 und 39 Jahren (Erdmann et al., 2021). Aktuelle Daten zur Wirksamkeit der HPV-Impfungen aus Schweden zeigen, dass eine Impfung gegen die HPV-Typen 16 und 18, die vor Vollendung des 17. Lebensjahrs erfolgte, das Erkrankungsrisiko um 88% senken konnte (Lei et al., 2020).

Aus vielfältigen Gründen lag die Impfquote 2020 in Deutschland jedoch nur bei 54,1% und eine regelmäßige Teilnahme am Früherkennungsprogramm erfolgte im Jahr 2016 nur von 47% der Frauen (Rieck et al., 2022, Tillmanns et al., 2019). Hier besteht also weiteres Potenzial zur Senkung der Inzidenzen vom Zervixkarzinom und seinen Vorstufen. Dieses sollte zum einen über intensive Aufklärung und zum anderen über möglichst niedrigschwellige diagnostische Angebote ausgeschöpft werden. Ein solches Angebot könnte die venöse Blutentnahme darstellen. Diese erfolgt insbesondere auch in allgemeinmedizinischen Praxen alltäglich und bei entsprechendem Risikoprofil der Patientinnen (bspw. ungeimpft und/oder keine Teilnahme an der gynäkologischen



Vorsorge) könnte schon die Blutentnahme im Rahmen des *Check-up 35* regelhaft um eine „Zervixkarzinomdiagnostik“ erweitert werden. Aktuell gibt es jedoch keine Verfahren, die über eine Blutentnahme das Risiko eines Zervixkarzinoms ausreichend sensitiv und spezifisch beziffern können. Diese Lücke könnte durch das Feld der *Liquid Biopsy* geschlossen werden; insbesondere durch die Analyse von im Blut zirkulierender, zellfreier (cf) Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Keller et al., 2021, Heitzer et al., 2017). Ein Anteil dieser DNA besteht bei Tumorpatient\*innen aus der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) (Song et al., 2022). Analysen dieser erhalten aktuell immer mehr Einzug in die klinische Praxis. So konnte gezeigt werden, dass Patient\*innen mit Kolonkarzinom Stadium II von einer ctDNA-Analyse gesteuerten postoperativen Chemotherapie profitieren (Tie et al., 2022).

In Bezug zum Zervixkarzinom ist bekannt, dass Cytosin-Methylierungen im Bereich von sogenannten Cytosin-Guanin-Dinukleotid (CpG)-Inseln in den regulatorischen Arealen von Tumorsuppressorgenen ein molekularpathologisch häufiges Ereignis in dessen Entstehung darstellen (Fang et al., 2014). Eine hierfür etablierte Methode stellt die sogenannte quantitative methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (qMSP) dar, bei der nach einer Bisulfitkonversion und dem Einsatz entsprechender *Primer* nur methylierte Gensegmente vervielfältigt und somit detektiert werden können (Herman et al., 1996).

So konnten Methylierungen definierter CpGs der Tumorsuppressorgene *cell adhesion molecule 1 (CADM1)* und *myelin and lymphocyte protein (MAL)* in Plattenepithelkarzinomgewebe der Zervix in 72% bzw. in 96% der Fälle nachgewiesen werden (Kuramochi et al., 2001, Lara-Lemus, 2019, Overmeer et al., 2011). Mindestens eines der beiden Tumorsuppressorgene lag in 99% der Fälle methyliert vor; dies konnte mit geringeren Anteilen auch in Vorläuferläsionen nachgewiesen werden; bei gesunden Patientinnen waren die entsprechenden CpGs nicht methyliert (Overmeer et al., 2011).

Diese Daten machen die Methylierungen von *CADM1* und *MAL* zu vielversprechenden diagnostischen Zielen in der *Liquid Biopsy* des Zervixkarzinoms. Insbesondere in Bezug zur möglichen Sensitivität und Spezifität zur Abgrenzung von gesunden Probandinnen könnte ein Nachweis dieser Methylierungen an der cfDNA sowohl einen Baustein zur Zervixkarzinomdiagnostik als auch zum Zervixkarzinommonitoring bilden. So soll diese Arbeit die Fragen ergründen, ob mittels qMSP eine Detektion von *CADM1*- und *MAL*-Methylierungen auch in cfDNA-Proben von Zervixkarzinompatientinnen technisch möglich ist und ob entsprechende Ergebnisse sinnvoll in den klinischen Kontext einzuordnen sind.

## 2.2 Material und Methoden

Wie in Leffers et al. bereits beschrieben, wurden folgende Materialien und Methoden verwendet (Leffers et al., 2022).

### 2.2.1 Patientinnenkohorte

Es wurden drei Patientinnenkohorten gebildet. Die erste Kohorte setzte sich aus

Tabelle 1: Klinische Merkmale der CIN-Kohorte.

		Anzahl (N=52)	%
Alter <sup>a</sup>	≤35	20	38,5%
	>35	32	61,5%
Schweregrad der Dysplasie	CIN 2	10	19,2%
	CIN 3	42	80,8%
Pap- Klassifikation	I	1	1,9%
	II-a	6	11,5%
	II-p	1	1,9%
	II-g	1	1,9%
	III-p	2	3,9%
	IIID1	4	7,7%
	IIID2	9	17,3%
	IVa-p	24	46,2%
	IVa-g	1	1,9%
	IVb-p	1	1,9%
HPV-Status	Positiv für einen Typen	21	40,4%
	Positiv für multiple Typen	28	53,8%
	Negativ	3	5,8%
Häufigste Typen	HPV 16	24	46,2%
	HPV 18	5	9,6%
	HPV 31	4	7,7%
HPV-Impfung	Nicht geimpft	42	80,8%
	Geimpft <sup>b</sup>	6	11,5%
	Unbekannt	4	7,7%
<p>a. Mittleres Erkrankungsalter in Deutschland liegt bei 35 Jahren (Barnes et al., 2016).</p> <p>b. Alle sechs Patientinnen waren positiv für HPV: Vier Patientinnen waren positiv für einen HPV-Typen, gegen den sie nicht geimpft waren; eine Patientin hat die Impfung erst nach dem empfohlenen Zeitpunkt erhalten; eine Patientin hatte multiple HPV-Infektionen im Zuge einer AML und entsprechender immundeprimierter Phase.</p>			

Patientinnen zusammen, die an Präkanzerosen des Zervixkarzinoms erkrankt waren. Von diesen Patientinnen wurde durch qualifizierte Fachärztinnen Abstrichmaterial der Zervix gewonnen. Diese Kohorte umfasste insgesamt 52 Patientinnen mit zervikaler intraepithelialer Neoplasie ((CIN)-Kohorte). Die zweite Kohorte wurde aus 24 Zervixkarzinompatientinnen gebildet (Karzinom-Kohorte), von denen mittels peripherer venöser Blutentnahme Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Blutproben gesammelt wurden. Die dritte Kohorte bildete die Kontrollgruppe aus 30 gesunden Probandinnen (*healthy donor* (HD)-Kohorte), von denen ebenfalls peripher-venöse EDTA-Blutproben gesammelt wurden. Das Durchschnittsalter in der CIN-Kohorte lag bei 39,6 Jahren. Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, zeigten zuvor durchgeführte zytologische Untersuchungen aus Zervixabstrichen bei 37 (71,2%) Patientinnen mindestens einen suspekten Befund von Pap IIID2 oder höher (nach der Münchner Nomenklatur III (Griesser et al., 2013)). 28 Patientinnen (53,8%) hatten multiple HPV-Infektionen, 21 (40,4%) waren mit einem HPV-Typen besiedelt und drei (5,8%) waren HPV-negativ. Dabei kam HPV-Typ 16 mit 46,2% am häufigsten vor.

Der Großteil der Patientinnen war gegen keinen HPV-Typen geimpft (80,8%).

Tabelle 2: Klinische Merkmale der Karzinom-Kohorte

		Anzahl (N=24)	%
Alter <sup>a</sup>	≤55	18	75,0%
	>55	6	25,0%
TNM	T1aN0M0	4	16,7%
	T1bN0M0	5	20,8%
	T2bN0M0	2	8,3%
	T1-4N1M0	9	37,5%
	T1-4N0-1M1	4	16,7%
FIGO-Stadium	IA	4	16,7%
	IB	5	20,8%
	IIB	2	8,3%
	IIIC	9	37,5%
	IVB	4	16,7%
Tumorgrad	G1	2	8,3%
	G2	14	58,3%
	G3	6	25,0%
	Unbekannt	2	8,3%
Histologie	Plattenepithelkarzinom	22	91,7%
	Adenokarzinom	2	8,3%
HPV-Status	Positiv	17	70,8%
	Negativ	1	4,2%
	Unbekannt	6	25,0%
Zeitpunkt der Blutentnahme	Vor der Therapie <sup>b</sup>	12	50,0%
	Während der Therapie <sup>c</sup>	12	50,0%

a. Mittleres Erkrankungsalter in Deutschland liegt bei 55 Jahren (Barnes et al., 2016).  
b. Neun Erstdiagnosen, drei Rezidive.  
c. Fünf unter Radiochemotherapie; fünf unter Chemotherapie; zwei zwischen stattgehabter Tumor-OP (lokal R0) und Radiochemotherapie.

Das Durchschnittsalter in der Karzinom-Kohorte lag bei 46,2 Jahren. Es waren die Tumorstadien nach der Klassifikation der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) IA (n=4; 16,7%), IB (n=5; 20,8%), IIB (n=2; 8,3%), IIIC (n=9; 37,5%) und IVB (n=4; 16,7%) vertreten (entsprechend der FIGO-Klassifikation von 2019 (Bhatla et al., 2019)). Bei 22 Patientinnen (91,7%) handelte es sich um ein Plattenepithel-; bei zwei Patientinnen (8,3%) um ein Adenokarzinom. Bei 17 Patientinnen (70,8%) war eine HPV-Infektion vorbeschrieben; eine Patientin (4,2%) war HPV-negativ (Tab. 2). Darüber hinaus ließ sich die Kohorte in zwei Subgruppen aufteilen: Von zwölf Patientinnen wurde die Blutprobe vor dem Start einer Therapie gewonnen; bei den restlichen zwölf Patientinnen geschah dies während eines laufenden Therapieregimes. Für drei Patientinnen wurden außerdem *Follow-up*-Proben im Therapieverlauf gesammelt und analysiert.

Die HD-Kohorte bildete sich aus 30 gesunden Blutspenderinnen des Instituts für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Hier lag das Durchschnittsalter bei 38,2 Jahren.

Alle Patientinnen und Probandinnen wurden über die Studie und die Verwendung ihrer Proben aufgeklärt. Eine entsprechende ethische Überprüfung wurde durch die lokale Ethikkommission durchgeführt und die Verfahrensweise wurde genehmigt (Nr. PV-5392, 06/12/2016, Ärztekammer Hamburg).

### 2.2.2 Probenverarbeitung

Aus den gesammelten Blutproben wurde die cfDNA extrahiert; aus den Abstrichproben wurde ebenfalls DNA extrahiert (smDNA). Zunächst wurde das Blutplasma in einem zweifachen Zentrifugationsverfahren von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Anschließend erfolgte eine Lagerung des Plasmas bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung. Die cfDNA-Extraktion aus den aufgetauten Plasmaproben erfolgte mittels *QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll. Die DNA aus den Zervixabstrichen wurde direkt am Tag der Probengewinnung mittels *QIAmp MinElute Media Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Das Herstellerprotokoll wurde für den Einsatz größerer Probenvolumina angepasst, sodass insgesamt 500 µL Abstrichemulsion eingesetzt werden konnten. Es erfolgte eine Quantifizierung der DNA-Konzentration mittels *Qubit 4* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Anschließend wurden sowohl die cfDNA- als auch die smDNA-Proben bei -20°C gelagert.

### 2.2.3 Quantitative methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion

Zur Detektion von CpG-Methylierungen der Gene *CADM1* und *MAL* wurde eine qMSP an der extrahierten cf- und smDNA durchgeführt (Herman et al., 1996). Zunächst mussten dafür die DNA-Proben bisulfitkonvertiert werden. Dies erfolgte durch das *EZ DNA Methylation-Lightning Kit* (Zymo Research, Irvine, CA, USA) nach Herstellerprotokoll. Für die darauffolgende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden *Primer*, wie von Overmeer et al. beschrieben, (*CADM1 M12* und *MAL M2*) synthetisiert und entsprechend mit Fluorophoren markiert (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) (Overmeer et al., 2011). Die *Primer* der Zielgene *CADM1* und *MAL* wurden dabei am 5'-Ende mit Carboxyfluorescein (FAM) markiert; das Kontrollgen *beta-Aktin (ACTB)* mit 5'-Cyanin5 (Cy5). Entsprechende *Quencher* befanden sich am 3'-Ende (*Black Hole Quencher 1 (BHQ1)* zu Fam; *Black Berry Quencher (BBQ)* zu Cy-5). Bisulfitkonvertierte DNA aus MDA-MB-231 Zellen, die zuvor mittels CpG-Methyltransferase (M.SssI) vollständig CpG-methyliert wurde (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), diente als Positivkontrolle (Cailleau et al., 1974); als Negativkontrolle diente bisulfitkonvertierte DNA aus primären Keratinozyten für die *MAL*-Analysen bzw. aus CAMA-1 Zellen für die *CADM1*-Analysen (Fogh et al., 1977, Rheinwald and Green, 1975). Zusätzlich diente vollständig CpG-methylierte MDA-MB-231-Zell-DNA, die nicht bisulfitkonvertiert wurde, als Negativkontrolle; ebenso lag in jedem Lauf eine *no-template-control* vor. Als Reaktionskit wurde das *Epitect Methylight PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Die absolute Ausgangsmenge an DNA lag bei jeder Reaktion bei 10 ng. Die PCR erfolgte in einem 45-fachen, zweistufigen Zyklus wie vom Hersteller empfohlen mittels *BioRad CFX96 C1000 Touch-Thermocycler* (Biorad, Hercules, CA, USA). Die *Annealing-*

Temperatur der *Primer* lag bei *CADM1*-Analysen bei 60°C; bei *MAL*-Analysen bei 59°C. Bei diesen Analyseparametern konnte für die *CADM1*-qMSP ein Detektionslimit von 0,1% und für die *MAL*-qMSP von 0,2% methylierter zu nicht-methylierter DNA erreicht werden.

Die Patientinnenproben wurden mindestens als Duplikate – wenn es die vorhandene DNA-Menge erlaubte auch als Triplikate – sowohl auf *CADM1*- als auch *MAL*-Methylierungen getestet. Die Proben der HD-Kohorte konnten in der Regel auf Grund der geringen cfDNA-Menge im Plasma lediglich singularär entweder für *CADM1*- oder für *MAL*-Methylierungen analysiert werden; bei zwei Proben war es möglich, die Methylierung sowohl für *CADM1* als auch für *MAL* zu analysieren. Um eine ausreichend hohe Qualität der Ausgangs-DNA zu gewährleisten, gingen lediglich Proben in die Auswertung ein, die einen Ct-Wert kleiner 33 im Kontrollgen *ACTB* vorwiesen. Positiv gewertet wurde eine DNA-Probe, sobald eine der Reaktionen in der relativen Quantifizierung nach  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  über dem 90%-Konfidenzintervall zur Kontrollgruppe (HD-Kohorte) lag. So konnte ein optimales Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität erreicht werden.

#### 2.2.4 Statistische Auswertung

Die abschließende statistische Auswertung erfolgte mit *IBM SPSS Statistics 27*. Um signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten und Subgruppen in Bezug zur Häufigkeit der vorliegenden Methylierung zu ermitteln, wurde der  $\chi^2$ -Test mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  verwendet. Korrelationen von Ordinalvariablen (FIGO-Stadium und Tumorgrad für die Karzinom-Kohorte; CIN-Status und Pap-Status für die CIN-Kohorte) und metrischen Variablen (Alter) zur Häufigkeit der Methylierung wurden mit dem Spearman-Rho-Test analysiert. Außerdem wurde eine *receiver operating caharacteristic* (ROC)-Analyse für *CADM1* und/oder *MAL* (*CADM1/MAL*) als kombinierter Marker mit dem  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert als Testvariable durchgeführt, um Karzinompatientinnen und gesunde Probandinnen in den Plasmaproben zu unterscheiden.

### **2.3 Ergebnisse**

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse von Leffers et al. wie folgt darstellen (Leffers et al., 2022).

#### 2.3.1 Evaluation des angepassten qMSP-Assays an der CIN-Kohorte

Zur Validierung, ob der an *Liquid Biopsy* Bedingungen angepasste Assay auch in Patientenproben weiterhin vergleichbare Ergebnisse liefert, wurden 52 Zervixabstriche von CIN 2- und CIN 3-Patientinnen auf das Vorliegen von *CADM1*- und *MAL*-Methylierungen untersucht. Bei 38 dieser *high-grade* Dysplasie-Patientinnen (73,1%) wurde eine Methylierung des *CADM1*-Gens festgestellt; bei 25 Patientinnen (48,1%) eine Methylierung des *MAL*-Gens. Bei einer kombinierten Analyse von *CADM1* und *MAL* zeigte sich eine

Methylierung bei 45 Patientinnen (86,5%). Bei ausschließlicher Betrachtung der CIN 3-Patientinnen hatten 76,2% einen positiven *CADM1*-, 50,0% einen positiven *MAL*-, und 85,7% einen positiven *CADM1/MAL*-Methylierungsbefund.

### 2.3.2 qMSP an cfDNA-Proben der Karzinom- und HD-Kohorten

Von zehn HD-cfDNA-Proben, die auf eine *CADM1*-Methylierung getestet wurden, waren alle negativ; bei 22 HD-cfDNA-Proben, die auf eine *MAL*-Methylierung getestet wurden, war eine positiv. In der Karzinom-Kohorte waren von insgesamt 24 Patientinnen 18 (75,0%) positiv für eine *CADM1*-, 14 (58,3%) positiv für eine *MAL*- und 20 (83,3%) positiv für eine *CADM1/MAL*-Methylierung. Bei Betrachtung der Plattenepithelkarzinom-Subgruppe (n=22) waren in 86,4% der Fälle *CADM1/MAL*-Methylierungen nachweisbar. Bei den 17 Patientinnen mit gesichert positivem HPV-Befund konnten in 94,1% der Fälle *CADM1/MAL*-Methylierungen detektiert werden. Insgesamt konnten zwischen den Subgruppen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Es war lediglich eine schwache Korrelation zwischen dem *MAL*-Befund und dem Alter der Patientinnen zu beobachten (Korrelationskoeffizient = 0,476;  $p = 0,019$ ). Darüber hinaus war zu beobachten, dass in der cfDNA von Patientinnen in früheren Stadien ähnlich häufig eine *CADM1/MAL*-Methylierung messbar war wie in lymphogen metastasierten oder fernmetastasierten Stadien: 81,8% in Stadium IA-IIB; 88,9% in Stadium IIIC; 75,0% in Stadium IV. Zwischen therapienaiven Patientinnen und Patientinnen, die sich bereits in einem Therapieregime befanden, ließ sich rein deskriptiv eine Verminderung um 16,7 Prozentpunkte der *CADM1/MAL*-Methylierung von 91,7% auf 75,0% beobachten. In Abgrenzung zur HD-Kohorte waren die Unterschiede zur Karzinom-Kohorte signifikant:  $p < 0,001$  für *CADM1*-Methylierung;  $p = 0,003$  für *MAL*-Methylierung. Die ROC-Analyse zeigte für die *CADM1/MAL*-Methylierung eine *area under the curve* (AUC) von 0,872 (95%-Konfidenzintervall: 0,743–1,000).

### 2.3.3 Follow-up

Von drei Patientinnen der Karzinom-Kohorte wurden *Follow-up*-Proben gewonnen und analysiert. Bei der ersten Patientin war unter Progress der Erkrankung auch eine Veränderung des *CADM1*-Methylierungsstatus in der cfDNA zu messen. Initial war in einem ossär-metastasierten Stadium weder eine Methylierung in *MAL* noch in *CADM1* nachweisbar. Vier Monate später unter erwähntem Progress war eine Methylierung des *CADM1*-Gens zu detektieren.

Die zweite Patientin konnte insgesamt zehn Monate nachbeobachtet werden. Initial hatte die Patientin die Diagnose eines lokalen inoperablen Rezidivs, worauf sie an eine Studie zur Evaluation des *programmed cell death protein 1* (PD-1) -Inhibitors Pembrolizumab angeschlossen wurde (*Keynote-826* Studie) (Colombo et al., 2021). Sowohl vor Beginn der

Therapie mittels Carboplatin, Paclitaxel, Bevacizumab, und Pembrolizumab/Placebo als auch neun Monate darauf war in der cfDNA der Patientin in *MAL* und *CADM1* eine Methylierung nachweisbar. Einen Monat darauf wurde ein Progress der Erkrankung diagnostiziert.

Die dritte Patientin konnte ebenfalls zehn Monate nachbeobachtet werden. Bei einer Fernmetastase in Form eines befallenen Halslymphknotens wurde die Patientin ebenfalls an die *Keynote-826* Studie angeschlossen (Colombo et al., 2021). Es wurden Blutproben direkt vor Therapiebeginn, vier Monate später und neun Monate später gewonnen und analysiert. Zu Beginn waren Methylierungen in *CADM1* und *MAL* detektierbar. Nach fünf Monaten war dies nur noch für *CADM1* der Fall. Neun Monate nach Therapiebeginn waren wieder beide Gene methyliert messbar. Innerhalb des Beobachtungszeitraums wurde kein Progress der Erkrankung beschrieben.

## 2.4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es darzulegen, ob mittels qMSP eine Detektion von *CADM1*- und *MAL*- Methylierungen auch in cfDNA-Proben von Zervixkarzinompatientinnen technisch möglich ist und ob entsprechende Ergebnisse sinnvoll in einen klinischen Kontext einzuordnen sind. Die erste Herausforderung des Projektes stellte das Etablieren und Anpassen der qMSP dar, um die Durchführbarkeit in *Liquid Biopsy* möglich zu machen. Über M.SssI vollständig methylierte DNA erwies sich als stabile und zuverlässige Positivkontrolle. Für die Negativkontrollen galt es, Zelllinien ausfindig zu machen, deren *CADM1*- und *MAL*-Gene nicht methyliert vorlagen. Bei der CAMA-1 Zelllinie war dies für *CADM1* der Fall; für *MAL* jedoch nicht. Für die *MAL*-Analysen wurden, wie in Overmeer et al. beschrieben, primäre Keratinozyten verwendet (Overmeer et al., 2011). Eine der großen Herausforderungen in der *Liquid Biopsy* ist es, methodisch eine hohe Sensitivität bei zugleich sehr niedrigen Gesamtmengen an DNA zu erreichen (Keller et al., 2021). Um dies zu analysieren, wurden Verdünnungsreihen bei 10 ng Ausgangsmenge DNA durchgeführt. Bis zu einem Verhältnis von 0,1% methylierter DNA zu 99,9% nicht-methylierter DNA konnte die *CADM1*-Methylierung sicher nachgewiesen werden; für *MAL* galt dies bei einem Verhältnis von 0,2% methylierter DNA zu 99,8% nicht-methylierter DNA. Bei einem aus der Literatur bekannten Anteil krebsspezifischer Mutationen von 0,01% - 10% war dies zunächst ein akzeptables Ergebnis (Song et al., 2022).

Darauffolgend galt es zu zeigen, dass der angepasste Assay in Abstrichproben von CIN-Patientinnen vergleichbare Resultate, wie zuvor in Overmeer et al. beschrieben, liefern kann (Overmeer et al., 2011). Ausgangswerte aus der Arbeit von Overmeer et al. sind zum einen eine Rate von 93% *CADM1/MAL*-Methylierungen in CIN 3-Gewebeproben und zum anderen eine Rate von 76% in smDNA-Proben von CIN 3-Patientinnen (Overmeer et al.,

2011). Zur Evaluation der angepassten qMSP wurden smDNA-Proben von 52 *high-grade* Dysplasie-Patientinnen (42 CIN 3-, zehn CIN 2-Patientinnen) verwendet. Mit dem angepassten Assay ließ sich in dieser Arbeit bei 85,7% der CIN 3-Patientinnen eine *CADM1/MAL*-Methylierung detektieren. Die an *Liquid Biopsy* angepasste qMSP lag folglich 9,7 Prozentpunkte über den smDNA-Ergebnissen von Overmeer et al. und kam damit dem Ausgangswert von 93% *CADM1/MAL*-Methylierungen im Gewebe noch näher. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch in klinischen Proben bei sehr geringen DNA-Ausgangsmengen von nur 10 ng die qMSP weiterhin sehr zuverlässig und sensitiv funktioniert.

In den cfDNA-Proben der Plattenepithelkarzinom-Subgruppe ließ sich in 86,4% der Fälle eine *CADM1/MAL*-Methylierung detektieren. Die Daten von Overmeer et al. zeigen, dass in Gewebeproben 99% der Plattenepithelkarzinome der Zervix eine *CADM1/MAL*-Methylierung aufweisen (Overmeer et al., 2011). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht das Vorliegen der Methylierung im Tumor an sich, sondern vielmehr deren Detektierbarkeit in der cfDNA entscheidend für das Ergebnis der cfDNA-qMSP ist. Bezogen auf die Ergebnisse der durchgeführten Verdünnungsreihen müssen mindestens 0,02 ng der eingesetzten 10 ng cfDNA ctDNA sein, dessen Qualität ausreichend hoch für eine *in vitro* Replikation ist. In Bezug auf die Daten der Plattenepithelkarzinom-Subgruppe könnte dies bedeuten, dass in 12,6% der Fälle dies nicht der Fall war und der Anteil replizierbarer ctDNA die Detektionsschwelle unterschritten hat. Bislang sind die Mechanismen, die die Prozesse zur Freisetzung der ctDNA steuern, noch nicht gänzlich entschlüsselt (Palmirotta et al., 2018, Zhang et al., 2021). Es ist jedoch bekannt, dass die Menge der ctDNA von Faktoren wie dem Tumorzellen und den Raten an Zellteilung und Zelluntergang abhängt (Song et al., 2022).

Wie oben beschrieben war im Vergleich der smDNA-Analysen an der CIN-Kohorte zu Daten aus Gewebeproben ebenso eine Differenz zu beobachten. Man kann also annehmen, dass von Gewebeproben über smDNA hin zu cfDNA der Anteil qualitativ hochwertiger Tumor-DNA abnimmt. Daraus folgt für die Analysen in der *Liquid Biopsy* ein besonders hoher technischer Anspruch und in diesem Fall weiteres Optimierungspotenzial. Ein Ansatzpunkt wäre der im Laufe der qMSP durchgeführte Schritt der Bisulfitkonversion. Zum einen schädigt die Bisulfitkonversion an sich die eingesetzte DNA und zum anderen wird die DNA insgesamt instabiler, weil sie nach der Konversion in Einzelsträngen vorliegt (Grunau et al., 2001). So verringert sich entsprechend die Sensitivität des gesamten Verfahrens. Um diese Fehlerquelle möglichst klein zu halten, wurde auf lang etablierte, in Bezug auf die qMSP optimierte, kommerzielle *Kits* zurückgegriffen. Dennoch sind Überlegungen möglich, die Methode auf schonendere Verfahren, die beispielweise auf den Einsatz von Restriktionsenzymen oder methylierungsspezifischer *Bead*-Anreicherung



beruhen, umzustellen (Kurdyukov and Bullock, 2016). Ob damit eine höhere Sensitivität erreicht werden könnte, gälte es jedoch zunächst noch zu beweisen. Trennt man die Parameter *CADM1* und *MAL* auf, wird darüber hinaus klar, dass insbesondere die Detektion der *MAL*-Methylierung für den Verlust an Sensitivität verantwortlich ist. Hier waren nur 45,5% der cfDNA-Proben der Plattenepithelkarzinom-Subgruppe positiv. Im Vergleich zu den Daten aus Gewebeproben (96%) ist eine Differenz von 50,5 Prozentpunkten zu beobachten (Overmeer et al., 2011). Bei *CADM1* war keine Reduktion der Methylierungsrate im Vergleich zwischen den Daten aus Gewebe und den cfDNA-Proben zu beobachten (Overmeer et al., 2011). Ein möglicher Grund, weshalb der Sensitivitätsverlust bei der *MAL*-Methylierung in der Höhe zu beobachten war, könnte sein, dass der DNA-Abschnitt des *MAL*-Promotors weniger häufig aus dem Tumorgewebe freigesetzt wird als der DNA-Abschnitt des *CADM1*-Promotors. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass dieser hohe Sensitivitätsverlust auch in der Studie von Overmeer et al. zwischen Gewebeproben und Abstrichproben von CIN 3-Patientinnen beobachtet wurde (Overmeer et al., 2011). Hier fällt die Methylierungsrate von *MAL* von 81% im Gewebe auf 53,3% im Abstrich (Overmeer et al., 2011); in den CIN 3-smDNA-Proben dieser Arbeit lag die Rate bei 50%. Die Tatsache, dass dieser Sensitivitätsverlust sowohl beim Vergleich von Gewebe- vs. cfDNA bei Gebärmutterhalskrebs als auch bei Gewebe- vs. smDNA bei CIN 3 zu beobachten ist, könnte ein Hinweis darauf sein, dass der anvisierte *MAL*-Promotorabschnitt im Vergleich zum *CADM1*-Promotorabschnitt fragiler ist und somit amplifizierbare *MAL*-DNA-*Templates* in geringerer Anzahl zur Verfügung stehen. Dies bietet Raum für weitere technische Anpassungen und Entwicklungen, zum Beispiel beim *Primer*-Design, um einen stabileren DNA-Bereich ins Visier zu nehmen und so das Potenzial der *MAL*-Methylierung in Bezug auf die Sensitivität voll auszuschöpfen. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse der *Follow-up*-Proben von der dritten Patientin diskussionswürdig. Es ist wahrscheinlich, dass der Anteil der amplifizierbaren *MAL*-ctDNA im Laufe der Zeit unter die Empfindlichkeitsgrenze der qMSP fiel, sodass diese zwischenzeitlich nicht nachgewiesen werden konnte. Später könnte die ctDNA-Konzentration angestiegen sein und sich damit wieder über die Nachweisgrenze bewegt haben. Aufgrund der Komplexität der ctDNA-Freisetzung, insbesondere während der Therapie, kann eine genaue Ursache nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Argumentativ stehen sich höhere ctDNA-Konzentrationen auf Grund des Tumorwachstums bei fortschreitender Erkrankung und höhere ctDNA-Konzentrationen auf Grund des Zelltods bei wirksamer Chemotherapie gegenüber (Palmirotta et al., 2018, Zhang et al., 2021, Song et al., 2022).

Die Spezifität der cfDNA-qMSP lag in Abgrenzung zu den HD-Proben bei 95,5%; vergleichend lag die Positivitätsrate in Gewebeproben von gesunden Probandinnen in der

Arbeit von Overmeer et al. bei 0% (Overmeer et al., 2011). Für die klinische Diagnostik ist dies zunächst ein gutes Fundament. Von besonderer klinischer Relevanz sind darüber hinaus Marker, die spezifisch für eine Tumorentität sind. In Bezug dazu zeigen Daten aus der Literatur, dass dies für *CADM1* und *MAL* nicht der Fall ist. Methylierungen dieser Gene konnten in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen werden (Lara-Lemus, 2019, Heller et al., 2006, Heller et al., 2007, Chen et al., 2011, Jansen et al., 2002, Fukuhara et al., 2002). In Bezug auf das Potenzial der *CADM1/MAL*-Methylierung als Marker zur Diagnostik des Zervixkarzinoms ist dennoch festzuhalten, dass auch in cfDNA-Proben noch asymptomatischer Patientinnen im FIGO Stadium IA in vier von vier Fällen eine *CADM1/MAL*-Methylierung nachgewiesen werden konnte. Um den Nutzen zur vollständigen Früherkennung abschätzen zu können, fehlen jedoch weitergehende Analysen an den Vorläuferläsionen des Zervixkarzinoms. Bei CIN-Läsionen, die noch kein invasives Wachstum zeigen, ist jedoch davon auszugehen, dass der Anteil an ctDNA im Vergleich zum invasiven Zervixkarzinom weiter abnimmt. Der bereits in diesen Analysen beobachtete Sensitivitätsverlust im Vergleich zu den Daten an Gewebeproben könnte darauf hindeuten, dass die Detektionsgrenze der hier angewandten qMSP von 0,2% nicht sensitiv genug sein könnte, um eine ausreichend sichere Detektion der *CADM1/MAL*-Methylierung in CIN-cfDNA-Proben zu gewährleisten.

Abseits vom Feld der Früherkennung birgt *Liquid Biopsy* ebenfalls das Potenzial des Tumormonitorings (Keller et al., 2021). Hier zeigte die Arbeit von Rong et al., dass mittels *CADM1*-qMSP an cfDNA-Proben quantifizierbare Ergebnisse generiert werden konnten. So konnte diese Gruppe zeigen, dass bei lymphogen metastasierten und fernmetastasierten Zervixkarzinompatientinnen der Anteil *CADM1*-methylierter DNA in den cfDNA-Proben signifikant höher war als bei nicht metastasierten Patientinnen und darüber hinaus der Anteil von *CADM1*-methylierter DNA in cfDNA-Proben von Zervixkarzinompatientinnen im Vergleich zum Anteil in cfDNA-Proben von CIN-Patientinnen signifikant höher war (Rong et al., 2019). Vergleichend dazu konnte in dieser Arbeit keine sichere Quantifizierung der Methylierungen erfolgen, da zwischen den Ct-Werten der Replika in den cfDNA-Proben eine zu hohe Abweichung zu beobachten war. Dennoch konnten sichere binäre Daten erhoben werden, die jedoch mit entsprechender Sensitivität und Spezifität nur die Aussage erlauben, ob ein Tumor vorhanden ist oder nicht.

Es lässt sich abschließend festhalten, dass in dieser Arbeit erstmals eine kombinierte Detektion von *CADM1/MAL*-Methylierungen an cfDNA-Proben von Zervixkarzinompatientinnen technisch gelungen ist und mit einer Sensitivität von 83,3% und einer Spezifität gegenüber gesunden Probandinnen von 95,5% klinisch relevante und nachvollziehbare Ergebnisse erzielt werden konnten. So konnte insgesamt ein weiterer Grundstein für aufbauende *Liquid Biopsy* Analysen am Zervixkarzinom gelegt werden.

Um einen Transfer in den klinischen Alltag möglich zu machen, sind jedoch weitere Schritte notwendig. So könnte sich die Ergänzung durch weitere Gene und somit das Erheben eines breiten Methylierungsmusters lohnen, um ein breites Spektrum von Tumoren spezifisch voneinander trennen zu können (Song et al., 2022). Darüber hinaus sind zur Ausschöpfung des Potenzials in puncto Tumormonitoring zunächst weitere methodische Optimierungen notwendig, um eine sichere Quantifizierung der Methylierungen zu ermöglichen; in puncto Früherkennung sind weitergehende patientenreichere Studien insbesondere auch an den Vorläuferläsionen notwendig, die ggf. auf noch sensitivere Verfahren zurückgreifen.

### 3. Zusammenfassung

In Deutschland ist das Zervixkarzinom die fünfthäufigste bösartige Tumorentität der Frau. Hauptrisikofaktor ist hierbei eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) vom *high-risk* Typ. Bei einer großen HPV-Impflücke und Teilnahmeraten von circa 47% am Vorsorgeprogramm gibt es in Deutschland Potenzial zur Verbesserung der Versorgung. Dieses Potenzial könnte zum Teil durch niedrighwellige präventive diagnostische Angebote, die beispielsweise über eine venöse Blutentnahme umgesetzt werden könnten, ausgeschöpft werden. Ein Weg hin zu solch einem Angebot stellt das Methodenfeld der *Liquid Biopsy* dar, bei der zum Beispiel über die Analyse von zellfreier, im Blut zirkulierender DNA (cfDNA) Informationen über Tumoren gesammelt werden können. Ein anderes vielversprechendes Einsatzgebiet der *Liquid Biopsy* neben der Früherkennung stellt das Tumormonitoring von in diesem Fall Zervixkarzinompatientinnen dar.

Methylierungsanalysen von Zervixkarzinomgewebe haben gezeigt, dass Methylierungen des *cell adhesion molecule 1 (CADM1)* und des *myelin and lymphocyte protein (MAL)* in über 90% aller hochgradigen intraepithelialen Zervixneoplasien (CIN) und invasiven Zervixkarzinomen vorhanden sind. In dieser Arbeit wurde ein *Liquid Biopsy Assay* zum Nachweis von *MAL*- und *CADM1*-Methylierungen an cfDNA von Zervixkarzinompatientinnen entwickelt. Die Detektion der Methylierungen erfolgte mittels quantitativer methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (qMSP). Eine Evaluation der an *Liquid Biopsy* Bedingungen angepassten qMSP erfolgte mittels Abstrichproben von CIN-Patientinnen und einem Vergleich bereits vorhandener Daten aus der Literatur. Von 52 Zervixabstrich-Proben von CIN 2- und CIN 3-Patientinnen zeigte sich in 86,5% der Fälle eine *CADM1* und/oder *MAL*- (*CADM1/MAL*) Methylierung. In cfDNA-Proben von 24 Zervixkarzinompatientinnen wurde in 83,3 % der Fälle eine *CADM1/MAL*-Methylierung nachgewiesen. Bei reinen Plattenepithelkarzinomen waren es 86,4%; bei bestätigt HPV-positiven 94,1%. In Kombination mit einer Spezifität von 95,5% gegenüber gesunden Probandinnen und einer *area under the curve* (AUC) von 0,872 in der *receiver operating characteristic* (ROC)-Analyse konnte geschlussfolgert werden, dass die technische Umsetzung der *CADM1/MAL*-qMSP in *Liquid Biopsy* erfolgreich war und in Bezug zur Klinik schlüssige Daten liefert. So bildet der Nachweis von *CADM1/MAL*-Methylierungen in cfDNA einen Grundstein für weitergehende *Liquid Biopsy* Analysen am Zervixkarzinom und dessen Vorläuferläsionen.

In Germany, cervical cancer is the fifth most common malignant tumor entity in women. The main risk factor is infection with high-risk human papillomaviruses (HPV). With a large HPV vaccination gap and screening participation rates of approximately 47%, there is potential to improve coverage in Germany. This potential could be partially exploited by low-threshold preventive diagnostic services that could be implemented, for example, via venous blood sampling. One route to such an offer is the method field of liquid biopsy, in which, for example, information about tumors can be collected via the analysis of cell-free DNA circulating in the blood (cfDNA). Another promising area of application for liquid biopsy, in addition to early detection, is tumor monitoring of patients with cervical cancer.

Methylation analyses of cervical cancer tissue have shown that methylations of *cell adhesion molecule 1 (CADM1)* and *myelin and lymphocyte protein (MAL)* are present in more than 90% of all high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and invasive cervical cancer. In this work, a *liquid biopsy* assay was developed to detect *MAL* and *CADM1* methylations on cfDNA from cervical cancer patients. Methylations were detected by quantitative methylation-specific polymerase chain reaction (qMSP). The qMSP, which was adapted to liquid biopsy conditions, was evaluated using smear samples from CIN patients and a comparison of existing data from the literature. Of 52 cervical smear samples from CIN 2 and CIN 3 patients, 86.5% showed *CADM1* and/or *MAL (CADM1/MAL)* methylation. In cfDNA samples from 24 cervical carcinoma patients, *CADM1/MAL* methylation was detected in 83.3% of cases. In pure squamous cell carcinomas, it was 86.4%; in confirmed HPV-positive 94.1%. In combination with a specificity of 95.5% compared to healthy donors and an area under the curve (AUC) of 0.872 in the receiver operating characteristic (ROC) analysis, it could be concluded that the technical implementation of *CADM1/MAL*-qMSP in liquid biopsy was successful and provides conclusive data in relation to the clinic. Thus, detection of *CADM1/MAL* methylation in cfDNA represents a cornerstone for more extensive *liquid biopsy* analyses of cervical cancer and its precursor lesions.

#### **4. Abkürzungsverzeichnis**

ACTB – beta-Aktin

AUC – area under the curve

BBQ – Black Berry Quencher

BHQ1 – Black Hole Quencher 1

CADM1 – cell adhesion molecule 1

CADM1/MAL – cell adhesion molecule 1 und/oder myelin and lymphocyte protein

cfDNA – circulating free DNA, zirkulierende freie DNA

CpG – Cytosin-Guanin-Dinukleotid

Ct – cycle threshold / Zyklus-Schwellenwert

ctDNA – circulating tumor DNA, zirkulierende Tumor-DNA

Cy5 – Cyanin-5

CIN – zervikale intraepitheliale Neoplasie

DNA – Desoxyribonukleinsäure

EDTA – Ethylendiamintetraazetat

FAM – Carboxyfluorescein

FIGO – Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

HD – healthy donor / gesunde Probandinnen

HPV – humanes Papillomavirus

MAL – myelin and lymphocyte protein

M.SssI – CpG-Methyltransferase

Pap-Abstrich – Abstrich nach Papanicolaou

PCR – Polymerase-Kettenreaktion

PD 1 – programmed cell death protein 1

qMSP – Quantitative methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion

ROC – receiver operating characteristic

smDNA – Zervixabstrich-DNA

STIKO – Ständige Impfkommission

## 5. Literaturverzeichnis

- BARNES, B., KRAYWINKEL, K., NOWOSSADECK, E., SCHÖNFELD, I., STARKER, A., WIENECKE, A. & WOLF, U. 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut.
- BERTZ, J., DAHM, S., HABERLAND, J., KRAYWINKEL, K., KURTH, B.-M. & WOLF, U. 2010. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland.
- BHATLA, N., BEREK, J. S., CUELLO FREDES, M., DENNY, L. A., GRENMAN, S., KARUNARATNE, K., KEHOE, S. T., KONISHI, I., OLAWAIYE, A. B. & PRAT, J. 2019. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 145, 129-135.
- BOSCH, F. X., LORINCZ, A., MUÑOZ, N., MEIJER, C. J. & SHAH, K. V. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55, 244-65.
- CAILLEAU, R., YOUNG, R., OLIVÉ, M. & REEVES, W. J., JR. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*, 53, 661-74.
- CHEN, K., WANG, G., PENG, L., LIU, S., FU, X., ZHOU, Y., YU, H., LI, A., LI, J., ZHANG, S., BAI, Y. & ZHANG, Y. 2011. CADM1/TSLC1 inactivation by promoter hypermethylation is a frequent event in colorectal carcinogenesis and correlates with late stages of the disease. *Int J Cancer*, 128, 266-73.
- COLOMBO, N., DUBOT, C., LORUSSO, D., CACERES, M. V., HASEGAWA, K., SHAPIRA-FROMMER, R., TEWARI, K. S., SALMAN, P., HOYOS USTA, E., YAÑEZ, E., GÜMÜŞ, M., OLIVERA HURTADO DE MENDOZA, M., SAMOUËLIAN, V., CASTONGUAY, V., ARKHIPOV, A., TOKER, S., LI, K., KEEFE, S. M. & MONK, B. J. 2021. Pembrolizumab for Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer. *N Engl J Med*.
- ERDMANN, F., SPIX, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K. & PENZKOFER, A. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018.
- FANG, J., ZHANG, H. & JIN, S. 2014. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumour Biol*, 35, 5083-93.
- FERLAY, J., ERVIK, M., LAM, F., COLOMBET, M., MERY, L., PIÑEROS, M., ZNAOR, A., SOERJOMATARAM, I. & BRAY, F. 2020. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/today> [Accessed 22/08/2023].
- FOGH, J., WRIGHT, W. C. & LOVELESS, J. D. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, 58, 209-14.
- FUKUHARA, H., KURAMOCHI, M., FUKAMI, T., KASAHARA, K., FURUHATA, M., NOBUKUNI, T., MARUYAMA, T., ISOGAI, K., SEKIYA, T., SHUIN, T., KITAMURA,

- T., REEVES, R. H. & MURAKAMI, Y. 2002. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res*, 93, 605-9.
- GRIESSER, H., MARQUARDT, K., JORDAN, B., KÜHN, W., NEIS, K., NEUMANN, H. H., BOLLMANN, R., PÖSCHEL, B., STEINER, M. & U., S. 2013. Münchner Nomenklatur III. *FRAUENARZT*, 54.
- GRUNAU, C., CLARK, S. & ROSENTHAL, A. 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic acids research*, 29, e65-e65.
- HEITZER, E., PERAKIS, S., GEIGL, J. B. & SPEICHER, M. R. 2017. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. *NPJ Precis Oncol*, 1, 36.
- HELLER, G., FONG, K. M., GIRARD, L., SEIDL, S., END-PFÜTZENREUTER, A., LANG, G., GAZDAR, A. F., MINNA, J. D., ZIELINSKI, C. C. & ZÖCHBAUER-MÜLLER, S. 2006. Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene*, 25, 959-68.
- HELLER, G., GERADTS, J., ZIEGLER, B., NEWSHAM, I., FILIPITS, M., MARKIS-RITZINGER, E. M., KANDIOLER, D., BERGER, W., STIGLBAUER, W., DEPISCH, D., PIRKER, R., ZIELINSKI, C. C. & ZÖCHBAUER-MÜLLER, S. 2007. Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 103, 283-91.
- HERMAN, J. G., GRAFF, J. R., MYÖHÄNEN, S., NELKIN, B. D. & BAYLIN, S. B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the national academy of sciences*, 93, 9821-9826.
- JANSEN, M., FUKUSHIMA, N., ROSTY, C., WALTER, K., ALTINK, R., HEEK, T. V., HRUBAN, R., OFFERHAUS, J. G. & GOGGINS, M. 2002. Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. *Cancer Biol Ther*, 1, 293-6.
- KELLER, L., BELLOUM, Y., WIKMAN, H. & PANTEL, K. 2021. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. *Br J Cancer*, 124, 345-358.
- KURAMOCHI, M., FUKUHARA, H., NOBUKUNI, T., KANBE, T., MARUYAMA, T., GHOSH, H. P., PLETCHER, M., ISOMURA, M., ONIZUKA, M., KITAMURA, T., SEKIYA, T., REEVES, R. H. & MURAKAMI, Y. 2001. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet*, 27, 427-30.
- KURDYUKOV, S. & BULLOCK, M. 2016. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology*, 5, 3.
- LARA-LEMUS, R. 2019. On The Role of Myelin and Lymphocyte Protein (MAL) In Cancer: A Puzzle With Two Faces. *J Cancer*, 10, 2312-2318.



- LEFFERS, M., HERBST, J., KROPIDLOWSKI, J., PRIESKE, K., BOHNEN, A. L., PEINE, S., JAEGER, A., OLIVEIRA-FERRER, L., GOY, Y., SCHMALFELDT, B., PANTEL, K., WÖLBER, L., EFFENBERGER, K. & WIKMAN, H. 2022. Combined Liquid Biopsy Methylation Analysis of CADM1 and MAL in Cervical Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, 14.
- LEI, J., PLONER, A., ELFSTRÖM, K. M., WANG, J., ROTH, A., FANG, F., SUNDSTRÖM, K., DILLNER, J. & SPARÉN, P. 2020. HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*, 383, 1340-1348.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT; DEUTSCHE KREBSHILFE; AWMF) 2020. Prävention des Zervixkarzinoms, Langversion 1.1.
- OVERMEER, R. M., LOUWERS, J. A., MEIJER, C. J., VAN KEMENADE, F. J., HESSELINK, A. T., DAALMEIJER, N. F., WILTING, S. M., HEIDEMAN, D. A., VERHEIJEN, R. H., ZAAL, A., VAN BAAL, W. M., BERKHOF, J., SNIJDERS, P. J. & STEENBERGEN, R. D. 2011. Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-)malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int J Cancer*, 129, 2218-25.
- PALMIROTTA, R., LOVERO, D., CAFFORIO, P., FELICI, C., MANNAVOLA, F., PELLÈ, E., QUARESMINI, D., TUCCI, M. & SILVESTRIS, F. 2018. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol*, 10, 1758835918794630.
- RHEINWALD, J. G. & GREEN, H. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6, 331-43.
- RIECK, T., FEIG, M. & SIEDLER, A. 2022. Impfquoten von Kinderschutzimpfungen in Deutschland—aktuelle Ergebnisse aus der RKI-Impfsurveillance.
- RONG, G., ZHANG, M., XIA, W., LI, D., MIAO, J. & WANG, H. 2019. Plasma CADM1 promoter hypermethylation and D-dimer as novel metastasis predictors of cervical cancer. *J Obstet Gynaecol Res*, 45, 1251-1259.
- SONG, P., WU, L. R., YAN, Y. H., ZHANG, J. X., CHU, T., KWONG, L. N., PATEL, A. A. & ZHANG, D. Y. 2022. Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics. *Nature biomedical engineering*, 6, 232-245.
- STIKO 2007. Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren—Empfehlung und Begründung. *Epidemiologisches Bulletin*, 23.
- TIE, J., COHEN, J. D., LAHOUEL, K., LO, S. N., WANG, Y., KOSMIDER, S., WONG, R., SHAPIRO, J., LEE, M., HARRIS, S., KHATTAK, A., BURGE, M., HARRIS, M., LYNAM, J., NOTT, L., DAY, F., HAYES, T., MCLACHLAN, S. A., LEE, B., PTAK, J.,

- SILLIMAN, N., DOBBYN, L., POPOLI, M., HRUBAN, R., LENNON, A. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., TOMASETTI, C. & GIBBS, P. 2022. Circulating Tumor DNA Analysis Guiding Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer. *N Engl J Med*, 386, 2261-2272.
- TILLMANN, H., SCHILLINGER, G. & DRÄTHER, H. 2019. Früherkennung bei Erwachsenen in der gesetzlichen Krankenversicherung: ergebnisse einer AOK-Sekundärdatenanalyse. *Versorgungsreport Früherkennung*.
- ZHANG, Y., YAO, Y., XU, Y., LI, L., GONG, Y., ZHANG, K., ZHANG, M., GUAN, Y., CHANG, L., XIA, X., LI, L., JIA, S. & ZENG, Q. 2021. Pan-cancer circulating tumor DNA detection in over 10,000 Chinese patients. *Nat Commun*, 12, 11.

## **6. Erklärung des Eigenanteils**

Die Arbeit erfolgte am Institut für Tumorbio­logie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. Klaus Pantel) unter der Betreuung von Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher und PD Dr. Katharina Harms-Effenberger. Die Publikation der Studie erfolgte mit meiner Person als Erstautor. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher, PD Dr. Katharina Harms-Effenberger, Prof. Dr. Lynn Wölber und mir wurde das Konzept entwickelt. Die Sammlung der Patientinnenproben erfolgte durch mich aufbauend auf Vorarbeiten von Johanna Herbst in Zusammenarbeit mit der Klinik für Gynäkologie (Chefärztin: Prof. Dr. Barbara Schmalfeldt; Prof. Dr. Lynn Wölber, Dr. Anna-Lena Bohnen, PD Dr. Katharina Prieske, Dr. Anna Jaeger, Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer), der Klinik für Transfusionsmedizin (Chefarzt: Dr. Sven Peine) und der Klinik für Strahlentherapie (Dr. Yvonne Goy) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Weiter wurden durch mich Patientinnendatenbanken gepflegt und neu aufgebaut. Aufarbeitung der Blutproben, Isolation der DNA, Herstellung der Kontrollen, Bestellung der notwendigen Kits und Chemikalien und Durchführung der qMSP erfolgte durch meine Person, unterstützt durch Jolanthe Kropidlowski. Die Auswertung der Daten und Weiterverarbeitung dieser mittels statistischer Software erfolgte ebenfalls durch meine Person. In diesem gesamten Prozess wurde ich durch Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher und PD Dr. Katharina Harms-Effenberger supervidiert und in Zusammenarbeit mit ihnen wurde von mir das Manuskript zur Veröffentlichung verfasst. Darüber hinaus erfolgte die Visualisierung der Daten und Präsentationen dieser in verschiedenen Kontexten durch meine Person.

## **7. Danksagung**

Mein herausragender Dank gilt Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher und PD Dr. Katharina Harms-Effenberger für die exzellente Betreuung, die immer von Wertschätzung geprägte Zusammenarbeit und die Chance, an diesem Projekt mitwirken zu dürfen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Lynn Wölber bedanken, die eine starke Kooperation mit der gynäkologischen Klinik des UKE möglich machte.

Mein weiterer Dank gilt allen Kolleg\*innen am Institut für Tumorbiologie für jede helfende Hand und jeden guten Rat; besonders bedanken möchte ich mich bei Johanna Herbst für die hervorragenden Vorarbeiten und eine umfassende Einarbeitung.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden – insbesondere bei meiner Frau, meinen Eltern und meinem Bruder – bedanken, die mir unentwegt Rückhalt geben und das Gelingen dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

## 8. Lebenslauf

### Akademische Ausbildung

#### Promotion

09/2020 – dato | Experimentelle Doktorarbeit  
Institut für Tumorbologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

#### Studium

10/2016 – 06/2023 | Studium der Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

10/2014 – 09/2016 | Studium der Molecular Life Sciences  
Universität zu Lübeck und Universität Hamburg

### Berufliche Erfahrungen

04/2021 – 06/2023 | Werkstudent in der Klinik für Intensivmedizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

04/2019 – 07/2019 | Werkstudent im Adipositas-Zentrum  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

08/2013 – 08/2014 | FSJ im Rettungsdienst  
Malteser Hilfsdienst Papenburg

### Schulbildung

08/2005 – 06/2013 | Allgemeine Hochschulreife  
Gymnasium Papenburg

## 9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....