

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**Immunhistologische Untersuchung verschiedener benigner und maligner  
Hautveränderungen auf Expression des phosphorylierten ribosomalen  
S6-Proteins (rpS6) als Zeichen der Aktivierung des mTOR-  
Signaltransduktionsweges**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von  
Jürgen Götz  
aus  
München  
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Ralf Wienecke

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Michael Fiegl

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Ralf Wienecke

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>4</b>
1.1	Der PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg	4
1.1.1	Aufbau des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges	4
1.1.1.1	Die mTOR-Kinase, die mTOR- Komplexe und die S6-Kinase	6
1.1.1.2	Das phosphorylierte ribosomale Protein S6 (rpS6)	8
1.1.2	Die physiologische Regulation der mTOR	8
1.1.3	Die physiologischen Funktionen der mTOR im PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg	9
1.1.4	Die physiologischen Funktionen der S6-Kinase und des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins	10
1.1.5	Die Rolle des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges bei menschlichen Erkrankungen	13
1.1.5.1	Erbliche Tumor-assoziierte Erkrankungen	13
1.1.5.2	Maligne Tumorerkrankungen	14
1.1.5.3	mTOR und pathologische Angiogenese	15
1.1.5.4	mTOR und cardiale Hypertrophie	15
1.2	Pharmakologische Hemmung des mTOR und klinische Relevanz	16
1.3	Aufbau der Haut	18
1.4	Die untersuchten Hautveränderungen	20
1.4.1	Viral bedingte Hauterkrankungen	20
1.4.1.1	Die Verruca Vulgaris	21
1.4.1.2	Die Condylomata acuminata	21
1.4.1.3	Die anale intraepitheliale Neoplasie (AIN)	22
1.4.2	Das Plattenepithel- oder spinozelluläre Karzinom	24
1.4.2.1	Histologie des spinozellulären Karzinoms	25
1.4.2.2	Therapie und Prognose des spinozellulären Karzinoms	25
1.4.3	Das Basalzellkarzinom (BCC)	27
1.4.3.1	Histologie des Basalzellkarzinoms	28
1.4.3.2	Therapie und Prognose des Basalzellkarzinoms	28
1.4.4	Das maligne Melanom	29
1.4.4.1	Histologie des malignen Melanoms	31
1.4.4.2	Therapie und Prognose des malignen Melanoms	32
1.4.5	Das Keloid	34
1.4.5.1	Histologie des Keloids	34
1.4.5.2	Therapie des Keloids	34
1.4.6	Das idiopathische Angiosarkom	36
1.4.6.1	Histologie des idiopathischen Angiosarkoms	36
1.4.6.2	Therapie und Prognose des idiopathischen Angiosarkoms	36
<b>2</b>	<b>Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>39</b>
3.1	Die immunhistochemische Analyse der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins	39
3.1.1	Die untersuchten Präparate	39
3.1.2	Die LAB/LSAB-Methode zur Detektion spezifischer Proteine	40
3.1.2.1	Der Primärantikörper	41
3.1.2.2	Das Sekundär-Brückenantikörper-Reagenz	41
3.1.2.3	Die Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Lösung	41

3.1.2.4	Die Chromogen-Rot-Färbung	41
3.1.2.5	Die Hämalaun-Gegenfärbung	41
3.1.3	Protokoll der immunhistochemischen Färbung	42
3.1.4	Die Herstellung der Puffersubstanzen	44
3.2	Geräte	44
3.3	Verbrauchsmaterialien	45
3.4	Chemikalien	45
3.5	Software und Datenbanken	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
4.1	Auswertung der untersuchten Präparate	46
4.1.1	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei der Verruca vulgaris	51
4.1.2	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei der Condylomata acuminata	52
4.1.3	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei der analen intraepithelialen Neoplasie	53
4.1.4	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim spinozellulären Karzinom	54
4.1.5	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Basalzellkarzinom	55
4.1.6	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim malignen Melanom	57
4.1.7	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei Hautmetastasen des malignen Melanoms	60
4.1.8	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Keloid	61
4.1.9	Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim idiopathischen Angiosarkom	62
4.1.10	Zusammenfassende Auswertung der immunhistochemischen Analysen	63
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
5.1	Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei normaler Haut	65
5.2	Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei viral bedingten Hautveränderungen	67
5.2.1	Verruca vulgaris	67
5.2.2	Condylomata acuminata	68
5.2.3	Anale intraepitheliale Neoplasie	68
5.3	Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim spinozellulären Karzinom	69
5.4	Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Basalzellkarzinom	71
5.5	Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Malignen Melanom und Hautmetastasen des malignen Melanoms	72
5.6	Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Keloid	74
5.7	Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim idiopathischen Angiosarkom	74

5.8	Zusammenfassende Diskussion	76
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Software, Datenbanken und Abbildungsverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>82</b>
8.1	Danksagung	82
8.2	Lebenslauf	83

# 1 Einführung

## 1.1 Der PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg

### 1.1.1 Aufbau des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges

Die mTOR ist ein wichtiger Bestandteil des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges (Abb. 1).

Wachstumsfaktoren aktivieren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) an der Zelloberfläche, welche wiederum selbst als Aktivatoren, nämlich der GTPase Ras, fungieren. Die Aktivierung der Ras durch die RTKs geschieht über deren Dimerisierung und Aktivierung ihrer Kinaseaktivität, was in einer Phosphorylierung von Tyrosinstellen an ihrem cytoplasmatischen Anteil resultiert. Diese dienen nun als Andockstellen für verschiedene Adapterproteine wie GRB2. Nachfolgend können weitere Effektoren wie SOS an die GRB2 binden, was die Phosphorylierung von GDP zu GTP an der Ras stimuliert.

Es gibt nun verschiedene Effektorproteine der Ras. Der wichtigste der drei Haupt-Signaltransduktionswege der Ras zur späteren Aktivierung der mTOR läuft über die Kinasen der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-Familie, die sogenannten PI3Ks. Diese sind in der Lage, eine Phosphorylierung am Inositolring des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphates durchzuführen, welches dann als second messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder PIP<sub>3</sub>) aktiv wird. Der second messenger PIP<sub>3</sub> kann nun Signalproteine aktivieren, die ihrerseits wiederum als Signalgeber und Aktivatoren für weitere Kinasen dienen. Eine Gruppe dieser Signalproteine sind die zur Akt-Familie gehörenden, als Serin/Threonin Kinasen fungierenden Kinasen Akt1, Akt2 und Akt3. Nach Bindung von PIP<sub>3</sub> und nachfolgender Translokation von Akt zur Plasmamembran wird Akt an zwei Stellen phosphoryliert, um aktiv zu werden, nämlich an der Aminosäure Thr 308 durch die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) und an der Aminosäure Serin 473. Kontrovers diskutiert wird seit langem, über welche Kinase die Aminosäure Serin 473 phosphoryliert wird.

Akt ist in der Lage, viele verschiedene Substrate zu phosphorylieren.

Ein Schlüsselsubstrat im PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg stellt der Tuberöse Sklerose Komplex 2 (TSC2) dar, der direkt durch Akt in vivo und in vitro phosphoryliert und damit gehemmt wird (Inoki et al. 2002; Manning et al. 2002).

TSC2, auch Tuberin genannt, stellt ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) für eine kleine Ras-ähnliche GTPase dar, die Rheb (Ras homolog enriched in brain). Diese ist aktiv in gebundenem Zustand mit GTP und aktiviert den Komplex aus raptor, einer Untereinheit der ersten von zwei existierenden TOR- Komplexen, auf welche weiter unten noch genau eingegangen wird, und der mTOR. Überexpression von Tuberin und Hamartin (TSC1) führt zu einer Abnahme der GTP- gebundenen Rheb und zu einer Zunahme der inaktiven GDP- gebundenen Rheb (Garami et al. 2003). Dieses Verhältnis normalisiert sich wieder bei Mutationen in der GAP- Domäne der TSC2 (Garami et al. 2003). Fehlt Tuberin, so bleibt die Rheb in gebundenem Zustand mit GTP und aktiviert somit dauerhaft die mTOR- Kinase. TSC2 hat folglich eine negativ regulierende Funktion für die Rheb und damit die Aktivität der mTOR.

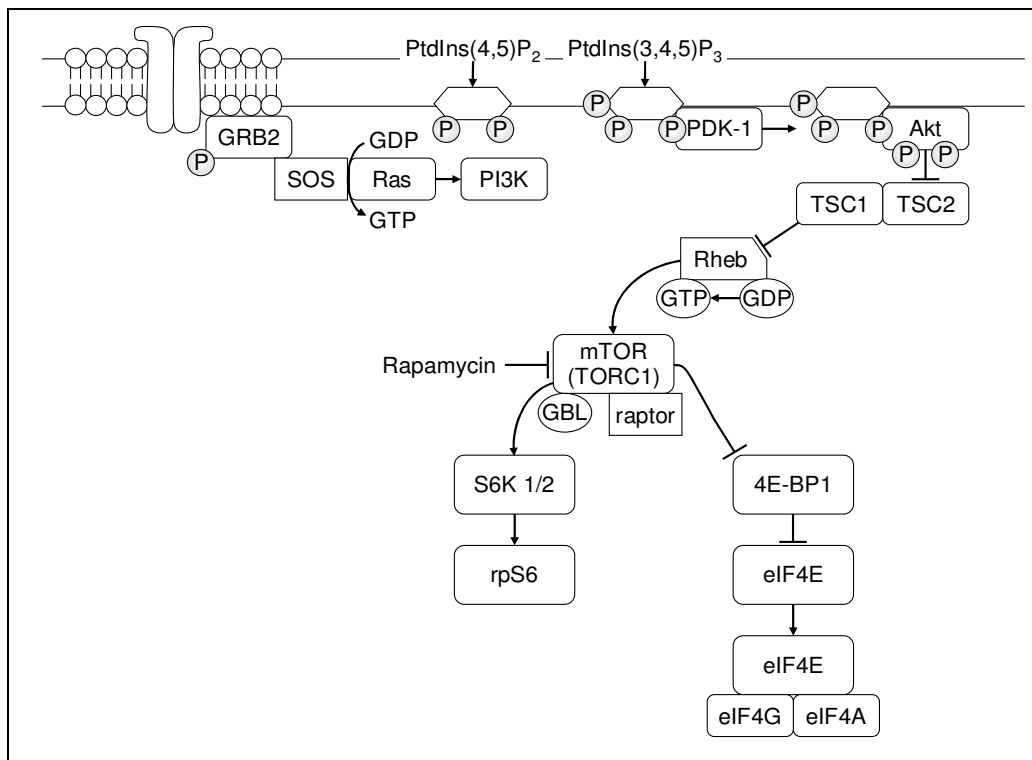
Über welchen Mechanismus Rheb die mTOR letztendlich aktiviert, ist noch nicht vollständig geklärt. Ein Ansatz geht von einer direkten Aktivierung der mTOR durch die Rheb aus (Long et al. 2005).

TSC2 bildet folglich mit TSC1 (Hamartin) einen heterodimeren Komplex, der durch Hemmung des mTOR- Signaltransduktionsweges tumorsuppressiv wirkt. Ob und wie TSC1 an der GTPase-Aktivität von TSC2 beteiligt ist, wird kontrovers diskutiert. Deutlich wird jedenfalls die tumorsuppressive Eigenschaft von TSC1 und TSC2 an der Krankheit der Tuberösen Sklerose, bei der durch Ausfall der beiden Gene für Hamartin und Tuberin und damit ständiger Aktivierung von mTOR multiple benigne Tumoren unter anderem an der Haut und der Retina (Hamartome), an den Nieren (Angiomyolipome), im Gehirn (Hamartome) und im Herzen (Rhabdomyome) entstehen.

Die am besten bekannten Substrate der mTOR sind die ribosomale S6 Kinase (S6K) und das sog. eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)- bindende Protein (4E-BP1). Phosphorylierung letzterer führt zu der Dissoziation von 4E-BP1 von eIF4E. eIF4E bindet daraufhin zwei weitere initiation factors, eIF4G und eIF4A, und dieser Komplex erleichtert das Rekrutieren von Ribosomen für die mRNA, was somit auch die Proteinsynthese erleichtert (Gingras et al. 1999).

Die S6K, von der Säugetiere zwei verschiedene Formen besitzen, die S6K1 und die S6K2, stellt das Bindeglied zwischen der mTOR und dem in dieser Arbeit auf die Expression bei verschiedenen Hautveränderungen hin untersuchten ribosomalen S6-Proteins dar.

Auf die Bedeutung und Funktion der mTOR-Kinase, der S6-Kinase und des ribosomalen S6-Proteins im PI3K/Akt/mTOR- Signaltransduktionsweg wird im Folgenden genauer eingegangen.



**Abb.1:** Vereinfachte Darstellung des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges

### 1.1.1.1 Die mTOR-Kinase, die mTOR- Komplexe und die S6-Kinase

Die mTOR ist ein wichtiger Bestandteil des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges. Sie wurde erstmals Anfang der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts von Heitman et al. durch Mutationen der Kinase in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. Diese Mutationen (TOR1-1, TOR2-1) führten zu einer Resistenz der TOR-Kinase gegenüber der immunsuppressiv wirkenden Substanz Rapamycin, durch die sie normalerweise gehemmt wird (Heitman et al. 1991). Im Folgenden wurden in der Hefe für die TOR zwei verschiedene zelluläre Aktivitäten und zwei verschiedene Gene für die TOR identifiziert (TOR1 und TOR2) (Heliwell et al. 1994). Anders als bei der Hefe kodiert bei den Eukaryonten ein Gen für die target of Rapamycin. Bei den Säugetieren wird sie mammalian target of Rapamycin genannt (mTOR). Die TOR der Eukaryonten ist ein ca. 289 kDa großes Protein, das zu der Familie der sogenannten Phosphatidylinositol-Kinase-verwandten (PIKK) Kinasen gehört und als eine Serin/Threonin-Kinase fungiert. Innerhalb der Carboxy-terminalen Region des Proteins befindet sich die Kinase-Domäne, während Amino-terminal der Kinase-Domäne in mTOR sich die FKBP12-Rapamycin-bindende



Domäne befindet. Der Komplex aus Rapamycin, einem Immunsuppressivum auf das noch weiter unten eingegangen wird, und der Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase FKBP12 bindet sich an diese Domäne, was zu einer Inhibition der mTOR führt.

Loewith et al. beschrieben 2002 zwei verschiedene TOR-Komplexe in der Hefe, TORC1 und TORC2 (Loewith et al. 2002). Assoziierte Proteine des TORC1 sind TOR1 oder TOR2, KOG1, LST8 und TCO89, des TORC2 AVO1-3, LST8 und BIT61. Auch bei Säugetieren wurden zwei TOR- Komplexe identifiziert. Wie die mTOR homolog zur TOR1 und TOR2 in der Hefe ist, so finden sich auch Homologien der assoziierten Proteine der TORC1 und der TORC2 in der Hefe zu den zwei TOR-Komplexen bei Säugetieren. Homolog beim TORC1 zu KOG1 ist bei den Säugetieren das die mTOR aktivierende Protein raptor (regulatory associated protein of TOR), zu LST8 die mLST8, welche den raptor-mTOR-Komplex stabilisiert und wichtige Funktionen in der Phosphorylierung von Substraten der mTOR übernimmt. Raptor und mLST8 stellen damit essentielle Komponenten in der Zellwachstumsregulation der TORC1 dar.

Im TORC2 ist das Protein rictor (mAVO3) bei Säugetieren der AVO3 bei Hefen homolog, die mLST8 (GβL) der LST8. Die mTOR-Kinase und die Proteine rictor und mLST8 besitzen im TORC2 wichtige Funktionen in der Veränderung von Zellmorphologie und Zelladhäsion, wahrscheinlich via Modulation des Aktin-Zytoskelettes.

Folglich bilden bei Säugetieren mTOR, raptor und mLST8 den TORC1 (mTORC1) und mTOR, rictor und mLST8 den TORC2 (mTORC2) (Loewith et al. 2002).

Das bekannteste Substrat der mTOR ist die S6-Kinase. 1998 wurde bei Säugetieren eine zweite Form dieser entdeckt, und damit die bis dahin bekannte S6-Kinase S6K1 genannt, während die neu entdeckte S6- Kinase seitdem die Bezeichnung S6K2 trägt (Shima et al. 1998). Ihre Funktionen im Rahmen des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges werden unter 1.1.4 beschrieben.

### **1.1.1.2 Das phosphorylierte ribosomale Protein S6 (rpS6)**

Eukaryontische Ribosomen besitzen eine 40S-Untereinheit und eine größere 60S-Untereinheit. Die 40S-Untereinheit ist aus 33 Proteinen und einer 18S-rRNS zusammengesetzt, die 60S-Untereinheit aus 45 Proteinen und drei rRNS-Stücken. Das 30 kDa große phosphorylierte ribosomale Protein S6 (rpS6) war das erste ribosomale Protein, bei dem eine Phosphorylierung festgestellt werden konnte und das erste identifizierte Substrat der S6K (Ruvinsky et al. 2006). Dass phosphoryliertes S6 im Zytosol und im Nukleus vorkommt, wurde erstmals 1974 durch Gressner et al. an sich regenerierender Rattenleber gezeigt (Gressner et al. 1974). An fünf Aminosäuren, welche sich am C-terminalen Ende des Proteins befinden, wird S6 phosphoryliert. Diese sind Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 und Ser247 (Krieg et al. 1988). Diese Phosphorylierungsstellen sind bei höheren Eukaryonten gleich.

### **1.1.2 Die physiologische Regulation der mTOR**

Die Regulation der mTOR wird vor allem durch das Nährstoffangebot vermittelt. Ein niedriges Angebot an Aminosäuren und Glucose führt zu einer Inaktivierung der mTOR. Umgekehrt kommt es zu einer Aktivierung der mTOR bei hohem Aminosäure- und Glucoseangebot. Der exakte Mechanismus, durch den ein positives Aminosäureangebot vermittelt bekommt, was zu deren Aktivierung führt, ist nicht ganz klar. Kim und Kollegen gehen von einer durch Aminosäuren vermittelten Änderung des raptor-mTOR-Komplexes aus, welcher für die Aktivierung der Substrate der mTOR obligat ist (Kim et al. 2002, 2003). Auch Insulin und andere Wachstumsfaktoren haben einen positiven Einfluss auf die Signaltransduktion zu mTOR. Dies geschieht über die PI3K und Akt. Kommt es aber zu einem ATP-Abfall aufgrund Glucosemangels, so sinkt die mTOR-Aktivität trotz hohem Insulinangebot (Dennis et al. 2001).

Die mTOR-Kinase stellt somit ein wichtiges Bindeglied zwischen Nährstoffangebot wie Glucose- und Aminosäureangebot und anabolen Effekten wie Proteinsynthese dar.

### **1.1.3 Die physiologischen Funktionen der mTOR im PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg**

Die im Folgenden beschriebenen Funktionen der mTOR werden durch den mTOR-Komplex 1 (mTORC1) ausgeführt. Die mTOR reguliert die Proteinsynthese über die Stimulation der Transkription von Genen der ribosomalen Biogenese, Transkription von rRNA-Genen durch die RNA-Polymerase I, Transkription von Genen ribosomaler Proteine durch die RNA-Polymerase II und Transkription von tRNA-Genen durch die Polymerase III (Hay and Sonenberg 2004).

Phosphorylierung der S6K1 und folglich des ribosomalen S6-Proteins führt zu einem Größenwachstum der Zelle. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 und dadurch Dissoziation von eIF4E führt letztlich wie unter 1.1.1 schon beschrieben durch Rekrutieren von Ribosomen zu einer verstärkten Proteinsynthese.

Durch die oben beschriebene Nährstoff- und Wachstumsfaktorenaktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges kommt es zu einer Bildung verschiedener mRNAs, unter anderem für FGF (fibroblast growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor), außerdem zu verstärkter Proteinsynthese, zu einem Größenwachstum und Proliferation der Zelle. Auch die Zellzyklusprogression wird durch die S6K1 und eIF4E vorangetrieben (Fingar et al. 2004). Der PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg vermittelt somit bei guter Ernährungslage anabole Effekte wie die Proliferation der Zelle durch Kopplung von Zellwachstum und Zellzyklusprogression und besitzt auch eine anti-apoptische Wirkung.

Viele Studien an der TOR von Vielzellern unterstützen diese Erkenntnisse. Homozygote mTOR <sup>-/-</sup> Mausembryos sterben kurz nach Implantation aufgrund stark erniedrigter Zellproliferation des Embryos (Murakami et al., 2004).

Es gibt auch Hinweise dafür, dass mTOR an der Alterung (Martin and Hall 2005) und an der Gedächtnisbildung beteiligt ist (Tischmeyer et al. 2003).

Hauptaufgaben der mTOR sind folglich Kontrolle des Wachstums vor allem im Wachstumsalter, während im Erwachsenenalter die Kontrolle anderer ernährungsabhängiger Vorgänge, wie Gedächtnisbildung und das Altern im Vordergrund stehen.

Während die Funktion des mTOR1-Komplexes (mTORC1) in Förderung und Kontrolle in gerade beschriebener ribosomaler Biogenese und Transkription der mRNA liegt, ist die mTORC2 für die Polymerisation des Aktins im Aktinzytoskelett und damit für die Organisation des Aktinzytoskelettes und die Zellmorphologie

zuständig (Sarbasov et al. 2004). Eine weitere Funktion der mTORC2 ist die Aktivierung der Akt.

Weitere Aufgaben der Akt- Kinase neben der als Aktivator der mTOR und damit in Zellwachstum und –proliferation bestehen in der Regulation von Zellüberleben, Genomstabilisierung und der Förderung von Neovaskularisation.

#### **1.1.4 Die physiologischen Funktionen der S6-Kinase und des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins**

Die S6K wurde schon sehr früh als Substrat der mTOR-Kinase identifiziert.

Durch genetische Untersuchungen an der Fliege *Drosophila melanogaster*, bei denen das Gen für das Effektorprotein des mammalian target of Rapamycin (mTOR), nämlich die S6- Kinase ausgeschaltet wurde (dS6K  $-/-$ ), ist bekannt, dass die S6-Kinase für das Wachstum der Zellen unerlässlich ist. Diese Fliegen wiesen nämlich bei etwa gleicher Zellzahl eine geringere Zellgröße der Flügel- und Augenzellen als ihre Wildtypen auf (Montagne et al. 1999).

S6K1  $-/-$  Myofibroblasten von Mäusen entwickeln ebenfalls eine geringere Zellgröße als Wildtypmyofibroblasten, was die essentielle Rolle der S6-Kinase als Substrat für die Akt- Kinase und die mTOR-Kinase in der Kontrolle des Zellwachstums bestätigt (Ohanna et al. 2005).

S6K2- defiziente Mäuse (S6K2  $-/-$ ) zeigten im Gegensatz zu S6K1  $-/-$  Mäusen keine reduzierte Körpergröße. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass S6K2  $-/-$  Zellen eine geringere Phosphorylierung des ribosomalen S6-Proteins aufweisen (Pende et al. 2004).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die S6K1 wichtige Funktionen in der Regulation des Zellwachstums übernimmt, während die S6K2 hauptsächlich für die Signaltransduktion zum ribosomalen S6-Protein durch dessen Phosphorylierung zuständig ist.

Das Zusammenwirken beider Kinasen ist für das Überleben essentiell, was an Mausembryos demonstriert werden konnte, die defizient für beide Gene, sowohl der S6K1, als auch der S6K2 waren. Diese wiesen nämlich im Gegensatz zu Mausembryos mit Verlust nur eines der beiden Gene für die S6K eine sehr hohe perinatale Letalität auf (Pende et al. 2004).

Obwohl das ribosomale S6-Protein als Substrat der S6K ebenfalls schon seit langem bekannt ist, bleibt dessen Funktion in mancher Hinsicht unklar.

Das ribosomale S6-Protein kann an 5 Stellen phosphoryliert werden. Diese sind die Nukleotide Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 und Ser247. Ser235 und Ser236 werden zur Aktivierung des ribosomalen S6-Proteins dabei als erstes phosphoryliert (Flotow und Thomas 1992).

Ein Knockout-Modell, bei dem Phosphorylierungsstellen zur Aktivierung von S6 für die S6K entfernt wurde (rpS6<sup>P<sup>-/-</sup></sup>), zeigte, dass Mausembryofibroblasten (MEFs) ohne phosphoryliertes S6 viel kleiner waren als die Wildtyp-MEFs. Dies führte zu der Annahme, dass rpS6 eine wichtige Rolle in der Zellzyklus- und Zellwachstumsregulation durch mTOR und die S6-Kinase spielt (Ruvinsky et al. 2005). Die gleichen Effekte konnten für pankreatische  $\beta$ -Zellen und für Interleukin-7-abhängige Zellen gezeigt werden.

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Hauptaufgabe der rpS6 in der Regulation der Translation sogenannter TOP-mRNAs liegt. Das sind mRNAs, die für die Bildung von Proteinen des Translationsapparates, wie ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren, kodieren. Diese mRNAs besitzen am 5'-Ende einen Oligopyrimidin-Trakt (5'TOP), weswegen sie TOP-mRNAs genannt werden.

Neuere biochemische und genetische Untersuchungen konnten den Zusammenhang von phosphoryliertem ribosomalen S6 und Kontrolle der Translation von TOP-mRNAs widerlegen (Stolovich et al. 2005).

Ebenfalls konnte in aktuellen Studien mit rpS6<sup>P<sup>-/-</sup></sup>-knockout-Mäusen, bei denen es zu einer vermehrten Proteinsynthese kam, im Umkehrschluss gefolgert werden, dass die Phosphorylierung des ribosomalen S6-Proteins im Gegensatz zu früheren Meinungen mit einer geringeren Proteinsynthese korreliert (Ruvinsky et al. 2005), während die Aktivierung eines weiteren Substrates der S6-Kinase, nämlich der 4E-BP1, zu einer vermehrten Proteinsynthese führt. Diese Beobachtung kann laut Ruvinsky und Meyuhas aber auch auf einer kompensatorisch vermehrten Aktivierung anderer Substrate der S6K beruhen (Ruvinsky und Meyuhas 2006).

Weiterhin wurde ebenfalls im Gegensatz zu früheren Vermutungen bei diesen rpS6<sup>P<sup>-/-</sup></sup>-MEFs eine gesteigerte Zellproliferation registriert, was laut der Autoren auf einen Kompensationsmechanismus für den Gesamtorganismus bei zu geringem Größenwachstum der Einzelzellen zurückzuführen ist (Ruvinsky et al. 2005).

Eine weitere Funktion der rpS6 konnte in rpS6<sup>P<sup>-/-</sup></sup>-knockout-Mäusen gezeigt werden. Diese zeigen nämlich bei Glucosebelastung keine adäquate Insulinsekretion, womit

auf eine wichtige Rolle der rpS6 in der Glucosehomöostase hingewiesen wird (Ruvinsky et al. 2005).

Zusammenfassend liegt somit die Hauptfunktion des phosphorylierten und somit aktiven ribosomalen S6-Proteins in der Förderung des Zellwachstums und in der Regulation des Glucosehaushaltes. Eine wichtige Funktion im komplizierten System sowohl der Proteinsynthese, als auch der Zellproliferation kann trotz der jüngeren Untersuchungen dennoch nicht mit Sicherheit widerlegt oder abgestritten werden. Die Grundvoraussetzung der Zellproliferation basiert nämlich auf Zellgrößenwachstum und diese benötigt wiederum eine gesteigerte Proteinsynthese. Folglich bilden die Vorgänge der Proteinsynthese, des Zellwachstums und der Zellproliferation eine unidirektionale Kette, wobei der jeweils vorangehende Teil essentiell für den darauf folgenden ist.

### 1.1.5 Die Rolle des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges bei menschlichen Erkrankungen

Es ist mittlerweile bekannt, dass es bei den verschiedensten menschlichen Erkrankungen zu einer Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges kommt oder aber Effektoren der mTOR direkt betroffen sind.

#### 1.1.5.1 Erbliche Tumor-assoziierte Erkrankungen

Zu dieser Gruppe von Erkrankungen, die auch Phakomatosen genannt werden, gehören unter anderem die Neurofibromatose, die tuberöse Sklerose, die von-Hippel-Lindau-Krankheit, die Cowden-Krankheit und das Peutz-Jeghers-Syndrom. All diesen sogenannten neurokutanen Syndromen ist gemeinsam, dass sie neuroektodermale und mesodermale Tumoren und Gefäßveränderungen an Haut, ZNS und den Augen bilden. Dabei kommt es durch den jeweilig spezifischen Genausfall nicht zu einer Transformation betroffener Zellen in maligne Zellen, sondern zu deren abnormalen Proliferation durch eine ständig aktive Signaltransduktion. Charakteristika der jeweiligen Erkrankung sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Erkrankung	Betroffenes Tumorsuppressorgen	Folgen innerhalb des Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges	Klinische Ausprägung (nicht vollständig)
Tuberöse Sklerose	TSC1 und TSC2 (Tuberöse Sklerose Komplex 1/2)	mTOR↑ → S6K↑ → rpS6↑, 4E-BP1↑	Hamartome in ZNS, Niere, Haut, Lunge, Herz
Cowden-krankheit	PTEN	Akt↑ → mTOR↑	Hohes Risiko für Brust-, Schilddrüsen- und Endometriumskarzinom
Peutz-Jeghers-syndrom	LKB1	AMPK↑ → mTOR↑	Gastrointestinale hamartomatöse Polypen
Neurofibromatose	NF1 (Neurofibromatin 1-Tumorsuppressorgen)	Ras↑ → PI3K↑ → Akt↑ → mTOR↑	Neurofibrome, Irishamartome, Gliom Phäochromozytome
Von-Hippel-Lindau-syndrom	VHL (Von-Hippel-Lindau-tumorsuppressorgen)	(mTOR→) HIF1α↑ → VEGF↑	Zerebellare und retinale Hämangioblastome, Nieren-, Leber- und Pankreaszysten

**Tab.1:** erbliche Tumor-assoziierte Erkrankungen, deren Folgen für den Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg und klinische Ausprägung (↑= Aktivierung)

### 1.1.5.2 Maligne Tumorerkrankungen

Für eine Vielzahl an malignen Erkrankungen konnte bis heute eine direkte oder indirekte Beteiligung des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges nachgewiesen werden. Dabei kommt es zu einer ständigen Signaltransduktion durch autokrine oder parakrine Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Überexpression oder auch Mutation von Rezeptoren der Wachstumsfaktoren, Ras-Aktivierung, Mutation des Tumorsuppressors PTEN, der PI3K oder von Akt. Einige der Tumoren und deren ursächlicher Mechanismus in der Signaltransduktion werden in Tab. 2 aufgeführt. Wie unter 1.1.3 schon erläutert, hat die mTOR und ihre Substrate anti-apoptotische und Zellzyklus-progressive Wirkung. Dies scheint ein Hauptgrund für die Zellproliferation in Tumoren mit aktivierter mTOR zu sein.

Betroffenes Element	Mechanismus	Folgen innerhalb des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges	Auswahl von dadurch entstehende Tumore
BCR-ABL-fusionsprotein	Chromosomale Translokation (9;22)	Akt↑	chronische myeloische Leukämie
Epidermaler Wachstumsfaktoren-Rezeptor	Überexpression	PI3K↑	Glioblastoma multiforme
Her-2/neu (Onkogen)	Überexpression	PI3K↑	Mammakarzinom
Akt (Kinase)	Amplifikation	Akt↑	Prostatakarzinom, Pankreaskarzinom, gastrales Adenokarzinom, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom
PIK3CA (Kinase)	Amplifikation Mutation	PI3K↑	Ovarial-und Zervixkarzinom Kolonkarzinom, Ovarial- und Mammakarzinom, Glioblastoma multiforme
PTEN (Tumorsuppressorgen)	Mutation	Akt↑	Karzinome der Blase, der Brust, des Endometriums, Melanome
PI3K/Akt (Kinasen)	Überexpression	PI3K/Akt↑	B-zell Non-Hodgkin-Lymphom, Multiples Myelom, akute myeloische Leukämie

**Tab.2:** Ursachen und Vorkommen der Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR- Signaltransduktionsweges bei einer Auswahl an Tumoren



Auch gibt es eine Reihe an Erkenntnissen über die Rolle des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges bei malignen Tumoren der Haut, auf die noch im Diskussionsteil dieser Arbeit eingegangen wird.

#### **1.1.5.3 mTOR und pathologische Angiogenese**

Pathologische Angiogenese ist eine wichtige Voraussetzung für die Proliferation und Metastasierung maligner Tumore. Aber auch benigne Tumore wie die Hamartome bei der tuberösen Sklerose sind auf ständige Substratlieferung und damit auf Angiogenese angewiesen.

Eine ständige Sauerstoffunterversorgung resultiert in einer Aktivierung der mTOR und dies zur Überexpression eines Transkriptionsfaktors, nämlich des HIF-1 $\alpha$ , was zu einer vermehrten Produktion und Ausschüttung des VEGF (vascular endothelial growth factor) führt (Hudson et al. 2002). VEGF regt nun die Bildung neuer Gefäße an, welche den Tumor adäquat ernähren.\$

#### **1.1.5.4 mTOR und cardiale Hypertrophie**

Hypertrophie bedeutet Zellvergrößerung. In vermehrtem und pathologischem Maße hat dies beim Herzen eine abgeschwächte Pumpleistung zur Folge und führt damit zur Herzinsuffizienz. Ein wichtiger Vermittler dieser Zellvergrößerung ist die mTOR mit nachfolgender Aktivierung des ribosomalen Proteins. Wie schon unter 1.1.4 erläutert, führt die Phosphorylierung des ribosomalen S6 zu einer Zellvergrößerung, was auch bei der cardialen Hypertrophie den entscheidenden Faktor darstellt.

## 1.2 Pharmakologische Hemmung des mTOR und klinische Relevanz

Mitte der siebziger Jahre wurde das Makrolid Rapamycin als fungizide Substanz entdeckt (Vezina et al., 1975). Rapamycin ist ein Produkt des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicus*. Es bildet zusammen mit dem FK506-bindenden Protein 12 (FKBP12) einen Komplex, der die mTOR-Kinase hemmt, was zu einem Stopp in der G1-Phase des Zellzyklus und zu pro-apoptotischen Effekten führt.

Die später entdeckte starke immunsuppressive Wirkung von Rapamycin (RAPA, Sirolimus) führte 1990 zu dessen Zulassung als erfolgreiches Immunsuppressivum nach Nierentransplantation (Rapamune; Wyeth-Ayerst, Collegeville, Pennsylvania, USA). Inzwischen wurden noch drei andere mTOR-Hemmer entwickelt, die eine bessere Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit aufweisen. Dies sind CCI-779 (cell cycle inhibitor 779, temserolimus; Wyeth Research), RAD001 (40-O-[2-hydroxyethyl]-rapamycin, everolimus; Novartis Pharma, Basel, Schweiz) und AP23573 (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, Massachusetts, USA).

Die von Rapamycin beschriebene antiproliferative Wirkung wurde Mitte der neunziger Jahre durch dessen Fähigkeit erklärt, Signaltransduktionswege zu hemmen, die ein Bindeglied darstellen zwischen mitogenen Stimuli und daraus folgender Proteinsynthese, welche für die Zellzyklusprogression von der G1-Phase in die S-Phase notwendig sind (Wiederrecht et al. 1995). Durch die antiproliferativen und die die pathologische Angiogenese hemmenden und damit antitumorösen Effekte von Rapamycin angespornt, konnte in den letzten zwei Dekaden eine gute Wirkung für dieses bei einer Reihe von Tumoren in vitro, in Tiermodellen und in klinischen Studien nachgewiesen werden. Ursache der anti-tumorösen Eigenschaften sind eine Wachstumshemmung der malignen Zellen durch einen Zellzyklusarrest und vermehrte Einleitung in die Apoptose (Wiederrecht et al. 1995, Luan et al. 2002).

Der frühe klinische Einsatz von Rapamycin als antitumoröse Substanz konnte wegen dessen schlechter Wasserlöslichkeit und Stabilität jedoch nicht gelingen. Nach Entwicklung von schon oben beschriebenen Derivaten des Rapamycin wurden diese nun in den letzten Jahren mit Erfolg einer klinischen Evaluation hinsichtlich ihrer antitumorösen Eigenschaften bei einigen Tumoren unterzogen.

In Tabelle 3 werden die Tumore aufgelistet, für die eine antitumoröse Wirkung bei den entsprechenden mTOR-Hemmern nachgewiesen wurde.

m-TOR- Hemmer	Wirkung Erfolg versprechend	Wirkung unzureichend	laufende Studien
Rapamycin	Rhabdomyosarkom (in vitro) (1), CML (Pilotstudie) (2)		
CCI-779	Glioblastom, Melanom, Prostata-, Pankreaskarzinom (in vitro, Tiermodelle) (3), Nierenzellkarzinom (I) (4), SCLC (II,K) (5)	Mammakarzinom (6), Glioblastom (7), metastasierendes Malignes Melanom (8), AML (alle II) (9)	
RAD001	NSCLC (I/II) (10), Myelodysplastisches Syndrom (I/II) (11)		Endometriumkarzinom (II) (NCT 00087685 trial)
AP23573	Glioblastom, Prostata-, Mamma-, Pankreas-, Lungen-, Kolonkarzinom (in vitro) (12), Glioblastom (I) (13,14), AML (II) (15)		

**Tab. 3:** Ausgewählte Studien bezüglich der Wirkung der m-TOR-Hemmer auf verschiedene maligne Tumorerkrankungen.(Abkürzungen in Klammern: I-II= Studienphase, K= in Kombination mit Chemotherapie, Nr.= Quellenangabe im Literaturverzeichnis)

Weitere erfolgreiche Anwendungsgebiete des mTOR-Hemmers Rapamycin sind aufgrund dessen signaltransduktionshemmenden Wirkung die starke Psoriasis und die Graft-versus-Host-Disease (GvHD). Gehemmt wird dabei die Aktivierung der T-Lymphozyten durch Hemmung der Signalübertragung vom Interleukin-2-Rezeptor über die mTOR-Kinase zum Zellkern der T-Lymphozyten, die an der Pathogenese von Psoriasis und der GvHD maßgeblich beteiligt sind.

Auf spezielle Erkenntnisse des mTOR-Signaltransduktionsweges und Erfahrungen in der Therapie der in dieser Arbeit untersuchten benignen und malignen Hautveränderungen wird im Diskussionsteil noch genauer eingegangen.

### 1.3 Aufbau der Haut

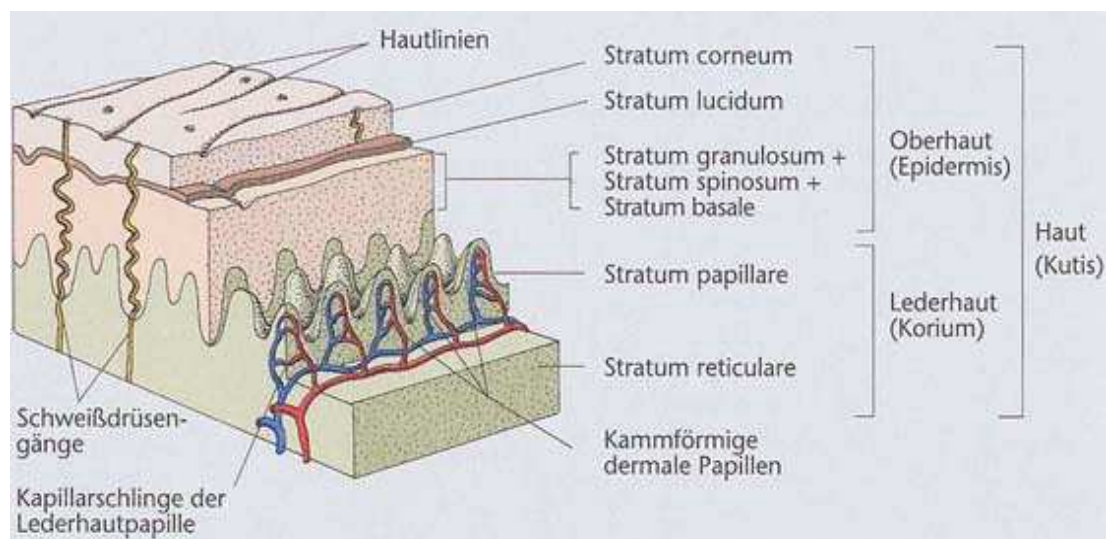
Die Epidermis setzt sich aus vier Zellagen zusammen mit jeweils speziellen morphologischen und funktionellen Eigenschaften.

Auf der Basallamina liegen die palisadenförmig angeordneten, über Hemidesmosomen verankerten zylindrischen Basalzellen, aus deren Zellteilung die differenzierungsfähigen Keratinozyten entstehen.

Nach Austritt aus der Basalzellschicht erfolgt die aktive Bewegung durch die sogenannte Stachelzellschicht (stratum spinosum, ca. 2-5 Zellagen), in der die horizontale Ausrichtung der Keratinozyten erfolgt.

Die Ausdifferenzierung der Keratinozyten erfolgt hauptsächlich im darauffolgenden stratum granulosum (Körnerschicht, ca. 1-3 Zellagen). Ihren Namen hat diese Schicht von den in den Keratinozyten vorkommenden basophilen Keratohyalin granula, die Vorläufer der Keratinmatrix.

Ein stratum lucidum kommt gewöhnlich nur in dicker Epidermis vor (z.B. Handflächen, Fußsohlen). Die Schicht ist sehr dünn und ihre Zellen gehen nach Abschluß ihrer Syntheseleistungen und Differenzierungsvorgänge über in die Zellen des ca. 10-20 Zellagen umfassenden stratum corneum (Hornschicht). Dieses setzt sich aus den jetzt kernlosen, plattenartig übereinander liegenden Korneozyten zusammen.



**Abb. 2:** Aufbau der Kutis

Die Dermis (Korium) (Abb.2) setzt sich aus dem stratum papillare und dem stratum reticulare zusammen. Erstgenannte besteht aus einem lockeren Netz aus Kollagen- und elastischen Fasern. Zwischen diesem Netz befindet sich die aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen bestehende Interzellulärsubstanz. Im stratum papillare befindet sich ein dichtes Netz aus Kapillaren und Lymphgefäßen, zudem ist diese Schicht mit einer Vielzahl an Abwehrzellen (Makrophagen, Lymphozyten), Mastzellen und Fibrozyten sehr zellreich.

Das stratum reticulare besteht aus einem sehr dichten, zellarmen Netz aus Kollagen- und elastischen Fasern. Dieses ist der Grund für die gute Reißfestigkeit und die gute Elastizität der Haut. Auch findet sich hier im Gegensatz zum stratum papillare nur wenig Interzellulärsubstanz.

In der Subkutis befindet sich läppchenartig aufgebautes Fettgewebe mit dazwischenliegenden bindegewebigen Septen. Letztere sind mit der Dermis verbunden und enthalten die Gefäße und Nerven. Aufgaben sind Wärmeisolierung, Energiespeicher und mechanischer Schutz.

## **1.4 Die untersuchten Hautveränderungen**

### **1.4.1 Viral bedingte Hauterkrankungen**

Viruswarzen sind eine häufige durch humane Papillomaviren (HPV) ausgelöste Hauterkrankung, deren Zielzellen die Keratinozyten darstellen. Eine Klassifizierung der hüllenlosen DNS-Viren erfolgte durch deren Gensequenzierung. Dabei kann man zwischen den einzelnen Gruppen zum Beispiel bezüglich Tropismus (Haut oder Schleimhaut) oder biologischen Charakteristika Unterschiede sehen. Mittlerweile sind über 80 HPV-Typen bekannt.

Übertragen werden die Viren von Mensch zu Mensch oder durch Autoinokulation.

Es gibt HPV-Typen die eine onkogene Potenz besitzen wie HPV-16 und HPV-18, weshalb diese auch als „high-risk“- Typen bezeichnet werden. Durch den Einbau von DNS-Bruchstücken in das Genom der Wirtszelle können auch lange Zeit nach der Primärinfektion Proteine produziert werden, die zelluläre Kontrollmechanismen und die Apoptose stören. Hauptsächlich ist hierfür die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 verantwortlich. Nachfolgend kommt es zu einer Tumorentwicklung und späteren Entwicklung von invasiven Karzinomen. Bekannt ist diese Art von Tumorentwicklung vor allem bei Tumoren des Anogenitalbereiches, der Mundhöhle und des Ösophagus.

Die Virusreplikation geschieht in den suprabasalen Zellen, was mit einer starken Synthese von viralen Strukturproteinen vor allem in den oberen Epidermisschichten einhergeht. Folglich kommt es durch die Proliferation der suprabasalen Epidermisschichten zu Akanthose, Para- und Hyperkeratose.

Je nach Virustyp, Morphologie und Lokalisation werden verschiedene Varianten von HPV-induzierten Warzen unterschieden, wie die Verruca vulgaris oder die Verruca plantaris an der Haut und die Condylomata acuminata oder die Condylomata plana an der Schleimhaut.

In dieser Arbeit wurden nur die Verruca vulgaris und die Condylomata acuminata auf die rpS6-Expression hin untersucht.

#### **1.4.1.1 Die Verruca Vulgaris**

Die meist flachen Knoten mit papillomatöser und verruköser Oberfläche treten hauptsächlich an den Dorsalseiten der Finger, am Handrücken, plantar und am Knie auf. Größere Konvolute aus ursprünglich einzeln stehenden Warzen kommen vor.

Am häufigsten sind bei den Verrucae vulgares die HPV-Typen 2 und 4 zu finden.

##### **1.4.1.1.1 Histologie der Verruca vulgaris**

Bei den virusbedingten Tumoren sind Akanthose, ausgeprägte Papillomatose und kräftige Hyperkeratose typisch. Charakteristisch sind perinukleär vakuolisierte, von einem hellen Zytoplasmasaum umgebene Keratinozyten mit kleinen, basophilen Kernen. Häufig lässt sich auch eine Doppelkernigkeit erkennen. Diese in kleinen Foci und vor allem in den oberen Epidermisschichten vorkommenden Zellen werden Koilozyten genannt, welche Ausdruck des zytopathogenen Effektes der HPV sind.

Ein perivaskuläres entzündliches Infiltrat kommt häufig vor.

##### **1.4.1.1.2 Therapie der Verruca vulgaris**

Da Viruswarzen der Haut eine benigne und selbstlimitierende Infektion darstellen, sollte erst konservativ behandelt werden. Dazu eignen sich Hauthobel, keratolytische Salben oder Kolloide. Auch vorherige Keratolyse und nachfolgende Entfernung mit einem scharfen Löffel zeigt gute Ergebnisse. Bleibt dies erfolglos, kann das Kryoverfahren mit flüssigem Stickstoff oder das elektrokaustische Verfahren angewendet werden, die aber alle eine hohe Rezidivrate aufweisen.

##### **1.4.1.2 Die Condylomata acuminata**

Die meist rötlichen, weichen Warzen kommen multipel vor allem im Genitoanalbereich vor. Bei Männern ist häufig das Frenulum und der sulcus coronarius des Penis betroffen, bei Frauen die Labia minora und die hintere Kommissur, aber auch die gesamte Vagina und die Zervix uteri können betroffen sein. Bei Konfluenz entstehen plattenartige Vegetationen.

Condylomata acuminata zählen zu den „sexual transmitted diseases“ (STDs), da sie hauptsächlich über den Geschlechtsverkehr übertragen werden. Häufigste verursachende HPV-Viren sind die Typen 6, 11, 16, 18, 31, 51. Die „high-risk“-HPV-Typen 16, 18 und 31 besitzen die oben beschriebene onkogene Potenz, was nach späterer maligner Transformation zu invasiven Plattenepithelkarzinomen oder zum Zervixkarzinom führen kann. Weitere Komplikationen sind Superinfektionen und

Fistelbildungen bei invasivem Wachstum der Condylomata (perforierende Condylomata acuminata).

#### **1.4.1.2.1 Histologie der Condylomata acuminata**

Condylomata acuminata weisen eine Akanthose mit verlängerten Reteleisten, eine Papillomatose und eine geringgradige Hyperkeratose auf. Auch kommen Koilozyten vor, was ein wichtiger diagnostischer Hinweis ist. Mitosen und Zellatypien können ebenfalls auftreten. Subepidermal befindet sich häufig ein entzündlich bedingtes, lymphoidzelliges Infiltrat.

#### **1.4.1.2.2 Therapie der Condylomata acuminata**

Häufig wird das zytostatisch wirksame Podophyllin (30%-ig in alkoholischer Lösung) auch bei Befall der Vagina und der Zervix topisch angewendet, was zu einer lokalen Entzündungsreaktion und Koagulationsnekrose der Kondylome führt. Bei stark hyperkeratotischen Kondylomen ist ein Therapieversuch mit Trichloressigsäure, elektrokaustischer oder CO<sub>2</sub>-Laser-Abtragung zu erwägen.

Eine seit kurzem zugelassene und sehr erfolgreiche Substanz ist Imiquimod. Diese induziert bei lokaler Anwendung Interferone und Zytokine, was zu einer immunologischen Reaktion gegen die Kondylome führt.

#### **1.4.1.3 Die anale intraepitheliale Neoplasie (AIN)**

Die intraepitheliale Neoplasie (IN) stellt eine Vorstufe zum invasiven Plattenepithelkarzinom dar. Sie kann makroskopisch durch verschiedene Effloreszenzen auffallen. Häufig sind flach-rote Makulae, pigmentierte Papeln und leukoplakieähnliche Areale anzutreffen. Auch rötliche und/oder weiße Plaques kommen vor.

Regelmäßig sind hier ebenfalls onkogene HPV-Typen, vor allem die Typen 16 und 31, seltener die Typen 18 und 33, nachweisbar.

Je nach Zellatypien bzw. Entdifferenzierung der Zellen unterscheidet man 3 Grade der IN von leichtgradiger (Grad 1) über mittelgradige (Grad 2) bis zu schwergradiger (Grad 3) intraepithelialer Neoplasie und je nach Lokalisation die vulväre, die vaginale, die zervikale, die penile, die perianale und die anale intraepitheliale Neoplasie (AIN).

Die AIN kommt im Analhautbereich vor und kann die oben beschriebenen Zellatypien in Kondylomen oder sogar in makroskopisch kaum veränderter Haut zeigen.



#### **1.4.1.3.1 Histologie der analen intraepithelialen Neoplasie**

Die AIN zeigt je nach Grad unterschiedliche histologische Veränderungen. Bestehen bei der AIN Grad 1 noch geringgradige Zellatypien in den unteren Epidermisschichten, so verstärken sich diese bis hin zu Grad 3 mit starken Zellatypien und großem Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis in allen Schichten der Epidermis. Übertreten diese atypischen basaloiden Keratinozyten die Basalzellschicht, so spricht man schon von einem invasiven Karzinom. Die AIN, vor allem mit Grad 2- und Grad 3- Veränderungen, entspricht somit einer Präkanzerose bzw. der Vorstufe eines Karzinoms.

#### **1.4.1.3.2 Therapie der analen intraepithelialen Neoplasie**

Bei Verdacht auf eine AIN sollte immer eine Biopsie mit histologischer Klärung zum Ausschluß einer Mikroinvasion und damit eines manifesten Plattenepithelkarzinoms durchgeführt werden.

Eine AIN Grad 1 kann man ähnlich der Therapie bei Condylomata acuminata mit Podophyllotoxin, Trichloressigsäure oder Imiquimod topisch behandeln. Auch eine intraläsionale Behandlung mit Interferon- $\alpha$  ist möglich.

Eine invasive Behandlung nach Diagnosesicherung ist vor allem den höhergradigen Veränderungen vorbehalten. Dabei können elektrokaustische Abtragung, Entfernung mittels CO<sub>2</sub>-Laser oder die Kryotherapie zum Einsatz kommen. Natürlich ist auch die komplette chirurgische Exzision möglich. Eine topische Therapie wie bei der AIN Grad 1 kann nach den invasiven Verfahren zur Heilung und Rezidivprophylaxe beitragen.

### **1.4.2 Das Plattenepithel- oder spinozelluläre Karzinom**

Das Entstehen eines spinozellulären Karzinoms erfordert lange Zeit und die Einwirkung von Karzinogenen, also mutagene exogene Faktoren. Diese können zum Beispiel chemische Substanzen (Arsen, aromatische Amine, polyzyklische Kohlenwasserstoffe u.v.m.), Viren (HPV) oder das UV-Licht sein, die am Beginn der Kanzerogenese (Initiation) zu Mutationen in den Keratinozyten führen. Weitere Schritte beinhalten die Promotion (Proliferation durch chronisch entzündliche oder chemische Noxen), die prä maligne Konversion (chromosomale Defekte durch autonome Punktmutationen, Deletionen u.a.) und schließlich durch erneute Mutation die maligne Konversion in die neoplastische Zelle mit Fähigkeit der Invasion und Metastasierung. Karzinogene führen zu Mutationen von Protoonkogenen (z.B. ras, myc und erb), die dann als dauernd überexprimierte Onkogene zu einer Proliferation der mutierten Zelle führen, da diese Gene für wachstums- und proliferationsfördernde Proteine kodieren. Des Weiteren führen Karzinogene zu Mutationen und Ausfall von Tumorsuppressorgenen wie RB (Retinoblastom) und NF-1 (Neurofibromatose), was ebenfalls einem Proliferationsvorteil entspricht, da diese für wachstumshemmende Proteine kodieren.

Der Hauptrisikofaktor für das spinozelluläre Karzinom ist die kumulative Exposition mit dem kurzwelligem UV-B-Licht (280-320 nm). Eine wichtige Ursache dafür ist die Mutation im p53-Gen. Hauptfunktionen des p53-Proteins sind der Stopp der Mitose, bis Schäden an der DNA versorgt sind, und die Einleitung der Apoptose, falls diese DNA-Schäden nicht mehr korrigiert werden können. Fallen diese Funktionen aus, ist auch hier die Proliferation des mutierten Klons die Folge.

Aus diesem Grund kommen spinozelluläre Karzinome vor allem an lichtexponierten Stellen wie dem Gesicht und bei Personen mit hellem Hauttyp vor. Plattenepithelkarzinome entstehen hauptsächlich aus Präkanzerosen wie den aktinischen Keratosen der sonnenexponierten Stellen, der präkanzerösen Leukoplakie der Mundschleimhaut oder dem Morbus Bowen an nicht lichtexponierten Bereichen. Auch aus chronisch entzündlichen Hautveränderungen wie Verbrennungsnarben oder einer chronische Radiodermatitis kann nach Jahren ein spinozelluläres Karzinom entstehen.

Klinisch lassen sich flächige, exophytische, diffus-infiltrierende oder oberflächlich bzw. tief exulzerierte Tumoren unterscheiden. Subjektiv fallen nur geringe Beschwerden auf. Eine seltene und meist späte Metastasierung erfolgt lymphogen

vor allem in die regionalen Lymphknoten. Zu einer Fernmetastasierung kommt es selten.

#### **1.4.2.1 Histologie des spinozellulären Karzinoms**

Histologisch zeigen sich in breiten Konglomeraten oder fingerförmig in die Tiefe wachsende Zellverbände. Typisch sind die häufig vorhandenen Hornperlen, konzentrisch angeordnete Keratinozyten mit einer parakeratotischen Verhornungstendenz zum Zentrum hin. Die Keratinozyten bieten ein breites Spektrum von nahezu normaler bis stark veränderter Morphologie mit großen, hyperchromatischen Kernen und zentralem, deutlichen Nukleolus, Variabilität im meist weiten Zytoplasmasaum und Einzelzeldyskeratosen mit stark amorphem Zytoplasma. Die regelrechte Schichtung wie bei normaler Epidermis ist nicht mehr nachweisbar.

#### **1.4.2.2 Therapie und Prognose des spinozellulären Karzinoms**

Standard ist heute eine chirurgische Exzision in toto mit einem 1 cm breiten Sicherheitsabstand. Hierbei hat sich die sog. mikrographische Chirurgie oder die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie (MKC) durchgesetzt. Dabei wird der Tumor unter histologischer Schnittrandkontrolle in mehreren Schritten mit geringen Seitenabständen von ca. 2-5 mm exziiert, um auch kleinste Tumorausläufer zu erfassen, die Ausgangspunkt eines Rezidivs sein können. Hierdurch ließ sich die Rezidivrate drastisch von ca. 15-40% auf ca. 3-4% senken.

Bei kleinen und oberflächlichen Tumoren kann auch die Elektrokoagulation durchgeführt werden, allerdings mit dem starken Nachteil, dass hinterher die histologisch exakte Tumorausdehnung nicht mehr ermittelt werden kann. Bei schwierig in toto zu entfernenden Tumoren wie im Zungen- oder Gaumenbereich kann die Radiotherapie in Kombination angewendet werden, ebenfalls bei Metastasen. Bei inoperablen Tumoren bleibt nur noch die nicht kurative Behandlung mit Zytostatika wie Cisplatin, Methotrexat oder Bleomycin übrig, die zu Remissionsraten von bis zu 40% führen.

Hinweisend auf eine schlechte Prognose sind der Anteil an hochgradig entdifferenzierten Tumorzellen, Akantholyse, ein hoher Mitoseindex, perineurale Invasion und Ulzerationen.

Ebenfalls als prognostisch relevant wird heute analog dem malignen Melanom die Eindringtiefe angesehen. Dabei wird die maximale Ausdehnung des Tumors vom

Stratum granulosum bis zur tiefsten Tumorzellage hin in Millimeter gemessen. Prognostisch ungünstig ist dabei eine Gesamttumordicke von über 4 mm. Des Weiteren weisen Tumoren mit einer Ausdehnung von über 2 cm eine eingeschränkte Heilungs-Wahrscheinlichkeit auf.

Insgesamt ist die Prognose des spinozellulären Karzinoms jedoch sehr gut mit einer Fünfjahres-Heilungsrate bei in toto entfernten Tumoren von 90-95%.

### **1.4.3 Das Basalzellkarzinom (BCC)**

Das Basalzellkarzinom (BCC) ist ein semimaligner Tumor. Dies bedeutet zwar die Fähigkeit einer Invasion in tiefer gelegene Strukturen, es kommt aber außerordentlich selten zu einer Metastasierung. Ähnlich dem spinozellulären Karzinom tritt das BCC häufiger bei Menschen hellen Hauttyps auf, außerdem korreliert die Inzidenz ebenfalls mit der UV-Exposition, was auch den wichtigsten mutagenen Faktor darstellt.

Es tritt zwar gehäuft im Gesichtsbereich auf, aber es sind auch Körperstellen mit geringerer kumulativer UV-Exposition betroffen, wie das Kapillitium, der retroaurikuläre Bereich und der Rumpf. Ein weiteres Charakteristikum ist sein ausschließliches Auftreten an haarfollikeltragenden Regionen.

Die Haupt- oder Primäreffloreszenz besteht aus einem derben, hautfarbenen und mehrere Millimeter großen Knötchen. Typisch ist ein perlmuttartiger Glanz und das Vorhandensein von Teleangiektasien, die sowohl auf dem glatten Knötchen vorkommen, als auch dieses umgeben.

Klinische Formen beinhalten das am häufigsten vorkommende knotige BCC, das zystische BCC und das durch Pigmenteinlagerungen charakterisierte pigmentierte BCC. Selten kommen das einem Psoriasisherd ähnelnde, oberflächliche Rumpfhautbasalzellkarzinom und das sklerodermiforme BCC vor. Letzteres zeigt selten die typische Knötchen und Teleangiektasien und kommt vorwiegend als flache Infiltration vor, weswegen es sehr schwer zu diagnostizieren ist.

Die beiden exulzerierten Formen des BCC sind das sog. Ulcus rodens, das horizontal wächst und zu weitflächigen, polyzyklisch begrenzten Exulzerationen führt und das Ulcus terebrans, das vertikal wächst und schnell tiefer gelegene Strukturen erreicht.

### **1.4.3.1 Histologie des Basalzellkarzinoms**

Histologische Merkmale des BCC sind die von der Basalzellschicht der Epidermis ausgehenden basaloiden Tumorzellproliferationen, die scharf abgegrenzt von einem bindegewebigen Stroma und zystischen Spalten umgeben sind und noch Verbindung zur Epidermis zeigen.

Typisch sind auch eine starke Basophilie und eine hohe Kern/Plasma-Relation der semimalignen Zellen. Ein histologisches Charakteristikum der Basalzellkarzinome ist die palisadenförmige Aufreihung der äußeren Tumorzellreihen, während die inneren Zellen ungeordnet liegen.

Das umgebende lymphoide Entzündungsinfiltrat kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

### **1.4.3.2 Therapie und Prognose des Basalzellkarzinoms**

Therapie der Wahl ist heute die Exzision im Gesunden. Auch beim BCC hat sich die Methode der mikrographischen Chirurgie durchgesetzt, mit der eine Senkung der Rezidivrate auf ca. 1-2% erreicht werden konnte.

Weitere Behandlungsmöglichkeiten sind die Röntgenbestrahlung bei älteren oder nicht operationsfähigen Patienten mit dem Nachteil, dass keine histologische Sicherung in toto möglich ist, sowie die photodynamische Therapie, die Kryotherapie und topisches 5-Fluoruracil bei oberflächlichen Basalzellkarzinomen.

Eine Therapie mit Interferon- $\alpha$  ist im Grunde möglich, aber wegen langer Therapiedauer, Nebenwirkungen und hohen Kosten unpraktikabel.

Die Prognose ist quoad vitam sehr gut, trotzdem können bei massiven Destruktionen tödliche Ausgänge resultieren. Dies betrifft zum Beispiel die Destruktion der Schädelkalotte mit einer daraus resultierenden Meningoenzephalitis.

#### **1.4.4 Das maligne Melanom**

Das maligne Melanom (MM) ist die am häufigsten zum Tode führende maligne Hauterkrankung der weißen Bevölkerung.

Risikofaktoren sind dispositionelle Faktoren wie heller Hauttyp, positive Familienanamnese, Geschlecht (weiblich) und genetische Erkrankungen wie die Xeroderma pigmentosa, bei der es zu einem gestörten DNA-Repair kommt. Die Entstehung des MM wird auch durch erworbene Faktoren wie die Anzahl der Sonnenbrände in der Kindheit oder eine iatrogene bzw. krankheitsbedingte Immundefizienz gefördert.

Zu etwa zwei Dritteln entstehen maligne Melanome de novo aus unveränderter Haut, zu etwa einem Viertel aus dysplastischen Naevuszellnaevi und zu etwa 10% aus kongenitalen Naevuszellnaevi (NZN), letztere zwei Varianten stellen somit auch einen Risikofaktor für das MM dar.

Die Pathogenese des MM beruht auf ähnlichen Mechanismen wie die Karzinogenese beim spinözellulären Karzinom. Am Anfang steht die erste Mutation, entweder durch UV-Licht erworben oder schon angeboren. Daraufhin kommt es wiederum zur Promotion und weiteren durch UV-Licht bedingten Mutationen, die jetzt auch in der Phase der praemalignen Konversion spontan ablaufen (Punktmutationen, Deletionen etc.). Es gibt eine große Anzahl von verschiedenen Mutationen, die dann zu einem malignen Zellklon, Invasion und Metastasierung führen. Beispiele sind die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16, dessen Protein zu einem Zellzyklusstopp führt, und der Verlust des Transkriptionsfaktors AP-2, der für die Regulation weiterer, an Tumorwachstum und Metastasierung beteiligter Gene zuständig ist. Fällt nun die wahrscheinlich wichtigste Kontrollstelle, nämlich das AP-2 aus, kommt es zu unkontrollierter Tumorzellproliferation und auch Metastasierung.

Die klinischen Typen des MM unterscheiden sich u.a. hinsichtlich des Zeitpunktes des invasiven Wachstums. Am Anfang kommt es beim sog. Melanoma in situ zu einem horizontalen Wachstum in der Epidermis. Dieses Primärstadium dauert je nach Melanomtyp unterschiedlich lange, bis die Basallamina durchbrochen wird und ein invasives MM vorliegt.

Gemeinsamkeiten aller Melanomtypen findet man bei der Kontur (unregelmäßig, polyzyklisch), der Begrenzung (meist scharf), der Farbe (viele Farben von weiß über rot bis hin zu braun und schwarz) und der Architektur (von flach bis knotig, aber auch atrophe oder ulzerative Bezirke können vorkommen).

Es gibt vier Haupttypen des MM, deren Charakteristika und klinisches Bild in Tabelle 4 und 5 zusammengefasst sind. Der am häufigsten vorkommende Typ ist das superfiziell spreitende MM (SSM). Die anderen drei Haupttypen, das noduläre MM, das akro-lentiginöse MM (ALM) und das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) treten seltener auf.

Melanomtyp	Rel. Häufigkeit	Prädilektionsalter in Jahren	Prädilektionsstellen	In situ Wachstum (ca.)	Besonderheiten
SSM	65%	30-60	Sonnenexponierte Regionen	5-7 a	Oft verletzlich
NM	15%	40-60	Sonnenexponierte Regionen	Bis 12 Monate	Aggressivster Typ durch schnelles vertikales Wachstum, sehr verletzlich
ALM	5%	40-60	Akren (palmar und plantar), Nagelbett	Bis 3 a	Meist erst späte Diagnose wegen Lokalisation und harmlosem Erscheinungsbild
LMM	5%	>60	Gesicht, Handrücken	Bis 15-20 a	Entsteht nach Jahren aus einer Lentigo maligna

**Tab.4:** Klinische Merkmale der häufigsten Melanomtypen

Melanomtyp	Begrenzung	Farbe	Oberfläche
SSM	Polyzyklisch, unregelmäßig, bizarr	Inhomogen: hell-dunkelbraun, schwarz, rötlich (Gefäße), weißlich (Depigmentierung)	Unregelmäßig, erhaben bis eingesunken, knotig bei invasivem Wachstum
NM	Unschärf und unregelmäßig	Inhomogen: dunkelbraun-schwarz, scheckig	Knotig unregelmäßig, oft erosiv und exulzeriert
ALM	Polyzyklisch, bizarr konfiguriert	Inhomogen: dunkelbraun-schwarz, scheckig, später depigmentierte Bereiche	Erst flach, dann knotig und exulzeriert
LMM	Scharf, polyzyklisch und unregelmäßig	Inhomogen: dunkelbraun-schwarz, scheckig	Erst flache Makula, knotige Anteile bei invasivem Wachstum

**Tab.5:** Morphologie der häufigsten Melanomtypen



Sehr seltene klinische Formen des MM sind Melanome der Schleimhaut (Mund- und Genitalschleimhaut), der inneren Organe, depigmentierte Melanome und das Aderhautmelanom des Auges. Meist werden sie aufgrund ihrer Lage oder ihrer unauffälligen Morphologie erst sehr spät entdeckt. Zusammen machen sie ca. 10% aller Melanome aus.

Die Metastasierung erfolgt meist erst lymphogen in die Umgebung des Primärtumors (Satellitenmetastasen) und weiter entfernt im Bereich der ableitenden Lymphwege (In-transit-Metastasen) und Lymphknoten. Erst später kommt es durch hämatogene Metastasierung zum Befall der inneren Organe, vor allem der Lunge, Haut, Leber, ZNS, Nieren, Nebennieren und Knochen.

#### **1.4.4.1 Histologie des malignen Melanoms**

Die Tumorzellen bilden Nester verschiedener Größe sowohl in der gesamten Epidermis als auch tiefer in der Dermis, die zur Konfluenz neigen. Aber auch Einzelzellformationen von Melanomzellen, die die Fähigkeit der Kohäsion verloren haben, können vor allem in der Epidermis vorkommen. Melanome zeigen makroskopisch wie mikroskopisch eine unscharfe, vor allem laterale Begrenzung, d.h. es kommen noch einzelne atypische Melanozyten außerhalb des letzten erkennbaren Melanozytennestes vor.

Zytomorphologisch zeigen sich verschiedene Zelltypen mit meist atypischen Kernen, Mitosen kommen vor allem an der Basis des Tumors vor.

Typischerweise breiten sich die Melanozyten entlang der Adnexstrukturen aus. Andere charakteristische Kriterien sind eine begleitende aktinische Elastose, Zeichen der Regression wie lymphoidzelliges Infiltrat und Fibrose und der Nachweis von Plasmazellen.

Die oben aufgeführten klinischen Subtypen zeigen zwar histologische Unterschiede, es gibt aber auch sehr viele Überschneidungen, weshalb eine genaue histologische Unterteilung heute nicht mehr benutzt wird. Mikroskopische Charakteristika einzelner klinischer Subtypen sind die in der Junctionszone bandförmig angeordneten atypischen Melanozyten und der starke Befall der Adnexstrukturen beim LMM und das Vorkommen einzelner oder in Nestern gelegener Melanomzellen in allen Schichten der Epidermis mit einer ausgeprägten Hyperkeratose der Epidermis beim ALM.

#### **1.4.4.2 Therapie und Prognose des malignen Melanoms**

Ein kurativer Ansatz ist immer mit der Exzision verbunden. Dabei werden je nach Tumordicke, gemessen von Stratum granulosum bis zum unteren Tumorrand, verschiedene Sicherheitsabstände gewählt. Diese sind beim Melanoma in situ

0,5 cm, bei Tumordicke unter 2 mm beträgt der Sicherheitsabstand 1 cm und bei Tumordicke über 2 mm wird er auf 2 cm erhöht. Bei akraler Lokalisation (Finger oder Zehen) wird eine Teilamputation durchgeführt. Der Defekt wird meist primär, seltener mittels Lappenplastiken gedeckt.

Beträgt die Tumordicke 1 mm und mehr, so wird heute die „sentinel-node“ –Biopsie empfohlen. Hierbei wird der erste im Lymphabflussgebiet des Tumors liegende Lymphknoten mittels radioaktiver Markierung durch ein Radionuklid (Technetium 99 Nanokolloid) und/oder Patentblau identifiziert. Diese zwei Substanzen werden in die direkte Umgebung des Tumors injiziert und reichern sich dann in diesem ersten „Wächterlymphknoten“ an. Nach dessen Entfernung kann dieser histologisch auf Mikrometastasen hin untersucht werden. Ist er frei von diesen, erübrigt sich die regionäre Lymphknotendisektion, die bei klinisch, durch Bildgebung oder im Sentinel-Lymphknoten nachgewiesenen Metastasen durchgeführt werden muss.

Eine Radiotherapie wird heute hauptsächlich bei inoperablen Primärtumoren und bei Lymphknoten- oder tiefen Hautmetastasen durchgeführt.

Eine Chemotherapie zeigt teilweise gute Remissionsraten, eine Lebensverlängerung oder gar Heilung ist aber immer noch nicht möglich. Eine gut wirksame Substanz ist das alkylierende Imidazolderivat Dacarbazin (DITC). Aber auch andere Substanzgruppen kommen zum Einsatz wie das Cistplatin (Platinderivat) oder Vincristin und Vinblastin (Vincaalkaloide). Zytostatika-Kombinationsschemata erbrachten gegenüber der Monotherapie keine signifikanten Vorteile.

Auch eine Zytokintherapie mit IFN- $\alpha$  zur Rezidivprophylaxe führt nach Exzision des Primärtumors nur zu einer Verlängerung des erscheinungsfreien Intervalls.

Eine Kombination aus Zytostatika und Zytokinen wie die Kombination aus DITC und IFN- $\alpha$  wird zwar heute häufig eingesetzt, zeigte aber auch nur geringe Vorteile für die Remissionsraten im Vergleich zur Monotherapie mit DITC.

Eine Erfolg versprechende Therapiealternative, die auch schon gute Ergebnisse im Tiermodell gezeigt hat, ist die spezifische aktive Immuntherapie mit tumorspezifischen Antigenen. Diese führen als Vakzinierung zu einer spezifischen und verstärkten Immunantwort gegen den Tumor.

Metastasen werden je nach Lokalisation und Ausdehnung unterschiedlich behandelt. Satelliten- und in Transit-Metastasen werden exzidiert und nachbestrahlt. Fernmetastasen werden nach Möglichkeit auch komplett exzidiert, um lokale und systemische Komplikationen zu verhindern. Eine gleichzeitige Chemotherapie, vor allem mit DITC, soll die Remissionsraten verbessern.

Die sogenannte Perfusionstherapie, bei der von Metastasen befallene Extremitäten mit Zytostatika und TNF- $\alpha$  unter Hyperthermie perfundiert werden, hat palliativen Charakter.

Die Prognose des MM hängt wie bei vielen anderen Tumoren auch von der TumorgroÙe und von der Ausbreitung ab. Prognostische Faktoren sind dabei die vertikale Tumordicke, das Vorhandensein von Ulzerationen, das Geschlecht (schlechter für Männer) und die Lokalisation des Tumors (ungünstig für Melanome des Stammes, der Oberarme, des behaarten Kopfes und für das ALM an den Akren). Die Prognose für Tumoren mit einer Tumordicke  $<0,75$  mm liegt bei einer Zehnjahresüberlebensrate von  $>97\%$  und sinkt auf ca.  $50\%$  bei einer Tumordicke  $>4$  mm.

Kam es schon zu einer Metastasierung, so sinkt die Zehnjahresüberlebensrate drastisch. Sie beträgt bei In-transit-Metastasen ca.  $30-40\%$ , während sie bei regionären Lymphknotenmetastasen auf  $15-30\%$  absinkt. Bei Fernmetastasen beträgt die mediane Überlebenszeit nur noch ca. ein halbes Jahr.

### **1.4.5 Das Keloid**

Keloide sind Hyperproliferationen des Bindegewebes. Dabei besteht der Unterschied zu hypertrophen Narben darin, dass die Proliferationen über den Bereich des Traumas hinausreichen.

Keloide sind anfangs rötliche wulstartige, prall gespannte und derbe Papeln, Plaques oder Knoten der Haut, die je nach individueller Disposition vor allem an postinflammatorischen- oder Verbrennungsnarben entstehen. Keloide können aber auch spontan entstehen. Wichtige individuelle Faktoren sind dabei das Geschlecht, das Alter, die Rasse (weitaus häufiger betroffen ist die schwarze Bevölkerung) und Lokalisation der Wunde. Exogene Faktoren wie aktuelle Medikation (Kortikoide, Zytostatika) und Entzündung im Wundbereich spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung von Keloiden.

Die Prädilektionsstellen des Keloids sind das Sternum, die Schulter und die Brust.

Später werden die Keloide haut- oder elfenbeinfarben und können Teleangiektasien aufweisen. Neben der kosmetischen Beeinträchtigung kommt es eventuell auch zu Kontrakturen bei Gelenküberschreitung, außerdem zu Paraesthesien, Juckreiz und Spontanschmerz.

#### **1.4.5.1 Histologie des Keloids**

In der verbreiterten Dermis lassen sich zahlreiche Fibroblasten und Mastzellen finden, die zwischen einer großen Masse aus hyalin verbreiterten Kollagenfasern liegen. Kapillaren und Entzündungsinfiltrate kommen in frischen Keloiden vor. Später erkennt man eine zellarme Anreicherung aus homogenisierten Kollagenfasern. Eine Atrophie der Haare, Schweiß- und Talgdrüsen ist typisch. Die Epidermis zeigt sich unauffällig, selten liegt eine akanthotische Epidermis vor.

#### **1.4.5.2 Therapie des Keloids**

Eine Standardtherapie der Keloide existiert nicht. Es müssen immer individuelle Faktoren berücksichtigt werden.

Die Behandlung mittels Kortikoidinjektionen zeigt vor allem bei frischen Keloiden gute Ergebnisse. Ursache dafür ist die Hemmung der Fibroblasten, die hauptsächlich bei der Keloidbildung hochaktiv sind und große Massen an Kollagen bilden.

Ebenfalls früh eingesetzt werden sollte die Druckbehandlung mit Kompressionsbandagen. Diese müssen für eine lange Zeit (3 Monate bis 2 Jahre) angewendet

werden, um eine effektive Verminderung der kapillären Perfusion und Abflachung der Narbe zu erreichen.

Die Kryotherapie führt bei aktiven Narben zu einem kältebedingten Zelltod und Mikrothrombosierungen. Diese Therapiealternative benötigt ebenfalls viel Zeit und kann nachteilig zu Hypopigmentationen führen.

Die Bestrahlung zeigt vor allem gute Ergebnisse als Rezidivprophylaxe nach der chirurgischen Entfernung des Keloids. Eine alleinige Strahlenbehandlung sollte kurze Zeit nach Keloidbildung erfolgen, da dieses nach ca. einem halben Jahr sehr unempfindlich gegen Bestrahlung ist.

Ebenfalls nach operativer Therapie zur Rezidivprophylaxe können Kortikoidinjektionen oder die Druckbehandlung angewendet werden. Eine alleinige operative Therapie führt meist zu noch verstärkter reaktiver Keloidbildung.

### **1.4.6 Das idiopathische Angiosarkom**

Es gibt verschiedene Entitäten des Angiosarkoms. Dabei unterscheidet man unter anderem das Kaposi-Sarkom, das klassische, idiopathische Angiosarkom, das Angiosarkom in chronischem Lymphödem und das bestrahlungsinduzierte Angiosarkom. In dieser Arbeit wird nur auf das klassische, idiopathische Angiosarkom eingegangen.

Dieses kommt vorwiegend im Kopf-Hals-Bereich älterer Menschen vor mit Bevorzugung des männlichen Geschlechtes. Im Frühstadium zeigen sich Ödeme und erysipelartige Schwellungen, die bald zu derben, dunkellivid- roten Knoten heranwachsen. Schnell entstehen auch Tochterherde, die das gesamte Kapillitium und Gesicht mit exulzerierten und teils nekrotischen Herden bedecken.

Das idiopathische Angiosarkom metastasiert früh vor allem in regionale Lymphknoten und die Lunge.

#### **1.4.6.1 Histologie des idiopathischen Angiosarkoms**

Das klassische Angiosarkom zeigt zahlreiche Mitosen und endotheliale Kernatypien. Typisch sind die dissezierenden lymphangiomähnlichen Gefäßspalten mit Papillen aus übereinander geschichteten Endothelien neben Bereichen mit vakuolisierten Tumorzellen, welche ein siebartiges Muster bilden. Daneben zeigen sich eine aktinische Elastose und ein multifokales Wachstum mit tumorfreien Zwischenbereichen („skip areas“). Auch Nekrosen und Hämorrhagien sind gehäuft feststellbar.

#### **1.4.6.2 Therapie und Prognose des idiopathischen Angiosarkoms**

Die Therapie besteht in einer großzügigen chirurgischen Exzision bei kleineren Tumoren evtl. mit Entfernung der regionalen Lymphknoten des Halses und einer Bestrahlung der Lymphabflusswege. Bei ausgedehntem Befall wird die alleinige Bestrahlung angewendet.

Die Prognose ist aufgrund des schnellen Wachstums und der schnellen Metastasierung sehr schlecht.

## 2 Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen

Es ist bekannt, dass mehrere verschiedene Transduktionswege an der humanen Tumorgenese beteiligt sind. Unter anderem gilt dies auch für den mTOR-Signaltransduktionsweg, was in der Einführung schon angesprochen wurde. Die Phosphorylierung des ribosomalen S6-Proteins als Zeichen der mTOR-Aktivierung und damit der Zellzyklusprogression und des Zellwachstums betrifft aber keineswegs nur maligne proliferative Prozesse, sondern kann auch bei gutartigen Zellproliferationen verschiedener Gewebe vorkommen.

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit auf die rpS6-Expression wurde nun den Fragen nachgegangen, bei welchen malignen Hautveränderungen es eben zu einer solchen rpS6-Expression kommt, mit welcher Stärke dieses Protein als Hinweis der Intensität der mTOR-Aktivität exprimiert wird und ob sowie aus welchem Grund auch andere Zelltypen in der Umgebung der malignen Zellen von einer Anschaltung des mTOR-Signaltransduktionsweges betroffen sind. Untersucht wurden dabei das spinözelluläre Karzinom, das Basalzellkarzinom, das maligne Melanom und das Angiosarkom.

Des Weiteren war auch die Frage interessant, ob es bei gutartigen Läsionen, die zu einem invasiven Tumor führen können, wie die durch humane Papillomviren induzierten Condylomata acuminata in einem spinözellulären Karzinom münden können, ebenfalls zu einer vermehrten und verstärkten rpS6-Expression kommt und welche Zelltypen in diesen Läsionen besonders davon betroffen sind. Mit der gleichen Fragestellung wurde die praeinvasive schwere anale intraepitheliale Neoplasie Grad 3 dieser immunhisto-chemischen Analyse unterzogen.

Nachfolgend ergab sich dabei noch die Frage, ob ergänzend zur klassischen Histologie die Untersuchung auf die rpS6-Expression bei praemalignen und praeinvasiven Hautveränderungen sinnvoll hinsichtlich Detektion dieser praemalignen oder schon malignen Keratinozyten ist.

Wie oben schon erwähnt, ist eine Zellproliferation nicht nur Zeichen eines malignen Zellklons, sondern kommt auch bei gutartigen Hautveränderungen mit Zellproliferation vor. Eine Untersuchung der rpS6-Expression und damit die Bedeutung einer mTOR- Aktivität wurde hinsichtlich dieser Erkenntnis auch bei den häufig vorkommenden, durch das humane Papilloma Virus bedingten Verrucae vulgares und Condylomata acuminata durchgeführt und ebenso bei den durch eine überschießende Bildung von Narbengewebe charakterisierten Keloiden. Auch bei

diesen Hautveränderungen stellte sich deshalb die Frage nach Vorhandensein, Stärke und Zelltyp der rpS6 exprimierenden Zellen.

Wie in der Einführung schon beschrieben, existiert mit dem mTOR-Hemmer Rapamycin und dessen Derivaten CCI-779 und RAD001 eine Medikamentengruppe, welche die mTOR-Kinase erfolgreich inhibieren kann. Nun konnte bei den einzelnen untersuchten Präparaten noch eine voraussichtliche Aussage darüber gemacht werden, ob und in welchem Maße eine mTOR-Inhibition mittels dieser Substanzen erfolgreich sein würde. Dies hängt natürlich von dem Vorhandensein, der Stärke und der pathogenetischen Bedeutung der rpS6-Expression und damit mTOR-Aktivität für die analysierten Hautveränderungen ab.



### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Die immunhistochemische Analyse der Expression des phosphorylierten S6**

##### **3.1.1 Die untersuchten Präparate**

Für die Färbungen wurden ausschließlich in Paraffinblöcke eingebettete Präparate verwendet.

Die für die Untersuchungen relevanten, ca. 5- 8 Mykrometer dünnen und auf silanisierte Glasobjektträger aufgetragenen Schnitte, stammten zum größten Teil von Patienten der Klinik für Dermatologie und Venerologie der LMU München. Es handelt sich dabei um 3 verrucae vulgares, 3 condylomata acuminata, 5 spinözelluläre Karzinome, 3 Basalzell-karzinome, 9 maligne Melanome, 3 Hautmetastasen eines malignen Melanoms, 2 Keloide und 3 Angiosarkome.

Die zwei analysierten Präparate der analen intraepithelialen Neoplasie Grad 2-3 wurden dem Verfasser dieser Arbeit freundlicherweise von Prof. Dr. Altmeyer, Direktor der Dermatologischen Klinik der Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

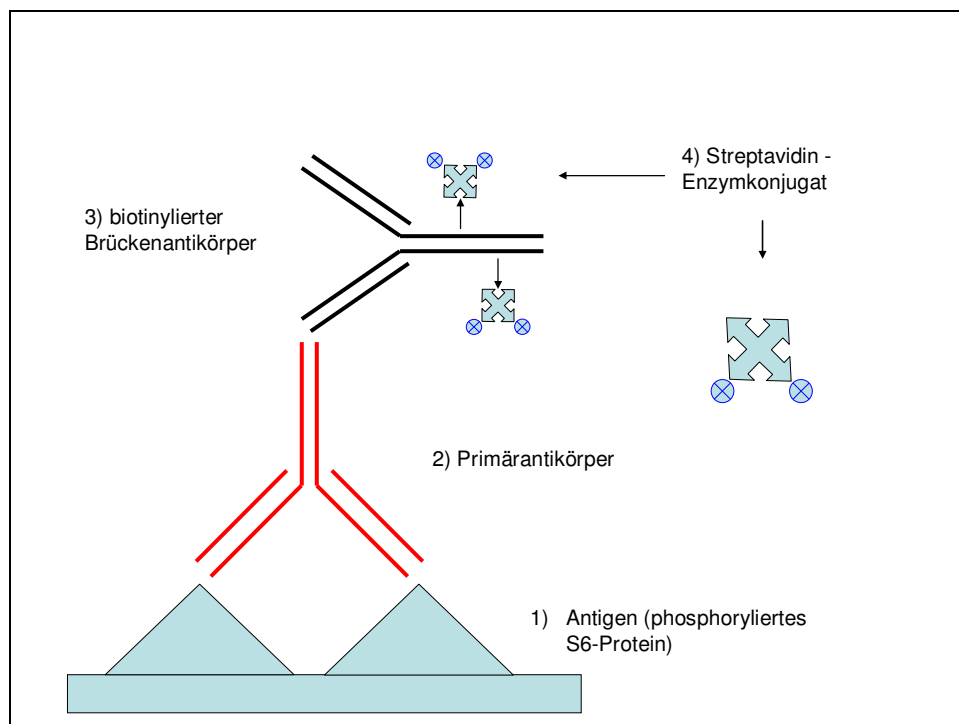
Für die geforderten Positiv- und Negativkontrollen wurden jeweils Präparate herangezogen, bei denen in einer vorherigen Färbung schon ein eindeutig positives Ergebnis zu verzeichnen war.

Die zur zusätzlichen Kontrolle der Sensitivität des Antikörpers verwendeten Tuberin-positiven und –negativen Rattenembryofibroblasten wurden freundlicherweise von Raymond Yeung von der Washington University in Seattle, USA, zur Verfügung gestellt.

### 3.1.2 Die LAB/LSAB-Methode zur Detektion spezifischer Proteine

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde das moderne und sehr sensitive Verfahren der Labeled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode angewandt (Abb. 2).

Im ersten Schritt bindet dabei der Primärantikörper an das zu detektierende Antigen. Im nächsten Schritt wird eine Lösung von Antikörpern hinzugefügt, die aus verschiedenen Tierspezies stammen (Multi-Link-Antikörper aus Maus, Kaninchen etc.). Diese so genannten Brückenantikörper sind mit dem wasserlöslichen Vitamin Biotin markiert (biotinyliert). Nach Zugabe von (Strept-)Avidin, das direkt mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert ist, bindet dieses über eine seiner vier möglichen Bindungsstellen an das Biotin des Sekundärantikörpers, zu dem es eine sehr gute Affinität besitzt. Im letzten Schritt wird eine Lösung aus Substratpuffer und drei verschiedenen Chromogenen vom Fast Red-Typ zur Detektion der alkalischen Phosphatase und damit der primären Antigen-Antikörper-Verbindungen verwendet. Für die Färbereihen wurde das ChemMate™ Detection Kit der Firma Dako Deutschland GmbH (Hamburg) verwendet. Dieses enthält das Sekundär-Brückenantikörper-Reagenz, die Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Lösung, die Levamisole-Konzentration und zur Herstellung der Farblösung sowohl die benötigten 3 Chromogen Rot Farbstoffe als auch den Alkalische Phosphatase Substrat Puffer.



**Abb. 2:** Vereinfachte Darstellung der LAB/LSAB-Methode zur Detektion spezifischer Proteine

### **3.1.2.1 Der Primärantikörper**

Für die Untersuchungen wurde ein polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper der Firma Cell Signaling Technology® (Beverly, MA, USA) gegen das menschliche ribosomale Protein S6 verwendet. Der im Kaninchen hergestellte Antikörper bindet ausschließlich an die phosphorylierten Aminosäuren Serin 235 und 236 dieses ribosomalen Proteins.

### **3.1.2.2 Das Sekundär-Brückenantikörper-Reagenz**

Das Multi-Link-Antikörperreagenz, das aus Anti-Maus und Anti-Kaninchen-Immunglobulinen in einer Pufferlösung besteht, reagiert gleich gut mit primären Maus- als auch Kaninchenantikörpern. Es fungiert daher gleichzeitig als Brückenantikörper- und als Sekundärantikörperreagenz. Zusätzlich sind die aus der Ziege gewonnenen Immunglobuline mit dem wasserlöslichen Vitamin H (Biotin) markiert.

### **3.1.2.3 Die Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Lösung**

Diese Lösung besteht aus dem Enzym alkalische Phosphatase, welches mit dem Protein Streptavidin zu einem Komplex konjugiert wurde, und einer gepufferten Lösung aus stabilisierendem Protein und Konservierungsmittel. Die alkalische Phosphatase stammt aus der Kalbdarmschleimhaut, während Streptavidin ein wasserlösliches Protein ist, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen wird.

### **3.1.2.4 Die Chromogen-Rot-Färbung**

Das Substratsystem zur Anfärbung und Detektion der Antigen-Antikörperbindung besteht aus einer Lösung dreier verschiedener Chromogene des Farbtons Rot mit einem alkalische Phosphatase (AP) Substratpuffer. Letzterem werden auf 10 ml ein Tropfen konzentrierte Levamisole hinzugefügt, um bei der Färbereaktion die endogene alkalische Phosphatase zu blockieren und damit eine unspezifische Anfärbung zu verhindern.

### **3.1.2.5 Die Hämaun-Gegenfärbung**

Um einen Kontrast zum umgebenden Gewebe herzustellen, wurden die Kerne mittels Hämaun im Farbton blau gegengefärbt.

### 3.1.3 Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbung aufgeführt:

- **Entparaffinieren der auf Glasobjektträgern sich befindenden Schnitte**

Die Paraffinschnitte werden fünf Minuten in eine Küvette mit einer Mischung aus 150 ml DEWAX und 135 ml 96 %-igem vergälltem Methyl-ethyl -alkohol getaucht. Dieser Vorgang wird in einer neuen Küvette mit der gleichen Mischung ebenfalls 5 Minuten wiederholt.

Daraufhin werden die Schnitte abwechselnd in zwei mit Leitungswasser gefüllte Küvetten für ca. 15 Sekunden eingetaucht. Das zum Entfernen der DEWAX/Methyl-ethyl-alkoholmischung benutzte Leitungswasser muss vor jedem neuen Waschvorgang gegen frisches Leitungswasser ausgetauscht werden. Die Schnitte werden auf diese Weise mindestens achtmal gewaschen.

- **Hitzedemaskierung der Antigene**

Die Schnittpräparate werden nun für 12 Minuten in einer hitzestabilen und mit Citrat-Puffer (10 mM, pH 6,0) gefüllten Küvette in einem Dampfkochtopf gekocht. Nach dem Abkühlen, das zehn Minuten ausserhalb des Dampfkochtopfes benötigt, wird der Citrat-Puffer gegen frisches Leitungswasser ersetzt.

- **Detektion der Antigene**

Die Schnitte werden ab diesem Schritt in einer mit befeuchteten Fließpapierstreifen ausgelegten Kammer weiterbehandelt, um deren Austrocknung zu verhindern.

- Zum Blockieren von unspezifischen Bindungen werden die Präparate nun mit einprozentiger Milch/TRIS-Puffer Lösung 10 Min. lang inkubiert. Die aufgetragene Menge der Lösung variiert wie auch bei den nachfolgenden Schritten je nach Präparatgrösse zwischen 60 und 100 µl.
- Nach Aufbringen des Primärantikörpers (Verdünnung 1:50) und einer definierten Inkubationszeit von 10 Std. bzw. 15 Std. werden die Schnitte durch siebenmaliges Auftragen und Ablaufen lassen von TRIS-Puffer (0,05 M, pH 7,4 – 7,6) gewaschen.
- Nachfolgend wird das biotinylierte Sekundärantikörperreagenz aufgetragen nach 5 Min. durch den gleichen Waschvorgang wie im vorherigen Schritt durch TRIS-Puffer komplett entfernt.

- Nun wird das an alkalische Phosphatase konjugierte Streptavidin ebenfalls für 5 Min. auf die Schnitte gebracht. Wiederholend schließt sich ein Waschvorgang mit TRIS-Puffer an.
- **Färbung der Schnitte**
  - Zum Sichtbarmachen des Streptavidin-Enzymkonjugates wird nun eine Lösung im Verhältnis von je 25 Teilen AP Substratpuffer/Levamisole und nacheinander Zugabe von je einem Teil Chromogen Rotfarbstoff 1, Chromogen Rotfarbstoff 2 und Chromogen Rotfarbstoff 3 hergestellt. Diese Lösung, die nicht länger als 20 Min. vor dem eigentlichen Färbvorgang hergestellt werden darf, wird nun 10 Min. auf die Schnitte aufgebracht und ebenfalls über den vorher beschriebenen Waschvorgang mit TRIS-Puffer wieder entfernt.
  - Daraufhin werden die Präparate durch Auftragen von Hämatoxilin 40 Sek. lang gegengefärbt und zum Waschen 5 Min. in eine mit Leitungswasser gefüllte Küvette gestellt.
- **Eindeckeln**
  - Auf ein Glasdeckplättchen (Menzel-Deckgläser) wird jeweils 1 Tropfen flüssige KAISERS Glyceringelatine (Fa. Merck) aufgebracht und mit diesem die Schnitte auf dem Glasobjektträger blasenfrei eingedeckelt.

### 3.1.4 Die Herstellung der Puffersubstanzen

Für die häufigen Waschvorgänge der Präparate wurde ein TRIS-Puffer verwendet:

- **Stammlösungen: 1:**
  - 30,3 g TRIS-Base ad 500 ml A. bidest
  - Einstellen von pH 7,6 mit Hilfe von 25%-iger HCl
- **Stammlösung 2:**
  - 43,83 g NaCl ad 500 ml Aqua bidest
- **Gebrauchslösung:**
  - 50 ml Stammlösung 1
  - ad 50 ml Stammlösung 2
  - ad 400 ml A. bidest

Für die Hitzedemaskierung der Antigene wurde ein Citratpuffer verwendet:

- **Stammlösung A:** 5,25 g Citronensäure ad 250 ml A. dest.
- **Stammlösung B:** 14,7 g TRI-NA-Citrat-Dihydrat ad 500 ml A. dest
- **Gebrauchslösung:**
  - 18 ml Stammlösung A
  - ad 82 ml Stammlösung B
  - ad 900 ml A. dest.

### 3.2 Geräte

- 20 µl/ 200 µl Pipetten, Fa. Abimed (Langenfeld)
- 200µl/ 1000µl Pipetten, Fa. Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
- Herdplatte RCT basic, IKA Labortechnik (Staufen)
- Schnellkochtopf, Marke Tischfein Crominal®, WMF AG (Geislingen)
- Waage, MC 1 Laboratory LC 1200 S, Sartorius AG (Göttingen)
- Mikroskop, Axioskop 2 MAT, Zeiss (Jena)
- Mikroskopkamera, 3 CCP Color Video Camera, Sony (Berlin)
- Wachsstift, DAKO Deutschland GmbH (Hamburg)
- Rüttler, Vortex-Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, NY, 11716, U.S.A)

### 3.3 Verbrauchsmaterial

- Glasbehälter 200ml, 500ml, 1000ml, Fa. Schott Duran GmbH (Wertheim)
- Deckgläser 24 x 24mm, 24 x 40mm, Menzel-Gläser (Braunschweig)
- Zentrifugenröhrchen 50ml, TPP (Trasadingen, Schweiz)
- Kaisers Glycerolgelatine für Mikroskopie, Merck KGaA (Darmstadt)
- Puderfreie Untersuchungshandschuhe, semper care® edition, Semperit Technische Produkte GmbH & Co KG (Wien, Österreich)
- Serologische Einmalpipetten 10ml, 25ml, 50ml, Sarstedt AG (Nümbrecht)
- Messzylinder 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml, VitLab GmbH (Großostheim)

### 3.4 Chemikalien

- Non fat-dried milk-powder, Sigma-Aldrich GmbH (München)
- Trizma Base, Sigma-Aldrich GmbH (München)
- Natriumchlorid zur Analyse, Merck KGaA (Darmstadt)
- Tri-natriumcitrat-dihydrat zur Analyse, Merck KGaA (Darmstadt)
- Natriumhydrogencarbonat, Merck KGaA (Darmstadt)
- Tri-natriumcitrat wasserfrei, Merck KGaA (Darmstadt)
- Saure Haemalaunlösung (nach P. Mayer), Apotheke Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 96%-iger Methyl- ethyl- alkohol, Apotheke Innenstadt der der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Ez-DeWax™, Tissue Deparaffinization Solution, Bio Genex (San Ramon, CA, USA)

### 3.5 Software und Datenbanken

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed> Carl Zeiss AxioVision Viewer and Sample Images Software, Carl Zeiss Vision GmbH (München)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswertung der untersuchten Präparate

Es wurden nur Präparate zur Auswertung herangezogen, die bestimmte Kriterien erfüllten. Die jeweils mitgeführte Positiv- bzw. Negativkontrolle musste eine eindeutig positive bzw. negative Färbung vorweisen (Abb. 3). Die Negativkontrollen wurden bei jedem Färbedurchgang ohne Primärantikörper behandelt, um eine falsch positive rpS6-Expression auszuschließen. Ebenso wurde eine interne Positiv- (z.B. Schweißdrüsen, normale Epidermis) sowie Negativkontrolle (z.B. interstitielle Lymphozyten) gefordert. Beschädigte, überfärbte (falsch positiv) und zu schwach (falsch negativ) gefärbte Präparate wurden verworfen.

Des Weiteren wurden bei jedem Färbedurchgang embryonale Fibroblasten von Ratten des Eker-Stammes (REF) auf die rpS6-Expression hin analysiert. Dieser Rattenstamm mit bilateral auftretenden Nierenkarzinomen wurde 1954 von Eker beschrieben und 40 Jahre später konnte die Ursache dieser Nierenkarzinome in einer homozygoten Mutation des Tumorsuppressorgens TSC2 (TSC2 (+/-)), welches für das Protein Tuberin kodiert, aufgedeckt werden (Eker 1954, Yeung et al. 1994). Bei jedem Färbedurchgang wurde ein Zellstamm der REF ohne Mutationen im Tuberin-Gen (TSC2 (+/+)) und ein Zellstamm der REF mit homozygot negativer Mutation im Tuberin- Gen (TSC2 (-/-)) auf die rpS6-Expression hin mit analysiert. Bei letzteren Zellen fällt somit das Tumorsuppressorgen TSC2 aus, was zu einer ständigen Aktivierung des mTOR-Signaltransduktionsweges führt und damit zu einer erwarteten starken rpS6-Expression (Abb. 4 A und B). Im Gegensatz dazu lassen die TSC2 (+/+) REF aufgrund des nicht aktivierten mTOR-Signaltransduktionsweges keine rpS6-Expression erwarten. Zusätzlich wurden diese Zellen mit 50  $\mu$ Mol Rapamycin behandelt, welches wie in der Einleitung schon beschrieben zu einer Hemmung des mTOR-Signaltransduktionsweges führt (Abb. 4 C und D). Diese verschiedenen rpS6-Expressionen, d.h. starke rpS6-Expression für TSC2 (-/-) REF und negative rpS6-Expression für TSC2 (+/+) REF mit gleichzeitiger Rapamycinbehandlung, konnten bei jedem Färbedurchgang der in dieser Arbeit untersuchten Präparate gezeigt und damit nachgewiesen werden, dass der verwendete Antikörper das Protein, das er detektieren soll, auch bei jeder neuen Analyse detektieren kann. Mit diesen zusätzlichen Färbungen konnte insgesamt eine hohe Sensitivität des verwendeten Antikörpers gezeigt werden.



Als zusätzliche Kontrolle wurden zwei verschiedene Tumore bei Patienten mit der in der Einleitung erwähnten und zu den Tumor-assoziierten Erkrankungen gehörenden Tuberösen Sklerose auf die rpS6-Expression hin untersucht. Durch den Ausfall des *Tuberous Sclerosis Complex 2* Gens oder (TSC2) des *Tuberous Sclerosis Complex 1* Gens (TSC1) kommt es wie oben beschrieben zu einer ständigen Aktivierung des mTOR-Signaltransduktionsweges und zur Bildung von gutartigen Tumoren unterschiedlicher Lokalisation, den so genannten Hamartomen.

Einer dieser auf die rpS6-Expression hin analysierter Tumor bei Tuberöser Sklerose war ein in der Niere vorkommendes Hamartom. Dieser zu unterschiedlichen Anteilen aus Blutgefäßen, glatter Muskulatur und Fett bestehender und folglich als Angiomyliom bezeichneter Tumor kommt bei der Mehrzahl der an Tuberöser Sklerose erkrankten Menschen vor.

Der zweite untersuchte Tumor war ein Schilddrüsenkarzinom bei einem weiteren Patienten mit Tuberöser Sklerose (Abb.5).

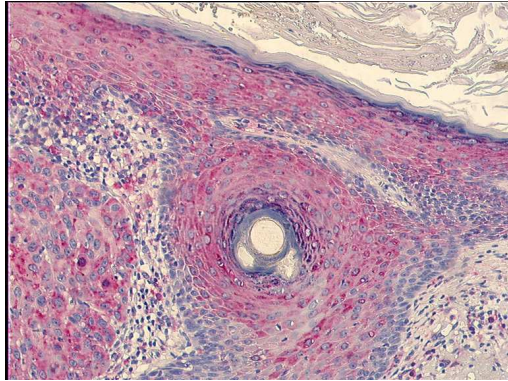
Aufgrund des zugrunde liegenden Gendefektes und des damit dauerhaft aktivierten mTOR-Signaltransduktionsweges konnte bei korrekter immunhistochemischer Analyse ein Nachweis des phosphorylierten ribosomalen Proteins S6 bei den Tumorzellen erwartet werden. Die sehr starke rpS6-Expression bestätigte diese Erwartung und damit die Korrektheit der Analyse sowohl in Bezug auf den verwendeten Antikörper als auch auf die Durchführung der Färbungen.

Zur Evaluation der immunhistochemischen Analysen wurde jeweils nur die für die Fragestellung relevante Zellpopulation herangezogen, worauf bei der Erläuterung der Ergebnisse noch im Einzelnen eingegangen wird.

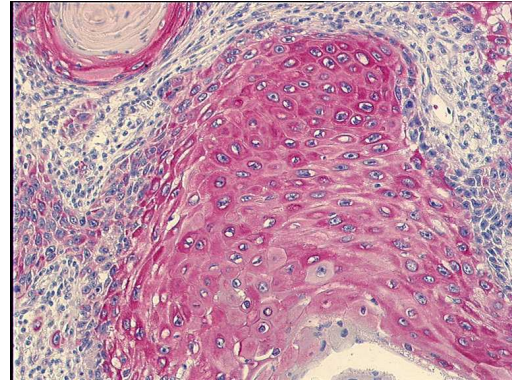
Mit einer zehnfachen Vergrößerung wurden die Präparate pro Gesichtsfeld nach Quantität der Färbung für phosphoryliertes ribosomales S6 eingeteilt in weniger als 10 %, zwischen 10 und 70 % und mehr als 70 % gefärbte relevante Zellen. Bei kleineren Präparaten wurde zur Auswertung eine 20-fache Vergrößerung herangezogen. Bei weniger als 10 % Anfärbung der relevanten Zellen wurde dabei von einer geringen Aktivität der mTOR-Kinase in dem jeweils untersuchte Präparat ausgegangen, bei über 70 % Anfärbung dementsprechend von einer sehr starken mTOR-Kinase-Aktivität.

Je nach Probengröße wurden ein bis maximal neun Gesichtsfelder der zu analysierenden Zellgruppen untersucht. Ebenfalls wurde die Stärke der Anfärbung

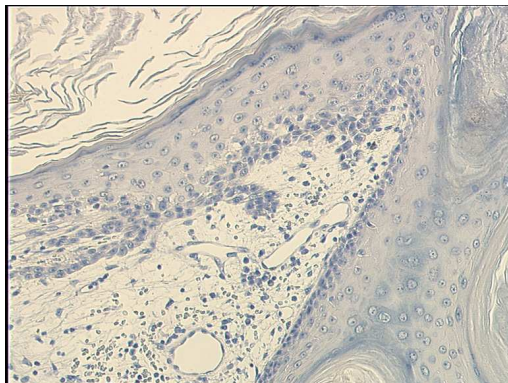
beschrieben mit den Zeichen (-) für Farblosigkeit, (+) für schwache Anfärbung, (++) für mittelstarke Anfärbung bis hin zu (+++) für sehr starke Anfärbung.



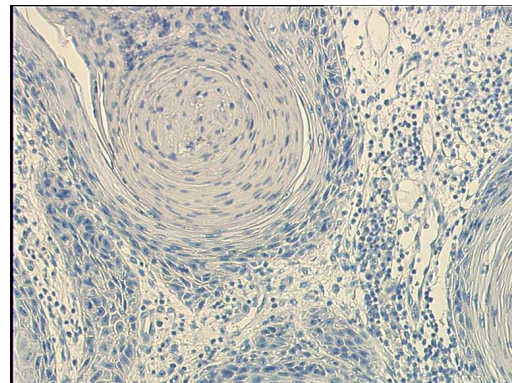
A



B



C

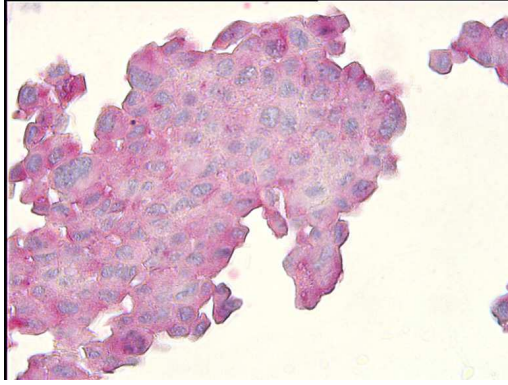


D

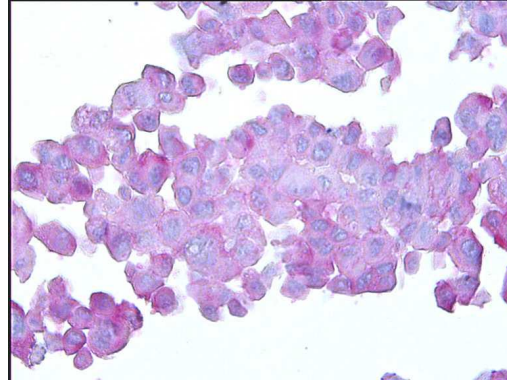
**Abb. 3:**

**A und B** – Beispiel einer Positivkontrolle mit starker rpS6-Expression (spinozelluläres Karzinom)

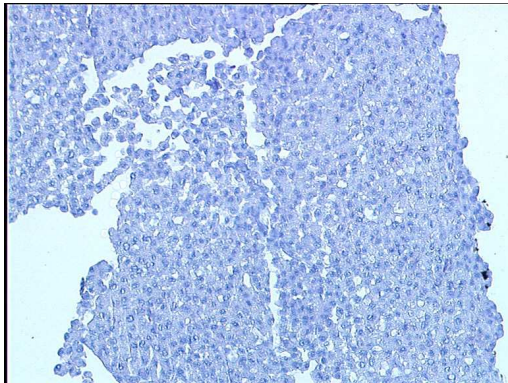
**C und D** – Beispiel einer Negativkontrolle mit negativer rpS6-Expression durch Weglassen des Primärantikörpers (spinozelluläres Karzinom)



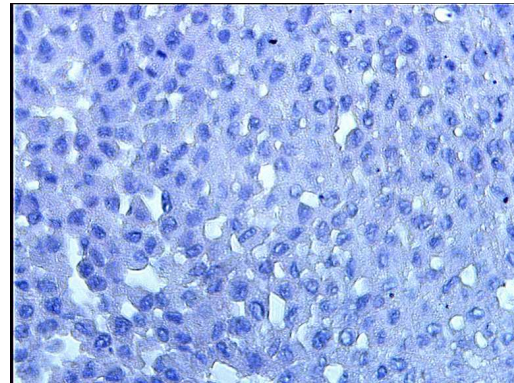
A



B



C

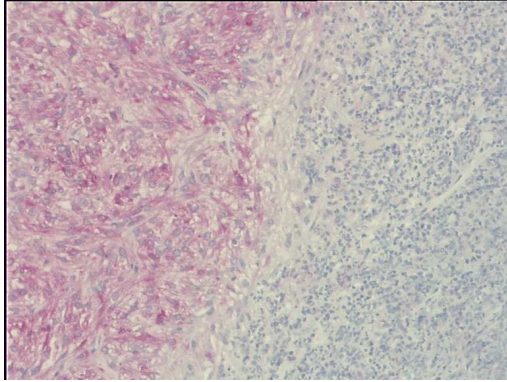


D

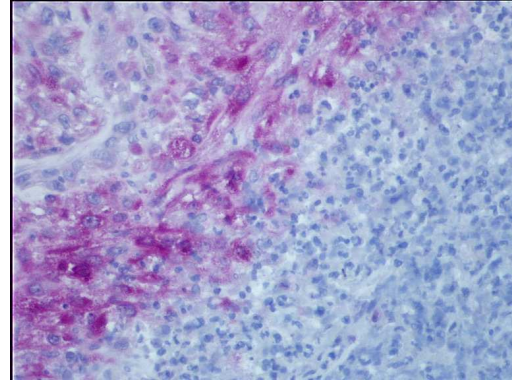
**Abb. 4:**

**A und B** – Starke rpS6-Expression bei TSC (-/-) Rattenembryofibroblasten ohne Behandlung mit Rapamycin

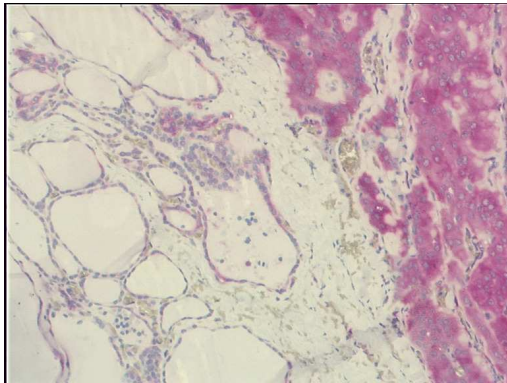
**C und D** – Negative rpS6- Expression bei TSC (+/+) Rattenembryofibroblasten bei gleichzeitiger Behandlung mit 50  $\mu$ Mol Rapamycin



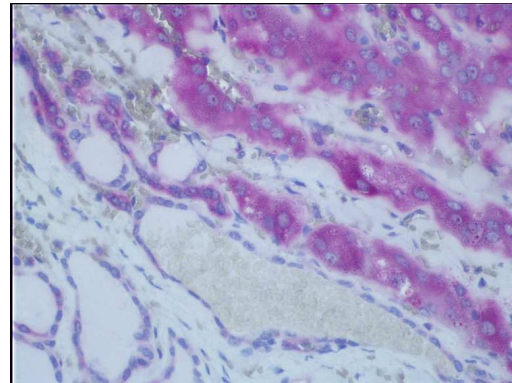
A



B



C



D

**Abb.5:**

**A und B** – Sehr stark pS6 exprimierendes Angiomyolipom bei Tuberöser Sklerose mit angrenzendem Entzündungsinfiltrat in 10- und 20-facher Vergrößerung

**B und C** – Sehr stark pS6 exprimierendes Schilddrüsenkarzinom bei Tuberöser Sklerose mit angrenzendem gesundem Schilddrüsengewebe in 10- und 20-facher Vergrößerung

#### 4.1.1 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei den Verrucae vulgares

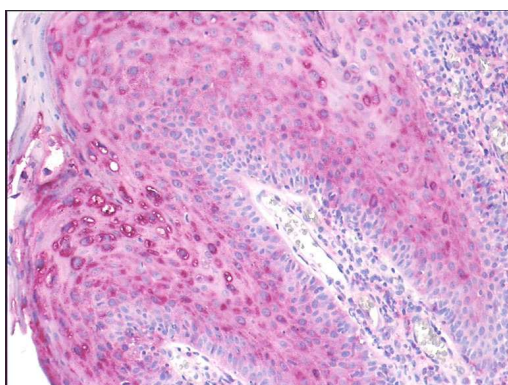
Die drei zur Auswertung herangezogenen Präparate zeigten bei der für verrucae vulgares typischen Akanthose bei überwiegend über 70%-iger Färbung eine starke Positivität (+++) in der oberen Hälfte der verbreiterten Epidermis mit abnehmender bis selten negativer Färbung (-) zur Basalzellschicht hin (Abb. 6).

Besonders die Präparate zwei und drei zeigten eine mittelstarke Färbung der unteren Epidermisschichten. Typisch waren vereinzelt oder in kleinen Gruppen liegende stark positive Zellen im gesamten Epidermisbereich zu sehen (Abb. 6A).

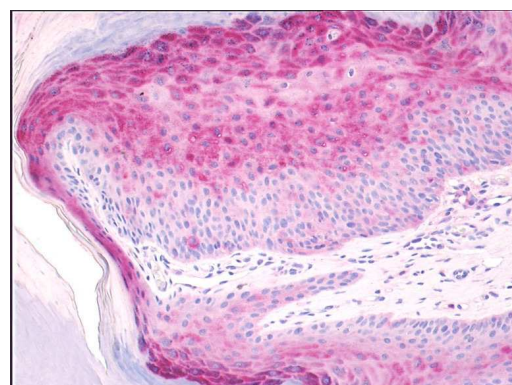
Einige dieser Zellen sind die bei verrucae vulgares typischerweise vorkommenden Koilozyten; vakuolisierte Keratinozyten mit kleinem Kern und hellem Zytoplasmasaum in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Auch hier stellten sich im zum Teil dichten Entzündungsinfiltrat, das vor allem im stratum papillare lokalisiert ist, in Gruppen oder vereinzelt liegende Lymphozyten und Histiozyten positiv dar.

Präparat Verruca Vulgaris	<10%	10-70%	>70%
1	0	1	3
2	0	0	2
3	0	0	4

**Tab. 3:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentuaem Anteil der rpS6 exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld bei verrucae vulgares



A



B

**Abb. 6:** Expression des rpS6 bei Verruca vulgaris:

**A** und **B** - Akanthotisch verbreiterte Epidermis mit starker rpS6-Expression in oberen Epidermisschichten (stratum granulosum) und in Koilozyten

#### 4.1.2 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei Condylomata acuminata

Insgesamt erfüllten drei Präparate die unter 4.1 genannten Voraussetzungen zur Auswertung. Es zeigte sich eine durchgehend über 70%-ige Färbung, die wie bei den verrucae vulgares zur Basalzellreihe hin abnahm (+++ → +).

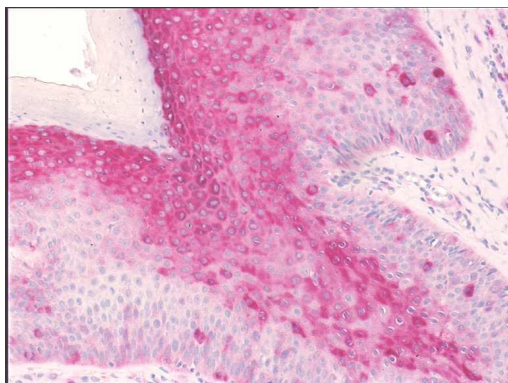
Auffällig stark gefärbt waren die auch bei condylomata lata vorkommenden Koilozyten, die bis in die unteren Schichten der Epidermis nachweisbar waren (Abb.7B).

Sehr stark angefärbte, nicht koilozytäre Zellen kamen vereinzelt ebenfalls bis zur Basalzellschicht hinein vor (Abb.7A).

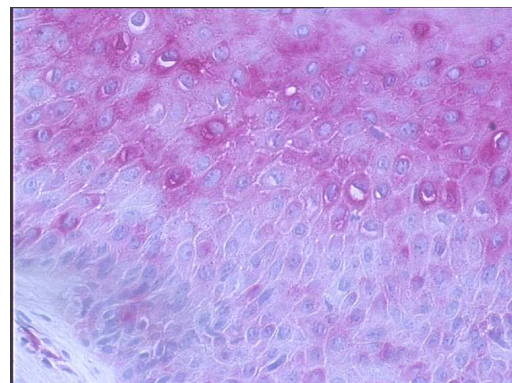
Ein subepidermal gelegenes lymphoides Entzündungsinfiltrat war auch hier zu sehen mit ebenfalls vereinzelt positiven, aber überwiegend negativen Lymphozyten und Monozyten.

Präparat Condylomata acuminata	<10%	10-70%	>70%
1	0	0	4
2	0	0	4
3	0	0	3

**Tab. 4:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentuaem Anteil der rpS6 exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld bei condylomata acuminata



**A**



**B**

**Abb. 7:** rpS6-Expression bei Condylomata acuminata:

- A** - Starke rpS6-Expression in oberen Epidermisschichten mit vereinzelt stark rpS6 exprimierenden Zellen bis in die Basalzellschicht hinein
- B** - Typische, bei Condylomata acuminata vorkommende, rpS6 exprimierende Koilozyten

### 4.1.3 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei der analen intraepithelialen Neoplasie

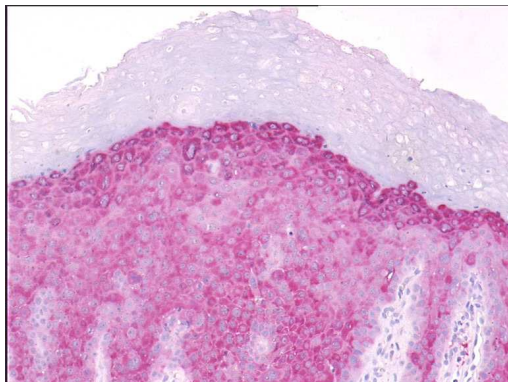
An zwei Präparaten einer analen intraepithelialen Neoplasie wurde die Expression von rpS6 untersucht. Deutlich war bei den durchgehend über 70 Prozent gefärbten Zellen ein Überwiegen von sehr stark gefärbten (+++), zum Teil sehr großen intraepithelialen neoplastischen Zellen (Abb.8).

Eine normale Schichtung der sehr stark verbreiterten Epidermis ließ sich weder über die Zellmorphologie noch über die bei normaler Epidermis typische abnehmende Farbintensität von oberen Epidermisschichten bis zur Basalzellschicht nicht mehr erkennen (Abb.8A).

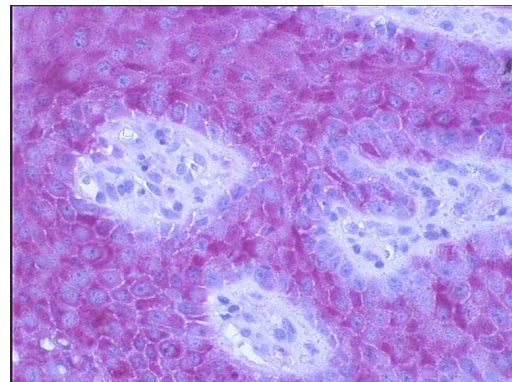
Nur die in typischer Palisadenstellung stehenden Basalzellen zeigten gelegentlich noch eine geringere Anfärbbarkeit.

Präparat intraepitheliale Neoplasie	<10%	10-70%	>70%
1	0	0	3
2	0	0	3

**Tab. 5:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentualem Anteil der rpS6 exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld bei intraepithelialer Neoplasie



**A**



**B**

**Abb. 8:** rpS6-Expression bei der analen intraepithelialen Neoplasie

- A** - Durchgehend sehr starke rpS6-Expression bei den praeinvasiven malignen Keratinozyten mit typischem Verlust der epidermalen Schichtung
- B** - Um Hornperlen gelagerte praeinvasive maligne Keratinozyten in der Epidermis

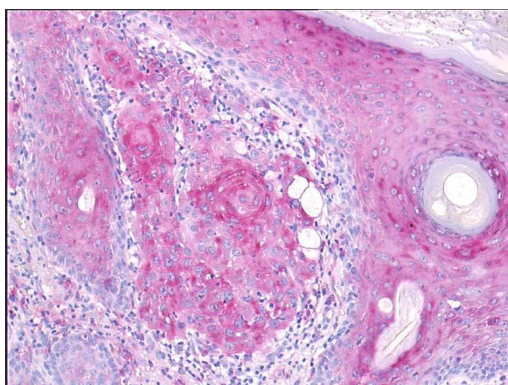
#### 4.1.4 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim spinozellulären Karzinom

Fünf Proben von spinozellulären Karzinomen erfüllten die zur Auswertung genannten Forderungen. Die Mehrzahl der Präparate zeigte bei nahezu allen ausgewerteten Gesichtsfeldern eine über 70%-ige Anfärbung der malignen Zellen. Bei einem Präparat war eine Abnahme der Farbquantität der um die beim spinozellulären Karzinom typischen Hornpfropfe gelagerten Tumorzellen bis zum Interstitium oder zum umgebenden Entzündungsinfiltrat zu erkennen. Die restlichen vier Präparate zeigten diese Abnahme der Farbintensität nicht mehr, vielmehr eine sehr starke Anfärbung (+++) aller malignen Zellen.

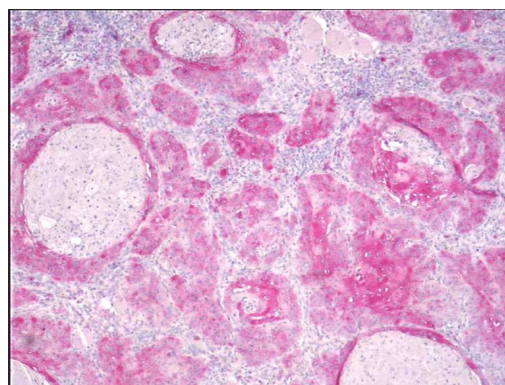
Die aus zumeist Lymphozyten bestehende, die Tumorkonglomerate umgebende Zellpopulation, war überwiegend farbnegativ mit nur vereinzelt positiven Lymphozyten, Histozyten und einzeln stehenden Tumorzellen.

Präparat spinozelluläres Karzinom	<10%	10-70%	>70%
1	0	0	7
2	0	1	6
3	0	0	3
4	0	0	7
5	0	0	4

**Tab. 6:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentuaem Anteil der rpS6 exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld beim spinozellulären Karzinom



**A**



**B**

**Abb. 9:** rpS6-Expression beim spinozellulären Karzinom

**A** - Sehr stark rpS6 exprimierende Epidermis- und Tumorzellen

**B** - Sehr stark rpS6 exprimierende, um Hornperlen gelagerte Tumorzellen



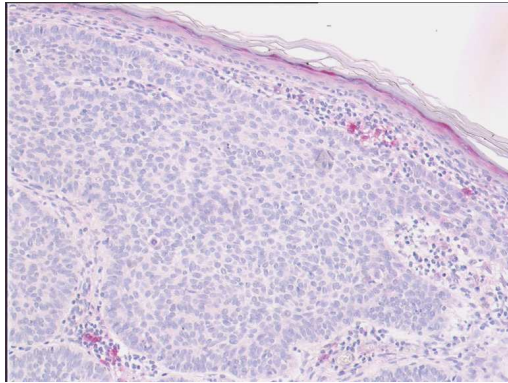
#### **4.1.5 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Basalzellkarzinom**

Die untersuchten Präparate zeigten bei korrekt durchgeführten Positiv- sowie Negativkontrollen mehrheitlich eine Farblosigkeit der für das Basalzellkarzinom typischen großen, in Zellverbänden zusammenliegenden Tumorzellen (Abb.10A und B). Eine schwache bis sehr starke positive Färbung (+ - +++) wurde bei drei von vier Präparaten vor allem in der Nähe von Haarfollikeln und knapp unterhalb der Epidermis gesehen. Die Epidermis dieser zwei Präparate zeigte über dem Tumor eine mittelstarke bis sehr starke (++) Färbung aller Schichten. (Abb.10C)

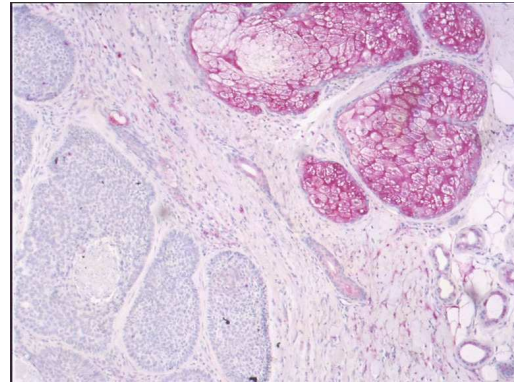
Das im Vergleich zum spinözellulären Karzinom geringer vorkommende Entzündungsinfiltrat um die Tumorzellnester zeigte auch hier eine überwiegend negative Färbung mit vereinzelt vorkommenden positiven Lymphozyten und Histiocyten. In die Auswertung gingen nur die für den Tumor typischen basaloiden Zellen ein.

Präparat Basalzellkarzinom	<10%	10-70%	>70%
1	1	1	0
2	4	0	0
3	2	2	0
4	4	0	0

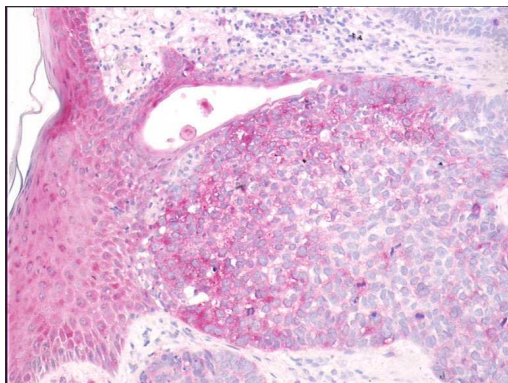
**Tab. 7:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentualem Anteil der rpS6 exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld beim Basalzellkarzinom



**A**



**B**



**C**

**Abb. 10:** rpS6- Expression beim Basalzellkarzinom

- A** - Negativ rpS6 exprimierende Basalzellkarzinomzellen unter sehr schmaler Epidermis mit rpS6 exprimierenden Keratinozyten des stratum granulosum
- B** - Negativ rpS6 exprimierende Basalzellkarzinomzellen neben sehr stark rpS6 exprimierenden Talgdrüsenzellen
- C** - Sehr stark rpS6 exprimierende Keratinozyten aller Epidermisschichten mit subepidermal gelegenen, zum Teil ebenfalls sehr stark rpS6 exprimierenden Basalzellkarzinomzellen

#### 4.1.6 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim malignen Melanom

Unter den neun ausgewerteten malignen Melanomen befanden sich fünf superfiziell spreitende maligne Melanome, zwei knotige maligne Melanome, zwei sekundär knotige maligne Melanome und ein akrolentiginöses malignes Melanom. Beim superfiziell spreitenden Melanom (SSM) waren die Tumorzellen überwiegend ungefärbt (-) mit in Gruppen liegenden mehrheitlich schwach (+) bis vereinzelt stark positiven (+++) Melanomzellen. Präparat eins der SSM zeigt eine starke Anfärbung der positiven Zellen (+++) (Abb. 11A), während bei Präparat fünf mehrheitlich eine schwache Färbung (+) mit vereinzelt mittelstark positiven Melanomzellen (++) auffiel (Abb. 11C).

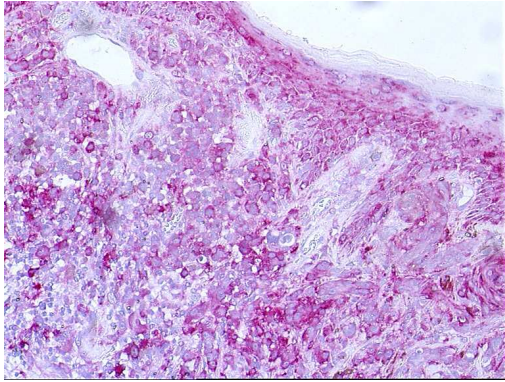
Sowohl beim knotigen malignen Melanom (Abb. 11D) als auch bei den sekundär knotigen malignen Melanomen (Abb. 11E) wurden hauptsächlich ungefärbte maligne Zellen mit ebenfalls vor allem vereinzelt, zum Teil auch in Nestern vorkommenden schwach positiv (+) bis sehr stark positiv (+++) gefärbten Tumorzellen gesehen.

Das akrolentiginöse maligne Melanom zeigte neben einer Region von mittelstark (++) bis stark positiv (+++) gefärbten, in Nestern angeordneten Tumorzellen (Abb. 11F) überwiegend ungefärbte Melanomzellen (-).

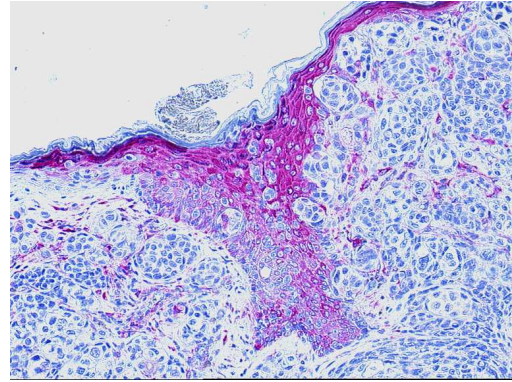
Unabhängig von der Art des MM konnte bei etwa der Hälfte aller untersuchten Präparate eine schwache bis sehr starke (+ → +++)Anfärbung der Epidermiszellen bis zur Basalzellschicht hin über dem Tumor festgestellt werden (Abb. 11A, B, C, E).

Präparat superfiziell spreitendes malignes Melanom	<10%	10-70%	>70%
1	0	0	3
2	5	0	0
3	3	4	0
4	4	1	0
5	0	2	2
Präparat knotiges malignes Melanom			
1	6	2	1
2	5	0	0
Präparat sekundär knotiges malignes Melanom			
1	2	2	0
2	6	0	0
Präparat akro-lentiginöses malignes Melanom			
1	3	0	1

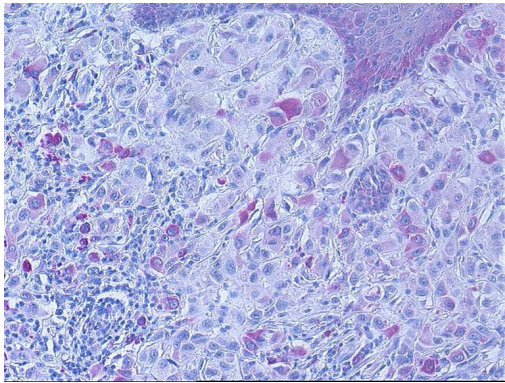
**Tab. 8:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentuaem Anteil der rpS6 exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld beim malignen Melanom



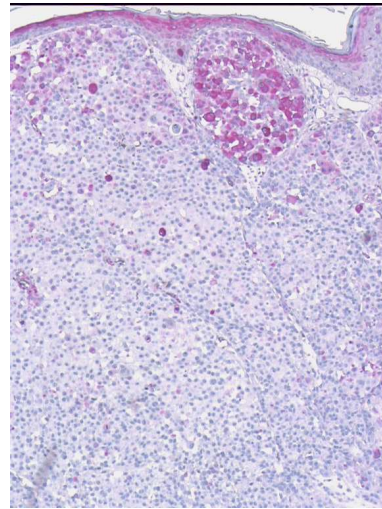
**A**



**B**



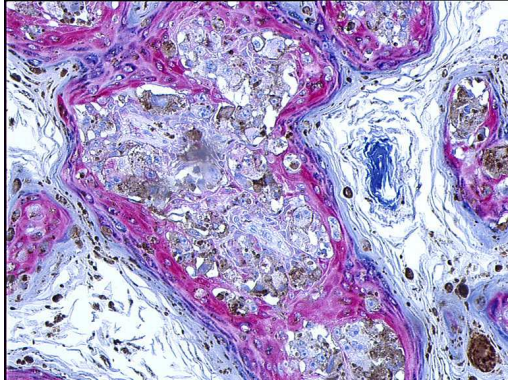
**C**



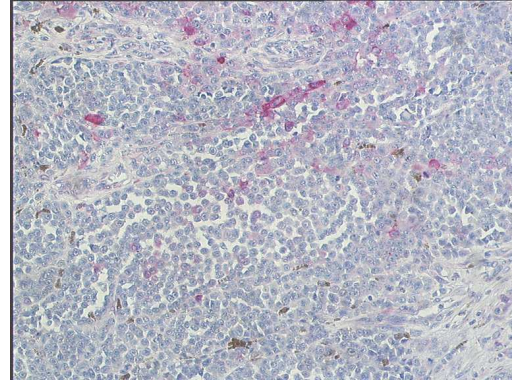
**D**

**Abb. 11:** rpS6- Expression beim malignen Melanom

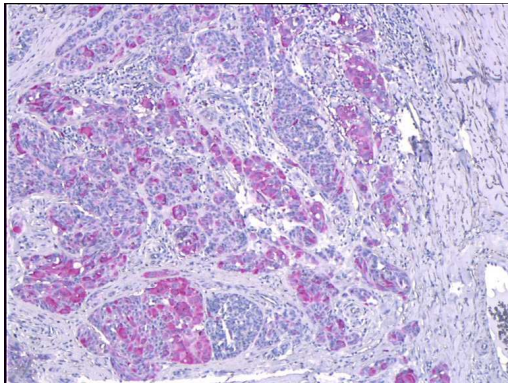
- A** -Sehr starke rpS6-Expression der Melanomzellen und der über dem Tumor gelegenen Epidermis bei einem superfiziell spreitenden malignen Melanom
- B** -Sehr starke rpS6-Expression der Epidermis über den vorwiegend negativ rpS6 exprimierenden Melanomzellen bei einem superfiziell spreitenden malignen Melanom
- C** -Überwiegend negativ rpS6 exprimierende Melanomzellen mit vereinzelt mittelstark positiv gefärbten Tumorzellen bei einem superfiziell spreitenden malignen Melanom
- D** - Überwiegend negativ rpS6 exprimierende Melanomzellen mit einem sehr stark rpS6 exprimierenden Tumorzellnest bei einem knotigen malignen Melanom



**E**



**F**



**G**

**Abb. 11:** rpS6- Expression beim malignen Melanom

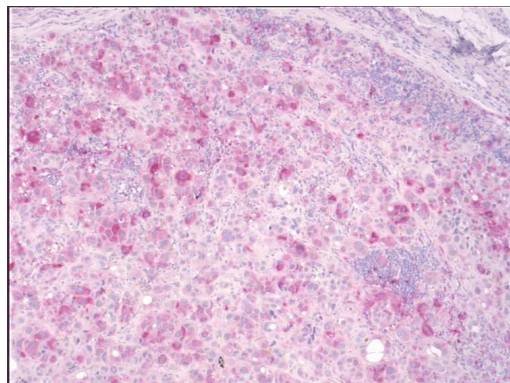
- E** - Vereinzelt schwach positive Melanomzellen beim sekundär knotigen malignen Melanom umgeben von sehr stark rpS6 exprimierender Epidermis
- F** - Vereinzelt mittelstark positive Melanomzellen beim sekundär knotigen malignen Melanom bei überwiegend negativ rpS6 exprimierenden Tumorzellen
- G** -Gruppe von sehr stark rpS6 exprimierenden Tumorzellnestern neben negativ rpS6 exprimierenden Melanomzellen beim akrolentiginösen Melanom

#### 4.1.7 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei Hautmetastasen des malignen Melanoms

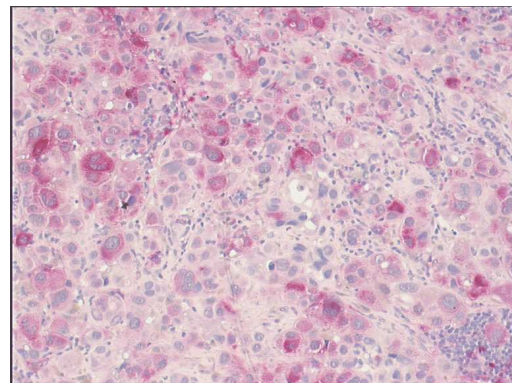
Während die Tumorzellen bei Präparat zwei und drei mehrheitlich eine nicht in Zellnestern vorkommende mittelstarke bis vereinzelt sehr stark positive (++) → (+++) Färbung aufwiesen (Abb. 12A und B), zeigten sich bei dem ersten Präparat überwiegend maligne Zellen ohne Färbung (-). Nur vereinzelt kommen bei letzterem Präparat mittelstark angefärbte Zellen vor (Abb. 12C).

Präparat Metastase des malignen Melanoms	<10%	10-70%	>70%
1	7	0	0
2	0	2	3
3	0	0	3

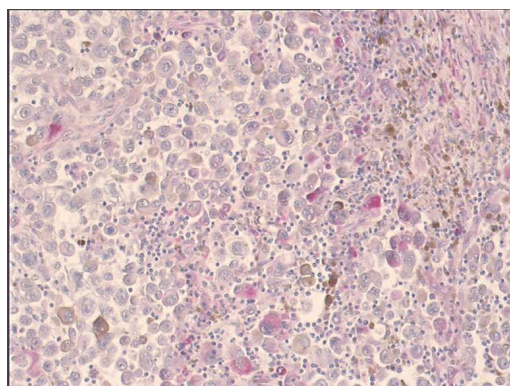
**Tab. 9:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentualem Anteil der rpS6-exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld bei Hautmetastasen des malignen Melanoms



**A**



**B**



**C**

**Abb. 12:** rpS6-Expression bei Metastasen des malignen Melanoms

- A** - Mittelstarke bis vereinzelt sehr starke rpS6-Expression bei einer Metastase eines malignen Melanoms mit Anschnitt der die Metastase umgebenden Kapsel
- B** - Vergrößerte Darstellung von Abb. 12A
- C** - Überwiegend negative rpS6-Expression mit vereinzelt mittelstark angefärbten Tumorzellen bei einer Metastase eines malignen Melanoms

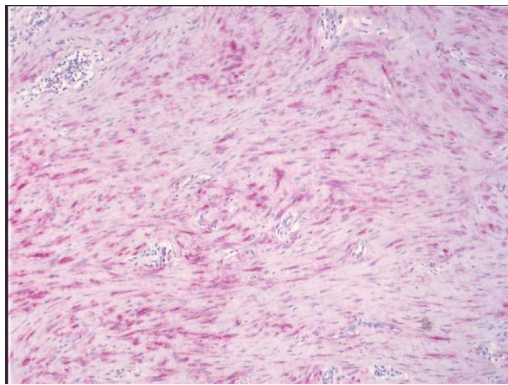
#### 4.1.8 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Keloid

Es wurden zwei Präparate von Keloiden ausgewertet, bei denen sich eine sehr starke Färbung (++++) aller der für dieses überschießende Narbengewebe typischen Fibroblasten zeigte.

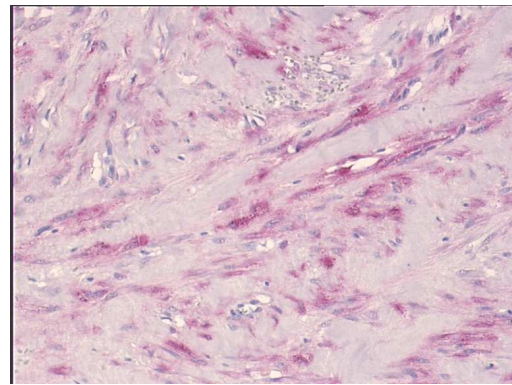
Auch wurden einige sehr stark rpS6 exprimierende Monozyten (++++) zwischen den Fibroblasten entdeckt.

Präparat Keloid	<10%	10-70%	>70%
1	0	0	7
2	0	0	4

**Tab. 10:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentuaem Anteil der rpS6 exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld beim Keloid



**A**



**B**

**Abb. 13:** rpS6-Expression beim Keloid

**A** - Sehr starke rpS6-Expression der Fibroblasten und einiger Monozyten beim Keloid

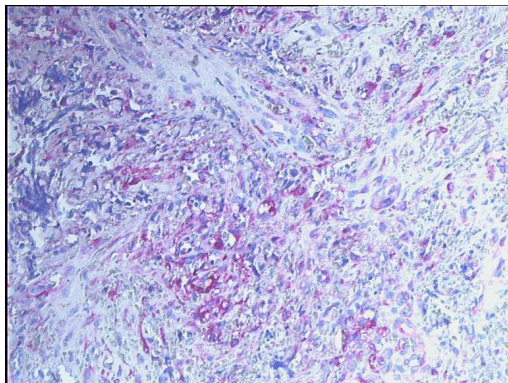
**B** - Vergrößerte Darstellung von Abb. 13A

#### 4.1.9 Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim idiopathischen Angiosarkom

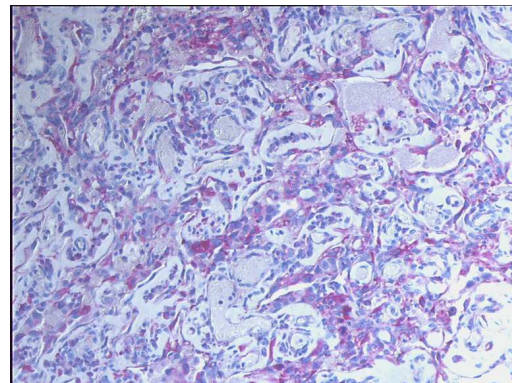
Es wurden zwei Präparate auf die Expression von rpS6 hin analysiert. Bei diesen zeigte sich bezogen auf die einzelnen malignen Zellen eine unterschiedlich starke Expression von rpS6, von weit überwiegend schwacher (+) bis gebietsweise mittelstarker (++) und sehr starker (+++) positiver Anfärbung (Abb. 14A und B). Deutlich war auch hier eine sehr starke rpS6-Expression (+++) der gesamten Epidermisschichten über dem Tumor (Abb. 14C). Häufig vorkommende Tumorzellen im Stadium der Mitose wurden ebenfalls registriert. Die Zellen des zum Teil stark ausgeprägten Entzündungsinfiltrates zeigten überwiegend keine Färbung.

Präparat Angiosarkom	<10%	10-70%	>70%
1	0	2	3
2	0	0	4

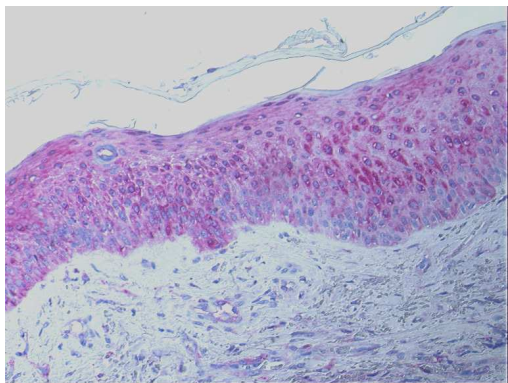
**Tab. 11:** Anzahl der Gesichtsfelder mit prozentualem Anteil der rpS6 exprimierenden Zellen <10%, 10-70% und >70% pro Gesichtsfeld beim Angiosarkom



**A**



**B**



**C**

**Abb. 14:** rpS6-Expression beim Angiosarkom

- A** - Schwache bis zum Teil sehr stark rpS6 exprimierende, zum Teil in Mitose befindliche Angiosarkomzellen des ersten Präparates
- B** - Überwiegend sehr stark rpS6 exprimierende, zum Teil in Mitose befindliche Angiosarkomzellen des zweiten Präparates
- C** - Sehr stark rpS6 exprimierende Keratinozyten der Epidermis über dem Angiosarkom des ersten Präparates



#### **4.1.10 Zusammenfassende Auswertung der immunhistochemischen Analysen**

Sowohl bei den benignen, als auch bei den malignen epithelialen Hautveränderungen konnte in sämtlichen Präparaten eine starke positive Färbung der Epithelzellen festgestellt werden. Die benignen, virusbedingten Veränderungen wie verrucae vulgares und condylomata acuminata zeigten zum Teil einen Verlust der typischen Schichtung mit abnehmender Farbintensität der Zellen von der oberen Epidermis bis zur Basalzellschicht. Auch sah man hier besonders große Zellen und auch stark positiv gefärbte Koilozyten.

Bei der praeinvasiven analen intraepithelialen Neoplasie und dem spinozellulären Karzinom, die ebenfalls bis auf ein Präparat des spinozellulären Karzinoms durchgehend eine in den untersuchten Gesichtsfeldern über 70-prozentige positive Färbung aufwiesen, war diese Schichtung zum größten Teil aufgehoben und eine überwiegend sehr starke Expression des ribosomal phosphorylierten S6 -Proteins erkennbar.

Beim semimaligen Basalzellkarzinom zeigte sich eine reguläre Abnahme der Farbintensität der Epidermis zur Basalzellschicht hin. Die Basalzellkarzinomzellen selbst exprimierten nur stellenweise und dann in Zellverbänden liegend das rpS6, was sich bei zwei Präparaten in der Hälfte der untersuchten Gesichtsfelder in einer mittelstarken, also 10-70-prozentigen Zellfärbung widerspiegelte.

Beim Keloid konnte eine durchgehende Anfärbung der für die Pathologie der Keloide verantwortlichen Fibroblasten festgestellt werden. Die Epidermis über dem überschießenden Narbengewebe zeigte eine normale Schichtung, sowohl morphologisch, als auch im Färbeverhalten.

Beim malignen Melanom waren die Ergebnisse uneinheitlich. Zwei von neun (22,2%) zeigten eine überwiegend positive Färbung, ein Präparat (11,1%) war weder mehrheitlich positiv noch negativ einzustufen und bei der überwiegenden Mehrheit, nämlich sechs von neun Präparaten (66,7%), war die Expression von rpS6 überwiegend nicht nachzuweisen. Ein Unterschied bei den einzelnen Formen des malignen Melanoms konnte dabei nicht festgestellt werden.

Die positiv gefärbten Zellen zeigten sich meist in Zellkonglomeraten, aber auch vereinzelt positive Zellen konnten gesehen werden. Bei über der Hälfte der untersuchten Tumore war auffällig, dass die Epidermis über dem Tumor bis zur Basalzellschicht hin stark gefärbt war, während diese im gesunden Bereich noch die

vorher schon beschriebene Intensitätsabnahme von den oberflächlichen zu den basalen Epidermisschichten aufwies.

Uneinheitlich waren auch die Ergebnisse bei den Metastasen des malignen Melanoms. Während bei einem Präparat unter zehn Prozent der gesamten Zellen gefärbt waren, zeigte ein anderes eine über 70 %ige Färbung der gesamten Zellen. Das dritte Präparat zeigte ein unterschiedliches Färbeverhalten von Gebieten mit durchgehend positiv angefärbten Zellen bis Zellverbände, die unangefärbt blieben. Innerhalb der Abschnitte mit gefärbten Zellen war die Intensität der Färbung unterschiedlich. Auch bei den überwiegend ungefärbten Bereichen konnte man einzelne maligne Zellen mit stark positiver Anfärbung sehen.

Das Phänomen der starken Anfärbung der gesamten Epidermis über dem Tumor wie beim malignen Melanom lässt sich auch bei den untersuchten Angiosarkomen nachweisen. Die Angiosarkomzellen selbst zeigten eine überwiegende, wenn auch nur schwach positive Anfärbung. Maligne Zellen direkt unterhalb der Epidermis zeigten dennoch häufig eine stärkere Expression des rpS6.

## **5 Diskussion**

Im Folgenden wird nun die Bedeutung einer Expression des phosphorylierten ribosomalen S6- Proteins sowohl bei unveränderter Haut, als auch bei den untersuchten benignen und malignen Hautveränderungen erörtert. Dabei wird auf das Ergebnis für die einzelnen Präparate ebenso eingegangen wie auf das Ergebnis für die jeweiligen Gruppen der pathologischen Hautveränderungen.

Des Weiteren wird auch auf die Frage eingegangen, ob damit die Anwendung der in der Einleitung beschriebenen Inhibitoren der mTOR-Kinase bei den einzelnen Hautveränderungen Erfolg versprechend ist.

### **5.1 Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei normaler Haut**

An der Epidermis nicht pathologisch veränderter Haut zeigt sich eine deutliche Zunahme der rpS6-Expression von den basalen zu den oberen Epidermisschichten. Dabei ist die Basalzellschicht ungefärbt und die Zellen des unteren stratum spinosum sehr schwach gefärbt, während die Keratinozyten des oberen stratum spinosum und des stratum granulosum eine sehr starke Anfärbung zeigen. Die Korneozyten des stratum corneum lassen keine Expression mehr erkennen.

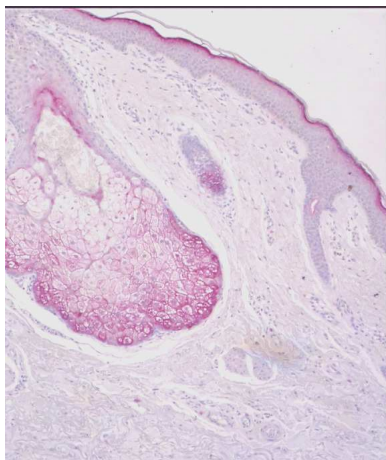
Daraus kann geschlossen werden, dass eine verstärkte mTOR-Aktivierung vor allem in synthesesreichen Keratinozyten des oberen stratum spinosum und in den Zellen des stratum granulosum bei der Umwandlung in die funktionstragende Hornschicht vorhanden ist. Die stark vermehrte Syntheserate der Keratinozyten des oberen stratum spinosum bezieht sich auf vier für die Funktion der Epidermis wichtige Proteine. Die Keratinfilamentproteine (Zytokeratine) sind die Strukturproteine der Epidermis, das Profilaggrin bildet mit den Keratinfilamenten Aggregate (Keratohyalingranula). Nach proteolytischem Zerfall des Profilaggrins in das Filaggrin kommt es zur Bildung des Keratins durch Vernetzung der Keratinfilamente.

Ein weiteres von den Keratinozyten des oberen stratum spinosum gebildetes Protein ist das Involukrin, das sich am Übergang des stratum granulosum zur Hornschicht an die Innenseiten der Korneozyten anlagert und mit weiteren Proteinen wie Loricrin und Keratolinin den sog. „cornified envelope“, ein zu hoher Rigidität der Korneozyten führendes Proteinnetz bildet.

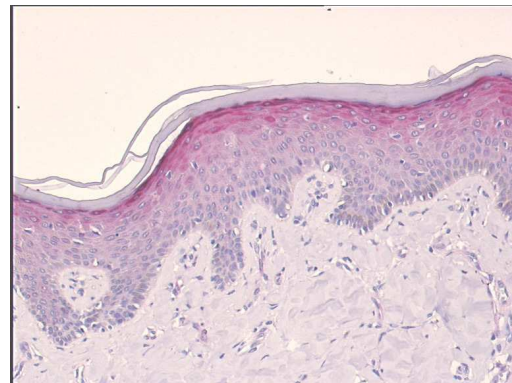
Auch die Bildung der Lipide, die am Übergang des stratum granulosum zur Hornschicht die Lipidbarriere bilden, erfolgt im oberen stratum spinosum.

Auch die Haarfollikel zeigen der Epidermis entsprechend eine Zunahme der rpS6-Expression von der Basalzellschicht bis zu den Zellen des stratum granulosum. Eine starke Anfärbung im Normalgewebe zeigen auch die Zellen der verschiedenen Drüsen (Talgdrüsen, ekkrine Schweißdrüsen, apokrine Schweißdrüsen), was anhand starker Synthesetätigkeit erklärt werden kann.

Endothelzellen der Blutgefäße subepidermal und in der Dermis weisen zum Teil auch eine mittelstarke rpS6-Expression auf, was ebenfalls das Spiegelbild einer erhöhten Stoffwechsellleistung darstellen und auch durch die bekannte mTOR-Aktivität bei der Neubildung von Gefäßzellen zustande kommen könnte.



**A**



**B**

**Abb. 15:** rpS6-Expression bei normaler Haut

**A** – Große Talgdrüse mit zum Teil sehr starker rpS6-Expression

**B** – rpS6-Expressionszunahme von der Basalzellschicht bis zum stratum granulosum

## **5.2 Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins bei viral bedingten Hautveränderungen**

### **5.2.1 Verruca vulgaris**

Während beim ersten Präparat die akanthotisch verbreiterte Epidermis noch das Verhältnis der rpS6-Expression wie bei normaler Haut zeigt, erkennt man bei den Präparaten zwei und drei schon eine mittelstarke Färbung der Epidermis vom unteren stratum spinosum an, teilweise sogar vom stratum basale. Hier kann somit eine verstärkte Aktivität des mTOR-Signaltransduktionsweges gefolgert werden, was möglicherweise auf den viral bedingten Proliferationsreiz mit erhöhter Mitoseaktivität der Basalzellen zurückgeführt werden kann.

Auch die durch den zytopathogenen Effekt der HPV charakteristischen Koilozyten, die im stratum spinosum und stratum granulosum vorkommen, lassen durch deren sehr starke positive Färbung auf eine hochregulierte mTOR-Aktivität schließen.

Eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges und damit auch der mTOR durch HP-Viren konnte schon nachgewiesen werden (Kim et al. 2006).

Die Anwendung eines mTOR-Hemmers könnte demnach zu einer Verringerung der epidermalen Proliferationsrate führen. Eine starke hemmende Wirkung auf Proteinsynthese und auf den Nährstoffmetabolismus ist auch bei den Koilozyten, die direkt durch den HPV befallenen und veränderten Keratinozyten, zu erwarten. Je nach Ausmaß des Befalls und der Grunderkrankungen müsste dabei zwischen einer topischen und systemischen Therapie entschieden werden. Sinnvoll wäre auch eine topische Anwendung nach klassischen Therapieformen wie der Exzision oder der elektrokaustischen Abtragung, um die doch sehr hohe Rezidivrate zu verringern.

Dharancy et al. berichten von einem starken Rückgang auf die Neubildung von HPV induzierten Warzen und sogar einen Rückgang schon entstandener Warzen bei einer lebertransplantierten Patientin nach Umstellung der immunsuppressiven Therapie durch Hinzunahme des mTOR-Inhibitors Sirolimus zum bis dahin angewendeten Schema Prednisolon/Tacrolimus/Mycophenolat-Mofetil (Dharancy et al. 2006). Bei notwendiger Immunsuppression kann damit das Risiko einer Warzenbildung durch HPV vermindert werden.

### **5.2.2 Condylomata acuminata**

Bei allen drei Präparaten wird eine Anfärbung aller Epidermisschichten deutlich, besonders des oberen stratum granulosum, was auf eine starke Aktivität der mTOR-Kinase hinweist. Hier zeigen sich noch in größerem Maße als bei den verrucae vulgares bis in die Basalzellschicht hinein einzeln liegende, besonders stark gefärbte Zellen. Dabei handelt es sich typischerweise um sehr große, zum Teil Atypien zeigende Keratinozyten, welche die virusproduzierenden Zellen darstellen. Eine aktive mTOR-Kinase scheint somit auch Grundlage für den energieverbrauchenden Vorgang der Virusreplikation zu sein.

Auch zeigen sich bei den Kondylomen stark rpS6 exprimierende und damit mTOR-aktive Koilozyten, die bei den condylomata acuminata typischerweise auch in tieferen Epidermisschichten vorkommen.

Folglich kann auch bei den Kondylomen bei zum Teil sehr starker rpS6-Expression und damit anzunehmender erhöhter mTOR-Aktivität von einer guten Wirkung topisch anwendbarer mTOR-Hemmer wie Everolimus ausgegangen werden.

Besondere Aufmerksamkeit kann auf die onkogene Potenz einiger condylomata acuminata verursachender HPV-Typen gelenkt werden.

Bei den oben beschriebenen, zum Teil dysplastisch veränderten, virusreplizierenden Keratinozyten kann es sich durchaus um mit diesen HPV-Typen befallene Keratinozyten handeln. Es ist stark anzunehmen, dass diese Zellen durch die stark hochregulierte mTOR-Kinase sehr gut auf die mTOR-Hemmer ansprechen, was wiederum eine onkogene Transformation dieser Zellen verhindern könnte.

Auch hinsichtlich Rezidivminimierung nach zum Beispiel elektrokaustischer Abtragung wäre die topische Anwendung der mTOR-Hemmer sinnvoll.

### **5.2.3 Anale intraepitheliale Neoplasie**

Beide Präparate zeigen einen Verlust der typischen Epithelschichtung mit stark dysplastisch veränderten und vergrößerten Keratinozyten bei mittelstarker bis sehr starker rpS6-Expression. Die Zellen im Bereich des vormaligen stratum granulosum heben sich dabei besonders stark von den darunter liegenden Keratinozyten ab. Ein deutlicher Expressionsverlust zur Basalzellschicht hin ist aber bei keinem der beiden Präparate mehr zu erkennen. Bei diesen präinvasiven Tumorzellen kann also der Schluss gefolgert werden, dass sie zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels und

Syntheseleistung der ständigen Aktivierung der mTOR unterliegen. Dabei exprimieren auch hier wiederum die sehr großen und dysplastischen Zellen besonders das rpS6-Protein. Es scheint also sowohl mit steigender Differenzierung zu den Keratinozyten des stratum granulosum hin, als auch mit steigender Dedifferenzierung der Keratinozyten im Rahmen der Onkogenese zu einer vermehrten Aktivität des mTOR-Transduktionsweges und damit zu einer verstärkten Expression des rpS6-Proteins zu kommen. Dabei könnte also neben der konventionellen Histologie von verdächtigen Hautveränderungen auch eine immunhistochemische Analyse dieser Präparate der Einstufung des Grades der Dedifferenzierung und damit eventuell des Malignitätsgrades behilflich sein.

Die Anwendung der mTOR-Hemmer verspricht bei diesen Ergebnissen ebenfalls erfolgreich zu sein. Eine geeignete Indikation könnte die topische Therapie nach Exzision sein, um entweder noch vorhandene intraepitheliale maligne Zellen bei durch schwierige Lokalisation bedingter, nicht ganz im Gesunden entfernter AIN in ihrer Synthesefähigkeit und Nährstoffumsetzung zu hemmen oder um angrenzende intraepitheliale Neoplasien niedrigen Grades bzw. Vorstufen derer zu behandeln, um einem Rezidiv vorzubeugen.

Auch eine primäre Therapie mit lokal anwendbaren mTOR-Hemmern bei zum Beispiel Fällen von Inoperabilität oder großer Ausdehnung der Läsionen wäre denkbar.

### **5.3 Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim spinozellulären Karzinom**

Alle fünf untersuchten Präparate zeigten eine ausserordentlich starke rpS6-Expression der Tumorzellen, was nach den Ergebnissen der praeinvasiven malignen Keratinozyten bei der AIN zu erwarten war. Auch hier scheint der Grund für die starke mTOR-Aktivität die verminderte Apoptoserate bei massiv erhöhter Proliferationsrate und die damit verstärkte Proteinsyntheserate bei begrenztem Nährstoffangebot zu sein. Das erste Präparat zeigt noch eine Expressionszunahme von der untersten Schicht der um die beim spinozellulären Karzinom vorkommenden Hornperlen gelagerten malignen Keratinozyten bis zur direkt unter diesen Hornperlen gelagerten Schicht maligner Zellen. Dies kann als Hinweis eines noch gut differenzierten Karzinoms gewertet werden, während die durchgehend sehr starke rpS6-Expression bei den anderen untersuchten Präparaten für eine fortgeschrittene

Dedifferenzierung sprechen könnten. Somit ließen sich prognostische Aussagen mittels einer Untersuchung auf die rpS6-Expression treffen.

Ein weiterer Beleg für die prognostische Relevanz der rpS6-Expression ist die Überexpression der Akt- Kinase bei spinözellulären Karzinomen im Maus- Modell, die für einen aggressiveren Typ mit früher Invasion, erhöhter Proliferationsrate und erniedrigter Apoptoserate der malignen Zellen steht (Segrelles et al. 2002). Ähnliches könnte damit für den Grad der rpS6-Expression gelten, denn eine hohe Akt-Aktivität führt über die mTOR zu einer verstärkten Expression der rpS6, gleichbedeutend mit einer erhöhten Aktivität der S6K1.

Eine die klassischen Therapieformen unterstützende Anwendung der mTOR-Hemmer lässt natürlich auch beim spinözellulären Karzinom Erfolge aufgrund der Ergebnisse der rpS6-Expression erwarten. Jimeno et al. konnten bei zwei im Tiermodell übertragenen Tumorzelllinien eines spinözellulären Karzinoms einen Wachstumsstopp in beiden Tumorzelllinien bei Anwendung des mTOR-Inhibitors Temsirolimus nachweisen (Jimeno et al. 2007). Auch beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ist der mTOR- Signaltransduktionsweg aktiviert und kann mittels Rapamycin gehemmt werden, was zu einem Arrest der malignen Zellen in der G0- /G1-Phase und zu einer Induktion der Apoptose führt (Hou et al. 2007). Somit könnte die Anwendung der mTOR-Hemmer ähnlich wie bei der AIN nach primärer Exzision zur Rezidivprophylaxe oder bei nicht operablen oder metastasierten Karzinomen zur Unterstützung der Chemo- und Radiotherapie eingesetzt werden.

Grund zu Optimismus gibt auch eine Studie, bei der das Auftreten von sowohl Hauttumoren als auch von soliden Organtumoren nach Nierentransplantation unter Immunsuppression untersucht wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Behandlung mit mTOR-Hemmern bzw. einer Kombination aus mTOR-Hemmern mit Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A im Vergleich zu einer Monotherapie mit Calcineurininhibitoren zu einem signifikant geringeren Auftreten von Hauttumoren (insbesondere dem spinözellulären Karzinom) und soliden Organtumoren führt (Kauffman et al. 2005).

Als Schlussfolgerung ist dabei von einer tumorsuppressiven Wirkung der mTOR-Hemmer auf die de-novo-Entstehung von Hauttumoren auszugehen.

Auch konnte schon am Mausmodell gezeigt werden, dass es bei Anwendung des mTOR-Hemmers Everolimus zu einer Inhibition und zu einem Rückgang von



Plattenepithel-karzinomen kommt, die aus der Inokulation von Plattenepithelkarzinomzellen entstanden sind (Khariwala et al. 2006).

Diese Ergebnisse lassen insgesamt eine erfolgreiche medikamentöse Behandlung des spinozellulären Karzinoms durch eine mTOR-Hemmung erwarten.

#### **5.4 Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Basalzellkarzinom**

Die bei drei der vier untersuchten Basalzellkarzinome in der Minderheit vorkommenden schwach bis mittelstark gefärbten Basalzellen zeigten eine unregelmäßige Abnahme der Farbtintensität von knapp unterhalb der Epidermis bis zur Basis des Basalzellkarzinoms. Interessanterweise waren bei diesen Präparaten alle Schichten der über dem Tumor liegenden Epidermis mittelstark, zum Teil auch sehr stark bis zur Basalzellschicht hin gefärbt. Dieses Phänomen könnte mit einer Signalfunktion der Epidermis für den darunter liegenden Tumor erklärt werden. Der unbekannte Überträger dieser Signalfunktion evtl. hinsichtlich der Proliferation und des Wachstums der Basalzellkarzinomzellen wäre dabei möglicherweise Ursache der vermehrten rpS6-Expression oder mTOR-Aktivität der Keratinozyten. Auch die Reaktion mit erhöhter Aktivität der mTOR bei den subepidermal liegenden Basalzellkarzinomzellen als Zeichen der vermehrten Proteinsynthese und verminderten Apoptose könnte damit erklärt werden. Um welchen Mechanismus es sich dabei handelt, könnte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Bei zwei Präparaten konnte bei normaler Expression des rpS6 in der Epidermis nur ganz vereinzelt eine Anfärbung der Zellen des Tumors nachgewiesen werden. Dieser Nachweis eines nicht aktivierten mTOR-Signaltransduktionsweges bei diesen und überwiegend auch bei den anderen zwei Präparaten wäre auch als Zeichen der bekannten geringen Aggressivität und sehr langsamen Proliferationsrate der Tumorzellen beim Basalzellkarzinom zu werten.

Eine direkte Hemmung der mTOR mit mTOR-Hemmern könnte damit eine Wachstumshemmung des Basalzellkarzinoms bewirken, eine vollständige Abheilung ist bei ausschließlicher Anwendung der mTOR-Hemmer aber aufgrund der überwiegend negativen rpS6-Expression nicht zu erwarten. Auch sollte vorher eine immunhistochemische Analyse auf eine mTOR-Aktivität hin angefertigt werden, um komplett mTOR-negative Tumoren ausschließen zu können, bei denen eine Wirkung von Rapamycin nicht zu erwarten ist.

Somit wäre die Anwendung von mTOR-Hemmern als supportive Maßnahme nach zum Beispiel Exzision oder als Rezidivprophylaxe möglich, wobei einer topischen Therapie wegen der geringeren Nebenwirkungsrate der Vorzug zu geben wäre.

### **5.5 Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Malignen Melanom und Hautmetastasen des malignen Melanoms**

Die sehr heterogene rpS6-Expression innerhalb der untersuchten malignen Melanome wurde schon im Ergebnisteil ausführlich beschrieben.

Nur bei einem Präparat der superfiziell spreitenden Melanome (SSM) konnte eine flächenhafte, sehr starke rpS6-Expression nachgewiesen werden. Die anderen Präparate der SSM zeigten vereinzelt, teilweise in Gruppen liegende sehr große und stark angefärbte neben überwiegend negativ gefärbten Melanomzellen. Das gleiche Ergebnis wiesen die knotigen MM, die sekundär knotigen MM und das akrolentiginöse MM (ALM) auf, was darauf hinweist, dass es keine Unterschiede in der mTOR-Aktivität bei den einzelnen Untergruppen des MM gibt.

Die zwei häufigsten genetischen Mutationen bei der Entstehung der malignen Melanome sind die Mutation der B-Raf-Kinase und die Mutation im PTEN-Tumorsuppressorgen. Letztere Mutation führt zu einer Aktivierung der mTOR, wobei ca. 30-60% der malignen Melanome davon betroffen sind (Molhoek et al. 2005). Xu et al. wiesen immunhistochemisch eine schwache bis mittelstarke Expression der mTOR bei malignen Melanomen nach (Xu et al. 2004).

Die Resultate der immunhistochemischen Färbung auf rpS6 bestätigen ebenfalls, dass der mTOR-Signaltransduktionsweg nicht ubiquitär und insgesamt auch nicht sehr stark aktiviert ist. Diese Ergebnisse weisen zwar nicht auf eine herausragende und alleinige Bedeutung der mTOR bei den malignen Melanomen hin, dennoch scheint die Kinase in Verbindung mit anderen Signaltransduktionswegen, Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgen in einem gewissen Maße die Proliferation der Melanomzellen zu fördern und deren Apoptose zu verhindern. Dies trifft vor allem für die häufig einzeln angefärbten und auch in Nestern vorkommenden stark rpS6 exprimierenden Zellen zu, die besonders deutlich beim ALM zu sehen waren.

Eine weitere Bedeutung der mTOR zeigt die bei etwa der Hälfte der untersuchten Präparate vorkommende starke rpS6-Expression der gesamten Epidermis über dem Tumor. Dies könnte wie bei den Basalzellkarzinomen ebenfalls Ausdruck einer Signalfunktion der Epidermiszellen zu den Melanomzellen sein. Ob es sich dabei um

wachstumsfördernde, anti-apoptotische oder andere Tumor-progressive Signale handelt, kann auch hier durch weitere Untersuchungen ermittelt werden.

Eine Proliferationshemmung mit mTOR-Inhibitoren konnte schon bei Melanomzellen *in vitro* nachgewiesen werden (Molhoek et al. 2005). Dennoch konnte bei diesen Untersuchungen die kombinierte Hemmung der zwei wichtigsten Signaltransduktionswege beim MM, nämlich die der B-Raf und der mTOR, eine deutlich stärkere Hemmung der Proliferation von Melanomzellen nachweisen. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Aggressivität und die schwierige Therapie der MM durch die verschiedenen beteiligten Mutationen und angeschalteten Signaltransduktionswege zustande kommen. Die alleinige Anwendung eines mTOR-Inhibitors beim malignen Melanom wäre damit nicht viel versprechend. Dies zeigt auch eine Phase-III Studie, bei der nur ein Melanompatient von 33 Patienten mit fortgeschrittenem metastasiertem malignen Melanom auf die Monotherapie mit dem proliferationshemmenden mTOR- Inhibitors CCI-779 angesprochen hat (Margolin et al. 2005). Die Zeit bis zur Tumorprogression bei diesem Patienten dauerte gerade einmal zwei Monate. Eine kombinierte Hemmung verschiedener Signaltransduktionswege könnte folglich auch *in vivo* eine weitaus höhere Ansprechrate zur Folge haben.

Bei mittels immunhistochemischer Färbung aufgedeckten starken rpS6-Expression der Tumore könnte die Aufnahme eines mTOR-Inhibitors in das Therapieschema gerechtfertigt sein, während bei weit überwiegend negativer Expression eher eine restriktive Haltung gegenüber einem mTOR-Hemmer anzuraten wäre.

Auch bei den untersuchten Hautmetastasen des malignen Melanoms zeigte sich kein einheitliches Bild der rpS6-Expression. Während bei einem Präparat eine überwiegend negative rpS6-Expression nachgewiesen werden konnte, exprimierten die anderen zwei Metastasen das rpS6-Protein mittelstark. Bei allen drei Präparaten hoben sich vereinzelt Melanomzellen mit gegenüber der Umgebung stärkerer Expression ab.

Die Entscheidung, einen mTOR-Hemmer in das Therapieschema des metastasierten malignen Melanoms aufzunehmen, könnte auch hier mit einer immunhistochemischen Analyse auf die rpS6- Expression erleichtert werden. Handelt es sich um einen Klon mit niedriger rpS6-Expression und damit niedriger mTOR-Aktivität, wäre die Anwendung eines mTOR-Hemmers nicht sehr günstig, im Gegensatz zu Metastasen mit hoher rpS6- Expression.

## **5.6 Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim Keloid**

Die bei beiden Präparaten vollständige und sehr starke rpS6-Expression der Fibroblasten und auch der Monozyten weist auf eine große Bedeutung der mTOR beim Keloid hin.

Ong et al. konnten kürzlich durch Hemmung der mTOR von monokultivierten Keloidfibroblasten nachweisen, dass dies zu einer geringeren Expression von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Kollagen und  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ - smooth muscle actin) führt und Zhang et al. zeigten eine Verminderung der durch Monozyten stimulierten Kollagen I- Expression mittels Hemmung der mTOR (Ong et al. 2007, Zhang et al. 2006).

Die mTOR-Inhibition bei den Monozyten und den Fibroblasten verspricht damit eine gute Hemmung der übermäßigen Kollagenproduktion bei Keloiden in vivo und stellt somit eine erfolgversprechende neue Therapiemöglichkeit bei überschießender Narbenbildung dar. Dabei ist natürlich die topische der systemischen Therapie aufgrund der geringeren Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen vorzuziehen. Des Weiteren ist eine geringere Dosis erforderlich und eine verbesserte Wirkung der direkt am Keloid angreifenden mTOR-Hemmer wahrscheinlich.

## **5.7 Bedeutung der Expression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins beim idiopathischen Angiosarkom**

Trotz einer überwiegend eher schwachen Expression des rpS6 zeigt doch ein sehr hoher Anteil der malignen Angiosarkomzellen diese Expression. Dies bedeutet auch hier eine entscheidende Rolle des mTOR-Signaltransduktionsweges bei der Pathologie des Angiosarkoms. Sehr auffällig war auch bei diesem malignen Gefäßtumor eine zum Teil sehr starke rpS6-Expression der gesamten Epidermisschichten über dem Tumor. Diese wurde auch in der Basalzellschicht nachgewiesen.

Eine sehr starke rpS6-Expression konnte vor allem bei den großen, in Mitose befindlichen Tumorzellen registriert werden, was die Erkenntnis unterstützt, dass die mTOR- Kinase bei proliferierenden Zellen in ihrer Aktivität hochreguliert wird.

Wie in der Einführung schon erläutert, hat der mTOR-Signaltransduktionsweg über den VEGF eine wichtige Funktion für die pathologische Angiogenese. Dies ist neben der antiapoptotischen Wirkung ein entscheidender Grund für die Aktivierung der

mTOR in den Angiosarkomzellen (Bader et al. 2006) und könnte auch Ursache für die mTOR- Aktivierung im Sinne einer proliferationsfördernden Signalwirkung in den Epidermiszellen sein.

Eine essentielle Rolle der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), welche zu einer Akt-Aktivierung und demnach auch zu einer mTOR-Aktivierung führt, konnte bei der Angiogenese schon nachgewiesen werden (Jjang BH et al. 2000). Im Jahre 2006 zeigten Bader et al. am Tiermodell die Wachstumshemmung eines Tumors mit Mutation im Gen für eine wichtige katalytische Untereinheit der PI3K. Dieser stark haemorrhagische Tumortyp wurde durch das Rapamycin-Derivat RAD001 hauptsächlich in dessen pathologischer Angiogenese gehemmt (Bader et al. 2006).

Die Ergebnisse der rpS6-Expression bei den untersuchten Angiosarkomen bestätigte zusammen mit Untersuchungen wie die von Jjang und Bader eine wichtige mTOR-Funktion bei malignen Gefäßtumoren und die mögliche klinische Relevanz der mTOR-Hemmer bei dieser Tumorentität.

## 5.8 Zusammenfassende Diskussion

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse auf die rpS6-Expression konnten bei einigen benignen und malignen Hautveränderungen die mehr oder weniger starke Bedeutung des mTOR-Signaltransduktionsweges nachweisen.

Vor allem proliferative Prozesse der Epidermis, sowohl gutartig wie die viral bedingten Hautveränderungen der verrucae vulgares und der condylomata acuminata mit ihrer Akanthose und den Koilozyten, als auch praeinvasive maligne Hautveränderungen wie bei der analen intraepithelialen Neoplasie bis hin zum spinözellulären Karzinom, lassen durch die starke rpS6-Expression auf eine starke Aktivität der mTOR-Kinase schließen. Folglich wäre bei diesen Diagnosen eine mTOR-Hemmung je nach Risikoabschätzung hinsichtlich Grunderkrankungen und Ausdehnung der Hautveränderung zusätzlich zur Standardtherapie topisch oder systemisch sehr vielversprechend.

Auch das Keloid lässt durch die starke rpS6-Expression der am pathologischen Prozess beteiligten Fibroblasten und Monozyten eine gute Wirksamkeit lokaler mTOR-Hemmer erwarten, was bei der oft sehr schwierigen Behandlung der Keloide Hoffnung weckt.

Beim malignen Melanom und beim Basalzellkarzinom scheint eine pharmakologische mTOR-Hemmung aufgrund der negativen oder überwiegend nur sehr schwachen rpS6-Expression nicht erfolversprechend. Dennoch könnte bei vereinzelt sehr stark exprimierenden Tumoren eine mTOR-Hemmung erwogen werden, sei es lokal zur Rezidivminderung nach zum Beispiel Exzision eines Basalzellkarzinoms oder frühen malignen Melanoms oder zusätzlich systemisch bei metastasiertem malignem Melanom.

Das Angiosarkom lässt aufgrund der Bedeutung des mTOR-Signaltransduktionsweges bei der pathologischen Angiogenese dieses Tumors und der in dieser Arbeit nachgewiesenen rpS6-Expression ebenfalls ein gutes Ansprechen auf die mTOR-Hemmung erwarten.

Letztlich von Bedeutung ist auch die beschriebene zum Teil sehr starke rpS6-Expression und damit mTOR-Aktivität der gesamten Epidermis über Tumoren wie dem Basalzellkarzinom, dem malignen Melanom oder dem Angiosarkom. Dies könnte einen proliferationsunterhaltenden Effekt der Keratinozyten auf die Tumoren widerspiegeln und somit auch ein interessanter Ansatzpunkt für die mTOR-Hemmung sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- Bader AG, Kang S et al. „Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo“, Proc Natl Acad Sci U S A. 103 (2006) 1475-1479
- Dennis PB, Jaeschke A et al. “Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor” Science. 294 (2001) 1102-1105
- Dharancy S, Cateau B et al. “Conversion to sirolimus: a useful strategy for recalcitrant cutaneous viral warts in liver transplant recipient” Liver Transpl. 12 (2006) 1883-1887
- Dudkin L, Dilling MB et al. „Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition“ Clin Cancer Res 7 (2001) 1758–1764
- Eker R “Familial renal adenomas in Wistar rats; a preliminary report” Acta Pathol Microbiol Scand. 34 (1954) 554-562
- Fingar DC, Richardson CJ et al. “mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/ eukaryotic translation initiation factor 4E” Mol Cell Biol. 24 (2004) 200-216
- Flotow H and Thomas G “Substrate Recognition Determinants of the Mitogen-activated 70K S6 Kinase from Rat Liver” J Biol Chem. 267 (1992) 3074-3078
- Garami A, Zwartkruis FJ et al. “Insulin activation of Rheb, a mediator or mTOR/S6K/4E-BP signalling, is inhibited by TSC1 and 2” Mol Cell 11 (2003) 1457-1466
- Gingras AC, Raught B et al. “eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation” Annu Rev Biochem. 68 (1999) 913-963
- Gressner AM and Wool IG „The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated” J Biol Chem. 249 (1974) 6917-6925
- Hay N and Sonenberg N “Upstream and downstream of mTOR” Genes Dev. 18 (2004) 1926-1945
- Heitman J, Movva NR und Hall, MN “Targets for cell cycle by the immunosuppressant rapamycin in yeast” Science. 253 (1991) 905-909
- Heliwell SB et al. “TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast” Mol Biol Cell. 5 (1994) 105-118
- Hou G, Xue L et al. “An activated mTOR/p70S6K signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and inhibition of the pathway by rapamycin and siRNA against mTOR” Cancer Lett. 253 (2007) 236-248

- Hudson CC, Liu M et al., "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin." *Mol Cell Biol.* 22 (2002) 7004-7014
- Inoki K, Li Y et al. "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling" *Nat Cell Biol.* 4 (2002) 648-657
- Jjang BH, Zheng JZ et al. „Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells“ *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (2000) 1749–1753
- Jimeno A, Kulesza P et al. "Dual EGFR and mTOR targeting in squamous cell carcinoma models, and development of early markers of efficacy" *Br J Cancer.* 96 (2007) 952-959
- Kauffman HM, Cherikh WS et al. "Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies" *Transplantation* 80 (2005) 883-9
- Khariwala SS, Kjaergaard J et al. "Everolimus (RAD) Inhibits In Vivo Growth of Murine Squamous Cell Carcinoma", *Laryngoscope.* 116 (2006) 814-820
- Kim DH, Sarbassov DD et al. "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery" *Cell.* 110 (2002) 163-175
- Kim DH, Sarbassov DD et al. "GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR" *Mol Cell.* 11 (2003) 895-904
- Kim SH, Juhn YS et al. „Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ERK1,2 and PI3K/Akt“ *Cell Mol Life Sci.* 63 (2006) 930-938
- Krieg J, Hofsteenge J et al. „Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide“ *J Biol Chem.* 263 (1988) 11473-11477
- Loewith R, Jacinto E et al. "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control" *Mol Cell.* 10 (2002) 457-468
- Long X, Ortiz-Vega S et al. "Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency" *J Biol Chem.* 280 (2005) 23433-23436
- Luan FL, Hojo M et al. "Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy" *Transplantation.* 73 (2002) 1565-1572
- Manning BD, Tee AR et al. "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway" *Mol Cell.* 10 (2002) 151-156



- Margolin KA, Longmate J et al. "CCI-779 in metastatic melanoma: A phase II trial of the California Cancer Consortium" *Cancer*. 104 (2005) 1045-1048
- Martin DE and Hall MN "The expanding TOR signalling network" *Curr Opin Cell Biol*. 17 (2005) 158-166
- Molhoek KR, Brautigan DL et al. „Synergistic inhibition of human melanoma proliferation by combination treatment with B-Raf inhibitor BAY43-9006 and mTOR inhibitor Rapamycin“ *J Transl Med*. 3 (2005) 39
- Montagne J et al. "Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size" *Science*. 285 (1999) 2126-2129
- Murakami M, Ichisaka T et al. "mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells" *Mol Cell Biol*. 24 (2004) 6710-6718
- Ohanna M, Sobering AK et al. "Atrophy of S6K1<sup>-/-</sup> skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control" *Nat Cell Biol*. 7 (2005) 286-294
- Ong CT, Khoo YT et al. "mTOR as a potential therapeutic target for treatment of keloids and excessive scars" *Exp Dermatol*. 16 (2007) 394-404
- Pende M, Um SH et al. „S6K1 (-/-) /S6K2(-/-) Mice Exhibit Perinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5-Terminal Oligopyrimidine mRNA Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway“ *Mol Cell Biol*. 24 (2004) 3112-3124
- Ruvinsky I, Sharon N et al. "Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis" *Genes Dev*. 19 (2005) 2199-2211
- Ruvinsky I, Meyuhas O et al. "Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size" *Trends Biochem. Sci*. 31 (2006) 342-348
- Sarbassov DD, Ali SM et al. "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive an raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton" *Curr Biol*. 14 (2004) 1296-1302
- Segrelles C, Ruiz S et al. "Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis" *Oncogene*. 21 (2002) 53-64
- Shima H, Pende M et al. „Disruption of the p70<sup>s6k</sup>/p85<sup>s6k</sup> gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase" *EMBO J*. 17 (1998) 6649-6659
- Stolovich M, Lerer T et al. "Lithium can relieve translational repression of TOP mRNAs elicited by various blocks along the cell cycle in a glycogen synthase kinase-3- and S6-kinase-independent manner" *J Biol Chem*. 280 (2005) 5336-5342
- Tischmeyer W, Schicknick H et al. „ Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory“ *Eur J Neurosci*. 18 (2003) 942-950

Vezina C, Kudelski A and Sehgal SN et al. "Rapamycin (AY-22,989) a new antifungal antibiotic. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle" J Antibiot (Tokyo). 28 (1975) 721-726

Wiederrecht GJ, Sabers CJ et al. „Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells" Prog Cell Cycle Res. 1 (1995) 53-71

Xu G, Zhang W et al. „Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors" Int J Oncol. 24 (2004) 893-900

Yeung RS, Xiao GH et al. "Predisposition to renal carcinoma in the Eker rat is determined by germ-line mutation of the tuberous sclerosis 2 (TSC2) gene." Proc Natl Acad Sci U S A. 91 (1994) 11413-11416

Zhang Q, Kelly AP et al. "Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI-3K/AkT signaling pathways." J Invest Dermatol. 126 (2006) 2607-2613

### **Literaturverzeichnis Tab.3:**

(1) - Dilling MB, Dias P et al. „Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor." Cancer Res 54 (1994) 903–907

(2) - Mayerhofer M, Boehm A et al. „In vitro and in vivo antileukemic effects of the mTOR-targeting drug rapamycin in patients with imatinib-resistant CML." Blood 106: abstr (2005) 4834

(3) - Dudkin L, Dilling MB et al. „Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition." Clin Cancer Res 7 (2001) 1758–1764

(4) - Smith JW, Ko Y-J et al. „Update of a phase 1 study of intravenous CCI-779 given in combination with interferon- $\alpha$  to patients with advanced renal cell carcinoma." J Clin Oncol 22 abstr (2004) 4513

(5) - Pandya KJ, Levy DE et al. „A randomized, phase II ECOG trial of two dose levels of temsirolimus (CCI 779) in patients with extensive stage small cell lung cancer in remission after induction chemotherapy." J Clin Oncol 23:abstr (2005) 7005

(6) - Chan S, Scheulen ME et al. „Phase 2 study of two dose levels of CCI-779 in locally advanced or metastatic breast cancer (MBC) failing prior anthracycline and/or taxane regimens." J Clin Oncol 23 (2005) 5314–5322

(7) - Chang SM, Wen P et al. „Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme." Invest New Drugs 23 (2005) 357–361

(8) - Margolin K, Longmate J et al. „CCI-779 in metastatic melanoma: a phase II trial of the California Cancer Consortium." Cancer 104 (2005) 1045–1048

(9) - Yee KWL, Garcia-Manero G et al. „A phase II study of temsirolimus (CCI-779) in patients with advanced leukemias“ Blood 104: abstr (2004) 4523

(10) - Yee KW, Zeng Z et al. „Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies“ Clin Cancer Res. 12 (2006) 5165-5173

(11) - Milton DT, Riely GJ et al. „Phase 1 trial of everolimus and gefitinib in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer“ Cancer 110 (2007) 599-605

(12) - Rowinsky EK „Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR)“ Curr Opin Oncol 16 (2004) 564–575

(13) - Clackson T, Metcalf CA et al. „Broad anti-tumor activity of AP23573, an mTOR inhibitor in clinical development“ Proc Am Soc Clin Oncol 22: abstr (2003) 882A

(14) - Nelms JL, Goldlust SA et al. „A novel mTOR inhibitor (AP23573) produces cell loss and apoptosis in glioblastoma multiforme independent of EGFR status“ Neuro-Oncology 5: abstr (2003) 29A

(15) - Feldman E, Giles F et al. „A phase 2 clinical trial of AP23573, an mTOR inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies“ J Clin Oncol 23:abstr (2005) 663

## **7 Software, Datenbanken und Abbildungsverzeichnis**

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

Carl Zeiss Axio Vision Viewer and Sample Images Software, Carl Zeiss Vision GmbH (München)

Abbildung2: Pädagogische Hochschule St. Gallen: <http://www.phs.unisg.ch>

## **8 Anhang**

### **8.1 Danksagung**

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Ralf Wienecke für die Ausarbeitung der Thematik, die Betreuung bei der Durchführung der immunhistologischen Färbungen sowie kritischen Beurteilung und Korrektur dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. med. M. Flaig (Klinikum für Dermatologie und Allergologie der LMU München) für die Bereitstellung der histologischen Präparate bedanken.

Ebenso gilt mein Dank dem Direktor der Klinik Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig und Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Ruzicka für die Bereitstellung der technischen Geräte sowie der Räumlichkeiten in der Klinik.

Für die Einarbeitung in die Methodik der immunhistologischen Färbung bedanke ich mich an dieser Stelle ganz besonders bei Fr. Hill sowie Fr. Puchta, die auch immer für Rückfragen zur Verfügung standen.

Dank auch an meine Schwester Gisela Marquart sowie an Karin Malinski für die Unterstützung bei der Gestaltung von Layout sowie Abbildungen.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich stets uneingeschränkt unterstützt haben.

## 8.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Götz  
Vorname: Jürgen  
Geburtsdatum/-ort: 20.08.1980, München  
Anschrift: Wastl-Witt-Str. 17  
80689 München  
Telefon: 089/724 58 174  
e-mail: Judo-Juergen@web.de

### Schulbildung:

1987 – 1991 Grundsule in Gröbenzell  
1991 – 2000 Gymnasium Puchheim  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung:

10/2000 – 04/2007 Ludwig Maximilian Universität München  
Studiengang: Humanmedizin  
08/2002 Ärztliche Vorprüfung  
08/2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
04/2006 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
04/2006 – 04/2007 Praktisches Jahr  
04/2007 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Dissertation:

ab 06/2004 Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München  
Thema: Immunhistologische Untersuchung verschiedener benigner und maligner Hautveränderungen auf Expression des phosphorylierten ribosomales S6-Proteins (rpS6) als Zeichen der Aktivierung des mTOR-Signaltransduktionsweges

### Berufliche Weiterbildung:

Seit 11/2007 Assistenzarzt an der Fachklinik für Innere Medizin der Klinik Augustinum München