

---

Aus dem Institut für Pathologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Kirchner

**Zellzyklusregulation in der pulmonalen Lymphangioliomyomatose  
im Vergleich zu glatter, ortsständiger Muskulatur**

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

vorgelegt von  
Henriette Sophie Heinrich

aus  
Tübingen

Jahr  
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Frau PD Dr. med Iris Bittmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Dietrich Reinhardt  
Prof. Dr. Oliver Eickelberg

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: \_\_\_\_\_

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2010

**Für meinen Vater**

<b>I.EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Allgemeine Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Pathologie und Klinik.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Klinische Geschichte und Therapieansätze bis heute .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Pathogenetische Grundlagen .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Zellzyklus und untersuchte Regulationsproteine .....</b>	<b>12</b>
Abb.1: Zellzyklusphasen .....	12
Abb.2: Schematische Darstellung der Zellzyklusregulation.....	18
<b>1.6 Fragestellung .....</b>	<b>19</b>
<b>II.MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Allgemeines.....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Fixierung und Einbettung der Gewebeproben .....	19
<b>2.2 Immunhistochemie (IHC) .....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Allgemeines Prinzip .....	20
2.2.2 Detektionsmethoden .....	20
Abb. 3: ABC- Methode (mit freundlicher Genehmigung der Fa. DAKO).....	21
Abb. 4: APAAP- Methode (mit freundlicher Genehmigung der Fa. DAKO).....	22
Tabelle 1:Verwendete Antikörper.....	23
2.2.3 Methodenprotokoll Immunhistologie .....	23
a) Vorbehandlung.....	23
c) ABC und LSAB Detektionssystem .....	25
d) APAAP-Detektionssystem .....	26
e) EGFR pharmDx IHC Kitsystem .....	27
2.2.5 Kontrollen Immunhistologie.....	28
<b>3.1 Prinzip der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH).....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Verwendete Sonden.....	29
3.1.2 Signalmuster.....	29
Abb.5: Fluoreszenzmuster einer normalen Zelle .....	30
Abb.6: Amplifikation .....	30
Abb.7: Deletion .....	30
Abb.8: balancierte Translokation .....	31
Abb.9: Philadelphiachromosom.....	31
<b>3.2 Methodenprotokoll FISH.....</b>	<b>31</b>
<b>4.Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>33</b>
4.1 Patienten.....	33
4.2 Gewebeproben.....	34
<b>5.Datenerhebung und –analyse.....</b>	<b>35</b>
5.1 Immunhistologie.....	35
5.2 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH).....	35

<b>III. ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
<b>1.1 Immunhistologie.....</b>	<b>36</b>
Tabelle 3: Prozentsatz positiver Zellen in LAM-Gewebe .....	36
Tabelle 4: Prozentsatz positiver Zellen in glatter, ortsständiger Muskulatur .....	37
Tabelle 5: Vergleich der Expression in glatter, ortsständiger Muskulatur der Lunge bzw. LAM-Gewebe .....	38
1.1.1 Expression der untersuchten Zellzykluskomponenten im Lungenparenchym ..	38
Abb. 9: Expression von ER-beta und EGFR in Lungenbiopsien:.....	39
Abb.10: p38, CDK4, p21 und ER- $\alpha$ .....	39
<b>1.2 Korrelationsanalyse.....</b>	<b>40</b>
1.2.1 Hormonrezeptoren und Zellzyklusregulationsproteine .....	40
1.2.1.1 Cycline .....	40
1.2.1.2 Cyclininhibitoren .....	40
1.2.1.3 Zellzyklusregulatoren .....	40
1.2.2 EGFR .....	41
1.2.2.1 Cyclininhibitoren .....	41
1.2.2.2 Zellzyklusregulatoren .....	41
1.2.2.3 Cycline und cyclinabhängige Kinasen .....	41
1.2.3 Cyclinabhängigekinasen .....	41
1.2.4 Cyclininhibitoren.....	41
1.2.5.1 Cycline und abhängige Kinasen .....	42
1.2.5.2 Zellzyklusregulatoren .....	42
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse .....	43
<b>2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....</b>	<b>43</b>
Tabelle 7: Cyclin D1 .....	44
Tabelle 8: BCR-ABL.....	44
Abb.11: BCR-ABL:.....	45
Abb.12: Cyclin D1: .....	45
<b>IV. DISKUSSION.....</b>	<b>46</b>
<b>1. Expression von Hormonrezeptoren in LAM-Läsionen.....</b>	<b>46</b>
1.1 Allgemeines .....	46
1.2 Struktur der Östrogenrezeptoren .....	47
1.3 Struktur des Progesteronrezeptors.....	48
1.4 Allgemeines Expressionsmuster des Progesteronrezeptors.....	48
1.5 Expressionsverhalten und Funktion der Östrogenrezeptoren in verschiedenen Gewebetypen .....	49
1.6 Expression der Hormonrezeptoren in LAM-Läsionen .....	50
<b>2. Expression von Zellzyklusproteinen in LAM-Zellen .....</b>	<b>52</b>
2.1 Das Rb-Protein - Allgemeines.....	52
Abb. 12. Erster Phosphorylierungsschritt von Rb.....	53
2.2 Der Restriktionspunkt – Regulation durch Rb.....	53
2.3 Erniedrigte Rb Expression in LAM-Zellen .....	54
2.3.1 p16 .....	54
2.3.2 Cyclin D1/CDK4 .....	55
2.4 ER- $\alpha$ und Rb Expression .....	57
2.5 EGFR Expression in LAM- Zellen .....	58

2.6 p53- Wächter des Genoms.....	59
<b>3. TSC 1 und 2 - Schlüssel zur Pathogenese der LAM.....</b>	<b>62</b>
3.1 TSC 1/2 und p38 - Allgemeines.....	62
3.2 Expression in LAM-Zellen .....	64
3.3 Negative Regulation von Cyclin D1 durch p 38 .....	65
<b>4.Ki-67- Allgemeines .....</b>	<b>66</b>
4.1 Ki-67- Expressionsmuster.....	66
4.2 Inhomogenes Expressionsverhalten von Ki-67 in LAM-Läsionen.....	67
4.3 Ki-67, p27 und Östrogenrezeptorexpression in LAM-Zellen.....	68
<b>5. p27 –Funktion und Expression in LAM- Zellen .....</b>	<b>69</b>
5.1 Regulation von p27 durch Östrogene .....	70
<b>V.ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>72</b>
<b>1.1 Er-<math>\alpha</math> Expression in LAM-Zellen .....</b>	<b>72</b>
<b>1.2 Die Rb/p16/ Signalkaskade in LAM- Läsionen .....</b>	<b>72</b>
<b>1.3 Beeinflussung der Rb-Signalkaskade durch Hormone/Wachstumsfaktoren....</b>	<b>73</b>
<b>1.4 p53 Expression in LAM –Zellen und die Rb- Signalkaskade .....</b>	<b>74</b>
<b>1.5 p38 und Ki-67 Expression in LAM-Läsionen.....</b>	<b>74</b>
<b>1.6 p27 –Widersprüchliches Expressionsmuster.....</b>	<b>75</b>
<b>1.7 Abschliessende Zusammenfassung .....</b>	<b>75</b>
<b>VI.LITERATUR .....</b>	<b>76</b>
<b>VII.DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>80</b>
<b>VIII.LEBENS LAUF.....</b>	<b>81</b>

## **I. Einleitung**

### **1.1 Allgemeine Einleitung**

Die pulmonale Lymphangiomyomatose (LAM) ist eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von ca. 1 zu 100000, die in nahezu allen Fällen Frauen im gebärfähigen Alter betrifft. Pathomorphologisch ist die pulmonale Lymphangiomyomatose durch die zystische Zerstörung von Lungengewebe durch Proliferation abnormaler glatter Muskelzellen gekennzeichnet. Die Krankheit ist mit dem Auftreten von Angiomyolipomen, charakteristischerweise in der Niere, und Lymphangiomyomen in den axialen Lymphknoten und im Abdomen assoziiert. Generell tritt die Erkrankung zwischen Menarche und Menopause erstmals auf. Das durchschnittliche Manifestationsalter der Erkrankung liegt bei 34 Jahren [1]. Nur im Zusammenhang mit einer Östrogensubstitutionstherapie wurde über eine postmenopausale Erstmanifestation berichtet [2]. Während die Symptome der LAM während einer Schwangerschaft exacerbieren können wird eine Milderung des Verlaufs in der Menopause beobachtet [3]. Viel häufiger als die primär pulmonale Form der Lymphangiomyomatose tritt die LAM im Rahmen einer neurokutanen Multisystemerkrankung der tuberösen Sklerose (TSC) auf [1]. Hierbei handelt es sich um ein autosomal-dominant vererbtes Leiden mit multiplen benignen Hamartomen in Gehirn, Nieren und der Haut, dessen Phänotyp stark variiert. Es wird vermutet, dass bei knapp 40% aller TSC Patientinnen eine pulmonale Lymphangiomyomatose vorliegt, die jedoch in vielen Fällen asymptomatisch bleibt.

## **1.2 Pathologie und Klinik**

Die LAM ist charakterisiert durch die Proliferation atypischer glatter Muskelzellen hauptsächlich im Interstitium, entlang bronchovaskulärer Strukturen und pulmonaler Lymphabflusswege sowie der Pleura. Der Ductus Thoracicus ist regelmäßig verdickt und erweitert, ebenso die Lymphgefäße. Häufig sind die hilären mediastinalen und retroperitonealen Lymphknoten beteiligt [4]. Das alveoläre Lungengewebe ist wabig-zystisch umgebaut und von zahlreichen LAM-Zellproliferaten, deren Durchmesser zwischen 0,1 cm und mehreren Zentimetern Länge variiert, durchzogen. Eine Hämosiderose der Lunge ist auf Grund der Ruptur dilatierter Venulen häufig zu beobachten [5]. LAM-Zellen ähneln glatten Muskelzellen, erscheinen jedoch verkürzter und polymorpher. Es können spindelförmige und epitheloide LAM-Zellen unterschieden werden. Histopathologisch zeigen erstere eine starke Reaktion mit proliferating cell nuclear antigen (PCNA) und eine schwächere mit dem monoklonalen Antikörper HMB-45, umgekehrt verhält es sich mit den epitheloiden Zellen. Dies führt zu der Vermutung, dass sich beide Zelltypen in unterschiedlichen Differenzierungs- bzw. Proliferationsstadien befinden: Beiden Formen ist ein positives Reaktionsverhalten mit typischen Markern glatter Muskulatur wie  $\alpha$ -smooth muscle Actin, Vimentin und Desmin gemeinsam [4].

Die extrapulmonalen Manifestationen der pulmonalen Lymphangioliomyomatose umfassen die Bildung von chylösen Ergüssen in der Bauchhöhle, Lymphadenopathie, das Vorliegen von Lymphangioliomyomen in Abdomen und Retroperitoneum und das häufige Vorkommen von renalen Angiomyolipomen. Die Nierenfunktion wird auch durch große Angiomyolipome nicht beeinträchtigt, sie bergen aber die Gefahr einer Ruptur und Blutung. Im Zusammenhang mit Lymphangioliomyomen wird häufig über Bauchschmerzen und über den Tag zunehmende Ödeme berichtet [1].



Die pulmonalen Manifestationen der LAM bestimmen jedoch das klinische Bild. Bei fast allen Patientinnen tritt im Laufe der Erkrankung ein Spontanpneumothorax auf, der rezidiert, oft beidseitig auftritt und ein hohes Mortalitätsrisiko birgt [6]. Oft ist eine Pleurodese notwendig. Der zystische Umbau der Lunge führt zur Obstruktion der Atemwege mit reduziertem Airflow und damit zu einer zunehmenden respiratorischen Insuffizienz [1]. Die seltener auftretenden, schwer zu therapierenden chylösen Pleuraergüsse haben ihre Ursache in einer Obstruktion des Ductus Thoracicus mit Ruptur von Lymphgefäßen der Pleura oder des Mediastinums durch LAM Proliferate [7]. Weitere Manifestationen sind Husten, Häm- und Chyloptysen [1].

### **1.3 Klinische Geschichte und Therapieansätze bis heute**

Die in dieser Arbeit untersuchte Erkrankung wurde wahrscheinlich 1918 das erste Mal von *Luttembacher et al.* beschrieben. Er berichtete über den Tod einer jungen, an Tuberöser Sklerose leidenden Patientin auf Grund eines beidseitigen Pneumothorax.

Unter dem Namen der „muskulären Zirrhose“ wurde die sporadische Form der pulmonalen Lymphangioliomyomatose 1937 das erste Mal von *von Stössel et al.* beschrieben.

1966 untersuchten *Cornog und Enterline et al.* zwanzig Fälle von pulmonaler Lymphangioliomyomatose mit gleichzeitig abdominalen Manifestationen, die sie als Lymphangiomyome bezeichneten. Zudem wiesen sie erstmals auf einen möglichen gemeinsamen genetischen Ursprung der LAM-Zellen hin [8].

*Corrin et al.* machte 1975 in einer ausführlichen Zusammenfassung der klinischen und histologischen Merkmale der Erkrankung erstmals auf die Möglichkeit einer Verbindung zwischen der tuberösen Sklerose und der LAM aufmerksam [4].

In den neunziger Jahren wurden in allen Teilen der Welt größere Fallkollektive untersucht und Patientenregister angelegt, die zu einem besseren Verständnis der Erkrankung beitrugen. Das fast ausschließliche Auftreten der LAM bei prämenopausalen Frauen, die Administration von Östrogenen sowie die mögliche Verschlechterung der Symptomatik in einer Schwangerschaft legte die Vermutung einer hormonell getriggerten Pathogenese nahe [9]. Es wurde über einen milderen Verlauf nach bilateraler Oophorektomie berichtet, jedoch konnte dies in nachfolgenden Studien nicht bestätigt werden. Untersuchungen zur Anwendung von GnRh –Analoga blieben ohne Ergebnis [10], [11]. Neuere Studien legen nahe, dass eine Östrogenwirkung die metastatische Ausbreitung von LAM-Zellen mit absoluter TSC 2 Defizienz fördert [12].

Die Behandlung mit Progesteronpräparaten wurde zwar zur Standardtherapie der LAM, jedoch ohne durch eindeutige Studien validiert worden zu sein. Eine retrospektive Studie von Johnson und Tattersfield [1] zeigte eine geringere Abnahme der FEV1 und DCLO bei mit Progesteron behandelten Patientinnen im Vergleich zu unbehandelten LAM-Patientinnen. Dieses Ergebnis wurde jedoch durch eine breit angelegte retrospektive Studie, die das Alter der Patientinnen, die Dauer der Erkrankung sowie die FEV1 bei Erstdiagnose berücksichtigte, mit 245 Patientinnen von Taveira et al widerlegt [13]. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der jährlichen Abnahme der FEV1 und der DCLO bei behandelten und unbehandelten Frauen.

Die Lungentransplantation wurde schließlich als ultima Ratio zur Behandlung der pulmonalen Lymphangioliomyomatose etabliert [1]. Die Überlebensrate von Lungen transplantierten LAM-Patientinnen scheint besser zu sein als bei Lungentransplantationen aus anderer Indikation. Transplantatabstoßung und Infektionen sind auch bei auf Grund einer pulmonalen Lymphangioliomyomatose transplantierten Patienten die Haupttodesursache. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der

Überlebenszeiten von einfach und Doppel- Lungentransplantierten LAM- Patienten [14].

#### **1.4 Pathogenetische Grundlagen**

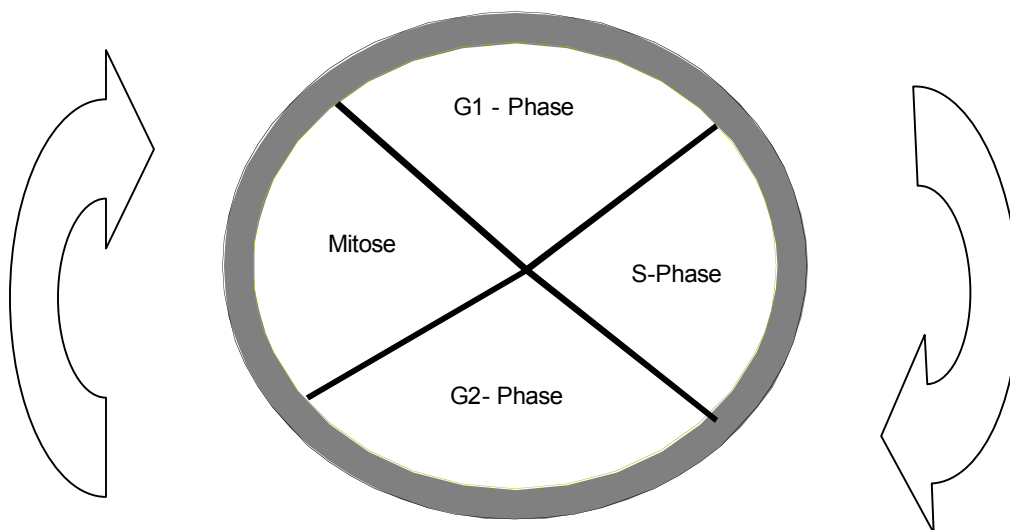
Im Jahre 2000 wurde erstmals die somatische Mutation im TSC2 Gen, die wahrscheinlich zu LAM führt, beschrieben [15]. Seitdem sind sowohl TSC1 als auch TSC2 mit seinem Genprodukt Tuberin Gegenstand ausgiebiger Forschung. Es zeigte sich, dass Zellen, die eine Mutation im TSC1 oder TSC2 Gen oder beiden Genen tragen, die Fähigkeit besitzen in andere Gewebe zu wandern, was sich im Falle der Tuberösen Sklerose in Form der pulmonalen Lymphangioliomyomatose manifestiert. Zusätzlich haben diese Zellen die Fähigkeit einer heterogenen Differenzierung, wie bei Angiomyolipomen in Fett, glatte Muskulatur und Gefäße [16]. Diese These einer „benignen Metastasierung“ oder eines „cellsheddings“ wurde durch das Wiederauftreten von LAM nach einseitiger Lungentransplantation in der Spenderlunge gestützt [17], [18]. Diese Ergebnisse führten dazu, dass bei Vorliegen einer pulmonalen Lymphangioliomyomatose, die einseitige zu Gunsten einer doppelseitigen Lungentransplantation verlassen wurde.

Einen weiteren Therapiefortschritt brachte die Entdeckung, dass Tuberin an TOR (target of rapamycin) bindet, mit ihm interagiert und somit hemmt. Ist Tuberin aus verschiedenen Gründen defekt, führt die Stimulation von TOR, z. B durch einen Wachstumsfaktor, zur Aktivierung von S6, einem ribosomalen Protein, das eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt und zu unkontrolliertem Zellwachstum führen kann [19]. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die experimentelle Einführung der Rapamycintherapie bei TSC Patienten mit Angiomyolipomen. Die Wirksamkeit auf die Proliferation der LAM-Zellen wird zurzeit in klinischen Studien untersucht.

Trotz intensiver Forschungsarbeit ist die genaue Pathogenese der pulmonalen Lymphangioliomyomatose bis zum heutigen Zeitpunkt ungeklärt. Die LAM scheint hormonell getriggert zu sein, wie die deutliche Geschlechtsspezifität zeigt. Die oben angeführten Studienergebnisse weisen zudem auf eine gestörte Regulation von Signalkaskaden des normalen Zellzyklusablaufes hin.

### **1.5 Zellzyklus und untersuchte Regulationsproteine**

In einer sich normal teilenden Zelle gliedert sich der Zellzyklus in vier unterschiedliche Phasen, wie in unten stehender Graphik (**Abb. 1**) dargestellt.



**Abb. 1: Zellzyklusphasen**

Verschiedenste Mitogene z.B. Wachstumsfaktoren und Hormone können die Zelle veranlassen, aus dem Ruhezustand in die G1-Phase einzutreten, in der sie sich auf die

S-Phase (DNA Synthese) vorbereitet. Nach Abschluss der S-Phase erfolgt der Eintritt in die G<sub>2</sub>-Phase und schließlich die Teilung in der M-Phase.

Auf jeder Regulationsebene des Zellzyklus kann das Vorliegen eines in seiner Funktion z.B. durch Mutationen beeinträchtigten Proteins oder Rezeptor das unkontrollierte Wachstum einer Zelle bewirken und so zur Entstehung von Tumoren beitragen. Der Funktionsverlust eines Zellzyklusproteins führt im besten Fall zur Aktivierung der Apoptosekaskade um die fehlerhafte Zelle zu eliminieren.

Ein Defekt eines Tumorsuppressors, wie z.B. p53 oder Rb, der unter anderem die Funktion hat den Zellzyklus bei Vorliegen von fehlerhaften Erbinformationen zu stoppen, hat zur Folge, dass die Zelle sich unkontrolliert teilt und vermehrt. Ist z.B. ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren z.B. durch Mutation nicht mehr abhängig von der Aktivierung durch seinen Liganden, sendet er unentwegt Wachstumssignale ins Innere der Zelle, die sich wiederum unkontrolliert teilt.

Der Übergang von der G<sub>1</sub> in die S-Phase stellt den am besten untersuchten und verstandenen Abschnitt eines regelrechten Zellzyklus dar. Entscheidend für den Übergang der Zelle von der G<sub>1</sub>- zur S Phase sind die so genannten Cycline, die die Aktivität Cyclinabhängiger Kinasen (CDK) regulieren. Die Aktivierung der Cycline kann unter anderem durch Mitogene erfolgen. Cycline bilden mit denen ihnen zugehörigen CDK Komplexe und aktivieren dadurch weitere Zellzyklusproteine. Diese Vorgänge können durch verschiedene Tumorsuppressoren und spezifische Inhibitoren reguliert und gehemmt werden.

Hier wurden sowohl Cyclin D1, Cyclin E sowie die Cyclin abhängigen-Kinasen CDK2 und CDK4 untersucht. Die Assoziation von Cyclin D1 und CDK4 bewirkt in einem normalen Zellzyklus eine Phosphorylierung des Komplexes Rb/E2F. Das in dieser Arbeit untersuchte Retinoblastoma-Protein (Rb) wird durch den Komplex von Cyclin E und CDK2 hyperphosphoryliert, aus seiner Bindung mit E2F (Elongationsfaktor 2)

gelöst und inaktiviert. Das freigesetzte E2F aktiviert die DNA-Polymerase initiiert die S-Phase.

Die Regulierung bzw. Hemmung der beschriebenen Vorgänge erfolgt durch verschiedene Zellzyklusinhibitoren bzw. Tumorsuppressoren.

Rb ist ein wichtiger Tumorsuppressor der durch verschiedene Mechanismen Kontrolle über den Zellzyklus ausübt. Durch die oben beschriebene Bindung an E2F kann es als direkter Repressor der Transkription wirken, wenn der Komplex aus beiden an einen Promoter eines zellzyklusregulierenden Gens bindet und dessen Expression inhibiert. In hypophosphorylierter, also in aktiver Form, hemmt Rb E2F und ebenso die Expression von Cyclin E.

Die Inaktivierung beider Allele, vor allen Dingen durch Keimbahnmutationen ist bei Kindern mit der Entstehung von Retinoblastomen assoziiert. Auch in einer Vielzahl von Tumoren des Erwachsenenalters wird eine Inaktivierung von Rb durch somatische Mutationen oder Deletionen beobachtet. E2F kann nicht mehr gebunden und damit gehemmt werden und so wird die DNA –Synthese initiiert [20].

P53 stellt als „Wächter des Genoms“ einer der wichtigsten Tumorsuppressoren dar. Es kann in vielen humanen Neoplasien wie z.B. Ösophagus- und Lungenkarzinomen aber auch bei Sarkomen nachgewiesen werden. In normalen und ruhenden Zellen kann es, auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit, nur geringgradig nachgewiesen werden. Bei Auftreten eines DNA -Schadens akkumuliert dieses Protein in der Zelle und aktiviert p21, das wiederum das Fortschreiten des Zellzyklus durch die Hemmung von CDK2 und 4 verhindert. Zudem kann die Akkumulation von p53 in einer Zelle die Aktivierung von Bcl-2 bewirken um so die Apoptose einer Zelle einzuleiten.

Ist das p53 Protein z.B. durch Mutation oder Deletion verändert, so kann es seine Funktion als wichtiger Tumorsuppressor nicht mehr wahrnehmen: Die Zelle teilt sich unkontrolliert und kann nicht mehr durch Apoptose ausgeschaltet werden [21].

P27 und p16 gehören zur Gruppe der Cyclin Kinase Inhibitoren (CKI). P27 hat Eigenschaften eines Tumorsuppressors und zeigt eine hohe Expression in ruhenden Zellen. Es hemmt in diesem Zustand die Aktivität von Cyclin D1, sein Spiegel sinkt jedoch sobald die Zelle beginnt sich z.B. durch die Wirkung eines Mitogens auf die Teilung vorzubereiten [22].

In vielen Tumoren, so auch in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, Colonkarzinomen und Mammakarzinomen ist die Expression vom p27 dauerhaft vermindert und mit einer hohen Aggressivität des Tumors sowie einer schlechteren Prognose vergesellschaftet.

P16 hemmt die Aktivität von CDK4 und somit Phosphorylierung des Rb/E2F Komplexes. Der Zellzyklus kann nicht fortschreiten.

Das ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte Protein Ki-67 ist ein immunhistochemischer Marker für proliferierende Zellen und scheint von vitaler Bedeutung für die Zellteilung zu sein. Jedoch ist seine genaue Funktion im Zellzyklus bis heute noch unklar. Die oben beschriebenen Vorgänge, können wie bereits erwähnt durch Hormone und Wachstumsfaktoren beeinflusst und gesteuert werden [23].

Die sporadische pulmonale Lymphangiomyomatose ist, wie der Uterus myomatosus und die fibromuskuläre Dysplasie der Blutgefäße, eine praktisch nur bei Frauen auftretende Erkrankung. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein hormoneller Proliferationsstimulus eine Rolle spielt. Daher wurde das Expressionsverhalten des Östrogenrezeptors vom Typ  $\alpha$  und  $\beta$  und des Progesteronrezeptors untersucht.

ER- $\alpha$  und - $\beta$  sind Produkte unterschiedlicher Gene, und sind ebenso auf unterschiedlichen Chromosomen -14q und 6q25.1 - lokalisiert. Im Gegensatz zu ER- $\alpha$ , das in bestimmten Typen des Mammakarzinoms exprimiert wird, liegt ER- $\beta$  hauptsächlich in normalem Gewebe vor. Das Vorliegen zweier Subtypen von Östrogenrezeptoren ist nicht vollständig verstanden. Ihr unterschiedliches

Reaktionsverhalten bei Bindung an Estradiol lässt vermuten, dass sie bei der Genregulation unterschiedliche Rollen innehaben

Im Zellinneren werden die Hormonrezeptoren durch Liganden– in diesem Fall Östrogenderivate und Progesteron- aktiviert und wirken so als zellkernständige Transkriptionsfaktoren. Sie führen zur Bindung hormonresponsiver DNA-Elemente in der Promoterregion der jeweiligen Zielgene, was die Transkriptionsrate unterschiedlicher Gene verändert. Es mehren sich jedoch Hinweise, dass die Liganden der untersuchten Hormonrezeptoren über die Funktion als Transkriptionsfaktor hinaus, die Eigenschaft besitzen, über die Aktivierung von MAP-Kinasen , die Progression des Zellzyklus sowie die Expression von Hormonrezeptoren und Wachstumsfaktoren direkt zu beeinflussen [24].

Aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren wurde in dieser Arbeit die Expression des Epithelial–Growth-factor–Rezeptors (EGFR) untersucht. Es handelt sich hierbei um einen 170kd Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, der durch das HER1 Gen kodiert wird und zur Familie der Erb-Tyrosinkinasen gehört. Der Epithelial–Growth–factor (EGF) und der Transforming Growth Faktor TGF-alpha aktivieren den Rezeptor extrazellulär als Liganden. Die Signalweiterleitung in den Zellkern und die Aktivierung des Zellzyklus erfolgt unter anderem über die Aktivierung von sogenannten MAP-Kinasen (Mitogen-activated-kinase).

In vielen Tumoren, wie zum Beispiel beim nichtkleinzelligen Karzinom der Lunge ist die Expression von EGFR z.B. durch Mutation des für den Rezeptor kodierenden Gens erhöht.

In den letzten Jahren wurden spezifische Hemmstoffe, z.B. Erlotinib und Cetuximab, für den EGFR-Rezeptor entwickelt und in die Therapie des Nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms oder auch des Kolonkarzinoms integriert [25].



Des Weiteren wurden die Gene BCR und ABL untersucht. Untersuchungen (nicht aufgeführt) hatten Hinweise für ein Vorliegen einer Veränderung im Bereich dieser Gene ergeben. In normalen Zellen kodiert BCR (Breakpoint Cluster Region) auf Chromosom 22q11.21 für ein 160kD Phosphoprotein mit Serin-oder Threonin Kinaseaktivität in der Zellmembran und kann unter anderem durch die Aktivierung von p38 MAP-Kinase die Proliferation einer Zelle beeinflussen.

Das Gen ABL auf Chromosom 9q34.1 kodiert in gesunden Zellen für eine im Zytoplasma und Zellkern lokalisierte Tyrosinkinase. Die im Zellkern durch Hyperphosphorylierung von Rb freigesetzte Form dieser Tyrosinkinase kann die Transkriptionsrate einer Zelle erhöhen und wird von Rb gehemmt.

Durch eine Translokation von Teilen des Chromosoms 9 und 22 entsteht das sogenannte „Philadelphia Chromosom“ das bei chronisch myeloischen und akuten Leukämien vorliegen kann. Ein Teil des BCR Genes von Chromosom 22 fusioniert mit dem ABL Gen auf Chromosom 9. Es entsteht eine von extrazellulären Stimuli unabhängige Tyrosinkinase, die Zellzyklusproteine aktiviert und so zu unkontrollierter Zellteilung führt [26].

In dieser Arbeit wurde als Vertreter der MAP-Kinasen, die für die Signalfortleitung innerhalb der Zelle verantwortlich sind, die p38 MAP-Kinase untersucht. Mitogen-aktivierte Protein Kinasen sind Serin /Threonin-spezifische Protein Kinasen, die durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden. Sie besitzen unterschiedlichste Funktionen im Bezug auf Genexpression, Zellteilung, Differenzierung und Apoptoseregulation.

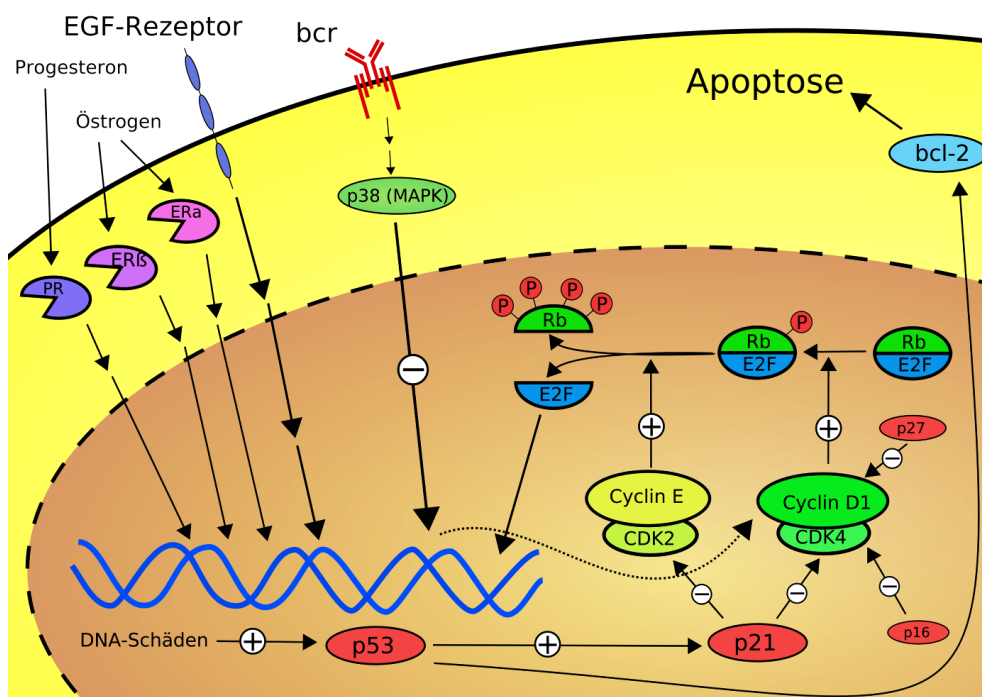
Es können drei Gruppen von MAP-Kinasen unterschieden werden.

Die sogenannten „extracellular signal regulated kinases“ (ERK) werden hauptsächlich durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie z.B. EGFR aktiviert und treiben so das Wachstum und die Differenzierung der Zelle voran.

Die c-jun N-terminal Kinases sind auch als stress-activated protein Kinases (SAPK) bekannt.

Die in dieser Arbeit untersuchte p38 MAP-Kinase kann durch inflammatorische Cytokine, UV-Licht und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Zudem kann p38 die Aktivität von Cyclin D1 negativ regulieren und somit auf das Fortschreiten des Zellzyklus Einfluss nehmen [27].

Anhand der folgenden Grafik (**Abb.2**) sind die wesentlichen Abläufe des Zellzyklus nochmals veranschaulicht und die untersuchten Proteine im Zusammenhang dargestellt.



**Abb.2: Schematische Darstellung der Zellzyklusregulation**

## **1.6 Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Rolle Störungen der Zellzyklusregulation in der Pathogenese der pulmonalen Lymphangioliomyomatose spielen. Voruntersuchungen mittels Microarrayanalysen nach Lasermikrodissektion von LAM-Läsionen hatten Hinweise auf eine mögliche gestörte Expression des Cyclin D1 Gens und des BCR-ABL Gens ergeben.(nicht veröffentlicht) Immunhistochemisch wurde die Expression relevanter Zellzyklusregulationsproteine wie z.B. p53, Cyclin D1 und p27 an LAM-Läsionen im Vergleich zu normaler ortständiger glatter Muskulatur der Lunge untersucht. Zudem wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eventuelle Veränderungen auf Genebene bei Cyclin D1 oder das Vorliegen einer Translokation im Falle von BCR- ABL untersucht. Da eine hormonell getriggerte Genese der LAM diskutiert wird, wurde zusätzlich die Expression verschiedener Hormonrezeptortypen untersucht.

## **II.Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeines**

#### **2.1.1 Fixierung und Einbettung der Gewebeproben**

Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme in gepuffertem 4-10%igem Formaldehyd (Formalin) für 24 bis 48 Stunden fixiert, anschließend routinemäßig in Paraffin (Paraplast, Fa. Vogel, Giessen Deutschland) eingebettet, danach dann Schnitte für die histopathologische Diagnostik angefertigt und die Blöcke archiviert. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden von den Paraffinblöcken je nach vorgesehener Untersuchungstechnik 2-8 µm dicke Gewebsschnitte mit Schlitten- oder

Rotationsmikrotomen (Fa. Jung) sowie Einmal-Klingen (Feather) angefertigt und auf sialinisierte Objektträger (SuperFrost/Plus, Fa.Menzel) aufgezogen.

## **2.2 Immunhistochemie (IHC)**

### **2.2.1 Allgemeines Prinzip**

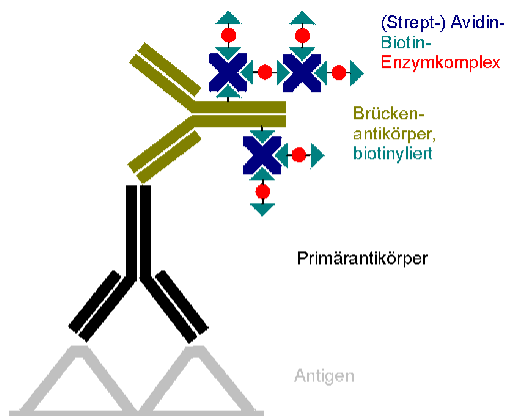
Die Immunhistochemie ermöglicht die spezifische Darstellung antigentrager Strukturen. Im histologischen Gewebsschnitt werden diese Proteine unter zur Hilfenahme von Antikörper-Farbkomplexen sichtbar gemacht. Zwei Formen von Antikörpern werden hier unterschieden:

Monoklonale Antikörper sind gegen ein einziges Epitop gerichtet, wohingegen polyklonale Antikörper sich gegen mehrere verschiedene Epitope richten. Die Antikörper werden durch Immunisierung verschiedener Tierspezies gegen ein humanes Zielantigen gewonnen. Monoklonale Antikörper werden durch die Isolierung klonaler antigenspezifischer B-Zelllinien, die mit Myelomzelllinien zu Hybridomen verschmolzen werden, unter Kulturbedingungen reproduzierbar hergestellt. Polyklonale Antikörper dagegen stammen nach Aufreinigung direkt von der gegen das Zielantigen immunisierten Tierspezies. Die Detektion der Bindung des Antikörpers an ein Zielantigen im immunhistochemischen Präparat erfolgt entweder auf direktem oder indirektem Wege: Der Antikörper wird also direkt mit einem Enzym- oder Farbkomplex gekoppelt oder er wird indirekt mit (gegen den Primärantikörper gerichteten) konjugierten Sekundärantikörpern bzw. noch komplexeren AK-Systemen farblich im Gewebe sichtbar gemacht. Für diese Arbeit wurden 4 verschiedene direkte und indirekte jeweils hochsensitive immunhistologische Detektionsmethoden eingesetzt.

### **2.2.2 Detektionsmethoden**

Die so genannte dreistufige **Avidin-Biotin-Methode** (ABC) beruht auf der starken Affinität (Dissoziationskonstante  $10^{-19}$  M) zwischen dem Vitamin Biotin und dem

Glykoprotein Streptavidin, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Auf Grund ihrer molekularen Konfiguration werden jedoch nicht alle besetzt.



(Strept-) Avidin-Biotin-Complex

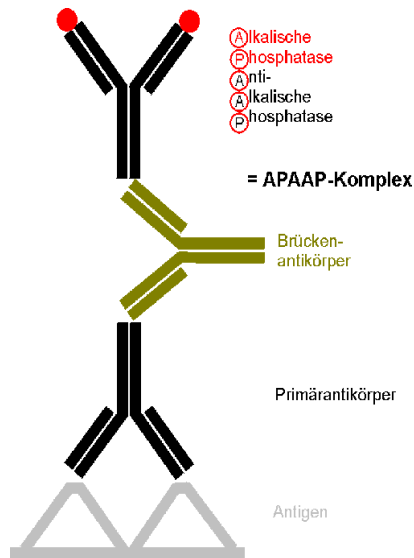
## ABC-Methode

**Abb. 3: ABC- Methode (mit freundlicher Genehmigung der Fa. DAKO)**

Im ersten Schritt wird ein mono- oder polyklonaler Primärantikörper gegen das gesuchte Antigen auf das Gewebe aufgetragen. Danach folgt ein biotinylierter, polyklonaler Zweitantikörper, der gegen den ersten Antikörper, den sogenannten Primärantikörper, der aus einer anderen Tierspezies gewonnen wird, gerichtet ist. Im dritten Schritt stellt Streptavidin mit dem Biotin des sekundären Antikörpers eine Verbindung her: den Peroxidase-konjugierten Streptavidin-Komplex siehe Abb. 5. Das gesuchte Antigen wird farblich durch die Wechselbeziehung der Peroxidase mit einem geeigneten Chromogen (z.B. 3,3'-diaminobenziden-Tetrahydrochlorid-DAB oder 3-Amino-9-Ethylcarbazol-AEC) dargestellt.

Anstatt ABC wird bei der **Markierten Streptavidin-Biotin** Technik (LSAB=Labelled Streptavidin Biotin) ein enzymmarkiertes Streptavidin verwendet.

Bei der **Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-Technik (APAAP-**



Technik) setzt sich der der Nachweiskomplex (bei primären Mausantikörpern) aus Anti-Maus-Immunglobulinen vom Kaninchen, monoklonalen Antikörpern gegen alkalische Phosphatase aus Kälberdarm sowie alkalischer Kälberdarmphosphatase, zusammen. Diese katalysiert am Ende des Versuches die Farbreaktion, siehe **Abb. 4**.

## APAAP-Methode

**Abb. 4: APAAP- Methode (mit freundlicher Genehmigung der Fa. DAKO)**

Die vorausgegangene Formalinfixierung bewirkt bei vielen Gewebsantigenen eine Veränderung in ihrer sterischen Konformation. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass es zu Interaktionen zwischen einzelnen endogenen Peroxidasen oder Phosphatasen im Gewebe mit den Detektionssystemen kommt. Um dies zu verhindern erfolgt die Vorbehandlung der Gewebsschnitte mit Substanzen zur Blockierung und Antigendemaskierung.

**Das EGFR pharmDx IHC Kitsystem** verwendet nach der Inkubation mit dem primären monoklonalen Antikörper, ein Visualisierungsreagenz auf der Basis der Dextrantechnologie. Es enthält sowohl Ziegen-Anti-Maus-Antikörpermoleküle als auch Meerrettichperoxidase-moleküle, die über ein Dextranpolymer verknüpft sind. Die Verwendung von Link-Antikörper und Peroxidasekonjugat werden dadurch überflüssig. Durch enzymatische Umwandlung des hinzugefügten Chromogens wird das Reaktionsprodukt sichtbar.

**Tabelle 1: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Firma	Original Protein-konzentration	Mögliche Expressions-lokalisierungen	Färbeverhalten	Antikörper art
ER- $\alpha$	LOXO	1.0mg/l	Uterus, Myo- und Endometrium, Mamma-Karzinom	nukleär	Monoklonal Maus
ER- $\beta$	Innovative Diagnostics	1.0mg/l	ubiquitär	nukleär	Polyklonal Maus
PR	LOXO	3.0g/l	Ovarien, Brustdrüsengangzellen sowie Endo-, und Myometrium	nukleär	Monoklonal Maus
EGFR	DAKO	KIT	Epithelien, glatte Muskulatur, Nervenzellen, Fibroblasten	Membranständig/ Zytoplasmatisch	Monoklonal Maus
Cyclin D1	Innovative Diagnostics	1mg/l	Mantelzelllymphom	nukleär	Monoklonal Kaninchen
Cyclin E	Novocastra	0.1mg/ml	Plazenta	nukleär	Monoklonal Maus
CDK2	Zycomed	0.2.mg/ml	HeLA-Zellen /Tonsille	Nukleär/ Zytoplasmatisch	Monoklonal Maus
CDK4	Zycomed	2mg/ml	Plattenepithel	Nukleär/ Zytoplasmatisch	Monoklonal Maus
p27	DAKO	110mg/l	Glatte Muskulatur, ruhende Zellen verschiedenster Gewebe	nukleär	Monoklonal Maus
p21	Calbiochem	0.1mg/ml	Ruhende Zellen verschiedenster Gewebe	nukleär	Monoklonal Maus
p16	Novocastra	6.1g/l	Inselzellen Pankreas, Epithel- und Drüsenzellen verschiedener Organe, Melanom, Lymphom, Sarkom, Leiomyom	Nukleär/ Zytoplasmatisch	Monoklonal Maus
p53	DAKO	390mg/l	Multiple Neoplasien	Nukleär/zytoplasma tisch	Monoklonal Maus
p38	Chemicon	0.1mg/l	Lymphomgewebe	Nukleär/ zytoplasmatisch	Polyklonal Kaninchen
Ki-67	DAKO	80mg/l	Intestinales Gewebe, glatte Muskulatur Histiocytoome, Prostata-und Mammakarzinome	nukleär	Monoklonal Maus
Rb	Biozol	0.05mg/ml	Multiple Neoplasien	nukleär	Monoklonal Maus
Bcl-2	DAKO	280mg/l	Lymphozyten, Mantel – und T-Zell Zone von Lymphknoten, Milz, Thymus, Lymphomzellen, Tumoren glatter Muskelzellen	zytoplasmatisch	Monoklonal Maus

### 2.2.3 Methodenprotokoll Immunhistologie

#### a) Vorbehandlung

Die ersten Schritte der Vorbehandlung gestalteten sich bei allen verwendeten Detektionsystemen (s. **Tabelle 2**) gleich.

Das Gewebe wurde im ersten Schritt 30 Minuten in 250 ml Xylol und anschließend jeweils 5 Minuten in absteigender Alkoholreihe (Isopropanol, 100%, 96%, 70%,) entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Objektträger dreimal sorgfältig mit Aqua dest. gespült und daraufhin für 2 mal 5 Minuten in ein 250ml Bad TRIS-Puffer (PH 7,5) gestellt.

Es folgte ein für jeden Antikörper spezifischer 30 minütiger Verdau in der Mikrowelle. Hierbei war nach jeweils 15 Minuten der Flüssigkeitsstand in den Küvetten zu überprüfen um einen zu starken Flüssigkeitsverlust ausgleichen zu können.

Die für den jeweiligen Antikörper verwendeten Verdünnungen, Verdauungen, Inkubationszeiten und Detektionssysteme sind folgender Tabelle zusammengestellt.

**b) Tabelle 2:** Verdünnung, Inkubation, Vorbehandlung und verwendetes System der Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubation</b>	<b>Vorbehandl.</b>	<b>System</b>
<b>p53</b>	1:20	60'RT	30'TRS 6	LSAB
<b>bcl-2</b>	1:150	60'RT	30'TRS 6	LSAB
<b>Cyclin D1</b>	1:30	60'RT	30'TRS 9	LSAB
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	1:50	60'RT	30'TUF	LSAB
<b>ER-<math>\beta</math></b>	1:40	60'RT	30'TRS 6	LSAB
<b>PR</b>	1:70	60'RT	30'TUF	LSAB
<b>p16</b>	1:40	60'RT	30'TRS 6	LSAB
<b>p21</b>	1:80	60'RT	30'TRS 6	LSAB
<b>Ki-67(MIB-1)</b>	1:60	60'RT	30'TRS 6	APAAP-M
<b>CDK4</b>	1:200	60'RT	30'TRS9	APAAPsp
<b>Retinoblastoma</b>	1:30	60'RT	30'TRS 6	ABC-Elite
<b>p27</b>	1:200	60'RT	30'Prot.IV	ABC-Elite
<b>p38</b>	1:40	60'RT	30'Prot.II	ABC-Elite
<b>Cyclin E</b>	1:30	60'RT	30'TRS 9	ABC-Elite
<b>CDK2</b>	1:50	60'RT	30'AR	ABC-Elite
<b>EGFR</b>	Kit	30'RT	5'Protease-K	Kit



Nach Beendigung des Verdaus wurden die Küvetten ohne Deckel zwanzig Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und die Präparate danach wiederum sorgfältig mit Aqua dest gespült.

### **c) ABC und LSAB Detektionssystem**

Bei den Detektionssystemen ABC-Elite und LSAB erfolgte im nächsten Schritt die endogene Peroxidase-Hemmung, wobei die Objektträger 10 Minuten in 7,5% Wasserstoffperoxid eingestellt wurden. Um die ablaufende Reaktion nicht zu hemmen, war hierbei darauf zu achten die Drahtbügel der Küvetten zu entfernen.

Die Präparate wurden daraufhin 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült und wiederum für zweimal fünf Minuten in ein Tris-Puffer Bad gestellt.

Im Anschluss wurden auf die Objektträger jeweils circa 2 Tropfen des im LSAB-Kit enthaltenen Non-Immuneserum (neutrale Proteinlösung) bzw. die im ABC-Kit enthaltene Blockinglösung aufgetragen. Für das LSAB-Detektionssystem galt eine Inkubationszeit von 10 Minuten, für das ABC-Elite System wurde für 20 Minuten lang die Blockinglösung auf den Objektträgern belassen.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Präparate nicht gespült, sondern vorsichtig mit einem Papiertuch entlang der Gewebegrenzen abgetupft. Hierauf erfolgte, für jede Serie in unterschiedlicher Verdünnung (**s. Tabelle 1**) das Auftragen des jeweiligen Primär - Antikörpers; die Objektträger wurden in feuchter Kammer bei Raumtemperatur 60 Minuten lang inkubiert und anschließend für 2 mal 5 Minuten in Tris-Brij- Puffer gespült.

Es wurde daraufhin die Linkflüssigkeit aus dem LSAB-Kit bzw. der mit Biotin konjugierte sekundäre Antikörper aus dem ABC-Elite Kit aufgetragen, 30 Minuten unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert und wiederum eine Spülung mit Tris-Brij vorgenommen.

Nach 30 minütiger Inkubation mit den jeweiligen Komplexlösungen (LSAB-Kit bzw. Peroxidase konjugierter Avidin-Biotin Komplex für ABC-Elite) wurden die Objektträger mit Tris-Brij gespült und zur Färbung vorbereitet.

Die Schnitte wurden mit AEC 10 Minuten lang gefärbt und anschließend 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Daraufhin erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun, und wiederum eine 10 minütige Spülung unter fließendem Leitungswasser zur Bläuung der Präparate. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Kaiser's Glycerin-Gelatine (im 37 ° C Brutschrank angewärmt) eingedeckelt.

#### **d) APAAP-Detektionssystem**

Die Vorbehandlung erfolgte wie bereits oben beschrieben. Verdau und Inkubation erfolgten für Ki-67 und CDK4 wie in obenstehender Tabelle angegeben.

Bei diesem System wurde nach der Abkühlungsphase keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Blockierung durchgeführt, sondern direkt eine zweimalige Waschung mit TRIS-Puffer vorgenommen.

Daraufhin erfolgte die 60 minütige Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper in oben stehender Verdünnung.

Die Objektträger wurden anschließend wiederum für 2 x 5 Minuten in TRIS-Puffer gewaschen.

Um bei der Detektion von Ki-67 und CDK4 im Gewebe eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden wurde kein Blocking mit neutraler Proteinlösung vorgenommen, sondern sofort die APPAP-M-Brücke für 30 Minuten aufgetragen. Nach erneutem Einstellen in Trist-Puffer wurden die Objektträger für 30 Minuten mit dem APPAP-Komplex inkubiert.

Um die Färbeintensität zu verstärken wurde die Behandlung mit der APPAP-M-Brücke und dem Komplex für jeweils 10 Minuten wiederholt. Zwischen allen genannten Schritten erfolgte die Waschung der Objektträger in TRIS-Puffer für 10 Minuten.

Anschließend erfolgte die Färbung mit Chromogen Fast Red, das man 10 Minuten lang einwirken ließ.

Vor und nach der Gegenfärbung mit Hämalaun wurden die Objektträger für jeweils 10 Minuten in fließendem Wasser gewässert.

Abschließend erfolgte die Eindeckung der Präparate mit Kaisers Glyceringelatine.

#### **e) EGFR pharmDx IHC Kitsystem**

Die Untersuchung der EGFR-Expression erfolgte mittels des spezifischen Kit -Systems EGFR pharm Dx (DakoCytomation Code K1492). Dieser beinhaltet ein genau auf den Antikörper zugeschnittenes Protokoll und alle zur Bearbeitung notwendigen Puffer und Lösungen sowie Positiv -und Negativkontrolle.

Hinsichtlich der Vorbehandlung unterschied sich das EGFR-Protokoll nicht von der des LSAB und ABC-Elite -Systems.

Die Präparate wurden jeweils mit circa 2 Tropfen Proteinase K behandelt und anschließend mit Parafilm abgedeckt, um eine gleichmäßige Benetzung des Objektträgers mit der Flüssigkeit zu gewährleisten. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in Aqua bidest gespült.

Es erfolgte eine 5 minütige Behandlung mit Peroxidase unter im vorhergehenden Absatz beschriebenen Bedingungen, jedoch wurden die Objektträger nach diesem Arbeitsgang nur vorsichtig mit einer Spritzflasche (Aqua Bidest) abgespült und anschließend für 5 Minuten in ein 1:10 verdünntes Waschpufferbad gegeben.

Im Anschluss wurden die zu bearbeitenden Objektträger mit jeweils 100µl EGFR mouse anti- human Antikörper 30 Minuten bei Raumtemperatur und in feuchter Kammer inkubiert. Auf die als Negativkontrolle zu verwendenden Präparate wurde in selber Menge das EGFR Negativ-Kontroll-Reagenz aufgetragen und wie die Untersuchungspräparate weiterbehandelt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden sowohl die mit dem Antikörper als auch die mit dem negativen Kontrollreagenz behandelten Objektträger vorsichtig mit Aqua bidest. abgespült.

Es erfolgte die 30 minütige Inkubation aller Präparate mit dem Labelled Polymer HRP unter oben beschriebenen Bedingungen und eine Waschung in der Pufferlösung.

Die Schnitte wurden nun 10 Minuten lang mit DAB und der Substrat Chromogen Lösung behandelt, vorsichtig abgespült und 10 Minuten fließend gewässert

Hierbei war zu beachten, die Farblösung erst kurz vor Gebrauch anzusetzen.

Die abschließenden Schritte -Gegenfärbung mit Hämalun, Eindeckeln mit Kaiser's Gelatine- sind weiter oben ausführlich beschrieben.

### **2.2.5 Kontrollen Immunhistologie**

Für die Sicherung der Spezifität wurden bei allen Färbungen Kontrollen mitgeführt. Zur Negativkontrolle wurde der jeweilige Primärantikörper durch entsprechende Isotyp-Immunglobuline von Maus oder Kaninchen ersetzt (Isotypkontrolle). Zur Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch Antikörperverdünnungsmedium ersetzt (Systemkontrolle). Ein immunhistologischer Färbedurchgang wurde nur ausgewertet, wenn bei diesen Isotyp- und Systemkontrollen keine unspezifischen Färbereaktionen nachweisbar waren.

Die Färbungen wurden in Serien mit derselben standardisierten Methodik durchgeführt, so dass die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse sichergestellt war.

### **3.1 Prinzip der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)**

Die von Pardue und Gall et al. bzw. John et al erstmals beschriebene Methode ermöglicht es, sowohl RNA als auch DNA -Strangsequenzen mittels Fluoreszenz für das menschliche Auge sichtbar zu machen. Der Mechanismus dieser Technik besteht in

der Basenpaarung der markierten Sonden-DNA mit der komplementären DNA-Zielsequenz in Interphasezellen und Metaphasechromosomen. Mit Antikörpern, die gegen das Markermolekül gerichtet und an einen Farbstoff, Biotin oder Digioxin, gekoppelt sind, kann die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz lokalisiert werden.

### **3.1.1 Verwendete Sonden**

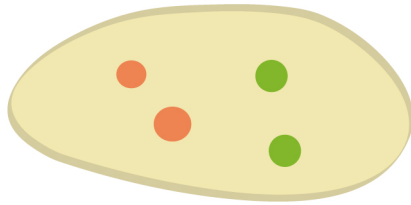
In diesem Projekt wurden Lokus Spezifische Sonden der Firma Vysis für Cyclin D1 bzw. BCR/ABL verwendet um eventuelle Amplifikationen, Deletionen und Translokationen zu untersuchen.

Die LSI Cyclin D1 SO/CEP 11 dual colour Sonde bindet mit roten Signal an den Genort von Cyclin D1 11q13 sowie an das Zentromer (11q11-q11) mit grünem Signal auf Chromosom 11.

Bei der LSI BCR/ABL dual Color Sonde erfolgt die Hybridisierung an Chromosom 22q11.3 (bcr-Region) mit grünem und an Chromosom 9q34 (abl-Oncogen) mit orangenem Signal. Ein eventuelles Fusionsgen zeigt unter dem Fluoreszenzmikroskop ein gelbes Fluoreszenzmuster.

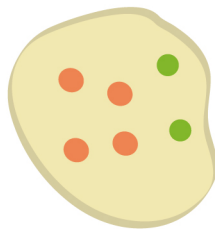
### **3.1.2 Signalmuster**

In den folgenden Graphiken sind sowohl die pathologischen als auch nicht pathologischen Signalmuster dargestellt.



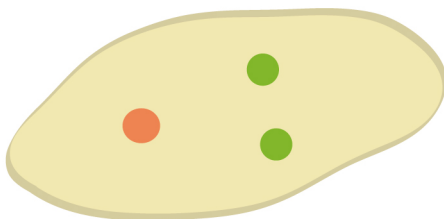
**Abb.5: Fluoreszenzmuster einer normalen Zelle**

Normale Zellen zeigen bei beiden verwendeten Sonden unter dem Fluoreszenzmikroskop jeweils zwei grüne und zwei rote Signale .



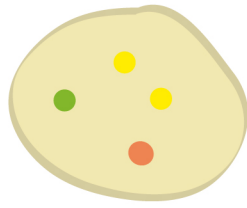
**Abb.6: Amplifikation**

Eine Amplifikation von Cyclin D1 präsentiert sich in Form mehrerer roter Signale bei zumeist unveränderter Anzahl der grünen Zentromersignale



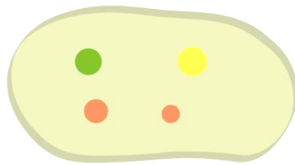
**Abb.7: Deletion**

Im Falle einer Deletion im Bereich des Cyclin D1 Gens, ergibt sich die Konstellation von einem roten und zwei grünen Signal.



**Abb.8: balancierte Translokation**

Bei einer einfach balancierten Translokation t(9; 22) zeigen sich zwei gelbe Fusionspunkte der veränderten Chromosomen 9 und 22, sowie ein grünes und ein orangenes Signal von den normalen Chromosomen 9 und 22.



**Abb.9: Philadelphiachromosom**

Zellen bei der das sog. Philadelphia –Chromosom (t9; 22)(q34; q11.2), vorliegt, zeigen ein grünes (ursprüngliches BCR-Gen), ein größeres (ursprüngliches ABL-Gen) und kleineres orangenes Signal sowie ein Fusionssignal

**3.2 Methodenprotokoll FISH**

Es wurden 4µm dicke Schnitte von jeder in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe des Untersuchungskollektivs auf Super Frost/Plus Objektträgern angefertigt.

Als erstes erfolgte die Entparaffinierung in frischem Xylol (reinst) für 2x 5 Minuten und die Wässerung in 100% EtOH (reinst). Dies diente der Entfernung von Xylolresten, die die Hybridisierungsvorgänge auf Grund ihrer Wasserunlöslichkeit hätten stören können.

Die Objektträger wurden nach der Entparaffinierung für mindestens 10 Minuten luftgetrocknet. In den ausgewählten Präparaten waren Gebiete mit hoher Dichte an LAM-Läsionen per Lichtmikroskop lokalisiert worden um das mit Sonde zu

bedeckende Areal optimal eingrenzen zu können. Mit Hilfe einer Klinge wurde das überflüssige Gewebe vom Objektträger abgeschabt, um nur die vorher ausgewählten Areale behandeln zu können.

Auf die Schnitte wurden jeweils 200 µl handwarmes Natriumisothiocyanat aufgetragen und mit langen Deckgläsern abgedeckt. Dann erfolgte die 30 minütige Inkubation in feuchter Kammer bei 80°C.

Anschließend wurden die Deckgläser vorsichtig abgeschüttelt und die Objektträger kurz in Aqua bidest. gespült. Der Pepsin- Verdau erfolgte mit 200µl Pepsinlösung (80µl Pepsin (100mg/ml)+ 920µl autoklaviertes H<sub>2</sub>O pH 2,0).Wiederum wurden die Schnitte mit langen Deckgläsern abgedeckt und für 30 Minuten bei 38°C inkubiert. Hierbei war auf genaue Zeiteinhaltung zu achten, da eine zu lange Behandlung mit Pepsin eine Veränderung der gewebetypischen Morphologie und damit eine erschwerte mikroskopische Orientierung zur Folge gehabt hätte. Die beschriebene Vorbehandlung mit Natriumisothiocyanat und Pepsin diente zum Aufbrechen der Protein DNA-Komplexe und der Permeabilisierung der Kernmembran.

Nach erfolgter Spülung in Aqua bidest. wurden die Präparate mindestens 10 Minuten luftgetrocknet.

Um die Doppelstrangstrukturen aufzutrennen, wurden die Objektträger 30 Minuten lang auf dem Heizblock bei 80 °C erhitzt. Nach der Denaturierung wurde die je nach Schnittgröße und Menge berechnete Sondenmenge in abgedunkelter Umgebung aufgetragen. Im Vorfeld war darauf zu achten, die Sonde auf Grund ihrer Viskosität rechtzeitig auf Raumtemperatur zu bringen und unter Alufolie vor Licht zu schützen.

Mit vorher passend zugeschnittenen Deckgläsern wurden die Präparate schließlich luftblasenfrei abgedeckt.

In einem weiteren Schritt wurden die mit Sonde behandelten Objektträger 10 Minuten auf dem Heizblock erhitzt, um einerseits die Einzelstrang-DNA mit der Gensonde zu



verbinden und andererseits die Anbindung an unspezifische DNA-Fragmente zu verhindern.

Die Deckgläser wurden mit „Fixogum Rubber Cement“ abgedichtet und die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C.

Am zweiten Tag wurden Fixogum und Deckgläser vorsichtig entfernt und im Anschluss erfolgte die Behandlung der Schnitte mit 0,1xSSC für 3 x 10 Minuten im Wasserbad bei 42°C. Die stringenten Waschvorgänge dienten der Entfernung unspezifisch gebundener DNA-Fragmenten. Nach 5 minütiger Inkubation der Objektträger mit BT-Puffer bei 42°C erfolgte das luftblasenfreie eindecken mit 20µl DAPI-Vectashield, um ein zu schnelles Verblässen der Fluoreszenz zu vermeiden.

Die fertig gestellten Präparate wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

## **4. Untersuchungsmaterial**

### **4.1 Patienten**

Es wurde Lungengewebe von 18 Patientinnen mit primärer pulmonaler Lymphangioliomyomatose bzw. einer tuberösen Sklerose mit Lymphangioliomyomatose untersucht. In n=8 Fällen lagen Folgebiopsien vor, so dass insgesamt n=30 Gewebefractionen untersucht wurden.

Bei 10 Patientinnen bestand eine sporadische LAM, 5 Patientinnen litten unter einer tuberösen Sklerose. Bei drei Patientinnen lagen uns keine entsprechenden klinischen Daten vor.

Das Alter der Patientinnen bei Biopsie lag zwischen 18 und 55 Jahren (n= 37 Jahre +/- 0,5 Jahre). In fünf Fällen lagen hierzu keine Daten vor.

Bei insgesamt 12 Patientinnen wurde im Krankheitsverlauf eine Hormontherapie durchgeführt. Bis auf eine mit Antiöstrogenen behandelte Patientin erhielten alle

Medroxyprogesteronacetat Präparate. Zu sechs Patientinnen wurden keine diesbezüglichen Angaben gemacht.

In zwei Fällen wurde von einer Schwangerschaft berichtet. Sieben der Patientinnen wurden nachweislich nie schwanger. Für eine stattgehabte Schwangerschaft lagen bei den restlichen Fällen keine Daten vor.

Bei 8 Patientinnen wurde eine Lungentransplantation durchgeführt. Davon waren n= 7 Doppellungentransplantationen sowie n=1 einfache Lungentransplantation.

Bei 4 Patientinnen wurden extrapulmonale Manifestationen in Niere, Lymphknoten, Haut und Leber berichtet. In einem Fall wurde eine retroperitoneale Raumforderung festgestellt. Bei sieben Patientinnen traten keine hamartomatösen Organveränderungen auf. Zu sechs Fällen konnten hierzu keine Angaben gemacht werden.

In fünf Fällen wurde unabhängig von der Grunderkrankung ein Uterus myomatosus bzw. Uterusmyome diagnostiziert. Des Weiteren trat bei einer dieser Patientinnen eine Endometriumhyperplasie auf.

In jeweils einem Fall trat ein Melanom, ein Adenokarzinom des corpus uteri, eine Tuberkulose und eine Kardiomyopathie auf. Zudem musste bei einer Patientin unseres Kollektivs ein Mitralklappenersatz vorgenommen werden.

## **4.2 Gewebeproben**

Es wurden 30 Gewebeproben von 18 verschiedenen Patientinnen untersucht. Das Kollektiv umfasste somit Oberlappenbiopsien n=8, beidseitige Lungenexplantate n=7, ein einseitiges Lungenexplantat n= 1, ein Sektionspräparat beider Lungenflügel sowie ortsständiger Lymphknoten n=1, und ein Biopsat einer retroperitonealen LAM-Geschwulst n=1.

## **5. Datenerhebung und –analyse**

### **5.1 Immunhistologie**

Die immunhistochemischen Präparate wurden mit dem Lichtmikroskop bei unterschiedlicher Vergrößerung beurteilt. Die immunhistochemische Reaktion wurde, bei jeweils 200 LAM-Zellen und glatten Muskelzellen ausgewertet und der Prozentsatz positiv reagierender Zellen bestimmt.

Die immunhistologischen Ergebnisse wurden als Median +/- SD ausgedrückt, außer es wurde anders aufgeführt. Es wurden die Mediane bzw. Häufigkeiten der Expressionsmuster von LAM-Zellen und normaler glatter Muskulatur verglichen. Die Ergebnisse der einzelnen Antikörperuntersuchung wurden jeweils untereinander einer Korrelationsanalyse mittels Chi-Quadratstest unterzogen.  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

Die Analyse aller erhobener Daten erfolgte mit SPSS (Superior Performance Software System Vers. 14.0 für Windows, Microsoft, USA).

### **5.2 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)**

Die FISH-Präparate wurden unter einem speziellen Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichen Vergrößerungen ausgewertet. Es wurden jeweils die Signale von 100 LAM-Zellen beurteilt und prozentual angegeben.

Die Resultate der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen wurden als Median+ /SD ausgedrückt, außer es wurde anders aufgeführt. Es wurden die Mediane bzw. die Häufigkeit normaler bzw. pathologischer Signalgebung durch die verwendeten Sonden erhoben. Die Analyse aller erhobener Daten erfolgte mit SPSS (Superior Performance Software System Vers. 14.0 für Windows, Microsoft, USA).

### III. Ergebnisse

#### 1.1 Immunhistologie

Der Prozentsatz positiver Zellen in LAM-Gewebe und glatter, normaler Atemwegsmuskulatur der Lunge wurde bezüglich Median, Mittelwert, Minimum und Maximum statistisch analysiert.

Die Ergebnisse sind unten stehenden **Tabellen 3 und 4** zu entnehmen.

**Tabelle 3: Prozentsatz positiver Zellen in LAM-Gewebe**

<b>Antikörper</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Gültig N=</b>	<b>Fehlend N=</b>
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	0,00	41,00	7,00	12,40	29	1
<b>ER-<math>\beta</math></b>	55,00	92,00	71,00	72,10	30	0
<b>PR</b>	7,00	87,00	59,50	51,61	26	4
<b>p53</b>	0,00	87,00	31,00	32,36	30	0
<b>p38</b>	0,00	86,00	41,00	41,74	27	3
<b>p21</b>	0,00	80,00	38,00	37,32	28	2
<b>p27</b>	0,00	52,00	8,50	11,57	28	2
<b>bcl-2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	30	0
<b>EGFR</b>	5,00	50,00	10,00	15,18	27	3
<b>Ki-67</b>	0,00	3,00	1,00	0,89	28	2
<b>Rb</b>	0,00	14,00	1,00	2,58	29	1
<b>p16</b>	0,00	23,00	0,00	2,03	30	0
<b>CDK2</b>	0,00	5,00	0,00	0,61	26	4
<b>CDK4</b>	0,00	73,00	47,00	47,42	26	4
<b>Cyclin D1</b>	0,00	25,00	3,00	5,93	30	0
<b>Cyclin E</b>	0,00	96,00	2,50	7,45	22	8

**Tabelle 4: Prozentsatz positiver Zellen in glatter, ortsständiger Muskulatur**

<b>Antikörper</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Gültig N=</b>	<b>Fehlend N=</b>
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>ER-<math>\beta</math></b>	27,00	74,00	54,00	51,92	28	2
<b>PR</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>p53</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>p38</b>	0,00	30,00	0,00	1,03	29	1
<b>p21</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>p27</b>	0,00	67,00	0,00	14,25	24	6
<b>bcl-2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>EGFR</b>	1,00	10,00	5,00	4,44	18	12
<b>Ki-67</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	28	2
<b>Rb</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>p16</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>CDK2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>CDK4</b>	0,00	19,00	0,00	0,65	29	1
<b>Cyclin D1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1
<b>Cyclin E</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	29	1

Die Expression der immunhistochemisch dargestellten Zellzykluskomponenten ist in **Tabelle 5** sowohl für die glatte ortsständige Muskulatur der Lunge sowie für das LAM-Gewebe dargestellt.

**Tabelle 5: Vergleich der Expression in glatter, ortsständiger Muskulatur der Lunge bzw. LAM-Gewebe**

<b>Antikörper</b>	<b>%-Satz positiver Zellen in LAM –Gewebe (Mittelwert)</b>	<b>Nachweis in Zellen der glatten Muskulatur</b>
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	12,40	negativ
<b>ER-<math>\beta</math></b>	72,10	positiv; %-Satz positiver Zellen 54,00
<b>PR</b>	51,60	negativ
<b>EGFR</b>	15,18	positiv; %-Satz positiver Zellen 5,00
<b>Cyclin D1</b>	5,90	negativ
<b>Cyclin E</b>	7,45	negativ
<b>CDK2</b>	0,61	negativ
<b>CDK4</b>	17,42	*
<b>p27</b>	11,57	*
<b>p21</b>	37,32	negativ
<b>p16</b>	2,03	negativ
<b>p53</b>	32,36	negativ
<b>p38</b>	41,74	*
<b>Ki-67</b>	0,89	negativ
<b>Rb</b>	2,58	negativ
<b>Bcl-2</b>	negativ	negativ

\* Bei CDK4, p27 und p38 konnten jeweils nur in einem Fall eine positive Expression an glatter, ortsständiger Muskulatur der Lunge festgestellt werden.

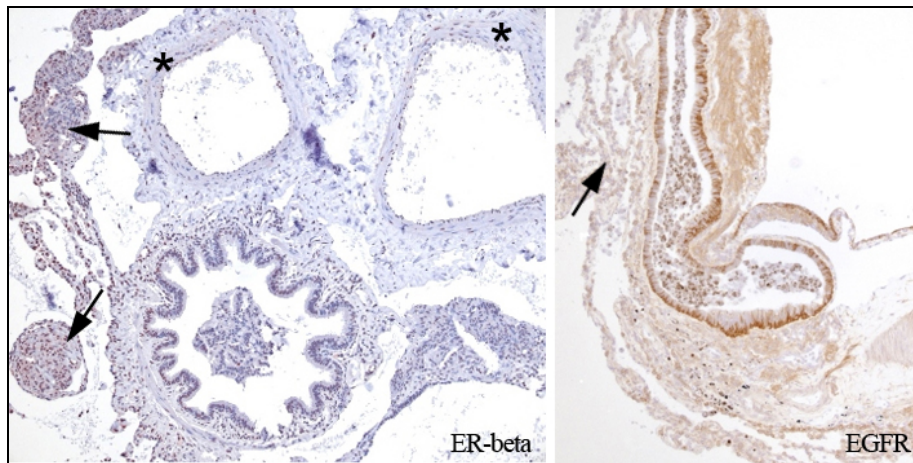
Im Fall von ER- $\beta$  und EGFR konnte eine Expression an der ortständigen glatten Muskulatur beobachtet werden. Bei CDK4, p27, sowie p38 konnte nur in einzelnen Fällen eine positive Reaktion festgestellt werden. Die restlichen Zellzyklusproteine zeigten keine Expression in der glatten Muskulatur. In allen Fällen lagen plausible interne Positivkontrollen vor.

### **1.1.1 Expression der untersuchten Zellzykluskomponenten im Lungenparenchym**

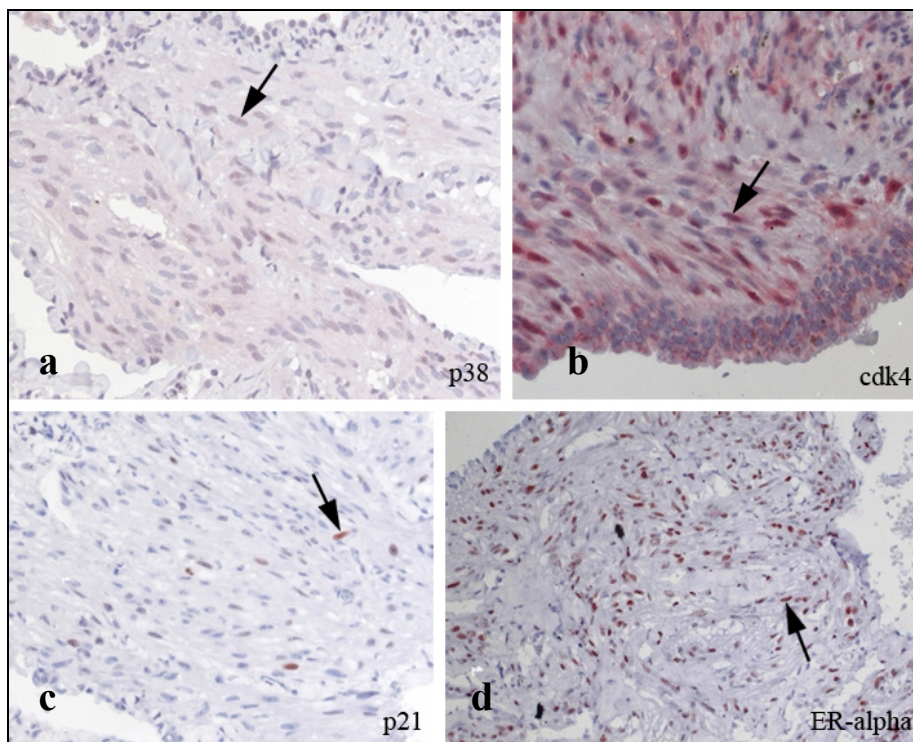
ER- $\alpha$  wurde nur in LAM-Zellen exprimiert, im übrigen Lungenparenchym konnte es nicht nachgewiesen werden.

Alle untersuchten Proteine (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , PR, p27, p21, p16, p53, p38, Rb, Ki-67, Bcl-2, Cyclin D und E, CDK2, CDK4 und EGFR) wurden in Zellen des Bronchialepithels nachgewiesen.

ER- $\beta$ , PR, p27, p21, p16, p53, p38 und Rb wurde in Endothelzellen pulmonaler Gefäße nachgewiesen.



**Abb.9: Expression von ER-beta (links) und EGFR (rechts) in Lungenbiopsien: Sowohl in LAM-Zellen(Pfeil) als auch in glatter Bronchialmuskulatur (\*) ist eine deutliche Reaktion zu erkennen (Vergrößerung 40x)**



**Abb.10: p38, CDK4, p21 und ER- $\alpha$ : Deutliches Expressionsverhalten in spindelförmigen LAM-Zellen (Vergrößerung 100x)**

## **1.2 Korrelationsanalyse**

In der Korrelationsanalyse mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson wurden die einzelnen Antikörper in verschiedene Gruppen eingeteilt, entsprechend ihrer Funktion im Ablauf eines normalen Zellzyklus.

### **1.2.1 Hormonrezeptoren und Zellzyklusregulationsproteine**

Zunächst wurden die vorliegenden Daten auf eine Korrelation zwischen der Expression der Hormonrezeptoren ER- $\alpha$ , - $\beta$ , und Progesteron und den Cyclinen D1 und E in LAM-Gewebe untersucht.

#### **1.2.1.1 Cycline**

Hierbei ergab sich eine Korrelation zwischen der Expression des Progesteronrezeptor (PR) und Cyclin E ( $p < 0.020$ ). Weniger deutlich war die Korrelation zwischen ER- $\alpha$  und Cyclin E mit  $p < 0.067$ .

Es zeigte sich keine Korrelation von Hormonrezeptoren und Cyclin D1 –Expression der LAM-Zellen.

#### **1.2.1.2 Cyclininhibitoren**

Sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  korrelierte mit der p27 Expression ( $p < 0.023$  und  $p < 0.022$ ).

Eine Korrelation zwischen den ebenfalls untersuchten Cyclininhibitoren p16 und p21 zeigte sich nicht.

#### **1.2.1.3 Zellzyklusregulatoren**

Für ER- $\alpha$  und Rb ergab sich eine signifikante Korrelation ( $p < 0.002$ ). Zudem deutete sich eine Korrelation zwischen ER- $\alpha$  und Ki-67 an ( $p < 0.057$ ).

Die Analyse der erhobenen Daten erlaubte keine Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen den einzelnen Hormonrezeptoren.



## **1.2.2 EGFR**

Für den Rezeptor des Wachstumsfaktors EGF wurde eine Korrelation mit CDK4 ( $p < 0.028$ ) sowie Rb ( $p < 0.048$ ) ermittelt. Es ergab jedoch sich kein Hinweis auf eine Korrelation zwischen EGFR und Hormonrezeptorstatus sowie den restlichen untersuchten Zellzyklusregulatoren.

### **1.2.2.1 Cyclininhibitoren**

Die Untersuchung der Expression von Cyclinen und deren Inhibitoren zeigte eine Korrelation von Cyclin D1 mit sowohl p16 ( $p < 0.037$ ) und p21 ( $p < 0.049$ ) als auch mit p27 ( $p < 0.058$ )

### **1.2.2.2 Zellzyklusregulatoren**

Im Bezug auf die weiteren untersuchten Komponenten des Zellzyklus ergab sich ein Hinweis auf eine Korrelation zwischen Cyclin D1 und p38 mit ( $p < 0.037$ ).

### **1.2.2.3 Cycline und cyclinabhängige Kinasen**

Es konnte weder eine Korrelation zwischen den untersuchten Cyclinen D1 und E noch zwischen CDK2 und 4 festgestellt werden.

## **1.2.3 Cyclinabhängige Kinasen**

CDK4 zeigte eine hochsignifikante Korrelation mit p38 ( $p = 0.0001$ ). Zudem ergab sich eine Korrelation zwischen CDK2 und Ki-67 mit ( $p < 0.039$ )

## **1.2.4 Cyclininhibitoren**

Innerhalb der Gruppe der Cyclininhibitoren ergab sich eine deutliche Korrelation zwischen p27 und p16 mit  $p < 0.006$

### **1.2.5.1 Cycline und abhängige Kinasen**

Des Weiteren korrelierte p27 mit CDK4 mit  $p < 0.019$ . Es konnten jedoch keine weiteren Korrelationen zwischen den untersuchten Cyclininhibitoren und den Cyclin abhängigen Kinasen festgestellt werden.

### **1.2.5.2 Zellzyklusregulatoren**

Sowohl für die Expression von Ki-67 ( $p < 0.002$ ), Rb ( $p < 0.002$ ) als auch für p38 ( $p < 0.011$ ) ergab sich ein Hinweis auf eine Korrelation mit der Expression von p27.

Darüber hinaus zeigte sich eine Korrelation zwischen p16 und p38 ( $p < 0.013$ ) sowie p16 und p53 mit  $p < 0.008$ ).

Für die restlichen untersuchten Proteine des Zellzyklus ergab sich ein Hinweis auf eine Korrelation zwischen Ki-67 und p38 mit  $p < 0.010$ . Zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen Rb und p53 mit  $p < 0.029$  sowie Rb und p38 ( $p < 0.058$ ).

**Tabelle 6 :Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse**

<b>ER-<math>\alpha</math></b>	<b>p27</b>	<b>p&lt; 0,023</b>
	<b>Rb</b>	<b>p&lt; 0,002</b>
<b>ER-beta</b>	<b>p27</b>	<b>p&lt; 0,022</b>
<b>PR</b>	<b>Cyclin E</b>	<b>p&lt; 0,020</b>
<hr/>		
<b>EGFR</b>	<b>CDK4</b>	<b>p&lt; 0,028</b>
	<b>Rb</b>	<b>p&lt; 0,048</b>
<hr/>		
<b>p38</b>	<b>Cyclin D1</b>	<b>p&lt; 0,037</b>
	<b>p27</b>	<b>p&lt; 0,011</b>
	<b>p16</b>	<b>p&lt; 0,013</b>
	<b>CDK4</b>	<b>p&lt; 0,001</b>
	<b>Ki-67</b>	<b>p&lt; 0,010</b>
<hr/>		
<b>Cyclin D1</b>	<b>p16</b>	<b>p&lt; 0,037</b>
	<b>p21</b>	<b>p&lt; 0,049</b>
<hr/>		
<b>p27</b>	<b>p16</b>	<b>p&lt; 0,006</b>
	<b>CDK4</b>	<b>p&lt; 0,019</b>
	<b>Ki-67</b>	<b>p&lt; 0,002</b>
	<b>Rb</b>	<b>p&lt; 0,002</b>
<hr/>		
<b>p53</b>	<b>p16</b>	<b>p&lt; 0,008</b>
	<b>Rb</b>	<b>p&lt; 0,029</b>
<b>CDK2</b>	<b>Ki-67</b>	<b>p&lt; 0,039</b>

## **2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Die Untersuchung von 18 ausgewählten Präparaten lieferte im Falle von Cyclin D1 keinen Anhalt für eine Amplifikation oder Deletion des Cyclin D1 Genes. Die in wenigen Zellen gefundenen Signalvermehrungen und Verluste können durch Schnittartefakte erklärt werden.

Des Weiteren ergab sich kein Hinweis auf das eventuelle Vorliegen von Philadelphia Chromosom positiven LAM-Zellen oder einer balancierten Translokation im Bereich der Gene BCR und ABL.

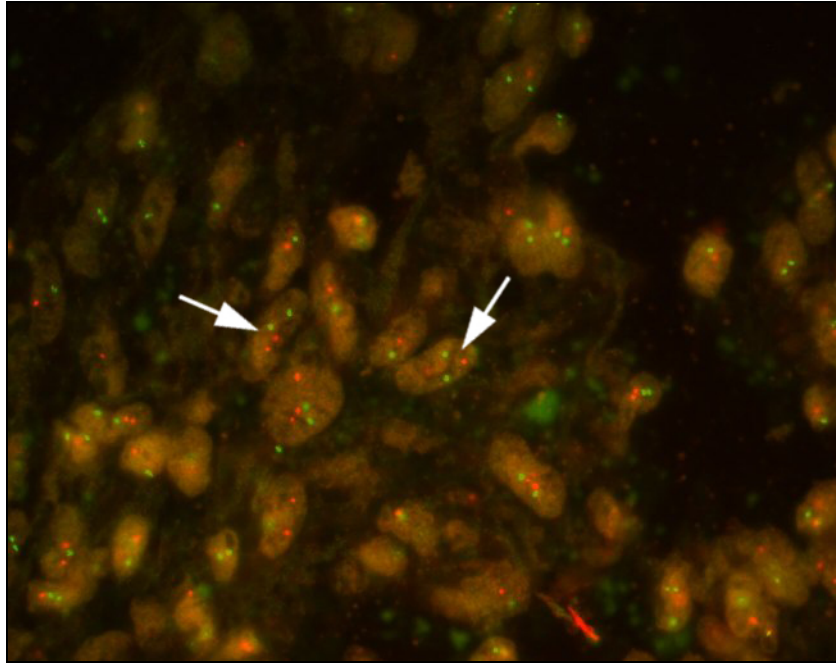
Bei den Untersuchungen mit der BCR-ABL Sonde konnten zwei Fälle auf Grund eines Konservierungsfehlers am Originalpräparat nicht mehr ausgewertet bzw. untersucht werden.

**Tabelle 7: Cyclin D1**

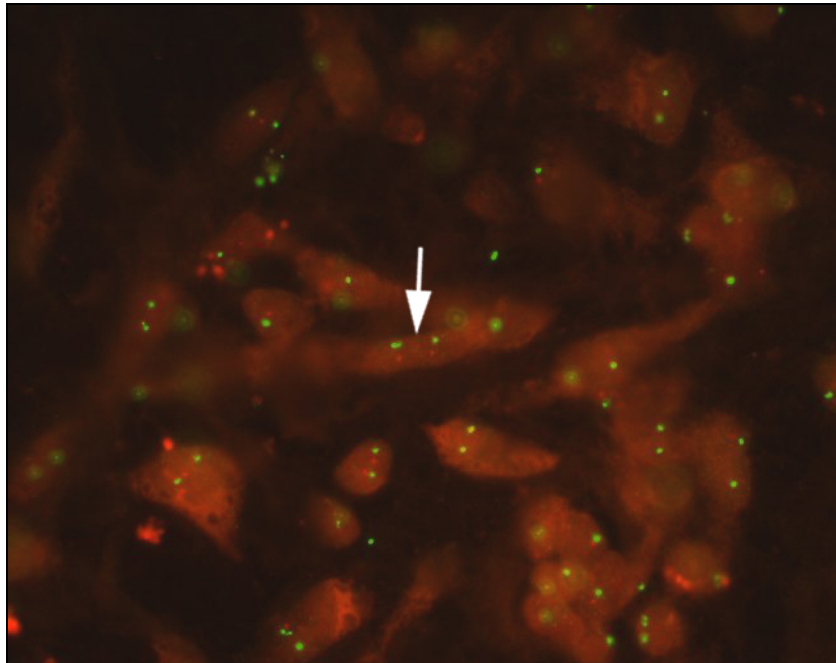
	Signal 2/2	Signal 1/2 (Deletion)	Signal 3/2 (Amplifikation)	Sonstige
<b>N Gültig</b>	18	18	19	18
<b>Fehlend</b>	12	12	11	12
<b>Mittelwert</b>	96,61	1,55	0,21	1,66
<b>Median</b>	97,00	1,00	0,00	1,00
<b>Minimum</b>	92,00	0,00	0,00	0,00
<b>Maximum</b>	100,00	7,00	2,00	5,00

**Tabelle 8: BCR-ABL**

	Signal 2/2	Signal 1/1/2 Balancierte Translokation	Signal 2/1/1 Philadelphia- Chromosom	Signal 3/2 Amplifikation	Signal 1/2 Deletion	Sonstige
<b>N Gültig</b>	16	16	16	16	16	16
<b>Fehlend</b>	14	14	14	14	14	14
<b>Mittelwert</b>	98,93	0,00	0,00	0,0625	0,56	0,50
<b>Median</b>	99,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Minimum</b>	97,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Maximum</b>	100,00	0,00	0,00	1,00	3,00	2,00



**Abb.11: BCR-ABL:  
nicht pathologisches 2/2 Expressionsmuster in LAM-Zellen  
(100x Vergrößerung, grünes Signal BCR, rotes Signal: ABL)**



**Abb.12: Cyclin D1:  
nicht pathologisches 2/2 Expressionsmuster in LAM -Zellen  
(100xVergrößerung; grünes Signal: Zentromer rotes Signal: Cyclin D1)**

## **IV. Diskussion**

Auf den folgenden Seiten wird zunächst das Expressionsmuster der untersuchten Hormonrezeptoren bzw. der verschiedenen untersuchten Zellzyklusproteine mit besonderem Schwerpunkt auf der zentralen Rolle von Rb und der assoziierten Signalwege für den Ablauf eines Zellzyklus diskutiert werden. Die p38 MAP Kinase mit sowohl proliferativer als auch antiproliferativer Wirkung und eventuelle Wechselwirkungen mit anderen Zellzyklusproteinen (Cyclin D1) in LAM-Zellen werden Thema sein. Auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie p27 in LAM-Zellen wird ebenfalls eingegangen werden.

### **1. Expression von Hormonrezeptoren in LAM-Läsionen**

#### **1.1 Allgemeines**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Östrogenrezeptoren vom Typ  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) und  $\beta$  (ER- $\beta$ ) sowie des Progesteronrezeptors (PR) in LAM-Gewebe sowie der ortständigen Muskulatur der Lunge immunhistochemisch untersucht.

In den untersuchten LAM-Läsionen zeigte sich eine Expression beider Östrogenrezeptorsubtypen. Jedoch wurde ER- $\beta$  wesentlich stärker exprimiert als ER- $\alpha$  und zeigte zusätzlich in Zellen des Alveolarepithels, in Zellen pulmonaler Gefäße sowie an der ortständigen Muskulatur der Lunge eine deutliche Expression.

ER- $\alpha$  hingegen wurde in dieser Studie ausschliesslich in LAM-Zellen nachgewiesen.

In der ortständigen Muskulatur sowie in normalem Lungengewebe zeigte sich in unserem Kollektiv keine Expression.

Auch der Progesteronrezeptor wurde in mehreren pulmonalen Zelltypen und in LAM-Zellen exprimiert.

Die untersuchten Hormonrezeptoren vermitteln die nicht nur im Rahmen der Reproduktionsphysiologie wichtige Wirkung von Östrogen und Progesteron für Wachstum und Zelldifferenzierung. Sie sind im Zellkern lokalisiert und werden durch Liganden aktiviert. Gleichzeitig wirken sie als Transkriptionsfaktoren: Durch die Bindung des jeweiligen Hormons als Ligand löst sich der Rezeptor von den ihn im Zytosol haltenden Proteinen und wandert als Komplex in den Kern, wo er direkt an die DNA bindet und den Beginn der Transkription sowie die Genexpression beeinflussen kann.

## **1.2 Struktur der Östrogenrezeptoren**

Östrogenrezeptoren lassen sich generell in zwei unterschiedliche Subtypen, ER- $\alpha$  und  $\beta$ , mit zahlreichen Isoformen und Splicevarianten gliedern. Analog befinden sich die für ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  kodierenden Gene auf verschiedenen Chromosomen, Chromosom 6 und 14q22-24.

ER- $\alpha$  und - $\beta$  gehören also derselben Rezeptorfamilie an, unterscheiden sich jedoch sowohl in ihrer Chromosomenlokalisierung als auch in ihrer Ligandenbindungsstelle, was unter anderem eine unterschiedliche Affinität der Liganden für die einzelnen Rezeptortypen zur Folge hat. So bindet das  $17\alpha$ -Estradiol oder das diesen Rezeptor regulierende Raloxifen mit höherer Affinität an den Östrogenrezeptor vom Typ  $\alpha$ . Auf der anderen Seite zeigen mehrere Umweltgifte wie z. B. Alkylphenole eine höhere Affinität für den Östrogenrezeptor  $\beta$  [24].

Die wichtigsten strukturellen Komponenten beider Rezeptorsubtypen sind die ligandenbindende (E Domäne) und die DNA bindende Domäne (C-Domäne). Diese bindet mit hoher Affinität und Spezifität an die Östrogen responsiven Elemente der DNA in der Promoterregion der Zielgene. Zu 95% stimmen ER- $\alpha$  und  $\beta$  in der Struktur der an die DNA bindenden Domäne überein, wohingegen bei der

ligandenbindenden Domäne nur 50% strukturelle Übereinstimmung besteht. Zusätzlich besitzen ER- $\alpha$  und  $\beta$  zwei Regionen (activated functions AF), die für die Steigerung der Transkriptionsaktivität, verursacht durch die Bindung des Rezeptors, verantwortlich sind. AF-1 agiert ligandenunabhängig wohingegen AF2, die auch in der ligandenbindenden Domäne lokalisiert ist, ligandenabhängig ist.

Ein Hinweis für eine mögliche unterschiedliche Funktion der beiden Östrogenrezeptoren liefert die Tatsache, dass sich beide in der Struktur der ligandenunabhängigen Domäne AF1 unterscheiden [28].

### **1.3 Struktur des Progesteronrezeptors**

Wie bereits erwähnt ist auch der Progesteronrezeptor ein Mitglied der Steroidhormonrezeptorfamilie, der analog zu der bei ER- $\alpha$  und  $\beta$  beschriebenen Weise aktiviert wird und seine Wirkung entfaltet. Es lassen sich ebenfalls zwei, in ihrer Struktur fast identische Subtypen des Progesteronrezeptors unterscheiden. Der Progesteronrezeptor vom Typ B (PRB) besitzt im Gegensatz zum Typ A (PRA) am N-Terminus 164 Aminosäuren mehr, wodurch sich die noch nicht vollständig verstandene deutlich divergierende Funktions- und Wirkungsweise dieser fast identisch strukturierten Rezeptorentypen erklären ließe. Im Gegensatz zu der unterschiedlichen Genlokalisierung der beiden Östrogensubtypen sind PRA und PRB auf demselben Chromosom, 11q22 kodiert [29].

### **1.4 Allgemeines Expressionsmuster des Progesteronrezeptors**

Im Gegensatz zu den Östrogenrezeptoren zeigen PRA und PRB ein identisches Expressionsmuster in ihren Zielorganen. In dieser Studie kam daher ein Antikörper, der nicht zwischen den Subtypen unterschied zur Anwendung.



Die Progesteronrezeptoren werden hauptsächlich in den progesteronsensiblen Geweben, wie dem Endo-und Myometrium des Uterus und den Granulosazellen und des Corpus Luteum im Ovar exprimiert. Das Hormon ist sowohl für die Entstehung als auch für die Erhaltung einer Schwangerschaft verantwortlich. Zudem hat Progesteron einen Einfluss auf die Modulation der Knochenmasse und spielt damit eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Osteoporose.

Sowohl in normalen Brustdrüsenzellen als auch in Mammakarzinomen sind beide Progesteronrezeptortypen exprimiert. Unter physiologischen Umständen wird das Vorherrschen eines Progesteronrezeptorsubtyps z.B. im Stromagewebe des Uterus (PRA) sowie in den epithelialen Drüsenzellen in der sekretorischen Phase des Menstruationszyklus, wo hauptsächlich PRB exprimiert wird, beobachtet. Zudem werden PRA und PRB physiologischerweise im Gehirn, dem Thymus, Gefässendothelien sowie in der Lunge exprimiert [29].

### **1.5 Expressionsverhalten und Funktion der Östrogenrezeptoren in verschiedenen Gewebetypen**

Das immunohistochemische Expressionsverhalten von ER- $\alpha$  und- $\beta$  unterscheidet sich in normalem und pathologisch verändertem Gewebe, was sich gut durch folgendes Beispiel veranschaulichen lässt: in der Plazenta wird ER- $\beta$  im Syncytiotrophoblasten exprimiert wohingegen ER- $\alpha$  ausschliesslich im Cytotrophoblasten vorgefunden wird [30].

In vielen nicht pathologisch veränderten Organen und Geweben wie zum Beispiel den grossen Gefässen, der Blase, der Mamma und dem Ovar werden beide Rezeptoren in allen Zelltypen, z.B. glatter Muskulatur und Epithelzellen vorgefunden. Im Gefässsystem hat Östrogen antiarteriosklerotische, antiinflammatorische Wirkung. ER- $\alpha$  scheint für die Östrogenwirkung an Gefässen

jedoch hauptverantwortlich zu sein, wohin die Rolle der ER- $\beta$  Expression noch geklärt werden muss [31].

In allen Organen des Körpers, mit Ausnahme der Prostata, die ausschließlich eine zytoplasmatische Expression von ER- $\beta$  aufweist, konnte das Vorkommen beider Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden. Innerhalb der einzelnen Zellschichten können jedoch Unterschiede im Expressionsmuster beobachtet werden. So konnte im Drüsengewebe des Endometriums, in Hepatozyten und im Hippocampus das ausschliessliche Vorkommen von ER- $\alpha$  gezeigt werden [32].

Die unterschiedliche Funktion der beiden Östrogenrezeptortypen lässt sich nicht nur anhand ihrer Struktur und ihres Expressionsverhalten verdeutlichen. In Endometriumkarzinomzellen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ER- $\alpha$  mit einer Proliferation und einem Tumorzellwachstum assoziiert ist [33, 34], wohingegen die Aktivierung von ER- $\beta$  proapoptotische, antiproliferativen Wirkung in Mammakarzinomzellen führt [35]. Dies wird durch das Anhalten der G2-Phase des Zellzyklus vermittelt und führt zu verminderter Expression von Cyclin D1, Cyclin E und erhöhter Expression von p27 und p21 [36]. Zusammenfassend kann ER- $\alpha$  als Tumorpromoter und ER- $\beta$  als Tumorsuppressor bezeichnet werden.

### **1.6 Expression der Hormonrezeptoren in LAM-Läsionen**

Die Expression von Östrogen und Progesteronrezeptoren ist auch für die pulmonale Lymphangioliomyomatose beschrieben [37].

Bonetti et al etablierten eine Klassifikation der LAM-Zellen, die zwischen epitheloiden (HMB 45 positiv) und spindelförmigen LAM-Zellen (PCNA positiv) unterscheidet. Studien deuten darauf hin, dass eine Expression von ER- $\alpha$  und PR eher in epitheloiden, HMB 45 positiven, also nicht stark proliferierenden LAM-Zellen vorliegt [38], [39].

In Angiomyolipomen, deren Auftreten mit der tuberösen Sklerose bzw. der pulmonalen Lymphangioliomyomatose vergesellschaftet ist, wurde die Expression beider Östrogen- und des Progesteronrezeptors gezeigt. Hier wurde in Angiomyolipomen unterschiedlicher histologischer Klassifikation, eine Expression von ER- $\beta$  beobachtet. Eine Expression von ER- $\alpha$  und des Progesteronrezeptors in tuberösen Sklerose assoziierten Angiomyolipomen, ist mehrfach beschrieben worden [40], [41].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass in pulmonalen LAM Läsionen ebenfalls eine Expression aller genannten Hormonrezeptoren zu beobachten ist.

Im Bezug auf die Expression von ER- $\alpha$  wurde jedoch deutlich, dass dieser Hormonrezeptorsubtyp, im Gegensatz zu ER- $\beta$  und Progesteron ausschliesslich an LAM-Zellen und nicht an anderen pulmonalen Zelltypen immunhistochemisch exprimiert wurde.

Eine Studie von Al Azzawi et al wies zwar eine Expression von ER- $\alpha$  in ortsständiger glatter Muskulatur nach, dennoch muss bemerkt werden, dass dies nicht an pathologisch verändertem humanem Lungengewebe sondern in Ratten gezeigt wurde [42].

Die ausschliessliche Expression von ER- $\alpha$  in LAM-Zellen könnte ein weiterer Hinweis für eine hormonell getriggerte Pathogenese der LAM sein. Zudem könnte dies den immunhistochemischen Nachweis des Östrogenrezeptors vom Typ  $\alpha$  zu einem weiteren nützlichen Mittel in der Diagnostik, neben Vimentin, Desmin und  $\alpha$ -smooth muscle actin, der pulmonalen Lymphangioliomyomatose machen.

## **2. Expression von Zellzyklusproteinen in LAM-Zellen**

### **2.1 Das Rb-Protein - Allgemeines**

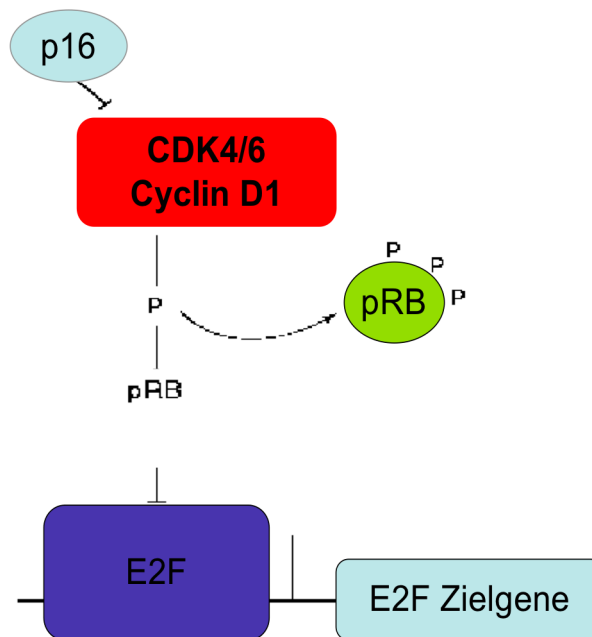
In den in dieser Studie untersuchten LAM- Zellen zeigte sich eine erniedrigte Expression des Rb Proteins.

Das Retinoblastomagen bzw. sein Genprodukt das Rb –Protein ist der erste entdeckte Tumorsuppressor des Zellzyklus. Rb spielt sowohl bei der Zellzyklusregulation als auch bei der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle.

Rb ist ein Schlüsselprotein, das im Zusammenspiel mit Cyclinen und Cyclinabhängigen Kinasen (CDK) den Restriktionspunkt zwischen früher G1 –Phase und später G1 /S-Phase reguliert.

Im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F verhindert Rb die Progression des Zellzyklus, indem es die Transkription von S-Phase spezifischen und für die DNA Synthese wichtigen Genen unterdrückt. Zusätzlich verhindert das Rb- Protein den Wiedereintritt von ruhenden Zellen in den Zellzyklus.

Eine niedrige Expression des Proteins spricht in vielen Tumoren, für eine Störung und ein unkontrolliertes Fortschreiten des Zellzyklus. Immunhistologisch Rb negative Mammakarzinome proliferieren eher und sind mit einem schlechten Überleben assoziiert [43].



**Abb. 12. Erster Phosphorylierungsschritt von Rb**

## 2.2 Der Restriktionspunkt – Regulation durch Rb

Die G1 Phase des Zellzyklus wird durch den sogenannten Restriktionspunkt in zwei Hälften geteilt.

Die erste Hälfte, mit einer konstanten Dauer von 3-4 Stunden, erstreckt sich vom wachstumsfaktorabhängigen postmitotischen Intervall bis zum Restriktionspunkt. Darauf folgt ein wachstumsfaktorunabhängiger, der S-Phase vorangehender Zeitraum, der unterschiedlich lange dauern kann. Je nach Zellzyklusphase unduliert der Phosphorylierungsstatus des Rb-Proteins und entscheidet über Fortschritt oder Stillstand der Zellteilung. In der späten G1- Phase wird Rb durch den Komplex aus Cyclin D1 und CDK4 hyperphosphoryliert. Dies ist der erste Schritt zur Inaktivierung der Funktion von Rb als Tumorsuppressor. Eine weitere Phosphorylierung und damit die Freisetzung von E2F aus der Bindung mit Rb erfolgt durch den Komplex aus Cyclin E und CDK2. Die Zelle schreitet im Zellzyklus fort [20].

## **2.3 Erniedrigte Rb Expression in LAM-Zellen**

Die möglichen Ursachen der veränderten Expression des Rb Proteins sind vielfältig.

Die niedrige Expression von Rb könnte auf einen Funktionsverlust als Tumorsuppressor, entweder funktionell oder auf Genebene hindeuten, und macht deutlich, dass in LAM-Zellen ebenso wie in nahezu 90 % aller Lungentumore, unabhängig des histologischen Subtyps eine Veränderung der Rb Signalkaskade vorliegen könnte.

### **2.3.1 p16**

Die Rb Signalkaskade wird durch weitere Zellzyklusregulatoren gesteuert. Die Funktion der Komplexe aus Cyclin/CDK ist durch das Rb-Protein eng verknüpft, und wird durch spezifische Inhibitoren reguliert. So wird z.B. die Aktivität des Komplexes aus CDK4/6/Cyclin D1 durch den CDK Inhibitor aus der INK 4 Familie, p16 gesteuert.

Die Signalkaskade Rb/Cyclin D1/p16 ist in nahezu allen Lungentumoren inaktiviert oder verändert [44].

In pulmonalen Karzinomen konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung, egal auf welcher Stufe der Rb Signalkaskade, ähnliche Auswirkungen auf eine Zelle hat wie der alleinige Verlust der Rb-Funktion. Die Zelle wird in der Folge unempfindlich für mitogene Signale.

P16 wirkt als Inhibitor, der die Formierung des Komplexes aus Cyclin D1 und CDK4 /6 hemmt. In den untersuchten LAM-Zellen zeigte sich im Bezug auf p16 und Rb eine ähnlich niedrige Expression von p16 wie von Rb. In kleinzelligen Lungenkarzinomen liegt in 90% eine Inaktivierung des Rb Proteins vor, wohingegen eine Inaktivierung von p16 durch verschiedene Mechanismen wie Deletion, Translokation, chromosomale Inversionen oder Hypermethylierung in bis zu 60 % aller nicht kleinzelligen Lungentumoren vorliegt. Durch immunhistochemische Untersuchung kann nicht

festgestellt werden, welches der beiden Proteine in der LAM für die ursächliche Störung des Rb-Signalweges verantwortlich sein könnte.

Eine Deletion beider Tumorsuppressoren ist unwahrscheinlich, da eine solche noch nie nachgewiesen wurde [45].

Jedoch legen diese Ergebnisse ebenso wie in Lungentumoren eine Störung der Rb-Signalkaskade in LAM-Zellen nahe.

### **2.3.2 Cyclin D1/CDK4**

Die Bildung des Komplexes aus Cyclin D1 und CDK4 und 6, der für den ersten inaktivierenden Phosphorylierungsschritt von Rb verantwortlich ist, wird ebenfalls durch p16 gehemmt. Auf Grund der erniedrigten p16 Expression in LAM-Zellen wäre daher eine erhöhte Expression von Cyclin D1 und CDK4/ 6 zu erwarten. Es zeigte sich jedoch nur eine mässige Expression von Cyclin D1 wohingegen die Expression von CDK4 jedoch deutlich erhöht war.

Cyclin D1 ist ein essentielles Zellzyklusregulationsprotein. Eine Überexpression wird, mit divergierendem Expressionsmuster je nach Subtyp, unter anderem auch in Lungentumoren beobachtet. Die häufigste Ursache für eine Überexpression von Cyclin D1 ist eine Amplifikation auf Genebene. In unserer Studie konnte jedoch mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) nachgewiesen werden, dass in LAM-Zellen keine Amplifikation, bzw. Deletion des Cyclin D1 Proteins vorliegt.

In Lungentumoren kann eine defekte Funktion von CDK4 für eine Störung des Rb Signalweges verantwortlich gemacht werden. In 40-60% der Lungentumoren wird eine erhöhte Expression von CDK4 beschrieben. In seltenen Fällen ist eine Amplifikation hierfür verantwortlich. Auch in LAM-Zellen weist das immunhistochemische Expressionsmuster auf eine Dysfunktion von CDK4 hin.

Ob die Überexpression von CDK4 jedoch die alleinige Ursache für die in LAM –Zellen möglicherweise vorliegende Störung des Rb Signalweges ist, und auf Grund eines eventuellen p16 Verlusts akkumuliert, kann allein durch immunhistochemische Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Die deutliche Expression von CDK4, sowie die normale Expression von Cyclin D1, sprechen gegen einen alleinigen Effekt eines p16 Mangels. In diesem Fall wäre ebenfalls eine erhöhte Cyclin D1 Expression zu erwarten. Die deutliche Expression von CDK4 könnte durch ein fehlendes suppressives Signal oder durch eine Akkumulation zu erklären sein.

Zudem wurde in LAM-Zellen eine hochsignifikante Korrelation der Expression von p38 MAP Kinase und CDK4 nachgewiesen. Dies könnte mit der bereits diskutierten negativen Regulation von Cyclin D1 durch p38 in Zusammenhang stehen, obwohl eine ebenfalls erniedrigte Expression von CDK4 zu erwarten wäre.

Die p38 MAP Kinase wird bei Stimulation durch FAS, eines Apoptose vermittelten Signalstoffes, aktiviert und führt zu einer direkten, von Cyclinen und assoziierten CDKs abhängigen Phosphorylierung und damit zu einer Inaktivierung von Rb [46].

Hier für würde die niedrige Expression von Cyclin D1, Cyclin E und CDK2 in LAM-Zellen sprechen, jedoch nicht die deutliche Expression von CDK4. Zudem zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von p38 MAPK und der Expression von Rb.



## 2.4 ER- $\alpha$ und Rb Expression

Eine Expression des ER- $\alpha$  Rezeptors wurde in den in dieser Studie untersuchten LAM – Zellen nachgewiesen. Die Expression von ER- $\alpha$  korrelierte mit der Expression von Rb. Zudem zeigte sich eine fehlende p16 Expression.

In einem von Clements et al entworfenen Xenograftmodell immortalisierter Angiomyolipomzellen, konnte Wachstum durch eine Östrogenbehandlung induziert werden. Auch ist eine Inaktivierung von Tuberin bzw. Aktivierung von mTor durch Östrogene in Mammakarzinomzellen beschrieben [47]. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass eine Östrogenstimulation die pulmonale Metastasierung von TSC<sup>-/-</sup> LAM-Zellen fördert [12].

In ER- $\alpha$  positiven Mammakarzinomzelllinien wurde durchgehend ein Verlust von p16 beschrieben, was über eine gestörte CDK/Cyclin Aktivität auch zu einer funktionellen Inaktivierung von Rb führen würde.

Die niedrige Expression der Cyclin D und E, der CDK2 sowie von Rb und p16 könnte also als Folge einer Östrogenstimulation in LAM-Zellen mit defekter Funktion von TSC 2 bzw. Tuberin interpretiert werden.

In Zellkulturen mit Angiomyolipomzellen wird nicht über eine Aktivierung von p38 MAP-Kinase durch Östrogenstimulation, sondern über eine Phosphorylierung von AKT berichtet [48]. Es kann also angenommen werden, dass das östrogenvermittelte Wachstum von Angiomyolipomzellen durch diese Signalkaskade und nicht durch eine Aktivierung von p38 MAP Kinase vermittelt wird.

Die fehlende Korrelation zwischen der Expression von p38 MAP Kinase und der Expression der Östrogenrezeptoren Er- $\alpha$  und  $\beta$  unterstützt diese Ergebnisse und deutet wiederum eher auf eine inhibitorische Wirkung der p38 MAP Kinase hin.

## 2.5 EGFR Expression in LAM- Zellen

Interessanterweise zeigte sich in den untersuchten LAM- Zellen eine höhere Expression von EGFR als in glatter ortsständiger Muskulatur. Zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), CDK4 sowie der Expression von Rb.

EGFR ist eine Tyrosinkinase Rezeptor der Erb-Familie. Durch Ligandenbindung kommt es zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden wie PI3/AKT und der Raf/Ras/MAPK Kaskade zur Regulation von Zellüberleben und Proliferation.

In TSC<sup>-/-</sup> Angiomyolipomzellen ist für das Wachstum dieser Zellkulturen die Anwesenheit von EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Tumorsuppressors Tuberin für diese Abhängigkeit verantwortlich ist [49].

In einer Vielzahl von Karzinomen (HNO-Tumoren und colorektale Karzinome) spielt der EGFR Signalweg eine Rolle und wird als Angriffspunkt für eine gezielte Therapie verwendet.

Die Studie von Lesma et al machte deutlich, dass in TSC<sup>-/-</sup> Zellen die Gabe von EGFR-Antikörpern eine Signalkaskade mit direktem Einfluss auf ERK und Tuberin blockiert, und, ähnlich wie Rapamycin, das direkt inhibitorisch auf m TOR wirkt, zu einem reduzierten Wachstum dieser TSC<sup>-/-</sup> Zellen führt.

Zudem kommt es durch Gabe des EGFR-Antikörpers zu einem Anstieg der Expression von p27, einem besonders in ruhenden Zellen exprimierten Inhibitor der Cyclin/CDK Komplexe. Auch wurde bei Gabe von Erlotinib (Tyrosinkinaseinhibitor) eine Hemmung der Phosphorylierung von Rb beobachtet [50].

In LAM-Zellen zeigte sich eine mässige, jedoch innerhalb der LAM-Proliferate stark schwankende Expression (örtliche Expression in bis zu 50% der Zellen) von EGFR. im Vergleich dazu zeigte sich in glatter ortständiger Muskulatur eine niedrige Expression.

In den untersuchten Zellen ist eine Dysfunktion von Tuberin bzw. TSC2 anzunehmen und könnte so die stärkere Expression von EGFR an LAM-Zellen im Vergleich zu glatter ortsständigen Muskulatur erklären.

Die Korrelation zwischen der Expression von EGFR in LAM-Zellen und CDK4 und Rb lässt, unter der Voraussetzung das in den untersuchten Zellen ein Tuberin nicht vorhanden ist oder eine verminderte Funktion vorliegt, einen Einfluss des Wachstumsfaktors auf diese Signalkaskade vermuten und könnte die Veränderungen der Rb/ p16/ CDK4 Kaskade erklären.

## **2.6 p53- Wächter des Genoms**

Ein weiteres wichtiges Zellzyklusregulationsprotein ist p53, das in dieser Studie eine Expression von 31% in LAM-Zellen zeigte.

Das für dieses Protein kodierende Gen ist das am häufigsten mutierte in humanen Tumoren. 50 % aller Tumoren zeigen einen Verlust oder ein inaktives, mutiertes p53 Protein. In normalen Zellpopulationen ist p53 funktionell inaktiv und nur niedrig exprimiert, da es durch die MDM Ubiquitin Ligase sehr schnell abgebaut wird. Jede Form von Stresstimulus, vor allem DNA- Schädigungen aber auch z. B Hypoxie führen zur Aktivierung von p53, z. B. auch über Vermittlung der p38 MAP Kinase [50, 51].

Auch am schon vorher angesprochenen Restriktionspunkt des Zellzyklus, an dem die Zelle endgültig in den Zellzyklus eintritt, spielt p53 eine wichtige Rolle. An diesem Übergang zwischen G1 und S-Phase ist bei Vorliegen eines DNA-Schadens, ein

funktionierendes p53 Protein nötig um den Zellzyklus anzuhalten. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung von p21, einem Inhibitor der CKIs, was die Replikation geschädigter DNA verhindert [21].

p53 hat einen entscheidenden Einfluss auf die weiter oben beschriebenen Rb-Signalkaskade. Bei p53 Aktivierung durch genotoxische Stressstimuli verhindert es die Phosphorylierung des Rb-Proteins und nimmt so Einfluss auf das Anhalten des Zellzyklus, um eine DNA Reparatur zu gestatten oder die Zelle über den sogenannten BAX- Bcl -2 Signalweges in die Apoptose zu führen.

Der Verlust von p53 durch verschiedenste Mechanismen führt zur einem Kontrollverlust über den Restriktionspunkt und auch zu einem Verlust der Apoptosefunktion einer Zelle, was im Endeffekt zu unkontrollierten Zellwachstum führt [52].

In den in dieser Studie untersuchten LAM-Zellen zeigte sich eine Expression von 31%, jedoch nur mit schwacher Färbeintensität.

In glatter, ortsständiger Muskulatur konnte keine Expression von p53 gezeigt werden.

In Lungentumoren ist sehr häufig eine Mutation von p53 zu beobachten. Meistens zeigt sich eine Akkumulation von p53 im Zellkern. Falls mehr als 20% der Zellen eine Akkumulation von p53 zeigen ist sehr wahrscheinlich von einer Mutation auszugehen [53].

Diese Ergebnisse könnten daraufhin deuten, dass in LAM-Zellen ebenfalls eine Störung des p53 Signalweges vorliegen könnte, da in mehr als 20 % der Zellen eine Expression von p53 nachgewiesen werden konnte

Die niedrige Expression des Rb Proteins in LAM- Zellen könnte auch durch die fehlende Inhibition durch ein funktionierendes p53 Protein zustande kommen. Eine Korrelation zwischen der Expression von p53 und Rb deutet hierauf hin. Zudem zeigte

sich eine Korrelation zwischen der Expression von p53 und p16, was auf einen Zusammenhang dieser Signalkaskaden auch in LAM-Zellen hinweisen könnte.

Ein Defekt des p53 Gens würde nicht zu einer Aktivierung von p21 führen und so eine niedrige immunohistochemische Expression von p21 Cip 1/ Waf 1 erwarten lassen. P21 ist bei Aktivierung durch p53 für einen Anhalten des Zellzyklus in der G1 Phase durch negative Regulation von Cyclin A und E sowie CDK2, aber auch für die Verarbeitung von Apoptosesignalen verantwortlich.

In LAM-Zellen zeigte sich jedoch eine deutliche Expression von p21 (38 %), was indirekt gegen eine p53 Schädigung in LAM-Zellen spricht. Die Expression von p21 korrelierte mit einer erniedrigten Expression von Cyclin D1 was für einen Erhalt der inhibitorischen Funktion von p21 und für eine eventuell erhaltene Funktion von p53 spricht. Für p21 ist innerhalb des Zellzyklus ein inhibitorischer Effekt auf die in dieser Studie untersuchten und niedrig exprimierten Zellzyklusproteine Cyclin E und CDK2 beschrieben. Dennoch können diese Resultate dafür sprechen, dass p21 seine inhibitorische Funktion in LAM-Zellen wahrnimmt, und den Zellzyklus in LAM-Zellen arretiert [51].

Die niedrige, blasse Färbeintensität von p53 in LAM-Zellen könnte für ein falsch positives Färbeverhalten sprechen. Die Korrelation zwischen p53, Rb und p16 könnte in diesem Fall dahingehend interpretiert werden, dass p53 als Reaktion auf die in LAM – Zellen möglicherweise vorliegende Deregulation im Bereich der Rb/p16 Signalkaskade eventuell durch eine gestörte CDK4 Funktion, aktiviert wird und seine Rolle als Tumorsuppressor über die Aktivierung von p21 wahrnimmt.

Ob p53 seinen Aufgabe als proapoptisches Zellzyklusregulationsprotein in LAM-Zellen erfüllt, konnte nicht beurteilt werden, da sich weder in LAM-Zellen noch in glatter ortsständiger Muskulatur eine Expression des apoptotischen Proteins BCL -2

nachweisen liess. Usuki et al zeigten im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie in LAM-Zellen eine Expression von Bcl-2 in LAM-Zellen [54].

### **3. TSC 1 und 2 - Schlüssel zur Pathogenese der LAM**

Wie bereits in der Einleitung angesprochen spielt der Komplex aus TSC1 und TSC 2 bei der Pathogenese und Progression der pulmonalen Lymphangioliomyomatose eine zentrale Rolle. Während bei der sporadischen Form der LAM hauptsächlich Mutationen von TSC2 vorliegen, bestehen bei einer tuberösen Sklerose auch Mutationen von TSC1. Innerhalb der Zellzyklusregulation verarbeitet der Komplex aus TSC1 und TSC2 verschiedenste Signale von Wachstumsfaktoren, Insulin und Nährstoffen, wobei TSC 1 hauptsächlich eine TSC2 stabilisierende Funktion zugeschrieben wird.

Unter anderem erfolgt die Regulation von TSC 2 durch die in der vorliegenden Studie immunhistochemisch dargestellte Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) p38, die eine deutliche Expression in LAM-Läsionen zeigte, jedoch nicht an glatter ortsständiger Muskulatur.

#### **3.1 TSC 1/2 und p38 - Allgemeines**

Der Verband von TSC 1 und 2 befindet sich im Zytosol und wird durch Phosphorylierung reguliert. Innerhalb der Kontrolle des Zellzyklus nimmt der TSC1/TSC2 Komplex die Rolle eines Tumorsuppressors ein und beeinflusst Wachstum und Zelldifferenzierung. TSC2 wirkt vor allem als Inhibitor der mTor/p70 S6 Kinase Signalkaskade.

In LAM-Zellen ist durch unterschiedliche Mutationen im Bereich von TSC2 dessen inhibitorische Funktion eingeschränkt oder nicht vorhanden.

Es konnte gezeigt werden, dass metabolischer Stress oder Hypoxie in normalen Zellen eine Stabilisierung des Komplexes aus TSC 1 und 2 durch Phosphorylierungsvorgänge hervorruft und so das Zellwachstum durch eine negative Regulierung der mTor Signalkaskade hemmt. Hierbei wird die für das Zellwachstum verantwortliche mTor abhängige Phosphorylierung des S6KI Proteins unterbunden und somit auch die Proteintranslation verhindert [55].

Die p38 MAPK gehört zu einer Familie spezifischer intrazellulärer Programme, mit deren Hilfe die Zelle extrazelluläre Stimuli erkennen und verarbeiten kann. Alle Säugetierzellen besitzen mehrere MAP-Kinase Signalkaskaden. Fünf sind näher erforscht: ERK (Extracellular kinase) 1 und 2, JNK 1,2,3 (c-junctionale aminoterminal Kinase), die ERKs 3, 4 sowie 5 und zuletzt die p38 MAP Kinase mit vier verschiedenen Unterformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  [27]. Die drei erstgenannten Isoformen sind ubiquitär exprimiert, die  $\delta$ -Isoform der p38 MAP-Kinase wird jedoch nur im Skelettmuskel angetroffen [56].

Obwohl für jede dieser Signalkaskaden spezifische Stimuli erforderlich sind, gleichen sie sich in der Art der intrazellulären Signalweiterleitung. Drei jeweils aufeinanderfolgende MAPKs, werden durch Phosphorylierung oder durch G-Proteine der Ras / Rho Familie aktiviert und leiten so das empfangene Signal ins Zellinnere weiter.

Die p38 MAPK ist zu 50 % homolog zum Aufbau der ERK 2. In Säugetierzellen erfolgt die Aktivierung von p38, häufig mit einer simultanen Aktivierung von JNK, durch Umweltfaktoren, mitogene Stimuli, Oxidationsstress, UV-Strahlung, Ischämie, inflammatorische Zytokine sowie Hypoxie. In ruhenden Zellen kann p38 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. In proliferierenden Zellen wird die Lokalisation des Proteins noch stark diskutiert.

Für die p 38 MAP Kinase sind mitogenspezifische inhibitorische als auch aktivierende Wirkungen auf den Zellzyklus beschrieben [57].

Wie zu Beginn erläutert werden p38 MAP Kinasen als Reaktion auf Stress, Entzündung und Hypoxie aktiviert und können über die Phosphorylierung verschiedener nachgeschalteter Zellzyklusregulatoren z.B. p53 Einfluss auf den Zellzyklus nehmen und ihn arretieren [58].

### **3.2 Expression in LAM-Zellen**

In den in dieser Studie untersuchten LAM-Zellen konnte immunhistochemisch eine deutliche Expression von p38 MAP Kinase nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch keine Expression in Zellen der glatten ortsständigen Muskulatur. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten von Karbowinzek et al und Goncharova et al, die eine Aktivierung p38 MAPK in TSC2 defizienten Zellen zeigten [17].

Goncharova et al stellten die Beobachtung an, das die durch p38 aktivierte Kinase MK2 direkt TSC2 phosphoryliert und im Weiteren zu einer Aktivierung von S6K1 führt. Die Funktion von TSC2 als Tumorsuppressor wird so, wie auch durch PI3K und ERK geschwächt. Die funktionelle Bedeutung der Aktivierung von MK2 ist jedoch noch nicht geklärt [59]. Die Aktivierung von p38 MAP Kinase hätte somit eine eher proliferationsfördernde Wirkung.

Diese Ergebnisse stehen im scheinbaren Widerspruch zu der kürzlich gemachten Entdeckung, dass obwohl eine Aktivierung der p38 MAP Kinase in LAM-Zellen vorliegt, diese jedoch einen nur unzureichenden inhibitorischen Effekt hat. LAM – Zellen exprimieren Rezeptoren für die Interferone  $\alpha$  und  $-\beta$ . Interferon-  $\beta$  zeigt in verschiedenen Zelltypen einen proapoptischen, antiproliferativen Effekt. Es konnte gezeigt werden, dass INF- $\beta$  abhängige Aktivierungen von p38 MAP Kinase nicht



ausreichend sind um die Proliferation von Zellen mit einer Dysfunktion von TSC2 zu inhibieren [60].

Die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase. In den untersuchten Zellen ist von einer Dysfunktion von TSC 2 auszugehen. Ob die hohe Expression von p38 MAP Kinase in den hier untersuchten LAM-Zellen proliferationsfördernde Wirkung hat, lässt sich jedoch mit den angewendeten immunhistochemischen Methoden direkt nicht feststellen.

### **3.3 Negative Regulation von Cyclin D1 durch p 38**

Die Expression von Cyclin D1, das in der Regulation des Zellzyklus eine tragende Rolle spielt, wurde ebenfalls untersucht: Verschiedene Mitogene bzw. extrazelluläre Signalkaskaden können Cyclin D1 aktivieren. Eine Phosphorylierung von Cyclin D1 führt über die Komplexbildung mit CDK4 zur ersten, inaktivierenden Phosphorylierung des Rb Proteins. **(s.Abb.1)**

In dieser Studie zeigten sich an LAM-Zellen eine hohe Expression von p38 sowie eine niedrige von Cyclin D1.

In glatter Atemwegsmuskulatur wird bei Aktivierung der p38 MAP Kinase durch verschiedene Faktoren die Expression von Cyclin D1 negativ reguliert [61].

Mittels FISH konnte eine Deletion bzw. Amplifikation auf Proteinebene für Cyclin D1 ausgeschlossen werden.

Hier könnte also vermutet werden, dass in LAM-Zellen die vorher beschriebene Aktivierung der p38 MAPK einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von Cyclin D1 ausübt und somit eher antiproliferative Wirkung hat. Eine niedrige Expression der Cycline D und E und von CDK2 unterstützt dieses Konzept, da diese eher bei Aktivierung des Zellzyklus durch mitogene Stimuli erhöht exprimiert werden [22].

#### **4. Ki-67- Allgemeines**

Das in dieser Studie untersuchte Protein Ki-67 wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, also von der G1-Phase bis zur Mitose, exprimiert [62].

In LAM-Zellen zeigte sich eine schwache Expression von Ki-67.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Proteins gehen mit dem Transit der Zellen durch die Mitose einher. Zudem ändert sich im Verlauf der Mitose bzw. der G1-Phase das Verteilungsmuster der Ki-67 Expression innerhalb des Zellkerns [23].

In ruhenden Zellen kann Ki-67 nicht nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften machen Ki-67 zu einem verlässlichen Parameter für den Nachweis des Anteils proliferierender Zellen einer Zellpopulation. Sowohl Tumorzellen als auch normal wachsende und sich teilende Zellen zeigen eine Expression von Ki-67 [63]. In Mammakarzinomen kann z. B. mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises von Ki-67 die Wachstumsfraktion der Tumorzellen bestimmt werden.

Obwohl Ki-67 ein etablierter Marker zur Bestimmung des Prozentsatzes proliferierender Zellen in Tumoren ist, ist relativ wenig über die biologische Funktion des Ki-67 bekannt. Dennoch scheint das Protein für den Ablauf eines normalen Zellzyklus unersetzlich zu sein [64].

##### **4.1 Ki-67- Expressionsmuster**

Die Expression der Ki-67 Proteine ist von verschiedenen Faktoren abhängig.

So ist bei gesunden Männern sowie Rauchern beider Geschlechter ein generell leicht erhöhter Ki-67-Index im Bereich des Bronchialepithels festzustellen. Gesunde Frauen und Nichtraucher zeigen einen vergleichsweise niedrigeren Ki-67-Index. In Bronchialkarzinomen und der COPD ist der Ki-67- Index im Bronchialepithel ebenfalls erhöht. Miller et al bestätigten die bereits mehrfach aufgestellte These, dass der Ki -67 Index mit Zunahme der histologischen Dysplasie ansteigt [65].

In Bronchialepithelzellen der mittels Immunhistochemie untersuchten Lungengewebe von LAM- Patientinnen zeigte Ki-67 eine mittlere Färbeintensität, es konnte jedoch keine ungewöhnlich hohe Expression von Ki-67 festgestellt werden.

Eine niedrige oder gar fehlende Ki-67 Expression in glatten Muskelzellen und LAM – Zellen könnte ein weiteres gemeinsames Charakteristikum dieser Zelltypen sein, da reife, glatte Atemwegsmuskulatur generell eine niedrige Proliferationsrate zeigt.

Auch lässt dieses Ergebnis darauf schließen, dass sich die Ki-67 negativen LAM- Zellen in einem ruhenden oder nicht proliferierenden Stadium befinden und nur ein geringer Anteil für das Wachstum bzw. die Proliferation der LAM –Zellen verantwortlich ist.

Die niedrige Expression von Ki-67, könnte ein weiterer Hinweis für eine eventuell inhibitorische Wirkung der in LAM-Zellen aktivierten p38 MAP Kinase sein, da sich eine Korrelation zwischen der Expression der beiden Proteine zeigte.

Die Korrelation zwischen Ki-67 und der ebenfalls nur niedrig exprimierten CDK2 spricht ebenfalls nicht für eine Aktivierung des Zellzyklus in LAM- Zellen. Der Komplex aus CDK2 und Cyclin E ist für den zweiten Phosphorylierungsschritt von Rb und damit für den endgültigen Eintritt der Zelle in die S-Phase verantwortlich.

#### **4.2 Inhomogenes Expressionsverhalten von Ki-67 in LAM-Läsionen**

Dennoch ließen sich Unterschiede in der Verteilung Ki-67 positiver Zellen feststellen.

Einige untersuchte LAM-Läsionen zeigten deutliche höhere Expression von Ki-67.

Das inhomogene Expressionsmuster innerhalb der LAM-Läsionen, könnte eine Bestätigung für die oft postulierte These sein, dass LAM- Zellen unterschiedlicher Differenzierung mit unterschiedlichem Proliferationspotential existieren. Zhe et al. zeigten in einer Studie, dass ein Grossteil untersuchten LAM-Zellen mit PNL-2, einem gegen ein noch uncharakterisiertes melanozytäres Antigen gerichteten Antikörper

reagierten. Diese Zellen zeigten keine Expression von Ki-67. Wie in unserem Kollektiv zeigte sich eine deutlich erniedrigte Expression von Ki-67 in LAM-Läsionen [66].

Dennoch ist der morphologische Phänotyp der Proliferation aktiven LAM-Zellen bisher nicht genau identifiziert. Generell wird spindelförmigen LAM-Zellen mehr Wachstumspotential zugesprochen, als den epitheloiden, HMB-45 positive Zellen [59].

#### **4.3 Ki-67, p27 und Östrogenrezeptorexpression in LAM-Zellen**

p27 ein Inhibitor des Zellzyklus, zeigte eine mässige Expression und war mit einer niedrigen Expression von Ki-67 assoziiert. In glatter ortsständiger Muskulatur konnte nur in einem Fall eine Expression von p27 nachgewiesen werden.

P27 wird in ruhenden Zellen exprimiert, wohingegen eine niedrige oder fehlende Expression mit schlechtem Überleben vieler Tumoren assoziiert ist [51].

Die Expression von p27 in LAM –Zellen war im Gegensatz zu der Expression in der glatten Muskulatur höher, wo nur in einem Präparat eine Expression von p27 nachweisbar war.

Zusammen mit der niedrigen Expression von Ki -67 sprechen diese Ergebnisse für eine langsame Proliferation der LAM-Zellen, die eher mit ruhenden Zellen zu vereinbaren ist.

Die Frage ob die Zahl Ki-67 positiver Zellen bei Vorliegen einer LAM in Zeiten erhöhter Hormonausschüttung, wie zum Beispiel im Falle einer Schwangerschaft, steigt, bleibt noch zu klären. In dieser Arbeit konnte jedoch kein ausreichender Hinweis auf eine Korrelation zwischen der Expression des Östrogenrezeptors vom Typ  $\alpha$  und Ki-67 festgestellt werden. Es kann also nur spekuliert werden, ob die Expression von ER- $\alpha$  in Zusammenhang mit der ebenfalls niedrigen Expression von Ki-67 steht. Auch die Expression des Rezeptors für den Wachstumsfaktor EGF korrelierte nicht mit der von Ki-67.

Trotz der ausschliesslichen Aktivität von Ki-67 in der sich teilenden Zelle ist kein funktioneller Zusammenhang zu anderen Schlüsselproteinen des Zellzyklus wie Rb und p53 bekannt: Auch in unserer Studie fanden sich hierfür keine Hinweise [64].

### **5. p27 –Funktion und Expression in LAM- Zellen**

Die Regulation der Cyclin/CDK Komplexe innerhalb des Zellzyklus erfolgt durch verschiedene inhibitorisch wirkende Proteine die nach Struktur und Funktion in zwei Familien eingeteilt werden:

Aus der CIP/Kip Familie wurden in dieser Studie p27, das in LAM-Zellen mässig exprimiert wurde und p21 untersucht. Funktion und eventuelle Störungen des INK 4 Familie angehörenden p16 Protein in LAM-Zellen wurde bereits weiter oben erläutert.

Obwohl die Funktion dieser Proteine komplex ist und kontrovers diskutiert wird, kann generell gesagt werden, dass diese als Reaktion auf DNA-Schäden oder Hypoxie das Fortschreiten des Zellzyklus negativ regulieren [67].

Interessanterweise ist p27 fast nie auf Genebene mutiert oder ausgeschaltet [68].

Gesichert ist eine negative Regulation von Cyclin E und CDK2 durch p27. Hierdurch erfolgt eine Regulation des Übergangs zwischen G1 zur S-Phase. Eine inhibitorische Wirkung von p27 auf den Komplex aus Cyclin D1 und CDK4 wird kontrovers diskutiert [69].

Während eines Zellzyklus fluktuiert die Konzentration von p27. In ruhenden Zellen ist generell eine hohe Expression von p27 zu beobachten. Als Reaktion auf eine Stimulation durch ein Mitogen sinkt die Konzentration von p27. Damit der Zellzyklus fortschreiten kann ist eine Degradierung von p27 notwendig. Eine Überexpression von p27 wird jedoch auch mit Apoptoseinduktion in Zusammenhang gebracht. Im Allgemeinen ist eine niedrige Expression von p27 mit einer schlechteren Prognose bei Tumorleiden vergesellschaftet [51].

In den in dieser Studie untersuchten LAM-Zellen zeigte sich eine mässige Expression von p27, was ein Argument für eine in LAM-Zellen vorliegende Aktivierung des Zellzyklus sein könnte. In der glatten ortsständigen Muskulatur zeigte sich in nur einem Präparat eine nur unwesentlich höhere Expression von p27 von 14 %.

Eine Regulation von p27 durch Tuberin wird diskutiert. Eine Überexpression von Hamartin oder Tuberin, zwei Tumorsuppressoren, die wie bereits erwähnt an der Pathogenese der pulmonalen Lymphangioliomyomatose entscheidend beteiligt sind, führt zu einem Anstieg von p27. Die Bindung von Tuberin an p27 verhindert den Abbau von p27 und somit das Fortschreiten des Zellzyklus. In Blasentumoren mit TSC Gen Mutationen konnte eine Korrelation mit erniedrigtem p27 festgestellt werden. In der pulmonalen Lymphangioliomyomatose ist von einem Defekt von Tuberin und Hamartin auszugehen und könnte daher die nur mässige Expression von p27 erklären.

### **5.1 Regulation von p27 durch Östrogene**

Für die Expression der in dieser Studie untersuchten Östrogenrezeptoren ER- $\alpha$  und  $\beta$  konnte eine deutliche Korrelation mit der Expression von p27 nachgewiesen werden.

In Zellen des Endometriums ist Östrogen ein entscheidender Faktor für die Karzinogenese. Die Spiegel von p27 sinken durch Östrogenstimulation vermittelt durch ER- $\alpha$ , und gestatten so die Proliferation dieser Zellen [70], [34]. Gleichzeitig wurde jedoch eine erhöhte Expression von z. B Cyclin D1 und eine erniedrigte Expression von p21 beobachtet, was in den in dieser Studie untersuchten LAM – Zellen nicht festgestellt werden konnte.

Die Korrelation der Expression der Östrogenrezeptoren mit der Expression von p27 sowie die Korrelation der Östrogenrezeptoren mit der Expression von Rb, legen einen möglichen Einfluss auf diese Signalkaskade jedoch nahe.

Es zeigte sich keine hohe Expression von Cyclin E und CDK2, wie auf Grund der für p27 beschriebenen inhibitorischen, in diesem Fall fehlenden Wirkung, zu erwarten.

Viel eher zeigte sich eine starke Korrelation von p27 zur Expression von CDK4 und p16 was erneut auf eine Deregulation der Rb/p16 Signalkaskade hindeuten könnte. Es sollte jedoch bedacht werden, dass p27 je nach Wachstumsstadium der Zelle gegenüber CDK4 unterschiedliche regulatorische Wirkungen einnehmen kann.

In ruhenden Zellen nimmt p27 die Rolle eines Inhibitors war, wohingegen in proliferierenden Zellen eine nicht inhibitorische Wirkung diskutiert wird [69].

Jedoch könnte auch die Rolle von ER- $\beta$  als Tumorsuppressor eine Rolle spielen. In den LAM-Zellen zeigten sich eine hohe Expression von ER- $\beta$  sowie eine Korrelation mit p27 was auf einen antiproliferativen Effekt durch ER- $\beta$  hinweisen könnte.

## **V.Zusammenfassung**

### **1.1 Er- $\alpha$ Expression in LAM-Zellen**

Alle untersuchten Hormonrezeptortypen – ER- $\alpha$ , und - $\beta$  und der Progesteronrezeptor – wurden in LAM- Zellen exprimiert.

Dennoch zeigt unsere Studie, dass ER- $\alpha$  aufgrund seines Expressionsverhaltens eine Sonderrolle einnimmt. ER- $\beta$  und PR wurden sowohl in glatter, ortsständiger Muskulatur als auch in LAM- Zellen exprimiert. ER- $\alpha$  wurde hingegen nur in LAM-Zellen nachgewiesen.

In der Diagnostik der LAM werden unterschiedliche Marker, Vimentin, Desmin,  $\alpha$  – smooth muscle actin als Marker glatter Muskulatur verwendet. Zusätzlich kommt HMB 45, sowie das Glycoprotein 100 also melanozytärer Differenzierung zur Anwendung.

Die Expression aller drei Hormonrezeptoren unterstreicht den hormonellen Einfluss auf die Pathogenese der LAM. Da ER- $\alpha$  in unserem Untersuchungskollektiv ausschliesslich in LAM-Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte, könnte die Anwendung des Nachweises als zusätzliches diagnostisches Werkzeug diskutiert werden.

### **1.2 Die Rb/p16/ Signalkaskade in LAM- Läsionen**

In dieser Studie zeigte sich, dass in LAM- Zellen ebenso wie in bis zu 90 % aller malignen Lungentumoren eine Störung der durch das Rb, p16 ,Cyclin D1 regulierten Signalkaskade vorliegt, da die Expression der genannten Proteine fehlte oder sehr niedrig war. Ein Defekt von Cyclin D1 konnte auf Genebene mittels FISH



ausgeschlossen werden und deutet eher auf eine übergeordnete Störung bzw. Downregulation hin.

Die im Gegensatz hierzu stark erhöhte Expression von CDK4 in LAM-Zellen könnte auf eine Akkumulation auf Grund eines Funktionsverlusts von p16 hindeuten, oder auch als Ursache der Störung dieses Signalweges z.B. durch eine seltene Amplifikation.

### **1.3 Beeinflussung der Rb-Signalkaskade durch Hormone und Wachstumsfaktoren**

Die Korrelation zwischen der Expression von Rb und Er- $\alpha$  lieferte Hinweise für eine eventuell vorliegende hormonelle Modulation der Rb-Signalkaskade mit folglich Downregulation der nachgeschalteten Cycline und p16 in LAM-Zellen. Zudem korrelierte die nur mässige Expression von p27 mit der Expression beider Östrogenrezeptoren und Rb. Da eine niedrige oder mittlere Expression p27 auf ein gewisses Wachstum dieser Zellen hindeutet kann dies als weiteres Argument für einen östrogenvermittelten Proliferationsfördernden Effekt auf die Rb- Signalkaskade gesehen werden.

Es zeigten sich jedoch auch indirekte Hinweise für eine Wachstumsfaktor vermittelte Beeinflussung der Rb-Signalkaskade.

Die Expression von EGFR in LAM-Zellen war höher als in glatter ortsständiger Muskulatur, was sich unter der Voraussetzung das in den untersuchten LAM-Zellen eine Dysfunktion von TSC2 vorliegt, erklären lässt.

Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation für die Expression von EGFR, Rb und CDK4. Dies könnte auf eine Wachstumsfaktor vermittelte Proliferation von LAM-Zellen z.B. durch eine Phosphorylierung und Inaktivierung von Rb hindeuten und ebenfalls die niedrige Expression bzw. die fehlende Expression nachgeschalteter Proteine erklären.

#### **1.4 p53 Expression in LAM –Zellen und die Rb- Signalkaskade**

P53 zeigte eine Expression die mit einer Mutation des p53 Gens, die in vielen Neoplasieformen vorliegt, oder einer Störung der assoziierten Signalkaskade vereinbar ist.

Es zeigten sich zudem auch Hinweise für eine Beeinflussung der Rb/p16 Signalkaskade durch einen Defekt von p53.

Die hohe p21 Expression in LAM-Zellen spricht jedoch eher gegen einen Funktionsverlust von p53, da sie nur bei Aktivierung von p53 exprimiert wird und inhibitorisch wirkt.

#### **1.5 p38 und Ki-67 Expression in LAM-Läsionen**

In dieser Studie konnte bestätigt werden, dass in LAM-Zellen eine Aktivierung der p38 MAP Kinase vorliegt, für die sowohl inhibitorische als auch aktivierende Wirkung auf den Zellzyklus beschrieben sind.

Für p38 wurde eine negative Regulation und damit ein antiproliferativer Effekt in glatter Atemwegsmuskulatur beschrieben. Die Korrelation der Expression von p38 und Cyclin D1 in LAM-Zellen spricht für einen ähnlichen antiproliferativen Effekt in LAM-Zellen.

Zudem zeigte sich in LAM-Zellen eine niedrige Expression von Ki-67, was für eine niedrige Wachstumsfraktion spricht und mit der langsamen Progression der pulmonalen Lymphangioliomyomatose in Einklang zu bringen ist.

## **1.6 p27 –Widersprüchliches Expressionsmuster**

P27 zeigte in LAM Läsionen ein nur mässiges Expressionsverhalten und wurde nur in einem Präparat an glatter ortsständiger Muskulatur nachgewiesen.

Es zeigte sich eine Korrelation mit Ki 67 und könnte im Sinne einer zwar bestehenden jedoch langsamen Proliferation der LAM-Zellen interpretiert werden.

Die Regulation der p27 Spiegel durch Tuberin ist in der Literatur beschrieben. In der Annahme, dass in den untersuchten LAM-Zellen TSC2 bzw. sein Genprodukt Tuberin seine Wirkung als Tumorsuppressor nicht ausüben kann, liesse sich die Expression von p27 in LAM-Zellen als Zeichen einer stattfindenden Proliferation durch fehlende Inhibition durch TSC 2 erklären.

## **1.7 Abschliessende Zusammenfassung**

Die in dieser Studie gezeigte ausschliessliche Expression von Er- $\alpha$  in LAM-Zellen, könnte zu einem weiteren diagnostischen Hilfsmittel bei der Feststellung einer pulmonalen Lymphangioliomyomatose werden.

Auf der Ebene der Zellzyklusregulation zeigten sich Hinweise für eine Fehlfunktion oder dysfunktionale Regulation der in den meisten Lungenkarzinomen veränderten Rb/p16 Signalkaskade.

Vieles spricht für eine durch östrogenvermittelte Beeinflussung dieses Signalweges des Zellzyklus.

Zusätzlich war die Expression von Markern, die mit Zellwachstum assoziiert sind, wie Ki-67 und p27 mit dem generell langsamen Wachstum der pulmonalen Lymphangioliomyomatose vereinbar.

## VI.Literatur

1. Johnson, S.R. and A.E. Tattersfield, *Decline in lung function in lymphangioliomyomatosis: relation to menopause and progesterone treatment*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. 160(2): p. 628-33.
2. Johnson, S.R., *Lymphangioliomyomatosis*. Eur Respir J, 2006. 27(5): p. 1056-65.
3. Brunelli, A., G. Catalini, and A. Fianchini, *Pregnancy exacerbating unsuspected mediastinal lymphangioliomyomatosis and chylothorax*. Int J Gynaecol Obstet, 1996. 52(3): p. 289-90.
4. Corrin, B., A.A. Liebow, and P.J. Friedman, *Pulmonary lymphangiomyomatosis. A review*. Am J Pathol, 1975. 79(2): p. 348-82.
5. Kitaichi, M., et al., *Pulmonary lymphangioliomyomatosis: a report of 46 patients including a clinicopathologic study of prognostic factors*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. 151(2 Pt 1): p. 527-33.
6. Berkman, N., et al., *Bilateral spontaneous pneumothorax as the presenting feature in lymphangioliomyomatosis*. Respir Med, 1995. 89(5): p. 381-3.
7. Ryu, J.H., et al., *Chylothorax in lymphangioliomyomatosis*. Chest, 2003. 123(2): p. 623-7.
8. Cornog, J.L., Jr. and H.T. Enterline, *Lymphangiomyoma, a benign lesion of chyloiferous lymphatics synonymous with lymphangiopericytoma*. Cancer, 1966. 19(12): p. 1909-30.
9. Yano, S., *Exacerbation of pulmonary lymphangioliomyomatosis by exogenous oestrogen used for infertility treatment*. Thorax, 2002. 57(12): p. 1085-6.
10. Taylor, J.R., et al., *Lymphangioliomyomatosis. Clinical course in 32 patients*. N Engl J Med, 1990. 323(18): p. 1254-60.
11. Rossi, G.A., et al., *Response to treatment with an analog of the luteinizing-hormone-releasing hormone in a patient with pulmonary lymphangioliomyomatosis*. Am Rev Respir Dis, 1991. 143(1): p. 174-6.
12. Yu, J.J., et al., *Estrogen promotes the survival and pulmonary metastasis of tuberin-null cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(8): p. 2635-40.
13. Taveira-DaSilva, A.M., et al., *Decline in lung function in patients with lymphangioliomyomatosis treated with or without progesterone*. Chest, 2004. 126(6): p. 1867-74.
14. Kpodonu, J., et al., *The US experience with lung transplantation for pulmonary lymphangioliomyomatosis*. J Heart Lung Transplant, 2005. 24(9): p. 1247-53.
15. Carsillo, T., A. Astrinidis, and E.P. Henske, *Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioliomyomatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(11): p. 6085-90.
16. Astrinidis, A. and E.P. Henske, *Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease*. Oncogene, 2005. 24(50): p. 7475-81.
17. Karbowniczek, M., et al., *Recurrent lymphangiomyomatosis after transplantation: genetic analyses reveal a metastatic mechanism*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 167(7): p. 976-82.
18. Bittmann, I., et al., *Recurrence of lymphangioliomyomatosis after single lung transplantation: new insights into pathogenesis*. Hum Pathol, 2003. 34(1): p. 95-8.
19. Goncharova, E.A., et al., *Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM)*. J Biol Chem, 2002. 277(34): p. 30958-67.

20. Khidr, L. and P.L. Chen, *RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation*. *Oncogene*, 2006. 25(38): p. 5210-9.
21. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. *Cell Prolif*, 2003. 36(3): p. 131-49.
22. Ammit, A.J. and R.A. Panettieri, Jr., *Signal Transduction in Smooth Muscle: Invited Review: The circle of life: cell cycle regulation in airway smooth muscle*. *J Appl Physiol*, 2001. 91(3): p. 1431-1437.
23. Endl, E. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function*. *Exp Cell Res*, 2000. 257(2): p. 231-7.
24. Gruber, C.J., et al., *Production and actions of estrogens*. *N Engl J Med*, 2002. 346(5): p. 340-52.
25. Martinelli, E., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2009. 158(1): p. 1-9.
26. Balmanno, K. and S.J. Cook, *Tumour cell survival signalling by the ERK1//2 pathway*. *Cell Death Differ*, 2008. 16(3): p. 368-377.
27. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. 68(2): p. 320-44.
28. Hopp, T.A., et al., *Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(22): p. 7490-9.
29. Graham, J.D. and C.L. Clarke, *Physiological action of progesterone in target tissues*. *Endocr Rev*, 1997. 18(4): p. 502-19.
30. Deyrup, A.T., M. Tretiakova, and A.G. Montag, *Estrogen receptor-beta expression in extraabdominal fibromatoses: an analysis of 40 cases*. *Cancer*, 2006. 106(1): p. 208-13.
31. Register, T.C. and M.R. Adams, *Coronary artery and cultured aortic smooth muscle cells express mRNA for both the classical estrogen receptor and the newly described estrogen receptor beta*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998. 64(3-4): p. 187-91.
32. Deyrup, A.T., et al., *Estrogen receptor beta expression in vascular neoplasia: an analysis of 53 benign and malignant cases*. *Mod Pathol*, 2004. 17(11): p. 1372-7.
33. Au, W.W., S. Abdou-Salama, and A. Al-Hendy, *Inhibition of growth of cervical cancer cells using a dominant negative estrogen receptor gene*. *Gynecologic Oncology*, 2007. 104(2): p. 276-280.
34. Zhang, Y., et al., *Function of estrogen receptor isoforms;; in endometrial carcinoma cells*. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2006. 16(4): p. 1656-1660.
35. Ström, A., et al., *Estrogen receptor  $\beta$  inhibits 17-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(6): p. 1566-1571.
36. Paruthiyil, S., et al., *Estrogen Receptor {beta} Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing a G2 Cell Cycle Arrest*. *Cancer Res*, 2004. 64(1): p. 423-428.
37. Logginidou, H., et al., *Frequent estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in renal angiomyolipomas from women with pulmonary lymphangioliomyomatosis*. *Chest*, 2000. 117(1): p. 25-30.
38. Matsui, K., et al., *Downregulation of estrogen and progesterone receptors in the abnormal smooth muscle cells in pulmonary lymphangioliomyomatosis following therapy. An immunohistochemical study*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(3 Pt 1): p. 1002-9.
39. Cho, N.H., et al., *Estrogen receptor is significantly associated with the epithelioid variants of renal angiomyolipoma: a clinicopathological and immunohistochemical study of 67 cases*. *Pathol Int*, 2004. 54(7): p. 510-5.

40. Boorjian, S.A., et al., *Hormone receptor expression in renal angiomyolipoma: clinicopathologic correlation*. Urology, 2008. 72(4): p. 927-32.
41. Henske, E.P., et al., *Frequent progesterone receptor immunoreactivity in tuberous sclerosis-associated renal angiomyolipomas*. Mod Pathol, 1998. 11(7): p. 665-8.
42. Taylor, A. and F. Al-Azzawi, *Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues*. J Mol Endocrinol, 2000. 24(1): p. 145-155.
43. Jares, P., et al., *Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status*. J Pathol, 1997. 182(2): p. 160-6.
44. Kaye, F.J., *RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer*. Oncogene, 2002. 21(45): p. 6908-14.
45. Lukas, J., et al., *Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. Nature, 1995. 375(6531): p. 503-6.
46. Nath, N., et al., *Apoptotic and mitogenic stimuli inactivate Rb by differential utilization of p38 and cyclin-dependent kinases*. Oncogene, 2003. 22(38): p. 5986-94.
47. Yu, J. and E.P. Henske, *Estrogen-Induced Activation of Mammalian Target of Rapamycin Is Mediated via Tuberin and the Small GTPase Ras Homologue Enriched in Brain*. Cancer Res, 2006. 66(19): p. 9461-9466.
48. Clements, D., et al., *Analysis of the oestrogen response in an angiomyolipoma derived xenograft model*. Endocr Relat Cancer, 2009. 16(1): p. 59-72.
49. Lesma, E., et al., *Anti-EGFR antibody efficiently and specifically inhibits human TSC2-/- smooth muscle cell proliferation. Possible treatment options for TSC and LAM*. PLoS One, 2008. 3(10): p. e3558.
50. Efeyan, A. and M. Serrano, *p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes*. Cell Cycle, 2007. 6(9): p. 1006-10.
51. Maddika, S., et al., *Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy*. Drug Resistance Updates, 2007. 10(1-2): p. 13-29.
52. Brambilla, C., et al., *Early detection of lung cancer: role of biomarkers*. Eur Respir J Suppl, 2003. 39: p. 36s-44s.
53. Brambilla, E., et al., *Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas*. Am J Pathol, 1993. 143(1): p. 199-210.
54. Usuki, J., et al., *Immunohistochemical analysis of proteins of the Bcl-2 family in pulmonary lymphangioliomyomatosis: association of Bcl-2 expression with hormone receptor status*. Arch Pathol Lab Med, 1998. 122(10): p. 895-902.
55. Goncharova, E.A., et al., *Abnormal growth of smooth muscle-like cells in lymphangioliomyomatosis: Role for tumor suppressor TSC2*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. 34(5): p. 561-72.
56. Page, K., J. Li, and M.B. Hershenson, *p38 MAP kinase negatively regulates cyclin D1 expression in airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. 280(5): p. L955-64.
57. Fernandes, D.J., et al., *Contribution of the p38MAPK signalling pathway to proliferation in human cultured airway smooth muscle cells is mitogen-specific*. Br J Pharmacol, 2004. 142(7): p. 1182-90.
58. Olson, J.M. and A.R. Hallahan, *p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy*. Trends Mol Med, 2004. 10(3): p. 125-9.
59. Goncharova, E.A. and V.P. Krymskaya, *Pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM): progress and current challenges*. J Cell Biochem, 2008. 103(2): p. 369-82.
60. Goncharova, E.A., et al., *Interferon {beta} Augments Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2)-Dependent Inhibition of TSC2-Null ELT3 and Human Lymphangioliomyomatosis-Derived Cell Proliferation*. Mol Pharmacol, 2008. 73(3): p. 778-788.

61. Page, K. and M.B. Hershenson, *Mitogen-activated signaling and cell cycle regulation in airway smooth muscle*. Front Biosci, 2000. 5: p. D258-67.
62. Gerdes, J., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. 133(4): p. 1710-5.
63. Endl, E., C. Hollmann, and J. Gerdes, *Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis*. Methods Cell Biol, 2001. 63: p. 399-418.
64. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. 182(3): p. 311-22.
65. Miller, Y.E., et al., *Bronchial epithelial Ki-67 index is related to histology, smoking, and gender, but not lung cancer or chronic obstructive pulmonary disease*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. 16(11): p. 2425-31.
66. Zhe, X. and L. Schuger, *Combined smooth muscle and melanocytic differentiation in lymphangioliomyomatosis*. J Histochem Cytochem, 2004. 52(12): p. 1537-42.
67. Singhal, S., et al., *Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review*. Clin Cancer Res, 2005. 11(11): p. 3974-86.
68. Blain, S.W., et al., *p27 as a target for cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2003. 3(2): p. 111-5.
69. Blain, S.W., *Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off*. Cell Cycle, 2008. 7(7): p. 892-8.
70. Watanabe, J., et al., *Stimulatory effect of estrogen on the growth of endometrial cancer cells is regulated by cell-cycle regulators*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2007. 107(3-5): p. 163-171.

## **VII. Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt **Frau PD Dr. med. Iris Bittmann** für die Überlassung des Dissertationsthemas und die weitere Betreuung und Hilfe zur Anlage und Durchführung der Arbeit.

Weiterhin danke ich herzlich **Frau Gaby Charell** für die fruchtbare Zusammenarbeit, Betreuung und Anleitung im Labor.

Zusätzlich möchte ich mich bei meiner Mutter, **Frau Dr. Susanne Naujoks Heinrich** für Ihre Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.



## **VIII.Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

*Name:* Henriette Sophie Heinrich

*Geboren:* 10.5. 1982 in Tübingen

*Familienstand* Ledig

*Staatsangehörigkeit* Deutsch

### **Ausbildung und berufliche Tätigkeit**

*August 1989 - Juni 2001* Schulausbildung und Abitur am Gymnasium Oberhaching

*März 2002- Mai 2008* Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität, München

*Februar 2007- Juni 2007* 1.Tertial des praktischen Jahres: Chirurgische Klinik, Kantonsspital Zug, Schweiz

*Juni 2007- Oktober 2007* 2.Tertial des praktischen Jahres: Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München

*Oktober 2007- Januar 2008* 3.Tertial des Praktischen Jahres: Departement für Innere Medizin, Universität Zürich

*Juli 2008* Approbation

*Seit August 2008* Wissenschaftliche Assistenzärztin, Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, UniversitätsSpital Zürich

## **Publikationen:**

**Heinrich H**, Bauerfeind P

Successful EMR of High Grade Dysplasia Barret mucosa in Skleroderma  
Endoscopy. 2009;41 Suppl 2:E133. Epub 2009 Jun 19.

**Heinrich H**, Bauerfeind P

Endoscopic treatment of Zenker`s diverticulum using a hook knife  
Endoscopy 2009, Unusual cases and techniques library, in print

**Heinrich H**, Weber A, Bauerfeind P

Successful removal of papillary adenoma using CAP-Technique  
GIE Endoscopy 2009, in print

## **Publizierte Abstracts :**

**Heinrich H**, Kaufman E, Gietl A, Fried M, Fruehauf H, Fox M

„Influence of Motivation and Instruction on Anorectal High Resolution manometry findings“

Neurogastroenterology & Motility,2009. 21(s1): p. 15-98.

**Heinrich H**, Kaufman E, Gietl A, Fried M, Fruehauf H, Fox M

„Anorectal motor and sensory function in patients with fecal incontinence assessed by high resolution manometry and barostat studies“

Neurogastroenterology & Motility, 2009. 21(s1): p. 15-98.

**Heinrich H**, Kaufman E, Gietl A, Fox M, Fried M, Fruehauf H

“Variation of upper and lower oesophageal sphincter pressure during stationary high resolution manometry”

Neurogastroenterology & Motility,2009. 21(s1): p. 15-98

Fruehauf H, **Heinrich H**, Kaufman E, Goetze O, Weisshaupt D, Fried M, Fox M  
Assessment of obstructive Defecation by High Resolution Manometry compared to  
Magnetic Resonance Defecography

Gastroenterology, 2009 136(5): p. A-220