

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Ch. Marsch



P53 – Expression und DNS – Ploidie bei Basaliomen verschiedener Wachstumstypen

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christiane Wohlrab  
geboren am 03. August 1971 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Marsch
2. Prof. Dr. med. Holzhausen
3. Priv-Doz. Dr. med. Sollberg

Promotionsverteidigung am 17.11.2000

Das Basaliom ist mit einer jährlichen Rate von ca. 100 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner der am häufigsten auftretende epitheliale Tumor der Haut. Aufgrund seiner pathobiologischen Merkmale nimmt das Basaliom eine „Mittelstellung“ zwischen benignen und malignen Hauttumoren ein.

Hinsichtlich der Aggressivität im Wachstumsverhalten ist bei vielen Tumoren ein Zusammenhang sowohl mit Veränderungen im Ploidiegrad als auch in der Mutation des p53-Tumorsuppressorgens bekannt. Ziel der Untersuchungen war es deshalb, das Verhalten des Ploidiestatus und der p53-Expression bei diesen semimaligen Tumoren zu bestimmen und mit dem histologischen Basaliomtyp zu vergleichen.

Dazu wurden bei insgesamt 76 Basaliomen (35 solide Basaliome, 37 multilokuläre superfizielle Basaliome, 3 Ulcera rodentia, 1 Ulcus terebrans) bildzytometrisch das DNS-Verteilungsmuster und immunhistochemisch der p53-Nachweis durchgeführt. In 38% der Fälle konnte eine positive Immunreaktion nachgewiesen werden, während bei nur 5 Tumoren (7%) ein aneuploider DNS-Gehalt gefunden wurde.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Nachweis von mutiertem p53 und dem Ploidiestatus der untersuchten Basaliome, unabhängig von ihrem histologischen Typ, ließ sich nicht nachweisen.

Die Ergebnisse zeigen, daß das p53-Protein eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Basalioms spielt. Weitere Untersuchungen zur Aufklärung einer möglichen Beziehung zwischen positiver p53-Immunreaktion und p53-Genmutationen sind notwendig. So ist beispielsweise der Nachweis von p53-Mutationen in Basaliomen mittels PCR zu erwägen.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
<b>1. Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
1.1. Einleitung	1
1.2. Zielstellung	5
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>6</b>
2.1. Untersuchungsmaterial	6
2.2. Immunhistochemische Nachweismethoden	7
2.3. DNS-Nachweis in histologischen Präparaten nach Feulgen	11
2.4. Datenerfassung und –bearbeitung	12
2.4.1. Messung des zellulären DNS-Gehaltes	12
2.4.2. Auswertung der p53-Nachweise	13
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>14</b>
3.1. Charakterisierung des Untersuchungsmaterials	14
3.2. DNS-Gehalt und Ploidiestatus	16
3.3. p53 mittels AEC	22
3.4. Vergleich der Ergebnisse von p53 und DNS-Ploidie	27
<b>4. Diskussion</b>	<b>28</b>
4.1. Zellzyklus und Ploidie	28
4.2. Tumorsuppressorgene beim Basaliom	34
4.3. Schlußfolgerung	43
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>

<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	57
7.1.	Stammdaten der verwendeten histologischen Präparate, aufgeschlüsselt nach ihrer histologischen Diagnose	57
7.1.1.	Stammdaten der soliden Basaliome	57
7.1.2.	Stammdaten der multilokulären superfiziellen Basaliome	58
7.1.3.	Stammdaten der ulzerierenden Basaliome	59
7.2.	Verwendete Chemikalien	60
7.3.	Verwendete Geräte und Hilfsmittel	61
<b>8.</b>	<b>Thesen</b>	62

Lebenslauf

Erklärungen

Danksagung

## Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BCC	Basalzellkarzinom
CV	Variationskoeffizient
DAB	Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DI	DNS-Index
DNS	Desoxyribonukleinsäure
HE	Hämalauneosin
MG	Malignitätsgrad
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PUVA	8-Methoxypsoralen-UV-A
SCC	Spinozelluläres Karzinom, Plattenepithelkarzinom, Spinaliom
UV-Licht	ultraviolettes Licht
2cDI	2c-deviation index
5cER	5c-exceeding rate

## 1. Einleitung und Zielstellung

### 1.1. Einleitung

Die Zahl von Patienten mit verschiedenen Arten des Hautkrebses steigt weltweit deutlich an. Das Umweltprogramm der Vereinten Nationen schätzt, daß mehr als 2 Millionen Tumoren und zusätzlich 200.000 maligne Melanom-Fälle pro Jahr weltweit auftreten. Nach derzeitigen Schätzungen der Vereinten Nationen stellt das Basaliom (BCC) den häufigsten epithelialen Tumor der Haut dar [11, 25, 57]. Seine Inzidenzrate beträgt ca. 120 Neuerkrankungen pro 100.000 Männer und ca. 92 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen im Jahr [13]. Der Kopf-Hals-Bereich stellt mit 80% die Hauptlokalisation dar. Chronische Sonnenexposition ist der bedeutendste ätiologische Faktor bei der Entstehung von Basaliomen [4, 57, 75]. Ein weiteres wichtiges Karzinogen ist Arsen [9, 20]. Die meisten Basaliome treten um das 60. Lebensjahr auf. Basaliome wachsen langsam infiltrierend, auch destruierend und ulcerierend, metastasieren in der Regel aber nicht [77]. Daher werden sie auch als semimaligne Tumoren eingestuft [12, 49, 62].

Die Basaliome nehmen ihren Ausgang von den basalen Zellagen der Epidermis und / oder der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel. Basaliome bestehen aus epithelialen dunkelkernigen Zellhaufen, deren außen liegende Zellen palisadenförmig gegen ein ausgeprägtes bindegewebiges Stroma gerichtet sind. Die im Inneren liegenden Zellen sind ungeordnet und meist spindelförmig.

Nach klinischen Gesichtspunkten unterscheidet man ulzerierende von nicht-ulzerierenden Basaliomen. Zu den *nicht-ulzerierenden Basaliomen* werden die *soliden Basaliome* und die *multilokulären superfiziellen Basaliome* gezählt. Die soliden Basaliome fallen zumeist als flach erhabene umschriebene solide Knötchen oder Knoten mit einem perlschnurartigen Randsaum auf. Die multilokulären superfiziellen Basaliome sind meist am Stamm lokalisiert und imponieren als roter Fleck (sog. Rumpfhautbasaliome) [12; 20]. Im histologischen Schnittpräparat zeichnen sich die multilokulären superfiziellen Basaliome dadurch aus, daß an der

Unterfläche der Epidermis multifokale Tumorzellzapfen mit geringer Invasivität simultan und langsam progredient entstehen. Dadurch wird eine lebhaft zellulär vermittelte Entzündungsreaktion ausgelöst, welche klinisch als scharf begrenzte Erythemscheibe imponiert. Die *ulzerierenden Basaliome* können klinisch als Tumoren mit bizarrem Ulcusrand und flachen Exulzationen im Tumorzentrum erscheinen. Diese werden als *Ulcus rodens* bezeichnet und zeigen im histologischen Bild typischerweise digitiforme basaloide Epithelzapfen, welche bis in die mittleren und tiefen Schichten des Koriums reichen. Treten klinisch tiefe Ulzerationen mit ausgedehnten Destruktionen auf und zeigt sich im histologischen Schnittpräparat ebenfalls ein massiv destruierend wachsendes Basaliom mit Infiltrationen bis in die angrenzenden Weichteile, Muskulatur und ggf. knöchernen Strukturen, spricht man von einem *Ulcus terebrans*. Dieses ist vorwiegend am Kopf lokalisiert und kann bei meist schnell erreichter Inoperabilität wegen seines raschen und aggressiven Wachstums zum Tode führen [27]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Basaliome wurden entsprechend dieser Kriterien dem jeweiligen Basaliomtyp zugeordnet.

Die operative Therapie ist das Standardverfahren bei der Behandlung des Basalioms [63]. Bei der mikrographischen Chirurgie wird der Tumor durch sparsame chirurgische Exzision (2–4 mm Sicherheitsabstand) entfernt. Anschließend wird das Exzissat lückenlos histologisch aufgearbeitet unter besonderer Berücksichtigung der Exzissataußenflächen. Durch dieses Verfahren kann durch eventuelle Nachexzisionen in über 99% der Fälle eine dauerhafte Heilung erreicht werden.

Bei der konventionellen Chirurgie mit stichprobenartiger histologischer Kontrolle muß auf Grund der möglichen spezifischen lokalen Infiltration der Basaliome mit höheren Rezidivquoten von 5-30% gerechnet werden [12]. Um bei diesem Verfahren Rezidive möglichst auszuschließen, muß auch bei kleinen Basaliomen ein größerer Sicherheitsabstand zwischen Tumor und gesundem Gewebe eingehalten werden, allerdings z.T. auf Kosten eines schlechteren kosmetischen Ergebnisses [71].

Eine weitere Therapiemöglichkeit für das Basaliom ist die Kryotherapie mit flüssigem Stickstoff. Sie hat bei sachgerechter Anwendung ähnliche Ergebnisse wie

die konventionelle Chirurgie und stellt bei älteren Patienten eine Alternative zur Operation dar [70, 71].

Weiterhin wird die Strahlentherapie, insbesondere bei Inoperabilität sowie bei Rest- oder Rezidivtumoren, angewandt.

Weitere Behandlungsmöglichkeiten stellen die lokale Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und die intratumorale Behandlung mit Typ-1-Interferonen (a,b) dar. Bei metastasierten Basaliomen kommt eine systemische Chemotherapie in Frage. Erfahrungen mit Zytostatika sind aufgrund der seltenen Fälle gering und in der Literatur oft nur auf Einzelbeschreibungen limitiert. Fortgeschrittene oder metastasierende Basaliome scheinen am ehesten auf Cisplatin evtl. in Kombination mit Doxorubicin anzusprechen [13,22].

Charakteristischerweise entwickelt sich ein Basaliom über Monate bis Jahre. Ohne Therapie wachsen alle Basaliome nach mehreren Jahren bis Jahrzehnten in die tieferen Gewebsschichten ein. So kann es zu Destruktionen von Fettgewebe, Faszien und Muskelgewebe kommen. Durch Gefäßarrosionen oder durch ossäre Destruktion mit Einbruch z.B. in die Schädelkalotte können Basaliome auch zum Tode führen [4; 20]. Heutzutage haben jedoch die meisten Basaliome bei frühzeitiger und adäquater Therapie eine gute Prognose. Die Mortalität beträgt beim Basaliom ca. 0,12% [4, 24].

Nach heutigem Verständnis sind Tumoren Erkrankungen, welche durch Veränderungen des genetischen Materials hervorgerufen werden. Diese entstehen schrittweise und werden nach Akkumulation mehrerer Mutationen in verschiedenen Genen klinisch manifest. Das am häufigsten von Mutationen betroffene Gen ist das p53 Tumorsuppressor-Gen. Statistisch gesehen findet man annähernd in jedem zweiten Tumor eine p53-Mutation [23]. In der gesunden Zelle steigt nach einer DNS-Schädigung intrazelluläres p53 an und führt zu einer temporären Proliferationsblockade in der G1- Phase des Zellzyklus. Dadurch wird der Zelle Zeit zur DNS-Reparation gegeben. Mutiertes p53 hat diese Funktion verloren. Dadurch fehlt dieser Zelle ein wichtiger Regulationsmechanismus.

Mutiertes p53-Protein ist häufig äußerst stabil und wird dadurch besonders gut immunhistochemisch nachweisbar [60]. Bei einer Vielzahl von Tumoren korreliert die erhöhte Expression von mutiertem p53 mit einem aggressiveren Wachstumsverhalten oder einer erhöhten Metastasierungstendenz. In der Karzinogenese der nicht melanozytären Hauttumoren treten p53 Mutationen frühzeitig auf [47].

Gleichzeitig ist bei einer Vielzahl von malignen Tumoren ein enger Zusammenhang zwischen den Veränderungen des Ploidiegrades und dem autonomen aggressiven Wachstumsverhalten bekannt. Während gutartige Tumoren in der Regel ein normales, euploides DNS-Verteilungsmuster besitzen, weicht dieses bei bösartigen Tumoren häufig von der normalen DNS-Verteilung ab. Im allgemeinen haben euploide Tumoren eine weniger aggressive Wachstumstendenz als aneuploide Tumoren mit entsprechend verändertem DNS-Verteilungsmuster [30].

## 1.2. Zielstellung

Basaliome besitzen pathobiologische Merkmale, die ihnen eine Mittelstellung zwischen benignen und malignen Tumoren zuweisen. Das Verhalten des Ploidiestatus und der p53-Expression ist deshalb bei diesen semimaligen Tumoren von besonderem Interesse.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zum einen, den Ploidiegrad anhand der DNS-Verteilungsmuster in Abhängigkeit von den histologischen Basaliomtypen zu charakterisieren. Dazu wird mit bildanalytischer Technik der DNS-Gehalt von Einzelzellen verschiedener Basaliomtypen quantitativ bestimmt und im Vergleich mit Referenzzellen mit bekanntem DNS-Gehalt ausgewertet. Andererseits wird vom selben Tumorgewebe mit immunhistochemischer Technik die p53-Expression bestimmt und dem histologischen Basaliomtyp zugeordnet.

Eine vergleichende Auswertung dieser Ergebnisse soll folgende Fragen klären:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen Ploidiestatus und p53-Expression unter Berücksichtigung des histologischen Basaliomtyps?
2. Lassen sich klinisch aggressiv wachsende Basaliome mittels DNS-Ploidie oder durch den immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins von klinisch weniger aggressiv wachsenden Basaliomen unterscheiden?
3. Können durch Kenntnis des Ploidiestatus und der p53-Expression des Tumors Rückschlüsse auf notwendige Therapiemaßnahmen gezogen werden?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Untersuchungsmaterial**

Aus dem Gesamtkrankengut (203 Fälle) aller im Jahr 1994 in der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg operativ entfernten Basaliome wurden 78 Tumoren für den immunhistochemischen p53-Nachweis und für die bildzytometrische DNS-Analyse aufgearbeitet und gefärbt. Es wurden alle HE-Färbungen und Paraffinblöcke der 203 Basaliome aus dem Jahre 1994 gesichtet. Alle Basaliome, bei welchen für die geplanten Untersuchungen ausreichend Material zur Verfügung stand, wurden verwendet. Unter Berücksichtigung des klinischen Befundes und des registrierten histologischen Bildes erfolgte die Zuordnung aller Tumoren gemäß der eingangs dargestellten Basaliom-Klassifikation (vgl. Seite 1-2). So konnten 37 solide und 37 superfizielle Basaliome sowie von den ulzerierenden Basaliomen ein Ulcus terebrans und drei Ulcera rodentia untersucht werden. Zwei der soliden Basaliome waren aus technischen Gründen nicht meßbar. Es standen somit 76 Tumoren, welche alle von unterschiedlichen Patienten stammten, für die Auswertung zur Verfügung (vgl. Anhang, Kap. 7.1.).

## 2.2. Immunhistochemische Nachweismethoden

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mittels eines Microtoms histologische Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Die histologischen Schnitte wurden auf Adhäsivobjektträger aufgebracht und in einem Brutschrank bei 48 °C über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min. in ein Xylolbad eingebracht. Anschließend wurde laut Arbeitsvorschrift 1 verfahren.

### Arbeitsvorschrift 1:

- Schnitte in absteigender Ethanolreihe nach folgendem Schema:
  - 2x in 96 %-igem Ethanol für je 5 min.
  - 1x in 70 %-igem Ethanol für 5 min.
  - 1x in 50 %-igem Ethanol für 5 min.
  - 1x in Aqua dest für 5 min.
- Schnitte in offener Plastikkuvette mit Citratpuffer (Tab. 1) (pH 6,0) in die Mikrowelle bei 750 W 5 x 3 min (jeweils nach je 3 min mit Aqua dest auffüllen, um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern)
- Schnitte bei Raumtemperatur für 15 Minuten auskühlen lassen
- Schnitte 2x mit Aqua dest spülen
- zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 6 Minuten in 3 %-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (gelöst in Aqua dest) gelegt
- 2x mit Aqua dest spülen
- Schnitte für 2 Minuten in PBS stellen
- Puffer sorgfältig mit Zellstoff abtupfen mit PAP Pen umranden
- auf die Schnitte vorsichtig Eiweißblocker tropfen und für 15 Minuten in feuchter Kammer lichtgeschützt inkubieren
- Eiweißblocker abgießen, Schnitte zum Abfließen der Flüssigkeit schräg stellen und mit Zellstoff abtupfen

- zu den Schnitten p53 - Antikörper 1:50 verdünnt mit Antikörperverdünnungsreagenz zugeben (pro Schnitt mit ca. 100 µl rechnen, für große Schnitte ca. 200 µl)
- in feuchter Kammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubieren
- am nächsten Tag:
- nach Herausnahme aus dem Kühlschrank Schnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur erwärmen lassen
- Schnitte 2x à 5 Minuten mit PBS spülen
- Sekundärantikörper (biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper); 1:100 verdünnt zugeben und 30 Minuten lichtgeschützt in feuchter Kammer einwirken lassen
- ABC Herstellung aus Kit (Vectastain ABC-Kit Normal) :
  - genau 2 Tropfen von Reagenz A zu 10 ml Puffer in die ABC Mixflasche geben, dann genau 2 Tropfen von Reagenz B in die Mixflasche geben, sofort mixen und mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Schnitte 2x à 5 Minuten mit PBS spülen
- das frisch hergestellte ABC zugeben und 60 Minuten einwirken lassen
- Schnitte 2x à 5 Minuten mit PBS spülen, danach mit Zellstoff Überstände abtupfen

**Tab. 1:** Zusammensetzung des Citratpuffer

	<b>Summenformel</b>	<b>Konzentration</b> [mmol/l]	<b>Volumen</b> [ml]
<b>Zitronensäure</b>	$C_6H_8O_7 \times H_2O$	0,1	9
<b>Natriumnitrat</b>	$NaC_3H_5O_7 \times 2 H_2O$	0,1	41
<b>Aqua dest</b>	$H_2O$		450

(pH = 6,0 , eingestellt mit 2 mmol/l NaOH)

Zu Beginn der Meßreihe wurden pro Präparat zwei histologische Schnitte angefertigt. Der eine Schnitt wurde mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) gefärbt, der andere Schnitt mit DAB. Im Verlauf der Untersuchungen wurde als Chromogen nur noch AEC verwandt, da dieses eine farbintensivere Reaktion zeigte und damit die Auswertung vereinfachte. Die Färbung mit AEC erfolgte nach Arbeitsvorschrift 2, die Färbung mit DAB nach Arbeitsvorschrift 3.

### **Arbeitsvorschrift 2**

- AEC unter Abzug zugeben und 10 - 40 Minuten einwirken lassen
- Schnitte für 3 Minuten in fließendem Leitungswasser spülen
- Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 45 - 60 Sekunden (nicht länger !)
- mit Leitungswasser spülen, bis es farblos bzw. klar ist, dann Schnitte für 10 min in fließendem kalten Leitungswasser bläuen
- Schnitte mit Glycerolgelatine eindecken (wasserlösliches Eindeckmittel)
- Deckglas

### **Arbeitsvorschrift 3**

- DAB vor Gebrauch filtrieren (lichtgeschützt) unter dem Abzug zugeben und 1 - 20 min. einwirken lassen
- Schnitte für 3 Minuten in fließendem Leitungswasser spülen
- Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 45 - 60 Sekunden (nicht länger !)
- mit Leitungswasser spülen, bis es farblos bzw. klar ist, dann Schnitte für 10 min. in fließendem kaltem Leitungswasser bläuen
- Entwässern: Aqua dest, dann aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 2x 96% je Ethanol 5 mal eintauchen, letztes Ethanol 1 min.), anschließend 3x 10 min. Xylolbad, abschließend eindecken mit Kanadabalsam
- Deckglas

## **Kontrollen**

Positive und negative Kontrollen wurden gemeinsam mit den Testpräparaten durchgeführt, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse in jeder Serie zu sichern. Es ist wichtig, daß positive und negative Kontrollen unter gleichen Bedingungen fixiert und bearbeitet werden wie das unbekannte Präparat. In der vorliegenden Meßreihe dienten als Positivkontrollen sicher p53 positive Schnitte von Glioblastomen, welche uns von Herrn Dr. H. Bahn (Pathologisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg) zur Verfügung gestellt wurden. Als Negativkontrollen wurden Basaliompräparate verwandt, bei denen anstatt des Primärantikörpers Verdünnungspuffer (PBS) hinzugegeben wurde.

### **2.3. DNS-Nachweis in histologischen Präparaten nach Feulgen**

Zur zellulären DNS-Analyse wurden mittels eines Microtoms histologische Schnitte mit einer Dicke von 7 µm angefertigt.

Die DNS-Färbung nach Feulgen beruht auf einer zweistufigen Reaktion. Nachdem in einer ersten Stufe Aldehydgruppen im DNS-Molekül markiert werden, können diese in einem zweiten Schritt mit dem sogenannten Schiff'schen Reagens durch eine Farbreaktion visualisiert werden.

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte im Brutschrank bei 60°C über die absteigende Ethanolreihe. Begonnen wurde mit einem 10-minütigem Xylolbad. Es folgten für je 5 Minuten Rotisol, 96 %-iges, 70 %-iges und 50%-iges Ethanol. Nach einminütiger Wässerung in Aqua dest erfolgte die Darstellung der Aldehydgruppen im DNS-Molekül durch saure Hydrolyse. Dazu wurde das histologische Präparat für 45 Minuten mit 5 mmol/l HCl bei 22°C inkubiert. Nach einer erneuten, 30 Sekunden dauernden Wässerung in Aqua dest erfolgte die Färbung mit dem Schiff'schen Reagens, das mit Glycin-Stammlösung und NaCl, 0,1 n HCL und Aqua dest gepuffert wurde. Die Schnitte wurden 60 Minuten bei Zimmertemperatur lichtgeschützt inkubiert. Hierbei war ein genaues Einhalten der Hydrolysezeit wichtig, da die Färbeintensität u.a. von der Hydrolysezeit abhängig ist. Das bedeutet, daß sie nach einer Stunde ein Plateau erreicht, um dann nachfolgend wieder abzunehmen. Im nächsten Schritt wurden die Präparate zweimal für je 3 Minuten in ein SO<sub>2</sub>-Spülbad (10 ml 1 n HCl, 10 ml 10%iges Kaliummetabisulfat, 200 ml Aqua dest) eingebracht. Danach folgte eine halbstündige Spülung der Schnitte mit fließendem Wasser. Nachfolgend wurden die Präparate über die aufsteigende Ethanolreihe ( 50 %-iges, 70 %-iges, 80 %-iges und 90 %-iges Ethanol, Rotisol, Xylol jeweils 2 Minuten ) entwässert und mit einem Deckglas versehen.

## 2.4. Datenerfassung und -bearbeitung

### 2.4.1. Messung des zellulären DNS-Gehaltes

Im Anschluß an die Färbung der Präparate nach Feulgen erfolgte die Messung des nukleären DNS-Gehaltes mit Hilfe der Bildanalyse. Der Farbstoff bindet an die DNS, so daß es möglich ist, den DNS-Gehalt mittels monochromatischem Licht bei einer Wellenlänge von 466 nm absorptionsphotometrisch zu messen. Die quantitative DNS-Zytometrie erfolgte am Cydok Bildanalyse-System, welches mit Grauwertanalyse arbeitet. Die von der Fernsehkamera erzeugten Kernbilder wurden vom Untersucher markiert und sofort automatisch vermessen. Sich berührende Zellkerne konnten mittels einer Trennfunktion separiert werden. In jedem Präparat wurden 100 Tumorzellen und 30 Referenzzellen für die Messung ausgewählt. Die Referenzzellen, überwiegend Bindegewebszellen, dienten der Erstellung eines DNS-diploiden Standards. Während der Messung errechnete das Gerät fortlaufend die aktuellen DNS-Werte und erstellte die entsprechenden Histogramme (DNS-Verteilungsmuster) [35].

Aus dem DNS-Histogramm lassen sich sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über die untersuchte Zellpopulation ableiten, besonders zum Proliferationsstatus und der DNS-Ploidie. Das Bildanalysegerät ermittelt neben dem DNS-Histogramm folgende DNS-relevante Meßwerte:

- Anzahl und CV (Variationskoeffizient) der Referenzzellen
- Anzahl, CV, MG, 5cER, 9cER der Diagnosezellen
- Stammlinie und Stammlinieninterpretation, DNS-Index (DI)

Für die Auswertung der untersuchten Basaliomzellen wurden DNS-Index, 5cER und MG als Parameter verwendet [32]. Änderungen der Chromosomenzahl stehen zytometrisch entsprechende Veränderungen im DNS-Gehalt gegenüber, die als DI erfaßt werden. Die 5c exceeding rate (5cER) wird als der Prozentsatz der aneuploiden Zellen mit einem DNS-Gehalt größer als 5c definiert.

Nach Böcking et al. [6] ist der den Malignitätsgrad  $MG$  wie folgt definiert:

$$MG = \frac{3 \cdot \log(2cDI \cdot 5cER + 1)}{\log 3758}$$

$$MG = 0,84 \cdot \log(2cDI \cdot 5cER + 1)$$

#### 2.4.2. Auswertung der p53-Nachweise

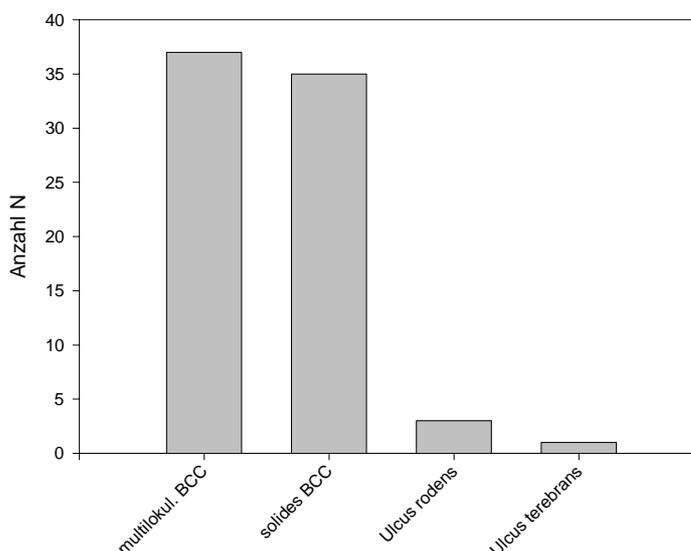
Die Quantifizierung des p53-Gehaltes der Basaliompräparate erfolgte durch die lichtmikroskopische Auswertung der mittels AEC gefärbten histologischen Schnitte. Entsprechend dem Vorschlag von Magee et al. [44] wurden die histologischen Schnitte in 4 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfaßte die schwach p53-positiven, die zweite die mittelstark p53-positiven und die dritte Gruppe die stark p53-positiven Präparate. Die vierte Gruppe erfaßte die p53-negativen Basaliomschnitte. Als Positivkontrollen dienten p53-positive Glioblastomschnitte. Für die Negativkontrollen wurden die Basaliompräparate anstatt mit dem Primärantikörper mit PBS versetzt und anschließend nach den oben beschriebenen Arbeitsvorschriften gefärbt (vgl. auch S. 4).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung des Untersuchungsmaterials

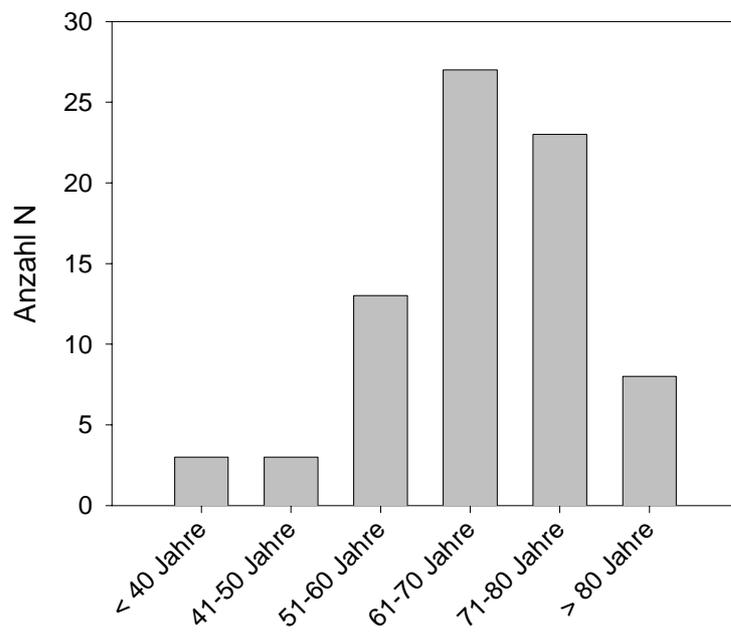
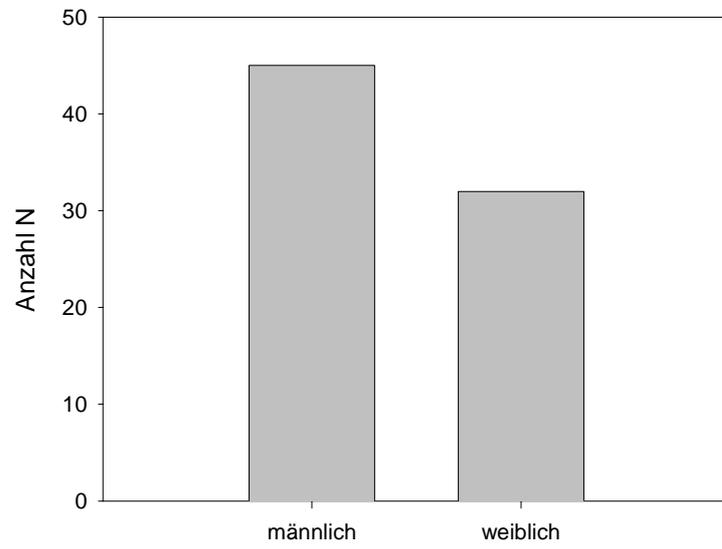
Untersucht wurden 76 Basaliome von Patienten, die in der Hautklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg operativ entfernt wurden (vgl. Anhang, Kap. 7.1.). Von allen Tumoren lagen Schnittpräparate (HE-Färbungen) und Paraffinblöcke vor. Klinisch-histologisch handelte es sich um 37 multilokuläre superfizielle Basaliome, 37 solide Basaliome, drei Ulcera rodentia und um ein Ulcus terebrans (Abb. 1).

**Abb. 1:** Klinisch-histologische Zuordnung der untersuchten Basaliome (n=76)



Das untersuchte Patientengut bestand zu 58,4 % aus männlichen und 41,6% aus weiblichen Patienten im Alter von 28 bis 90 Jahren (Abb. 2). Bei den vorliegenden Untersuchungen stammten 25% der Basaliome von Patienten welche jünger und 75% von Patienten welche älter als 60 Jahre alt waren (Kapitel 7.1.).

**Abb. 2:** Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten

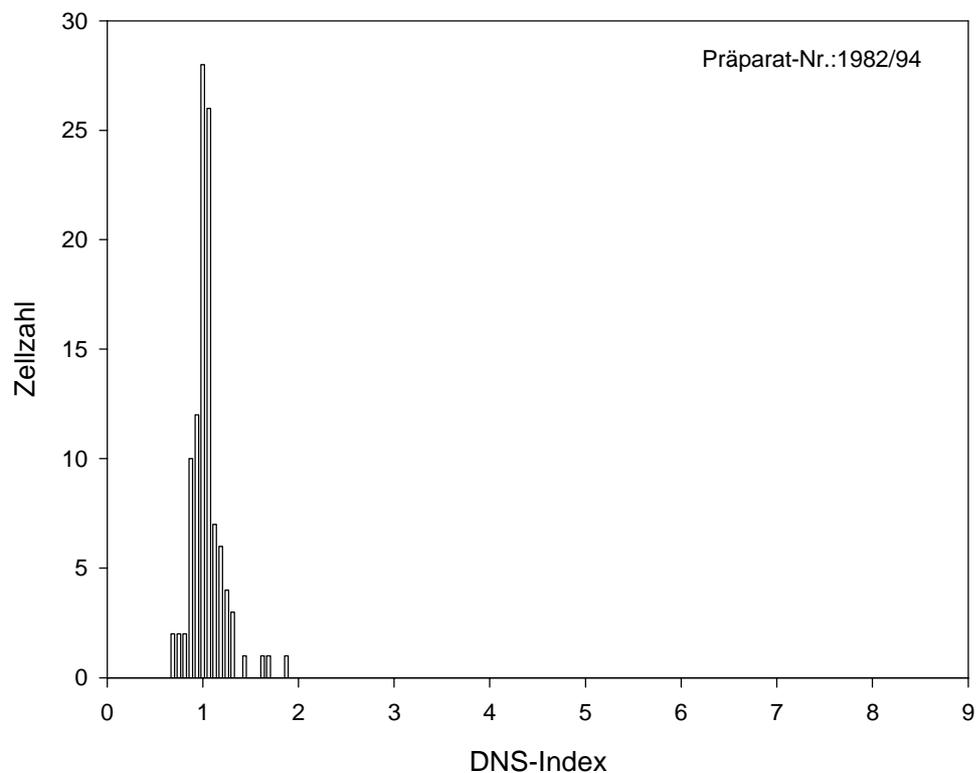


### 3.2. DNS-Gehalt und Ploidiestatus

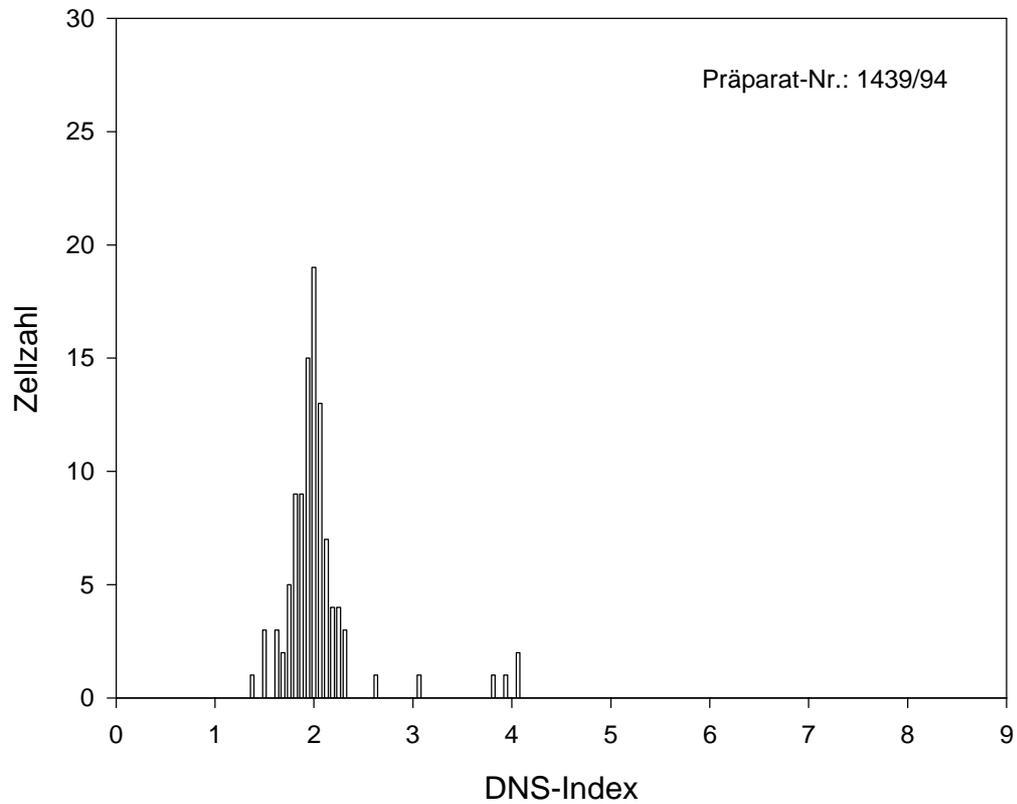
Von den gemessenen 76 Tumorpräparaten zeigten 71 Basaliome einen DNS-Index  $1 \pm 10\%$ , sie waren euploid. Lediglich 5 Basaliome wiesen einen aneuploiden DNS-Index ( $>1 \pm 10\%$ ) auf (Tab. 2, S. 19).

Von den 35 bildzytometrisch untersuchten soliden Basaliomen zeigten 34 Tumoren (97%) einen normoploiden bzw. euploiden DNS-Gehalt. Die Abb. 3 zeigt als Beispiel ein Histogramm eines soliden Basalioms mit DNS-diploider Stammlinie. Lediglich ein solides Basaliom zeigte ein DNS-aneuploides Verteilungsmuster. Bei diesem Tumor handelt es sich um ein Geschwulst mit einer tetraploiden Stammlinie bei einem DNS-Index von 2,02 und einem 5c exceeding rate von 0,02 (Abb. 4).

**Abb. 3:** DNS-Histogramm eines DNS-diploiden soliden Basalioms mit einer DNS-diploiden Stammlinie (DI = 1,00; 5cER = 0,0)

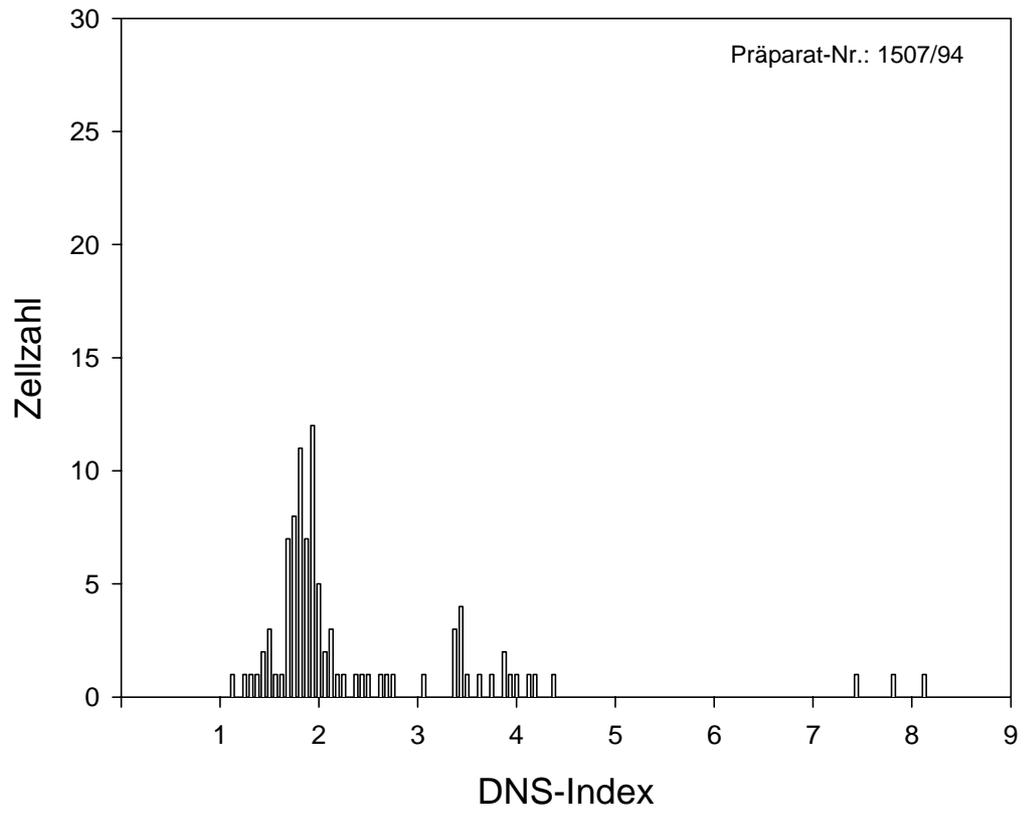


**Abb. 4:** DNS-Histogramm eines soliden Basalioms mit einer tetraploiden Stammlinie und euploider Polyploidisierung (DI = 2,02; 5cER = 0,02)

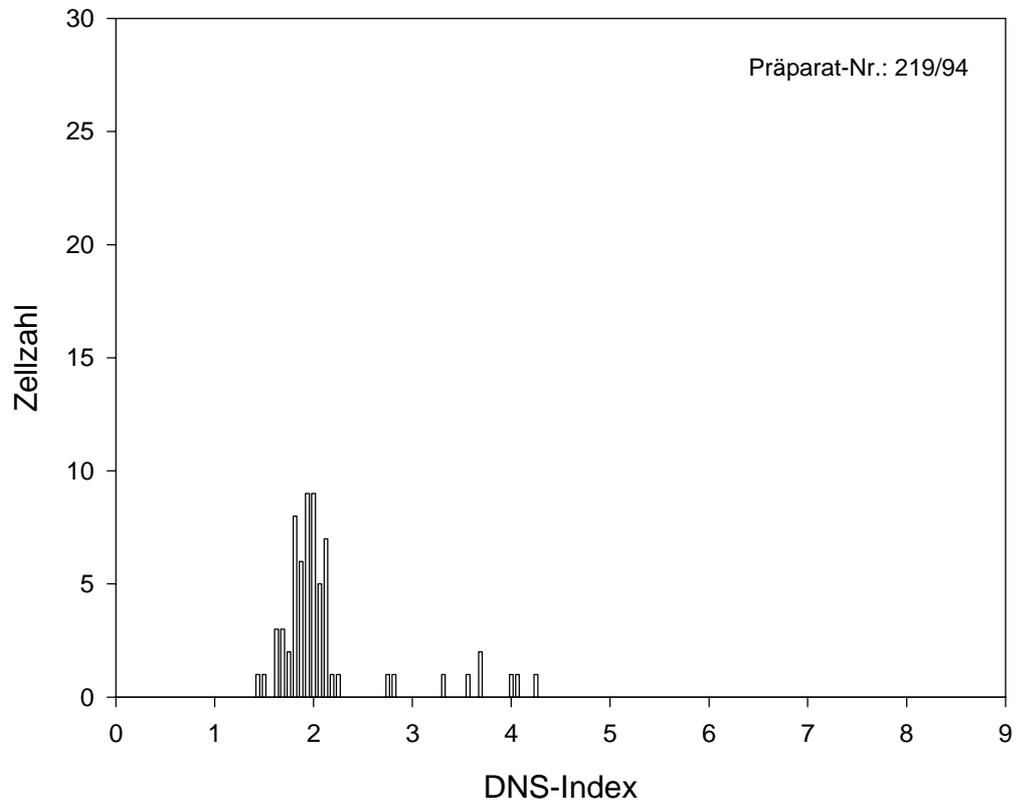


11% (N=4) der untersuchten multilokulären superfiziellen Basaliome zeigten ein DNS-aneuploides Verteilungsmuster. Bei drei der genannten Basaliome handelt es sich um tetraploide Tumoren mit polyploiden Anteilen mit einem DNS-Index von 1,90, 2,02 bzw. 1,84 und einem 5cER von 0,13, 0,05 bzw. 0,17 (Abb. 5 bis 7).

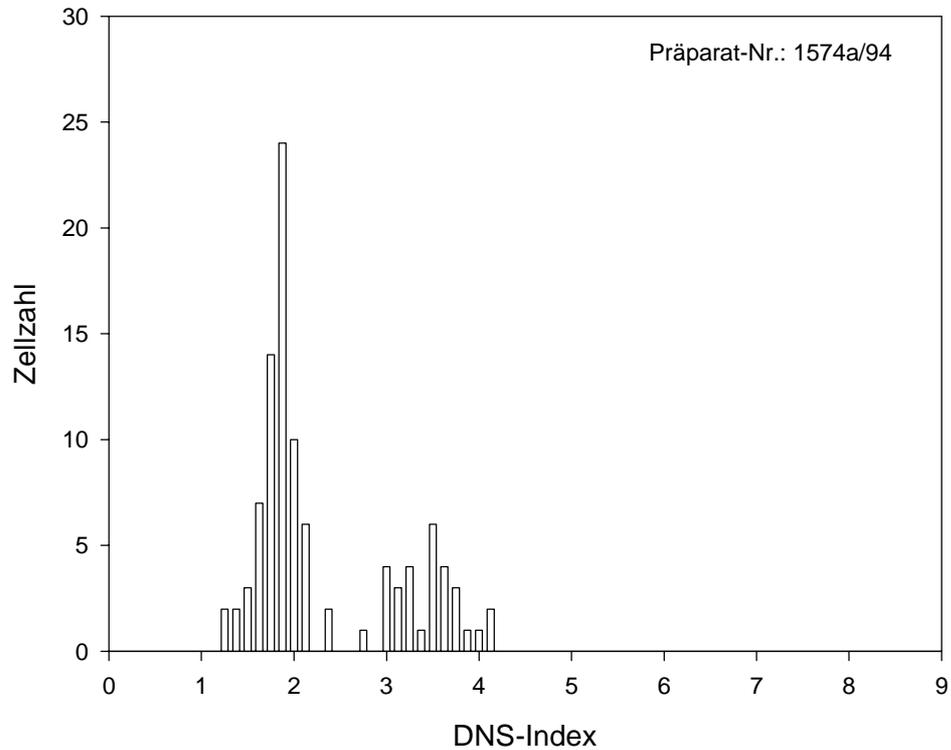
**Abb. 5:** DNS-Histogramm eines multilokulären superfiziellen Basalioms mit tetraploider Stammlinie und polyploiden Anteilen (DI = 1,90; 5cER = 0,13)



**Abb. 6:** DNS-Histogramm eines multilokulären superfiziellen Basalioms mit tetraploider Stammlinie und polyploiden Anteilen (DI = 2,02; 5cER = 0,05)



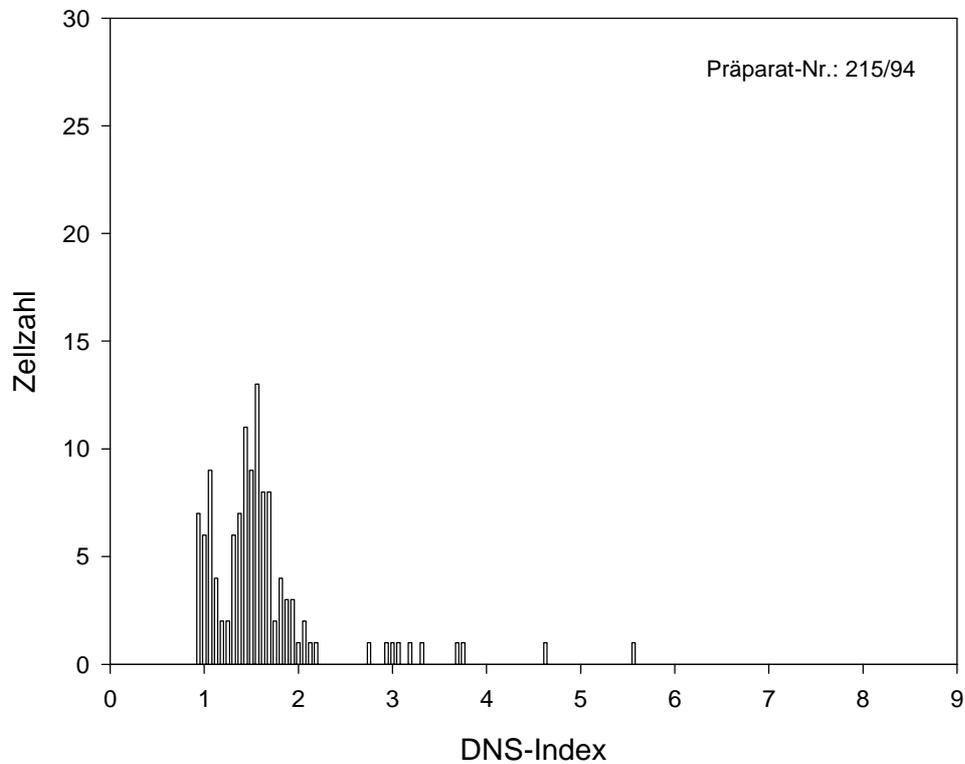
**Abb. 7:** DNS-Histogramm eines aneuploiden multilokulären superfiziellen Basalioms mit einer Stammlinie im tetraploiden Bereich und polyploiden Anteilen (DI=1,84, 5cER=0,17)



Bei dem vierten nicht-euploiden multilokulären superfiziellen Basaliom handelt es sich um einen aneuploiden Tumor, welcher neben einem polyploiden Anteil mit Mitosen bei 6c und 11c auch diploide Zellen aufwies. Sein DNS-Index betrug 1,57, die 5cER lag bei 0,07 (Abb. 8).

Alle übrigen untersuchten multilokulären superfiziellen Basaliome zeigen einen euploiden DNS-Index.

**Abb. 8:** DNS-Histogramm eines multilokulären superfiziellen Basalioms mit polyploiden und diploiden Anteilen (DI = 1,57; 5cER = 0,07)



**Tab.2:** Charakterisierung der bildanalytisch aneuploiden Basaliome

Histologie	DNS-Index	5cER	Histogramm-auswertung	Abb. des Histogramms
superfizielles BCC	2,02	0,05	tetraploid	6
superfizielles BCC	1,57	0,07	aneuploid mit polyploidem Anteil, Mitosen bei 6,00 u. 12,00, daneben auch diploide Zellen	8
superfizielles BCC	1,90	0,13	tetraploid, polyploid	5
superfizielles BCC	1,84	0,17	tetraploid, polyploid	7
solides BCC	2,02	0,02	tetraploid	4

### 3.3. p53 mittels AEC

Insgesamt konnten von 76 Basaliomen bei 29 Tumoren (38%) positive p53-Reaktionen nachgewiesen werden. Die positive Immunreaktion zeigte sich in einer roten Anfärbung der Zellkerne, mit unterschiedlicher Intensität. Die übrigen 47 Basaliome (62%) waren p53 negativ. Diese Befunde sind durch die mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen abgesichert.

Mit Hilfe einer semiquantitativen Skala (Tab. 3) wurde eine Zuordnung nach der Intensität der Farbreaktion vorgenommen:

**Tab. 3:** Gradeinteilung der p53-Farbreaktion

<b>Grad-einteilung</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Anteil der p53 positiven Zellen</b>	1-25% schwach	26-50% mäßig	51-75% stark	76-100% sehr stark

Tab. 4 zeigt die Untersuchungsergebnisse beim p53-Nachweis aufgeschlüsselt nach den einzelnen histologischen Basaliomtypen.

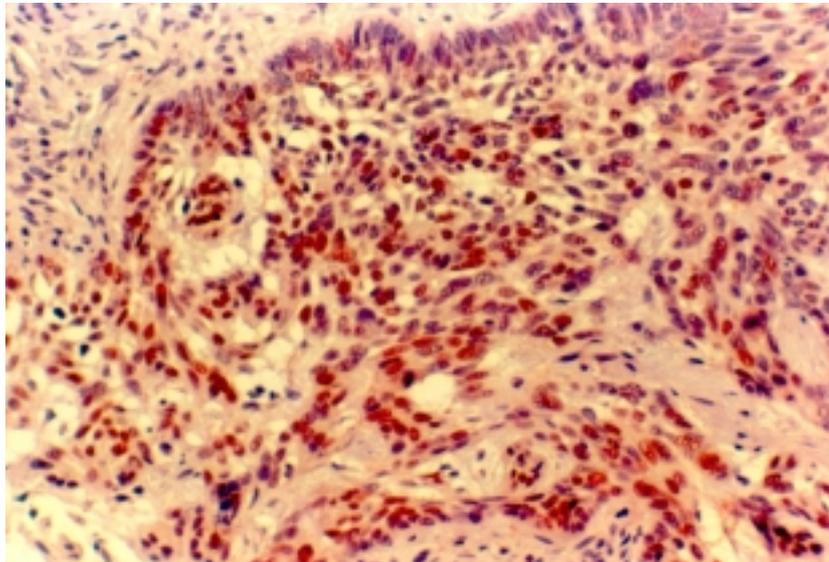
**Tab. 4:** Ergebnisse des p53-Nachweises in Abhängigkeit des histologischen Befundes

	<b>P53 negativ</b>	<b>P53 positiv (gesamt)</b>	<b>P53 positiv Grad 1</b>	<b>P53 positiv Grad 2</b>	<b>P53 positiv Grad 3</b>	<b>P53 positiv Grad 4</b>
<b>Solides Basaliom</b>	22 (63%)	13 (37%)	2 (6%)	3 (9%)	5 (14%)	3 (9%)
<b>Superfizielles Basaliom</b>	21 (57%)	16 (43%)	6 (16%)	5 (14%)	4 (11%)	1 (3%)
<b>Ulcus terebrans</b>	1	0	-	-	-	-
<b>Ulcus rodens</b>	2	1	-	-	1	-

Dabei ergab sich sowohl bei soliden Basaliomen als auch multilokulären superfiziellen Basaliomen eine nahezu gleichmäßige Verteilung hinsichtlich der Intensität des Reaktionsausfalls. Ebenfalls ist aus der gering höheren Anzahl p53 positiver multilokulärer Basaliome kein Unterschied zu den soliden Basaliomen abzuleiten ( $\chi^2 = 0,2783$ ; nicht signifikant).

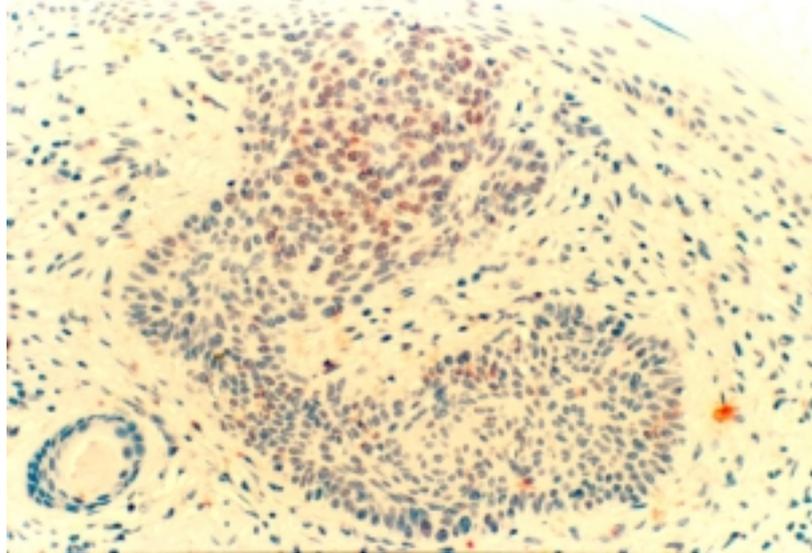
**Abb. 9:** Multilokuläres superfizielles Basaliom (Präparat-Nr.: 128/94)

Immunhistochemische p53-Färbung mit AEC, p53-positive Zellkerne sind rot angefärbt (entspricht Intensitätsgrad 3), p53-negative Zellkerne färben sich blau; mikroskopische Vergrößerung 400 fach



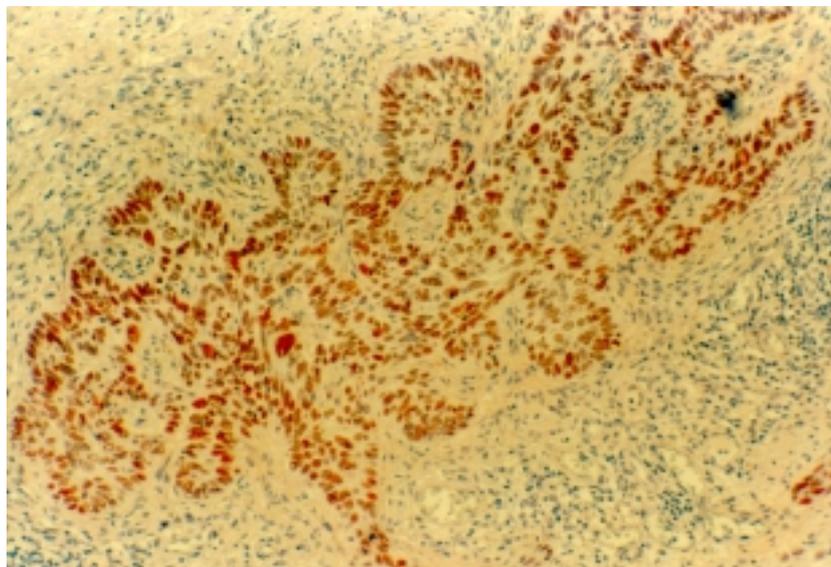
**Abb. 10:** Multilokuläres superfizielles Basaliom (Präparat-Nr.: 219/94)

Immunhistochemische p53-Färbung mit AEC, p53-positive Zellkerne sind rot angefärbt (entspricht Intensitätsgrad 2), p53-negative Zellkerne färben sich blau; mikroskopische Vergrößerung 200 fach



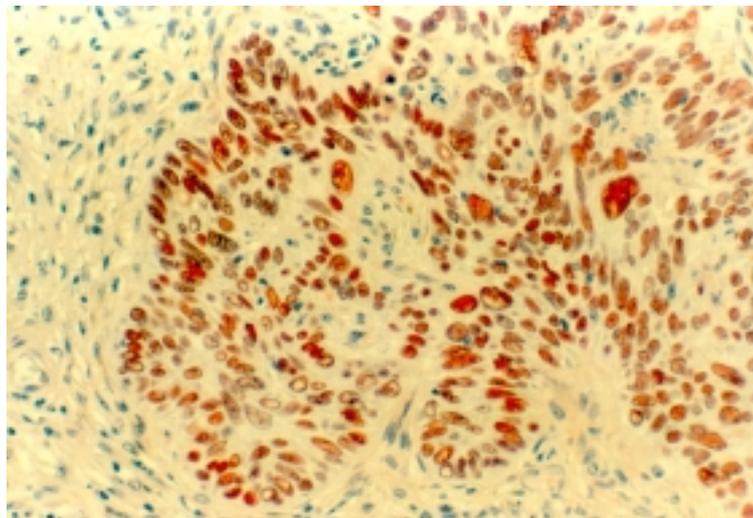
**Abb. 11:** Multilokuläres superfizielles Basaliom (Präparat-Nr.: 215a/94)

Immunhistochemische p53-Färbung mit AEC, p53-positive Zellkerne sind rot angefärbt (entspricht Intensitätsgrad 4), p53-negative Zellkerne färben sich blau; mikroskopische Vergrößerung 200 fach



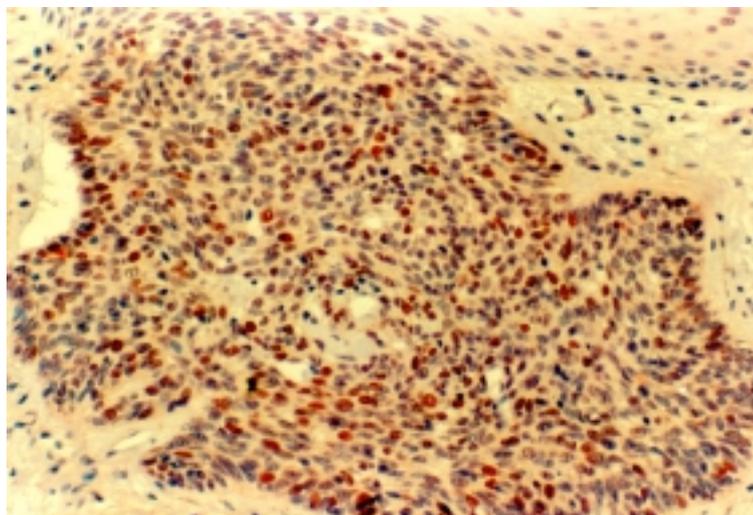
**Abb. 12:** Multilokuläres superfizielles Basaliom (Präparat-Nr.: 215/94)

Immunhistochemische p53-Färbung mit AEC, p53-positive Zellkerne sind rot angefärbt (entspricht Intensitätsgrad 4), p53-negative Zellkerne färben sich blau; mikroskopische Vergrößerung 400 fach  
(Ausschnittsvergrößerung von Abb. 11)



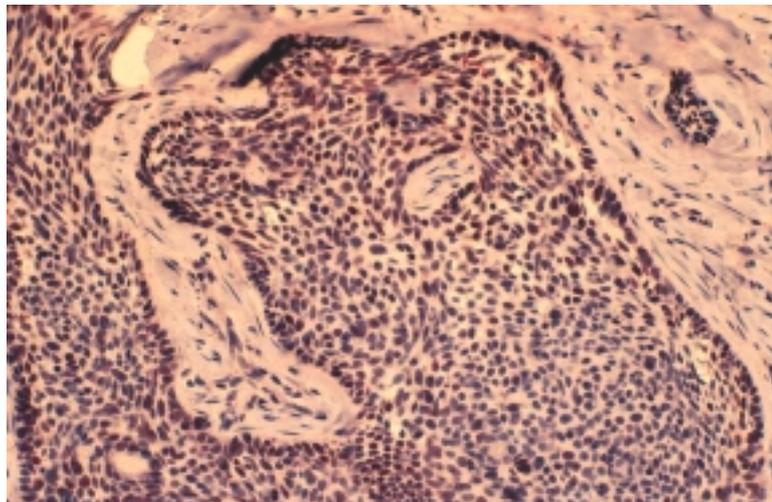
**Abb. 13:** Multilokuläres superfizielles Basaliom (Präparat-Nr.: 220a/94)

Immunhistochemische p53-Färbung mit AEC, p53-positive Zellkerne sind rot angefärbt (entspricht Intensitätsgrad 3), p53-negative Zellkerne färben sich blau; mikroskopische Vergrößerung 200 fach



**Abb. 14:** solides Basaliom (Präparat-Nr.: 2132/94)

Immunhistochemische p53-Färbung mit AEC, p53-positive Zellkerne sind rot angefärbt (entspricht Intensitätsgrad 3), p53-negative Zellkerne färben sich blau; mikroskopische Vergrößerung 200 fach



### 3.4. Vergleich der Ergebnisse von p53 und DNS-Ploidie

Aus dem Vergleich der Ergebnisse des p53-Nachweises, des Ploidiestatus und dem DNS-Gehalt bei unterschiedlichen Basaliomtypen lassen sich keine Zuordnungen ableiten (Tab. 5). In euploiden Basaliomen mit einer diploiden Stammlinie und unterschiedlicher histologischer Charakteristik kann p53 mit unterschiedlichem Intensitätsgrad nachgewiesen werden oder negativ ausfallen. Auch bei den Basaliomen, welche einen von der Norm abweichenden DNS-Index, 5cER oder MG aufweisen, lassen sich keine einheitlichen Ergebnisse hinsichtlich des p53-Nachweises zuordnen (Tab. 5).

Folglich läßt sich keine Korrelation zwischen DNS-Ploidie und p53-Nachweis bei unterschiedlichen Basaliomen ableiten.

**Tab. 5:** Charakteristik der DNS-aneuploiden Basaliome

<b>Basaliomtyp</b>	<b>P53</b>	<b>DNS-Index</b>	<b>5cER</b>	<b>MG</b>
<b>superfiziell</b>	Grad 1 (schwach)	2,02	0,05	1,56
<b>superfiziell</b>	Grad 3 (stark)	1,57	0,07	1,15
<b>superfiziell</b>	negativ	1,90	0,13	2,03
<b>superfiziell</b>	negativ	1,84	0,17	1,78
<b>solide</b>	negativ	2,02	0,02	1,40

## **4. Diskussion**

Weltweit nimmt die Zahl der Patienten, welche an verschiedenen Arten des Hautkrebses erkranken deutlich zu. Unter den verschiedenen Hautkrebsarten zeigt das Basaliom die höchste Inzidenz. Basaliome wachsen invasiv, destruierend, metastasieren in der Regel aber nicht. Aufgrund dieser pathobiologischen Merkmale nehmen sie eine Mittelstellung zwischen malignen und benignen Tumoren ein und werden deshalb auch als semimaligne Tumoren bezeichnet [12]. Deshalb ist das Verhalten des Ploidiestatus und der p53-Expression von besonderem Interesse.

Ein Vergleich dieser beiden Parameter sollte klären, ob ein Zusammenhang zwischen p53-Expression und Ploidiestatus unter Berücksichtigung des histologischen Basaliomtyps besteht. Weiterhin sollte gezeigt werden, ob sich klinisch aggressiv wachsende Basaliome mittel DNS-Ploidie oder durch den immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins von klinisch weniger aggressiv wachsenden Basaliomen unterscheiden lassen. Ferner galt es die Frage zu klären, ob mit dem Ploidiestatus und der p53-Expression des Tumors Rückschlüsse auf notwendige Therapiemaßnahmen gezogen werden können.

### **4.1. Zellzyklus und Ploidie**

Grundlage für jegliche Wachstums-, Differenzierungs- und Teilungsvorgänge von Zellen ist die als DNS im Zellkern gespeicherte genetische Information.

Jede sich nicht teilende gesunde humane Zelle enthält 23 Chromosomenpaare. Der DNS-Gehalt einer solchen Zelle ist als eu- bzw. diploid festgelegt (2c). In der G1-Phase des Zellzyklus erfolgt die Synthese zelleigener Proteine, der Aufbau von Zytoplasmastrukturen sowie die Vorbereitung der Zelle auf die DNS-Synthese. Diese erfolgt in der S-Phase. Am Ende der S-Phase hat sich die Chromosomenzahl verdoppelt. Diese Zelle wird als tetraploid (4c) bezeichnet. Karyotypisch ist eine solche Zelle jedoch weiterhin euploid. Die darauffolgende G2-Phase wird durch die Synthese von bestimmten Enzymsystemen zur Vorbereitung auf die Mitose bestimmt, in welcher die Zellteilung erfolgt. Dabei entstehen zwei Tochterzellen

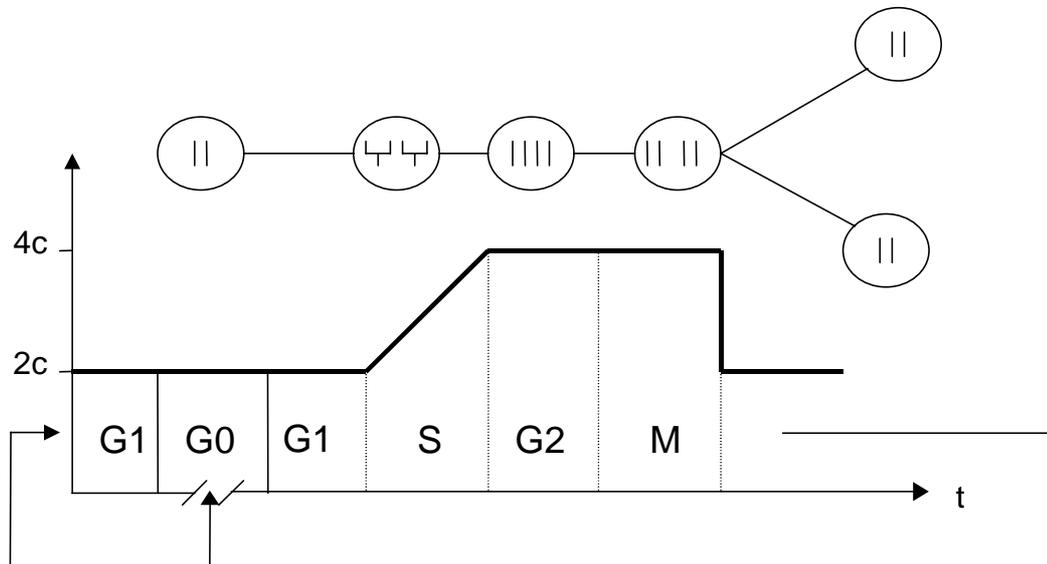
welche je die Hälfte des genetischen Ausgangsmaterials besitzen. Diese Tochterzellen sind nun wieder diploide Zellen ( $2c$ ), deren genetische Informationen identisch sind (Abb. 15) [21, 36].

Die Dauer eines vollständigen Zellzyklus ist in erster Linie von der Dauer der G<sub>1</sub>-Phase abhängig, die in Abhängigkeit vom Zelltyp sehr variieren kann. Alle übrigen Zyklusphasen sind relativ zeitkonstant.

Eine Änderung der Chromosomenzahl (numerische Chromosomenaberration), meist eine Zunahme der Chromosomen, wird als aneuploid bezeichnet. Diese Änderung führt zu einer Verschiebung des DNS-Gehaltes der Zelle (DNS-Aneuploidie). Eine DNS-Aneuploidie ist sowohl für die Charakterisierung und Prognosebeurteilung maligner Tumoren von Bedeutung, sie kann auch als Hinweis zur diagnostischen Abgrenzung maligner Prozesse dienen [7].

Seidel und Sandritter [nach: 5, 6] prägten bereits 1963 den Begriff „DNS-Stammlinie“. Sie definierten ihn als den höchsten Peak im DNS-Verteilungsmuster einer Zellpopulation. Bei proliferierenden Zellen findet sich ein „Duplikations- oder sekundärer Peak“ bei  $4c$  in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Dieser Sekundärpeak kann aber auch Ausdruck einer tetraploiden Tumorzellpopulation sein. Letzteres muß angenommen werden, wenn einige Zellen einen DNS-Gehalt von  $8c$  aufweisen. Von einer DNS-Stammlinie im eigentlichen Sinne kann man nur bei Vorhandensein eines Verdopplungsgipfels (sog. bimodales DNS-Histogramm) oder sogar eines dritten Häufigkeitsgipfels (sog. trimodales DNS-Histogramm) sprechen, da nur dann Basis-DNS-Gehalt und proliferierende bzw. polyploide Zellpopulationen eindeutig unterschieden werden können [41].

**Abb. 15:** Beziehung zwischen dem Zellzyklus und dem DNS-Gehalt von Zellen  
(verändert nach Beckhaus) [6]



Die Kenntnis der DNS-Ploidie hat sich als ein geeignetes diagnostisches und prognostisches Mittel bei der Differenzierung von Tumoren bewährt [8]. Im Allgemeinen sind euploide Tumoren mit einer normalen DNS-Verteilung weniger aggressiv als aneuploide Tumoren mit einem abnormalen DNS-Gehalt [30, 31]. Zytometrische Messungen ermöglichen die Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes von Zellkernen. Dabei wird die absolute DNS-Menge des untersuchten Zellkernes in Relation zur DNS-Menge von bekannten Referenzzellen, welche einen diploiden Chromosomensatz aufweisen, gesetzt [30, 31, 32]. Viele verschiedene Arbeitsgruppen [31] haben gezeigt, welche Schwierigkeiten bei der Festlegung der Standards bei den Fixations- und Färbemethoden, der Meßdauer, der Qualität der Meßeinrichtung, der Beleuchtung und letztendlich auch bei der Auswahl der Tumor- und Referenzzellen auftreten können.

Für die Ermittlung des relativen DNS-Gehaltes einer Zelle stehen zwei verschiedene Grundprinzipien zur Verfügung, die **Durchflußzytometrie** (Synonym: Flowzytometrie) und die **statische DNS-Zytophotometrie**.

Der Vorteil der Durchflußzytometrie besteht darin, eine Vielzahl von Zellen innerhalb kürzester Zeit messen zu können [30, 35]. Im Gegensatz dazu können bei der Bildzytometrie nur relativ wenige Tumorzellen vermessen werden. Darausfolglich ist die Messung subtiler unterschiedlicher Zellkomponenten und die Erfassung genauer kinetischer Wachstumsstadien z.B. Zellzyklusanalysen, entweder gar nicht oder nur eingeschränkt möglich. Der große Vorteil der Bildzytometrie liegt aber darin, daß man gezielt eine bestimmte Zellpopulation vermessen kann, wie es z.B. für die vorliegenden Messungen der epidermalen Basaliome unerlässlich ist.

Enthält eine Probe zum Beispiel nur wenige Tumorzellen inmitten einer großen Anzahl „normaler“ Zellen, ist es möglich, daß diese Tumorzellen nur mit Hilfe der Bildzytometrie identifiziert werden können [30, 35]. Für die vorliegenden Untersuchungen der DNS-Analyse von Basaliomen stellt aus verschiedenen Gründen die Bildanalyse die Methode der Wahl dar.

Trotzdem besteht bei der Bildzytometrie die Gefahr der Messung überlappender Zellkerne oder Kernanschnitte, ein Problem, daß bei den häufig sehr eng beieinanderliegenden Basaliomzellen besonders zu beachten war [35]. Aus diesem Grunde war eine optimale Schnittdicke (4 µm) und das aufwendige gründliche „Durchfokussieren“ der Präparate besonders wichtig.

Ein besonderer Vorteil der Bildzytometrie ist die Messung an Gewebeschnittpräparaten. Dadurch kann die Methode auch an archivierten Schnitten eingesetzt werden und eine wiederholte Messung oder Kontrollmessung durch andere Untersucher ist ebenfalls möglich [30].

Ein weiterer Grund, warum in der vorliegenden Arbeit nicht die Durchflußzytometrie verwendet wurde ist, daß in den Gewebeschnitten der Basaliome häufig der Anteil der Basaliomzellen gegenüber den peritumoralen Entzündungszellen und Drüsenzellen zu ungunsten der Basaliomzellen verschoben ist. Weiterhin liegen die Basaliomzellen meistens sehr dicht beieinander, so daß die Messung solcher Zellkonglomerate eine weitere Fehlerquelle darstellte.

In der vorliegenden Arbeit wurden je Präparat mindestens 100 Tumorzellen und 30 Referenzzellen vermessen. Dies entspricht der von Herzberg et al. [30, 31] und Böcking et al. [6] empfohlenen Zellzahl. Allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß mit 100 Zellen genaue Zellzyklusanalysen kaum möglich sind. Da aber

Basaliome häufig sehr kleine Tumoren sind, war eine Vermessung von wesentlich mehr als 100 Zellkernen bei Beachtung der genannten Kriterien nicht möglich.

Als Referenzzellen aus demselben Schnitt wurden Stromazellen genutzt [31]. Auf die Messung von Lymphozyten als Referenzzellen wurde verzichtet, da bei diesen Zellen der DNS-Gehalt im Vergleich zu diploiden Zellen um ca. 10% vermindert ist [8, 35, 41]. Die Ursache dafür wird in einer Kernschrumpfung und die daraus folgende hohe Chromatindichte als eine Fehlerquelle bei formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Präparaten gesehen.

In der vorliegenden Arbeit waren von 76 bildzytometrisch gemessenen Präparaten 5 (7%) Tumoren aneuploid. Alle anderen Tumoren besaßen einen diploiden DNS-Gehalt. Aufgeschlüsselt nach den einzelnen histologischen Typen waren von den untersuchten soliden Basaliomen lediglich 3% aneuploid. Bei den multilokulären superfiziellen Basaliomen betrug der Anteil der aneuploiden Tumoren 11%.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Tuthill et al. [73]. Diese Arbeitsgruppe untersuchte 30 Frischgewebeproben von Basaliomen mittels Durchflußzytometrie und erhielt als Untersuchungsergebnis eine Aneuploidierate von 13%. Dabei hatten Rezidivbasaliome eine größere Anzahl von Zellen in der G2/M Phase als Primärtumoren.

In einer von der Universität Münster geleiteten multiinstitutionalen Studie [14] wurden mit flowzytometrischer Technik die DNS-Verteilungsmuster u.a. verschiedener humaner Hauttumoren untersucht. Dabei zeigte sich die niedrigste Aneuploidierate in Basaliomen (19%) und kongenitalen melanozytären Nävi (9%). Der DNS-Index bei den Basaliomen variierte zwischen 1,10 und 2,40, mit einer Hauptverteilung um 1,95. In den Untersuchungen dieser Arbeit schwankten die DNS-Indizes zwischen 1,57 und 2,02, bei einer Aneuploidierate von 14%.

Herzberg et al. [31] untersuchte mit Hilfe der Bildzytometrie 51 Basaliome. Sie verglichen den Ploidiestatus mit dem histologischen Wachstumsmuster. Nach diesen Ergebnissen waren 78% (7 von 9) der soliden Tumoren euploid. Im Gegensatz dazu waren 75% (3 von 4) der multilokulären superfiziellen Basaliome aneuploid oder euploid mit aneuploiden Anteilen. Bei Untersuchungen von Böcking et al. [30] zeigten 83% von 23 untersuchten Basaliome bei der bildzytometrischen

Untersuchung einen aneuploiden Charakter. Diese Arbeitsgruppe verwendete Frischgewebe und Ausstrichpräparate.

Die von Herzberg et al. [31] postulierte Auffassung, daß aggressiv wachsende Basaliome häufiger aneuploid seien, konnte mit den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die geringen Anzahlen von DNS-aneuploiden Basaliomen bei unterschiedlichen histologischen bzw. klinischen Zuordnungen bei allen bekannten Untersuchungen, lassen u. E. diesen Schluß nicht mit der notwendigen Sicherheit zu. Eine weitere Bestätigung dafür sehen wir auch in der Tatsache, daß das ebenfalls untersuchte Ulcus terebrans, welches klinisch eine sehr aggressive Wachstumstendenz zeigte [11, 20, 27, 62], einen euploiden DNS-Gehalt besaßen.

Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Interpretation der wenigen Ergebnisse zum Ploidiestatus der Basaliome könnte auch in der Art des verwendeten Untersuchungsmaterials liegen. So zeigten verschiedene Arbeitsgruppen Unterschiede des Ploidiestatus von Frischgewebe und Paraffinschnitten derselben Probe. Diese Ergebnisse legen nahe, daß es während der Fixierungs- und Einbettungsprozedur zur Zerstörung der labileren aneuploiden Zellen kommen kann und damit falsch negative Ergebnisse entstehen können [30]. Auch Unterschiede in den Präparations- und Arbeitsmethoden können ursächlich dafür verantwortlich sein. Weitere mögliche Ursachen sind die unterschiedlichen Wachstumsmuster der untersuchten Basaliome und die häufig sehr geringe Anzahl der untersuchten Tumorpräparate. So analysierten Herzberg et al. [31] beispielsweise 9 solide und 4 multilokuläre superfizielle Basaliome, Böcking et al. [30] 23 Tumoren.

Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit mit Untersuchungen an immerhin 76 Basaliomen kommt deshalb eine besondere Bedeutung zu. Das gilt vor allem auch im Vergleich zu den bekannten Ergebnissen zum Ploidiestatus bei anderen Hauttumoren.

Offensichtlich ist die DNS-Aneuploidierate beim Plattenepithelkarzinom der Haut (Spinaliom) und Keratoakanthom mit 58% bzw. 48% höher als beim Basaliom [30]. Auch in der bereits erwähnten Studie der Universität Münster wurden bei 82% der untersuchten Spinaliome eine DNS-Aneuploidie nachgewiesen. Allerdings ist auch

hier bei der vergleichenden Interpretation Vorsicht geboten, da jeweils nur eine geringe Anzahl von Tumoren ( N=21) vermessen wurden.

Wesentlich bessere Kenntnisse liegen für das maligne Melanom vor [14, 30]. Mehrfach belegt wurde ein Zusammenhang zwischen DNS-Aneuploidie und Metastasierung bzw. geringerer Überlebenszeit. So konnte gezeigt werden, daß DNS-aneuploide maligne Melanome, auch wenn sie vollständig im Gesunden reseziert wurden, eine signifikant höhere Metastastierungstendenz aufweisen als DNS-euploide Melanome [1, 14]. DNS-Aneuploidie stellt nach diesen Ergebnissen einen wesentlichen Prognosefaktor beim malignen Melanom dar.

#### **4.2. Tumorsuppressorgene beim Basaliom**

Die Tumorinitiation ist ein irreversibler zellulärer Vorgang, bei dem Mutationen in der DNS induziert werden [21, 56]. Besondere Bedeutung haben dabei Mutationsarten, die Onkogene oder Tumorsuppressorgene betreffen [36]. Dabei versteht man unter Onkogenen Strukturen, die normale Zelle zu einer Tumorzelle transformieren können [59, 60].

Eine andere Klasse von Tumorgenen unterdrückt dagegen das neoplastische Wachstum. DNS-Schädigungen in solchen Tumorsuppressorgen sind von besonderer Relevanz, da diese Proteine normalerweise als physiologische Barriere gegen klonale Expansion und genomische Mutabilität dienen. Des Weiteren verhindern sie das durch Onkogene hervorgerufene unkontrollierte Wachstum einer Zelle. Der Verlust dieser Tumorsuppressorfunktion kann durch genomische Mutation, chromosomale Rearrangements, Genkonversion oder mitotische Rekombination hervorgerufen werden. Auch die Wechselwirkung mit anderen Zellproteinen oder viralen Onkoproteinen kann die tumorsupprimierende Eigenschaft neutralisieren [42]. In vielen epithelialen Neoplasien scheint die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen häufiger zu sein als die Aktivierung von Onkogenen [59].

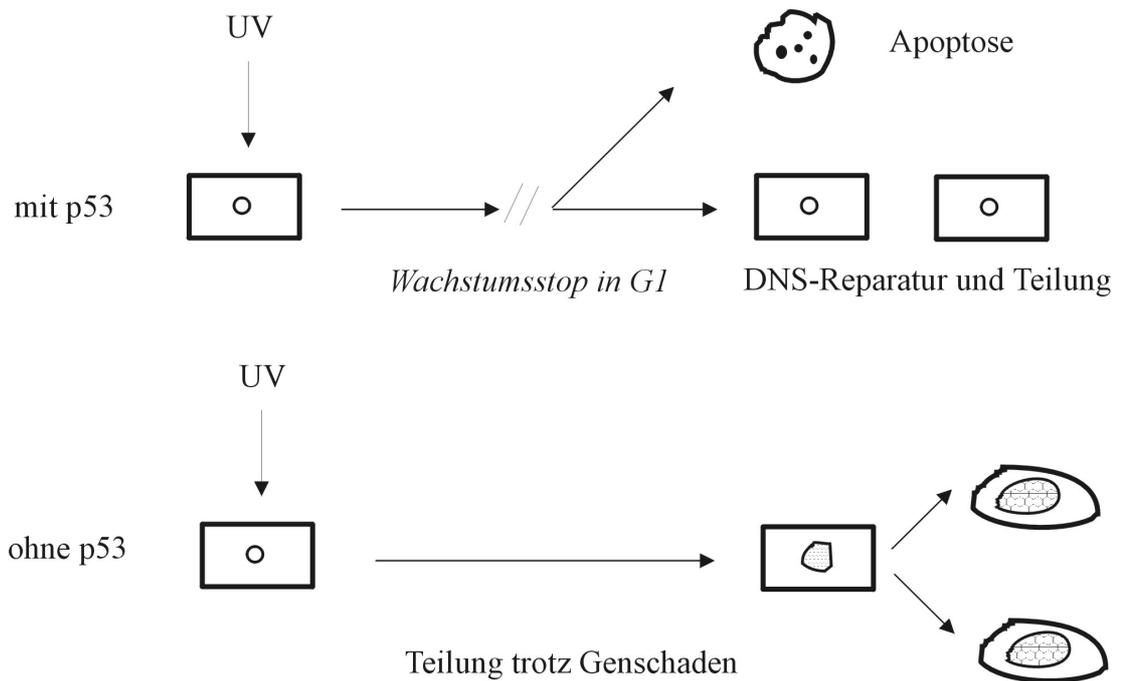
Das am häufigsten von Mutationen betroffene Suppressor-Gen in menschlichen Tumoren ist das p53-Protein [33, 42, 47]. Das p53 Gen ist auf dem kurzen Arm des

Chromosoms 17 lokalisiert. Das Gen besteht aus 11 Exons. Die Exon-Intron-Struktur des p53-Gens und seine Sequenz wurde während der Evolution konserviert [54]. Das p53-Gen kodiert für ein 53 kd Phosphoprotein (p53-Protein), welches im Zellkern lokalisiert ist und Anfang der 70-er Jahre erstmals beschrieben wurde [59]. Es spielt eine zentrale Rolle in der genetischen Stabilität nach DNS-Schädigung. So nimmt intrazelluläres p53-Protein nach DNS-Schädigung zu und führt zu einem Proliferationsblock in der G1-Phase des Zellzyklus [23]. Dadurch wird der Zelle Zeit zur DNS-Reparation gegeben, d.h. Mutationen können am Genom entfernt werden, bevor sie in der S-Phase des Zellzyklus dupliziert und später an die Tochterzelle weitergegeben werden können. Besteht eine zu umfangreiche bzw. irreversible Schädigung der Zelle, wird durch p53 der programmierte Zelltod, die Apoptose, induziert [39].

Jede Zelle besitzt zwei Kopien des p53-Gens. Entfällt durch eine Mutation im p53 Gen diese wichtige G1-Arretierung, so wird der zelluläre Schaden nicht eliminiert und kann durch mitotische Teilung an die Tochterzellen weitergegeben werden [39, 47] (Abb.16).

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Mutationen in völlig verschiedenen Bereichen des p53 Gens gefunden, am häufigsten jedoch in den Exons 5 bis 8 [33, 42]. Zum überwiegenden Teil handelt es sich um Punktmutationen, seltener um eine Deletion mehrerer DNS-Basen. Das Ergebnis aller dieser Mutationen ist gleich. Es kommt zum Verlust der tumorsuppressiven Eigenschaften von p53. Einige mutante p53 Proteine zeigen darüber hinaus proliferationsfördernde Eigenschaften, d.h. sie beschleunigen sogar die Teilung von Zellen mit genetischen Fehlinformationen [38, 50, 58].

**Abb. 16:** p53 Funktionsmodell nach Lane [39]



Mutationen des p53 Proteins führen zu einer Verlängerung seiner Halbwertszeit. So besitzt das "normale" p53, auch Wildtyp p53 genannt, eine Halbwertszeit von 5 bis 20 min [52]. Dem gegenüber hat mutiertes p53 eine Halbwertszeit von 2 bis 12 Stunden. Dies führt zu einer Akkumulation von mutiertem p53 in der Zelle [47, 51]. Neben Genmutationen können auch Interaktionen mit Virusproteinen, wie z.B. durch HPV, Adenoviren die biologischen Eigenschaften von p53 ändern [59, 66].

Wegen der kurzen Halbwertszeit und der damit verbundenen geringen Proteinmenge in "normalen" Zellen kann Wild-Typ p53 immunhistochemisch praktisch nicht nachgewiesen werden. Wird die Halbwertszeit jedoch durch Mutationen verlängert und kommt es zur Akkumulation, ist ein Nachweis des p53 möglich. Hierfür stehen zahlreiche Antikörper zur Verfügung [47].

In malignen menschlichen Tumoren konnten sehr häufig p53 Mutationen nachgewiesen werden [42]. So fand man in ca. 70% der Kolonkarzinome und in 50% der Bronchialkarzinome p53 Mutationen. Auch Mammakarzinome sind mit 30 bis 50% mutiertem p53 häufig betroffen [33]. Der immunhistochemische Nachweis von p53 wurde in vielen Studien als ein sehr guter Prognosefaktor gewertet. So ist der

Nachweis von p53 in Mammakarzinomen, in kolorektalen Tumoren sowie in Bronchial-, Magen- und Gehirntumoren signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit verbunden [33].

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an 76 Basaliomen wurde ein spezifischer anti-p53 Antikörper (DO7) verwendet. Hierbei zeigten 38 % der untersuchten Basaliome eine positive Reaktion. Die Ergebnisse dieser Arbeiten scheinen die Hypothese zu stützen, daß die Mutation des p53-Gens und der damit einhergehende Verlust der tumorsuppressiven Eigenschaft auch bei der Pathogenese von Basaliomen eine wesentliche Rolle spielt.

Vergleichbare Ergebnisse fanden Koutselini et al. [37] und Barbareschi et al. [2] mit 40% bzw. (16 von 40 Basaliome) 48% (13 von 27) positiven Basaliome. Auch in den Arbeiten von Ro et al. [61] und Mc Gregor et al. [46] waren 42% (11 von 26) bzw. 46% (14 von 24) der untersuchten Basaliome p53 positiv. Shea et al. [65] fanden mit dem Antikörper PAb1801 bei 83% (30 von 36 Tumoren) eine positive p53-Immunreaktion. Bei Anwendung des Antikörpers PAb240 zeigten im Gegensatz nur 58% der Basaliome eine positive p53-Reaktion.

Diesen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu weiteren Studien, in welchen keine positive Reaktion nachweisbar war [46]. So konnten Gusterson et al. [26] keine positive Immunreaktion auf p53 bei der Untersuchung von 10 Basaliomen finden. Dies ist möglicherweise auf Unterschiede in den angewandten Untersuchungsbedingungen zurückzuführen. So wurden zur Fixierung Methacarn statt Formalin verwendet und andere Antikörper eingesetzt.

#### *P53 Nachweis bei anderen epithelialen Hauttumoren*

Auch bei anderen epithelialen Hauttumoren wurden vielfach positive p53 Immunreaktionen nachgewiesen [16, 51, 53]. Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von p53 am Spinaliom erbrachten den beim Basaliom ermittelten Befunden vergleichbare Ergebnisse. So waren bei Ro et al. [61] 56% der untersuchten Spinaliome p53 positiv, bei Oram et al. [53] zeigten ca. 67% (10 von 15) der Spinaliome aus sonnenexponierter Haut und 55% (6 von 11) aus nicht-

sonnenexponierter Haut eine p53 positive Reaktion. Auch Nagano et al. [51] konnten bei 54% der untersuchten Spinaliome aus sonnenexponierter Haut eine positive p53 Immunreaktion finden. Allerdings zeigten nur 19% der nicht-sonnenexponierten Spinaliome p53 positive Reaktionen.

Auch beim Keratoakanthom läßt sich p53 nachweisen [34]. Es konnte gezeigt werden, daß sich der Tumor hinsichtlich Verteilung und Ausprägung von p53-Protein nicht von einem Plattenepithelkarzinom der Haut (Spinaliom) unterscheidet und das Protein im Keratoakanthom auch in der Regressionsphase noch nachweisbar ist. Dies unterstreicht die enge verwandtschaftliche Verbindung der beiden Tumoren.

Es wird vermutet, daß das Keratoakanthom und das Spinaliom Varianten der gleichen Grundkrankheit sind und das Keratoakanthom ein regredientes Spinaliom darstellt [34]. Ursache für diese Regression ist möglicherweise die erfolgreiche Wirkung des p53 Tumorsuppressorgens. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Borkowski et al. [10]. Sie konnten bei 77% der untersuchten Keratoakanthome eine positiven p53 Nachweis führen.

Campbell et al. [15] beobachteten in 8 von 20 Fällen bei Bowen-Karzinomen eine p53-Genmutation. Die Arbeitsgruppe um Szekeres konnte in 57% der immunhistochemisch untersuchten Bowen-Karzinome ein positive p53-Reaktion nachweisen [68].

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zum p53 Gehalt in malignen Melanomen weisen sehr unterschiedlichen Ergebnisse auf. Anfang der 90-er Jahre wurde in verschiedenen Studien mit 70% und 95% eine sehr hohe Anzahl p53 positiver Melanome beschrieben [1, 78]. Dabei waren primäre Melanome anscheinend häufiger positiv als Melanommetastasen [78].

Jüngere Arbeiten zeigen hingegen deutlich niedrigere Prozentzahlen der positiven p53 Immunreaktion beim malignen Melanom neben Werten zwischen 4% und 7 % [43, 61] fanden andere Arbeitsgruppen 27 % bis 58% der Tumoren eine positive Reaktion [17, 28, 45].

Ursache für die große Schwankungsbreite der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen sehen Cristofolini et al. [17] in der biologischen Spezifität des

untersuchten Tumormaterials, den unterschiedlichen Fixierungsverfahren sowie in der Spezifität und Sensitivität der verwendeten Antikörper.

Untersuchungen mit der PCR haben aber gezeigt, daß wesentlich seltener p53 Mutationen nachweisbar sind. So konnten im Exon 5-8 bei 16 primären Melanomen und 6 Melanommetastasen keine p53 Mutationen nachgewiesen werden [43]. Andere Untersucher fanden bei 34 primären Melanomen und Melanommetastasen ebenfalls keine p53 Mutation [66]. Obwohl in einer anderen Studie in ca. 40% eine positive Immunreaktion bei Melanomen und Melanommetastasen beobachtet wurde, war es nur in 2 von 30 immunhistochemisch positiven Melanommetastasen möglich, eine p53 Mutation mittels PCR nachzuweisen [66].

Ähnliche Befunde publizierten auch Sparrow et al. [66]. Insgesamt gesehen wurde daraus geschlußfolgert, daß p53 Mutationen in Melanomen selten sind und erst als späteres Ereignis auftreten [66, 80].

#### *Vergleich PCR und immunhistochemischer p53-Nachweis*

Eine positive p53-Immunreaktion wurde in vielen Studien als Hinweis auf das Vorliegen einer p53 Mutation gewertet [2, 37, 48]. Dennoch gibt es in der letzten Zeit Hinweise darauf, daß diese Annahme nicht allgemein gültig ist [15, 38]. Eine positive Immunreaktion ohne den Nachweis einer p53-Genmutation könnte Ausdruck einer genetischen Schädigung unbekannter Kontrollmechanismen des p53-Levels sein oder eine Reaktion auf noch laufende Schäden darstellen. So zeigten Kubo et al. [38] mittels PCR, daß in 12% der untersuchten Basaliome und in 30% der Plattenepithelkarzinome p53 Mutationen vorlagen. Immunhistochemische Untersuchungen an 12 Spinaliomen in der gleichen Arbeit gegenübergestellt, zeigten allerdings, daß nur bei 50% der p53 positiven Tumoren wirklich eine Mutation nachweisbar war. Des Weiteren hatten 3 von 8 p53 negativen Spinaliome eine Mutation im p53 Gen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Campbell et al. [15]. Auch sie untersuchten 20 Basaliome sowohl mittels PCR als auch immunhistochemisch. Zwei der Tumoren hatten ein mutiertes p53, einer der beiden Tumoren besaß zwei Mutationen. Hierbei handelte es sich um Transversionen von Cytosin zu Thymin und einmal von Thymin zu Adenin. Bei der

immunhistochemischen Untersuchung wurde ein mit der hier vorliegenden Arbeit vergleichbares Ergebnis von 45% p53 positiven Tumoren erzielt. Allerdings zeigte kein Basaliom mit einer nachgewiesenen Mutation im p53 Gen eine positive p53-Immunreaktion.

Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Moles et al. [50]. Hier zeigten 48% (9 von 19) der Basaliome eine Mutation im p53 Gen. Die ebenfalls untersuchten Spinaliome zeigten nur in 15% (2 von 13) eine p53 Mutation. Insgesamt gesehen sind demnach sowohl die bisher bekannten, als auch die vorliegenden Befunde noch nicht abschließend zu beurteilen. Für ihre Interpretation müssen auch die möglichen Ursachen für falsch negative Ergebnisse bzw. falsch positive Ergebnisse beim p53 Nachweis berücksichtigt werden.

#### *Ursachen für falsch negative bzw. falsch positive Ergebnisse beim p53 Nachweis*

Die genannten Untersuchungsergebnisse legen nahe, daß Mutationen von p53 nicht die einzige Ursache für eine Anhäufung von p53 im Zellkern sein können. Falsch negative Ergebnisse könnten auch von einer Deletion beider p53 Gene herrühren, so daß kein p53 Protein gebildet werden kann [43, 64]. Auch muß nicht jede p53 Mutation zu stabilem p53 führen [42].

Ebenfalls falsch negative Ergebnisse können durch eine inadäquate Fixation des Proteins im Gewebeschnitt entstehen, so daß es während der Inkubations- und Waschvorgänge extrahiert wird [47].

Eine weitere Möglichkeit besteht auch in dem Auftreten einer Mutation an einer Stelle im Molekül, welche durch den verwendeten Antikörper nicht erkannt werden kann [44].

Falsch positive Reaktionen können vorkommen, wenn Wildtyp p53 auf Grund eines verzögerten Abbaus, z.B. bei einem Defekt des natürlichen Abbauweges, erhöht ist [61, 78]. Eine Akkumulation des p53 Proteins kann man ebenfalls kurze Zeit nach einer UVB- Bestrahlung finden [29, 69, 75]. Des Weiteren konnte das p53 Protein in einer Reihe von normalen, schnell-proliferierenden Zellen nachgewiesen werden, so z.B. in Knochenmarkszellen, in vitro stimulierten Lymphozyten und in Keratinozyten

in psoriatischer Haut [18, 40]. Zu einer Fehlerquelle können weiterhin auch die verwendeten unterschiedlichen Antikörper werden. So unterscheiden die Antikörper Pab 1801 und DO7 nicht zwischen mutiertem und Wildtyp p53 [47]. Beide Antikörper binden an Epitope in der hochkonservierten Region in der Nähe des N-Terminus, welcher außerhalb der Gebiete liegt, welche gewöhnlich von Mutationen befallen sind. Ähnliche Eigenschaften hat auch der von vielen Arbeitsgruppen verwendete Antikörper CM-1 [47]. Im Gegensatz dazu reagiert Pab240 nur mit der mutierten und denaturierten Form von p53, aber nicht mit dem Wildtyp. Pab240 kann jedoch nur bei Gefrierschnitt-Untersuchungen, nicht aber in formalinfixierten Paraffinschnitten eingesetzt werden.

In experimentellen Untersuchungen konnte eine Hypoxie ebenfalls eine p53 Expression induzieren. Die molekularen Ursachen dafür sind bis jetzt unklar [60].

#### *Weitere Regulationsmechanismen*

Neben dem p53 Protein sind für die Regulation der Zellzykluskontrolle und der Initiierung und dem Ablauf der Apoptose eine Anzahl weiterer Faktoren von Bedeutung, deren Zusammenspiel mehr und mehr erkannt wird [36, 74].

So ist die Blockierung einer Anzahl von Apoptoseprogrammen auf die Anwesenheit des Protoonkogens bcl-2 zurückzuführen [36]. Das in niedrigmalignen B-Zell-Lymphomen der Keimzentren entdeckte bcl-2-Protein ist ein intrazelluläres Protein und befindet sich in Mitochondrien, im endoplasmatischen Retikulum, in Kernmembranen und wird von Lymphozyten und verschiedenen Geweben u.a. der Haut exprimiert. Dieses Protoonkogen fungiert als potenter ApoptosSuppressor [3, 76]. Es verwundert daher nicht, daß v.a. langlebige, stark proliferierende Zellen, u.a. auch Stammzellpopulationen, bcl-2 exprimieren. Das bcl-2-Protein scheint für das Langzeitüberleben lymphatischer Zellen von entscheidender Bedeutung zu sein [36]. Auch viele Tumoren, z.B. Prostatakarzinome, verhindern durch eine bcl-2 Überexpression die Apoptose. Basarab et al. [3] zeigten mit ihren Untersuchungen, daß aggressiver wachsende Basaliomtypen einen geringeren Prozentsatz an bcl-2 positiven Zellen haben als klinisch weniger aggressive Basaliomformen. Man weiß heute, daß bcl-2 nur ein Mitglied einer ganzen Genfamilie von Apoptoseregulatoren

ist, welche zum Teil bcl-2-homologe, zum Teil bcl-2-antagonisierende Funktionen haben [36]. So wirken z.B. Bcl-Xs und Bax (bcl 2 assoziiertes X-Protein) als Antagonisten von bcl-2 [55, 72].

Auch bei der Entstehung von Hauttumoren scheint bcl-2 eine wichtige Rolle zu spielen. Das Protein wird in den Basalzellen der normalen menschlichen Epidermis exprimiert, aber nicht in den suprabasalen Keratinozyten.

Verhaegh et al. [76] untersuchten die bcl-2 Expression in normaler Haut, in Basaliomen und in Spinaliomen. Sie zeigten, daß eine positive bcl-2-Immunreaktion in der Basalzellschicht der normalen Haut zu finden war. Alle untersuchten Basaliome waren bcl-2 positiv, dagegen konnte in den untersuchten Spinaliomen kein bcl-2 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß Basaliome von den basalen Schichten der Epidermis ausgehen.

Eine vergleichende Untersuchung der p53- und der bcl-2-Expression wurde von Wikonkal et al. [79] publiziert. Sie zeigten, daß 29% der Basaliome und 50% der Spinaliome eine p53 positive Reaktion aufwiesen, dagegen waren 76% der Basaliome und nur 27% der Spinaliome bcl-2 positiv. Auch hier zeigten deutlich mehr Basaliome als Spinaliome eine positive bcl-2-Immunreaktion. In diesem Zusammenhang ist der Hinweis von Bedeutung, daß die Anzahl apoptotischer Zellen in Tumoren mit hoher bcl-2 Expression (über 20%) insgesamt niedriger ist als bei Tumoren mit geringer bcl-2 Expression [67]. Eine abschließende Erklärung für diese Befunde steht bisher noch aus.

#### *Beziehungen zwischen der p53 Expression und der DNS-Ploidie*

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen läßt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Ploidiestatus und dem Vorhandensein von mutiertem p53 bei Basaliomen nicht nachweisen. Das scheint auch für das humane maligne Melanom und kolorektale Tumoren [1] zu gelten, bei denen keine Korrelation zwischen p53 Expression und DNS-Ploidie nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten Studien an Magenkarzinomen und Ovarialkarzinomen, daß eine p53 Mutation in aneuploiden Tumoren nachweisbar war, wohingegen die diploiden Tumoren keine p53-Mutation aufwiesen [1].

### **4.3. Schlußfolgerung**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur DNS-Bildanalyse und zum immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins lassen nur begrenzt Rückschlüsse auf eine zukünftige Diagnostik und Prognosebeurteilung von Tumoren der Epidermis zu.

Insgesamt konnte mit Hilfe der Bildanalyse und dem immunhistochemischen p53 Nachweis in der vorliegenden Arbeit keine sichere Interpretation bzw. Differenzierung zwischen klinisch aggressiv und weniger aggressiv wachsenden Basaliomen erfolgen. Es waren mehr multilokuläre superfizielle Basaliome p53 positiv und aneuploid als solide Basaliome. Demgegenüber waren nicht alle der bekanntermaßen klinisch aggressiveren Basaliome vom Typ *Ulcus rodens* und *Ulcus terebrans* p53 positiv und keines zeigte einen aneuploiden DNS-Gehalt.

Zum genaueren und ausschließlichen Nachweis von p53-Mutationen in Basaliomen ist die Durchführung der PCR zu erwägen.

Standard der bisherigen Basaliomdiagnostik ist das klinische Erscheinungsbild und die histologische Diagnosesicherung nach der operativen Entfernung [12, 13, 62]. Allerdings hängen die Entwicklung und der Einsatz neuer Behandlungsverfahren auch von der besseren Kenntnis der Mechanismen der Zellzyklus- und Apoptosekontrolle dieser Tumoren ab.

Das p53 Protein ist von zentraler Bedeutung bei der Hemmung des Wachstums einer Vielzahl menschlicher Tumorzellen [19]. Viele p53 Mutationen führen zu einer falschen Faltung des p53 Proteins. Dieses strukturell veränderte p53 Protein ist nicht mehr in der Lage an die DNS zu binden und die den Zellzyklus oder auch die Apoptose regulierenden Gene zu aktivieren. Kürzlich gelang es Foster und Mitarbeitern [19] eine Reihe von Substanzen zu identifizieren, die im Tierversuch in der Lage sind, als „molekulare Prothese“ für mutierte p53 Proteine zu fungieren. Diese Substanzen führten dazu, daß die Zahl der korrekt gefalteten p53 Proteine signifikant zunahm und damit das Tumorwachstum gehemmt werden konnte.

Trotz der Vielzahl der heute bekannten Faktoren lassen sich angesichts unseres noch sehr mangelhaften Verständnisses der Apoptoseregulation, neue, heilende Therapien

aus den molekulargenetischen Ursachenforschungen bisher kaum verwirklichen. Dabei ist aber zu beachten, daß in der Dermatologie bereits seit Jahrzehnten Apoptosemodulatoren eingesetzt werden. So führt z.B. der Einsatz von UV-B-Strahlung, von Glukokortikoiden, Dithranol und PUVA zu einer Apoptoseinduktion. Eine solche lokale Apoptosesteigerung wird bei hyperproliferativen und neoplastischen Dermatosen angestrebt. Eine Apoptosehemmung ist dagegen bei atrophischen Hauterkrankungen und Wundheilungsstörungen erwünscht, wie sie u.a. für Zink und Cyclosporin A nachgewiesen wurde [55].

Mit den in dieser Arbeit gewonnen zellbiologischen Daten (DNS-Ploidie und p53-Expression) konnten keinen klaren Rückschlüsse auf maligne Teilkriterien wie z.B. Schnelligkeit und Ausmaß des infiltrativen oder destruierenden Wachstums gezogen werden. Aufgrund der Semimalignität des Basalioms wäre die Kenntnis der malignen Teilkriterien des Tumors für den klinischen Verlauf und die Therapieplanung wie z.B. zur Verhinderung von Lokalrezidiven oder zur frühzeitigen Erkennung des ggf. besonders aggressiven Wachstumsverhaltens, von besonderer Bedeutung.

## 5. Zusammenfassung

Das Basaliom ist der häufigste epitheliale Tumor der Haut. In Mitteleuropa registriert man derzeit ca. 100 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr. In den letzten Jahrzehnten hat diese Inzidenzrate erheblich zugenommen.

Basaliome repräsentieren eine onkologische Entität mit pathobiologischen Merkmalen, die ihnen eine Mittelstellung zwischen benignen und malignen epithelialen Hauttumoren zuweisen. Sie neigen wie maligne Tumoren zum infiltrativen und destruierenden Wachstum, metastasieren aber in der Regel nicht.

Sie werden deshalb auch als semimaligne Tumoren bezeichnet.

Die durchgeführten Untersuchungen sollten einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Ploidiestatus der untersuchten Basaliome und der p53-Expression unter Berücksichtigung der histologischen Basaliomtypen nachweisen. Dazu wurden 35 solide und 37 multilokuläre superfizielle Basaliome sowie ein Ulcus terebrans und drei Ulcera rodentia immunhistochemisch und bildzytometrisch untersucht. Von den untersuchten soliden Basaliomen zeigten 35% eine p53-positive Immunreaktion. Bei 43% der multilokulären superfiziellen Basaliome und bei einem der untersuchten Ulcera rodens ließ sich ebenfalls p53 immunhistochemisch nachweisen.

Insgesamt zeigten 29 der 76 untersuchten Basaliome (38%) eine p53-positive Immunreaktion. Vergleichbare Ergebnisse fanden auch Koutselini et al. [37] und Ro et al. [61] mit 40% bzw. 42%. Eine Klassifizierung in die einzelnen histologischen Basaliomtypen nahmen die genannten Autoren jedoch nicht vor.

Bei den bildzytometrischen Untersuchungen zum Ploidiestatus der Basaliome zeigten von 76 untersuchten Basaliomen 5 (7%) einen aneuploiden DNS-Gehalt (1 von 35 soliden und 4 von 37 multilokulären superfiziellen Basaliomen). Die in der Literatur beschriebene Aneuploidierate von Basaliomen ist sehr unterschiedlich. Die Angaben liegen zwischen 13 % und 83 % Aneuploidierate.

In der vergleichenden Betrachtung von Ploidiestatus und immunhistochemischem p53-Nachweis zeigten von insgesamt vier aneuploiden multilokulären superfiziellen Basaliomen lediglich zwei Basaliome eine positive p53-Reaktion. Alle anderen aneuploiden Basaliome waren unabhängig ihres histologischen Typs p53 negativ, bzw. alle p53 positiven Basaliome waren bildzytometrisch euploide Tumoren.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ploidiestatus und dem immunhistochemischen Nachweis von mutiertem p53 konnte sowohl bei soliden oder multilokulären superfiziellen Basaliomen als auch bei den als klinisch besonders aggressiv wachsenden Basaliomen vom Typ *Ulcus rodens* und *terebrans* somit nicht nachgewiesen werden. Damit ist festzustellen, daß eine mögliche Beziehung zwischen der positiven p53-Immunreaktivität der untersuchten Basaliome und der p53-Genmutation in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden muß.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Akslen LA, Morkve O: Expression of p53 protein in cutaneous melanoma. Am J Cancer 52 (1992) 13-16
2. Barbareschi M, Girlando S, Cristofolini P, Cristofolini M, Togni R, Boi S: P53 protein expression in basal cell carcinomas. Histopathology 21 (1992) 579-581
3. Basarab T, Orchard G, Russell-Jones R: The use of immunostaining for bcl-2 and CD34 and the lectin peanut agglutinin in differentiating between basal cell carcinoma and trichoepitheliomas. Am J Dermatopathol 20 (1998) 448-452
4. Bastiaens MT, Hoefnagel JJ, Bruijn JA, Westendorp RGJ, Vermeer BJ, Bavinck JN: Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinomas indicate different types of tumors. J Invest Dermatol 111 (1998) 880-884
5. Beckhaus E: Flowzytometrische Analyse des DNA-Gehaltes von operierten Bronchialkarzinomen - Untersuchungen zur prognostischen Relevanz. Med. Diss., Univ. Halle-Wittenberg (1997)
6. Beckhaus U: Bildanalytische DNA-Zytophotometrie beim resezierten Bronchialkarzinom - Untersuchung der prognostischen Relevanz. Med. Diss., Univ. Halle-Wittenberg (1997)
7. Böcking A: Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. Dt Ärztebl 95 (1998) 504-508

8. Böcking A, Streepecke E, Füzési L: Zytogenetische und proliferationskinetische Grundlagen der diagnostischen DNA-Zytometrie. *Verh Dtsch Ges Path* 78 (1994) 552-554
9. Boonchai W, Walsh M, Cummings M, Chenevix-Trench G: Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 136 (2000) 195-198
10. Borkowski A, Bennett WP, Jones RT, Borkowski P, Harres CC, Ferreira L, Kao GF, Trump BF: Quantitative image analysis of p53 protein accumulation in keratoacanthomas. *Am J Dermatopathol* 17 (1995) 335-338
11. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH: *Dermatologie und Venerologie*. 4. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996, 1324-1333
12. Breuninger H, Garbe C: Basalzellkarzinom. *Hautarzt* 49 (1998) 15-19
13. Breuninger H, Dummer R, Garbe C, Hauschild H, Kaufmann R, Panizzon R, Schöfer H, Sebastian G, Soyer HP, Sterry W, Tilgen W: Zur Diskussion gestellt: Entwurf zu den Leitlinien zur Qualitätssicherung in der dermatologischen Onkologie. *derm* 2 (1996) 5-13
14. Büchner THW, Wörmann B, Kleinemeier B, Schumann J, Göhde G, Ritter J, Müller KM, von Bassewitz DB, Grundmann E: Differential pattern of DNA-aneuploidy in human malignancies. *Path Res Pract* 179 (1985) 310-317
15. Campbell C, Quinn AG, Angus B, Rees JL: The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 129 (1993) 235-241

16. Campbell C, Quinn AG, Ro Y, Angus B, Rees JL: P53 mutations are common an early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J Invest Dermatol* 100 (1993) 746-748
17. Cristofolini M, Boi S, Girlando S, Zumiani G, Cristofolini P, Dalla Palma P, Doglioni C, Barbareschi M: P53 protein expression in naevi and melanomas. *Arch Dermatol* 129 (1993) 739-743
18. Edwards MJ, Thomas R, Mills CM, Dykes PJ, Marks R: Immunolocalisation of the p53 tumour suppressor gene product in normal and diseased human epidermis. *Br J Dermatol* 127 (1992) 417
19. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F: Pharmacological rescue of mutant p53 confirmation and function. *Science* 286 (1999) 2507-2510
20. Fritsch P, Zelger B, Sepp N: Tumoren der Haut. In: Fritsch P (Hrsg.): *Dermatologie und Venerologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1998. S 543-645
21. Funk JO, Kind P: Zellzykluskontrolle, genetische Stabilität und Krebs. *Hautarzt* 48 (1997) 157-165
22. Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W: *Dermatologische Onkologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997, 135-181
23. Gasparro FP: P53 in dermatology. *Arch Dermatol* 134 (1998) 1029-1032
24. Gordon PM, Cox NH, Paterson WD, Lawrence CM: Basal cell carcinoma: are early appointments justifiable?. *Br J Dermatol* 142 (2000) 446-448
25. Grosse D: Hautkrebsrate steigt weltweit rasant an. *Kosmet Med* 19 (1998)

26. Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane DP, O'Hare M, Stamps A, Carter R, Jayatilake H: Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 6 (1991) 1785-1789
27. Hardmeier T, Hornstein OP, Hundeiker M, Kerl H, Kresbach H, Weidner F: *Histopathologie der Haut*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979, 190-206
28. Hartig C, Mohnke KM, Stadler R: P53 Expression beim malignen Melanom. *Z Haut Geschlechtskr* 70 (1995) 306-309
29. Healy E, Reynolds NJ, Smith MD, Campbell C, Farr PM, Rees JL: Dissociation of erythema and p53 protein expression in human skin following UVB irradiation, and induction of p53 protein and mRNA following application of skin irritants. *J Invest Dermatol* 103 (1994) 493-499
30. Herzberg AJ: Significance of DNA ploidy in cutaneous lesions. *Arch Dermatol* 128 (1992) 663-672
31. Herzberg AJ, Garcia JA, Kerns BJ, Jordan PA, Pence JC, Rotter SM, Dzubow LM: DNA ploidy of basal cell carcinoma determined by image cytometry of fresh smears. *J Cutan Pathol* 20 (1993) 216-222
32. Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M, Barlogie B, Herman CJ, Leif RC, Mayall RF, Murphy RF, Sandberg AA: Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 5 (1984) 445-446
33. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: P53 mutations in human cancers. *Science* 253 (1991) 49-53

34. Kerschmann RL, McCalmont TH, LeBoit PE: P53 oncoprotein expression and proliferation index in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 130 (1994) 181-186
35. Klapperstück T, Wohlrab W: DNA image cytometry on sections as compared with image cytometry on smears and flow cytometry in melanoma. *Cytometry* (1996) 82-89
36. Koldehoff M: Zellzyklusregulation und die Funktion beim neoplastischen Wachstum. *Biol Med* 26 (1997) 62-66
37. Koutselini H, Mikou P, Tsambaos D, Kapranos N, Zografakis C, Brokalakis J, Berger H: Expression von p53 Protein in Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen der Haut. *Z Haut Geschlechtskr* 70 (1995) 191-194
38. Kubo Y, Urano Y, Asano T, Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuhara K, Arase S, Itakura M: P53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol* 102 (1994) 440-444
39. Lane DP: P53, guardian of the genome. *Nature* 358 (1992) 15-16
40. Lauritzen AF, Vejlsgaard GL, Hou-Jensen K, Ralfkiaer ER: P53 protein expression in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 133 (1995) 32-36
41. Loertzer H: Untersuchungen zur Bedeutung der bildanalytischen DNA-Zytophotometrie sowie des proliferationsassoziierten Ki-67 an Tumoren des exokrinen und endokrinen Pankreas. *Med. Diss., Univ. Halle-Wittenberg* (1997)

42. Lübke J, Kleihues P, Burg G: Das Tumorsuppressor-Gen p53 und seine Bedeutung für die Dermatologie. *Hautarzt* 45 (1994) 741-745
43. Lübke J, Reichel M, Burg G, Kleihues P: Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 102 (1994) 819-821
44. Magee JW, McCalmont TH, LeBoit PE: Overexpression of p53 tumor suppressor protein in porokeratosis. *Arch Dermatol* 130 (1994) 187-190
45. Mc Gregor JM, Yu CC, Dublin EA, Barnes DM, Levison DA, Mc Donald DM: P53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi. *Br J Dermatol* 128 (1993) 606-611
46. Mc Gregor JM, Yu CC, Dublin EA, Levison DA, MacDonald DM: Aberrant expression of p53 tumour-suppressor protein in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 127 (1992) 463-469
47. Mc Nutt NS, Saenz-Santamaria C, Volkenandt M, Shea CR, Albino AP: Abnormalities of p53 protein expression in cutaneous disorders. *Arch Dermatol* 130 (1994) 225-232
48. Mc Nutt NS, Shea CR, Volkenandt M, Lugo J, Prioleau PG, Albino AP: P53 protein expression is frequent in basal cell carcinomas. *Lab Invest* 66 (1992) 33a
49. McIntosh LM, Jackson M, Mantsch HH, Stranc MF, Pilavdzic D, Crowson AN: Infrared spectra of basal cell carcinomas are distinct from non-tumor-bearing skin components. *J Invest Dermatol* 112 (1999) 951-956

50. Moles JP, Moyret C, Guillot B, Jeanteur P, Guilhou J, Theillet C, Basset-Seguin N: P53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene* 8 (1993) 583-588
51. Nagano T, Ueda M, Ichihachi M: Expression of p53 protein is an early event in ultraviolet light-induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Arch Dermatol* 129 (1993) 1157-1161
52. Onodera H, Nakamura S, Sugai T: Cell proliferation and p53 protein expression in cutaneous epithelial neoplasms. *Am J Dermatopathol* 18 (1996) 580-588
53. Oram Y, Orengo I, Baer S, Ocal T: P53 expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-sun-exposed sites. *J Am Acad Dermatol* 31 (1994) 417-422
54. Ozturk M: P53, UV light and carcinogenesis. *Eur J Dermatol* 4 (1994) 503-505
55. Paus R, Menrad A, Czarnetzki BM: Nekrobiologie der Haut: Apoptose. *Hautarzt* 46 (1995) 285-303
56. Petzoldt D, Krutmann J: Hautkrebs, Sonnenschutz und DNS-Schäden. *Hautarzt* 48 (1997) 783-785
57. Petzoldt D, Krutmann J: Neue Erkenntnisse zur Basaliomentstehung. *Hautarzt* 47 (1996) 661-663
58. Rady P, Scieicariello F, Wagner R, Tyring SK: P53 mutations in basal cell carcinoma. *Cancer Res* 52 (1992) 3804-3806

59. Rees J: Genetic alterations in non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 103 (1994) 747-750
60. Rees J, Healy E: Molecular genetic approaches to non-melanoma and melanoma skin cancer. *Clin Exp Dermatol* 21 (1996) 253-262
61. Ro JS, Cooper PN, Lee JA, Quinn AG, Harrison D, Lane D, Horne CH, Rees JL, Angus B: P53 protein expression in benign and malignant skin tumours. *Br J Dermatol* 128 (1993) 237-241
62. Rook A, Wilkinson DS, Ebling FJG: Textbook of dermatology. 6<sup>th</sup> edition Blackwell Publishers, London, Oxford, Edinburgh, 1998, 1679-1687
63. Russel EB, Carrington PR, Smoller BR: Basal cell carcinoma: a comparison of shave biopsy versus punch biopsy techniques in subtype diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 41 (1999) 69-71
64. Sakatani S, Kusakabe H, Kiyokane K, Suzuki K: P53 mutations in squamous cell carcinoma occurring in scars. *Am J Dermatopathol* 20 (1998) 463-467
65. Shea CR, Mc Nutt NS, Volkenandt M, Lugo J, Prioleau PG, Albino AP: Overexpression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. *Am J Pathol* 141 (1992) 25-29
66. Sparrow LE, Soong R, Dawkins HJS, Iacopetta BJ, Heenan PJ: P53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 5 (1995) 93-100
67. Steck KD, Mc Donnell TJ, El-Naggar AK: Flow cytometric analysis of apoptosis and bcl-2 in human solid neoplasms. *Cytometry* 20 (1995) 154-161

68. Szekeres G, De Giacomoni P: Ki-67 and p53 expression in cutaneous Bowen's disease: an immunohistochemical study of fixed-embedded tissue sections. *Acta Derm Venereol* 74 (1994) 95-97
69. Taguchi M, Watanabe S, Yashima K, Murakami J, Sekiya T, Ikeda S: Aberrations of the tumor suppressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin. *J Invest Dermatol* 103 (1994) 500-503
70. Telfer NR, Colver GB, Bowers PW: Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 141 (1999) 415-423
71. Thiessen M, Neumann M, Schouten L: A systematic review of treatment modalities for primary basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 135 (1999) 1177-1183
72. Tomokova H, Fujimoto W, Arata J: Expression of the bcl-2 homologue bax in normal human skin, psoriasis vulgaris and non-melanoma skin cancers. *Eur J Dermatol* 8 (1998) 256-260
73. Tuthill RJ, McGillis ST, Guitart J, Bailin PL: DNA flowcytometry of basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 17 (1990) 322
74. Unteregger G: Quantitative und qualitative Bestimmung von Apoptose. *BIOforum* (1997) 680-683
75. Urano Y, Asano T, Yoshimoto K, Iwahana H, Kubo Y, Kato S, Sasaki S, Takeuchi N, Uchida N, Nakanishi H, Arase S, Itakura M: Frequent p53 accumulation in the chronically sun-exposed epidermis and clonal expansion of p53 mutant cells in the epidermis adjacent to basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 104 (1995) 928-932

76. Verhaegh ME, Sanders C, Arends JW, Neumann H: Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2 in non-melanoma skin cancer.  
Br J Dermatol 132 (1995) 740-744
77. Weinstein GD, Frost P: Cell proliferation in human basal cell carcinoma.  
Cancer Res 30 (1970) 724-728
78. Weiss J, Heine N, Körner B, Pilch H, Jung EG: Expression of p53 protein in malignant melanoma: clinicopathological and prognostic implications.  
Br J Dermatol 133 (1995) 23-31
79. Wikonkal NM, Berg RJW, van Haselen C, Horkay I, Remenyik E, Begany A, Hunyadi J, van Vloten W, De Gruijl F: Bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate in human nonmelanoma skin cancers.  
Arch Dermatol 133 (1997) 599-602
80. Yamamoto M, Takahashi H, Saitoh K, Horikoshi T, Takahashi M: Expression of the p53 protein in malignant melanomas as a prognostic indicator.  
Arch Dermatol Res 287 (1995) 146-151

## 7. Anhang

### 7.1. Stammdaten der verwendeten histologischen Präparate aufgeschlüsselt nach ihrer histologischen Diagnose

#### 7.1.1. Stammdaten der soliden Basaliome

Präp-Nr	/	Alter	p53	MG	5cER	DI
66	m	48	neg.	0.11	0	0.98
93	m	68	neg.	0.01	0	1
272	m	59	neg.	0.02	0	1
348	m	70	neg.	0.13	0	1.04
506	m	63	II-III	0.22	0	1.03
632	w	82	neg.	0.07	0	1.03
653	m	28	neg.	0.12	0	0.93
715	m	45	neg.	0.08	0	1.01
751	m	69	II-III	0.19	0	1.02
752	m	53	neg.	0.04	0	0.99
824	w	56	neg.	0.03	0	0.96
844	w	72	II-III	0.29	0	1.02
1053	w	60	neg.	0.04	0	1.07
1106	w	79	neg.	0.03	0	1
1199	w	74	I-II	0.05	0	0.98
1224	w	77	neg.	0.09	0	0.98
1227	w	66	neg.	0.06	0	1
1243	w	73	neg./I	0.18	0	1.04
1313	m	62	II-III	0.06	0	0.94
1323	m	58	II-III	0.18	0	1.05
1439	w	79	neg.	1.4	0.02	2.02
1498	m	69	neg.	0.15	0	0.98
1532	m	77	neg.	0.04	0	0.99
1553	m	74	I-II	0.12	0	1
1652	w	68	neg.	0.1	0	0.98
1760	m	65	neg.	0.07	0	0.98
1775	m	68	neg./I	0.09	0	1.06
1988	m	50	neg.	0.11	0	1.08
2132	w	64	III	0.19	0	1
2253	w	70	III	0.12	0	1.06
2254	w	70	neg.	0.11	0	1.01
2349	m	85	II	0.05	0	1.03
2434	m	71	III	0.17	0	1
2470	m	69	neg.	0.1	0	1.05
2543	m	79	neg.	0.09	0	0.99

## 7.1.2. Stammdaten der multilokulären superfiziellen Basaliome

<b>Präp-Nr</b>	<b>/</b>	<b>Alter</b>	<b>p53</b>	<b>MG</b>	<b>5cER</b>	<b>DI</b>
76	w	63	neg.	0.14	0	1.07
91	m	73	I-II	0.02	0	0.99
128	m	74	II-III	0.06	0	1.03
129	m	74	neg.	0.12	0	0.95
202	w	69	neg./I	0.15	0	1.03
207	w	87	II	0.23	0	1.09
215	m	74	II-III	1.15	0.07	1.57
216	m	74	neg.	0.12	0	1.02
218	m	55	I	1.56	0.05	2.02
219	m	55	II	0.6	0	1.04
220	m	55	III	0.73	0	1.02
254	w	79	neg.	0.03	0	1
260	w	55	I	0.04	0	0.97
294	m	69	neg.	0.04	0	0.98
349	m	70	neg.	0.05	0	0.96
410	m	63	neg.	0.15	0	0.99
622	w	65	neg.	0.1	0	0.94
623	w	65	neg.	0.03	0	0.97
633	m	61	neg.	0.04	0	1.03
652	m	28	neg.	0.12	0	1.05
710	m	57	neg.	0.09	0	0.95
818	w	37	neg.	0.18	0	1.01
852	m	72	II	0.05	0	0.98
879	m	68	neg.	0.04	0	1.02
988	m	57	neg.	0.12	0	0.98
1016	m	70	III	0.18	0	1
1033	w	90	I-II	0.14	0	0.97
1105	w	79	neg.	0.09	0	0.96
1201	m	63	I	0.05	0	0.96
1329	w	51	neg.	0.06	0	0.95
1507	w	87	neg.	2.03	0.13	1.9
1573	m	74	neg.	1.78	0.17	1.84
1574	m	74	neg.	0.11	0	1
1648	m	72	neg.	0.13	0	1.1
1899	w	65	II-III	0.11	0	1
1982	w	78	I	0.09	0	1
2022	w	82	neg.	0.08	0	1.05
2147	w	82	neg.	0.17	0	1.01
2209	m	77	neg.	0.03	0	0.99
2217	w	60	neg.	0.09	0	0.95
2255	w	70	II-III	0.11	0	0.99
2259	m	83	I	0.11	0	0.95

7.1.3. Stammdaten der ulzerierenden Basaliome

<b>Präp-Nr</b>	<b>/</b>	<b>Alter</b>	<b>p53</b>	<b>MG</b>	<b>5cER</b>	<b>DI</b>	<b>Histologie</b>
254	w	79	neg.	0.03	0	1	Ulcus rodens
710	m	57	neg.	0.09	0	0.95	Ulcus rodens
2255	w	70	II-III	0.11	0	0.99	Ulcus rodens
652	m	28	neg.	0.12	0	1.05	Ulcus terebrans

## 7.2. Verwendete Chemikalien

Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eiweißblocker Protein Block Serum-Free	Dako, Hamburg, Deutschland
p53 Antikörper p53 (Ab-6)	Oncogene Science, Cambridge, USA
Antikörperverdünnungsreagenz	Dako, Hamburg, Deutschland
biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper	Dako, Hamburg, Deutschland
Vectastain ABC-Kit Normal	Serva, Heidelberg, Deutschland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Puffer	Dako, Hamburg, Deutschland
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)	Sigma, St. Louis, USA
DAB	Sigma, St. Louis, USA
Mayer's Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerolgelatine	Sigma, St. Louis, USA
Rotisol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schiff'sches Reagenz	Sigma, St. Louis, USA
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliummetabisulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 7.3. Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Microtom Jung RM 2035	Leica Instruments, Bensheim, Deutschland
Adhäsivobjektträger	Merck, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank INCO 2	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, Frankfurt (M.), Deutschland
Cydok Bildanalyseesystem	Firma Carl H. Hilges, Königswinter, Deutschland
PAP Pen	Daido Sangyo, Japan
Lichtmikroskop Olympus BX 50 F4	Olympus Optical Co., LTD. , Tokio, Japan

## 8. Thesen

1. Das Basaliom stellt mit einer Inzidenzrate von ca. 100 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr den am häufigsten auftretenden epithelialen Tumor der Haut dar.
2. Aufgrund seiner pathobiologischen Merkmale nimmt das Basaliom eine Mittelstellung zwischen benignen und malignen Hauttumoren ein. Es wird deshalb auch als semimaligner Hauttumor bezeichnet.
3. Tumoren sind Erkrankungen, welche durch Mutationen von Genen entstehen. Das am häufigsten betroffene Gen ist das p53 Tumorsupressor-Gen.
4. Wildtyp p53-Protein besitzt eine Halbwertszeit von wenigen Minuten. Mutierte p53-Formen hingegen zeigen häufig eine deutlich längere Halbwertszeit.
5. Mutiertes p53 wurde immunhistochemisch in den untersuchten histologischen Schnittpräparaten nachgewiesen. Hierzu wurde als Antikörper DO7 verwendet.
6. Der DNS-Gehalt von Tumorzellen ist aufgrund von genetischen Veränderungen in malignen Geweben häufig gegenüber dem DNS-Gehalt von gesunden Zellen verändert.
7. Die Bildzytometrie ist eine geeignete Methode zur Bestimmung des DNS-Gehaltes. Mit dieser Methode können in histologischen Schnittpräparaten gezielt bestimmte Zellpopulationen vermessen werden. In jedem Präparat wurden mindestens 100 Tumorzellen und 30 Referenzzellen vermessen.

8. Es wurden 76 Basaliome in Abhängigkeit von ihrem histologischen Typ vergleichend bildzytometrisch und immunhistochemisch untersucht. Bei 7% der untersuchten Basaliome ließ sich bildzytometrisch ein aneuploider DNS-Gehalt nachweisen, 38% zeigten eine positive p53-Reaktion.
9. Im Vergleich von Ploidiestatus und immunhistochemischen p53 Nachweis zeigten von insgesamt vier aneuploiden multilokulären superfiziellen Basaliomen nur zwei eine positive p53-Reaktion. Alle übrigen Basaliome waren unabhängig von ihrem histologischen Typ p53 negativ, bzw. alle p53-positiven Basaliome zeigten einen euploiden DNS-Gehalt.
10. Die Ergebnisse von vergleichbaren Studien mit erheblich geringerer Fallzahl differieren sehr stark. Ursache für die starke Schwankungsbreite der Ergebnisse können die biologische Spezifität des Tumormaterials, die unterschiedlichen Fixierungsverfahren sowie die Spezifität und Sensitivität der verwendeten Antikörper sein.
11. Es ließ sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Nachweis von mutiertem p53 und dem Ploidiestatus der untersuchten Basaliome nachweisen.
12. Die Frage der Bedeutung der Bildanalyse und des immunhistochemischen p53-Nachweises für eine zukünftige Diagnostik und Prognosebeurteilung kann nicht beantwortet werden. Auch kann aus diesen Befunden keine sichere Differenzierung zwischen klinisch aggressiv und weniger aggressiv wachsenden Basaliomen abgeleitet werden.

13. Die Entwicklung und der Einsatz neuer Therapiestrategien hängen von der besseren Kenntnis der Mechanismen der Zellzyklus- und Apoptosekontrolle dieser Tumoren ab. Trotz der Vielzahl der heute bereits bekannten Faktoren lassen sich angesichts unseres mangelnden Verständnisses der Apoptoseregulation neue, heilende Therapien aus der molekulargenetischen Ursachenforschung bisher nur unzureichend verwirklichen.

## Lebenslauf

Name: Christiane Wohlrab (geb. Faßhauer)

Geburtstag: 03.08.1971 in Halle/Saale

Familienstand: verheiratet mit Dr. med. David Wohlrab

Eltern: Dr. med. Edeltraud Faßhauer, Ärztin  
Wilhelm Faßhauer, Diplomphysiker

Geschwister: Mathias Faßhauer

Ausbildung: 1978 - 1986  
Polytechnische Oberschule, Halle/S.  
1986 - 1990  
Erweiterte Oberschule, Halle/S. (Abitur)  
1990- 1991  
Vorpraktikum  
1991 - 1996  
Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
1996 - 1997  
Praktisches Jahr an der Medizinischen Fakultät der Martin-  
Luther-Universität Halle-Wittenberg und am St. Elisabeth-  
Krankenhaus Halle - Neurologie (Prof. Dr. S. Zierz)  
- Innere Medizin (Prof. Dr. B. Osten)  
- Chirurgie (CA Dr. Wöllenweber)  
Jan. 1998- Juni 1999  
Tätigkeit als Ärztin im Praktikum an der Klinik für Neurologie  
des Städtischen Krankenhauses Martha Maria Halle-Dölau bei  
Herrn CA Dr. med. F. Hoffmann  
seit Juli 1999  
Tätigkeit als Assistenzärztin an der Klinik für Neurologie  
des Städtischen Krankenhauses Martha Maria Halle-Dölau

## **Erklärung**

Hiermit versichere an Eides statt, die vorliegende Dissertation

**„ P53 – Expression und DNS – Ploidie bei Basaliomen verschiedener  
Wachstumstypen“**

selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu  
haben.

Halle/Saale, im Mai 2000

Christiane Wohrab

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation

**„ P53 – Expression und DNS – Ploidie bei Basaliomen verschiedener  
Wachstumstypen“**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.) erstmalig  
einreiche.

Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Halle/Saale, im Mai 2000

Christiane Wohrab

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Ch. Marsch für die Überlassung des Themas, das Heranführen an die Problematik, seine Hilfe bei der Durchführung der Experimente und die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

In besonderem Maße bin ich Frau Fickert, Frau Herfurth sowie Frau Hölsken zu Dank verpflichtet, die durch ihre beratende Hilfe ganz entscheidend zum Gelingen des experimentellen Teils der Arbeit beigetragen, mich sehr unterstützt und angespornt haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Klapperstück für die freundliche Einweisung am Bildzytophotometer und die zahlreichen Hinweise und Ratschläge.

Herrn Dr. H. Bahn (Pathologisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) bin ich für die Bereitstellung der p53-Positivkontrollen, für die vielen Anregungen und die fachliche sowie engagierte Unterstützung zu Dank verpflichtet.