

**Die diagnostische Bedeutung des  
„Invasionsfaktors“ Laminin-5 in  
prämaligen und malignen Läsionen der  
Cervix uteri**

**Dissertation**

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

**vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Katharina Kühne

geboren am 12.01.1979 in Jena

## Gutachter

1. Prof. Dr. med. H. Kosmehl, Jena
2. PD Dr. rer. nat. A. Berndt, Jena
3. Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Kriegsmann, Trier

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19.12.2006



## Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ACIS	Adenocarcinoma in situ
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
BM	Basalmembranabbruch – diskontinuierliche immunhistochemische Darstellung der Basalmembranregion mittels monoklonalem Antikörper D4B5
CIN	<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i> , zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIS	Carcinoma-in-situ
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EHS-Tumor	Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
HGSIL	High-grade Squamous Intraepithelial Lesion
HBSS	<i>Hanks' buffered salt solution</i> , Hanks' gepufferte Salzlösung
HE	Hämalaun-Eosin
HPV	Humanes Papilloma Virus
IF	Invasionsfront
LGSIL	Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion
Ln-5	Laminin-5
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT-MMP	Membrangebundene Matrix-Metalloproteinase
PAP	Papanicolaou-Test
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
SD	Stromadeposition – immunhistochemische extrazelluläre Expression, dargestellt mittels monoklonalem Antikörper D4B5
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TZ	Transformationszone
TZK	Tumorzellkomplex
UICC	Union International Against Cancer
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
ZR	Zelluläre Retention – immunhistochemische zytoplasmatische Expression, dargestellt mittels monoklonalem Antikörper D4B5

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
2.1. Vorkommen und Pathogenese des Zervixkarzinoms .....	9
2.2. Morphologische Klassifikation des Zervixkarzinoms.....	10
2.2.1. <i>Morphologische Vorläuferläsionen des Plattenepithelkarzinoms</i> .....	11
2.2.2. <i>Karzinome der Zervix</i> .....	13
2.3. Die Basalmembran als Bestandteil der extrazellulären Matrix .....	15
2.3.1. <i>Definition und Komposition der extrazellulären Matrix</i> .....	15
2.3.2. <i>Struktur und Funktion der Basalmembran</i> .....	15
2.3.3. <i>Die Basalmembran in epithelialen Tumoren</i> .....	17
2.4. Die Molekülfamilie der Laminine .....	18
2.4.1. <i>Allgemeiner Aufbau der Laminine</i> .....	19
2.4.2. <i>Besonderheiten im Aufbau von Laminin-5</i> .....	19
2.4.3. <i>Laminin-5 - Schlüsselprotein der Adhäsion</i> .....	20
2.4.4. <i>Der Migrationsfaktor Laminin-5</i> .....	20
2.4.5. <i>Die Bedeutung von Laminin-5 für die Tumorinvasion</i> .....	21
2.5. Zielstellung.....	22
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1. Patientendaten .....	23
3.2. Gewinnung und Aufbereitung des Gewebes .....	23
3.2.1. <i>Fixierung, Paraffineinbettung und konventionelle Histologie</i> .....	23
3.2.2. <i>Kryokonservierung</i> .....	24
3.3. Klassifikationsprinzipien der prämaligen und malignen Zervixläsionen.....	24
3.3.1. <i>Klassifikation der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN)</i> .....	24
3.3.2. <i>Klassifikation der Karzinome</i> .....	25
3.4. Immunhistochemie .....	30
3.4.1. <i>Lichtmikroskopische Detektion der immunhistochemischen Laminin-5 <math>\gamma</math>2 Ketten-Expression mittels APAAP-Methode</i> .....	30
3.4.2. <i>Lichtmikroskopische Bewertung der Immunreaktion</i> .....	32

3.4.3. Immundoppelmarkierung für die Lichtmikroskopie .....	33
3.4.4. Immunfluoreszenzdoppelmarkierung .....	34
3.5. Nachweis der Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette mittels Western-Blot .....	34
3.5.1. Herstellen von Gewebelysaten .....	34
3.5.2. SDS-PAGE .....	35
3.5.3. Tankblot / Immundetektion .....	35
3.6. Statistische Analyse .....	36
3.6.1. Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung .....	36
3.6.2. Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson .....	37
3.6.3. Vier-Felder-Test ( $\chi^2$ -Test) .....	37
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
4.1. Qualitative Bewertung der immunhistochemischen Expression der Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette in Bezug zum histologischen Kontext .....	38
4.1.1. Demonstration der Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette am histologischen Routinematerial der Zervix .....	38
4.1.2. Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression in normaler, metaplastischer und entzündlich-veränderter Zervix .....	38
4.1.3. Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression bei CIN-Läsionen .....	39
4.1.4. Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression im Zervixkarzinom .....	40
4.1.4. Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression im Zervixkarzinom .....	41
4.2. Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5 $\gamma$ 2 Expression in Abhängigkeit von der histologischen Diagnose .....	45
4.3. Analyse der mittels Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung dargestellten Kolo-kalisation von Faktor VIII und dem monoklonalen Antikörper D4B5 .....	50
4.4. Western Blot .....	51
4.5. Statistische Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression .....	53
4.5.1. Korrelation von Laminin-5 Expressionsphänomenen mit Grading und pT-Kategorie .....	53
4.5.2. Abhängigkeit zwischen Laminin-5 Expressionsphänomenen und pN1+, cM1-Kategorie .....	53
4.5.3. Zusammenhang zwischen dominierendem Expressionsphänomen und Grading/pT-Kategorie/Metastasierung beim Zervixkarzinom .....	53

4.5.4. <i>Abhängigkeit zwischen Laminin-5 positiven subepithelialen Gefäßstrukturen und Laminin-5 Expression in CIN-Läsionen und mikroinvasivem Karzinom</i> .....	54
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>55</b>
5.1. Die Rolle von Laminin-5 in der Invasionsbiologie .....	55
5.1.1. <i>Die Bedeutung der prozessierten- und nicht-prozessierten Form der Laminin-5 <math>\gamma</math>2-Kette</i> .....	55
5.2. Die Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette im Zervixkarzinom.....	56
5.2.1. <i>Differenzierte intra- und extrazelluläre Visualisierung der Laminin-5 <math>\gamma</math>2-Ketten unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5</i> .....	56
5.2.2. <i>Die Rolle der intrazellulären Expression</i> .....	57
5.2.3. <i>Nachweis und Bedeutung der Stromadeposition beim Zervixkarzinom</i> .....	58
5.2.4. <i>Basalmembrandiskontinuitäten trennen eindeutig zwischen prämaligener und invasiver Zervixläsion</i> .....	58
5.2.5. <i>Fehlende Laminin-5 <math>\gamma</math>2-Ketten Expression als Indikator neuroendokriner Differenzierung</i> .....	59
5.2.6. <i>Laminin-5 kennzeichnet die räumliche Dynamik der Tumorprogression</i> .....	60
5.3. Laminin-5 – ein Marker der Invasion beim Zervixkarzinom? .....	60
5.4. Laminin-5 – ein Indikator der Metastasierung beim Zervixkarzinom? .....	61
5.5. Laminin-5 markiert die Invasionsbereitschaft prämaligener Zervixläsionen .....	62
5.6. Laminin-5 - eine Leitschiene für die Tumorangioneogenese? .....	63
5.7. Einsatzmöglichkeiten des monoklonalen Antikörpers D4B5 in der zervikalen Routinediagnostik.....	64
5.8. Potentielle klinische Einsatzmöglichkeiten von Laminin-5 .....	65
<b>6. Schlussfolgerungen.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>80</b>

# 1. Zusammenfassung

Die Invasion neoplastischer Zellen erfordert zum einen das Durchbrechen der Basalmembran, zum anderen die Fähigkeit zu Migration und Adhäsion an extrazelluläre Matrixbestandteile wie Laminine, Fibronektine oder Kollagene zur weiteren Ausbreitung im Stroma.

Als Protein der extrazellulären Matrix spielt das heterotrimere Molekül Laminin-5 ( $\alpha3\beta3\gamma2$ ) zum einen als Bestandteil des epithelialen Adhäsionskomplexes bei der Verankerung epithelialer Zellen an der Basalmembran eine Schlüsselrolle, zum anderen stellt die durch Matrix-Metalloproteinasen prozessierte  $\gamma2$ -Kette einen potenten Migrationsfaktor dar, welcher unter anderem im Rahmen der Wundheilung von Bedeutung ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die detaillierte qualitative sowie semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma2$ -Ketten Expression bei prämaligen und malignen Läsionen der Zervix unter Verwendung des paraffingängigen, monoklonalen Antikörpers D4B5, welcher die Laminin-5  $\gamma2$ -Kette prozessiert und nicht-prozessiert, im ungekoppelten Zustand als auch in Kombination mit der  $\beta3$ - oder  $\alpha3$ -Kette erkennt.

Für die immunhistochemische Markierung standen insgesamt 283 paraffineingebettete, formalinfixierte Gewebeproben zur Verfügung, im einzelnen 120 CIN-Läsionen, 128 Plattenepithel-, 26 Adenokarzinome sowie 4 neuroendokrine Zervixkarzinome.

Unter erstmaliger Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 bei zervikalen Läsionen stellte sich im ruhenden Epithel die Basalmembran kontinuierlich scharf dar. Bei den prämaligen und malignen Läsionen traten zusätzlich folgende Modulationen der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma2$ -Ketten Expression auf:

1. eine Expression im Zytoplasma invadierender Tumorzellen (zelluläre Retention),
2. Nachweis im Bereich des die Invasionszone umgebenden Stromas (Stromadeposition),
3. ein Verlust der Darstellbarkeit der Basalmembran (Basalmembranabbruch),

letztere hier erstmalig bei Zervixläsionen beschrieben.

Die Bifunktionalität von Laminin-5 als Ankerprotein und Migrationsfaktor wird dadurch vollständig erfasst und nachvollziehbar dargestellt, wobei die histologische Lokalisation Rückschlüsse auf die Funktion erlaubt.

Eine kontinuierliche Darstellung der Basalmembran mittels Laminin-5  $\gamma2$ -Ketten-Antikörper lässt auf einen intakten epithelialen Adhäsionskomplex schließen, welcher aufgrund seiner hohen Stabilität eine Invasion ausschließt, sodass mittels Laminin-5 Färbung zwischen prämaligener und invasiver Läsion unterschieden werden kann.

Die Differenzierung zwischen hochgradiger CIN-Läsion und mikroinvasivem Karzinom ist oftmals im H&E-Schnitt schwierig. Mittels des monoklonalen Antikörper D4B5 ließen sich karzinomtypische intra- und extrazelluläre Modulationen der Laminin-5 Expression regelmäßig auch bei einem Teil der höhergradigen CIN-Läsionen beobachten. Damit kann vor dem Hintergrund der tumorbiologischen Bedeutung der  $\gamma$ 2-Kette als Migrationsfaktor von einem erhöhten Invasionsrisiko ausgegangen und Laminin-5 als ein sensitiver Marker für die Invasionsbereitschaft einer Läsion postuliert werden mit potentiellen Einsatzmöglichkeiten auch in der Zervixzytologie.

Eine komplett fehlende immunhistochemische Expression der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette zeigten neuroendokrine Karzinome der Zervix, ebenfalls hier erstmalig beschrieben. Dieses exklusiv in neuroendokrinen Karzinomen nachweisbare immunhistochemische Phänomen kann die histologische Diagnosefindung unterstützen sowie als Marker für diesen Karzinomtyp postuliert werden. Es lässt weiterhin vermuten, dass nicht alle Zervixkarzinome Laminin-5 für die Invasion nutzen und verschiedene Invasionsmechanismen mit einer individuellen Utilisierung extrazellulärer Matrixmoleküle existieren.

Mittels Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte meines Wissens nach erstmalig eine Kolo-kalisation von Faktor VIII und dem monoklonalen Antikörper D4B5 in subepithelialen Gefäßstrukturen bei einem Teil der CIN-Läsionen sowie der mikroinvasiven Plattenepithelkarzinome aufgezeigt werden. Die Translokation von Laminin-5 in Endothelzellen lässt vermuten, dass Laminin-5-haltige Matrixprotein-Komplexe neuformierte Kapillarsprossen zu invadierenden Tumorzellen hinführen und Laminin-5 eine potentielle Leitschiene der Tumorangiogenese darstellt.

Eine Assoziation der immunhistochemischen Laminin-5 Expression zu pT-Kategorie, Differenzierungsgrad oder nodaler Metastasierung blieb in der vorliegenden Studie ohne ausreichende statistische Signifikanz. Damit ist Laminin-5 nicht zur Erfassung einer Individualprognose geeignet.

Zusammenfassend lässt sich anhand der intra- und extrazellulären Modulationen der immunhistochemischen Laminin-5 Expression die Bedeutung des Proteins als potenter migrationsfördernder Faktor im histopathologischen Kontext zervikaler Läsionen bestätigen. Erwartungen in Laminin-5 bezüglich seiner diagnostischen als auch prognostischen Bedeutung dürfen sicher nicht überschätzt werden, da die Laminin-5- $\gamma$ 2-Ketten-vermittelte Migration neoplastischer Zellen nur einen einzelnen Schritt innerhalb des komplexen Prozesses von Invasion und Metastasierung darstellt.

## 2. Einleitung

### 2.1. Vorkommen und Pathogenese des Zervixkarzinoms

Das Zervixkarzinom stellt die zweithäufigste Krebserkrankung der Frau weltweit dar mit geschätzten 493.000 Neuerkrankungen, davon 83% in den Entwicklungsländern, sowie 274.000 Todesfällen pro Jahr (Parkin et al. 2005). Die Mortalität des Zervixkarzinom ist deutlich niedriger als seine Inzidenz mit einer Mortalität zu Inzidenz Ratio von weltweit 55% (Abbildung 1; Parkin et al. 2005). Neben der unterschiedlichen geographischen Prävalenz von Risikofaktoren konnten Inzidenz und Mortalität insbesondere des Plattenepithelkarzinom in Europa aufgrund der Einführung effektiver Screening-Programme mittels PAP-Test in den 1970er Jahren bedeutsam gesenkt werden (Bray et al. 2005). Dennoch gehört Deutschland zu den Ländern mit der höchsten Inzidenz (14,7 Neuerkrankungen auf 100.000 Frauen) und Mortalität (7,1 auf 100.000 Erkrankte) in Westeuropa (van Ballegooijen et al. 2000, Anttila et al. 2004).

Das Zervixkarzinom und seine Präkanzerosen sind typischerweise Erkrankungen der jüngeren Frau. So werden 60% aller Karzinome zwischen dem 30. und 55. Lebensjahr diagnostiziert (Dudenhausen et al. 1999).

Die Hauptstufen der Karzinogenese umfassen dabei HPV-Infektion, virale Persistenz, Progression des infizierten Epithel zu präkanzerösen Vorläuferläsionen, den sog. zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) sowie die Invasion des karzinomatösen Gewebes.

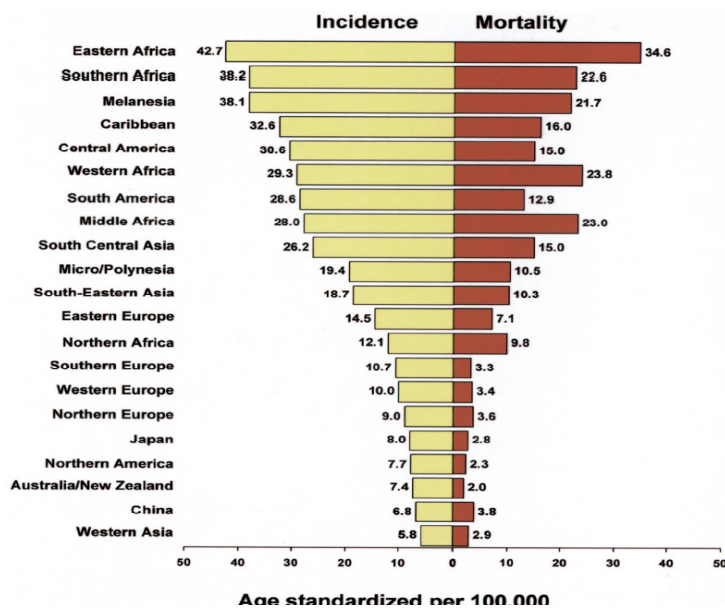
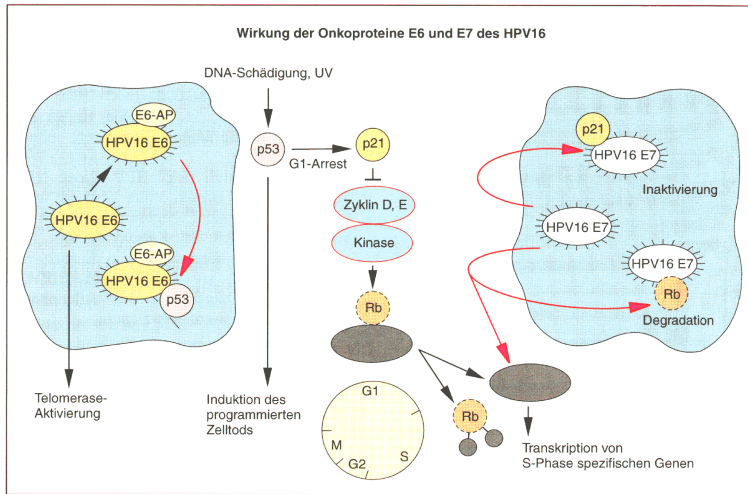


Abb. 1: Alters-standardisierte Inzidenz und Mortalität des Zervixkarzinoms auf 100.000 Frauen (Modifiziert nach Parkin et al. 2005).

Das biologische Verhalten einer CIN-Läsion, dem Vorläufer des invasiven Plattenepithelkarzinom, wird sowohl durch Progression, aber auch durch Persistenz und Regression bestimmt. So entwickeln sich weniger als 5 von 100 mittelschweren Dysplasien (PAP-III/IIIId) zu einem invasiven Karzinom weiter ([www.dimdi.de/dynamic/de](http://www.dimdi.de/dynamic/de)).



**Abb. 2: Wirkung der Onkoproteine E6 und E7 des Hochrisiko-HP-Virus Typ 16 (Modifiziert nach Dudenhausen et al. 1999).**

Onkogene Subtypen des humanen Papillomvirus (HPV) spielen bei der Karzinogenese eine entscheidende Rolle (Bosch et al. 2002). Dabei korreliert die Prävalenz allgemein mit dem Zervixkarzinom-Risiko einer Population (Munoz et al. 1992, Pham et al. 2003). Insbesondere eine Infektion mit dem HPV-Typ 16, welcher seine Wirkung über

die Onkoproteine E6 und E7 vermittelt (Abbildung 2), aber auch mit HPV-18 beinhaltet das Risiko der Entwicklung einer höhergradigen zervikalen Dysplasie (Bulkmans et al. 2005).

Meistens erfolgt eine immunologische Verarbeitung der HPV-Infektion ohne Erkrankung. Das Karzinom-Risiko nach Infektion wird wahrscheinlich modifiziert durch weitere Kofaktoren wie Immunsuppression (HIV-Infektion), Strahlenbelastung, sozioökonomischer Status, Multiparität und Sexualverhalten (häufiger Partnerwechsel, frühe erste Kohabitation). Die Bedeutung von Nikotinabusus sowie Langzeitandwendung oraler Kontrazeptiva erfährt unterschiedliche Bewertungen (Shields et al. 2004, Hellberg und Stendahl 2005, McIntyre-Seltman et al. 2005).

Für die definitive Diagnose des Zervixkarzinoms ist die histologische Untersuchung erforderlich. Diese liefert Aussagen zum histopathologischen Typ, Malignitätsgrad, Lokalisation und Größe des Tumors. Insbesondere die Abgrenzung der hochgradigen Dysplasie zum frühinvasiven Karzinom hat weitreichende therapeutische Konsequenzen für die Patientin. Die histologische Diagnose stellt somit die Basis für Therapieentscheidungen und lässt Rückschlüsse auf die Prognose zu.

## 2.2. Morphologische Klassifikation des Zervixkarzinoms

Die histopathologische Einteilung des Zervixkarzinom erfolgt nach der WHO Klassifikation der Tumoren des weiblichen Genitaltraktes. Zirka 80% stellen dabei Plattenepithelkarzinome, 15% Adenokarzinome der Zervix dar. Die restlichen 5% verteilen sich auf neuroendokrine Karzinome sowie sekundäre Tumoren (Kurman 1994). Weiterhin unterscheidet man beim Zervixkarzinom exophytisches (80%) von endophytischem (20%) Wachstum.



Als morphologische Vorläuferläsion gilt für das Plattenepithelkarzinom die sogenannte *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN). CIN-Läsionen nehmen ihren Ausgang in der zervikalen Transformationszone, welche durch eine altersabhängige Verschiebung bei jüngeren Frauen die Portiooberfläche, in der Prä- und Postmenopause die tiefe Endozervix darstellt. Diese ist besonders empfindlich für onkogene Stimuli, wie Infektionen mit Hochrisiko-HPV-Viren (Typ 16, 18, 45, 56).

### **2.2.1. Morphologische Vorläuferläsionen des Plattenepithelkarzinoms**

1973 führte Richart den Begriff der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) ein (Richart 1973). CIN-Läsionen umfassen HPV-induzierte dysplastische Epithelveränderungen der Transformationszone sowie das Carcinoma in situ und beschreiben somit die Vorläuferläsionen des zervikalen Plattenepithelkarzinoms. Sie sind charakterisiert durch abnorme zelluläre Proliferation und Reifung, zytologische und nukleäre Atypien mit hyperchromatischen, polymorphen Nuklei sowie einem gesteigerten Kern-Zytoplasma Verhältnis.

Die klassische semiquantitativ dreistufige Einteilung der CIN (Tabelle 1) beruht auf dem Anteil des Epithels, der von basaloiden, undifferenzierten Zellen mit Verlust epithelialer Reifung und Glykogenisierung eingenommen wird (Richart 1973). Zunehmend wird das diagnostische Kontinuum CIN-Läsion auch zweistufig in niedrig- und hochgradige CIN eingeteilt. Auch die Bethesda Nomenklatur unterteilt zweistufig in niedrig-gradige (LGSIL) und hochgradige squamöse intraepitheliale Läsionen (HGSIL), wobei erstere HPV-assoziierte Papillome sowie Kondylome zusätzlich beinhaltet (Tavassoli und Devilee 2003; Tabelle 2).

**Tabelle 1: Morphologische Unterscheidungskriterien der CIN-Läsionen (Modifiziert nach WHO Classification of Tumours; Tavassoli und Devilee 2003)**

<b>Merkmal</b>	<b>CIN 1</b>	<b>CIN 2</b>	<b>CIN 3</b>
<b>Ausreifung</b>	Obere zwei Epitheldrittel	Obere Epithelhälfte	Oberes Epitheldrittel bzw. nicht vorhanden
<b>Zelluläre Atypie</b>	Unteres Epitheldrittel; Koilozytose oberes Drittel	Unteres bis mittleres Epitheldrittel	Gesamte Epithelbreite
<b>Nukleäre Atypien</b>	Wenig, in allen Schichten	Regelmäßig, in allen Epithelschichten	Zahlreich, in allen Epithelschichten
<b>Mitotische Figuren</b>	Wenig, basales Epitheldrittel	Regelmäßig, basal und parabasal	Zahlreich, in allen Epithelschichten.

**Tabelle 2: Klassifikation der HPV-induzierten intraepithelialen Läsionen der Zervix (Modifiziert nach WHO Classification of Tumours; Tavassoli und Devilee 2003)**

Bezeichnung	HPV-onkogenes Potential	Vergleich der Klassifikationssysteme		
		Zweistufige CIN	Dysplasie/CIS	SIL
Exophytisches Kondylom	Niedrig			LGSIL
Squamöses Papillom	Niedrig			LGSIL
Flaches Kondylom	Niedrig + Hoch			LGSIL
CIN 1	Niedrig + Hoch	Niedriggradige CIN	Niedriggradige Dysplasie	LGSIL
CIN 2	Hoch	Hochgradige CIN	Mittelgradige Dysplasie	HGSIL
CIN 3	Hoch	Hochgradige CIN	Hochgradige Dysplasie/CIS	HGSIL

Als Äquivalent des Carcinoma in situ repräsentiert das Adenocarcinoma in situ (ACIS) hochgradig dysplastische Veränderungen im endozervikalen Zylinderepithel. Der Begriff ACIS wurde durch Friedell geprägt (Friedell und Mc. Kay 1953). Dabei unterscheidet man die atypische endozervikale Hyperplasie von einem ACIS. Die atypische endozervikale Hyperplasie ist geprägt durch hyperchromatische Nuklei mit wenig mitotischen Figuren, minimale Pseudostratifizierung sowie fehlende kribriiforme Abschnitte. In über 90% der zervikalen ACIS Läsionen konnten ebenfalls onkogene HPV nachgewiesen werden, wobei auch hier HPV-Typ 18 eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Farnsworth et al. 1989, Higgins et al. 1992). Tabelle 3 fasst die Eigenschaften des ACIS zusammen.

**Tabelle 3: Morphologische Eigenschaften des ACIS (Modifiziert nach Blaustein's Pathology of the female genital tract; Kurman 1994)**

Merkmal	Adenocarcinoma in situ (ACIS)
HPV-Typ	Anogenitale HPV (Typ 18)
Charakteristik	Zytoplasma stark reduziert, wenig intrazelluläres Muzin, Pseudostratifizierung, komplexe papilläre Faltungen, fokal kribriiform, keine Zeichen einer Invasion
Subtypen	Endozervikal, intestinal; endometrioid, Klarzelltyp
Lokalisation	Endozervikale Drüsen
Differentialdiagnosen	Reparative/reaktive glanduläre Atypien (Entzündung/Bestrahlung/virale Infektion) Mikroglanduläre Hyperplasie, Endometriose, tubale Metaplasie, mesonephrische remnants, invasives Adenokarzinom

### **2.2.2. Karzinome der Zervix**

Die histopathologische Einteilung des Zervixkarzinoms erfolgt nach der WHO Klassifikation der Tumoren des weiblichen Genitaltraktes.

Des weiteren besteht für das Zervixkarzinom eine international gültige Stadieneinteilung, die sog. FIGO-Klassifikation bzw. die TNM Klassifikation, die auf der klinisch-pathologischen Ausbreitung des Karzinoms basieren und zugleich Hinweise auf die Prognose geben.

#### **2.2.2.1. Das mikroinvasive Plattenepithelkarzinom**

Hierbei handelt es sich um Karzinome mit einer maximalen Ausdehnung von 5 mm in der Tiefe sowie 7 mm in der Horizontale. Das mikroinvasive Karzinom zeichnet sich durch fokalen Basalmembranverlust, unregelmäßig konturierte Invasionsknospen sowie häufig eine begleitende lymphoplasmazelluläre Stromainfiltration aus. Nach FIGO-Klassifikation kann eine lymphovaskuläre Infiltration vorliegen. Wichtigste Differentialdiagnose stellt die hochgradige CIN-Läsion dar.

Für die Prognose sind das Ausmaß der Stromainvasion, das Vorhandensein lymphovaskulärer Infiltrationen, das Tumolvolumen sowie der Status der Resektionsränder bedeutsam. Dabei steigt mit zunehmender Invasionstiefe der Anteil der Patientinnen mit positivem Lymphknotenbefall (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Lymphknotenbefall beim frühinvasiven Zervixkarzinom in Abhängigkeit von der Stromainvasion (Modifiziert nach Kurman 1994)**

<b>Invasionstiefe (mm)</b>	<b>Nachweis positiver Lymphknoten (%)</b>
≤ 3	0,5
3,1 – 5	5,3
5,1 – 10	15,8
10,1 – 15	23,5
15,1 – 20	38

#### **2.2.2.2. Das invasive Plattenepithelkarzinom**

Die Einteilung der Plattenepithelkarzinome erfolgt ihrer Fähigkeit zur Keratinperlenbildung nach in keratinisierend und nicht keratinisierend, scharf abgegrenzt zum kleinzelligen Karzinom mit neuroendokriner Differenzierung. Zum anderen wird dem Karzinom ein Grad der epithelialen Differenzierung auf Grundlage der modifizierten Broders Methode (Broders 1920) zugeordnet mit Unterteilung in gut- (keratinisierend), mäßig-, schlecht- sowie undifferenziert, wobei zirka 60% der Karzinome mäßig-differenziert sind, gefolgt von schlecht

und gut differenzierten (Tavassoli und Devilee 2003). Die prognostische Signifikanz der Differenzierung ist noch nicht endgültig geklärt.

Mikroskopisch gesehen sind Zervixkarzinome sehr heterogen, häufig charakterisiert durch anastomosierende zungenartige Ausläufer oder Nester und Trabekel neoplastischen Epithels, die das umgebende Stroma infiltrieren. Zentral gelegene Abschnitte werden dabei nekrotisch oder keratinisieren. Andere Tumoren invadieren das Stroma mit großen Massen plattenepithelial-differenzierter neoplastischer Zellen. Begleitende höhergradige CIN-Läsionen finden sich häufig an der Oberfläche oder am Rand kleiner Tumoren.

#### *2.2.2.3. Das Adenokarzinom*

Die Gruppe der Adenokarzinome stellt sich ebenfalls heterogen dar, wobei die histologische Klassifikation auf dem jeweils dominierenden Zelltyp beruht. Am häufigsten findet sich das muzinöse Adenokarzinom (Kleine et al. 1989), welches weiter in einen endozervikalen und intestinalen Typ unterteilt wird. Die Bestimmung des Differenzierungsgrades erfolgt anhand des soliden Anteiles des Tumor in Abgrenzung zum glandulär differenzierten in gut (<10% soliden Anteile), mäßig (11-50% solide), schlecht (>50% solide) und undifferenziert.

#### *2.2.2.4. Das neuroendokrine Karzinom*

Neuroendokrine Karzinome der Zervix sind selten, jedoch durch eine schlechte Prognose und frühzeitige nodale sowie Fernmetastasierung gekennzeichnet (Schmidt et al. 2005). Nach der aktuellen WHO-Klassifikation unterscheidet man dabei hauptsächlich kleinzellige („oat cell“), großzellige neuroendokrine Karzinome, ferner auch das Karzinoid und atypische Karzinoid (Tavassoli und Devilee 2003). Für die Diagnosestellung muß dabei mindestens ein neuroendokriner Marker, Chromogranin, Synaptophysin oder NSE, exprimiert werden. Häufig findet sich eine Assoziation mit einer Hochrisiko-Typ HPV-Infektion, bevorzugt HPV-Typ 18 und 16.

## **2.3. Die Basalmembran als Bestandteil der extrazellulären Matrix**

### **2.3.1. Definition und Komposition der extrazellulären Matrix**

Die extrazelluläre Matrix, das komplexe Makromolekülsystem des Interzellularraumes, setzt sich aus Proteoglykanen und Faserproteinen zusammen. Proteoglykane bilden die stark wasserhaltige Grundsubstanz, die sich wie eine semipermeable Membran verhält und Grundlage für die Diffusion von Nährstoffen, Metaboliten, Zytokinen etc. ist. Faserproteine, welche strukturbildende Proteine (Kollagen, Elastin) und Anheftungsproteine (Fibronectin, Laminin, Tenascin) umfassen, betten sich geflechtartig in diese Grundsubstanz ein (Timpl und Aumailley 1989).

Die extrazelluläre Matrix greift direkt in die Regulation von Wachstum, Differenzierung, Regeneration und Apoptose ein und steht somit in komplexer Interaktion mit der Zelle. In Abhängigkeit von Differenzierungsgrad und spezifischer Funktion synthetisieren Zellen ihre umgebende extrazelluläre Matrix individuell (Kosmehl et al. 1996), wobei die Matrixkomponenten wiederum selbst Zellproliferation und -differenzierung modulieren (Bissell et al. 1982, Bissell und Ram 1989).

Die adhäsive Interaktion der extrazellulären Matrix mit der Zelle ist wesentlich für Zellmorphogenese und Aufrechterhaltung der Integrität eines Organismus. Integrine, heterodimere Glykoproteine der Zelloberfläche, dienen dabei als transmembranäre Membranrezeptoren, die sowohl epitheliale Zell-Matrix-Haftverbindungen als auch die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln (Hynes 1987, Hynes 1992) und somit entscheidend an Zellmorphologie, -adhäsion und -motilität beteiligt sind (Bretscher 1996).

Die extrazelluläre Matrix kann in unterschiedlicher Weise in Erscheinung treten, entweder in Form eines fibrillären Netzwerkes, in dem die verschiedenen Zelltypen eingebettet sind, oder hochorganisiert in Form der Basalmembran.

### **2.3.2. Struktur und Funktion der Basalmembran**

Die Basalmembran wird als spezialisierte, hochorganisierte Region der extrazellulären Matrix angesehen (Bosman et al. 1989). Ihre Darstellung kann lichtmikroskopisch mittels Versilberung, unter Anwendung der PAS-Reaktion (Sorokin und Hoyt 1978), mittels elektronenmikroskopischer Methoden oder durch den immunhistochemischen Nachweis Basalmembran-assoziiierter Substanzen erfolgen.

Elektronenmikroskopisch lässt sich der ultrastrukturelle Aufbau der Basalmembran nachvollziehen mit Einteilung in die direkt an die Basalzellen angrenzende Lamina rara, die

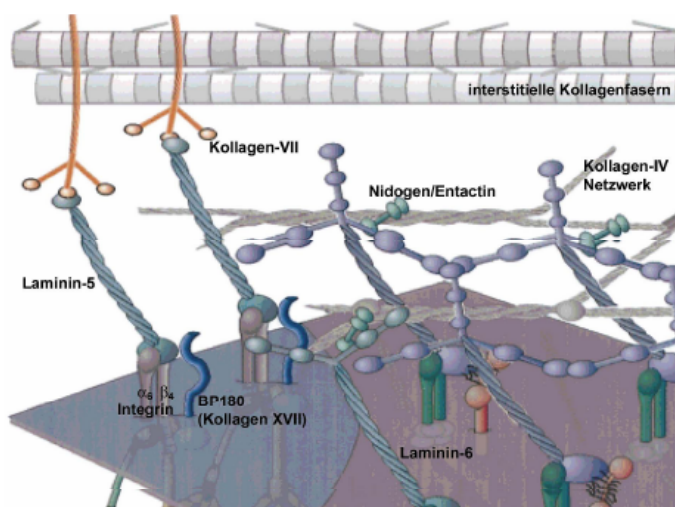
Lamina densa und als äußerste Schicht die Lamina fibroreticularis, deren Dichte und Zusammensetzung ortsabhängig variiert (Ghadially 1997).

Die Grundstruktur besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk feiner Fibrillen, wobei Kollagen Typ IV-Moleküle, über kovalente Bindungen miteinander verknüpft, ein maschenartiges Grundgerüst bilden und Stabilität verleihen. Laminin-Varianten vernetzen die Fibrillen miteinander und sind wichtigster nichtkollagenöser Bestandteil der Basalmembran (Timpl et al. 1981, Martin und Timpl 1987; Abbildung 3). Weitere Glykoproteine und Proteoglykane wie Tenascine oder Fibronectine sind am Aufbau der Basalmembran beteiligt (Timpl und Brown 1996).

Die Komposition der Basalmembran richtet sich nach Reifung und Differenzierung des Gewebes. Neben einer quantitativ unterschiedlichen Expression der Glykoproteine trägt auch der Einbau differenter Isoformen zur differenzierten Heterogenität der Basalmembran bei (Hindermann et al. 1999), so auch die verschiedenen Lamininisformen (Engvall et al. 1990).

Die Zell - Basalmembran - Kontakte sind in Form einer ultrastrukturellen Organelle, den Hemidesmosomen, organisiert. Diese zelloberflächenassoziierten transmembranären Multiproteinkomplexe bilden Integrin  $\alpha 6 \beta 4$ -vermittelt mit den aus der Basalmembran ragenden Ankerfilamenten den epithelialen Adhäsionskomplex (Lohi et al. 1998; Abbildung 3), wobei Laminin-5 das entscheidende Strukturprotein der Ankerfilamente darstellt (Rousselle et al. 1991). Hierdurch wird der Erhalt der Polarität der Epithelzellen sowie deren Adhäsion mit dem Stroma gewährleistet (Lohi et al. 2000).

Eine Störung dieses Verankerungsmechanismus, beispielsweise durch genetische Defekte des Laminin-5,  $\alpha 6 \beta 4$ -Integrins oder des Kollagen Typ VII führt zu einer letalen blasenbildenden



**Abb. 3:** Der epitheliale Adhäsionskomplex (Modifiziert nach Cognato und Yurchenco 2000).

Dermatose, der Epidermolysis bullosa (Korge und Krieg 1996).

Neben dieser mechanisch unterstützenden und Kompartiment-trennenden Funktion ist die Basalmembran grundsätzlich auch an Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration, an Genexpression sowie Apoptose beteiligt (Timpl 1996). So können Basalmembranirregularitäten zur Apoptose von Drüsenepithelien

führen (Bissell und Ram 1989).

Die Struktur der Basalmembran leistet somit einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung der Gewebsstruktur und zum zellulären Überleben (Colognato und Yurchenco 2000).

### **2.3.3. Die Basalmembran in epithelialen Tumoren**

Nach Durchbrechen der E-cadherin/Catenin-vermittelten interzellulären Adhäsion erfordert die Invasion neoplastischer Zellen das Überwinden der Basalmembran, sei es bei der Ablösung vom Haupttumor, bei der Intra- und Extravasation oder bei der Invasion anderer Gewebe. (Liotta und Kohn 2001). Die physiologischen Funktionen der Basalmembran müssen demnach im Tumorgewebe dysreguliert sein. Die Fragmentierung oder Abwesenheit infolge aktiver proteolytischer Degradierung, verminderter Synthese von Basalmembran-Komponenten oder mittels Remodelling durch Tumorzellen korreliert mit dem Fortschreiten des Tumorwachstums (Barsky et al. 1983).

Benigne Läsionen verschiedener Gewebe besitzen im Gegensatz zu mikroinvasiven Läsionen eine kontinuierliche Basalmembran (Barsky et al. 1983, Bosman 1994), sodass vorgeschlagen wurde, dass es sich bei der Degradierung der Basalmembran um eine Voraussetzung zur Invasion handelt (Barsky et al. 1983, Flug und Kopf-Maier 1995). Kurze Basalmembranunterbrechungen können ebenfalls im normalen Gewebe, besonders bei ausgeprägter entzündlicher Stromainfiltration, auftreten (Vogel und Mendelsohn 1987, d'Ardenne 1989).

Neben Basalmembrandiskontinuitäten scheint auch die Synthese sowie Deposition von Basalmembrankomponenten eine Rolle während der Tumorinvasion zu spielen. Immunhistochemische Studien konnten eine vermehrte Expression von Laminin-5, dem Schlüsselprotein des epithelialen Adhäsionskomplex, im Zytoplasma invasiver neoplastischer Epithelkomplexe nachweisen (Pyke et al. 1995).

So schafft das komplexe Wechselspiel zwischen Tumor, Stromazelle und extrazellulärer Matrix ein migrationsförderndes Milieu, welches Bedingung zur Umsetzung eines malignen Potentials neoplastischer Zellen ist.

## 2.4. Die Molekülfamilie der Laminine

1979 isolierten Timpl und Mitarbeitern ein nichtkollagenes Glykoprotein aus der Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumors der Maus, das den Namen Laminin erhielt (Timpl et al. 1979). Es zeigte sich, daß es sich hierbei nicht nur um ein singuläres Molekül, sondern eine ganze Molekülfamilie handelt. Kürzlich konnte die 16. Lamininisoform etabliert werden (Tabelle 5) mit gleichzeitiger Einführung einer neuen Laminin-Nomenklatur aufgrund der ständig wachsenden Anzahl neuer Isoformen (Aumailley et al. 2005).

**Tabelle 5: Nomenklatur der 16 Laminin-Isoformen (Modifiziert nach Aumailley et al. 2005)**

Standard	Abbreviated	Previous
$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	111	1
$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	211	2
$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	121	3
$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	221	4
$\alpha 3A\beta 3\gamma 2$	332, or 3A32	5, or 5A
$\alpha 3B\beta 3\gamma 2$	3B32	5B
$\alpha 3A\beta 1\gamma 1$	311, or 3A11	6, or 6A
$\alpha 3A\beta 2\gamma 1$	321, or 3A21	T, or 7A
$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	411	8
$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	421	9
$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	511	10
$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	521	11
$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	213	12
$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	423	14
$\alpha 5\beta 2\gamma 2$	522	-
$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	523	15

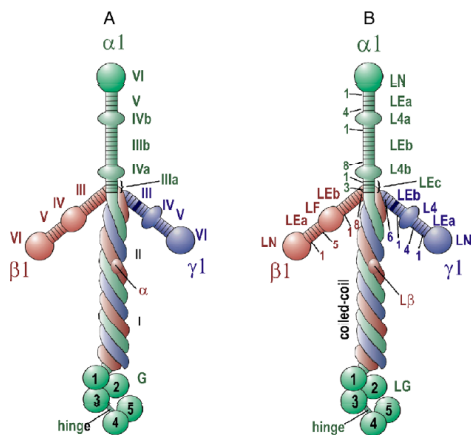
Laminine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und stellen quantitativ das bedeutendste nicht-kollagene Matrixprotein und somit ein wichtiges Bauelement von Basalmembranen dar. Weiterhin sind sie involviert in Zelladhäsion, Wachstum, Migration und Differenzierung, wobei die Funktion der einzelnen Lamininisoformen noch nicht im Detail erschlossen ist. Sicher ist eine unterschiedliche Expression der Isoformen in Abhängigkeit von Differenzierung und Zellreife (Burgeson et al. 1994, Gagnoux-Palacios et al. 1996, Miner et al. 1997, Aumailley und Smyth 1998). Während zum Beispiel Laminin-2 reichlich in Basalmembranen von Nerven, Skelettmuskeln (Patton et al. 1997) und Myoepithelien (Strassburger et al. 1998) nachweisbar ist, wird Laminin-5 regelmäßig in epithelialen Basalmembranen gefunden. Laminine scheinen also für die strukturelle Diversität von Basalmembranen und demzufolge auch für die Zellinteraktionen mit der extrazellulären Matrix von essentieller Bedeutung zu sein. Einen ausführlichen Überblick über die verschiedenen Lamininisoformen, deren



Rezeptor-Interaktionen sowie Effekte geben Colognato und Yurchenco (Colognato und Yurchenco 2000).

### 2.4.1. Allgemeiner Aufbau der Laminine

Laminine sind kreuzförmige heterotrimere Moleküle, die sich jeweils aus einer schweren  $\alpha$ -Polypeptidkette (~400 kD) sowie einer leichten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette (~130-200 kD) zusammensetzen. Bisher wurden in der Literatur 5 $\alpha$ -, 3 $\beta$ - und 3 $\gamma$ -Ketten beschrieben (Miner und Yurchenco 2004). Alle Ketten bestehen aus einem kurzen und einem langen Arm. Über



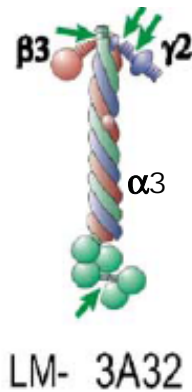
**Abb. 4:** Die Struktur der Laminin-Heterotrimeren (Modifiziert nach Aumailley et al. 2005). Zuvorige (A) und aktuelle (B) Nomenklatur der Domänen des Laminin-Moleküls, hier exemplarisch für Laminin-1 bzw. -111.

den helikalen Abschnitt der langen Arme lagern sich die Lamininketten mittels Disulfidbrücken aneinander, um ein heterotrimeres Molekül zu bilden. Dabei ist der lange Arm der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten ausschließlich helikaler Natur, während die  $\alpha$ -Kette neben der helikalen Struktur ein zusätzliches C-terminales Ende mit mehreren globulären Domänen aufweist. Viele Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren, einschließlich der Integrine, sind hier lokalisiert (Aumailley und Smyth 1998, Colognato und Yurchenco 2000). Die kurzen Arme bestehen aus EGF-ähnlichen Sequenzen und globulären Abschnitten (Engel et al. 1991; Abbildung 4).

### 2.4.2. Besonderheiten im Aufbau von Laminin-5

Die Proteine Kalinin, Nicein (BM-600), Epiligrin und Ladsin wurden unabhängig voneinander entdeckt und beschrieben (Carter et al. 1991, Rousselle et al. 1991, Verrando et al. 1992, Miyazaki et al. 1993). Im Nomenklaturvorschlag für die Laminine von 1994 wurden sie als Laminin-5 (Ln-5) zusammengefasst (Burgeson et al. 1994), nach der neuen Nomenklatur von 2005 als Laminin-332 bezeichnet (Aumailley et al. 2005).

Laminin-5 setzt sich aus einer  $\alpha 3$ -,  $\beta 3$ - sowie  $\gamma 2$ -Kette zusammen, wobei die leichten Ketten ( $\beta 3$ ,  $\gamma 2$ ) exklusiv in Laminin-5 vorkommen. Von der  $\alpha 3$ -Kette sind zwei Splicingvarianten bekannt ( $\alpha 3A$ ,  $\alpha 3B$ ), jedoch wurde bisher keine  $\alpha 3B$ -Kette enthaltene Laminin beschrieben. Laminin-5 wird als Heterotrimer sezerniert und durchläuft eine Prozessierung mit



**Abb. 5:** Die Struktur von Laminin-5 (Modifiziert nach Aumailley et al. 2005). Grüne Pfeile verweisen auf die Prozessierungsloci der  $\alpha$ 3- und  $\gamma$ 2-Kette.

weiterer Verkürzung der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Kette (Carter et al. 1991, Marinkovich et al. 1992, Verrando et al. 1992). Laminin-5 ist als einziges Laminin in allen Ketten verkürzt. Dadurch hat es nicht das klassische kreuzförmige Aussehen, sondern erscheint eher stabförmig (Abbildung 5). Bevorzugte Liganden von Laminin-5 sind Integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 6 $\beta$ 1, Kollagen-VII sowie Laminin-6 und -7 (Champlaud et al. 1996, Rousselle et al. 1997).

### **2.4.3. Laminin-5 - Schlüsselprotein der Adhäsion**

Basalmembranen setzen sich als spezialisierte Form der extrazellulären Matrix aus Kollagen-IV-Fibrillen zusammen, welche durch Laminin-Isoformen miteinander vernetzt sind (Yurchenco et al. 1992). Die Zell - Basalmembran - Kontakte sind in Form einer ultrastrukturellen Organelle, den Hemidesmosomen, organisiert. Diese transmembranären Multiproteinkomplexe bilden Integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4-vermittelt mit den aus der Basalmembran ragenden Ankerfilamenten den epithelialen Adhäsionskomplex (Lohi et al. 1998). Laminin-5 stellt hierbei das entscheidende Strukturprotein der Ankerfilamente dar (Rousselle et al. 1991). Pathologische Veränderungen der Komponenten des epithelialen Adhäsionskomplexes führen über eine Verminderung der Zell-Basalmembran-Adhäsion zum Beispiel zu blasenbildenden Dermatosen wie der Epidermolysis junctionalis bullosa Herlitz (Korge und Krieg 1996) oder dem vernarbenden Pemphigoid, letzteres bedingt durch Autoantikörper gegen Laminin-5-Ketten (Moll und Moll 1998).

### **2.4.4. Der Migrationsfaktor Laminin-5**

Neben seiner Rolle als Adhäsionsfaktor gilt Laminin-5 auch als Promotor von Migration und Streuung verschiedener Zellen (Giannelli et al. 1997). Posttranslationale proteolytische Veränderungen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Kette sind offensichtlich entscheidend für den Funktionszustand von Laminin-5 und damit Grundvoraussetzung für die Bifunktionalität des Moleküls. So wirkt die mittels Plasmin prozessierte  $\alpha$ 3-Kette (160kD) zelladhäsionsfördernd. Sowohl der unprozessierten  $\alpha$ 3-Kette (190kD) als auch der mittels Matrixmetalloproteasen MT1-MMP und MMP-2 proteolytisch prozessierten  $\gamma$ 2-Kette (Soini et al. 1996, Giannelli et al. 1997, Koshikawa et al. 2000) wurde ein migrationsfördernder Effekt nachgewiesen (Baker et al.

1996, Goldfinger et al. 1998, Hirosaki et al. 2000). Laminin-5 kann die Migrationsgeschwindigkeit von Epithelzellen positiv beeinflussen (Tani et al. 1996). Es wird während der Wundheilung von randständigen, proliferierenden Keratinozyten exprimiert und auf der Wundoberfläche noch vor migrierenden Keratinozyten nachweisbar (Larjava et al. 1993, Kainulainen et al. 1998).

#### **2.4.5. Die Bedeutung von Laminin-5 für die Tumorinvasion**

Miyazaki beschrieb 1993 erstmalig ein extrazelluläres Molekül, welches die Migration von Karzinomzellen unterstützt (Miyazaki et al. 1993) und später als Laminin-5 identifiziert werden konnte (Zhang und Kramer 1996, Berndt et al. 1997, Giannelli et al. 1997).

Zwei Jahre später demonstrierte Pyke unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers immunhistochemisch die intrazelluläre Expression der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette in verschiedenen Karzinomtypen und formulierte die These, dass sich bei Laminin-5 um einen potentiellen Marker der Invasivität bei einer Auswahl von humanen Karzinomen handeln könnte (Pyke et al. 1994, Pyke et al. 1995).

In der Literatur wird Laminin-5 bezüglich seiner Expression in Karzinomen häufig als Invasionsfaktor gehandelt und eine gesteigerte intrazelluläre Expression mit Tumorprogression und schlechter Prognose gleichgesetzt, wie zum Beispiel beim Endometriumkarzinom (Lundgren et al. 2003), beim Plattenepithelkarzinom der Vagina (Hellman et al. 2000) sowie des Ösophagus (Yamamoto et al. 2001) oder beim Adenokarzinom des Kolon (Pyke et al. 1995, Lenander et al. 2001); für weitere Literatur siehe auch [www.dako.com](http://www.dako.com)). Dass jedoch auch ein gesteigerter Laminin-5 Verlust mit einer Neigung zu schwerwiegender Disseminierung und schlechter Prognose einhergeht, wurde am Beispiel maligner epithelialer Läsionen der Mamma (Henning et al. 1999) sowie beim Prostatakarzinom (Davis et al. 2001) demonstriert.

Für das Plattenepithelkarzinom der Zervix wurde Laminin-5 als Marker der Invasivität beschrieben (Skyldberg et al. 1999), jedoch konnte bislang keine Korrelation zwischen immunhistochemischer zytoplasmatischer Expression und Überleben demonstriert werden (Andersson et al. 2005). Bei den CIN-Läsionen korreliert die zytoplasmatische Laminin-5 Immunreaktion mit dem Grad der Dysplasie (Kohlberger et al. 2003).

Die Bedeutung von Laminin-5 als Marker von Invasion und Metastasierung scheint somit noch nicht endgültig geklärt zu sein und bedarf weiterführender Studien.

## 2.5. Zielstellung

Gegenstand der eigenen Arbeit ist die detaillierte qualitative sowie semiquantitative immunhistochemische Analyse der Veränderungen der Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression bei prämaligen und malignen Läsionen der Zervix unter Verwendung des paraffingängigen, monoklonalen Antikörpers D4B5.

Hierbei soll das Spektrum der dysplastischen Veränderungen sowie der häufigen Karzinome der Zervix untersucht werden, verbunden mit einer Überprüfung der Eignung des paraffingängigen monoklonalen Antikörpers D4B5 für die Routinediagnostik der Zervix.

Weiterhin werden Aussagen zur nodalen Metastasierung und der damit verbundenen Prognose im Zusammenhang mit dem immunhistochemischen Laminin-5 Expressionsverhalten bei malignen Läsionen der Zervix formuliert.

Folgende Teilaspekte werden bearbeitet:

- Ø Immunhistochemische Darstellung der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette am histologischen Routinematerial der Zervix,
- Ø Qualitative und semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Expression sowie Charakterisierung der Expressionsmuster in normaler, metaplastisch- und entzündlich-veränderter Zervix,
- Ø Immunhistochemische Analyse und Vergleich der Laminin-5 Expression bei CIN-Läsionen und mikroinvasivem Plattenepithelkarzinom der Zervix,
- Ø Qualitative und semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Expression sowie Charakterisierung der unterschiedlichen Expressionsmuster beim Plattenepithel, Adeno- sowie neuroendokrinen Karzinom der Zervix,
- Ø Analyse der immunhistochemischen Expression in Korrelation zum histologischen Kontext,
- Ø Analyse der mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesenen immunhistochemischen Kolo-kalisation von Faktor VIII und dem monoklonalen Antikörper D4B5 bei CIN-Läsionen sowie mikroinvasivem Karzinom und
- Ø Klärung des Zusammenhangs zwischen immunhistochemischer Laminin-5 Expression und Malignitätsgrad sowie Metastasierung beim Zervixkarzinom.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Patientendaten

Alle Gewebeproben entstammen dem Einsendegut des Institutes für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena im Zeitraum von 1996 bis 2002. Es setzte sich zusammen aus Einsendungen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der FSU Jena sowie aus Eingängen zuweisender Krankenhäuser und niedergelassener Gynäkologen aus dem Umkreis.

Dabei wurde Material von insgesamt 283 Patientinnen operativ gewonnen. Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei 40 +/- 13,9 Jahren (17-87 Jahre).

Insgesamt lagen 59 Biopsien der Zervix, 105 Konisations- sowie 119 Hysterektomiepräparate zur histologischen und immunhistochemischen Beurteilung vor.

Das Gewebe wurde unmittelbar postoperativ sowohl für die Paraffineinbettung als auch für die Kryokonservierung aufbereitet. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die Diagnosen der insgesamt 283 untersuchten Präparate.

**Tabelle 6: Diagnosenübersicht der untersuchten Präparate**

Diagnose	Anzahl (n)
Transformationszone	2
Endozervizitis	1
Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)	120
CIN 1	18
CIN 2	27
CIN 3	75
Adenocarcinoma in situ (ACIS)	2
Plattenepithelkarzinom	128
Adenokarzinom	26
Neuroendokrines Karzinom	4

#### 3.2. Gewinnung und Aufbereitung des Gewebes

##### 3.2.1. Fixierung, Paraffineinbettung und konventionelle Histologie

Für die konventionelle Histologie wurde das Untersuchungsmaterial unmittelbar nach der operativen Entfernung in 5% gepuffertem Paraformaldehyd für 18-24 Stunden fixiert und in Paraffin im Einbettautomat Hypercentre von Shandon eingebettet. Von den eingebetteten Proben wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt (Rotationsmikrotom RM2045, Leica, Deutschland) und nach Entparaffinierung mit Hämalaun-Eosin (HE) zur Kern-Plasma-

Differenzierung gefärbt (Färbeautomat Medite Meisei) sowie im Eindeckautomaten (Medite Meisei) in synthetischem Neutralbalsam (Pertex Medite) eingedeckt.

Die Diagnosestellung erfolgte mittels lichtmikroskopischer Bewertung anhand des konventionellen HE-gefärbten Paraffinschnitts.

### **3.2.2. Kryokonservierung**

Native Resektate der Zervix wurden unmittelbar nach der Operation in 4°C kalte sterile HANKS´ Salzlösung (HBSS, ohne Kalzium, ohne Magnesium; GIBCO Life Technologie GmbH, Eggenstein, Deutschland) überführt. Das Zervixkarzinom konnte durch seine veränderte Konsistenz und Oberfläche im Hysterektomiepräparat vom Normalgewebe identifiziert und abgegrenzt werden. Bei Konisationspräparaten erfolgte zunächst eine Aufarbeitung des gesamten Konus mit selektiver Nachbearbeitung zwecks Kryokonservierung. Aus den pathologisch veränderten Arealen wurden 4x4x4mm große Proben entnommen, zur Vermeidung einer gefrierbedingten Austrocknung mit TISSUE-TEK (Sakura Finetek Europe B.V., Zoewoude, Niederlande) behandelt, in Stickstoff-gekühltem flüssigen Propan schockgefroren und bei -75°C bis zur weiteren Bearbeitung steril gelagert.

### **3.3. Klassifikationsprinzipien der prämaligen und malignen Zervixläsionen**

Die histologische Klassifikation der Läsionen der Zervix erfolgte am formalinfixierten, paraffineingebetteten H&E Schnitt.

#### **3.3.1. Klassifikation der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN)**

Die klassische semiquantitativ dreistufige Einteilung der CIN-Läsionen beruht auf dem Anteil des Epithels, der von basaloiden, undifferenzierten Zellen mit Verlust epithelialer Reifung und Glykogenisierung eingenommen wird (Richart 1973). Zunehmend wird das diagnostische Kontinuum CIN-Läsion auch zweistufig eingeteilt. So unterteilt die Bethesda Nomenklatur in niedrig-gradige (LGSIL) und hochgradige squamöse intraepitheliale Läsionen (HGSIL), wobei erstere zusätzlich HPV-assoziierte Papillome sowie Kondylome beinhaltet (Tavassoli und Devilee 2003). Tabelle 7 fasst die Merkmale der Klassifikationen zusammen.

**Tabelle 7: Unterscheidungskriterien zervikaler intraepithelialer Läsionen (Modifiziert nach Kurman 1994)**

Merkmal	CIN 1 (LGSIL)	CIN 2 (HGSIL)	CIN 3 (HGSIL)
Lokalisation	unteres Epitheldrittel	basal, parabasal	alle Schichten
Koilozytose	immer	gelegentlich	selten
Mitotische Aktivität	basal gesteigert	basal / parabasal gesteigert	in allen Schichten gesteigert
Abnorme mitotische Figuren	vereinzelt	vorhanden	regelmäßig
Nukleäre Atypien	basal	basal, parabasal	in allen Schichten
Ploidität	diploid, polyploid	diploid, polyploid	aneuploid
Epitheliale Reifung	parabasal und superfizial, Akanthose	superfizial	keine Ausreifung, Verlust Zellpolarität

*CIN: zervikale intraepitheliale Neoplasie; LGSIL: Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion; HGSIL: High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion*

### **3.3.2. Klassifikation der Karzinome**

#### **2.3.2.1. Histopathologische Klassifizierung**

Die histologische Klassifikation der Karzinome erfolgte entsprechend den Kriterien der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumoren der Brust und des weiblichen Genitaltraktes (Tavassoli und Devilee 2003), dargestellt in Tabelle 8.

**Tabelle 8: WHO-Klassifikation der epithelialen Tumoren der Zervix (Modifiziert nach Tavassoli und Devilee 2003)**

<p><b>Epithelial tumours</b></p> <p><b>Squamous tumours and precursors</b></p> <p>Squamous cell carcinoma, not otherwise specified</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Keratinizing</li> <li>Non-keratinizing</li> <li>Basaloid</li> <li>Verrucous</li> <li>Warty</li> <li>Lymphoepithelioma-like</li> <li>Squamotransitional</li> </ul> <p>Early invasive (microinvasive) squamous cell carcinoma</p> <p>Squamous intraepithelial neoplasia</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 3 / Squamous cell carcinoma in situ</li> </ul> <p>Benign squamous cell lesions</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Condyloma acuminatum</li> <li>Squamous papilloma</li> <li>Fibroepithelial polyp</li> </ul> <p><b>Glandular tumours and precursors</b></p> <p>Adenocarcinoma</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mucinous adenocarcinoma</li> <li>Endocervical</li> <li>Intestinal</li> <li>Signet-ring cell</li> <li>Minimal deviation</li> <li>Villoglandular</li> <li>Endometrioid adenocarcinoma</li> <li>Clear cell adenocarcinoma</li> <li>Serous adenocarcinoma</li> <li>Mesonephric adenocarcinoma</li> </ul> <p>Early invasive adenocarcinoma</p> <p>Adenocarcinoma in situ/Glandular dysplasia</p> <p>Benign glandular lesions</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Müllerian papilloma</li> <li>Endocervical polyp</li> </ul> <p><b>Other epithelial tumours</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Adenosquamous carcinoma</li> <li>Glassy cell carcinoma variant</li> <li>Adenoid cystic carcinoma</li> </ul>	<p>Adenoid basal carcinoma</p> <p>Neuroendocrine tumours</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoid</li> <li>Atypical carcinoid</li> <li>Small cell carcinoma</li> <li>Large cell neuroendocrine carcinoma</li> </ul> <p>Undifferentiated carcinoma</p> <p><b>Mesenchymal tumours and tumour-like conditions</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Leiomyosarcoma</li> <li>Endometrioid stromal sarcoma, low grade</li> <li>Undifferentiated endocervical sarcoma</li> <li>Sarcoma botryoides</li> <li>Alveolar soft part sarcoma</li> <li>Angiosarcoma</li> <li>Malignant peripheral nerve sheath tumour</li> <li>Leiomyoma</li> <li>Genital rhabdomyoma</li> <li>Postoperative spindle cell nodule</li> </ul> <p><b>Mixed epithelial and mesenchymal tumours</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinosarcoma (malignant müllerian mixed tumour; metaplastic carcinoma)</li> <li>Adenosarcoma</li> <li>Wilms tumour</li> <li>Adenofibroma</li> <li>Adenomyoma</li> </ul> <p><b>Melanocytic tumours</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Malignant melanoma</li> <li>Blue naevus</li> </ul> <p><b>Miscellaneous tumours</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Tumours of germ cell type</li> <li>Yolk sac tumour</li> <li>Dermoid cyst</li> <li>Mature cystic teratoma</li> </ul> <p><b>Lymphoid and haematopoietic tumours</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Malignant lymphoma (specify type)</li> <li>leukaemia (specify type)</li> </ul> <p><b>Secondary tumours</b></p>
--	---



### 3.3.2.2. Histopathologischer Grad der Differenzierung

Zur Einteilung der Karzinome bezüglich ihres Differenzierungsgrades wurde die modifizierte Broders Methode (Broders 1920; Tabelle 9) herangezogen. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über den Differenzierungsgrad der untersuchten Karzinome.

**Tabelle 9: Definition des Differenzierungsgrades nach Broders (Broders 1920)**

Differenzierungsgrad	Beschreibung
Gx	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Gering differenziert
G4	Undifferenziert

**Tabelle 10: Differenzierungsgrad der untersuchten Zervixkarzinome**

	Anzahl	G1	G2	G3	G4	Gx
<b>Plattenepithelkarzinom</b>						
mikroinvasiv	32	8	2	0	0	22
pT >1a	96	1	36	53	4	2
<b>Adenokarzinom</b>	26	3	15	7	0	1
<b>Neuroendokrines Karzinom</b>	4	0	0	3	1	0

### 3.3.2.3. Einteilung der Karzinome nach TNM- und FIGO-Klassifikation

Zur Charakterisierung von Tiefeninfiltration und Metastasierung der Karzinome wurde die TNM-Klassifikation herangezogen. Tabelle 11 führt zum Vergleich die entsprechenden Stadien der FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) auf. Tabelle 12 faßt die Definitionen der N- sowie M-Kategorie zusammen. Im Anschluß gibt Tabelle 13 eine Übersicht über die TNM-Klassifikation der untersuchten Karzinome.

**Tabelle 11: Definition der T-Kategorie der TNM-Klassifikation in Gegenüberstellung zum entsprechenden FIGO-Stadium (Modifiziert nach TNM-Klassifikation maligner Tumoren, Wittekind et al. 2002)**

TNM-Kategorie	Cervix uteri	FIGO-Stadium
<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor	
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ	
<b>T1</b> <b>T1a</b> <b>T1a1</b> <b>T1a2</b> <b>T1b</b>  <b>T1b1</b> <b>T1b2</b>	Begrenzt auf den Uterus* Invasives Karzinom, ausschließlich mikroskopisch diagnostizierbar Stromainvasion $\leq 3$ mm, horizontale Ausdehnung $\leq 7$ mm. Stromainvasion $>3 - 5$ mm, horizontale Ausdehnung $\leq 7$ mm Klinisch (makroskopisch) sichtbare Läsion oder mikroskopische Läsion $> T1a2/IA2$  $< 4$ cm in größter Ausdehnung $> 4$ cm in größter Ausdehnung	<b>I</b> <b>IA</b>  <b>IA1</b> <b>IA2</b> <b>IB</b>  <b>IB1</b> <b>IB2</b>
<b>T2</b>  <b>T2a</b> <b>T2b</b>	Ausdehnung jenseits des Uterus, aber nicht zur Beckenwand und nicht zu unterem Vaginaldrittel Ohne Infiltration des Parametriums Mit Infiltration des Parametriums	<b>II</b>  <b>IIA</b> <b>IIB</b>
<b>T3</b>  <b>T3a</b> <b>T3b</b>	Ausbreitung bis zur Beckenwand und/oder unteres Vaginaldrittel und/oder Hydronephrose/stumme Niere Unteres Vaginaldrittel; keine Ausdehnung zur Beckenwand Beckenwandinfiltration und/oder Hydronephrose/stumme Niere	<b>III</b>  <b>IIIA</b> <b>IIIB</b>
<b>T4</b>	Infiltration der Schleimhaut von Blase oder Rektum und/oder Überschreiten der Grenzen des kleinen Beckens	<b>IVA</b>
<b>M1</b>	Fernmetastasen	<b>IVB</b>

\*Die Invasionstiefe ist definiert als das Maß der Tumorausdehnung von der Epithel-Stroma-Grenze einer nahen oberflächlichen dermalen Papille bis zum tiefsten Punkt der Invasion. Die Invasion von Gefäßen beeinflusst die Klassifikation nicht.

**Tabelle 12: Definition der N- und M-Kategorie (Modifiziert nach TNM-Klassifikation maligner Tumoren; Wittekind et al. 2002)**

N-Kategorie		M-Kategorie	
<b>Nx</b>	Regionäre Lymphknoten* können nicht beurteilt werden	<b>Mx</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Befunderhebung
<b>N1</b>	Regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden	<b>M1</b>	Fernmetastasen vorhanden

\*Als regionäre Lymphknoten gelten die parazervikalen, parametranen und hypogastrischen Lymphknoten (Lymphknoten an den Aa. Iliacae internae, Obturatoriallymphknoten), ferner an den Aa. Iliacae communes und externae sowie die präsakralen und lateralen sakralen Lymphknoten.

**Tabelle 13: TNM-Klassifikation der untersuchten Zervixkarzinome (n=158)**

<b>Plattenepithelkarzinom</b>							
<b>pT</b>	<b>n=128</b>	<b>pN0</b>	<b>pN1</b>	<b>pNx</b>	<b>pM0</b>	<b>pM1</b>	<b>pMx</b>
1							
1a							
1a1	n=27	5		22			27
1a2	n=5	5					5
1b							
1b1	n=21	18	3		16	3	2
1b2	n=19	13	5	1	11	2	6
1bx	n= 8	6	1	1	4		4
2							
2a	n=4	3	1		3	1	
2b	n=30	22	7	1	13	3	14
2x	n=3	1	2		1	1	1
3							
3a	n=2		2		1		1
3b	n=3	1	2		3		
4	n=7	1	4	2	2	1	4
<b>Adenokarzinom</b>							
<b>pT</b>	<b>n=26</b>	<b>pN0</b>	<b>pN1</b>	<b>pNx</b>	<b>pM0</b>	<b>pM1</b>	<b>pMx</b>
1							
1a							
1a1	n=1	1			1		
1a2	n=1	1			1		
1b							
1b1	n=4	3	1		2	1	1
1b2	n=8	7	1		6	1	1
1bx	n=1			1			1
2							
2a	n=1		1		1		
2b	n=8	4	2	2	6		2
3							
3b	n=2	1	1		2		
<b>Neuroendokrines Karzinom</b>							
<b>PT</b>	<b>n=4</b>	<b>pN0</b>	<b>pN1</b>	<b>pNx</b>	<b>pM0</b>	<b>pM1</b>	<b>pMx</b>
1b							
1b2	n=1	1					1
1bx	n=2	1	1		1	1	
2							
2b	n=1		1			1	

### **3.4. Immunhistochemie**

#### **3.4.1. Lichtmikroskopische Detektion der immunhistochemischen Laminin-5 $\gamma$ 2 Ketten-Expression mittels APAAP-Methode**

Der für die Immunhistochemie eingesetzte primäre Antikörper ist der monoklonale Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Antikörper D4B5 (Chemicon Int., Deutschland; Verdünnung: 1:5000; (Mizushima et al. 1998). Die Laminin  $\gamma$ 2-Kette findet sich ausschließlich im Laminin-5 Molekül. Der Klon D4B5 erkennt und markiert dabei die Laminin-5 spezifische  $\gamma$ 2-Kette in isolierter, mit der Laminin  $\beta$ 3 und/oder  $\alpha$ 3 Kette gebundener, in prozessierter (105 kD) und unprozessierter Form (150 kD). Die Interpretation wurde vor dem Hintergrund der diagnosegebenden H&E Schnitte möglich.

Die APAAP-Methode dient dem immunhistochemischen Nachweis spezifisch im histologischen Präparat gebundener primärer Antikörper. Hier wurde sie modifiziert nach einem Protokoll von Gustmann (Gustmann et al. 1991) angewandt.

Dabei wurden 4  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte angefertigt (Rotationsmikrotom RM2045, Leica, Deutschland). Es erfolgte die Inkubation der Paraffinschnitte mit Pronase E (Serva) in 37°C erwärmtem Tris-Puffer im Verhältnis 50 $\mu$ g:100ml für 10 Minuten mit anschließender Spülung in Tris-Puffer. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung: 1:5000 in *background reducing medium*, Dako, Glostrup, Dänemark) über Nacht bei 4°C. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte die Behandlung mit einem Kaninchen-anti-Maus-Serum (Dako, Glostrup, Dänemark, Verdünnung: 1:70 in Verdünnungspuffer für Brückenantikörper), gefolgt von der Inkubation mit dem APAAP-Komplex (Dako, Glostrup, Dänemark, Verdünnung: 1:70 in Verdünnungspuffer für APAAP-Komplex) für jeweils 45 Minuten bei Raumtemperatur. Die Schritte Kaninchen-anti-Maus-Serum und APAAP-Komplex wurden zur Steigerung der Sensitivität der Methode zweimal wiederholt. Zwischen allen Inkubationen wurden die Schnitte gründlich in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) gespült. Der Nachweis gebundener alkalischer Phosphatase erfolgte mittels Naphtol-AS-Biphosphate (Sigma, USA) und Neufuchsin (Merck, Deutschland) unter lichtmikroskopischer Kontrolle.

Zur Blockierung endogener Enzymaktivität wurde die Entwicklerlösung mit 0,25 mmol Levamisol (Sigma, St. Louis, MO, USA) angereichert. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin versetzt und in Glycerol/Gelatine eingedeckt. Zur Evaluierung der immunhistochemischen Färbung wurde in der Negativkontrolle der primäre Antikörper durch ein nicht immunreaktives Serum ersetzt. Tabelle 14 gibt eine Übersicht über die verwandten Substanzen.

**Tabelle 14: Übersicht der verwandten Lösungen für die Immunhistochemie**

<p><b>Hämalaun nach Meyer</b>                  2,5 g Hämatoxylin                  0,5 g Natriumjodat                  125 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat                  125 g Chloralhydrat                  2,5 g Zitronensäure                  auf 2500 ml Aqua dest.                  14 Tage reifen lassen</p>	<p><b>PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)</b>                  8 g NaCl                  0,2 g KCl                  1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·x2H<sub>2</sub>O                  0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000 ml Aqua dest.</p> <p><b>TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)</b>                  2,25 g Tris-Base                  17,125 g Tris/HCl                  21,95 g NaCl                  ad 2500 ml Aqua dest. pH 7,4-7,6</p>
<p><b>Puffer für das APAAP-System</b>  <b>Tris-Puffer</b>                  0,45 g Tris-Base                  3,425 g Tris/HCl                  0,5 g Natriumazid ad 500 ml Aqua dest.</p>	<p><b>Verdünnungslösung für Brückenantikörper</b>                  10% (v/v) RPMI-Medium in Tris-Puffer                  10% (v/v) inaktiviertes Humanserum</p> <p><b>Verdünnungslösung für APAAP-Komplex</b>                  10% (v/v) RPMI-Medium in Tris-Puffer</p>
<p><b>Entwicklungslösung</b>                  70 ml Entwicklungspuffer (a)                  25 ml Propandiollösung (b)                  40 mg Levamisol                  0,5 ml Natriumnitritlösung (c)                  0,135 ml Neufuchsinlösung (d)                  0,6 ml Naphtol-AS-Phosphatlösung (e)                  ad 100 ml Aqua dest.</p> <p><b>a) Entwicklungspuffer</b>                  34,8 g NaCl                  6 g Tris/HCl                  19,6 g Tris-Base ad 700 ml Aqua dest.</p>	<p><b>b) Propandiollösung</b>                  21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol                  ad 1000 ml Aqua dest.</p> <p><b>c) Natriumnitritlösung</b>                  30 mg Natriumnitrit ad 1000 ml Aqua dest</p> <p><b>d) Neufuchsinlösung</b>                  5 g Neufuchsin ad 100 ml 2N HCl</p> <p><b>e) Naphtol-AS-BI-Phosphat</b>                  350 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat ad 6 ml DMF</p>

### 3.4.2. Lichtmikroskopische Bewertung der Immunreaktion

Die lichtmikroskopische Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma 2$ -Ketten Expression erfolgte im Zytoplasma, im Stroma sowie im Bereich der Basalmembran an mindestens zwei zufällig gewählten repräsentativen, nicht-nekrotischen Tumorabschnitten der Invasionsfront bei 20facher Vergrößerung. Die Färbemuster wurden dabei semiquantitativ bewertet (Tabelle 15 und 16). Ein Keratinozyt wurde bei vollständiger ausschließlich zytoplasmatischer Immunreaktion als Laminin-5 positiv deklariert.

Die Auswertung und fotografische Dokumentation der Befunde erfolgte am Lichtmikroskop mit den Objektivvergrößerungen 5x, 10x, 20x und 40x.

**Tabelle 15: Semiquantitative und qualitative Bewertungskriterien (Score) der immunhistochemischen Laminin-5 Expression bei prämaligen Zervixläsionen**

<b>Zelluläre Retention (ZR)</b>		
<b>Score</b>	<b>Semiquantitative Bewertung</b>	<b>Qualitative Bewertung</b>
<b>0</b>	Kein Verlust	Keine intrazelluläre Immunreaktion
<b>1</b>	Schwach	Einzelne, nicht zusammenhängende Keratinozyten positiv („Mosaik“)
<b>2</b>	Mäßig	Fokal positive Keratinozyten in basalen Zellschichten
<b>3</b>	Stark	Fokal komplette Epithelbreite positiv oder größere zusammenhängende Abschnitte positiver basaler Zellen
<b>Stromadeposition (SD)</b>		
<b>Score</b>	<b>Semiquantitative Bewertung</b>	<b>Qualitative Bewertung</b>
<b>0</b>	Keine Färbung	Keine extrazelluläre Immunreaktion
<b>1</b>	Schwach	Einzelne Herde direkt unterhalb des Epithels („spots“)
<b>2</b>	Mäßig	Konfluierende Herde direkt unterhalb des Epithels
<b>3</b>	Stark	Konfluierende Herde, das komplette Stroma erfassend
<b>Basalmembranabbruch (BM)</b>		
<b>Score</b>	<b>Semiquantitative Bewertung</b>	<b>Qualitative Bewertung</b>
<b>0</b>	Keine Färbung	Basalmembran kontinuierlich scharf dargestellt
<b>1</b>	Schwach	Basalmembran kontinuierlich, jedoch unscharf, verwaschen, fokal aufgelockert
<b>2</b>	Mäßig	Basalmembran diskontinuierlich, nicht sicher abgrenzbar
<b>3</b>	Eindeutig	Basalmembran fokal nicht darstellbar

**Tabelle 16: Semiquantitative und qualitative Bewertungskriterien (Score) der immunhistochemischen Laminin-5 Expression bei malignen Zervixläsionen**

<b>Zelluläre Retention (ZR)</b>		
<b>Score</b>	<b>Semiquantitative Bewertung</b>	<b>Qualitative Bewertung</b>
<b>0</b>	Keine Färbung (0%)	Keine intrazelluläre Immunreaktion
<b>1</b>	Gering (<33%)	Herdförmig basal betont, auf „knospende“ Tumorzellkomplexe (TZK) der Invasionsfront begrenzt
<b>2</b>	Mäßig (33%-66%)	Konfluierende Herde oder die komplette basale Zirkumferenz größerer TZK positiv
<b>3</b>	Stark (>66%)	Zahlreiche konfluierende Herde oder komplett positiver TZK
<b>Stromadeposition (SD)</b>		
<b>Score</b>	<b>Semiquantitative Bewertung</b>	<b>Qualitative Bewertung</b>
<b>0</b>	Keine Färbung (0%)	Keine extrazelluläre Immunreaktion
<b>1</b>	Gering (<33%)	Einzelne Herde entlang der Invasionsfront („spots“)
<b>2</b>	Mäßig (33%-66%)	Konfluierende Herde entlang der Invasionsfront
<b>3</b>	Stark (>66%)	Konfluierende Herde, das komplette Stroma der Invasionsfront erfassend
<b>Basalmembranabbruch (BM)</b>		
<b>Score</b>	<b>Semiquantitative Bewertung</b>	<b>Qualitative Bewertung</b>
<b>0</b>	Kein Verlust (0%)	Basalmembran kontinuierlich scharf dargestellt
<b>1</b>	Gering (<33%)	Fokaler Verlust der Darstellung, meist auf „knospende“ TZK begrenzt
<b>2</b>	Mäßig (33%-66%)	Mehrere Herde mit Verlust der Darstellung, zusammenhängende Basalmembranabschnitte noch vorhanden
<b>3</b>	Stark (>66%)	Überwiegend bis komplett fehlende Darstellung, keine zusammenhängenden Abschnitte („Zerstückelung“)

### **3.4.3. Immundoppelmarmarkierung für die Lichtmikroskopie**

4µm dicke Kryostatschnitte der Proben wurden auf einem Objektträger (Super Frost, Menzel, Braunschweig, Deutschland) platziert und für 15 Minuten in eisgekühltem Aceton fixiert. Den Schnitten wurde der Primär-Antikörper D4B5 (Verdünnung 1:5000, Chemicon) gegen die Laminin-5  $\gamma$ -2-Kette zugegeben und über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Es erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper unter Verwendung der APAAP-Methode mit Generierung einer roten Markierung. Die Schnitte wurden anschließend mit dem zweiten primären Antikörper (polyklonaler Antikörper gegen Faktor VIII assoziiertes Antigen, Verdünnung 1:200, DAKO; Weidner et al. 1991); monoklonaler panZytokeratin-Antikörper MNF116, Verdünnung 1:150, DAKO; Prieto et al. 1996) für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Falle des polyklonalen Antikörpers erfolgte nach gründlichem Waschen mit Tris/Tween anschließend eine Behandlung mit einem biotinylierten sekundären Ziege-anti-Kaninchen-Serum. Der monoklonale Zytokeratin-Antikörper wurde vor dem Einsatz mittels des ARK-Kits

(DAKO) entsprechend den Herstellerangaben biotinyliert. Der Nachweis der gebundenen zweiten primären Antikörper wurde unter Verwendung des Vectastain ABC Kit's (Vector Laboratories) ausgeführt. Auf der Basis von Peroxidase entstand dabei ein graues Farbstoffpräzipitat.

#### **3.4.4. Immunfluoreszenzdoppelmarkierung**

4µm dicke Kryostatschnitte der Proben wurden auf einem Objektträger (Super Frost, Menzel, Braunschweig, Deutschland) platziert und für 15 Minuten in eisgekühltem Aceton fixiert. Den Schnitten wurde der Primär-Antikörper D4B5 (Verdünnung 1:200, Chemicon) gegen die Laminin-5  $\gamma$ -2-Kette zugegeben und über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Tris/Tween, gefolgt von der Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper ZaMa-Cy3 (Verdünnung 1:200, Dianova) für 45 Minuten. Nach erneutem Waschen mit Tris/Tween wurden die Schnitte mit dem FITC-markierten CD31-Antikörper (Zymbus Biotechnology) für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte im RPMI-Zellkulturmedium (BioWhittaker Europa, Verviers, Belgien). Nach erneutem Waschen erfolgte die Eindeckung mit *Vectashield mounting medium H-1000* (Vector, Burlingame, CA, USA) zur Verhinderung eines Ausbleichens des Fluoreszenzfarbstoffes. In der Negativkontrolle wurde der primäre Antikörper durch nicht immunreaktives Serum ersetzt.

Für Auswertung und fotografische Dokumentation der Doppelfärbungen stand ein Axiophot-2 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) zur Verfügung. Neben der Ausrüstung für Durchlicht- und Auflichtmikroskopie ist dieses Mikroskop mit einem Laser-Scanning-Modul (LSM-510 Zeiss, Jena, Deutschland) und einer 3-Chip-CCD-Kamera (DXC-930P Sony, Tokyo, Japan) bestückt. An Objektiven standen Planapochromate der Firma Zeiss mit den Vergrößerungen 5x, 10x, 20x, 40x, 63x und 100x zur Verfügung.

### **3.5. Nachweis der Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette mittels Western-Blot**

#### **3.5.1. Herstellen von Gewebelysaten**

Kryokonserviertes Gewebe von insgesamt vier Zervixkarzinomen wurde in eine Petrischale gegeben, mit destilliertem Wasser abgespült und nach Überführung in ein Eppendorf-Tübchen und Hinzugabe von jeweils 250µl Lysepuffer mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax T8, IKA-Werke, Deutschland) homogenisiert, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach dem Wiederauftauen wurden die Zelltrümmer bei 14000rpm für 15



Minuten unter Kühlung abzentrifugiert (Kühlzentrifuge UNIVERSAL 30RF, Hettich, Deutschland) und der Überstand abpipettiert. Dieser wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Aufarbeitung des als Positivkontrolle mitgeführten Gewebes (Zelllinie PE15) erfolgte nach gleichem Protokoll.

### **3.5.2. SDS-PAGE**

Die Analyse der Gewebelysate erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung der Vertikal-Gel-Elektrophoreseeinheit Hoefer, Sturdier-SE 400 (100 V unter Sichtkontrolle). Gemäß dem zu erwartenden Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine wurde mit Minigelen und 8%igem Trenngel gearbeitet. Dabei kam Acrylamid-Bis-Fertiglösung 30%/37,5 zur Anwendung. Das Auftragsvolumen der Proben, welche für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und kurz anzentrifugiert wurden, betrug 20  $\mu\text{l}$  (Lysat + Probenpuffer im Verhältnis 1:1). Die Bestimmung des Molekulargewichts nach Elektrophorese und Western Blot erfolgte unter Verwendung eines farbigen Molekulargewichtstandards (Rainbow protein molecular weight markers, Amersham, USA).

### **3.5.3. Tankblot / Immundetektion**

Zunächst wurden Gele, Filterpapier und Schwämmchen für 30 min in Transferpuffer eingeweicht. Nach Zurechtschneiden der PVDF-Membran (microporus polyvinylidene difluoride membrane, Roche, Deutschland) wurde diese für 1 Minute in 100 % Methanol, danach für 3 Minuten in Aqua dest. und anschließend für 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Der elektrophoretische Transfer vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe einer Tank-Blot-Einheit (Mighty Small Transfer TE 22, Höfer/Pharmacia, Deutschland, 200 mA für 2,5h). Die zurecht geschnittene PVDF-Membran wurde in Hochsalzpuffer gespült und anschließend über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in 10 % Magermilchpulver / Hochsalzpuffer auf dem Schüttler geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (D4B5 Maus anti Ln-5 /  $\gamma 2$ -Kette, monoklonaler Antikörper, IgG<sub>1</sub>, 5  $\mu\text{l/ml}$ ; Chemicon) erfolgte ebenfalls bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Nach viermaligem Waschen mit 1xTBS-Tween für je 15 Minuten schloss sich die Zugabe des sekundären Antikörpers (Anti-mouse Ig/anti-rabbit IgG-AP, BM Chromogenic Western Blotting Kit, Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) verdünnt mit 10 % Magermilchpulver / Hochsalzpuffer im Verhältnis 1:275 an (Konzentration 800mU/ml). Nach Inkubation für 1 Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und wiederum ausgiebigem Waschen mit 1xTBS-Tween erfolgte der Nachweis der gebundenen Antikörper unter

Verwendung der "ready-to-use substrate solution" des BM Chromogenic Western Blotting Kit (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) entsprechend des Herstellerprotokolls. Tabelle 18 gibt eine Übersicht über die verwandten Substanzen.

**Tabelle 17: Übersicht der verwandten Puffer und Gele für Western Blot und Proteinextraktion**

<b>Lysepuffer</b> 0,1M Tris/HCl; pH7,5 0,01M EDTA 2M Harnstoff 0,002M PMSF 0,002M N-Ethylmaleinimid 10E/ml Aprotinin	<b>2x Desintegrationspuffer</b> 0,125M Tris/HCl; pH 6,8 4% SDS 20% Glycerol 10% 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau
<b>Trenngel (8%) für Proteinelektrophorese</b> 18,95ml Aqua dest. 10,39ml 30% Acrylamid-Bis-Premix 3% C in Aqua dest. (Roche Diagnostics GmbH) 10ml 1,5M Tris/HCl; pH8,8 mischen und entgasen 0,4ml 10% SDS 0,24ml 10% APS 0,024ml TEMED	<b>Sammegel für Proteinelektrophorese</b> 11,71ml Aqua dest. 2,92ml 30% Acrylamid-Bis-Premix 3% C in Aqua dest. (Roche Diagnostics GmbH) 5ml 0,5M Tris/HCl; pH 6,8 mischen und entgasen 0,2ml 10% SDS 0,155ml 10% APS 0,0155ml TEMED
<b>Elektrophoresepuffer</b> 0,025M Tris/HCl; pH8,3 0,192M Glycin 0,1% SDS  <b>Blockierungslösung</b> 10% Magermilchpulver in Hochsalzpuffer	<b>Hochsalzpuffer</b> 0,01M Tris 0,2% Tween 20 0,5M NaCl  <b>Transferpuffer</b> 0,025M Tris/HCl; pH8,3 0,192M Glycin 20% Methanol

### 3.6. Statistische Analyse

#### 3.6.1. Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung

Der Mittelwert (MW) wurde aus der Summe der Einzelwerte, dividiert durch die Anzahl der Patientinnen (n) berechnet. Durch die Wurzel des Quotienten aus der Quadratsumme der Differenz der Einzelwerte zum Mittelwert und (n-1) ergab sich die jeweilige Standardabweichung (SD).

$$MW = \frac{\sum \text{Einzelwerte}}{n} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (\text{Einzelwert} - MW)^2}{n - 1}}$$

### 3.6.2. Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson

Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient  $r$  stellt ein normiertes Maß zur Quantifizierung eines linearen Zusammenhangs dar, wobei dieser sich durch die Division der Kovarianz  $s_{xy}$  durch die beiden Standardabweichungen  $s_x$  und  $s_y$  errechnet:

$$r = \frac{s_{xy}}{(s_x * s_y)}$$

Der dimensionslose Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen  $-1$  und  $+1$  annehmen, wobei ein positives Vorzeichen für einen gleichsinnigen, ein negatives für einen gegensinnigen Zusammenhang steht. Der Zusammenhang ist umso stärker ausgeprägt, je näher der Betrag an  $1$  liegt. Je näher  $r$  an  $0$  liegt, desto schwächer der Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient  $t$  wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet angegeben.

### 3.6.3. Vier-Felder-Test ( $\chi^2$ -Test)

Die Unabhängigkeit von zwei Alternativmerkmalen wurde mittels  $\chi^2$ -Test untersucht. Dem Test zugrunde lag eine Stichprobe des Umfangs  $n$  sowie den Häufigkeiten  $(a, b, c, d)$ , die sich aus der Betrachtung zweier Alternativmerkmale  $(A, A', B, B')$  ergab.

Die Prüfgröße berechnet sich beim Vierfelder-Test aus den absoluten Häufigkeiten als:

$$\chi^2 = \frac{n (ad-bc)^2}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)}$$

Die Prüfgröße ist umso größer, je mehr die beobachteten von den erwarteten Häufigkeiten abweichen. Unter der Nullhypothese sind die relevanten Ereignisse unabhängig voneinander. Falls die Prüfgröße innerhalb des Intervalls  $[0; \chi^2_{1;1-\alpha}]$  liegt, wird die Nullhypothese auf dem  $\alpha$ -Niveau beibehalten.

Für  $\alpha=5\%$  ist  $\chi^2_{1;0,95} = 3,841$ . Ist die Prüfgröße kleiner als dieser kritische Wert, ist anhand der Stichprobe kein Zusammenhang nachweisbar ( $p < 0,05$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Qualitative Bewertung der immunhistochemischen Expression der Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette in Bezug zum histologischen Kontext

#### 4.1.1. *Demonstration der Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette am histologischen Routinematerial der Zervix*

Für die Analyse der immunhistochemischen Expressionsmuster im histologischen Routinematerial der Zervix verwendeten wir den paraffingängigen monoklonalen Antikörper D4B5, welcher gegen die  $\gamma$ 2-Kette des Laminin-5 Moleküls gerichtet ist.

Dabei konnten grundsätzlich drei Phänomene identifiziert werden, die unabhängig voneinander in unterschiedlicher Ausprägung bei den einzelnen Läsionen nachweisbar waren:

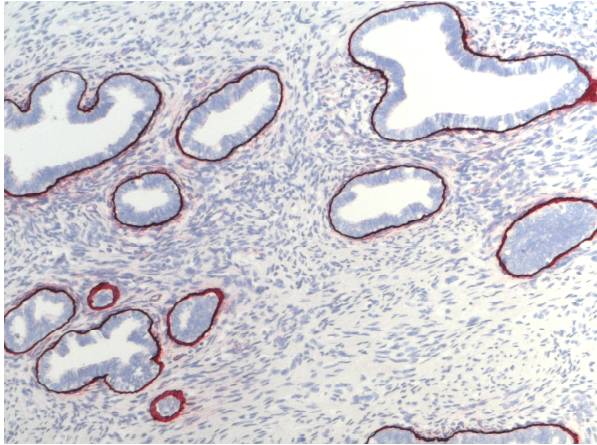
1. Eine Expression im Zytoplasma der Epithelzellen (zelluläre Retention),
2. Nachweis im Bereich des die Epithelkomplexe umgebenden Stromas (Stromadeposition) sowie
3. Eine Darstellung der Epithel-Stroma-Grenze, der Basalmembran entsprechend.

#### 4.1.2. *Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression in normaler, metaplastischer und entzündlich-veränderter Zervix*

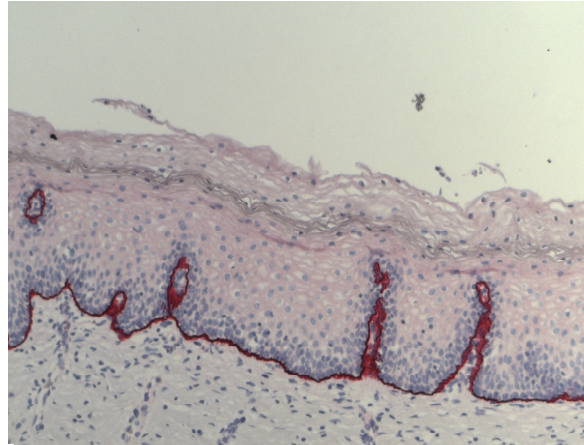
Im normalen adulten zervikalen Platten- und Zylinderepithel stellte sich unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 eine kontinuierliche bandförmige Färbung unterhalb der Basalzellschicht an der Epithel-Stroma-Grenze dar, welcher der Basalmembranregion entsprach. Weitere Expressionsphänomene konnten nicht nachgewiesen werden.

Im metaplastischen Zervixepithel sowie in hyperplastischen endozervikalen Drüsen traten regelmäßig Verbreiterungen der Basalmembran mit teilweise unscharfen äußeren Konturierungen auf (Abbildung 6 und 7). Metaplastisches Epithel der Transformationszone zeichnete sich weiterhin durch eine zytoplasmatische Expression einzelner Keratinozyten aller Zellagen mit Betonung der Basal- und Parabasalschicht aus („Mosaikmuster“).

Erosiv-entzündlich verändertes Zervixepithel markierte sich immunhistochemisch stark zytoplasmatisch, wobei die Immunreaktion sich ausschließlich auf unmittelbar von der Erosion betroffene Keratinozyten beschränkte. Im Unterschied zur Transformationszone fand sich kein „mosaikartiges“ Expressionsmuster. Vereinzelt ließ sich dagegen im anliegenden Stroma eine fokal wolkige Immunreaktion nachweisen. Bei starker Schädigung des Zervixepithels konnte die Basalmembran nicht ausnahmslos kontinuierlich dargestellt werden.



**Abb. 6:** Hyperplasie endozervikaler Drüsen, Ln-5 Färbung, 10fach vergrößert. Kontinuierliche Basalmembran (BM)-Darstellung, fokale Verdickung (Score ZR 0; SD 0; BM 0).



**Abb. 7:** Unreifes metaplastisches Plattenepithel der Transformationszone, Ln-5-Färbung, 10fach vergrößert. Kontinuierliche BM-Darstellung, abschnittsweise verdickt (Score ZR 0; SD 0; BM 0)..

Sowohl im Bereich der Transformationszone als auch bei einem Teil der erosiv-entzündlichen Läsionen konnten im unmittelbar angrenzenden Stroma Laminin-5 positive Strukturen detektiert werden, welche mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung (Laminin-5 und Faktor VIII) als Gefäßderivate bestätigt wurden (Kapitel 4.3.).

#### **4.1.3. Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression bei CIN-Läsionen**

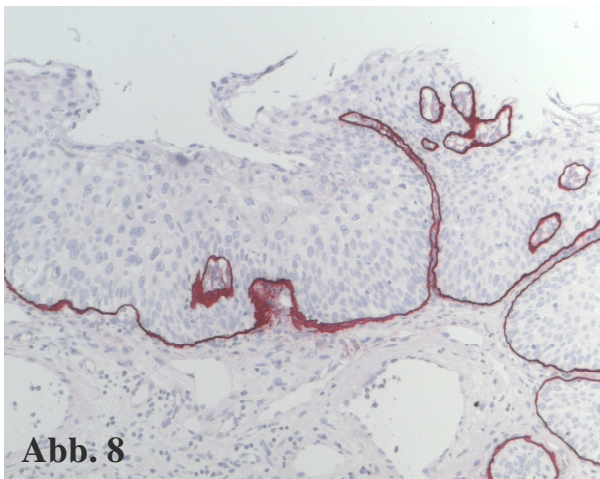
Grundsätzlich ließ sich in der Gruppe der prämaligen Läsionen eine immunhistochemische Expression zytoplasmatisch sowie extrazellulär in Stroma und Basalmembran nachweisen, wobei jede Dysplasie mindestens ein Expressionsphänomen zeigte. Weiterhin konnten Unterschiede zwischen den Dysplasiegraden bezüglich der Ausprägung einzelner Phänomene beobachtet werden.

In der Gruppe der CIN 1-Läsionen ließ sich die Basalmembran kontinuierlich darstellen. Vereinzelt trat eine zytoplasmatische Expression, ähnlich dem „Mosaikmuster“ der Transformationszone auf, jedoch mit stärkerer Betonung basaler Zellagen. Bei einem Drittel der Fälle konnte eine herdförmige epithelnahe Stromadeposition verzeichnet werden.

Bei den CIN 2-Läsionen zeigten die Basalmembranen regelmäßig Verdickungen und unscharfe Konturen, häufig in Kombination mit zytoplasmatischer oder extrazellulärer Laminin-5 Expression. Die zelluläre Retention trat dabei betont basal und parabasal auf, das für die Transformationszone sowie CIN 1-Läsion typische „Mosaikmuster“ wurde nur vereinzelt nachgewiesen. Aufgrund einer ausgeprägten basalen zellulären Retention konnte in zwei Fällen die Basalmembran nicht sicher abgegrenzt werden. Bei einem Drittel der Fälle ließ sich auch in dieser Gruppe eine herdförmige Expression im angrenzenden Stroma unabhängig von weiteren Expressionsphänomenen verzeichnen.

Die Gruppe der CIN 3-Läsionen zeigte sich lichtmikroskopisch bezüglich der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma 2$  Expression inhomogen. Bei einem Teil (40%) beschränkte sich die Immunreaktion auf die Darstellung einer abschnittsweise verdickten Basalmembran (Abbildung 8), gelegentlich von einer fokalen subepithelialen Stromadeposition begleitet. Die Mehrzahl der CIN 3-Läsionen (60%) sowie das Adenocarcinoma in situ wiesen Abschnitte basal betonter zellulärer Retention auf (Abbildung 9 und 10), welche regelmäßig von Basalmembrandiskontinuitäten und herd- oder bandförmiger Stromadeposition begleitet wurden. In 4 Fällen (5%) ließ sich die Basalmembran nicht mehr kontinuierlich nachweisen, in 5 Fällen (7%) war eine sichere Abgrenzung aufgrund einer ausgeprägten basalen zellulären Retention nicht möglich.

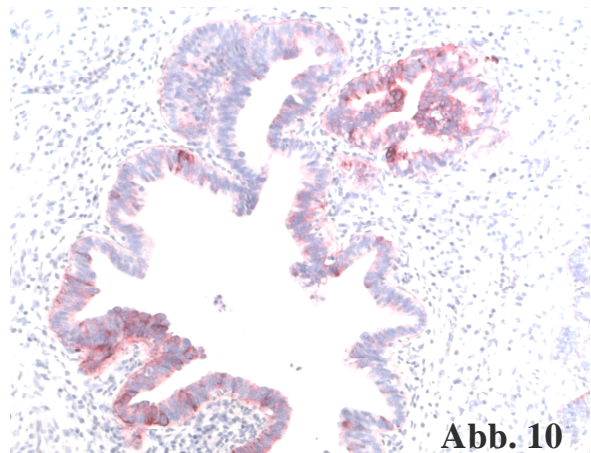
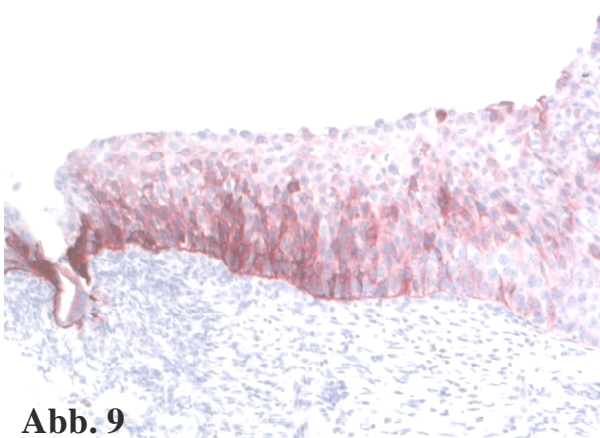
Bei 30% der CIN-Läsionen konnten subepithelial Laminin-5 positive Strukturen im Stroma detektiert werden, welche mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung (Laminin-5 und Faktor VIII) als Gefäßderivate bestätigt wurden (Kapitel 4.3.).



**Abb. 8:** CIN-3 Läsion der Zervix, Ln-5 Färbung, 10fach vergrößert. Basalmembran kontinuierlich, abschnittsweise verdickt (Score ZR 0; SD 0; BM 0).

**Abb. 9:** CIN-3 Läsion der Zervix. Ln-5 Färbung, 10fach vergrößert. Basalmembran kontinuierlich, fokal ausgedünnt. Ausgeprägte basale zelluläre Retention (Score ZR 2; SD 0; BM 1).

**Abb. 10:** Adenocarcinoma in situ (ACIS), Ln-5 Färbung, 10fach vergrößert. Basalmembran „verwaschen“, fokal basal zelluläre Retention (Score ZR 1; SD 0; BM 1).



#### **4.1.4. Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression im Zervixkarzinom**

Im Vergleich zum normalen, ruhenden Zervixepithel ließen sich unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 folgende immunhistochemische Modulationen der Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression in der Invasionszone des Plattenepithel- und Adenokarzinom aufzeigen:

1. Eine Expression im Zytoplasma invadierender Tumorzellen (zelluläre Retention),
2. Nachweis im Bereich des die Invasionszone umgebenden Stromas (Stromadeposition) sowie
3. Ein Verlust der Darstellbarkeit im Bereich der Basalmembran (Basalmembranabbruch).

Dabei stellte das Herauslösen von Laminin-5 aus dem Bereich der Basalmembran, lichtmikroskopisch als Basalmembranabbruch imponierend, ein obligates Phänomen für die Zervixkarzinome dar.

Als Ausnahme kristallisierten sich die neuroendokrinen Karzinome heraus, welche keine Immunreaktion gegenüber dem monoklonalen Antikörper D4B5 zeigten.

Auch innerhalb eines Karzinoms ergaben sich räumlich unterschiedliche Ausprägungen der Laminin-5 Expression mit der stärksten Immunreaktion stets an der Invasionsfront.

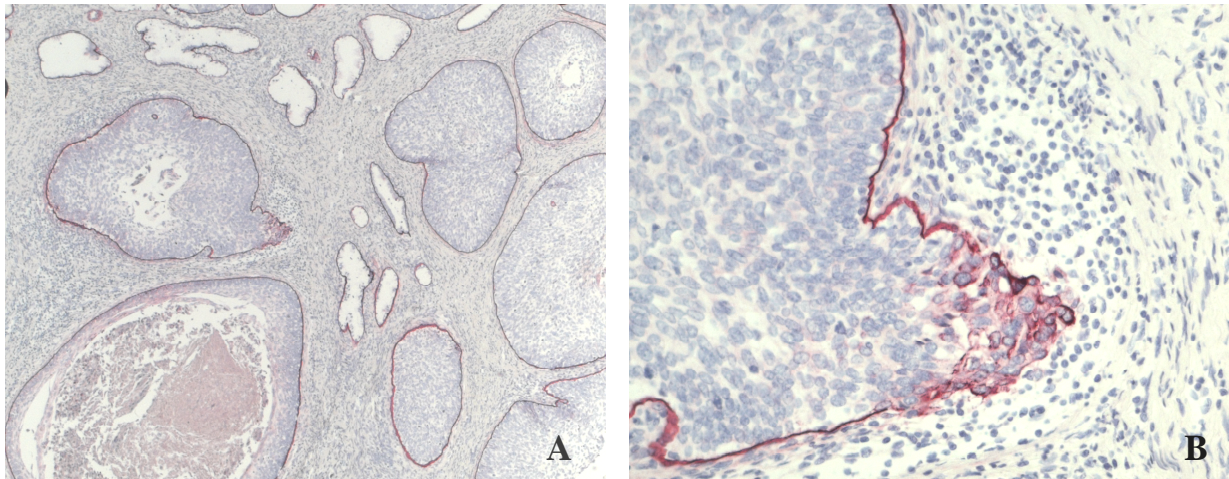
Um repräsentative Immunreaktionen zu erlangen, untersuchten wir bei allen Karzinomen mindestens zwei Abschnitte der Invasionsfront desselben Tumors, wobei der jeweilig repräsentativste zur Wertung gelangte.

##### **4.1.4.1. Immunreaktion beim mikroinvasiven Plattenepithelkarzinom**

Die zytoplasmatische Immunreaktion stellte beim mikroinvasiven Plattenepithelkarzinom der Zervix das führende Expressionsphänomen dar (Abbildung 11). Invadierende Tumorzellkomplexe im Bereich der Invasionsfront zeigten dabei eine alle Epithelschichten betreffende intensive zelluläre Retention. Hiermit verbunden konnte neben einer fokalen Stromadeposition (50% der Fälle) ein meist auf einzelne Invasionsknospen beschränkter Basalmembranverlust demonstriert werden. In 6 von 27 mittels HE-Schnitt diagnostizierten mikroinvasiven Karzinomen (22%) fehlte der Nachweis eines Basalmembranverlustes, wobei diese Fälle, mit Ausnahme eines, sich in der weiteren Aufarbeitung als Carcinoma-in-situ präsentierenden, regelmäßig eine moderate Stromadeposition unterhalb des neoplastischen Epithels aufwiesen.

Bei 40% der mikroinvasiven Plattenepithelkarzinome konnten subepithelial Laminin-5 positive Strukturen detektiert und mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung (Laminin-5 und Faktor VIII) als Gefäßderivate bestätigt werden (Kapitel 3.3.).





**Abb. 11:** Mikroinvasives Karzinom der Zervix, Ln-5 Färbung. Dysplastisches Epithel innerhalb endozervikaler Drüsen mit fokaler Mikroinvasion **A-** Übersicht, 4fach vergrößert. **B-** Ausschnitt, 20fach vergrößert. Im Bereich der Mikroinvasion fokaler Verlust der Basalmembran mit basaler zellulärer Retention (Score ZR 1; SD 0; BM 1).

#### 4.1.4.2. Immunreaktion beim Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom der Zervix zeichnete sich durch eine ausgeprägte Variabilität an immunhistochemischen Laminin-5 Expressionsphänomenen aus. Dabei lag an der Invasionsfront stets das stärkste Ausmaß an Expression vor, wobei jeweils ein Phänomen, also zelluläre Retention, Stromadeposition oder Basalmembranabbruch, führend war.

Zentrale Tumorabschnitte demonstrierten wenig Basalmembranverluste und eine geringe zytoplasmatische Immunreaktion bei fehlender Stromadeposition.

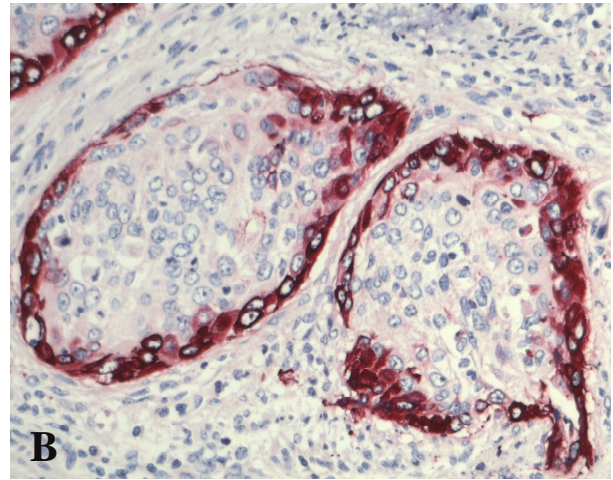
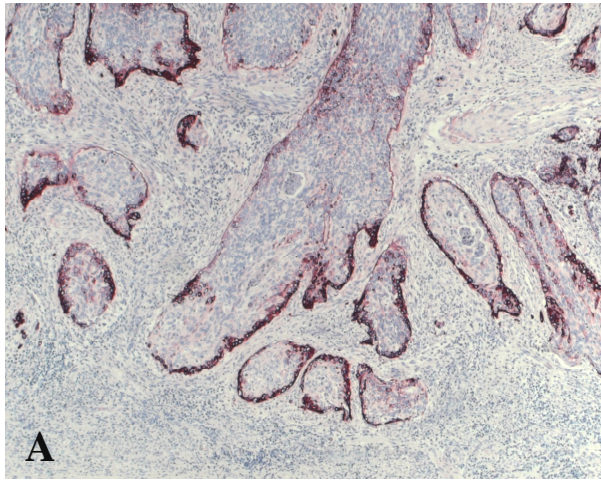
An der Invasionsfront führte in der Mehrzahl der Fälle (56%) die zelluläre Retention (Abbildung 12), regelmäßig von Basalmembranverlusten sowie fokaler Stromadeposition begleitet. Dabei variierte das semiquantitative Ausmaß von positiven „knospenden“ Tumorzellkomplexe bis hin zum komplett retinierenden Tumorzellkomplex. Schlecht differenzierte Karzinome zeigten weniger zelluläre Retention als besser differenzierte. Mittels immunhistochemischer Laminin-5-Zytokeratin-Doppelmarkierung konnte die zytoplasmatische Immunreaktion als intrazellulär bestätigt werden (Abbildung 16).

Die Stromadeposition, in 10% der Fälle führendes Phänomen der Invasionsfront (Abbildung 13), umgab zumeist herdförmig konfluierend zellulär retinierende Tumorzellkomplexe (Abbildung 14).

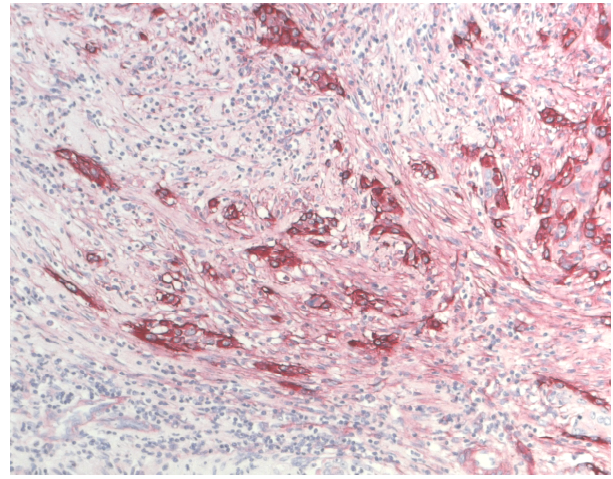
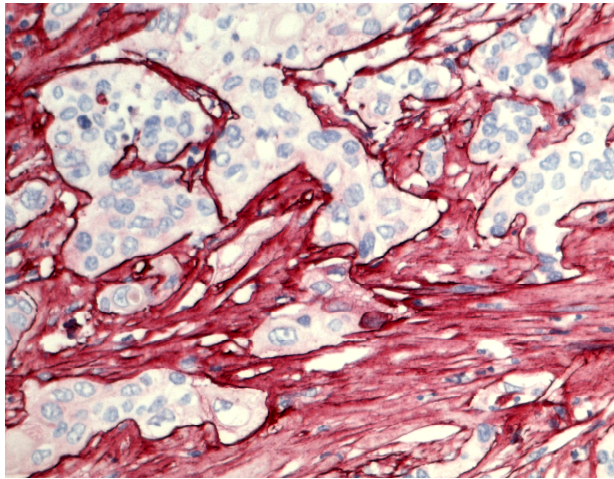
Basalmembranverluste konnten in allen untersuchten Fällen an der Invasionsfront nachgewiesen werden, in 33% als führendes Expressionsphänomen (Abbildung 15). Hierbei wirkte die Basalmembran „zerstückelt“ und wurde regelmäßig von einer ausgeprägten Stromadeposition begleitet.

Nur in Einzelfällen ließen sich beim Plattenepithelkarzinom subepithelial Laminin-5 positive Gefäßderivate nachweisen (Kapitel 3.3.).



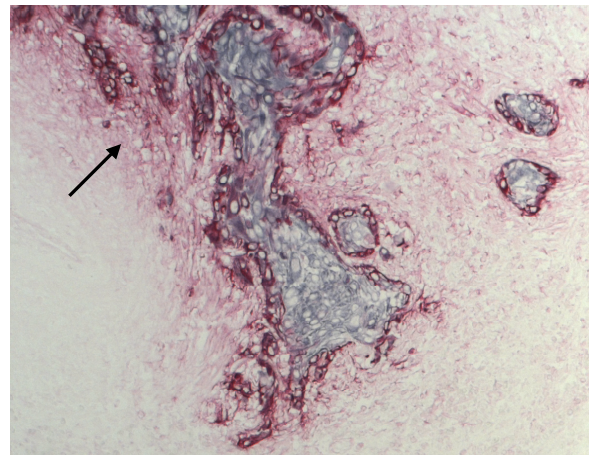
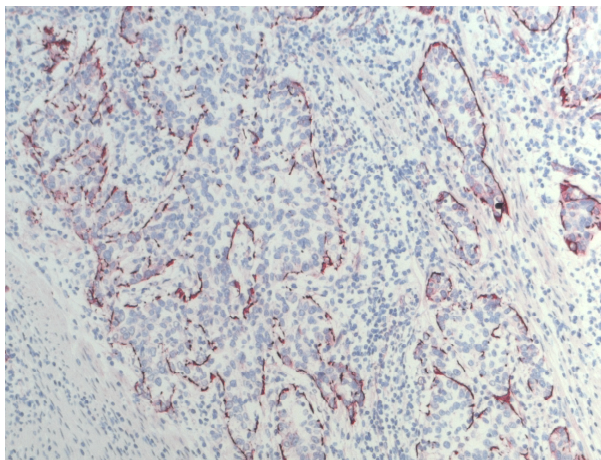


**Abb. 12:** Invasionsfront eines gering differenzierten Plattenepithelkarzinoms der Zervix, Ln-5 Färbung. Ausgeprägte basale zelluläre Retention im Bereich knospende Tumorzellkomplexe mit korrespondierendem Verlust der Basalmembranarstellung (Score ZR 2; SD 0; BM 3). A- Übersicht, 4fach vergrößert, B- Ausschnitt, 20fach vergrößert.



**Abb. 13:** Gering differenziertes Plattenepithelkarzinom der Zervix, Ln-5 Färbung, 20fach vergrößert. Den gesamten extrazellulären Raum ausfüllende Stromadeposition (Score ZR 0; SD 3; BM 2).

**Abb. 14:** Invasionsfront eines gering differenzierten Plattenepithelkarzinoms der Zervix, Ln-5 Färbung, 10fach vergrößert. Ausgeprägte zelluläre Retention, konfluierende Stromadeposition. Basalmembran nicht darstellbar (Score ZR 2; SD 2; BM 3).



**Abb. 15:** Invasionsfront eines gering differenzierten Plattenepithelkarzinoms der Zervix, Ln-5 Färbung, 10fach vergrößert. Prominente Basalmembranabbrüche (Score ZR 0; SD 0; BM 3).

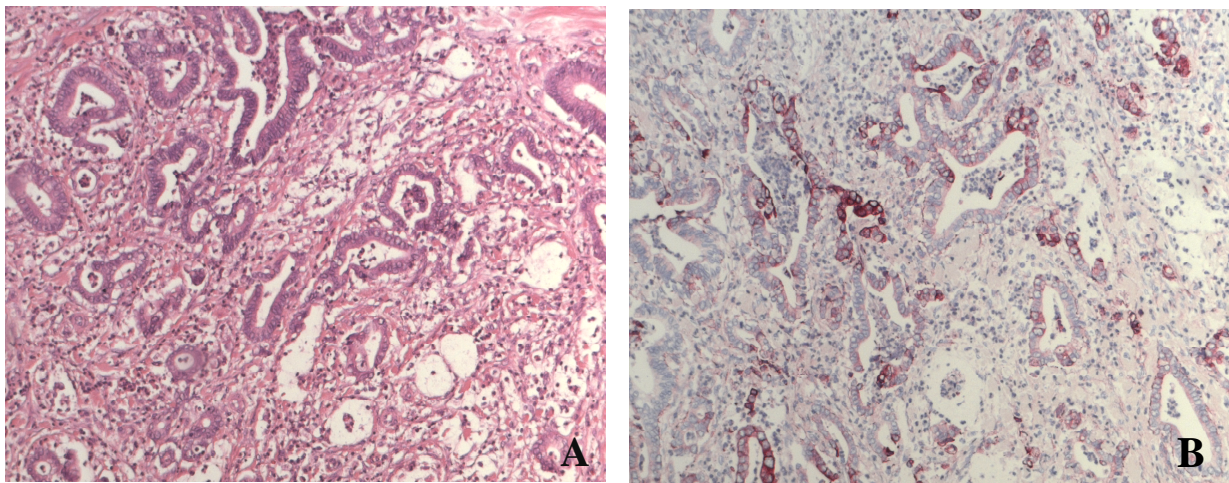
**Abb. 16:** Invasionsfront eines mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinoms der Zervix, Doppelmarkierung Zytokeratin (schwarz) und Ln-5 (rot), 10fach vergrößert. Epithelial differenzierte Zellen (schwarz) mit ausgeprägter basaler zellulärer Retention (rot) und begleitender Stromadeposition (Pfeil) (Score ZR 2; SD 2; BM 2).



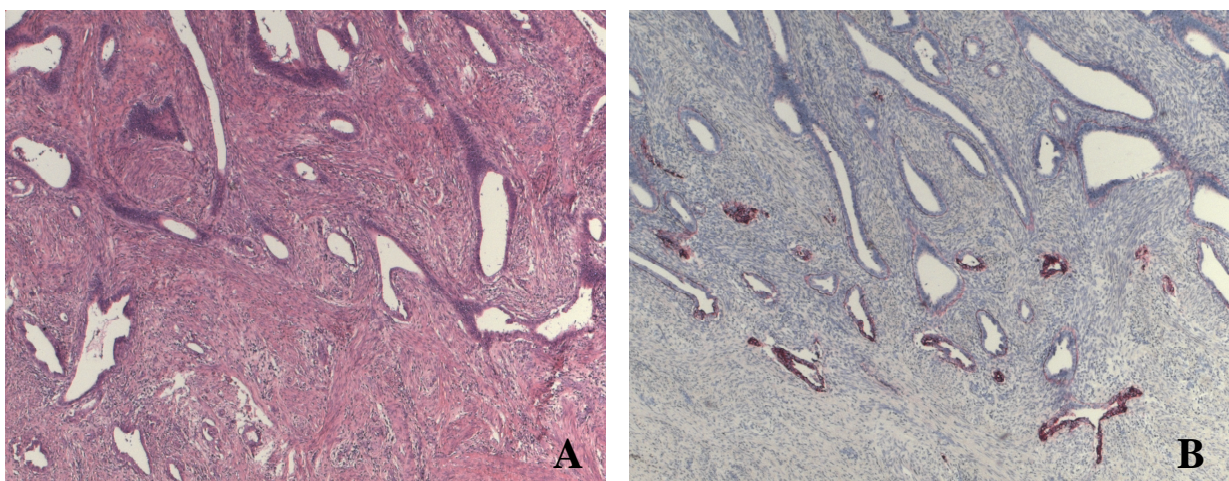
#### 4.1.4.3. Immunreaktion beim Adenokarzinom

Beim Adenokarzinom der Zervix ließen sich grundsätzlich die gleichen Muster nachweisen wie beim Plattenepithelkarzinom. Auch hier überwog die zelluläre Retention als führendes Expressionsphänomen an der Invasionsfront (65%) gegenüber dem Basalmembranabbruch (19%) sowie der Stromadeposition (12%). Jedoch war die intrazelluläre Immunreaktion im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom generell schwächer ausgeprägt und blieb zumeist auf „knospende“ Tumorzellkomplexe beschränkt (Abbildung 17 und 18).

An der Invasionsfront konnten Basalmembranverluste in allen untersuchten Fällen sowie eine variierende Stromadeposition in der Mehrzahl der Fälle nachgewiesen werden.



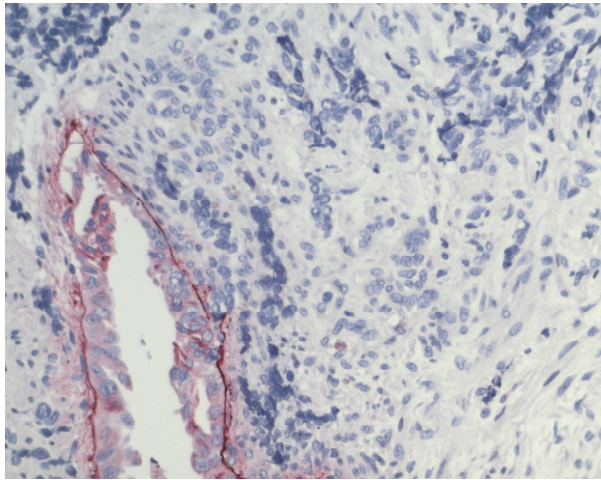
**Abb. 17:** Mäßig differenziertes Adenokarzinom der Zervix, endozervikaler Typ. **A-** H&E-Färbung, 10fach vergrößert. **B-** Ln-5 Färbung, 10fach vergrößert. Fokal basale zelluläre Retention (Score ZR 1; SD 0; BM 2).



**Abb. 18:** Minimal-abweichendes Adenokarzinom der Zervix. **A-** H&E, 4fach vergrößert. Unregelmäßig verzweigte, ektatische endozervikale Drüsen, geringgradige Zellatypien. **B-** Ln-5 Färbung, 4fach vergrößert. Fokale basale zelluläre Retention, streng auf Invasionsfront begrenzt (Score ZR 1; SD 0; BM 2). Zentral fehlende intra- sowie extrazelluläre Reaktion.

#### 4.1.4.4. Immunreaktion beim neuroendokrinen Karzinom

Neuroendokrine Karzinome demonstrierten unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers



**Abb. 19:** Neuroendokrines kleinzelliges Karzinom der Zervix, Ln-5 Färbung, 20fach vergrößert. Keine Laminin-5 Immunreaktion im gesamten Tumor. Im Kontrast dazu die kontinuierliche Basalmembranartikulation einer angrenzenden endozervikalen Drüse (Score ZR 0; SD 0; BM 0).

D4B5 ausnahmslos ein Fehlen jeglicher immunhistochemischer Expression bei erhaltener Darstellung der Basalmembran im angrenzenden, ruhenden Platten- oder Zylinderepithel (Abbildung 19). Anteile schlecht differenzierter Karzinome mit komplett fehlender Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression konnten nachträglich mittels immunhistochemischer Methoden (Somatostatin, NSE, Chromogranin) als neuroendokrin identifiziert werden.

## 4.2. Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5 $\gamma$ 2 Expression in Abhängigkeit von der histologischen Diagnose

Die semiquantitative Bewertung erfolgte mittels des im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebenen Auswertungsmodus für prämaligene bzw. maligne Zervixläsionen.

Bei den prämaligen Läsionen sowie dem mikroinvasiven Plattenepithelkarzinom wurde neben der Ausprägung der einzelnen Expressionsphänomene auch das Vorhandensein Laminin-5 positiver Gefäßstrukturen im anliegenden Stroma erfasst (Tabelle 18 und 19), welche mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung (Laminin-5 und Faktor VIII) als solche verifiziert (Kapitel 4.3.).

Beim Plattenepithel- und Adenokarzinom der Zervix wurde die Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5 Expression um die Zuordnung eines an der Invasionsfront dominierenden Expressionsphänomens, also zelluläre Retention, Stromadeposition oder Basalmembranabbruch erweitert (Tabelle 20 und 21). Bei 15% der Plattenepithel- bzw. 23% der Adenokarzinome konnte aufgrund gleich stark ausgeprägter Phänomene keine eindeutige Zuordnung getroffen werden. Das neuroendokrine Karzinom zeichnete sich durch eine komplette fehlende Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression aus (Tabelle 22).

**Tabelle 18: Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma 2$  Expression in prämaligen Läsionen der Zervix (Transformationszone, Endozervizitis, CIN-Läsion)**

Nr.	CIN	ZR	SD	BM	Gefäße	Nr.	CIN	ZR	SD	BM	Gefäße	Nr.	CIN	ZR	SD	BM	Gefäße
1	1	0	0	0	1	51	3	3	0	0	0	101	3	3	0	1	0
2	1	1	0	0	0	52	3	3	1	3	1	102	3	1	0	0	0
3	1	0	1	0	1	53	3	1	0	0	1	103	3	1	1	0	0
4	1	0	0	0	0	54	3	2	0	0	1	104	3	2	1	1	0
5	1	1	0	0	0	55	3	0	1	0	0	105	3	1	0	0	0
6	1	1	1	0	0	56	3	1	2	0	1	106	3	2	1	0	1
7	1	1	1	0	0	57	3	2	0	0	0	107	3	2	2	0	1
8	1	1	2	0	1	58	3	1	0	0	1	108	3	2	1	0	1
9	1	1	0	0	1	59	3	0	1	0	1	109	3	0	0	0	0
10	1	0	1	0	1	60	3	2	0	0	0	110	3	3	0	3	1
11	1	0	1	0	0	61	3	0	0	0	1	111	3	0	0	0	0
12	1	0	0	0	0	62	3	2	0	0	0	112	3	2	0	0	0
13	1	2	1	1	1	63	3	2	1	1	0	113	3	0	0	0	0
14	1	0	0	0	0	64	3	3	2	1	1	114	3	0	0	0	0
15	1	1	0	0	0	65	3	0	0	0	0	115	3	2	0	1	0
16	1	0	0	0	0	66	3	0	2	0	1	116	3	2	0	1	1
17	1	0	0	0	0	67	3	0	1	0	1	117	3	2	0	0	0
18	1	0	0	0	0	68	3	0	0	0	0	118	3	2	3	1	1
19	2	2	1	0	0	69	3	0	1	0	0	119	3	2	0	0	0
20	2	1	0	0	0	70	3	0	0	0	0	120	3	0	0	0	0
21	2	1	1	0	1	71	3	2	1	2	1	121	ACIS	1	0	1	0
22	2	0	0	0	0	72	3	0	0	0	0	122	ACIS	0	1	0	1
23	2	0	0	0	0	73	3	1	1	0	1	123	TZ	1	0	0	1
24	2	0	0	0	0	74	3	0	0	0	0	124	TZ	1	1	0	1
25	2	1	1	0	1	75	3	2	0	0	0	125	Zervizitis	1	1	0	1
26	2	1	1	0	1	76	3	2	0	1	1						
27	2	0	0	0	0	77	3	2	1	0	1						
28	2	0	0	0	0	78	3	0	0	0	0						
29	2	2	0	0	0	79	3	2	0	0	1						
30	2	2	1	1	0	80	3	2	2	1	1						
31	2	2	2	0	1	81	3	0	1	0	0						
32	2	3	0	1	0	82	3	2	0	3	1						
33	2	2	1	2	1	83	3	1	0	0	1						
34	2	2	0	0	0	84	3	2	0	2	0						
35	2	1	0	0	0	85	3	1	0	0	0						
36	2	0	0	0	0	86	3	2	0	1	0						
37	2	0	1	0	1	87	3	2	1	0	1						
38	2	2	0	0	1	88	3	1	1	0	0						
39	2	2	2	0	0	89	3	0	0	0	0						
40	2	2	0	0	0	90	3	1	0	0	0						
41	2	2	0	0	0	91	3	2	0	0	0						
42	2	2	0	2	1	92	3	3	0	2	0						
43	2	1	0	0	0	93	3	1	1	0	0						
44	2	2	0	1	0	94	3	2	0	1	1						
45	2	2	0	0	0	95	3	0	1	0	0						
46	3	3	0	1	0	96	3	1	1	0	1						
47	3	0	1	0	1	97	3	0	0	0	0						
48	3	3	0	2	0	98	3	2	0	2	0						
49	3	2	1	3	0	99	3	0	0	0	0						
50	3	0	0	0	0	100	3	1	1	0	0						

CIN: zervikale intraepitheliale Neoplasie

ZR: zelluläre Retention

SD: Stromadeposition

BM: Basalmembranverlust

ACIS: Adenocarcinoma in situ

TZ: Transformationszone

**Tabelle 19: Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma$ 2 Expression beim mikroinvasiven Plattenepithelkarzinom der Zervix**

Nr.	pT	N	M	G	ZR	SD	BM	Gefäße	Nr.	pT	N	M	G	ZR	SD	BM	Gefäße
1	1a1	x		x	1	0	1	0	17	1a1	x		x	1	0	1	0
2	1a1	x		x	0	1	0	1	18	1a1	x		x	0	0	2	0
3	1a1	0		1	0	1	1	1.	19	1a1	x	x	1	1	0	1	0
4	1a1	x		x	0	1	1	1	20	1a1	x		x	0	1	0	1
5	1a1	x	x	2	1	1	1	1	21	1a1	x		x	1	0	1	0
6	1a1	x		x	0	1	0	1	22	1a1	0		x	1	1	1	1
7	1 a1	x		x	1	1	1	1	23	1a1	x		x	1	1	1	0
8	1 a1	x	x	x	2	1	1	0	24	1a1	x		x	0	0	0	0
9	1 a1	x		x	1	0	2	0	25	1a1	0		x	1	2	2	1
10	1 a1	0	0	x	2	1	2	1	26	1a1	x		x	2	0	2	0
11	1 a1	x		x	1	1	1	1	27	1a1	x		1	1	0	1	0
12	1a1	x		x	0	1	0	0	28	1a2	0		1	1	0	1	0
13	1a1	0		1	1	0	1	1	29	1a2	0		1	2	1	2	0
14	1a1	x		x	1	0	1	0	30	1a2	0	0	2	1	0	1	0
15	1a1	x		x	1	0	1	0	31	1a2	0		1	1	0	1	0
16	1a1	x		x	0	1	0	1	32	1a2	0	0	1	1	0	1	0

CIN: zervikale intraepitheliale Neoplasie

pT: Tumorausdehnung

ZR: zelluläre Retention

N: nodale Metastasierung

SD: Stromadeposition

M: Fernmetastasierung

BM: Basalmembranverlust

G: Differenzierungsgrad

**Tabelle 20: Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma 2$  Expression beim Plattenepithelkarzinom der Zervix (pT>1a)**

Nr.	pT	N	M	G	ZR	SD	BM	Dom. Phänomen	Nr.	pT	N	M	G	ZR	SD	BM	Dom. Phänomen
33	1 b	0	x	3	3	0	3	BM/ZR	81	2	1	0	3	1	3	2	ZR
34	1 b	0	0	2	1	2	1	ZR	82	2	0	x	2	1	3	2	ZR
35	1 b	x	x	x	2	1	2	ZR	83	2a	1	0	2	1	3	3	ZR/SD
36	1 b	0	0	3	1	2	3	BM	84	2a	0	0	3	1	2	1	SD
37	1 b	0	0	3	1	1	3	ZR	85	2a	0	1	3	0	3	1	BM
38	1 b	0	0	2	1	2	2	ZR	86	2a	0	0	3	2	2	2	ZR
39	1 b	1	x	2	2	0	2	ZR	87	2 b	0	0	2	0	1	2	BM
40	1 b	0	x	3	1	1	3	BM/ZR	88	2 b	0	x	3	1	3	3	BM/SD
41	1 b1	1	1	3	2	1	3	ZR	89	2 b	0	0	2	1	1	2	ZR
42	1 b1	0	0	2	1	1	2	ZR	90	2 b	0	x	3	1	1	3	BM/ZR
43	1 b1	0	0	3	0	1	2	BM	91	2 b	0	0	2	2	1	2	ZR
44	1 b1	0	0	3	0	1	3	BM	92	2 b	0	x	3	1	1	2	ZR
45	1 b1	0	x	2	1	2	2	ZR/SD	93	2 b	0	1	2	1	1	3	BM
46	1 b1	0	0	3	1	1	2	ZR	94	2 b	0	0	3	0	3	2	SD
47	1 b1	0	0	3	1	3	2	SD	95	2 b	0	0	3	0	2	2	SD/BM
48	1 b1	1	0	3	1	3	3	BM/SD	96	2 b	0	x	2	1	2	3	BM
49	1 b1	0	0	3	0	1	3	BM	97	2 b	1	0	2	1	1	3	ZR/BM
50	1 b1	0	x	2	1	2	2	ZR	98	2 b	0	x	2	2	2	2	ZR
51	1 b1	0	0	3	1	2	2	ZR	99	2 b	x	x	4	1	1	3	ZR
52	1 b1	0	0	2	1	3	2	ZR	100	2 b	0	x	3	1	2	2	ZR
53	1 b1	0	1	2	2	2	3	ZR	101	2 b	1	0	3	0	1	3	BM
54	1 b1	0	0	2	1	1	2	BM	102	2 b	1	0	2	1	1	3	ZR
55	1 b1	0	0	3	2	2	3	ZR	103	2 b	0	1	3	1	3	3	ZR
56	1 b1	0	0	3	0	2	3	BM	104	2 b	1	x	3	0	1	3	BM
57	1 b1	0	0	2	1	1	1	ZR	105	2 b	0	1	3	0	3	3	BM/SD
58	1 b1	0	0	1	1	0	1	ZR	106	2 b	0	x	3	1	3	3	SD
59	1 b1	0	0	3	1	1	1	ZR	107	2 b	0	x	3	1	2	3	BM
60	1 b1	1	0	4	1	1	3	SD	108	2 b	0	x	4	3	1	3	ZR
61	1 b1	0	1	3	0	1	3	BM	109	2 b	0	0	3	2	3	2	ZR
62	1 b2	0	x	2	2	3	2	SD/ZR	110	2 b	0	x	2	2	1	2	ZR
63	1 b2	0	0	3	1	3	3	SD/BM	111	2 b	0	0	3	1	3	2	SD
64	1 b2	0	0	3	0	1	1	BM	112	2 b	1	0	3	1	1	3	BM
65	1 b2	0	x	3	2	2	2	ZR	113	2 b	0	x	2	2	3	3	ZR
66	1 b2	0	0	3	1	2	3	ZR	114	2 b	1	0	3	1	2	3	ZR
67	1 b2	0	0	3	0	1	3	BM	115	2 b	0	0	2	1	2	2	BM
68	1 b2	1	0	2	1	0	3	ZR	116	2 b	1	x	3	1	3	3	BM/SD
69	1 b2	0	x	3	2	1	3	ZR	117	3a	1	0	3	1	3	1	ZR
70	1 b2	1	1	3	0	1	3	BM	118	3a	1	x	3	2	3	3	ZR
71	1 b2	1	1	2	0	1	3	BM	119	3 b	1	0	2	1	3	2	SD/ZR
72	1 b2	0	0	2	1	0	1	ZR	120	3 b	0	0	2	1	2	1	ZR
73	1 b2	0	0	2	2	2	3	ZR	121	3 b	1	0	2	1	1	3	ZR
74	1 b2	0	0	3	0	2	3	BM	122	4	x	x	4	1	2	3	BM
75	1 b2	0	x	3	1	1	2	ZR	123	4	1	x	3	1	2	2	ZR
76	1 b2	0	0	2	1	2	2	ZR	124	4	1	1	x	1	1	2	ZR
77	1 b2	1	0	3	2	0	2	ZR	125	4	1	x	2	2	2	3	ZR
78	1 b2	x	x	3	0	3	3	BM	126	4	x	x	3	0	3	2	BM
79	1 b2	1	0	2	1	1	2	ZR	127	4	1	0	3	1	2	2	ZR
80	1 b2	0	x	2	2	1	2	ZR	128	4	0	0	2	0	2	3	BM



**Tabelle 21: Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma 2$  Expression beim Adenokarzinom der Zervix**

Nr.	Adenokarzinom-Typ	pT	N	M	G	ZR	SD	BM	Dom. Phänomen
1	Endozervikal/minimal-invasiv	1a1	0	0	x	1	0	0	ZR
2	Endozervikal/minimal-invasiv	1a2	0	0	1	0	1	0	ZR
3	Wechselnd differenziert/muzinös	1b	x	x	2	1	1	3	ZR
4	Tubulo-papillär	1b1	1	1	2	0	2	3	BM
5	Endozervikal/minimal abweichend	1b1	0	0	1	1	1	1	ZR
6	Endozervikal	1b1	0	x	3	1	2	3	ZR
7	Hellzellig	1b1	0	0	2	2	2	3	ZR
8	Endozervikal/muzinös/intestinal	1b2	0	0	3	1	1	3	ZR
9	Adenoid-zystisch	1b2	0	x	3	1	3	2	SD
10	Endozervikal	1b2	0	0	2	1	2	3	BM
11	Adenosquamös	1b2	0	0	2	2	2	3	ZR
12	Endozervikal	1b2	0	0	3	1	2	2	BM/SD
13	Villoglandulär-endozervikal	1b2	0	0	2	1	2	1	ZR/BM
14	Endozervikal/muzinös	1b2	1	0	2	1	0	2	ZR
15	Endozervikal	1b2	0	1	2	1	2	2	ZR
16	Endozervikal	2a	1	0	2	2	1	3	ZR
17	Adenosquamös	2b	x	x	2	1	3	2	SD/BM
18	Adenosquamös	2b	1	0	3	1	3	3	BM/SD
19	Endozervikal/tubulo-villös	2b	x	x	2	1	0	3	ZR
20	Endozervikal	2b	0	0	1	1	0	1	ZR
21	Endozervikal/muzinös	2b	1	0	2	1	3	3	ZR
22	Endozervikal/muzinös	2b	0	0	2	1	2	3	ZR
23	Siegelringzellenbildend trophoblastische Differenzierung	2b	0	0	3	0	2	3	BM
24	Endozervikal	2b	0	0	2	1	1	1	ZR
25	Adenoid-zystisch	3b	1	0	2	1	3	2	ZR/SD
26	Adenosquamös	3b	0	0	3	1	3	2	SD/BM

**Tabelle 22: Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma 2$  Expression beim neuroendokrinen Zervixkarzinom**

Nr.	pT	N	M	G	zR	SD	BM
1	1b	1	x	4	0	0	0
2	1b	0	1	3	0	0	0
3	1b2	0	0	3	0	0	0
4	2 b	1	1	3	0	0	0

CIN: zervikale intraepitheliale Neoplasie

ZR: zelluläre Retention

SD: Stromadeposition

BM: Basalmembranverlust

pT: Tumorausdehnung

N: nodale Metastasierung

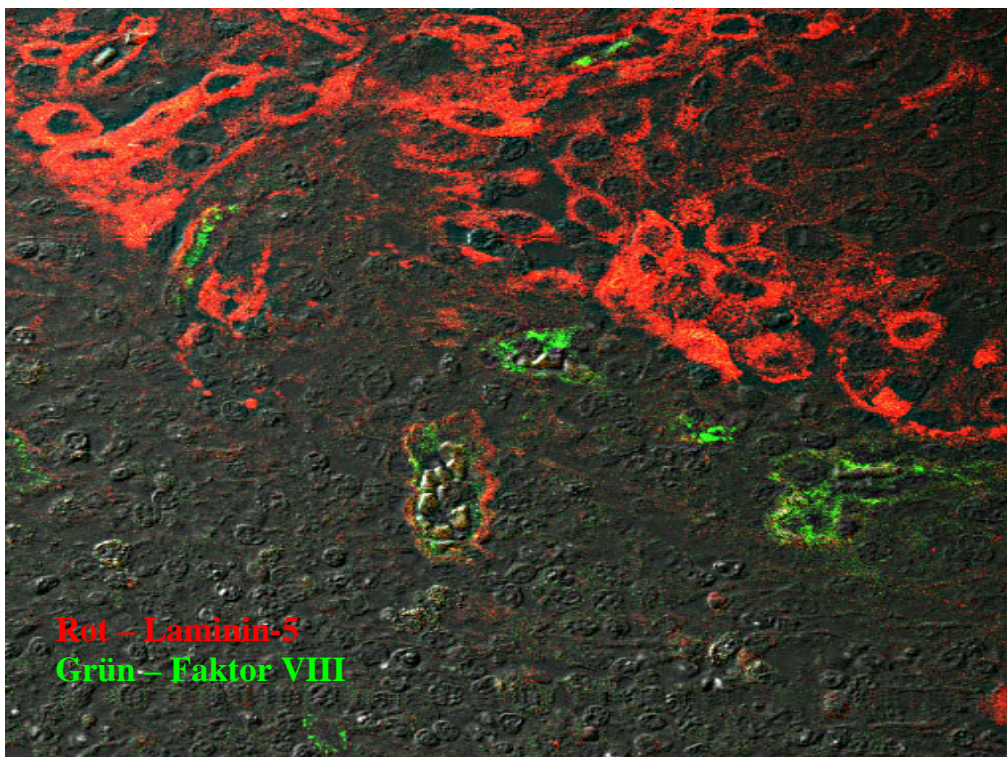
M: Fernmetastasierung

G: Differenzierungsgrad

### 4.3. Analyse der mittels Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung dargestellten Kolokalisation von Faktor VIII und dem monoklonalen Antikörper D4B5

Bei der Auswertung der Laminin-5 Expressionsmuster fielen sowohl in der zervikalen Transformationszone, bei den CIN-Läsionen als auch beim mikroinvasiven Plattenepithelkarzinom regelmäßig Laminin-5 positive Strukturen im unmittelbar angrenzenden Stroma auf. Mittels Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung konnte eine Kolokalisation des Endothelmarkers Faktor VIII mit dem monoklonalen Antikörper D4B5 zum Nachweis der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette aufgezeigt werden. Diese Kolokalisation wurde exemplarisch anhand von drei Fällen (Transformationszone, CIN 3-Läsion, mikroinvasives Karzinom) mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bewiesen sowie überzeugend optisch dargestellt (Abbildung 20) und erlaubte damit eine Bestätigung dieser Strukturen als Gefäßderivate.

Alle untersuchten Transformationszonen wiesen ausnahmslos Laminin-5 positive Gefäßderivate auf. Erosiv-entzündliche Läsionen zeigten regelmäßig zahlreiche Faktor VIII-positive Gefäßderivate, jedoch nur unregelmäßig eine Kolokalisation mit dem monoklonalen Antikörper D4B5. Bei insgesamt 42 von 120 CIN-Läsionen (35%) wurden unmittelbar unterhalb des dysplastischen Epithels Laminin-5 positive Gefäßspalten identifiziert (CIN 1: 6



**Abb. 20:** Markierung der Gefäßwände neuformierter Tumorgefäße in der Invasionszone eines Plattenepithelkarzinoms der Zervix. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, DIG-Kontrast zur Darstellung der zellulären Umrise, Doppelimmunfluoreszenzmarkierung, grün - Faktor VIII, rot - Laminin-5.



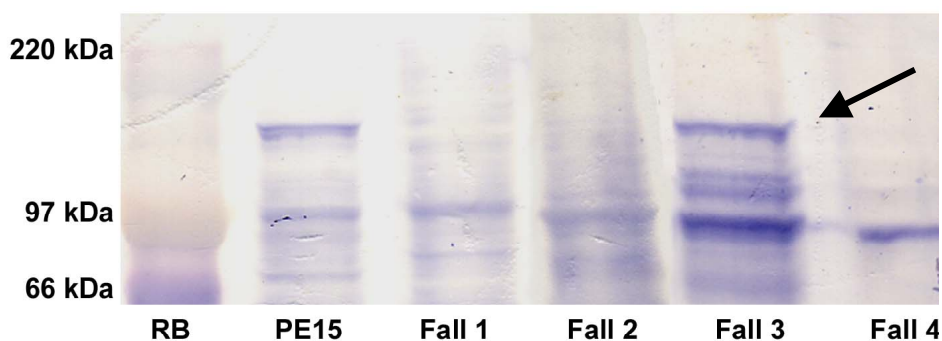
(33%); CIN 2: 8 (30%); CIN 3: 28 (37%)). Dabei waren diese Gefäßstrukturen, im Gegensatz zu denen der Transformationszone, in 17 Fällen (41%) von einer fokalen Stromadeposition umgeben.

Bei den mikroinvasiven Karzinomen konnten bei insgesamt 13 von 32 untersuchten Fällen (41%) in die Invasionsfront umgebenden Stroma positive Gefäßstrukturen aufgezeigt werden, während diese bei Karzinomen in fortgeschritteneren pT-Stadien (pT >1a) nur sehr vereinzelt auftraten.

#### 4.4. Western Blot

In Gewebelysaten von vier verschiedenen Zervixkarzinomen unterschiedlichen Differenzierungsgrades erfolgte der Nachweis der Laminin-5  $\gamma 2$  Kette auf Proteinebene mittels Western Blot. Da vergleichbare Gewebemengen für die Analyse eingesetzt wurden, konnte über die Stärke der Banden eine Einschätzung der Menge an Laminin-5  $\gamma 2$  Kette erfolgen.

In allen vier Fällen konnte die prozessierte Form der Laminin-5  $\gamma 2$ -Kette (105 kDa) eindeutig nachgewiesen werden. Fall 3 zeigte eine zusätzliche Bandenmarkierung bei 155 kDa (Abbildung 21, Pfeil), die nicht-prozessierte Form der  $\gamma 2$ -Kette repräsentierend. In der Positivkontrolle (Zelllinie PE15) konnte sowohl die prozessierte als auch die nicht-prozessierte Form der Laminin-5  $\gamma 2$ -Kette detektiert werden. Unterschiede in der Expression der Laminin-5  $\gamma 2$ -Kette schienen in keinem Bezug zum Differenzierungsgrad der ausgewählten Karzinome zu stehen.



**Abb. 21:** Immunoblotting unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 bei unterschiedlichen Zervixkarzinom-Zell-Lysaten (Fall 1-4; Zelllinie PE15 als Positivkontrolle). Fall 3 zeigt eine zusätzliche Bandendarstellung im Bereich von 150 kDa (Pfeil), der unprozessierten Form der Laminin-5  $\gamma 2$ -Kette entsprechend.

Die lichtmikroskopische Bewertung der Laminin-5  $\gamma 2$ -Expression erfolgte sowohl am Kryostat als auch am entparaffinierten Schnitt, wobei die Modulationen der immunhistochemischen

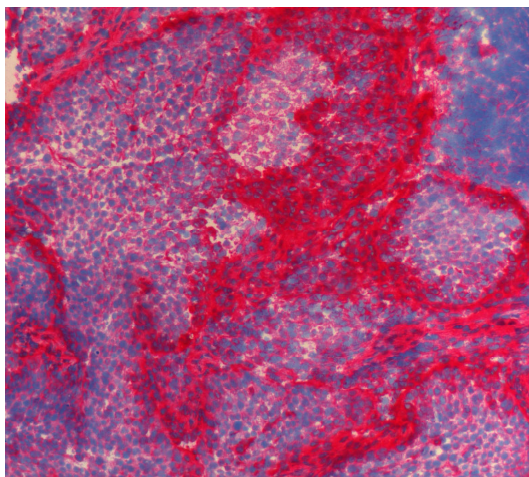
Laminin-5 Expression im Ausmaß einander entsprachen mit Ausnahme von Fall 2, der durch ausgedehnte Nekrosen im Kryostatschnitt gekennzeichnet war, sodass hier nur eine Bewertung am Paraffinschnitt erfolgte (Tabelle 23).

Fall 1 zeigte eine ausgeprägte zelluläre Retention (Abbildung 22), während Fall 3 sich durch eine massive Stromadeposition auszeichnete (Abbildung 23).

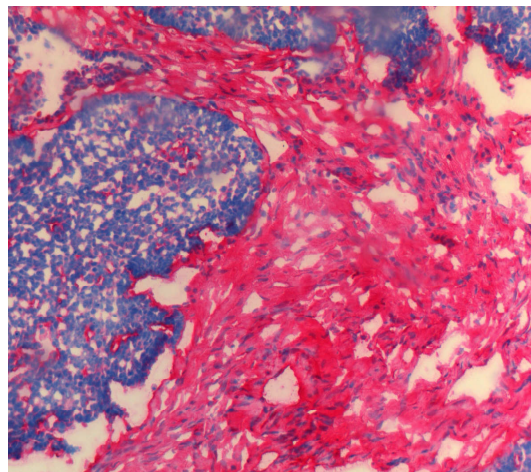
**Tabelle 23: Histologische Merkmale der im Western Blot untersuchten Zervixkarzinome sowie semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Ln-5  $\gamma$ 2 Expression am Kryostatschnitt**

	Histologische Diagnose (HE)	pTN	cM	Lichtmikroskopische semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5 Expression am Kryostatschnitt*
<b>Fall 1</b>	Gering differenziertes Plattenepithelkarzinom	pT2b pN1	M0	ZR 3 (2) SD1 BM 3
<b>Fall 2</b>	Gering- bis undifferenziertes Plattenepithelkarzinom	pT2b pN0	Mx	ZR 2 SD3 BM 2
<b>Fall 3</b>	Gering differenziertes Plattenepithelkarzinom	pT2a pN0	M1	ZR 0 SD 3 BM 2 (1)
<b>Fall 4</b>	Mäßig differenziertes Plattenepithelkarzinom	pT2b N0	Mx	ZR 2 (1) SD 1 BM 2 (3)

\* Bei Abweichungen der quantitativen Laminin-5 Expression zum Paraffinschnitt ist dies in Klammern vermerkt. ZR: zelluläre Retention; SD: Stromadeposition; BM: Basalmembranabbruch; pT: Tumorstadium; pN: nodale Metastasierung; cM: Fernmetastasierung.



**Abb. 22:** Gering differenziertes Plattenepithelkarzinom der Zervix (pT2b N1 cM0), Ln-5 Färbung, Kryostatschnitt, 10fach vergrößert. Zelluläre Retention dominierend (Score ZR 3; SD 1; BM 3).



**Abb. 23:** Gering differenziertes Plattenepithelkarzinom der Zervix (pT2a N0 cM1), Ln-5 Färbung, Kryostatschnitt, 10fach vergrößert. Prominente Stromadeposition (Score ZR 0; SD 3; BM 2).

## **4.5. Statistische Bewertung der immunhistochemischen Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression**

### **4.5.1. Korrelation von Laminin-5 Expressionsphänomenen mit Grading und pT-Kategorie**

Mittels Korrelationskoeffizienten-Berechnung konnte bei den präkanzerösen Läsionen der Zervix keine Korrelation zwischen Dysplasiegrad und Laminin-5 assoziierten Expressionsphänomenen festgestellt werden.

Dagegen zeigte sich beim Plattenepithelkarzinom der Zervix eine geringe Korrelation zwischen Differenzierungsgrad sowie den Phänomenen Basalmembranabbruch und Stromadeposition (jeweils  $r \sim 0,45$ ). Die Stromadeposition korrelierte weiterhin mit der pT-Kategorie ( $r \sim 0,49$ ). Weder Differenzierungsgrad noch pT-Stadium korrelierten mit der zellulären Retention.

Bei den Adenokarzinomen ergab sich ein ähnliches Bild, insofern der Malignitätsgrad ebenfalls mit der Stromadeposition ( $r \sim 0,50$ ) und dem Basalmembranabbruch ( $r \sim 0,51$ ) im Zusammenhang stand. Im Unterschied zum Plattenepithelkarzinom konnte keine Korrelation zwischen pT-Kategorie und Laminin-5 Expressionsphänomenen hergestellt werden.

### **4.5.2. Abhängigkeit zwischen Laminin-5 Expressionsphänomenen und pN1+, cM1-Kategorie**

Im Vier-Felder-Test ( $\chi^2$ -Test) zeigte sich sowohl für das Plattenepithel- als auch das Adenokarzinom der Zervix eine signifikante Abhängigkeit zwischen nodaler Metastasierung und dem Phänomen Basalmembranabbruch ( $p < 0,05$ ). Kein Zusammenhang konnte mittels  $\chi^2$ -Test zu den Phänomenen zelluläre Retention und Stromadeposition hergestellt werden.

Eine Abhängigkeit zwischen Fernmetastasierung und Laminin-5 Expressionsphänomenen konnte nicht aufgezeigt werden.

### **4.5.3. Zusammenhang zwischen dominierendem Expressionsphänomen und Grading/pT-Kategorie/Metastasierung beim Zervixkarzinom**

Anhand des an der Invasionsfront semiquantitativ vorherrschenden Expressionsphänomens, also zelluläre Retention, Stromadeposition oder Basalmembranabbruch, wurde jedem Plattenepithel- und Adenokarzinom ein entsprechender Haupttyp der Expression zugeordnet.

Dabei zeigte sich, dass mit sinkendem Differenzierungsgrad der Anteil der zellulären Retention als vorherrschendes Expressionsphänomen abnimmt, dagegen Stromadeposition und Basalmembranabbruch zunehmen.

Bezüglich der pT-Kategorie ließ sich für das Plattenepithel- und Adenokarzinom eine tendenzielle Zunahme von Stromadeposition als auch Basalmembranabbruch an der Invasionsfront mit steigender pT-Kategorie erkennen. Die zelluläre Immunreaktion schien in keinem Zusammenhang zur pT-Kategorie zu stehen.

Kein Zusammenhang konnte zwischen dominierendem Laminin-5 Expressionsphänomen an der Invasionsfront und nodaler bzw. Fernmetastasierung hergestellt werden.

#### **4.5.4. Abhängigkeit zwischen Laminin-5 positiven subepithelialen Gefäßstrukturen und Laminin-5 Expression in CIN-Läsionen und mikroinvasivem Karzinom**

Mittels immunhistochemischer Kolo-kalisation von Faktor VIII mit dem monoklonalen Antikörper D4B5 gelang regelmäßig die Darstellung der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette im Bereich subepithelialer Gefäßspalten sowohl bei CIN-Läsionen als auch beim mikroinvasiven Plattenepithelkarzinom der Zervix.

Dabei konnte im Vier-Felder-Test ( $\chi^2$ -Test) eine signifikante Abhängigkeit zwischen zellulärer Retention und Laminin-5 positiven Gefäßstrukturen (CIN-Läsion:  $p < 0,01$ ; mikroinvasives Karzinom:  $p < 0,05$ ) aufgezeigt werden. Für das Merkmal Stromadeposition und Laminin-5 positives Gefäß ergab sich für beide histologische Gruppen ein hochsignifikantes Abhängigkeitsniveau ( $p < 0,001$ ). Kein Zusammenhang konnte mittels  $\chi^2$ -Test für das Merkmal Basalmembranveränderung und Gefäßpositivität sowohl bei den CIN-Läsionen als auch beim mikroinvasiven Plattenepithelkarzinom hergestellt werden.

Die Subgruppenanalyse der CIN-Läsionen erbrachte für den Zusammenhang von positiven Gefäßspalten und den Laminin-5 Expressionsphänomenen zelluläre Retention und Stromadeposition ein mit dem Dysplasiegrad steigendes Abhängigkeitsniveau (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Subgruppenanalyse der CIN-Läsionen für den Zusammenhang zwischen Laminin-5 positiven subepithelialen Gefäßen und immunhistochemischem Laminin-5 Phänomen**

	CIN 1	CIN 2	CIN 3
<b>Zelluläre Retention</b>	n.s. $c_n=0,11$	n.s. $c_n=1,07$	$p < 0,01$ $c_n=4,11$
<b>Stromadeposition</b>	$p < 0,05$ $c_n=2,92$	$p < 0,001$ $c_n=8,88$	$p < 0,001$ $c_n=10,44$
<b>Basalmembranabbruch</b>	n.s. $c_n=2,12$	n.s. $c_n=0,32$	n.s. $c_n=1,32$

p: Signifikanzniveau;  $c_n$ : Prüfgröße im Vier-Felder-Test; n.s.: nicht signifikanter Zusammenhang

## 5. Diskussion

### 5.1. Die Rolle von Laminin-5 in der Invasionsbiologie

Die Invasion neoplastischer Zellen erfordert zu einem das Durchbrechen der Basalmembran, zum anderen die Fähigkeit zu Migration und Adhäsion an extrazelluläre Matrixbestandteile wie Laminine, Fibronektine oder Kollagene zur Ausbreitung in das umgebende Stroma. Eine tumorfreundliche Umgebung im Sinne einer qualitativ und quantitativ veränderten extrazellulären Matrix stellt eine Voraussetzung für den Prozeß der Invasion dar.

Laminin-5 ist invasionsbiologisch gesehen ein janusköpfiges Molekül mit dualer Funktion.

Als Protein der extrazellulären Matrix spielt es zum einen als Adhäsionsfaktor bei der Vernetzung der Kollagen-IV-Fibrillen innerhalb der Basalmembran (Yurchenco et al. 1992) sowie als Bestandteil des epithelialen Adhäsionskomplexes bei der Verankerung epithelialer Zellen an der Basalmembran eine wichtige Rolle (Rousselle et al. 1991, Lohi et al. 1998).

Zum anderen stellt die durch Matrix-Metalloproteinasen prozessierte Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette einen potenten Migrationsfaktor dar (Giannelli et al. 1997), welcher auch im Rahmen der Wundheilung (Larjava et al. 1993, Kainulainen et al. 1998) von Bedeutung ist.

Die in der eigenen Studie aufgezeigten immunhistochemischen Veränderungen der Laminin-5 Expression unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 widerspiegeln sowohl die Funktion als Ankerprotein mittels kontinuierlicher Darstellung der Basalmembran im ruhenden Zervixepithel als auch die Migrationsfaktor-Funktion in Form von zytoplasmatischen sowie extrazellulären Expressionsveränderungen bei invasiven Läsionen.

Zusammenfassend läßt sich in der vorliegenden Arbeit die Bifunktionalität von Laminin-5 anhand der differenzierten Expression der  $\gamma$ 2-Kette in unterschiedlichen Zervixläsionen logisch nachvollziehen. Damit können umgekehrt auch aus der histologischen Lokalisation der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette Rückschlüsse auf die jeweilige Funktion des Moleküls gezogen werden.

#### 5.1.1. Die Bedeutung der prozessierten- und nicht-prozessierten Form der Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette

Grundlage der Bifunktionalität von Laminin-5 sind posttranslationale proteolytische Veränderungen (Goldfinger et al. 1998, Hirotsaki et al. 2000) insbesondere der  $\gamma$ 2 Kette mit konsekutiver Umwandlung des Moleküls vom „Zelladhäsionstyp“ in den „Zellmigrationstyp“ (Giannelli et al. 1997, Ogawa et al. 2004).

Mittels Western Blot konnte sowohl die prozessierte (105 kDa) als auch die nicht-prozessierte Form (105kDa) der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette beim Zervixkarzinom eindeutig nachgewiesen werden.

Damit bestätigte der Western Blot quantitativ das Vorhandensein der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette in Zervixkarzinomen sowie die Spezifität des immunhistochemischen Nachweis unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5. Er ergänzt ihn weiterhin um eine differenzierte Darstellung der prozessierten, als auch nicht prozessierten Form der  $\gamma$ 2-Kette.

Die zusätzliche Darstellung der nicht-prozessierten Form der  $\gamma$ 2-Kette ist als Hinweis für eine erhöhte Expression der  $\gamma$ 2-Kette zu werten, lichtmikroskopisch durch eine ausgeprägte Stromadeposition visualisiert. Dieses Karzinom scheint einen erhöhten „Umsatz“ an Laminin-5 zu haben, welcher mit einer klinisch erhobenen späten Fernmetastasierung möglicherweise prognostische Relevanz besitzt.

## **5.2. Die Laminin-5 $\gamma$ 2-Kette im Zervixkarzinom**

### ***5.2.1. Differenzierte intra- und extrazelluläre Visualisierung der Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5***

Die ersten Studien zur differenzierten Expression der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette bei unterschiedlichen Karzinomtypen publizierte Pyke (Pyke et al. 1994, Pyke et al. 1995). Dabei konnte ein immunhistochemischer Zuwachs der  $\gamma$ 2-Kette insbesondere im Zytoplasma „knospender“ Tumorzellen beobachtet werden.

Gegenstand der eigenen Arbeit war die detaillierte Analyse der Veränderungen der immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression beim Karzinom der Zervix unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5.

Dabei traten im Vergleich zum normalen, ruhenden Zervixepithel folgende Modulationen des immunhistochemischen Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expressionsmusters auf:

1. eine Expression im Zytoplasma invadierender Tumorzellen (zelluläre Retention),
2. Nachweis im Bereich des die Invasionszone umgebenden Stromas (Stromadeposition) sowie
3. ein Verlust der Darstellbarkeit der Basalmembran (Basalmembranabbruch).

Für das Karzinom der Zervix wurde bereits mehrfach eine gesteigerte zelluläre Retention im Bereich der Invasionsfront beschrieben (Skyldberg et al. 1999, Malina et al. 2004, Stoltzfus et al. 2004), jedoch fehlt meines Wissens nach bislang eine differenzierte Darstellung der extrazellulären Deposition sowie des Herauslösens von Laminin-5 aus der Basalmembran.

Mit einer komplett fehlenden Laminin-5 Expression stellten die neuroendokrinen Zervixkarzinome eine Ausnahme dar, auch dies meines Wissen nach hier zum ersten Mal beschrieben und diskutiert.

### **5.2.2. Die Rolle der intrazellulären Expression**

Pyke beobachtete erstmalig einen immunhistochemischen Zuwachs der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette im Zytoplasma „knospender“ Tumorzellen der Invasionsfront (Pyke et al. 1995). Sordat interpretierte dieses Phänomen als zelluläre Retention (Sordat et al. 1998), welches Ausdruck einer gesteigerten Synthese der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette zu sein schien (Kainulainen et al. 1997).

Auch für das Karzinom der Zervix wurde bereits mehrfach eine gesteigerte zelluläre Retention im Bereich der Invasionsfront beschrieben (Skyldberg et al. 1999, Malina et al. 2004, Stoltzfus et al. 2004, Andersson et al. 2005), welche in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 für das Plattenepithel- und Adenokarzinom bestätigt werden konnte.

Die zelluläre Retention der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette wurde bei kolorektalen Neoplasien als negativer Prognosefaktor herausgearbeitet (Sordat et al. 1998). Hindermann bestätigte die intrazelluläre Laminin-5 Expression beim urothelialen Karzinom als wichtigsten prognostischen Parameter neben dem Tumorstadium (Hindermann et al. 2003). Beim Zervixkarzinom wurde bislang keine Korrelation zwischen zytoplasmatischer Laminin-5 Expression und Überleben aufgezeigt (Andersson et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte für das Plattenepithel- und Adenokarzinom der Zervix weder eine Korrelation der zellulären Laminin-5 Retention zu pT-Kategorie oder Differenzierungsgrad noch im Vier-Felder-Test ein Zusammenhang zwischen intrazellulärer Expression und Metastasierung erbracht werden.

Eine mögliche tumorbiologische Erklärung wäre, dass Zervixkarzinome sich bezüglich der Invasionsmechanismen von anderen Karzinomen unterscheiden und der Modulation der extrazellulären Laminin-5 Expression eine größere Bedeutung zukommt.

Da mit sinkender Differenzierung die zelluläre Retention als vorherrschendes Expressionsphänomen beim nicht-neuroendokrinen Zervixkarzinom abnimmt, könnte dies auch im Zusammenhang mit der Wachstumsgeschwindigkeit zu sehen sein, wobei möglicherweise mit rascher Progression eine ausgeprägte intrazelluläre Akkumulation nicht erfolgen kann.

Zusammenfassend ist die intrazelluläre Neosynthese und Akkumulation der Laminin  $\gamma$ 2-Kette ein regelmäßig nachweisbares Phänomen an der Invasionsfront des Zervixkarzinoms. Sie stellt jedoch nur einen Baustein der Laminin-5 Expressionsmodulation dar und scheint nicht alleinig invasive Prozesse zu demarkieren und das tumorbiologische Verhalten zu bestimmen.

### **5.2.3. Nachweis und Bedeutung der Stromadeposition beim Zervixkarzinom**

Tani gab den ersten Hinweis auf eine organisierte Laminin-5 Stromadeposition beim Pankreaskarzinom (Tani et al. 1997), wobei Kainulanen extrazelluläres Laminin-5 als Folge einer akzelerierten Synthese und Sekretion durch Karzinomzellen der Invasionsfront interpretierte (Kainulainen et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine regelmäßige Stromadeposition von Laminin-5 entlang der Invasionsfront von Zervixkarzinomen nachgewiesen werden, wobei gleichartige Beobachtungen für das Adenokarzinom des Pankreas, Kolon und Magen bereits dokumentiert wurden (Tani et al. 1997, Sordat et al. 1998, Koshikawa et al. 1999).

Eine Erklärung könnte dabei im verwandten monoklonalen Antikörper D4B5 liegen, welcher die Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette sowohl im ungekoppelten Zustand als auch in Kombination mit der  $\beta$ 3- oder  $\alpha$ 3-Kette erkennt.

An der Invasionsfront des oralen Plattenepithelkarzinoms lässt sich eine extrazelluläre Organisation von Laminin-5 mit Tenascin-C und ED-B+ Fibronectin zu fibrillären Matrixprotein-Komplexen nachweisen, welche als migrationsfördernde Basalmembran-Äquivalente mit einer möglicherweise supportiven Rolle für das invasive Tumorverhalten angesehen werden (Berndt et al. 2001).

Die statistische Analyse der vorliegenden Arbeit ließ eine Korrelation zwischen dem Phänomen Stromadeposition und Differenzierungsgrad beim Plattenepithel- ( $r \sim 0,45$ ) als auch beim Adenokarzinom ( $r \sim 0,50$ ) der Zervix erkennen, jedoch konnte im Vier-Felder-Test keine Abhängigkeit zwischen Stromadeposition und nodaler Metastasierung dargestellt werden.

Die Stromadeposition als vorherrschendes Expressionsphänomen nahm beim Plattenepithel- und Adenokarzinom mit sinkender Differenzierung zu.

Damit scheint zum einen der extrazellulären Laminin-5 Deposition als Leitschiene der Stromainvasion mit sinkender Differenzierung eine steigenden Bedeutung zuzukommen, zum anderen sich das nicht-neuroendokrine Zervixkarzinom bezüglich der Invasionsmechanismen durch eine betonte Modulation der extrazellulären Laminin-5 Expression hervorzuheben.

### **5.2.4. Basalmembrandiskontinuitäten trennen eindeutig zwischen prämaligener und invasiver Zervixläsion**

Morphologische Veränderungen der Basalmembran können bei degenerativen, inflammatorischen und neoplastischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Damjanov 1990, Ghadially 1997). Neben strukturellen Irregularitäten liegen auch qualitative Veränderungen vor (Tani et al. 1997, Thorup et al. 1998, Kosmehl et al. 1999). So konnte Haas mittels konfokaler



Laser-Scanning-Mikroskopie einem deutlichen Laminin-5 Verlust im Bereich der Basalmembran an der Invasionsfront oraler Plattenepithelkarzinome nachweisen mit teilweise normalem Laminin-5 Gehalt in zentralen Tumorabschnitten (Haas et al. 2001).

Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit für das Zervixkarzinom lichtmikroskopisch unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 ausnahmslos bestätigt und erstmalig beschrieben, sodass in Übereinstimmung mit Haas (Haas et al. 2001) der Laminin-5 Verlust in der Basalmembranregion als ein typisches Phänomen der Invasionszone von Karzinomen zu werten ist.

Bei 22% der mikroinvasiven Karzinome ließ sich in der Laminin-5 Färbung kein Basalmembranverlust darstellen, wogegen 12% der hochgradigen CIN-Läsionen eine diskontinuierliche Basalmembranarstellung zeigten.

Im Bereich der Basalmembran ist Laminin-5 ein Schlüsselprotein der Adhäsion. Eine kontinuierliche Darstellung der Epithel-Stroma-Grenze mittels Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Antikörper spricht demnach deutlich gegen eine fokale Invasion. Damit lässt das Phänomen Basalmembranverlust eine klare Unterscheidung zwischen prämaligen und invasiven Läsionen zu und ermöglicht eine Aussage zur Invasionsbereitschaft des Epithels.

In der statistischen Analyse zeigte sich für das Plattenepithel- und Adenokarzinom zum einen eine Korrelation zwischen Basalmembranverlust und Differenzierungsgrad ( $r \sim 0,45$ ), zum anderen im Vier-Felder-Test ein Zusammenhang zwischen nodaler Metastasierung und Expressionsverlust ( $p < 0,05$ ), welcher Hinweise auf die prognostische Bedeutung des Phänomens liefert.

#### ***5.2.5. Fehlende Laminin-5 $\gamma$ 2-Ketten Expression als Indikator neuroendokriner Differenzierung***

Neuroendokrine Zervixkarzinome sind gekennzeichnet durch eine schlechte Prognose und frühzeitige Metastasierung (Schmidt et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 bei diesem Karzinomtyp systematisch eine komplett fehlende immunhistochemische Expression der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette aufgezeigt werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde eine Minimierung der Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression bereits beim kleinzelligen Bronchialkarzinom beschrieben (Maatta et al. 1999). Unter dem Gesichtspunkt der Tumordiagnostik wird damit das komplette Fehlen von Laminin-5 in einem Karzinom als Indikator neuroendokriner Differenzierung hervorgehoben. Das heterotrimere Molekül unterstützt somit die histologische Diagnosefindung.

In der Literatur sind für Karzinome Unterschiede bezüglich einzelner Invasionsmechanismen kaum dokumentiert oder funktionell interpretiert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass nicht alle Karzinome Laminin-5 für die Invasion nutzen und demnach differenzierte Invasionsstrategien mit einer individuellen Utilisierung extrazellulärer Matrixmoleküle bestehen.

### **5.2.6. Laminin-5 kennzeichnet die räumliche Dynamik der Tumorprogression**

Eine heterogene intrazelluläre Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression mit positiven Karzinomzellen entlang der Invasionsfront und fehlender Immunreaktion in zentralen Tumorabschnitten wurde bereits für mehrere Karzinome, so für das kolorektale Karzinom (Sordat et al. 1998), das Ösophaguskarzinom (Yamamoto et al. 2001), aber auch für das Zervixkarzinom (Skyldberg et al. 1999) beschrieben. Ein ausgeprägter Laminin-5 Verlust in der Basalmembran der Invasionsfront im Gegensatz zu zentralen Tumorabschnitte konnte Haas mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie quantitativ nachweisen (Haas et al. 2001).

Beide Phänomene ließen sich unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 beim Plattenepithel- sowie Adenokarzinom der Zervix lichtmikroskopisch bestätigen. Zusätzlich zeigte sich ein erstmalig beschriebenes stromales Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expressionsmuster mit Betonung der Invasionsfront und Aussparung zentraler Tumorabschnitte.

Somit kann anhand der Laminin-5  $\gamma$ 2 Ketten Expression die Invasionsfront deutlich von zentralen Abschnitten abgegrenzt werden.

Diese invasionsassoziierten Veränderungen der Laminin-5  $\gamma$ 2 Expression lassen sich auch zur Verdeutlichung der räumlichen Dynamik einer Tumorprogression heranziehen. Gerade die Theorie der „knospenden“ Tumorzellkomplexe (Pyke et al. 1995) unterstreicht die Annahme, dass Karzinome sich nicht gleichförmig ausbreiten, sondern dass ein fokales Wachstum in Schüben das Verhalten besser charakterisiert. Beim kolorektalen Karzinom scheint Laminin-5 zur Formation knospender Tumorzellkomplexe synergistisch beizutragen (Masaki et al. 2003). So ist eine veränderte Laminin-5  $\gamma$ 2-Expression im Zusammenhang mit einer lokalen Invasionsbereitschaft des Epithels auch beim Zervixkarzinom zu sehen.

### **5.3. Laminin-5 – ein Marker der Invasion beim Zervixkarzinom?**

Vor elf Jahren demonstrierte Pyke zum ersten Mal unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers immunhistochemisch die Expression der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette in unterschiedlichen Karzinomtypen und formulierte dabei die These, dass es sich bei Laminin-5 um einen

potentiellen Marker der Invasivität bei einer Auswahl von humanen Karzinomen handeln könnte (Pyke et al. 1994, Pyke et al. 1995).

In der Literatur wird Laminin-5 bezüglich seiner Expression in Karzinomen häufig als Invasionsfaktor gehandelt und eine gesteigerte intrazelluläre Expression mit Tumorprogression und schlechter Prognose gleichgesetzt, wie zum Beispiel beim Endometriumkarzinom (Lundgren et al. 2003), beim Plattenepithelkarzinom der Vagina (Hellman et al. 2000) sowie des Ösophagus (Yamamoto et al. 2001) oder beim Adenokarzinom des Kolons (Pyke et al. 1995, Lenander et al. 2001); für weitere Literatur siehe auch [www.dako.com](http://www.dako.com)).

Dass jedoch auch ein gesteigerter Laminin-5 Verlust mit einer Neigung zu schwerwiegender Disseminierung und schlechter Prognose einhergeht, ließ sich am Beispiel maligner epithelialer Läsionen der Mamma (Henning et al. 1999) sowie am Prostatakarzinom (Davis et al. 2001) demonstrieren.

Für das Plattenepithelkarzinom der Zervix wurde Laminin-5 als Marker der Invasivität beschrieben (Skyldberg et al. 1999), jedoch konnte bislang keine Korrelation zwischen Laminin-5 Expression und Überleben demonstriert werden (Andersson et al. 2005).

Die vorliegende Arbeit konnte für das Plattenepithel- und Adenokarzinom der Zervix eine gezielte Modulation der Laminin-5 Expression an der Invasionsfront bestätigen, wobei die gesteigerte intrazelluläre Expression häufig führendes, jedoch nicht alleiniges Phänomen war. Mit sinkender Differenzierung nahm die zelluläre Retention als vorherrschendes Expressionsphänomen zugunsten gesteigerter Stromadeposition und prominenter Basalmembranabbrüche ab, beim neuroendokrinen Karzinom fehlte der Nachweis einer intra- oder extrazellulären immunhistochemischen Laminin-5 Expression.

Damit scheinen die einzelnen Zervixkarzinome unterschiedliche Invasionsmechanismen zu nutzen und Laminin-5 darf deskriptiv beim nicht- neuroendokrinen Zervixkarzinom als Marker invasionsassoziierter Prozesse postuliert werden, welcher die tumorbiologische Bedeutung des Proteins als migrationsfördernder Faktor im histopathologischen Kontext bestätigt.

#### **5.4. Laminin-5 – ein Indikator der Metastasierung beim Zervixkarzinom?**

Die nodale Metastasierung etablierte sich in der Literatur gemeinsam mit der lymphangischen Karzinose als Prädiktor für verkürztes Überleben und Rezidivfreiheit (Hoskins 1988, Kobierski et al. 2002, Morice et al. 2003).

Trotz zahlreicher Hinweise konnte der Zusammenhang zwischen nodaler Metastasierung und Laminin-5 Expression bislang noch nicht eindeutig geklärt werden.

So scheint beim hepatozellulären Karzinom eine verstärkte zelluläre Laminin-5 Expression mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko behaftet zu sein (Giannelli et al. 2003), wogegen für das Adenokarzinom des Pankreas eine indirekte Korrelation zwischen Laminin  $\gamma$ 2-Ketten Expression und metastatischem Potential beschrieben wurde (Soini et al. 1996).

Beim Zervixkarzinom konnte bislang keine Korrelation zwischen Laminin-5 Expression und Überleben demonstrieren werden (Andersson et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit ließ die statistische Analyse für das Plattenepithel- und Adenokarzinom der Zervix im Vier-Felder-Test einen Zusammenhang zwischen nodaler Metastasierung und Basalmembranverlust ( $p < 0,05$ ), jedoch nicht zu zellulärer Retention oder Stromadeposition erkennen. Neuroendokrine Zervixkarzinome zeichneten sich durch eine komplett fehlender Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression aus.

Somit kann die zytoplasmatische Retention in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Andersson (Andersson et al. 2005) für das Zervixkarzinom nicht als prognostischer Faktor bestätigt werden. Jedoch scheint eine differenzierte Modulation der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette im Bereich der Basalmembran der Invasionsfront ein erhöhtes Metastasierungspotential zu beinhalten, welches durch Studien mit größeren Fallzahlen weiter untersucht werden sollte.

### **5.5. Laminin-5 markiert die Invasionsbereitschaft prämaligener Zervixläsionen**

Bereits 1997 verzeichnete Kainulanen eine im Vergleich zum normalen Mundhöhlenepithel veränderte Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression bei oralen epithelialen Dysplasien (Kainulainen et al. 1997). Laminin-5 positive Carcinoma in situ Läsionen schienen dabei ein hohes Risiko zur Progression in ein invasives Karzinom zu besitzen (Nordemar et al. 2001).

Für CIN-Läsionen wurde eine positive Korrelation zwischen Malignitätsgrad und zytoplasmatischer Laminin-5 Expression mehrfach beschrieben (Skyldberg et al. 1999, Kohlberger et al. 2003, Noel et al. 2005), bislang ohne Berücksichtigung immunhistochemischer Expressionsveränderungen im Bereich der Basalmembran oder extrazellulär.

In der vorliegenden Arbeit zeigte ein Teil der höhergradigen CIN-Läsionen ein karzinomtypisches Laminin-5 Expressionsmuster mit zellulärer Retention, aber auch Stromadeposition und Basalmembranirregularitäten, wobei letztere Phänomene meines Wissens nach erstmalig beschrieben werden. Damit kann mittels immunhistochemischer Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression die höhergradige CIN-Läsion von der niedriggradigen abgegrenzt werden. Da sich karzinomtypische Laminin-5 Expressionsmuster sowohl in höhergradigen Dysplasien als auch in invasiven Karzinomen nachweisen lassen, können beide Gruppen anhand der

Laminin-5 Expression nicht immer sicher unterschieden werden. Allerdings fehlten 22% der mikroinvasiven Karzinome Basalmembranunterbrechungen, wogegen 12% der CIN-Läsionen diese wiederum aufwiesen. Intakte Adhäsionskomplexe am Epithel-Stroma-Interface, visualisiert durch eine kontinuierliche Basalmembrandarstellung mittels Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten-Antikörper, schließen eine freie Invasion aus, sodass in diesen Fällen mittels Immunhistochemie eine Unterscheidung zwischen prämaligener und invasiver Läsion getroffen werden kann.

Mit dem Vorliegen karzinomtypischer Laminin-5 Expressionsmuster in einem Teil der präkanzerösen Läsionen kann vor dem Hintergrund der tumorbiologischen Rolle des heterotrimeren Moleküls als Migrationsfaktor von einer erhöhten Invasionsbereitschaft des Epithels ausgegangen werden.

Laminin-5 kann damit als sensitiver Marker für die Invasionsbereitschaft einer Läsion postuliert werden.

## **5.6. Laminin-5 - eine Leitschiene für die Tumorangioneogenese?**

Die Entstehung neuer Gefäßspalten bietet neben der nutritiven Versorgung dem wachsenden Tumor zusätzlich die Möglichkeit zur hämatogenen Metastasierung. Eine hohe Dichte an Tumorangioneogenese lässt demnach ein erhöhtes Metastasierungspotential vermuten. Die Datenlage hierzu ist jedoch äußerst widersprüchlich. So bestätigte Wiggins die Angioneogenese als unabhängigen Risikofaktor für ein Rezidiv beim Plattenepithelkarzinom der Zervix (Wiggins et al. 1995). Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien keine signifikante Korrelation zwischen angioneogenetischer Gefäßdichte und Stadium bzw. etablierten prognostischen Faktoren, wie zum Beispiel nodaler Metastasierung, erhoben werden (Kainz et al. 1995, Rutgers et al. 1995).

Mittels Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Kollokalisierung von Faktor VIII mit der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette in subepithelialen Gefäßstrukturen bei intraepithelialen Neoplasien (35%) sowie entlang der Invasionsfront mikroinvasiver Plattenepithelkarzinome (40%) der Zervix gezeigt. Die Kollokalisierung von Endothelmarker und dem monoklonalen Antikörper D4B5 wurde exemplarisch mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bewiesen und überzeugend optisch dargestellt.

Der dahinterstehende Pathomechanismus ist dabei noch nicht geklärt. Auf der einen Seite könnte es sich um eine direkte, bislang nicht beschriebene Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Syntheseleistung der Endothelzellen handeln. Zum anderen wäre eine Translokation des

heterotrimeren Moleküls in Endothelzellen denkbar mit Laminin-5 als Leitschiene der Invasion zwischen neuformierten Gefäßen und invadierenden Zellen.

Die Tumorangiogenese beinhaltet zumeist einen „angiogenetischen Switch“, unter anderem durch eine inflammatorische Reaktion oder Matrix-Metalloproteinasen getriggert, welcher die Balance zwischen pro- und antiangiogenetischen Signalen zu ersteren verschiebt. Dies geschieht häufig in einem frühen, prämaligen Stadium (Hanahan und Folkman 1996, Carmeliet und Jain 2000, Bergers und Benjamin 2003), in der vorliegenden Arbeit anhand der in CIN-Läsionen sowie im mikroinvasivem Plattenepithelkarzinom prominent nachgewiesenen Angiogenese bestätigt.

Neuformierte Tumorgefäße sind umgeben von ein provisorischen, Tenascin- und Fibronectin-haltigen extrazellulären Matrix (Natali et al. 1991), wobei Fibronectin nicht nur als Marker der Angiogenese gelten darf (Castellani et al. 1994, Castellani et al. 2002), sondern auch in Form extrazellulärer Matrix-Fasern den Kapillarsprossen als Leitschiene im Tumorstroma dient (Tarli et al. 1999). Laminin-5 organisiert sich mit Tenascin-C und ED-B+ Fibronectin zu fibrillären Matrixprotein-Komplexen, welche als migrationsfördernde Basalmembran-Äquivalente angesehen werden (Berndt et al. 2001). Das in den Karzinomzellen der Invasionsfront synthetisierte Laminin-5 wird in der vorliegenden Arbeit erstmalig im Stroma und in subepithelialen Gefäßstrukturen bei Läsionen der Zervix nachgewiesen.

So kann man postulieren, dass Laminin-5-haltige Matrixprotein-Komplexe gemeinsam mit Tenascin-C und ED-B+ Fibronectin das Endothel neuformierter Kapillarsprossen zu invadierenden Tumorzellen hinführen und Laminin-5 eine potentielle Leitschiene der Tumorangiogenese darstellt.

### **5.7. Einsatzmöglichkeiten des monoklonalen Antikörpers D4B5 in der zervikalen Routinediagnostik**

Die Diagnose der Invasion basiert auf einer histopathologischen Entscheidung, zumeist anhand einer kleinen Gewebeprobe.

Gerade die hochgradigen CIN-Läsionen stellen bezüglich ihres klinischen Verlaufes eine inhomogene Gruppe dar, wobei unbehandelt sich lediglich 12% bis 30% der hochgradigen CIN-Läsionen zu einem invasiven Karzinom weiter entwickeln (Gad 1976, McIndoe et al. 1984, Gustafsson und Adami 1989). Das Risiko für ein invasives Karzinom ist jedoch über das Doppelte erhöht bei Frauen mit zuvor behandelter CIN 3-Läsion im Vergleich zur durchschnittlichen weiblichen Bevölkerung (Pettersson und Malzer 1989).

Die Unterscheidung zwischen präkanzeröser und frühinvasiver Läsion ist oftmals im HE-Schnitt anhand der kleinen Gewebeprobe äußerst schwierig, die prognostischen als auch therapeutischen Folgen jedoch weitreichend. Ein immunhistochemischer Marker für invasionsverdächtige Läsionen ist notwendig. Laminin-5 stellt dabei einen interessanten Kandidaten dar.

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers D4B5 gelingt die Darstellung der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette in allen prämaligen und frühinvasiven Läsionen der Zervix, wobei in Abgrenzung zur kontinuierlichen Basalmembrandarstellung im normalen Epithel sich bei einem Teil der CIN-Läsionen karzinomtypische intra- und extrazelluläre Modulationen der immunhistochemischen Laminin-5 Expression nachweisen lassen. Damit kann, in Übereinstimmung mit kürzlich publizierten Ergebnissen (Noel et al. 2005), die Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette die Identifizierung von prämaligen Läsionen mit einem potentiellen Risiko zur Progression in ein invasives Karzinom erleichtern.

Insbesondere die Verwendung des monoklonalen Antikörpers D4B5 bietet den Vorteil, dass die Darstellung der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette im normalen, dysplastischen und neoplastischen Zervixepithel zytoplasmatisch, extrazellulär sowie im Bereich der Basalmembran gelingt.

Da die zytoplasmatische Immunreaktion der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette bei malignen epithelialen Neoplasien als Marker der Invasion gehandelt wird (Pyke et al. 1995), ist die Anwendung der immunhistochemischen Laminin-5 Darstellung für die Routine- Zervixzytologie interessant, wobei neben den üblichen zytologischen Kriterien zur Beurteilung der Malignität einzelner Zellen der zytoplasmatische Gehalt von Laminin-5 die Identifizierung potentieller Risikoläsionen unterstützen kann.

## **5.8. Potentielle klinische Einsatzmöglichkeiten von Laminin-5**

Laminin-5, exprimiert durch epitheliale Zellen, erfährt eine proteolytische Prozessierung der  $\gamma$ 2-Kette am NH<sub>2</sub>-terminalen Ende, welche eine Umwandlung des heterotrimeren Moleküls vom „Zelladhäsionstyp“ in den „Zellmigrationstyp“ bewirkt (Giannelli et al. 1997, Koshikawa et al. 2000, Ogawa et al. 2004).

Katayama konnte das dabei entstandene NH<sub>2</sub>-terminale Fragment der  $\gamma$ 2-Kette (G2F) nicht nur im menschlichen Serum nachweisen, sondern stellte auch eine deutliche Erhöhung des Serumspiegels bei Pankreaskarzinom-Patienten fest (Katayama et al. 2003, Katayama et al. 2005). Er postulierte den Serumspiegel von G2F als prognostischen, tumorcharakterisierenden

Marker zur Abschätzung von Invasivität und Malignität epithelialer Tumoren (Katayama et al. 2003).

Die Bedeutung des G2F-Serumspiegel bei Patientinnen mit benignen oder malignen Läsionen der Zervix wurde bislang noch nicht untersucht. Denkbar wäre, dass die Laminin  $\gamma$ 2-Kette nicht nur bei der histopathologischen und zytologischen Evaluierung des invasiven Potentials einer zervikalen Läsion eine Rolle spielt, sondern dass auch paraklinisch mittels Bestimmung des  $\gamma$ 2-Ketten-Fragment-Spiegels ergänzende Hinweise zur Prognoseabschätzung gewonnen werden können.

Ferner wäre auch eine Umwandlung dieser funktionellen Laminin-5-Fragmente in therapeutische Substanzen vorstellbar (z. B. als Rezeptorantagonist), um so das Verhalten maligner Tumoren therapeutisch zu beeinflussen.

Dass Laminin-5 auch die Wirksamkeit antineoplastischer Substanzen zu beeinflussen vermag, publizierte kürzlich Giannelli (Giannelli et al. 2004). Dabei konnte gezeigt werden, dass das extrazelluläre Matrixmolekül Laminin-5 die Wirksamkeit von Gefitinib („Iressa“), einem Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR)-Tyrosinkinase-Inhibitor, beim hepatozellulären Karzinom inhibiert, und somit anhand der unterschiedlichen Laminin-Expressionsspiegel eine Optimierung des individuellen antineoplastischen Therapie-Regime erhofft werden kann.



## 6. Schlussfolgerungen

Der in der vorliegenden Arbeit erstmalig bei zervikalen Läsionen verwandte monoklonale Antikörper D4B5 ist exzellent geeignet zur immunhistochemischen Darstellung der Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten Expression in prämaligen und malignen Läsionen. Dabei erfasst er sowohl die unprozessierte als auch die prozessierte Form der Laminin-5  $\gamma$ 2-Kette, mittels Western Blot quantitativ bestätigt.

Es gelingt nicht nur die differenzierte Visualisierung der intrazellulären Expression, sondern auch des extrazellulären Laminin-5 in Stroma und Basalmembran der Zervix, hier erstmalig beschrieben.

Die Bifunktionalität von Laminin-5 als Ankerprotein und Migrationsfaktor wird dadurch vollständig erfasst und nachvollziehbar dargestellt, wobei die histologische Lokalisation Rückschlüsse auf die Funktion erlaubt.

Laminin-5 ist ein Schlüsselprotein der Adhäsion. Eine kontinuierliche Darstellung der Basalmembran mittels Laminin-5  $\gamma$ 2-Ketten-Antikörper schließt eine Invasion aus, sodass mittels Laminin-5 zwischen prämaligener und invasiver Läsion unterschieden werden kann.

Die immunhistochemische Darstellung der Laminin-5 Expression unterstützt eine Differenzierung der CIN-Läsionen in niedrig- und hochgradig. Da ein Teil der hochgradigen Dysplasien auch karzinomtypische Modulationen zeigt, kann das heterotrimere Molekül als sensitiver Marker für die Invasionsbereitschaft einer Läsion genutzt werden.

Somit erleichtert Laminin-5 die Einschätzung der biologischen Wertigkeit einer prämaligen Läsion in Abgrenzung zum frühinvasiven Karzinom. Die Laminin-5 Expression bietet damit auch potentiell wertvolle Einsatzmöglichkeiten in der Zervixzytologie.

Laminin-5 unterstützt durch seine in der vorliegenden Arbeit erstmalig systematisch beschriebene in neuroendokrinen Karzinomen fehlende Expression die histologische Diagnosefindung und wird als Marker für diese Untergruppe an Zervixkarzinomen postuliert.

Daraus lässt sich ableiten, dass nicht alle Zervixkarziome Laminin-5 für die Invasion nutzen und es ist zu vermuten, dass verschiedene Invasionsmechanismen mit einer individuellen Utilisierung extrazellulärer Matrixmoleküle existieren.

Eine Assoziation der immunhistochemischen Laminin-5 Expression zu pT-Kategorie, Malignitätsgrad oder nodaler Metastasierung bleibt in der vorliegenden Studie ohne ausreichende statistische Signifikanz. Damit ist Laminin-5 nicht zur Erfassung einer Individualprognose geeignet.

Mittels Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung sowie konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnten erstmalig Laminin-5 positive subepitheliale Gefäßstrukturen bei CIN-Läsionen und frühinvasiven Zervixkarzinomen beschrieben werden. Laminin-5-haltige Matrixprotein-Komplexe könnten so neuformierte Kapillarsprossen zu invadierenden Tumorzellen hinführen und damit eine potentielle Leitschiene der Tumorangioneogenese darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Andersson S, Hellstrom AC, Angstrom T, Stendahl U, Auer G, Wallin KL. 2005. The clinicopathologic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in cervical squamous carcinoma and adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 15 (6):1065-1072.
- Anttila A, Ronco G, Clifford G, Bray F, Hakama M, Arbyn M, Weiderpass E. 2004. Cervical cancer screening programmes and policies in 18 European countries. *Br J Cancer*, 91 (5):935-941.
- Aumailley M, Smyth N. 1998. The role of laminins in basement membrane function. *Journal of Anatomy*, 193 (Pt 1):1-21.
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD. 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol*, 24 (5):326-332.
- Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, Andreason GL, Frasier F, Plopper G, Quaranta V, Jones JC. 1996. Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Sci*, 109 (Pt 10):2509-2520.
- Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. 1983. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Laboratory Investigation*, 49 (2):140-147.
- Bergers G, Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3 (6):401-410.
- Berndt A, Borsi L, Hyckel P, Kosmehl H. 2001. Fibrillary co-deposition of laminin-5 and large unspliced tenascin-C in the invasive front of oral squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 127 (5):286-292.
- Berndt A, Hyckel P, Konneker A, Katenkamp D, Kosmehl H. 1997. Oral squamous cell carcinoma invasion is associated with a laminin-5 matrix re-organization but independent of basement membrane and hemidesmosome formation. clues from an in vitro invasion model. *Invasion & Metastasis*, 17 (5):251-258.
- Bissell MJ, Ram TG. 1989. Regulation of functional cytodifferentiation and histogenesis in mammary epithelial cells: role of the extracellular matrix. *Environ Health Perspect*, 80:61-70.

- Bissell MJ, Hall HG, Parry G. 1982. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol*, 99 (1):31-68.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55 (4):244-265.
- Bosman FT. 1994. The borderline: basement membranes and the transition from premalignant to malignant neoplasia. *Microscopy Research & Technique*, 28 (3):216-225.
- Bosman FT, Cleutjens J, Beek C, Havenith M. 1989. Basement membrane heterogeneity. *Histochemical Journal*, 21 (11):629-633.
- Bray F, Loos AH, McCarron P, Weiderpass E, Arbyn M, Moller H, Hakama M, Parkin DM. 2005. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (3):677-686.
- Bretscher MS. 1996. Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell*, 87 (4):601-606.
- Broders AC. 1920. Squamous-cell epithelioma of the lip: A study of 537 cases. *JAMA*, 74:656-664.
- Bulkmans NW, Bleeker MC, Berkhof J, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. 2005. Prevalence of types 16 and 33 is increased in high-risk human papillomavirus positive women with cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse. *Int J Cancer*, 117 (2):177-181.
- Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, et al. 1994. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biology*, 14 (3):209-211.
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407 (6801):249-257.
- Carter WG, Ryan MC, Gahr PJ. 1991. Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell*, 65 (4):599-610.
- Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. 1994. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer*, 59 (5):612-618.
- Castellani P, Borsi L, Carnemolla B, Biro A, Dorcaratto A, Viale GL, Neri D, Zardi L. 2002. Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin. *Am J Pathol*, 161 (5):1695-1700.

- Champliaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE. 1996. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *Journal of Cell Biology*, 132 (6):1189-1198.
- Colognato H, Yurchenco PD. 2000. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218 (2):213-234.
- Damjanov I. 1990. Heterogeneity of basement membranes in normal and pathologically altered tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 416 (3):185-188.
- d'Ardenne AJ. 1989. Use of basement membrane markers in tumour diagnosis. *J Clin Pathol*, 42 (5):449-457.
- Davis TL, Cress AE, Dalkin BL, Nagle RB. 2001. Unique expression pattern of the alpha6beta4 integrin and laminin-5 in human prostate carcinoma. *Prostate*, 46 (3):240-248.
- Dudenhausen JW, Schneider HPG, Bastert G. 1999. *Frauenheilkunde und Geburtshilfe*. 2te Aufl. Berlin: Walter de Gruyter.
- Engel J, Hunter I, Schulthess T, Beck K, Dixon TW, Parry DA. 1991. Assembly of laminin isoforms by triple- and double-stranded coiled-coil structures. *Biochem Soc Trans*, 19 (4):839-843.
- Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti E, Sanes JR. 1990. Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul*, 1 (10):731-740.
- Farnsworth A, Laverty C, Stoler MH. 1989. Human papillomavirus messenger RNA expression in adenocarcinoma in situ of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol*, 8 (4):321-330.
- Flug M, Kopf-Maier P. 1995. The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anatomica*, 152 (2):69-84.
- Friedell GH, Mc. Kay DG. 1953. Adenocarcinoma in situ of the endocervix. *Cancer*, 6 (5):887-897.
- Gad C. 1976. The management and natural history of severe dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix. *Br J Obstet Gynaecol*, 83 (7):554-559.
- Gagnoux-Palacios L, Vailly J, Durand-Clement M, Wagner E, Ortonne JP, Meneguzzi G. 1996. Functional Re-expression of laminin-5 in laminin-gamma2-deficient human keratinocytes modifies cell morphology, motility, and adhesion. *J Biol Chem*, 271 (31):18437-18444.

- Ghadially F. 1997. *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*. Boston, Butterworth–Heinemann,
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. 1997. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*, 277 (5323):225-228.
- Giannelli G, Fransvea E, Bergamini C, Marinosci F, Antonaci S. 2003. Laminin-5 chains are expressed differentially in metastatic and nonmetastatic hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9 (10 Pt 1):3684-3691.
- Giannelli G, Azzariti A, Fransvea E, Porcelli L, Antonaci S, Paradiso A. 2004. Laminin-5 offsets the efficacy of gefitinib ('Iressa') in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer*, 91 (11):1964-1969.
- Goldfinger LE, Stack MS, Jones JC. 1998. Processing of laminin-5 and its functional consequences: role of plasmin and tissue-type plasminogen activator. *Journal of Cell Biology*, 141 (1):255-265.
- Gustafsson L, Adami HO. 1989. Natural history of cervical neoplasia: consistent results obtained by an identification technique. *Br J Cancer*, 60 (1):132-141.
- Gustmann C, Altmannsberger M, Osborn M, Griesser H, Feller AC. 1991. Cytokeratin expression and vimentin content in large cell anaplastic lymphomas and other non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*, 138 (6):1413-1422.
- Haas KM, Berndt A, Stiller KJ, Hyckel P, Kosmehl H. 2001. A comparative quantitative analysis of laminin-5 in the basement membrane of normal, hyperplastic, and malignant oral mucosa by confocal immunofluorescence imaging. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49 (10):1261-1268.
- Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86 (3):353-364.
- Hellberg D, Stendahl U. 2005. The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer. *Anticancer Res*, 25 (4):3041-3046.
- Hellman K, Hellstrom AC, Silfversward C, Salo S, Aspenblad U, Nilsson B, Frankendal B, Tryggvasson K, Auer G. 2000. Cancer of the vagina: Laminin-5 $\gamma$ 2 chain expression and prognosis. *Int J Gynecol Cancer*, 10 (5):391-396.
- Henning K, Berndt A, Katenkamp D, Kosmehl H. 1999. Loss of laminin-5 in the epithelium-stroma interface: an immunohistochemical marker of malignancy in epithelial lesions of the breast. *Histopathology*, 34 (4):305-309.

- Higgins GD, Phillips GE, Smith LA, Uzelin DM, Burrell CJ. 1992. High prevalence of human papillomavirus transcripts in all grades of cervical intraepithelial glandular neoplasia. *Cancer*, 70 (1):136-146.
- Hindermann W, Berndt A, Haas KM, Wunderlich H, Katenkamp D, Kosmehl H. 2003. Immunohistochemical demonstration of the gamma2 chain of laminin-5 in urinary bladder urothelial carcinoma. Impact for diagnosis and prognosis. *Cancer Detect Prev*, 27 (2):109-115.
- Hindermann W, Berndt A, Borsi L, Luo X, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H. 1999. Synthesis and protein distribution of the unspliced large tenascin-C isoform in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology*, 189 (4):475-480.
- Hirosaki T, Mizushima H, Tsubota Y, Moriyama K, Miyazaki K. 2000. Structural requirement of carboxyl-terminal globular domains of laminin alpha 3 chain for promotion of rapid cell adhesion and migration by laminin-5. *J Biol Chem*, 275 (29):22495-22502.
- Hoskins WJ. 1988. Prognostic factors for risk of recurrence in stages Ib and Iia cervical cancer. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 2 (4):817-828.
- Hynes RO. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48 (4):549-554.
- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69 (1):11-25.
- Kainulainen T, Autio-Harmainen H, Oikarinen A, Salo S, Tryggvason K, Salo T. 1997. Altered distribution and synthesis of laminin-5 (kalinin) in oral lichen planus, epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Br J Dermatol*, 136 (3):331-336.
- Kainulainen T, Hakkinen L, Hamidi S, Larjava K, Kallioinen M, Peltonen J, Salo T, Larjava H, Oikarinen A. 1998. Laminin-5 expression is independent of the injury and the microenvironment during reepithelialization of wounds. *J Histochem Cytochem*, 46 (3):353-360.
- Kainz C, Speiser P, Wanner C, Obermair A, Tempfer C, Sliutz G, Reinthaller A, Breitenecker G. 1995. Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Res*, 15 (4):1549-1551.
- Katayama M, Sanzen N, Funakoshi A, Sekiguchi K. 2003. Laminin gamma2-chain fragment in the circulation: a prognostic indicator of epithelial tumor invasion. *Cancer Res*, 63 (1):222-229.
- Katayama M, Funakoshi A, Sumii T, Sanzen N, Sekiguchi K. 2005. Laminin gamma2-chain fragment circulating level increases in patients with metastatic pancreatic ductal cell adenocarcinomas. *Cancer Lett*, 225 (1):167-176. Epub 2005 Jan 2005.

- Kleine W, Rau K, Schwoerer D, Pflaiderer A. 1989. Prognosis of the adenocarcinoma of the cervix uteri: a comparative study. *Gynecol Oncol*, 35 (2):145-149.
- Kobierski J, Emerich J, Krolikowska B, Majdak E. 2002. [Lymph node metastasis as a prognostic factor in cervical carcinoma]. *Ginekol Pol*, 73 (11):925-929.
- Kohlberger P, Beneder C, Horvat R, Leodolter S, Breitenacker G. 2003. Immunohistochemical expression of laminin-5 in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, 89 (3):391-394.
- Korge BP, Krieg T. 1996. The molecular basis for inherited bullous diseases. *J Mol Med*, 74 (2):59-70.
- Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. 2000. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5.[erratum appears in *J Cell Biol* 2000 Oct 16;151(2):479]. *Journal of Cell Biology*, 148 (3):615-624.
- Koshikawa N, Moriyama K, Takamura H, Mizushima H, Nagashima Y, Yanoma S, Miyazaki K. 1999. Overexpression of laminin gamma2 chain monomer in invading gastric carcinoma cells. *Cancer Research*, 59 (21):5596-5601.
- Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. 1996. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch*, 429 (6):311-322.
- Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, Borsi L, Rousselle P, Mandel U, Hyckel P, Zardi L, Katenkamp D. 1999. Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 81 (6):1071-1079.
- Kurman RJ. 1994. Blaustein's Pathology of the female genital tract. 4th editionte Aufl. Springer Verlag.
- Larjava H, Salo T, Haapasalmi K, Kramer RH, Heino J. 1993. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest*, 92 (3):1425-1435.
- Lenander C, Habermann JK, Ost A, Nilsson B, Schimmelpenning H, Tryggvason K, Auer G. 2001. Laminin-5 gamma 2 chain expression correlates with unfavorable prognosis in colon carcinomas. *Analytical Cellular Pathology*, 22 (4):201-209.
- Liotta LA, Kohn EC. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411 (6835):375-379.
- Lohi J, Leivo I, Owaribe K, Burgeson RE, Franssila K, Virtanen I. 1998. Neoexpression of the epithelial adhesion complex antigens in thyroid tumours is associated with proliferation and squamous differentiation markers. *Journal of Pathology*, 184 (2):191-196.



- Lohi J, Oivula J, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Frojzman K, Yamada Y, Burgeson RE, Leivo I, Virtanen I. 2000. Basement membrane laminin-5 is deposited in colorectal adenomas and carcinomas and serves as a ligand for alpha3beta1 integrin. *Apmis*, 108 (3):161-172.
- Lundgren C, Frankendal B, Silfversward C, Nilsson B, Tryggvason K, Auer G, Nordstrom B. 2003. Laminin-5 gamma2-chain expression and DNA ploidy as predictors of prognosis in endometrial carcinoma. *Med Oncol*, 20 (2):147-156.
- Maatta M, Soini Y, Paakko P, Salo S, Tryggvason K, Autio-Harmanen H. 1999. Expression of the laminin gamma2 chain in different histological types of lung carcinoma. A study by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Pathol*, 188 (4):361-368.
- Malina R, Motoyama S, Hamana S, Maruo T. 2004. Laminin-5 gamma2 chain and matrix metalloproteinase-2 expression in the neoplastic changes of uterine cervical squamous epithelium. *Kobe J Med Sci*, 50 (3-4):123-130.
- Marinkovich MP, Lunstrum GP, Burgeson RE. 1992. The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (25):17900-17906.
- Martin GR, Timpl R. 1987. Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol*, 3:57-85.
- Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Izumisato Y, Goto A, Sakamoto A, Atomi Y. 2003. Laminin-5 gamma 2 chain and matrix metalloproteinase-2 may trigger colorectal carcinoma invasiveness through formation of budding tumor cells. *Anticancer Res*, 23 (5b):4113-4119.
- McIndoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR. 1984. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol*, 64 (4):451-458.
- McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM. 2005. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (5):1165-1170.
- Miner JH, Yurchenco PD. 2004. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:255-284.
- Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, Copeland NG, Sanes JR. 1997. The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *Journal of Cell Biology*, 137 (3):685-701.

- Miyazaki K, Kikkawa Y, Nakamura A, Yasumitsu H, Umeda M. 1993. A large cell-adhesive scatter factor secreted by human gastric carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (24):11767-11771.
- Mizushima H, Koshikawa N, Moriyama K, Takamura H, Nagashima Y, Hirahara F, Miyazaki K. 1998. Wide distribution of laminin-5 gamma 2 chain in basement membranes of various human tissues. *Horm Res*, 50 (Suppl 2):7-14.
- Moll R, Moll I. 1998. Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch*, 432 (6):487-504.
- Morice P, Piovesan P, Rey A, Atallah D, Haie-Meder C, Pautier P, Sideris L, Pomel C, Duvillard P, Castaigne D. 2003. Prognostic value of lymphovascular space invasion determined with hematoxylin-eosin staining in early stage cervical carcinoma: results of a multivariate analysis. *Ann Oncol*, 14 (10):1511-1517.
- Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Botti C, Castellani P, Risso AM, Zardi L. 1991. Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues. *Int J Cancer*, 47 (6):811-816.
- Noel JC, Fernandez-Aguilar S, Fayt I, Buxant F, Ansion MH, Simon P, Anaf V. 2005. Laminin-5 gamma 2 chain expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 84 (11):1119-1123.
- Nordemar S, Kronenwett U, Auer G, Hogmo A, Lindholm J, Edstrom S, Tryggvasson K, Linder S, Munck-Wikland E. 2001. Laminin-5 as a predictor of invasiveness in cancer in situ lesions of the larynx. *Anticancer Res*, 21 (1B):509-512.
- Ogawa T, Tsubota Y, Maeda M, Kariya Y, Miyazaki K. 2004. Regulation of biological activity of laminin-5 by proteolytic processing of gamma2 chain. *J Cell Biochem*, 92 (4):701-714.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55 (2):74-108.
- Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR. 1997. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol*, 139 (6):1507-1521.
- Pettersson F, Maler B. 1989. Invasive carcinoma of the uterine cervix following diagnosis and treatment of in situ carcinoma. Record linkage study within a National Cancer Registry. *Radiother Oncol*, 16 (2):115-120.
- Pham TH, Nguyen TH, Herrero R, Vaccarella S, Smith JS, Nguyen Thuy TT, Nguyen HN, Nguyen BD, Ashley R, Snijders PJ, Meijer CJ, Munoz N, Parkin DM, Franceschi S.

2003. Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer*, 104 (2):213-220.
- Prieto VG, Lugo J, McNutt NS. 1996. Intermediate- and low-molecular-weight keratin detection with the monoclonal antibody MNF116. An immunohistochemical study on 232 paraffin-embedded cutaneous lesions. *J Cutan Pathol*, 23 (3):234-241.
- Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Romer J, Dano K, Tryggvason K. 1995. Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Research*, 55 (18):4132-4139.
- Pyke C, Romer J, Kallunki P, Lund LR, Ralfkiaer E, Dano K, Tryggvason K. 1994. The gamma 2 chain of kalinin/laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers. *American Journal of Pathology*, 145 (4):782-791.
- Richart RM. 1973. Cervical Intraepithelial Neoplasia - A review. In: Hrsg. Sommers SC *Pathology annual*. Aufl. East Norwalk, CT: Appleton-Century Crofts, 301-328.
- Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE. 1991. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *Journal of Cell Biology*, 114 (3):567-576.
- Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, Champlaud MF, Rest M, Burgeson RE. 1997. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *Journal of Cell Biology*, 138 (3):719-728.
- Rutgers JL, Mattox TF, Vargas MP. 1995. Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 14 (2):114-118.
- Schmidt D, Horn LC, Kommos F. 2005. [Neuroendocrine carcinomas of the cervix.]. *Pathologe*, 26 (4):262-265.
- Shields TS, Brinton LA, Burk RD, Wang SS, Weinstein SJ, Ziegler RG, Studentsov YY, McAdams M, Schiffman M. 2004. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13 (10):1574-1582.
- Skyldberg B, Salo S, Eriksson E, Aspenblad U, Moberger B, Tryggvason K, Auer G. 1999. Laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions. *Journal of the National Cancer Institute*, 91 (21):1882-1887.
- Soini Y, Maatta M, Salo S, Tryggvason K, Autio-Harmainen H. 1996. Expression of the laminin gamma 2 chain in pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol*, 180 (3):290-294.

- Sordat I, Bosman FT, Dorta G, Rousselle P, Aberdam D, Blum AL, Sordat B. 1998. Differential expression of laminin-5 subunits and integrin receptors in human colorectal neoplasia. *J Pathol*, 185 (1):44-52.
- Sorokin SP, Hoyt RF, Jr. 1978. PAS-lead hematoxylin as a stain for small-granule endocrine cell populations in the lungs, other pharyngeal derivatives and the gut. *Anat Rec*, 192 (2):245-259.
- Stoltzfus P, Salo S, Eriksson E, Aspenblad U, Tryggvason K, Auer G, Avall-Lundqvist E. 2004. Laminin-5 gamma2 chain expression facilitates detection of invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol*, 23 (3):215-222.
- Strassburger S, Berndt A, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H. 1998. Differential expression of laminin chains in the human major salivary gland. *Histochem J*, 30 (2):81-88.
- Tani T, Karttunen T, Kiviluoto T, Kivilaakso E, Burgeson RE, Sipponen P, Virtanen I. 1996. Alpha 6 beta 4 integrin and newly deposited laminin-1 and laminin-5 form the adhesion mechanism of gastric carcinoma. Continuous expression of laminins but not that of collagen VII is preserved in invasive parts of the carcinomas: implications for acquisition of the invading phenotype. *Am J Pathol*, 149 (3):781-793.
- Tani T, Lumme A, Linnala A, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Burgeson RE, Kangas L, Leivo I, Virtanen I. 1997. Pancreatic carcinomas deposit laminin-5, preferably adhere to laminin-5, and migrate on the newly deposited basement membrane. *American Journal of Pathology*, 151 (5):1289-1302.
- Tarli L, Balza E, Viti F, Borsi L, Castellani P, Berndorff D, Dinkelborg L, Neri D, Zardi L. 1999. A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood*, 94 (1):192-198.
- Tavassoli FA, Devilee P. 2003. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Aufl.
- Thorup AK, Reibel J, Schiodt M, Stenersen TC, Therkildsen MH, Carter WG, Dabelsteen E. 1998. Can alterations in integrin and laminin-5 expression be used as markers of malignancy? *Apmis*, 106 (12):1170-1180.
- Timpl R. 1996. Macromolecular organization of basement membranes. *Current Opinion in Cell Biology*, 8 (5):618-624.
- Timpl R, Aumailley M. 1989. Biochemistry of basement membranes. *Adv Nephrol Necker Hosp*, 18:59-76.
- Timpl R, Brown JC. 1996. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*, 18 (2):123-132.

- Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kuhn K. 1981. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem*, 120 (2):203-211.
- Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. 1979. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254 (19):9933-9937.
- van Ballegooijen M, van den Akker-van Marle E, Patnick J, Lynge E, Arbyn M, Anttila A, Ronco G, Dik J, Habbema F. 2000. Overview of important cervical cancer screening process values in European Union (EU) countries, and tentative predictions of the corresponding effectiveness and cost-effectiveness. *Eur J Cancer*, 36 (17):2177-2188.
- Verrando P, Partouche O, Pisani A, Ortonne JP. 1992. The 6/2 (AA3) polyclonal antibody identifying a 37 kD keratinocyte protein reacts also with BM-600/nicein, the basement membrane component bound by the monoclonal antibody GB3. *Experimental Dermatology*, 1 (1):52-58.
- Vogel HP, Mendelsohn G. 1987. Laminin immunostaining in hyperplastic, dysplastic, and neoplastic lesions of the endometrium and uterine cervix. *Obstet Gynecol*, 69 (5):794-799.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. 1991. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 324 (1):1-8.
- Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabresi P. 1995. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, 56 (3):353-356.
- Wittekind C, Meyer H-J, Bootz F. 2002. TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6.Auflage. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
- Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Hosokawa M, Imai K. 2001. Expression of the gamma(2) chain of laminin-5 at the invasive front is associated with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 7 (4):896-900.
- Yurchenco PD, Cheng YS, Colognato H. 1992. Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol*, 117 (5):1119-1133.
- Zhang K, Kramer RH. 1996. Laminin 5 deposition promotes keratinocyte motility. *Experimental Cell Research*, 227 (2):309-322.

## 8. Anhang

### Danksagung

Herzlicher Dank gilt an erster Stelle meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. Kosmehl für die Überlassung des Themas und Einarbeitung in die Materie der extrazellulären Matrix. Danke für das gemeinsame Mikroskopieren, die kritischen Hinweise sowie ständige Unterstützung und Ansporn.

Des weiteren danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Alexander Berndt für die Erläuterungen zu den immunhistochemischen Methoden und die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung des Western Blot.

Mein Dank gebührt auch Herrn Dr. K. Michael Haas für seine Hilfe bei der Erstellung und Bearbeitung der Photographien sowie der Durchführung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.

Besonderer Dank gilt Frau Bergholz sowie Frau König aus dem Pathologischen Institut für die Durchführung der über 290 immunhistochemischen Färbungen

Für die Unterstützung bei der Literaturrecherche soll Frau Gunstheimer aus der Bibliothek des Pathologischen Instituts mein Dank ausgesprochen werden.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen meinen Eltern für ihre beständige Unterstützung und Motivation sowie Markus Ferrari für sein unermüdliches Verständnis, seine Aufmunterungen und Hilfe bei der Korrektur des Manuskriptes.

## Curriculum vitae - Katharina Kühne

### Persönliche Angaben

Katharina Kühne

Geboren am: 12.01.1979 in: Jena

### Ausbildung

Schulbildung	07/85 – 06/89	Polytechnische Oberschule Thomas Müntzer, Mihla bei Eisenach
	07/89 – 06/97	Adolf-Reichwein-Gymnasium, Jena
	06/97	Abschluss Allgemeine Hochschulreife, Note:1,2; Latinum, Graecum
Hochschulbildung	09/97-07/04	Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller- Universität (FSU), Jena
	06/04	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen) Gesamtnote: 1,8
Berufliche Tätigkeit	08/04-09/04	Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Klinik für Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie, Universitätsklini- kum Jena
	10/04-heute	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Herz-, Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Jena, in Weiterbildung zur Fachärztin für Herzchirurgie

Jena, den 04.04.2006

Katharina Kühne

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. habil. H. Kosmehl,

PD. Dr. rer. nat. A. Berndt,

Dr. med. K.-M. Haas,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 04.04.2006

Katharina Kühne