

**IMMUNHISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
NICHT-MELANOZYTÄRE HAUPTUMORE ANHAND
MONO- UND POLYKLONALER ANTIKÖRPER DER
HITZE-SCHOCK-PROTEINE HSP27, HSP32, HSP70,
HSP72, HSP73 UND METALLOTHIONEIN**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Ulrike Degenhardt
aus Essen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med Christian Mittermayer
Privatdozent Dr. med. Karl-Heinz Treutner

Tag der mündlichen Prüfung: 6.Mai 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.

*Unser Wissen ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen, ist ein Ozean.*

Isaac Newton

INHALT	SEITE
1 Grundlagen	3
1.1 PHYSIOLOGIE DER KERATINOZYTÄREN DIFFERENZIERUNG	3
1.2 DIE UNTERSUCHTEN HAUTTUMORE	3
1.3 ENTDECKUNGSGESCHICHTE DER HITZE-SCHOCK-PROTEINE	6
1.4 REGULATIONSMECHANISMEN DES HSP-EXPRESSION	7
1.5 FUNKTIONEN VON HITZE-SCHOCK-PROTEINEN	8
1.6 HSP 27	12
1.7 HSP 32	13
1.8 DIE HSP 70-FAMILIE	14
1.9 METALLOTHIONEIN	18
1.10 HITZE-SCHOCK-PROTEINE IN DER HAUT	19
1.11 FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT	20
2 Material und Methoden	22
2.1 MATERIAL	22
2.2 GEWEPRÄPARATION	23
2.3 IMMUNHISTOCHEMIE	24
2.4 ANTIKÖRPER	26
2.5 LICHTMIKROSKOPISCHE BEFUNDUNG	27

3	ERGEBNISSE	28
3.1	NORMALE HAUT UND HAUTANHANGSGEBILDE	28
3.2	AKTINISCHE KERATOSEN	34
3.3	SEBORRHOISCHE KERATOSEN	35
3.4	VERRUCAE VULGARES	37
3.5	BASALIOME	38
3.6	SPINALIOME	40
4	DISKUSSION	42
4.1	HSP- UND METALLOTHIONNEIN-EXPRESSION IN NORMALER HAUT	52
4.2	HSP UND METALLOTHIONEIN-EXPRESSION IN DEN TUMOREN	63
4.3	BEWERTUNG DER METHODIK	65
4.4	AUSBLICK	69
4.5	TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG	66
5	ABBILDUNGEN	67
6	TABELLEN	81
7	LITERATURVERZEICHNIS	93
8	DANKSAGUNG	116
9	LEBENS LAUF	117

ZUSAMMENFASSUNG

Hitzeschockproteine sind eine Gruppe ubiquitärer und hoch-konservierter Eiweiße, denen zahlreiche Funktionen in der intrazellulären Protein-Synthese, -Faltung, -Reparatur, im Protein-Abbau und in der Regulation von Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptosevorgängen zugesprochen werden. Ihre Expression kann durch verschiedene Umweltbedingungen, die eine Gefahr für das Überleben der Zelle bedeuten (Hyperthermie, Hypoxie, Schwermetalle, Ischämie, Entzündung, etc.), induziert werden. Metallothionein ist ein zysteinreiches Metallo-Protein. Mit den Hitzeschockproteinen hat es die weite Verbreitung in pro- und eukaryontischen Spezies und die Induzierbarkeit durch diverse Stressfaktoren gemeinsam.

In der vorliegenden Studie wurde das Expressionsmuster der Hitzeschockproteine HSP27, HSP32, der HSP70-Familie und Metallothioneins in fünf Gruppen nicht-melanozytärer Hauttumoren sowie in normaler Haut immunhistochemisch untersucht. Die gewählten Tumorklassen spiegeln eine Gradierung zunehmender Malignität und unterschiedlicher Ätiologien keratinozytärer Veränderungen wider, so dass sich eine breite Datengrundlage zur Beurteilung von Proliferations-, Differenzierungs- und Entartungsprozessen ergab. Trotz einiger Studien zu HSP27, HSP72 und HSP73 in der Epidermis existieren keine vergleichbar umfassenden Untersuchungen zu Hitzeschockproteinen in Hauttumoren. Die untersuchten Hitzeschockproteine zeigten in den gefärbten Tumoren und Hautabschnitten spezifische Expressionsmuster, so dass mit dieser Studie zu einer weiteren Differenzierung und besserem Verständnis ihrer Funktionen beigetragen werden konnte.

Die konstitutive Expression von HSP27 in menschlichen Keratinozyten konnte *in vivo* belegt werden und seine Expression in den Nervenscheiden und Skelettmuskeln der Dermis erstmals gezeigt werden. Für die zentrale Funktion von HSP27 in Wachstums- und Differenzierungsprozessen finden sich in den untersuchten Hauttumoren zahlreiche Hinweise. Eine fortschreitende keratinozytäre Entdifferenzierung aufgrund chronischer UV-Exposition führt zu einer reduzierten oder unregelmäßigen HSP27-Expression. Da sich in morphologisch unauffälligen Bereichen in Tumornähe zum Teil Veränderungen in der HSP27-Expression zeigten, eignet sich HSP27 möglicherweise als früher Marker von Differenzierungsstörungen. Das Expressionsmuster des HSP32-Antigen ließ keine Rückschlüsse auf eine Assoziation mit Proliferation oder

Differenzierung zu. In der HSP70-Familie zeigte sich HSP73 als zuverlässiger Differenzierungsmarker, dessen in normaler Haut sehr spezifisches Färbeverhalten in sämtlichen Tumoren charakteristische Unregelmäßigkeiten zeigte.

Die morphologischen Kennzeichen der aktinischen Keratose spiegelten sich auf molekularbiologischer Ebene in einer reduzierten und unregelmäßigen HSP- und Metallothionein-Expression wider. Die untersuchten Verrucae vulgares ließen keine wesentliche Abweichung ihrer Antigenverteilung von normaler Haut erkennen. Bei den Basaliomen und Spinaliomen fiel häufig eine fokale Reaktivität einzelner Tumorbereiche auf, HSP72 und Metallothionein markierten hier zum Teil speziell die Invasionsfront des Tumors.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit der vorliegenden Studie zu einem verbesserten Verständnis der vielfältigen Funktionen von Hitzeschockproteinen und Metallothionein beigetragen werden konnte. Vielversprechende klinische Anwendungen von Hitzeschockproteinen zeichnen sich in der Entwicklung von Krebsvakzinen und in der gezielten Modifikation von Stressreaktionen in verschiedenen Geweben ab.

1 GRUNDLAGEN

1.1 Physiologie der keratinozytären Differenzierung

Die Epidermis stellt ein System fortwährender Proliferation und Differenzierung dar und ist damit zur Erforschung der molekularbiologischen Grundlagen dieser Mechanismen besonders geeignet. Während des keratinozytären Differenzierungsprozesses werden undifferenzierte, proliferierende Keratinozyten in hochgradig differenzierte, teilungsunfähige Zellen umgewandelt, aus denen schließlich leblose Hornschuppen hervorgehen. Die Erforschung der Genregulation normaler Keratinozyten kann neue Erkenntnisse über die spezifischen lipophiler interzellulärer Substanz aneinander (nach ECKERT, 1989).

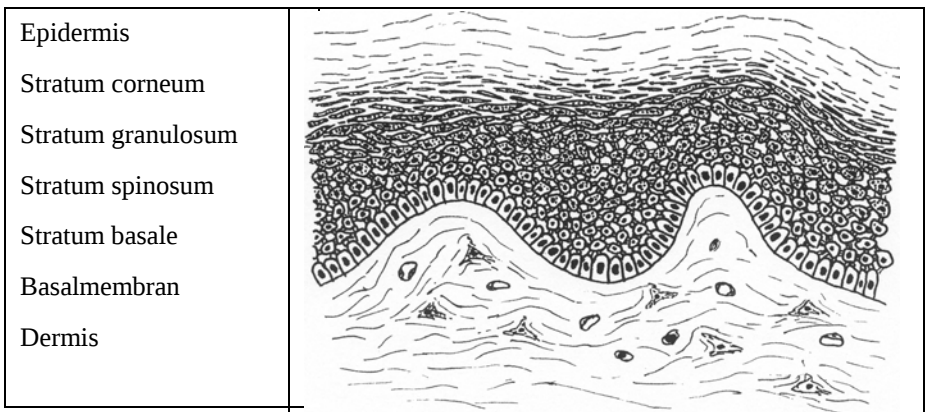


Abbildung 1: schematische Darstellung des verhornenden Plattenepithelkarzinoms der menschlichen Epidermis (modifiziert nach Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, S.454)

Wie in anderen Wechselgeweben besteht in der Epidermis eine klare topologische Verteilung mitotisch aktiver und sich differenzierender Zellen. Die Stammzellpopulation des **Stratum basale** hat unmittelbaren Kontakt zur **Basalmembran**. Ihr fehlen die chemischen und morphologischen Marker der oberen epidermalen Schichten. Ihre proliferative Aktivität wird von verschiedenen Faktoren reguliert. Zum Beispiel führen EGF (epidermal growth factor), TGF α (tumor growth factor) und cAMP-Induktoren wie Choleratoxin und Adrenalin zu einer deutlich höheren Proliferationsrate (ECKERT, 1989). Die Zellen des **Stratum spinosum** zeichnen sich durch die Synthese hochmolekularer Keratinpeptide aus. Im **Stratum granulosum** treten die Keratohyalin- sowie die Lipid-gefüllten

Granula morphologisch in den Vordergrund. Die anschließende Übergangszone zum **Stratum corneum** ist eine Region hoher enzymatischer Aktivität und zellulärer Umstrukturierung. Zellorganellen werden zerstört, Lipide aus den Granula in den Interzellularraum freigesetzt und Hornhüllen gebildet. Endprodukt der terminalen Keratinozytendifferenzierung ist der sogenannte Korneozyt. Er besteht aus einer Hülle kovalent gebundener Proteine und umschließt die verdichteten Keratin-Makrofibrillen. Die Korneozyten haften mittels modifizierter Desmosome und lipophiler interzellulärer Substanz aneinander (nach ECKERT, 1989).

Wie die Proliferation in der Basalzellschicht so wird auch die Differenzierung in den oberen Epidermisschichten von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst und reguliert. Vitamin D, Hydrocortison und Ca^{2+} -Ionen steigern die keratinozytäre Differenzierung. Im Sinne einer Autoregulation auf zellulärer Ebene exprimieren undifferenzierte Zellen eine höhere Anzahl von Vitamin-D-Rezeptoren als differenzierte und zeigen damit eine erhöhte Reaktionsbereitschaft auf diesen Differenzierungsreiz. Vitamin A dagegen hält Keratinozyten in einem undifferenzierten Zustand, Vitamin-A-Entzug führt zu einer gesteigerten Verhornung (ECKERT, 1989).

Neben den Keratinozyten, die den Großteil der Zellpopulation ausmachen, finden sich noch drei weitere Zellarten in der Epidermis: Die Melanozyten, die das Pigment Melanin synthetisieren, in Melanosomen speichern und an die benachbarten Keratinozyten abgeben, sind in der Basalzellschicht und in den Haarfollikeln lokalisiert. Die Langerhans-Zellen des Immunsystems befinden sich in den suprabasalen Schichten und den äußeren Wurzelscheiden und die als Mechanorezeptoren geltenden Merkel-Zellen liegen im Stratum basale und den äußeren Wurzelscheiden.

In der Dermis finden sich neben Fibroblasten und einem dichten Kollagenfasergeflecht auch Blut- und Lymphgefäße, Nerven, Immunzellen und ein Teil der Hautanhangsgebilde. Hierzu werden unter anderem die holokrinen, lobulär aufgebauten Talgdrüsen, die ekkrinen, tubulären, von Myoepithelzellen umgebenen Schweißdrüsen und die Haarfollikel gerechnet.

Die Hautoberfläche eines Erwachsenen beträgt 1,2 bis 2,3m². Als Organ erfüllt die Haut zahlreiche Funktionen in Stoffwechsel, Ausscheidung, Thermoregulation und Immunabwehr. Für die Fragestellung dieser Arbeit ist ihre permanente Exposition zu physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Noxen von

besonderer Bedeutung. Weitere Vorteile für die Erforschung von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen sind die Tatsachen, dass sich native Keratinozyten gut in Zellkulturen züchten lassen und dass zahlreiche transformierte Zelllinien dermalen Ursprungs für *in-vitro*-Studien zur Verfügung stehen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die an ihnen gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt auf die Verhältnisse *in vivo* zu übertragen sind. So konnten YAAR ET AL 1993 zeigen, dass die malignen Keratinozyten der gut differenzierten Plattenepithel-Zellreihe SCC12F trotz ihres normalen phänotypischen Erscheinungsbildes auf molekularer Ebene weniger differenziert sind und daher anders auf Differenzierungsreize reagieren als unveränderte Keratinozyten.

1.2 Die untersuchten Hauttumore

1.2.1 Aktinische Keratose

Bei der aktinischen Keratose¹ handelt es sich um eine prä maligne epidermoide Läsion, die auf dem Boden einer kumulativen Langzeitschädigung der Epidermis durch UV-Strahlen beruht. In 60% aktinischer Keratosen finden sich Mutationen des Tumorsuppressor-Gens p53 (HALL ET AL, 1993). Ausgangspunkt der morphologischen Veränderung ist das Stratum basale, in dem sich ein atypischer Basalzellklon zunächst horizontal ausbreitet. Später greift diese Population auf die oberen Schichten der Epidermis über. Histologisch zeigen sich multifokale oder konfluierende Bezirke ungeordneter Keratinozyten mit unterschiedlich ausgeprägten Kernatypien, die von einer verbreiterten, parakeratotischen Hornschicht bedeckt sind. Prädisponierend wirken Hellhäutigkeit und übermäßige UV-Exposition über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten. In der Regel sind prominente Gesichtspartien oder die Handrücken befallen, subjektive Beschwerden sind selten. Da die aktinische Keratose in 10 bis 20% der Fälle in ein spinözelluläres Karzinom übergeht, sollte sie durch Exzision, kryotherapeutisch oder lokal zytostatisch behandelt werden. (nach BRAUN-FALCO ET AL, 1995 und NOLTENIUS, 1987)

¹ Synonyme: solare Keratose, Keratosis actinica, Keratosis senilis, Keratoma senile

1.2.2 Verruca vulgaris

Die Verruca vulgaris oder vulgäre Warze gehört in die Gruppe der benignen infektiösen Epitheliosen. Eine Virusinfektion führt zur tumorigenen Transformation der Epidermis durch keratinozytäre Hyperproliferation. Kennzeichnend ist eine reaktive Hyperkeratose und konsekutive Verbreiterung des Papillarkörpers (Papillomatose). Im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum finden sich große vakuolisierte Zellen mit basophilen Kerneinschlüssen. Da Viruspartikel nur in den oberen epidermalen Schichten nachweisbar sind, ist zu vermuten, dass die Virusexpression von einem bestimmten Differenzierungsgrad der Keratinozyten abhängig ist.

Erreger ist das humane Papillomavirus HPV, ein DNS-Virus mit zirkulärer doppelsträngiger Erbmasse, von dem zur Zeit mehr als 68 Subtypen identifiziert sind. Vierzehn von ihnen² sind als Erreger der Verruca vulgaris bekannt. Besonders häufig befallen sind Kinder und Jugendliche sowie immungeschwächte Patienten. Bei vorhandener Immunkompetenz kommt es innerhalb von Wochen, Monaten oder Jahren zur Spontanheilung. (nach ECKERT, 1989 und BRAUN-FALCO ET AL, 1995)

1.2.3 seborrhische Keratose

Bei der seborrhischen Keratose³ handelt es sich um den Prototyp eines benignen und zugleich unreifen Epithelioms bzw. Fibroepithelioms. Sie leitet sich von den basalen Epidermiszellen her und zeigt langsame Wachstums- und stark eingeschränkte Differenzierungstendenz. Maligne Entartung ist extrem selten. Führendes histologisches Merkmal ist die basaloidzellige Epithelproliferation mit eingeschlossenen Pseudohornzysten. Die seborrhische Keratose gehört zu den häufigsten Hauttumoren und tritt vor allem bei älteren Menschen auf. Abtragung ist nur bei mechanischer Irritation erforderlich, bei unklarer Diagnose wird Exzision empfohlen. (nach BRAUN-FALCO ET AL, 1995 und NOLTENIUS, 1987)

1.2.4 Basaliom

Beim Basaliom handelt es sich um einen semi-malignen Tumor, der sich von den pluripotenten Stammzellen des Stratum basale ableitet. Es wächst lokal

² HPV1-4, 26-29, 38, 41,49,57, 63, 65 (nach de Villiers, 1992)

³ Synonyme: Verruca seborrhica, Verruca senilis

infiltrierend und destruierend, metastasiert jedoch nicht. Mit 65% der malignen Hauttumoren ist es die häufigste epidermale Neoplasie. In 75% der Fälle ist der Kopfbereich und hier besonders die periorbitale Region betroffen. Auf der unbehaarten Haut der Palmar- und Plantarflächen treten keine Basaliome auf. Histologische Besonderheit dieses Tumortyps ist die funktionelle und morphologische Wechselwirkung mit dem bindegewebigen Stroma, die zu einer palisadenartigen Ausrichtung der peripheren Tumorzellen führt. In zentralen Tumorabschnitten sind ovale Zellen mit geringgradiger Kernpleomorphie kennzeichnend. Eine Häufung von Mutationen im p53-Tumorsuppressor-Gen in Basaliomen ist bekannt, ohne dass die ätiologische Bedeutung dieser Mutation ausreichend erklärt wäre. Bei Exzision im Gesunden beträgt die Heilungsrate von Basaliomen 95%. (nach BRAUN-FALCO ET AL, 1995 und NOLTENIUS, 1987)

1.2.5 Spinaliom

Bei dem Spinaliom⁴ handelt es sich um ein invasiv wachsendes, metastasierendes Karzinom, das von den Keratinozyten des Stratum spinosum ausgeht. Plattenepithelkarzinome entstehen in der Regel auf vorgeschädigter Haut, am häufigsten in Folge chronischer UV-Schäden. In über 90% liegen Mutationen des p53-Tumorsuppressor-Gens vor, UV-Strahlung selektiert diese Klone und wirkt so nicht nur als Tumor-Initiator sondern auch als -Promotor (ZIEGLER ET AL, 1994). Die Inzidenz in Mitteleuropa liegt bei 9/100.000, in Australien beträgt sie über 50/100.000. Neben einer UV-Exposition spielen auch Karzinogene wie Teer und Arsen, Narben, Virusinfektionen mit HPV16 und 18 sowie chronisch-entzündliche Hauterkrankungen eine ätiologische Rolle (JANSEN ET AL, 1998). Die Metastasierungsrate primärer dermaler Plattenepithelkarzinome wird in der Literatur zwischen 3% und 5,2% angegeben (ROWE ET AL, 1992), bei Karzinomen im Bereich entzündlich oder degenerativ vorgeschädigter Haut sogar mit 10-30% (MOLLER ET AL, 1979). Die Prognose hängt wesentlich vom Differenzierungsgrad ab. Resektion, Strahlen- und Chemotherapie stellen stadien-abhängig die wesentlichen Therapiemöglichkeiten dar.

Das histologische Erscheinungsbild des Spinalioms variiert mit dem Differenzierungsgrad. So finden sich in gut differenzierten Tumoren noch Hornperlen und

⁴ Synonyme: spinozelluläres Karzinom, Plattenepithelkarzinom, Stachelzellkarzinom, verhornender Plattenepithelkrebs

Keratinisierung, während weniger differenzierte Plattenepithelkarzinome ein zunehmend pleomorphes Erscheinungsbild präsentieren (nach BRAUN-FALCO ET AL, 1995 und NOLTENIUS, 1987). Da entsprechende Zellkulturen vorhanden sind, liegen viele Studien über die molekulargenetischen Eigenschaften von Spinaliomzellen⁵ vor. Die Expression wichtiger Strukturproteine, wie Keratin und Involucrin, sowie die Transglutaminase-Aktivität und Hornhüllenbildung sind im Vergleich zu normalen Keratinozyten gestört. Darüber hinaus unterscheiden sich kultivierte Spinaliomzellen durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Differenzierungsreizen (Ca^{2+} , Retinoide, Hydrocortison) von normalen Keratinozyten (ECKERT, 1989).

1.3 Entdeckungsgeschichte der Hitze-Schock-Proteine

1962 beobachtete RITOSSA erstmals charakteristische Auftreibungen („puffs“) an den Chromosomen Wärme-exponierter *Drosophila*-Fliegen. Erst 1974 stellten TISSIERES ET AL fest, dass dieses Phänomen mit einer vermehrten Expression bestimmter Proteine, den sogenannten Hitze-Schock-Proteinen, einhergeht. Die Stellen, an denen diese Proteine transkribiert werden, werden als chromosomale Auftreibungen sichtbar.

Seitdem sind in zahlreichen verschiedenartigen Zellen Proteine nachgewiesen worden, die sich durch Hitze-Schock, d.h. eine temporäre Erhöhung der Temperatur auf 3-5°C über die gewöhnliche Umgebungstemperatur, induzieren lassen. Diese Proteine sind phylogenetisch hochkonserviert, das heißt, es bestehen hochgradige Sequenzübereinstimmungen zwischen den Hitze-Schock-Proteinen äußerst verschiedener Spezies. Zwischen den Genen des HSP70 im menschlichen Genom und dem Genom des Bakteriums *E. coli* findet sich z.B. 50% Sequenzanalogie, in einigen Domänen beträgt die Übereinstimmung bis zu 96% (aus SCHLESINGER 1990). Dieser hohe Konservierungsgrad lässt eine essentielle Funktion der Hitze-Schock-Proteine für das Überleben der Zelle und des Organismus vermuten.

Inzwischen weiß man, dass sich die Expression von Hitze-Schock-Proteinen außer durch Überwärmung auch durch zahlreiche andere Stimuli induzieren lässt, so z.B. UV-Strahlung, Schwermetalle oder Arsenit (MACARIO ET AL, 1994). Allen Stimuli gemeinsam ist, dass sie das Überleben der Zelle durch Proteindenaturation gefähr-

⁵ sog. SCC-Zellreihen (squamous cell carcinoma)

den und die Zelle dadurch „unter Stress“ setzen. Hitze-Schock-Proteine werden deshalb auch als Stress-Proteine bezeichnet. Sie können bis zu 5% der Proteinmasse einer Zelle ausmachen (FEIGE und POLLA, 1994) und werden nach ihrem Molekulargewichtes (kDa) in Gruppen eingeteilt: HSP27, HSP32, HSP60, die HSP70-Familie und HSP90, HSP110. Ihnen allen ist die Fähigkeit gemeinsam, Polypeptide zu binden, korrekt zu falten und zwischen Zellkompartimenten hin- und herzutransportieren. Einerseits erhöht diese sogenannte Chaperon-Funktion⁶ unter Stressbedingungen die Überlebenschancen der Zelle, andererseits ist sie auch für die Stoffwechselprozesse der Zelle unter physiologischen Bedingungen von zentraler Bedeutung (HARTL 1996, LEPPA und SISTONEN, 1997). Neben dem Phänomen der Thermotoleranz wird Hitzeschockproteinen deshalb eine wichtige Rolle in Proliferation, Differenzierung und Onkogenese zugesprochen. (siehe Abschnitt 1.5.4)

1.4 Regulationsmechanismen der HSP-Expression

Die Tatsache, dass die Stressantwort auf unterschiedliche Induktoren nicht uniform abläuft, lässt auf ein komplexes System von Regulationsmechanismen schließen. Sie sind bisher erst unvollständig entschlüsselt und sollen hier nur in Grundzügen erläutert werden. Sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten gibt es Regulationsmechanismen auf transkriptionaler und post-transkriptionaler Ebene, die die Proteinbiosynthese von Hitzeschockproteinen induzieren. Ihr gemeinsames Ziel ist es, in zellulären Stresssituationen eine möglichst schnelle Produktion von Hitzeschockproteinen zu gewährleisten. (LINDQUIST und CRAIG, 1988). Bei Eukaryonten erfolgt die Regulation der HSP-Expression mittels der spezifischen Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren HSF1, HSF2 und HSF3 (nach FRACELLA und RENSING; 1995, von JOLLY und MORIMOTO 2000 detailliert revidiert). Bei Temperaturerhöhung oligomerisieren diese Hitzeschockfaktoren und wandeln sich so in aktive Transkriptionsfaktoren, die sich spezifisch an die HSE-Promotorregionen⁷ binden. Dadurch kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg der Transkriptionsrate der nachgeschalteten HSP-Gene (nach MORIMOTO, 1991). Dass die mRNA von HSP-Genen darüber hinaus in gestressten Zellen selektiv translatiert wird, führte SCHLESINGER 1990 auf strukturelle

⁶ chaperon (engl.) – „Anstands dame“ (PONS, Kompaktwörterbuch Klett, 1985)

⁷ HSE - heat shock element

Besonderheiten wie das Fehlen von Intron-Sequenzen und stabilisierende Segmente im nicht-translatierten 3'-Ende zurück.

1.5 Funktionen von Hitze-Schock-Proteinen

1.5.1 Thermotoleranz und Radiosensitivität

Die erste Funktion, die Hitzeschockproteinen 1986 von LINDQUIST zugeschrieben wurde, ist die sogenannte Thermotoleranz. Sie ist definiert als ein induzierbares Phänomen, bei dem Zellen nach Exposition eines recht milden Hitzestresses⁸ einer ansonsten tödlichen Hitzebelastung⁹ gegenüber resistent werden. Die molekularen Mechanismen dieser Protektion sind Gegenstand intensiver Forschung, ohne bisher befriedigend erklärt worden zu sein. 1988 schrieben LINDQUIST und CRAIG in einem Übersichtsartikel: *„Akzeptiert man, dass Hitzeschockproteine in Thermotoleranz eine Rolle spielen, erscheinen zwei Schlussfolgerungen angebracht: Erstens muss Zellen eine Vielfalt von Mechanismen zur Verfügung stehen, um mit den toxischen Effekten hoher Temperaturen zurecht zu kommen, die von der HSP-Synthese unabhängig sind. [...] Zweitens können Zellen durch unterschiedliche Läsionen getötet werden, je nachdem, in welchen Stadien von Metabolismus und Differenzierung sie sich gerade befinden, bzw. ob sie kurze Zeit extremen Temperaturen ausgesetzt werden oder über einen längeren Zeitraum mäßig erhöhten Temperaturen.“*

MAYTIN ET AL (1990) konnten an kultivierten menschlichen Keratinozyten zeigen, dass Hitzebehandlung sowohl zu Thermotoleranz als auch zum Anstieg der HSP-Synthese führt, wobei keine zeitliche oder quantitative Korrelation dieser beiden Phänomene nachweisbar ist und die Thermotoleranz an ein umschriebenes Zeitfenster nach der Konditionierung gebunden ist. Darüber hinaus fanden sie heraus, dass die Entstehung von Hitzetoleranz an die Synthese von mRNA gebunden ist. KAMPINGA postulierte 1993 in einer zentraler Übersicht zu dem Thema, dass der intrazellulären Verteilung von Hitzeschockproteinen größere Bedeutung für die Entstehung von Hitzetoleranz zukomme als ihrer absoluten Menge. Im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass durch Hyperthermie nicht nur Hitzetoleranz sondern auch eine Unempfindlichkeit gegenüber anderen Reizen (Schwermetalle,

⁸ z.B. 42°C über eine Stunde

⁹ z.B. 48°C

Hypoxie) induziert werden kann. Umgekehrt können andere Stressfaktoren auch eine Hitzetoleranz bewirken (MINOWADA ET AL, 1995).

Von klinischer Bedeutung ist das Phänomen der Hitzetoleranz unter anderem, weil es als unerwünschter Nebeneffekt in der Radio-Onkologie die Wirksamkeit einer kombinierten Hyperthermie-Radiationstherapie herabsetzt. Erst ein Verständnis der molekularbiologischen Grundlagen dieser Prozesse ermöglicht eine Modulation oder Ausschaltung dieser Abläufe.

1.5.2 UV-Strahlung als Stressfaktor

Betrachtet man die Wirkung von UV-Strahlung auf Zellen und Gewebe, ist es wichtig, hinsichtlich akuter und chronischer Effekte sowie unterschiedlicher Wellenlängen zu differenzieren. UVA, UVB und UVC kommen in unterschiedlichen Mengen in der natürlichen Sonnenstrahlung vor, penetrieren unterschiedlich tief in Epidermis und Dermis und werden von unterschiedlichen biologischen und molekularen Strukturen absorbiert, in denen sie ihre Wirkung entfalten. Dies erklärt die Beobachtungen der Gruppe VILE ET AL (1994), dass UV-Strahlen unterschiedlicher Wellenlänge auch unterschiedliche Stressantworten hervorrufen.

Je nach geographischer Breite beruhen etwa 20-40% der Zytotoxizität von Sonnenlicht auf UVB-Strahlen (TYRRELL und PIDOUX, 1987). Aufgrund ihrer Wellenlänge penetrieren sie tief genug in die Haut, um Epidermis und Dermis ernsthaft zu schädigen. Sie sind für akute Schäden (Sonnenbrand) und chronische Effekte, zum Beispiel die Entstehung von Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen, verantwortlich (nach TYRRELL, 1996). Die kurzwelligeren UVC-Strahlen kommen im natürlichen Licht an der Erdoberfläche nur in sehr geringen Mengen vor, da sie größtenteils vom Ozon in der Atmosphäre absorbiert werden. Nicht selten werden sie als schädigendes Agens in Studien über zelluläre Strahleneffekte verwendet, was bei der Beurteilung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *in-vivo*-Gewebe berücksichtigt werden muss. Die langwelligen UVA-Strahlen¹⁰ penetrieren bis in die Tiefe der Epidermis, werden jedoch von Biomolekülen, wie zum Beispiel Nukleinsäuren und Proteinen, nur wenig absorbiert.

Chronische UV-Exposition führt zu einer dosisabhängigen Akkumulation von Schäden an Biomolekülen (nach TYRRELL, 1996) und zu einer Entdifferenzierung

¹⁰ Wellenlängen: UVA 320-380nm, UVB 290-320nm, UVC 190-290nm

von Geweben (GARMYN ET AL, 1992). Die Mutationsrate mitochondrialer DNA ist in chronisch UV-exponierter Haut höher als in sonnengeschützter Haut (BERNEBURG ET AL, 1997). Die vorherrschenden UV-induzierten DNA-Schäden sind Pyrimidin-Dimere vom Cyclobutan-Typ und Pyrimidin-Pyrimidone, die beide mutagene Wirkung haben (BLACK ET AL, 1997). Eine *chronische* UV-Exposition verändert außerdem die Regulationsmechanismen zentraler Wachstumsgene bei *akuter* UV-Belastung (GARMYN ET AL, 1995). Sowohl regelmäßig einwirkende UVA- als auch UVB-Strahlen tragen zur lichtbedingten Hautalterung und der Entstehung melanozytärer und nicht-melanozytärer Hauttumoren bei (TYRRELL, 1996).

UV-Strahlung vermag ruhende Gene zu aktivieren (LIEBERMAN ET AL, 1983). Mittels zweidimensionaler Gel-Elektrophorese ist gezeigt worden, dass sich die Wirkung von UVB-Strahlen auf die keratinozytäre Genexpression deutlich von den durch Hitze induzierten Veränderungen unterscheidet. So wird HSP70 zum Beispiel nur von Hitze nicht jedoch von UVB-Strahlen induziert (MAYTIN, 1992). Nichtsdestotrotz lässt sich durch eine vorhergehende Hyperthermie-Behandlung die UVB-Resistenz humaner epidermaler Keratinozyten *in vitro* steigern (MAYTIN ET AL, 1994). Dieser Effekt ist nach sechs Stunden maximal und erfordert intakte mRNA- und Proteinsynthese. Eine Überexpression von HSP70 in transfizierten Fibroblasten führt zu einer höheren Überlebensrate bei UVB-Bestrahlung (SIMON ET AL, 1995). In menschlichen Keratinozyten lässt sich UV-Resistenz *in vitro* durch Hitze-vermittelte HSP72-Induktion erzeugen (TRAUTINGER ET AL, 1995). Mit dem Nachweis, dass sich durch eine Hitze-Behandlung eine erhöhte UVB-Resistenz *in vivo* induzieren lässt, lieferten KANE ET AL 1995 die Grundlage für eine mögliche Anwendung der Hitzeschockantwort in der Prävention von solaren Strahlenschäden. (siehe Abschnitt 4.4)

1.5.3 Immunologische Bedeutung von Hitze-Schock-Proteinen

Wegen des hohen Konservierungsgrades von Hitzeschockproteinen zwischen den Spezies würde man eine hohe Toleranzschwelle des menschlichen Immunsystems gegenüber diesen Polypeptiden erwarten, aber genau das Gegenteil ist der Fall. Ein erheblicher Teil von Immunglobulinen und zytotoxischen T-Lymphozyten ist auf die Erkennung und Elimination von HSP-relatierten Peptiden ausgerichtet. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Mikroorganismen bei der Invasion eines Wirtsorganismus häufig eine Hitze-Schock-Reaktion mit daraus folgender gesteigerter HSP-Expression durchmachen. Auch die befallenen Wirtszellen

durchleben infolge des intrazellulären Mikrobeawachstums eine Stressreaktion. Durch Elimination der befallenen Zellen kann das Immunsystem eine Infektionsausbreitung wirkungsvoll unterbinden. Es besteht daher die Vermutung, dass eine gesteigerte Sensibilität und Fokussierung des Immunsystems auf HSP-Antigene sowohl einer schnellen Immunantwort gegen Mikroorganismen als auch einer Immunüberwachung körpereigener Zellen dienlich ist. Auf der anderen Seite wird eine Beteiligung von HSP-Antigenen in der Entstehung von Autoimmunreaktionen vermutet (nach SCHLESINGER, 1990).

1.5.4 Hitze-Schock-Proteine und Neoplasien

Es wurde bereits erwähnt, dass Hitzeschockproteinen auch wichtige Funktionen in Proliferations- und Differenzierungsprozessen zugesprochen werden, was in den entsprechenden Abschnitten des Diskussionskapitels noch näher beleuchtet werden soll (siehe Abschnitt 4.1.1 bis 4.1.6). Diese Überlegungen können zu einem besseren Verständnis von Entartungsprozessen und zu neuen Ansätzen in der Krebstherapie führen. FERRARINI ET AL postulierten 1992, dass sich Krebszellen im Muster ihrer HSP-Expression von normalen Zellen unterscheiden. Der Gehalt an Stress-Proteinen in Tumorzellen kann Aufschluss geben über ihr Ansprechen auf eine Therapie (FRACELLA und RENSING, 1995). HSP27 erhöht zum Beispiel die spezifische Doxorubicin-Resistenz von Brustkrebs-Zelllinien, so dass eine Beeinflussung der HSP27-Expression einen therapeutischen Ansatz darstellen könnte (FUQUA ET AL, 1994). In N0-Mammakarzinomen stellt hohe HSP70-Expression einen unabhängigen prognostischen Marker für kürzeres krankheitsfreies Überleben dar (CIOCCA ET AL, 1993). In Melanomen ist HSP70 sowohl als negativer (RICANIADIS ET AL, 2001) als auch als positiver (KONSTADOULAKIS ET AL, 1998) prognostischer Faktor für den Krankheitsverlauf bezeichnet worden. Nach MORIMOTO (1991) kann HSP72 die transformierenden Eigenschaften des mutierten Onkoprotein p53, dem in der Entstehung nicht-melanozytärer Hauttumore eine wichtige Rolle zugesprochen wird, unterdrücken (siehe Abschnitt 4.2.4). Sowohl HSP72 als auch HSP27 sind anti-apoptotische Eigenschaften in Tumorzellen attestiert worden (JÄÄTTELÄ, 1999).

Gleichzeitig wurde beobachtet, dass eine erhöhte Expression von Stress-Proteinen nach Hyperthermie-Behandlung mit einer verstärkten Oberflächenpräsentation von HSP72 einhergeht und mit einer erhöhten Immunogenität der Tumorzellen korreliert. Diese Beobachtung hat zu zahlreichen Versuchen geführt, mittels Hitzeschockproteinen die körpereigene Abwehr spezifisch auf Krebszellen

auszurichten. Mäuse, die mit Hitzeschockproteinen, die von einem Tumor stammen, geimpft werden, sind anschließend gegen den entsprechenden Tumor resistent (BLACHERE ET AL, 1993). Ähnliche Ergebnisse wurden von SRIVASTAVA (1993), UDONO (1993) und GRANER (2000) referiert. In den letzten Jahren sind Hitzeschockproteine zu einem der vielversprechendsten Ansätze in der Entwicklung von Krebsvakzinen geworden (HIPP ET AL, 2000, SRIVASTAVA und AMATO, 2001). Die Immunogenität der Hitzeschockproteine scheint im wesentlichen auf an sie gebundenen Peptiden zu beruhen, so dass von HSP-Peptid-Komplexen gesprochen wird (WANG ET AL, 2000). Auslösender Mechanismus der Immunantwort bei HSP-unterstützter Vakzination ist eine Aktivierung von CD8-T-Lymphozyten durch HSP70 (CHEN ET AL, 2000).

1.6 HSP 27

Das niedermolekulare HSP27 wurde erstmals 1987 von ARRIGO und WELCH isoliert. Dass es mit zahlreichen anderen beschriebenen Proteinen dieser Größenordnung identisch ist, konnte erst mit der Zeit nachgewiesen werden. So gelang 1991 CIOCCA und LUCQUE der immunologische Beweis, dass es sich bei dem zuvor in Brust- und Endometrium-Krebszellen beschriebenen p29-Östrogen-Rezeptor assoziierten Protein um das Hitze-Schock-Protein 27kD handelt. Nach wie vor sind zahlreiche synonyme Bezeichnungen für dieses Protein üblich¹¹, die zum Teil analoge Entitäten bei verschiedenen Spezies bezeichnen und einen Hinweis auf die vielfältige Funktion von HSP27 in zellulären Abläufen geben. Im menschlichen Genom konnten bisher auf den Chromosomen 3, 9 und X dem HSP27 verwandte Sequenzen bestimmt werden (MCGUIRE ET AL, 1989).

Intrazellulär liegt HSP27 in vier Isoformen zunehmender Phosphorylierung vor. UVB-Bestrahlung führt zur post-translationalen Phosphorylierung und Verlagerung der phosphorylierten Isoformen in den Nukleus und ins paranukleäre Zytoplasma (NOZAKI ET AL, 1996). Diese Assoziation einzelner Isoformen mit spezifischen Zellkompartimenten lässt vermuten, dass das HSP27 mittels dieser Modifikation an seinen zellulären Bestimmungsort dirigiert wird (ISSEROFF ET AL, 1993). Neben seiner Beteiligung an der Hitze-Schock-Antwort werden HSP27 vor

¹¹ zum Beispiel: 24K, 28000, 25kD, L4-L2, p29, 29kD, 25kD, srp27, M_r 24000, HSP28, α -Kristallin

allen Funktionen in Zellwachstum und Differenzierung zugesprochen (CIOCCA, 1993).

Seitdem CIOCCA ET AL 1982 die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen p29 (=HSP27) gelang, ist wiederholt das Expressionsmuster von HSP27 in verschiedenen Neoplasien untersucht worden (KATO ET AL 1992 in intrakraniellen Tumoren, TETU ET AL 1992 in Fibroxanthomen, DELHAYE ET AL 1992 in Leberkarzinomen, KANITAKIS ET AL 1989 und GANDOUR-EDWARDS ET AL 1994 in einzelnen Hauttumoren und einer Übersicht von CIOCCA 1993 zu Mamma-Karzinomen). Kontrovers wird die prognostische Relevanz von HSP27-Expression in Tumoren diskutiert. Festzustehen scheint, dass HSP27 eine wichtige Rolle in epidermaler Differenzierung, Hyperplasie und Entartung spielt, ohne dass seine Funktion in der Pathologie kutaner Neoplasien hinreichend verstanden wäre.

1.7 HSP 32

Bei dem Hitze-Schock-Protein 32 handelt es sich um die induzierbare Form der Hämoxygenase (HO-1), dem zentralen Enzym im Häm-Abbau. Die zweite Isoform dieses Enzyms, HO-2, wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert. Auf molekulargenetischer Ebene ähnelt HO-1 anderen Hitze-Schock-Proteinen insofern, dass sich unter ihren Regulator-Sequenzen im 5'-Ende ein heat shock element (HSE), also eine die Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren HSF1, HSF2 und HSF3 bindende Promotorregion (siehe Abschnitt 1.4), befindet. Die aus vier Intron- und fünf Exon-Abschnitten bestehende Nukleotid-Sequenz der Hämoxygenase-1 wurde 1987 von MULLER ET AL entschlüsselt. Gleichzeitig lieferten SHIBARA ET AL weitere Indizien, dass es sich bei der Hämoxygenase um ein Hitze-Schock-Protein handelt: die HO-1-Induktion durch Hitzeschock beruht auf einem grundlegend anderen Mechanismus als die Induktion durch Häm, was auf eine vom Häm-Katabolismus unabhängige zelluläre Funktion des Proteins hinweist. Der Nachweis, dass das zuvor beschriebene Stress-induzierbare 32kD Protein mit HO-1 identisch ist, gelang 1989 KEYSE und TYRRELL.

Inzwischen ist weitgehend erklärt, wie Hämoxygenase die Aufgaben in sich vereint, einerseits den Blutfarbstoff Häm abzubauen, und andererseits, die Zelle bei oxidativer Belastung zu schützen. Das Enzym wirkt, indem es die Spaltung von Häm-Molekülen zu Eisen, Kohlenmonoxid und Biliverdin unter NADPH-Reduktion katalysiert (MAINES, 1988). Aus der Eisenfreisetzung kann zwischenzeitlich eine erhöhte Anfälligkeit für oxidativen Stress resultieren (KVAM

ET AL, 2000). Gleichzeitig wird das äußerst oxidant wirkende Häm in seine antioxidanten Metaboliten Bilirubin und Biliverdin überführt. Bei den begrenzten Häm-Beständen in den meisten Zellen dürften letztere aber kaum in ausreichender Menge entstehen, um oxidative Reaktionen in der Zelle wirkungsvoll zu blockieren. In einem Hemmversuch mit Desferoxamin konnten VILE ET AL 1994 zeigen, dass die membranprotektiven Mechanismen humaner Fibroblasten nach Zellstress an die Anwesenheit von freiem Eisen gebunden sind, wie es von Häm-Oxygenase aus Häm freigesetzt wird. Bereits 1993 hatten VILE und TYRRELL beobachtet, dass der Eisenanstieg eine erhöhte Ferritin-Synthese induziert, die die Zelle langfristig gegen oxidative Belastungen resistenter macht.

Im Laufe der Zeit sind vielfältige Induktoren von HO-1 identifiziert worden, wobei die oxidativen Stressoren eine wichtige Gruppe darstellen. 1987 zeigten KEYSE und TYRRELL, dass UVA-Strahlen, Wasserstoffperoxid und Natrium-Arsenit die HO-1-Expression in humanen Fibroblasten erhöhen, während Hitze-Schock-Behandlung keine Wirkung hatte. In kultivierten Kardiomyozyten erhöht neben H_2O_2 auch Hypoxie die Bildung von HSP32-mRNA (BORGER und ESSIG, 1998). Zu den physiologischen HO-1 Induktoren zählen Interleukin 1α und der Tumornekrosefaktor TNF- α (TERRY ET AL, 1998).

Die Erhöhung der HO-1-Expression in kultivierten menschlichen Fibroblasten geschieht hauptsächlich durch Aktivierung der Transkription, während die mRNA-Stabilität unbeeinflusst bleibt (KEYSE ET AL, 1990). BAUER ET AL fanden 1998 in nicht-parenchymatösen Leberzellen allerdings Hinweise auf eine post-transkriptionale Kontrolle der HO-1-Expression. Diese beiden Befunde lassen sich einerseits durch die Möglichkeit mehrerer hintereinander geschalteter Regulationsmechanismen erklären, andererseits postulierten TERRY ET AL 1998, dass abhängig von Zelltyp und Agens verschiedene Mechanismen der HO-1-Induktion existieren. LAVROVSKY ET AL gelang 1994 die Identifikation von Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren NFkB und AP-2 in der Promotor-Region des HO-1-Genes. Die Induktion der HO-1-Transkription wird über den cAMP-Signaltransduktionsweg vermittelt (IMMENSCHUH ET AL, 1998).

1.8 Die HSP 70-Familie

Bei dieser großen funktionell zusammenhängenden Gruppe handelt es sich um die am besten untersuchten Hitze-Schock-Proteine. Sie treten ubiquitär auf und ihre Funktion als molekulare Chaperone ist umfassend beschrieben. Sie binden hydro-

phobe Proteinanteile und ermöglichen dadurch die Aufrechterhaltung einer korrekten Faltung. Denaturierte Proteine führen sie der lysosomalen Degradation zu. Auch der transmembranäre Transport von Proteinen, der zum Teil deren Entfaltung und Rekonfiguration erfordert, fällt in ihren Aufgabenbereich (nach FRACELLA und RENSING, 1995).

In eukaryontischen Zellen sind HSP72 und HSP73 sowie die Glucose-regulierten Proteine GRP75 und GRP78 die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe, ihnen entspricht das prokaryontische Hitze-Schock-Protein DnaK. Im menschlichen Genom wurden wenigsten zehn HSP70-codierende Gene gefunden, die auf die Chromosomen 1,5,6,14 und 21 verteilt sind (MUES ET AL, 1986; GÜNTHER ET AL, 1994). Die Makro-Struktur des HSP70 setzt sich aus drei Teilen zusammen: eine hochkonservierte, ATP-bindende Domäne (a) am N-terminalen Ende, die über einen Protease-sensitiven Abschnitt (b) mit der variableren Domäne (c) am Carboxyl-Ende verbunden den ist.

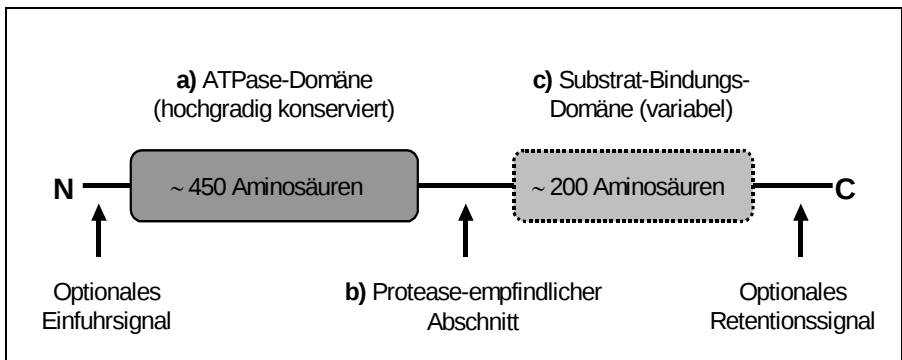


Abbildung 2: Die Struktur der HSP70-Moleküle (nach FEIGE und POLLA, 1994)

Der ATP-bindende und -spaltende Bereich ist in allen Vertretern dieser Gruppe nachweisbar (nach FRACELLA und RENSING, 1995). Das HSP70-Molekül liegt nativ als Dimer vor, bildet in der Zelle jedoch oligomere Komplexe. Sein Bindungsverhalten deutet auf eine hydrophobe Nische an der Moleküloberfläche hin (nach SCHLESINGER, 1990). HSP70 gehören zu den wichtigsten Hitze-induzierbaren Proteinen, ihre Expression wird außerdem durch die Phasen des

Zellzyklus reguliert (MILARSKI und MORIMOTO, 1986). Ursprünglich hielt man HSP72 für einen Vertreter dieser Gruppe, der ausschließlich nach Hitzeschock gebildet wird. Inzwischen ist bekannt, dass es in einigen Tumorzelllinien und in Keratinozyten auch konstitutiv vorkommt (TRAUTINGER ET AL, 1993). Nach Hitzestress akkumuliert es im Zellkern, es scheint also für den Schutz nukleärer Strukturen nach Stress eine Rolle zu spielen (EDWARDS ET AL, 1991). HSP73, auch als HSC70 bezeichnet, wird generell nur konstitutiv, und das vor allem in wachsenden Zellen gebildet. Zwischen den Aminosäure-Sequenzen von HSP72 und HSP73 besteht große Homologie (nach MACARIO, 1994).

Die Tatsache, dass den HSP70 unterschiedliche Signalsequenzen vorgeschaltet sind, zeigt, dass HSP70 auch in anderen Situationen als Hitzeschock synthetisiert wird. Die Induktion von HSP70 geschieht auf der Ebene der Transkription (MAYTIN, 1992). YOUNG postulierte 1990, dass der zelluläre HSP70-Gehalt einem Autoregulationsmechanismus unterliegt, d.h. die Zelle titriert die HSP70-Expression relativ zum Ausmaß der Stressexposition. Physiologisch werden HSP70 auch in der frühen S-Phase im Zellzyklus aktiviert (SCHLESINGER, 1990). Tabelle 1 fasst die Konditionen, die zu einer HSP70-Induktion führen, zusammen.

Umweltbedingungen	Pathophysiologie	Physiologie
Hyperthermie	Fieber	Zellzyklus
Aminosäure-Analoga	Hypertrophie	Wachstumsfaktoren
Inhibitoren des Energiestoffwechsels	Hypoxie	Entwicklung und Differenzierung
Schwermetalle	Entzündungen	Onkogene u. Proto-Onkogene
Zytostatika	Ischämie, Reperfusion	Onkogene
	pH-Entgleisungen	
	virale Infektionen	

Tabelle 1: Übersicht über Konditionen, die die Transkription von HSP70-Genen induzieren (nach MORIMOTO, 1991)

Etwas detailliertere Ergebnisse hinsichtlich der Regulation von HSP70 liegen in einer Studie von HANG und FOX (1996) vor. Sie untersuchten verschiedene Säugtier-Zelllinien und fanden eine große Variation zwischen den einzelnen Zelltypen.

Sie folgerten, dass es keine universale Hitze-Schock-Antwort gäbe und diesbezügliche Beobachtungen jeweils nur für den untersuchten Zelltyp gültig sind.

Über die Bedeutung von Mitgliedern der HSP70-Familie für verschiedene Krankheitsprozesse liegen zahlreiche Vermutungen und Forschungsansätze vor. Sie werden z.B. für wirksame Antigene bei bakteriellen und viralen Infektionen gehalten (nach FRACELLA und RENSING, 1995). MORIMOTO, der sich intensiv mit ihrer Funktion als Chaperone beschäftigte, vermutet, dass eine Störung der ausgewogenen Interaktion von HSP70 mit neu-synthetisierten oder beschädigten Proteinen Zellwachstum, -differenzierung und -tod beeinflussen kann (1991).

Verschiedene Untersuchungen zu HSP70 und Karzinomen fußen in der Annahme CIOCCAS (1993), dass Hitze-Schock-Proteine ein Indikator für das Ausmaß des Zellstress von Tumorzellen und damit von prognostischer Relevanz sein könnten. Gezeigt werden konnte zum Beispiel, dass die HSP70-Expression in Pankreaskarzinomen erhöht ist (GRESS ET AL, 1994) und mit dem klinischen Stadium maligner Melanome korreliert (LAZARIS ET AL, 1995). Ferner ist bekannt, dass der HSP70-Level in N0-Mammakarzinomen einen unabhängigen Vorhersagewert für kürzeres metastasen-freies Überleben darstellt (CIOCCA ET AL, 1993).

1.9 Metallothionein

Das Metallo-Protein Metallothionein wurde erstmals 1960 von KÄGI und VALLEE in den Zellen der Nierenrinde von Pferden beschrieben. Inzwischen ist bekannt, dass es unter Wirbeltieren und Wirbellosen, Pflanzen, eukaryontischen Mikroorganismen und einigen Prokaryonten weit verbreitet ist. Es hat ein Molekulargewicht zwischen 6 und 7 kDa und besteht aus 61 Aminosäuren. Auffallend sind die quantitative Dominanz von Zystein¹² und das Fehlen jeglicher aromatischer Aminosäuren. Mittels der Zysteine kann das Metallothionein-Molekül bis zu sieben zweiwertige Metall-Ionen in Thiolbindung halten (KOJIMA ET AL, 1976). Beim Menschen wie bei den meisten Wirbeltieren kommt Metallothionein in den beiden Isoformen MT-1 und MT-2 vor, die von unterschiedlichen Cistronen¹³ kodiert werden (nach NORDBERG, 1986). Das relative Verhältnis

¹² 20 der insgesamt 61 Aminosäuren sind Zystein

¹³ DNA-Abschnitt, der ein einzelnes Genprodukt determiniert

dieser beiden Isoformen zueinander variiert mit Spezies, Gewebetyp und Entwicklungsstadium (nach WEBB und CAIN, 1982).

Obwohl viele Wirkungsbereiche von Metallothioneinen beschrieben worden sind, war ihre Funktion auch drei Jahrzehnte nach ihrer Entdeckung noch nicht zufriedenstellend geklärt (KÄGI, 1991). 1982 sprachen BRADY ET AL ihnen eine zentrale Rolle im Zink- und Kupfer-Haushalt zu. WEBB und CAIN konnten im gleichen Jahr zeigen, dass der Zink-Metabolismus durch die Synthese intestinalen und hepatischen Metallothioneins reguliert wird. Außerdem kommt Metallothionein eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Schwermetallen zu (DURNAM und PALMITER, 1981) und es fungiert als Radikalfänger (THORNALLEY und VASAK, 1985). Seine Expression ist durch Schwermetalle, Glukokortikoide, Interferon, Polypeptid-Hormone und Entzündungsmediatoren induzierbar (KAJI ET AL, 1993). ALAM und SMITH konnten 1992 zeigen, dass Häm-Hämopexin neben Hämoxxygenase-1-Induktion auch eine gesteigerte Metallothionein-mRNA-Synthese bewirkt. Ein weiterer effektiver MT-Induktor ist Oleanonsäure, die in China zur Behandlung der Hepatitis eingesetzt wird. Eine Oleanonsäure-Vorbehandlung führt bei Mäusen zu einem wirksamen Schutz vor Cadmium-bedingter Lebertoxizität (LIU ET AL, 1993). Gleiches beobachteten KREPPPEL ET AL (1994) bei Induktion von hepatischem Metallothionein durch Zink und anschließender Arsenit-Behandlung. Da es letzteren jedoch nicht gelang, eine Korrelation zwischen Metallothioneinmenge und Überleben zu demonstrieren, folgerten sie, dass die erhöhte Toxizitätstoleranz nicht auf MT-Induktion beruhen könne. Zumindest scheinen die daran beteiligten Mechanismen komplexer Natur und noch nicht hinreichend verstanden zu sein.

1.10 Hitze-Schock-Proteine in der Haut

Da die Haut eine große Kontaktfläche des Organismus mit seiner Umwelt und zahlreichen Noxen darstellt, sind zelluläre Verteidigungsmechanismen, die sie gegen Schädigungen durch Hitze und UV-Licht schützen, ein Gebiet von besonderem Interesse (nach MAYTIN, 1992). Dass Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle in dermalen Biologie und Pathologie spielen, lässt sich nicht zuletzt aus ihrer Funktion als molekulare Chaperone herleiten. Eine korrekte Proteinfaltung und -prozessierung ist unter anderem für die Kollagen-Synthese von Bedeutung, die bei verschiedenen Hauterkrankungen, wie z.B. der aktinischen Keratose, gestört sein kann.

Trotzdem ist dem Thema *Hitzeschockproteine in der Haut* lange verhältnismäßig wenig Aufmerksamkeit gewidmet worden. Von 6.900 Artikeln zum Thema Hitzeschock, Stressproteine und Thermotoleranz, die bis 1994 in den Katalog der *National Library of Medicine* Eingang fanden, behandeln weniger als hundert spezifisch Haut oder Hautzellen (nach MAYTIN, 1995). Einige frühe Studien (z.B. KEYSE und TYRRELL, 1987) zur HSP-Expression verwendeten allerdings bereits dermale Fibroblasten als Untersuchungsobjekt, und im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass sie HSP72 konstitutiv exprimieren und dass UV-Bestrahlung, Hitze und Cadmium zu einer verstärkten Induktion führen (SUZUKI und WATANABE, 1992; EDWARD ET AL, 1991). Auch in menschlichen Keratinozyten ist sowohl die konstitutive Expression von HSP72 als auch seine Induzierbarkeit durch Hitzeschock, UVB- und UVC-Strahlung und Noxen wie Na^+ -Arsenit in zahlreichen Studien gezeigt worden (TRAUTINGER ET AL, 1993; MAYTIN ET AL, 1990; EDWARDS ET AL, 1991; GARMYN ET AL, 1991; MURAMATSU ET AL, 1992). Die Expression einiger Hitzeschockproteine in Haut wurde 1995 von MAYTIN sowie von CHARVERON ET AL revidiert. Zu HSP27, 72 und 73 in menschlicher Epidermis liegen einige Studien vor, wobei epidermale Tumore hierin nur zum Teil und in sehr geringer Fallzahl berücksichtigt wurden. Zur HSP32- und Metallothionein-Expression der Haut liegen bisher meines Wissens keine ausführlichen Untersuchungen vor.

1.11 Fragestellung dieser Arbeit

In einem Übersichtsartikel von 1994 entwickelt MACARIO für die nächste Dekade der HSP-Forschung folgende Perspektiven: „Das Potential von Hitzeschockproteinen als diagnostische Marker, prognostische Indikatoren und therapeutische Ansatzpunkte wird klarer werden und dementsprechend genutzt werden können.“ und „Man wird lernen, wann und auf welchem Wege die Stressantwort und -proteine beeinflusst werden können, um Krankheiten, an denen diese beteiligt sind, zu heilen.“ Intention dieser Arbeit ist es, den genannten Zielen dadurch näher zu kommen, dass neue Erkenntnisse über die untersuchten Tumorklassen einerseits sowie über Hitzeschockproteine und ihre Bedeutung für Physiologie und Pathophysiologie keratinozytärer Differenzierung andererseits gewonnen werden.

Für viele Tumorklassen ist inzwischen eine veränderte Hitzeschockprotein-Expression beschrieben worden, ohne dass diese Beobachtungen erklären können, ob es sich hierbei um einen kausalen oder koinzidentiellen Zusammenhang mit der Karzinogenese handelt (JOLLY und MORIMOTO, 2000). Wie bereits im vorigen

Abschnitt beleuchtet, wurden vor 1994 Hitzeschockproteine in Haut oder Hautzellen kaum untersucht. Viele Fragen zu ihrer Rolle in Proliferation, Differenzierung, UV-bedingter Hautalterung, bei Verletzungen, Infektionen und Onkogenese der Haut sind unbeantwortet (nach MAYTIN, 1995). Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die die Stressgen-Expression in entarteten Zellen verändern, kann neue Erkenntnisse über frühe Abläufe in der Transkriptionskontrolle normaler Zellen liefern (MORIMOTO, 1991). ECKERT postulierte 1989, dass die Herausforderung des folgenden Jahrzehntes darin bestünde, den Mechanismus der Wachstumsregulation und Differenzierung von Keratinozyten im Detail zu verstehen. Mit dieser Studie versuchen wir genau diesen Berührungspunkt von physiologischer und pathologischer Reifung menschlicher Haut und der Expression von Hitzeschockproteinen näher zu beleuchten.

Die Gründe, Metallothionein in die Betrachtungen dieser Studie mit einzubeziehen, sind seine den Hitze-Schock-Proteinen gemeinsamen Eigenschaften der frühzeitigen evolutionären Entstehung und der Induzierbarkeit durch eine Vielzahl von Agentien und Stresskonditionen. Zum anderen räumten ihm HASHIBA ET AL (1989) neben seiner Funktionen im Metallstoffwechsel eine Rolle in Zellwachstumsprozessen ein und vermuteten eine Korrelation zwischen MT-mRNA-Induktion und epidermaler Hyperplasie. Diese Vermutung soll anhand der verschiedenen epidermalen Tumore überprüft werden.

Die immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten ist als Methode gewählt worden, um morphologische Information über die Tumoren zu erhalten und diese auf zellulärer und subzellulärer Ebene mit der HSP-Expression korrelieren zu können. Dies ist besonders wichtig, da der intrazellulären Lokalisation, zum Beispiel der Relokation von HSP27 und HSP72 in den Zellkern im Rahmen der Stressantwort funktionelle Bedeutung zukommt.

Die fünf gewählten Tumorklassen stellen eine Serie keratinozytärer Veränderungen dar, in der sich von den aktinischen Keratosen über die Basaliome zu den Spinaliomen eine Gradierung zunehmender Malignität widerspiegelt. Außerdem finden in der Auswahl dieser Tumoren verschiedene ätiologische Faktoren wie UV-Exposition, Virusinfektion und Hautalterung Berücksichtigung, so dass sich eine breite Datengrundlage zur Beurteilung von Proliferations-, Differenzierungs- und Entartungsprozessen ergibt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Die untersuchten Fälle stammen aus Material, das im Jahr 1994 zur routinemäßigen Befundung im pathologischen Institut der RWTH Aachen eingesandt wurde. Durch Revision der archivierten HE-gefärbten Präparate wurden 79 Fälle aus fünf Diagnosegruppen gestörter keratinozytärer Differenzierung unterschiedlicher Genese und keratinozytärer Entartung ausgewählt. Diese Gruppen sind: aktinische Keratosen, seborrhoische Keratosen, Verrucae vulgares, Basaliome und Plattenepithelkarzinome. Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme beträgt 61,95 Jahre, bei 8 Patienten werden mehrere Gewebeproben betrachtet.

Die Verteilung innerhalb der einzelnen Gruppen ist folgender Tabelle zu entnehmen:

N	Diagnose	Aufteilung	Patientengut
15	aktinische ratosen	Ke- 1 1.Grades 4 2. Grades 2 atrophe 5 hyperplastische 1 multizentrische (2 nicht klassifizierte)	Durchschnittsalter 70,2 ([52-81]) 6 männliche, 9 weibliche
16	Basaliome	5 noduläre 3 sklerodermiforme 3 multizentrische 2 solide 2 metatypische 1 oberflächliches	Durchschnittsalter 65,81 ([43-83]) 10 männliche, 6 weibliche
15	seborrhoische Keratosen	7 akanthotische 4 pigmentierte 3 mechanisch irritierte 1 klonale	Durchschnittsalter 59,53 ([15-81]) 7 männliche, 8 weibliche
13	Spinaliome	3 gut differenzierte 5 mäßig differenzierte 2 wenig differenzierte (3 nicht klassifizierte)	Durchschnittsalter 69,36 ([48-83]) 7 männliche, 4 weibliche, 2 ?
17	Verrucae vulgares		Durchschnittsalter 46,53 ([13-86]) 10 männliche, 7 weibliche

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Tumore

2.2 Gewebepreparation

Unmittelbar nach der Exzision wurden die Präparate in 4%igem, nicht gepuffertem Formalin eingelegt. Nach makroskopischer Befundung und Zuschnitt wurden die einzelnen Gewebelöcke durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration und Xylol-Bad dehydriert und in Paraffin eingebettet. Von diesen Gewebelöcken wurden mehrere Schnitte mit einer Schichtdicke von 4µm angefertigt, auf mit Poly-L-Lysin (0,1%, Sigma Diagnostics, USA, P 8920) beschichtete Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3 Immunhistochemie

Es wurde die indirekte Peroxidasemethode in einer Modifikation nach FELLER und PARWARESCH, 1983, verwandt. Zur Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung wurden die Paraffinschnitte über Nacht bei 37°C inkubiert. Der gesamte Färbeprozess fand bei Raumtemperatur statt.

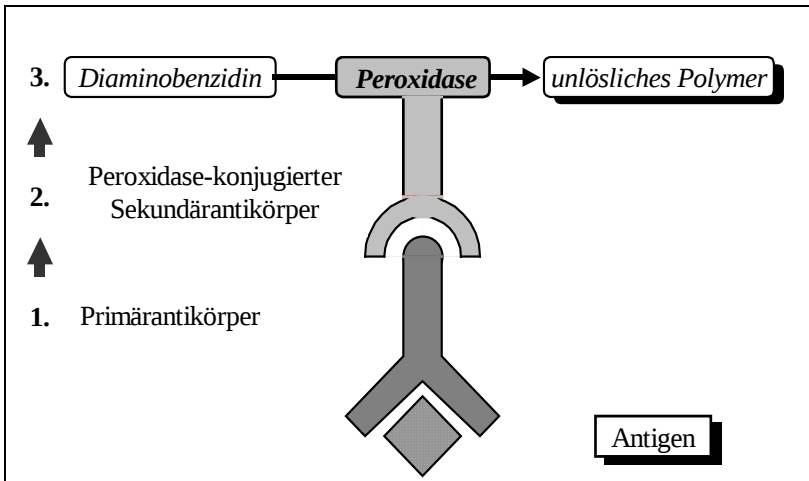


Abbildung 3: schematische Darstellung der indirekten Peroxidasemethode

Die Färbung begann mit Deparaffinierung der Schnitte mittels eines je 15-minütigen Xylol- und Ethanol-Bades. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit 1%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Methanol, um die

endogene erythrozytäre Peroxidase-Aktivität zu hemmen. Dann durchliefen die Präparate eine Reihe Alkoholbäder absteigender Konzentration (96%iges, 70%iges Ethanol und Aqua dest. für je 15 Min.) und wurden anschließend in PBS (phosphatgepufferte Salzsäure, *Seromed*, Biochrom KG, Berlin, L 182-50) gesetzt.

Die Antikörper-Inkubation fand im PBS-gepufferten Milieu einer feuchten Kammer statt. Sämtliche Antikörper wurden mit 1%iger BSA-Lösung (bovines Serum-Albumin in PBS, Aurion) verdünnt. Der Erstantikörper inkubierte 60 Minuten, nach dreifacher Spülung mit PBS wirkte der Zweitantikörper 45 Minuten lang ein. Negativ-Kontrollschnitten wurde anstelle des Erstantikörpers 1%ige BSA-Lösung zugesetzt. Der Überschuss nicht-gebundener Zweitantikörper wurde mit drei PBS-Spülvorgängen entfernt.

Durch 60sekundiges Einwirken von DAB-Lösung (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid, Sigma, D-5905), die zuvor mit 50µl 30%iger H_2O_2 -Lösung aktiviert worden war, wurden die Präparate entwickelt. Da das DAB-Reagenz lichtempfindlich ist, wurde der Arbeitsplatz für diesen Schritt abgedunkelt. Das Chromogensubstrat dieser Lösung wird durch eine peroxidasekatalysierte Reaktion als unlösliches braunes Polymer lichtmikroskopisch sichtbar. Nach 5- bis 10-facher Spülung mit Leitungswasser wurden die Präparate zur Darstellung der Zellkerne 60 Sekunden mit *Mayers Hämalaun* (Merck KGaA Darmstadt, R:22) behandelt und wiederum gründlich mit Leitungswasser gespült. Abschließend fand eine Reihe Alkoholbäder aufsteigender Konzentration (70%iges, 96%iges, 2x 100%iges Ethanol je 4 Minuten) statt, bevor die Präparate mit Xylol getränkt und mit *Vitro-Clud* (R.Langenbrinck, Emmendingen) unter Abdeckgläsern fixiert wurden.

2.4 Antikörper

Primärantikörper			Hersteller, Katalognr.	Titer
Anti-HSP27	monoklonaler Antikörper	Mouse-	StressGen Biotech. Corp., Canada SPA-800, Klon G3.1	1:100
Anti-HSP32	polyklonaler Antikörper	Rabbit-	StressGen Biotech. Corp., Canada SPA-895	1: 50
Anti-HSP70	polyklonaler Antikörper	Rabbit-	Dako Corporation, USA A 500	1:150
Anti-HSP72	monoklonaler Antikörper	Mouse-	StressGen Biotech. Corp., Canada SPA-810, C92F3A-5	1: 25
Anti-HSP73	monoklonaler Antikörper	Rat-	StressGen Biotech. Corp., Canada SPA-815, 1B5	1: 50
Anti-MT	monoklonaler Antikörper	Mouse-	Dako Corporation, USA M639, Klon E9	1: 10

Tabelle 3: verwendete Primärantikörper und Verdünnungen

Sekundärantikörper	Hersteller, Katalognr.	Titer
Goat-anti-Mouse- HRP	Dako, Dänemark P 447	1: 50
Swine-anti-Rabbit-HRP	Dako, Dänemark P 217	1: 50
Rabbit-anti-Rat-HRP	Dako, Dänemark P 0450	1: 50

Tabelle 4: verwendete peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper und Verdünnungen

Die geeigneten Antikörpertiter wurden anhand von Verdünnungsreihen ermittelt. Ziel war dabei, eine möglichst klare und spezifische Anfärbung der antigenen Strukturen bei geringstmöglicher Hintergrundfärbung zu erreichen.

2.5 Lichtmikroskopische Befundung

Die Schnitte wurden bei 400facher Vergrößerung lichtmikroskopisch begutachtet und die Intensität der Anfärbung verschiedener Zellverbände der Läsion sowie basaler und apikaler Zellen der umliegenden Epidermis auf einer dreistufigen Skala beurteilt (negativ, (+) für schwach positiv und + für deutlich positiv). Sofern Blutgefäße, Nervengewebe, Haarbälge oder Drüsen mit angeschnitten waren, wurden auch diese hinsichtlich ihrer Anfärbbarkeit beurteilt.

3 ERGEBNISSE

3.1 normale Haut und Hautanhangsgebilde

Zunächst werden in diesem Kapitel die Expressionsmuster der verschiedenen Hitze-Schock-Proteine in unveränderter Haut dargestellt. Hierzu werden die die Läsionen umgebenden Hautabschnitte verwendet, sofern sie mit angeschnitten sind. In den tabellarischen Übersichten werden basale und apikale Zellschichten getrennt betrachtet. Präparate, in denen nicht genügend unveränderte Haut mit angeschnitten ist, sind jeweils in der Gruppe negativer Expression in apikalen und basalen Zellschichten enthalten. In der Beurteilung wurde gleichmäßige, d.h. homogene Anfärbung einer Gewebeschicht von nur in einzelnden Bereichen auftretender, d.h. fokaler Reaktivität unterschieden.

3.1.1 HSP27

apikale Zell- schichten basale Zellschichten	+	fokal +	(+)	fokal (+)	negativ	Summe
+	1	-	-	-	-	1
fokal +	1	1	-	-	1	3
(+)	18	1	1	-	-	20
fokal (+)	4	1	-	-	-	5
negativ	23	2	3	2	15	45
Summe	47	5	4	2	16	74

Tabelle 5: HSP27-Verteilung in normaler Haut

Die umliegende Epidermis der untersuchten Hauttumoren zeigt ein weitgehend einheitliches HSP27-Expressionsmuster. Bei insgesamt 47 Präparaten sind die apikalen Schichten deutlich anfärbbar, bei neun weiteren Präparaten färben sich diese Schichten zumindest schwach oder stellenweise an. Mit Ausnahme eines Falles, der eine nukleäre HSP27 Expression zeigt, handelt es sich hier um eine zytoplasmatische Anfärbung. Die Intensität der Antikörperreaktion nimmt vom Stratum basale bis ins Stratum granulosum kontinuierlich zu, während das

Stratum corneum in keinem der Präparate anfärbbar ist. Bei dem Großteil der untersuchten Fälle zeigen die basalen Schichten der unveränderten Epidermis keine Immunreaktion, bei 25 Schnitten ist eine schwach positive Reaktion dieser Areale zu verzeichnen. Lediglich drei Schnitte zeigen fokal deutliche Färbung der basalen Zellschichten.

Im Stroma der Dermis lässt sich keine Antigenität für HSP27 nachweisen, bei den Hautanhangsgebilden sind jedoch zahlreiche Immunreaktionen zu beobachten. Im Bereich der Talg- und Schweißdrüsen, Blutgefäße, Haarwurzeln, Skelettmuskulatur und Nervenscheiden kann in mehreren Präparaten Antikörperreaktivität nachgewiesen werden, wobei sich besonders die Ausführungsgänge der ekkrinen Drüsen hervorheben (siehe Abb. 2).

3.1.2 HSP32

apikale Zellschichten basale Zellschichten	+	fokal +	(+)	fokal (+)	negativ	Summe
+	4	-	1	-	-	5
fokal +	-	-	-	-	-	0
(+)	13	-	2	-	-	15
fokal (+)	-	-	-	3	-	3
negativ	8	4	12	2	19	45
Summe	25	4	15	5	19	68

Tabelle 6: HSP32-Verteilung in normaler Haut

Für das Hämoxygenase-I-Antigen fällt die Färbereaktion insgesamt schwächer als für HSP27 aus, wobei auch hier die apikalen Epidermischichten häufiger und deutlicher positiv sind (29 Fälle +, 20 Fälle (+)). Auffällig ist die häufig ausgeprägte Reaktivität des Stratum corneum, bei vier Präparaten färben sich ausschließlich die Hornlamellen an. Nur fünf Präparate zeigen in basalen Zellschichten deutliche Immunogenität, bei achtzehn ist eine schwache Reaktion dieser Areale nachweisbar. Die Zahl der Fälle mit zumindest schwacher HSP32-Expression, bei denen

kein wesentlicher Unterschied in der Antigenmuster zwischen basalen und apikalen Zellschichten besteht, beträgt neun.

Sowohl im umgebenden Bindegewebe als auch bei den Hautanhangsgebilden sind zahlreiche Strukturen immunogen. Im Stroma besteht in sieben Fällen ein deutlich positiver Befund, der sich dreimal auffallend auf die Fibroblasten und einmal auf die unmittelbare Umgebung des Tumorherds bezieht. Die Talg- und Schweißdrüsen zeigen in sieben Fällen deutliche, in drei Fällen schwache Anfärbbarkeit. Nervenzellen, glatte Muskeln und Skelettmuskulatur zeigen ebenfalls mehrfach deutlich positive Reaktion, in einem Präparat sind Entzündungszellen deutlich gefärbt.

3.1.3 HSP70

apikale Zellschichten basale Zellschichten	+	fokal +	(+)	fokal (+)	negativ	Summe
+	1	-	-	-	-	1
fokal +	-	2	-	-	-	2
(+)	2	-	3	-	1	6
fokal (+)	-	-	-	1	-	1
negativ	8	1	11	1	40	61
Summe	11	3	14	2	41	71

Tabelle 7: HSP70-Verteilung in normaler Haut

Die Anfärbbarkeit mit dem HSP70 Antikörper ist insgesamt eher schwach. Vierzehn Präparate zeigen eine deutliche, sechzehn eine schwache Immunreaktion der apikalen Epidermisschichten, wobei es sich jeweils zum Teil um fokal begrenzte Befunde handelt. Im Bereich des Stratum corneum zeigte sich nur geringe Anfärbbarkeit.

Eine Reaktion der basalen Schichten liegt nur bei zehn Schnitten vor, bei sieben von diesen handelt es sich um eine schwache Reaktion. In sieben Fällen zeigen sich keine deutlichen Unterschiede in der spezifischen Reaktion unterschiedlich differenzierter

Epidermisschichten, das heißt, die Reaktion ist insgesamt unregelmäßig, fokal begrenzt oder schwach.

Auch die Reaktivität der Hautanhangsgebilde und des umgebenden Bindegewebes ist selten und oftmals schwach. In acht Fällen zeigen die Drüsen eine Immunreaktion, zweimal liefert Skelettmuskulatur einen deutlich positiven Befund, je einmal reagieren Gefäße und ein Haarfollikel mit dem HSP70 Antikörper. In den beiden Fällen mit einer Reaktion im dermalen Stroma handelt es sich um einen fokal begrenzten oder schwachen Befund.

3.1.4 HSP72

apikale Zellschichten basale Zellschichten	+	fokal +	(+)	fokal (+)	negativ	Summe
+	1	-	-	-	-	1
fokal +	-	1	-	-	-	1
(+)	14	-	6	-	-	20
fokal (+)	-	-	-	1	-	1
negativ	13	-	18	-	25	56
Summe	28	1	24	1	25	79

Tabelle 8: HSP72-Verteilung in normaler Haut

Die Färbung mit dem HSP72 Antikörper erbringt für die unveränderte Epidermis wenig spezifische Ergebnisse. Wie bei den vorhergehenden Antikörpern überwiegt die Immunreaktion in den apikalen Zellschichten, in 29 Fällen ist sie deutlich, bei weiteren 25 schwach ausgeprägt. Deutlich zeigt sich hier die Immunogenität der Hornlamellen, mit positivem Befund in 15 dieser Präparate.

In den Schnitten, in denen eine Reaktion der basalen Zellschichten vorliegt, bleibt diese in der Regel hinter der Reaktivität in höher gelegenen Schichten zurück. Bei neun Präparaten liegt eine diffuse oder unregelmäßige Reaktion vor, die keine Epidermisschicht spezifisch bevorzugt.

Am deutlichsten zeigt sich bei den Hautanhangsgebilden die Immunogenität der Talg- und Schweißdrüsen mit insgesamt 16 positiven Befunden. Für Nervenzellen und Gefäßmuskulatur können einzelne positive Befunde erhoben werden. Die Stromareaktion ist eher schwach, in drei Fällen liegt spezifische Immunreaktivität einzelner Fibroblasten vor.

3.1.5 HSP73

apikale Zellschichten basale Zellschichten	+	fokal +	(+)	fokal (+)	negativ	Summe
+	-	-	-	-	-	0
fokal +	1	4	-	-	1	6
(+)	9	-	-	-	1	10
fokal (+)	-	-	-	-	1	1
negativ	23	1	2	-	30	56
Summe	33	5	2	0	33	73

Tabelle 9: HSP73-Verteilung in normaler Haut

Bei der HSP73 Färbung fällt besonders die häufig scharfe Grenze zwischen deutlich positiven Zellverbänden ab dem Stratum spinosum und dem negativen Stratum basale auf. Dieses spezifische Expressionsmuster zeigt sich in 36 Schnitten, in drei dieser Fälle ist die apikale Reaktion allerdings nur schwach oder auf einzelne Abschnitte begrenzt. Bei 10 weiteren Präparaten liegt zusätzlich zur apikalen Reaktion eine schwache oder fokal begrenzte Anfärbung des Stratum basale vor. In acht Fällen sind die Hornlamellen positiv, in drei Fällen zeigt sich ausschließlich eine schwache oder partielle Reaktion des Stratum basale. In vier Präparaten reagieren die apikalen und basalen Zellverbände unspezifisch. Es handelt sich immer um eine zytoplasmatische Expression des HSP73-Antigens.

Bei der HSP73 Färbung zeigen sich in vielen Präparaten deutliche Reaktionen der Schweiß- und Talgdrüsen, außerdem positive Befunde für Skelett- und Gefäßmuskulatur sowie Entzündungszellen. Bei

insgesamt 19 Präparaten kann im dermalen Bindegewebe eine Reaktion mit dem HSP73-Antikörper nachgewiesen werden. Sie ist in 18 Fällen deutlich ausgeprägt und beschränkt sich häufig auf einzelne Fibroblasten oder Fibroblastengruppen, zum Teil fällt die besonders deutliche Bindegewebsreaktion in unmittelbarer Nähe zur Tumorinvasion auf.

3.1.6 Metallothionein

Der Metallothionein-Antikörper zeigt in der unveränderter Epidermis ein spezifisches Färbemuster. In 42 Schnitten reagieren die basalen Zellschichten, davon in 17 Fällen deutlich, in sieben Fällen schwach und in achtzehn Fällen fokal begrenzt. In einigen dieser Präparate zeigt sich die Immunreaktion speziell in den basalen Nuklei. Die apikalen Epidermischichten bleiben bis auf sechs Fälle ausgespart, wobei sich in drei dieser Präparate auch eine Anfärbung der basalen Schichten findet. Auch in dieser Gruppen fällt in zwei Schnitten die besondere Anfärbung nukleärer Strukturen auf.

apikale Zellschichten basale Zellschichten						Summe
	+	fokal +	(+)	fokal (+)	negativ	
+	-	-	-	-	17	17
fokal +	-	1	-	-	12	13
(+)	-	-	2	-	5	7
fokal (+)	-	-	-	-	5	5
negativ	2	-	1	-	25	28
Summe	2	1	3	0	64	70

Tabelle 10: Metallothionein-Verteilung in normaler Haut

Im umliegenden Bindegewebe beobachten wir 13 größtenteils deutliche Reaktionen, die sich z.T. speziell auf die Fibroblasten beziehen. Außerdem sind in sechs Präparaten immunogene Makrophagen oder andere Entzündungszellen zu sehen. Für die Hautanhangsgebilde finden sich zahlreiche positive Befunde. So reagieren in zehn Fällen die Drüsen und in sieben Fällen Haarbälge mit dem Metallothionein-Antikörper.

3.2 aktinische Keratosen

3.2.1 HSP27

Bei der HSP27-Färbung aktinischer Keratosen (siehe Tabelle 13) zeigt sich eine deutliche Abweichung vom Expressionsmuster unveränderter Epidermis. In zehn der dreizehn untersuchten Fälle ist die Reaktivität als fokal begrenzt oder unregelmäßig zu bezeichnen (siehe Abbildung 5).

Auch die vorwiegende Anfärbung apikaler Epidermisschichten ist weniger ausgeprägt, bei sieben der dreizehn Fälle bestehen keine spezifischen Unterschiede in der Anfärbbarkeit einzelner Schichten, z.T. finden sich isoliert liegende, deutlich positive Zellen (siehe Abbildung 6)

In drei Fällen ist eine partielle Reaktion des Stratum basale zu beobachten.

3.2.2 HSP32

Bei den aktinischen Keratosen fällt die HSP32-Färbung schwach aus, von den zehn untersuchten Präparaten sind fünf negativ und vier zeigen nur eine schwache Reaktion, die zweimal fokal und einmal auf die apikalen Schichten begrenzt ist (siehe Tabelle 13). Lediglich in einem Fall beobachten wir fokal starke Anfärbbarkeit apikal gelegener Zellverbände, wie sie in unveränderter Haut für diesen Antikörper charakteristisch ist.

3.2.3 Metallothionein

Das spezifische Metallothionein-Expressionsmuster unveränderter Epidermis mit deutlicher isolierter Anfärbung des Stratum basale spiegelt sich bei den aktinischen Keratosen nicht wider. Elf der dreizehn Fälle zeigen keine wesentliche Antikörperreaktion, bei den beiden positiven Ergebnissen ist keine Relation der Reaktivität zum Differenzierungsgrad der Keratinozyten ersichtlich. (Siehe Tabelle 13 und Abbildung 6)

3.2.4 HSP70

Die bevorzugte Anfärbbarkeit apikaler Schichten, wie sie sich in der HSP70-Färbung unveränderter Epidermis zeigt, lässt sich bei den untersuchten aktinischen Keratosen nicht wiederfinden. Alle dreizehn Präparate sind negativ. (siehe Tabelle 14)

3.2.5 HSP72

Auch dem HSP72 Antikörper gegenüber zeigen sich die aktinischen Keratosen weniger reaktiv als normale Haut. Nur bei vier der zwölf untersuchten Fälle können wir eine Reaktion beobachten, bei nur einem kann sie als deutlich bezeichnet werden. Bei zwei dieser Präparate zeigt sich die Bevorzugung apikaler Epidermisschichten, wie wir sie typischerweise in unveränderter Haut sehen. (siehe Tabelle 14)

3.2.6 HSP73

Das HSP73 Expressionsmuster ist in den untersuchten aktinischen Keratosen weniger spezifisch als in unveränderter Epidermis (siehe Tabelle 14). Nur drei der zwölf vorliegenden Fälle zeigen eine ausgeprägte Anfärbbarkeit apikaler Zellverbände (siehe Abbildung 7), bei fünf Präparaten ist das Reaktionsmuster unregelmäßig oder fleckig (siehe Abbildung 8).

3.3 seborrhoische Keratosen

3.3.1 HSP27

Das Ergebnis der HSP27 Färbung seborrhoischer Keratosen ist wenig einheitlich. Bei fünf der dreizehn untersuchten Präparate ähnelt die Reaktion dem Expressionsmuster, das wir in unveränderter Haut beobachten, das heißt eine relativ deutlichere Anfärbbarkeit apikaler Bereiche sowie der Verhornungszone (siehe Abbildung 9). In zwei Fällen ist nur das Stratum corneum positiv. In vier Präparaten ist die Färbereaktion im Tumor unregelmäßig oder fokal akzentuiert. Bemerkenswert ist die starke Reaktion, die wir im Randbereich eines entzündeten Exemplars beobachten. (siehe Tabelle 15)

3.3.2 HSP32

Die Reaktivität seborrhoischer Keratosen mit dem HSP32 Antikörper ist im Vergleich zu unveränderter Epidermis in allen Schichten herabgesetzt. Bei zwölf beurteilten Präparaten zeigt sich nur in zwei eine Reaktion, die als deutlich zu bewerten ist (einmal basal, einmal im Stratum corneum). Vorherrschend ist das Bild diffuser oder fokaler schwacher Positivität, nur bei zwei Schnitten findet sich die für diesen Antikörper typische Bevorzugung apikaler Epidermisschichten. (siehe Tabelle 15)

3.3.3 Metallothionein

Die untersuchten seborrhoischen Keratosen reagieren nur zu einem geringen Teil mit dem Metallothionein-Antikörper, neun von vierzehn Präparaten sind immunonegativ. Die in unveränderter Epidermis beobachtete spezifische Expression dieses Antigens in den basalen Schichten zeigt sich nur in einem einzigen Präparat, in drei anderen Fällen liegt eine diffuse oder fokale Färbung des Tumors vor (siehe Abbildung 10). In einem Fall beschränkte sich die Immunreaktion auf das Stratum spinosum. (siehe Tabelle 15)

3.3.4 HSP70

Von den vierzehn untersuchten seborrhoischen Keratosen zeigen nur fünf eine Immunreaktion mit dem HSP70-Antikörper. Bei zwei von ihnen handelt es sich um einen deutlich positiven Befund, der einmal fokal begrenzt ist. Bei den drei Präparaten mit schwacher Färbung beschränkt sich die Reaktion in zwei Fällen auf die apikalen Epidermisschichten. Dieses Expressionsmuster unterscheidet sich nicht wesentlich von dem in unveränderter Haut beobachteten. (siehe Tabelle 16)

3.3.5 HSP72

Bei drei Präparaten der HSP72 Untersuchung zeigt sich eine deutliche Färbung, zweimal in apikalen Zellschichten, einmal sind die Keratinlamellen positiv. Häufig ist der Befund einer schwachen Reaktivität der apikalen Epidermis, der sich bei fünf der vierzehn untersuchten Schnitte zeigt. In fünf anderen Präparaten ist das Färbeverhalten so diffus oder

unspezifisch verteilt, dass sie sich keinem eindeutigen Expressionsmuster zuteilen lassen. (siehe Tabelle 16)

3.3.6 HSP73

Acht der untersuchten seborrhoischen Keratosen zeigen dem HSP73 Antikörper gegenüber ein Reaktionsmuster, das weitgehend dem unveränderter Epidermis entspricht (apikal deutlich positiv, keine bzw. schwache Reaktion der basalen Schichten, siehe Abbildung 16). In fünf Präparaten fällt die fleckige Verteilung oder fokale Häufung des Antigens auf (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13) (siehe Tabelle 16)

3.4 Verrucae vulgares

3.4.1 HSP27

Bei den 14 gefärbten Verrucae vulgares spiegelt sich weitgehend die HSP27 Expression unveränderter Epidermis wider. Nur ein einziger Fall zeigt keine Reaktivität, bei alle anderen Präparaten erschien in den apikalen Schichten eine deutlich stärkere Färbeintensität als in den basalen Bereichen. (siehe Tabelle 17)

3.4.2 HSP32

Auch bei der HSP32 Färbung der Verrucae vulgares bleibt die höhere Reaktivität apikaler Schichten, die in normaler Haut zu beobachten war, weitgehend erhalten. Neun der vierzehn untersuchten Schnitte zeigen ein entsprechendes Expressionsmuster, in einem sind alle Schichten gleichermaßen positiv, vier Fälle liefern einen negativen Befund. (siehe Tabelle 17)

3.4.3 Metallothionein

In der Metallothionein Färbung ist ausschließlich Reaktivität in basalen Zellschichten zu beobachten (Abb. 8/27-23295), zehn von den siebzehn untersuchten Präparaten zeigen überhaupt keine Anfärbbarkeit. In fünf Fällen handelt es sich um eine fokale Expression (siehe Abbildung 14), bei einem Exemplar liegt nur ein schwach positiver Befund vor. Damit unterscheiden sich die Verrucae vulgares auch in ihrem Verhalten

diesem Antikörper gegenüber nicht wesentlich von unveränderter Epidermis. (siehe Tabelle 17)

3.4.4 HSP70

Die Reaktion dieser Tumorgruppe mit dem HSP70 Antikörper ist fast ausschließlich schwach ausgeprägt, neun von siebzehn Schnitten bleiben insgesamt negativ. In den immunpositiven Präparaten zeigen sechsmal die apikalen Schichten Reaktivität (siehe Abbildung 15), in zwei Fällen verteilt sich die Farbreaktion über den gesamten Tumor. (siehe Tabelle 18)

3.4.5 HSP72

Bei der HSP72 Färbung zeigt sich häufig eine stärkere Anfärbbarkeit der apikalen Tumorbereiche, bei acht von siebzehn Präparaten ist ein solches Expressionsmuster zu beobachten. Insgesamt sind sechzehn Tumore schwach positiv. (siehe Tabelle 18)

3.4.6 HSP73

Alle sechzehn Verrucae vulgares reagieren mit dem HSP73 Antikörper, bei dreizehn Präparaten ist die Reaktion deutlich. In neun Fällen zeigen die apikalen Schichten eine intensivere Färbung, in vier Fällen handelt es sich um eine unregelmäßige Antigenexpression. Bei jeweils drei Verrucae war eine netzartige oder einzellige Verteilung der Reaktivität zu beobachten. (siehe Tabelle 18)

3.5 Basaliome

3.5.1 HSP27

Zehn der achtzehn untersuchten Basaliome zeigen bei der HSP27 eine deutliche Reaktion, die sich in je einem Fall auf die Verhornungszone, zentrale Tumorabschnitte und singuläre Zellen (siehe Abbildung 16) bezieht. In den übrigen sieben Fällen handelt es sich um fokale Reaktivität einzelner Tumorzellverbände, wobei sich zum Teil das typische Verteilungsmuster normaler Haut mit vom Stratum spinosum zum Stratum granulosum zunehmender Reaktivität findet (siehe Abbildung

17) Zwei Präparate zeigen eine unregelmäßig schwache Reaktion, sechs sind vollständig immunonegativ. (siehe Tabelle 19)

3.5.2 HSP32

Bei der HSP32 Färbung zeigen neun von vierzehn Präparaten eine schwach positive Reaktion. In je drei dieser Fälle tritt diese Reaktion nur fokal bzw. insbesondere in den peripheren Tumorbereichen auf. Nur in einem einzigen Fall ist fokal eine deutliche Anfärbung des Tumors zu verzeichnen, vier Präparate sind völlig immunonegativ. (siehe Tabelle 19)

3.5.3 Metallothionein

Von 15 Metallothionein gefärbten Basaliomen reagieren vier schwach und sieben deutlich positiv. In sechs Fällen ist das Expressionsmuster von fokaler Reaktivität geprägt, je einmal fällt besondere Anfärbbarkeit der Nuklei (siehe Abbildung 18) und der Invasionsfront auf. (siehe Tabelle 19)

3.5.4 HSP70

Zwölf von fünfzehn Basaliomen zeigen keinerlei Reaktion mit dem HSP70 Antikörper. Von den drei positiven Befunden zeigt ein Präparat besondere Anfärbbarkeit des Tumorrandbereichs. (siehe Tabelle 20)

3.5.5 HSP72

Bis auf drei zeigen alle der fünfzehn HSP72 gefärbten Basaliome wenigstens eine schwache Immunreaktion. Bei drei Präparaten ist diese Reaktion fokal, bei einem unregelmäßig über den Tumor verteilt. In je einem Fall zeigt sich eine Bevorzugung apikaler bzw. peripherer Tumorbereiche. (siehe Tabelle 20)

3.5.6 HSP73

Dem HSP73 Antikörper gegenüber zeigen alle sechzehn Basaliome eine deutliche Immunreaktion. Diese hat bei acht Präparaten eine fokale Ausprägung (siehe Abbildung 19) und bevorzugt in zwei Fällen apikale Areale. Eine besondere Reaktivität der Invasionsfront beobachten wir in zwei Fällen. (siehe Tabelle 20)

3.6 Spinaliome

3.6.1 HSP27

Von den zwölf HSP27 gefärbten Spinaliomen sind ein Exemplar negativ, sieben deutlich und vier schwach positiv. In 6 Fällen sind einzelne Tumorabschnitte fokal positiv, in zwei Fällen bezieht sich die Reaktion speziell auf die verhornenden Abschnitte. (siehe Tabelle 21)

3.6.2 HSP32

Die Hälfte der zwölf gefärbten Spinaliome reagieren mit dem Hämoxigenase Antikörper, wobei es sich nur bei zwei Präparaten um eine deutliche Reaktion handelt (siehe Abbildung 20). Je einmal bezieht sich die Reaktivität eindeutig auf die peripheren bzw. verhornenden Tumorabschnitte, bei den anderen vier positiven Befunden ist kein spezifisches Expressionsmuster zu erkennen. (siehe Tabelle 21)

3.6.3 Metallothionein

Bei der Metallothionein Färbung sind nur zwei von neun Präparaten völlig immunonegativ. In zwei der positiven Fälle handelt es sich um lokal begrenzte Reaktionen (siehe Abbildung 21). Auffällig ist, dass sich in drei Schnitten spezifisch die Invasionsfront des Tumors anfärbt (siehe Abbildung 22). (siehe Tabelle 21)

3.6.4 HSP70

Bei der HSP70 Färbung zeigen nur zwei der neun gefärbten Präparate eine schwache Immunreaktion. (siehe Tabelle 22)

3.6.5 HSP72

In der HSP72 Färbung beobachten wir bei zehn der elf Spinaliome eine mindestens schwache Reaktivität (siehe Abbildung 23), viermal bezieht sie sich speziell auf verhornende Tumorabschnitte, in zwei Fällen zeigt sich ein fokales Expressionsmuster. (siehe Tabelle 22)

3.6.6 HSP73

Bei den zehn gefärbten Spinaliomen ist die Reaktion mit dem HSP73 Antikörper nur einmal negativ, bei allen anderen Präparaten zumindest stellenweise deutlich positiv (siehe Abbildung 24). In einem Exemplar

heben sich einzelne Zellen durch besondere Reaktivität von der Umgebung ab, in fünf Fällen sind einzelne Tumorbereiche fokal positiv (siehe Abbildung 25). In vier Präparaten reagieren besonders apikale Abschnitte. (siehe Tabelle 22)

4 DISKUSSION

4.1 HSP- und Metallothionein-Expression in normaler Haut

In diesem ersten Teil des Diskussionskapitels soll beleuchtet werden, inwiefern das Färbeverhalten in unveränderter Haut Rückschlüsse auf die Funktion von Hitzeschockproteinen und Metallothionein in der Proliferation und Differenzierung menschlicher Keratinozyten zulässt.

4.1.1 HSP27

In den Bereichen unveränderter Epidermis zeigte sich eine zunehmende Anfärbbarkeit vom Stratum spinosum bis ins Stratum granulosum, wobei die Hornlamellen des Stratum corneum in allen Präparaten negativ blieben und sich das Stratum basale größtenteils gar nicht oder nur schwach anfärbte. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Beobachtungen anderer immunhistochemischer HSP27-Studien menschlicher Epidermis überein (GANDOUR-EDWARDS ET AL, 1994; TRAUTINGER ET AL, 1995; KANITAKIS ET AL, 1989, GHOREISHI ET AL, 2000). Nur in einer Studie der Gruppe BOEHNCKE ET AL (1994) ist eine homogene HSP27-Verteilung durch alle epidermalen Schichten beschrieben worden, wobei dieses Ergebnis aufgrund der sehr geringen Probenzahl (n=5) sorgfältig gegen die anderen vier Studien (zusammen n=32) abzuwägen ist.

Übereinstimmend ist in den vier erstgenannten Studien die Aussparung des Stratum basale beschrieben, was besondere Aufmerksamkeit auf die drei Präparate im Material lenkte, in denen sich fokal eine deutliche Anfärbung dieses Bereiches zeigte. Es liegen Überlegungen vor, dass variierende HSP27-Expression innerhalb einer Zellpopulation unterschiedliche Stadien von Sekretion und Synthese widerspiegelt (CIOCCA ET AL, 1983). Da es sich bei den Zellen des Stratum basale jedoch nicht um sekretorisches Gewebe handelt, scheint diese Überlegung als Erklärung nicht befriedigend. Sie vermag darüber hinaus nicht zu begründen, warum sich jeweils Gruppen benachbarter Zellen anfärben. Falls die HSP27-Expression im Stratum basale z.B. an eine bestimmte Phase des Zellzyklus gebunden wäre, würde man eine gleichmäßige Verteilung einzelner positiver Zellen in dieser Schicht erwarten. Vergleicht man

das Färbemuster in diesen Präparaten gezielt mit der HSP27-Expression in der benachbarten tumorösen Läsion¹⁴, stellt man fest, dass sich hier ebenfalls eine fokale Anfärbung des Stratum basale findet. Dies lässt die Spekulation zu, dass sich auch in den morphologisch unauffälligen Bereichen der umgebenden Haut auf molekularbiologischer Ebene bereits Veränderungen zeigen, wie sie für die benachbarte Läsion charakteristisch sind, und HSP27 somit möglicherweise einen frühen Marker von Differenzierungsstörungen wie z.B. Basaliomen und seborrhoischen Keratosen darstellen könnte (siehe Abschnitt 4.2.2 und Abschnitt 4.2.4). Die Negativität des Stratum corneum ist damit zu erklären, dass das HSP27, wie die meisten anderen Proteine, durch die enzymatische Aktivität im Stratum granulosum zersetzt wird.

Die Beobachtungen hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation, das heißt die fast ausschließlich zytoplasmatische Anfärbung, stimmen ebenfalls mit den Ergebnissen der oben genannten Studien überein. Bei dem einen Präparat, in dem sich ein nukleäres Muster der HSP27-Antikörper-Reaktion fand, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es unmittelbar vor der Tumorexzision zu einer Stress-Antwort mit HSP27-Phosphorylierung und Verlagerung ins nukleäre Kompartiment kam, wie es von NOZAKI 1997 nach UVB-Bestrahlung oder von MCCLAREN und ISSEROFF 1994 nach Hyperthermie und Arsenitexposition beschrieben wurde.

Es stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse Rückschlüsse auf zellulären Funktionen von HSP27 zulassen, die über eine Beteiligung an der Hitze-Schock-/Stress-Antwort hinausgehen. Hyperthermie führte zu gesteigerter HSP27-Expression in normaler Haut (WILSON ET AL, 2000). Es ist aber auch bekannt, dass HSP27 konstitutiv, das heißt auch in Abwesenheit spezifischer Stressoren, in kultivierten menschlichen Keratinozyten gebildet wird (MCCLAREN und ISSEROFF, 1994) und die vorliegenden Ergebnisse belegen dies *in vivo*. Es fällt auf, dass die HSP27-Expression im Bereich der unveränderten Haut gut mit dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten korreliert, eine Schlussfolgerung, die sich auch in den Studien von KANITAKIS ET AL (1989) und GANDOUR-EDWARDS ET AL

¹⁴ zwei seborrhoische Keratosen und ein multizentrisches Basaliom

(1994) findet und von HONORE ET AL 1994 mittels cDNA-Klonierung verifiziert wurde. Auch in der Embryonalentwicklung korreliert die HSP27-Expression mit dem Differenzierungsgrad menschlicher Keratinozyten (JANTSCHITSCH ET AL, 1998). Vergleichende Studien zwischen HSP27 und etablierten keratinozytären Differenzierungsmarkern wie den spr (*small proline rich*) (KARTASOVA und VAN DE PUTTE, 1988) liegen meines Wissens nicht vor. In kultivierten Keratinozyten ist ein Anstieg der HSP27-Expression auf das 2,5fache beschrieben worden, wenn man der Zellkultur als Differenzierungsreiz 1,0 mmolare Ca^{2+} -Lösung zusetzt (KINDAS-MÜGGE und TRAUTINGER, 1994). Eine enge funktionelle Verknüpfung von HSP27 mit dem Differenzierungs-geschehen belegen auch zwei Studien an anderen Zelltypen. VARGAS-ROIG ET AL fanden 1997 in Mammakarzinomzellen auf zellulärer Ebene eine deutliche inverse Korrelation von HSP27-Expression und Prolifera-tion bei der immunhistochemischen Co-Lokalisations-Analyse mit den Proliferationsmarkern PCNA und AgNOR. 1992 gelang SPECTOR ET AL der Nachweis, dass das Ende der Wachstumsphase humaner B-Lympho-zyten, also der Zeitpunkt im Programm der Zelle, an dem von Prolife-ration auf Differenzierung umgeschaltet wird, mit einer HSP27-Induktion einhergeht. In den Abschnitten 4.2.4 und 4.2.5 wird näher beleuchtet, in wie weit sich die Tauglichkeit von HSP27 als Differenzierungsmarker in normalen Keratinozyten auch in den untersuchten Tumorgruppen widerspiegelt.

Im Bereich der Hautanhangsgebilde sind die Ergebnisse der oben genannten Studien nicht immer eindeutig, zum Teil widersprechen sie sich. Es zeigten sich positive HSP27-Reaktionen im Bereich von Talg- und Schweißdrüsen, Blutgefäßen, Haarwurzeln, Skelettmuskulatur und Nervenscheiden. Deutliche Anfärbbarkeit der Ausführungsgänge ekkriner Drüsen ist bereits mehrfach referiert worden (KANITAKIS ET AL, 1989; CIOCCA ET AL, 1982 und 1983). In Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen berichten KANITAKIS ET AL darüber hinaus von HSP27-Expression in Talgdrüsen und Haarwurzeln. GANDOUR-EDWARDS ET AL (1994) fanden im Gegensatz dazu keine Anfärbbarkeit von Drüsen, Blutgefäßen und Nerven. Dies mag damit zu erklären sein, dass die HSP27-Expression in den Hautanhangsgebilden variabel ist und durch eine höhere Zahl untersuchter Proben eher positive Befunde

erhoben werden konnten. Meines Wissens stellen diese Befunde den ersten Bericht über HSP27-Expression in an die Dermis angrenzende Skelettmuskulatur und Nervenscheiden dar. In einer Studie an intrakraniellen Tumoren wurde zerebelläres und Chorda-spinalis-Gewebe als HSP27-negativ beschrieben (KATO ET AL, 1992).

4.1.2 HSP32

Die Ergebnisse der HSP32-Färbung an normaler Haut waren insgesamt weniger eindeutig als bei den anderen untersuchten Antikörpern, aufgrund der Reproduzierbarkeit ist die beobachtete Reaktivität aber durchaus als spezifisch zu erachten. In unterschiedlichem Maße finden sich positive Areale in allen epidermalen Schichten und in den Hautanhangsgebilden. Hierbei ist ein schwaches Überwiegen im apikalen Bereich zu sehen. In der Dermis findet sich vor allem in Nachbarschaft von Spinaliomen, Basaliomen und Verrucae vulgares HSP32-Expression. Meines Wissens liegen keine weiteren Studien vor, in denen die HO-1-Expression in menschlicher Haut und dermalen Neoplasien *in vivo* immunhistochemisch untersucht wurde.

In vitro ist die enzymatische Aktivität der Hämoxygenase in Keratinozyten und dermalen Fibroblasten von APPELGATE ET AL (1995) verglichen worden. Sie fanden in Keratinozyten eine wesentlich niedrigere HO-1-Aktivität, dafür eine höhere Expression der konstitutiven Isoform HO-2 und des Antioxidans Ferritin. Ähnliche Ergebnisse liegen für frisch biopsierte Haut von UVA-bestrahlten Individuen und Kontrollpersonen vor (TYRRELL, 1999). Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass die Epidermis als ein exponiertes Ziel von UV-Einstrahlung besser mit anti-oxidativen Verteidigungssystemen ausgestattet ist als die darunter liegende Dermis. Diese Studien verdeutlichen darüber hinaus die enge funktionelle Korrelation der beiden Hämoxygenase-Isoformen und legen die Vermutung nahe, dass sich die Aussagekraft dieser Ergebnisse gegebenenfalls durch zusätzliche Bestimmung der HO-2 steigern ließe.

An menschlichen Keratinozyten ist außerdem gezeigt worden, dass zugeführtes Stickoxid (NO) die HO-1 Expression steigert und die damit verbundene erhöhte HO-1 Aktivität zu einer Steigerung des zellulären Metabolismus und der Proliferationsrate führt (CLARK ET AL, 1997).

Dass Stickoxid als Mediator der Proliferationsstimulation in Keratinozyten eine wichtige Rolle spielt, hatten BENRATH ET AL bereits 1995 am Wundheilungsprozess nach UV-Bestrahlung demonstriert. In der vorliegenden Studie findet sich kein Anhalt für eine Korrelation von HO-1-Expression und proliferativer Aktivität, so dass HO-1 in Keratinozyten hiernach allenfalls eine modulierende, keinesfalls eine zentral steuernde Wirkung in der Regulation der Proliferation zugesprochen werden kann.

Das heutige Wissen über die Funktion und Regulation von HSP32 eröffnet Möglichkeiten für verschiedene klinische Anwendungen. Seine Beteiligung an anti-oxidativen zellulären Schutzmechanismen macht es zu einem potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt bei ischämischen Organschäden. So konnten VOGT ET AL 1995 zeigen, dass die erhöhte Widerstandsfähigkeit nach Endotoxin-Behandlung in einem Tiermodell akuten Nierenversagens auf einer erhöhten HO- und Ferritin-Synthese beruht. ITO ET AL referierten 1997, dass eine 15-minütige Leberischämie (z.B. Pringle-Manöver bei Leberchirurgie oder -transplantation) eine gesteigerte HO-1-Expression in der Umgebung der Zentralvenen induziert. Auch Studien, die HO-1 eine zentrale Rolle in der zellulären Entzündungsantwort zuschreiben und hier einen Ansatzpunkt für die Therapie akuter Entzündungsreaktionen und in der Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen sehen, liegen vor (TERRY ET AL, 1998; WILLIS ET AL, 1996).

4.1.3 HSP 72

In der HSP72-Färbung unveränderter Haut überwog die Anfärbbarkeit apikaler Epidermisschichten, wobei auch das Stratum corneum häufig deutlich positiv war. Im Bereich der Hautanhangsgebilde fiel besonders die Reaktivität der Talg- und Schweißdrüsen auf, auch Nervenzellen und Gefäßmuskulatur waren vereinzelt positiv. Bei den neun Präparaten, bei denen eine diffuse oder unregelmäßige Reaktion aller Epidermisschichten vorliegt, handelt es sich in sechs Fällen um unveränderte Haut in Nachbarschaft aktinischer Keratosen, so dass man von einer chronischen UV-Exposition dieser Hautbereiche ausgehen kann.

Die bevorzugte HSP72-Färbung apikaler Zellschichten, die sich in diesen Präparaten zeigte, ist in bisherigen immunhistochemischen Studien menschlicher Epidermis nicht beschrieben worden. Sowohl MURAMATSU ET AL (1992) als auch TRAUTINGER ET AL (1993) fanden eine gleichmäßige Reaktivität aller Epidermisschichten und sahen keinen Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten. In einer anderen Studie war in nicht wärmebehandelter Haut kein HSP72 nachzuweisen, erst eine Hyperthermiebehandlung führte zu gleichmäßiger HSP72-Expression in den basalen und suprabasalen Schichten (EDWARDS ET AL, 1999). Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen berichten TRAUTINGER ET AL über gute Anfärbbarkeit der ekkrinen Drüsen und generelle Immunonegativität der Dermis.

Die gleiche Forschungsgruppe mutmaßte 1995, dass die konstitutive Expression von HSP72 in menschlicher Epidermis ein Mechanismus der UV-Protektion sein könnte. BAYERL und JUNG gelang 1999 methodisch elegant der Beweis für die zentrale Bedeutung des HSP72 in der UV-Protektion der Zelle: Keratinozyten, deren HSP72 durch intrazelluläre Injektion von Mikro-Antikörpern gehemmt wurde, zeigen bei UV-Bestrahlung eine deutlich höhere Apoptoserate als die Vergleichsgruppe. Nimmt man eine essentielle Rolle von HSP72 in der UV-Protektion an, könnten Untersuchungen von BRULS ET AL (1984) die vorliegenden Ergebnisse – zumindest im Bereich lichtexponierter Haut - erklären: Sie bestimmten die Eindringtiefe von Strahlung in die Epidermis und fanden im Bereich der tieferen Epidermisschichten bereits eine Reduktion auf 5% der gesamten Strahlendosis. Die Zellen, die in den oberflächlich gelegenen Schichten einer höheren UV-Strahlendosis ausgesetzt sind, müssten demnach mehr HSP72 exprimieren. Die Bedeutung von HSP72 für die UV-Resistenz menschlicher Keratinozyten *in vitro* ist bekannt (TRAUTINGER ET AL, 1995). Anderer Stressoren, wie Hyperthermie, führen nachweislich zu einer erhöhten HSP72-Expression in Haut (WILSON ET AL, 2000). Auch die Beobachtung der Gruppe EDWARDS ET AL (1991), die HSP72 als Indikator des zellulären Stresses menschlicher Keratinozyten identifizierten, mag die stärkere Anfärbung apikaler Schichten erklären. Die massive Synthese von Keratinlamellen im Stratum spinosum bei nur

indirekter vaskulärer Versorgung dieses Gewebes sowie die hohe enzymatische Aktivität im Stratum granulosum, die zur Zersetzung von Zellorganellen und zum Auftreten von Abbauprodukten führt, kann für die Keratinozyten dieser Bereiche einen metabolischen Stress bedeuten, der zu einer erhöhten HSP72-Expression führt. Über das Ausmaß des Stresses, dem die untersuchten Präparate vor der Exzision ausgesetzt waren, sind methoden-immanent keine Daten verfügbar (siehe Kapitel 4.3). Es ist also nicht auszuschließen, dass zum Beispiel eine ischämiebedingte Hypoxie durch Injektion von vasokonstriktiven Substanzen vor Exzision der Läsionen zu der HSP-Induktion geführt haben, die stellenweise zu beobachten ist. Hierbei ist zu beachten, dass nicht von einem einfachen Schwellenwert-Modell der *in vivo* Induzierbarkeit von HSP70 ausgegangen werden kann (DRESSEL ET AL, 1996).

Ungeklärt bleibt, warum in der HSP72-Färbung auch das Stratum corneum positiv reagiert. Die Epitope des HSP72-Antigens, die von den verwendeten Antikörpern erkannt werden, scheinen durch die lytische Aktivität im Stratum granulosum nicht erfasst zu werden. Die Beobachtungen FERRARINIS ET AL (1992), dass das intrazelluläre Verteilungsmuster von HSP72 heterogen ist und dass die HSP72-Expression nicht im Zellzyklus zu variieren scheint, werden von den vorliegenden Ergebnissen bestätigt. Die hitzebedingte Relokation von HSP72 in den Nukleus menschlicher Keratinozyten, die KITANO und OKADA 1990 beschrieben, lässt sich anhand des untersuchten Materials nicht überprüfen. Ihre Beobachtung, dass dieses rasche intranukleäre Auftreten von HSP72 durch Cycloheximid¹⁵ nicht hemmbar ist und die Schlussfolgerung, dass das HSP72 daher bereits in der Zelle vorhanden gewesen sein muss, liefert jedoch einen Hinweis auf die konstitutive Expression dieses Proteins.

4.1.4 HSP73

Auffallend bei der Färbung normaler Haut mit dem HSP73-Antikörper ist die klare Trennlinie zwischen dem negativen Stratum basale und gleichmäßig positiven Zellen in den suprabasalen Schichten, vereinzelt sogar bis in das Stratum corneum (siehe Abbildung 7). Auch im Bereich

¹⁵ Hemmstoff der eukaryontischen Proteinbiosynthese

der Hautanhangsgebilde und benachbarter Strukturen sind deutlich positive Reaktionen zu beobachten.

Die positiven Befunde sind zwar mit der Tatsache zu erklären, dass HSP73 konstitutiv in allen Körperzellen gebildet wird, jedoch erklärt dies nicht, warum das Stratum basale so eindeutig und spezifisch negativ ist. Dies verwundert um so mehr, als postuliert worden ist, dass HSP73 mRNA während der Zellteilung vermehrt gebildet wird (SORGER und PELHAM, 1987). Man würde also im teilungsaktiven Gewebe des Stratum basale zumindest in einzelnen Zellen eine erhöhte HSP73-Expression erwarten. Eine Assoziation von konstitutivem und induzierbarem HSP70 mit Proliferation konnten auch VARGAS-ROIG ET AL (1997) nachweisen, die eine immunzytochemische Co-Lokalisations-Studie mit Antikörpern gegen HSP72, HSP73 und die Proliferationsmarker PCNA und AgNOR an Mammakarzinom-Biopsien durchführten. Von MILARSKI und MORIMOTO (1986) liegt die Beobachtung vor, dass HSP70 in der G2-Phase für Antikörper nicht erreichbar ist. Dies würde jedoch nur die Negativität einzelner prämitotische Zellen im Stratum basale erklären. Erst kürzlich wurde von fast ausschließlicher Begrenzung der HSP73-Expression auf die Dermis normaler und hyperthermie-behandelter Haut berichtet (WILSON ET AL, 2000). Die vorliegenden Ergebnisse widersprechen also zum Teil anderen Publikationen und sind mit den vorhandenen Erkenntnissen über die Funktion von HSP73 nicht zufriedenstellend zu erklären.

Dass es sich trotzdem um richtige, im Sinne von reproduzierbaren Beobachtungen handelt, wird durch eine immunhistochemische Studie von BOEHNCKE ET AL (1994) bestätigt, die in normaler Haut bei HSP73-Färbung ebenfalls eine Bevorzugung der apikalen Epidermisschichten feststellten. Ob sich der Widerspruch zwischen den Studien von VARGAS-ROIG ET AL auf der einen Seite und der von BOEHNCKE ET AL und der hier vorliegenden auf der anderen Seite damit erklären lässt, dass BOEHNCKES Gruppe den gleichen Antikörper wie diese Untersuchung verwendete, während VARGAS-ROIG ET AL mit dem

BRM-22 Antikörper¹⁶ arbeiteten, müsste durch einen direkten Vergleich der beiden Antikörper überprüft werden.

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Negativität des Stratum basale liefert eine Studie von YAAR ET AL (1993). Sie behandelten normale Keratinozyten und Spinaliomzellen der Reihe SCC12F mit TPA, einem Induktor epithelialer Differenzierung, und beobachteten anschließend eine ca. 30stündige HSP73-Suppression und nachfolgende Überexpression. Sie folgerten, dass HSP73 augenscheinlich erst in späteren Differenzierungsstadien, wenn die Proteinbiosynthese bereits in Gang gekommen ist, notwendig ist. Diese Vermutung deckt sich mit den Beobachtungen am vorliegenden Material, dass HSP73 in normaler Epidermis erst in den Schichten apikal des Stratum basale exprimiert wird.

Für die Expression von HSP73 im Stratum corneum gelten die gleichen Überlegungen, wie für HSP72 im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, nämlich, dass die antigenen Epitope des HSP73 von der lytischen Aktivität im Stratum granulosum nicht betroffen zu sein scheinen.

4.1.5 HSP 70

Die Ergebnisse der HSP70-Färbung im Bereich unveränderter Haut sind insgesamt wenig spezifisch und die beobachteten Reaktionen waren größtenteils schwach ausgeprägt. Häufig besteht kein wesentlicher Unterschied zwischen verschiedenen Zellschichten. Die wenigen deutlich positiven Befunde, die sich zeigten, betreffen häufiger die apikalen als die basalen Zellschichten. Das Stratum corneum blieb in allen Präparaten negativ. Vereinzelt finden sich im Bereich der Hautanhangsgebilde und benachbarter Strukturen positive Befunde (ekkrine Drüsen, Haarfollikel, Gefäße, Skelettmuskulatur).

Der verwendete Antikörper reagiert laut Herstellerangaben gleichermaßen mit dem HSP72- und dem HSP73-Antigen. Das Expressionsmuster müsste sich daher aus einer additiven Betrachtung des Färbeverhaltens dieser beiden Antikörper ergeben. Rein qualitativ betrachtet ist diese Erwartung zutreffend, denn es findet sich in unterschiedlichem

¹⁶ Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri

Ausmaß überall dort HSP70-Reaktivität, wo eine HSP72- oder HSP73-Expression nachweisbar war. Bei der insgesamt schwach ausgefallenen HSP70-Färbung bleibt die Färbeintensität jedoch hinter den Erwartungen zurück. Da die geeignete Antikörperkonzentration im Vorfeld der Färbung durch eine Verdünnungsreihe ermittelt wurde und niedrigere Titer nur zu einer Zunahme der unspezifischen Hintergrundfärbung führten, scheidet unzureichende Antikörpersättigung als Erklärung aus. Der verwendete polyklonale HSP70-Antikörper erzielt in Paraffinschnitten eine weniger spezifische Anfärbung als die monoklonalen HSP72 und HSP73-Antikörper.

4.1.6 Metallothionein

Das Charakteristische der Metallothionein-Färbung besteht in einer selektiven Anfärbung des Stratum basale, zum Teil findet sich eine deutliche intranukleäre Lokalisation des Antigens. Im umliegenden Gewebe fällt die Positivität einzelner Fibroblasten und Entzündungszellen sowie der Drüsen und Haarbälge auf. Diese Ergebnisse stimmen mit denen VAN DEN OORDS und DELEY (1994) überein, die in ihrer Untersuchung dermalen Kryoschnitte eine starke Reaktivität basaler Keratinozyten, der Haarwurzeln, der ekkrinen Drüsen und der glandulären Myoepithelzellen beschrieben. Sie folgerten, dass es sich um einen brauchbaren Marker basaler Keratinozyten handelt und zur Differenzierung ekkriner und apokriner Drüsen geeignet ist.

Dieses Expressionsmuster deutet auf eine wichtige Rolle des Metallothioneins bei der Zellteilung hin. Zum einen reagiert es spezifisch mit den Zellen des teilungsaktiven Stratum basale, zum anderen reichert es sich hier auch noch speziell in den Zellkernen an. Diese Ergebnisse sind mit der Vermutung vereinbar, Metallothionein sei für die Bereitstellung von Zink-Ionen an die intranukleären Enzyme, die Nukleinsäuren und Proteine synthetisieren, verantwortlich (BRADY ET AL, 1982). Auch bestätigen sie HASHIBAS ET AL (1989) Annahme, Metallothionein sei am Zellwachstum beteiligt.

Ob die Metallothionein-Induzierbarkeit durch UV-Strahlen, die 1988 von FORNACE ET AL an V79-Zellen¹⁷ und 1986 von ANGEL ET AL an menschlichen Hautfibroblasten demonstriert wurde, auch auf Keratinozyten zutrifft, lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen aus methodischen Gründen nicht bestätigen. Da es sich um archivierte Material aus Routinebetrieb des Pathologischen Institutes handelt, existieren keine Angaben zur UV-Exposition der Proben vor ihrer Exzision.

4.2 Hitze-Schock-Proteine und Metallothionein in den Tumoren

4.2.1 Aktinische Keratose

Die aktinischen Keratosen stehen in der Reihe der untersuchten Tumoren für die prä-malignen, durch chronische UV-Bestrahlung hervorgerufenen Läsionen der Haut. BUCKMAN ET AL konnten 1998 immunhistochemisch eine deutliche erhöhte Zyklus-oxygenase-2-Expression (COX-2) in aktinischen Keratosen im Vergleich zu normaler Haut demonstrieren. Da COX-2 Entzündungsmediatoren wie z.B. Prostaglandine synthetisiert und diese über eine HSF1-Induktion wiederum zur gesteigerten HSP-Produktion führen (siehe Abschnitt 1.4, FRACELLA und RENSING, 1995), würde man in aktinischen Keratosen - eine unveränderte HSP-Regulation vorausgesetzt - insgesamt erhöhte HSP-Level erwarten. Die Abweichungen im Expressionsmuster der untersuchten Hitze-Schock-Proteine in aktinischen Keratosen lassen sich jedoch wie folgt zusammenfassen: es finden sich Unregelmäßigkeit in der HSP27- und HSP73-Expression, die HSP32- und HSP72-Expression ist insgesamt schwach und HSP70- und Metallothionein-Reaktivität fehlen fast vollständig. Somit scheinen für die HSP-Expression in chronisch UV-geschädigter Haut grundsätzliche andere Regulationsmechanismen als in normaler Haut zu gelten.

Der HSP27-Antikörper zeigt in normaler Haut ein besonders spezifisches Färbemuster und seine Korrelation mit dem

¹⁷ Lungenfibroblasten des chinesischen Hamster

Differenzierungsgrad ist bereits umfassend diskutiert worden (siehe Abschnitt 4.1.1). Dieses Färbemuster lässt sich auch in chronisch UV-exponierter Epidermis nachvollziehen, solange eine morphologisch regelrechte Schichtung erhalten ist (KIRIYAMA ET AL, 2001). Dass eine fortschreitende Entdifferenzierung aufgrund chronischer UV-Exposition auch mit einer reduzierten oder unregelmäßigen HSP27-Expression einhergeht, wird von den vorliegenden Ergebnissen bestätigt: bei den untersuchten aktinischen Keratosen, die noch eine Bevorzugung apikaler Schichten in der HSP27-Anfärbbarkeit zeigen¹⁸, handelt es sich fast ausschließlich um aktinische Keratosen 1. oder 2. Grades und atrophe Formen, während die gering differenzierten und hyperplastischen Präparate in der Regel eine deutlich verringerte HSP27-Exposition zeigen (siehe z.B. Abbildung 6). Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen der Arbeitsgruppe GANDOUR-EDWARDS ET AL (1994) überein, die bei aktinischen Keratosen (n=2) eine fleckige HSP27-Anfärbbarkeit mit suprabasaler Betonung fanden. Sie stellten keinen Unterschied in der HSP27-Expression sonnenbelasteter und strahlengeschützter Haut fest und folgerten, dass HSP27 im Gegensatz zu HSP72 nicht strahleninduzierbar sei. Bei dem untersuchten Material handelte es sich allerdings ebenfalls um Routinepräparate aus dem pathologischen Archiv, so dass keine sichere Angaben über die UV-Exposition unmittelbar vor der Tumorexzision gemacht werden können. Die Entnahmestelle erlaubt je nach Körperregion (Gesicht, Rumpf, Extremitäten) allenfalls Rückschlüsse auf das Ausmaß der chronischen UV-Exposition. Dass eine chronische UV-Exposition die Regulationsmechanismen zentraler Differenzierungsgene, zu denen HSP27 nach den Ergebnissen dieser Studie mit großer Wahrscheinlichkeit gerechnet werden kann, unter akuter UV-Belastung verändert, ist bereits 1995 von GARMYN ET AL postuliert worden.

Die in unveränderter Haut sehr ausgeprägte spezifische Anfärbung des Stratum basale mit Metallothionein fehlt in den untersuchten aktinischen Keratosen vollständig. Das heißt, das zytomorphologische Kennzeichen der aktinischen Keratose, die horizontale Ausbreitung eines atypischen Zellklons im Stratum basale, spiegelt sich auch in einer veränderten

¹⁸ Präparate 1992 A, 2059 A5, 2223 B und 519, siehe Tabelle 13

Metallothionein-Expression wieder. Die Vermutung HASHIBAS (1989), der eine Korrelation von Metallothionein und epidermaler Hyperplasie vermutete, lässt sich mit diesen Ergebnissen nicht bestätigen, da auch die untersuchten hyperplastischen aktinischen Keratosen keine erhöhten Metallothionein-Level exprimieren.

Die insgesamt schwache Anfärbbarkeit der aktinischen Keratosen mit dem HSP32-Antikörper erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Festzustellen ist jedoch, dass die Schlussfolgerung CLARKS ET AL (1997), erhöhte HO-1 Aktivität führe zu einer Steigerung des zellulären Metabolismus und der Proliferationsrate, hiernach nicht umkehrbar ist. Die gesteigerte Proliferationsrate der untersuchten, insbesondere der hyperplastischen, aktinischen Keratosen ist in keinem der Präparate mit einer erhöhten HSP32-Expression vergesellschaftet. Dies stützt die oben genannte Annahme (siehe S. 45), dass HO-1 keine zentrale, sondern allenfalls eine modifizierende Rolle in der Proliferationskontrolle zukommt.

Da HSP72 in unveränderter Haut eher in den apikalen, das heißt den differenzierten Epidermisschichten vorkommt, verwundert es nicht, dass seine Expression in den durch beginnende Entdifferenzierung charakterisierten aktinischen Keratosen insgesamt reduziert ist. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei diesem Protein eben nicht um eine ausschließlich durch Hitze induzierbare Variante des HSP70 handelt, sondern auch eine konstitutive Expression in Keratinozyten und einigen Tumorzelllinien bekannt ist (TRAUTINGER ET AL, 1993), die auch in den untersuchten Präparaten unveränderter Haut zu beobachten ist (siehe Abschnitt 3.1.4). Die Bedeutung von HSP72 für die UV-Resistenz menschlicher Keratinozyten *in vitro* ist bekannt (TRAUTINGER ET AL, 1995). Gegenstand weiterer Forschung sollte es sein, zu bestimmen, inwieweit die verringerte HSP72-Expression in aktinischen Keratosen *in vivo* ursächlich an der Entstehung aktinischer Keratosen beteiligt ist und ob die Zufuhr oder spezifische Induktion von HSP72 einen präventiven oder kurativen Ansatz in der Behandlung dieser Läsion darstellen könnte.

Ein weiterer Antikörper, der in normaler Haut ein besonders spezifisches Färbemuster mit selektiver Aussparung des Stratum basale

zeigt, ist HSP73. Die Unregelmäßigkeit der Anfärbung in aktinischen Keratosen lässt sich anhand der Abbildung 7 und Abbildung 8 gut nachvollziehen, die das Verschwinden der klaren Grenzen zwischen einem negativen Stratum basale und den HSP73-positiven suprabasalen Schichten im Bereich aktinischer Keratosen zeigen. Da es sich beim HSP73 um ein Protein handelt, das vor allem in wachsenden Zellen konstitutiv gebildet wird, überrascht diese zum Teil deutliche Expression in dem hyperproliferativen Gewebe aktinischer Keratosen nicht.

Die Tatsache, dass keine der untersuchten aktinischen Keratosen mit dem polyklonalen Antikörper der HSP70-Familie reagiert, verleitet zu der Frage, ob es sich hier um eine pathognomische, eventuell sogar ursächliche molekulare Veränderung dieser Läsionen handelt. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die HSP70-Expression auch in unveränderter Haut nur unregelmäßig und schwach ausfällt, so dass der praktische Wert dieses Antikörpers als immunhistochemischer Negativindikator dieser Hautläsion gering ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die morphologischen Veränderungen, die aktinische Keratosen kennzeichnen, also eine gestörte Differenzierung und Aufhebung der epidermalen Schichtung, sich auf molekularbiologischer Ebene in ihrer HSP- und Metallothionein-Expression widerspiegeln.

4.2.2 seborrhoische Keratosen

Die Expression der verschiedenen Hitze-Schock-Proteine in den untersuchten seborrhoischen Keratosen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die HSP27-Expression ist unregelmäßiger als in normaler Haut, die Antigene HSP70 und HSP72 zeigen bei insgesamt schwacher Anfärbbarkeit keine wesentlichen Unterschiede zur Expression in normaler Haut, HSP32 wird in seborrhoischen Keratosen in reduziertem Maße exprimiert und die Expression von HSP73 ist zum Teil fleckig. Die spezifische Anfärbbarkeit des Stratum basale mit Metallothionein-Antikörper ist in den seborrhoischen Keratosen aufgehoben. Bei keinem der Antikörper lässt sich ein Zusammenhang

des Expressionsmuster mit dem jeweiligen Subtyp¹⁹ der seborrhischen Keratosen feststellen.

Bisher liegen nur vereinzelt Ergebnisse anderer Gruppe über Hitzeschockproteine in seborrhischen Keratosen vor, nämlich zum einen von GANDOUR-EDWARDS ET AL (1994, n=3) und KANITAKIS ET AL (1989, n=1) bezüglich HSP27 und zum anderen von VAN DEN OORD (1994) bezüglich Metallothionein. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen berichten GANDOUR-EDWARDS ET AL von einer im Vergleich zu normaler Haut diffusen Anfärbbarkeit der seborrhischen Keratosen mit HSP27, bei der die bevorzugte Reaktivität der suprabasalen Schichten weitestgehend aufgehoben ist. Wie auch bei KANITAKIS ET AL beschrieben ist das Antigen deutlich im Zytoplasma lokalisiert. Diese Unregelmäßigkeiten in der Expression des Differenzierungsmarkers HSP27 spiegeln auf molekularbiologischer Ebene die morphologisch eingeschränkte Differenzierungstendenz seborrhischer Keratosen wieder. Die Studie VAN DEN OORDS zur Metallothionein-Lokalisation in Kryoschnitten zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie eine Ausweitung der Expression auf suprabasale Schichten des hyperplastischen Gewebes seborrhischer Keratosen (siehe Abbildung 10). In unveränderter Haut markiert Metallothionein spezifisch die proliferierenden Zellen des Stratum basale, so dass diese Abweichung bereits von VAN DEN OORD im Sinne einer Zunahme proliferierender Zellen in seborrhischen Keratosen gewertet wurde.

Die Abweichung der HSP73-Färbung von dem spezifischen Expressionsmuster in normaler Haut²⁰ belegt die reduzierte Differenzierungstendenz der seborrhischen Keratose (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13). Da HSP72 nach gegenwärtigem Verständnis nur geringfügig an der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist, verwundert es nicht, dass keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Expression in normaler Haut

¹⁹ z.B. akantotische, pigmentierte, entzündete Formen der seborrhischen Keratose

²⁰ siehe Abschnitt 4.1.4

und seborrhoischen Keratosen bestehen. Die reduzierte HSP32-Expression ist am ehesten im Sinne einer allgemeinen Entdifferenzierung der hyperproliferativen Zellen zu werten.

Da es sich bei seborrhoischen Keratosen um typische Veränderung der alternden Haut handelt, sei hier der Zusammenhang zwischen HSP-Expression und Alter näher beleuchtet. YAAR betonte 1995, dass der Schlüssel zum Verständnis der altersabhängigen Abnahme der proliferativen Kapazität in den molekularen Regulationsmechanismen der Zellproliferation zu suchen ist. Hierin spielen Hitze-Schock-Proteine eine, wenn auch noch nicht endgültig determinierte, so doch zentrale Rolle. Wiederholte Induktion von Hitzeschockprotein scheint bestimmte zelluläre Alterungsprozesse verzögern zu können (RATTAN, 1998). Eine negative Korrelation zwischen der HSP-Induzierbarkeit und dem Alter des Patienten ist wiederholt beschrieben worden (DRESSEL ET AL 1996; MURAMATSU ET AL 1996, BLAKE ET AL 1991). DNA-Veränderungen hängen aber eher von der kumulativen UV-Exposition der Haut, als von ihrem chronologischen Alter ab (BIRCH-MACHIN ET AL, 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie an normaler Haut lassen grob orientierend eine kräftigere Exposition der Antigene HSP27, HSP70 und Metallothionein bei jüngeren Patienten erahnen, während HSP32 bei älteren Patienten häufiger exprimiert zu werden scheint. Es muss allerdings deutlich darauf hingewiesen werden, dass die Altersabhängigkeit der HSP-Expression nicht primäre Fragestellung dieser Arbeit ist und somit bei der Wahl der Methodik nicht berücksichtigt wurde. So können diese Tendenzen ebenso darin begründet sein, dass bei den jüngeren Patienten in der Hauptsache Verrucae vulgares untersucht wurden, deren Entstehung im Gegensatz zu den aktinischen Keratosen, Basaliomen und Spinaliomen des älteren Menschen nicht an langjährige kumulative UV-Exposition gebunden ist. Weder KANITAKIS ET AL (1989) noch GANDOUR-EDWARDS ET AL (1994) fanden in ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der HSP27-Expression in Haut und dem Alter des Patienten, wobei die Alterszusammensetzung der Patientenkollektive ebenso zufällig zu sein scheint, wie in der vorliegenden Studie.

4.2.3 Verruca vulgaris

Bei den untersuchten Verrucae vulgares lassen sich für keinen der Antikörper wesentliche Abweichungen vom Expressionsmuster in normaler Haut feststellen. Für Metallothionein decken sich diese Beobachtungen mit Ergebnissen VAN DEN OORDS (1994), der eine bevorzugte Metallothionien-Anfärbung des Stratum basale in epidermalen Hyperplasien verschiedener Genese beschrieb. Darüber hinaus sind mir keine weiteren immunhistochemischen Studien zu Hitze-Schock-Proteinen in Verrucae vulgares bekannt.

Es liegen einige Studien zur Wirkung anderer Viren als dem Humanen Papilloma Virus auf die HSP-Expression vor, deren. Bereits 1983 zeigten KHANDJIAN und TUELER, dass die Infektion von Mäusezellen mit Polyoma-Viren zur Expression zweier Proteine mit den Molekulargewichten 92 und 72kDa führt, die sich auch durch eine 43°C-Behandlung induzieren lassen. Einige spezifische DNA-Viren, nicht jedoch das Papillomavirus, induzieren selektiv die Transkription von HSP70 (PHILLIPS ET AL, 1991) und Genprodukte von Adenoviren²¹, die die Synthese von HSP70 direkt induzieren, konnten identifiziert werden (JINDAL und MALKOVSKY, 1994). Letztere postulierten, dass Viren die Hitze-Schock-Proteine des Wirts zur Replikation und zum Zusammenbau ihrer Nukleinsäuren nutzen. Andererseits können die Hitze-Schock-Proteine auch einen Verteidigungsmechanismus der Wirtszelle darstellen, indem sie am Zusammenbau und der Präsentation funktioneller Antigen-MHC-Komplexe beteiligt sind und so eine Rolle in der Immunüberwachung Virus-infizierter Zellen spielen könnten (DENAGEL und PIERCE, 1993). So werden zum Beispiel HIV-infizierte Zellen, die an ihrer Zelloberfläche verstärkt HSP60 exprimieren, selektiv von $\gamma\delta$ -T-Zellen lysiert (MALKOVSKY, 1992).

Nach den vorliegenden Ergebnissen verändern Humane Papilloma Viren die Hitzeschockprotein- und Metallothionein-Expression der infizierten Zellen nicht. Dies lässt sich damit erklären, dass das Virus zur Replikation des eigenen Erbgutes auf einen intakten Metabolismus der Wirtszelle angewiesen ist und somit die für die Proliferation und

²¹ zum Beispiel das sogenannte E1A

Proteinbiosynthese zentralen Proteine nicht ausgeschaltet werden dürfen.

4.2.4 Basaliom

Unter den untersuchten Basaliomen fielen bei fast allen Antikörpern einzelne Präparate auf, die eine deutliche Reaktion fokaler Tumorbereiche zeigen (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Bei den Färbungen mit den Hitzeschockproteinen der HSP70-Familie und mit Metallothionein ließ sich zum Teil eine besondere Reaktivität der Invasionsfront des Tumors nachweisen.

In der HSP27-Färbung ähnelte das Expressionsmuster in Tumorabschnitten, die noch eine epidermale Schichtung erkennen lassen, der HSP27-Verteilung in normaler Haut, häufig zeigten sich jedoch auch fokal positive Tumorzellverbände. Die Heterogenität dieser Ergebnisse stimmt mit den Angaben anderer Veröffentlichungen zu HSP27 in Basaliomen überein. KANITAKIS ET AL (1989) fanden in ihrer HSP27-Färbung an 21 Basaliomen bei insgesamt geringerer Anfärbbarkeit zum Teil fokal deutlich positive Areale in der Verhornungszone, wobei sie jeweils keinen Zusammenhang mit dem biologischen Verhalten oder histologischen Kennzeichen der Zellen feststellen konnten. GANDOUR-EDWARDS ET AL (1994, n=1) beschrieben eine deutliche Anfärbung suprabasaler Tumorzellen eines oberflächlichen Basalioms, also keine wesentliche Abweichung von normaler Haut. TRAUTINGER ET AL (1995), die in Basaliomen und Spinaliomen kein HSP27 nachweisen konnten, folgerten, dass HSP27 ein Marker der Keratinozytendifferenzierung ist und das Fehlen dieses Proteins in den oberen Epidermisschichten ein Zeichen für Malignität sein könnte. Andere Autoren fanden HSP27-Expression in Basaliomen und deuteten sie als Hinweis auf einen relativ benignen und langsam fortschreitenden Tumor (BAYERL ET AL, 1999). Dass HSP27-Deletion nicht in allen Geweben als Malignitätsmarker geeignet ist, zeigen Ergebnisse DELHAYES ET AL (1992), die in Leberzellkarzinomen eine erhöhte HSP27-Expression fanden. In den Präparaten der vorliegenden Studie unterscheiden sich die fokal positiven Tumoreale nicht durch einen höheren Differenzierungsgrad vom umliegenden Tumorgewebe. Die prognostische

Relevanz von HSP27-Expression in Tumorgewebe ist letztlich nur in prospektiven klinischen Studien zu klären.

Eine Heterogenität in der HSP27-Expression ist bisher in verschiedenen Tumoren beschrieben worden, so zum Beispiel für primär intrakranielle Tumore²² von KATO ET AL (1992) und an diversen Neoplasien²³ von CIOCCA ET AL (1983). Eine Erklärung hierfür kann das Konzept der „mixed bag“, das MARX 1982 bezüglich der fehlenden Homogenität in Tumorzellpopulationen formulierte, liefern. Demnach finden sich innerhalb eines Tumorzellverbandes nicht identische Klone einer Krebszelle, sondern eine Vielzahl verschiedener Zellen. Auch bei einheitlicher Morphologie könnten also Unterschiede bezüglich der Expression einzelner Proteine bestehen, wie sie in den untersuchten Basaliomen bei allen verwendeten Antikörpern zu beobachten sind. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die fokale Positivität kann eine inhomogene Verteilung lokaler Stressfaktoren im Tumorgewebe sein, zum Beispiel eine lokale Hypoxie bei unzureichender Tumervaskularisation. Ob es sich bei den gefärbten Arealen um die gefäßfernen Tumorbereiche handelt, ist anhand der vorliegenden Präparate nur schwer zu zeigen oder zu widerlegen. Dieser Überlegung steht entgegen, dass FUQUA ET AL (1994) zeigten, dass sich in Tumorzellen veränderte Kontrollmechanismen der Stressantwort finden. In Mammarkarzinomzellen, die HSP27 mRNA überexprimierten, wurde dieser mRNA-Level nicht mehr von Östrogen und Hitzebehandlung beeinflusst.

Ähnliche Beobachtungen existieren für die Metallothionein-Expression, deren transkriptionale Kontrolle sich während der Tumorentstehung wahrscheinlich durch den Verlust eines Regulationsmechanismus verändert (HASHIBA ET AL, 1989). Das kann die inhomogene Anfärbbarkeit der Basaliome mit dem Metallothionein-Antikörper erklären, die im

²² Meningiome, Glioblastome, Hypophysenadenome, Astrozytome, Medulloblastome, Oligodendrogliome, Schwannome und Gangliogliome

²³ Mammarkarzinome, Leberkarzinome, Spinaliome, Urothelkarzinome und Astrozytome

übrigen mit den Ergebnissen VAN DEN OORDS (1994) übereinstimmt. Obwohl er Metallothionein als einen Marker der basalen Keratinozyten sieht und man somit eine homogene Positivität in dem sich aus diesen Zellen ableitendem Tumor erwarten würde, beschreibt auch er eine uneinheitliche MT-Reaktivität in Kryoschnitten von Basaliomen und deutet diese im Sinne einer Entdifferenzierung der Tumorzellen.

Eine Häufung von Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens in Basaliomen ist bekannt, nach Angaben einiger Autoren sind sie an der Entstehung von Basaliom auch ursächlich beteiligt (NATARAJ ET AL, 1995). Die Interaktion des Onkoproteins p53 mit HSP72 wurde 1991 von MORIMOTO in einem Übersichtsartikel beleuchtet. Nur das mutierte p53 bildet mit HSP72 stabile Komplexe und ist vermutlich aufgrund dieses Mechanismus deutlich langlebiger als das normale p53. Erhöhte HSP72-Expression kann durch diese Bindung die transformierenden Eigenschaften des mutierten p53 unterdrücken (YEHIELY und OREN, 1992). Die ausgeprägte Expression von Hitzeschockproteinen der HSP70-Familie, die sich in mehreren Präparaten besonders an den Tumorrändern zeigte, könnte also im Sinne einer Kontrolle der Tumorausbreitung im Gewebe wirken. Um den genauen Zusammenhang von HSP72-Expression und p53 an der Tumorinvasionsfront zu beleuchten, wäre die zusätzliche Bestimmung von p53-Mutationen in den entsprechenden Tumorarealen notwendig.

4.2.5 Spinaliom

Das Antigen-Expressionsmuster der untersuchten Spinaliome ähnelt zumeist dem Färbeverhalten der suprabasalen Epidermisschichten unveränderter Haut. Das heißt, es finden sich deutliche Reaktionen mit den Antikörpern HSP27, HSP73 und Metallothionein, und schwächere Reaktionen bei den Antikörpern HSP32, HSP72 und HSP70. Bei den Färbungen mit HSP27, HSP72 und HSP73 fallen fokal positive Tumorareale auf, bei Metallothionein besteht teilweise eine besondere Anfärbbarkeit der Tumorinvasionsfront.

Ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren ist bei den Antikörpern HSP27 und Metallothionein möglich. Für ersteren liegen folgende Veröffentlichungen vor: KANITAKIS ET AL (1989, n= 8) beschrieben eine deutliche HSP27-Reaktivität in Spinaliomen und folgerten, dass die

HSP27-Expression mit dem Differenzierungsgrad normaler und neoplastischer Keratinozyten, nicht jedoch mit dem biologischem Verhalten oder histologischen Merkmalen von Hauttumoren korreliert. Auch in einer aktuellen Studie von KIRIYAMA ET AL (2001), in der die HSP27-Expression in Spinaliomen bestimmt und mit Differenzierungsmarker Cytokin10 korreliert wurde, wird HSP27 als Differenzierungsmarker und nicht als Malignitätskriterium postuliert. Von GANDOUR-EDWARDS ET AL (1994) beschrieben eine schwächere HSP27-Anfärbbarkeit an der Invasionsfront von Spinaliomen (n=2), also in jenen Tumorarealen, in denen man ehesten eine zunehmende Entdifferenzierung erwarten würde. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Vermutungen KANITAKIS und KIRIYAMA insofern, als dass sämtliche gut differenzierte Spinaliome des Materials eine deutliche HSP27-Reaktivität zeigen, während sie bei den mäßig und wenig differenzierten Tumoren häufig nur schwach ausgeprägt ist. Inwieweit HSP27 als prognostischer Faktor für den klinischen Verlauf (Rezidivneigung, Metastasierungsrate) taugt, wäre im Rahmen prospektiver Studien zu überprüfen.

Für Metallothionein wurden bisher schwache und fokale Anfärbbarkeit in Spinaliomen beschrieben, ohne dass ein Zusammenhang mit der Invasionsfront des Tumors erwähnt wird (VAN DEN OORDS, 1994). Die Tatsache, dass sich in den untersuchten Spinaliomen häufig eine deutliche Anfärbbarkeit mit dem Metallothionein-Antikörper zeigt, obwohl in normaler Haut die Zellen des Stratum spinosum negativ sind, ist am ehesten als Zeichen einer Entartung der Tumorzellen zu sehen, die zu einer Gen-Amplifikation einzelner Proteine führen kann. Möglicherweise liegen der Metallothionein-Expression im Stratum basale unveränderter Haut und an der Invasionsfront von Spinaliomen auch ähnliche Mechanismen zugrunde, zum Beispiel eine Induktion durch angrenzende Dermiszellen. Andererseits lässt sich die vorwiegende Expression an der Invasionsfront auch damit erklären, dass Metallothionein die Rolle eines Proliferationsmarkers zugesprochen wird. Hierzu passt, dass es sich bei den Spinaliomen mit deutlicher Metallothionein-Expression ausschließlich um mäßig differenzierte handelt, während die Metallothionein-Reaktivität in den gut differenzierten Exemplaren nur schwach ausfällt. Metallothionein zeigt

also eine Korrelation mit dem histologischen Differenzierungsgrad der Spinaliome, die sich invers zur HSP27-Expression in Spinaliomen verhält.

In der HSP70-Familie fällt die Reaktivität mit dem polyklonalen HSP70-Antikörper wie in den anderen Tumorguppen nur schwach aus. Meist deutliche und zum Teil fokale Anfärbbarkeit zeigt sich jedoch bei den HSP72- und HSP73-Antikörpern. Für HSP72 ist eine konstitutive Expression in epidermalen Tumorzelllinien bekannt (TRAUTINGER ET AL, 1993), die von den vorliegenden Ergebnissen *in vivo* bestätigt wird. Die schützende Funktion von HSP70-Expression in Tumorzellen gegenüber dem Tumor-Nekrose-Faktor TNF- α ist bekannt (JÄÄTTELÄ ET AL, 1992), und es bestehen Vermutungen, dass TNF- α die Expression von HSP72 und HSP73 induziert (LOPEZ-COTARELO ET AL, 2000). Der Verdacht, dass das aggressive neoplastische Mikroklima zu einer erhöhten HSP70-Expression in Tumoren führt, wurde bereits 1994 von LAZARIS ET AL geäußert, ohne dass spezifische Induktoren genannt werden.

Vergleicht man die Expression der untersuchten Antigene in Basaliomen und Spinaliomen, scheint keiner der verwendeten Antikörper differentialdiagnostisch in dieser klinisch und morphologisch manchmal schwierigen Abgrenzung hilfreich zu sein (siehe auch Tabelle 12). Andere Antikörper, die zur immunhistochemischen Differenzierung dieser Tumoren verwendet werden, sind zum Beispiel Ber-EP4 und *bcl-2* (Swanson et al, 1998)

4.3 Bewertung der Methodik

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die gewählte immunhistochemische Methode im gewünschten Maße aussagekräftige Ergebnisse lieferte. Die Antikörper zeigten sich bis auf die erwähnte geringe Reaktivität des polyklonalen HSP70-Antikörpers als geeignet und die Nachweisbarkeit von HSP-Antigenen in Paraffin-fixierten Gewebeschnitten konnte erneut belegt werden. Nach Optimierung des jeweiligen Antikörpertiters ergaben sich spezifische und deutliche Färbeergebnisse. Die Methode erwies sich als wenig störanfällig und gut reproduzierbar. Die Qualität der angefertigten Präparate ist als hoch zu bewerten.

Im Gegensatz zu in-vitro-Studien an kultivierten Tumorzelllinien spiegeln die immunhistochemischen Färbungen auch die Morphologie der untersuchten Tumore wider. Der sich daraus ergebenden Heterogenität der Ergebnisse wurde bereits im Vorfeld versucht, durch Auswahl besonders typischer und eindeutiger Tumorexemplare zu begegnen. Die Tatsache, dass morphologische Charakteristika der Tumoren im Paraffinschnitt erhalten bleiben, erlaubte zum Beispiel die gezielte Bewertung von besonders aggressiven oder entzündlich veränderten Tumorarealen. Da die HSP-Verteilung im Tumorgewebe zentraler Bestandteil der Fragestellung dieser Arbeit war, erwies sich das Vorgehen trotz der Nachteile, die eine im wesentlichen qualitative Auswertung mit sich bringt, als sehr geeignet.

Zunächst kritisch zu bewerten ist das Heranziehen der um die Tumore gelegenen Haut als repräsentatives Beispiel für unveränderte Epidermis. Theoretisch ist in unmittelbarer Nachbarschaft von radiogenen oder virogenen Läsionen nicht von ungeschädigter Haut auszugehen und Aberrationen in der Proteinexpression sind in diesen Bereichen auch bei regelrechter Morphologie denkbar (siehe auch Abschnitt 4.1.1). Der wesentliche Vorteil dieser Vorgehensweise besteht in der guten Vergleichbarkeit dieser Hautabschnitte mit den untersuchten Tumoren. Da die HSP-Expression im Wesentlichen von akutem und chronischem Zellstress reguliert wird, ist es essentiell, dass Tumor und Vergleichshaut in diesen Variablen²⁴ weitestmöglich überstimmen. Nur so sind die Tumor-bedingten Veränderungen der HSP-Expression zu bewerten. Schon ein minimal differierender Entnahme- und Aufbereitungsmodus könnte zu einer Veränderung in der HSP-Expression führen. Haut, die im Rahmen plastisch-chirurgischer Eingriffe gewonnen wird, zeigt erhöhte HSP72-Level (GATTO ET AL 1992). In frisch biopsierten Keratinozyten lässt sich HSP72 auch durch einstündige Kälteexposition von 15°C oder die anschließende Wiedererwärmung auf 37°C induzieren (HOLLAND ET AL, 1993). Im vorliegenden Material stimmen Haut und Tumoren hinsichtlich Grad der chronischen UV-Exposition und Gewebeverarbeitung nach Exzision so weit als möglich überein. Die Validität der Expressionsmuster in normaler Haut wird

²⁴ z.B. kumulative und aktuelle UV-Exposition zum Entnahmezeitpunkt

darüber hinaus dadurch erhöht, dass sie unabhängig von Entität und Ätiologie des benachbarten Tumors gut übereinstimmen.

Methodisch kritisch zu betrachten ist die Tatsache, dass es sich um archivierte Material handelt und somit keine kontrollierten Entnahmebedingungen bestehen. So ist zum Beispiel eine hohe UV- oder Hitzeexposition der Haut vor Tumorexzision theoretisch nicht auszuschließen. Darüber hinaus kann die Injektion von Lokalanästhetikum mit Adrenalinzusatz vor Exzision über eine Vasokonstriktion zu einer Gewebehypoxie und konsekutivem HSP-Anstieg geführt haben. Da nach Zellstress maximale HSP-Level erst nach ungefähr einer Stunde erreicht werden (MAYTIN ET AL, 1990), dürfte dieser Mechanismus keinen quantitativ relevanten Einfluss auf die HSP- Menge haben. Eine hypoxie-bedingte Verschiebung von Hitzeschockproteinen ins nukleäre Kompartiment kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da dieser Prozess nur wenige Minuten dauert (MCCLAREN und ISSEROFF, 1994).

Fraglich ist ferner, ob man die jeweilige Entnahmestelle der Tumoren (Rumpf, Extremitäten, Gesicht) in der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigen sollte. Da für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Bereich der Lippe andere ätiologische Faktoren als in der übrigen Dermis postuliert wurden (TAMURA ET AL, 1997), wurden in dieser Studie keine Tumore dieser Region betrachtet. Darüber hinaus schien uns eine Berücksichtigung der Entnahmestelle wenig sinnvoll, da sich daraus aufgrund interindividueller Unterschiede²⁵ nur unzuverlässige Rückschlüsse auf Risikofaktoren wie chronische UV-Exposition ziehen lassen. Für einen Großteil der Präparate ist durch die Entstehung einer UV-induzierten Hautveränderung zuverlässiger auf eine entsprechende UV-Exposition zu schließen, als dies anhand der Entnahmestelle der Fall wäre. Falls hiernach von einer entsprechenden Belastung der untersuchten Hautbereiche auszugehen war, wurde dies im entsprechenden Diskussionskapitel berücksichtigt (siehe Abschnitt 4.1.1). Es liegen Veröffentlichungen vor, nach denen sich Basaliome in Populationen mit hoher chronischer UV-Exposition in ihrer HSP-

²⁵ Freizeitverhalten wie regelmäßig Solariennutzung oder Fernreisen

Expression nicht von den Tumoren in UV-geschützten Kollektiven unterscheiden (BAYERL ET AL, 1999).

4.4 Ausblick

Neugewonnene Erkenntnisse über die Funktion und Regulation von Hitzeschockproteinen eröffnen viele Möglichkeiten zu klinischer Anwendung. Szenarien, in denen ihre Schutzfunktion genutzt werden kann, um Photoschäden der Haut zu reduzieren, sind vorstellbar (MAYTIN, 1995). Eine lokale Hyperthermie vor UVB-Exposition menschlicher Haut führt zu einer messbaren Reduktion von Sunburn-Zellen (TRAUTINGER ET AL, 1996). Sunburn-Zellen stellen aller Vermutung nach apoptotische Keratinozyten und damit ein Maß für die strahlenbedingte Hautschädigung dar (ZIEGLER ET AL, 1994; KANE und MAYTIN, 1995). So könnte eine milde Hitze-Konditionierung thermische Hautschäden in der umgebenden gesunden Haut bei verschiedenen Behandlungsverfahren in der Dermatologie²⁶ reduzieren (nach MAYTIN ET AL, 1990), oder das Resultat von Hautlappenplastiken (KOENIG ET AL, 1992) und das Überleben freier myokutaner Lappen (WANG ET AL, 1998) durch eine verbesserte Ischämietoleranz verbessern. Neben einer exogenen HSP-Induktion durch Hyperthermie führt auch eine parenterale Zn^{2+} -Behandlung im Tiermodell zu erhöhter HSP70- und MT-Expression in hepatischem, respiratorischem und renalem Gewebe (KLOSTERHALFEN ET AL, 1996). Eine solche gezielte HSP-Induktion mittels Zn^{2+} -Stimulation kann die intestinale Vitalität im Tiermodell eines Mesenterialinfarktes deutlich verbessern (TÖNS ET AL, 1997). Auch eine HSP-Induktion zur Beschleunigung post-ischämischer und post-traumatischer Reparaturprozesse ist möglich, so zum Beispiel eine verbesserte Gewebe-Regeneration und Wundheilung durch laser-induzierte HSP70-Expression in Schnittwunden (SOUIL ET AL, 2001).

Erste HSP-basierte Krebsvakzine (siehe Abschnitt 1.5.4) befinden sich im Stadium klinischer Prüfung. In der Toxikologie und Umweltmedizin

²⁶ z.B. Heißwasserbehandlung von Warzen, Wärmebehandlung von Psoriasis

kann der zelluläre Stressproteingehalt als Parameter für den Belastungszustand von Geweben, der von der Zelle mobilisierten Schutzmechanismen und als Indikator für Proteintoxizität verschiedener Noxen dienen (FRANCELLA und RENSING, 1995). Die in Abschnitt 4.1.3 erwähnte neu entwickelte Methodik der intrazellulären Injektion von Mikro-Antikörpern gegen Hitzeschockproteine (BAYERL und JUNG, 1999) eröffnet unzählige Möglichkeiten für weitere funktionell orientierte Studien. Ein umfassendes und nahezu vollständiges Verständnis der Funktionen von Hitzeschockproteinen scheint damit innerhalb der nächsten Jahre in Reichweite zu rücken.

4.5 Tabellarische Zusammenfassung

	HSP27	HSP32	HSP72	HSP73	HSP70	Metallo- thionei n
Stratum corneum	-	+	+	- / (+)	- / (+)	-
suprabasale Zellschic hten	+	(+) / +	(+) / +	+	(+) / +	- / (+)
Basalzellen	- / (+)	- / (+)	(+)	-	(+)	+
Anhangsgebil de und Dermis	bes. ekkrine Drüsen +	Drüsen +, Stroma + bes. Makrophagen	Drüsen +	Drüsen +, Stroma +, Muskeln +	z. T. (+), Skelettmusk. +	Drüsen u. Fibroblasten n +
überwiegende Funktion	Differenzie- rungsmarker	Zytoprotektor, Entzündungs- mediator	UV- Protektor	Differenzie- rungsmarker	Kumulative HSP72/ HSP73- Expression	Proliferatio nsmarker

Tabelle 11: schematisierte Zusammenfassung der Ergebnisse in unveränderter Epidermis, die Grauschattierung korreliert mit der Färbeintensität

Antikörper überwiegende Funktion	HSP 27 Differenzierungs- marker	HSP 32 Entzündungs- mediator ?	HSP 72 UV-Protector	HSP 73 Differenzierungs- marker	HSP 70 Kumulative HSP72/ HSP73- Expressio n	Metallthionein Proliferations marker
Aktinische Keratose	unregelmäßig, fokal +	(+)	(+)	unregelmäßig	-	-
seborrhische Keratose	z.T. wie norm. Haut, z.T. unregelmäßig	- / (+)	wie in normaler Haut	z.T. wie n Haut, z.T. unregelmäßig	wie in normaler Haut	- / diffus (+)
Basaliom	zentrale Tumorbereich einzeln +	(+)	(+) / +, besonders Tumorränder +	+ , z.T. besonders Invasionsfront	- , z.T. Tumorrand +	(+) / + , z.T. besonders Invasionsfront
Spinaliom	(+) / + , z.T. fokal +	(+) / +	(+) / + , z.T. fokal +	+ , z.T. fokal u. einzeln	- / (+)	+ , z.T. besonders Invasionsfront
Verruca vulgaris	wie in normaler Haut	wie in normaler Haut	wie in normaler Haut	z.T. wie normale Haut, z.T. netzartig	(+)	wie in normaler Haut

Tabelle 12: stark vereinfachte Zusammenfassung der Antigen-Expression in den verschiedenen Tumoren

5 ABBILDUNGEN

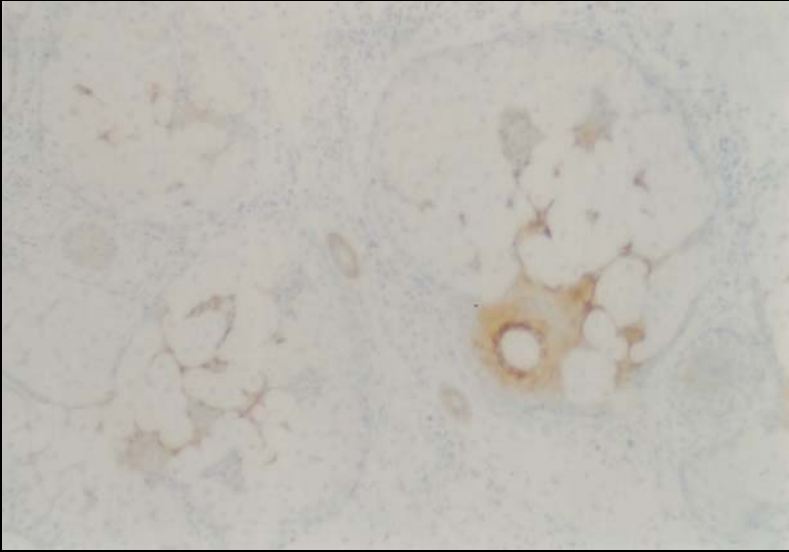


Abbildung 4: Talgdrüsen in HSP27-Färbung (6/35A-2098A)

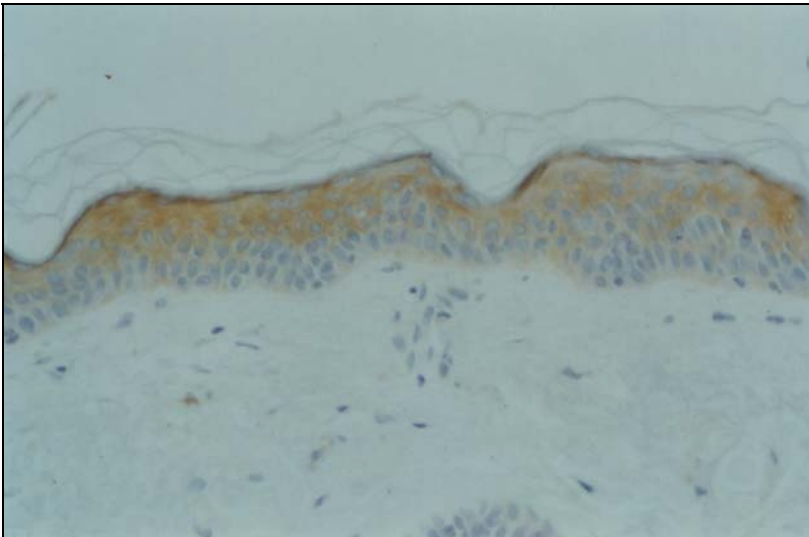


Abbildung 5: HSP27-Färbung einer aktinischen Keratose. Besonders in der rechten Bildhälfte unregelmäßige, d.h. nicht an Epidermisschichten gebundene Expression (9/11-1992A2)

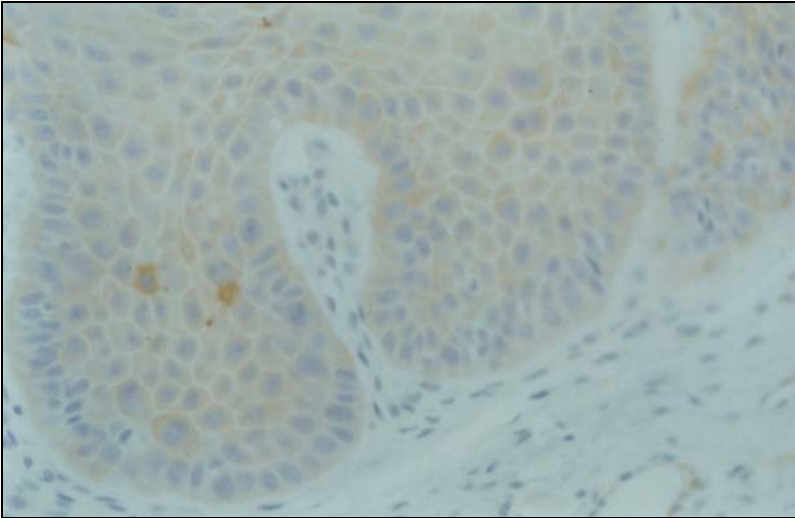


Abbildung 6: HSP27-Färbung einer aktinischen Keratose mit einzelnen positiven Zellen im Stratum spinosum (9/1-621)

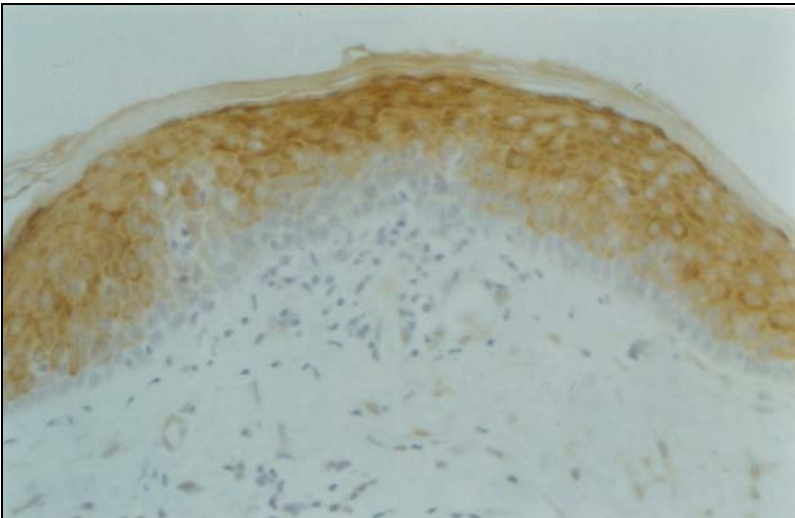


Abbildung 7: deutliche Anfärbung apikaler Zellschichten in der HSP73-Färbung einer aktinischen Keratose. Am rechten Bildrand besteht eine klare Grenze zur negativen Basalzellschicht, während die Schichtung im mittleren Bildbereich weniger deutlich ist. (9/18-2095A5)

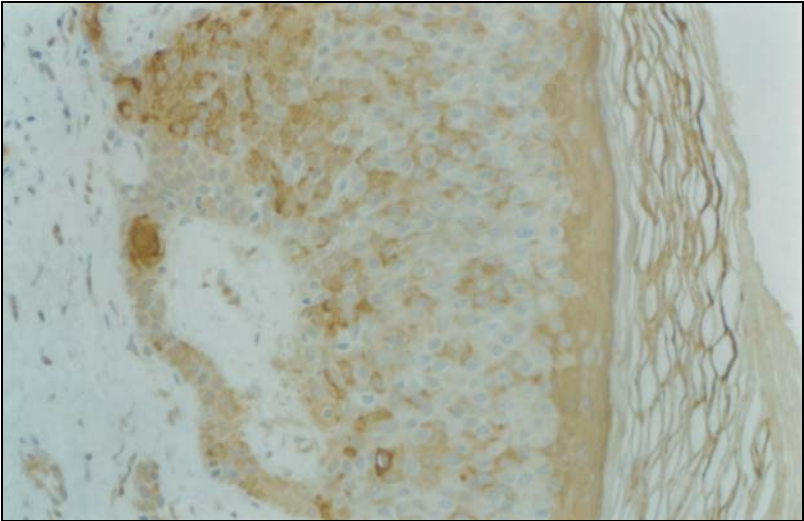


Abbildung 8: unregelmäßig, fleckige Anfärbung einer aktinischen Keratose mit dem HSP73-Antikörper (9/24-2223B)

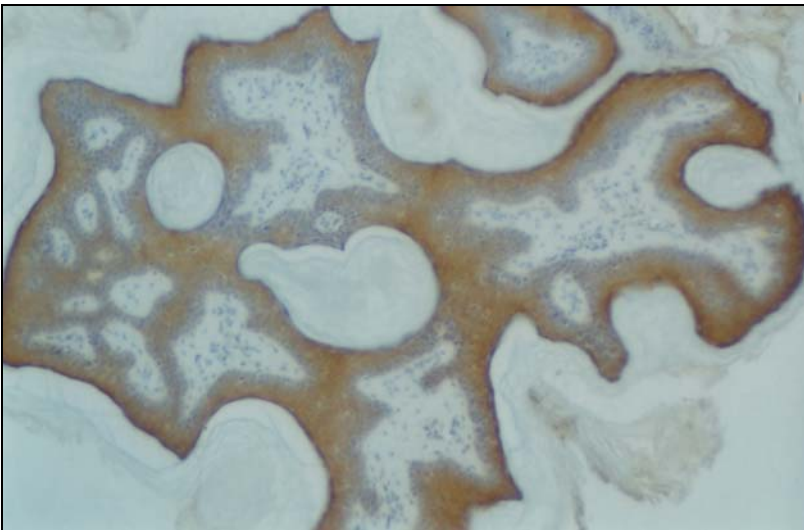


Abbildung 9: HSP27-Färbung ein seborrhoischen Keratose. Deutliche Bevorzugung apikaler Schichten und intensive Anfärbung der Verhornungszonen (10/13A-146B)

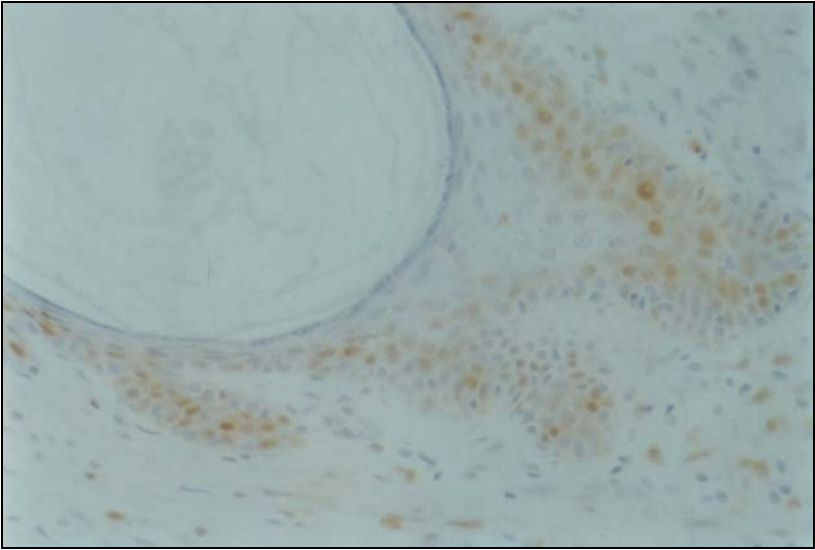


Abbildung 10: Metallothionein-Färbung einer seborrhoischen Keratose. Einzelne positive Zellen, zum Teil mit nukleär betonter Anfärbung. (10/4A-310)

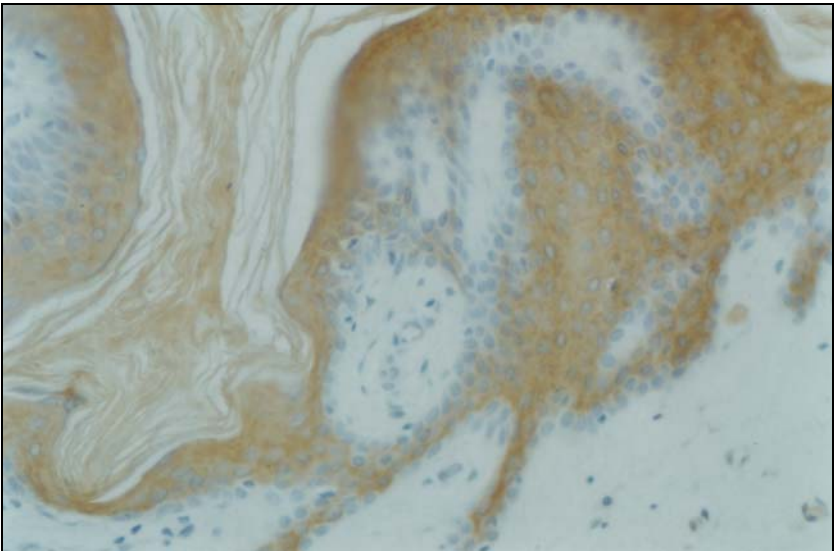


Abbildung 11: HSP73-Färbung einer seborrhoischen Keratose mit erhaltener negativer Basalzellreihe (9/10A-1181)

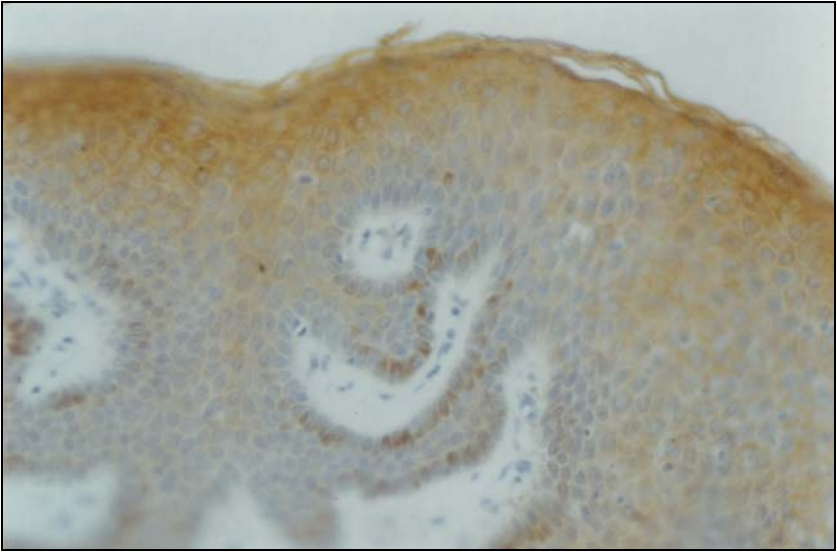


Abbildung 12: HSP73-Färbung einer seborrhoischen Keratose. Fokal deutlich positive Reaktion der Basalzellschicht (9/30-2214)

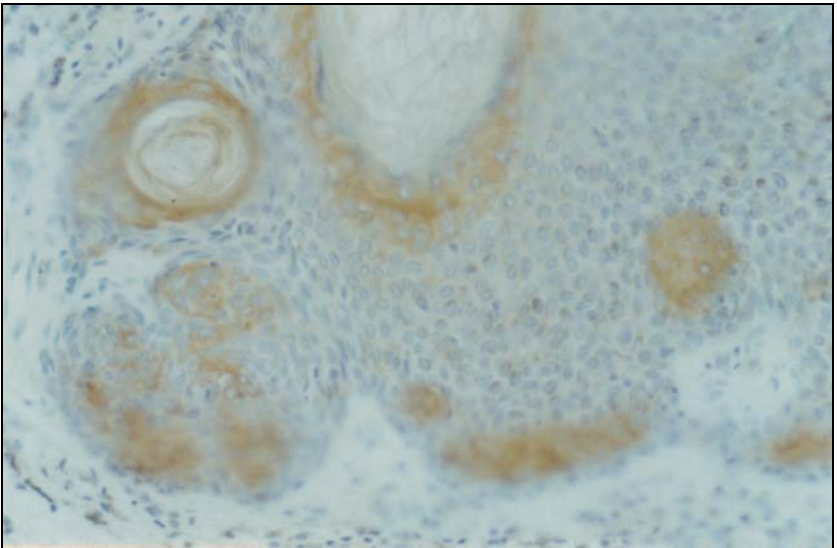


Abbildung 13: HSP73-Färbung einer seborrhoischen Keratose. Fokal deutlich positiv reagierende Zellnester (9/35-1839)

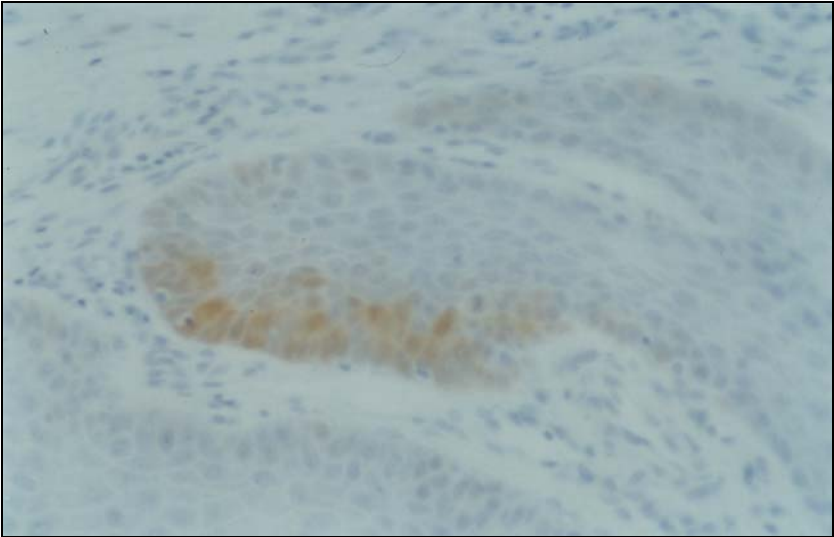


Abbildung 14: Metallothionein-Färbung einer Verruca vulgaris: fokale Anfärbung basaler Zellschichten (11/2-23296)

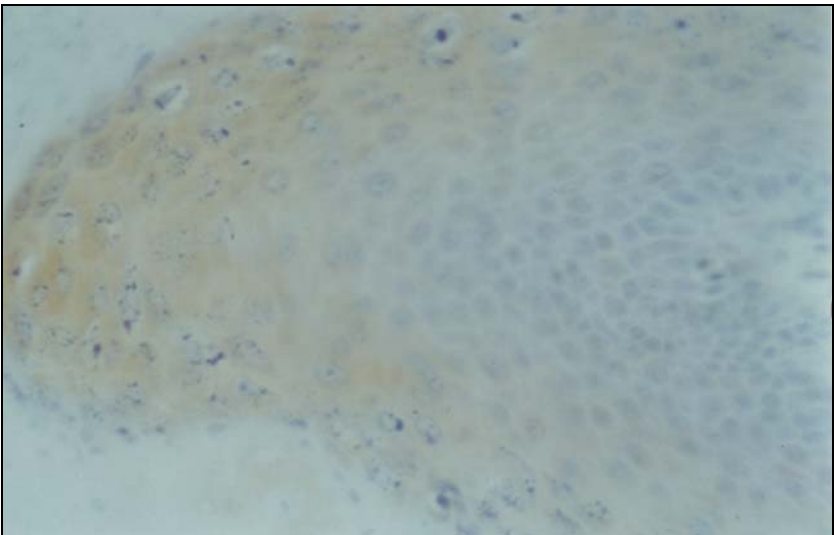


Abbildung 15: HSP70-Färbung einer Verruca vulgaris mit bevorzugter Anfärbung des Stratum granulosum (11/12-23296)

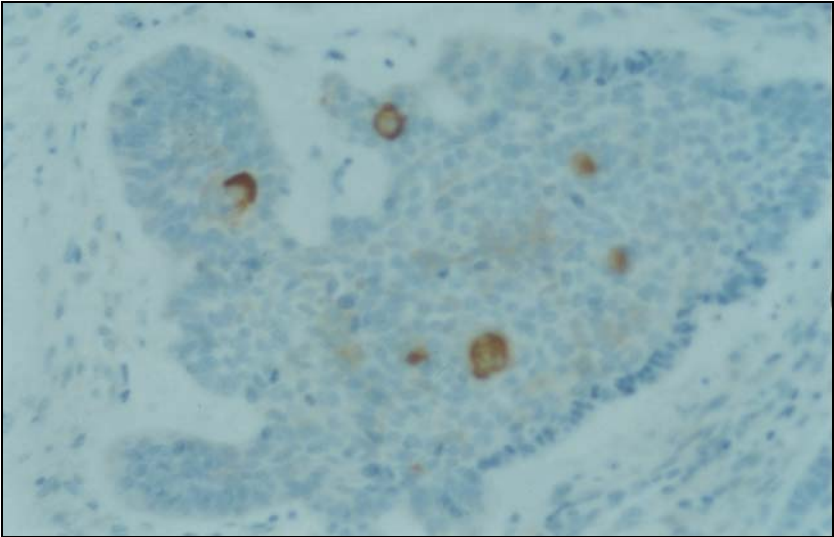


Abbildung 16: HSP27-Färbung eines Basalioms, vereinzelt liegende deutlich positive Zellen (7/29-4100)

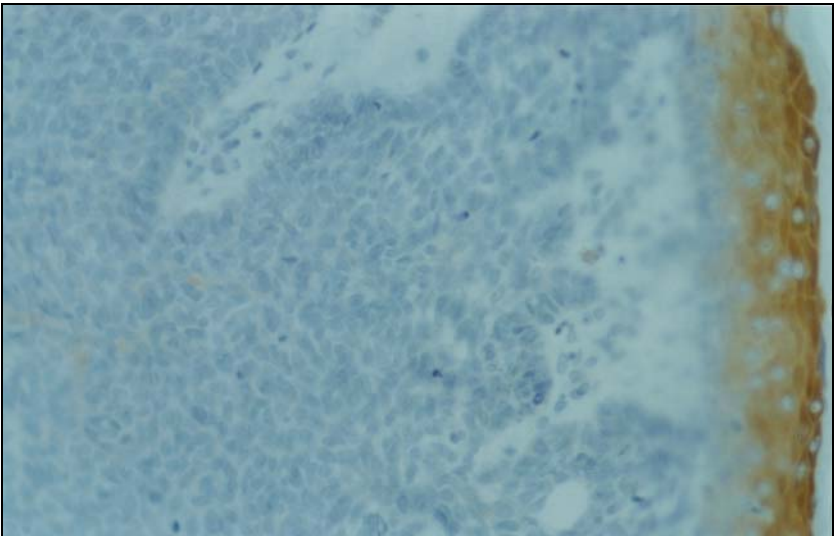


Abbildung 17: HSP27-Färbung eines Basalioms, mit zunehmender Anfärbung zur Verhornungszone hin, während tieferliegende Tumorbereiche vollständig negativ sind. (8/10-45112)

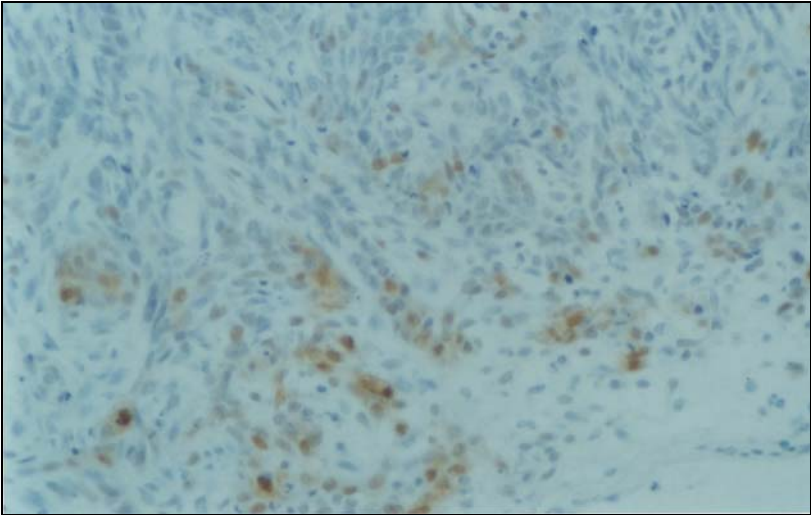


Abbildung 18: Metallothionein-Färbung eines Basalioms: einzelzellige und nukleär-betonte Positivität von Tumorzellen (7/1-249)

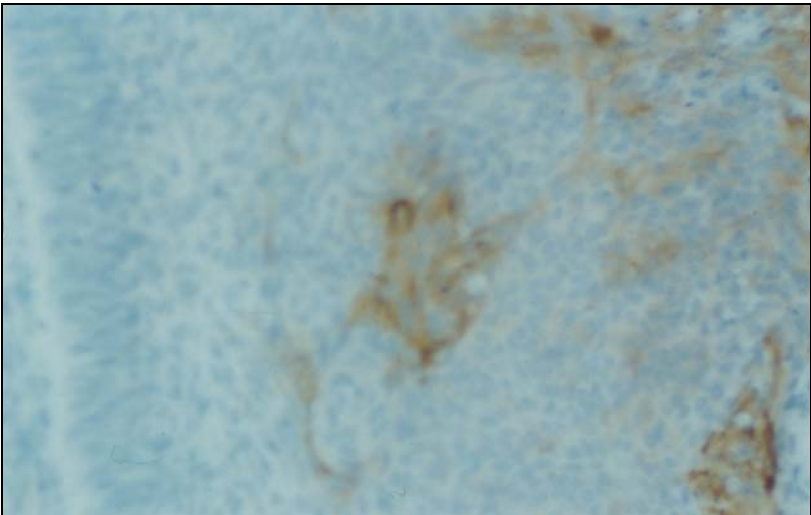


Abbildung 19: HSP73-Färbung eines Basalioms: deutliche Reaktion fokaler Tumorbereiche. (7/32-4100)

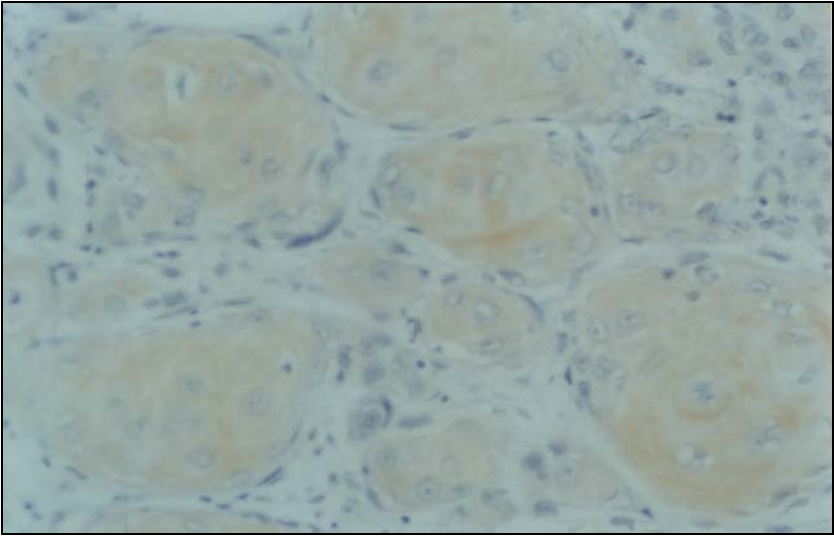


Abbildung 20: Schwach positive Reaktion im Bereich von Spinaliomzellnestern in einem HSP32 gefärbten Schnitt (12/10-35060)

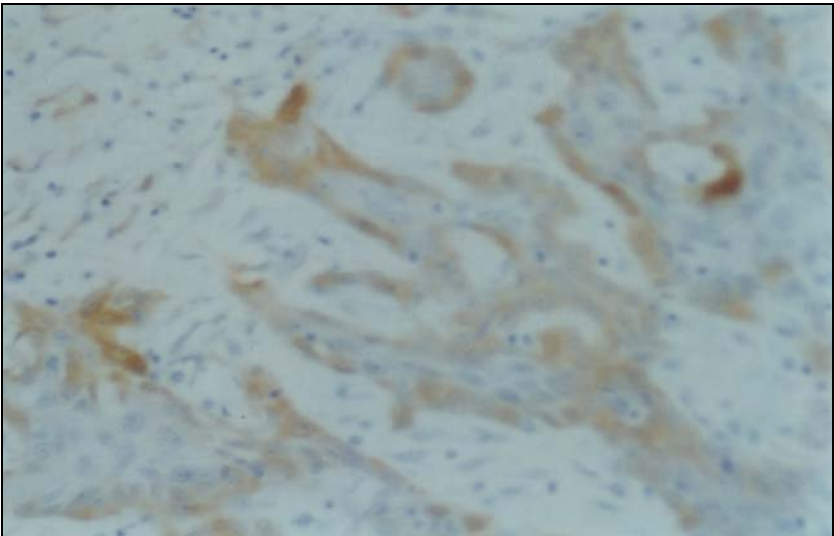


Abbildung 21: fokal positive Tumorbereiche in einem Metallothionein gefärbten Spinaliom (12/23-27433/2)

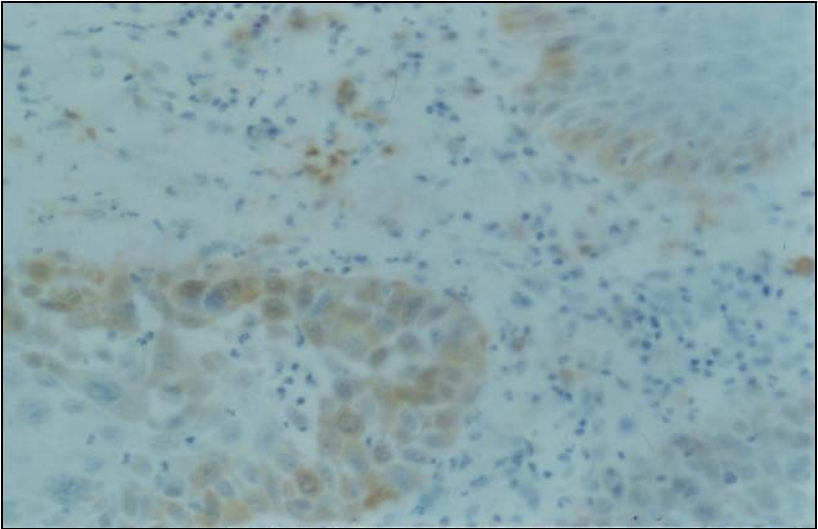


Abbildung 22: Metallothionein-Färbung eines Spinaliomausläufers, deutliche Betonung der Invasionsfront (6/26A-2098A)

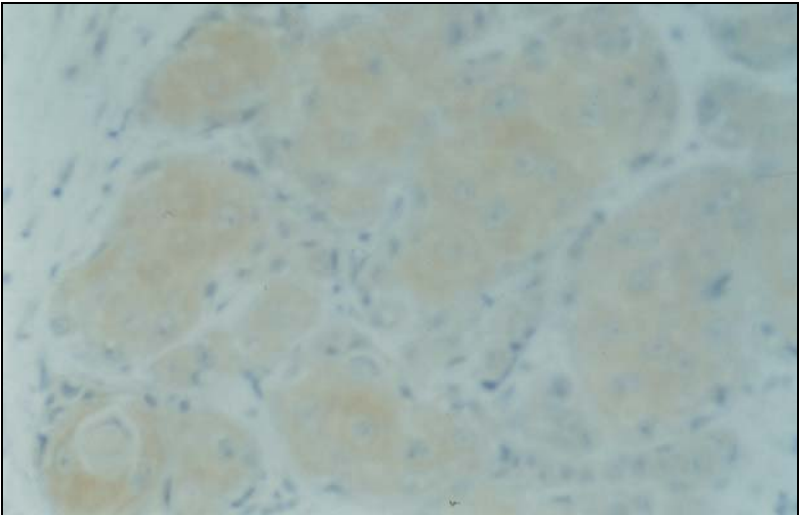


Abbildung 23: Schwach positive Reaktion in einer HSP72-Färbung eines Spinalioms (12/13-35060)

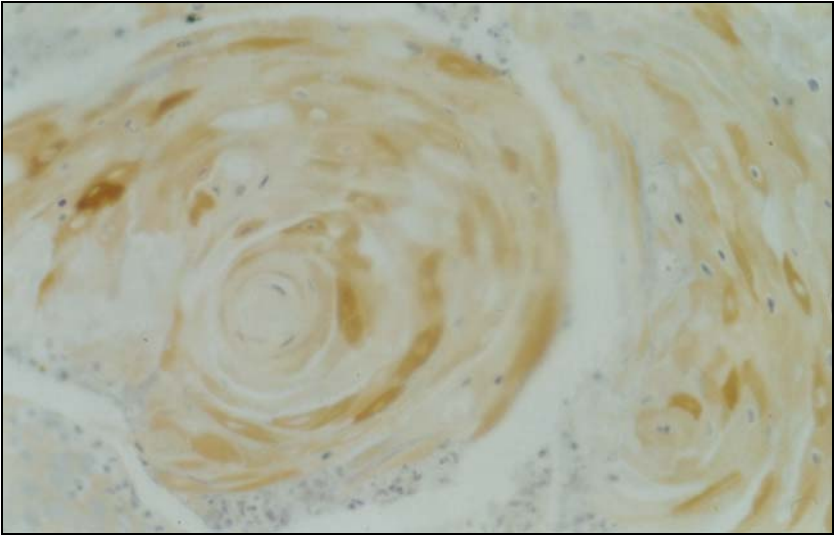


Abbildung 24: HSP73-Färbung: Beispiel einer deutlich positiven Reaktion im Bereich einer Spinaliomknoche (6/15-1638)

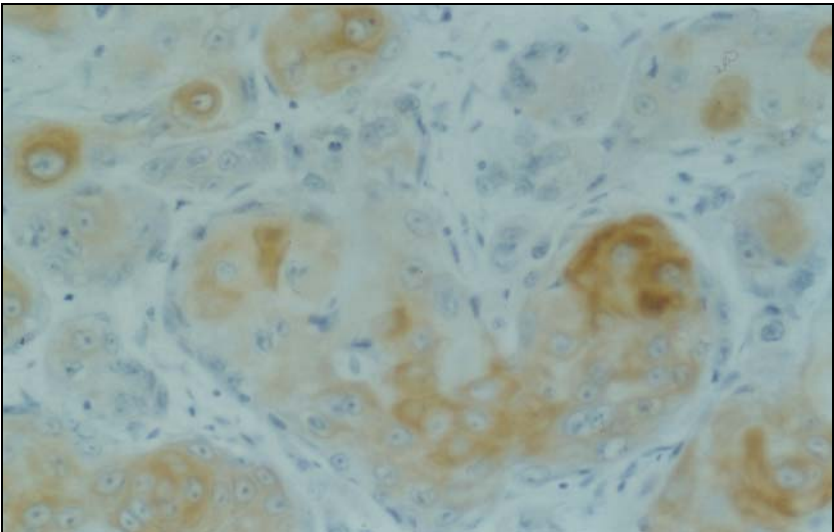


Abbildung 25: fokal deutlich positive Reaktion in einer HSP73-Färbung eines Spinalioms (12/5-35060)

6. TABELLEN

Aktinische Keratosen			Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient	Subtyp	HSP27	HSP32	MT
94-001228 A2	81, m	1. Grades	fokal +	apikal fokal +, basal (+)	-
94-001992 A	52, w	2. Grades	apikal (+), fokal +	apikal (+)	-
94-002059 A1	62, m	2. Grades	-	-	-
94-002059 A5	62, m	2. Grades	fokal apikal +	-	-
94-002223 B	75, m	2. Grades	fokal apikal +, z.T. basal +	fokal (+)	-
94-000519	77, m	3. Grades	apikal +, basal fokal (+)	(+)	+
94-002706 A	76, w	atroph	fokal (+)	fokal (+)	-
94-000621	62, m	hyperplastisch	unregelmäßig +	-	-
94-002381	61, w	hyperplastisch	fokal apikal +, z.T. basal (+)		-
94-003622/1	80, w	hyperplastisch	unregelmäßig (+)	-	-
94-004617	73, w	hypertroph	fokal +		fokal +
94-004698 A	65, w	hypertroph	netzförmig +		
94-003958/2	74, w	multizentrisch	(+)	-	
94-002223 A	75, m	nicht klassifiziert			-
94-002604 A	79, w	nicht klassifiziert			-

Tabelle 13: HSP27, HSP32 und Metallothionein-Expression in aktinischen Keratosen

Aktinische Keratosen		Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient Subtyp	HSP27	HSP32	MT
94-001228 A2	81, m 1. Grades	-	-	-
94-001992 A	52, w 2. Grades	-	-	
94-002059 A1	62, m 2. Grades	-	-	-
94-002059 A5	62, m 2. Grades	-	-	fleckig +
94-002223 B	75, m 2. Grades	-	-	fokal (+)
94-000519	77, m 3. Grades, atroph	-	-	-
94-002706 A	76, w atroph	-	apikal (+)	(+), fokal +
94-000621	62, m hyperplastisch	-	-	fleckig (+)
94-002381	61, w hyperplastisch	-	apikal +, basal (+)	apikal +, basal (+)
94-003622/1	80, w hyperplastisch	-	(+)	unregelmäßig +
94-004617	73, w hypertroph	-		
94-002223 A	75, m nicht klassifiziert	-		
94-002604 A	79, w nicht klassifiziert	-		
94-004698 A	65, w hypertroph		(+)	apikal +
94-003958/2	74, w multizentrisch		-	+
94-002706 B	76, w atroph			apikal unregelm. +

Tabelle 13: HSP70, HSP72 und HSP73-Expression aktinischer Keratosen

Seborrhoische Keratosen			Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient	Subtyp	HSP27	HSP32	MT
	t				
94-000146 B	15, w	akanthotisch	apikal +, basal (+)	fokal (+)	-
94-000146 C	15, w	akanthotisch	unregelmäßig +	apikal (+)	+
94-000777 B	65, m	akanthotisch	apikal +, basal fokal (+)	-	-
94-001851	77, m	akanthotisch	(+)	fokal (+)	-
94-003865	50, m	akanthotisch	fokal und Verhornung +	diffus (+)	fokal basal +
94-001181	58, w	akanth., pigmentiert	(+), Verhornung +	apikal (+), basal +	-
94-002462	69, m	akanth., pigmentiert	fokal +	-	-
94-003476	73, w	klonal	apikal (+)	-	
94-002971	58, w	mechanisch irritiert	unregelm. (+), Verhornung +	Verhornung unregelm.+	Str. spinosum +
94-003264	73, w	mechanisch irritiert	Verhornung +	diffus (+)	fokal (+)
94-000310	67, m	entzündet	Randbereich +	-	-
94-001228 A1	81, m	pigmentiert	Verhornung +		-
94-002214	53, w		apikal +, basal (+)	apikal (+)	-
94-001839	73, m	pigmentiert			fokal (+)
94-000391	66, w				-

Tabelle 14: HSP27, HSP32 und Metallothionein-Expression in seborrhoischen Keratosen

Seborrhoische Keratosen			Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient	Subtyp	HSP70	HSP72	HSP73
	t				
94-000146 B	15, w	akanthotisch	apikal (+)	(+)	+
94-000146 C	15, w	akanthotisch	+	-	(+)
94-000777 B	65, m	akanthotisch	-	(+)	apikal diffus +
94-001851	77, m	akanthotisch	(+)	apikal +, diffus (+)	apikal fokal +, basal fokal (+)
94-003865	50, m	akanthotisch	-	apikal (+)	fleckig +
94-001181	58, w	akanthotisch, pigmentiert	-	(+)	apikal u. Keratin +, basal (+)
94-002462	69, m	akanthotisch, pigmentiert	-	fokal (+)	apikal +, basal (+)
94-002971	58, w	mechanisch irritiert	apikal (+)	diffus (+)	apikal +
94-003264	73, w	mechanisch irritiert	-	apikal +	apikal +, basal (+)
94-000310	67, m	mechanisch irritiert	-	apikal (+)	Verhornung fokal +
94-001228 A1	81, m	pigmentiert	-	apikal (+)	apikal +, basal(+)
94-001839	73, m	pigmentiert	fokal +		apikal fokal +
94-000391	66, w		-	apikal (+), Keratin +	apikal +
94-002214	53, w		-	apikal (+)	apikal +, basal(+)
94-003476	73, w	klonal		-	fokal +

Tabelle 15: HSP70, HSP72 und HSP73-Expression in seborrhoischen Keratosen

Verrucae vulgares		Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient	HSP27	HSP32	MT
94-012048	53, m	apikal +, basal (+)	-	-
94-001641	66, m	-	-	-
94-004109	27, w	apikal +, basal (+)	apikal +	-
94-005808	68, m	apikal +, basal (+)	-	basal +
94-008057	55, w,	(+), Verhornung +	Verhornung +, basal -	fokal basal +
94-009340	52, w	apikal +, basal -	apikal +, basal (+)	-
94-015020	86, m	apikal diffus +	apikal (+)	-
94-023024	13, m	apikal +		-
94-023109	14, m	apikal +	apikal diffus (+)	basal fokal +
94-023295	35, m	apikal (+) *)	(+), Hornschicht +	basal fokal +
94-023296	49, w	apikal +	apikal +, basal(+)	basal fokal +
94-023298	13, m	apikal +, basal (+)	apikal +, basal(+)	basal fokal +
94-012354	49, m	apikal +, basal (+)	+	-
94-005805 A	66, w	apikal +	apikal (+)	basal (+)
94-013800	62, w		-	-
94-000096	18, m			-
94-014380	64, w			-

Tabelle 16: HSP27, HSP32 und Metallothionein-Expression in Verrucae vulgares

Verrucae vulgares		Expressionsmuster	
Eingangsnr.	Patient	HSP70	HSP72
94-012048	53, m	-	HSP73
94-000096	18, m	-	unregelm. Apikal betont (+)
94-001641	66, m	-	säulenförmig +, basal -
94-004109	27, w	-	apikal +, Str. Spinosum (+)
94-005808	68, m	apikal (+)	(+)
94-008057	55, w	apikal (+)	(+)
94-009340	52, w	apikal (+)	apikal betont (+)
94-013800	62, w	-	apikal (+)
94-015020	86, m	-	(+), Hornlamellen +
94-023024	13, m	-	(+)
94-023109	14, m	(+)	apikal betont (+)
94-023295	35, m	(+)	(+)
94-023296	49, w	apikal +	(+)
94-023298	13, m	apikal (+), Keratin +	apikal +; basal (+), einzel. +
94-012354	49, m	-	apikal +; basal (+), einzel. +
94-005805 A	66, w	apikal (+)	diffus (+)
94-014380	64, w	-	apikal +; basal -
			apikal (+), Keratin +

Tabelle 17: HSP70, HSP 72 und HSP73-Expression in Verrucae vulgares

Basaliome			Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient	Subtyp	HSP27	HSP32	MT
	t				
94-000842/7	67, m	keratotisch	fokal +	(+)	-
94-004134/7	71, m	metatypisch	Verhornung fokal +	(+)	unregelmäßig (+)
94-000980/2	65, m	multizentrisch	-	fokal +	an Invasionsfront +
94-004416	71, w	multizentrisch	fokal +	(+)	fokal (+)
94-001849/2	70, w	nodulär	fokal +	Stromagrenze (+), sonst -	fokal (+)
94-002098 B	83, m	nodulär	unregelmäßig (+)	-	fokal +
94-002099/5	57, w	nodulär	vereinzelte Zellen +	fokal (+)	+
94-004511/2	57, w	nodulär-ulzerierend	fokal +	-	fokal +
94-000249	61, m	nodulär-ulzerierend	fokal +	fokal (+)	fokal nukleär +
94-002223 E	75, m	oberflächlich	-	-	(+)
94-002978/5	71, w	skleridermiform	-		
94-003461 A	65, m	skleridermiform	-		-
94-003461 B	65, m	skleridermiform	fokal (+)	fokal (+)	Stroma +
94-004615	72, m	skleridermiform	fokal +		-
94-003959	56, w	solid	-	-	-
94-004100	43, w	solid	zentral fokal +	peripher fokal (+)	
94-002978/5	71, w	skleridermiform	-		
94-002223 F	75, m	multizentrisch	fokal +	Ausläufer z.T. (+)	+

Tabelle 18: HSP27, HSP32 und Metallothionein-Expression in Basaliomen

Basaliome			Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient	Subtyp	HSP70	HSP72	HSP73
94-000842/7	67, m	keratotisch	-	(+), Verhornung +	fokal +
94-004134/7	71, m	metatypisch	-	apikal (+)	apikal +
94-000980/2	65, m	multizentrisch	-	(+)	fokal +
94-004416	71, w	multizentrisch	+	(+)	fokal +
94-001849/2	70, w	nodulär	-	(+), Invasionsfront +	+
94-002098 B	83, m	nodulär	randbetont +	(+)	fokal +
94-002099/5	57, w	nodulär	-	(+)	+
94-004511/2	57, w	nodulär-ulzerierend	-	-	apikal +, basal (+)
94-000249	61, m	nodulär-ulzerierend	-	fokal +	fokal +
94-002223 E	75, m	oberflächlich	-	-	+
94-003461 A	65, m	skleridermiform	-	(+)	+
94-003461 B	65, m	skleridermiform	diffus (+)	fokal (+)	+
94-004615	72, m	skleridermiform	-	-	fokal (+)
94-003959	56, w	solid	-		+
94-002223 F	75, m	multizentrisch	-	unregelmäßig (+)	fokal +, Ausläufer (+)
94-004100	43, w	solid		fokal (+)	fokal (+), Invasionsfront +

Tabelle 20: HSP70, HSP72 und HSP73-Expression in Basaliomen

Spinaliome			Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient	Subtyp	HSP27	HSP32	MT
94-025664	59, m	wenig differenziert	-	-	
94-000622/2	74, w	mäßig differenziert	diffus (+)	-	-
94-002098 A	83, m	mäßig differenziert	Verhornung +	(+)	an Invasionsfront +
94-027303	81, w	mäßig differenziert	fokal einzelz. +	Verhornung (+)	
94-027383 A5	74, m	mäßig differenziert	fokal (+)	-	an Invasionsfront +
94-035060	62, m	mäßig differenziert	fokal (+)	+	fokal +
94-019864 H	62, m	hoch differenziert	fokal +	(+)	
94-001638	66, m	gut differenziert	apikal +	diffus (+)	(+)
94-024758 B	82, w	gut differenziert	fokal +	Zapfen +	fokal (+), Invasionsfront +
94-026857 B			Verhornung +	-	-
94-018575/5	72, w		homogen (+)	-	basal (+)
94-026857 A			fokal +	-	+

Tabelle 9: HSP27, HSP32 und Metallothionein-Expression in Spinaliomen

Basaliome			Expressionsmuster		
Eingangsnr.	Patient	Subtyp	HSP70	HSP72	HSP73
94-000622/2	74, w	mäßig diff., ulzerierend	-	(+)	fokal +
94-002098 A	83, m	mäßig differenziert	-	fokal (+), Verhornung +	diffus (+), einzelz. +
94-027383 A5	74, m	mäßig differenziert	-	heterogen (+)	(+), fokal +
94-035060	62, m	mäßig differenziert	-	+	apikal +, sonst(+)
94-001638	66, m	gut differenziert	-	(+)	apikal +, basal fokal +
94-024758 B	82, w	gut differenziert	(+)		
94-026857 B		nicht klassifiziert	-	+	apikal +
94-018575/5	72, w		(+)	(+), Verhornung +	apikal fokal +, Invasionsfront -
94-026857 A			-	Verhornung (+)	fokal +
94-025664	59, m	wenig differenziert		(+), Verhornung +	
94-027303	81, w	mäßig differenziert		-	-
94-019864 H	62, m	hoch differenziert		(+), fokal+	

Tabelle 10: HSP70, HSP72 und HSP73-Expression in Spinaliomen

7 LITERATURVERZEICHNIS

Alam J, Smith A

Heme-hemopexin-mediated induction of metallothionein gene expression
J-Biol-Chem 1992; 267: 16379-84

Angel P, Poting A, Mallick U, Rahmsdorf HJ, Schorpp M, Herrlich P

Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts
Mol Cell Biol 1986; 6: 1760-6

Applegate LM, Noel A, Vile G, Frenk E, Tyrrell RM

Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress
Photochem-Photobiol 1995; 61: 285-91

Arrigo AP, Welch WJ

Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein
J-Biol-Chem 1987, 262:15359-69

Bauer I, Wanner GA, Rensing H, Alte C, Miescher EA, Wolf B, Pannen BH, Clemens MG, Bauer M

Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver
Hepatology. 1998 Mar; 27(3): 829-38

Bayerl C, Dorfner B, Rzany B, Fuhrmann E, Coelho CC, Jung EG

Heat shock protein HSP 27 is expressed in all types of basal cell carcinoma in low and high risk UV exposure groups.
Eur-J-Dermatol. 1999 Jun; 9(4): 281-4.

Bayerl C, Jung EG

Microinjection of an antibody against HSP 72 in keratinocytes to study acute UV injury.
Exp-Dermatol. 1999 Aug; 8(4): 247-53.

Benrath J, Zimmermann M, Gillardon F

Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation
Neurosci-Lett. 1995 Nov; 200(1): 17-20

- Berneburg M, Gattermann N, Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, Krutmann J
 Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system
 Photochem-Photobiol. 1997 Aug; 66(2): 271-5
- Birch-Machin MA, Tindall M, Turner R, Haldane F, Rees JL
 Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging
 J-Invest-Dermatol. 1998 Feb; 110(2): 149-52
- Blachere NE, Udono H, Janetzki S, Li Z, Heike M, Srivastava PK
 Heat-shock protein vaccines against cancer
 J-Immunother 1993; 14(4): 352-6
- Black HS, deGruijl FR, Forbes PD, Cleaver JE, Ananthaswamy HN, de Fabo EC, Ullrich SE, Tyrrell RM
 Photocarcinogenesis: an overview
 J-Photochem- Photobiol.-B 1997 Aug; 40(1): 29-47
- Blake MJ, Udeslman R, Feulner GJ, Norton DD, Holbrook NJ
 Stress-induce heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response
 Proc-Nat-Acad-Sci USA 1991; 88: 9873
- Boehncke WH, Dahlke A, Zollner TM, Sterry W
 Differential expression of heat shock protein 70 (HSP 70) and heat shock cognate protein 70 (HSC70) in human epidermis
 Arch-Dermatol-Res. 1994; 287(1): 68-71
- Borger DR, Essig DA
 Induction of HSP 32 gene in hypoxic cardiomyocytes is attenuated by treatment with N-acetyl-L-cysteine
 Am-J-Physiol. 1998 Mar; 274(3 Pt 2): H965-73
- Brady FO, Webb M, Mason R
 Zinc and copper metabolism in neonates: role of metallothionein in growth and development in the rat
 Dev-Toxicol-Environ-Sci 1982 ; 9 : 77-98
- Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH
 Dermatologie und Venerologie, S. 671f, 1291f, 1303ff, 1324ff
 Springer-Verlag Berlin 1995 ISBN-3-540-53542-X

- Bruls WAG, Slaper H, van der Leun JC, Berrens L
Transmission of human epidermis and stratum corneum as function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths
Photochem-Photobiol 1984; 40: 485-94
- Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP
COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer
Carcinogenesis. 1998 May; 19(5): 723-9
- Charveron M, Calvo M, Gall Y
Cell stress and implications of the heat-shock response in skin
Cell-Biol-Toxicol. 1995 Aug; 11(3-4): 161-5
- Chen CH, Wang TL, Hung CF, Yang Y, Young RA, Pardoll DM, Wu TC
Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene.
Cancer-Res. 2000 Feb 15; 60(4): 1035-42.
- Ciocca D, Lucque E
Immunological evidence for the identity between hsp27 estrogen-regulated heat shock protein and the p29 estrogen-receptor-associated protein in breast and endometrial cancer
Breast-Cancer-Res-Treatment 1991; 20: 33-42
- Ciocca DR, Adams DJ, Edwards DP, Bjercke RJ, McGuire WL
Distribution of an Estrogen-induced protein with a molecular weight of 24.000 in normal and malignant human tissues and cells
Cancer-Res 1982; 42: 4256-8
- Ciocca DR, Adams DJ, Bjercke RJ, Edwards DP, McGuire WL
Immunohistochemical detection of an Estrogen-regulated protein by monoclonal antibodies
Cancer-Res 1983; 43: 1204-10
- Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK
Heat shock protein HSP70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications
J-Natl-Cancer-Inst 1993; 85(7): 570-4
- Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SA
Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review
J-Natl-Cancer-Inst. 1993 Oct 6; 85(19): 1558-70

- Clark JE, Green CJ, Motterlini R
Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway in keratinocyte proliferation
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1997 Dec 18 ; 241(2) : 215-20
- Delhaye M, Gulbis B, Mairesse N
Expression of 27kD heat shock protein isoforms in human neoplastic and nonneoplastic liver tissues
Hepatology 1992; 16: 382-9
- DeNagel DC, Pierce SK
Heat shock proteins in immune responses
CRC Crit-Rev-Immunol 1993; 13: 71-81
- Dressel R, Heine L, Elsner L, Geginat G, Gefeller O, Kolmel KF, Gunther E
Induction of heat shock protein 70 genes in human lymphocytes during fever therapy
Eur-J-Clin-Invest. 1996 Jun; 26(6): 499-505
- Durnam DM, Palmiter RD
Transcriptional regulation of the metallothionein-I gene by heavy metals
J-Biol-Chem 1981; 256: 5712-6
- Eckert RL
Structure, function and differentiation of the keratinocyte
Phys-Rev 1989 Oct, 69(4): 1316-46
- Edwards MJ, Marks R, Dykes PJ, Merrett VR, Morgan HE, O'Donovan MR
Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts
J-Invest-Dermatol 1991, 96: 392-96
- Edwards MJ, Nazmi N, Mower C, Daniels A
Hsp72 antigen expression in the proliferative compartment of involved psoriatic epidermis.
J-Cutan-Pathol. 1999 Nov; 26(10): 483-9.
- Feige U, Polla BS
Hsp70 – a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications
Experientia. 1994 Nov 30; 50(11-12) 979-86
- Feller AC, Parwaresch MR
Simultaneous enzyme-immuno-cytochemical detection of antigens in monocellular specimens with monoclonal antibodies
J-Immunol-Methods 1983; 63: 273-79

- Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C
Unusual expression and localization of heat-shock-proteins in human tumor cells
Int-J-Cancer 1992; 51: 613-9
- Fornace AJ, Schalch H, Alamo I
Coordinate induction of metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation
Mol Cell Biol 1988; 8: 4716-20
- Fracella F, Rensing L
(Stress proteins: their growing significance in medicine)
Naturwissenschaften 1995 Jul; 82(7): 303-9
- Fuqua SA, Benedix MG, Krieg S, Weng CN, Chamness GC, Oesterreich S
Constitutive overexpression of the 27,000 dalton heat shock protein in late passage human breast cancer cells
Breast-Cancer-Res-Treat 1994; 32(2): 177-86
- Fuqua SA, Oesterreicher S, Hilsenbeck SG, Von-Hoff DD, Eckardt J
Heat shock proteins and drug resistance
Breast-Cancer-Res-Treat 1994; 32(1), 67-71
- Gandour-Edwards R, McClaren M, Isseroff RR
Immunolocalization of Low-Molecular-Weight Stress Protein HSP 27 in normal skin and common cutaneous lesions
Am-J-Dermatopath. 1994; 16(5): 504-9
- Garmyn M, Degreef H, Gilchrist BA
The effect of acute and chronic photodamage on gene expression in human keratinocytes
Derm 1995; 190: 305-8
- Garmyn M, Yaar M, Boileau N, Backendorf C, Gilchrist B
Effect of aging and habitual sun exposure on the genetic response of cultured human keratinocytes to solar-stimulated irradiation
J-Invest-Dermatol 1992; 99: 743-8
- Garmyn M, Yaar M, Holbrook N, Gilchrist BA
Immediate and delayed molecular response of human keratinocytes to solar – simulated irradiation
J-Lab-Invest 1991; 65: 471-8
- Gatto H, Viac J, Charveron M, Schmitt D
Effects of thermal shocks on interleukin-1 levels and heat shock protein 72 (HSP72) expression in normal human keratinocytes
Arch-Dermatol-Res. 1992; 284(7): 414-7

- Ghoreishi M, Yokozeki H, Hua WM, Nishioka K
Expression of 27 KD, 65 KD and 72/73 KD heat shock protein in atopic dermatitis: comparison with those in normal skin and contact dermatitis.
J-Dermatol. 2000 Jun; 27(6): 370-9.
- Graner, M; Raymond, A; Romney, D; He, L; Whitesell, L; Katsanis, E
Immunoprotective activities of multiple chaperone proteins isolated from murine B-cell leukemia/lymphoma.
Clin-Cancer-Res. 2000 Mar; 6(3): 909-15.
- Gress TM, Muller-Pillasch F, Weber C
Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma
Cancer Res 1994; 54(2): 547-51
- Günther E, Walter L
Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates
Experientia 1994; 50: 987-1001
- Hall P, McKee PH, Menage HP, Dover R, Lane DP
High levels of p53 protein in UV-induced normal human skin
Oncogene 1993; 8: 203-7
- Hang H, Fox MH
Levels of 70-kD heat shock protein through the cell cycle in several mammalian cell lines
Cytometry, 1996 Dec 1; 25(4): 367-73
- Hartl FU
Molecular chaperones in cellular protein folding
Nature 1996 Jun 13; 381(6583): 571-9
- Hashiba H, Hosoi J, Karasawa M, Yamada S, Nose K, Kuroki T
Induction of metallothionein mRNA by tumor promoters in mouse skin and its constitutive expression in papillomas
Mol-Carcinog 1989; 2(2): 95-100
- Hipp, JD; Hipp, JA; Lyday, BW; Minev, BR
Cancer vaccines: an update.
In-Vivo. 2000 Sep-Oct; 14(5): 571-85.
- Holland DB, Roberts SG, Wood EJ, Cunliffe WJ
Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes
J-Invest-Dermatol 1993; 101: 196-9

- Honore B, Rasmussen HH, Celis A et al
The molecular chaperones HSP28, GRP78, endoplasmic, and calnexin exhibit strikingly different levels in quiescent keratinocytes as compared to their proliferating normal and transformed counterparts: cDNA cloning and expression of calnexin
Electrophoresis 1994; 15:3-4
- Immenschuh S, Kietzmann T, Hinke V, Wiederhold M, Katz N, Muller-Eberhard U
The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures
Mol-Pharmacol. 1998 Mar; 53(3): 483-91
- Isseroff RR, Lombard LM, McClaren M
Multiple isoforms of the heat shock protein HSP27 and their unique patterns of subcellular localization in human keratinocytes
J-Invest-Dermatol 1993, 100 (4): 579
- Ito K, Ikeda S, Shibata T, Yano T, Horikawa S
Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-I in rat liver after ischemia
Biochem-Mol-Biol-Int. 1997 Oct; 43(3): 551-6
- Jäättelä M
Escaping cell death: survival proteins in cancer
Exp-Cell-Res 1999; 248: 30-43
- Jäättelä M, Wissing D, Bauer PA, Li GC
Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity
EMBO J 1992; 11: 3507
- Jansen T, Muller S, Kaudewitz P, Plewig G
Spinozelluläres Karzinom
Fortschr-Med. 1998 Mar 30; 116(9): 49-50
- Jantschitsch C, Kindas-Mugge I, Metze D, Amann G, Micksche M, Trautinger F
Expression of the small heat shock protein HSP 27 in developing human skin.
Br-J-Dermatol. 1998 Aug; 139(2): 247-53.
- Jindal S, Malkovsky M
Stress responses to viral infection
Trends-Microbiol. 1994 Mar; 2(3): 89-91
- Jolly C, Morimoto RI
Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death
J-Natl-Cancer-Inst 2000 Oct; 92 (19): 1564-72

- Kägi JHR
Overview of metallothionein
Methods-Enzymol 1991; 205: 613-26
- Kägi JHR, Vallee BL
Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex
Int-J-Biol-Chem 1960; 235: 3460-5
- Kaji T, Yamamoto C, Tsubaki S, Ohkawara S, Sakamoto M, Sato M, Kozuka H
Metallothionein induction by cadmium, cytokines, thrombin and endothelin-1 in cultured vascular endothelial cells
Life-Sci 1993; 53: 1185-91
- Kampinga HH
Thermotolerance in mammalian cells: protein denaturation and aggregation, and stress proteins
J-Cell-Sci 1993; 104: 11-7
- Kane KS; Maytin EV
Ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes in murine skin is reduced by mild local hyperthermia
J-Invest-Dermatol 1995; 104: 62-7
- Kanitakis J, Zambruno G, Viac J, Tommaselli L, Thiovolet J
Expression of an estrogen receptor-associated protein (p29) in epithelial tumors of the skin
J-Cutan-Pathol 1989 ; 16 : 272-6
- Kartasova T, van-de-Putte P
Isolation, characterization, and UV-stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes
Mol-Cell-Biol 1988; 8: 2195-203
- Kato M, Herz F, Kato S, Hirano A
Expression of stress-response (heat-shock) protein 27 in human brain tumors: an immunohistochemical study
Acta-Neuropathol 1992; 83: 420-2
- Keyse S, Applegate L, Tromvoukis Y, Tyrrell RM
Oxidant stress leads to transcriptional activation of the human heme oxygenase gene in cultured skin fibroblasts
Mol-Cell-Biol 1990; 10: 4967-9

- Keyse SM, Tyrrell RM
Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32 kDa stress protein in normal human skin fibroblasts
J Biol Chem 1987; 262: 14821-5
- Keyse SM, Tyrrell RM
Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite
Proc-Natl-Acad-Sci-USA 1989; 86: 99-103
- Khandjian EW, Tuerler H
Simian virus 40 and polyoma virus induce synthesis of heat shock proteins in permissive cells
Mol-Cell-Biol 1983; 3: 1-8
- Kindas-Mügge I, Trautinger F
Increased expression of the 27kD heat shock protein (hsp27) in *in vitro* differentiated normal human keratinocytes
Cell Growth Differ 1994; 5: 777-81
- Kiriyama MT, Oka M, Takehana M, Kobayashi S
Expression of a small heat shock protein 27 (HSP27) in mouse skin tumors induced by UVB-irradiation.
Biol-Pharm-Bull. 2001 Feb; 24(2): 197-200
- Kitano Y, Okada N
Organization and disorganization of actin filaments in human epidermal keratinocytes
Cell-Tissue-Res 1990; 261: 269-74
- Klosterhalfen B, Töns C, Hauptmann S, Tietze L, Offner FA, Kupper W Kirkpatrick CJ
The influence of heat shock protein 70 and metallothionein induction by zinc-bis-(DL- hydrogenaspartate) on the release of inflammatory mediators in a porcine model of recurrent endotoxemia
Biochem-Pharmacol 1996 Oct 25; 52(8): 1201-10 MB vorhanden Pz1727
- Koenig WJ, Lohner RA, Perdrizet GA, Lohner ME, Schweitzer RT, Lewis VL Jr
Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery
Plast-Reconstr-Surg. 1992 Oct; 90(4): 659-64
- Kojima Y, Berger C, Vallee BL, Kägi JHR
Amino acid sequence of equine renal metallothionein-1B
Proc-Natl-Acad-Sci 1976; 73: 3413-7

- Konstadoulakis MM, Vezeridis M, Hatziyianni E, Karakousis CP, Wanebo HJ
Molecular oncogene markers and their significance in cutaneous malignant melanoma.
Ann-Surg-Oncol. 1998 Apr-May; 5(3): 253-60.
- Kreppel H, Liu J, Liu Y, Reichl FX, Klaassen CD
Zinc-induced arsenite tolerance in mice
Fundam-Appl-Toxicol. 1994; 23(1): 32-7
- Kvam E, Hejmadi V, Ryter S, Pourzand C, Tyrrell RM
Heme oxygenase activity causes transient hypersensitivity to oxidative ultraviolet A radiation that depends on release of iron from heme.
Free-Radic-Biol-Med. 2000 Apr 15; 28(8): 1191-6
- Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG
Identification of binding sites for transcription factors NF- κ B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene
Proc-Natl-Acad-Sci-USA 1994; 92: 5987-91
- Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Aroni K, Saetta A, Davaris PS
Immunohistochemical expression of C-myc oncogene, heat shock protein 70 and HLA-DR molecules in malignant cutaneous melanoma
Virchows-Arch. 1995; 425(5): 461-7
- Leppa S, Sistonen L.
Heat shock response- pathophysiological implications
Ann-Med. 1997 Feb; 29 (1): 73-8
- Lieberman MW, Beach LR, Palmiter RD
Ultraviolet radiation-induced metallothionein-I gene is associated with extensive DNA demethylation
Cell 1983; 35: 207-14
- Lindquist S
The heat shock response
Annu Rev Biochem 1986; 55:1151-91,
- Lindquist S, Craig EA
The heat shock proteins
Annu-Rev-Genet 1988; 22: 631-7 Zs A1109
- Liu Y, Kreppel H, Liu J, Choudhuri S, Klaassen C
Oleanolic acid protects against cadmium hepatotoxicity by inducing metallothionein
J Pharmacol Exp Ther 1993; 266: 400-6

- Lopez-Cotarelo,-C; Sellhaus,-B; Baba,-H-A; Manegold,-E; Luka,-J; Handt,-S;
Mittermayer,-C; Klosterhalfen,-B; Tietze,-L
Expression of heat shock proteins 72/73 in human peritoneal mesothelial cells in vivo and in vitro.
Nephron. 2000 Jun; 85(2): 148-55.
- Macario AJ
Heat shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics and therapeutics
Int-J-Clin-Lab-Res 1994 ; 25 (2) : 59-70
- Maines M
Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications
FASEB-J 1988; 2: 2557-68
- Marx JL
Tumors: a mixed bag of cells
Science (Wash. DC) 1982; 215: 275-7
- Maytin E
Differential effects of heat shock and UVB light upon stress protein expression in epidermal keratinocytes
J-Biol-Chem 1992; 267: 23189-96
- Maytin EV
Heat shock proteins and molecular chaperones: implications for adaptive responses in the skin
J-Invest-Dermatol. 1995 Apr; 104(4):448-55
- Maytin EV, Wimberly JM, Kane KS
Heat shock modulates UVB-induced cell death in human epidermal keratinocytes: evidence of a hyperthermia inducible protective response
J-Invest-Dermatol 1994; 103: 547-53
- Maytin EV, Wimberly JM, Anderson RR,
Thermotolerance and the heat shock response in normal human keratinocytes in culture
J-Invest-Dermatol 1990, 95: 635-42
- McClaren M, Isseroff RR
Dynamic changes in intracellular localization and isoforms of the 27-kD stress protein in human keratinocytes
J-Invest-Dermatol 1994; 102: 375-81

- McGuire SE, Fuqua SAW, Naylor SL, Helin-Davis DA, McGuire WL
Chromosomal assignments of human 27kDa heat shock protein gene family
Somatic-Cell-Molec-Genet 1989; 15: 167-71
- Milarski KL, Morimoto R
Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle
Proc-Natl-Acad-Sci USA 1986; 83: 9517-21
- Minowada G
Clinical implications of the stress response
J-Clin-Invest- 1995 Jan; 95(1): 3-12
- Moller R, Reymann F, Hou-Jensen K
Metastases in dermatological patients with squamous cell carcinoma
Arch Dermatol 1979; 115: 703-5
- Morimoto RI
Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation
Cancer-Cells 1991; 3: 295-301
- Mues GI, Munn TZ, Raese JD
A human gene family with sequence homology to *Drosophila melanogaster* HSP70 heat shock gene
J-Biol-Chem 1986; 26: 874-7
- Muller RM, Taguchi H, Shibara S
Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene
J Biol Chem. 1987; 262: 6795-802
- Muramatsu T, Hatoko M, Tada H, Shirai T, Ohnishi T
Age-related decrease in the inductability of heat shock protein 72 in normal human skin
Br-J-Dermatol. 1996 Jun; 134(6): 1035-8
- Muramatsu T, Tada H, Kobazashi N, Yamji M, Shirai T, Ohnishi T
Induction of the 72-kD heat shock protein in organ-cultured normal human skin
J-Invest-Dermatol. 1992 May; 98(5): 786-90
- Nataraj AJ, Trent JC, Ananthaswamy HN
p53 gene mutations and photocarcinogenesis
Photochem-Photobiol 62 (1995): 218-30
- Noltenius H
Pathologie und Klinik der menschlichen Tumoren in 4 Bd., S. 1129ff, 1143ff, 1148ff und 1156ff
Urban & Schwarzenberg 1987, ISBN 3-541-09625-X

- Nordberg M
 Metallothionein deserves attention
 Prog-Clin-Biol-Res 1986; 214: 401-10
- Nozaki J, Takehana M, Kobayashi S
 UVB irradiation induces changes in cellular localization and phosphorylation of mouse HSP27
 Photochem-Photobiol 1997 May; 65(5): 843-8
- van den Oord JJ, DeLey M
 Distribution of metallothionein in normal and pathological human skin.
 Arch-Dermatol-Res.1994; 286(1): 62-8.
- Phillips B, Abravaya K, Morimoto RI
 Analysis of the specificity and mechanism of the transcriptional activation of the human HSp70 gene during infection by DNA viruses
 J Virol 1991; 65(11): 5680-92
- Rattan SI
 Repeated mild heat shock delays ageing in cultured human skin fibroblasts
 Biochem-Mol-Biol-Int. 1998 Jul; 45(4): 753-9
- Ricaniadis N, Kataki A, Agnantis N, Androulakis G, Karakousis CP
 Long-term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression in patients with malignant melanoma.
 Eur-J-Surg-Oncol. 2001 Feb; 27(1): 88-93.
- Ritossa F
 A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila* Experientia. 1962; 18:571-3
- Roti-Roti JL, Mackey MA, Higashikubo R
 The effects of heat shock on cell proliferation
 Cell-Prolif. 1992 Mar; 25(2): 89-99
- Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Jr.
 Prognostic factors for local recurrence, metastases, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear , and lip
 J-Am-Acad-Dermatol 1992; 26: 976-90
- Schlesinger MJ
 Heat Shock Proteins (A Minireview)
 J-Biol-Chem 1990 Jul; 256(21): 12111-4
- Shibahara S, Muller R, Taguchi H
 Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock
 J-Biol-Chem 1987; 262: 12889-92

- Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Jaattela M, Schwarz T
Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts
J Clin Invest 1995; 95(3): 926-33
- Sorger PK, Pelham HRB
EMBO J 1987; 6: 993-8
- Souil E, Capon A, Mordon S, Dinh-Xuan AT, Polla BS, Bachelet M
Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin.
Br-J-Dermatol. 2001 Feb; 144(2): 260-6.
- Spector N, Samson W, Ryan C, Gribben J, Urba W, Welch W, Nadler L
Growth arrest of human B lymphocytes is accompanied by induction of the low molecular weight mammalian heat shock protein (hsp28)
J-Immunol 1992; 148: 1668-73
- Srivastava PK
Peptide-binding heat shock proteins in the endoplasmic reticulum: role in immune response to cancer and in antigen presentation
Adv-Cancer-Res 1993; 62: 153-77
- Srivastava PK, Amato RJ
Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents.
Vaccine. 2001 Mar 21; 19(17-19): 2590-7.
- Suzuki K, Watanabe M
Augmented expression of HSP72 protein in normal human fibroblasts irradiated with ultraviolet light
Biochem Biophys-Res-Commun 1992; 186: 1257-64
- Swanson PE, Fitzpatrick MM, Ritter-JH; Glusac EJ, Wick MR
Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens
J-Cutan-Pathol. 1998 Mar ; 25(3) : 153-9
- Tamura A ; Ohnishi K ; Ishikawa O ; Miyachi Y
Flow cytometric DNA content analysis of ultraviolet light-induced squamous cell carcinomas: a comparative study of squamous cell carcinomas of the lip and those arising from other sites of sun-damaged skin
Acta-Derm-Venereol. 1997 Nov; 77(6): 425-7

- Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS
Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells
Am-J-Physiol. 1998 Mar; 274(3 Pt 2): H883-91
- Tetu B, Lacasse L, Boucard HL, Lagacé R, Huot J, Landry J
Prognostic influence of HSP27 expression in malignant fibrous histiocytoma: a clinicopathological and immunohistochemical study
Cancer Res 1992; 52: 2325-28
- Thornalley PJ, Vasak M
Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals
Biochem-Biophys-Acta 1985; 827 (1): 36-44
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM
Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs
J-Mol-Biol. 1974; 84(3): 389-98
- Töns C, Klosterhalfen B, Anurov M, Titkova Bs, Tietze L, Schumpelick V
Steigerung der intestinalen Ischämietoleranz durch Stressproteininduktion (HSP 70 und Metallothionein) in einem Zink-Stimulationsmodell
Langenbecks-Arch-Chir-Suppl-Kongressbd. 1997; 114: 613-8
- Trautinger F, Kindas-Mügge I, Barlan B, Neuner P, Knobler RM
72-kD heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet light B
J-Invest-Dermatol 1995; 105: 160-2
- Trautinger F, Kindas-Mügge I, Dekrout B, Knobler RM, Metze D
Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immunohistological study
Br-J-Dermatol. 1995 Aug; 133(2): 194-202
- Trautinger F, Knobler RM, Honigsmann H, Mayr W, Kindas-Mügge I
Increased expression of the 72-kDa heat shock protein and reduced sunburn cell formation in human skin after local hyperthermia (letter)
J-Invest-Dermatol. 1996 Sep; 107(3): 442-3
- Trautinger F, Trautinger I, Kindas-Mügge I, Metze D, Luger TA
Human keratinocytes *in vivo* and *in vitro* constitutively express the 72kD heat shock protein
J-Invest-Dermatol 1993; 101: 334-8

- Tyrrell R
Redox regulation and oxidant activation of heme oxygenase-1
Free-Radic-Res. 1999 Oct; 31(4): 335-40
- Tyrrell RM
UV activation of mammalian stress proteins
EXS. 1996; 77: 255-71
- Tyrrell RM
Oxidant, antioxidant status and photocarcinogenesis: the role of gene activation
Photochem-Photobiol. 1996 Apr; 63(4): 380-3
- Tyrrell RM, Pidoux M
Action spectra for human skin cells. Estimations of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes
Cancer-Res 1987; 47: 1825-9
- Udono H, Srivastava PK
Heat shock protein 70 associated peptides elicit specific cancer immunity
J-Exp-Med 1993; 178(4): 1391-6
- Vargas-Roig LM; Fanelli MA; Lopez LA; Gago FE; Tello O; Aznar JC; Ciocca DR
Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples
Cancer-Detect-Prev. 1997; 21(5): 441-51
- Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM
Heme oxygenase-1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts
Proc-Natl-Acad-Sci-USA 1994; 91: 2607-10
- Vile GF, Tyrrell RM
Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin
J-Biol-Chem 1993 July 15, 268(20): 14678-81
- Vogt BA, Alam J, Croatt AJ, Vercellotti GM, Nath KA
Acquired resistance to acute oxidative stress: possible role of heme oxygenase and ferritin
Lab-Invest 1995; 72: 474-83
- Wang BH, Ye C, Stagg CA, Lin M, Fawcett T, VanderKolk CA, Udelsman R
Improved free musculocutaneous flap survival with induction of heat shock protein.
Plast-Reconstr-Surg. 1998 Mar; 101(3): 776-84

- Wang, XY; Kaneko, Y; Repasky, E; Subjeck, JR
Heat shock proteins and cancer immunotherapy.
Immunol-Invest. 2000 May; 29(2): 131-7.
- Webb M, Cain K
Functions of metallothionein
Biochem-Pharmacol.1982; 31 (2): 137-42
- Welch WJ
Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease
Physiol-Rev 1992; 72: 1063-81
- Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA
Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response
Nat-Med 1996; 2: 87-90
- Wilson N, McArdle A, Guerin D, Tasker H, Wareing P, Foster CS, Jackson MJ, Rhodes LE
Hyperthermia to normal human skin in vivo upregulates heat shock proteins 27, 60, 72i and 90.
J-Cutan-Pathol. 2000 Apr; 27(4): 176-82.
- Yaar M
Molecular mechanisms of skin aging
Adv-Derm 1995; 10: 63-75
- Yaar M, Gilani A, DiBenedetto PJ, Harkness DD, Gilchrist BA
Gene modulation accompanying differentiation of normal versus malignant keratinocytes
Exp-Cell-Res. 1993 Jun; 206(2): 235-43
- Yehiely F, Oren M
The gene for the rat heat-shock cognate, hsc70, can suppress oncogene-mediated transformation
Cell-Growth-Differ 1992; 3: 803-9
- Young RA
Stress proteins and immunology
Annu Rev. Immunol 1990 ; 8 : 401-20
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE
Sunburn and p53 in the onset of skin cancer
Nature 1994; 372: 773-6

8 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Mittermayer für das Überlassen des Themas und für die profunden Einblicke in sein Fachgebiet, die er im Rahmen seiner engagierten Vorlesung vermittelt hat, und bei Herrn Dr. Tietze für die unermüdliche und zuverlässige Betreuung meiner Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Leon Muys für seinen steten versierten Rat bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und vielen weiteren hilfsbereiten Mitarbeitern des Instituts für Pathologie.

Herzlich danke ich meiner Familien, Freunden und Kollegen, die diese Arbeit mit Rat und Zuspruch begleitet haben, besonders meinen Eltern für Ihre stets selbstverständliche Unterstützung, meiner Mutter und Gaby fürs Korrekturlesen, meinem Bruder fürs Einscannen der Abbildungen und Hilfe bei PC-Problemen, Alice für Ihren Einsatz in der MZB Köln und Steff, Peter, Arnd und vielen anderen für Ihre moralische Unterstützung.

LEBENS LAUF

geboren 16. Juli 1973 in Essen
Eltern Dr.-Ing. Ulrich Degenhardt (†1998)
Dipl.-Bibl. Hildegard Degenhardt, geb. Beckers

SCHULE UND STUDIUM

1979 - 83 Grunds Schulbesuch in Kiel und Essen
1989 - 90 St.-Vincent-Highschool Petaluma, Kalifornien
Juni 1992 Abitur am Goethegmnasium Essen
1992 –1999 Medizinstudium in Aachen, Maastricht und Trondheim
Aug. 1994 Ärztliche Vorprüfung (*Physikum*)
1998 - 99 Prakt. Jahr am Rikshospitalet Oslo und Luisenhospital Aachen
Dez. 1999 Abschluss des Medizinstudiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (*Staatsexamen*)

BERUFLICHER WERDEGANG

Feb. 2000 - Juli 2001 Ärztin im Praktikum, HNO-Klinik des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf (Prof. Dr. U. Koch)
Okt. 2001 - Juni 2002 Weiterbildungsassistentin, HNO-Klinik des St. Anna-Krankenhauses Duisburg (Prof. Dr. K. Sesterhenn)
seit Aug 2002 Weiterbildungsassistentin, HNO-Klinik des Marienkrankenhauses Hamburg (Prof. Dr. G. Neumann)

Hamburg, Mai 2003