Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Zillikens

Der Rekombinationsfaktor Rad51 in Tumoren der Haut: eine immunhistochemische Studie

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Monja Röske
aus Eisenhüttenstadt

2005

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Tronnier
2. Berichterstatter	Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult W. Kühnel
Tag der mündlichen Prüfung:	22.06.2006
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	22.06.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Klinik der verschiedenen Hauttumoren 2
1.1.1 Aktinische Keratose 2
1.1.2 Morbus Bowen 4
1.1.3 Plattenepithelkarzinom 5
1.1.4 Melanozytärer Nävus 6
1.1.5 Malignes Melanom 7
1.2 Von der Zelle zur Tumorzelle 10
1.3 DNA-Reparatur und homologe Rekombination 12
1.4 Der Rekombinationsfaktor Rad51 16
1.5 Zielsetzung 19

2. Material und Methoden 20
2.1 Material 20
2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien 20
2.1.2 Kits 21
2.1.3 Antikörper 21
2.1.4 Lösungen und Puffer 21
2.1.5 Geräte und Laborbedarf 22
2.1.6 Untersuchungsmaterial 22
2.2 Methoden 23
2.2.1 Aufbereitung des Untersuchungsmaterials 23
2.2.1.1 Vorbereitung des Gewebematerials 23
2.2.1.2 Antigendemaskierung 23
2.2.1.3 H_2O_2 und Tritonbehandlung 24
2.2.2 Die Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-(APAAP)-Technik 24
2.2.3 Färbung mit "Vectastain Elite ABC-Kit" 26
2.2.4 Kerngegenfärbung und Eindeckelung 27
2.2.5 Computergestützte Auswertung der gefärbten Präparate 27

2.2.5.1 Bilddokumentation 27
2.2.5.2 Bildanalyse 28
2.2.6 Statistische Analyse 30
2.2.6.1 Vergleich von Stichproben 30

3. Ergebnisse 31
3.1 Immunhistochemische Darstellung von Rad51 und Ki-67 31
3.2 Das Bildanalyseprogramm "PiClick" 32
3.3 Ergebnisse der Studie an Tumoren der Haut 33
3.3.1 Charakterisierung der Tumoren der Haut 33
3.3.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs 34
3.3.3 Rad51 in Tumoren der Haut 36
3.3.3.1 Statistische Analyse der Rad51-Expression 39
3.3.4 Ki-67 in Tumoren der Haut 42
3.3.4.1 Statistische Analyse der Ki-67-Expression 44
3.3.5 Vergleich der Rad51-Expression mit der Ki-67-Expression 47

4. Diskussion 50
4.1 Die Expression von Rad51 in normalen Zellen 53
4.2 Veränderte Rad51-Expression und Folgen 54
4.2.1 Die Herunterregulation der Rad51-Expression 54
4.2.2 Gesteigerte Rad51-Expression 55
4.3 Ursachen einer veränderten Rad51-Expression in Tumoren 60
4.4 Analyse der Studienergebnisse 62
4.4.1 Das hoch- und entdifferenzierte spinozelluläre Karzinom und die Tumorvorstufen aktinische Keratose und Morbus Bowen 63
4.4.2 Das maligne Melanom und der melanozytäre Nävus 66
4.5 Schlussfolgerung und Ausblicke 68

5. Zusammenfassung 70
6. Anhang 72
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen 78
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen 80

7. Literaturverzeichnis 81
8. Danksagung 101
Lebenslauf 102

1. Einleitung

Hautkrebs ist die weltweit häufigste Krebserkrankung in der weißen Bevölkerung. Nach Schätzungen der WHO erkranken jährlich zwei Millionen Menschen an Basal- und Plattenepithelkarzinomen und etwa 200000 am malignen Melanom. In Deutschland liegt die Zahl der Hautkrebs-Neuerkrankungen nach Breitbart (2000) bei 100000 bis 120000 pro Jahr, davon entfallen etwa 6% auf Melanome. So macht das maligne Melanom mit ca. 6300 jährlich in Deutschland neu erkrankten Menschen rund 2% aller Krebserkrankungen aus (Robert-Koch-Institut, 2002). Auf die häufiger vorkommenden bösartigen Neubildungen der Epithelzellen der Haut, Spinaliom und Basalzellkarzinom, entfallen deutlich mehr Erkrankungen, doch nur 0,2% aller Krebstodesfälle. Die Erkrankungshäufigkeit wird aber noch nicht wie beim malignen Melanom flächendeckend erfasst.

Die Häufigkeit der Diagnose „malignes Melanom der Haut“ ist in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen. Seit den 70er Jahren haben sich die Erkrankungsraten annähernd vervierfacht. Die Gründe liegen zum einen in der immer älter werdenden Bevölkerung. Zum anderen weisen epidemiologische Studien darauf hin, dass einer der pathogenetischen Faktoren bei der Tumorentstehung die Bestrahlung mit UV-Licht ist, so dass ein weiterer Grund des Anstieges der Melanomhäufigkeit in dem veränderten Umgang mit dem Sonnenlicht vermutet wird. Etwa 95% aller Karzinome treten an sonnenlichtexponierten Körperpartien, wie Gesicht, Hals, Nacken und

Handrücken, auf. Für das maligne Melanom liegt in Ländern mit starker Sonneneinstrahlung, wie Australien und den Südstaaten der USA, die Zahl der Neuerkrankungen mit bis zu 50 je 100000 Einwohner weitaus höher als in Mitteleuropa, wo die Inzidenz derzeit etwa bei 6-15 Fällen je 100000 Einwohner liegt (Garbe et al., 1997; DKZF-Heidelberg 2003). Fall-Kontroll-Studien ergaben, dass das relative Risiko für die Entwicklung von Melanomen nach schmerzhaften Sonnenbränden in der Kindheit und Adoleszenz um das 2- bis 3fache anstieg (Garbe, 1992; Garbe, 1995). Neben dem malignen Melanom gehört das Plattenepithelkarzinom zu den Krebserkrankungen der Haut, die ein Metastasierungspotential aufweisen. Der Morbus Bowen und die aktinische Keratose werden als Vorstufen bzw. als In-situ-Karzinome aufgefasst. Das Basalzellkarzinom, als häufigster maligner Hauttumor, metastasiert in der Regel nicht.

1.1 Klinik der verschiedenen Hauttumoren

1.1.1 Aktinische Keratose

Die aktinische Keratose ist gekennzeichnet durch ein unscharfes Erythem mit wechselhaft stark ausgeprägter Keratose, deren häufigste Lokalisation das Gesicht (hier besonders die Nase) und der Handrücken ist (Sober und Burstein, 1995). Ein typisch histologisches Charakteristikum ist eine kompakte Orthohyperkeratose im Wechsel mit einer Parakeratose (siehe Abb. 1). Es handelt sich um eine relativ häufige Hautveränderung in chronisch lichtexponierten Arealen der Haut. Über 60% der Menschen über 40 Jahre haben mindestens eine aktinische Keratose (Drake et al., 1995). Am häufigsten sind Menschen betroffen, die sich viel im Freien aufhalten (Farmer, Matrosen) oder in großen Höhen leben (Sober und Burstein, 1995) und somit einer erhöhten UV-Belastung ausgesetzt sind. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (Braun et al., 2000). Die aktinische Keratose kann aber auch Folge einer Exposition von Röntgenstrahlung, UV-Licht aus künstlichen Quellen oder polyzyklischen aromatischen

Kohlenwasserstoffen sein (Callen et al., 1997). In der Literatur wird konträr diskutiert, ob die aktinische Keratose eine Präkanzerose (Butani et al., 2005) oder bereits ein typisches Carcinoma in situ ist (Callen et al., 1997). In einer Studie von Marks (Marks et al., 1988) wurde gezeigt, dass eine von 1000 aktinischen Keratosen in ein invasives Plattenepithelkarzinom übergeht. Das Ausschalten des ätiologischen Faktors Sonne und verbesserte Aufklärungsarbeit und Prävention ist zur Vorbeugung der Entstehung von aktinischen Keratosen ausreichend (Marks et al., 1986). Kürettage, Elektrodissektion, Kryotherapie, Exzision und topische Chemotherapie stellen alternative Behandlungsmethoden dar (Drake et al., 1995). Moderne Therapieoptionen beinhalten die topische Immunmodulation und die photodynamische Therapie (Marmur et al., 2004).

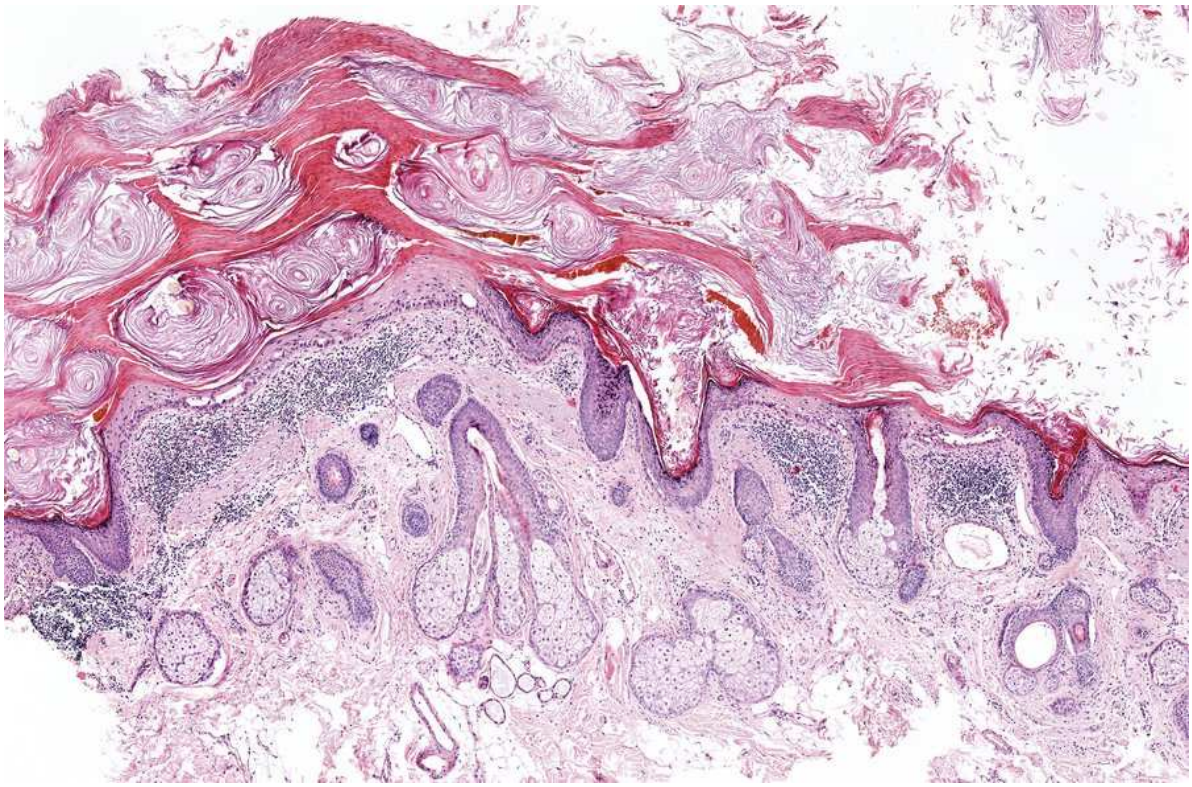


Abb. 1 Histologie der aktinischen Keratose

Hyper-parakeratotisch verhornende akanthotisch verbreiterte Epidermis. Bandförmiges Entzündungsinfiltrat in der dermoepidermalen Junktionszone. (HE (Hämalaun-Eosinfärbung) x25).

1.1.2 Morbus Bowen

Der Morbus Bowen zeigt sich als ein häufig auf sonnenexponierter, seltener auch auf sonnengeschützter Haut (Keefe und Smith, 1991) langsam wachsender, scharf begrenzter, entzündlich geröteter Herd mit variabler Verhornung. Histologisch können zahlreiche Kern- und Zellatypien bei intakter Basalmembran und irregulärer Schichtung der Epidermis nachgewiesen werden (siehe Abb. 2). Er wurde erstmals 1912 von John Templeton Bowen als eine „chronisch atypische epitheliale Proliferation“ beschrieben (Bowen, 1912). Heute zählt man ihn zu den In-situ-Karzinomen (Sober und Burstein, 1995). Der Übergang in ein Plattenepithelkarzinom wird in der Literatur mit einer Häufigkeit von 3% bis 8% (Glogau, 2000; Graham und Helwig, 1973; Kao, 1986) beschrieben. Er kann in jedem Alter auftreten, ist jedoch vor dem 30. Lebensjahr sehr selten. Die meisten Patienten sind bei der Erstdiagnose über 60 Jahre alt (Kossard und Rosen, 1992; Kovacs et al., 1996). Frauen sind häufiger betroffen als Männer (Cox, 1994; Kossard und Rosen, 1992; Thestrup-Pedersen et al., 1988). Die Therapie des Morbus Bowen besteht in der Exzision, der Kürettage oder der Kryotherapie (Cox et al., 1999).

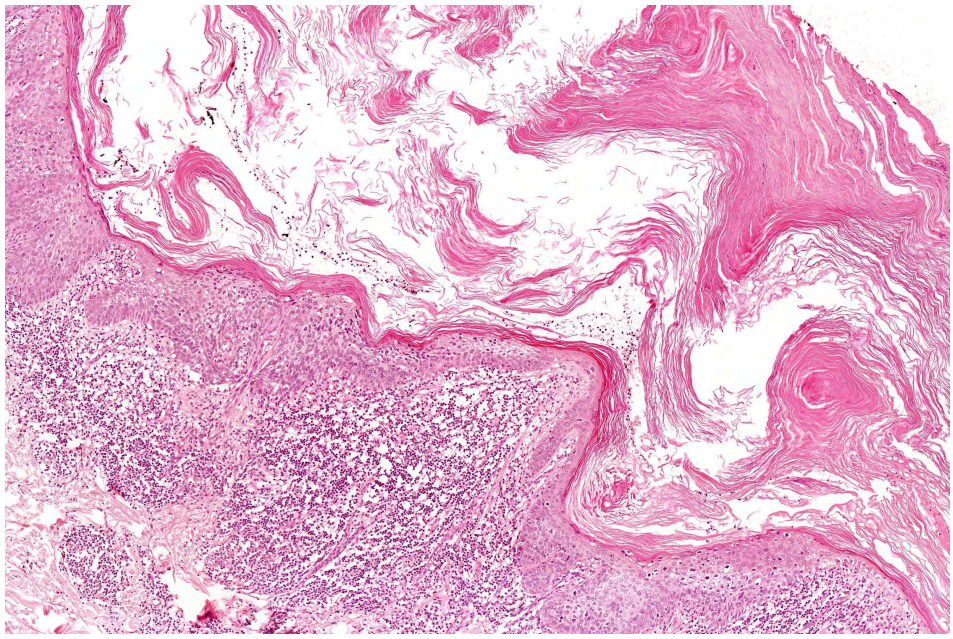


Abb. 2 Histologie des Morbus Bowen

Akanthotische Verbreiterung und Parakeratose der Epidermis. Aufhebung der normalen Schichtung . Dichtes bandförmiges lymphozytäres Entzündungsinfiltrat in der Dermis. (HE, x25)

1.1.3 Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom der Haut, auch spinozelluläres Karzinom oder Spinaliom genannt, ist ein maligner Tumor, der selten metastasiert. Die Ätiologie ist ebenso vielfältig wie die der aktinischen Keratose. Die meisten Läsionen entstehen auf chronisch entzündeter (z.B. Lupus vulgaris) oder durch Sonnenlicht oder Röntgenstrahlung vorgeschädigter Haut (Preston und Stern, 1992). In Mitteleuropa ist das Plattenepithelkarzinom mit einer Inzidenz von ca. 25-30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern und Jahr der zweithäufigste maligne Hauttumor nach dem Basalzellkarzinom (Breuninger und Garbe, 1998). In Australien beträgt die Zahl der Neuerkrankungen rund 1500 pro 100.000 Einwohnern und Jahr. Dies spiegelt eindrucksvoll den Zusammenhang mit erhöhter UV-Strahlung als wichtigsten ätiopathogenetischen Faktor wider. Männer sind etwas häufiger betroffen (Diepgen und Mahler, 2002; Stern, 1999). Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose liegt derzeit bei 70 Jahren (Breuninger und Garbe, 1998). Die meisten Plattenepithelkarzinome entstehen auf dem Boden von Vorstufen und In-situ-Karzinomen, wobei die aktinische Keratose die mit Abstand wichtigste epitheliale Vorstufe darstellt. Der Tumor wächst häufig exophytisch-papillomatös oder ulzerierend. Die Tumorzellkomplexe wachsen diffus infiltrierend und destruierend in die Dermis vor. In den zentralen Anteilen weisen sie typischerweise konzentrisch geschichtete, meist parakeratotische "Hornperlen" auf (siehe Abb. 3). Das Ausmaß der Verhornung korreliert mit dem Differenzierungsgrad. Je zahlreicher die Hornperlen im Zentrum der Tumorzellkomplexe auftreten, desto höher differenziert ist der Tumor (Garbe et al., 1997). Das Plattenepithelkarzinom wird anhand der Prozentzahl der undifferenzierten Zellen ohne Verhornungstendenz histologisch in vier Stufen eingeteilt (Broders, 1921). Zur Behandlung des Plattenepithelkarzinoms stehen die konventionelle Chirurgie, die mikrographische Chirurgie, Kryotherapie, Strahlentherapie, sowie lokale und systemische Chemotherapie zur Verfügung.

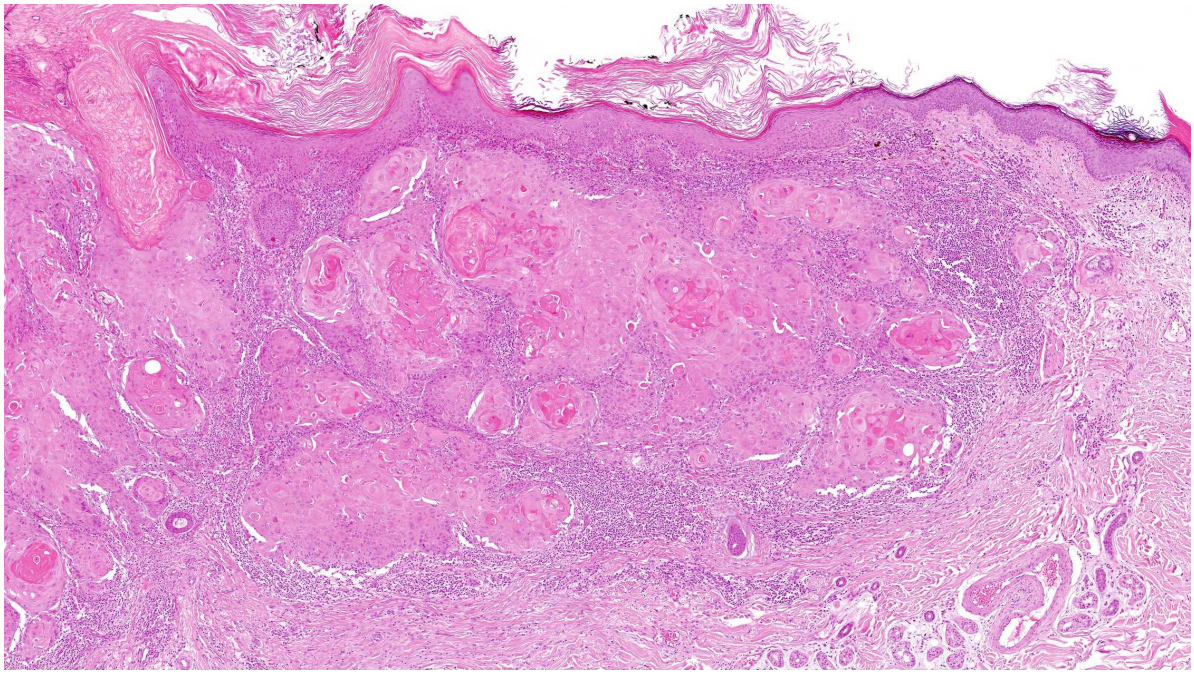


Abb. 3 Histologie des Plattenepithelkarzinoms

Die Tumorzellkomplexe haben Kernatypien und parakeratotische „Hornperlen“ (HE, x25)

1.1.4 Melanozytärer Nävus

Unter Nävus („Mal“) versteht man umschriebene Fehlbildungen der Haut verschiedener Natur. Melanozytäre Nävi (Nävuszellnävi) zeichnen sich durch fokale Vermehrung von Melanozyten/Nävuszellen aus. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlichster Nävi, die sowohl Risikoindikatoren als auch direkte Vorläufer maligner Melanome sein können. Die in dieser Studie bearbeiteten Nävi sind melanozytäre Nävi vom „Compound“-Typ, die die große Mehrzahl aller melanozytären Nävi beim Erwachsenen ausmachen. Melanozytäre Nävi sind der wichtigste Risikofaktor für die Melanomentwicklung (Garbe et al., 1994). Einzelne Studien haben eine hohe Rate (über 50%) von nachweisbaren Nävusassoziationen maligner Melanome gezeigt (Sagebiel, 1993; Skender-Kalnenas et al., 1995). Bei etwa 25% aller malignen Melanome können im histologischen Präparat noch dermale Nävuszellverbände in Kontinuität mit dem malignen Melanom nachgewiesen werden (Stadler und Garbe, 1991; Stolz et al., 1989). Der melanozytäre Nävus vom „Compound“-Typ ist eine regelmäßig geformte, hell- bis dunkelbraune, flache Papel. Die Größe beträgt in der Regel 3-5mm im Durchmesser. Histologisch finden sich Melanozytengruppen

(Nävuszellnester) in der dermoepidermalen Junktionszone und im oberen Korium. Die dermalen Zellverbände zeigen eine Abnahme des Zellkernvolumens der Melanozyten und der Pigmentierung (siehe Abb. 4) Eine besondere Überwachung ist wegen der großen Verbreitung nicht angezeigt. Wegen ihrer regelmäßigen Form und Farbe lassen sie sich in der Regel gut vom malignen Melanom unterscheiden. Eine Indikation zur Exzision besteht bei der nicht sicheren klinischen Abgrenzung zum Melanom.

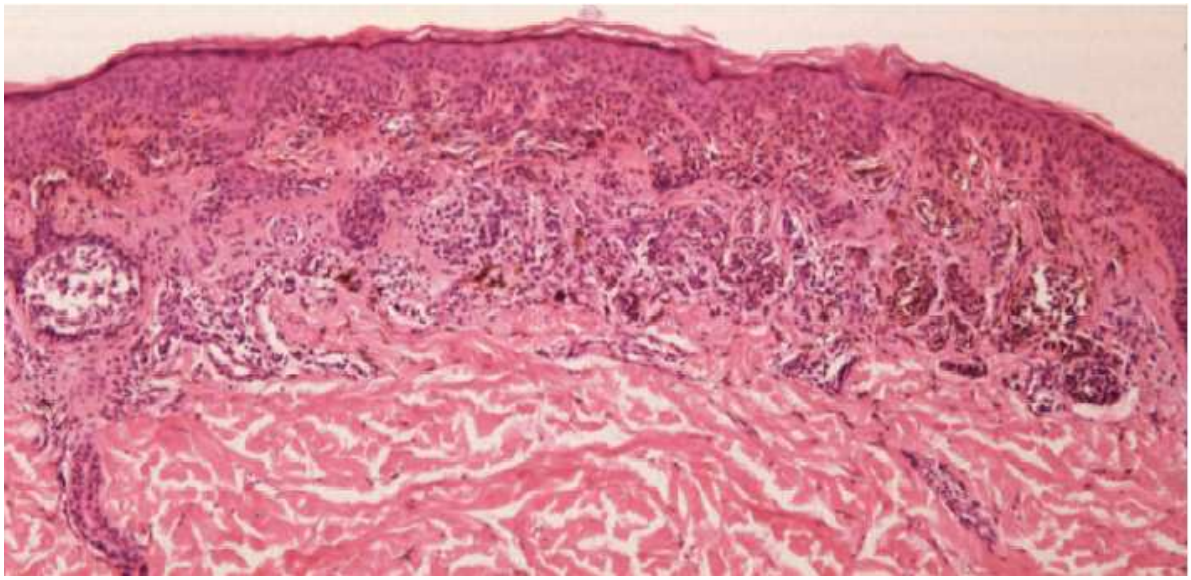


Abb. 4 Histologie des melanozytären Nävus vom „Compound“-Typ

Die Nävuszellnester finden sich in der dermoepidermalen Junktionszone und im oberen Korium (HE, x50)

1.1.5 Malignes Melanom

Dem malignen Melanom kommt in der Dermatologie eine besondere Bedeutung zu: wegen seiner Häufigkeit, seines aggressiven Wachstumsverhaltens, einer frühen Metastasierung und seiner ausgeprägten Therapieresistenz bei eingetretener Metastasierung. Am malignen Melanom versterben bei weitem mehr Menschen als an allen anderen Hauttumoren insgesamt. Das maligne Melanom ist ein Tumor, der von den Melanozyten ausgeht. Mehr als 90 % der Tumoren entwickeln sich primär an der Haut, da die Melanozyten überwiegend in der

Basalzellschicht der Epidermis lokalisiert sind (siehe Abb. 5). Darüber hinaus verbleiben Pigmentzellen in der Dermis und den Schleimhäuten, den Leptomeningen, der Uvea und Retina des Auges und der Cochlea sowie dem vestibulären Labyrinth des inneren Ohres. Entsprechend können an diesen Lokalisationen auch maligne Melanome entstehen. Als wichtiger Faktor bei der Entstehung von Melanomen wird das Sonnenlicht diskutiert. Mögliche Genloci für ein erhöhtes Melanomrisiko wurden auf den Chromosomen 1p36, 6 und 9p21 identifiziert (Goldstein et al., 1996; Kraehn et al., 1995).

Für die klinische Diagnose wurde in den 80er Jahren die ABCD-Regel (A=Asymmetrie; B=Begrenzung; C=Colorit; D=Durchmesser) aufgestellt, mit der auch Frühformen des malignen Melanoms erkannt werden sollen (Friedman und Rigel, 1985; Rigel und Friedman, 1993). Eine weitere Bereicherung ist die Diagnostik mit der Auflichtmikroskopie, mit der die Sensitivität der Diagnosestellung auf etwa 90% angehoben werden kann (Binder et al., 1995; Nilles et al., 1994). In der Histologie werden neben morphologischen Kriterien zusätzliche Parameter, wie die Tumordicke nach Breslow oder das Invasionslevel nach Clark, hinzugezogen. Die Tumordicke stellt den wichtigsten prognostischen Faktor primärer Melanome dar (Breslow, 1970). Deshalb ist die Abnahme der Tumordicke zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Effizienz einer Früherkennung. Als Tumordicke gilt der vertikale Durchmesser ab dem Stratum granulosum bis zur tiefsten identifizierbaren Tumormanifestation. Zusätzlich zur Tumordicke wird die Invasion des Tumors anhand der Invasionslevel nach Clark angegeben (Clark et al., 1969). Klinisch und histologisch unterscheidet man vier Haupttypen des malignen Melanoms: superfiziell spreitendes Melanom (SSM), noduläres Melanom (NMM), akrolentiginöses Melanom (ALM) und Lentigo-maligna-Melanoma (LMM), deren Kriterien Ende der 60er Jahre entwickelt wurden (Clark et al., 1969; Mihm et al., 1971). Die Therapie hat die chirurgische Totalexzision des Primärtumors und lokaler und lymphogener Mikrometastasen zum Ziel. Die „Sentinel“-Lymphadenektomie (Sentinel-node-biopsy) wird ab einer Tumordicke von 1mm empfohlen und hat die elektive Lymphknotendissektion abgelöst (Johnson et al.,

1998). Radiotherapie und Kryochirurgie treten als primäre Therapien in den Hintergrund. Als weitere Alternativen kommen eine Chemotherapie und Immuntherapie mit Interferon als palliative oder adjuvante Maßnahmen in Betracht.

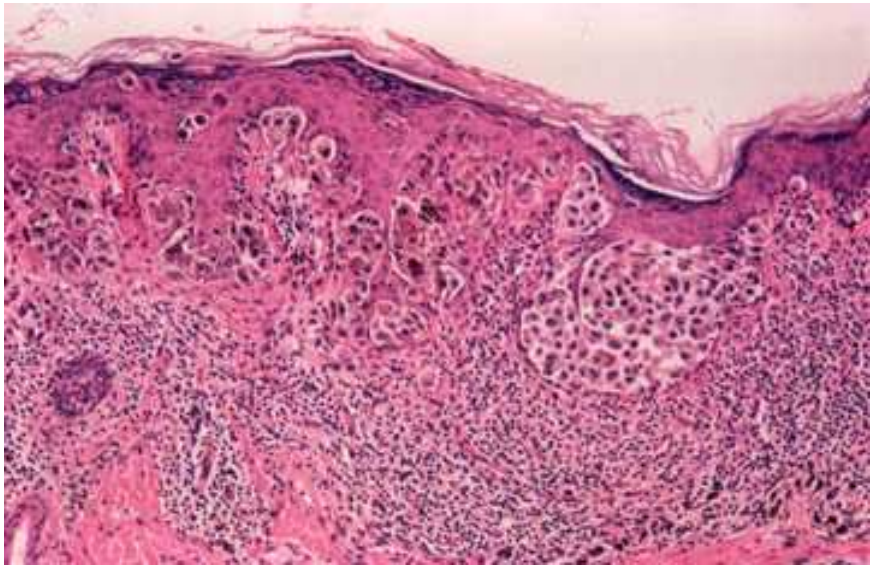


Abb.5 Histologie des malignen Melanoms

Die Tumorzellen finden sich in einem mehrschichtigen Band in der Junktionszone, teils oberhalb, teils unterhalb der Basalmembran, zusätzlich disseminierte Durchsetzung der Epidermis (HE, x100)

In der dermatologischen Routinediagnostik werden Hauttumoren bisher durch morphologische und histologische Merkmale charakterisiert. Als Ergänzung zu der bisher angewandten Charakterisierung wird zunehmend versucht, Ursachen der Tumorentstehung auf zytogenetischer Ebene zu identifizieren, um mit molekularbiologischen Markern Hauttumoren exakter klassifizieren zu können. Denn trotz gleicher Bewertungen und entsprechend gleicher Behandlung zeigen Krebserkrankungen einzelner Patienten oft sehr unterschiedliche Verläufe. Dies liegt unter anderem an der Fähigkeit der Tumoren, Resistenzen gegen Radio- bzw. Chemotherapien zu entwickeln. Neben Resistenzgenen könnten möglicherweise Alterationen in DNA-Reparaturmechanismen von Bedeutung sein (Mueller-Klieser, 1997). Durch die Erforschung dieser molekularen Mechanismen und die Identifizierung potentieller molekularer Marker und ihre Bedeutung in der Tumorgenese könnten neue Therapieansätze gefunden werden.

1.2 Von der Zelle zur Tumorzelle

Molekularbiologische Analysen haben gezeigt, dass trotz der Vielfalt der Körperzellen und der auftretenden bösartigen Tumore die maligne Transformation somatischer Zellen auf ähnlichen molekularen Mechanismen beruht. Die maligne Transformation einer Körperzelle stellt sich als ein komplexes Ereignis dar und ist im wesentlichen auf genetische Ursachen zurückzuführen (Vogelstein und Kinzler, 1993). Mit zytogenetischen und molekularbiologischen Methoden wurde eine große Anzahl von DNA-Veränderungen in Tumorzellen entdeckt. Dabei enthalten einige Zellen Mutationen in Genen, deren Produkte die Zellteilung oder die DNA-Reparatur beeinflussen und somit zu vermehrter Teilung und gestörter DNA-Reparatur beitragen. Die dadurch entstehende genetische Instabilität wird durch Veränderungen in definierten Genen vermutlich schon früh im Verlauf der Tumorentstehung hervorgerufen (Cahill et al., 1999). Die daraus resultierende erhöhte Mutationswahrscheinlichkeit des kompletten Genoms begünstigt die fortschreitende maligne Transformation einer Zelle. Hanahan und Weinberg (2000) führen in ihrem auf Untersuchungen des Colonkarzinoms basierenden Modell die maligne Transformation als Pathogenese der Krebserkrankung auf wenige allgemeingültige Prinzipien zurück. Krebszellen erlangen während ihrer malignen Transformation bis zu sechs neue Eigenschaften, welche die natürlichen Abwehrmechanismen des Organismus zur Entstehung entarteten Gewebes ausschalten (Hanahan und Weinberg, 2000):

1) Tumorzellen proliferieren unabhängig von exogenen Wachstumsfaktoren, indem sie entweder eigene Wachstumsfaktoren bilden oder durch Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. das her2/neu-Onkogen) (Slamon et al., 1987; Yarden und Ullrich, 1988).
2) Sie entziehen sich weitestgehend wachstumsinhibierenden Signalen, z.B. durch Mutationen in Genen der Zellzykluskontrolle (Weinberg, 1995).
3) In malignen Zellen wird der programmierte Zelltod (Apoptose), welcher die Replikation genetisch veränderter Zellen unterbindet, verhindert, z.B. durch Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 (Symonds et al., 1994).

4) Tumorzellen haben eine unlimitierte Replikationsfähigkeit erlangt. Während die Anzahl der möglichen Zellzyklen einer gesunden Zelle durch alterungsbedingten Abbau der Telomeren begrenzt ist, findet man in fast allen Tumorzellen Mechanismen, die zur Telomererhaltung und somit zur Immortalisation der Zellen führen (Bryan und Cech, 1999; Counter et al., 1992).
5) Tumore aktivieren die Neoangiogenese, z.B. durch vermehrte Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor), um eine ausreichende Energie- und Sauerstoffversorgung sicherzustellen (Veikkola und Alitalo, 1999).
6) Tumorzellen haben u.a. durch die Expression extrazellulärer gewebeabbauender Proteasen die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung erlangt (Coussens und Werb, 1996).

Das Ergebnis des „multi-hit-process“, welcher durch eine Akkumulation mehrerer Mutationen charakterisiert ist und über mehrere Jahre andauern kann, ist jeweils der maligne Phänotyp einer Zelle. Von zentraler Bedeutung sind dabei Mutationen in Gensequenzen von Onkogenen (z.B. myc, k-ras) und Tumor-Suppressorgenen (z.B. p53, pRb). Onkogene können als sogenannte Protoonkogene durch ihre Genprodukte (Onkoproteine) die normalen Wachstums- und Differenzierungsprozesse (insbesondere die Zellproliferation) beeinflussen. Sie kodieren Komponenten von Signalketten, die in Wechselwirkung zwischen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren auf der Zelloberfläche treten und im Zellkern genetische Programme abrufen, die Zellteilungszyklen einleiten. Tumorsuppressoren sind Proteine, die in der Zellzykluskontrolle und in den Erhalt der genomischen Integrität eingebunden sind. Sie haben einen negativen Einfluss auf den Zellzyklus, indem sie die Proliferation von Zellen unterdrücken. Zusätzlich können einige dieser Proteine Signale vermitteln, die zelluläre DNA-Reparaturmechanismen aktivieren oder den programierten Zelltod induzieren. Ihr Ausfall begünstigt z.B. eine unregulierte DNA-Replikation oder dass Reparaturprozesse nicht mehr ausgeführt werden können. Die Veränderungen in Onkogenen und Tumor-Suppressorgenen können zur Entstehung von genetischer

Instabilität führen, der eine hohe Bedeutung für die Tumorentstehung zugeschrieben wird (Lengauer et al., 1998). Damit Mutationen, die zur genetischen Instabilität führen, sich nicht manifestieren können, müssen DNA-Schäden repariert werden.

1.3 DNA-Reparatur und homologe Rekombination

Die DNA aller Lebewesen ist ständigen Schädigungen ausgesetzt, die durch verschiedene exogene und endogene Einflüsse entstehen können, z.B. UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, chemische Karzinogene und fehlerhafte Replikation. So vielfältig die Ursachen für eine DNA-Schädigung sind, so unterschiedlich sind auch die daraus resultierenden Schäden, z.B. Alkylierung der DNA, fehlerhafte Basenpaarung („mismatch“) oder DNA-„cross-links“. Zur stabilen Übertragung genetischer Informationen bedarf es aber einer genauen DNA-Replikation, zu der die DNA-Reparatur beiträgt (Chen et al., 1998). Der größte Teil wird durch zelleigene Reparaturmechanismen repariert. Dafür stehen der Zelle verschiedene Systeme zur Verfügung, wie die Fehlpaarungs-Reparatur („Mismatch Repair“, MMR), die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) und die DNA-Doppelstrangbruchreparatur.

Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) repariert auffällige endogene DNA-Schäden, die durch Hydrolyse, Hydroxyl-Radikale oder Methylierungen entstehen. Das Ausschneiden der geschädigten Base erfolgt durch eine Glykosylase. Die entstandene Lücke wird mit der zum Gegenstrang komplementären Base durch eine DNA-Polymerase und eine Ligase geschlossen. Zu größeren Verzerrungen der DNA-Helix führen polyzyclische Kohlenwasserstoffe durch Anheftung an DNA-Basen (bulky adducts) oder ultraviolettes Licht durch Bildung von Thymin-Dimeren. In diesen Fällen erfolgt eine Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER). Eine Endonuklease schneidet einige Nucleotide 5’- und 3’-wärts vom DNA-Schaden heraus (Knippers, 2001). Die Auffüllung der entstandenen Lücke erfolgt wie bei der BER durch eine DNA-Polymerase, die Phosphordiester-Banden werden durch die

DNA-Ligase miteinander verbunden. Die Korrektur von Fehlpaarungen sowie Insertion/Deletions-Schleifen erfolgt durch die „mismatch“-Reparatur (MMR). Die Proteine MHH (MutH-Homolog), MLH (MutL-Homolog) und MSH (MutS-Homolog) erkennen Fehlpaarungen und schneiden den nicht-methylierten DNA-Strang auf der 3’- oder 5’-Seite des „falschen“ Basenpaares. Der geschnittene Strang wird durch DNA-Helikase 2 entwunden und durch Exonukleasen abgebaut. Es entsteht eine Lücke, die durch Reparatursynthese geschlossen wird.

Die DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) sind von den vorkommenden DNA-Schäden die wahrscheinlich folgenreichsten (Khanna und Jackson, 2001). Sie entstehen durch ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika, freie Sauerstoffradikale und andere endogene und exogene Einwirkungen oder werden spontan während der DNA-Replikation oder während der Meiose durch Endonukleasen verursacht (Haber, 2000; Khanna und Jackson, 2001). Die Folge eines DSB kann der Tod der Zelle sein, z.B. durch Inaktivierung eines essentiellen Genes oder durch Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose). Die Reparatur von DSB ist wichtig für die genomische Integrität der Zelle. Fehlerhafte DSB-Reparaturen können zu Translokationen oder Deletionen von Chromosomen führen, die z.B. ein Tumorsupressorgen inaktivieren und somit ein Grund bei der Entstehung maligner Tumoren sein können (Baumann und West, 1998; Khanna und Jackson, 2001). DNA-DSB können durch verschiedene Mechanismen repariert werden. Die wichtigsten und am besten untersuchten sind die Nicht Homologe Endverknüpfung („Non Homlogous End Joining“, NHEJ), die Einzelstrangverbindung („Single Strand Annealing“, SSA), und die Homologe Rekombination (HR) (Bishop und Schiestl, 2000; Liang et al., 1998).

Die Verknüpfung der Enden bei der NHEJ (siehe Abb. 6, Bild (1)) ist komplex und besteht aus vielen Komponenten, deren Funktionen bisher nur teilweise aufgeklärt sind. Ein Protein-Komplex aus den Komponenten Ku70, Ku80 und der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PK) bindet an die DNA-Enden und katalysiert das Aneinanderlagern der gebrochenen DNA-Enden (Knippers, 2001). Im Gegensatz zur homologen Rekombination benötigt das NHEJ keine Sequenz-Homologien der DNA-Enden. Proteine mit Endonukleaseaktivität schneiden die

DNA-Enden als Voraussetzung für ihre kovalente Verbindung zurecht. Die NHEJ ist ein fehleranfälliger Mechanismus, bei dem oft kleinere Deletionen der DNA-Sequenz entstehen (Baumann und West, 1998). Die Einzelstrangverbindung (SSA) (siehe Abb. 6 Bild (2)) hat besondere Bedeutung bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen in repetitiven DNA-Sequenzen. Um den Doppelstrangbruch entstehen nach Prozessierung Bereiche aus einzelsträngiger DNA, die sich an homologe repetitive Bereiche des gegenüberliegenden Stranges anbinden. Die überhängenden DNA-Enden werden anschließend exonukleolytisch abgebaut und die DNA-Stränge ligiert (Baumann und West, 1998; Khanna und Jackson, 2001; Shinohara und Ogawa, 1995).

Bei der homologen Rekombination (siehe Abb. 6 Bild (3)) entsteht durch exonukleolytischen Abbau an der Stelle des Doppelstrangbruches ein freies 3'OH-Ende der DNA. Der intakte Strang wird nach Finden der homologen Kopie des geschädigten DNA-Abschnittes aus der Doppelhelix verdrängt. Nach komplementärer Bindung wird der geschädigte DNA-Strang durch Polymerasen verlängert, wobei der intakte Strang als Matrize genutzt wird. Die so entstandene „Holiday"-Struktur bewegt sich nach rechts oder links entlang des Doppelstranges („branch migration"). Dies geht mit Drehung der beiden DNA-Moleküle und ständigem Öffnen und Schließen von Wasserstoffbrücken einher, ohne dass sich die Geometrie der DNA auffällig ändert. So werden größere Teile des intakten und des zu reparierenden Stranges ausgetauscht. Die Auflösung der „Holiday"-Struktur erfolgt durch Enzyme, die die Überkreuzungsstellen erkennen und Einzelstrangschnitte einführen. Dabei kann es zum "Crossing over", dem Austausch von DNA-Abschnitten zwischen den Schwesterchromatiden kommen. Abschließend erfolgt die Ligation der nun reparierten DNA-Moleküle. Die homologe Rekombination ist nicht nur an der DNA-Reparatur beteiligt, sondern schafft neue Genkombinationen durch Austausch homologer Sequenzen zwischen Chromosomen in der Meiose.

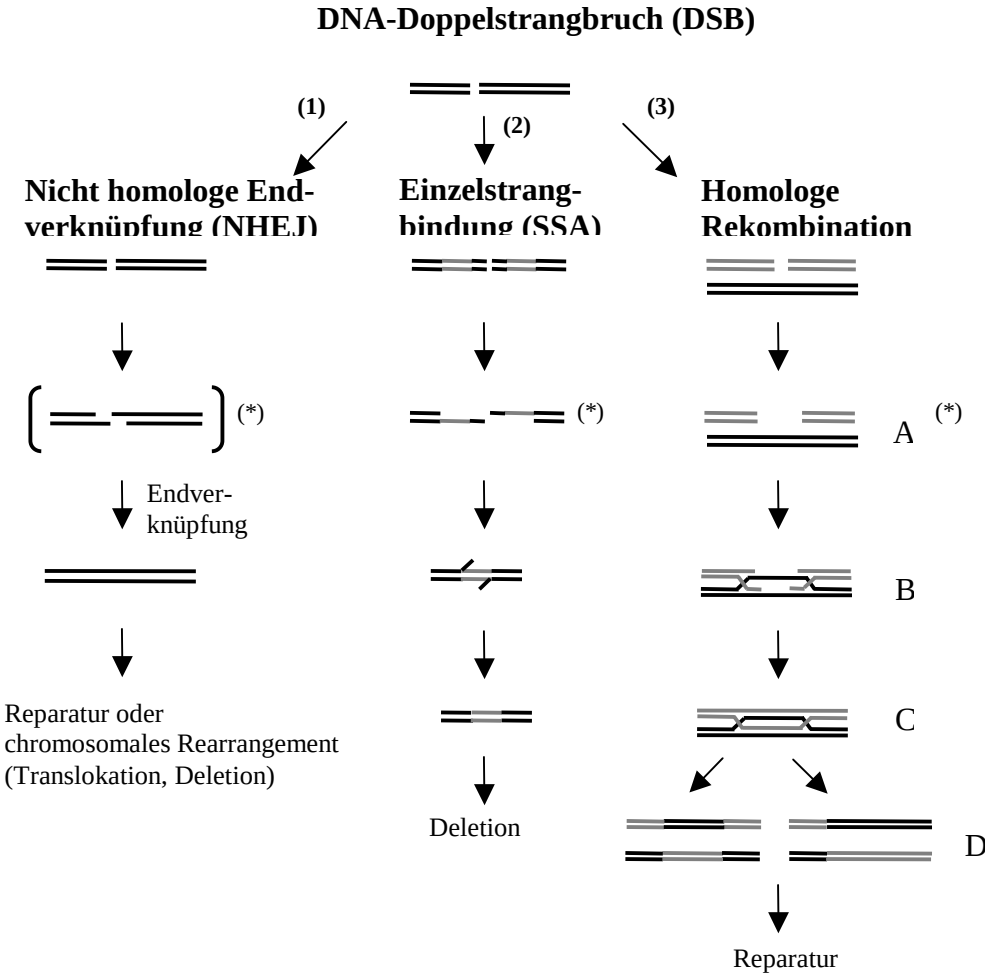


Abb. 6 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Ausführliche Beschreibung im Text

(1) „Non Homologous End Joining" (NHEJ) → Die Enden zweier doppelsträngiger DNA-Moleküle werden ligiert, bei einem Teil vorher Prozessierung.

(2) Einzelstrangbindung (SSA)→ nach Prozessierung entstehen Bereiche einzelsträngiger DNA (*); Bindung an repetitive Bereiche des gegenüberliegenden Stranges und Ligierung der Stränge.

(3) Homologe Rekombination (HR)→ A: Prozessierung; B: ein dabei entstehendes einzelsträngiges DNA-Molekül verdrängt den intakten Strang aus der Doppelhelix; C: komplementäre Bindung und Verlängerung des geschädigten DNA-Stranges durch DNA-Synthese; D: Lösung der Verbindungen und Ligation der reparierten DNA-Moleküle.

Ein in der homologen Rekombination zentral agierendes Protein ist das RecA-Protein (Baumann und West, 1998; Kowalczykowski und Eggleston, 1994; Shinohara und Ogawa, 1995), das Mitte der 60er Jahre aus dem Bakterium Escherichia coli (E. coli) isoliert wurde (Clark, 1996). Im Jahre 1992 wurde in strahlensensiblen Stämmen der Hefe Saccharomyces cerevisiae das eukaryotische Homolog des RecA-Proteins identifiziert (Shinohara et al., 1992). Nur ein Jahr später konnte auch das menschliche Homolog hRad51 identifiziert werden (Shinohara et al., 1993).

1.4 Der Rekombinationsfaktor Rad51

In Studien wurde belegt, dass Rad51 in eukaryoten Zellen eine ähnliche Bedeutung für die homologe Rekombination besitzt, wie RecA in Prokaryonten (Benson et al., 1994; Gupta et al., 1997; Ogawa et al., 1993). Im Unterschied zu E. coli wurden beim Menschen bis heute sechs RecA-Homologe gefunden. Das *hrad51* Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 15 (15 q 14-15) lokalisiert (Takahashi et al., 1994) und besteht aus 10 Exons, von denen die Exone 2 bis 10 translatiert werden (Schmutte et al., 1999). Das Rad51-Protein besitzt ein Molekulargewicht von 36,9 kDa und wird in allen bislang untersuchten Geweben exprimiert. Eine sehr hohe Expression findet sich in lymphatischem und meiotischem Gewebe (Bezzubova und Buerstedde, 1994).

Bislang gelang es nicht, eine Rad51-defiziente Säugtierzelllinie zu etablieren. Rad51-Nullmäuse sterben sehr früh in der Embryonalentwicklung. Die Rad51-negativen Säugetierzellen akkumulieren vor dem Zelltod zahlreiche Chromosomenbrüche (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996). In Zellkulturen mit Hühnerzellen konnte man in Abwesenheit von Rad51 einen Zellzyklusarrest am Übergang der G2- in die M-Phase beobachten (Sonoda et al., 1998). Defiziente Hefe- und E.coli-Zellen weisen zwar eine erhöhte Rekombinationsdefizienz und Strahlensensibilität auf, jedoch wird das Rad51-

Homolog nicht essentiell für das Überleben gebraucht (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996).
Nach DNA-Schädigungen kommt es im Gegensatz zum RecA-Protein nicht zu einer erhöhten Expression von hRad51. In immunhistochemischen Färbungen konnte eine Umverteilung des Rad51-Proteins nachgewiesen werden. Das zunächst diffus verteilte Protein konzentrierte sich nach Einwirkung schädigender Noxen in Foci, möglicherweise an den Orten der geschädigten DNA (Haaf et al., 1995; Tan et al., 1999). Nach mehrfach aufeinander folgender DNA-Schädigung wurde eine Zunahme der Foci-Zahl beobachtet (Haaf et al., 1995; Raderschall et al., 1999; Tashiro et al., 2000).

Die biochemischen Funktionen des Rad51-Proteins sind vielfältig, aber noch nicht völlig aufgeklärt. Rad51 ist einer der Schlüsselfaktoren für die homologe Rekombination von DNA-DSB in humanen Zellen (Lambert und Lopez, 2000; Liang et al., 1998). HRad-51 bildet wie RecA helikale DNA-Protein-Filamente in Gegenwart von ATP aus und katalysiert den Strang-Austausch zwischen homologen DNA-Bereichen (Baumann et al., 1996; Baumann and West, 1998; Benson et al., 1994; Gupta et al., 1997). Diese fördern die homologe Basenpaarung und den Austausch zwischen komplementären DNA-Strängen (Ogawa et al., 1993; Sung, 1997). In seiner Funktion bei der HR ist das Rad51-Protein auf Kofaktoren wie Rad52 und „Replication Protein A“ (RPA) angewiesen (Kanaar und Hoeijmakers, 1998; Sung, 1997). Die Bindung von Rad51 an Rad52 führt zu synergistischen Effekten bei der Bildung von Nukleoproteinfilamenten (Milne und Weaver, 1993; Sung, 1997).
Des weiteren bindet sich Rad51 an verschiedene Tumorsuppressoren, z.B. p53, BRCA1 und BRCA2. Der Tumorsupressor p53, welcher als ein zentraler Faktor der genomischen Integrität den Zellzyklus, verschiedene DNA-Reparaturmechanismen und die Apoptose beeinflusst, enthält zwei Rad51-Bindungsstellen (Buchhop et al., 1997). Nach DNA-Schädigung bildet Rad51 *in vivo* und *in vitro* Proteinkomplexe mit p53 (Sturzbecher et al., 1996). Weiterhin bindet sich Rad51 an die Produkte der Tumorsupressorgene BRCA1 und BRCA2 (Scully et al., 1997). Keimbahn-Mutationen in diesen Genen sind eng mit der

Entstehung von hereditären Mamma- und Ovarialkarzinomen assoziiert. Während für BRCA2 mehrere Rad51-Bindungsstellen beschrieben wurden (Marmorstein et al., 1998; Scully et al., 1997; Zhang et al., 1998), ist die Co-Lokalisation von Rad51 und BRCA1 in Immunfluoreszenzfärbungen wahrscheinlich indirekt bedingt (Golub et al., 1997; Scully et al., 1997). Durch die Bindung von Rad51 an BRCA2 wird die durch Rad51 katalysierte Bildung der ssDNA-Nukleoproteinfilamente verhindert, welche die Voraussetzung für die Paarung mit der homologen Schwesterchromatide während der homologen Rekombination ist (Chen et al., 1998; Venkitaraman, 2002). Zusätzlich inhibiert die BRCA2-Expression die Transkription von p53 in Krebszellen. Dieser Effekt wird durch die Co-Expression von Rad51 verstärkt (Marmorstein et al., 1998).

Somit leistet Rad51 im Zusammenspiel mit Proteinen wie p53 und BRCA1/2 einen wichtigen Beitrag bei der Unterdrückung von malignem Wachstum. Eine Beeinträchtigung der Rad51-Funktion könnte zu Störungen der DNA-Reparatur führen, was in den betroffenen Zellen zu Doppelstrangbrüchen und Mutationen führen würde, wie man es häufig in malignen Tumoren beobachtet. Entkoppelte Rekombinationsvorgänge bei fehlregulierter übermäßiger Aktivierung des Rad51-Proteins könnten ebenfalls zu genetischer Instabilität von Zellen führen und eine maligne Entartung begünstigen.

1.5 Zielsetzung

(1) In mehreren Versuchssystemen konnte gezeigt werden, dass sich die Sensitivität gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Einflüssen, wie z.B. Cisplatin (Vallerga, 1999, persönliche Kommunikation) erhöht, wenn die Tumorzellen durch eine Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden eine verminderte Rad51-Expression haben. Dagegen werden Zellen bei einer Überexpression von Rad51 resistenter gegenüber ionisierender Strahlung (Vispe et al., 1998). In diesen Zellen kommt es zu einer erhöhten Rekombinationsreparatur (Vispe et al., 1998). Ob dies jedoch die Ursache für die erhöhte Resistenz ist, ist noch weitestgehend unklar.

(2) In verschiedenen malignen Tumoren konnte eine Überexpression von Rad51 nachgewiesen werden. Dies gilt beispielsweise für Mamma- (Maacke et al., 2000a), Pankreas- (Maacke et al., 2000b), Urothel-Karzinome (persönliche Kommunikation Dr. W. Henning) und Lungenkarzinome (Qiao et al., 2005). Zudem korreliert das Ausmaß der Überexpression in Mamma-Karzinomen mit dem histologischen Grading, bei Lungenkarzinomen mit der Überlebenszeit.

- Anhand von archiviertem Paraffinmaterial von verschiedenen Tumoren der Haut soll das Expressionsniveau von Rad51 untersucht werden.
- Die Studie soll, neben der Verteilung des potentiellen neuen Markers, Daten zur Korrelation mit etablierten Markern (histologisches Grading, Tumorgröße, Ki-67-Expression) liefern.
- Durch die Erfassung des Markers Ki-67 soll diese Studie in den Kontext bestehender Studien eingeordnet werden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Alle im folgenden nicht näher genannten Reagenzien entsprechen den üblichen analytischen Reinheitsgraden und wurden von den Firmen Merck, Darmstadt und Sigma, Steinheim bezogen.

Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)	GibcoBRL, Karlsruhe
Faramount-Eindeckmedium	Dako, Hamburg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Levamisol	Sigma, Steinheim
Naphthol-AS-BI-Phosphat	Sigma, Steinheim
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
Mayer's Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt

Penicillin 10000 IE/ml	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Streptomycin 10 mg/ml	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Vectashield Eindeckmedium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Apotheke der MUL
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.1.2 Kits

DAB Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastain Elite ABC-Peroxidase-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.3 Antikörper

Anti-Ki-67 (MIB-1)	Dako, Hamburg
Anti-Rad51 (Klon 1G8)	(Buchhop et al., 1996)
Goat-anti-mouse-FITC	Zymed Laboratories, San Franscisco, USA
APAAP-Brückenantikörper Maus Ig	Dako, Hamburg
APAAP-Komplex, Maus	Dako, Hamburg

2.1.4 Lösungen und Puffer

ABC-Peroxidase-Reagenz:	20µl “Reagenz A”, 20µl “Reagenz B” aus „ABC-Kit“ in 1ml PBS; 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen
Citratpuffer:	Stammlösung A: 2,101g Zitronensäure in 100ml Aqua; Stammlösung B: 2,941g Natriumcitrat in 100ml Aqua →18ml A + 82ml B + 900ml Aqua

DAB-Färbelösung:	zu 5ml Aqua 2 Tropfen “Buffer Stock Solution”, 4 Tropfen „DAB Stock Solution“, 2 Tropfen „Hydrogen Peroxid Solution“
Substrat-Chromogen-Lösung:	Lösung 1: 4,35g Natriumchlorid, 0,75g Trizma Hydrochlorid, 2,45g Trizma Base in 87,5ml Aqua bidest, 31,25 Propandiol, pH=9,75, 50mg Levamisole; Lösung 2: 25mg Natriumnitrit in 625µl Aqua bidest., 250µl Neufuchsin; Lösung 3: 62,5mg Naphthol-AS-BI-Phosphat in 750µl Dimethylformamid; Lösung 2 und 3 werden nacheinander in Lösung 1 gegeben und gut vermischt.
PBS:	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na_2HPO_4, 0,24g KH_2PO_4 in 800ml Aqua bidest.; auf pH=7,4 einstellen
Triton X-100-Lösung 0,2%:	100µl Triton X-100 in 50ml Aqua bidest. lösen
Wasserstoffperoxidlösung:	7ml H_2O_2 in 53ml Aqua bidest.

2.1.5 Geräte und Laborbedarf

Bildanalysemikroskop	Olympus BX-40
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Falcon CultureSlide	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axioscop 2 MOT, Carl Zeiss, Göttingen
Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Hettich-Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Superfrost-Plus-Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

2.1.6 Untersuchungsmaterial

Die Untersuchung wurde an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material von sechs verschiedenen Tumoren der Haut durchgeführt. Die Gewebeblöcke

stammten aus dem histologischen Archiv der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Lübeck. Es wurden nur Fälle untersucht, die histologisch eindeutig zugeordnet werden konnten. Bei den sechs verschiedenen Tumoren der Haut handelt es sich um Morbus Bowen und aktinische Keratosen, das hoch- und das entdifferenzierte spinozelluläre Karzinom, das maligne Melanom und melanozytäre Nävi vom „Compound“-Typ. Mittels des computergestützten Archivierungssystems HiDIS von der Firma c.a.r.u.s., Hamburg, wurden pro Tumor 30 repräsentative Fälle aus den Jahren 1994-2000 ausgewählt. Anhand des Archivierungssystems HiDIS wurden auch Daten zum Alter und Geschlecht erfasst. Bei den malignen Melanomen wurden des weiteren histopathologische Parameter, wie die Tumordicke nach Breslow (1970) und die Eindringtiefe nach Clark (1969), statistisch erfasst.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

2.2.1.1 Vorbereitung des Gewebematerials

Von den formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebestücken wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die im Streckbad auf „Superfrost-plus“-Objektträger aufgezogen wurden. Anschließend wurden die Schnitte im Brutschrank bei 37℃ über Nacht getrocknet. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte 2 x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert, anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 5 min 100% Ethanol, 2 x 2 min 80% Ethanol, 1 x 1 min 70% Ethanol, 1x 1 min 50% Ethanol (Ethanolverdünnung jeweils in destilliertem Wasser) rehydriert und für fünf Minuten in PBS gewaschen.

2.2.1.2 Antigendemaskierung

Im Rahmen der Formalinfixierung entstehen Aldehydvernetzungen, die die dreidimensionale Struktur des Antigens verändern und eine Bindung des Antikörpers an das Antigen verhindern können. Dieser Vorgang wird als

„Antigenmaskierung“ bezeichnet (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Diese maskierten Antigenepitope müssen wieder freigelegt werden. Hierfür wurden die Paraffinschnitte in einem Schnellkochtopf bei maximalem Dampfdruck für drei Minuten in Citratpuffer (pH 6) inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte durch Zugabe von Leitungswasser langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt und wieder in PBS überführt.

Alternativ werden die Paraffinschnitte in Citratpuffer (pH 6) in einem Mikrowellenherd bei 850 W für zehn Minuten erhitzt. Es war darauf zu achten, dass die Präparate immer vollständig mit Puffer bedeckt waren. Nach Abkühlen der Präparate wurden diese in PBS gewaschen.

2.2.1.3 H_2O_2 und Triton-Behandlung

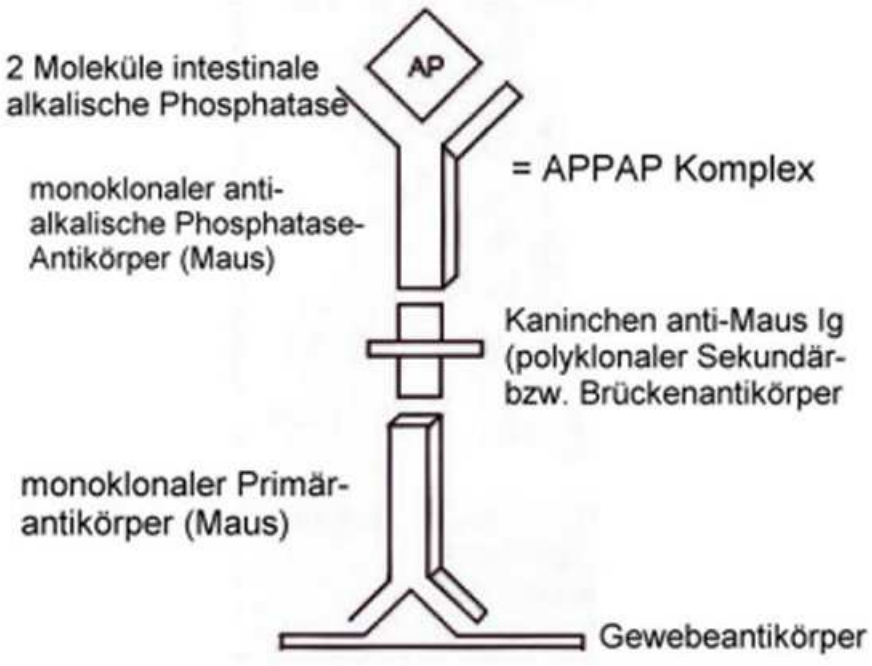
Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen durch 5minütige Inkubation in Wasserstoffperoxidlösung (3,5%) blockiert.

Nachfolgend wurden die Präparate für zehn Minuten in einer Triton-X-100-Lösung (0,2%) inkubiert, um die Zellmembranen zu permeabilisieren und die Benetzbarkeit der Präparate durch die Antikörperlösung zu verbessern. Anschließend wurden die Präparate in PBS überführt.

2.2.2 Die Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik

Für die Darstellung von Ki-67 (MIB-1) wurde die Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Technik verwendet (Cordell et al., 1984). Das Prinzip dieser Methode ist eine Antikörper-Brücken-Technik (siehe Abbildung). Der monoklonale Primärantikörper von der Maus (MIB-1) wird in der Verdünnung 1:10 in PBS für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Der zweite Antikörper ist der Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Mausimmunglobulin) und wird in der Verdünnung 1:20 in PBS ebenfalls für 30 Minuten auf die Präparate aufgetragen.

Anschließend erfolgt die Inkubation des APAAP-Komplexes in der Verdünnung 1:50 in PBS für weitere 30 Minuten. Der APAAP-Komplex besteht aus 2 Molekülen alkalischer Phosphatase und einem gegen die alkalische Phosphatase gerichteten monoklonalen Antikörper von der Maus. Um die Intensität der Immunfärbung zu erhöhen, wurden der zweite und dritte Antikörper nochmals inkubiert, wobei die Inkubationszeit jeweils auf zehn Minuten reduziert wurde. Im Anschluss wurden die Präparate mit der frisch angesetzten Substrat-Chromogen-Gebrauchslösung für 10-20 Minuten überdeckt. Dabei wird ein Naphtolsalz der alkalischen Phosphatase als Substrat hinzugefügt. Neufuchsin dient als chromogene Substanz und ist für die Rotfärbung des Reaktionsproduktes verantwortlich. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Präparate jeweils für 1-2 Minuten in PBS gewaschen. Als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen. Alle übrigen Parameter entsprachen den Bedingungen des Färbeprotokolls.



(Abb. 7: Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik)

2.2.3 Färbung mit „Vectastain Elite ABC-Kit“

Zur Darstellung von Rad51 wurde das „Vectastain ABC System“ verwendet, welches ein universell einsetzbares 3-Schritt-Detektionssystem für die Immunhistochemie darstellt. Es nutzt die hohe Affinität des Glykoproteins Avidin zum Vitamin Biotin (Guesdon et al., 1979; Hsu et al., 1981). Die Blockierung unspezifischer Proteinbindungen erfolgte durch 15minütige Inkubation mit verdünntem Normalserum vom Pferd. Nach Waschen in PBS erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem in PBS verdünnten Primärantikörper 1G8 (1:2000) in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Präparate für 30 Minuten mit dem sekundären, biotinylierten Anti-Maus-IgG-Antikörper aus dem „Vectastain Elite-ABC-Kit“ inkubiert und nachfolgend für weitere 30 Minuten mit dem „ABC-Reagenz“ überschichtet. Während der Inkubation bildet Avidin eine Brücke zwischen dem sekundären, biotinylierten Anti-Maus-IgG-Antikörper und der biotinylierten Meerrettichperoxidase (siehe Abb. 8). Die Präparate wurden für zwei Minuten mit dem „DAB-Färbesubstrat“ behandelt, welches zu einer intensiven Braunfärbung peroxidasemarkierter Bereiche führt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Präparate jeweils für 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen. Alle übrigen Parameter entsprachen den Bedingungen des Färbeprotokolls.

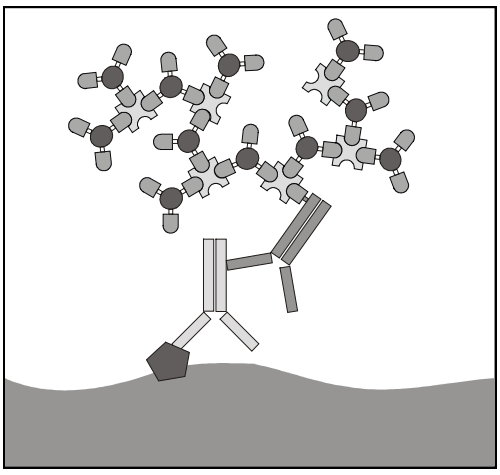


Abb. 8 Prinzip der „Vectastain ABC-Methode“

: Antigen, : Primärantikörper, : biotinylierter Sekundärantikörper, : Avidin, : biotinylierte Meerrettichperoxidase

2.2.4 Kerngegenfärbung und Eindeckelung

Für die Kerngegenfärbung wurde Mayer's Hämalaun verwendet. Nach Färben in Hämalaun für 3 Minuten und Waschen in Leitungswasser für 10 Minuten, wurden die getrockneten Präparate unter Verwendung von „Faramount"- Eindeckmedium mit einem Deckgläschen versehen.

2.2.5 Computergestützte Auswertung der gefärbten Präparate

2.2.5.1 Bilddokumentation

Für die Auswertung der Paraffinschnitte wurde ein Olympus-BX-40 Bildanalysemikroskop benutzt. Für die Digitalisierung der Bilddaten wurde eine Sony-CCD-Kamera des Typs CCD-3 sowie das Bildanalyseprogramm AnalySIS Pro 2.10.200 (SIS Software GmbH, Münster) verwendet.

Zur besseren Übersicht wurde das Präparat am Anfang mit der kleinsten Vergrößerung seitens der Kamera abgefahren. Um ein objektives Ergebnis zu erhalten wurden je Präparat 600-1000 Tumorzellkerne bzw. bei geringerer Tumorzelldichte fünf zufällig ausgewählte, nicht überlappende, repräsentative Bereiche des Tumors bei einer 400fachen Objektivvergrößerung dokumentiert. Im Fall der aktinischen Keratose wurde bei einer 400fachen Objektivvergrößerung das gesamte Präparat abgefahren und die jeweils unteren beiden Zellreihen der Basalzellschicht im Bereich der aktinischen Keratose dokumentiert und ausgewertet, da nur hier atypische Keratinozyten zu erwarten sind.

Die Bilddaten wurden für die spätere Auswertung im JPEG-Format mit einer Kompressionsstufe von 20% gespeichert. Für Bilddaten, bei denen eine Ausgabe auf Fotopapier oder Diafilm vorgesehen war, wurde das verlustfrei arbeitende TIFF-Format zur Sicherung gewählt.

2.2.5.2 Bildanalyse

Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mit dem Programm „PiClick Image Analysis“, welches freundlicherweise von Dr. Sven Opitz, Institut für Humangenetik, zur Verfügung gestellt wurde. Das Programm unterstützt das manuelle Auszählen und die Verwaltung der Auswertungsdaten und ermöglicht die Messung des positiven Zellindex (PCI) in einem repräsentativen Ausschnitt des Tumorgewebes.

Die Auswertung der Bilddaten erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher. Die Ergebnisse der beiden Untersucher wurden gemittelt, bei Abweichungen von mehr als 5% war eine gemeinsame Auswertung vorgesehen. Die Klassifikation einer Tumorzelle als positiv im Sinne des immunhistochemischen Proteinnachweises wurde vor Beginn der Auswertung anhand von Referenzbildern festgelegt (vgl. Abb. 9 und 10). Dabei wurden nur deutliche Kernfärbungen gewertet.

Die Auswertung für die Antikörper Rad51 und Ki-67 erfolgte nach dem „Positive stained Cell Index“ (PCI) (Linder et al., 1997), der den prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellkerne an der Gesamtzahl der Tumorzellkerne im analysierten Präparateausschnitt beschreibt.

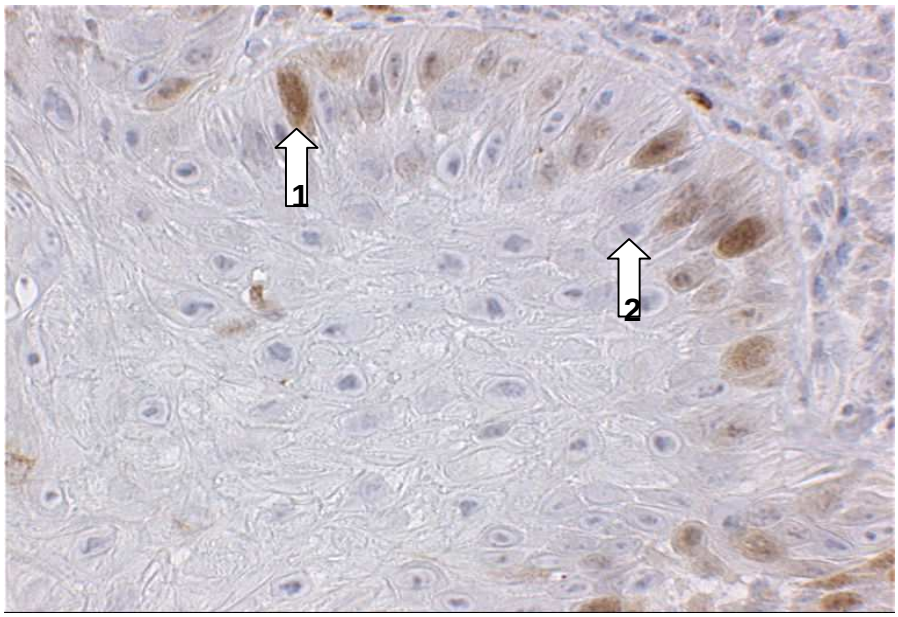


Abb. 9 Referenzbild zur Auswertung der Immunhistochemischen Färbung (Rad51)

Zu sehen sind deutlich positiv angefärbte Tumorzellkerne (1) und negative Tumorzellkerne (2) (400fache Vergrößerung)

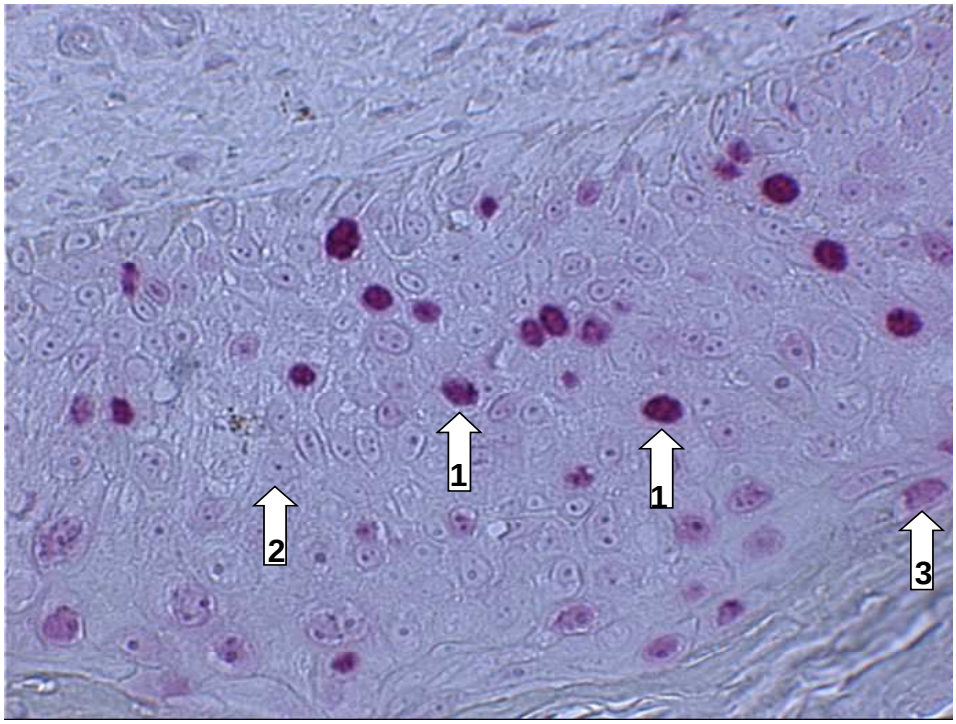


Abb. 10 Referenzbild zur Auswertung der Immunhistochemischen Färbung (Ki-67)

Zu sehen sind deutlich positiv angefärbte Tumorzellkerne (1) und negative Tumorzellkerne (2), schwach angefärbte Zellen (3) wurden als negativ gezählt (400fache Vergrößerung)

2.2.6 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse der Daten wurde das Statistikprogramm SPSS (Version 9.0) benutzt. Die Auswahl der Methoden und die Ergebnisse wurden durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. A. Ziegler) überprüft.

2.2.6.1 Vergleich von Stichproben

Die als PCI gemessene Proteinexpression lieferte Prozentangaben als Ergebnisse. Es kamen parameterfreie statistische Tests zur Anwendung, da die Verteilung der Werte im untersuchten Tumormaterial zum einen nicht normalverteilt sein muss und sich darüber hinaus aus Prozentwerten nicht ohne weiteres Mittelwerte bilden lassen.

Zum Vergleich von zwei Stichproben wurde der U-Test nach Mann und Whitney verwendet (Zöfel, 1992). Bei mehr als zwei Stichproben diente der H-Test nach Kruskal und Wallis (Zöfel, 1992) als Globaltest. Wenn in diesem Test signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben festgestellt wurden, schloss sich ein paarweiser Vergleich der Einzelstichproben mittels des U-Testes an, der in diesem Fall nach Bonferroni korrigiert wurde (Sachs, 1997).

Im weiteren sollte überprüft werden, ob zwischen den einzelnen untersuchten Parametern ein Zusammenhang im Sinne einer Korrelation bestand. Da die pathologischen Parameter ordinalskaliert sind, kam der Rangkorrelationskoeffizient r_S nach Spearman zur Anwendung (Zöfel, 1992). Er kann Werte von –1 und +1 annehmen, wobei ein Betrag nahe Null einen schwachen und ein Betrag nahe Eins einen starken Zusammenhang bedeutet.

3. Ergebnisse

Die Haut hat unter allen Organen des menschlichen Körpers die höchste Inzidenz und Vielfalt an Tumoren. Die dermatologische Diagnostik beruht im Regelfall auf klinisch-morphologischen Kriterien. Bei Verdacht auf Hauttumoren reicht oft das klinische Erscheinungsbild allein nicht aus. Zur Diagnostik und zur Charakterisierung der Hauttumore werden deshalb histologische Merkmale (siehe Abschnitt 1.1.1 bis 1.1.4) und oft auch Laboruntersuchungen herangezogen. In der Tumordiagnostik haben sich immunhistologische Techniken wie die APAAP-, IGSS- und ABC-Technik bereits etabliert, um Rückschlüsse über die Herkunft und den Grad der Differenzierung eines Tumors zu gewinnen (Tronnier et al., 1989).
In dieser Studie wurde die Expression von Rad51 in verschiedenen Tumoren der Haut untersucht. Des weiteren wurde geprüft, ob anhand der Rad-51-Expression eine Aussage über die Malignität eines Tumors gemacht werden kann.

3.1 Immunhistochemische Darstellung von Rad51 und Ki-67

Das Protein Rad51 wird auf geringem Niveau in allen eukaryotischen Zellen exprimiert (Bezzubova und Buerstedde, 1994). Untersuchungen an Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigen, dass immunhistochemisch positive Tumorzellen deutlich mehr Rad51 enthalten, als im Rahmen von

zellzyklusabhängigen Schwankungen zu beobachten ist (Maacke et al., 2000b). Das verwendete immunhistologische Verfahren führt nicht zur Detektion von basalen Rad51-Spiegeln. Im folgenden wird somit bei einer deutlichen Kernfärbung, z.B. braun (bei Verwendung des „Vectastain Elite ABC-Kit“), die in der Auswertung als positiv gewertet wurde (siehe 2.2.8.2), von einer Rad51-Überexpression gesprochen. Keine immunhistochemische Anfärbung bedeutet eine Expression unterhalb der Nachweisgrenze. Der Nachweis der Rad51-Protein-Expression in paraffingebetteten, epithelialen Zellen mit immunhistochemischen Methoden wurde das erste Mal von Maacke und Mitarbeitern beschrieben (Maacke et al., 2000b). Nach Antigendemaskierung ließen sich mit den Antikörpern 5D10, 6D3 und 1G8 (Buchhop et al., 1996) deutlich angefärbte Tumorzellen darstellen. Die besten Färbeergebnisse wurden mit dem Antikörper 1G8 erzielt. Für die Färbung wurde das „Vectastain Elite ABC-Kit“ verwendet. Dieses System wurde von Dr. Sven Opitz mit dem Antikörper 1G8 zur Darstellung der Rad51-Expression in Mammakarzinomen reproduzierbar etabliert (Maacke et al., 2000a). Vorversuche zeigten, dass dieses System auch an Gewebeproben der Haut anwendbar ist.

Der Nachweis von Ki-67 erfolgte mit der APAAP-Methode (Cordell et al., 1984). Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Verfahren (Schaumburg-Lever, 1986; Tronnier et al., 1989), welches in der Dermatopathologie der Universität zu Lübeck häufig angewandt wird. Für die immunhistochemische Darstellung des Ki-67-Antigens wurde der monoklonale IgG-Antikörper MIB-1 verwendet (Cattoretti et al., 1992).

3.2 Das Bildanalyseprogramm „PiClick“

Die Auswertung der gefärbten Präparate (das Auszählen positiver und negativer Tumorzellkerne) und die Berechnung des PCI erfolgten computergestützt. Hierfür wurde das Programm „PiClick“ benutzt, das von Dr. Sven Opitz, Institut für Humangenetik, entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Das Programm lässt sich auf jedem Rechner der Pentiumklasse ab 75Mhz unter den Windows Betriebssystemen installieren. Auf Funktionen der Bildbearbeitung und automatische Auswertungsalgorithmen wurde verzichtet; dadurch sind die für diese Studie benötigten Funktionen schnell erreichbar und komfortabel zu bedienen. Das Programm verwaltet die Ergebnisse der Auszählung automatisch.

3.3 Ergebnisse der Studie an Tumoren der Haut

3.3.1 Charakterisierung der Tumoren der Haut

Der bedeutendste Tumor der Haut ist das maligne Melanom. Weitaus häufiger ist das spinozelluläre Karzinom mit seinen Tumorvorstufen Morbus Bowen und aktinische Keratose, die aber nur einen geringen Teil der Todesfälle verursachen.

In dieser Studie wurde die Expression des Rad51-Proteins in den oben genannten Tumoren der Haut untersucht. Auf Grund der unterschiedlichen Gewebeeigenschaften wurden die untersuchten Tumore und Tumorvorstufen in zwei Gruppen eingeteilt. Das histologische Charakteristikum der „Compound“-Nävi und der Melanome sind die melanozytären Zellen, so dass die Ergebnisse von Nävus und Melanom miteinander verglichen wurden. In der zweiten Gruppe wurden die Ergebnisse des spinozellulären Karzinoms und seiner Tumorvorstufen aktinische Keratose und Morbus Bowen untereinander verglichen. Insgesamt wurden für jeden Tumortyp mit Hilfe der Datenbank HiDIS im Institut für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Lübeck 30 Fälle zufällig ausgewählt und gefärbt. Die histologische Charakterisierung des Tumors erfolgte durch einen Dermatologen in der Klinik für Dermatologie. Von den melanozytären Nävi wurden nur 14 Fälle in die Bewertung einbezogen. Insgesamt wurden 1318 digitale Bilder von Rad51- und Ki-67-gefärbten Präparaten ausgewertet. Je Präparat wurden im Durchschnitt 867 Tumorzellen gezählt. Im Vorfeld der Auswertung wurde anhand von Referenzbildern festgelegt, welche Tumorzelle im Sinne des immunhistochemischen Proteinnachweises als positiv zu werten ist (siehe 2.2.8.2).

3.3.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Das mittlere Alter der Patienten und Patientinnen mit benignen Nävi betrug 35 Jahre, mit malignem Melanom 66 Jahre, mit aktinischer Keratose, Morbus Bowen oder dem hochdifferenzierten spinozellulären Karzinom 73 Jahre, bei Patienten mit entdifferenziertem spinozellulären Karzinom 77 Jahre (siehe Abbildung 11).

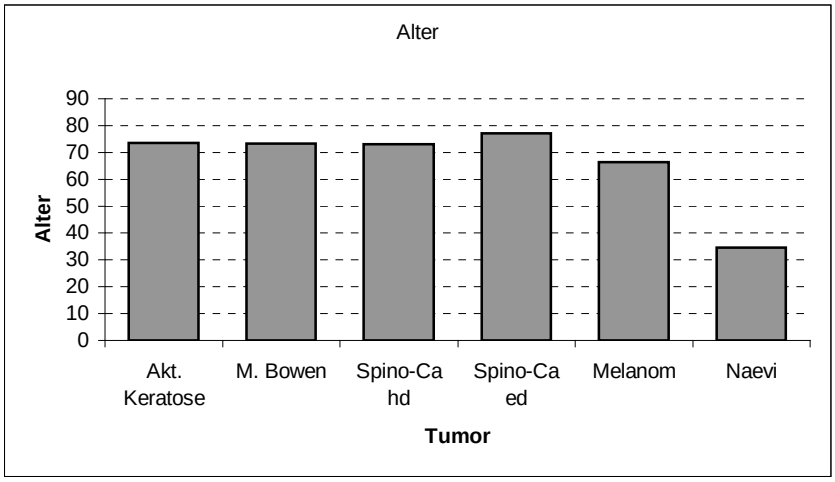


Abb 11. Mittleres Alter des Studienkollektivs

(Akt. Keratose = aktinische Keratose; M. Bowen = Morbus Bowen; Spino-Ca hd = hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom; Spino-Ca ed = entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom)

Die Anzahl weiblicher und männlicher Patienten war nicht in jeder Tumorgruppe gleich. Während der Anteil der männlichen Patienten in der Gruppe der aktinischen Keratose und dem spinozellulären Karzinom vom entdifferenzierten Typ etwa 66% betrug, gehörten beim malignen Melanom 56%, beim spinozellulären Karzinom vom hochdifferenzierten Typ 53%, beim Morbus Bowen 40% und bei den Nävi 36% zum männlichen Geschlecht (siehe Abbildung 12).

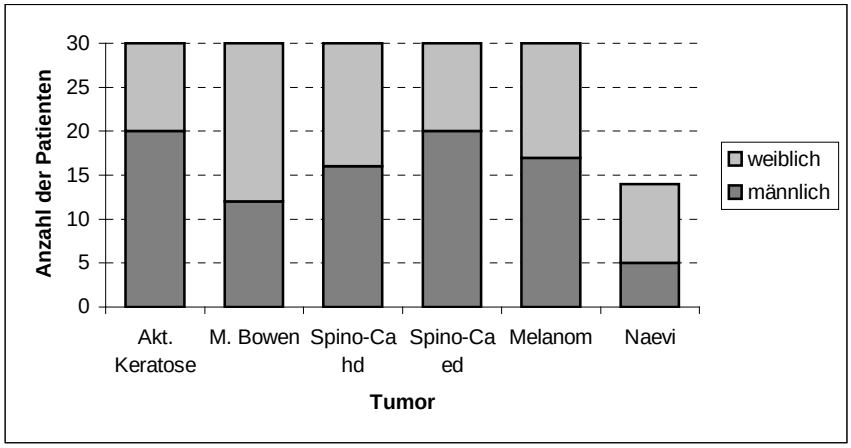
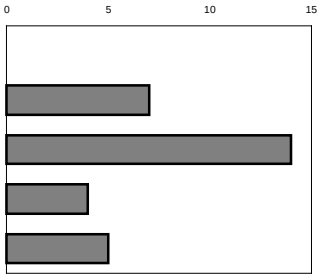
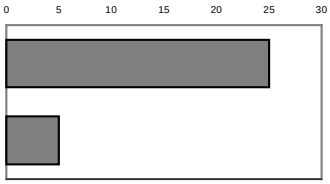


Abb. 12 Geschlechtsverteilung des Studienkollektivs

(Akt. Keratose = aktinische Keratose; M. Bowen = Morbus Bowen; Spino-Ca hd = hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom; Spino-Ca ed = entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom)

Das maligne Melanom nimmt aufgrund seiner Malignität unter den Tumoren der Haut eine Sonderstellung ein. Zur Prognoseeinschätzung und zur Durchführung einer stadiengerechten Therapie und Nachsorge ist eine Abschätzung der Tumorgröße und Tumorausbreitung erforderlich. Zu den wichtigsten prognostischen Kriterien gehören dabei die Tumordicke nach Breslow (1970) und die Eindringtiefe nach Clark (1969). Die Messung der Dicke des primären Tumors (pT) erfolgt am histologischen Präparat und ist definiert durch den Abstand zwischen dem Stratum granulosum der Epidermis und der am tiefsten in das Gewebe infiltrierenden Melanomzelle. Die Eindringtiefe nach Clark bezieht sich auf die Ausbreitung des Primärtumors in den unterschiedlichen Schichten der Haut. So dringt im Stadium Clark IV der Tumor ins Stratum reticulare ein, während er bei Clark V bereits die Subkutis erreicht. Die Einteilung der Stadien erfolgte nach den Vorgaben der „American Joint Committee for Cancer“ (AJCC). Tabelle 1 zeigt die pathologischen Parameter der in dieser Arbeit untersuchten malignen Melanome. Alle Tumore sind tiefer als 0,75 mm, fast die Hälfte der untersuchten Melanome sind zwischen 1,51 und 3 mm tief (entspricht Stadium pT3a). Der größte Anteil der Melanome dringt bis ins Stratum reticulare ein (Clark IV), fünf sogar bis in die Subkutis (Clark V).

Tab.1 Pathologische Parameter der untersuchten malignen Melanome

Parameter	n	Stadieneinteilung		Häufigkeit	Anzahl graphisch
Tumordicke nach Breslow	30	pT1	< 0,75 mm	0	
		pT2	0,76-1,5 mm	7	
		pT3a	1,51-3,0 mm	14	
		pT3b	3,01-4,0 mm	4	
		pT4	> 4,01 mm	5	
Eindringtiefe nach Clark	30	IV		25	
		V		5	

(n: Gesamtzahl der Fälle; mm: Millimeter)

3.3.3 Rad51 in Tumoren der Haut

In den Präparaten, die mittels des 1G8-Antikörpers angefärbt wurden, zeigten sich in einzelnen Tumorzellen deutliche nukleäre Anfärbungen. In der Gruppe der spinozellulären Karzinome und den Tumorvorstufen liegen die Mittelwerte Rad51-positiver Tumorzellen zwischen 6,38% und 10,08%. Die Tumorvorstufen aktinische Keratose und Morbus Bowen haben mit 6,48% und 6,38% annähernd eine gleiche durchschnittliche Anzahl Rad51-positiver Tumorzellen. Mit Zunahme der Entdifferenzierung enthält das Karzinomgewebe zunehmend mehr Rad51-positive Tumorzellkerne. Die höchste durchschnittliche Anzahl Rad51-positiver Tumorzellen hat das spinozelluläre Karzinom, im hochdifferenzierten Stadium mit 8,07% und im entdifferenzierten Stadium mit 10,08%.

Die melanozytären Nävi vom „Compound“-Typ haben im Durchschnitt 0,08% Rad51-positiv gefärbte Zellen. Das maligne Melanom hat im Mittel 1,29% Rad51-positiv gefärbte Tumorzellen, mehr als die benignen Nävi, aber deutlich weniger als die epithelialen Tumoren der Haut (siehe Abb. 13).

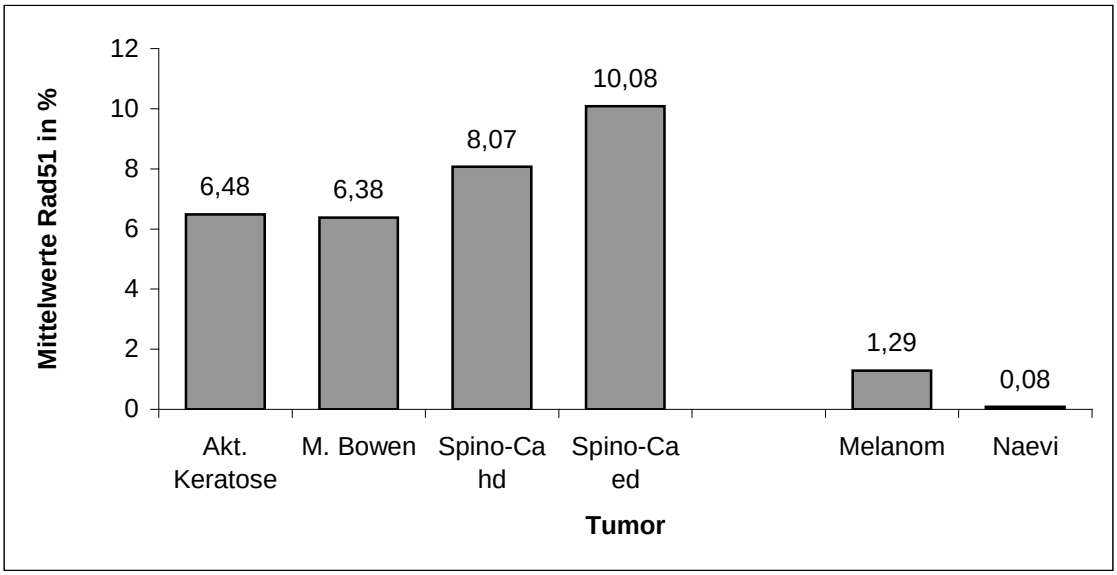


Abb. 13 Durchschnittliche Expression von Ki-67 in Tumoren der Haut

(Akt. Keratose = aktinische Keratose; M. Bowen = Morbus Bowen; Spino-Ca hd = hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom; Spino-Ca ed = entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom)

In allen Präparaten bewegt sich der Anteil der Rad51-positiven Tumorzellen zwischen 0% und 23,01%, dabei findet sich nur in der Gruppe der melanozytären Nävi keine nachweisbare Überexpression. Der höchste Wert ist bei spinozellulären Karzinomen im entdifferenzierten Stadium zu beobachten.

In der Gruppe der Tumorvorstufen/In-situ-Karzinome (aktinische Keratose und Morbus Bowen) liegt die Anzahl Rad51-überexprimierender Tumorzellen zwischen 1-18%. Die meisten Tumore haben einen Anteil Rad51-überexprimierender Tumorzellen von 4-6%. Bei beiden Tumorvorstufen zeigte sich jeweils bei einem Tumor ein deutlich höheren Anteil mit 17% bzw. 18% (siehe Abb. 14 A,B). Beim spinozellulären Karzinom vom ent- und hochdifferenzierten Typ liegt der Anteil Rad51-positiver Zellen zwischen 3-23% (siehe Abb. 14 C,D), bei den meisten Tumoren im Bereich zwischen 4-8%. Einen deutlich höheren Anteil von 18-25% gibt es bei wenigen Tumoren nur in der Gruppe des entdifferenzierten spinozellulären Karzinoms (siehe Abb. 14 D).

In den Nävi findet sich nur eine sehr geringe und in acht Fällen keine vermehrte Rad51-Überexpression, maximal 0,36% (grafisch nicht gezeigt). In den malignen Melanomen liegt die Anzahl Rad51-positiver Zellen zwischen 0,1-4,5%. Die meisten Tumoren lagen zwischen 0-2% (siehe Abb. 14 E).

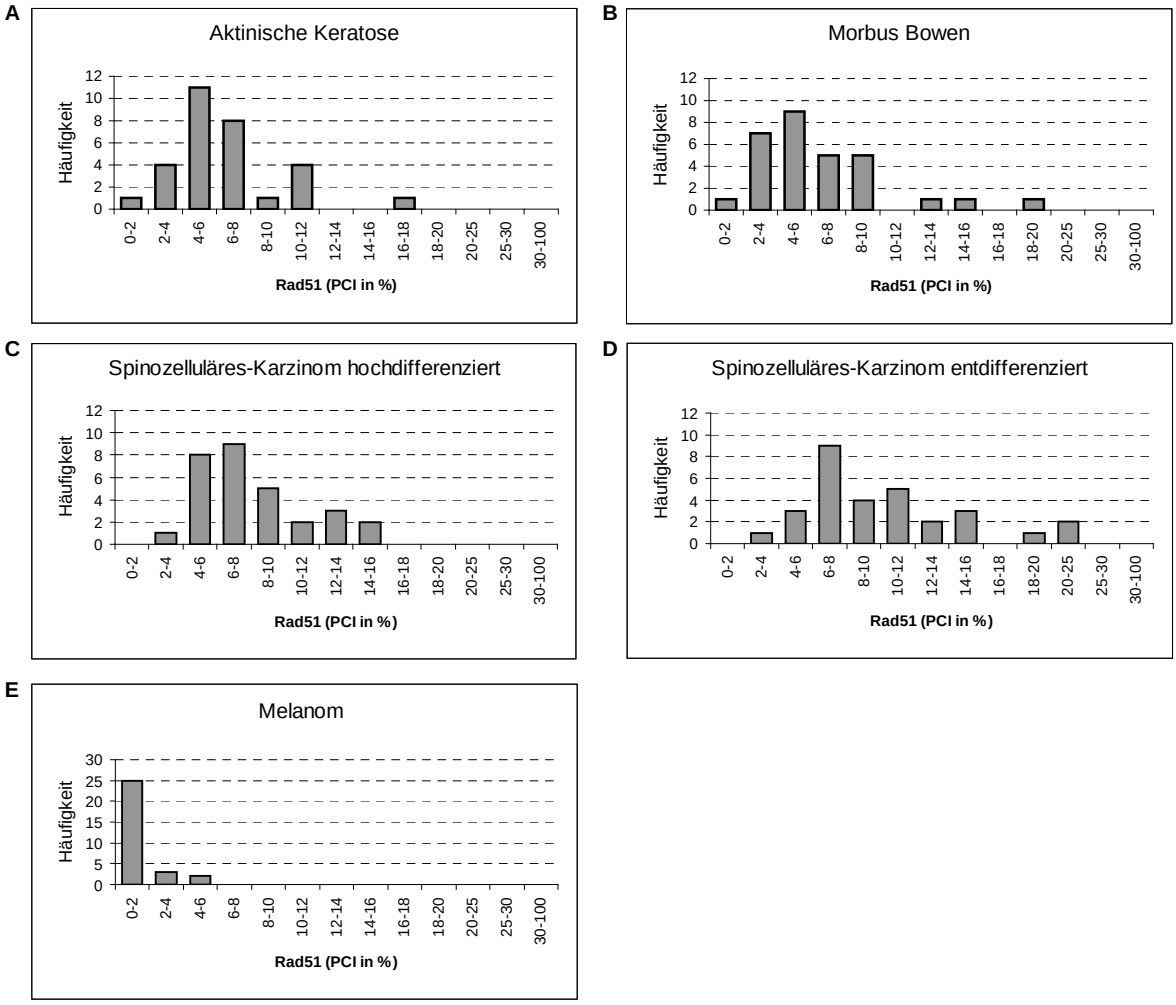


Abb.14 Verteilung der Rad51-Expression in den einzelnen Tumoren der Haut

(PCI: „positive cell index“)

3.3.3.1 Statistische Analyse der Rad51-Expression

Die statistischen Analysen der Rad51-Expression in Tumoren der Haut sind in den Tabellen 2 bis 4 zusammengefasst. Die Ergebnisse wurden auf Grund der unterschiedlichen histologischen Merkmale in zwei Gruppen eingeteilt (siehe 3.3.1.) Die Ergebnisse der aktinische Keratosen, des Morbus Bowen und des spinozellulären Karzinoms im hoch- und entdifferenzierten Stadium wurden zusammen analysiert. Die Ergebnisse des malignen Melanoms wurden mit den Ergebnissen der melanozytären Nävi vom „Compound"-Typ verglichen.

Die mittlere Anzahl Rad51-positiver Tumorzellen ist bei den männlichen Patienten größer. Einzige Ausnahme ist das hochdifferenzierte spinozelluläre Karzinom. Hier ist der Mittelwert der Rad51-Überexpression bei den männlichen Patienten ist 6,75%, bei den weiblichen Patienten 9,57%. Dieser Unterschied ist bei Anwendung des U-Tests nach Mann und Whitney (Zöfel, 1992) als einziger signifikant (p=0,0472).

Tab. 2 Statistische Analyse der Rad51-Überexpression bei männlichen und weiblichen Patienten in Tumoren der Haut

Tumor	Gesamt-anzahl	Klasse	Anzahl	Rad51 (Mittelwert in %)	U-Test	
aktinische Keratose	30	weiblich	10	5,72	p=0,8121	ns
		männlich	20	6,87		
Morbus Bowen	30	weiblich	18	5,56	p=0,4908	ns
		männlich	12	7,6		
Spino-Ca hd	30	weiblich	14	9,57	p=0,0472	*
		männlich	16	6,75		
Spino-Ca ed	30	weiblich	10	8,49	p=0,3282	ns
		männlich	20	10,87		
Melanom	30	weiblich	13	1,07	p=0,1977	ns
		männlich	17	1,45		

H-Test nach Kruskal und Wallis: U-Test nach Mann und Whitney; nn: Test nicht notwendig; ns: Test nicht signifikant; */**/***: p<0,05/0,01/0,001 nach Bonferroni-Korrektur; Spino-Ca hd = hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom; Spino-Ca ed = entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom

Bei den Melanomen ergab der Vergleich der Rad51-Überexpression bezüglich der Tumordicke nach Breslow und des Clark-Index keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab 3). Zum Vergleich der Rad51-Überexpression in den Tumorstadien T2 bis T4 wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis als Globaltest verwendet (Zöfel, 1992). Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden, so dass ein paarweiser Vergleich der Tumorstadien nicht notwendig war. Der Anteil Rad51-positiver Tumorzellen nimmt bis zum Tumorgrößestadium T3a zu. Ausgedehntere Tumoren (T3b und T4) haben dagegen einen geringeren Mittelwert als T2-Tumoren. Mit zunehmender Eindringtiefe des Tumors in das Gewebe (Clark-Index) nimmt die Anzahl Rad51-positiver Tumorzellen ab. Der Vergleich der Rad51-Mittelwerte der Stadien IV und V ergab keinen signifikanten Unterschied. Grundlage dieses Testes war der U-Test nach Mann und Whitney (Zöfel, 1992).

Die absolute Anzahl der Rad51-überexprimierten Zellen ist bei den Melanomen und den Nävi gering (siehe Tab. 3), jedoch ergibt der Vergleich beider Mittelwerte mit dem U-Test nach Mann und Whitney einen signifikanten Unterschied ($p<0,0001$).

Tab. 3 Statistische Analyse der Melanomparameter und Vergleich Melanom mit Nävus

Tumor	Parameter	Anzahl	Rad51 (Mittelwert in %)	H-Test	U-Test
Melanom	Breslow-Index				
	pT1 < 0,75 mm	0			
	pT2 0,76-1,5 mm	7	1,28		
	pT3a 1,51-3,0 mm	14	1,53	ns	nn
	pT3b 3,01-4,0 mm	4	1,13	p=0,5205	
	pT4 > 4,01 mm	5	0,68		
	Clark-Index				
	IV	26	1,37	nn	IV:V ns
	V	4	0,72		p=0,3911
Melanom		30	1,29	nn	*** p<0,0001
Nävus		14	0,08		

H-Test nach Kruskal und Wallis: U-Test nach Mann und Whitney; nn: Test nicht notwendig; ns: Test nicht signifikant; */**/***: p<0,05/0,01/0,001 nach Bonferroni-Korrektur

Die Verwendung des H-Testes nach Kruskal und Wallis als Globaltest zum Vergleich der Rad51-Überexpression beim Morbus Bowen und den aktinischen Keratosen sowie des hoch- und entdifferenzierten spinozellulären Karzinoms zeigte einen repräsentativen Unterschied (p=0,003), so dass sich eine paarweise Gegenüberstellung der vier Tumoren untereinander anschloss. Nicht signifikant war der Unterschied der durchschnittlichen Anzahl Rad51-positiver Tumorzellkerne beim Vergleich des Morbus Bowen mit der aktinischen Keratose (p=0,6048) und des hochdifferenzierten spinozellulären Karzinoms mit dem entdifferenzierten spinozellulären Karzinom (p=0,1039) (siehe Tab. 4). Ein großer Unterschied fand sich dagegen beim Vergleich des Morbus Bowen und den aktinischen Keratosen mit dem entdifferenzierten spinozellulären Karzinom (p≤ 0,0006).

Tab. 4 Statistische Analyse der Rad51-Expression in Tumoren der Haut untereinander

Parameter	Anzahl	Rad51 Mittelwert in %	H-Test	U-Test		
aktinische Keratose (1)	30	6,48		(1):(2)	ns	p=0,6048
				(1):(3)	*	p=0,0298
Morbus Bowen (2)	30	6,38	***	(1):(4)	***	p=0,0006
			p=0,0003	(2):(3)	*	p=0,0180
Spino-Ca hd. (3)	30	8,07		(2):(4)	***	p=0,0004
				(3):(4)	ns	p=0,1039
Spino-Ca ed. (4)	30	10,08				

H-Test nach Kruskal und Wallis: U-Test nach Mann und Whitney; nn: Test nicht notwendig; ns: Test nicht signifikant; */**/***: p<0,05/0,01/0,001 nach Bonferroni-Korrektur; spino-Ca hd: spinozelluläres Karzinom hochdifferenziert; spino-Ca ed: spinozelluläres Karzinom entdifferenziert

3.3.4 Ki-67 in Tumoren der Haut

Die Mittelwerte der Ki-67-Expression liegen zwischen 0,03% und 18,12%. Die höchste durchschnittliche Expression hat der Morbus Bowen mit 18,12%, im Vergleich dazu ist der Mittelwert bei aktinischen Keratosen mit 6,34% deutlich geringer. Mit zunehmender Entdifferenzierung nimmt die Anzahl Ki-67-positiver Tumorzellen erstaunlicherweise ab (hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom 12,47%, entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom 5,49%).

Das maligne Melanom zeigt im Mittel 2,54% Ki-67-positiv gefärbte Tumorzellen, deutlich mehr als die Nävi mit 0,03%, aber auch deutlich weniger als in den epithelialen Tumoren der Haut (siehe Abb. 15).

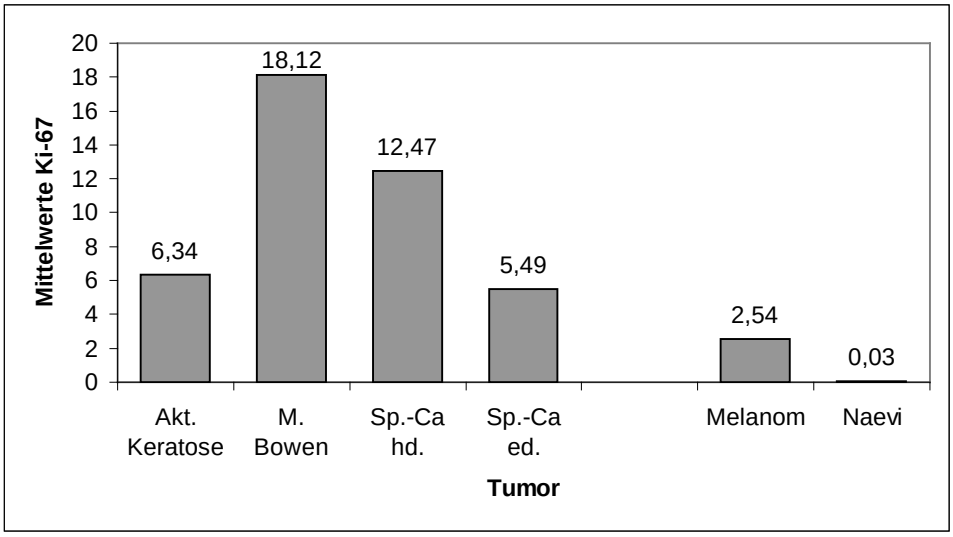


Abb. 15 Durchschnittliche Expression von Ki-67 in Tumoren der Haut

(Akt. Keratose = aktinische Keratose; M. Bowen = Morbus Bowen; Spino-Ca hd = hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom; Spino-Ca ed = entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom)

In allen Präparaten bewegt sich der Anteil der Ki-67-positiven Tumorzellen zwischen 0% und 32%. Dabei findet sich nur in der Gruppe der Nävi keine nachweisbare Expression. Der höchste Wert wurde beim Morbus Bowen beobachtet.

Die Anzahl Ki-67-exprimierender Tumorzellen liegt bei der aktinischen Keratose zwischen 0-18%, überwiegend zwischen 0-8% (siehe Abb. 16 A). Beim Morbus Bowen findet sich meist eine Positivität zwischen 14-18%, insgesamt liegt die Anzahl Ki-67-positiver Zellen zwischen 8-32% (siehe Abb. 16 B). Beim entdifferenzierten spinozellulären Karzinom wurde eine Ki-67-Expression zwischen 3-22% gefunden, in der Mehrzahl zwischen 8-16% (siehe Abb. 16 C). Beim entdifferenzierten spinozellulären Karzinom liegt der Anteil Ki-67-positiver Zellen zwischen 1-15%, meist zwischen 2-6%. Nur wenige Tumoren zeigten einen deutlich höheren Anteil von 14-16% Ki-67-positiven Zellen (siehe Abb. 16 D).

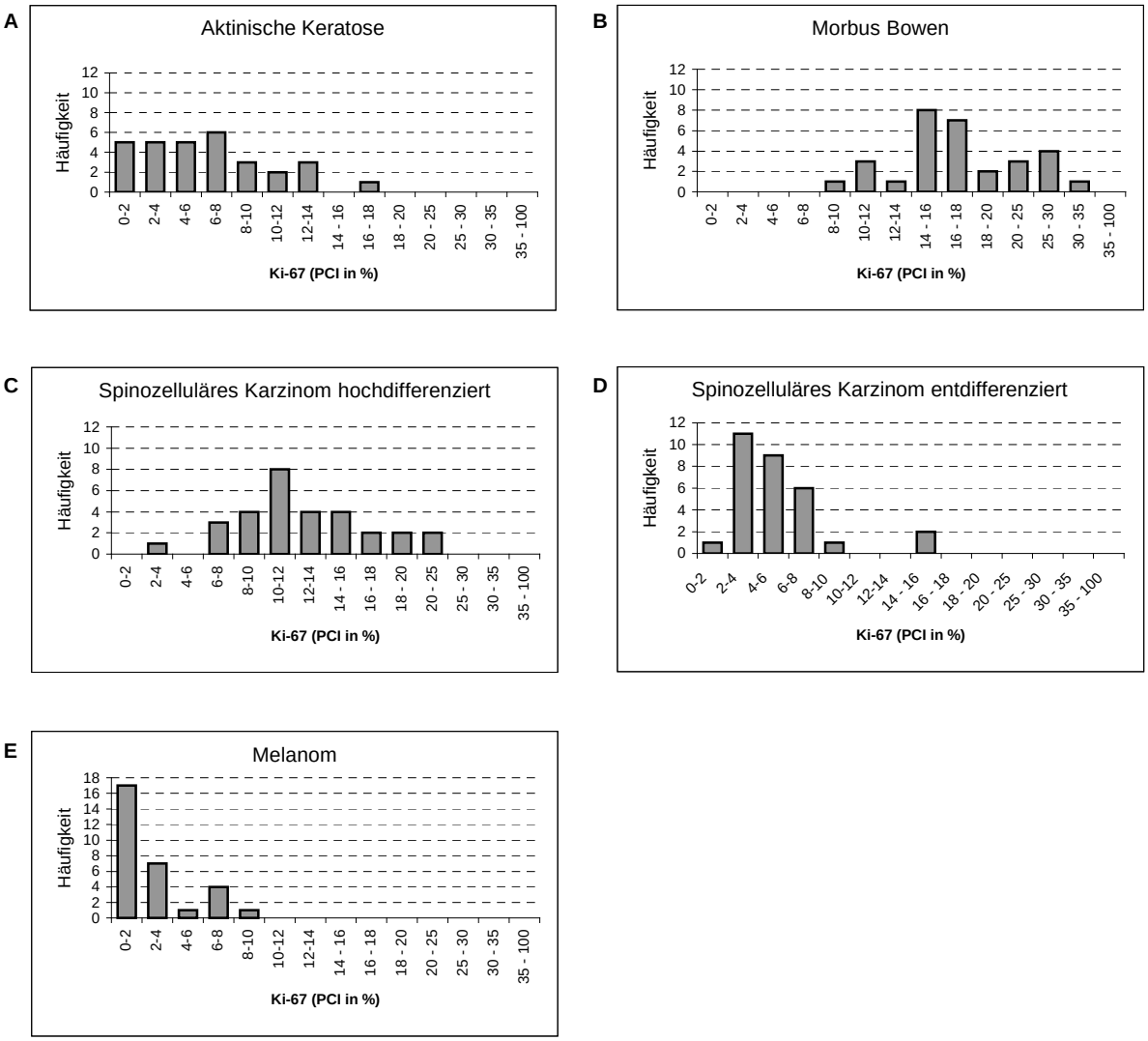


Abb. 16 Verteilung der Ki-67 Expression in den Tumoren der Haut

(PCI: „positive cell index“)

In malignen Melanomen finden sich 0-9% Ki-67-positive Zellen. Überwiegend zeigt sich eine geringe Proliferation mit 0-2% positiven Tumorzellen (siehe Abb. 16 E). Nicht abgebildet ist die Expression von Ki-67 in Nävi. Als höchster Wert wurden 0,13% Positivität ermittelt, in zehn Fällen fand sich gar keine Ki-67-Expression.

3.3.4.1 Statistische Analyse der Ki-67-Expression

Männliche Patienten mit Morbus Bowen oder Melanom haben eine höhere Anzahl Ki-67-positiver Zellen als weibliche Patienten in der gleichen Tumorgruppe. Signifikant ist der Unterschied der Mittelwerte der Ki-67-Expression bei männlichen und weiblichen Patienten bei der aktinischen Keratose (p=0,0190), beim hochdifferenzierten spinozellulären Karzinom (p=0,0426) und bei den Melanomen (p=0,0481) (siehe Tab 5).

Tab. 5 Statistische Analyse der Ki-67-Expression bei männlichen und weiblichen Patienten in Tumoren der Haut

Tumor	Gesamtanzahl	Klasse	Anzahl	Ki-67 (Mittelwert in %)	U-Test	
aktinische Keratose	30	Weiblich	10	8,89	p=0,0190	*
		männlich	20	5,06		
Morbus Bowen	30	weiblich	18	17,95	p=0,3913	ns
		männlich	12	18,37		
Spino-Ca hd	30	weiblich	14	13,99	p=0,0426	*
		männlich	16	11,15		
Spino-Ca ed	30	weiblich	10	5,81	p=0,8798	ns
		männlich	20	5,33		
Melanom	30	weiblich	13	1,56	p=0,0481	*
		männlich	17	3,3		

H-Test nach Kruskal und Wallis: U-Test nach Mann und Whitney; ns: Test nicht signifikant; */**/***: p<0,05/0,01/0,001 nach Bonferroni-Korrektur; Spino-Ca hd = hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom; Spino-Ca ed = entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom

Tab. 6 Statistische Analyse der Melanomparameter bei der Ki-67-Expression

Tumor	Parameter	Anzahl	Ki-67 Mittelwerte in %	H-Test	U-Test
Melanom	Breslow-Index				
	pT1 < 0,75 mm	0			
	pT2 0,76-1,5 mm	7	3,9		
	pT3a 1,51-3,0 mm	14	2,06	ns	nn
	pT3b 3,01-4,0 mm	4	2,7	p=0,5268	
	pT4 > 4,01 mm	5	2,44		
	Clark-Index				
	IV	26	2,42	nn	IV:V ns
	V	4	3,32		p=0,4607
Melanom	2,54	30	2,54	nn	*** p<0,0001
Nävus	0,03	14	0,03		

H-Test nach Kruskal und Wallis: U-Test nach Mann und Whitney; ns: Test nicht signifikant; nn: Test nicht notwendig; */**/***: p<0,05/0,01/0,001 nach Bonferroni-Korrektur;

Keine statistische Signifikanz ergab ein Vergleich der Ki-67-Expression bei den Melanomparametern Breslow- und Clark-Index. Ein Vergleich der Tumorstadien T2 bis T4 mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis als Globaltest ergab keine statistische Signifikanz (p=0,5268) (Zöfel, 1992). Dadurch schloss sich ein paarweiser Vergleich der Tumorstadien aus.
Die Anzahl Ki-67-positiver Tumorzellen ist im Tumorstadium T2 am größten und im Stadium T3a am geringsten. Bei ausgedehnteren Tumoren (T3b und T4) nimmt die prozentuale Ki-67-Expression mit Zunahme der Tumordicke ab.

Bei isolierter Betrachtung der Eindringtiefe nach Clark nimmt mit zunehmender Eindringtiefe des Tumors ins Gewebe die Anzahl Ki-67-positiver Tumorzellen zu (siehe Tab. 6). Der U-Test nach Mann und Whitney (Zöfel, 1992) ergab aber bei dem Vergleich der Ki-67-Mittelwerte der Stadien IV und V keinen signifikanten Unterschied (p=0,4607).

Bei den Melanomen und den Nävi ist die absolute Anzahl Ki-67-positiver Zellen gering (siehe Tab. 6), ein Vergleich beider Mittelwerte mit dem U-Test nach Mann und Whitney zeigt aber einen signifikanten Unterschied (p<0,0001).

Ein Vergleich der Ki-67-Expression beim Morbus Bowen, der aktinischen Keratose und des hoch- und entdifferenzierten spinozellulären Karzinoms mittels des H-Testes nach Kruskal und Wallis als Globaltest zeigte einen repräsentativen Unterschied (p<0,0001). Es schloss sich eine paarweise Gegenüberstellung der vier Tumore untereinander mittels des U-Tests nach Mann und Whitney an (Zöfel, 1992). Nicht signifikant war einzig der Unterschied der durchschnittlichen Anzahl Ki-67-positiver Tumorzellkerne beim Vergleich der aktinischen Keratose mit dem entdifferenzierten spinozellulären Karzinom (p=0,4964) (siehe Tab.7).

Tab. 7 Statistische Analyse der Ki-67-Expression in Tumoren der Haut untereinander

Parameter	Anzahl	Ki-67 Mittelwert in %	H-Test	U-Test		
aktinische Keratose (1)	30	6,34		(1):(2)	***	p<0,0001
				(1):(3)	***	p<0,0001
Morbus Bowen (2)	30	18,12	***	(1):(4)	ns	p=0,4964
			p<0,0001	(2):(3)	***	p=0,0001
Spino-Ca hd. (3)	30	12,47		(2):(4)	***	p<0,0001
				(3):(4)	***	p<0,0001
Spino-Ca ed. (4)	30	5,49				

H-Test nach Kruskal und Wallis: U-Test nach Mann und Whitney; nn: Test nicht notwendig; ns: Test nicht signifikant; */**/***: p<0,05/0,01/0,001 nach Bonferroni-Korrektur; Spino-Ca hd = hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom; Spino-Ca ed = entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom

3.3.5 Vergleich der Rad51-Expression mit der Ki-67-Expression

Die Überexpression von Rad51 zeigt eine Steigerung im Rahmen der Tumorprogression bei den epithelialen Tumoren. Die Ki-67-Expression dagegen zeigt ein nicht einheitliches Muster. Überraschend war der geringe prozentuale Anteil Ki-67-positiver Tumorzellen bei mikroskopisch erkennbarer Entdifferenzierung des Tumors. Eine progressionsadaptierte Steigerung der Ki-67-Expression findet sich von aktinischer Keratose zum hochdifferenzierten spinozellulären Karzinom. Einzig bei der aktinischen Keratose ist die Anzahl Rad51- und Ki-67-positiver Zellen etwa gleich (6,48% und 6,34%).

Die Melanome haben eine höhere Anzahl Rad51-überexprimierender Zellen und eine höhere Anzahl Ki-67-positiver Zellen als in melanozytären Nävi beobachtet werden konnte.

Für den Vergleich der Rad51-Überexpression mit der Ki-67-Expression in den verschiedenen Tumoren wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Nicht signifikant war nur der Unterschied zwischen der Anzahl Rad51-positiver Zellen und Ki-67-positiver Zellen bei der aktinischen Keratose ($p=0,6959$) und den Nävi ($p=0,0929$) (siehe Tab. 8).

Die an Hand des medianen Ki-67-PCI eingeteilten Tumoren hoher und niedriger Ki-67-Expression (siehe Tab. 9) zeigen mit Ausnahme des Melanoms eine höhere Rad51-Expression bei Tumoren mit hoher Ki-67-Expression. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Tab. 8 Statistische Analyse der Rad51- gegen die Ki-67-Expression in Tumoren der Haut

Parameter	Anzahl	Rad51 Mittelwert in %	Ki-67 Mittelwert in %			Wilcoxon-Test
aktinische Keratose	30	6,48	6,34	Rad51:Ki-67	ns	p=0,6959
Morbus Bowen	30	6,38	18,12	Rad51:Ki-67	***	p<0,0001
Spino-Ca hochd.	30	8,07	12,47	Rad51:Ki-67	***	p<0,0001
Spino-Ca entd.	30	10,08	5,49	Rad51:Ki-67	***	p<0,0001
Melanom	30	1,29	2,54	Rad51:Ki-67	*	p=0,0256
Nävus	14	0,08	0,034	Rad51:Ki-67	ns	p=0,0929

ns: Test nicht signifikant; */**/***: p<0,05/0,01/0,001 nach Bonferroni-Korrektur; spino-Ca hochd: spinozelluläres Karzinom hochdifferenziert; spino-Ca entd: spinozelluläres Karzinom entdifferenziert

Tab. 9 Vergleich der Rad51-Expression bei hoher und niedriger Ki-67-Expression

Tumor	Gesamtzahl	Klasse	Anzahl	Rad51 Mittelwert in %	U-Test	
Aktinische Keratose	30	Ki-67 PCI<6,02	15	6,21	p=0,187	ns
		Ki-67 PCI>6,02	15	6,78		
Morbus Bowen	30	Ki-67 PCI<16,41	15	5,03	p=0,116	ns
		Ki-67 PCI>16,41	15	7,72		
Spino-Ca Hochdifferenziert	30	Ki-67 PCI<11,83	15	7,1	p=0,089	ns
		Ki-67 PCI>11,83	15	9,03		
Spino-Ca Entdifferenziert	30	Ki-67 PCI<4,78	15	9,65	p=0,683	ns
		Ki-67 PCI>4,78	15	10,5		
Melanom	30	Ki-67 PCI<1,89	15	1,35	p=0,967	ns
		Ki-67 PCI>1,89	15	1,22		

U-Test nach Mann und Whitney; ns: Test nicht signifikant; Spino-Ca = spinozelluläres Karzinom; PCI= „positive cell index“

Zur Darstellung, ob zwischen den untersuchten Parametern Rad51-Überexpression und Ki-67-Expression ein Zusammenhang im Sinne einer Korrelation bestand, kam der Rangkorrelationskoeffizient r_S nach Spearman zur Anwendung (Zöfel, 1992). Er kann Werte zwischen –1 und +1 annehmen, wobei ein Betrag nahe Null einen schwachen und ein Betrag nahe Eins einen starken Zusammenhang bedeutet. Ein geringer Zusammenhang zwischen der Anzahl Rad51 und Ki-67-positiver Zellen findet sich beim Morbus Bowen (r_S=0,3780) und beim hochdifferenzierten spinozellulären Karzinom (r_S=0,4376). Bei den anderen Tumorvorstufen und Tumoren findet sich keine signifikante Korrelation zwischen der Rad51-Überexpression und der Ki-67-Expression (Abb. 17).

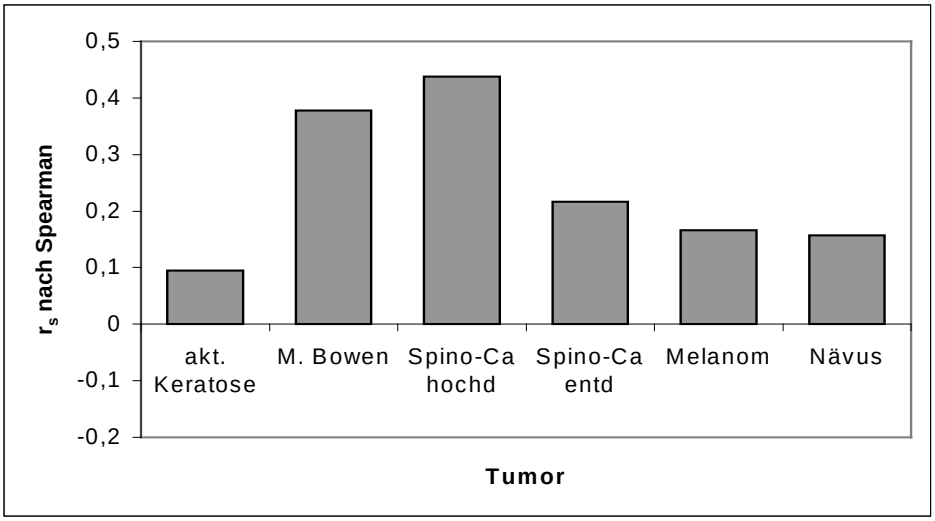


Abb. 17 Korrelation der Rad51-Expression mit der Ki-67-Expression

Dargestellt ist der Rangkorrelationskoeffizient r_S nach Spearman, signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet (*/**/***:; p<0,05/0,01/0,001, Akt. Keratose = aktinische Keratose; M. Bowen = Morbus Bowen; Spino-Ca hd = hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom; Spino-Ca ed = entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom).

4. Diskussion

Im Jahre 2002 erlag jeder vierte Verstorbene in Deutschland einem Krebsleiden (Statistisches Bundesamt). Demnach gehören in der Bundesrepublik Deutschland nach den Herzkreislauferkrankungen maligne Tumoren zu den zweithäufigsten Todesursachen. Prinzipiell können aus jedem Organ und Gewebe des menschlichen Körpers bösartige Tumoren hervorgehen. Die Haut hat unter allen Organen des Körpers die höchste Inzidenz und Vielfalt an Tumoren. Jährlich erkranken rund 2,2 Millionen Menschen an Hautkrebs (WHO). Er ist nicht nur die weltweit häufigste Krebserkrankung, sondern auch die mit den höchsten jährlichen Zuwachsraten. Ursachen ihres Tumorreichtums sind die Größe der Haut, der strukturreiche Aufbau und die exponierte Lage gegenüber karzinogenen Noxen der Umwelt. Das maligne Melanom ist dabei der bedeutendste Tumor der dermatologischen Onkologie, nicht wegen seiner Häufigkeit, es macht etwa 6% aller Hautkrebserkrankungen in Deutschland aus, sondern aufgrund seines aggressiven Wachstumsverhaltens. Etwa 4,3% aller bösartigen Neubildungen in der Altersgruppe unter 50 Jahren sind maligne Melanome, die etwa 1% aller Krebstodesfälle verursachen (Robert Koch Institut, 2004). Die Melanominzidenz nimmt weltweit zu, insbesondere bei stark sonnenexponierten hellhäutigen Bevölkerungsgruppen (Grin-Jorgensen et al., 1992; Marks und Kopf, 1995; Sober et al., 1991). Das maligne Melanom ist im fortgeschrittenen Krankheitsstadium durch seine ausgeprägte Therapieresistenz gekennzeichnet. Konventionelle Behandlungsstrategien einschließlich der Chirurgie, Radiatio oder der

Chemotherapie hatten im Stadium der Metastasierung bislang keinen wesentlichen Einfluss auf die Überlebenszeit.

Aufgrund der steigenden Inzidenz des malignen Melanoms und der infausten Prognose bei Metastasierung wurden in den vergangenen Jahren neben den allgemeinen Prognosefaktoren (z.B. Tumordicke, Eindringtiefe, Ulzeration und Metastasenstatus) auch spezifischere Faktoren (z.B. potentielle Tumormarker) auf ihre klinische Eignung hin untersucht. Tumormarker bezeichnen Substanzen und zelluläre Veränderungen, deren Auftreten und Konzentrationsänderung in Beziehung mit der Entstehung und dem Wachstum von malignen Tumoren eines Individuums stehen. Zu den zellulären Tumormarkern gehören unter anderem zellmembranständige Tumorantigene, Rezeptoren (Hormonrezeptoren) und Zellmarker, die auf eine vermehrte Expression von Onkogenen und ein monoklonales Zellwachstum hindeuten, sowie molekulargenetische zelluläre Veränderungen (Chromosomenaberrationen). Humorale Tumormarker (z.B. prostataspezifisches Antigen (PSA), onkofetale Antigene (CEA, AFP)) sind Substanzen, die gegenüber physiologischen Bedingungen in Serum, Blut, Urin und anderen Körperflüssigkeiten in erhöhter Konzentration nachweisbar sind. Idealerweise sezernieren Tumorzellen die Signalsubstanz erst nach ihrer malignen Transformation. Das Indikationsgebiet von Tumormarkern liegt in erster Linie in der Therapie- und Verlaufskontrolle maligner Erkrankungen. Außerhalb von klinischen Studien sind kommerziell verfügbare, einfach handhabbare, standardisierte und reproduzierbare Methoden Grundvoraussetzung für einen Tumormarkertest. Für das maligne Melanom gab es lange keinen neben experimentellen und klinischen Studien stehenden Tumormarker. Zu den bisher publizierten Melanommarkern gehören Melaninmetabolite (5-S-Cysteinyl-Dopa (Horikoshi et al., 1994); Tyrosinase (Sonesson et al., 1995), tumorassoziierte Antigene (neuronspezifische Enolase (Hornef et al., 1992); „Lipid bound sialic acid“ (Buzaid et al., 1994); S-100 (von Schoultz et al., 1996), Zytokine (Interleukin-8 (Scheibenbogen et al., 1995); Interleukin-10 (Dummer et al., 1995)) und MIA (melanoma inhibitory activity) (Blesch et al., 1994). Unter allen diskutierten Signalsubstanzen entsprechen den geforderten Qualitätsansprüchen (hohe Sensitivität und Spezifität, leichte Reproduzierbarkeit, einfaches und

kostengünstiges Verfahren) an einen Tumormarker am ehesten der Nachweis von S-100 und MIA, die seit einiger Zeit kommerziell erhältlich sind. S-100 und MIA können anhand der bisherigen Ergebnisse als potente Marker zur Therapie- und Verlaufskontrolle bei Metastasierung genutzt werden (Brochez et al. 2000, Djukanovic et al., 2001, Ugurel et al., 2005). Einen frühen Progressionsmarker des Melanoms gibt es bisher nicht.
Das Verständnis der Tumorentstehung kann dabei helfen, weitere geeignete molekularbiologische Marker zu finden, um Tumore der Haut exakter zu klassifizieren und den Grad der Malignität eines Tumors besser einzuschätzen, um dementsprechend eine geeignete und erfolgreiche Therapie zu gewährleisten.

In dieser Arbeit wurde an Gewebematerial das Protein Rad51 auf seine Eignung als Tumormarker untersucht. Das Produkt des Rad51-Gens ist Angehöriger einer Proteinfamilie, die DNA-Strangaustauschreaktionen katalysiert und so an prominenter Stelle an Rekombinationsvorgängen und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Die Interaktion von Rad51 mit Tumorsuppressoren wie BRCA1, BRCA2 und p53 lässt eine zentrale Bedeutung der homologen Rekombinationsreparatur der DNA vermuten. Ziel dieser Studie war es, die Expression von Rad51 in verschiedenen Tumoren der Haut zu untersuchen. Dabei wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Dignität, dem Differenzierungsgrad und den Tumorstadien verschiedener Hauttumoren und der Rad51-Expression besteht. Dazu wurde in dieser Studie die Rad51-Expression des hoch- und entdifferenzierten Spinozellulären Karzinoms mit seinen Tumorvorstufen/ In-situ Formen der aktinische Keratose und des Morbus Bowen verglichen und die Rad51-Expression beim Melanom mit der beim melanozytären Nävus analysiert. Die zur Analyse gewählten Reaktionsbedingungen mit dem monoklonalen Antikörper 1G8 führten nicht zu einer Detektion basaler Rad51-Spiegel. Somit wurde eine Unterscheidung zwischen normalem und erhöhtem Rad51-Gehalt möglich.
Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen allerdings keine Aussagen über mögliche funktionelle Interaktionen mit anderen Proteinen zu. Auch Aussagen zur Funktion

oder Regulierung von Rad51 sind nicht möglich, hierfür müssen weitere molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

4.1 Die Expression von Rad51 in normalen Zellen

Das humane Rad51-Protein wird in allen eukaryotischen Zellen exprimiert. Seine Funktion in der menschlichen Zelle ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ihm kommt eine zentrale Funktion in mitotischen und meiotischen Rekombinationsprozessen sowie in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen der Zelle zu.

Ein besseres Verständnis der Funktion von Rad51 in der Zelle und bei der Tumorgenese wurde durch Expressionsanalysen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus erreicht. Humanes Rad51 wird Zell-Zyklus-abhängig auf transkriptioneller Ebene reguliert. Dies zeigten Versuche, bei denen der hRad51-Proteinspiegel nach Inhibition der RNA-Synthese durch z.B. Actinomycin, nicht aber nach Inhibition der DNA-Replikation durch z.B. Aphodicolin D, sank. Beobachtungen an normal proliferierenden peripheren Lymphozyten des Blutes zeigten, dass Rad51 seine Funktion in der späten S- und G2-Phase ausübt, in der die Schwesterchromatide ausgeformt sind (Flygare et al., 1996). Der hRad51-RNA-Spiegel stieg während der Mitose in der späten S-Phase auf den dreifachen Ausgangswert an, ein fünffacher hRad51-Proteinspiegel wurde in der späten G2-Phase beobachtet. Die physiologische Expression und der Proteingehalt von Rad51 in synchronisierten Mauszellen zeigt ebenfalls, ausgehend von G0 am Übergang der späten G1 in die S-Phase, einen Anstieg mit einem maximalen Spiegel in der G2-/M-Phase. Rad51 wird während der späten G1-, S- und G2-Phase durch immunhistochemische Färbungen ausschließlich im Zellkern nachgewiesen. Eine sehr hohe Expression von Rad51 weisen lymphatisches (vor allem in Lymphknoten, Milz und Darm) und meiotisches (Spermatogonien) Gewebe auf (Bezzubova und Buerstedde, 1994; Yamamoto et al., 1996). Die Funktion von Rad51 in der DNA-Replikation und –Reparatur spielt sich somit

entweder direkt vor der S-Phase am sogenannten „G1-Checkpoint“ ab oder nach der DNA-Replikation am „G2-Checkpoint“. Durch diese „cell-cycle-checkpoints“ wird die Replikation geschädigter DNA (G1-Arrest) und die Segregation geschädigter Chromosomen (G2-Arrest) verhindert (Yamamoto et al., 1996). Der Bedarf der Zellen an Rad51-Protein ist somit reguliert, d.h. eine erhöhte Aktivität des Proteins geht mit einem erhöhten Proteingehalt einher.

In normal proliferierenden Zellen wird z.B. nach Bestrahlung als mögliches Zeichen einer Aktivitätssteigerung eine Rad51-Akkumulation und Organisation in sogenannte Foci im Zellkern beobachtet und geht zunächst nicht mit einer Steigerung des Proteinspiegels einher (Haaf et al., 1995; Raderschall et al., 1999). Erst nach mehrfacher aufeinander folgender DNA-Schädigung wurde eine Zunahme der Foci-Zahl beobachtet (Bishop et al., 1998; Haaf et al., 1995; Raderschall et al., 1999; Tashiro et al., 2000). Unklar bleibt jedoch, ob damit auch eine Erhöhung der Proteinmenge einher geht. Durch Transkriptionsinhibitoren kann die Foci-Bildung unterbunden werden, eine Steigerung der Rad51-Proteinmenge konnte im „Western Blot“ aber nicht nachgewiesen werden (Bishop, 1994, Haaf et al., 1995).

4.2 Veränderte Rad51-Expression und Folgen

4.2.1 Die Herunterregulation der Rad51-Expression

Veränderungen des Rad51-Proteingehaltes in der Zelle können nicht nur durch eine Überexpression des Proteins hervorgerufen werden. So wurde in einer immunhistochemischen Studie eine um 30% reduzierte Expression des Rad51-Proteins in Tumoren sporadischer Mammakarzinome im Vergleich zu dem umliegenden, gesunden Gewebe gefunden (Yoshikawa et al., 2000). Kanamoto und Mitarbeiter (2002) zeigten, dass der „transforming growth factor-beta“ (TGF-beta), der bei zahlreichen Entwicklungs- und Wachstumsvorgängen (z.B. Embryonalentwicklung, Angiogenese, Karzinogenese, Knochenaufbau) von eukaryotischen Zellen von Bedeutung ist, die Rad51-Expression senkt, jedoch

nicht vollständig unterdrückt. Diese verminderte Rad51-Expression korreliert mit einer geringeren Focibildung und dementsprechend mit einer verminderten DNA-Reparatur-Kapazität. Durch die Inhibition der DNA-Reparatur kann TGF-beta zur genetischen Instabilität beitragen (Kanamoto et al., 2002). So korrelierte in verschiedenen Versuchssystemen eine verringerte Rad51-Expression mit einer gesteigerten Sensitivität von Zellen gegenüber DNA-schädigenden Einflüssen. In Zelllinien von Prostatatumoren wurde die Rad51-Expression durch Ribozym herunterreguliert. Tumorzellen, in denen durch das Ribozym der Rad51-Gehalt um 20-50% gesenkt wurde, waren deutlich radiosensitiver (Collis et al., 2001). Auch die Behandlung von m5S-Mauszellen mit Rad51-Antisense-Oligonukleotiden (Rad51-AO) führte zu einer erhöhten Strahlensensibilität (Taki et al., 1996). Das Senken der Rad51-Expression in zwei Gliomzelllinien durch Glivec zeigte ebenfalls eine verringerte Rad51-Expression und eine erhöhte Strahlensensitivität der Zelle. Glivec ist ein spezifischer Inhibitor der Tyrosinkinase c-Abl, die an der Rad51-Regulation beteiligt ist. Dadurch kommt es zur verminderten c-Abl-abhängigen Rad51-Phosphorylierung, was offenbar zu Verlust der Rad51-abhängigen DNA-Reparatur und Sensitivierung gegenüber alkylierenden Substanzen und gegenüber Bestrahlung führt. Dagegen hatte dieselbe Behandlung einer nicht immortalisierten Fibroblastenzelllinie mit Glivec keine Auswirkungen auf die Rad51-Expression und die Strahlensensitivität (Russell et al., 2003). Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass das Rad51-Protein mit der Radiosensitivität assoziiert ist. Eine therapeutische Herunterregulation des Rad51-Proteins wäre somit ein möglicher Ansatz für die Steigerung der Wirksamkeit einer Radiotherapie.

4.2.2 Gesteigerte Rad51-Expression

Eine gegenüber den normalen Zell-Zyklus-abhängigen Schwankungen gesteigerte Rad51-Expression konnte in immortalen Zellen mit gesteigertem Replikationsverhalten nachgewiesen werden. Die Replikation normaler diploider Zellen ist begrenzt. Die Anzahl der Replikationen ist durch die Länge sogenannter Telomere begrenzt, die in eukaryotischen Chromosomen Guanin-reiche

Sequenzen besitzen, die mit jeder Zellteilung verkürzt werden. Telomerase-Holoenzyme erhalten in immortalisierten Zelllinien und Keimzelllinien die Telomere, so dass sich einige Zelllinien (z.B. Tumorzellen) unbegrenzt teilen (Dunham et al., 2000). Als Zeichen einer hohen Rekombinationsrate weisen sie eine hohe Frequenz an Chromosomenaberrationen auf. In transformierten, immortalisierten Fibroblastenzellen (durch z.B. Simian Virus 40 (SV40)) zeigte sich im Vergleich zu normalen Zellen ein 4,5facher Rad51-mRNA-Gehalt. Die Rekombinationsfrequenz stieg in den transformierten Zellen um das 2-5fache (Xia et al., 1997).

Die Translation und die nachfolgende Expression eines spezifischen Proteins kann durch eine Antisense-Behandlung suprimiert werden. So senkt die Transfektion von komplementären hmd51-Oligonukleotiden in den selben Fibroblasten die homologe Rekombinationsrate. Damit wird die Abhängigkeit der homologen Rekombination von der zur Verfügung stehenden Menge des Rad51-Proteins gezeigt (Xia et al., 1997). Bei Patienten mit dem sogenannten „Bloom´s Syndrom“ wurde ebenfalls eine Erhöhung der Rad51-Expression in der Fibroblastenzelllinie nachgewiesen. Das „Bloom´s Syndrom“ gehört zu den Instabilitätssyndromen und zeichnet sich durch vermehrte somatische Mutationen, eine hohe Inzidenz von Chromosomenbrüchen, einem Verlust der Heterozygotität und den daraus resultierenden vielfältigen malignen Transformationen aus (German, 1993). In der untersuchten Zelllinie wurde eine Mutation im Gen des Tumorsupressorproteins p53 gefunden. Die verminderte mRNA-Stabilität bedingt einen Mangel des p53-Proteins. p53 verursacht eine Senkung der Rekombinationsrate sowohl durch Inhibition des Zell-Zyklus-Prozesses nach DNA-Schädigung als auch durch direkte Bindung an die Faktoren der homologen Rekombination (z.B. Rad51-Protein) (Buchhop et al., 1997; Sturzbecher et al., 1996). Die Fibroblastenzelllinie weist durch den Mangel an p53 eine gesteigerte Rekombination auf, welche durch die beobachtete Rad51-Überexpression weiter verstärkt wird (Magnusson et al., 2000).

Untersuchungen verschiedener humaner Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigten in 66% der Fälle eine Rad51-Überexpression (Maacke et al., 2000b). Untersuchungen an weiteren Tumorzelllinien (Leukämie- und Glioblastomzellen)

zeigten eine 2-7fach gesteigerte Rad51-Expression gegenüber nicht malignen Zelllinien (Raderschall et al., 2002b). Eine Rad51-Überexpression wurde ebenfalls in nicht-invasiven Urothelkarzinomen gefunden (mündliche Mitteilung Dr. W. Henning). Bei der immunhistochemischen Untersuchung von 108 sporadischen invasiv duktalen Mammakarzinomen wurde in den Tumorzellen eine deutlich erhöhte Rad51-Expression im Vergleich zu normalem Brustdrüsengewebe nachgewiesen. Die Rad51-Expression korrelierte dabei statistisch signifikant mit dem histologischen Tumorgrading. Auf Grund dieser Daten wurde eine Etablierung von Rad51 als prognostischer Marker für Brustkrebspatienten diskutiert (Maacke et al., 2000a).

In einer Vielzahl von Tumorentitäten ist die Rad51-Überexpression nicht nur ein sekundäres Phänomen der Tumorgenese, sondern scheint auch eine Rolle in der malignen Transformation bzw. der Tumorprogression zu haben (Raderschall et al., 2002b). Bei einer Erhöhung der Rad51-Expression um das 2-3fache steigert sich die spontane homologe Rekombination um das 20fache (Vispe et al., 1998). Die gesteigerte Rekombination bewirkt eine statistisch signifikant niedrigere Rate an DNA-Doppelstrangbrüchen (Raderschall et al., 2002b). Die genetische Integrität kann jedoch durch Kumulation von Rekombinationsfehlern (Translokation, Deletion) beeinträchtigt werden (Lengauer et al., 1998). „Repeat“-Sequenzen sind besonders während des Rekombinationsprozesses empfindlich für genetische Veränderungen. Durch eine gesteigerte Rekombinationsrate kommt es vermehrt zu z.B. Deletionen oder Amplifikation der „Repeats“. So finden sich besonders in immortalisierten Zelllinien häufiger Deletionen in den direkten „Repeat“-Sequenzen als in normal proliferierenden Zellen (Finn et al., 1989). In Rad51-überexpremierenden Zellen ist das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Komponenten des DNA-Reparatursystems gestört. Einige Komponenten, wie die Tumorsuppressoren p53 und BRCA2, reduzieren die Aktivität des Rad51-Proteins durch Unterbindung der Polymerbildung von Rad51. Bei einer Überexpression des Rad51-Proteins reichen die Tumorsuppressoren nicht mehr aus, um die Polymerbildung zu regulieren (Raderschall et al., 2002b). Somit wird durch die mangelnde Inhibition des Rad51-Proteins eine fehlerhafte Hyperrekombination wahrscheinlicher (Vispe et al., 1998; Xia et al., 1997). In der Annahme, dass

Ereignisse wie DNA-Doppelstrangbrüche, die zu chromosomalen Rearrangements und Deletionen führen, einen großen Anteil der Krebserkrankungen verursachen, muss ein Zusammenhang zwischen diesen Ereignissen, der möglicherweise daraus resultierenden gesteigerten Rekombinationsrate und der Disposition ein Karzinom zu entwickeln, vermutet werden. Die Homologe Rekombination kann von verschiedenen Einflüssen aktiviert werden. Unabhängig von der Replikation der Zellen sind dabei nur DNA-Doppelstrangbrüche auslösende Ereignisse. Zellen mit vermehrter Proliferation haben somit eine höhere Rekombinationsrate und ihre genetische Instabilität ist dadurch stärker gefährdet (Bishop und Schiestl, 2000).

Ein hoher Rad51-Spiegel induziert die Expression von p21, einem Proteinkinase-Inhibitor (el-Deiry et al., 1993; Raderschall et al., 2002a). p21 inhibiert hauptsächlich die Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und kann so einen Zellzyklusarrest in der G1/G2-Phase initiieren. Möglicherweise wird diese Funktion durch Rad51 vermittelt, um während des G1-Arrests Zeit für die Reparatur des DNA-Schadens zu geben. Dem widerspricht die Tatsache, dass Rad51 seine Aktivität besonders in der späten S/G2-Phase ausübt (Flygare et al., 1996). Ungeklärt bleibt, ob Rad51 die Zell-Zyklus-Verzögerung über einen anderen, unbekannten Mechanismus auslöst und die p21-Heraufregulation demnach ein sekundäres Phänomen ist.
Eine Überexpression von Rad51 und die damit verbundene Steigerung der Rekombinationsrate führen zu einer vermehrten Resistenz der Zellen gegenüber ionisierender Strahlen, welche ohne ersichtliche genetische Veränderungen einhergeht (Yanez und Porter, 1999). In Zellkulturversuchen zeigte sich bei Rad51-überexprimierenden Hamsterfibroblasten (CHO, „chinese hamster ovary“) nach Gamma-Bestrahlung in der späten S/G2-Phase des Zellzyklus eine vermehrte Strahlenresistenz durch eine höhere Überlebensrate gegenüber Kontrollzellen (Vispe et al., 1998). In Einklang damit wurde in radioresistenten Karzinomzelllinien eine erhöhte Expression von Rad51 gefunden (Yanagisawa et al., 1998). Die Expression von Rad52, einem anderen an der DNA-Reparatur beteiligten und mit Rad51 interagierendem Protein, zeigt in Strahlen-resistenten Zelllinien N10 im Vergleich zu Strahlen-sensiblen Zelllinien KB keine

Unterschiede. Die Röntgen-Bestrahlung der Zelllinien verursacht in beiden Fällen einen Anstieg der rad51-mRNA-Konzentration, wohingegen die mRNA-Spiegel von Rad52 gleich bleiben (Yanagisawa et al., 1998). Somit scheinen die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Zellen und die Ausbildung von Strahlenresistenzen unter anderem unter dem Einfluss der Rad51-Expression zu stehen. Die Rad51-Expression ist somit möglicherweise ein prädiktiver Marker für oder gegen eine Strahlentherapie.

Auch die Chemotherapieresistenz maligner Zellen wird mit einer erhöhten Rad51-Expression in Verbindung gebracht. So induziert Chlorambucil Dosis-abhängig in vivo und in vitro die Expression von Rad51 in Lymphozyten und in chronisch lymphatischen Leukämiezellen (B-CLL-Zellen) (Christodoulopoulos et al., 1999). Die durch Chlorambucil induzierte Rad51-Überexpression könnte durch eine gesteigerte Aktivierung der Homologen Rekombination eine Chemoresistenz verstärken (Christodoulopoulos et al., 1999). Dies wird durch die Beobachtungen von Maacke und Mitarbeitern unterstrichen, die nach der Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit dem DNA-Doppelstrangbrüche verursachenden Zellgift Calicheamicin bei Rad51-überexprimierenden Zellen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den nicht überexprimierenden Zellen beobachteten (Maacke et al., 2000b). Die erhöhte Rad51-Proteinexpression und damit gesteigerte Rekombinationsreparatur könnte somit an der Radio- und Chemoresistenz beteiligt sein, die in vielen malignen Tumoren zu finden ist und ein großes Problem in der Therapie der Neoplasien darstellt. Eine therapeutische Herunterregulation des Rad51-Proteins wäre ein möglicher Ansatz für die Steigerung der Wirksamkeit einer Radiotherapie und gewinnt an Bedeutung in der Therapieforschung für die Chemosensibilisierung von Tumorzellen.

4.3 Ursachen einer veränderten Rad51-Expression in Tumoren

Auf Grund der Auswirkungen einer veränderten Rad51-Expression in Tumorzelllinien und Tumoren ist eine Assoziation zwischen dem Rad51-Protein und einer genetischen Instabilität sowie der möglicher Weise daraus resultierenden Tumorgenese bzw. Tumorprogression wahrscheinlich, auch wenn die Rolle von Rad51 dabei bisher kaum verstanden wird. Dabei ist bei verschiedenen Ereignissen, die gehäuft in Tumorgeweben vorkommen, eine ursächliche Beteiligung des rad51-Gens bzw. des Rad-Proteins denkbar. Alterationen der Chromosomenzahl sind in nahezu allen humanen Tumoren beschrieben (Lengauer et al., 1998). Der häufig auftretende „loss of heterozygosity“ (LOH) beschreibt den Verlust eines Wildtyp-Allels bei mutiertem zweiten Allel, was zu einer veränderten Funktion des kodierten Proteins führen kann. Ein Beispiel ist hier der Tumorsuppressor PTEN, der in Glioblastomen durch LOH inaktiviert ist (Wang et al., 1997). Mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern können diese Verluste von Chromosomenteilstücken in Tumoren erfasst und lokalisiert werden. Studien zeigen, dass in vielen Tumorentitäten bei jeweils einem beachtlichen Anteil der untersuchten Proben ein Verlust eines Teils von Chromosom 15q und damit möglicherweise auch eines Allels vom rad51-Gen vorkommt. Bereits 1991 wurde ein Allelverlust des Lokus 15q in Mammakarzinomen beschrieben (Devilee et al., 1991). Ein LOH auf dem Chromosom 15q15.1, das in 31 von 98 untersuchten Mammakarzinomen nachgewiesen wurde, korreliert mit der Frequenz der Metastasierung und hat eine schlechte Prognose für den Krankheitsverlauf zur Folge (Gonzalez et al., 1999; Schmutte et al., 1999; Takahashi et al., 1994). Bei der Untersuchung von 24 Pankreaskarzinomen wurde in 73% ein 15q-LOH beschrieben (Mahlamaki et al., 1997). Auch in diversen anderen Tumoren wie z.B. dem Cervixkarzinom (Kersemaekers et al., 1998), dem Ovarialkarzinom (Cliby et al., 1993) und Mesotheliomen (Balsara et al., 1999), wurden 15q-LOH detektiert.

Im Rahmen der Tumorgenese könnten verschiedene Mechanismen einen LOH des Rad51-Lokus wichtig werden lassen. Zum einen könnte, um die DNA-Doppelstrangbruchreparatur vollständig zu unterhalten, eine Kopie des rad51-Gens nicht voll ausreichen. Bei Mäusen mit einem Rad51$^{+/-}$-Genotyp wurden jedoch keine auffälligen Phänotypen gefunden. In den Zellen der Mäuse konnte keine erhöhte genetische Instabilität beobachtet werden (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996). Damit reicht offensichtlich eine intakte Rad51-Genkopie für eine hinreichende Rad51-Funktion in der Zelle aus. Weiterhin bleibt allerdings unklar, ob mit dem Rad51-Heterozygotenstatus eine erhöhte Mutationsrate verbunden ist. Ein vollständiger Verlust beider Rad51-Allele ist allerdings für Säugetierzellen letal (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996). In der Vergangenheit sind bis auf zwei Ausnahmen keine Mutationen in der kodierenden Sequenz des rad51-Gens gefunden worden (Schmutte et al., 1999). Bisher wurde lediglich ein Basenaustausch des Kodon 150 (G→A) in Exon 6 des rad51-Gens in Keimbahnzellen zweier Patientinnen mit hereditärem, bilateralem Brustkrebs beschrieben. In einer Kontrollgruppe mit sporadischem Mammakarzinom konnte dieselbe Mutation nicht nachgewiesen werden, sie ist daher möglicherweise krankheitsauslösend (Kato et al., 2000). Ein erhöhter Rad51-Proteingehalt muss demnach durch andere Mechanismen erklärt werden, z.B. Änderungen in der Genexpression durch Mutationen in der Promoterregion, durch Stabilisierung der RNA im Zytoplasma, durch eine verlängerte Halbwertzeit des Proteins im Zellkern oder durch veränderte DNA-Methylierung (Wang et al., 2001).

Die Tumorgenese kann ebenfalls durch die Translokation von Chromosomen, wie sie bei der chronisch myeloischen Leukämie in Form des Philadelphia-Chromosoms vorkommt, gefördert werden (Nowell, 1997). Diese Translokationen, so wird vermutet, manifestieren sich unter dem Einfluss verschiedener mit Rad51 interagierender Proteine (z.B. ATM („Ataxia Teleangiectasia Mutated“), BRCA1/2, p53), bevor die DNA-Doppelstrangbrüche durch Rekombinationsprozesse repariert werden können (Lengauer et al., 1998). Veränderungen im Zusammenwirken der verschiedenen Proteine und Rad51 könnte möglicherweise die Manifestation der Translokation verhindern. Die Interaktion von Rad51 mit den

Tumorsuppressoren BRCA1 und BRCA2 ist demnach offenbar wesentlich für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Zellen (Marmorstein et al., 1998; Scully et al., 1997; Sharan et al., 1997). Ein Verlust von nur einem der drei Interaktionspartner führt zur Anhäufung von Doppelstrangbrüchen und zum Zelltod (Lim und Hasty, 1996; Ludwig et al., 1997; Sharan et al., 1997; Tsuzuki et al., 1996).

Die Überexpression von Rad51 in einer Vielzahl von Tumorzelllinien und Tumorentitäten sowie ihre beschriebenen Auswirkungen auf normal proliferierende sowie transformierte Zellen weist auf eine erhebliche Bedeutung in der Tumorgenese und Tumorprogression hin. Die Ursachen der konstitutiven Rad51-Überexpression, welche prinzipiell auf transkriptionaler, translationaler sowie posttranslationaler Ebene begründet sein können, sind jedoch nicht bekannt.

4.4 Analyse der Studienergebnisse

In dieser Studie wurde an verschiedenen Tumorvorstufen/In-situ-Karzinomen und malignen Tumoren die Expression von Rad51 untersucht. Aus der Dermatologischen Datenbank in Lübeck wurden dafür je 30 Fälle von Aktinischer Keratose, Morbus Bowen, Spinozellulärem Karzionom hoch- und entdifferenziert und malignem Melanom und 15 Fälle von melanozytären Nävi vom „Compound“-Typ zufällig herausgesucht. Die Alters- und Geschlechtsverteilung deckt sich mit den Angaben, die in der Literatur zu finden sind (Braun et al., 2000; Breuninger und Garbe, 1998; Cox, 1994; Diepgen und Mahler, 2002; Drake et al., 1995; Schmidt und Hölzel, 2000). Mit den in der vorliegenden Studie angewandten immunhistochemischen Verfahren mit dem Antikörper 1G8 kam es zu keiner Detektion basaler Rad51-Spiegel. Die in diesem Zusammenhang als positiv bezeichneten Zellen, die bei der Auswertung eine charakteristische Anfärbung hatten, zeigen somit eine Überexpression des Rad51-Proteins in diesen Zellen (siehe 2.2.5.2).

4.4.1 Das hoch- und entdifferenzierte spinozelluläre Karzinom und die Tumorvorstufen aktinische Keratose und Morbus Bowen

Die aktinische Keratose gehört zu den typischen Präkanzerosen, aus denen nach meist jahrelanger Latenz ein spinozelluläres Karzinom (Plattenepithelkarzinom) hervorgehen kann. Der Morbus Bowen dagegen wird bereits als In-situ-Karzinom angesehen (Lee und Wick, 1993), aus dem ebenfalls ein spinozelluläres Karzinom entstehen kann. Der Morbus Bowen, der histologisch eine stärkere Entdifferenzierung als die aktinische Keratose zeigt, weist annähernd die gleiche prozentuale Rad51-Überexpression (Aktinische Keratose 6,48%; Morbus Bowen 6,38) auf. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob die aktinische Keratose noch zu den Tumorvorstufen gezählt werden kann, oder ob sie nicht wie der Morbus Bowen schon zu den In-siu-Karzinomen gehört. In der Literatur wird dies bereits kontrovers diskutiert. Viele Autoren sehen die aktinische Keratose als obligates In-situ-Karzinom (Berner, 2005; Biesterfeld et al., 1995; Cockerell, 2000; Guenthner et al., 1999; Lober und Lober, 2000; Shimizu et al., 1995). Butani und Mitarbeiter (2005) und Salama und Mitarbeiter (2003) hingegen sehen die aktinische Keratose noch als Tumorvorstufe. Salama zeigt in seiner Studie, dass das Protein p16INK4a ein sensitiver und spezifischer Marker für die Unterscheidung zwischen dem In-situ-Karzinom Morbus Bowen und der aktinischen Keratose ist (Salama et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit kann man anhand von Rad51 keine Unterscheidung zwischen aktinischer Keratose und Morbus Bowen vornehmen, da beide annähernd die gleiche Überexpression des Proteins haben. Dieses Ergebnis unterstützt die Aussage, dass die aktinische Keratose wie der Morbus Bowen ein In-situ-Karzinom ist.

Eine deutliche Zunahme der Anzahl Rad51-positiver Zellen zeigten das spinozelluläre Karzinom im hochdifferenzierten (8,07%) und im entdifferenzierten Stadium (10,08%) im Vergleich zur aktinischen Keratose und dem Morbus Bowen. Eine hohe Anzahl Rad51-positiver Zellen würde demnach für eine hohe Malignität und Dedifferenzierung des Tumors sprechen. Vergleichende Literaturangaben liegen leider nicht vor. Ein Vergleich der Rad51-Expression in anderen Karzinomen zeigt, dass der Anstieg der prozentualen Rad51-Überexpression mit Zunahme der Malignität und Abnahme der Differenzierung in Tumoren der Haut

nicht sehr ausgeprägt ist. So findet sich beispielsweise bei invasiv duktalen Mammakarzinomen (Maacke et al., 2000a) und Urothelkarzinomen (mündliche Kommunikation Dr. W. Henning) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tumorstadien und dem Tumorgrading. Vergleicht man hingegen die Rad51-Expression in Tumoren der Haut, findet man einen statistisch signifikanten Unterschied nur zwischen den Tumorvorstufen/In-situ-Karzinomen und den einzelnen Stufen des spinozellulären Karzinoms. Dadurch könnte anhand der Rad51-Expression nur die Aussage getroffen werden, ob es sich noch um eine Tumorvorstufe/In-situ-Karzinom oder schon um einen malignen Tumor handelt. Keine Aussage hingegen kann gemacht werden über den Zusammenhang zwischen erhöhter Rad51-Proteinexpression und dem Grad der Entdifferenzierung (gemessen am histologischen Grading) beim spinozellulären Karzinom.
Die geringe und fehlende statistische Signifikanz zwischen den Tumorvorstufen und den einzelnen Tumorstadien und die im Vergleich zu anderen Tumoren geringere Überexpression des Rad51-Proteins zeigt, dass der Stellenwert des Rad51-Proteins in der immunhistologischen Diagnostik kutaner Tumoren geringer ist, als bei anderen Tumoren (z.B. Mammakarzinom (Maacke et al., 2000a)).

Neben der Beurteilung der Rad51-Expression in Tumoren und Tumorvorstufen war es auch ein Ziel dieser Arbeit, mögliche Assoziationen der Rad51-Expression mit bereits etablierten Prognosemarkern zu untersuchen. Durch den immunhistochemischen Nachweis des Ki-67-Proteins durch MIB-1 lässt sich ein Überblick über die proliferative Kapazität eines Tumors gewinnen, denn Ki-67 lässt sich in allen Phasen des Zellzyklus, außer in der G_0- und frühen G_1-Phase, nachweisen (Gerdes et al., 1984). In dieser Studie zeigen Zellen mit hoher Ki-67-Expression, aufgeschlüsselt nach dem Median, eine durchschnittlich höhere Anzahl an Rad51-positiven Zellen, wie es ähnlich auch bei Mammakarzinomen gefunden wurde (Maacke et al., 2000a, Dissertation Sven Opitz). Allerdings ist der Unterschied zu gering, um statistisch relevant zu sein.
Vergleicht man jedoch die mediane Expression von Rad51 und Ki-67 eines Tumors, so wurde beobachtet, dass mit Zunahme der Entdifferenzierung eines Tumors und zunehmendem Rad51-Gehalt die Anzahl Ki-67-positiver Zellen

statistisch signifikant sank. Für diese Beobachtung findet sich keine plausible biologisch begründete Erklärung.

So ist auch in der Literatur bisher keine Abnahme der Proliferation bei Zunahme der Malignität eines Tumors beschrieben worden. In einer Studie von Matsuta (1996), die die Expression von Ki-67 mit dem dem MIB-1-Antikörper in epithelialen Hauttumoren untersuchte, fand sich mit Zunahme der Malignität eines Tumors auch eine Zunahme der Anzahl Ki-67-positiver Zellen (Matsuta et al., 1996). Des weiteren exprimierten die einzelnen Tumore durchschnittlich mehr Ki-67. So fanden Matsuta et al beim Morbus Bowen 37,1% Ki-67 positive Tumorzellen, während in dieser Studie nur 18,12% gefunden wurden. Andere Studien beschreiben beim Morbus Bowen eine Ki-67-Expression von 21% (Kuo et al., 1997) und 34,4% (Szekeres und De Giacomoni, 1994). Ähnlich verhält es sich beim spinozellulären Karzinom. Während in dieser Arbeit jeweils 12,47% (hochdifferenziertes Spinozelluläres Karzinom) und 5,49% (entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom) Ki-67 positive Tumorzellen gefunden wurden, zeigen Studien eine durchschnittliche Expression von 36% (Shimizu et al., 1999), 42% (Biesterfeld und Josef, 2002; Shimizu et al., 1997) und höher (Mansoor et al., 1996). Die unterschiedlich hohe Expression des Ki-67-Proteins könnte durch Unterschiede in der Antikörperverdünnung, der Inkubationszeiten und der verwendeten Methoden begründet sein. So findet sich z.B. in fast allen Studien ein anderer Verdünnungsfakor und eine deutlich längere Inkubationszeit mit dem Antikörper MIB-1, was eine vermehrte Anfärbung von Tumorzellen zur Folge haben könnte. In dieser Studie wurde dabei nach dem Prinzip der APAAP-Technik gefärbt, wie es 1986 von Schaumburg-Lever beschrieben wurde. Die Inkubationszeiten richteten sich nach den Empfehlungen der Firma DAKO, von denen auch der MIB-1 Antikörper bezogen wurde.

Ein weiterer Grund könnten Unterschiede in der Zählung und Auswertung der Ki-67-positiven Tumorzellen sein. Aus den Literaturstudien geht nicht hervor, welche Intensität der Färbung noch als positiv gewertet wurde. In dieser Studie wurden nur intensiv angefärbte Tumorzellen als positiv gewertet, welches vorher anhand von Beispielbildern festgelegt wurde (siehe Abb. 9). In den Studien von Mansoor et al (1996) und Shimizu et al (1997) wurde beim spinozellulären Karzinom die

größte Expression in der Peripherie des Tumors und die geringste Expression in den zentralen Abschnitten des Tumors gefunden. Aus den Unterlagen ging allerdings nicht hervor, ob die gezählten Bildausschnitte auch zentrale Anteile ohne oder nur geringer Ki-67-Expression enthielten. Das Protein Ki-67 ist mit Ausnahme der G_0- und frühen G_1-Phase in allen Phasen des Zellzyklus nachweisbar. Die Expression von Ki-67 in den Phasen des Zellzyklus ist allerdings unterschiedlich stark, so wird in der restlichen G_1-Phase die geringste Expression gefunden (Bruno et al., 1991). So könnte sich aufgrund der geringen Ki-67-Expression ein Großteil der Tumorzellen in der G_0- oder G_1-Phase befinden.

4.5.2 Das maligne Melanom und der melanozytäre Nävus

Melanozytäre Nävi vom „Compound“-Typ machen die größte Zahl aller Nävi beim erwachsenen Menschen aus. In großer Anzahl gehören sie zu den wichtigen Risikofaktoren für die Melanomentstehung (Garbe et al., 1994). Die Zahl Rad51-positiver Zellen bei den Nävi ist mit 0,08% verschwindend gering. Die Expression von Rad51 beim malignen Melanom, die am häufigsten tödlich verlaufende Hautkrankheit der weißen Bevölkerung mit einem weltweiten Anstieg der Inzidenz, ist mit 1,29% ebenfalls sehr gering, statistisch besteht aber ein signifikanter Unterschied zum melanozytären Nävus. Aus diesem Ergebnis könnte man schlussfolgern, dass der Nachweis von Rad51 in einem Pigmenttumor für die Diagnose eines malignen Melanoms spricht. Ein fehlender Nachweis von Rad51 ist jedoch nicht beweisend für die Gutartigkeit eines Tumors, da bei vielen Melanomen keine Rad51-positiven Tumorzellen nachgewiesen werden konnten. Aufgrund der geringen Anzahl Rad51-positiver Tumorzellen und der bei vielen Melanomen nicht nachweisbaren Rad51-Expression kann keine sichere Aussage über die Dignität eines Tumors getroffen werden. Für die Routinedignostik ist somit der Nachweis von Rad51 nicht geeignet, da der Test zwar eine gute Spezifität, aber eine sehr schlechte Sensitivität hat.

Ein Vergleich des Tumorstadiums pT (gemessen am Breslow-Index) mit der Expression von Rad51 ergab ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang. Die

Unterschiede in der Expression sind so gering, dass eine Aussage über die Tumorausdehnung an Hand der Anzahl Rad51-positiver Zellen nicht möglich ist. Auch ein Vergleich der Eindringtiefe nach Clark ergab keinen signifikanten Zusammenhang mit der Rad51-Expression. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Rad51-Protein bei der Progression des malignen Melanoms keine wesentliche Bedeutung zu haben scheint, oder die Unterschiede bei ohnehin geringer Überexpression nicht sicher erkennbar waren.

Zellen mit hoher Proliferation, gemessen an der Ki-67-Expression, zeigten keine erhöhte Rad51-Expression. Der Unterschied ist zu gering, um statistisch signifikant zu sein. So ergab sich auch keine signifikante Korrelation zwischen der Rad51- und der Ki-67-Expression. Mit durchschnittlich 2,54 % bei den Melanomen und 0,034% bei den Nävi ist die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 gering. In der Literatur findet sich bei malignen Melanomen ein sehr unterschiedliches Expressionsniveau. Die Werte liegen dabei bei 2,6% (Böni et al., 1996); 3,1% (Kaleem et al., 2000) und 3,3% (Sparrow et al., 1998). Auch eine Studie von Moretti und Mitarbeitern (2001) zeigte nur in sehr wenigen Melanomen eine Ki-67-Expression höher als 5%. Die Ergebnisse sind mit den Ergebnissen dieser Studie vergleichbar. Andere Studien zeigen allerdings eine deutlich höhere Expression von Ki-67 in Melanomen. Bergmann et al. fanden durchschnittlich 14,9% Ki-67-positive Zellen (Bergman et al., 2001), in einer anderen Studie wurden Werte zwischen 11% und 48% gefunden (Kanter et al., 1995). Die Ursachen für diese großen Unterschiede in der Ki-67-Expression könnten unter anderem am Subtyp der Melanome liegen. So zeigten in einer Studie von Kaleem und Mitarbeitern (2000) superfiziell spreitende Melanome (SSM) eine durchschnittliche Ki-67-Expression von 3,1%, während noduläre maligne Melanome (NMM) im Durchschnitt 16,1% Ki-67-positive Tumorzellen haben. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Melanompräparate gehören bis auf wenige Ausnahmen zum Typ der SSM, wodurch sich eine niedrige Expression erklären lässt. Böni und Mitarbeiter (1996) beobachteten zudem, dass bereits metastasierte Melanome eine höhere Proteinexpression haben (12,3%). Aus den Studien von Bergmann (2001) und Kanter (1995) ging leider nicht hervor, um welche Art der

Melanome es sich handelte und ob sie bereits Metastasen gebildet haben. Des weiteren können auch hier Unterschiede in der Methode, der Antikörperverdünnung oder der Länge der Inkubtionszeit zu unterschiedlich hohen Expressionszahlen führen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblicke

Expressionsstudien von Rad51 in Tumoren legen nahe, dass bei bestimmten Tumorentitäten Rad51 eine Rolle bei der malignen Transformation einer Zelle und der Tumorprogression spielt (Maacke et al., 2000a). Eine erhöhte Rekombination könnte zum einen durch eine höhere Variabilität des Zellgenoms zu einer verbesserten Anpassungsfähigkeit an die Tumorumgebung führen und damit die Tumorprogression unterstützen (Cahill et al., 1999).
In vielen fortgeschrittenen Tumoren kann man eine Chemo- und Strahlenresistenz beobachten. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass Tumorzellen mit erhöhter Rad51-Expression besser mit anfallenden DNA-Läsionen umgehen können als normale Zellen. Eine erhöhte Rad51-Expression wurde in vielen Tumorentitäten gefunden. Besonders interessant ist dabei die nachgewiesene Korrelation zwischen dem Tumorgrading, als etablierter Prognosemarker und Ausdruck der Differenzierung, und der Rad51-Expression in sporadischen Mammakarzinomen und Urothelkarzinomen. In dieser Studie an Tumorvorstufen und Tumoren der Haut sollte die Expression des Rad51-Proteins und sein Bezug zu verschiedenen Tumorstadien und Differenzierungsgraden untersucht werden. Es fand sich lediglich ein Zusammenhang zwischen der Differenzierung des Tumors und der Rad51-Expression beim spinozellulären Karzinom und seinen Tumorvorstufen/ In-situ-Formen den aktinischen Keratosen und dem Morbus Bowen.
Somit wäre an Hand der Rad51-Expression eine Unterscheidung zwischen Tumorvorstufen und Frühformen und dem fortgeschrittenen malignen Tumor möglich. Der Unterschied in der Anzahl Rad51-positiver Zellen zwischen den Tumorstadien ist nicht so ausgeprägt, wie er sich in anderen Tumoren zeigt.

Zur Behandlung der Melanome, vor allem im fortgeschrittenen Stadium und bei Metastasierung, wird immer öfter auch die Chemo- und Radiotherapie eingesetzt. Studien haben gezeigt, dass der Rad51-Gehalt Einfluss auf die Strahlen- und Chemosensibilität der Zellen hat und somit möglicherweise therapeutische Konsequenzen besitzt (Vispe et al., 1998; Yanagisawa et al., 1998). Eine erhöhte Rad51-Expression in Tumorzellen hat eine Radio- und Chemoresistenz zu Folge. Dementsprechend würde die Inhibition der Rad51-Expression zu einer erhöhten Strahlen- und Chemotherapiesensitivität führen. So konnte mittels Rad51-Antisense-Oligonukleotiden und Ribozym-Minigen vermittelten Techniken die Radiosensitivität von Gliomzellen bzw. Prostatakarzinomzelllinien gesteigert werden (Collis et al., 2001; Ohnishi et al., 1998; Taki et al., 1996). Ob das Rad51-Protein bei der Chemo- und Radioresistenz des Melanoms bei dem insgesamt eher niedrigen Expressionslevel eine Rolle spielt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5. Zusammenfassung

Die Zellen des menschlichen Körpers sind ständig äußeren und inneren Einflüssen ausgesetzt, durch die an der DNA der Zelle Schäden entstehen können. Die Zelle verfügt über verschiedene Mechanismen um diese Schäden zu reparieren, da durch Schäden an der DNA die Integrität des Genoms gefährdet ist. Einer dieser Mechanismen ist die homologe Rekombination. Durch sie wird eine weitgehend fehlerfreie Korrektur von DNA-Doppelstrangbrüchen ermöglicht. Das in eukaryotischen Zellen benötigte Schlüsselenzym der homologen Rekombination ist das Protein Rad51. Die zentrale Bedeutung von Rad51 für die Rekombination und die DNA-Reparatur wird zusätzlich durch seine Interaktionen mit Tumorsuppressoren wie BRCA1, BRCA2 und p53 unterstrichen. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass das humane Rad51-Protein an der Entstehung von Tumorerkrankungen beteiligt ist. So wurde in Pankreas-, Mamma- und Urothelkarzinomzellen ein erhöhter Rad51-Proteingehalt nachgewiesen. In dieser Studie sollte die Bedeutung von Rad51 in Tumoren der Haut näher untersucht werden.

Aus der Datenbank HiDIS im Institut für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Lübeck wurden je 30 Fälle von Aktinischen Keratosen, Morbus Bowen, hoch- und entdifferenzierten spinozellulären Karzinomen, malignen Melanomen und melanozytären Nävi vom „Compound“-Typ herausgesucht. Die durch immunhistochemische Verfahren dargestellte Rad51-Expression wurde mittels eines Bildanalyseprogramms erfasst, statistisch ausgewertet und mit etablierten pathologischen Parametern korreliert. Desweiteren wurde auch die Expression von Ki-67 untersucht, der sich als molekularbiologischer Marker in Tumoren der Haut bereits etabliert hat. Die Rad51-Immunhistochemie zeigte deutliche nukleäre Anfärbungen in einzelnen Tumorzellen. Der Anteil Rad51-positiver Tumorzellen bewegte sich zwischen 0 und 23%, wobei es bei den melanozytären Nävi keine nachweisbare Expression gibt und der höchste Wert beim entdifferenzierten spinozellulären Karzinom zu beobachten war. Die

Medianwerte lagen bei 6,48% (Aktinische Keratose), 6,38% (Morbus Bowen), 8,07% (hochdifferenziertes spinozelluläres Karzinom), 10,08% (entdifferenziertes spinozelluläres Karzinom), 1,29% (Malignes Melanom) und 0,08% (melanozytärer Nävus vom „Compound“-Typ). Die Analyse zeigte eine Zunahme der Anzahl Rad51-positiver Tumorzellen mit zunehmender Entdifferenzierung der Karzinome. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich zur Expression des Proliferationsmarkers Ki-67, zum Geschlecht der Patienten und bezüglich der Melanomparameter.

Die in der vorliegenden Studie gefundenen Ergebnissen zeigen, dass an Hand der Rad51-Expression eine Unterscheidung zwischen Tumorvorstufen und Frühformen und dem fortgeschrittenen malignen Tumor möglich ist. Aber aufgrund des geringen Unterschiedes und der fehlenden Korrelation zu etablierten Parametern hat die Expression des Proteins Rad51 eher eine untergeordnete Bedeutung in der Diagnostik von Tumoren der Haut.

6. Anhang

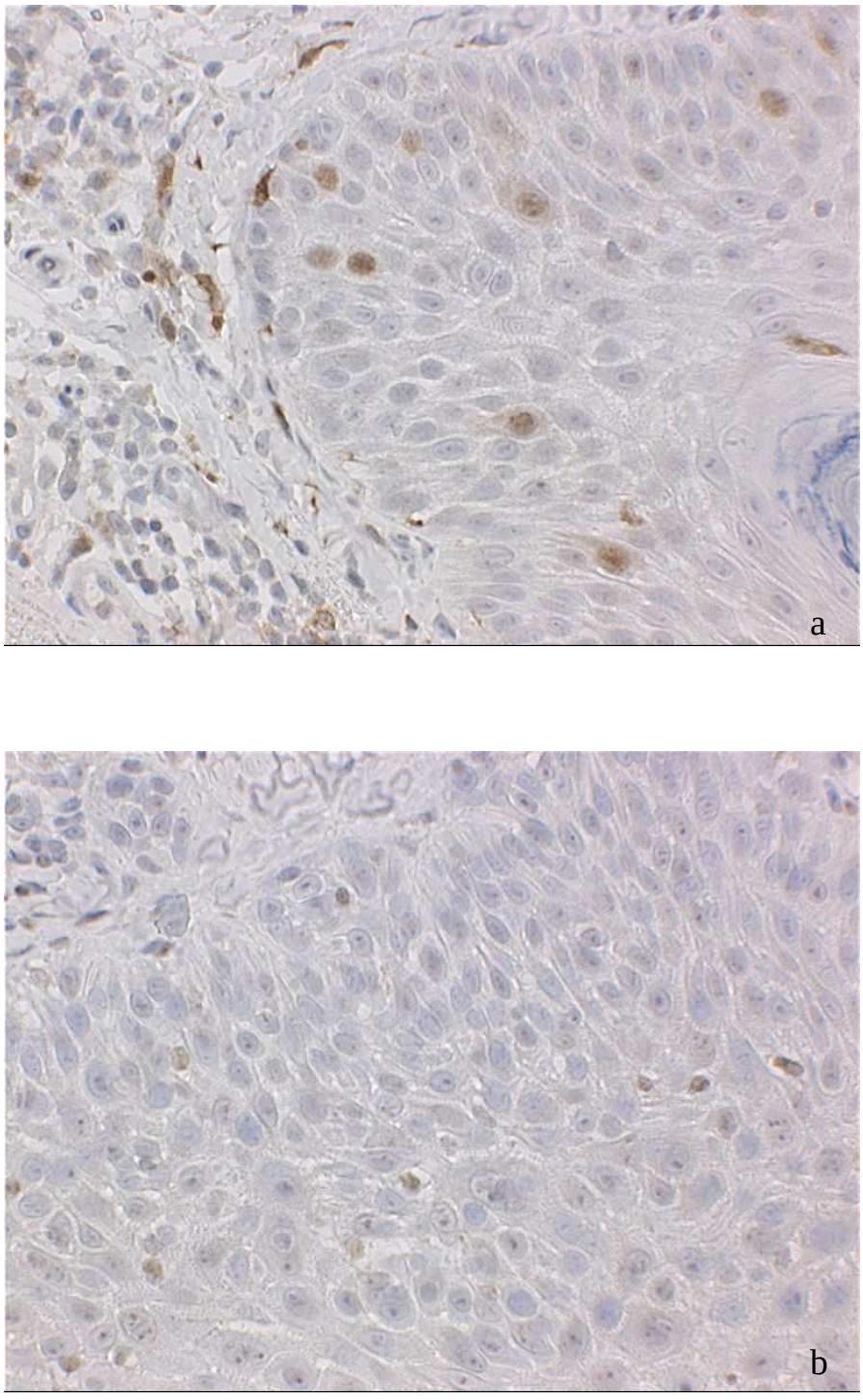


Abb. 18 Beispiel für die Rad51-Expression in der Aktinischen Keratose

a) Rad51-Expression (x400)

b) Negativkontrolle (x400)

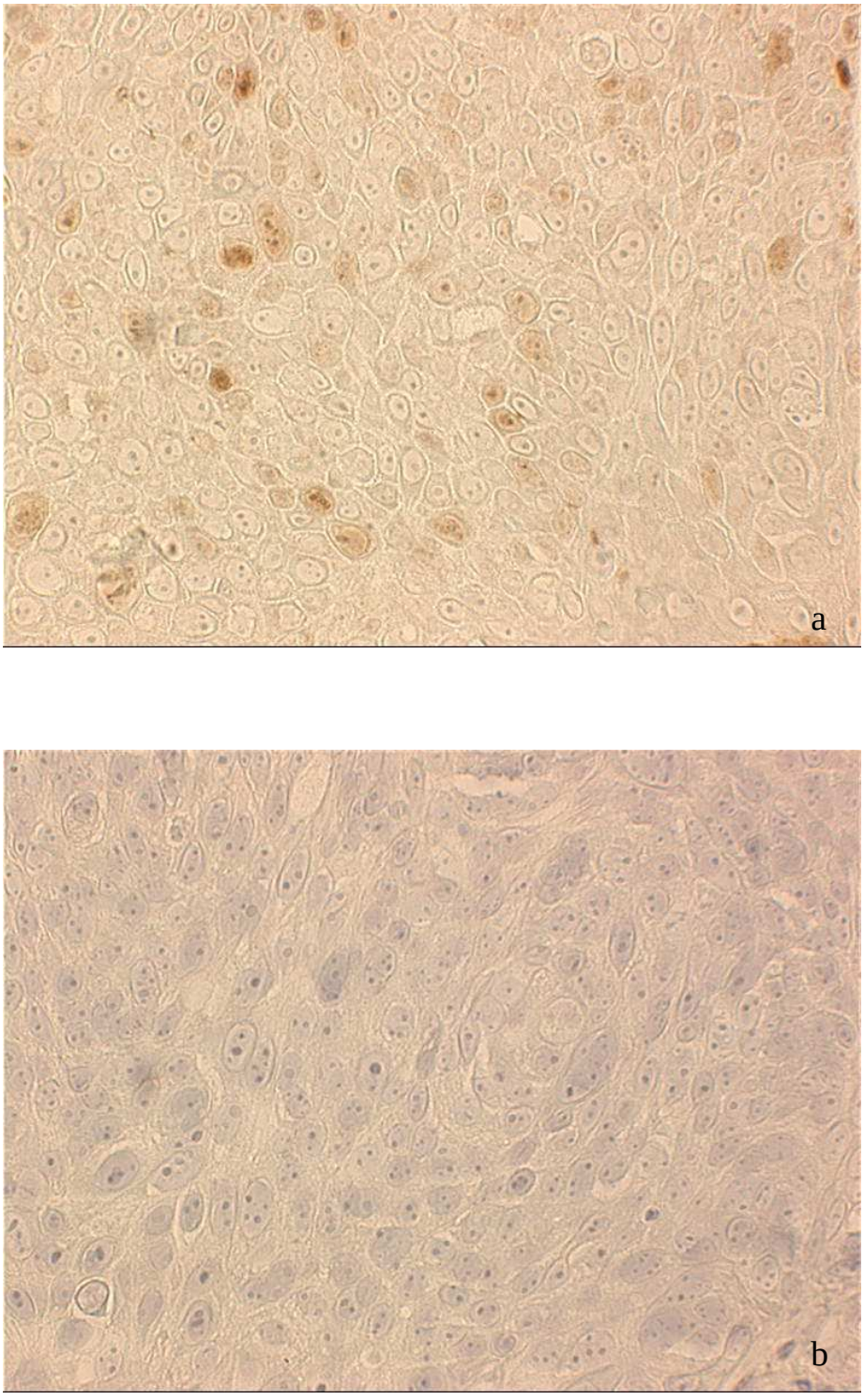


Abb. 19 Beispiel für die Rad51-Expression im Morbus Bowen

a) Rad51-Expression (x400)

b) Negativkontrolle (x400)

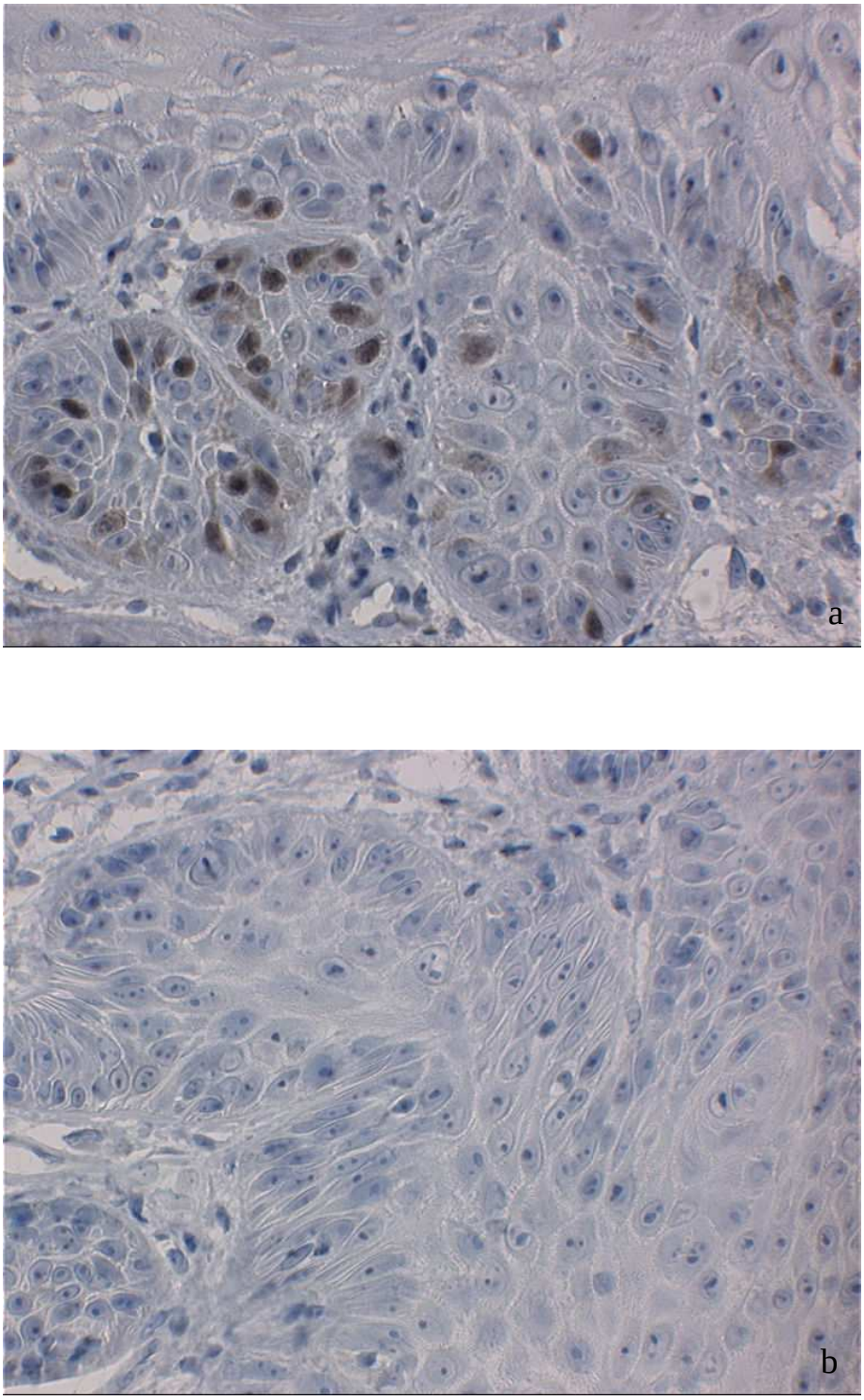


Abb. 20 Beispiel für die Rad51-Expression beim hochdifferenzierten spinozellulären Karzinom

a) Rad51-Expression (x400)

b) Negativkontrolle (x400)

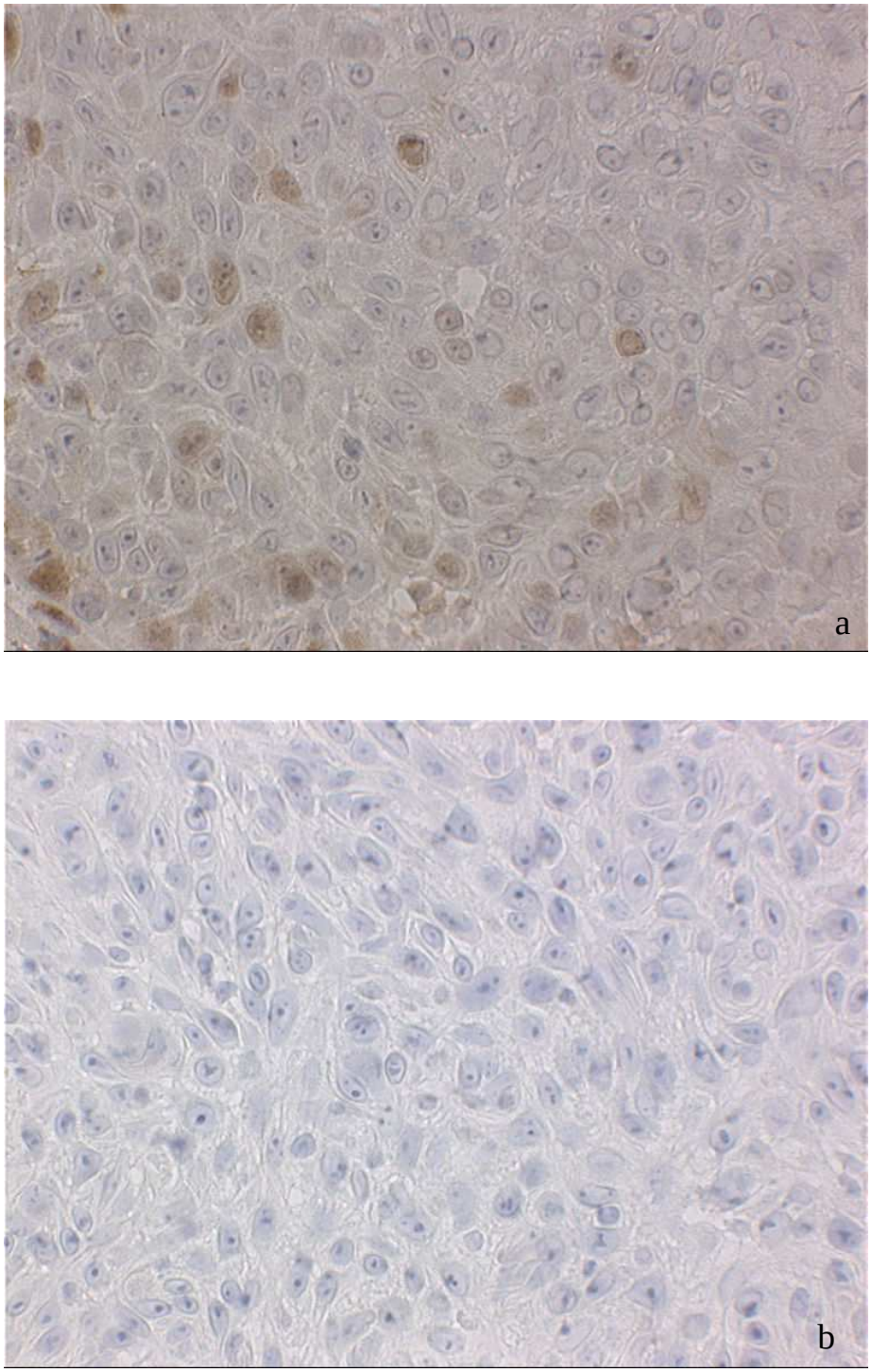
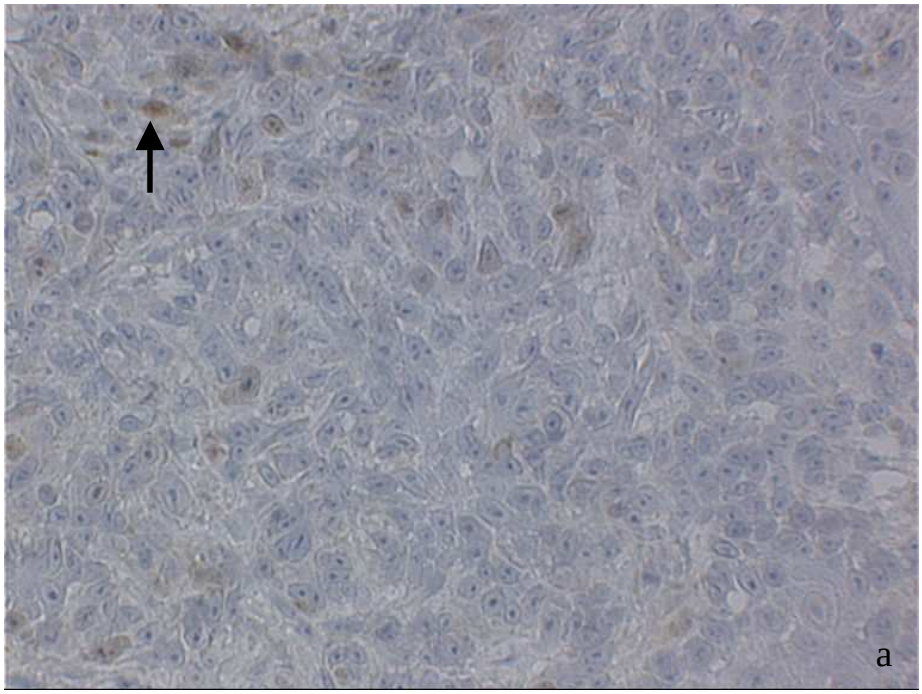


Abb.21 Beispiel für die Rad51-Expression beim entdifferenzierten spinozellulären Karzinom

a) Rad51-Expression (x400)

b) Negativkontrolle (x400)



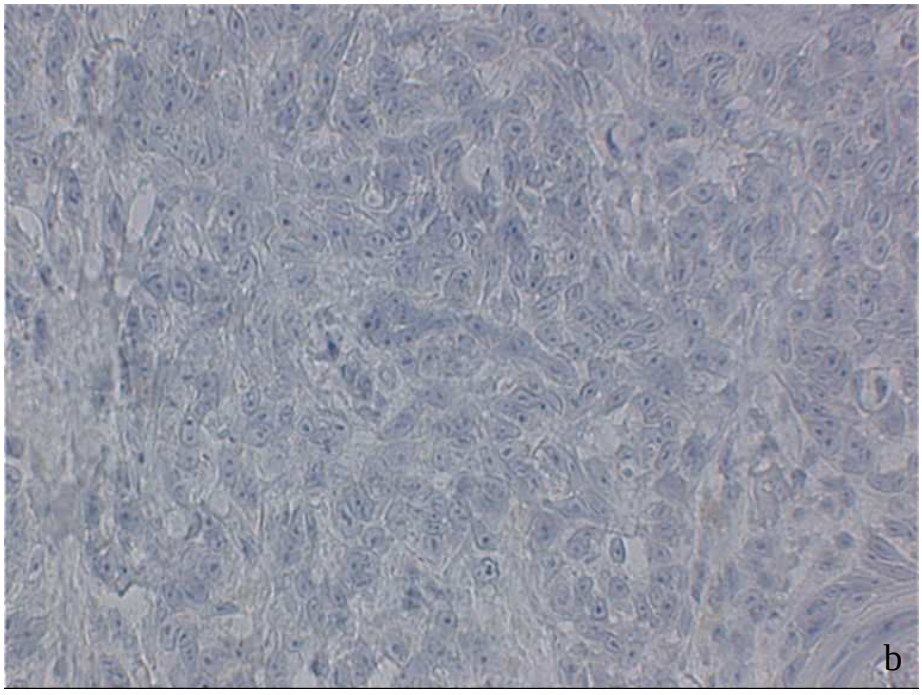
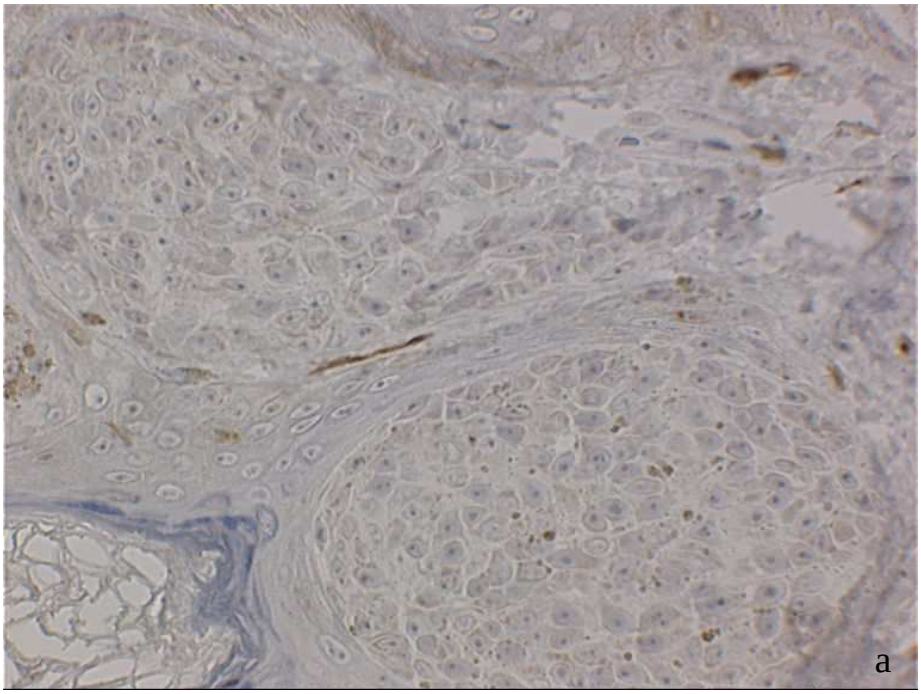


Abb.22 Beispiel für die Rad51-Expression im Malignen Melanom

a) Rad51-Expression (sehr wenig und schwach: siehe Pfeil) (x400)

b) Negativkontrolle (x400)



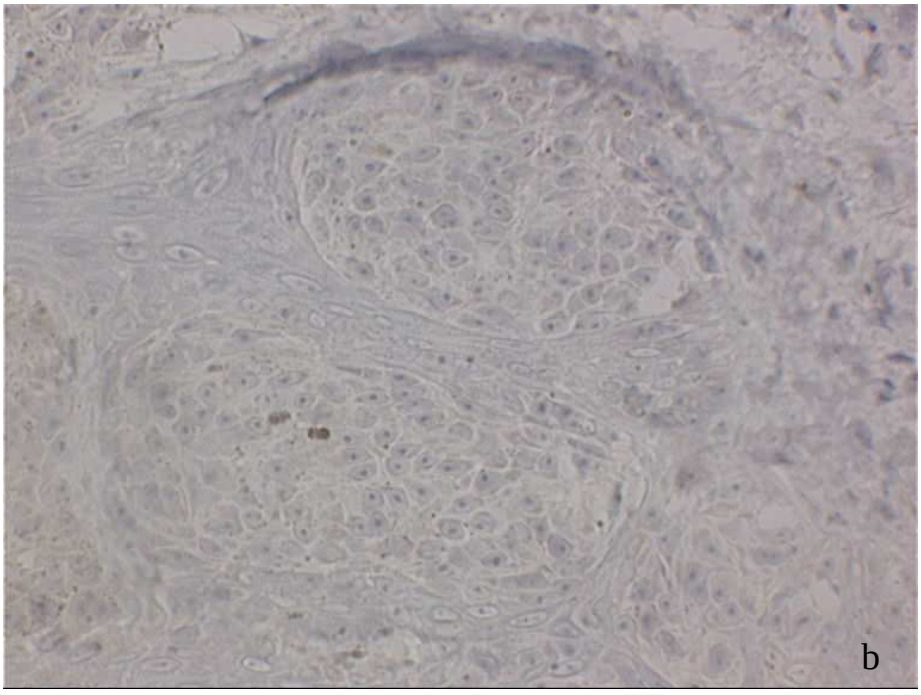


Abb.23 Beispiel für die Rad51-Expression im melanozytären Nävus

a) Rad51-Expression (keine Expression zu erkennen) (x400)

b) Negativkontrolle (x400)

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1: Histologie der aktinischen Keratose
Abb. 2: Histologie des Morbus Bowen
Abb. 3: Histologie des Plattenepithelkarzinoms
Abb. 4: Histologie des melanozytären Nävus vom „Compound“-Typ
Abb. 5: Histologie des malignen Melanoms
Abb. 6: Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen
Abb. 7: Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik
Abb. 8: Prinzip der „Vectastain ABC-Methode“
Abb. 9: Referenzbild zur Auswertung der Immunhistochemischen Färbung (Rad51)
Abb. 10: Referenzbild zur Auswertung der Immunhistochemischen Färbung (Ki-67)
Abb. 11: Mittleres Alter des Studienkollektivs
Abb. 12: Geschlechtsverteilung des Studienkollektivs
Abb. 13: Durchschnittliche Expression von Rad51 in Tumoren der Haut
Abb. 14: Verteilung der Rad51-Expression in den Tumoren der Haut
Abb. 15: Durchschnittliche Expression von Ki-67 in Tumoren der Haut
Abb. 16: Verteilung der Ki-67-Expression in den Tumoren der Haut
Abb. 17: Korrelation der Rad51-Expression mit der Ki-67-Expression
Abb. 18: Beispiel für die Rad51-Expression in der Aktinische Keratose
Abb. 19: Beispiel für die Rad51-Expression im Morbus Bowen
Abb. 20: Beispiel für die Rad51-Expression beim hochdifferenzierten spinozellulären Karzinom
Abb. 21: Beispiel für die Rad51-Expression beim entdifferenzierten spinozellulären Karzinom
Abb. 22: Beispiel für die Rad51-Expression beim Malignen Melanom
Abb. 23: Beispiel für die Rad51-Expression im melanozytären Nävus

Tabellen

Tab. 1: Pathologische Parameter der untersuchten malignen Melanome
Tab. 2: Statistische Analyse der Rad51-Überexpression bei männlichen und weiblichen Patienten in Tumoren der Haut
Tab. 3: Statistische Analyse der Melanomparameter und Vergleich Melanom mit Nävus
Tab. 4: Statistische Analyse der Rad51-Expression in Tumoren der Haut untereinander
Tab. 5: Statistische Analyse der Ki-67-Expression bei männlichen und weiblichen Patienten in Tumoren der Haut
Tab. 6: Statistische Analyse der Melanomparameter bei der Ki-67-Expression
Tab. 7: Statistische Analyse der Ki-67-Expression in Tumoren der Haut untereinander
Tab. 8: Statistische Analyse der Rad51- gegen die Ki-67-Expression in Tumoren der Haut
Tab. 9: Vergleich der Rad51-Expression bei hoher und niedriger Ki-67-Expression

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Excisionsreparatur
ca.	circa
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
HR	homologe Rekombination
kDa	Kilodalton
LOH	Verlust eines Allels („Loss of Heterozygosity“)
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
NER	Nukleotid-Excisionsreparatur
NHEJ	Nicht homologe Endverknüpfung („Non Homologous End Joining“)
PBS	“Phosphate buffered saline”, ein Phosphatpuffer
PCI	“Positive stained Cell Index”, Anteil immunhistochemischer Tumorzellen an der Gesamttumorzellzahl
SSA	Einzelstrangbindung („Single Strand Annealing“)
Tab.	Tabelle
UV	Ultraviolettes Licht

7. Literaturverzeichnis

Balsara, B. R., Bell, D. W., Sonoda, G., De Rienzo, A., du Manoir, S., Jhanwar, S. C., and Testa, J. R. (1999). **Comparative genomic hybridization and loss of heterozygosity analyses identify a common region of deletion at 15q11.1-15 in human malignant mesothelioma.** Cancer Res *59*, 450-454.

Baumann, P., Benson, F. E., and West, S. C. (1996). **Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro**. Cell *87*, 757-766.

Baumann, P., and West, S. C. (1998). **Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair.** Trends Biochem Sci *23*, 247-251.

Benson, F. E., Stasiak, A., and West, S. C. (1994). **Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA.** Embo J *13*, 5764-5771.

Bergman, R., Malkin, L., Sabo, E., and Kerner, H. (2001). **MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi.** J Am Acad Dermatol *44*, 500-504.

Berner, A. (2005). **Actinic keratosis and development of cutaneous squamous cell carcinoma.** Tidsskr Nor Laegeforen *125*, 1653-1654

Bezzubova, O. Y., and Buerstedde, J. M. (1994). **Gene conversion in the chicken immunoglobulin locus: a paradigm of homologous recombination in higher eukaryotes.** Experientia *50*, 270-276.

Biesterfeld, S., Pennings, K., Grussendorf-Conen, E. I. and Bocking, A. (1995) **Aneuploidy in actinic keratosis and Bowen´s disease- increased risk for invasive squamous cell carcinoma?** Br J Dermatol *133*, 557-560

Biesterfeld, S. and J. Josef (2002). **Differential diagnosis of keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the epidermis by MIB-1 immunohistometry.** Anticancer Res 22(5): 3019-23.

Binder, M., Schwarz, M., Winkler, A., Steiner, A., Kaider, A., Wolff, K., and Pehamberger, H. (1995). **Epiluminescence microscopy. A useful tool for the diagnosis of pigmented skin lesions for formally trained dermatologists.** Arch Dermatol *131*, 286-291.

Bishop, A. J., and Schiestl, R. H. (2000). **Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects.** Hum Mol Genet *9*, 2427-2334.

Bishop, D. K. (1994). **RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis**. Cell *79*, 1081-1092.

Bishop, D. K., Ear, U., Bhattacharyya, A., Calderone, C., Beckett, M., Weichselbaum, R. R., and Shinohara, A. (1998). **Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo.** J Biol Chem *273*, 21482-21488.

Blesch, A., Bosserhoff, A. K., Apfel, R., Behl, C., Hessdoerfer, B., Schmitt, A., Jachimczak, P., Lottspeich, F., Buettner, R., and Bogdahn, U. (1994). **Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA.** Cancer Res *54*, 5695-5701.

Boni, R., Doguoglu, A., Burg, G., Muller, B., and Dummer, R. (1996). **MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma.** J Am Acad Dermatol *35*, 416-418.

Bowen, J. T. (1912). **Precancerous dermatoses: A study of two cases of chronic atypical epithelial proliferation.** J cutan Dis Syph *30*, 241-255.

Braun, R. P., Saurat, J. H., and Krischer, J. (2000). **Hypoluminescence microscopy of pigmented skin lesions.** Melanoma Res *10*, 141-144.

Breitbart, E. (2000). **Basaliom, Spinaliom, Melanom - Hautkrebs nimmt weltweit zu.** Ärztezeitung 17.05.2000

Breslow, A. (1970). **Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma.** Ann Surg *172*, 902-908.

Breuninger, H., and Garbe, C. (1998). **[Squamous epithelial carcinoma of the skin including the lower lip and eyelids (spinalioma, spinous cell carcinoma). Quality Assurance Committee of the German Society of Dermatology and the professional Organization of German Dermatologists e.V.].** Hautarzt *48 Suppl 1*, S20-26.

Broders, A. (1921). **Squamous epithelioma of the skin.** Ann Surg *73*, 141-160.

Bronchez, L. and Naeyaert, J.M. (2000). **Serological markers for melanoma.** Br J Dermatol *143*, 256-268

Bruno, S., Crissman, H.A., Bauer, K.D. and Darzynkiewicz, Z.(1991). **Changes in cell nuclei during S phase: progressive chromatin condensation and altered expression of the proliferation-associated nuclear proteins Ki-67, cyvlin (PCNA), p105 and p34.** Exp Cell Res *196*, 99-106.

Bryan, T. M., and Cech, T. R. (1999). **Telomerase and the maintenance of chromosome ends.** Curr Opin Cell Biol *11*, 318-324.

Buchhop, S., Donzelmann, B., Nastainczyk, W., and Sturzbecher, H. W. (1996). **Isolation and characterization of six monoclonal antibodies raised against human RAD51 recombinant protein.** Hybridoma *15*, 205-210.

Buchhop, S., Gibson, M. K., Wang, X. W., Wagner, p., Stürzbecher, H. W., and Harris, C. C. (1997). **Interaction of p53 with the human Rad51 protein.** Nucleic Acids Res *25*, 3868-3874.

Butani, A., Arbesfeld, D. M. and Schwartz, R. A. (2005). **Premalignant and early squamous cell carcinoma.** Clin Plast Surg *32*, 223-235.

Buzaid, A. C., Sandler, A. B., Hayden, C. L., Scinto, J., Poo, W. J., Clark, M. B., and Hotchkiss, S. (1994). **Correlation between lipid-associated sialic acid and tumor burden in melanoma.** Int J Biol Markers *9*, 247-250.

Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (1999). **Genetic instability and darwinian selection in tumours.** Trends Cell Biol *9*, M57-60.

Callen, J. P., Bickers, D. R., and Moy, R. L. (1997). **Actinic keratoses.** J Am Acad Dermatol *36*, 650-653.

Cattoretti, G., Becker, M. H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J., and Gerdes, J. (1992). **Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.** J Pathol *168*, 357-363.

Chen, K. H., Yakes, F. M., Srivastava, D. K., Singhal, R. K., Sobol, R. W., Horton, J. K., Van Houten, B., and Wilson, S. H. (1998). **Up-regulation of base excision repair correlates with enhanced protection against a DNA damaging agent in mouse cell lines.** Nucleic Acids Res *26*, 2001-2007.

Christodoulopoulos, G., Malapetsa, A., Schipper, H., Golub, E., Radding, C., and Panasci, L. C. (1999). **Chlorambucil induction of HsRad51 in B-cell chronic lymphocytic leukemia.** Clin Cancer Res *5*, 2178-2184.

Clark, A. J. (1996). **RecA mutants of E. coli K12: a personal turning point.** BioEssays *18 no.9*, 767-772.

Clark, W. H., Jr., From, L., Bernardino, E. A., and Mihm, M. C. (1969). **The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin.** Cancer Res *29*, 705-727.

Cliby, W., Ritland, S., Hartmann, L., Dodson, M., Halling, K. C., Keeney, G., Podratz, K. C., and Jenkins, R. B. (1993). **Human epithelial ovarian cancer allelotype.** Cancer Res *53*, 2393-2398.

Cockerell, C. J. (2000). **Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis").** J Am Acad Dermatol *42*, 11-17

Collis, S. J., Tighe, A., Scott, S. D., Roberts, S. A., Hendry, J. H., and Margison, G. P. (2001). **Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells.** Nucleic Acids Res *29*, 1534-1538.

Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K. A., Stein, H., and Mason, D. Y. (1984). **Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline hosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).** J Histochem Cytochem *32*, 219-229.

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, S. (1992). **Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.** Embo J *11*, 1921-1929.

Coussens, L. M., and Werb, Z. (1996). **Matrix metalloproteinases and the development of cancer.** Chem Biol *3*, 895-904.

Cox, N. H. (1994). **Body site distribution of Bowen's disease.** Br J Dermatol *130*, 714-716.

Cox, N. H., Eedy, D. J., and Morton, C. A. (1999). **Guidelines for management of Bowen's disease.British Association of Dermatologists.** Br J Dermatol *141*, 633-641.

Devilee, P., van Vliet, M., van Sloun, P., Kuipers Dijkshoorn, N., Hermans, J., Pearson, P. L., and Cornelisse, C. J. (1991). **Allelotype of human breast carcinoma: a second major site for loss of heterozygosity is on chromosome 6q.** Oncogene *6*, 1705-1711.

Diepgen, T. L., and Mahler, V. (2002). **The epidemiology of skin cancer.** Br J Dermatol *146 Suppl 61*, 1-6.

Djukanovic, D., Hofmann, U., Sucker, A. and Schachendorf, D. (2001). **Melanoma tumour markers S100B and MIA: evaluation of stability in serum and blood upon storage and processing.** Br J Dermatol *145*, 1030-1031.

Drake, L. A., Ceilley, R. I., Cornelison, R. L., Dobes, W. L., Dorner, W., Goltz, R. W., Graham, G. F., Lewis, C. W., Salasche, S. J., Turner, M. L., and et al. (1995). **Guidelines of care for actinic keratoses. Committee on Guidelines of Care.** J Am Acad Dermatol *32*, 95-98.

Dummer, W., Becker, J. C., Schwaaf, A., Leverkus, M., Moll, T., and Brocker, E. B. (1995). **Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma.** Melanoma Res *5*, 67-68.

Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., and Reddel, R. R. (2000). **Telomere maintenance by recombination in human cells.** Nat Genet *26*, 447-450.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). **WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.** Cell *75*, 817-825.

Finn, G. K., Kurz, B. W., Cheng, R. Z., and Shmookler Reis, R. J. (1989). **Homologous plasmid recombination is elevated in immortally transformed cells.** Mol Cell Biol *9*, 4009-4017.

Flygare, J., Benson, F., and Hellgren, D. (1996). **Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes.** Biochim Biophys Acta *1312*, 231-236.

Friedman, R. J., and Rigel, D. S. (1985). **The clinical features of malignant melanoma**. Dermatol Clin *3*, 271-283.

Garbe, C. (1992). **[The sun and malignant melanoma].** Hautarzt *43*, 251-257.

Garbe, C. (1995). **[Risk factors for the development of malignant melanoma and identification of risk groups in German-speaking regions].** Hautarzt *46*, 309-314.

Garbe, C., Buttner, P., Weiss, J., Soyer, H. P., Stocker, U., Kruger, S., Roser, M., Weckbecker, J., Panizzon, R., Bahmer, F., and et al. (1994). **Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society.** J Invest Dermatol *102*, 695-699.

Garbe, C., Dummer, R., Kaufmann, R., and Tilgen, W. (1997**). Klinik und Histologie des malignen Melanoms.** In: Dermatologische Onkologie *1. Aufl., 247-267, Springer Verlag Berlin*.

Garbe, C., Dummer, R., Kaufmann, R., and Tilgen, W. (1997a). **Tumormarker des malignen Melanoms**. In: Dermatologische Onkologie *1. Aufl., 247-267, Springer Verlag Berlin*.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., and Stein, H. (1984). **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67**. J Immunol *133*, 1710-1715.

German, J. (1993). **Bloom syndrome: a mendelian prototyp of somatic mutational disease.** Medicine (Baltimore) *72*, 393-406.

Glogau, R. G. (2000). **The risk of progression to invasive disease.** J Am Acad Dermatol *42*, 23-24.

Goldstein, A. M., Goldin, L. R., Dracopoli, N. C., Clark, W. H., Jr., and Tucker, M. A. (1996). **Two-locus linkage analysis of cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi.** Am J Hum Genet *58*, 1050-1056.

Golub, E. I., Kovalenko, O. V., Gupta, R. C., Ward, D. C., and Radding, C. M. (1997). **Intereraction of human recombination proteins rad51 and rad54.** Nucleic Acids Res, *25*:4106–10.

Gonzalez, R., Silva, J. M., Dominguez, G., Garcia, J. M., Martinez, G., Vargas, J., Provencio, M., Espana, P., and Bonilla, F. (1999). **Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlations.** Br J Cancer *81*, 503-509.

Graham, J. H., and Helwig, E. B. (1973). **Erythroplasia of Queyrat. A clinicopathologic and histochemical study.** Cancer *32*, 1396-1414.

Grin-Jorgensen, C., Berke, A., and Grin, M. (1992). **Ocular melanoma.** Dermatol Clin *10*, 663-668.

Guenthner S. T., Hurwitz, R. M., Buckel, L. J. and Gray, H. R. (1999). **Cutaneous squamous cell carcinomas consistently show histologic evidence of in situ changes: a clinicopathologic correlation.** J Am Acad Dermatol *41*, 443-448.

Guesdon, J. L., Ternynck, T., and Avrameas, S. (1979). **The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques.** J Histochem Cytochem *27*, 1131-1139.

Gupta, R. C., Bazemore, L. R., Golub, E. I., and Radding, C. M. (1997). **Activities of human recombination protein Rad51.** Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 463-468.

Haaf, T., Golub, E. I., Reddy, G., Radding, C. M., and Ward, D. C. (1995). **Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes.** Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 2298-2302.

Haber, J. E. (2000). **Partners and pathwaysrepairing a double-strand break.** Trends Genet *16*, 259-264.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). **The hallmarks of cancer.** Cell *100*, 57-70.

Hein, R., Bosserhoff, A. K., and Degitz, K. (2000). **Tumormarker des malignen Melanoms.** MANUAL Maligne Melanome, 36-39.

Horikoshi, T., Ito, S., Wakamatsu, K., Onodera, H., and Eguchi, H. (1994**). Evaluation of melanin-related metabolites as markers of melanoma progression.** Cancer *73*, 629-636.

Hornef, S., Lux, J., and Rassner, G. (1992). **[Neuron-specific enolase (NSE)--a suitable tumor marker in malignant melanoma?]**. Hautarzt *43*, 77-80.

Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H. (1981). **Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.** J Histochem Cytochem *29*, 577-580.

Johnson, T. M., Yahanda, A. M., Chang, A. E., Fader, D. J., and Sondak, V. K. (1998). **Advances in melanoma therapy.** J Am Acad Dermatol *38*, 731-741.

Kaleem, Z., Lind, A. C., Humphrey, P. A., Sueper, R. H., Swanson, P. E., Ritter, J. H., and Wick, M. R. (2000). **Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas?** Mod Pathol *13*, 217-222.

Kanaar, R., and Hoeijmakers, J. H. (1998). **Genetic recombination. From competetion to collaboration.** Nature *391*, 337-338.

Kanamoto, T., Hellman, U., Heldin, C. H., and Souchelnytskyi, S. (2002). **Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair.** Embo J *21*, 1219-1230.

Kanter, L., Blegen, H., Wejde, J., Lagerlof, B., and Larsson, O. (1995). **Utility of a proliferation marker in distinguishing between benign naevocellular naevi and naevocellular naevus-like lesions with malignant properties.** Melanoma Res *5*, 345-350.

Kao, G. F. (1986). **Carcinoma arising in Bowen's disease.** Arch Dermatol *122*, 1124-1126.

Kato, M., Yano, K., Matsuo, F., Saito, H., Katagiri, T., Kurumizaka, H., Yoshimoto, M.,Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G.*, et al.* (2000). **Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer.** J Hum Genet *45*, 133-137.

Keefe, M., and Smith, G. D. (1991). **Bowen's disease arising in a scar--a case report and review of the relationship between trauma and malignancy.** Clin Exp Dermatol *16*, 478-480.

Kersemaekers, A. M., Kenter, G. G., Hermans, J., Fleuren, G. J., and van de Vijver, M. J. (1998). **Allelic loss and prognosis in carcinoma of the uterine cervix.** Int J Cancer *79*, 411-417.

Khanna, K. K., and Jackson, S. P. (2001). **DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection.** Nat Genet *27*, 247-254.

Knippers, R. (2001). **Mutationen. DNA-Schäden und DNA-Reparatur.** in Knippers R Molekulare Genetik *8. Auflage*, 245-282.

Kossard, S., and Rosen, R. (1992). **Cutaneous Bowen's disease. An analysis of 1001 cases according to age, sex, and site.** J Am Acad Dermatol *27*, 406-410.

Kovacs, A., Yonemoto, K., Katsuoka, K., Nishiyama, S., and Harhai, I. (1996). **Bowen's disease: statistical study of a 10 year period.** J Dermatol *23*, 267-274.

Kowalczykowski, S. C., and Eggleston, A. K. (1994). **Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins.** Annu Rev Biochem *63*, 991-1043.

Kraehn, G. M., Schartl, M., and Peter, R. U. (1995). **Human malignant melanoma. A genetic disease?** Cancer *75*, 1228-1237.

Kuo, T.-T., Hu, S., Lo, S.-K. and Chan, H.-L. (1997). **p53 Expression and Proliferative Activity in Bowen´s Disease With or Without Chronic Arsenic Exposure.** Hum Pathol 28: 786-790.

Lambert, S., and Lopez, B. S. (2000). **Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms.** Embo J *19*, 3090-3099.

Lee, M. M. and Wick, M. M. (1993). **Bowens`s Disease.** Clinics in Dermatology, 43-46.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). **Genetic instabilities in human cancers.** Nature *396*, 643-649.

Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J., and Jasin, M. (1998). **Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells.** Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 5172-5177.

Lim, D. S., and Hasty, P. (1996). **A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53.** Mol Cell Biol *16*, 7133-7143.

Linder, S., Parrado, C., Falkmer, U. G., Blasjo, M., Sundelin, P., and von Rosen, A. (1997). **Prognostic significance of Ki-67 antigen and p53 protein expression in pancreatic duct carcinoma: a study of the monoclonal antibodies MIB-1 and DO-7 in formalin-fixed paraffin-embedded tumour material.** Br J Cancer *76*, 54-59.

Lober, B. A., Lober, C. W., and Accola, J. (2000). **Actinic keratosis is squamous cell carcinoma.** J Am Acad Dermatol *43*, 881-882.

Ludwig, T., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., and Efstratiadis, A. (1997). **Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53 and Brca2/p53 nullizygous embryos.** Genes Dev *11*, 1226-1241.

Maacke, H., Jost, K., Opitz, S., Miska, S., Yuan, Y., Hasselbach, L., Luttges, J., Kalthoff, H., and Sturzbecher, H. W. (2000b). **DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma.** Oncogene *19*, 2791-2795.

Maacke, H., Opitz, S., Jost, K., Hamdorf, W., Henning, W., Kruger, S., Feller, A. C., Lopens, A., Diedrich, K., Schwinger, E., and Sturzbecher, H. W. (2000a). **Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer.** Int J Cancer *88*, 907-913.

Magnusson, K. P., Sandstrom, M., Stahlberg, M., Larsson, M., Flygare, J., Hellgren, D., Wiman, K. G., and Ljungquist, S. (2000). **p53 splice acceptor site mutation and increased HsRAD51 protein expression in Bloom's syndrome GM1492 fibroblasts.** Gene *246*, 247-254.

Mahlamaki, E. H., Hoglund, M., Gorunova, L., Karhu, R., Dawiskiba, S., Andren-Sandberg, A., Kallioniemi, O. P., and Johansson, B. (1997). **Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer.** Genes Chromosomes Cancer *20*, 383-391.

Mansoor, A., McKee, P. H., Simpson, J. A., McGuire, B. and Hobbs, C. (1996). **Prognostic Significance of Ki-67 and p53 immunoreactivity in cutaneous squamous cell carcinomas.** Am J Dermatopathol *18*, 351-357.

Marks, R., Foley, P., Goodman, G., Hage, B. H., and Selwood, T. S. (1986). **Spontaneous remission of solar keratoses: the case for conservative management.** Br J Dermatol *115*, 649-655.

Marks, R., and Kopf, A. W. (1995). **Cancer of the skin in the next century.** Int J Dermatol *34*, 445-447.

Marks, R., Rennie, G., and Selwood, T. S. (1988). **Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma.** Lancet *1*, 795-797.

Marmorstein, L. Y., Ouchi, T., and Aaronson, S. A. (1998). **The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and Rad51.** Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 13869-13874.

Marmur, E. S., Schmults, C. D. and Goldberg, D. J. (2004). **A review of laser and photodynamic therapie for the treatment of nonmelanoma skin cancer.** Dermatol Surg *30*, 264-271.

Matsuta, M., Kimura, S., Kosegawa, G., and Kon, S. (1996). **Immunohistochemical detection of Ki-67 in epithelial skin tumors in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using a new monoclonal antibody (MIB-1).** J Dermatol *23*, 147-152.

Mihm, M. C., Jr., Clark, W. H., Jr., and From, L. (1971). **The clinical diagnosis, classification and histogenetic concepts of the early stages of cutaneous malignant melanomas.** N Engl J Med *284*, 1078-1082.

Milne, G. T., and Weaver, D. T. (1993). **Dominant negative alleles of Rad52 reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52.** Genes Dev *7*, 1755-1765.

Moretti, S., Spallanzani, A., Chiarugi, A., Fabiani, M., and Pinzi, C. (2001). **Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness.** J Am Acad Dermatol *44*, 188-192.

Nilles, M., Boedeker, R. H., and Schill, W. B. (1994). **Surface microscopy of naevi and melanomas--clues to melanoma.** Br J Dermatol *130*, 349-355.

Noll, S., und Schaub-Kuhnen, S. (2000). **Praxis der Imunhistochemie.** 1 Aufl Urban und Fischer München.

Nowell, P. C. (1997). **Genetic alterations in leukemias and lymphomas: impressive progress and continuing complexity**. Cancer Genet Cytogenet *94*, 13-19.

Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A., and Egelman, E. H. (1993**). Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament.** Science *259*, 1896-1899.

Ohnishi, T., Taki, T., Hiraga, S., Arita, N., and Morita, T. (1998). **In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene.** Biochem Biophys Res Commun *245*, 319-324.

Opitz, S. (2001). **Der Rekombinationsfaktor Rad51 in invasiv duktalen Mammakarzinomen: eine immunhistochemische Studie.** Med. Diss. Lübeck

Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). **Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations.** Mutagenesis *15*, 289-302.

Preston, D. S., and Stern, R. S. (1992). **Nonmelanoma cancers of the skin.** N Engl J Med *327*, 1649-1662.

Qiao, G. B., Wu, Y. L., Yang, X. N., Zhong, W. Z., Xie, D., Guan, X. Y., Fischer, D., Kolberg, H. C., Kruger, S., Stuerzbecher, H. W. (2005). **High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients.** Br J Cancer *14*, S0007-0920.

Raderschall, E., Bazarov, A., Cao, J., Lurz, R., Smith, A., Mann, W., Ropers, H. H., Sedivy, J. M., Golub, E. I., Fritz, E., and Haaf, T. (2002a). **Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis.** J Cell Sci *115*, 153-164.

Raderschall, E., Golub, E. I., and Haaf, T. (1999). **Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage.** Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 1921-1926.

Raderschall, E., Stout, K., Freier, S., Suckow, V., Schweiger, S., and Haaf, T. (2002b). **Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells.** Cancer Res *62*, 219-225.

Rigel, D. S., and Friedman, R. J. (1993). **The rationale of the ABCDs of early melanoma.** J Am Acad Dermatol *29*, 1060-1061.

Russell, J. S., Brady, K., Burgan, W. E., Cerra, M. A., Oswald, K. A., Camphausen, K., and Tofilon, P. J. (2003). **Gleevec-mediated inhibition of Rad51 expression and enhancement of tumor cell radiosensitivity.** Cancer Res *63*, 7377-7383.

Sachs, L. (1997). **Angewandte Statistik**. 8Aufl, springer-Verlag, Berlin.

Sagebiel, R. W. (1993). **Melanocytic nevi in histologic association with primary cutaneous melanoma of superficial spreading and nodular types: effect of tumor thickness.** J Invest Dermatol *100*, 322S-325S.

Salama, M. E., Mahmood, M. N., Qureshi, H. S., Ma, C., Zarbo, R. J. and Ormsby, A. H. (2003). **p16INK4a expression in actinic keratosis and Bowens´s disease.** Br J Dermatol *149*, 1006-1012.

Schaumburg-Lever, G. (1986). **Immunoenzyme techniques in dermatopathology.** Int J Dermatol *25*, 217-223.

Scheibenbogen, C., Mohler, T., Haefele, J., Hunstein, W., and Keilholz, U. (1995). **Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumour load.** Melanoma Res *5*, 179-181.

Schmidt, M. und Hölzel, D. (2000). **Klinisch-epidemiologische Daten zum malignen Melanom aus dem Bereich des Tumorzentrums München.** Manual Maligne Melanome, 2-7.

Schmutte, C., Tombline, G., Rhiem, K., Sadoff, M. M., Schmutzler, R., von Deimling, A., and Fishel, R. (1999). **Characterization of the human Rad51 genomic locus and examination of tumors with 15q14-15 loss of heterozygosity (LOH).** Cancer Res *59*, 4564-4569.

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D. T., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D. M. (1997). **Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells.** Cell *88*, 265-275.

Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., and Bradley, A. (1997). **Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2.** Nature *386*, 804-810.

Shimizu, K., Toriyama, F., Zhang H. M. and Yoshida H. (1995). **The expression of placental-type glutathione S-transferase (GST-pi) in human cutaneous carcinoma in situ, that is, actinic keratosis and Bowen´s disease, compared with normal human skin.** Carcinogenesis *16*, 2327-2330.

Shimuzu, A., Muto, M., Murakami, T., Furumoo, H., Mogami, S. and Asagami, C. (1997). **Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity as evaluatd by Ki-67 immunostaining in well-differentiated squamous cell crcinoma of the skin.** Dermatology *195*, 224-227.

Shimizu, T., Murkami, T., Oga, A., Furumoto, H., Nakano, J. and Muto, M. (1999). **Prognostic significance of expression of p53 protein and Ki-67 Antigen in well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin.** J Dermatol *26*, 837-840.

Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). **Rad51 protein involved in repair and recombination in S. cerevisiae is a RecA-like protein.** Cell *69*, 457-470.

Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., and Ogawa, T. (1993). **Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA.** Nat Genet *4*, 239-243.

Shinohara, A., and Ogawa, T. (1995). **Homologous recombination and the roles of double-strand breaks.** Trends Biochem Sci *20*, 387-391.

Skender-Kalnenas, T. M., English, D. R., and Heenan, P. J. (1995). **Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma?** J Am Acad Dermatol *33*, 1000-1007.

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** Science *235*, 177-182.

Sober, A. J., and Burstein, J. M. (1995). **Precursors to skin cancer.** Cancer *75*, 645-650.

Sober, A. J., Lew, R. A., Koh, H. K., and Barnhill, R. L. (1991). **Epidemiology of cutaneous melanoma. An update.** Dermatol Clin *9*, 617-629.

Sonesson, B., Eide, S., Ringborg, U., Rorsman, H., and Rosengren, E. (1995). **Tyrosinase activity in the serum of patients with malignant melanoma.** Melanoma Res *5*, 113-116.

Sonoda, E., Sasaki, M. S., Buerstedde, J. M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda, S. (1998). **Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death.** Embo J *17*, 598-608.

Sparrow, L. E., English, D. R., Taran, J. M., and Heenan, P. J. (1998). **Prognostic significance of MIB-1 proliferative activity in thin melanomas and immunohistochemical analysis of MIB-1 proliferative activity in melanocytic tumors.** Am J Dermatopathol *20*, 12-16.

Stadler, R., and Garbe, C. (1991). **[Nevus associated malignant melanomas--diagnostic validation and prognosis].** Hautarzt *42*, 424-429.

Stern, R. S. (1999). **The mysteries of geographic variability in nonmelanoma skin cancer incidence**. Arch Dermatol *135*, 843-844.

Stolz, W., Schmoeckel, C., Landthaler, M., and Braun-Falco, O. (1989). **Association of early malignant melanoma with nevocytic nevi.** Cancer *63*, 550-555.

Sturzbecher, H. W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., and Buchhop, S. (1996). **P53 is linked directly to homologous recombination processes via Rad51/RecA protein interaction.** Embo J *15*, 1992-2002.

Sung, P. (1997). **Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase.** J Biol Chem *272*, 28194-28197.

Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., and Van Dyke, T. (1994). **p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo.** Cell *78*, 703-711.

Szekeres,G. and De Giacomoni, P. (1994). **Ki-67 and p53 expression in cutaneous Bowen´s disease: an immunohistochemical study of fixed-embedded tissue sections.** Acta Derm Venereol *74*, 95-97.

Takahashi, E., Matsuda, Y., Hori, T., Yasuda, N., Tsuji, S., Mori, M., Yoshimura, Y., Yamamoto, A., Morita, T., and Matsushiro, A. (1994). **Chromosome mapping of the human (RECA) and mouse (Reca) homologs of the yeast RAD51 and Escherichia coli recA genes to human (15q15.1) and mouse (2F1) chromosomes by direct R-banding fluorescence in situ hybridization.** Genomics *19*, 376-378.

Taki, T., Ohnishi, T., Yamamoto, A., Hiraga, S., Arita, N., Izumoto, S., Hayakawa, T., and Morita, T. (1996). **Antisense inhibition of the RAD51 enhances radiosensitivity.** Biochem Biophys Res Commun *223*, 434- 438.

Tan, T. L., Essers, J., Citterio, E., Swagemakers, S. M., de Wit, J., Benson, F. E., Hoeijmakers, J. H., and Kanaar, R. (1999). **Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation.** Curr Biol *9*, 325-328.

Tashiro, S., Walter, J., Shinohara, A., Kamada, N., and Cremer, T. (2000). **Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin.** J Cell Biol *150*, 283-291.

Thestrup-Pedersen, K., Ravnborg, L., and Reymann, F. (1988). **Morbus Bowen. A description of the disease in 617 patients.** Acta Derm Venereol *68*, 236-239.

Tronnier, M., Schaumburg-Lever, G., and Rassner, G. (1989). **Ein Vergleich immunhistologischer Techniken in der Dermatopathologie.** Hautarzt *40*, 259-265.

Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and MoritaT (1996). **Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice.** Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 6236-6240.

Ugurel, S. (2005). **Serummarker des malignen Melanoms.** Hautarzt *56*, 173-186.

Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999). **VEGFs, receptors and angiogenesis.** Semin Cancer Biol *9*, 211-220.

Venkitaraman, A. R. (2002). **Cancer susceptibility and the functions of brca1 and brca2**. Cell,*108*:171–82.

Vispe, S., Cazaux, C., Lesca, C., and Defais, M. (1998). **Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation.** Nucleic Acids Res *26*, 2859-2864.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1993). **The multistep nature of cancer.** Trends Genet *9*, 138-141.

von Schoultz, E., Hansson, L. O., Djureen, E., Hansson, J., Karnell, R., Nilsson, B., Stigbrand, T., and Ringborg, U. (1996). **Prognostic value of serum analyses of S-100 beta protein in malignant melanoma.** Melanoma Res *6*, 133-137.

Wang, S. I., Puc, J., Li, J., Bruce, J. N., Cairns, P., Sidransky, D., and Parsons, R. (1997). **Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme.** Cancer Res *57*, 4183-4186.

Wang, Z. M., Chen, Z. P., Xu, Z. Y., Christodoulopoulos, G., Bello, V., Mohr, G., Aloyz, R., and Panasci, L. C. (2001). **In vitro evidence for homologous recombinational repair in resistance to melphalan.** J Natl Cancer Inst *93, 1*473-1478.

Weinberg, R. A. (1995). **Prospects for cancer genetics.** Cancer Surv *25*, 3-12.

Xia, S. J., Shammas, M. A., and Shmookler Reis, R. J. (1997). **Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase.** Mol Cell Biol *17*, 7151-7158.

Yamamoto, A., Taki, T., Yagi, H., Habu, T., Yoshida, K., Yoshimura, Y., Yamamoto, K., Matsushiro, A., Nishimune, Y., and Morita, T. (1996). **Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells.** Mol Gen Genet *251*, 1-12.

Yanagisawa, T., Urade, M., Yamamoto, Y., and Furuyama, J. (1998). **Increased expression of human DNA repair genes, XRCC1, XRCC3 and RAD51, in radioresistant human KB carcinoma cell line N10.** Oral Oncol *34*, 524-528.

Yanez, R. J., and Porter, A. C. (1999). **Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51.** Gene Ther *6*, 1282-1290.

Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). **Growth factor receptor tyrosine kinases.** Annu Rev Biochem *57*, 443-478.

Yoshikawa, K., Ogawa, T., Baer, R., Hemmi, H., Honda, K., Yamauchi, A., Inamoto, T., Ko, K., Yazumi, S., Motoda, H.*, et al.* (2000). **Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas.** Int J Cancer *88*, 28-36.

Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Bi, D., Weber, B. L. and El-Deiry, W. S. **Brca1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity.** *Oncogene*, 16:1713–21., 1998.

Zöfel, P. (1992). **Statistik in der Praxis.** 3Aufl, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

8. Danksagung

Herzlich danken möchte ich all jenen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Tronnier für die Vergabe des Dissertationsthemas und die stetige Betreuung über den gesamten Zeitraum der Studie. Besonders danke ich Herrn Dr. Wilhelm Henning, dessen fachkundiger Rat mir häufig weiterhelfen konnte und der stets ein offenes Ohr für mich hatte. Seine kontinuierliche Hilfsbereitschaft war mir eine große Stütze.

Des weiteren möchte ich mich beim Institut für Dermatologie und Venerologie für die Überlassung der Gewebeproben und die Bereitstellung des Bildanalysemikroskops bedanken. Frau Atefi und Frau Alexander bin ich für die Hilfe bei der Erstellung der Gewebeschnitte und die Einführung in die Labortätigkeit dankbar.

Darüber hinaus danke ich Dr. med. Sven Opitz, der mir freundlicherweise das Bildanalyseprogramm „Pick Click“ zur Verfügung stellte und Herrn Prof. Dr. Stürzbecher aus dem Institut für Humangenetik für die Bereitstellung des Rad51-Antikörpers.

Herrn Dr. Fröhlich möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinem Lebenspartner und meiner Mutter, die mir geduldig bei der Abfassung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben und mich unterstützt haben, wo sie nur konnten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Monja Derkes geb. Röske
Adresse	Carl-Adolph-Riebeck-Straße 8
	06679 Hohenmölsen
Tel.-Nr.	034441/50665
Geburtsdatum	04.08.1977
Geburtsort	Eisenhüttenstadt

Schulbildung

1984-1985	**Polytechnische Oberschule Wellmitz**
1985-1991	Polytechnische Oberschule 13 Eisenhüttenstadt
1991-1997	Albert-Schweitzer Gymnasium Eisenhüttenstadt

Hochschulbildung

1997-2004	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
09/99	Ärztliche Vorprüfung
08/00	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/03	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/04	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 12/04	Assistenzarzt für Anästhesie in der Asklepiosklinik Weißenfels