

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Histiozytom**

#### **2.1.1 Vorkommen, Morphologie**

Das kanine, kutane Histiozytom ist ein gutartiger, mesenchymaler Tumor, der mit annähernd 20 - 30% aller Haut- und Unterhauttumore den häufigsten gutartigen Hauttumor des Hundes darstellt (Dobson et al., 2002; Frese et al., 1982; Taylor et al., 1969). Im Biopatgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin waren allerdings von 4301 untersuchten Hauttumoren Histiozytome mit 368 Fällen nur am zweithäufigsten vertreten (Walter et al., 1997). Bislang konnte diese Tumorart ausschließlich beim Hund sicher nachgewiesen werden; lediglich Sutton und McLennan (1987) vermuteten eine ähnliche Erkrankung bei einer Färsen.

Histiozytome erscheinen als schnell wachsende, kuppelförmige Zubildungen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,5 bis 2 cm (Kelly, 1970; Kelm, 1982; Taylor et al., 1969), die häufig oberflächlich ulzerieren und meist solitär auftreten. Die Tumore sind gut vom umliegenden Gewebe abgrenzbar, ohne abgekapselt zu sein, und von fester Konsistenz mit heller Schnittfläche (Kelly, 1970; Taylor et al., 1969). Aufgrund eines häufig auf der Oberfläche erscheinenden Erythems wird für diesen Tumor auch das Synonym „strawberry tumor“ verwendet. Es findet keine Metastasierung statt, und auch Rezidive treten nur selten auf. So wurden von Weber (1985) bei 120 untersuchten Histiozytomen nur ein und von Taylor et al. (1969) in 520 Fällen drei Rezidive beobachtet. Bevorzugt sind diese Tumore an Kopf (hier vor allem an den Ohrspitzen) und Extremitäten lokalisiert (Ando et al., 2003; Frese et al., 1982; Weber, 1985).

Das histologische Bild variiert zum Teil erheblich. Nach Taylor et al. (1969) bilden die Tumorzellen gleichförmige Zellflächen, die die Haut- und Unterhaut infiltrieren. Andere Autoren bemerkten, dass die Histiozytomzellen teils in Reihen angeordnete oder ungeordnete dermale Akkumulationen formen (Drommer und Schulz, 1969; Kelm, 1982). Die Zellen weisen runde bis ovale, zum Teil gefaltete oder deutlich eingekerbte Zellkerne mit einem oder mehreren Nukleoli und ein leicht azidophiles, blasses Zytoplasma auf (Drommer und Schulz, 1969; Glick et al., 1976; Kelly, 1970; Kipar, 1994; Taylor et al., 1969). Die Zellgrenzen der runden

bis polygonalen Tumorzellen sind undeutlich. Die Angaben über die Mitoserate schwanken erheblich – zum Teil wurden nur vereinzelte (Drommer und Schulz, 1969; Kipar, 1994), zum Teil aber auch bis zu acht und mehr Mitosen pro Gesichtsfeld beobachtet (Glick et al., 1976; Guvenc et al., 2002; Martin de las Mulas et al., 1999; Taylor et al., 1969).

Obwohl in allen Studien ein häufigeres Auftreten bei männlichen Tieren beobachtet wurde, konnte eine signifikante Geschlechtsdisposition bislang ebenso wenig nachgewiesen werden wie eine saisonale Häufung. Eine Rassendisposition für Boxer und Dackel wurde von mehreren Autoren in Untersuchungen mit großen Fallzahlen festgestellt (Er und Sutton, 1989; Kipar, 1994; Taylor et al., 1969; Weber, 1985). Andere Studien fanden ein gehäuftes Auftreten beim Labrador und Boxer (Weinstein et al., 1989) sowie beim Spaniel (Frese et al., 1982). Im Unterschied zu anderen Hauttumoren tritt dieser in annähernd 50-70% der Fälle bei Hunden im Alter bis zu zwei Jahren auf (Kelly, 1970; Stannard und Pulley, 1978; Weber, 1985). Kipar (1994) konnte in einer Untersuchung an 42 Histiocyten älterer Hunde (über zwei Jahre) und an 16 von jüngeren Hunden dennoch keine altersbedingten Unterschiede im biologischen und immunhistologischen Verhalten dieser Tumore feststellen.

Ein wichtiges Charakteristikum dieser Neoplasie stellt ihre Fähigkeit zur spontanen Regression dar. Diese Tendenz zur Selbstheilung wird allerdings durch die häufigen oberflächlichen, unspezifischen Entzündungserscheinungen verkompliziert.

### **2.1.2 Begriffsentwicklung und Ätiologie**

Vermutlich wurde der Begriff des „Histiocyten“ in Verbindung mit gutartigen, mesenchymalen Tumoren erstmals von Mulligan (1948) verwandt. Zuvor wurden ähnliche Tumore der Haut als Rund-Zell-Sarkome (McClelland, 1940), transmissible Lymphosarkome (Lacroix und Riser, 1947) oder Retikulum-Zell-Sarkome (Ottosen, 1949) bezeichnet. Mulligan (1948) vermutete dagegen, dass das Histiocyten dem venerischen Lymphosarkom entspreche, einem Synonym für den „übertragbaren venerischen Tumor (transmissible venereal tumor, TVT)“. 1961 wurden diese extragenitalen Tumore erstmals als „canine cutaneous Histiocytoma“ (CCH) bezeichnet und als eigenständige Tumorart betrachtet, die sich morphologisch deutlich von Mastzellentumoren, Fibromen, Retikulum-Zell-Sarkomen und TVT unterscheiden sollten (Moulton, 1961). Smith und Jones (1966) erkannten später, dass die am äußeren Genital ent-

nommenen TVT-Zellen lediglich 59 Chromosomen aufwiesen, wohingegen die Zellen des „extragenitalen veneralen Tumors“ (= CCH) 76 Chromosomen zählten, die der Anzahl in den Zellen des Hundes entsprechen. Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von TVT und CCH zeigten ebenfalls deutliche Unterscheidungsmerkmale (Drommer und Schulz, 1969). Versuche einer experimentellen Übertragbarkeit des CCH führten weder in vivo noch in vitro zu einem positiven Ergebnis (Taylor et al., 1969). Auch Theorien, nach denen das CCH eher einer ungewöhnlichen Entzündungsform als einem Tumor entsprechen könnte, wurden nicht verifiziert. Bislang konnte weder mit Hilfe von Virus-Isolationstechniken, histologischen oder elektronenmikroskopischen Untersuchungen noch durch Tierversuche ein infektiöses oder onkogenetisches auslösendes bzw. proliferationsförderndes Agens isoliert werden (Affolter und Moore, 2000; Howard und Nielsen, 1969; Kelm, 1982; Taylor et al., 1969). Die WHO-Klassifikation von Tumoren der Haussäugetiere nahm 1974 das kutane Histiozytom in die Gruppe der mesenchymalen Tumore auf (Weiß, 1974). Zur näheren Bestimmung der ursprünglichen Zellart des Histiozytoms folgten zahlreiche ultrastrukturelle (Kelly, 1970; Kelm, 1982), zytochemische (Glick et al., 1976; Weber, 1985) und zytologische (Duncan und Prasse, 1979) Untersuchungen. Dabei wiesen die Tumorzellen zahlreiche Charakteristika von Histiocyten auf, und ihre Abstammung vom Mononukleären-Phagozyten-System (MPS) schien sehr wahrscheinlich. Dennoch reichten diese Kriterien noch nicht für eine sichere zytogenetische Zuordnung der Histiozytomzellen aus. Bei nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen wurden zahlreiche Antikörper (Tabelle 1, S. 5) getestet, wobei erstmals Zweifel am histiozytären Ursprung der Tumorzellen entstanden.

Tabelle 1: Antikörper zur näheren Charakterisierung von CCH-Zellen

Antikörper	Charakteristika	Nachweis im CCH	Studien
Lysozym	Monozyten/Makrophagen Beim Menschen nicht charakteristisch für neoplastische Zellen	heterogen	(Kipar, 1994; Moore, 1986; Sandusky et al., 1987) (Flavell et al., 1987)
alpha-1-antitrypsin	Marker benigner und maligner Histozyten beim Menschen	heterogen (-)	(Sandusky et al., 1987) (Marchal et al., 1995b)
alpha-1-antichymotrypsin	Marker benigner und maligner Histozyten beim Menschen	(-)	(Marchal et al., 1995b; Sandusky et al., 1987)
S-100-Protein	kanine LZ reagieren im Gegensatz zu menschlichen negativ	(-)	(Kipar, 1994; Marchal et al., 1995b; Sandusky et al., 1987)
Vimentin	Zellen mesenchymalen Ursprungs	heterogen (+)	(Marchal et al., 1995b) (Kipar, 1994)
kanine CD45	Zellen die vom KM abstammen	(+)	(Marchal et al., 1995b)
human CD14	Marker für kanine Monozyten	(-)	(Marchal et al., 1995b)
ACM1	Hundespezifischer, monoklonaler Antikörper, der ein Epitop zahlreicher Gewebshistozyten erkennt und negativ reagiert bei LZ	(-)	(Marchal et al., 1995b)
kanine MHC-II	Marker Antigen-präsentierender-Zellen und Lymphozyten	(+)	(Kipar et al., 1998; Marchal et al., 1995b; Moore et al., 1996; Rabanal et al., 1995)
CD1 a, b, c	LZ-Darstellung bei Mensch und Nager	(+)	(Moore et al., 1996)
CD4	T-Zell-abhängige-Areale von Lymphorganen und zum Teil Antigen-präsentierende-Zellen (+) LZ (-)	(-)	(Moore et al., 1996) Beim Mensch : (Rabanal et al., 1995)
Thy1	Charakteristisch für humane und kanine dermale Dendrozyten	(-)	(Moore et al., 1996)
L1 (MAC 387)	(+) Monozyten und Gewebshistozyten beim Menschen (+) infiltrierende Makrophagen, Neutrophile und intravaskuläre Monozyten (-) dermale Dendrozyten und LZ	(-)	(Flavell et al., 1987)  (Kipar et al., 1998)

(-) keine Reaktion; (+) positive Reaktion; LZ: Langerhans-Zellen

Der Vimentin-Nachweis bestätigte zunächst den mesenchymalen Charakter des Histiocytems und die positive Reaktion auf das kanine CD45 die Abstammung der Zellen vom Knochenmark. Histiocytomzellen reagierten in unterschiedlichen Studien (Tabelle 1) unter anderem heterogen auf Lysozym, einen immunhistochemischen Marker für Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (MMS). So wird Lysozym beispielsweise als Histiocytenmarker zur Differenzierung von humanen proliferativen und granulomatösen, histiozytären Erkrankungen eingesetzt. Nach Moore (1986) könnte dieses heterogene Auftreten entweder Ausdruck einer geringen Zelldifferenzierung der Histiocyten in Teilen der Tumore sein, oder ein Anteil könnte von Langerhans-Zellen abstammen, die kein Lysozym exprimieren. Allerdings stellt Lysozym beim Menschen in neoplastischen Zellen des MMS keinen zuverlässigen Marker dar

(Flavell et al., 1987), und somit schließt die Abwesenheit von Lysozym einen histiozytären Ursprung nicht aus.

Marchal et al. (1995b) befassten sich ebenfalls mit der These eines epidermalen Langerhans-Zell-Ursprungs und erstellten mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen einen Immunophenotyp des CCH und von kaninen Langerhans-Zellen:

Tabelle 2: Immunophenotypische Charakteristika von kaninen Langerhans-Zellen und Histozytomzellen

<b>Immunophenotypische Charakteristika kaniner Langerhans-Zellen</b>	<b>Immunophenotypische Charakteristika des CCH</b>
(+) MHC-II CD1 a,b,c CD11 a,c CD18 CD45	(+) MHC-II CD1 a,b,c (Moore et al., 1996) CD11 a,c CD18 CD45 <i>CD11 b</i> <i>CD44</i>
(-) CD45 <sub>RA</sub> Thy-1 CD4 <i>CD44</i> CD54 CD49 d ACM1 <i>CD11 b</i> $\alpha_D$	(-) Thy-1 CD4 ACM1 $\alpha_D$

Kursiv gedruckt: abweichende immunophenotypische Charakteristika

Der in Tabelle 2 beschriebene Immuno-Phenotyp des CCH zeigte zahlreiche Übereinstimmungen mit kaninen Langerhans-Zellen. Zusätzlich untermauerte nach Marchal et al. (1995b) die fehlende Reaktivität des humanen CD14, einem Marker kaniner Monozyten, und des ACM1 in Histozytomzellen die Annahme, dass diese Neoplasie ihren Ursprung nicht im MMS hat. Der Nachweis von MHC-II, einem zuverlässigen Marker Antigen-präsentierender Zellen des Hundes, zu denen auch die epidermalen Langerhans-Zellen zählen (Rabanal et al., 1995), und die Reaktivität mit CD1a (Antikörper zur Charakterisierung von Langerhans-Zellen bei Mensch und Nager) stützten die Theorie einer gemeinsamen Abstammung von Langerhans- und CCH-Zellen. Die Existenz zahlreicher ultrastruktureller Charakteristika, wie pleomorphe Einschlüsse, parakrystalline Strukturen und tiefe Plasmamembran Invaginationen, unterstrichen ebenfalls diese Ansicht (Marchal et al., 1995b; Moore et al., 1996). Baines et al. (2000) bestätigten in einer weiteren Untersuchung mittels Durchflußzytometrie diesen Immuno-Phenotyp der Histozytomzellen.

Laut diesen Studien zeigt das CCH Ähnlichkeiten mit der kutanen, selbstlimitierenden Langerhans-Zell-Histiozytosis des Menschen (Moore et al., 1996). Diese früher auch als „Histiozytosis X“ bezeichnete Veränderung stellt einen Oberbegriff für reaktiv-proliferative Erkrankungen im Kindesalter dar. Die Ätiologie ist ebenfalls noch unklar; möglicherweise handelt es sich um eine atypische Immunantwort oder eine Autoimmunkrankheit. Die Diagnose erfolgt beim Menschen immunhistologisch über den Nachweis des CD1-Antigens bzw. elektronenmikroskopisch über die Darstellung der typischen Birbeck-Granula in Langerhans-Zellen. Ein solch pathognomonischer Faktor fehlt für die Langerhans-Zellen des Hundes jedoch weiterhin. Zusätzlich betonten Kipar et al. (1998), dass auch eine nur heterogene Expression von Lysozym in Histiozytomzellen ein sicheres Zeichen sei, dass letztendlich Teile der Tumorzellen von Monozyten-Makrophagen-Zelllinien abstammen. Möglicherweise repräsentieren sie Zwischenstufen verschiedener histiozytärer und dendritischer Zellen. Das CCH könnte daher eine proliferative Hauterkrankung darstellen, die auf einer - durch einen bislang unbekanntem Stimulus induzierten - dermalen Invasion und lokalen Proliferation von vom Knochenmark abstammenden Makrophagen beruht. Dabei wird diese Erkrankung begleitet von der Entwicklung funktionaler Charakteristika von Langerhans-Zellen innerhalb der Haut und Unterhaut. Trotz umfassender Untersuchungen bleiben bislang zahlreiche Fragen sowohl der kausalen wie auch der formalen Pathogenese ungeklärt.

## **2.2 Immunsystem**

Die körpereigene Abwehr verfügt grundsätzlich über drei miteinander agierende Mechanismen: eine physikalische Barriere (wie die Haut), die unspezifische, angeborene Immunabwehr und die spezifische, erworbene Immunabwehr. Interaktionen zwischen dem unspezifischen und dem spezifischen Immunsystem sind unabdingbar für eine erfolgreiche körpereigene Abwehr. So spielen Zellen des MPS (Johnston, 1988) einerseits bei der unspezifischen Abwehr, aufgrund ihrer Fähigkeit, fremde oder geschädigte Zellen aufzunehmen und zu zerstören, eine wichtige Rolle. Andererseits sind sie in unterschiedlichem Maße in der Lage, fremde Antigene so genannten Antigen-sensitiven-Zellen (T-Helfer-Zellen, zytotoxische-T-Zellen, B-Zellen) zu präsentieren und dadurch wichtige Funktionen im Ablauf der spezifischen Immunabwehr wahrzunehmen. Die eigentliche erworbene Immunantwort wird dann von Lymphozyten organisiert. Sie besitzen Antigen-Rezeptoren, können präsentierte Antigene erkennen und eine spezifische Abwehr einleiten.

## 2.2.1 Unspezifische Immunabwehr

### 2.2.1.1 Makrophagen

Im Idealfall wird jeder eindringende Organismus nach Überwindung der physikalischen Barriere augenblicklich abgefangen und angegriffen, so dass er schnell zerstört werden kann. Für diesen Prozess sind Zellen verantwortlich, die fremde Partikel binden, verdauen und zerstören können (Phagozytose). Die phagozytierenden Zellen der Säugetiere gehören grundsätzlich zu zwei sich ergänzenden Systemen – dem myeloiden System (polymorphkernige Granulozyten) und dem MPS. Zellen, deren Hauptfunktion in der Beseitigung fremder Partikel und Zelltrümmer besteht, die eine ähnliche Morphologie sowie gemeinsame Abstammung aufweisen, werden als Makrophagen bezeichnet. Sie besitzen einen einzelnen, runden Zellkern und eine ausgeprägte Phagozytose-Fähigkeit (mononukleäre Phagozyten). Vorläuferzellen der Makrophagen sind myeloide Stammzellen, die sich von Promonozyten zu Monozyten entwickeln und als solche ins Blut wandern. Erst nach Einwanderung in unterschiedliche Gewebe entwickeln sie sich zu reifen Makrophagen, die je nach Art des Gewebes in Funktion und Morphologie leicht variieren. Sie gehören alle zum MMS und bilden eine gemeinsame Untergruppe des MPS (Johnston, 1988). Die Nomenklatur der verschiedenen Makrophagen-Typen richtet sich vor allem nach der Gewebeart, in der sie auftreten:

Bindegewebe	<b>Histiozyten</b>
Leber	Kupffer-Zellen
Gehirn	Mikrogliazellen
Lungenalveoli	Alveolar-Makrophagen
Lungenkapillare	pulmonäre, intravaskuläre Makrophagen
Knochen	Osteoklasten
Milz	Makrophagen
Knochenmark	Makrophagen
Lymphknoten	Makrophagen

Neben einer anhaltenden Phagozytose-Aktivität verstärken Makrophagen eine Immunantwort durch Sekretion zahlreicher Proteine wie Zytokine (IL 1, 6, 13, 18; TNF- $\alpha$ ), Enzyme (Lysozym, Proteasen etc.) und Komplementfaktoren (C 2, 3, 4, 5 etc.). Zusätzlich kontrollieren sie Entzündungsreaktionen, beteiligen sich an der Wundheilung und sind in der Lage, Antigene zu präsentieren (Brown, 1995). Darüber hinaus sezernieren aktivierte Makrophagen eine induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) und produzieren damit große Mengen Stickstoffmonoxid (NO), das auch eine direkte Tumorzelllyse ermöglicht.

### 2.2.1.2 Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex

Im Verlauf einer erworbenen Immunantwort werden selektierte und aufbereitete Anteile eindringender bzw. fremder Organismen Antigen-sensitiven-Zellen des Immunsystems präsentiert. Eine solche Antigen-Präsentation beinhaltet das Aufbrechen fremder Antigene in Fragmente und Platzieren dieser Fragmente an Bindungsstellen spezialisierter Zell-Oberflächen-Rezeptoren (Watts, 1997). Diese Rezeptoren sind so genannte Antigen-präsentierende-Moleküle bzw. Histokompatibilitäts-Moleküle, die aus zahlreichen unterschiedlichen Glykoproteinen bestehen und von einem als Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex: MHC) bezeichneten Genkomplex kodiert werden. Die MHC-Rezeptoren bestimmen, welche Antigene aufbereitet und präsentiert werden. Der MHC-Komplex liefert daher die genetischen Hauptkomponenten, die zu Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber infektiösen oder autoimmunen Erkrankungen führen. Jeder dieser Komplexe umfasst drei Klassen von Genorten: MHC class I, MHC class II und MHC class III; lediglich Anzahl und Verteilung der Genorte variieren bei den unterschiedlichen Spezies. MHC-II-Gene kodieren polymorphe Proteine an der Oberfläche Antigen-präsentierender-Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen), die in der Lage sind, Antigenfragmente zu binden, diese T-Helfer-Zellen zu präsentieren und entsprechend effektiv eine Immunantwort zu regulieren.

Bei Hund, Katze, Pferd, Schwein und Nerz finden sich MHC-II-Moleküle neben Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen auch auf adulten T-Zellen (Tizard und Schubot, 2000). Die Expression dieser Moleküle an Zelloberflächen ist erhöht bei sich schnell teilenden Zellen und solchen, die mit Interferon behandelt wurden. Die Bindungsstelle für antigene Peptide wird von den extrazellulären Anteilen zweier Proteinketten ( $\alpha_1$  und  $\beta_1$ ) in Form einer variablen Schleife gebildet. Die Form dieser Schleife bestimmt, welche Peptid-Fragmente gebunden und den Antigen-sensitiven-Zellen präsentiert werden können, und damit die Fähigkeit eines Lebewesens, auf ein spezifisches Epitop zu reagieren. Die Variabilität der Proteinketten resultiert aus Mechanismen wie Punktmutation, reziproker Rekombination und Konversion (MHC-Gene zeigen die höchste Mutationsrate aller Keimzellen, die bislang untersucht wurden). Die Effizienz der Antigenbindung durch MHC-Moleküle ist der limitierende Faktor für die Resistenz gegenüber Erkrankungen. Mit zunehmender Anzahl unterschiedlicher MHC-Moleküle in einem Individuum können entsprechend mehr Peptide gebunden und ef-

fektivere Immunantworten vermittelt werden. Allerdings steigt damit auch die Gefahr, dass mehr körpereigene Antigene gebunden werden.

### **2.2.1.3 Antigen-präsentierende-Zellen (APC) / Langerhans-Zellen**

Man unterscheidet drei Hauptgruppen von APCs. Im Gegensatz zu Makrophagen und B-Zellen, die ebenfalls eine Rolle bei der Antigenpräsentation spielen, ist eine Gruppe mononukleärer Zellen, die so genannten dendritischen Zellen, vor allem auf diese Funktion spezialisiert. Sie bildet somit die effektivste Gruppe der APCs (Banchereau und Steinman, 1998). Dendritische Zellen kommen in allen Geweben außer dem Gehirn, Teilen des Auges und den Hoden vor. Sie bestehen aus einer gemischten Population und stammen letztendlich von drei verschiedenen Quellen ab (Hart, 1997; Stingl et al., 1980):

1. von myeloiden Vorläuferzellen wie Granulozyten und Makrophagen: die entsprechenden Zellen werden als myeloid-dendritische-Zellen bezeichnet und unterteilen sich in epidermale und interstitiale dendritische Zellen. Sie unterscheiden sich in ihren Oberflächenmarkern, dem Profil der Zytokinexpression und darin, welche Lymphozyten stimuliert werden.
2. von Monozyten des Blutes: Monozyten sind der gemeinsame Vorläufer von Makrophagen und dendritischen Zellen. Welcher Zell-Typ sich entwickelt, hängt von den Zytokinen (Wachstumsfaktoren) ab, die während der Reifung auf die Zellen einwirken. Beide Zellformen haben die Fähigkeit, sich noch bei weit fortgeschrittener Differenzierung zur jeweils anderen zu entwickeln.
3. von lymphozytären Vorläufern: bislang nur bei der Maus beobachtet.

Aufgrund ihrer Morphologie, der überwiegend gleichen Abstammung und ihrer Fähigkeit zur Phagozytose werden die dendritischen Zellen grundsätzlich auch dem MPS zugeordnet. Sie besitzen lange, dünne zytoplasmatische Fortsätze (Dendriten), lobuläre Zellkerne und klares Zytoplasma. Sie exprimieren MHC-I und MHC-II (Hamada et al., 1992) und - nach ihrer Reifung - zahlreiche weitere Moleküle, die mit Bindung und Co-Stimulation von T-Zellen assoziiert sind (Steinman, 1991). Langerhans-Zellen sind noch nicht voll entwickelte dendritische Zellen in der Epidermis der Haut. Sie fangen und verarbeiten Antigene, die die Haut penetrieren. Als Folge beeinflussen sie entscheidend die Ausbildung von Haut- bzw. Kontaktallergien. Diese noch unreifen dendritischen Zellen können keine T-Zellen stimulieren, da ihnen

noch notwendige co-stimulierende Moleküle fehlen und sie nur eine geringe Anzahl von MHC-Molekülen exprimieren. Ihre Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen ist dagegen besonders ausgeprägt (Katz et al., 1985). Ihre Funktion besteht also vor allem in der Aufnahme und Aufbereitung von auch geringen Antigenmengen. Ein Aufeinandertreffen von diesen unreifen Zellen mit T-Zellen induziert jedoch Veränderungen in der Zellmorphologie und den Funktionen. Unter anderem wird dabei MHC-II vom Inneren der Zelle an die Zelloberfläche transportiert und damit die Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung gesteigert (Katz et al., 1985; Metlay et al., 1989). Die beim Menschen elektronenmikroskopisch nachweisbaren, charakteristischen Birbeck-Granula (Birbeck et al., 1961) im Zytoplasma der Langerhans-Zellen dienen inzwischen auch bei zahlreichen Tierarten als eindeutiger ultrastruktureller Marker zur Identifikation dieser Zellen. Unterschiedliche Studien wiesen die Birbeck-Granula unter anderem bei Rind (Khalil et al., 1982), Schwein (Romano und Balaguer, 1991), Pferd (Hamada et al., 1992), Katze (Kramer et al., 1996) und Huhn (Pérez-Torres und Ustarroz-Cano, 2001) nach. Moore und Mariassy (1986) konnten in einer Studie von dendritischen Zellen in der gesunden Haut des Hundes hingegen keine entsprechende Struktur finden.

## **2.2.2 Spezifisches Immunsystem / Lymphozyten**

Die außerordentlich langlebigen und häufig rezirkulierenden Lymphozyten sind die Schlüsselzellen im immunologischen Geschehen. Nach Antigenkontakt antwortet das Immunsystem auf zwei gleichzeitig ablaufende Arten: Man unterscheidet allgemein eine zelluläre (T-Zell-System) und eine humorale (B-Zell-System) Immunantwort. B- und T-Lymphozyten besitzen eine sehr ähnliche Zellstruktur und können meist nur aufgrund charakteristischer Zelloberflächen-Proteine (Immuno-Phenotyp) unterschieden werden.

### **2.2.2.1 Das T-Zell-System**

T-Lymphozyten sind für die zellvermittelte bzw. zelluläre Immunabwehr verantwortlich. Aus lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich Vorläufer-T-Zellen, die im Thymus zu T-Zellen reifen. Diese wandeln sich nach Antigenkontakt zu T-Lymphoblasten, die sich wiederum zu T-Helfer-Zellen, zytotoxischen-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen differenzieren. Alle T-Zellen besitzen das CD3-Antigen und so genannte T-Zell-Rezeptoren

(TCR), bestehend aus zwei Antigen-bindenden-Peptidketten, die mit zahlreichen zusätzlichen Glykoproteinen assoziiert sind. Die Art der verknüpften Glykoproteine bestimmt maßgeblich die Entwicklung und Funktion der T-Zell-Subpopulationen.

#### **2.2.2.1.1 T-Helfer-Zellen**

T-Helfer-Zellen (Th) besitzen neben den T-Zell-Rezeptoren und dem CD3-Antigen noch das CD4-Antigen, das in der Lage ist, die MHC-II-Moleküle von APCs zu binden. Die Kombination von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und APCs ist neben weiteren co-stimulierenden Faktoren ausschlaggebend für die Aktivierung der zellulären Immunantwort nach Antigenkontakt (Parnes, 1990). Durch die Bildung zahlreicher Zytokine beeinflussen die T-Helfer-Zellen auch noch weitere Komponenten der Immunabwehr. So fördern sie durch Anlocken und Aktivieren von Makrophagen und eosinophilen Granulozyten zusätzlich die unspezifische Zerstörung von Tumorzellen. Darüber hinaus sind sie in der Lage, B-Lymphozyten und damit die Bildung von Antikörpern zu aktivieren. Abhängig von der Art der freigesetzten Zytokine unterscheidet man vor allem Th1- und Th2-Zelltypen (Hung et al., 1998). Th1-assoziierte-Zytokine sind vor allem Interleukin-2 (IL-2) und Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), die sowohl die Entzündungsreaktion fördern als auch die Differenzierung und Proliferation der zytotoxischen-T-Zellen regulieren. IL-2-Zytokine werden zum Teil erfolgreich in der Immuntherapie eingesetzt (Rosenberg, 2001). Th2-Zellen bilden dagegen unter anderem IL-4, das die Proliferation und Aktivierung der B-Zellen beeinflusst.

#### **2.2.2.1.2 Zytotoxische-T-Zellen**

Anstelle des CD4-Antigens besitzen zytotoxische-T-Zellen das CD8-Antigen. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigene, wenn diese in Verbindung mit MHC-I-Molekülen an ihren TCR-Komplex binden (Parnes, 1990). Für eine Aktivierung ist ein kompliziertes Zusammenspiel der zytotoxischen-T-Zellen mit APCs und T-Helfer-Zellen notwendig. Die T-Helfer-Zellen aktivieren die APCs, steigern ihre MHC-Expression und stimulieren die Produktion von Zytokinen (wie IL-12). Sie fördern darüber hinaus mit Hilfe von IL-2 und IFN $\gamma$  direkt die Produktion und Differenzierung der zytotoxischen-T-Zellen. Im aktivierten Zustand sind die zytotoxischen-T-Zellen in der Lage, fremde oder defekte Zellen, wie virusinfizierte Zellen oder

Tumorzellen, durch Freisetzung löslicher zytolytischer Substanzen (Perforin, Granzym) zu zerstören. Darüber hinaus können sie durch verschiedene direkte Rezeptor/Liganden-Interaktionen den so genannten programmierten Zelltod auslösen. Die dabei auftretenden charakteristischen Zellveränderungen werden als Apoptose bezeichnet und unterscheiden sich von Nekrosen oder pathologischen Zellzerstörungen (Tizard und Schubot, 2000b).

#### **2.2.2.2 Das B-Zell-System**

B-Lymphozyten entwickeln sich ebenfalls aus lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks. Ihre Reifung vollzieht sich allerdings entweder bereits im Knochenmark oder in den Peyerschen Platten des Dünndarms. Nur beim Vogel reifen die B-Lymphozyten stattdessen in der Bursa fabricii. Nach dieser Entwicklung wandern die B-Zellen in die sekundären Lymphorgane aus. Nur ein geringer Teil (5-10%) der Zellen zirkuliert im Blut. Unter Einfluss verschiedener Stimuli können sich die B-Lymphozyten zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen weiter differenzieren (Berek und Ziegner, 1993). Neben ihrer Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, sind sie die einzige Zellgruppe, die in der Lage ist, Antikörper zu produzieren. Die daraus resultierende Antikörper-vermittelte-Abwehr bildet die Grundlage des humoralen Immunsystems (Myers, 1991). Ähnlich dem TCR der T-Lymphozyten besitzen auch die B-Lymphozyten einen speziellen Rezeptor, den BCR, bestehend aus zahlreichen unterschiedlichen Proteinketten (wie  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  oder  $\delta$ ). Jede Zelle wird von 200.000-500.000 identischer BCRs bedeckt (Pleiman et al., 1994). Diese Antigenrezeptoren sind neben ihrer Fähigkeit, spezifische Antigene zu binden und eine B-Zell-Antwort zu induzieren, auch in der Lage, die Aufnahme fremder Partikel in die Zelle zu fördern. Diese Endozytose führt zum Aufbrechen der Antigene und dem anschließenden Exprimieren der Peptidfragmente an MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche (Antigen-Präsentation). Die BCRs finden sich nicht nur an der Oberfläche von B-Lymphozyten, sondern werden nach entsprechender Stimulierung auch ins Blut und andere Gewebsflüssigkeiten abgegeben. Sie sind in gelöster Form weiterhin fähig, Antigene zu binden, und bilden damit die eigentlichen Antikörper, die allgemein zur Gruppe der Immunglobuline gehören. B-Lymphozyten benötigen nach Antigenbindung T-Helfer-Zellen zur Ausbildung einer spezifischen Immunantwort. Die zahlreichen Zytokine dieser T-Zellen induzieren Wachstum und Teilung der B-Zellen sowie ihre Differenzierung zu Plasmazellen, die in der Lage sind, extrem große Mengen von Antikörpern zu synthetisieren (Finkelman et al., 1992).

### **2.3 Proliferationsindex**

Die Zellvermehrung bzw. Proliferation von Zellen kann unter anderem als Proliferationsrate angegeben werden. Dabei wird bestimmt, wie hoch der Anteil mitotisch aktiver Zellen ist. Der prozentuale Anteil sich teilender Zellen in einer definierten Zellpopulation wird als Proliferationsindex oder Wachstumsfraktion bezeichnet (Broll et al., 1998; Gerdes et al., 1984; Roels et al., 1999). Die Immunhistochemie liefert eine sichere Methode, um diese Zellproliferation zu bestimmen, indem zellzyklusassoziierte Veränderungen - bezüglich Menge und Verteilung bestimmter Antigene - markiert werden. Diese Antigene können im Kern, im Zytoplasma oder in der Zellmembran lokalisiert und mit allen oder nur bestimmten Phasen des Zellzyklus assoziiert sein (Hall und Woods, 1990). Die Bestimmung der proliferativen Aktivität von Tumoren mit Hilfe von Antikörpern gegen zellzyklusassoziierte Antigene ist in der Humanmedizin bereits weit verbreitet (Broll et al., 1998; Dierendonck et al., 1991; Matsumoto et al., 1999). Dabei hat sich gezeigt, dass die Proliferationsrate häufig das biologische Verhalten von Tumoren widerspiegelt: Metastasierungstendenz, Rezidivneigung und Mortalität korrelieren mit erhöhter mitotischer Aktivität der Tumorzellen (Roels et al., 1999; Sarli et al., 1994). Auch in der Veterinärmedizin wurden zahlreiche Tumorarten in Hinblick auf ihre Wachstumsaktivität untersucht und überprüft, ob die Proliferation als möglicher prognostischer oder diagnostischer Faktor zu nutzen ist (Griffey et al., 1999; Martin de las Mulas et al., 1999; Roels et al., 1999; Sarli et al., 1994).

### **2.4 Tumorregression**

Bereits in frühen Studien (Kelly, 1970; Stannard und Pulley, 1978; Taylor et al., 1969) wurden Lymphozyten-Infiltrate als charakteristische Komponenten des CCH angesehen und mit der Selbstheilungstendenz dieser Tumorart in Verbindung gebracht. Von Cockerell und Slau-son (1979) wurde erstmals die Regression und ihre Auswirkung auf das histologische Bild des Histiocytems näher bestimmt. Sie untersuchten an 93 routinemäßig Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Histiocyten die Anzahl (semiquantitativ bestimmte relative Menge) und das Verteilungsmuster der Lymphozyten und teilten die Tumore anhand dessen in vier Gruppen ein (Tabelle 3, S.15). Ziel war es, dieses Schema mit dem Verlauf der Tumorentwicklung und der damit einhergehenden Regression des kaninen Histiocytems in Verbindung zu setzen.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung nach Cockerell und Slauson (1979)

Gruppe	relative Lymphozytenmenge	Verteilungsmuster	Tumorentwicklung
<b>I</b>	minimal bis abwesend	diffus verteilt in der Peripherie, am Übergang zur gesunden Haut	zahlreiche Mitosen (2-5 pro Gesichtsfeld); keine Nekrosen; 12% dieser Tumore sind ulzeriert; gleichförmige Tumorzellen mit rundem bis ovalem Zellkern, vereinzelt Nukleoli
<b>II</b>	mäßig	Aggregate in der Peripherie mit geringen, sich ins Tumorzentrum diffus ausbreitenden Komponenten	multifokale Nekroseareale an den Tumorrändern umgeben von Lymphozyten; 81% dieser Tumore zeigen Ulzeration; Morphologie der Tumorzellen wie bei <b>I</b>
<b>III</b>	deutlich	Aggregate sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum	Nekrosen in Verbindung mit Lymphozyten auch in zentraleren Bereichen; 84% der Tumore sind ulzeriert; vermehrt Nukleoli, Zellkerne schwach anfärbbar, vakuolisiertes Zytoplasma
<b>IV</b>	mehr Lymphozyten als Histiocyten	Aggregate von den tiefen Rändern bis hin zum Epithel	zahlreiche große Nekroseareale, geringe Tumorzellichte; 100% der Tumore mit Ulzeration; Histiocyten wie bei <b>III</b> , zusätzlich „multinucleated cells“

In nachfolgenden Studien wurde vermutet, dass es sich bei den infiltrierenden Lymphozyten überwiegend um CD3<sup>+</sup> (Kipar et al., 1998) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen handelt (Marchal et al., 1995b; Moore et al., 1996). Moore et al. (1996) stellten darüber hinaus weitergehende Vermutungen über Entstehung und Fortschreiten der Regression an. So sollen Anzeichen einer Rückbildung üblicherweise bei erst wenigen Wochen alten Läsionen auftreten und eine T-Zell-vermittelte-Reaktion darstellen. Eine solche Reaktion benötigt jedoch weitere co-stimulierende Faktoren. Sie favorisierten dabei zwei unterschiedliche Hypothesen der T-Zell-Aktivierung: Einerseits könnte die Einwanderung von Tumor-Histiocyten in Lymphknoten ortständige APCs und CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen aktivieren, die wiederum über exogenes IL-2 bei der T-Lymphozyten-Aktivierung mitwirken. Andererseits wäre es denkbar, dass die Histiocyten eine lokale Differenzierung durchlaufen, in deren Folge sich co-stimulierende Moleküle der B7-Familie vermehren, die CD8<sup>+</sup> zytotoxische-T-Zellen direkt aktivieren und somit die Histiocyten ihre eigene Zerstörung vermitteln. Kipar et al. (1998) stellten hingegen anhand einer Studie mit 45 Histiocytyomen einen Zusammenhang zwischen einem vermehrten Auftreten des MHC-II-Antigens an der Zelloberfläche der Histiocyten und dem Beginn und Fortschreiten der Tumorregression fest. Als Marker Antigen-präsentierender-Zellen könnte MHC-II einen ausschlaggebenden Faktor für das Vorbereiten und Aktivieren der T-Zellen spielen. Kaim (2003) stellte darüber hinaus neben einer vermehrten T- und B-Lymphozytenzahl auch einen signifikanten Anstieg von Makrophagen im Verlauf der Regression fest. Sie bemerkte

zusätzlich einen signifikanten Anstieg von Zytokinen (IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) und iNOS. Diese pro-inflammatorischen Substanzen fördern unter anderem die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen, die Migration von Effektorzellen ins Tumorgewebe und die Zellyse. Sie stellen damit vermutlich weitere wichtige co-stimulierende Faktoren für die Entwicklung der Tumorregression dar. Der exakte Mechanismus des Anlockens und Aktivierens von T-Zellen durch die Tumorzellen und die Natur des präsentierten Antigens sind jedoch weiterhin unbekannt.

## **2.5 Antigene und Antikörper**

### **2.5.1 Einleitung**

Alle Zellen besitzen Oberflächen-Antigene und -Antigenrezeptoren, die grundsätzlich eine Charakterisierung des Zelltyps ermöglichen. Antikörper binden an einen Bereich der Antigene, der als Epitop bezeichnet wird. Epitope können an zahlreiche Strukturen geknüpft und unter anderem auch durch die dreidimensionale Struktur eines Proteins bestimmt sein. Abweichungen der Reaktivität von Antikörpern mit ihren Epitopen können daher durch die Veränderung der räumlichen Struktur der Antigene - wie beispielsweise durch den Verlust von Disulfidbrücken infolge einer Denaturierung - verursacht werden (Roitt, 1993). Man unterscheidet allgemein so genannte monoklonale und polyklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Lymphozyten gebildet und sind daher immunchemisch nicht identisch; sie reagieren infolgedessen auch mit verschiedenen Epitopen des Antigens, gegen das sie gebildet wurden. Monoklonale Antikörper werden hingegen von Plasmazellklonen gebildet. Die Antikörper des jeweiligen Klons sind immunchemisch identisch und reagieren mit nur einem spezifischen Epitop des Antigens (Boenisch, 1989). Es gibt eine Zusammenstellung WHO-standardisierter Antikörper zur Erkennung definierter Oberflächen-Antigene auf immuninvolvierten Zellen, den so genannten „cluster of differentiation“ (CD). Die entsprechenden Antigene erhalten das Präfix `CD`. Antikörper, die gegen die Leukozyten-Differenzierungs-Antigene des Hundes gerichtet sind, wurden erstmals auf dem „First International Leucocyte Antigen Workshop“ (CLAW) wenn möglich der entsprechenden CD-Nomenklatur zugeordnet (Cobbold und Metcalfe, 1994).

### 2.5.2 CD3, CD4 und CD8

Das CD3-Antigen besteht aus mindestens drei miteinander verknüpften Proteinketten, der CD3- $\gamma$ , der CD3- $\delta$  sowie der CD3- $\epsilon$ -Kette. Diese drei Ketten sind mit dem TCR assoziiert und spielen eine Rolle in der Signalinduktion vom TCR zu intrazytoplasmatischen Komponenten (Dongen et al., 1988; Dongen et al., 1987). Es lassen sich zwei Formen von TCR unterscheiden, die analog zu der Struktur der Immunglobuline aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ - bzw. aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Glykoproteinkette aufgebaut sind (Thome et al., 1994). Das CD3-Antigen ist auf allen T-Lymphozyten zu finden. Mason et al. (1989) etablierten beim Menschen einen im Kaninchen hergestellten, polyklonalen Antikörper, der gegen eine intrazytoplasmatisch gelegene Domäne der CD3- $\epsilon$ -Kette gerichtet ist. Die Epitope dieser Aminosäuresequenz sind einer Denaturierung gegenüber resistent und können daher in formalinfixiertem, paraffineingebetteten Gewebe erkannt werden. Ferrer et al. (1992) gelang es später, das CD3-Antigen mit Hilfe dieses Antikörpers auch im formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebe des Hundes zu identifizieren.

Das CD4-Antigen besteht aus einer einzelnen Glykoproteinkette von 55-kDa und findet sich im Gegensatz zum CD3-Antigen nur auf den T-Helfer-Zellen. CD4 fungiert als Rezeptor für MHC-II-Moleküle und ist zusätzlich noch auf Monozyten, Makrophagen und teilweise Granulozyten nachweisbar. Das CD8-Antigen, das sich hingegen nur auf zytotoxischen-T-Zellen feststellen lässt, besteht aus zwei Glykoproteinketten mit jeweils 32-kDa und dient als Rezeptor für MHC-I-Moleküle (Saalmüller und Bryant, 1994). Sowohl das CD4- als auch das CD8-Antigen ließen sich bislang mit kommerziell erhältlichen Antikörpern nur am Gefrierschnitt nachweisen.

### 2.5.3 CD79 $\alpha$

Sakaguchi et al. (1988) wiesen immunglobulin-assoziierte-Moleküle auf B-Lymphozyten nach, als sie die Nukleotid-Sequenz eines Gens aus der cDNA von Mäusen (mb-1) beschrieben und gleichzeitig einen cDNA-Abschnitt des Menschen isolierten, welcher eine enge Homologie (ca. 90%) zu den Mäusegenen aufwies. Die von diesem Gen kodierte Aminosäuresequenz des mb-1-Proteins zeigte strukturelle Ähnlichkeiten zu den CD3- $\gamma$ ,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Ketten, aber keine Sequenz-Homologie (Sakaguchi et al., 1988). Auf dem „Fifth International Work-

shop on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ (LAWS) wurde ein durch Disulfidgruppen verbundenes Heterodimer, das mit Membran-gebundenem IgM von B-Lymphozyten assoziiert ist, als CD79 bezeichnet (Boston 1993). Dieses CD79-Dimer besteht aus zwei Polypeptiden – einem vom mb-1-Gen kodierten 34-kDa-Protein (IgM- $\alpha$ ) und einem vom so genannten B29-Gen kodierten 39-kDa-Protein (Ig- $\beta$ ) (Hombach et al., 1990; Noesel et al., 1991). Das mb-1-Protein wurde als CD79a und das B29-Protein als CD79b bezeichnet (Mason et al., 1995). Diese Komponenten bilden den „B-Cell-Antigen-Receptor-Complex“ (vergleichbar den TCR-assoziierten CD3-Komponenten auf T-Lymphozyten), der möglicherweise die Expression von IgM auf der Zelloberfläche kontrolliert und eine Rolle bei der Signal-Transduktion nach Antigen-Bindung spielt (Mason et al., 1991). Der monoklonale Antikörper HM57 identifiziert das CD79a-Antigen auf B-Lymphozyten zahlreicher Säugertierspezies und zeigt damit eine breite Kreuzreaktivität (Jones et al., 1993; Mason et al., 1991). Er kann unter anderem auch am formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebe des Hundes eingesetzt werden (Cangul et al., 1998; Milner et al., 1996; Schulden et al., 1998). Der HM57 reagiert dabei mit dem intrazytoplasmatisch gelegenen C-Terminalen-Ende des mb-1-Proteins (CD79a).

#### **2.5.4 MIB1**

Das Ki-67-Antigen ist ein Epitop auf einem Kernprotein, welches definiert ist durch sein Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper vom Ki-67-Klon (Gerdes et al., 1984), und das vermutlich eine Komponente der Kernmatrix (Sawhney und Hall, 1992) bildet. Die Primärstruktur des Proteins wurde von Gerdes et al. (1991) nach Klonen und Sequenzierung der ursprünglichen cDNA entschlüsselt. Das proliferationsassoziierte Ki-67-Antigen ist während aller Phasen des aktiven Zellzyklus nachweisbar, d.h. in der G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und Mitose-Phase; nur in der G<sub>0</sub>-Phase ruhender Zellen wird es nicht exprimiert (Gerdes et al., 1984). Im Verlauf der Interphase kann das Antigen ausschließlich innerhalb des Zellkerns gefunden werden, wohingegen ein Teil des Proteins während der Mitose an die Zelloberfläche wandert. Das Antigen besitzt eine sehr geringe Halbwertszeit und zerfällt mit Abschluss des Zellzyklus in weniger als einer Stunde (Bruno und Darzynkiewicz, 1992). Außerdem scheint es keine Ki-67-Exprimierung während der DNA-Reparatur-Prozesse zu geben (Scholzen und Gerdes, 2000). Dieses Antigen ist außer beim Menschen auch bei Rind, Schaf, Kaninchen, Ratte und Hund nachweisbar (Falini et al., 1989).

Der monoklonale Antikörper MIB-1 reagiert mit nativen Ki-67-Antigenen ebenso wie mit rekombinanten Fragmenten der Ki-67-Moleküle (Gerdes et al., 1992; Key et al., 1993). Er kann zur Darstellung des proliferationsassoziierten Antigens im Gegensatz zum früheren Ki-67-Antikörper auch am Paraffinschnitt bei Mensch und Hund eingesetzt werden (Cattoretti et al., 1992; Jösten et al., 1993; Sarli et al., 1994; Sawhney und Hall, 1992).

## **2.6 Prinzipien der Immunfärbung**

### **2.6.1 Immunhistochemie**

#### **2.6.1.1 Einleitung**

Die Immunhistochemie bildet eine außerordentlich wichtige Ergänzung üblicher histologischer Untersuchungstechniken im Rahmen der Tumordiagnostik (Baumal et al., 1984). Das Prinzip besteht darin, mit Hilfe von Antikörpern gewebliche oder zelluläre Antigene unterschiedlichen Ursprungs sichtbar zu machen. Die Darstellung einer solchen Reaktion erfolgt mit Hilfe verschiedener Marker, die direkt oder indirekt die Antigene über die eingesetzten Antikörper „anfärben“.

Bei der direkten Technik ist der Antikörper (Primärantikörper), der spezifisch gegen das zu suchende Antigen gerichtet ist, direkt mit einem Marker - meist Enzyme wie Peroxidase oder alkalische Phosphatase - verbunden (konjugiert oder gelabelt), der nach der Antigen-Antikörper-Reaktion dargestellt werden kann.

Für die indirekten Techniken werden unkonjugierte Primärantikörper in einem oder mehreren Schritten mit sekundären oder tertiären konjugierten Antikörpern verknüpft. Da sich mehrere Sekundär- oder Tertiärantikörper an den Primärantikörper binden können, entsteht eine verstärkte Reaktion. So können auch geringe Antigenmengen deutlich sichtbar gemacht werden. Die bekanntesten indirekten Techniken sind die Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-, die alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (APAAP)- und die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode (Falini und Taylor, 1983; Hsu et al., 1981). Auch das etwas neuere Biotin-Streptavidin Amplifikations (B-SA)-Nachweissystem findet zunehmend Verwendung.

### 2.6.1.2 Das Biotin-Streptavidin Amplifikations (B-SA)-Nachweissystem

Die B-SA-Methode repräsentiert eine modifizierte, indirekte Dreischritt-Technik, bei der ein biotinylierter Sekundärantikörper als Brücke zwischen dem Primärantikörper und einem mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten Streptavidin-Komplex fungiert. Der biotinylierte Brückenantikörper, ein so genannter Multi-Link-Antikörper, ist ein IgG, das gegen Maus-, Kaninchen-, Meerschweinchen- und Ratten-Antikörper gebildet wird. Dadurch kann beim Einsatz von in diesen Tierarten hergestellten monoklonalen und polyklonalen Primärantikörpern auf einen zusätzlichen Färbeschritt, die „Mausifikation“, verzichtet werden. Grundlage des B-SA-Nachweissystems bildet die außergewöhnlich hohe Affinität und Bindungsstabilität zwischen Streptavidin (Chaiet und Wolf, 1964) und dem Vitamin Biotin (Hsu et al., 1981). Das Streptavidin, ein Avidinanalogen aus *Streptomyces avidinii*, enthält im Gegensatz zu seinem Vorläufer Avidin keine Kohlenhydratreste, die mit lektinartigen Substanzen von Mastzellen, Nervenfasern, Leber-, Pankreas- und Nierengewebe reagieren können und dadurch zu unspezifischen Bindungen und nachfolgend falsch positiven Ergebnissen führen (Woods und Warnke, 1981). Ebenso wie Avidin besitzt Streptavidin vier Bindungsstellen für Biotin. Das Biotin wiederum kann an eine Reihe von Substanzen wie Immunglobuline, Lektine, Nukleinsäuren oder Hormone geknüpft werden. Im Falle der B-SA-Technik ist das Biotin mit dem FC-Rezeptor der Brückenantikörper konjugiert, der seinerseits so modifiziert ist, dass die Bindung mehrerer Biotinmoleküle ohne Beeinflussung der Bindungsaffinität möglich wird. Nachfolgend kann sich der Streptavidin-AP-Komplex an die so biotinylierten Antikörper anlagern, und die AP kann nach Zugabe eines entsprechenden Chromogens durch Katalysation einer Farbreaktion diese Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar machen. Durch die direkte Konjugation der AP mit dem Streptavidin entsteht eine hochstabile Reagenz, die über längere Zeit haltbar ist. Im Gegensatz zum ABC-Komplex, der unmittelbar vor Gebrauch zubereitet werden muss, entfällt dadurch ein weiterer Arbeitsschritt. Für eine maximale Empfindlichkeit bei geringer unspezifischer Färbung wird die AP der Peroxidase als Labelenzym vorgezogen, da sich die endogene AP-Aktivität durch Zugabe von beispielsweise Levamisol, Essigsäure oder Perjodat ohne Beeinflussung der als Marker verwendeten AP aus Kälberserum blockieren lässt (Mason und Sammons, 1978).

Die Kombination dieser Modifikationen bedeutet eine verbesserte Sensitivität (Verringerung der Antikörpermenge) bei gleichzeitig geringerer unspezifischer Reaktion im Vergleich zu allen früheren indirekten Standardverfahren wie der PAP-, APAAP- oder ABC-Methode. Das

B-SA-Nachweissystem vereinfacht und beschleunigt darüber hinaus die immunhistochemische Prozedur bis zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion.

### **2.6.1.3 Die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode**

Die ABC-Methode ist nach wie vor eine häufig eingesetzte indirekte Technik. Wie auch bei der B-SA-Methode wird ein biotinylierter Brückenantikörper (Link-Antikörper) verwendet, der zwischen dem Primärantikörper und einem Komplex aus Avidin und einem biotinyliertem Enzym eine Verbindung herstellt. Das Enzym wird in diesem Fall also nicht direkt an das Avidin konjugiert, sondern über das angelagerte Biotin mit diesem verknüpft. Meist wird als Markerenzym die Meerrettichperoxidase eingesetzt. Da zahlreiche Zellen, wie beispielsweise Mastzellen, Leukozyten, Leberzellen und Erythrozyten, über endogene Peroxidaseaktivität verfügen, muss diese Aktivität zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse durch Inkubation mit 0,3%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol (Straus, 1971) eliminiert werden.

### **2.6.1.4 Entwicklung**

Die Sichtbarmachung der jeweiligen Enzymkomplexe erfolgt über Zugabe unterschiedlicher Substrat-Chromogen-Gemische.

Die alkalische Phosphatase ist in der Lage, Phosphorsäureester unter alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} \geq 8$ ) zu hydrolisieren, indem sie P-O-Bindungen aufbricht (Neumüller, 1973). Daher eignen sich organische Phosphate wie Naphtol Anilid-Säure-phosphate (z.B. Naphtol AS-BI-Phosphat oder Naphtol AS-MX-Phosphat) als Substrate, wobei nach Abspaltung des Phosphatrests das Substrat mit einem Diazoniumsalz (wie Fast-Red und Neufuchsin) zu einem wasserunlöslichen Azofarbstoff gekoppelt wird.

Die Meerrettichperoxidase stammt aus der Gruppe der Oxidoreduktasen mit Hämatin als prosthetischer Gruppe. Das Enzym reagiert mit Wasserstoffperoxid als spezifisches Substrat und bildet mit diesem einen Primärkomplex. Bei Anwesenheit eines Elektronendonors bildet sich ein zweiter Komplex, wobei das Peroxid zu Wasser reduziert wird. Anschließend wird Substrat-unabhängig der Donor oxidiert, die Peroxidase regeneriert und der Komplex dissoziiert.

iert (Sternberger et al., 1970). Als Elektronen-Donoren werden meist Chromogene wie DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) oder AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) verwendet.

### **2.6.2 Kreuzreaktivität**

Als Kreuzreaktivität bezeichnet man allgemein die Fähigkeit eines Antikörpers, mit ähnlichen und sogar unterschiedlichen Epitopen zu reagieren. Dabei können auch identische Epitope auf unterschiedlichen Antikörpermolekülen gemeint sein (Boenisch, 1989). Derartige Reaktionen können zu unerwünschter Hintergrundfärbung führen. Eine Kreuzreaktivität zwischen unterschiedlichen Spezies, bei der beispielsweise gegen Gewebsepitope des Menschen entwickelte Antikörper auch mit den entsprechenden Geweben oder Zellen unterschiedlicher Tierarten reagieren (beispielsweise zahlreiche CD-Antikörper wie CD3, CD20 etc.), ist dagegen häufig erwünscht. Kostspielige Entwicklungen Spezies-spezifischer-Antikörper können so vermieden werden (Darbes et al., 1997).

### **2.6.3 Fixierung und Antigenmaskierung**

Um postmortale Zerfallserscheinungen zu unterbinden (Romeis und Böck, 1989a) und eine dauerhafte Archivierung zu gewährleisten, muss das zu untersuchende Gewebe üblicherweise fixiert werden. Ursprünglich basieren alle immunhistologischen Techniken auf dem Einsatz von Gefrierschnitten, bei denen die Antigenität sowohl an nativen wie auch fixierten Gewebeproben im Vergleich zu formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Material deutlich besser erhalten bleibt. Allerdings werden bei dieser Technik morphologische Strukturen von Zellen und Geweben oftmals erheblich in Mitleidenschaft gezogen (Chromatolyse; Verlust von Zellmembranen), was histologische Untersuchungen erschwert.

Der Vorteil formalinfixierten Gewebes besteht dagegen in der weitgehenden Erhaltung der Sekundärstrukturen (Mason und O'Leary, 1991) und der Möglichkeit, retrospektive Untersuchungen anhand von Archivmaterial durchführen zu können. Das Formalin entfaltet seine konservierende Wirkung hauptsächlich über Reaktionen mit basischen Aminosäuren in Proteinen, in deren Verlauf es zu quervernetzenden Methylenbindungen kommt (Mason und O'Leary, 1991). Dies führt wiederum dazu, dass zahlreiche Epitope von Antikörpern nicht

mehr erkannt werden; dabei gilt, je länger die Einwirkzeit des Formalins, desto schlechter die Immunreaktivität (Leong und Gilham, 1989). Diese „Antigenmaskierung“ ist allerdings zum Teil wieder reversibel, da die Antigene durch die Ausbildung der Methylenbrücken meist nicht zerstört werden, so dass mit Hilfe unterschiedlicher Vorbehandlungen die Antigene für die Antikörper wieder „demaskiert“ werden können.

#### **2.6.4 Antigendemaskierung durch Vorbehandlung**

Die unterschiedlichen Arten der Vorbehandlung zielen darauf ab, „maskierte“ Epitope den Antikörpern wieder zugänglich zu machen. Nach wie vor sind die genauen Mechanismen der Antigenmaskierung ebenso wie die der Demaskierung unbekannt. Neben der Ausbildung von Methylenbrücken infolge der Formalinfixierung werden weitere Komplexbildungen beispielsweise von Kalzium-Ionen oder anderen divalenten Metall-Kationen mit Proteinen für die Maskierung verantwortlich gemacht (Pileri et al., 1997). Allgemein bestimmen nach Cattoretti et al. (1993) Einwirkzeit, Temperatur und Konzentration der Fixativa sowie die Verfügbarkeit nahe gelegener Proteine zur Vernetzung den Grad der Maskierung. Die zahlreichen Vorbehandlungsmethoden müssen daher für den jeweilig verwendeten Antikörper im Hinblick auf das zu untersuchende Gewebe auf ihre Effektivität getestet werden. Man unterscheidet grundsätzlich enzymatische Techniken von so genannten Antigen-Retrieval-Systemen:

##### *Enzymatische Vorbehandlung*

Üblicherweise werden Pepsin, Trypsin oder Pronase zum „Andauen“ eingesetzt. Als Pronasen werden Staphylokokkus-Proteasen bezeichnet, die bevorzugt an der Carboxylseite von Asparat- und Glutamatresten vernetzte Proteine spalten können. Möglicherweise werden bei diesen Vorverdauungen allerdings nur Oberflächen-Protein-Ketten aufgebrochen (Cattoretti et al., 1993).

##### *Antigen-Retrieval-Systeme*

Bei dieser Methode werden die Schnitte beispielsweise mittels Mikrowelle, Autoklav oder Wasserbad in unterschiedlichen „Retrieval“-Lösungen erhitzt. Als Lösungen werden verschiedene (Metall-) Salzlösungen (Zitratpuffer, Tris-HCl, EDTA-NaOH etc.) oder Protein-Denaturantien wie Harnstoff verwendet. Mehrere Studien (Cattoretti et al., 1993; Morgan et al., 1994; Pileri et al., 1997; Shi et al., 1991) konnten nachweisen, dass die Erhitzung in den

unterschiedlichen Puffern die Immunreaktivität in fixiertem Gewebe oftmals wiederherzustellen vermag und gegenüber enzymatischen Verfahren meist erfolgreicher ist. Nach Morgan et al. (1994) könnten hohe Temperaturen die notwendige Energie zur Herauslösung der Kalzium-Ionen und divalenten Metall-Kationen aus den Komplexen mit Gewebsproteinen liefern und somit die Kalzium-Chelatbildung mit den Ionen der verwendeten Pufferlösungen ermöglichen. Die Hitze scheint möglicherweise auch das Polypeptidgrundgerüst anzugreifen, so dass die durch Formalinfixierung entstandenen Vernetzungen gespalten werden. Gleichzeitig wird mit Hilfe der jeweiligen Vorbehandlungs-Lösungen die Tertiärstruktur der Proteine durch Dissoziation der Wasserstoffbindungen geöffnet (Norton et al., 1994). Shi et al. (1995) halten wiederum den pH-Wert der Pufferlösung für einen entscheidenden Co-Faktor zahlreicher Antigene. Ein weiterer Vorteil der nicht-enzymatischen-Antigendemaskierung besteht in der Zerstörung endogener Enzyme, wie beispielsweise der AP durch die Hitzeeinwirkung. Dadurch werden falsch positive Ergebnisse vermieden (Cattoretti et al., 1993). Es gab Versuche, einheitliche Vorbehandlungsschemata für paraffingängige Antikörper zu erstellen, um einer Standardisierung in der Histopathologie näher zu kommen (Pileri et al., 1997). Bis heute konnten jedoch keine solchen Standardisierungen etabliert werden.

### **2.6.5 Kontrollen**

Um falsch positive und falsch negative Ergebnisse auszuschließen, müssen immunologische und methodische Kontrollen bei jedem Färbedurchgang mitgeführt werden (Bourne, 1983). Dabei wird als Positivkontrolle eine gleichartig vorbehandelte Probe verwendet, die das nachzuweisende Antigen sicher enthält, und als Negativkontrolle eine, die das fragliche Antigen sicher nicht enthält. Methodische Kontrollen sollen unerwünschte Kreuzreaktivitäten ausschließen. Um solche falsch positiven Reaktionen festzustellen, kann der Primärantikörper durch ein nicht-immunogenes Serum aus der gleichen Spezies, aus der auch der Primärantikörper stammt, ersetzt werden (Bourne, 1983).