

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE  
PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Aktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in kutanen Leiomyomen und Leiomyosarkomen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Carolin Rebecca Domicela Scherer

2022



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE  
PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Aktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in kutanen Leiomyomen und Leiomyosarkomen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Carolin Rebecca Domicela Scherer

2022

**Dekan:**

**Prof. Dr. Dirk Hellwig**

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sebastian Haferkamp

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sebastian Geis

Tag der mündlichen Prüfung: 17.05.2023

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
1.1 WEICHTEILTUMORE .....	10
1.2 EPIDEMIOLOGIE DER LEIOMYOME.....	10
1.3 HISTOPATHOLOGIE DER KUTANEN LEIOMYOME.....	11
1.4 DIAGNOSTIK DER KUTANEN LEIOMYOME.....	12
1.5 THERAPIE UND PROGNOSE DER KUTANEN LEIOMYOME .....	12
1.6 EPIDEMIOLOGIE DER LEIOMYOSARKOME .....	13
1.7 HISTOPATHOLOGIE DER KUTANEN LEIOMYOSARKOME .....	14
1.8 DIAGNOSTIK DER KUTANEN LEIOMYOSARKOME .....	14
1.9 THERAPIE UND PROGNOSE DER KUTANEN LEIOMYOSARKOME.....	16
1.10 SIGNALWEGE .....	17
1.10.1 Der PI3K-Signalweg .....	18
1.10.2 Der mTOR-Signalweg .....	19
1.11 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....	22
<b>2 MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>23</b>
2.1 MATERIAL.....	23
2.1.1 Gewebeproben.....	23
2.1.2 Geräte und Equipment.....	23
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien .....	24
2.1.4 Software.....	25
2.2 METHODEN .....	26
2.2.1 Anfertigen histologischer Schnitte.....	26
2.2.2 Anfertigen einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	26
2.2.3 Immunhistochemie.....	27
2.2.4 Etablierung der Antikörper .....	31
2.2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	32
2.2.6 Statistik .....	33
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>34</b>
3.1 DEMOGRAPHISCHE UND KLINISCHE CHARAKTERISTIKA DES PATIENTENKOLLEKTIVS .	34

3.1.1	<i>Auswertung demographischer und klinischer Daten des Patientenkollektivs mit Diagnose Leiomyom</i> .....	36
3.1.2	<i>Auswertung demographischer und klinischer Daten des Patientenkollektivs mit Diagnose Leiomyosarkom</i> .....	36
3.2	ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN .....	37
3.2.1	<i>Auswertung der Farbreaktionen</i> .....	37
3.2.2	<i>Darstellung der Bewertungskategorien für die untersuchten Proteine</i> .....	39
3.2.3	<i>Darstellung starker Farbreaktionen aller untersuchten Proteine in Leiomyom 19 und Leiomyosarkom 9</i> .....	40
3.2.4	<i>Vergleich des Färbeverhalten der Leiomyome gegenüber der Leiomyosarkome</i> 41	
3.2.5	<i>Analyse von Expressionsmustern</i> .....	44
3.2.6	<i>Expressionsmuster in Leiomyomen</i> .....	45
3.2.7	<i>Expressionsmuster in Leiomyosarkomen</i> .....	46
3.3	KORRELATION VON EXPRESSIONSMUSTERN UND DEMOGRAPHISCHEN SOWIE KLINISCHEN FAKTOREN .....	49
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>51</b>
4.1	DISKUSSION DER PATIENTENWAHL UND EINSCHLUSSKRITERIEN .....	51
4.2	DISKUSSION DER METHODE .....	51
4.2.1	<i>Schwächen der Immunhistochemie</i> .....	52
4.2.2	<i>Auswertung durch menschliche Individuen versus durch künstliche Intelligenz</i> . 53	
4.3	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE.....	55
4.3.1	<i>Signalwege in Leiomyomen</i> .....	55
4.3.2	<i>Interpretation demographischer und klinischer Faktoren in Leiomyomen</i> .....	59
4.3.3	<i>Signalwege in Leiomyosarkomen</i> .....	60
4.3.4	<i>Interpretation demographischer und klinischer Faktoren in Leiomyosarkomen</i> . 63	
4.4	PERSPEKTIVE FÜR DIE ZUKUNFT .....	64
<b>5</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>66</b>
5.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	66
5.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	68
5.3	TABELLENVERZEICHNIS .....	69
5.4	ETABLIERUNG DER ANTIKÖRPER .....	70
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>71</b>

**7 DANKSAGUNG ..... 83**

**8 LEBENSLAUF..... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

## Zusammenfassung

Sarkome stellen eine vielfältige Gruppe von seltenen Tumoren dar, welche größtenteils aus dem embryonalen Mesoderm hervorgehen und in Knochen-, neuroektodermale und Weichteilsarkome unterteilt werden. Primär kutane Leiomyome und Leiomyosarkome zählen zu einer Subgruppe der Weichteilsarkome und gehen aus Zellen der glatten Muskulatur hervor.

Leiomyome sind benigne und machen 1-2 % aller Weichteiltumore aus. Sie weisen ein langsames Wachstum auf und sind hauptsächlich im Uterus lokalisiert, wo sie als uterine Leiomyome zu den häufigsten Neoplasien bei Frauen zählen. Die sehr viel seltenere Klasse der kutanen Leiomyome kann in drei Untergruppen eingeteilt werden: Piloleiomyome, ausgehend vom Musculus arctor pili, Angioleiomyome, hervorgehend aus der Muskulatur kutaner Gefäße und dartoide Leiomyome, die ihren Ursprung in der Skrotalhaut haben.

Leiomyosarkome stellen, im Gegensatz zu den Leiomyomen, aggressiv wachsende maligne Neoplasien dar und machen einen Anteil von 14 % aller Weichteiltumore aus. Sie sind maligne mesenchymale Neoplasien der glatten Muskelzellen. Es wird zwischen dem uterinen, dem vaskulären und dem kutanen Typ unterschieden, wobei die uterine Untergruppe den größten Anteil ausmacht. Kutane Leiomyosarkome können weiter unterteilt werden in dermale, subkutane und sekundäre Formen.

Leiomyome und Leiomyosarkome entstehen am häufigsten an den Extremitäten (50%), am Rumpf (40%) und im Kopf-Hals-Bereich (15-20%). Das durchschnittliche Alter zum Diagnosezeitpunkt liegt bei Leiomyomen zwischen dem 20.-40. Lebensjahr, bei Leiomyosarkomen zwischen dem 40.-60. Lebensjahr. Die Verteilung zwischen den Geschlechtern zeigt eine Präferenz für das männliche Geschlecht.

Histopathologisch zeigen sich sowohl beim Leiomyom als auch beim Leiomyosarkom spindelige Tumorzellen mit teilweise zigarrenförmigen Zellkernen. Die Zellen sind oft wirbel- oder fischzugartig angeordnet. Das Leiomyosarkom weist darüber hinaus eine erhöhte Mitoseaktivität auf. Färbungen für Vimentin, Desmin und  $\alpha$ -SMA fallen für beide Entitäten positiv aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Proteinen des PI3K- und mTOR-Signalwegs von kutanen Leiomyomen im Vergleich zu kutanen Leiomyosarkomen immunhistochemisch untersucht. Ziel der Arbeit ist es Unterschiede im Expressionsmuster herauszuarbeiten, um Rückschlüsse über die Aktivität der jeweiligen Signalkaskaden ziehen zu können.



In die Untersuchung der Expression von Proteinen des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs wurden 41 Patienten einbezogen, darunter 19 mit der Diagnose eines kutanen Leiomyoms und 22 mit der Diagnose eines kutanen Leiomyosarkoms. Der Nachweis der Expression der für den Signalweg relevanten Proteine phospho-Akt, total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K wurde immunhistochemisch mithilfe der Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode an histologischen Resektionspräparaten durchgeführt. Zudem wurden demographische und klinische Patientendaten in die Auswertung miteinbezogen.

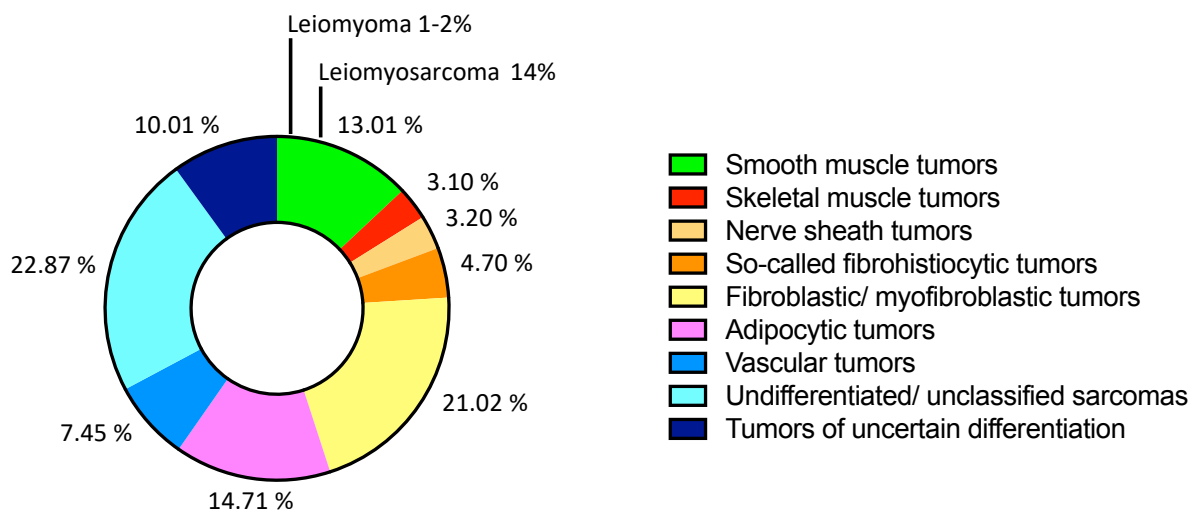
Der jeweilige immunhistochemische Nachweis der Proteine phospho-Akt, total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K in den untersuchten Gewebeproben ergab verschiedene Expressionsmuster in Leiomyomen und Leiomyosarkomen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass in mehr als der Hälfte der Leiomyosarkome eine Koexpression von PTEN und phospho-P70S6K vorlag.

## 1 Einleitung

### 1.1 Weichteiltumore

Sarkome stellen eine vielfältige Gruppe von seltenen Tumoren dar, welche größtenteils aus dem embryonalen Mesoderm hervorgehen. Unterschieden werden Knochensarkome, wie Osteosarkome, Ewing Sarkome, neuroektodermale Sarkome und Weichteilsarkome, welche am häufigsten vorkommen (1).

Weichteilsarkome, auch als Weichteiltumore bezeichnet, bilden eine heterogene Gruppe von Neoplasien, welche in Abhängigkeit der histologischen Ähnlichkeit mit ihrem Ursprungsgewebe in verschiedene Subklassen eingeteilt werden (2). Diese Tumore können überall im Körper vorkommen, jedoch häuft sich ihr Auftreten an den Extremitäten, am Rumpf und dem Retroperitoneum (1).



**Abbildung 1:** Unterformen der Weichteilsarkome  
Prozentuale Häufigkeit der jeweiligen Unterform von Weichteilsarkomen (Cancer Management and Research 2021: 13 8795-8802, Jeong et. al)

### 1.2 Epidemiologie der Leiomyome

Leiomyome machen nur ca. 1-2 % der benignen Weichteiltumore aus und gehen aus glatter Muskulatur hervor (3). Sie wurden erstmals 1854 von Virchow beschrieben (4). Sie weisen ein langsames Wachstum auf und sind vorwiegend im Uterus lokalisiert (5). Diese sogenannten uterinen Leiomyome zählen zu den häufigsten Neoplasien bei Frauen. Neben den uterinen Leiomyomen unterscheidet man zusätzlich zwischen kutanen und vaskulären Leiomyomen.

Die uterinen Leiomyome stellen eine häufige Diagnose in der Gynäkologie dar und treten bei Frauen ab dem 30. Lebensjahr vermehrt auf. Sie enthalten muskuläre und bindegewebige

Anteile des Myometriums und gehören zu einer Gruppe nicht epithelialer uteriner Tumore (6). Abhängig von ihrer Lokalisation, lassen sie sich in subseröse, intramurale und submuköse Myome einteilen (7). Uterine Leiomyome können je nach Ausprägung, Lokalisation und Größe zu starken Blutungen, Schmerzen, Unfruchtbarkeit oder Fehlgeburten führen (8). Sowohl eine medikamentöse als auch operative Therapie sind möglich, wobei die Leiomyome eine geringe Neigung zur Entartung und somit zur Metastasierung aufweisen. Vaskuläre Leiomyome treten sehr viel seltener auf als uterine und gehen aus der glatten Muskulatur der Gefäßwände hervor (9). Klinisch präsentieren sich vaskuläre Leiomyome in den unteren Extremitäten als solitäre, kleine, schmerzhafte Knoten. Die operative Exzision stellt die Therapie der Wahl dar, optional kann präoperativ eine Embolisation des Tumors durchgeführt werden, um starken Blutungen vorzubeugen (9).

Kutane Leiomyome gehen von glatten Muskelzellen der Haut aus. Aufgrund ihrer Ätiologie können drei Entitäten unterschieden werden: die Piloleiomyome, ausgehend vom Musculus arctor pili, die Angioleiomyome, ausgehend von der glatten Gefäßmuskulatur und die dartoiden Leiomyome, welche der glatten Muskulatur des Skrotums entspringen (10).

Piloleiomyome sind die häufigste Form der kutanen Leiomyome und präsentieren sich als rötliche Papeln am Stamm, im Gesicht oder im Bereich der Extremitäten (11). Auf Druck oder bei Exposition gegenüber Kälte werden diese Hautveränderungen von Patienten häufig als schmerzhaft beschrieben. Das klinische Auftreten kutaner Leiomyome kann von einzelnen Läsionen bis zur massiven Aussaat disseminierter Leiomyome variieren (12). Dieses Krankheitsbild wird als hereditäre kutane Leiomyomatose bezeichnet. Man vermutet hierbei ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster mit inkompletter Penetranz (10). Sie können über den ganzen Körper verteilt auftreten, werden jedoch am häufigsten an den Extremitäten und dem Oberkörper beobachtet (13). Kutane Leiomyome treten gehäuft zwischen dem 20.-40. Lebensjahr auf (13). Zum Auftreten der kutanen Leiomyome bei Männern und Frauen gibt es unterschiedliche Angaben in der Literatur; diese reichen von einer gleichmäßigen Verteilung zwischen beiden Geschlechtern bis hin zu einem Verteilungsverhältnis von 1:3 mit einem vermehrten Vorkommen beim weiblichen Geschlecht (12, 14). Ätiologische Assoziationen mit Umweltfaktoren, Immundefizienz, viraler Infektion und genetischen Faktoren betreffen nur einen geringen Teil der Leiomyome (15, 16).

### *1.3 Histopathologie der kutanen Leiomyome*

Kutane Leiomyome präsentieren sich als unscharf begrenzte Tumore mit unregelmäßigen Konvoluten aus spindeligen glatten Muskelzellen, die oft wirbel- oder fischzugartig

angeordnet sind. Die Tumorzellen sind durch eine schmale Grenzzone von der Epidermis getrennt und können Strukturen von Bindegewebe enthalten (12, 17). Charakteristisch sind spindelförmige Kernformationen und unterschiedlich ausgeprägte Polymorphismen des Kerns sowie zigarrenförmige Zellkerne (18). Häufig stellt sich die Epidermis über der Läsion atrophisch dar und es können kleinere Ulzerationen entstehen (13). Der Tumor kann bis in die Subkutis vordringen (18).

Zu den klinischen Differentialdiagnosen gehören unter anderem eruptive Syringiome, Neurofibrome, ekkrine Spiradenome, Trichofollikulome, papulöse Akneläsionen und Mastozystome (10).

#### *1.4 Diagnostik der kutanen Leiomyome*

Die Diagnose eines Leiomyoms erfolgt durch die histopathologische Beurteilung des Gewebes (10). Hierbei sind die unter 1.3 genannten histologischen Kriterien Grundlage, um die Diagnose eines Leiomyoms zu stellen. Mittels immunhistochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen Desmin, Vimentin, S100, Melan A und alpha-smooth-muscle-Aktin ( $\alpha$ -SMA) wird die Expression der jeweiligen charakteristischen Proteine nachgewiesen (19, 20). Dieses Verfahren hilft, um die histologische Diagnose zu bestätigen beziehungsweise andere Differentialdiagnosen (siehe Punkt 1.2) mit möglichst hoher Sicherheit auszuschließen. In Leiomyomen lassen sich in der Regel eine Expression von Desmin, Vimentin und  $\alpha$ -SMA nachweisen (18, 21).

#### *1.5 Therapie und Prognose der kutanen Leiomyome*

Leiomyome sind benigne Weichteiltumoren, die nicht metastasieren. Durch fortschreitendes Größenwachstum können sie jedoch umliegendes Gewebe verdrängen und dadurch Schmerzen oder Missempfindungen verursachen (4, 18). Der Einsatz einer Schmerztherapie sowie einer Therapie mit Wirkstoffen wie Gabapentin oder Nifedipin ist in der Literatur beschrieben (10). Goldstandard ist jedoch die operative Entfernung des Tumors (12). Zusätzlich können bei multiplen bzw. disseminierten Läsionen Therapievarianten wie Laser- und Kryotherapie, Bestrahlung und Verödung in Erwägung gezogen werden (12, 13, 18). Die Zahl der Rezidiven ist mit fast 50% trotz großzügiger chirurgischer Exzisionen hoch (13, 22, 23).

### *1.6 Epidemiologie der Leiomyosarkome*

Leiomyosarkome gehören ebenfalls den Weichteiltumoren an und machen einen Anteil von 14 % aus (24). Sie stellen maligne Neoplasien dar, die von der glatten Muskulatur ausgehen (25, 26). Sie weisen ein lokal aggressives Wachstum auf und können an verschiedenen Lokalisationen entstehen (25, 27, 28). Sie treten gehäuft im Abdomen und im Becken auf, und gelten als vorherrschender vaskulärer Sarkom-Subtyp, mit Ursprung in den muskulären Gefäßwandanteilen großer Blutgefäße (29). Leiomyosarkome des Uterus sind häufige Tumore bei Frauen und bilden eine große Untergruppe der Leiomyosarkome (30). Neben den abdominellen, vaskulären und uterinen Leiomyosarkomen unterscheidet man zusätzlich primär kutane Leiomyosarkome, welche mit 2-5% insgesamt selten vorkommen (31).

Diese lassen sich in drei weitere Untergruppen aufteilen: dermale, subkutane und sekundäre Leiomyosarkome (31, 32). Oberflächliche, dermale Leiomyosarkome zeigen kein tiefes Wachstum. Es wird angenommen, dass diese Tumoren von den Muskelzellen des Musculus arrector Pili oder der Skrotalhaut abstammen, wohingegen die tieferliegenden, subkutanen Leiomyosarkome den glatten Muskelzellen der Gefäßwände zugeordnet werden (22). Der dritte Subtyp, sekundäre Leiomyosarkome, stellt Metastasen dar, welche von anderen Primärtumoren ausgehen. Häufig werden ebendiese bei uterinen Leiomyosarkomen festgestellt (25, 33). Dermale Leiomyosarkome kommen häufiger vor als die subkutane und sekundäre Form (27).

Kutane Leiomyosarkome können theoretisch am gesamten Körper auftreten (26). Gemäß der vorhandenen Literatur hat sich jedoch eine Häufung im Kopf-Hals-Bereich gezeigt (22, 31, 32).

Im klinischen Erscheinungsbild imponieren die Läsionen als erythematös-bläuliche Papeln, Plaques und Knoten, die solitär oder gruppiert vorkommen. Sie können schmerzhaft sein, eine unregelmäßige Oberfläche bzw. Ulzerationen aufweisen und bluten (31, 34). Die Größe der Läsionen kann stark variieren, wobei subkutane Leiomyosarkome sich meist als gut abgrenzbare Knoten präsentieren (34).

Das Patientenalter zum Diagnosezeitpunkt liegt im Durchschnitt zwischen 40 und 60 Jahren, Leiomyosarkome der Haut können jedoch auch bei Kindern oder älteren Patienten vorkommen (25, 27, 35, 36). Die Verteilung des kutanen Leiomyosarkoms zwischen Männern und Frauen präsentiert sich in einem Verhältnis von 2:1 bzw. 3:1 mit einem vermehrten Vorkommen beim männlichen Geschlecht (37-39).

Ätiologisch wird eine Assoziation mit Verletzungen, Narben, Strahlung, Lupus vulgaris, vorhergehenden benignen Leiomyomen und Tätowierungen vermutet (12, 22, 34, 40, 41).

Zusätzlich zeigt sich ein vermehrtes Auftreten von kutanen Leiomyosarkomen bei Patienten mit HIV, EBV und Li-Fraumeni-Syndrom in der medizinischen Vorgeschichte (38, 42, 43).

### *1.7 Histopathologie der kutanen Leiomyosarkome*

Kutane Leiomyosarkome bilden üblicherweise unscharf begrenzte Knoten, welche dermal oder subkutan liegen. Es kann nicht immer eindeutig zwischen dermalen und subkutanen Läsionen unterschieden werden. Die Tumoren weisen ein infiltrierendes und destruierendes Wachstum auf kombiniert mit den histologischen und immunhistologischen Eigenschaften glatter Muskulatur (31, 44, 45). Eine Grenzzone zwischen der Läsion und der Epidermis ist nicht zwingend vorhanden. Ulzerationen und Akanthosen über dem Tumor kommen vorwiegend bei dermalen oberflächlichen Tumoren vor (32). Charakteristisch ist ein faszikulärer Aufbau, ein spindeliger Zelltyp und zigarrenförmige Zellkerne (34). Die Tumorzellen organisieren sich in Bündeln und Nestern und es lassen sich neben Kernpolymorphien zahlreiche Mitosefiguren sowie Zellnekrosen erkennen, welche beim benignen Leiomyom fehlen (27, 32).

Zu den Differentialdiagnosen gehören basosquamöse Karzinome, Epidermoidzysten, Dermatofibrome, Lipome, Neurofibrome und benigne Papillome (26, 34).

### *1.8 Diagnostik der kutanen Leiomyosarkome*

Zur Diagnose eines kutanen Leiomyosarkoms werden Gewebeprobe aus Probeexzisionen und Operationen herangezogen, welche histopathologisch untersucht werden. Die unter 1.7 aufgeführten histologischen Eigenschaften dienen zur Erkennung eines Leiomyosarkoms. Um andere potenzielle Differentialdiagnosen auszuschließen, werden zusätzlich immunhistochemische Färbungen vorgenommen. Man untersucht das Gewebe hierbei auf Expression von Desmin, Vimentin,  $\alpha$ -SMA, S100, Melan A und stellt den Ki67 Index fest (31, 34). Die Färbungen auf Desmin, Vimentin und  $\alpha$ -SMA erscheinen positiv, wohingegen S100 und Melan A vorwiegend negativ sind. Die Feststellung des Ki67 Index dient zur Beurteilung des Grads an Zellproliferation, welche bei malignen Tumoren typischerweise erhöht ist (46).

Das jeweilige Leiomyosarkom wird gemäß der TNM-Klassifikation für Weichteiltumore nach UICC/AJCC eingeteilt (47) (siehe Tabelle 1-3). Diese Einteilung spielt jedoch überwiegend bei den anderen Untergruppen, wie den uterinen und vaskulären Leiomyosarkomen, eine wichtige Rolle (siehe 1.6.).

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation für Weichteiltumoren (UICC/AJCC 2017)

<b>Klassifikation</b>	<b>Extremitäten/ Stamm</b>	<b>Retroperitoneum</b>	<b>Kopf-Hals</b>	<b>Eingeweide Thorax /Abdomen</b>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden			
T0	Kein Anhalt für Primärtumor			
T1	Tumor ≤5cm	Tumor ≤5cm	Tumor ≤2cm	Tumor begrenzt auf ein Organ
T2a	T2, Tumor >5 ≤10 cm	T2, Tumor >5 ≤10 cm	T2, Tumor >2 ≥4cm	Serosa des visz. Peritoneums infiltriert
T2b				Mikroskopische Ausbreitung jenseits Serosa
T3	Tumor >10 ≤15 cm	Tumor >10 ≤15cm	Tumor >4 cm	Makroskopische Ausbreitung jenseits Serosa/ zusätzlich Organ infiltriert
T4a	T4, Tumor >15cm	T4, Tumor >15cm	T4a, Infiltration Orbita/Schädelbasis/Dura/ zentrale Eingeweide/ Gesichtsknochen/ Musc.pterygoidei	Multifok. Tumor, > 2 Lokalisationen in einem Organ
T4b			T4b, Infiltration Gehirn/ prävertebrale Muskulatur/ A. carotis/ perineurale Beteiligung	Multifok. Tumor, >2 <5 Bezirke
T4c			Multifok. Tumor, >5 Bezirke	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden			
	Keine regionären Lymphknotenmetastasen			
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen			
M0	Keine Fernmetastasen			

M1	Fernmetastasen
----	----------------

**Tabelle 2:** Histopathologisches Grading Sarkom (48)

<b>zweistufig</b>	<b>dreistufig</b>
niedriggradig	Grad 1
hochgradig	Grad 2
	Grad 3

**Tabelle 3:** Stadieneinteilung Extremitäten und Stamm, Retroperitoneum (UICC/AJCC 2017)

<b>Stadium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Grading dreistufig</b>	<b>Grading zweistufig</b>
IA	T1	N0	M0	G1	niedriggradig
IB	T2, T3	N0	M0	G1, GX	niedriggradig
II	T1	N0	M0	G2, G3	hochgradig
IIIA	T2	N0	M0	G2, G3	hochgradig
IIIB	T3, T4	N0	M0	G2, G3	hochmaligne
IIIC	Jedes T	N1	M0	Jedes G	
IV	Jedes T	Jedes N	M1	Jedes G	

Trotz der genannten Charakteristika ist eine eindeutige Diagnose eines kutanen Leiomyosarkoms anspruchsvoll und kann oft erst nach mehreren Untersuchungen gestellt werden (31).

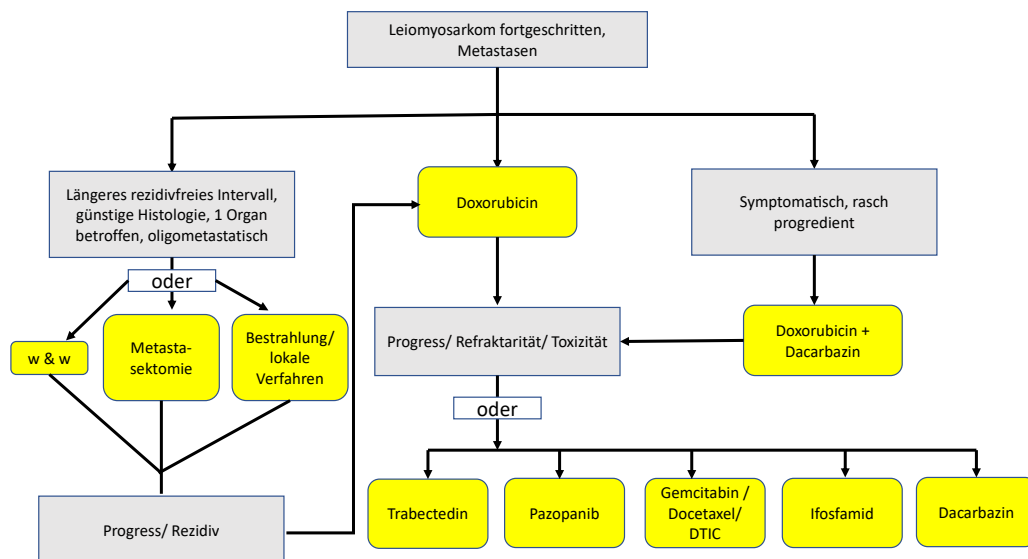
### *1.9 Therapie und Prognose der kutanen Leiomyosarkome*

Die Therapie der Wahl bei malignen Leiomyosarkomen der Haut ist eine operative Entfernung des Tumors (27). Hierbei sollte auf einen ausreichenden Sicherheitsabstand geachtet werden; 3 cm zur Seite und in die Tiefe bis einschließlich zur Muskelfaszie, insbesondere bei subkutaner Lokalisation (34, 49). Je nach Ausmaß der Infiltration können auch Muskelanteile entfernt werden. Sofern eine radikale Entfernung mit ausreichendem Sicherheitsabstand nicht möglich ist, ist mit einer hohen Rezidivrate und einer schlechteren Prognose zu rechnen (27, 49-51).

Nicht vollständig resektable Tumoren können zusätzlich einer Strahlentherapie zugeführt werden (34, 52).



Falls ein Tumor bei Diagnosestellung bereits metastasiert ist, ist eine Systemtherapie indiziert. Eine Auswahl von möglichen Medikamenten ist in Abbildung 1 im Pfeildiagramm dargestellt (53, 54) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 2:** Chemotherapie metastasierter Leiomyosarkome

Auswahl von Chemotherapeutika zur Behandlung eines metastasierten Leiomyosarkoms. Je nach Symptomen und Progress oder Rezidiv besteht die Option zu operieren, zu bestrahlen, abzuwarten bzw. mit Doxorubicin und Dacarbazin zu therapieren. Sollten die beiden Wirkstoffe keinen Behandlungserfolg zeigen, steht eine Eskalation der Therapie mit Trabectedin, Pazopanib, Gemcitabin, Docetaxel, Ifosfamid und Dacarbazin zur Debatte. (onkopedia Leitlinie, Weichgewebssarkome des Erwachsenen, Schütte et.al)

Oberflächliche dermale Leiomyosarkome metastasieren sehr selten und haben daher eine bessere Prognose als tiefer gelegene subkutane Tumore (25, 39). Die Metastasierung bei Leiomyosarkomen erfolgt zunächst lymphogen in die regionalen Lymphknoten sowie hämatogen in die Lunge. Subkutane Leiomyosarkome haben mit 30-40% ein deutlich höheres Rezidivrisiko als der dermale Subtyp mit ca. 20% (54-58).

### 1.10 Signalwege

Tumore entstehen aufgrund von genetischen und epigenetischen Veränderungen, welche die Expression und Aktivität von Onkoproteinen und Tumorsuppressorproteinen beeinflussen (59, 60). Das Zusammenspiel aller signalübertragenden Proteine ist im Netzwerk der intrazellulären Signaltransduktion vereint (59). Dieses Netzwerk umfasst mehrere Signalwege bzw. Pfade, welche im Falle eines Tumors fehlerhaft oder defekt sind. Die Signalwege setzen

sich aus unterschiedlichen Rezeptoren und Proteinen zusammen und unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die Zielzellen. Sie beeinflussen unter anderem Vorgänge wie Genexpression, Zellproliferation, Apoptose und DNA-Reparatur (60).

Signalwege sind die Voraussetzung für die Verarbeitung und Reaktion von Zellen auf eintreffende Reize und Informationen der interzellulären Kommunikation (61). Zu den Molekülen eines Signalwegs gehören Rezeptoren, Adapterproteine, Enzyme und Second-Messenger-Moleküle. Diese führen im Zusammenspiel zur Aktivierung oder Inhibierung von Signalkaskaden (62, 63).

Im Folgenden werden zwei für die Tumorentstehung wichtige Signalwege erläutert, der Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3K) und mammalian-Target-Of-Rapamycin-(mTOR) Signalweg.

### 1.10.1 Der PI3K-Signalweg

Der PI3K-Signalweg ist ein wichtiger intrazellulärer Signalweg, der bei zahlreichen Zellaktivitäten, welche das Wachstum, die Proliferation und den Zellstoffwechsel regulieren, eine übergeordnete Rolle spielt. Bis heute sind nicht all seine Funktionen im Detail geklärt (64-66). Die Aktivierung von PI3K kann durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren oder G-Proteine, vermittelt werden. Es wird eine Autophosphorylierung hervorgerufen, wodurch die PI3K aktiviert wird (65). Die aktive PI3K phosphoryliert Membranlipide, sodass aus  $PIP_2$  (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat)  $PIP_3$  (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat) entsteht.  $PIP_3$  bindet an die Serin/Threonin-Kinase Akt und aktiviert diese (67). Die Kinase Akt ist eine Proteinkinase B (PKB) und fungiert als Pro-Onkogen (67). Zusätzlich wird durch die Entstehung von  $PIP_3$  die Protein-3-Phosphoinositid-dependant Proteinkinase-1 (PDK1) aktiv. Durch die Aktivierung und Inhibierung verschiedener Prozesse kann PKB/Akt diverse Signalketten beeinflussen. Zu den wichtigsten gehört die Hemmung der Apoptose, die Aktivierung der Proteintranslation und die Steigerung der Proliferation (68). Somit hat Akt auch Einfluss auf nachgeschaltete Signalpfade, wie beispielsweise den mTOR-Signalweg (69). In unterschiedlichen malignen Tumoren konnte bereits eine erhöhte Aktivität des PI3K-Signalweges und PKB/Akt-Kaskade nachgewiesen werden (68).

#### 1.10.1.1 Akt

*AKT1* ist ein Gen, welches gemeinsam mit *AKT2* und *AKT3* für die Proteinkinasen B (PKB  $\alpha/\beta/\gamma$ ) kodiert (65). Es kann in allen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen

werden. Seine Lokalisation befindet sich im Nukleoplasma (70). Die drei von AKT kodierten PKB-Enzyme gehören zu den Serin/Threoninkinasen und übertragen Phosphatgruppen auf andere Proteine, wodurch die veränderten Proteine Bestandteil wichtiger Signalwege im Körper werden. Dadurch sind die Proteinkinasen B (PKB) selbst Teil der Signaltransduktion (71). In Tumorzellen weisen diese PKBs häufig eine erhöhte Aktivität auf, weshalb AKT1/2/3 als Onkogene gelten (66).

Zu den zellulären Prozessen, bei denen die PKBs und somit auch AKT1/2/3 eine zentrale Rolle spielen, gehören Wachstum, Zellproliferation, Zellzyklus, Zellüberleben bzw. Apoptose, und Stoffwechsel. All diese Abläufe können durch die PKBs erheblich beeinflusst werden (70).

PKBs werden vor allem durch Insulin und Wachstumsfaktoren stimuliert und aktiviert. Zusätzlich können die PKBs durch den ihnen übergeordneten PI3K-Signalweg beeinflusst werden (70).

Im Rahmen des Signalweges bindet die PKB an  $PIP_3$  und wird an der Zellmembran von der Phosphoinositide-dependent Kinase 1 (PDK1) an ihrem Serin (473) und Threonin (308) phosphoryliert (siehe Abbildung 2). Durch die Phosphorylierung entsteht Phospho-Akt (68). Dieser Aktivierungsschritt befähigt die PKBs andere Substrate ebenfalls zu phosphorylieren und damit zu aktivieren bzw. inaktivieren.

Genau wie Akt ist Phospho-Akt in allen Geweben des menschlichen Körpers nachweisbar, bevorzugt im Nukleoplasma (70).

Das phosphorylierte Akt fördert das Überleben der Zellen durch die Inhibierung der Zellapoptose sowie die Inaktivierung von diversen Faktoren, beispielsweise Kaspasen. Je mehr der Serin und Threonin-Abschnitte phosphoryliert vorliegen, desto höher ist die AKT-Aktivität (70). Neben den oben aufgeführten Wirkungen von Akt und Phospho-Akt auf Proteine beeinflussen sie zudem den mTOR-Signalweg.

### 1.10.2 Der mTOR-Signalweg

Neben dem phosphorylierten PKB/Akt kann auch das Polypeptid mTOR in phosphorylierter Form vermehrt in Tumoren nachgewiesen werden (72). mTOR ist eine Serin/Threonin-Kinase, die sowohl beim Menschen als auch bei allen anderen Säugetieren vorkommt. mTOR bewirkt die Phosphorylierung von Molekülen und führt zu deren Aktivierung (73). Durch die in 1.3.1 beschriebene Phosphorylierung und somit Aktivierung von Akt indiziert dieses in nachfolgenden Schritten die Phosphorylierung von mTOR, wodurch dieses ebenfalls aktiv

wird (72). Zusätzlich kann der mTOR-Signalweg auch von Aminosäuren aktiviert werden (73).

Der Signalweg um mTOR reguliert Prozesse der Proliferation, Differenzierung und Vermehrung von Gewebe und kann die Signalkaskade von Immunantworten unterstützen (66).

mTOR kann zwei Signalkomplexe bilden, mTOR-Komplex 1 (mTORC1) und mTOR-Komplex 2 (mTORC2). mTORC1 setzt sich zusammen aus mTOR, dem regulatory-associated protein of mTOR, kurz Raptor, PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa), mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8) und DEP-domain-containing mTOR interacting protein (Deptor). Eine Aktivierung von mTORC1 führt zur Phosphorylierung zweier Schlüsselproteine, welche die Translation von Proteinen regulieren, nämlich 4E-BP1 (eukaryotic factor E4 binding protein1) und S6K1 (protein S6 kinase 1). Dadurch werden Vorgänge wie Zellproliferation und Zellwachstum beeinflusst. mTORC1 kann durch exogenes Rapamycin, ein Immunsuppressivum, gehemmt werden.

mTORC2 besteht aus mTOR, Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mLST8, mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein1), Protor-1 (protein observed with rictor-1) und Deptor. Es ist unempfindlich gegenüber Rapamycin und führt zu einer Aktivierung von AKT.

Dementsprechend führt die Aktivierung von mTOR und mTORC1 bzw. mTORC2 zur Synthese und Phosphorylierung von Proteinen, welche im Zellhaushalt eine wichtige Rolle spielen.

Eine Hemmung von mTOR ist ebenfalls möglich. Einerseits kann PTEN durch eine Dephosphorylierung die Wirkung von PI3K aufheben. Andererseits hemmt der Tuberous Sclerosis Complex (TSC) mTOR. Dieser besteht aus zwei Proteinen, Hamartin (TSC1) und Tuberin (TSC2); dies sind Tumorsuppressoren. TSC1 und TSC2 inaktivieren die Hydrolyse von GTP zu GDP, sodass mTOR nicht aktiviert wird (siehe Abbildung 2) (73).

#### 1.10.2.1 PTEN

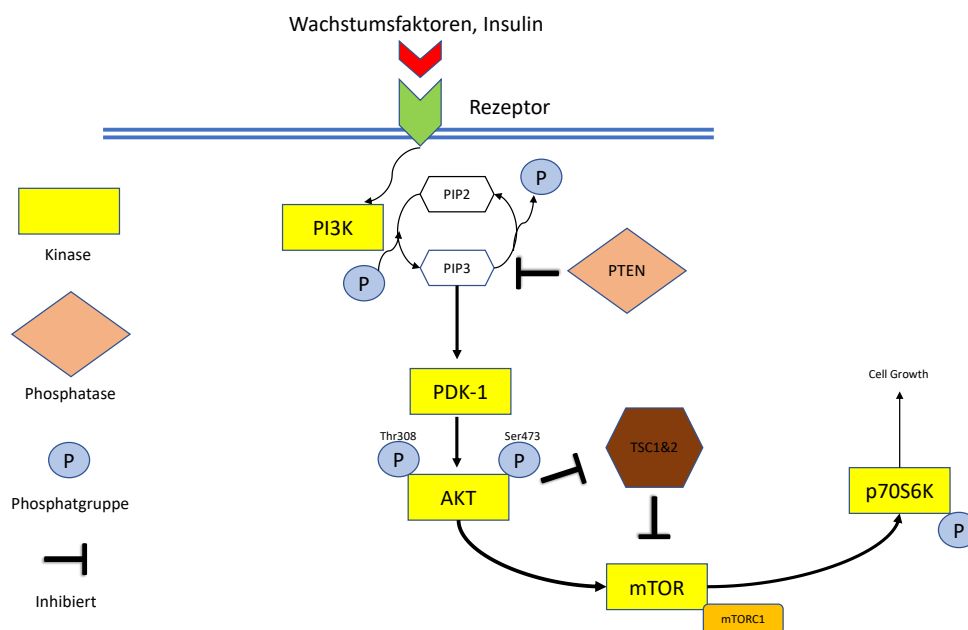
PTEN ist eine Phosphatase, welche die Hydrolyse von diversen Phosphorsäureestern katalysiert (70). Das Enzym kommt in fast allen Geweben des menschlichen Körpers vor und ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert (70). Zu den von PTEN hydrolysierten Substraten gehören signalübertragende Moleküle wie PIP<sub>1/2/3</sub> und AKT1 (74). PTEN ist unter anderem an der Regulation der Apoptose beteiligt, weshalb es als Tumorsuppressor gilt (71). Im normalen Zellzustand wird PTEN durch den Faktor TGF-β

gehemmt. PTEN-Mutationen oder Defekte am PTEN-Enzym können zur unkontrollierten Zellvermehrung führen und somit die Entstehung von Tumoren begünstigen (66).

Eine wichtige Funktion von PTEN ist die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositolphosphaten (PIP) und die Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges. Somit wirkt es der aktiven Form von Akt entgegen und reduziert die Zellteilungsrate (75).

### 1.10.2.2 P70S6 Kinase

Die P70S6 Kinase ist ein Enzym, welches zu den Serin/Threonin-Kinasen gehört. Sie kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma vor und kann fast jedem Gewebe des menschlichen Körpers nachgewiesen werden (70). Die P70S6 Kinase hat proliferationsfördernde Eigenschaften und gehört zu einem Signalweg, welcher dem PI3K- und mTor-Signalweg nachgeschaltet ist (76). Verschiedene Signale von beispielsweise Insulinrezeptoren oder Wachstumsfaktoren können zu einer Phosphorylierung führen, wodurch die phospho-P70S6 Kinase (pP70S6K) entsteht (77). Durch die Phosphorylierung des Enzyms kommt es zu einer Signalwegsaktivierung und somit Stimulation der Proliferation des jeweiligen Gewebes. Eine gesteigerte Aktivität der pP70S6 Kinase steht in Assoziation mit einem erhöhten Risiko für Tumoren im menschlichen Körper (66).



**Abbildung 3:** PI3K/Akt/mTOR -Signalkaskade

PI3K wird durch Wachstumsfaktoren oder Insulin an Rezeptoren der Zellmembranen aktiviert, sodass PI3K PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> phosphorylieren kann. Dieser Vorgang kann durch PTEN gehemmt werden. Bei einer Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> folgt eine Aktivierung der PDK1, welche wiederum AKT phosphoryliert. Das phosphorylierte AKT reguliert den mTOR-Signalweg hoch, indem einerseits die Aktivität von mTOR gesteigert wird und andererseits TSC1&2 vom aktivierten AKT gehemmt werden. TSC1&2 (Hamartin und Tuberin) sind

Tumorsuppressorgene, welche die Aktivität von mTOR unterdrücken können. Nachgeschaltete Proteine, wie die p70S6Kinase, werden ebenfalls phosphoryliert. Diese aktivierten Proteine haben Einfluss auf die Proliferation und das Wachstum der Zellen.

### *1.11 Fragestellung und Zielsetzung*

In dieser Arbeit wurde die Aktivität des PI3K- und mTOR-Signalwegs in benignen Leiomyomen und malignen Leiomyosarkomen der Haut bestimmt und miteinander verglichen. Hierfür wurden mittels immunhistochemischer Analysen die Expression von Proteinen der PI3K- und mTOR-Signalkaskade untersucht. Ziel war es ein besseres Verständnis der Pathophysiologie dieser beiden Entitäten zu erlangen.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gewebeproben

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurden Gewebeproben des kutanen Leiomyoms und Leiomyosarkoms histologisch gefärbt sowie analysiert. Zur Durchführung der Färbungen wurde Material von Patienten gewählt, welche im Zeitraum von 2011 bis 2021 die Diagnose eines kutanen Leiomyoms beziehungsweise Leiomyosarkoms erhielten und jenes daraufhin operativ in der dermatologischen Klinik des Universitätsklinikums Regensburg (UKR) entfernen ließen. Die Fixierung des Patientenmaterials in Formalin sowie die Einbettung in Paraffin erfolgte durch das Routinelabor der Klinik für Dermatologie des UKRs. Die Biopsien wurden retrospektiv auf die Expression ausgewählter Proteine des PI3K- und mTOR-Signalwegs analysiert. Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt (21-2300-101) und erfüllt die Anforderungen der Deklaration von Helsinki.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 19 Leiomyome (LM1-LM19) und 22 Leiomyosarkome (LMS1-LMS22) analysiert. Somit wurden Proben von insgesamt 41 Personen untersucht. Darunter waren 14 Frauen und 27 Männer im Alter zwischen 32 und 96 Jahren bei Erstdiagnose. Die Patienten mit der Diagnose Leiomyom setzten sich zusammen aus 9 Frauen und 10 Männern zwischen 32 und 75 Jahren; die Leiomyosarkome wurden bei 5 Frauen und 17 Männern diagnostiziert, die zwischen 40 und 96 Jahren alt waren (Tabelle 4). Eine detailliertere Auflistung der demografischen und klinischen Charakteristika der Patienten erfolgt im Ergebnisteil unter Kapitel 3.1.

**Tabelle 4:** Anzahl, Geschlecht und Alter zum Diagnosezeitpunkt der Patienten

	<b>Leiomyom</b>	<b>Leiomyosarkom</b>
<b>Menge (n)</b>	19	22
<b>Geschlecht (w/m)</b>	9/10	5/17
<b>Alter zu Diagnosezeitpunkt in Jahren</b>	32-75	40-96

#### 2.1.2 Geräte und Equipment

Die folgende Tabelle führt die verwendeten Geräte und Equipment auf und enthält Angaben zu deren Herstellern.

**Tabelle 5:** Geräte und Equipment

<b>Geräte und Equipment</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
Adhäsive Objektträger Superfrost PLUS	Thermo Fisher Scientific	270908123
Digitales Mikroskop & Scanner M8	Preci Pointl, ViewPoint Light	
Deckgläser 24x60mm	Roth	Gem. ISO 8255-1
Fettstift Roti.Liquid Barrier Marker	Roth	AN92.1
Kühlplatte	Microm, Typ CP 60	
Mikroskop Biomed	Leitz, Typ 020-507.010	
Mikrotomklingen	Feather, Typ S 35	
Mikrotom	Thermo Scientific, Typ HM 350 SV	
Trockenschrank	WTB binder, Typ 15115300002020	
Wasserbad	Microm, Typ SB 80	

### 2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

In der folgenden Tabelle sind Informationen zu den Reagenzien und Chemikalien der Arbeit vermerkt.

**Tabelle 6:** Reagenzien und Chemikalien

<b>Reagenzien und Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
AEC Plus high sensitivity Substrat Chromogen Ready- to-use	Dako	K3469
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb	Cell Signaling	#4691
Antibody Diluent	Zytomed	REF ZUCO 25-100
Aquatex Eindeckmittel	Merck	1.08562.0050
Antibody Diluent	Zytomed	REF ZUCO 25-100
Citrate Buffer pH6	Zytomed	REF ZUC028
Dulbecco's Phosphate	Sigma-Aldrich	D8537



Buffered Saline		
Eosin	Sigma Aldrich	HT110116
Ethanol vergällt	Universität Regensburg Einkauf	
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth	T865.3
Wasserstoffperoxid 30% in Wasser	Fisher Scientific	1404697
Isotyp Pp70S6K Rabbit mAb	Invitrogen	08-6199, LOT VC293193
Isotyp (DA1E) Rabbit mAb, Phospho Akt, Pan Akt, PTEN	cell signaling,	3900S, LOT 40
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP Rabbit mAb	cell signaling	#4060
PTEN (138G6) Rabbit mAb	cell signaling	#9559
Phospho-p70 S6 Kinase (Ser371) Polyclonal Antibody	Thermo Fisher	#PA5-104841
Roti- Histokitt II	Roth	T 160.1
Xylol	Merck	8.08691.1000
ZytoChemPlusHRP Kit/Rabbit	Zytomed	REF HRP060-Rb

#### 2.1.4 Software

Die folgende Tabelle enthält die in dieser Arbeit verwendeten Softwares.

**Tabelle 7:** Softwares

<b>Software, Datenbanken</b>	<b>Version</b>	<b>Anwendung</b>
GraphPad Prism	Version 9.0.1 (128)	Statistik
Microsoft Office	Version 2019	Dokumenterstellung, Auswertung, grafische Darstellung
Precipoint Scan	M8	Schnitte Scan

ViewPoint Light	1.0.0.9628	Bild-/ Fotoprogramm
-----------------	------------	------------------------

Der humane Proteinatlas wurde als Datenbank zu den jeweiligen Antikörpern und Signalwegen verwendet (<https://www.proteinatlas.org/>) (78); dieser enthält Informationen zum Vorkommen, der Funktion und der Wirkweise bzw. Interaktion der jeweiligen Antikörper und Signalwegmoleküle.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anfertigen histologischer Schnitte

Um das Gewebe immunhistochemisch anfärben und analysieren zu können, mussten histologische Schnitte der FFPE-Gewebeproben angefertigt werden. Die FFPE-Gewebeproben wurden zuerst auf einer Kühlplatte auf -20°C gekühlt. Mithilfe eines Rotationsmikrotoms wurden 2 µm dicke Schnitte aus den Paraffinblöcken angefertigt. Danach wurden die Schnitte in ein auf 42°C erwärmtes Wasserbad transferiert. Durch das Wasser sollten die Schnitte gestreckt werden, um sie anschließend faltenfrei auf vorbeschriftete, adhäsive Objektträger aufzubringen.

### 2.2.2 Anfertigen einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von jedem Präparat wurde zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E. Färbung) angefertigt, um einen Eindruck des Vorkommens und des Aufbaus des entarteten Gewebes zu gewinnen.

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in einem Wärmeschrank für 20 Minuten bei 72°C erwärmt, um ein besseres Haften des Gewebes an den Objektträgern zu ermöglichen und das Paraffin von den Schnitten abtropfen zu lassen.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten mit Xylol gewaschen, um Paraffinreste zu entfernen. Anschließend wurde dem Gewebe nach der folgenden Tabelle durch zweimaliges Eintauchen in Flüssigkeiten einer absteigenden Alkoholreihe Flüssigkeit zugeführt.

**Tabelle 8:** Absteigende Alkoholreihe

Konzentration des Alkohols	Verweildauer
2x 100% Ethanol	Je 5 Minuten
2x 96% Ethanol	
2x 70% Ethanol	

Daraufhin wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und für 10 Minuten mit Mayers Hämalaunlösung gefärbt. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten mit lauwarmem Leitungswasser gespült und im Anschluss wurde die Färbung mikroskopisch kontrolliert. Die Hämalaunlösung geht im sauren Milieu mit basophilen Strukturen, wie beispielsweise Zellkernen, eine Bindung ein, wodurch diese Strukturen rötlich braun gefärbt werden (79). Durch das Spülen mit Leitungswasser wird der pH-Wert auf über drei angehoben, sodass es zum Farbumschlag in eine blau-violette Farbe kommt (79).

Als nächstes wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und dann für 3 Sekunden mit Eosin gegengefärbt. Eosin färbt die eosinophilen Bestandteile der Zelle bzw. des Zytoplasmas an (79). Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Tabelle 9) gezogen, um dem Gewebe Flüssigkeit zu entziehen.

**Tabelle 9:** Aufsteigenden Alkoholreihe

<b>Konzentration des Alkohols</b>	<b>Verweildauer</b>
2x 70% Ethanol	2-3 Sekunden
2x 96% Ethanol	2-3 Sekunden
100% Ethanol	2 Minuten

Zum Schluss wurden die Proben zweimal für je 5 Minuten in Xylol inkubiert und nach Auftragen eines wasserfreien Eindeckmediums (RotiHistokitt) ein Deckglas aufgelegt.

### 2.2.3 Immunhistochemie

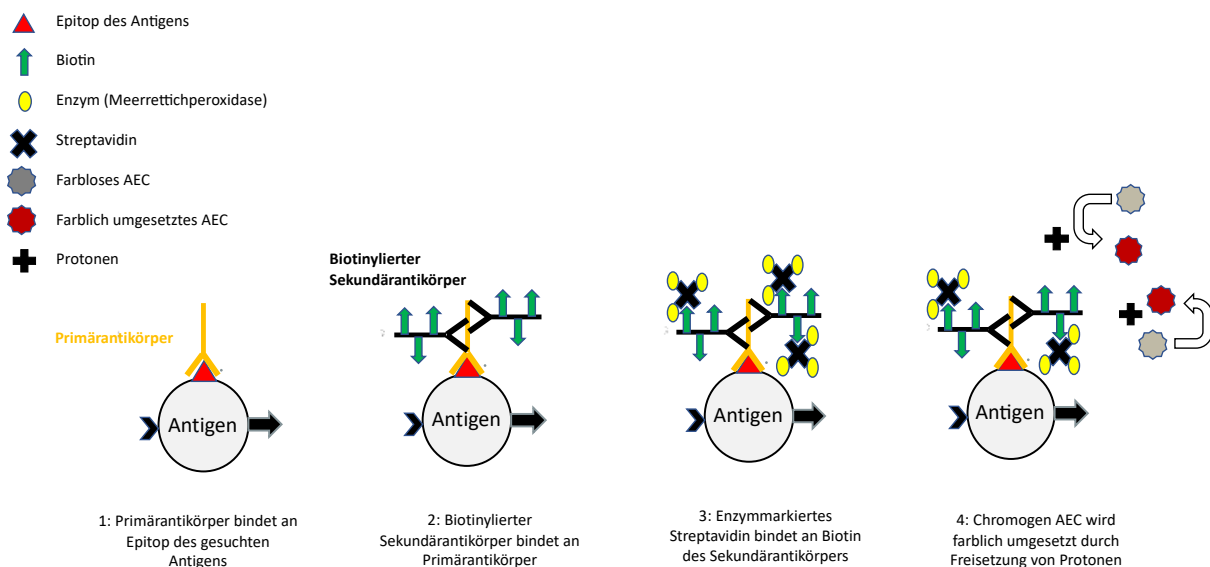
#### 2.2.3.1 Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode

Die immunhistochemische Färbung von Gewebeproben beruht auf einer Antigen-Antikörperbindung, welche durch Zuhilfenahme eines gekoppelten Nachweissystems farblich dargestellt wird. Hierbei nutzt man die Affinität eines Antikörpers zu einem Epitop des jeweiligen Antigens. In der Immunhistochemie wird zwischen direkten und indirekten Methoden unterschieden. Bei der direkten Methode bindet ein enzymmarkierter Antikörper direkt an das Antigen, sodass es unter Zugabe eines Chromogens zwischen dem Enzym und dem Chromogen-Substrat zu einer Farbreaktion kommt. Bei der indirekten Methode kommen zwei verschiedene sekundäre Antikörper zum Einsatz. Ein Beispiel für eine indirekte Methode ist die Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB), welche auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam.

Bei dieser Methode bindet der spezifische unkonjugierte Primärantikörper direkt an das gesuchte Antigen im Gewebe. Im nächsten Schritt wird der Sekundärantikörper aufgetragen, der gegen die Wirtsspezies und den Isotyp des Primärantikörpers gerichtet ist und außerdem mit einem Nachweissystem markiert ist. Das Nachweissystem in diesen Untersuchungen ist an den Sekundärantikörper gekoppeltes Biotin, ein wasserlösliches Vitamin aus dem B-Komplex.

Ein Vorteil der LSAB Methode ist, dass mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können, wobei es letztendlich zu einer Verstärkung des Farbsignals kommt. Im dritten Schritt wird ein Enzymkonjugat hinzugefügt, welches an das Detektionssystem bindet.

Streptavidin, welches eine sehr hohe Affinität für das Biotin-Molekül auf dem Sekundärantikörper aufweist, bildet mit dem Biotin einen Biotin-Streptavidin-Komplex. Nach Zugabe eines Chromogens kommt es zu einer Farbreaktion, welche das Vorhandensein des gesuchten Antigens aufzeigt. Das Chromogen, in der vorliegenden Arbeit AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol), reagiert gemeinsam mit einem sogenannten Reporterenzym, beispielsweise einer Meerrettich-Peroxidase. Dieser Peroxidase wird Wasserstoffperoxid angeboten, wodurch es zur Freisetzung von Protonen kommt und somit zur Oxidation des zuvor nahezu farblosen Chromogens zu einem farbigen Endprodukt. Im Fall von AEC erscheint die Färbung rot.



**Abbildung 4:** Ablauf der LSAB-Methode

Zunächst bindet der Primärantikörper an das passende Epitop des gesuchten Antigens (1). In einem weiteren Schritt wird ein Sekundärantikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist, hinzugefügt. Dieser liegt in biotinylierter Form vor (2). Nun bindet das enzymmarkierte Streptavidin an das Biotin, welches sich auf dem

Sekundärantikörper befindet (3). Im letzten Schritt wird das Chromogen AEC hinzugefügt, welches durch die Freisetzung von Protonen zu einem farbigen Produkt oxidiert wird (4).

### 2.2.3.2 Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Der Ablauf der immunhistochemischen Färbungen erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers des Zytochem-Plus HRP Kits (Rabbit). Im Folgenden wird das Färbeprotokoll erläutert.

Die ersten Schritte des Färbeprotokolls deckten sich mit denen der H.E.-Färbung (siehe Kapitel 2.2.2) und wurden inklusive der absteigenden Alkoholreihe identisch durchgeführt. Nach dem letzten Alkoholschritt wurden die Schnitte für 10 Minuten in 200 mL einer 3%-Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )-Lösung inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Herstellung der 3%- $H_2O_2$  Lösung wurden 20 mL 30%  $H_2O_2$  und 180 mL 70% Ethanol vermischt. Das  $H_2O_2$  blockiert die endogene Peroxidase. Somit wird einer unspezifischen Hintergrundfärbung vorgebeugt.

Anschließend wurden die Schnitte in einem zuvor auf ca. 100°C erhitztem einfachem Citratpuffer (pH 6) für 30 Minuten in einem Dampfgarer gekocht. Der einfache Citratpuffer setzt sich aus 100 mL zehnfachem Citratpuffer (pH 6) und 900 mL destilliertem Wasser zusammen.

Das Kochen der Schnitte im Citratpuffer ermöglicht eine Demaskierung der Antigene (80). Dieser Vorgang ist notwendig, da durch die Fixierung von Gewebe postoperativ in Formalin Kreuzvernetzungen reaktiver Gruppen entstehen (81), welche die Antigene für Antikörper unzugänglich werden.

Nach dem Kochen kühlten die Schnitte 20 Minuten auf Eis ab und wurden danach dreimal für jeweils fünf Minuten mit einfachem Phosphat Saline Puffer (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte auf einer feuchten Kammer ausgebreitet, welche zuvor mit destilliertem Wasser befüllt wurde. Dieses sollte verhindern, dass die Schnitte im weiteren Verlauf austrocknen.

Dann wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Dieser Fettstift schafft eine Barriere, sodass ein Herunterlaufen der später aufgetragenen Flüssigkeiten verhindert werden kann und eine gleichmäßige Benetzung der Objektträger ermöglicht wird. Außerdem konnte somit Material und Antikörper gespart werden.

Im Anschluss wurden die Proben 10 Minuten mit einer im Zytochem-Plus HRP (Rabbit) Kit enthaltenen Blocking Solution geblockt, diese danach abgeklopft und die Schnitte für 5 Minuten mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Währenddessen wurde der entsprechende

Primärantikörper vorbereitet, indem er mit dem Antibody-Diluent, welches ebenfalls Bestandteil des Zytochem-Plus HRP (Rabbit) Kits war, verdünnt wurde (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Verdünnung der Antikörper der jeweiligen Färbung

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
phospho-Akt	1/50
total-Akt	1/300
PTEN	1/200
phospho-P70S6Kinase	1/200

Die Schnitte wurden anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper wurde zuvor im Rahmen der Etablierung mithilfe von Positiv- und Negativkontrollen festgelegt (siehe 2.2.4).

Am Folgetag wurde der Primärantikörper abgeklopft und die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der im Zytochem-Plus HRP (Rabbit) Kit enthaltene biotinylierte Sekundärantikörper für 30 Minuten aufgetragen. Nachfolgend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wirkte das Streptavidin HRP-Konjugat aus dem Zytochem-Plus HRP (Rabbit) Kit für 30 Minuten ein, bevor die Schnitte dann erneut für dreimal 5 Minuten in 1x PBS gewaschen wurden.

Im nächsten Schritt wurde durch das Auftragen des Chromogens AEC eine Farbreaktion hervorgerufen. Die jeweilige Einwirkdauer variierte abhängig vom jeweiligen Antikörper und ist in Tabelle 11 aufgezeigt.

**Tabelle 11:** Einwirkzeit des Chromogens bei der jeweiligen Färbung

<b>Antikörper</b>	<b>Einwirkzeit Chromogen</b>
phospho-Akt	30 Minuten
total-Akt	30 Minuten
PTEN	11 Minuten
phospho-P70S6Kinase	6 Minuten

Die Farbreaktion wurde mit destilliertem Wasser gestoppt. Danach wurden die Schnitte in Hämalaunlösung gegengefärbt und dann 10 Minuten mit lauwarmem Leitungswasser gebläut. Nach dem Bläuen wurde mikroskopisch überprüft, ob die Schnitte die gewünschte Gegenfärbung angenommen haben.

Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit wässrigem Eindeckmedium (Aquatex) eingedeckelt.

#### 2.2.4 Etablierung der Antikörper

Zur Qualitätssicherung wurden alle verwendeten Antikörper vor der immunhistochemischen Färbung der Patientebiospien getestet, um deren Spezifität und Sensitivität zu überprüfen, sowie die passende Antikörperverdünnung herauszufinden. Gleichzeitig wurde die Dauer der Inkubation der Schnitte mit dem Chromogen festgelegt.

Im Rahmen der Etablierung wurden zu jedem Antikörper mehrere Kontrollen angefertigt.

Die erste Kontrolle war eine Positivkontrolle. Hierzu wurde vom jeweiligen Hersteller Gewebe empfohlen, welches das gesuchte Protein sicher exprimiert und somit eine positive Farbreaktion mit dem Antikörper zeigt (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Positivkontrollgewebe der Antikörper

Antikörper	Gewebe Positivkontrolle
phospho-Akt	Mamma Karzinom
total-Akt	Mamma Karzinom
PTEN	Colon Karzinom
phospho-P70S6Kinase	K5 Block (Hoden, Niere, Darm)

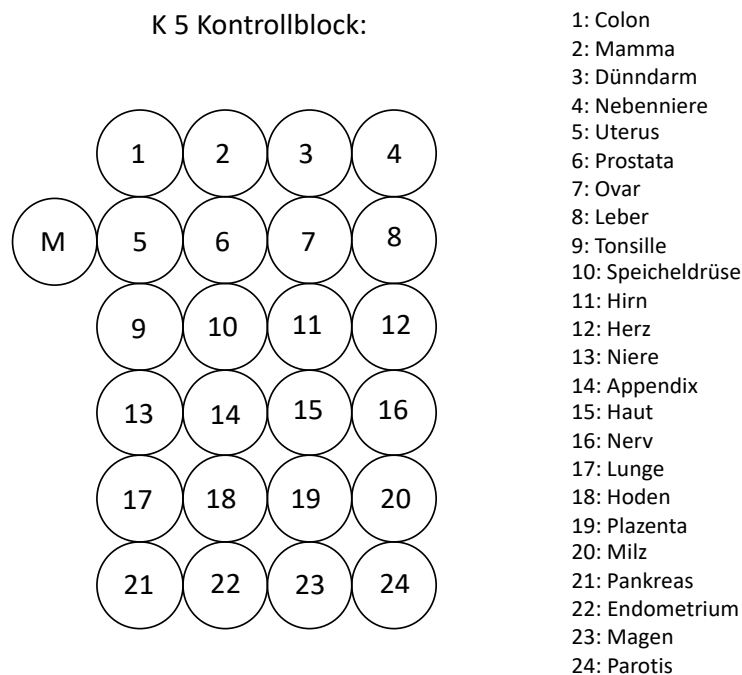
Zusätzlich wurden Negativkontrollen zu jedem Antikörper angefertigt. Diese beinhalteten eine Isotypkontrolle, die das Ausmaß unspezifischer Bindung an das untersuchte Gewebe aufzeigt sowie eine weitere Negativkontrolle, um unspezifische Hintergrundfärbungen des Sekundärantikörpers und des an diesen gebundenen Detektionssystems (Biotin) auszuschließen. Bei dieser Kontrolle wurde das Färbeprotokolls wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings der primäre Antikörper nicht aufgetragen.

Bei der Auswahl der Positiv- und Negativkontrollen wurde sich an der Empfehlung des jeweiligen Herstellers des Antikörpers orientiert oder der humane Proteinatlas zur Hilfe genommen.

Die Kontrolle des Isotyps und die Negativkontrolle ohne den primären Antikörper wurde an dem gleichen Gewebe wie dem der Positivkontrolle durchgeführt. Die Verdünnung der Isotypkontrollen orientierte sich an der Verdünnung des jeweiligen Primärantikörpers.

Der für die Etablierung verwendete Kontrollblock (K5 Block) ist ein sogenannter Tissue Microarray (TMA), welcher vom Institut für Pathologie des UKRs zur Verfügung gestellt

wurde. Auf diesem TMA befinden sich Gewebestanzungen von 24 verschiedenen gesunden Geweben (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Gewebe des K5 Kontrollblocks

In dieser Abbildung sind die jeweiligen Gewebestanzungen, welche sich auf dem K5 Block befinden, abgebildet. In der nebenstehenden Spalte ist den Nummern das Gewebe zugeordnet.

Der Ablauf der Etablierung folgte dem oben aufgeführten immunhistochemischen Färbeprotokoll, bis zum Schritt des Auftragens des Chromogens. Zum Zeitpunkt der Etablierung war die genaue Einwirkdauer des Chromogens noch nicht festgelegt. Es wurden die Positiv-, Negativ- und Isotypkontrolle mit dem Chromogen inkubiert, eine Stoppuhr gestartet und die Färbung unter einem Mikroskop beobachtet. Sobald ein eindeutiges Färbegergebnis vorlag, wurde die Zeit gestoppt. So wurde die jeweilige Einwirkzeit des Chromogens für jeden Antikörper etabliert (siehe 2.2.3.2.). Entsprechende Aufnahmen der Etablierung jedes Antikörpers finden sich im Anhang (siehe 5.4).

### 2.2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die immunhistologischen Färbungen wurden unabhängig von drei Individuen bewertet: Barbara Schwertner (M.Sc., Klinik- und Poliklinik für Dermatologie, UKR), Sebastian Haferkamp (MD, PhD, Klinik- und Poliklinik für Dermatologie, UKR) und Carolin Scherer (Medizinstudentin, UKR).



Zuvor wurden die gefärbten Schnitte mit dem digitalen Mikroskop und Scanner Preci Point M8 eingescannt. Anschließend konnten die Scans mit dem Programm ViewPoint Light geöffnet und von dem/der jeweiligen Evaluator\*in ausgewertet werden.

Zur Auswertung der Färbungen wurde ein Bewertungsschema festgelegt. Jeder Schnitt wurde nach der Prozentmenge an positiv gefärbten Zellen des LM oder LMS beurteilt. Die Prozentschritte erfolgten in 10er Intervallen: 0%, 1-10%, 11-20%..., 91-100%.

Des Weiteren wurden die Schnitte in die Kategorien „negativ, leicht, mittel, stark“ eingeteilt. Die Zuordnung zu der jeweiligen Kategorie erfolgte anhand der prozentualen Auswertung der Färbungen (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Grenzwerte der Kategorien „Negativ, Leicht, Mittel, Stark“

<b>Färbekategorie</b>	<b>Anteil an gefärbten Zellen in %</b>
Negativ	0
Leicht	1-30
Mittel	31-60
Stark	61-100

Tabelle 18 gibt eine Übersicht, in welchem subzellulären Bereich die Proteine (phospho-Akt, total-Akt, PTEN, phospho-P70S6K) lokalisiert sind und demnach eine spezifische Färbung zu erwarten ist (70). Die Information über die zu erwartende Lokalisation der jeweiligen Färbung war hilfreich, um die Farbreaktionen der Schnitte bestmöglich auszuwerten. Die Lokalisationen der jeweiligen Proteine konnten dem humanen Proteinatlas entnommen werden (70).

**Tabelle 14:** Antikörper und die zu erwartende Lokalisation der Farbreaktion

<b>Antikörper:</b>	<b>Lokalisation der Färbung:</b>
phospho-Akt	Kernfärbung
total-Akt	Kernfärbung
PTEN	Kern- / Zytoplasmafärbung
phospho-P70S6K	Kern- /Zytoplasmafärbung

### 2.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism Version 9.0.1 (128) und Microsoft Excel Version 2019. Statistische Details werden bei der entsprechenden Grafik angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Demographische und klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

Die Tabellen 15 und 16 zeigen eine Übersicht über die klinischen und demographischen Charakteristika des Patientenkollektivs. Zusätzlich sind Informationen zur anatomischen Lokalisation, dem Ki67 Index und der  $\alpha$ -SMA Expression aufgelistet. Der Ki67 Index ist ein Proliferationsindex, welcher in Tumoren häufig erhöht ist und Zeichen für ein unkontrolliertes Zellwachstum sein kann.  $\alpha$ -SMA ist ein Protein, welches als histologischer Marker zur Diagnosesicherung für Leiomyome und Leiomyosarkome eingesetzt wird (siehe Kapitel 1.8).

**Tabelle 15:** demographische und klinische Informationen zum Patientenkollektiv mit der Diagnose Leiomyom (LM)

LM	Geschlecht*	Alter**	Lokalisation	Zweitumor/ Rezidiv	Ki67***	$\alpha$ -SMA****
LM1	m	55	Unterarm li.		n. erhöht	positiv
LM2	w	53	Oberarm li.	Lymphom	n. erhöht	positiv
LM3	w	64	Schulter re.		n. erhöht	positiv
LM4	m	68	Rücken		n. erhöht	positiv
LM5	m	66	Rücken		n. erhöht	positiv
LM6	w	38	Oberschenkel re.	SLE*	n. erhöht	positiv
LM7	m	58	Oberarm re.	Psoriasis vulg.	erhöht	positiv
LM8	m	67	Brust		n. erhöht	positiv
LM9	m	39	Brust		n. erhöht	positiv
LM10	m	32	Unterarm li.		n. erhöht	positiv
LM11	w	53	Brust		n. erhöht	positiv
LM12	m	43	Unterarm li.		n. erhöht	positiv
LM13	w	75	Mamille		n. erhöht	positiv
LM14	w	68	Brust		n. erhöht	positiv
LM15	m	69	Brust		n. erhöht	positiv
LM16	w	74			n. erhöht	positiv
LM17	m	40			n. erhöht	positiv
LM18	w	43	Handfläche re.		n. erhöht	positiv
LM19	w	50	Unterarm li.		n. erhöht	positiv

\* m = männlich, w = weiblich, re. = rechts, li. = links

\*\* Alter zum Diagnosezeitpunkt

\*\*\* Ki67 Index: Proliferationsindex

\*\*\*\*  $\alpha$ -SMA: Alpha SMA

**Tabelle 16:** demographische und klinische Informationen zum Patientenkollektiv mit der Diagnose Leiomyosarkom (LMS)

LMS	Geschlecht*	Alter**	Lokalisation	Zweittumor/ Rezidiv	Ki67***	$\alpha$ -SMA****
LMS1	m	76	Schädel re.		erhöht	positiv
LMS2	m	73	Stirn re.		n.erhöht	positiv
LMS3	m	73	Schädel	Rezidiv	n.erhöht	positiv
LMS4	m	96	Nase		n.erhöht	positiv
LMS5	m	52	Pektoral re.		n.erhöht	positiv
LMS6	w	61	Schulter re.		erhöht	positiv
LMS7	m	72	Schädel li.		n.erhöht	positiv
LMS8	m	55	Schulter li.	Melanom	n.erhöht	positiv
LMS9	w	81	Stirn li.		erhöht	positiv
LMS10	m	65	Oberschenkel li.	Lymphom	n.erhöht	positiv
LMS11	m	69			n.erhöht	positiv
LMS12	m	74	Kapillitium		n.erhöht	positiv
LMS13	m	78	Schädel li.		erhöht	positiv
LMS14	w	70	Unterschenkel re.		erhöht	positiv
LMS15	m	76	Stirn	Rezidiv	n.erhöht	positiv
LMS16	w	40			n.erhöht	positiv
LMS17	w	92	Wange li.		n.erhöht	
LMS18	m	78	Stirn re.		n.erhöht	positiv
LMS19	m	81	Schädel re.	Rezidiv	n.erhöht	positiv
LMS20	m	79	Schädel li.		n.erhöht	positiv
LMS21	m	90	Schädel re.	Rezidiv	erhöht	positiv
LMS22	m	72			erhöht	

### 3.1.1 Auswertung demographischer und klinischer Daten des Patientenkollektivs mit Diagnose Leiomyom

Ziel der Analyse der demographischen und klinischen Daten der Patienten war es mögliche Assoziationen herauszuarbeiten.

Tabelle 17 zeigt die Verteilung der Leiomyome auf die jeweiligen anatomischen Lokalisationen unterteilt in obere Extremitäten (oEx), Brust, Rücken und untere Extremitäten (uEx).

**Tabelle 17:** Lokalisation der Leiomyome

<b>Lokalisation</b>	<b>oEx</b>	<b>Brust</b>	<b>Rücken</b>	<b>uEx</b>	<b>unbekannt</b>
Leiomyome	8	6	2	1	2
Anteil in %	42	32	10,5	5	10,5

Die 19 Leiomyome traten bei 9 Frauen und 10 Männern auf, die zum Zeitpunkt der Diagnose im Mittel 55,5 Jahre alt waren.

Die hier untersuchten Leiomyome entsprechen bezüglich anatomischer Lokalisation, geschlechtlicher Verteilung, Durchschnittsalter bei Diagnose und histologischen Merkmalen denen in der Literatur angegebenen Eigenschaften (siehe 1.3). Bei allen Leiomyomen konnte die Expression von  $\alpha$ -SMA nachgewiesen werden. Lediglich bei einem der untersuchten Leiomyome (LM7) wurde ein erhöhter Ki67 Index festgestellt.

### 3.1.2 Auswertung demographischer und klinischer Daten des Patientenkollektivs mit Diagnose Leiomyosarkom

Auch im Patientenkollektiv der Leiomyosarkome wurden demographische und klinische Faktoren erhoben und analysiert.

Bei 4 (18%) Leiomyosarkomen handelte es sich um Rezidive (LMS 3, 15, 19, 21); zwei der Patienten wiesen ein Melanom (LMS8) und ein Lymphom (LMS10) in der klinischen Anamnese auf. Dies ist von Interesse, da Rezidive vor allem bei subkutanen Leiomyosarkomen häufig vorkommen und ein Zusammenhang zwischen Vorerkrankungen und der Entstehung der Leiomyosarkome angenommen wird (siehe Kapitel 1.7). Tabelle 18 zeigt die Verteilung der Leiomyosarkome in Bezug auf ihre Lokalisation.

**Tabelle 18:** Lokalisation der Leiomyosarkome

<b>Lokalisation</b>	<b>Caput/Kopf</b>	<b>oEx</b>	<b>Brust</b>	<b>uEx</b>	<b>unbekannt</b>
Leiomyosarkome	14	2	1	2	3

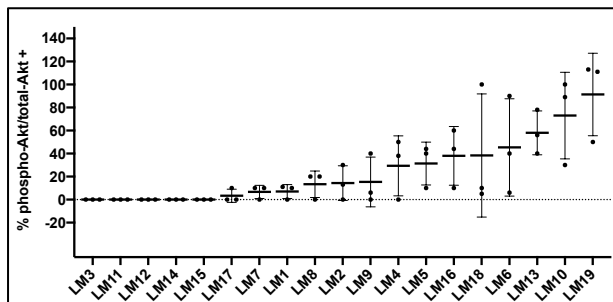
Anteil in %	64	9	4	9	14
-------------	----	---	---	---	----

Die Verteilung zwischen weiblich und männlich beträgt 5 zu 17, das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei 72,8 Jahren. Die geschlechtliche Verteilung und das Alter zum Diagnosezeitpunkt weichen deutlich von den Daten der Leiomyom-Patienten ab. Die Daten unserer Kohorte sind vergleichbar mit größeren Fallsammlungen von kutanen Leiomyosarkomen. Die histopathologischen Untersuchungen ergaben bei allen 22 Leiomyosarkomen den Nachweis von  $\alpha$ -SMA sowie einen erhöhten Ki67 Index bei 7 von 22 Leiomyosarkomen (32%).

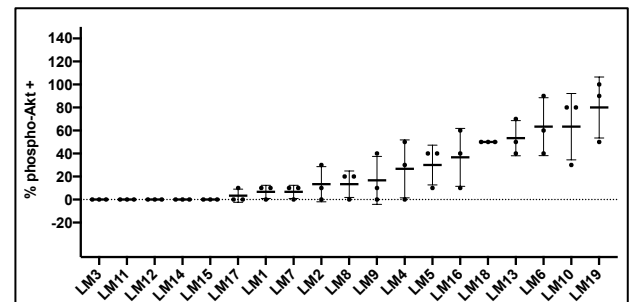
### 3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

#### 3.2.1 Auswertung der Farbreaktionen

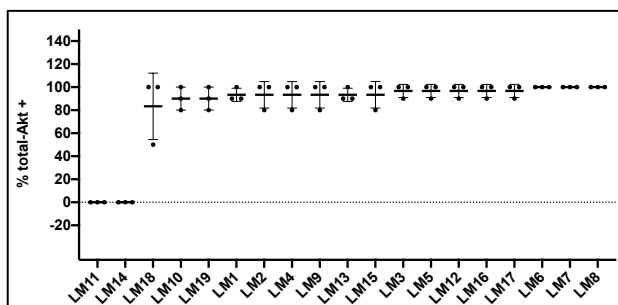
Bei einer Auswertung durch mehrere Personen ist eine gewisse Streuung der Ergebnisse zu erwarten. In Abbildung 6 und 7 sind die Ergebnisse inklusive der jeweiligen Streuungen dargestellt. Aus den Diagrammen geht hervor, dass die Färbungen teilweise unterschiedlich bewertet wurden; dennoch gab es überwiegend eine ähnliche Tendenz in der Kategorisierung der Färberegebnisse der einzelnen Schnitte. In dieser Arbeit wurde mit dem Mittelwert der drei Einzelbewertungen gearbeitet.



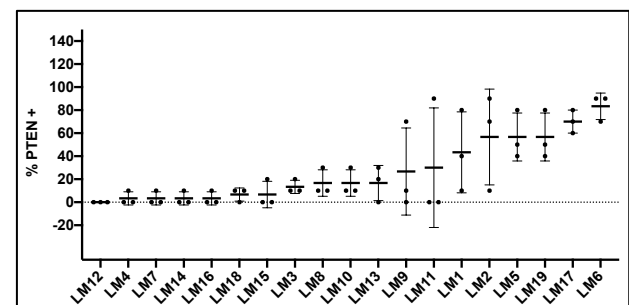
A



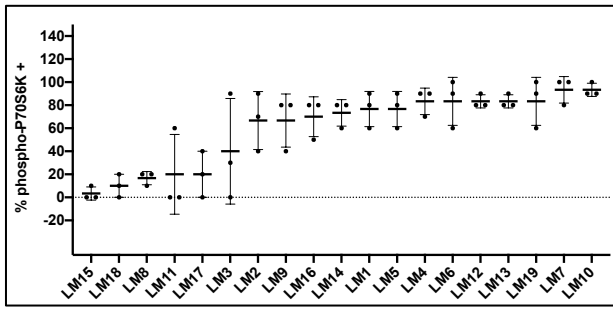
B



C



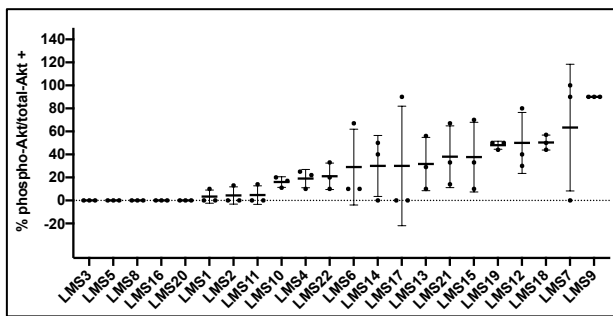
D



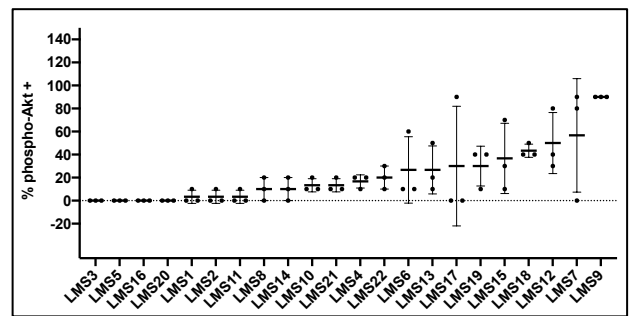
E

**Abbildung 6:** Auswertung der einzelnen immunhistochemischen Färbungen der Leiomyom-Biopsien

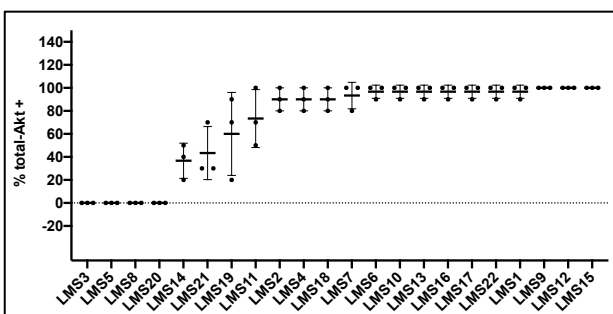
Bewertung der Immunfärbung durch drei unabhängige Personen, die die Farbreaktion der gefärbten Leiomyome für jeden Antikörper in Prozent (A-E) kategorisiert (0%, 1-10%, ..., 91-100%). Die Daten zeigen die Mittelwerte sowie den größten und kleinsten evaluierten Wert für jede Läsion, geordnet nach aufsteigender Positivität für jeden Antikörper.



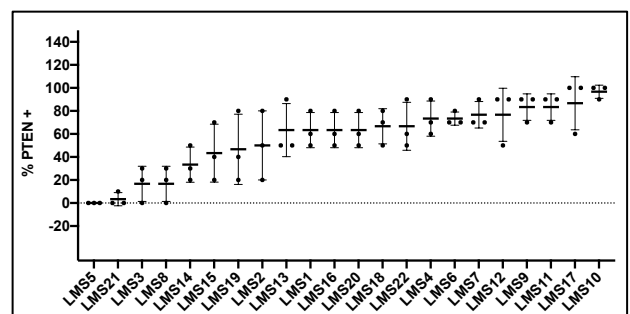
F



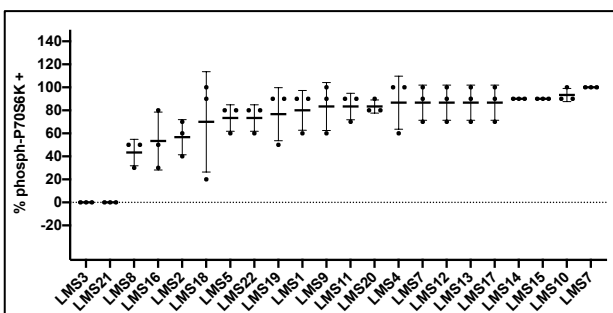
G



H



I



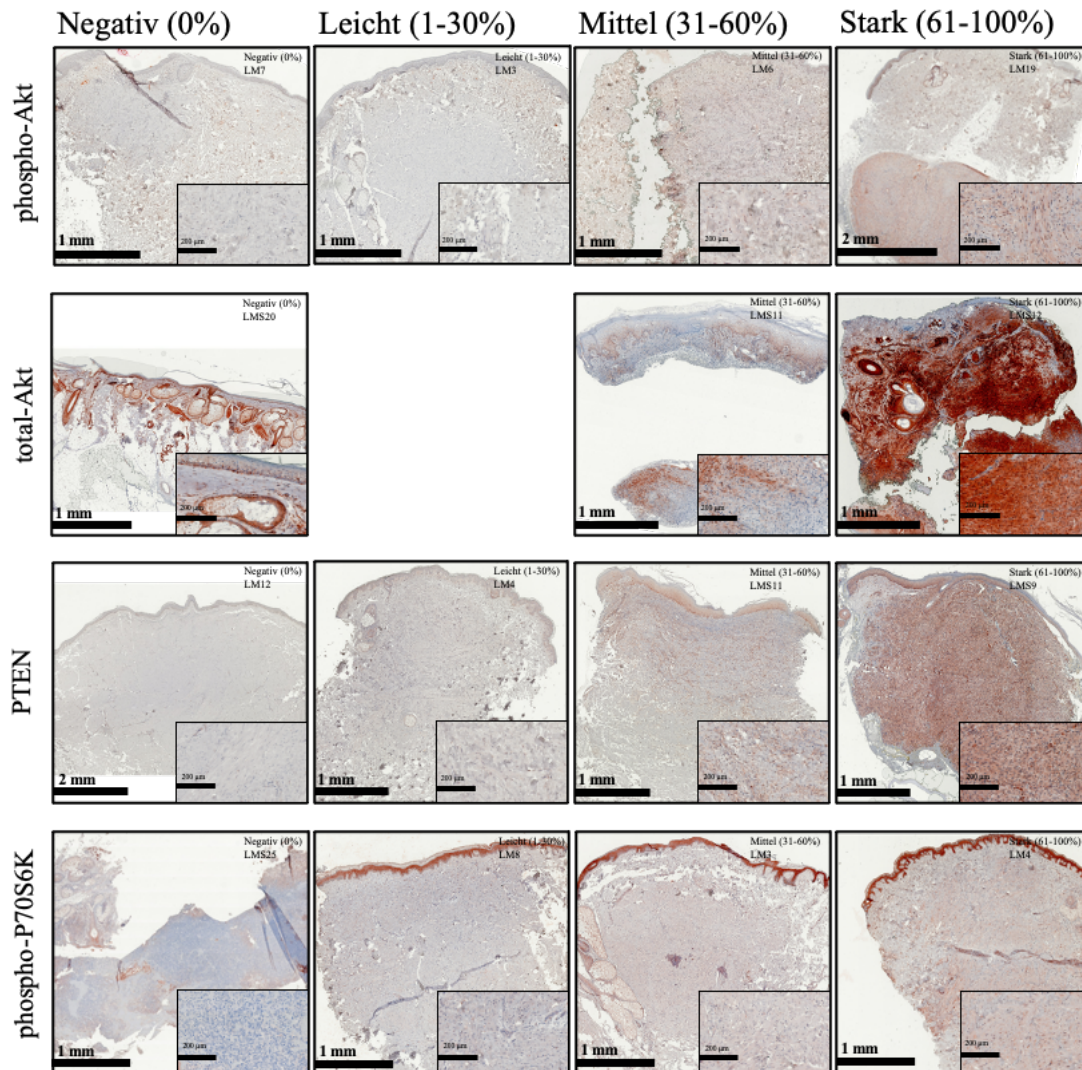
J

**Abbildung 7:** Auswertung der einzelnen immunhistochemischen Färbungen der Leiomyosarkom-Biopsien  
Bewertung der Immunfärbung durch drei unabhängige Personen, die Farbreaktion der gefärbten Leiomyosarkome für jeden Antikörper (F-J) kategorisiert (0%, 1-10%, ..., 91-100%). Die Daten zeigen neben Mittelwert die minimalen und maximalen evaluierten Werte für jede Läsion.

### 3.2.2 Darstellung der Bewertungskategorien für die untersuchten Proteine

Die Farbreaktionen wurden nach der Auswertung durch die Individuen und der Berechnung der jeweiligen Mittelwerte entsprechend dem prozentualen Anteil der positiv gefärbten Leiomyom- und Leiomyosarkomzellen in die Kategorien „Negativ“, „Leicht“, „Mittel“ und „Stark“ eingeteilt. Die Einteilung in diese Kategorien spiegelt die Zuordnung der Leiomyome und Leiomyosarkome zu einem bestimmten Färbeverhalten wider. Die Kategorien sind wie folgt definiert: „Negativ“ = 0%, „Leicht“ zwischen 1-30% positiv gefärbter Zellen, „Mittel“ bei 31-60% und „Stark“ ab 61% positiver Farbreaktionen in den Leiomyomen bzw. Leiomyosarkomen. Eine ausführliche Erläuterung der Auswertung ist im Methodenteil (siehe Kapitel 2.2.5) zu finden.

Abbildung 8 zeigt immunhistochemische Färbungen von ausgewählten Leiomyomen bzw. Leiomyosarkomen, um die jeweiligen Färbekategorien (Negativ, Leicht, Mittel und Stark) für phospho-Akt, total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K beispielhaft darzustellen. Es lassen sich klare Unterschiede in den Farbreaktionen jeder Kategorie feststellen, welche vor allem in den vergrößerten Bildausschnitten gut zu erkennen sind.

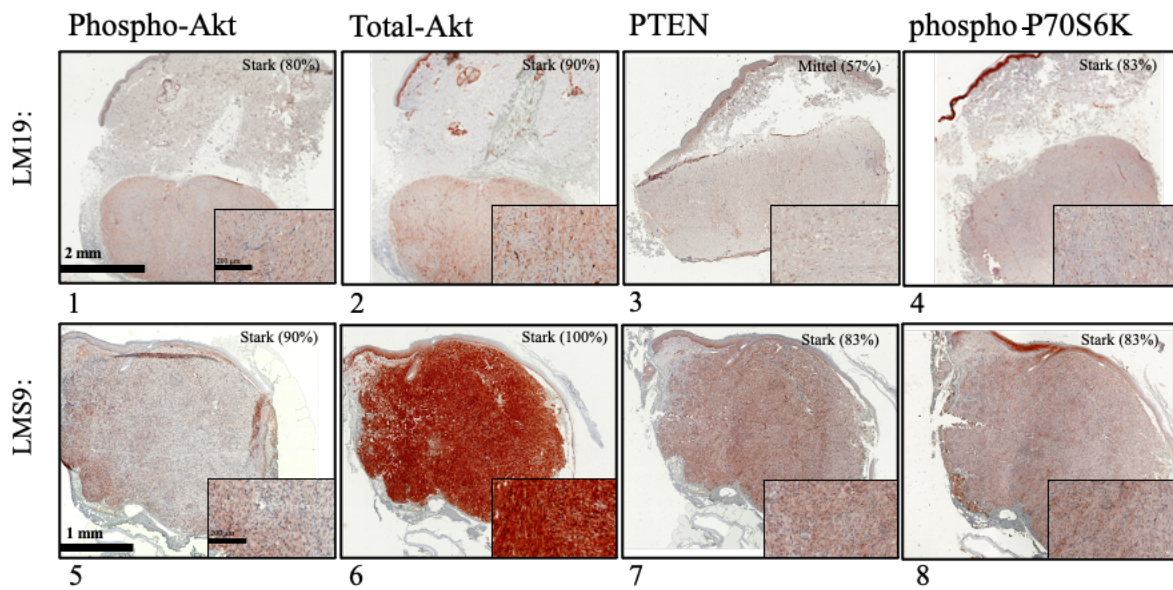


**Abbildung 8:** Beispielhafte Darstellungen der Kategorien „Negativ“, „Leicht“, „Mittel“ und „Stark“  
 A zeigt die einzelnen Kategorien für phospho-Akt, B für das Protein total-Akt, C für PTEN und D für phospho-P70S6K. Entsprechende Größenbalken sind angegeben; unten rechts ist in jedem Bild zusätzlich eine höhere Vergrößerung dargestellt. Die Beschriftungen der Bilder geben Auskunft über die abgebildete Läsion sowie den genauen Prozentwert der positiv gefärbten Anteile und der daraus resultierenden Färbekategorie.

### 3.2.3 Darstellung starker Farbreaktionen aller untersuchten Proteine in Leiomyom 19 und Leiomyosarkom 9

Abbildung 9 zeigt beispielhaft Aufnahmen eines ausgewählten Leiomyoms und Leiomyosarkoms für alle vier immunhistochemischen Färbungen. Das Färbeverhalten einer Gewebebiopsie für alle verwendeten Proteine soll dadurch veranschaulicht werden.



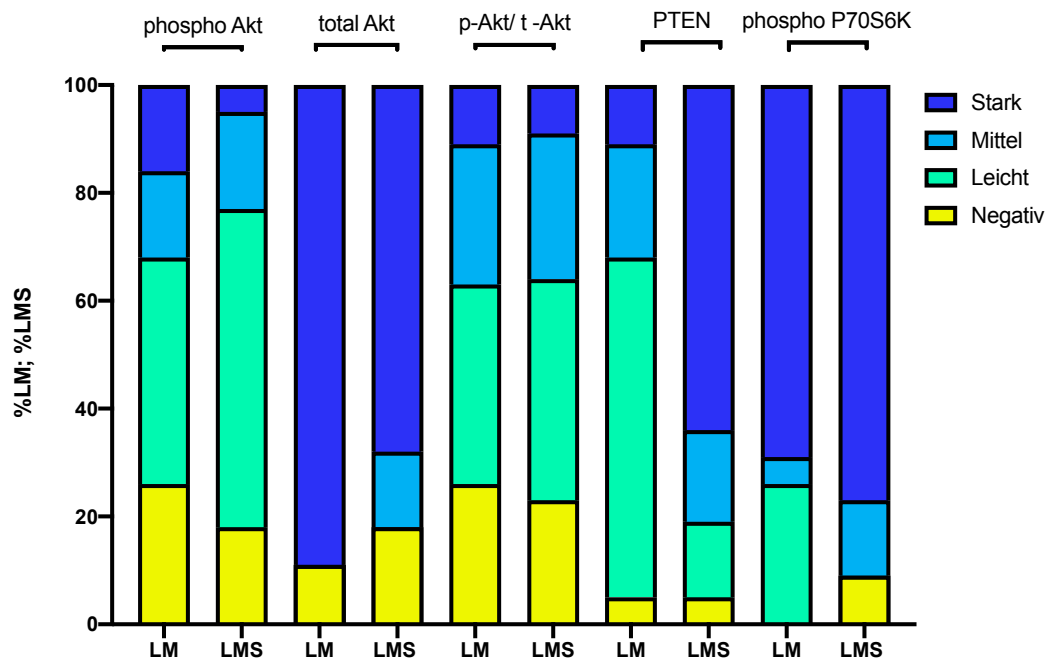


**Abbildung 9:** Beispiel für die Immunfärbung von phospho-Akt, total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K

Die Färbungen werden jeweils in einer Leiomyom Läsion und einer Leiomyosarkom Läsion gezeigt. Entsprechende Größenbalken sind repräsentativ in Bild 1 und 5 enthalten; unten rechts ist in jedem Bild zusätzlich eine höhere Vergrößerung dargestellt.

### 3.2.4 Vergleich des Färbeverhalten der Leiomyome gegenüber der Leiomyosarkome

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die benignen Leiomyome und die malignen Leiomyosarkome basierend auf Unterschieden in der Proteinexpression (phospho-Akt, total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K) und der daraus resultierenden Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges näher beleuchtet werden. In Abbildung 10 sind die immunhistochemischen Färbeergebnisse aller untersuchten Leiomyome und Leiomyosarkome zusammengefasst grafisch gegenübergestellt. Für jedes gefärbte Protein wurde dazu der prozentuale Anteil aller „Negativ“, „Leicht“, „Mittel“ und „Stark“ gefärbten Leiomyome und Leiomyosarkome ermittelt.



**Abbildung 10:** Balkendiagramm der immunohistochemischen Färbungen

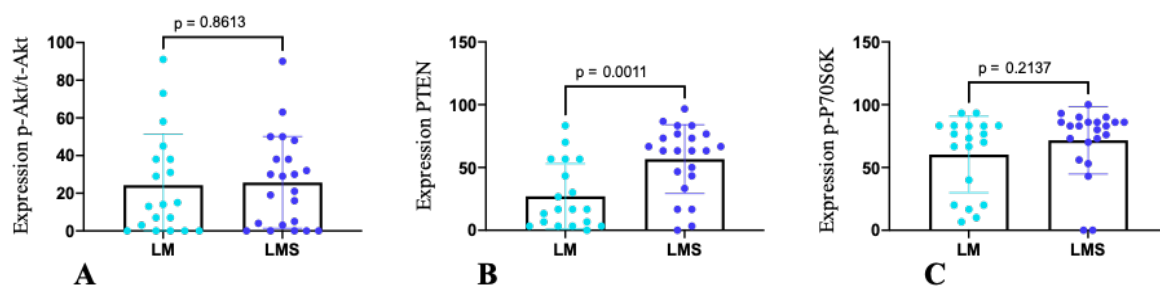
Es werden die Färbungen phospho-Akt/total-Akt; phospho-Akt; total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K aller untersuchten Leiomyome im Vergleich zu allen untersuchten Leiomyosarkomen abgebildet. Die positive Farbreaktion in Prozent der Leiomyome bzw. Leiomyosarkome (%LM; %LMS) für jeden Antikörper wurde in die Färbekategorien „Negativ“, „Leicht“, „Mittel“ und „Stark“ kategorisiert (p-Akt =phospho-Akt; t-Akt =total-Akt).

Bei malignen Tumoren ist der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg häufig aktiviert. Signifikante Unterschiede in der Färbeintensität von phospho-Akt und total-Akt konnten in den von uns untersuchten Leiomyomen im Vergleich zu Leiomyosarkomen nicht festgestellt werden. Anders zeigte sich das Färbeverhalten und somit die Expression von PTEN. Während in den Leiomyomen bei mehr als 60% negative und leichte Färbungen vorkamen, zeigten sich die Leiomyosarkome in mehr als 60% mit einer starken und in 20% der Fälle mit einer mittleren Reaktion. Dies spricht für eine Hochregulation von PTEN in Leiomyosarkomen.

Die phospho-P70S6K-Färbung fiel in beiden Entitäten mit jeweils über 60% in der Kategorie „Stark“ aus. Bei den Leiomyomen konnte kein negatives Färbeergebnis nachgewiesen werden, bei den Leiomyosarkomen dafür keines der Kategorie „Leicht“. Insgesamt weist dieses Verhalten auf eine verstärkte Expression von phospho-P70S6K in beiden Geweben hin, unabhängig der Dignität (benigne versus maligne). Unsere Ergebnisse weisen auf eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs sowohl in Leiomyomen als auch Leiomyosarkomen hin.

Um signifikante Unterschiede in der Expression der jeweiligen Proteine in Leiomyomen und Leiomyosarkomen zu bestimmen, wurden unter Einbeziehung der ermittelten Mittelwerte t-Tests durchgeführt (siehe Abbildung 11 A-C). Ein t-Test der Mittelwerte der Färbung

phospho-Akt/total-Akt in Leiomyomen und Leiomyosarkomen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Entitäten auf ( $p = 0,86$ ) (Abbildung 11 A). Dies geht mit den oben aufgeführten Erkenntnissen aus der Untersuchung des Färbeverhaltens einher. Im Gegensatz dazu ergab die Untersuchung der Mittelwerte der PTEN-Färbung deutliche Unterschiede (Abbildung 11 B). Der starke Expressionsunterschied zwischen Leiomyomen und Leiomyosarkomen bestätigte sich bei der Durchführung eines t-Tests. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression von PTEN festgestellt mit  $p = 0,0011$  (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Vergleich der Expressionsniveaus von phospho-Akt /total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K in Leiomyomen und Leiomyosarkomen

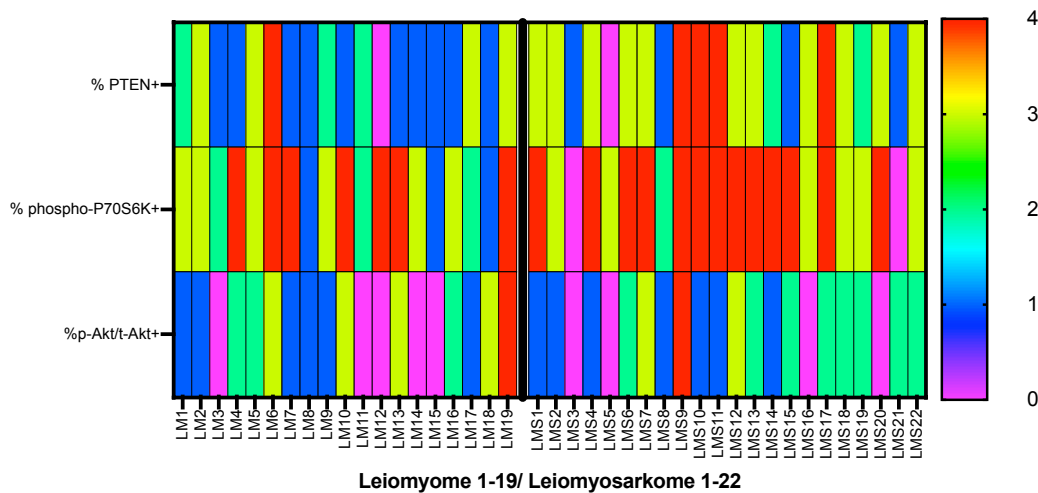
Prozentualer Anteil der Tumore mit positiver Färbung in % für (A) phospho-Akt/total-Akt, (B) PTEN und (C) phospho-P70S6K. Jeder abgebildete Punkt stellt einen gefärbten Schnitt dar. Dargestellt sind außerdem die Mittelwerte und die Standardabweichungen; die Statistiken wurden mit dem t-Test berechnet. LM: Leiomyom, LMS: Leiomyosarkom. B: Der t-Test zum Vergleich der PTEN-Expression in Leiomyomen zu den Leiomyosarkomen fiel mit  $p=0,0011$  signifikant aus (\*\*). Somit ist die Expression von PTEN in Leiomyosarkomen signifikant abweichend von der in Leiomyomen, wobei der Unterschied im Färbeverhalten bereits in Abbildung 10 auffällt. C: Passend zu Abbildung 10 zeigt der t-Test der Leiomyome und Leiomyosarkome bezüglich phospho-P70S6K keinen signifikanten Unterschied mit  $p=0,21$  zwischen beiden Entitäten.

Erwartungsgemäß konnte in einem t-Test über die Expression von phospho-P70S6K kein signifikanter Unterschied bezüglich der Leiomyome gegenüber den Leiomyosarkomen festgestellt werden (siehe C). Der p-Wert betrug 0,21.

Zusammenfassend wurde in den untersuchten Leiomyomen und Leiomyosarkomen eine sehr geringe Expression von phosphoryliertem Akt in Kombination mit einer verstärkten Expression von phospho-P70S6K in beiden Entitäten festgestellt. Ein signifikanter Unterschied beider Tumore stellt sich in Bezug auf PTEN dar. Die Expression von PTEN konnte in den Leiomyosarkomen besonders stark nachgewiesen werden.

### 3.2.5 Analyse von Expressionsmustern

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob es innerhalb der Leiomyome und Leiomyosarkome eine Häufung eines bestimmten Proteinexpressionsmusters sowie Interaktionen zwischen diesen gibt. Unter Proteinexpressionsmustern wird die Koexpression von verschiedenen Proteinen, in diesem Fall phospho-Akt, total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K, innerhalb einer Gewebeprobe verstanden. Zunächst wurde eine Heatmap erstellt (Abbildung 13); in dieser wurde den einzelnen Antikörperfärbungen je nach Stärke der Farbreaktion und somit Expression eine Farbe zugeordnet. Um sich einen besseren Überblick über das Vorkommen der einzelnen Proteine in den benignen und malignen Läsionen zu verschaffen und die Unterschiede zu erkennen, wurden diese im Folgenden voneinander getrennt begutachtet.

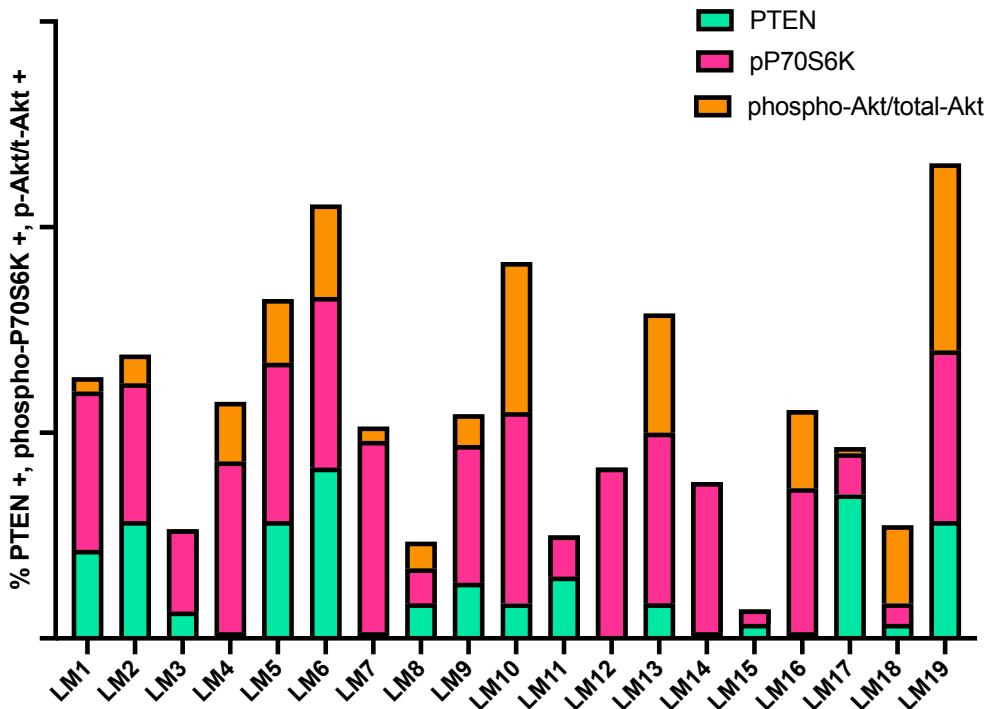


**Abbildung 12:** Stärke der Expression der Proteine phospho-Akt/total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K in Leiomyomen und Leiomyosarkomen

Die Stärke der Expression des jeweiligen Proteins wurde in die Kategorien 0-4 eingeteilt (0=0%; 1= 1-20%, 2= 21-40%, 3=41-60%, 4=61-100%). Es lässt sich erkennen, dass die Expression von phospho-Akt/total-Akt in beiden Entitäten nur sehr gering nachgewiesen wurde (Kategorie 0-2). Phospho-P70S6K zeigt vorwiegend starke Expressionen in beiden Gruppen (Kategorie 3-4), PTEN bewegt sich dazwischen mit einer stärkeren Expression des Proteins in den Leiomyosarkomen (Kategorie 3-4) als den Leiomyomen (Kategorie 1-2). Die gehäufte Koexpression von PTEN und phospho-P70S6K in den Leiomyosarkomen lässt sich in dieser Heatmap optisch darstellen. Ein vermehrtes gemeinsames Vorliegen der Kategorien 3-4 in den Spalten PTEN und phospho-P70S6K verdeutlicht dies. Somit liegt ein Hinweis auf die Existenz eines dominanten Expressionsmusters in Leiomyosarkomen vor.

### 3.2.6 Expressionsmuster in Leiomyomen

Als nächstes wurden Expressionsmuster von phospho-Akt/total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K in den Leiomyomen näher beleuchtet. Abbildung 13 zeigt die Expression von phospho-Akt/total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K in unterschiedlichen Leiomyomen.



**Abbildung 13:** Vorkommen der Expression von phospho-Akt/total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K (LM)

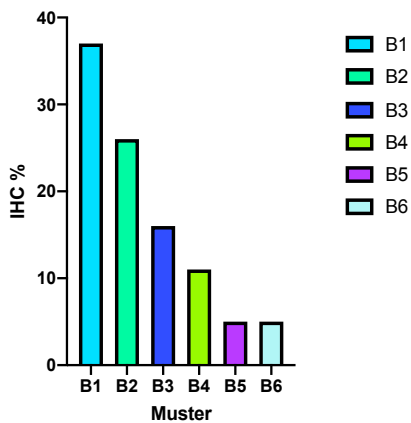
Auf der X-Achse sind die Leiomyome 1-19 aufgeführt, die y-Achse zeigt unterteilt in die Farben türkis (PTEN), rosa (phospho-P70S6K) und orange (phospho-Akt/total-Akt) durch variierende Balkenlängen die Stärke der Expression der einzelnen Färbungen in den jeweiligen Leiomyomen.

Zur Einteilung in Expressionsmuster wurden die jeweiligen Färbereaktionen der Gewebeschnitte anschließend in  $</>50\%$  positive Färbung eingeteilt. Insgesamt konnten 6 Expressionsmuster identifiziert werden (siehe Tabelle 19), von denen das Muster B1 mit 37% am häufigsten vorkam. In 37% der Leiomyome liegt die Kombination aus vermindertem phospho-Akt, PTEN und hochreguliertem phospho-P70S6K vor. Neben dem Expressionsmuster B1 traten 5 weitere Muster zu geringeren Häufigkeiten auf. Diese sind ebenfalls in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19:** Expressionsmuster Leiomyome. Die jeweiligen Expressionsmuster B1-B6 kommen mit unterschiedlichen Häufigkeiten in den Leiomyomen vor

Muster	phospho-Akt/ total-Akt	PTEN	phospho-P70S6K	Häufigkeit
B1	<50%	<50%	>50%	37%
B2	<50%	<50%	<50%	26%
B3	<50%	>50%	>50%	16%
B4	>50%	<50%	>50%	11%
B5	<50%	>50%	<50%	5%
B6	>50%	>50%	>50%	5%

**Expressionsmuster Leiomyome**

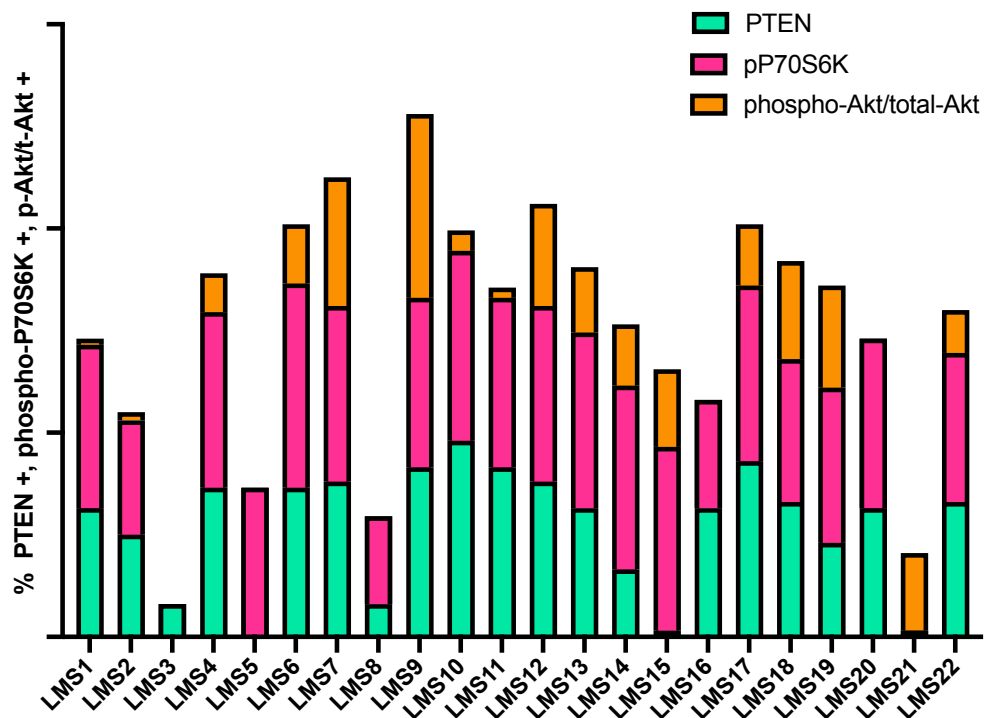


**Abbildung 14:** Prozentuale Mengenverteilung der Expressionsmuster in Leiomyomen

Das Expressionsmuster B1 zeigt sich in der Mehrheit der Leiomyome mit einem deutlichen Abstand zum Expressionsmuster B2.

### 3.2.7 Expressionsmuster in Leiomyosarkomen

Im Folgenden sind die Expressionsmuster in den Leiomyosarkomen (LMS1-22) von phospho-Akt/total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K abgebildet.



**Abbildung 15:** Vorkommen der Expression von phospho-Akt/total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K (LMS)

Auf der X-Achse sind die Leiomyosarkome 1-22 aufgeführt, die y-Achse zeigt unterteilt in die Farben türkis (PTEN), rosa (pP70S6K) und orange (phospho-Akt/total-Akt) die Stärke der Expression der einzelnen Färbungen in den jeweiligen Leiomyosarkomen, welche durch unterschiedliche Länge der Balken verbildlicht wird. Hierbei fallen beispielsweise in den Leiomyosarkomen 1, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12 und 17 auf den ersten Blick die sehr breiten Balken in den beiden Farben türkis für PTEN und rosa für phospho-P70S6K auf, was für eine starke Farbreaktion der Leiomyosarkome in Bezug auf diese Proteine spricht.

Die Einteilung der Expressionsmuster in  $</>$  50% erfolgte wie beim Leiomyom beschrieben (siehe 3.4.1).

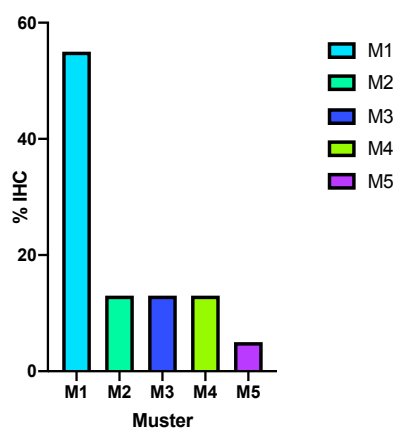
Bei Betrachten der Farbreaktion der Leiomyosarkome auf die Antikörper der vier Färbungen lässt sich ein vermehrt wiederkehrendes Muster erkennen, genauer eine verstärkte Koexpression von PTEN und pP70S6K und einer geringen Expression von phospho-Akt/total-Akt. Dieses Expressionsmuster kommt bei einem Großteil von 55% in Form des Expressionsmusters M1 (siehe Tabelle 20) vor und stellt auch das dominante Expressionsmuster dar. Zusätzlich lassen sich 4 weitere Kombinationen nachweisen, welche jedoch deutlich seltener auftreten und ebenso in Tabelle 20 aufgeführt sind.

In dem Muster M1 liegt phospho-Akt mit weniger als 50% vor, PTEN und phospho-P70S6K hingegen zu über 50%.

**Tabelle 20:** Expressionsmuster der Leiomyosarkome. Die Muster M1-M6 treten mit unterschiedlicher Häufigkeit auf, wobei das Muster M1 deutlich dominiert

Muster	phospho-Akt/ total-Akt	PTEN	phospho-P70S6K	Häufigkeit
M1	<50%	>50%	>50%	55%
M2	<50%	<50%	<50%	13,3%
M3	<50%	<50%	>50%	13,3%
M4	>50%	>50%	>50%	13,3%
M5	>50%	<50%	>50%	5%

**Expressionsmuster Leiomyosarkome**



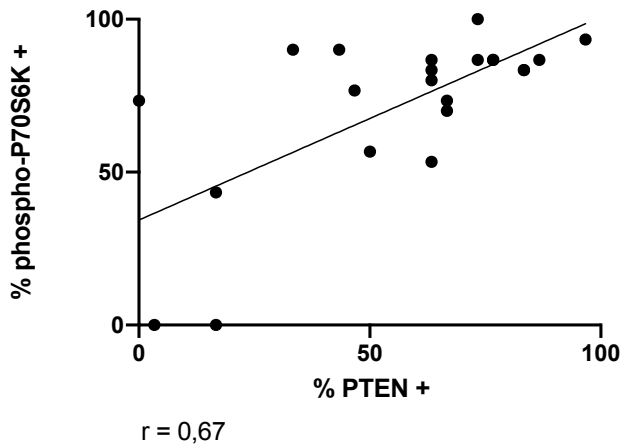
**Abbildung 16:** Mengenverteilung der Expressionsmuster in Leiomyosarkomen

Das Expressionsmuster M1 sticht deutlich als vorherrschendes Expressionsmuster hervor.

Um den linearen Zusammenhang der erhöhten Koexpression von PTEN und phospho-P70S6K zusätzlich zu belegen, wurde der Korrelationskoeffizient berechnet (siehe Abbildung 17). Die Expression von phospho-Akt/total-Akt wurde hierbei bewusst exkludiert, da diese in allen Gewebeproben, sowohl Leiomyom als auch Leiomyosarkom, ähnlich gering ausfiel und daher wenig Aussagekraft in Bezug auf die Expressionsmuster hat. Durch einen Korrelationstest wird der lineare Zusammenhang zweier Variablen bestimmt, wobei der Korrelationskoeffizient ein Maß der Stärke der Korrelation ist. Der Korrelationskoeffizient, bzw. Pearson Wert betrug zwischen phospho-P70S6K und PTEN  $r = 0,67$ , was für einen verstärkten linearen Zusammenhang spricht. Der p-Wert ist mit  $p = 0,0005$  signifikant. Der p-Wert und somit die Signifikanz des Korrelationskoeffizienten gibt die Wahrscheinlichkeit eines systemischen Zusammenhangs zweier Variablen an.

Dies belegt, dass in Leiomyosarkomen mit einer vermehrten Expression von PTEN mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls mit einem erhöhten Vorkommen von phospho-P70S6K zu rechnen ist.





**Abbildung 17:** Korrelationsanalyse der Koexpression von PTEN und phospho-P70S6K in Leiomyosarkomen. Die PTEN-Expression wurde mit der phospho-P70S6K-Expression, beides ermittelt durch Immunhistochemie, korreliert. Die Spearman-Korrelationskoeffizientenanalyse wurde durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient  $r = 0,67$  bestätigt den linearen Zusammenhang.

### 3.3 Korrelation von Expressionsmustern und demographischen sowie klinischen Faktoren

Bezugnehmend auf die demographischen und klinischen Faktoren (Kapitel 3.1) der Patienten in der Anamnese konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem Auftreten von Leiomyomen und Leiomyosarkomen mit den häufigen Expressionsmuster B1 bzw. M1 und Rezidiven, Vorerkrankungen, dem Alter oder dem Geschlecht gefunden werden.

**Tabelle 21:** Korrelation der Expressionsmuster B1/M1 in LM und LMS mit Alter, Geschlecht, Rezidiv/Vorerkrankung.

LM/LMS	Geschlecht	Alter	Vorerkrankung/Rezidiv	Expressionsmuster
LM1	m	55	-	B1
LM4	m	68	-	B1
LM7	m	58	Psoriasis vulgaris	B1
LM9	m	39	-	B1
LM12	m	43	-	B1
LM14	w	68	-	B1
LM16	w	74	-	B1
LMS1	m	76	-	M1
LMS2	m	73	-	M1
LMS4	m	96	-	M1
LMS6	w	61	-	M1
LMS10	m	65	Lymphom	M1
LMS11	m	69	-	M1

LMS13	m	78	-	M1
LMS16	w	40	-	M1
LMS17	w	92	-	M1
LMS18	m	78	-	M1
LMS20	m	79	-	M1
LMS22	m	72	-	M1

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es onkologisch bedeutsame Signalwege in kutanen Leiomyomen und Leiomyosarkomen zu charakterisieren. Hierzu zählen der PI3K- und mTOR-Signalweg, welche vorwiegend wichtige Funktionen in den Bereichen der Zellproliferation und des Zellwachstums innehaben.

Detaillierte Untersuchungen dieser Signalwege können zu einem besseren Verständnis der Entstehung von Tumoren und deren gegenseitige Abgrenzung verhelfen sowie Therapiemöglichkeiten aufzeigen.

Eine gängige Methode zur Detektion von Molekülen und Proteinen in Gewebeproben stellt die Immunhistochemie dar. Diese Methode ermöglicht einen kostengünstigen und bei Einhalten der standardisierten Protokolle validen Nachweis von Proteinen.

### *4.1 Diskussion der Patientenwahl und Einschlusskriterien*

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben von insgesamt 41 Patienten untersucht, darunter 19 Leiomyome und 22 Leiomyosarkome. Das Einschlusskriterium war die histopathologische Diagnose eines kutanen Leiomyoms bzw. Leiomyosarkoms durch die dermatologische Klinik des UKRs innerhalb der letzten zehn Jahre (2010-2020). Kutane Leiomyome und Leiomyosarkome sind sehr seltene Entitäten, welche sich klinisch vielseitig präsentieren können, was die Diagnosefindung erschwert (12, 32).

Die Anzahl der von uns untersuchten Proben ergab sich einerseits durch die Seltenheit von kutanen Leiomyomen und Leiomyosarkomen (17, 31), andererseits wurden bewusst ausschließlich Patienten des UKRs in die Arbeit aufgenommen, um eine möglichst vollständige Auswertung der Ergebnisse in Kombination mit den demographischen und klinischen Daten sowie Vorbefunden zu ermöglichen.

### *4.2 Diskussion der Methode*

Die Immunhistochemie stellt eine bewährte Methode zum Nachweis von Proteinen und anderen Molekülen in Geweben dar. Sie hat sich über die letzten Jahrzehnte stetig weiterentwickelt und durch Fortschritte in den Färbemethoden sowie der Herstellung spezifischer und sensitiver Antikörper an Genauigkeit und Aussagekraft gewonnen (82). In den vorliegenden Färbereihen wurde in den Gewebeproben die Expression von phospho-Akt, total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K untersucht, welche sich allesamt durch immunhistochemische Färbungen nachweisen lassen (70).

Trotz standardisierter Abläufe sowie der Anwendung qualitativ hochwertiger Antikörper existieren in immunhistochemischen Versuchen Faktoren, welche die Reliabilität der Ergebnisse beeinflussen können und die Reproduzierbarkeit erschweren (83).

#### 4.2.1 Schwächen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, durch welches Biomaterialien hinsichtlich ihrer Proteinausstattung untersucht werden können. Die Anwendbarkeit der IHC bezieht sich auf den Nachweis von Proteinen und die jeweiligen Verteilungsmuster. Somit ergibt sich ein breites Einsatzspektrum in den Bereichen der klinischen Routinediagnostik sowie der Forschung (84). Einen besonders hohen Stellenwert hat die IHC in der Diagnostik von Tumoren (85). Trotz der häufigen Anwendung wurde bis heute keine allgemeine Standardisierung der Analysekriterien bzw. der Färbemethoden eingeführt (84), sodass unterschiedliche Protokolle in unterschiedlichen Laboren befolgt werden.

Allerdings können trotz Befolgen eines standardisierten Färbeprotokolls, methodische Unterschiede auftreten, welche die Vergleichbarkeit erschweren und zu abweichenden Ergebnissen der Färbereihe führen können (86). Insbesondere finden sich bei den manuellen Abläufen Fehlerquellen, wie beispielsweise Verunreinigungen des Arbeitsplatzes und ungenaues Pipettieren, welche die Ergebnisse beeinflussen können (84).

Neben den Fehlerquellen bei der Durchführung der IHC-Färbung können auch in der anschließenden Auswertung durch unabhängige Individuen Diskrepanzen auftreten. Hinzu kommt, dass die Auswertung der Farbreaktionen von den subjektiven Eindrücken der Betrachter abhängt, was sie schwer reproduzierbar macht. Zudem führt ein unterschiedliches Maß an Erfahrung und Präzision zu abweichenden Ergebnissen (85, 87).

Daraus resultierend lässt sich ableiten, dass immunhistochemische Untersuchungen und Anaylsen eine Intra- und Interobserver-Variabilität aufweisen (88). Unter Intraobserver-Variabilität versteht man die voneinander abweichenden Ergebnisse, die ein und dieselbe Person produziert, allerdings zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Interobserver-Variabilität beschreibt die Unterschiede in der Auswertung zwischen den jeweiligen Individuen.

Aus diesen Gründen ist es ratsam, die Färbereihe von mehreren Betrachtern beurteilen zu lassen, um eine möglichst valide Aussage treffen zu können und der Inter-/Intraobserver-Variabilität entgegenzuwirken. Jeder weitere Begutachter erhöht die Präzision (85). Ein wichtiges Bias, welches unbedingt vermieden werden sollte, ist die Beeinträchtigung der jeweiligen Auswertung durch die Individuen untereinander (89).

Bei der Durchführung dieser Arbeit wurde versucht, potenzielle Fehlerquellen bestmöglich zu vermeiden. Die jeweiligen Färbereien wurden mit Antikörpern einer Charge inkubiert, es wurde auf exaktes Pipettieren und Berechnen der Verdünnungen geachtet, einheitliche Einwirkzeiten der Substrate berücksichtigt und Verunreinigungen durch regelmäßiges Reinigen der Materialien vorgebeugt. Die Schnitte in dieser Arbeit wurden von drei unabhängigen Individuen analysiert und ausgewertet.

#### 4.2.2 Auswertung durch menschliche Individuen versus durch künstliche Intelligenz

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben ergeben Auswertungen durch menschliche Individuen potenzielle Fehlerquellen, da aufgrund der Intra- und Interobserver-Variabilität die Ergebnisse mitunter stark voneinander abweichen können (90). Zusätzlich können Unterschiede im Equipment, der Erfahrung und der Interpretation von Bewertungskriterien zu Diskrepanzen in der Analyse führen (siehe 4.2.1) (89).

In den letzten Jahren hat es auf dem Feld der künstlichen Intelligenz zahlreiche Fortschritte und Errungenschaften gegeben. Unter anderem erreichten bildanalytische Verfahren der künstlichen Intelligenz in vielen Fällen die für den klinischen Einsatz geforderte Genauigkeit und konnten teilweise die Leistung menschlicher Fachexperten übertreffen (91).

Im Jahr 2017 veröffentlichten A. Esteva, *et al.* der Stanford University in der Zeitschrift „Nature“ einen Artikel, der für großes Aufsehen sorgte. Es handelte sich um die Auswertung von Bildern dermalen Läsionen durch ein sogenanntes „gefaltetes neuronales Netzwerk/künstliches neuronales Netzwerk“ (KNN), auf Englisch „Convolutional Neural Network“ (CNN) (92). Dieses gefaltete neuronale Netzwerk ist eine Sonderform eines künstlichen neuronalen Netzes, das speziell auf maschinelles Lernen und die Verarbeitung von Bilddaten ausgelegt ist. Um das neuronale Netzwerk mit Informationen zur Auswertung von Bildern zu speisen, ist der Vorgang des „Deep Learnings“, zu Deutsch „mehrschichtiges Lernen“, notwendig. Dieser beschreibt maschinelles Lernen, wodurch künstliche neuronale Netzwerke mit zahlreichen Zwischenschichten gespeist werden, sodass sich eine umfangreiche Informationsstruktur ausbildet (93). Dadurch können Informationen besser und detaillierter verarbeitet werden.

Die Arbeitsgruppe der Stanford University strebte die Entwicklung eines Computers an, welcher der Tätigkeit eines Dermatologen in drei grundlegenden diagnostischen Verfahren gerecht werde: die Unterscheidung zwischen Plattenepithel Karzinomen und Melanomen, die Beurteilung beider Entitäten sowie die Einteilung von Plattenepithel Karzinomen und

Melanomen mithilfe eines Dermatoskops (92). Es wurden die Befunde von 21 zertifizierten Dermatologen über dermale Läsionen mit den Ergebnissen des KNNs zu selbigen verglichen. Sowohl im Bereich der Sensitivität sowie der Spezifität war das KNN System den Dermatologen überlegen. Das KNN übertraf bei der Bewertung von Plattenepithel Karzinomen und Melanomen 96 % bzw. 94 % der Dermatologen in Bezug auf die Sensitivität und zu 96 % in Bezug auf die Spezifität (92). Dieses Experiment zeigte, dass die Einspeisung großer Daten- und Informationsmengen Maschinen bzw. Computer befähigt, je nach Fachbereich Krankheitsbilder mit gleichwertiger, wenn nicht sogar höherer Sensibilität und Spezifität als Menschen zu erkennen und diese zu diagnostizieren. Der Einsatz künstlicher Intelligenz im Bereich der Medizin ist somit Realität geworden (94).

Trotz der großen Fortschritte und positiven Ergebnisse bringt die Arbeit mit künstlicher Intelligenz zum momentanen Zeitpunkt Herausforderungen mit sich.

Zum einen sind diese aufwendigen Technologien aufgrund ihrer Neuheit weder im klinischen Alltag erprobt noch den Ärzten und Patienten im Umgang geläufig (95). Somit könnte es durch Unwissenheit in der Anwendung zu Fehlern kommen, welche letztendlich die Diagnose und adäquate Therapie verfälschen oder verzögern könnten (96). Dies würde das Vertrauen der Patienten und somit die Basis guter Betreuung und Behandlung schwächen. Hinzu kommt, dass die Erstellung künstlicher Intelligenz (KI) gestützter Programme zum momentanen Zeitpunkt einen außerordentlich großen Arbeitsaufwand und Kosten für Kliniken bedeutet, da die Entwicklung eines entsprechenden Logarithmus bis dato wenig etabliert und sehr zeitintensiv ist sowie von Experten vorgenommen wird, um der Komplexität der Technologie gerecht zu werden (91, 97). Bezugnehmend auf die vorliegende Arbeit wären die Kosten einer Auswertung durch KI bei begrenztem Budget weder durch die Menge an Gewebeproben noch den Umfang der Färbungen gerechtfertigt gewesen. Eine Auswertung der 41 Läsionen war durch drei Personen gut durchführbar, weshalb auch keines der oben aufgeführten Auswertungsprogramme angewendet werden musste.

Zuletzt ist noch aufzuführen, dass das Misstrauen der Gesellschaft in diesen neuen Technologiebereich nach wie vor sehr stark ausgeprägt ist, wodurch die Anwendung im Alltag nicht erleichtert wird (96). Abhilfe könnte hier verstärkte Aufklärung und Transparenz in Bezug auf die Funktionsweise schaffen.

Trotz der aktuellen Schwierigkeiten stellen die Entwicklungen der KNNs und des Deep Learnings langfristig zukunftsreiche Bereiche dar, welche in den nächsten Jahren zunehmend in den medizinischen Alltag integriert sein werden (94).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass eine Diagnose und Auswertung von medizinischem Material und Experimenten mithilfe künstlicher Intelligenz oder einem digitalen Auswertungsprogramm einige Vorteile bietet, wobei bei der Entscheidung der Kosten-Nutzen-Faktor sowie der Aufwand mitberücksichtigt werden sollten (97). Ein Beispiel, in dem die Verwendung künstlicher Intelligenz sowie Bildauswertungsprogrammen einen Vorteil bieten würden, wären Experimente mit sehr hohen Fallzahlen sowie der Beurteilung großer Bildmengen. Hierbei können diese neuen Technologien einen wertvollen Beitrag leisten, sodass der Nutzen die Kosten und den Aufwand rechtfertigen würde (98).

### 4.3 Interpretation der Ergebnisse

#### 4.3.1 Signalwege in Leiomyomen

Die Rolle des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs für die Pathogenese des Leiomyoms und Leiomyosarkoms wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (99-105).

In Bezug auf Leiomyome wurde das Auftreten von PI3K/Akt/mTOR-Signalweg relevanten Proteinen vorwiegend in uterinen Leiomyomen festgestellt. So beschrieben Boharay, *et al.* (99) in ihrer Studie einen klaren Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Östrogen, Progesteron und Wachstumsfaktoren und der Entwicklung von uterinen Leiomyomen. Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wurde neben Wachstumsfaktoren wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) (106) und dem Insulin-like-growth Factor (IGF) auch von G-Protein- und Membrangekoppelten Steroid Rezeptoren stimuliert (51). Die Aktivität der Signalwege und somit ihr Einfluss auf die Pathogenese dieser Tumore konnte in Karra L, *et al.* (2010) (107) und Crabtree JS, *et al.* (2009) (108) ebenfalls belegt werden.

Interessanterweise konnte Jeong YJ, *et al.* (2010) (109) ein erhöhtes Vorkommen von PTEN in Leiomyomen nachweisen, wohingegen phosphoryliertes Akt vermindert vorlag.

Crabtree JS, *et al.* konnte eine Hochregulation des mTOR-Signalwegs sowohl in humanen als auch tierischen Leiomyomen vorfinden. Somit lässt sich festhalten, dass Mutationen in Genen des PI3K/Akt/mTOR-Signalweg oder in PTEN, welche eine Hochregulation bzw. Inaktivierung bewirken, mit hoher Wahrscheinlichkeit Einfluss auf die Pathogenese von uterinen Leiomyomen haben.

Hinsichtlich der Rolle von Signalwegen in kutanen Leiomyomen ist bisher nur wenig bekannt. In Zusammenhang mit familiären Krebs Syndromen, wie beispielsweise dem der Hereditäre Leiomyomatose und Nierenzellkarzinom (HLRCC), auch Reed Syndrom genannt (110), kommt es zum Auftreten von Leiomyomen. Hierbei liegen Mutationen der Fumarat Hydratase (FH) vor, einem mitochondrialen Gen (111). Dies führt unter anderem zur

Ausbildung zahlreicher Leiomyome, welche mitunter kutan auftreten. Bei bis zu 15% der betroffenen Patienten treten zusätzlich Nierenzellkarzinome auf (112, 113).

In Fallberichten zu primär kutanen Leiomyomen (11) wird vor allem auf die Lokalisation, Symptome und potentielle Behandlungsmöglichkeiten eingegangen (114, 115), nicht jedoch auf Analysen von Signalkaskaden. In dieser Arbeit wurden 19 Leiomyome und 22 Leiomyosarkome durch immunhistochemische Färbungen von phospho-Akt, total-Akt, PTEN und phospho-P70S6K charakterisiert. Die gefärbten Schnitte wurden durch drei unabhängige Individuen ausgewertet. Anschließend erfolgte eine Einteilung der Färbereaktionen in die Kategorien „Negativ“, „Leicht“, „Mittel“ und „Stark“, sodass Tendenzen der einzelnen Färbungen herausgearbeitet werden konnten. Bereits hier fielen Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede in dem Färbeverhalten von Leiomyomen und Leiomyosarkomen auf.

Bei der Gesamtheit der Leiomyome fielen die Färbungen für phospho-Akt überwiegend schwach aus (26% „Negativ“, 42% „Leicht“, 16% „Mittel“, 16% „Stark“), wohingegen total-Akt in einem Großteil der Gewebeproben hochgradig positiv nachgewiesen werden konnte (11% „Negativ“, 89% „Stark“). In Bezug auf die Proteine PTEN und phospho-P70S6K fiel ein klarer Unterschied in der Expression auf. PTEN konnte nur in wenigen Leiomyomen deutlich positiv nachgewiesen werden (5% „Negativ“, 63% „Leicht“, 21% „Mittel“, 11% „Stark“). Phospho-P70S6K wurde in einem Großteil der Leiomyome sehr stark exprimiert (26% „Leicht“, 5 % „Mittel“, 69% „Stark“). PTEN ist ein Tumorsuppressorprotein, welches als Inhibitor gilt und die Aktivität von PI3K/AKT/mTOR hemmt. Es wurde erwartet, dass PTEN in den benignen LMs vermehrt exprimiert vorliegt und somit den PI3K/Akt/mTOR Signalweg behindert. Dementsprechend fiel das Färbeverhalten von PTEN in den hier untersuchten Leiomyomen überraschend gering aus.

Da die Interaktion der Proteine untereinander von großem Interesse ist, wurde beschlossen, aus den vorliegenden Färbeergebnissen sogenannte Expressionsmuster zu generieren, um einen besseren Überblick bezüglich der Regulation der Signalwege in den Leiomyomen zu erlangen. Die häufigste Konstellation, welche bei 37% aller Leiomyome auftrat, war das Expressionsmuster B1, bei welcher die Färbungen phospho-Akt/total-Akt und PTEN mit weniger als 50% positiv gefärbten Zellen vorlagen und phospho-P70S6K mit über 50% positiv anfärbte. Dies würde, ebenfalls wie bei der gesamten Betrachtung aller Leiomyome, für das Vorliegen eines inaktiven PI3K/Akt-Signalwegs sowie für eine Hochregulierung des mTOR-Signalwegs sprechen. Daraus ließe sich ableiten, dass eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs auch unabhängig von einer Aktivierung des PI3K/Akt-Komplexes vorliegen kann, welcher dem mTOR-Signalweg vorgeschaltet ist (72). In dem Artikel von Wang, *et al.*



(2001) wurde in Bezug auf die Phosphorylierung der P70S6-Kinase ähnliches festgestellt (116). Hier zeigte sich, dass die Aktivierung der P70S6-Kinase überwiegend abhängig von der Phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) ist (116). Die PDK1 gehört den sogenannten AGC Kinasen an, einer Subgruppe von Proteinkinasen mit katalytischen Funktionen (117). Diese Subgruppe enthält 60 Kinasen, darunter PDK1 sowie Akt und die phospho-P70S6Kinase. Im Falle einer Aktivierung der PDK1 könnte diese das P70S6K unabhängig von Akt phosphorylieren und aktivieren, sodass ein Nachweis der PDK1 in Leiomyomen in weiteren Studien nachgewiesen werden sollte.

In der Arbeit von Nicklin, *et al.* (2009) wurde festgestellt, dass neben dem Signalweg PI3K/Akt auch die Aufnahme von Aminosäuren, wie beispielsweise L-Glutamin, in Zellen mTORC1 aktivieren können (118). mTORC1 ist ein Bestandteil des mTOR-Proteinkomplexes und führt bei Aktivierung zur Phosphorylierung von Funktionsproteinen. Diese Aktivierung läuft über Signalwege der Rag GTPase, MAP/ERK Kinase Kinase Kinase 3 (MEK3) (119, 120). Somit könnte eine Aktivität der phospho-P70S6 Kinase unabhängig vom PI3K/Akt Signalweg und bedingt durch andere Signalwege bei gleichzeitig niedrigem phospho-Akt vorliegen.

Das Expressionsmuster B2 zeigte mit 26% Häufigkeit in allen untersuchten Leiomyomen weniger als 50% positiv gefärbte Zellen bzw. Zellkerne für alle 3 Antikörper, was sowohl auf eine Inaktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs als auch eine Herabregulation des PTEN-Proteins hinweist. In diesem Falle könnten onkogene Signale durch anderweitige Einflüsse von Proteinen oder Signalwegen begründet sein (121).

Das Muster B3 hingegen präsentiert sich mit einer Häufigkeit von 16% in den Leiomyomen. Positiv mit über 50% waren PTEN und phospho-P70S6K, phospho-Akt/total-Akt lag bei unter 50%. Auch diese Koexpression würde die obige These einer PI3K/Akt unabhängigen Aktivierung stützen. Hinzu kommt, dass PTEN als Tumorsuppressorprotein die Aktivierung von PI3K/Akt unterbindet (75), sodass die Aktivierung von phospho-P70S6K auf anderem Wege stattgefunden haben muss.

Das Expressionsmuster B4 lag zu 11% vor und zeigte im Gegensatz zu den vorigen Mustern eine erhöhte Expression von phospho-Akt und phospho-P70S6 Kinase, sowie einer verminderten Expression von PTEN. Dies würde für ein Zusammenspiel der PI3K/Akt/mTOR-Signalwege sprechen. PTEN liegt hier in geringer Menge vor, sodass die Phosphorylierung von Akt und dessen Aktivierung stattfinden kann. Daraus resultiert die nachfolgende Phosphorylierung von P70S6K und Aktivierung des mTOR-Signalweges.

Die Muster B5 und B6 wurden jeweils in 5% der Proben nachgewiesen. B5 zeigte eine Hochregulation von PTEN und eine geringe Expression von phospho-Akt und phospho-P70S6 Kinase. PTEN hat unter anderem die Funktion, die Interaktion von PI3K/Akt zu unterdrücken, sodass eine Hochregulation von PTEN eine geringe Aktivität von phospho-Akt und der P70S6-Kinase durchaus erklären würde (122). In B6 liegen alle drei Färbungen verstärkt positiv vor.

Die Heterogenität in den Expressionsmustern des Leiomyoms, welche in dieser Arbeit festgestellt wurde, kann verschiedene Gründe haben. Osaki, *et al.* (2004) beschrieben in ihrem Artikel, dass die Interaktion von Akt und mTOR noch unzureichend erforscht ist (72), da beide Kinasen neben dem gegenseitigen Einfluss aufeinander durch Signale von außen beeinflusst werden können.

Auch das Vorkommen und die Funktion von PTEN und seinen diversen Subtypen in Signalwegen bzw. Tumoren ist nur zu einem bestimmten Anteil geklärt. PTEN gilt als Tumorsuppressor Gen, welches die Aktivität von Tumor-Signalwegen mindert (123); durch Mutationen und Protein-Instabilität kann es zu einem Verlust von PTEN oder einer Änderung dessen Wirksamkeit kommen, wodurch sich die onkogenen Signalwege durchsetzen können. Diese Mutationen konnten wiederholt in Tumoren nachgewiesen werden (123). Zudem gilt PTEN zunehmend als prognostischer und prädiktiver Biomarker für die Entwicklung maligner Erkrankungen und Syndrome. Das Fehlen von PTEN in Tumoren hat sich als relevant für das Outcome, die Überlebensrate und die Ansprechrate auf Therapieoptionen gezeigt (124). Des Weiteren sind Mutationen im PTEN Gen oft mit Syndromen vergesellschaftet, den sogenannten PTEN Hamartom Syndromen (PHTS) (125).

In dem Artikel von HU, *et al.* (2020) wurden uterine Leiomyome von 9 weiblichen Patienten genetisch untersucht. Hierbei konnte erstaunlicherweise das gleichzeitige Vorliegen des Tumorsuppressor Protein PTEN im Wildtyp sowie aktives phospho-Akt und mTOR in allen 9 Proben nachgewiesen werden (126). Das gemeinsame Auftreten von Proteinen der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade und Tumorsuppressor Proteinen wie PTEN stellt die gegenseitige Wirkung von PI3K/Akt/mTOR und PTEN aufeinander in Frage.

Ergänzend dazu konnte Slipicevic, *et al.* (2005) das Vorliegen aktivierten phospho-Akts mit zeitgleich hochreguliertem PTEN in Melanomen nachweisen (127). Slipicevic führt einen interessanten Gedanken in Bezug auf die zeitliche Verkettung der gegenseitigen Aktivierung bzw. Hemmung von Proteinen untereinander an; es wurde überlegt, ob beispielsweise eine Aktivierung des PI3K/Akt/ mTOR-Signalwegs nicht akut, sondern zeitlich versetzt zu einer

Hemmung des PTENs führen könnte, sodass je nach Zeitpunkt der Untersuchung mehr bzw. weniger aktives PTEN zeitgleich mit phospho-Akt nachgewiesen werden kann (127).

Neben der Erforschung der Aufgaben von PTEN in der Zellzyklusregulation wurde auch den unterschiedlichen Mutationen, welche zu einer Strukturänderung von PTEN führen, sowie der potenziellen Rolle der Haploinsuffizienz Aufmerksamkeit zuteil (121, 128, 129). Das Zusammenspiel von PI3K/Akt/mTOR und PTEN, sowie zahlreichen weiteren Proteinen bleibt weiterhin Gegenstand der Forschung (121, 130).

#### 4.3.2 Interpretation demographischer und klinischer Faktoren in Leiomyomen

Bezüglich demographischer und klinischer Parameter zeigte das Patientenkollektiv der in dieser Arbeit untersuchten Leiomyome sowohl Übereinstimmungen als auch Abweichungen zu publizierten Kollektiven.

Das durchschnittliche Alter zum Diagnosezeitpunkt lag bei 55,5 Jahren, die geschlechtliche Verteilung bei 9:10 von Frauen zu Männern. In der Arbeit von Fisher, *et al.* (1963) wurde das Auftreten zwischen dem 20-40 Lebensjahr angegeben, jedoch wird ebenso eine Diagnose im höheren Alter als verbreitet beschrieben (13). Ein möglicher Grund für eine spätere Diagnose könnte das teils sehr langsam voran schreitende Größenwachstum von Leiomyomen sein, sodass diese erst nach Erreichen eines gewissen Ausmaß störend auffallen (5). Die geschlechtliche Verteilung präsentiert sich entsprechend der in publizierten Kollektiven aufgeführten Verteilung; Orellana-Diaz, *et al.* (1983) stellten ein vermehrtes Auftreten von Leiomyomen bei Frauen fest, Raj, *et al.* (1997) wiederum sprachen sich für eine gleichmäßige Verteilung aus (12, 14).

Die anatomischen Lokalisationen der 19 untersuchten Leiomyome zeigten keine Auffälligkeiten oder Besonderheiten im Vergleich zu publizierten Daten; am häufigsten zeigten sich Läsionen an den oberen Extremitäten (42%) und der Brust (32%), was den mit den Beschreibungen von Fisher *et al.* und dem Artikel von Mitra, *et al.* (2009) einhergeht (11, 13).

In der Veröffentlichung von Magg, *et al.* (2018) wurde der Zusammenhang zwischen Immunschwächen aufgrund einer Transplantation oder HIV und dem Vorkommen von Weichteiltumoren, wie beispielsweise Leiomyomen, aber vor allem Leiomyosarkomen, untersucht (15). Hier ließ sich eine klare Korrelation nachweisen, welche allerdings überwiegend bei Kindern mit entsprechenden Krankheitsbildern auffiel (131, 132). In dem Patientenkollektiv dieser Arbeit sind keine Kinder inbegriffen; ebenso konnten keine

immunologischen Erkrankungen oder Transplantationen in der Anamnese der Patienten festgestellt werden.

#### 4.3.3 Signalwege in Leiomyosarkomen

Cuppens, *et al.* (2018) konnten in uterinen Leiomyosarkomen Veränderungen des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs sowie einen Verlust des PTEN-Gens nachweisen (133). Ähnliche Entdeckungen wurden von Fourneau, *et al.* (2017) gemacht; ein Zusammenhang der Änderungen in PI3K/Akt/mTOR-Signalwegen und der Entstehung von Leiomyosarkomen ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Owusus-Bracket, *et al.* (2019) veranschaulichten in ihrer Arbeit in einem breiter gefassten Rahmen die Auswirkung der Signalwege auf die Karzinogenese und führten als Tumoren mit Aberrationen des PI3K-Signalwegs mitunter Sarkome auf (134). Zudem wurden Inhibitoren der Signalwege als potentielle Therapieoptionen untersucht (135).

Im Falle von primär kutanen Leiomyosarkomen wurde die Bedeutung dieser Signalwege bisher nur spärlich beleuchtet. Miller, *et al.* (2020) untersuchten in ihrer Arbeit genetische Mutationen in malignen kutanen Entitäten. In Bezug auf kutane Leiomyosarkome stellte sich vor allem eine Mutation oder Deletion des RB1-Gens heraus (136). Das RB1-Gen ist ein Tumorsuppressor, dessen Produkt Rb involviert ist in die Regulation des Zellzyklus, wobei es Hyperproliferationen inhibiert (137-139). Mutationen bzw. Funktionsverluste des RB1-Gens wurden bereits in Weichteilsarkomen nachgewiesen (140).

Des Weiteren konnte Miller, *et al.* einen Verlust des PTEN-Gens und Mutationen im TP53-Gen nachweisen. TP53 gehört ebenfalls der Gruppe der Tumorsuppressor Gene an und kodiert einen Transkriptionsfaktor, welcher abhängig von Zellstress aktiviert vorliegt und antiproliferativ wirkt (141). Somatische Aberrationen im TP53-Gen treten gehäuft in Tumoren auf und können zu einer Prädisposition für Tumor Syndrome führen, beispielsweise dem Li-Fraumeni-Syndrom(142).

Wie bereits oben beschrieben, stellt PTEN ebenfalls einen Tumorsuppressor dar, dessen Verlust bzw. verringertes Vorkommen mit der Entwicklung maligner Entitäten assoziiert ist. Die Interaktion zwischen PTEN und dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in Bezug auf die Entstehung von Tumoren konnte bereits mehrfach belegt werden, unter anderem auch in uterinen Leiomyosarkomen (122, 125, 133, 143).

Die Bedeutung des PI3K-Signalwegs in kutanen Leiomyosarkomen ist noch nicht endgültig erfasst und bedarf noch weiterer Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurden neben

kutanen Leiomyomen auch kutane Leiomyosarkome auf die Expression von PI3K/Akt/mTOR-Signalweg relevanten Proteinen und PTEN untersucht.

Nach Anfertigung der Färbungen wurden auch diese von drei unabhängigen Individuen bewertet und in die Kategorien „Negativ“, „Leicht“, „Mittel“ und „Stark“ eingeteilt. Phospho-Akt konnte, wenn alle untersuchten Leiomyosarkome betrachtet wurden, nur zu einem kleinen Anteil mittel bis stark exprimiert nachgewiesen werden, total-Akt kam in der Mehrzahl der Gewebeproben verstärkt vor. Ähnlich wie bei den Leiomyomen lag hier eine geringe Phosphorylierung von total-Akt vor, was auch in diesem Fall für eine Herunterregulation des PI3K/Akt-Signalwegs spräche. Die Färbung auf phospho-P70S6K präsentierte sich similär zu den Leiomyomen überwiegend stark positiv, was auch hier für eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs spricht. Eine deutliche Diskrepanz ließ sich zwischen den Leiomyomen und den Leiomyosarkomen bei der PTEN-Färbung feststellen. Dieses Protein wurde in einem Großteil der Leiomyosarkome stark exprimiert wohingegen PTEN in einem Großteil der Leiomyome schwach exprimiert vorlag. Dementsprechend wies diese Entdeckung auf eine Hochregulation des PTEN-Proteins in den malignen Leiomyosarkomen hin. Zum direkten Vergleich der Färbeergebnisse wurden für die Leiomyosarkome Expressionsmuster gemäß derer der Leiomyome erstellt. Die Sichtung der Expressionsmuster in den 22 eingeschlossenen Leiomyosarkomen ergab 5 verschiedene Proteinexpressionsmuster.

Die Proteinexpressionsmuster M2 und M3 lagen jeweils zu 13,3 % in den untersuchten Leiomyosarkomen vor. In M2 waren phospho-Akt, PTEN und phospho-P70S6K mit weniger als 50% exprimiert; in M3 verhielt es sich ähnlich, jedoch war die Färbung von phospho-P70S6K mehr als 50% positiv.

Das Muster M3 zeigte bei der phospho-P70S6K-Färbung eine verstärkte Phosphorylierung. In dem Artikel „Amino Acid- dependent Signal Transduction“ von Dubbelhuis, *et al.* (2002) wurden die Einflüsse der Aminosäuren Leucin, Tyrosine und Phenylalanin außerhalb des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs auf die Aktivierung der P70S6-Kinase behandelt und belegt (144). Ein entsprechender Nachweis dieser Aminosäuren und Proteine könnte Aufschluss über Aktivierungsmechanismen von P70S6K geben.

In M4 liegen alle drei Färbungen mit mehr als 50% positiv gefärbter Zellen vor, sodass eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs zeitgleich mit einer erhöhten Aktivität von PTEN vorliegt. Somit stellt sich die Frage, inwiefern der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und PTEN unabhängig voneinander aktiviert werden. Ein alternativer Grund für den verstärkten Nachweis von PTEN könnte das Vorliegen des Proteins in mutierter Form sein, wie es von

Lotan, *et al.* (2016) in ihrer Arbeit nachgewiesen wurde. Es wurden mutierte Formen von PTEN mit abweichender Struktur immunhistochemisch positiv angefärbt, welche sich in malignen Prostata Karzinomen nachweisen ließen (145). Pallares, *et al.* zeigten in ihrer Arbeit die Anwesenheit von PTEN in Karzinomen des Endometriums (146). Ob der Tatsache, dass PTEN bisher als Tumorsuppressorgen agiert, konnte das gleichzeitige Vorkommen von PTEN und Proteinen des aktiven PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs bereits wissenschaftlich belegt werden.

Eine Aktivierung von PTEN unabhängig von PI3K kann beispielsweise durch einen Transkriptions-Faktor, PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor), hervorgerufen werden und somit einen verstärkten immunhistochemischen Nachweis hervorrufen (109). Jeong, *et al.* (2010) konnten in ihrer Arbeit eine Steigerung von PTEN in Abhängigkeit vom PPAR $\gamma$  in uterinen Leiomyomen nachweisen.

Das Muster M5 lag mit einem Anteil von 5% vor. Hier präsentierten sich phospho-Akt und phospho-P70S6K mit mehr als 50% positiv gefärbten Zellen und PTEN mit weniger als 50%. Dementsprechend liegt eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs vor, welcher in der Folge auch die P70S6-Kinase phosphoryliert. Die Rolle dieses Signalwegs konnte bereits wiederholt in zahlreichen Tumoren und auch speziell in kutanen Leiomyosarkomen nachgewiesen werden (103, 147).

Das Expressionsmuster M1 konnte mit einer Häufigkeit von 55% festgestellt werden. Hier lagen PTEN und phospho-P70S6K jeweils mit mehr als 50% positiver Farbreaktion vor, phospho-Akt präsentierte sich mit weniger als 50%. Diese Konstellation spricht für eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs sowie PTENs. Der lineare Zusammenhang der Koexpression von PTEN und phospho-P70S6K für das Expressionsmuster M1 bestätigte sich in einem Korrelationstest ( $r= 0,07$  und  $p= 0,0005$ ).

In der Arbeit „Targeting the PI3K/PTEN/Akt/mTOR Pathway in Treatment of Sarcoma Cell lines“ von Lim , *et al.* (148) wurden fünf Sarkom-Zelllinien der pathologischen Subtypen Liposarkom, Fibrosarkom, Synovialsarkom und malignes Histiocytom auf die Expression von PTEN und Proteinen des PI3K-Signalwegs untersucht. Bei der genetischen Analyse von PTEN wurde lediglich in einer Zelllinie eine Missense Mutation entdeckt, welche zum Verlust PTENs führte; die restlichen Zelllinien beinhalteten keine Mutationen (148). Es wurde in malignen Sarkomen eine erhöhte Aktivität des Tumorsuppressorgens PTEN nachgewiesen.

Bezüglich der nachgewiesenen gesteigerten Phosphorylierung von P70S6K ohne erhöhte Expression von phospho-Akt vermuteten die Autoren Mutationen im mTOR-Signalweg. In „

A diverse array of cancer-associated mTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity” von Grabiner, *et al.* (2014) wurden Signalweg-Mutationen in mTOR untersucht, welche teils unabhängig von PI3K/Akt zu einer gesteigerten Aktivität der mTOR Kinase führen können und somit eine Phosphorylierung der P70-Kinase zur Folge haben (149). Hierbei wurden diverse Krebsarten miteingeschlossen. Neben geläufigen Mutationen wie KRAS, PI3K und Akt konnten mehr als 33 neue Mutationen gefunden werden, welche zu einer gesteigerten Interaktion von mTOR führen.

Mit Blick auf die nachgewiesene Expression von PTEN in Sarkomen und die Aktivierung von mTOR unabhängig von PI3K stellt sich eine Koexpression beider Proteine in kutanen Leiomyosarkomen mitunter als Katalysator für die Entartung durchaus nachvollziehbar dar.

Stellt man die Ergebnisse der untersuchten Leiomyome in Vergleich mit den untersuchten Leiomyosarkomen, so lässt sich festhalten, dass ein deutlicher Unterschied in der Aktivität sowie möglicherweise in der Aufgabe von PTEN in den beiden Entitäten besteht. Der Tumorsuppressor konnte in den Leiomyomen dieser Arbeit nur vereinzelt stark exprimiert nachgewiesen werden, wobei PTEN allgemein für bekannt ist, in benignen Geweben vermehrt vorzukommen (121). Im Rahmen dieser Arbeit wurde hingegen eine erhöhte PTEN-Expression in Leiomyosarkomen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu steht die Expression von phospho-Akt bzw. dessen Anteil an total-Akt. Diese zeigte sich in beiden Gruppen sehr gering, obwohl gemäß einer Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in den Leiomyosarkomen eine deutlich stärkere Expression vorbeschrieben wurde (66). phospho-P70S6K hatte eine deutlich stärkere Expression in den Leiomyosarkomen als in den Leiomyomen, was wiederum einer Aktivität des mTOR-Signalwegs in Leiomyosarkomen entsprechen würde. Die Ergebnisse der Leiomyome und Leiomyosarkome lassen sich gut voneinander abgrenzen. Der Einfluss der Signalwege und Proteine des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs auf die Entstehung von Leiomyomen und Leiomyosarkomen und einer deutlichen Unterscheidung der beiden Entitäten kann somit durchaus als eindeutig vorhanden angesehen werden.

#### 4.3.4 Interpretation demographischer und klinischer Faktoren in Leiomyosarkomen

Bezugnehmend auf demographische und klinische Parameter zeigte sich das Patientenkollektiv des Leiomyosarkoms regelrecht.

Das Alter zum Diagnosezeitpunkt lag im Durchschnitt bei 72,8 Jahren; aus anderen Arbeiten geht ein ähnliches Durchschnittsalter ab der 6. Lebensdekade aufwärts hervor (31, 39). Das

Auftreten von kutanen Leiomyosarkomen ist in der Literatur um den Faktor 3 höher beim männlichen Geschlecht beschrieben als bei Frauen (39). In dieser Arbeit lag ein Verhältnis von 5 Leiomyosarkomen in weiblichen Patienten zu 17 Leiomyosarkomen im männlichen Geschlecht vor, was der aus der Literatur hervorgehenden Verteilung entspricht.

Die häufigsten Lokalisationen der kutanen Leiomyosarkome des Patientenkollektivs waren der Kopf mit 64% und die Extremitäten mit jeweils 9%. Dies entspricht den Lokalisationen, die in einem Großteil der Literatur beschrieben wurden, und somit keine neuen Erkenntnisse bringt (22, 32).

Bei allen 22 Entitäten wurde  $\alpha$ -SMA nachgewiesen, was mit ausschlaggebend für die Diagnosefindung war (150) sowie der Ki67 Index untersucht. Dieser war in 7 der 22 Leiomyosarkome erhöht. Der Ki67 Index ist ein Proliferations-Marker und Richtwert für maligne Entartungen. Er beschreibt die Hyperproliferation von Gewebe und ist somit vermehrt in Tumoren vorzufinden (46). Die Leiomyosarkome mit erhöhtem Ki67 Index wiesen in Hinblick auf Lokalisation, Aggressivität oder Wachstumsmuster keine Unterschiede zu den Ki67 negativen Läsionen auf. Dementsprechend ließ sich nicht in allen Tumoren eine erhöhte Proliferation im Sinne eines gesteigerten Ki67 Index nachweisen. Die Auswirkung des Ki67 Index auf die Entwicklung maligner Entitäten ist belegt, jedoch noch nicht abschließend geklärt (151).

In der Arbeit „Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS“ von McClain, *et al.* (1995) wurde der Zusammenhang zwischen Erkrankungen des Immunsystems und der Entstehung von Leiomyomen und Leiomyosarkomen beleuchtet (43). Das gemeinsame Auftreten von Immunerkrankungen und Tumoren der glatten Muskulatur konnte mehrfach beobachtet werden, bzw. die RNA des Epstein-Barr Virus konnte in den Zellen des entarteten Gewebes bestimmt werden. Dieser Zusammenhang wurde in weiteren Arbeiten belegt (15, 131). In der vorliegenden Arbeit wies keiner der Patienten in diesem Sinne klassische Erkrankungen bzw. Schwächen des Immunsystems auf.

#### *4.4 Perspektive für die Zukunft*

In den letzten Jahren hat es auf dem Gebiet der therapeutischen Optionen für Tumorthapien neue Errungenschaften gegeben. Unter anderem wurde zunehmend die Anwendung monoklonaler Antikörper und Immuntherapien etabliert, welche für eine Vielzahl von malignen Erkrankungen große Erfolge feierte (152).

Die Therapie kutaner Leiomyome und Leiomyosarkome sieht in einem Großteil der Fälle die operative Entfernung der Entität vor (18, 26). In den meisten Fällen ist dieses Vorgehen



möglich, allerdings nur solange es die Lokalisation und Größe des Tumors zulässt (18, 34). Bei großflächigen Leiomyomen bzw. multiplen Läsionen kommen Behandlungen wie Kryotherapie und CO<sub>2</sub> Laser zum Einsatz, jedoch mit einer nicht unerheblichen Rezidiv Rate (16). Bei Leiomyosarkomen können ab einer Größe von mehr als 5 cm, postoperativen R1 Rändern, lokalen Rezidiven, Metastasen oder einer hochgradigen Atypie adjuvante Therapien wie Doxorubicin und Dacarbazin oder monoklonale Antikörper wie Olaratumab verwendet werden (31, 34). Allerdings hatten diese bisher nur eine mäßige Erfolgsrate vorzuweisen und bedürfen weiterer Erforschung (57).

Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs wurden in den Arbeiten „PI3K/Akt/mTOR inhibition in combination with doxorubicin is an effective therapy for leiomyosarcoma“ von Babichev, *et al.* (2016) (105) und „MK-2206, an Akt Inhibitor, Promotes Caspase-Independent Cell Death and Inhibits Leiomyoma Growth“ von Sefton, *et al.* (2013) (153) an pelvinen Leiomyosarkomen und uterinen Leiomyomen untersucht. Hierbei stellten Babichev, *et al.* fest, dass die Kombination aus Dactolisib (BEZ235), einem Imidazochinolinderivat, welches als PI3K Inhibitor fungiert, und Doxorubicin, einem Chemotherapeutikum, welches in der Therapie metastasierter Leiomyosarkome vorkommt, besonders potente Wirksamkeit zeigte (105).

Sefton, *et al.* konnten durch Verwendung des Medikamentenkandidats MK-2206, einem sehr selektiven Akt Inhibitor, die Hemmung der Akt Aktivität, sowie die Induktion von Caspase unabhängigen Zelltod belegen (153). Demzufolge stellen Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs sowohl in Leiomyomen als auch in Leiomyosarkomen vielversprechende Therapieoptionen dar.

Alternativen zu chirurgischen Eingriffen bzw. Therapien mit geringeren Nebenwirkungen als der klassischen Chemotherapie könnte die Behandlung von Leiomyomen und Leiomyosarkomen, unabhängig von ihrer Lokalisation, weiter voranbringen sowie die Lebensqualität und das Outcome der Patienten erheblich verbessern.

## 5 Anhang

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AG	Antigen
AK	Antikörper
$\alpha$ -SMA	alpha SMA/ alpha smooth muscle actin
atyp.	atypisch
BCC	Basazellkarzinom
CA	Karzinom
dyspl.	dysplastisch
EBV	Epstein Barr Virus
FFPE	formalin-fixiertes paraffin-gebettetes Gewebe
H.E. Färbung	Hämalaun Eosin Färbung
histol.	histologisch
HIV	humanes Immundefizienzvirus
hypertrophe Ak	hypertrophe Akanthose
IHC	Immunhistochemie
Ki67	Ki67 Index
li.	links
LM	Leiomyom
LMS	Leiomyosarkom
LSAB	labelled Streptavidin-Biotin
multifok.	multifokal
m	männlich
oEx	obere Extremität
p.Akt	phospho-Akt
PBS	Phosphat Saline Puffer
PDK1	Protein-3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
pP70S6K	phospho-P70S6-Kinase
re.	rechts
Spi Ca	spinozelluläres Karzinom

t.Akt	total-Akt
TGF- $\beta$	Tumor growth factor $\beta$
TMA	Tissue Microarray
uEx	untere Extremität
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
visz.	viszeral
w	weiblich

## 5.2 Abbildungsverzeichnis

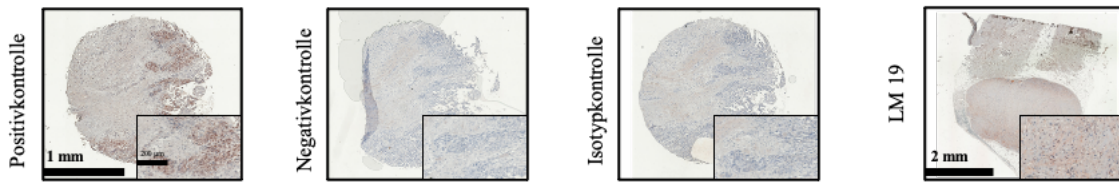
ABBILDUNG 1: UNTERFORMEN DER WEICHTEILSARKOME .....	10
ABBILDUNG 2: CHEMOTHERAPIE METASTASIERTER LEIOMYOSARKOME.....	17
ABBILDUNG 3: PI3K/AKT/MTOR -SIGNALKASKADE .....	21
ABBILDUNG 4: ABLAUF DER LSAB-METHODE .....	28
ABBILDUNG 5: GEWEBE DES K5 KONTROLLBLOCKS.....	32
ABBILDUNG 6: AUSWERTUNG DER EINZELNEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN DER LEIOMYOM-BIOPSIEN .....	38
ABBILDUNG 7: AUSWERTUNG DER EINZELNEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN DER LEIOMYOSARKOM-BIOPSIEN .....	39
ABBILDUNG 8: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNGEN DER KATEGORIEN „NEGATIV“, „LEICHT“, „MITTEL“ UND „STARK“ .....	40
ABBILDUNG 9: BEISPIEL FÜR DIE IMMUNFÄRBUNG VON PHOSPHO-AKT, TOTAL-AKT, PTEN UND PHOSPHO-P70S6K .....	41
ABBILDUNG 10: BALKENDIAGRAMM DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN.....	42
ABBILDUNG 11: VERGLEICH DER EXPRESSIONSNIVEAUS VON PHOSPHO-AKT /TOTAL-AKT, PTEN UND PHOSPHO-P70S6K IN LEIOMYOMEN UND LEIOMYOSARKOMEN .....	43
ABBILDUNG 12: STÄRKE DER EXPRESSION DER PROTEINE PHOSPHO-AKT/TOTAL-AKT, PTEN UND PHOSPHO-P70S6K IN LEIOMYOMEN UND LEIOMYOSARKOMEN .....	44
ABBILDUNG 13: VORKOMMEN DER EXPRESSION VON PHOSPHO-AKT/TOTAL-AKT, PTEN UND PHOSPHO-P70S6K (LM).....	45
ABBILDUNG 14: PROZENTUALE MENGENVERTEILUNG DER EXPRESSIONSMUSTER IN LEIOMYOMEN .....	46
ABBILDUNG 15: VORKOMMEN DER EXPRESSION VON PHOSPHO-AKT/TOTAL-AKT, PTEN UND PHOSPHO-P70S6K (LMS) .....	47
ABBILDUNG 16: MENGENVERTEILUNG DER EXPRESSIONSMUSTER IN LEIOMYOSARKOMEN.....	48
ABBILDUNG 17: KORRELATIONSANALYSE DER KOEXPRESSION VON PTEN UND PHOSPHO- P70S6K IN LEIOMYOSARKOMEN .....	49

### 5.3 Tabellenverzeichnis

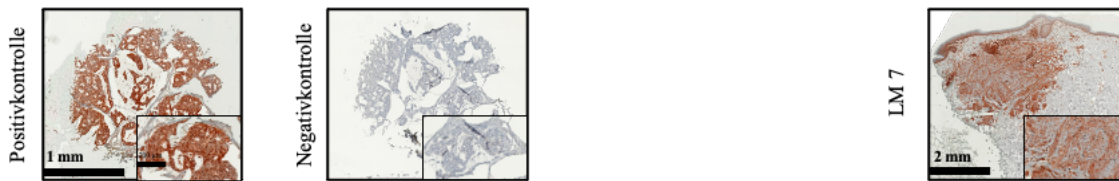
TABELLE 1: TNM-KLASSIFIKATION FÜR WEICHTEILTUMOREN (UICC/AJCC 2017).....	15
TABELLE 2: HISTOPATHOLOGISCHES GRADING SARKOM (48).....	16
TABELLE 3: STADIENEINTEILUNG EXTREMITÄTEN UND STAMM, RETROPERITONEUM (UICC/AJCC 2017) .....	16
TABELLE 4: ANZAHL, GESCHLECHT UND ALTER ZUM DIAGNOSEZEITPUNKT DER PATIENTEN ..	23
TABELLE 5: GERÄTE UND EQUIPMENT .....	24
TABELLE 6: REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN .....	24
TABELLE 7: SOFTWARES .....	25
TABELLE 8: ABSTEIGENDE ALKOHOLREIHE .....	26
TABELLE 9: AUFSTEIGENDEN ALKOHOLREIHE .....	27
TABELLE 10: VERDÜNNUNG DER ANTIKÖRPER DER JEWELIGEN FÄRBUNG .....	30
TABELLE 11: EINWIRKZEIT DES CHROMOGENS BEI DER JEWELIGEN FÄRBUNG .....	30
TABELLE 12: POSITIVKONTROLLGEWEBE DER ANTIKÖRPER .....	31
TABELLE 13: GRENZWERTE DER KATEGORIEN „NEGATIV, LEICHT, MITTEL, STARK“ .....	33
TABELLE 14: ANTIKÖRPER UND DIE ZU ERWARTENDE LOKALISATION DER FARBREAKTION .....	33
TABELLE 15: DEMOGRAPHISCHE UND KLINISCHE INFORMATIONEN ZUM PATIENTENKOLLEKTIV MIT DER DIAGNOSE LEIOMYOM (LM).....	34
TABELLE 16: DEMOGRAPHISCHE UND KLINISCHE INFORMATIONEN ZUM PATIENTENKOLLEKTIV MIT DER DIAGNOSE LEIOMYOSARKOM (LMS).....	35
TABELLE 17: LOKALISATION DER LEIOMYOME .....	36
TABELLE 18: LOKALISATION DER LEIOMYOSARKOME .....	36
TABELLE 19: EXPRESSIONSMUSTER LEIOMYOME. DIE JEWELIGEN EXPRESSIONSMUSTER B1-B6 KOMMEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN HÄUFIGKEITEN IN DEN LEIOMOYMEN VOR .....	46
TABELLE 20: EXPRESSIONSMUSTER DER LEIOMYOSARKOME. DIE MUSTER M1-M6 TRETEN MIT UNTERSCHIEDLICHER HÄUFIGKEIT AUF, WOBEI DAS MUSTER M1 DEUTLICH DOMINIERT ...	48
TABELLE 21: KORRELATION DER EXPRESSIONSMUSTER B1/M1 IN LM UND LMS MIT ALTER, GESCHLECHT, REZIDIV/VORERKRANKUNG.....	49

### 5.4 Etablierung der Antikörper

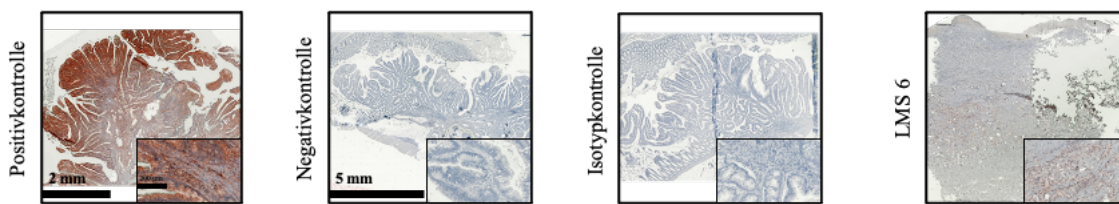
#### Etablierung phospho- Akt



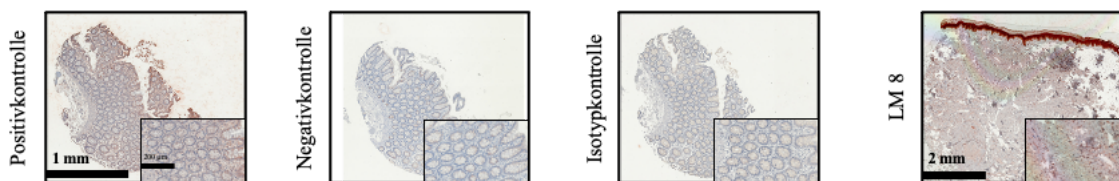
#### Etablierung total-Akt



#### Etablierung PTEN



#### Etablierung phospho- P70S6K



## 6 Literaturverzeichnis

1. Cormier JN, Pollock RE. Soft Tissue Sarcomas. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2004;54(2):94-109.
2. Weiss SW, Goldblum JR, Folpe AL. Enzinger and Weiss's soft tissue tumors: Elsevier Health Sciences; 2007.
3. Raetzel G. XXVIII. Weichteiltumoren. Lehrbuch Chirurgie: De Gruyter; 2011. p. 647-54.
4. Stout AP. Solitary Cutaneous and Subcutaneous Leiomyoma. The American Journal of Cancer. 1937;29(3):435-69.
5. Pozzatti RR, Cordeiro CP, da Cruz Jde M, de Araújo GC. Leiomyoma in the thumb causing trigger finger. BMJ Case Rep. 2015;2015.
6. Kolben M. Ätiologie und Pathogenese des Uterus myomatosus. In: Gauwerky JFH, editor. Uterus myomatosus. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2003. p. 9-14.
7. Islam MS, Protic O, Giannubilo SR, Toti P, Tranquilli AL, Petraglia F, et al. Uterine Leiomyoma: Available Medical Treatments and New Possible Therapeutic Options. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2013;98(3):921-34.
8. Sabry M, Al-Hendy A. Medical treatment of uterine leiomyoma. Reproductive sciences. 2012;19(4):339-53.
9. Wang CP, Chang YL, Sheen TS. Vascular leiomyoma of the head and neck. The Laryngoscope. 2004;114(4):661-5.
10. Gläser R. Kutane Leiomyome. Der Hautarzt. 2010;61(3):265-6.
11. Mitra A, Gudgeon PW, Merchant W, Shah M. A case of diffuse pilar leiomyoma or acquired smooth muscle hamartoma? Clinical and Experimental Dermatology. 2009;34(5):e145-e7.
12. Orellana-Díaz O, Hernández-Pérez E. Leiomyoma cutis and leiomyosarcoma: a 10-year study and a short review. J Dermatol Surg Oncol. 1983;9(4):283-7.
13. FISHER WC, HELWIG EB. Leiomyomas of the Skin. Archives of Dermatology. 1963;88(5):510-20.
14. Raj S, Calonje E, Kraus M, Kavanagh G, Newman PL, Fletcher CD. Cutaneous pilar leiomyoma: clinicopathologic analysis of 53 lesions in 45 patients. Am J Dermatopathol. 1997;19(1):2-9.
15. Magg T, Schober T, Walz C, Ley-Zaporozhan J, Facchetti F, Klein C, et al. Epstein-Barr Virus(+) Smooth Muscle Tumors as Manifestation of Primary Immunodeficiency Disorders. Front Immunol. 2018;9:368.

16. García Muret MP, Pujol RM, Alomar A, Calaf J, de Moragas JM. Familial leiomyomatosis cutis et uteri (Reed's syndrome). *Arch Dermatol Res.* 1988;280 Suppl:S29-32.
17. Latoni JD, Neuburg M, Matloub HS. Pilar leiomyoma: a case report and review of the literature. *Ann Plast Surg.* 2000;45(6):662-4.
18. Badeloe S, Frank J. Clinical and molecular genetic aspects of hereditary multiple cutaneous leiomyomatosis. *European Journal of Dermatology.* 2009;19(6):545-51.
19. Szczudrawa J, Urbańczyk K, Urban A, Stachura J. Coexpression of vimentin and desmin in gastric leiomyomas. An immunohistochemical study in paraffin sections. *Folia Histochem Cytobiol.* 1989;27(2):73-81.
20. Al-Daraji W, Husain E, Zelger BG, Zelger B. A practical and comprehensive immunohistochemical approach to the diagnosis of superficial soft tissue tumors. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2009;2(2):119-31.
21. Gaitan Cepeda LA, Quezada Rivera D, Tenorio Rocha F, Leyva Huerta ER, Mendez Sanchez ER. Vascular leiomyoma of the oral cavity. Clinical, histopathological and immunohistochemical characteristics: presentation of five cases and review of the literature. 2008.
22. Holst VA, Junkins-Hopkins JM, Elenitsas R. Cutaneous smooth muscle neoplasms: clinical features, histologic findings, and treatment options. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(4):477-90; quiz, 91-4.
23. Porter CJ, Januszkiewicz JS. Cutaneous leiomyosarcoma. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109(3):964-7.
24. Ressing M, Wardelmann E, Hohenberger P, Jakob J, Kasper B, Emrich K, et al. Strengthening health data on a rare and heterogeneous disease: sarcoma incidence and histological subtypes in Germany. *BMC Public Health.* 2018;18(1):235.
25. Stout AP, Hill WT. Leiomyosarcoma of the superficial soft tissues. *Cancer.* 1958;11(4):844-54.
26. Bernstein SC, Roenigk RK. Leiomyosarcoma of the skin: treatment of 34 cases. *Dermatologic surgery.* 1996;22(7):631-5.
27. Fields JP, Helwig EB. Leiomyosarcoma of the skin and subcutaneous tissue. *Cancer.* 1981;47(1):156-69.
28. Hashimoto H, Daimaru Y, Tsuneyoshi M, Enjoji M. Leiomyosarcoma of the external soft tissues. A clinicopathologic, immunohistochemical, and electron microscopic study. *Cancer.* 1986;57(10):2077-88.



29. Howlader N., Noone AM., Krapcho M., et al, editors. SEER Cancer Statistics Review 1975-2013: Bethesda, National Cancer Institute; 2003 [Available from: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/)].
30. Amant F, Coosemans A, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. Clinical management of uterine sarcomas. *The Lancet Oncology*. 2009;10(12):1188-98.
31. Zacher M, Heppt MV, Brinker TJ, Hayani KM, Flaig MJ, Berking C. Primary leiomyosarcoma of the skin: a comprehensive review on diagnosis and treatment. *Medical Oncology*. 2018;35(10):1-9.
32. Kaddu S, Beham A, Cerroni L, Humer-Fuchs U, Salmhofer W, Kerl H, et al. Cutaneous Leiomyosarcoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1997;21(9):979-87.
33. van Cann T, Cornillie J, Wozniak A, Debiec-Rychter M, Sciort R, Hompes D, et al. Retrospective Analysis of Outcome of Patients with Metastatic Leiomyosarcoma in a Tertiary Referral Center. *Oncology Research and Treatment*. 2018;41(4):206-13.
34. Kazlouskaya V, Lai YC, Khachemoune A. Leiomyosarcoma of the skin: review of the literature with an emphasis on prognosis and management. *International Journal of Dermatology*. 2020;59(2):165-72.
35. Feigenbaum L, Skinner D, Golda N. Atypical Cutaneous Leiomyosarcoma with Skip-Lesion Behavior. *Dermatologic Surgery*. 2013;39(4):660-2.
36. Yanguas I, Goday J, González-Güemes M, Lozano M, Soloeta R. Cutaneous leiomyosarcoma in a child. *Pediatr Dermatol*. 1997;14(4):281-3.
37. Swanson PE, Stanley MW, Scheithauer BW, Wick MR. Primary cutaneous leiomyosarcoma. A histological and immunohistochemical study of 9 cases, with ultrastructural correlation. *J Cutan Pathol*. 1988;15(3):129-41.
38. Kraft S, Fletcher CD. Atypical intradermal smooth muscle neoplasms: clinicopathologic analysis of 84 cases and a reappraisal of cutaneous "leiomyosarcoma". *Am J Surg Pathol*. 2011;35(4):599-607.
39. Winchester DS, Hocker TL, Brewer JD, Baum CL, Hochwalt PC, Arpey CJ, et al. Leiomyosarcoma of the skin: clinical, histopathologic, and prognostic factors that influence outcomes. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2014;71(5):919-25.
40. Hietanen A., Sakai Y. Leiomyosarcoma in an old irritated lupus lesion. *Acta Derm Venereol* 1960;40:167-72.
41. Yamamura T, Takada A, Higashiyama M, Yoshikawa K. Subcutaneous Leiomyosarcoma Developing in a Radiation Dermatitis. *Dermatology*. 1991;183(2):154-6.

42. Tetzlaff MT, Nosek C, Kovarik CL. Epstein-Barr virus-associated leiomyosarcoma with cutaneous involvement in an African child with human immunodeficiency virus: a case report and review of the literature. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2011;38(9):731-9.
43. McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, et al. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. *N Engl J Med*. 1995;332(1):12-8.
44. Suster S, Rosen LB, Sánchez JL. Granular cell leiomyosarcoma of the skin. *The American journal of dermatopathology*. 1988;10(3):234-9.
45. Serrano C, George S. Leiomyosarcoma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2013;27(5):957-74.
46. Lee C-H, Turbin DA, Sung YCV, Espinosa I, Montgomery K, van de Rijn M, et al. A panel of antibodies to determine site of origin and malignancy in smooth muscle tumors. *Modern Pathology*. 2009;22(12):1519-31.
47. UICC/AJCC. Cancer Staging 2016 [Available from: <https://cancerstaging.org/About/news/Documents/NCRA%20AJCC%20Cancer%20Staging%20Manual%208th%20Edition%20Update.pdf>].
48. Coindre JM. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(10):1448-53.
49. Tsutsumida A, Yoshida T, Yamamoto Y, Itoh T, Minakawa H, Sugihara T. Management of superficial leiomyosarcoma: a retrospective study of 10 cases. *Plastic and reconstructive surgery*. 2005;116(1):8-12.
50. Starling J, 3rd, Coldiron BM. Mohs micrographic surgery for the treatment of cutaneous leiomyosarcoma. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(6):1119-22.
51. McKee MD, Liu DF, Brooks JJ, Gibbs JF, Driscoll DL, Kraybill WG. The prognostic significance of margin width for extremity and trunk sarcoma. *J Surg Oncol*. 2004;85(2):68-76.
52. Hollmig ST, Sachdev R, Cockerell CJ, Posten W, Chiang M, Kim J. Spindle cell neoplasms encountered in dermatologic surgery: a review. *Dermatol Surg*. 2012;38(6):825-50.
53. Tap WD, Jones RL, Van Tine BA, Chmielowski B, Elias AD, Adkins D, et al. Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial. *Lancet*. 2016;388(10043):488-97.
54. Le Cesne A, Blay JY, Judson I, Van Oosterom A, Verweij J, Radford J, et al. Phase II study of ET-743 in advanced soft tissue sarcomas: a European Organisation for the Research

and Treatment of Cancer (EORTC) soft tissue and bone sarcoma group trial. *J Clin Oncol.* 2005;23(3):576-84.

55. Sleiwah A, Clinton A, Herbert K. Delayed diagnosis of dermal leiomyosarcoma mimicking keloid scar. *BMJ Case Rep.* 2018;2018.

56. D'Angelo SP, Shoushtari AN, Agaram NP, Kuk D, Qin LX, Carvajal RD, et al. Prevalence of tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in the soft tissue sarcoma microenvironment. *Hum Pathol.* 2015;46(3):357-65.

57. D'Angelo SP, Mahoney MR, Van Tine BA, Atkins J, Milhem MM, Jahagirdar BN, et al. Nivolumab with or without ipilimumab treatment for metastatic sarcoma (Alliance A091401): two open-label, non-comparative, randomised, phase 2 trials. *Lancet Oncol.* 2018;19(3):416-26.

58. Aneiros-Fernandez J, Antonio Retamero J, Husein-Elahmed H, Ovalle F, Aneiros-Cachaza J. Primary cutaneous and subcutaneous leiomyosarcomas: evolution and prognostic factors. *Eur J Dermatol.* 2016;26(1):9-12.

59. Wagener C, Müller O. *Molekulare Onkologie.* Thieme2010.

60. Ali MA, Sjöblom T. Molecular pathways in tumor progression: from discovery to functional understanding. *Mol Biosyst.* 2009;5(9):902-8.

61. Signaling Pathways National Cancer Institute [Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/signaling-pathway>.

62. Huang H. *Advances in Parasitology.* ScienceDirect. 2011.

63. Campbell N., J. R. *Biologie.* Pearson 2009. 1984 p.

64. Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, et al. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *Journal of neurochemistry.* 2005;93(1):105-17.

65. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 16):2903-10.

66. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* 2017;170(4):605-35.

67. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2012;4(9):a011189-a.

68. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews.* 2004;30(2):193-204.

69. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2014;4(64).
70. The Human Protein Atlas [updated 24.02.21. Protein Atlas version 20.1:[Available from: <https://www.proteinatlas.org/about/releases>.
71. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Current cancer drug targets*. 2008;8(3):187-98.
72. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004;9(6):667-76.
73. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
74. Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*. 2007;28(7):1379-86.
75. LIM HJ, WANG X, CROWE P, GOLDSTEIN D, YANG J-L. Targeting the PI3K/PTEN/AKT/mTOR Pathway in Treatment of Sarcoma Cell Lines. *Anticancer Research*. 2016;36(11):5765-71.
76. Pullen N, Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Letters*. 1997;410(1):78-82.
77. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*. 1998;279(5351):707-10.
78. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
79. mit Pikrinsäure M. Anleitung A10. 8. Romeis-Mikroskopische Technik. 2015:182.
80. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol*. 1993;171(2):83-98.
81. Noll S, Schaub-Kuhen S. *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer, München 2000.
82. Baskin DG. A Historical Perspective on the Identification of Cell Types in Pancreatic Islets of Langerhans by Staining and Histochemical Techniques. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(8):543-58.
83. Lin F, Chen Z. Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry: Literature Review and Geisinger Experience. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2014;138(12):1564-77.

84. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(9):1204-7.
85. Becker RL, Jr. Standardization and quality control of quantitative microscopy in pathology. *J Cell Biochem Suppl*. 1993;17g:199-204.
86. Grube D. Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol*. 2004;67(2):115-34.
87. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*. 2006;49(4):411-24.
88. Słodkowska J, Rojo MG. Digital pathology in personalized cancer therapy. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011;49(4):570-8.
89. Pannucci CJ, Wilkins EG. Identifying and avoiding bias in research. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(2):619-25.
90. Woynarowski M, Cielecka-Kuszyk J, Kałużyński A, Omulecka A, Sobaniec-Łotowska M, Stolarczyk J, et al. Inter-observer variability in histopathological assessment of liver biopsies taken in a pediatric open label therapeutic program for chronic HBV infection treatment. *World J Gastroenterol*. 2006;12(11):1713-7.
91. Pouly M, Koller T, Gottfrois P, Lionetti S. Künstliche Intelligenz in der Bildanalyse – Grundlagen und neue Entwicklungen. *Der Hautarzt*. 2020;71(9):660-8.
92. Esteva A, Kuprel B, Novoa RA, Ko J, Swetter SM, Blau HM, et al. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*. 2017;542(7639):115-8.
93. Goodfellow I, Bengio Y, Courville A, Bengio Y. *Deep learning*: MIT press Cambridge; 2016.
94. Pesapane F, Codari M, Sardanelli F. Artificial intelligence in medical imaging: threat or opportunity? Radiologists again at the forefront of innovation in medicine. *European Radiology Experimental*. 2018;2(1):35.
95. Awwalu J, Garba AG, Ghazvini A, Atuah R. Artificial intelligence in personalized medicine application of AI algorithms in solving personalized medicine problems. *International Journal of Computer Theory and Engineering*. 2015;7(6):439.
96. Lee MK, Rich K. Who Is Included in Human Perceptions of AI?: Trust and Perceived Fairness around Healthcare AI and Cultural Mistrust. 2021.
97. Kern SE, Jaron D. Healthcare technology, economics, and policy: An evolving balance. *IEEE engineering in medicine and biology magazine: the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society*. 2003;22(1):16-9.

98. Pfürringer D, Matusiewicz D, Tsitsilonis S, Gehlen T, Back DA. [Economic aspects of digitalization in orthopedics and trauma surgery]. *Unfallchirurg*. 2020;123(11):856-61.
99. Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, Boehning D. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. *Molecular Medicine*. 2015;21(1):242-56.
100. Hoekstra AV, Sefton EC, Berry E, Lu Z, Hardt J, Marsh E, et al. Progesterins activate the AKT pathway in leiomyoma cells and promote survival. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(5):1768-74.
101. Mehine M, Kaasinen E, Heinonen H-R, Mäkinen N, Kämpjärvi K, Sarvilinna N, et al. Integrated data analysis reveals uterine leiomyoma subtypes with distinct driver pathways and biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(5):1315-20.
102. Styer AK, Rueda BR. The epidemiology and genetics of uterine leiomyoma. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2016;34:3-12.
103. Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, Menendez S, Matushansky I, Mills J, et al. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nature Medicine*. 2007;13(6):748-53.
104. Dhingra S, Rodriguez ME, Shen Q, Duan X, Stanton ML, Chen L, et al. Constitutive activation with overexpression of the mTORC2-phospholipase D1 pathway in uterine leiomyosarcoma and STUMP: morphoproteomic analysis with therapeutic implications. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2011;4(2):134.
105. Babichev Y, Kabaroff L, Datti A, Uehling D, Isaac M, Al-awar R, et al. PI3K/AKT/mTOR inhibition in combination with doxorubicin is an effective therapy for leiomyosarcoma. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14(1):67.
106. Weinberg RA. *The biology of cancer*: Garland science; 2013.
107. Karra L, Shushan A, Ben-Meir A, Rojansky N, Klein BY, Shveiky D, et al. Changes related to phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in leiomyomas: possible involvement of glycogen synthase kinase 3 $\alpha$  and cyclin D2 in the pathophysiology. *Fertility and sterility*. 2010;93(8):2646-51.
108. Crabtree JS, Jelinsky SA, Harris HA, Choe SE, Cotreau MM, Kimberland ML, et al. Comparison of human and rat uterine leiomyomata: identification of a dysregulated mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer research*. 2009;69(15):6171-8.
109. Jeong Y-J, Noh E-M, Lee Y-R, Yu H-N, Jang K-Y, Lee SJ, et al. 17 $\beta$ -estradiol induces up-regulation of PTEN and PPAR $\gamma$  in leiomyoma cells, but not in normal cells. *International journal of oncology*. 2010;36(4):921-7.

110. Carter CS, Skala SL, Chinnaiyan AM, McHugh JB, Siddiqui J, Cao X, et al. Immunohistochemical Characterization of Fumarate Hydratase (FH) and Succinate Dehydrogenase (SDH) in Cutaneous Leiomyomas for Detection of Familial Cancer Syndromes. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(6):801-9.
111. Udager AM, Mehra R. Morphologic, Molecular, and Taxonomic Evolution of Renal Cell Carcinoma: A Conceptual Perspective With Emphasis on Updates to the 2016 World Health Organization Classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(10):1026-37.
112. Lehtonen HJ. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: update on clinical and molecular characteristics. *Fam Cancer*. 2011;10(2):397-411.
113. Menko FH, Maher ER, Schmidt LS, Middleton LA, Aittomäki K, Tomlinson I, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC): renal cancer risk, surveillance and treatment. *Familial cancer*. 2014;13(4):637-44.
114. Ghanadan A, Abbasi A, Hesari KK. Cutaneous leiomyoma: novel histologic findings for classification and diagnosis. *Acta Medica Iranica*. 2013:19-24.
115. Matthews JH, Pichardo RO, Hitchcock MG, Leshin B. Cutaneous leiomyoma with cytologic atypia, akin to uterine symplastic leiomyoma. *Dermatologic surgery*. 2004;30(9):1249-51.
116. Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo j*. 2001;20(16):4370-9.
117. Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11(1):9-22.
118. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009;136(3):521-34.
119. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*. 2008;320(5882):1496-501.
120. Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J*. 2007;403(1):13-20.
121. Shi Y, Paluch BE, Wang X, Jiang X. PTEN at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 20):4687-92.
122. Makker A, Goel MM, Mahdi AA, Bhatia V, Das V, Agarwal A, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling & its regulator tumour suppressor genes PTEN & LKB1 in human uterine leiomyomas. *Indian J Med Res*. 2016;143(Supplement):S112-s9.

123. Stefano S, Giovanni S. The PTEN Tumor Suppressor Gene in Soft Tissue Sarcoma. *Cancers*. 2019;11(8):1169.
124. McCabe N, Kennedy RD, Prise KM. The role of PTEN as a cancer biomarker. *Oncoscience*. 2016;3(2):54-5.
125. Pilarski R. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: A Clinical Overview. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6).
126. Hu S, Wang L, Zhao H, Li G, Ji X, Xin F, et al. Clinicopathological features and gene phenotypes of benign metastasizing leiomyoma. *Zhonghua Bing li xue za zhi= Chinese Journal of Pathology*. 2020;49(7):704-9.
127. Slipicevic A, Holm R, Nguyen MT, Böhler PJ, Davidson B, Flørenes VA. Expression of activated Akt and PTEN in malignant melanomas: relationship with clinical outcome. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(4):528-36.
128. Luongo F, Colonna F, Calapà F, Vitale S, Fiori ME, De Maria R. PTEN Tumor-Suppressor: The Dam of Stemness in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8).
129. Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, Podsypanina K, Parsons R, Greenberg N, et al. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(20):11563-8.
130. Leroux AE, Schulze JO, Biondi RM. AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Semin Cancer Biol*. 2018;48:1-17.
131. Tulbah A, Al-Dayel F, Fawaz I, Rosai J. Epstein-Barr virus-associated leiomyosarcoma of the thyroid in a child with congenital immunodeficiency: a case report. *The American journal of surgical pathology*. 1999;23(4):473-6.
132. Mierau GW, Greffe BS, Weeks DA. Primary leiomyosarcoma of brain in an adolescent with common variable immunodeficiency syndrome. *Ultrastructural pathology*. 1997;21(3):301-5.
133. Cuppens T, Moisse M, Depreeuw J, Annibali D, Colas E, Gil-Moreno A, et al. Integrated genome analysis of uterine leiomyosarcoma to identify novel driver genes and targetable pathways. *International journal of cancer*. 2018;142(6):1230-43.
134. Owusu-Brackett N, Shariati M, Meric-Bernstam F. Role of pi3k/akt/mtor in cancer signaling. *Predictive Biomarkers in Oncology: Springer*; 2019. p. 263-70.
135. Cuppens T, Annibali D, Coosemans A, Trovik J, Ter Haar N, Colas E, et al. Potential targets' analysis reveals dual PI3K/mTOR pathway inhibition as a promising therapeutic strategy for uterine leiomyosarcomas—an ENITEC Group Initiative. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(5):1274-85.



136. Miller TI, Zoumberos NA, Johnson B, Rhodes DR, Tomlins SA, Chan MP, et al. A genomic survey of sarcomas on sun-exposed skin reveals distinctive candidate drivers and potentially targetable mutations. *Human Pathology*. 2020;102:60-9.
137. Atzori L, Pilloni L, Zanniello R, Ferreli C, Rongioletti F. Clear-cell variant of superficial cutaneous leiomyosarcoma associated with RB1 mutation: Clinical, dermoscopic, and histopathological characteristics. *Journal of cutaneous pathology*. 2020;47(6):571-5.
138. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(12):910-7.
139. Dei Tos AP, Maestro R, Doglioni C, Piccinin S, Libera D, Boiocchi M, et al. Tumor suppressor genes and related molecules in leiomyosarcoma. *The American journal of pathology*. 1996;148(4):1037.
140. Stratton M, Williams S, Fisher C, Ball A, Westbury G, Gusterson B, et al. Structural alterations of the RB1 gene in human soft tissue tumours. *British journal of cancer*. 1989;60(2):202-5.
141. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.
142. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Advances in cancer research*. 1999;77:81-137.
143. Papa A, Pandolfi PP. The PTEN–PI3K axis in cancer. *Biomolecules*. 2019;9(4):153.
144. Dubbelhuis PF, Meijer AJ. Chapter 14 - Amino Acid-dependent Signal Transduction. In: Storey KB, Storey JM, editors. *Cell and Molecular Response to Stress*. 3: Elsevier; 2002. p. 207-19.
145. Lotan TL, Wei W, Ludkovski O, Morais CL, Guedes LB, Jamaspishvili T, et al. Analytic validation of a clinical-grade PTEN immunohistochemistry assay in prostate cancer by comparison with PTEN FISH. *Mod Pathol*. 2016;29(8):904-14.
146. Pallares J, Bussaglia E, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Mod Pathol*. 2005;18(5):719-27.
147. Hall BJ, Grossmann AH, Webber NP, Ward RA, Tripp SR, Rosenthal HG, et al. Atypical Intradermal Smooth Muscle Neoplasms (Formerly Cutaneous Leiomyosarcomas): Case Series, Immunohistochemical Profile and Review of the Literature. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2013;21(2):132-8.

148. Lim HJ, Wang X, Crowe P, Goldstein D, Yang J-L. Targeting the PI3K/PTEN/AKT/mTOR Pathway in Treatment of Sarcoma Cell Lines. *Anticancer Research*. 2016;36(11):5765.
149. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, Possemato R, Shen K, Sinha S, et al. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer discovery*. 2014;4(5):554-63.
150. Murback NDN, Takita LC, de Castro BC, Hans Filho G. Cutaneous leiomyosarcoma on the face. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2018;93(2):262-4.
151. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard J-Y, Patard J-J, Manunta A, Moulinoux J-P, et al. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology*. 2000;55(4):501-5.
152. Cai HH. Therapeutic Monoclonal Antibodies Approved by FDA in 2020. 2021.
153. Sefton EC, Qiang W, Serna V, Kurita T, Wei JJ, Chakravarti D, et al. MK-2206, an AKT inhibitor, promotes caspase-independent cell death and inhibits leiomyoma growth. *Endocrinology*. 2013;154(11):4046-57.

## 7 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Mark Berneburg danken für die Möglichkeit in seiner Klinik zu arbeiten und zu promovieren.

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Haferkamp, für die schöne, sehr zuverlässige sowie unkomplizierte Zusammenarbeit und die großartige Unterstützung bedanken. Er stand mir stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite. Der rege Austausch hat mir sehr großen Spaß gemacht und mir neue Einblicke in die Forschung ermöglicht, von denen ich auf meinem weiteren beruflichen Weg sicherlich profitieren werde.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Barbara Schwertner, die bei der Durchführung der experimentellen Arbeit im Labor beratend zur Seite stand und dank deren stetiger Betreuung, zuverlässigen Unterstützung und Hilfe ich die Anfertigung und Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen erfolgreich durchführen konnte. Zudem möchte ich ihr für die exzellenten Ideen, Vorschläge sowie ihre Zeit und Mühe danken. Durch die gemeinsame Arbeit mit Frau Dr. Schwertner hatte ich die Möglichkeit, Einblicke in hochwertiges, gewissenhaftes wissenschaftliches Arbeiten zu erlangen und mich auf diesem Gebiet weiterzuentwickeln. Vielen Dank für die sehr schöne Zeit im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich noch meinen Eltern, Dr. med. Renata und Dr. med. Christian Scherer, sowie meinem Bruder, Dr. med. Nicolas Scherer, bedanken. Ich möchte euch diese Arbeit widmen, denn eure Unterstützung, eure Hilfe, eure Ideen, euer Tatendrang, eure Motivation und eure konstruktive Kritik haben mich nicht nur bei dieser Arbeit, sondern das gesamte Studium über begleitet. Ihr habt mich stets bestärkt, Schwierigkeiten zu bewältigen und an den Aufgaben sowie Herausforderungen zu wachsen.

