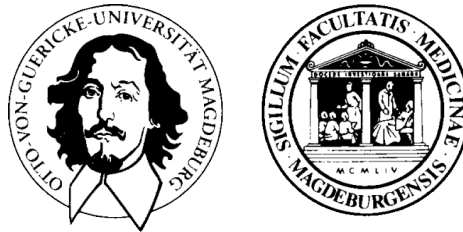


Aus der  
**Klinik für Dermatologie und Venerologie**  
der  
**Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**  
(Betreuer: PD Dr. med. Dr. (PhD) Sven R. Quist und Prof. Dr. med. Harald Gollnick)



Expression von Stammzellmarkern in der Haut und im  
Basalzellkarzinom des Menschen

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von: André Kriesche  
geboren in: Stollberg (Erzgebirge)  
Magdeburg: 2016

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung

Kriesche, André:

Expression von Stammzellmarkern in der Haut und im Basalzellkarzinom des Menschen - 2016 - 64 Bl. : 28 Abb., 16 Tab., 2 Anh.

## Kurzreferat

Die menschliche Haut besteht aus verschiedenen Kompartimenten, deren Zellpopulationen durch sog. Stammzellen reguliert werden. Eine Reihe von potentiellen Markern solcher multipotenter Stammzellen sind in Experimenten an Säugetierhaut, überwiegend Mäusen, beschrieben wurden. Unklar ist, ob solche Stammzellen der Haut auch im Rahmen der Karzinogenese und in manifesten Hautmalignomen eine Rolle spielen. Um die Bedeutung von Stammzellen im Rahmen der Karzinogenese von Basalzellkarzinomen (BCC) genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit 45 exzidierte BCCs, mit den Subtypen superfiziell, solide, sklerodermiform, adenoid und verwildert auf die Expression von Markern wie CK15, Lrig1, LGR5, SOX9,  $\beta$ -Catenin, Ephrin-Rezeptor B2 N- und C-Terminus, Nestin und CRABP1 untersucht und mit gesunder Haut gleicher Entnahmeregion verglichen. Insgesamt konnte mit Ausnahme von Ephrin B2C und Nestin eine Anfärbung der BCCs festgestellt werden.  $\beta$ -Catenin zeigt von allen Markern die stärkste Expression im BCC gefolgt von CK15 und Lrig1. CRABP1 und Ephrin-Rezeptor B2N zeigen vor allem in den verwilderten BCC-Subtypen eine stärkere Expression. CK15 verhält sich entgegengesetzt und wird primär in den soliden und adenoiden Subtypen exprimiert. LGR5 konnte als guter Marker für adenoiden BCCs identifiziert werden. Zudem scheint es der geeignetste potentielle Stammzellmarker des unteren Talgdrüsenfollikels zu sein. Lrig1 hingegen markiert die im Mausmodell beschriebenen basalen potentiellen Stammzellen von Infundibulum und Epidermis auch beim Menschen. Nestin konnte als Marker des peritumoralen Stromas bestätigt werden und scheint wesentlich am Aufbau der bindegewebigen Scheide der BCCs beteiligt. Zusammengefasst wird die Expression von potentiellen Stammzellmarkern der normalen Haut auch im BCC weitgehend beibehalten. Jedoch zeigen einige Marker mit zunehmender Entdifferenzierung der BCCs eine verstärkte (CRABP1, Ephrin B2N) oder verringerte Expression (CK15).

## Schlüsselwörter

Stammzellen, Basalzellkarzinom, CK15, Lrig1, LGR5, SOX9,  $\beta$ -Catenin, Ephrin-Rezeptor B2, Nestin und CRABP1

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Bedeutung und Funktion der Haut . . . . .	1
1.2. Anatomie und Embryologie der Haut . . . . .	2
1.2.1. Anatomie der Haut . . . . .	2
1.2.2. Embryologie der Haut . . . . .	4
1.3. Stammzellen der Haut . . . . .	6
1.4. Das Basalzellkarzinom und seine Histogenese . . . . .	8
1.5. Relevante Marker in der BCC-Histogenese . . . . .	10
1.5.1. Cytokeratin 15 . . . . .	10
1.5.2. Lrig1 . . . . .	11
1.5.3. LGR5 . . . . .	11
1.5.4. SOX9 . . . . .	12
1.5.5. $\beta$ -Catenin . . . . .	13
1.5.6. Ephrin B2 Rezeptor, N- und C-Terminus . . . . .	14
1.5.7. Nestin . . . . .	14
1.5.8. CRABP1 . . . . .	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1. Material . . . . .	16
2.1.1. Geräte und Reaktionsstoffe . . . . .	16
2.1.2. Verwendete Primärantikörper . . . . .	16
2.2. Methoden . . . . .	16
2.2.1. Untersuchungskollektiv und Basalzellkarzinomtypisierung . . . . .	16
2.2.2. Immunhistochemie und Herovici-Färbung . . . . .	18
2.2.3. Histologische Auswertung . . . . .	20
2.2.4. Statistische Methoden . . . . .	21
2.2.5. Verwendete Software . . . . .	21

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1. Expression von CK15 im BCC und in gesunder Haut . . . . .	22
3.1.1. CK15 Expression in gesunder Haut . . . . .	22
3.1.2. CK15 Expression im BCC . . . . .	23
3.2. Expression von Lrig1 im BCC und in gesunder Haut . . . . .	24
3.2.1. Lrig1 Expression in gesunder Haut . . . . .	24
3.2.2. Lrig1 Expression im BCC . . . . .	25
3.3. Expression von LGR5 im BCC und in gesunder Haut . . . . .	27
3.3.1. LGR5 Expression in gesunder Haut . . . . .	27
3.3.2. LGR5 Expression im BCC . . . . .	28
3.4. Expression von SOX9 im BCC und in gesunder Haut . . . . .	29
3.4.1. SOX9 Expression in gesunder Haut . . . . .	29
3.4.2. SOX9 Expression im BCC . . . . .	29
3.5. Expression von $\beta$ -Catenin im BCC und in gesunder Haut . . . . .	31
3.5.1. $\beta$ -Catenin Expression in gesunder Haut . . . . .	31
3.5.2. $\beta$ -Catenin Expression im BCC . . . . .	32
3.6. Expression von Ephrin B2-Rezeptor im BCC und in gesunder Haut . . . . .	34
3.6.1. Ephrin B2-Rezeptor Expression in gesunder Haut . . . . .	34
3.6.2. Ephrin B2-Rezeptor Expression im BCC . . . . .	35
3.7. Expression von Nestin im BCC und in gesunder Haut . . . . .	37
3.7.1. Nestin Expression in gesunder Haut . . . . .	37
3.7.2. Nestin Expression im BCC und seinem Stroma . . . . .	37
3.8. Expression von CRABP1 im BCC und in gesunder Haut . . . . .	41
3.8.1. CRABP1 Expression in gesunder Haut . . . . .	41
3.8.2. CRABP1 Expression im BCC und seinem Stroma . . . . .	41
3.9. Vergleich der verwendeten Antikörper . . . . .	44
<b>4. Diskussion</b>	<b>48</b>
4.1. Cytokeratin 15 . . . . .	48
4.2. Lrig 1 . . . . .	50
4.3. LGR5 . . . . .	52
4.4. SOX9 . . . . .	53
4.5. $\beta$ -Catenin . . . . .	54
4.6. Ephrin B2 Rezeptor, N- und C-Terminus . . . . .	56
4.7. Nestin . . . . .	58
4.8. CRABP1 . . . . .	60
4.9. Vergleich der Antikörper . . . . .	62
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>64</b>

<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>Danksagung</b>	<b>82</b>
<b>Ehrenerklärung</b>	<b>83</b>
<b>Bildungsweg</b>	<b>84</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>85</b>
A.1. Tabellen . . . . .	85
A.1.1. Verwendete Geräte . . . . .	85
A.1.2. Verwendete Reaktionsstoffe . . . . .	87

# Abbildungsverzeichnis

1.1. Aufbau der Haut . . . . .	2
1.2. Aufbau des TFs . . . . .	3
1.3. Der Haarzyklus . . . . .	4
1.4. Embryologie von Epidermis und Dermis . . . . .	5
1.5. Embryologie des Talgdrüsenfollikels . . . . .	6
1.6. Stammzellkompartimente der Haut . . . . .	7
3.1. CK 15 Expression in gesunder Haut . . . . .	22
3.2. CK15 Expression im BCC . . . . .	24
3.3. Lrig1 Expression in gesunder Haut . . . . .	25
3.4. Lrig1 Expression im BCC . . . . .	26
3.5. LGR5 Expression in gesunder Haut . . . . .	27
3.6. LGR5 Expression im BCC . . . . .	29
3.7. SOX9 Expression in gesunder Haut . . . . .	30
3.8. SOX9 Expression im BCC . . . . .	31
3.9. $\beta$ -Catenin Expression in gesunder Haut . . . . .	32
3.10. $\beta$ -Catenin Expression im BCC . . . . .	33
3.11. EphB2N Expression in gesunder Haut . . . . .	35
3.12. EphB2C Expression in gesunder Haut . . . . .	35
3.13. EphB2N Expression im BCC . . . . .	36
3.14. EphB2C Expression im BCC . . . . .	37
3.15. Nestin Expression in gesunder Haut . . . . .	38
3.16. Nestin Expression im BCC und seinem Stroma . . . . .	39
3.17. Herovici-Färbung im BCC und seinem Stroma . . . . .	40
3.18. CRABP1 Expression in gesunder Haut . . . . .	41
3.19. CRABP1 Expression im BCC und seinem Stroma . . . . .	42
3.20. Expression von CK15, Lrig1, LGR5, SOX9, $\beta$ -Catenin, EphB2N und CRABP1 in BCCs . . . . .	45
3.21. Expression von Nestin und CRABP1 im BCC-Stroma . . . . .	45
4.1. Vergleich der Anfärbungen gesunder Haut und der BCCs . . . . .	63

# Tabellenverzeichnis

2.1. Verwendete Primärantikörper . . . . .	16
2.2. Histologische Einteilung der BCCs . . . . .	18
2.3. Behandlung der Primärantikörper . . . . .	20
3.1. CK15 Expression in BCCs . . . . .	23
3.2. Lrig1 Expression in BCCs . . . . .	27
3.3. LGR5 Expression in BCCs . . . . .	28
3.4. SOX9 Expression in BCCs . . . . .	30
3.5. $\beta$ -Catenin Expression in BCCs . . . . .	34
3.6. EphB2 Expression in BCCs . . . . .	37
3.7. Nestin Expression in BCCs und ihrem Stroma . . . . .	40
3.8. CRABP1 Expression in BCCs und ihrem Stroma . . . . .	43
3.9. Expression von CK15, Lrig1, LGR5, SOX9 und $\beta$ -Catenin in gesunder Haut .	46
3.10. Expression von EphB2N, EphB2C, Nestin und CRABP1 in gesunder Haut . .	47
4.1. CK 15 Expression in BCCs . . . . .	49
A.1. Verwendete Geräte . . . . .	86
A.2. Verwendete Reaktionsstoffe . . . . .	88

# Abkürzungsverzeichnis

BCC	Basalzellkarzinom
BG	Bindegewebe
BGS	Bindegewebsscheide
CD	Cluster of Differentiation
CK15	Cytokeratin 15
CRABP1	Cellular retinoic-acid binding protein 1
EGF	Epidermal growth factor
Eph	Ephrin-Rezeptor
Ephrin	Ephrin-Ligand
EW	Entwicklungswoche
HP	Haarpapille
HWS	Haarwurzelscheide
IFE	Interfollikuläre Epidermis
KO	Knock-Out
KZ	Keratinocyten
LGR5	Leucine-rich Repeat-containing, G-protein coupled Receptor 5
Lrig1	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1
pos.	positiv/e/en/er
PTCH	Patched
RA	Retinsäure
SCC	Plattenepithelkarzinom
SD	Schweißdrüse
SHH	Sonic-Hedgehog
SMO	Smoothened
SOX9	Sex-determining region of Y-related HMG-box-transcriptionfactor 9
SZ	Stammzelle/n
TD	Talgdrüse
TF	Talgdrüsenfollikel
TI	Tumorinterface
TS	Tumorsepten
UV	Ultraviolett

# 1. Einleitung

## 1.1. Bedeutung und Funktion der Haut

Die menschliche Haut ist mit einer Größe von ca. 1,5-2 m<sup>2</sup> eines der größten Organe des menschlichen Körpers. Sie grenzt den Organismus zur Umwelt ab und übernimmt zahlreiche lebenswichtige Funktionen, wie z.B. Schutz vor physikalischen, chemischen und mikrobiellen Einwirkungen oder die Regulierung des Wärme- und Flüssigkeitshaushaltes. Zudem hat die Haut als größtes Sinnesorgan wichtige Tast- und Kontaktfunktionen und übernimmt als Immunorgan eine bedeutende Überwachungsfunktion („Immunosurveillance“) bei der Hauttumorentstehung. Die Grundlage dafür bildet ein dreischichtiger Aufbau in Epidermis, Dermis und Subkutis. Dabei werden die epithelialen Kompartimente, zu denen die Epidermis, der Talgdrüsenfollikel (TF) und die anhängenden Drüsen gehören, von den mesenchymalen Anteilen (dermales Bindegewebe) getrennt.

Um ihren zahlreichen Funktionen nachkommen zu können, unterliegt vor allem die Epidermis einer permanenten zellulären Erneuerung, welche nach aktuellen Untersuchungen von sog. Stammzellen (SZ) und ihren Progenitorzellen reguliert wird. Diese Zellen haben ein nahezu unerschöpfliches Potenzial zur Selbsterneuerung und Regeneration. Derzeit wird angenommen, dass die einzelnen Kompartimente der Haut über eigenständige Stammzellnischen verfügen, welche z.B. nach Verletzungen oder bei der Induktion eines neuen Haarzyklus selbstständig agieren. Die Erforschung dieser einzelnen Stammzellnischen ist derzeit von hohem Interesse, denn durch ein besseres Verständnis des biologischen Verhaltens dieser Zellen könnte man mehr Rückschlüsse auf die Pathogenese von dermatologischen Erkrankungen vornehmen.

Auch in der Karzinogenese sind die SZ von Interesse, da sie bei der Entstehung von Hauttumoren als verantwortliche Zellen diskutiert werden, u.a. bei dem häufigsten kutanen Malignom: Dem Basalzellkarzinom (BCC). Das BCC ist zwar durch eine nur geringe Letalität aber eine lokale Destruktivität sowie eine weltweit ansteigende Inzidenz geprägt. Auch wenn über ätiologische und pathogenetische Faktoren des BCCs einiges bekannt ist, bleibt eine der wesentlichsten Fragen noch immer unbeantwortet: Aus welchen aberranten (Stamm)Zellen entsteht das BCC? Das BCC ist eine der wenigen Tumorentitäten, bei der die Histogenese nicht abschließend geklärt ist. Das Wissen über seine Tumorbilogie könnte zu neuen präventiven und therapeutischen Optionen führen. Ein wesentlicher Ansatz ist daher zuverlässige Antikörper als Marker zu entdecken, welche potentielle SZ spezifisch detektieren. Ziel dieser Arbeit ist es solche Stammzellmarker an den verschiedenen Typen des BCC immunhistochemisch zu entdecken, um Rückschlüsse über dessen Histogenese gewinnen zu können.

## 1.2. Anatomie und Embryologie der Haut

### 1.2.1. Anatomie der Haut

Im Folgenden sollen nur die für diese Arbeit wichtigen Anteile der Haut, die Epidermis, der Talgdrüsenfollikel (TF) und die Dermis, näher beschrieben werden. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, das zu 90% aus Keratinozyten (KZ) besteht und einer Basallamina aufsitzt. Zudem beinhaltet es die mit ihr in Verbindung stehenden Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen. Die KZ werden von potentiellen SZ in der untersten Schicht, dem Str. basale, vorwiegend der Papillarregion, generiert. Im Anschluss durchlaufen sie ein strikt reguliertes Differenzierungsprogramm, die terminale Differenzierung, und bilden die aufsitzenden Schichten: Str. spinosum, Str. granulosum und Str. corneum (Abbildung 1.1 b). Die Zellform verändert sich im Rahmen der Differenzierung von kubisch (basal) über horizontaloval zu abgeplattet (corneal). Die Grenze zur Dermis, die dermoepidermale Junctionszone, zeigt mehrere Ausstülpungen in beide Richtungen, sog. Reteleisten und dermale Papillen (Abbildung 1.1) [1, 2].

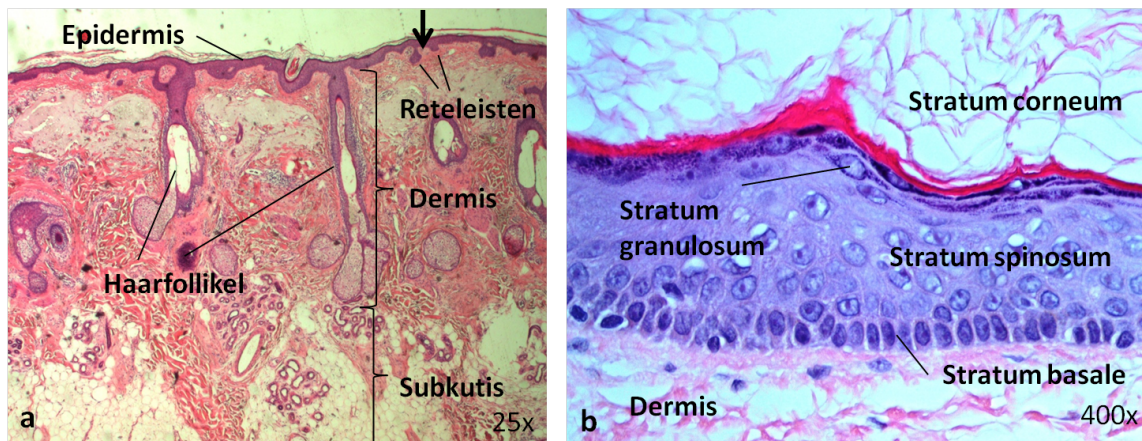


Abbildung 1.1.:

Aufbau der Haut in der HE-Färbung. (a) Die drei Schichten der Haut in der Übersicht. Der Pfeil deutet eine dermale Papille zwischen zwei Reteleisten an. (b) Epidermis in der Detailaufnahme.

Der TF ist als Invagination der Epidermis kontinuierlich mit dieser verbunden. Es setzt sich zusammen aus der das Haar umgebenden röhrenförmigen epithelialen Haarwurzelscheide (HWS) und dem zwiebelartigen Haarbulbus, der die Matrixzellen beinhaltet (Abbildung 1.2 a). Man unterscheidet einen konstanten oberen und einen dem Zykluswechsel unterworfenen variablen, unteren Anteil (Abbildung 1.3). Als Grenze wird der sog. Wulst knapp oberhalb der Ansatzstelle des M. arector pili angesehen [3]. Der obere Anteil wird nochmals in das trichterförmig erweiterte Infundibulum und dem darunterliegenden, durch den einmündenden Talgdrüsenausführungsgang abgegrenzten, Isthmus gegliedert. Die epitheliale HWS wird in eine innere (mit Kutikula, mehrschichtiger Huxley- und einschichtiger Henleschicht) und eine

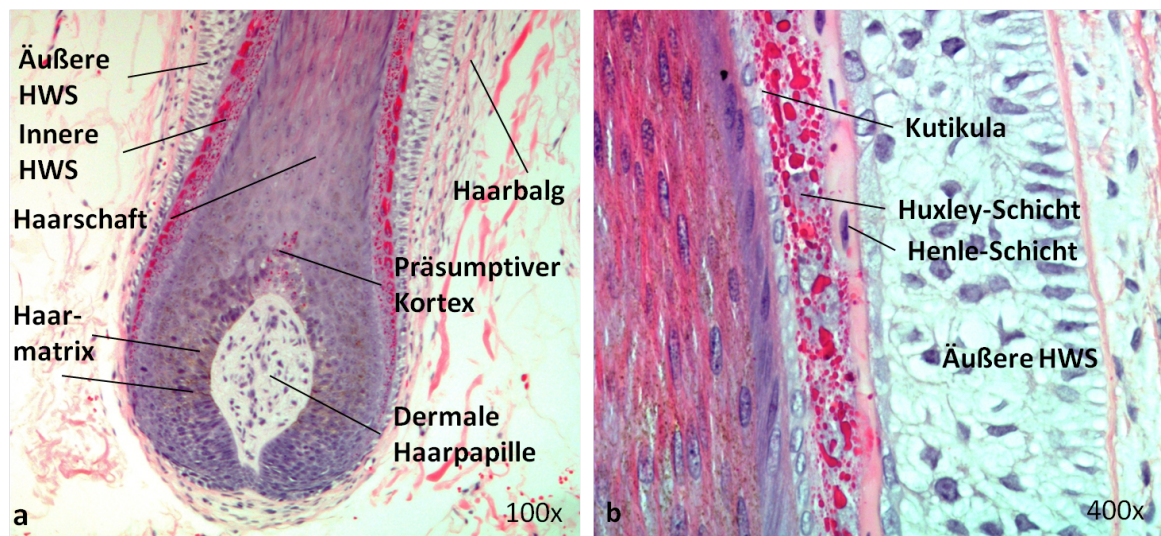


Abbildung 1.2.:

Aufbau des TFs in der HE-Färbung. (a) TF-Bulbus. (b) Detailaufnahme der epithelialen HWS.

äußere HWS unterteilt (Abbildung 1.2 b) und ist von einer Bindegewebsscheide, dem sog. Haarbalg, umgeben. Dieser mündet in den glockenförmig eingezogenen Bulbus und bildet die dermale Haar-papille (HP). Diese Beschreibung trifft auf TF zu, die sich in der mehrere Jahre dauernden Anagen- oder Proliferationsphase befinden (Abbildung 1.3). Während dieser Phase werden der Haarschaft und die innere HWS von den Haarmatrixzellen im Bulbus gebildet [4]. Anschließend stellt sich eine wenige Wochen dauernde Regressionsphase (katagen) ein, um letztlich in die etwa vier Monate dauernde Telogenphase zu münden. In der Katagenphase stellt die Haarmatrix die Proliferation ein und der epitheliale Anteil des TFs unterhalb des Wulstes bildet sich zum sog. sekundären Haarkeim zurück. In der Telogenphase löst sich die Verankerung des alten Haarschafts im Follikel (Abbildung 1.3) [5, 6]. Hier soll kurz die Bedeutung von Signalwegen, insbesondere des Wnt- und des Sonic-Hedgehog(SHH)-Weges erläutert werden. Die Aktivierung dieser Signalwege ist der wichtigste, von den HP-Zellen vermittelte, Trigger für die potentiellen Wulst-SZ eine neue Anagenphase einzuleiten [7, 8, 9]. In dieser werden aus den diskutierten SZ des Haarwulstes neue Zellen rekrutiert, die mit der HP in die Tiefe wachsen und eine neue Matrix sowie eine neue HWS bilden [10]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass wie auch in der TF-Entwicklung (siehe 1.2.2 und 1.5.5) der SHH-Weg wichtig für das Tiefenwachstum des Haares ist, aber durch die proliferationsaktivierenden Signale des Wnt-Weges reguliert wird [7, 11].

Die Dermis besteht aus dem oberen Str. papillare und dem Str. reticulare. Sie ist für die mechanische Belastbarkeit der Haut von großer Bedeutung und besteht im Wesentlichen aus Kollagen- und elastische Fasern, welche für die nötige Reißfestigkeit und Dehnbarkeit sorgen. Zudem beherbergt sie die versorgenden Nerven und Blutgefäße. Letztere werden in einen

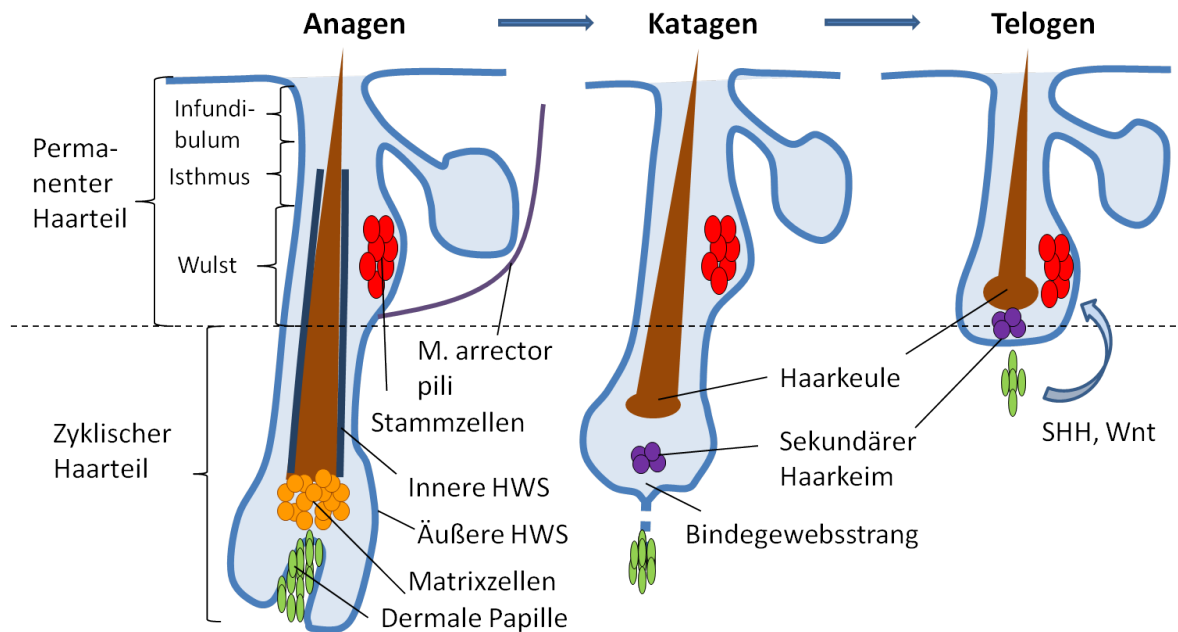


Abbildung 1.3.:

Haarzyklus und Aufbau des Haares schematisch. Modifiziert nach [10, 5, 6]

oberflächlichen und tiefen Plexus mit vertikalen Verbindungsgefäßen unterteilt (Abbildung 1.1). Hinsichtlich der zellulären Bestandteile findet man vor allem Fibroblasten, Mastzellen und verschiedene immunologische Zellen. An den Kontaktstellen zu den epithelialen Anteilen von Drüsen und TF bildet die Dermis separate Bindegewebsscheiden aus [1, 2].

### 1.2.2. Embryologie der Haut

Die Embryologie der Haut und ihrer Anhangsgebilde, insbesondere des TFs, ist für das Verständnis der Tumorbilogie des BCC essentiell. Mehrere Studien weisen daraufhin, dass das BCC in embryonale Entwicklungsmuster zurückfällt und sogar dieselben Differenzierungsmarker wie die entstehende Haarknospe exprimiert. Zudem ist kaum ein anderes Organsystem von der Entwicklung bis zum Lebensende auf eine derart genau abgestimmte Differenzierung und Wechselwirkung zweier Gewebeschichten angewiesen. Dies spiegelt sich auch in der komplexen Tumor-Stroma-Interaktion von Hauttumoren wider.

#### Entwicklung der Epidermis

Die Epidermis entsteht aus dem einschichtigen Oberflächenektoderm. In der 8. Entwicklungswoche (EW) entsteht durch Proliferation aus der einlagigen Basalschicht eine zweite ihr aufgelagerte Zellschicht, das Periderm. Durch weitere Proliferation der Basalschicht kommt es in der 11. EW erstmals zu einer Dreischichtung (Abbildung 1.4) mit einer Zwischenschicht, die bereits aus KZ besteht. Dieses verstärkte Zellwachstum führt auch zur Bildung der Rete-

leisten, welche sich in die entwickelnde Dermis vorstülpen. Weitere Differenzierungsprozesse führen schließlich zur Ablösung des Periderms in der 21. EW. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Epidermisanlage schon aus ihren späteren vier Schichten [12].

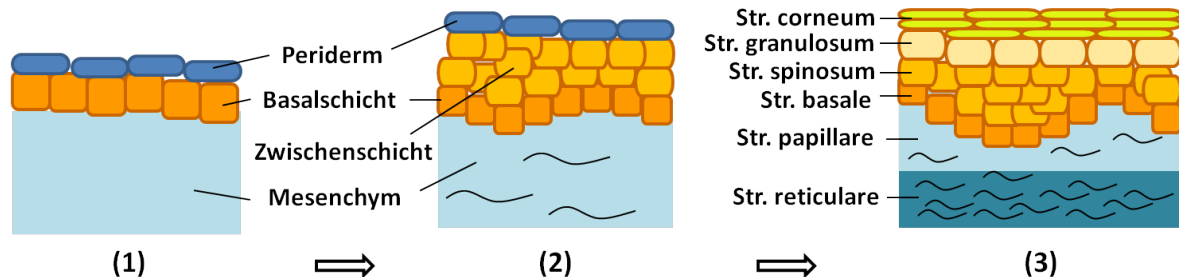


Abbildung 1.4.:

Embryologie von Epidermis und Dermis. (1) 8. EW, (2) 11. EW, (3) 21. EW. Modifiziert nach [12].

### Entwicklung der Dermis

Die Dermis entwickelt sich aus dem Mesenchym, welches dem Oberflächenektoderm anliegt und stammt außer am Kopf vom Mesoderm ab. Als Reaktion auf die einwachsenden Reteleisten bilden sich die dermalen Papillen mit dem papillären Gefäßplexus aus, welche durch die damit größere Oberfläche zwischen Epidermis und Dermis eine stabile Verbindung bilden. Ab der 11. EW bilden die jetzt als Fibroblasten bezeichneten Mesenchymzellen die ersten Kollagen- und elastischen Fasern. Anhand der Verteilung der Fasern entsteht das dichtere und straffere Str. reticulare und das weniger dichte Str. papillare [12].

### Entwicklung des Talgdrüsenfollikels

Die Entwicklung des TFs ist von komplexen Wechselwirkungen zwischen Dermis und Epidermis abhängig. Die erste Haaranlage, die sog. Haarknospe oder Haarplakode, entsteht in der 9. - 12. EW durch Signale mesenchymaler Nestin exprimierender Zellen [13] auf die Basalzellen der Epidermis. Diese proliferieren und vermitteln durch Rücksignale die Ansammlung mesenchymaler Zellen, die initiale HP. Durch weitere Proliferation der Basalzellen hat sich ab der 14. EW bereits der zweischichtige Haarzapfen und in der 16. EW die keulenförmige Haaranlage mit aufgetriebenem Haarbulbus und eingestülpter mesenchymaler HP gebildet (Abbildung 1.5). Die epitheliale Anlage der späteren Talgdrüse (TD) entsteht aus der epithelialen Wurzelscheide. In der 22. EW ist das Wachstum der TF abgeschlossen [12]. An dieser Stelle soll nochmals die Bedeutung des SHH-Weges hervorgehoben werden, da er neben der TF-Entwicklung auch für die BCC-Entstehung von ausschlaggebender Bedeutung ist. Die SHH-Signale in den Zellen der initialen HP sind für das Einwachsen der Haarplakode in die Dermis verantwortlich. So zeigen SHH-Knock-out(KO)-Mäuse zwar eine normale Verteilung der Haarplakoden, aber es werden keine TF gebildet, weil hier die dermale Signalkrückkopplung über den SHH-Weg fehlt [14]. Der Wnt-Weg übernimmt bei der TF-Entwicklung ebenfalls eine essentielle Rolle. Im Kapitel 1.5.5  $\beta$ -Catenin wird darauf näher eingegangen.

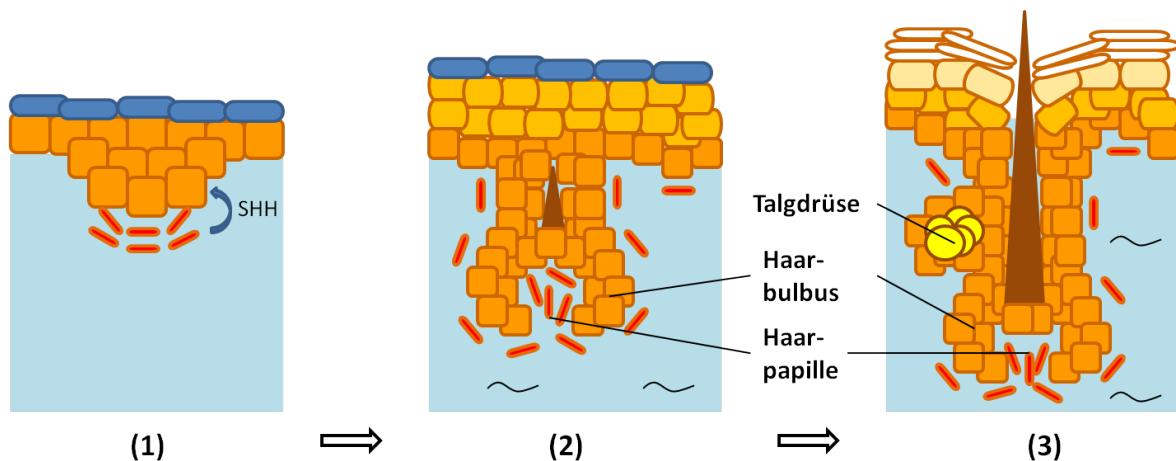


Abbildung 1.5.:

Embryologie des TF. (1) 9.-12. EW, (2) 16. EW, (3) 22. EW. Modifiziert nach [12].

### 1.3. Stammzellen der Haut

Die Haut ist eines der am stärksten proliferierenden Gewebe des menschlichen Körpers, was die essentielle Grundlage für ihr schnelles Regenerationspotential z.B. nach Verbrennungen durch Einwirkung von Ultraviolett(UV)-Strahlung oder mechanischen Verletzungen ist. Die Kehrseite dieses enormen proliferativen Potentials ist das bei fehlerhafter Reparatur oder Fehlsteuerung erhöhte kanzerogene Risiko. Die Basis für die stetige Erneuerung der Haut sind SZ, welche in verschiedenen Kompartimenten liegen. SZ sind langlebige Zellpopulationen, die die Fähigkeit der Selbstvermehrung und Geweberegeneration über ihre gesamte Lebenszeit besitzen und sowohl während der normalen Homöostase als auch unter pathologischen Bedingungen agieren. Es gibt zwei Modelle wie SZ den zellulären Haushalt aufrechterhalten. Lange Zeit dachte man, dass SZ sog. Progenitorzellen (auch transit amplifying cells genannt) bilden, die sich für einen definierten Zeitraum teilen und danach der terminalen Differenzierung unterliegen [15, 16]. Später wurde gezeigt, dass SZ die Fähigkeit zur Polarisierung besitzen und sich daher auch asymmetrisch in eine SZ-Tochter und einer der direkten Differenzierung unterliegenden Zelle teilen können [17]. Allerdings stammt der Großteil der bisherigen Kenntnisse über die Lage der potentiellen SZ von Studien an Maushaut und ist daher stark abhängig von Region, Geschlecht und Alter. Außerdem ist unklar, ob sich die Daten überhaupt und wenn, in welchem Ausmaß auf den Menschen übertragen lassen.

Es gibt drei vermutete Haupt-SZ-Nischen in den epithelialen Anteilen der Haut. Die Wulst-region des TFs ist die am besten beschriebene potentielle SZ-Nische. Cotsarelis et al. zeigten 1990, dass in diesem Bereich sehr langlebige Zellen, sog. Label-retaining-cells (LRCs), liegen [18]. In später folgenden Transplantations- und Zelllinienstudien konnte das SZ-Potential der Wulstzellen untermauert werden [19, 20, 21]. Oberhalb des Wulstes liegt im Isthmus die zweite potentielle SZ-Nische. Die dort über ihren Gang einmündende TD unterliegt im Rahmen

ihrer holokrinen Sekretion einer permanenten zellulären Erneuerung durch Progenitorzellen. Jedoch ist nicht geklärt ob diese ein eigenes SZ-Kompartiment darstellen oder aus ausgewanderten Zellen von Wulst oder Isthmus, und somit vom TF, abstammen [22, 23, 24, 25]. In der interfollikulären Epidermis (IFE) wird die dritte, vom TF unabhängige, SZ-Population vermutet [26]. Jedoch konnten für diese Zellen noch keine zuverlässigen Marker identifiziert werden [22, 25]. Das in dieser Studie untersuchte Lrig1 könnte ein vielversprechender Regulator und vielleicht auch Marker der potentiellen SZ der IFE sein [27]. Eine weitere Zellgruppe mit hohem proliferativem Potential liegt in der Haarmatrix. Für sie ist noch nicht abschließend geklärt, ob sie in der Anagenphase aus auswandernden Wulstzellen [28, 29] oder aus Zellen des sekundären Haarkeims gebildet wird [21, 25]. Abbildung 1.6 zeigt die Lage der diskutierten SZ-Kompartimente und die Expression der für diese Arbeit wichtigen Marker im Mausmodell.

SZ sind nicht nur bei der Gewebemöostase sondern auch bei der Tumorentstehung von großer Bedeutung. So konnte bereits in Leukämien [30] und Brustkrebs [31] gezeigt werden, dass Tumoren aus mutierten SZ der jeweiligen Gewebe entstehen. Dieser Ansatz ist aktuell ein Forschungsschwerpunkt der experimentellen Dermatologie, z.B. bei der Suche nach der Ursprungszelle des BCCs.

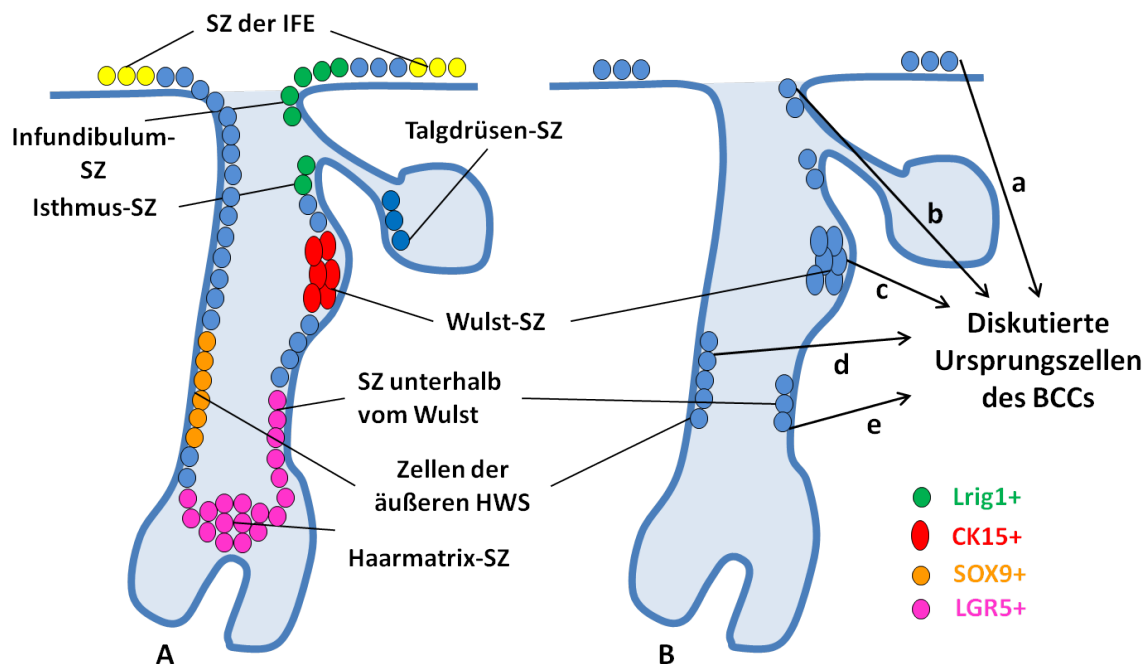


Abbildung 1.6.:

(A) Mögliche SZ-Kompartimente der Haut mit Lokalisation von Lrig1, CK15, SOX9 und LGR5 im Mausmodell. (B) zeigt in (a)-(e) die möglichen Ursprungszellen des BCCs. (a) aus der IFE [32, 33, 34, 35]. (b) aus den SZ des Infundibulums [32]. (c) aus den Wulst-SZ [35, 36]. (d) aus den Zellen der äußeren HWS [37, 34]. (e) aus den LGR5 positiven SZ des unteren TFs [34, 36]

## 1.4. Das Basalzellkarzinom und seine Histogenese

Das BCC ist in der kaukasischen Bevölkerungsgruppe mit einer Lebenszeitprävalenz von 30% der mit Abstand häufigste maligne Hauttumor [38]. Zudem zeigt es eine weltweit zunehmende Inzidenz von 3-10% jährlich [39]. Großbritannien verzeichnete von 1999 bis 2010 eine Zunahme der BCCs um 70% [40]. Auch wenn das BCC ein Tumor des höheren Lebensalters ist und nur eine niedrige Letalität aufweist, so wächst es lokal horizontal und vertikal destruierend, was besonders im Gesichtsbereich eine komplexe Therapie erfordern kann. Zudem zeigt das BCC, in Abhängigkeit von Subtyp und Therapiemethode, zum Teil hohe Rezidivraten und nach erstmaliger Erkrankung besteht eine 10fach erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Zweitmanifestation [41].

Über die ätiologischen Risikofaktoren und die Pathogenese des BCCs ist bereits einiges bekannt. Langjährige Sonnenlichtexposition gilt als der wichtigste kanzerogene Faktor, da 80% aller BCCs in den lichtexponierten Arealen, vor allem den Sonnenterassen des Gesichts, auftreten [42]. Die kurzwellige UVB-Strahlung spielt dabei eine größere Rolle als die UVA-Strahlung [43, 44]. Hohe UVB-Dosen in der Kindheit und im Jugendalter sind als besonders kritisch zu bewerten [45]. Weiterhin sind ein heller Hauttyp, eine zurückliegende Arsentherapie, radiogene Strahlen, allgemeine Immunsuppression (einschließlich Transplantatpatienten), höheres Lebensalter, sowie bestimmte Medikamente z.B. Calcineurinhhibitoren, Tetrazykline und Cephalosporine, bekannte Risikofaktoren [45].

Molekulargenetisch hervorzuheben ist der SHH-Signalweg, der bei bis zu 90% der sporadischen BCCs Mutationen im Patched (PTCH)- oder smoothened (SMO)-Gen und weiteren Genen zeigt [46, 47, 48]. Es kommt zu einer unkontrollierten SHH-Aktivität, die eine erhöhte Proliferation zur Folge hat. Beim autosomal-dominant vererbten [49] nävoiden Basalzellkarzinom-Syndrom (Gorlin-Goltz-Syndrom) besteht bei allen Patienten eine Keimbahn-PTCH-Mutation, sodass bereits eine weitere Mutation ausreicht, damit ein BCC entsteht [50]. Auch im Mausmodell konnte bestätigt werden, dass PTCH1+/- Mäuse verstärkt BCCs und andere Fehlbildungen des Gorlin-Goltz-Syndroms ausbilden [51]. Weiterhin finden sich bei über 50% aller BCCs eine p53-Genmutation [52], welche jedoch nicht spezifisch für diese Tumorentität ist. Klinisch werden die BCCs in drei Hauptformen eingeteilt, histologisch sind zahlreiche weitere Subtypen differenzierbar, was die Inhomogenität dieses Tumors unterstreicht. Das noduläre oder solide BCC als häufigste Variante, ist durch sein knotiges Wachstum gekennzeichnet und kann in ein longitudinal wachsendes Ulcus rhodens oder vertikal infiltrierendes Ulcus te-rebrans, als ulzerierende Form, übergehen. Weitere klinische Varianten sind das superfizielle und das sklerodermiforme BCC, die oft auch gemischt auftreten. Zystische, pigmentierte oder adenoide BCCs sind weitere Subtypen, die jedoch nur histologisch differenzierbar sind [1, 2].

Anhand der Fülle der bekannten Informationen über das BCC ist es um so erstaunlicher, dass die Herkunft des häufigsten Malignoms der Haut nicht vollständig geklärt ist. Der Na-

me des BCCs entstand aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit der Tumorzellen mit den basalen Zellen der IFE. Lange Zeit wurden diese, wie bereits 1903 von Krombrecher vermutet [53], auch als Ursprungszellen des BCCs angesehen. Erst ein halbes Jahrhundert später stellte Lever diese These in Frage und postulierte, dass das BCC aus dem primären epithelialen Haarkeim entsteht und damit follikulärer Herkunft wäre [54]. Nachfolgende Studien unterstützten die Annahme, dass das BCC einen follikulären Ursprung hat. So zeigen z.B. die äußere HWS des TFs und das BCC dasselbe Cytokeratin-Profil, wohingegen das der IFE vom BCC abweicht [55, 56, 57, 58]. Zudem wird ein follikulärer Ursprung wahrscheinlicher, wenn man die Tumorbilogie genauer betrachtet. Wie bereits erwähnt sind sowohl der SHH- als auch der Wnt-Signalweg von entscheidender Bedeutung für die TF-Entwicklung und Haarzyklusinitiierung. Für beide Signalwege wurden verstärkte Aktivitäten im BCC berichtet [47, 59]. Diese Tatsache verstärkt die Annahme des follikulären Ursprungs aber beweist ihn nicht. Jüngste Studien postulieren, dass eine SZ oder Progenitorzelle der IFE Mutationen im SHH-Weg erfährt, daraufhin in ein embryonales Muster zurückfällt und eine follikuläre Differenzierung durchläuft. Dadurch kommt es ebenfalls zu einer Wnt-Aktivierung, wodurch die Proliferation nochmals gesteigert wird und auch eine Reprogrammierung der dermalen Zellen stattfindet. Aufgrund der stark erhöhten Proliferation entarten schließlich einzelne Zellen und es entsteht die BCC-Knospe [32, 33]. Interessant ist, dass hier als Voraussetzung für die Tumorentstehung der mutierte SHH-Weg den Wnt-Weg aktiviert [59], also umgekehrt wie bei der Haarentwicklung. Diese Annahme, dass das BCC eine fehlgeleitete TF-Entwicklung darstellt, wird durch die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der initialen Haarknospe mit der BCC-Knospe [59, 60, 37] unterstützt und erklärt zudem die Expression von follikulären Markern im BCC. Für eine Entstehung aus der IFE würden zudem die Fakten sprechen, dass der wichtigste ätiologische Faktor, die UVB-Strahlung, in der IFE deutlich höhere Konzentrationen erreicht als im tiefer gelegenen Haarwulst. Außerdem ließen sich nach dieser Theorie die vereinzelt BCCs an nicht behaarter Haut erklären. Letztlich konnten im Mausmodell beide Theorien bestätigt werden [32, 35], (Abbildung 1.6 B).

Hervorzuheben sind die wenig aggressiven superfiziellen BCCs, die hinsichtlich Körperregion (vor allem an Rumpf und unterer Extremität [61, 62]), Alter (jüngere Patienten [63, 62]) und Geschlecht (bevorzugt Frauen [62]) deutlich andere Verteilungen als die restlichen BCCs zeigen. Ob biologische Faktoren (Verteilung der Hautadnexe, Geschlecht), andere ätiologische Faktoren (weniger UVB-Strahlung, eher chemische und andere Kanzerogene) oder vielleicht auch eine andere Ursprungszelle im Vergleich zu den anderen Subtypen ursächlich dafür sind, ist nicht vollständig geklärt. Grachtchouk et al. zeigten im Mausmodell, dass es von der SHH-Aktivität und der mutierten Zelle abhängt, welcher BCC-Subtyp entsteht [34]. Während die soliden BCCs aus Zellen des unteren Wulstes oder des sekundären Haarkeims entstehen, entspringt der superfizielle Subtyp aus Zellen der IFE oder nicht behaarten Epidermis [34]. Bei reduzierter SHH-Aktivität entstanden statt BCCs Hamartom ähnliche Tumoren, die sich womöglich aus einem irregulären SZ-Pool rekrutieren [34, 64]. Ob diese Daten auf den Menschen

übertragbar sind, ist jedoch ungewiss. In den letzten Jahren wurde die Entstehung des BCCs aus den potentiellen Wulst-SZ des TFs bzw. den aus ihnen hervorgehenden Progenitorzellen am stärksten favorisiert. Endgültig abgeschlossen ist dieses Thema aber noch lange nicht.

Schon angedeutet ist die Bedeutung des Tumorstromas für die BCC-Entwicklung und Aufrechterhaltung nicht zu vergessen. Bereits 1961 konnte gezeigt werden, dass transplantierte BCCs ohne Tumorstroma degenerieren oder komplett absterben, wohingegen die BCCs mit Stroma sich normal weiter entwickeln [65]. Dass die stromalen Fibroblasten eine Rolle bei der malignen Entartung der epithelialen Zellen übernehmen ist denkbar, da auch die dermalen Zellen bei der BCC-Entstehung eine Reprogrammierung durchlaufen [33].

### 1.5. Relevante Marker in der BCC-Histogenese

#### 1.5.1. Cytokeratin 15

Cytokeratin 15 (CK15) ist ein Protein der Keratinfamilie, eine Untergruppe der Intermediärfilamente, welche spezifisch in Epithelien exprimiert werden [66, 67]. Es gehört zur Keratin-Gruppe 1, den kleineren CKs, und bildet eine Ausnahme, da es keinen Keratin-Partner an sich bindet, wie es für viele andere CKs beschrieben ist. Die Verteilung der einzelnen CKs in den epithelialen Anteilen der Haut ist ein Zeichen für Differenzierung und Spezialisierung der verschiedenen Zellschichten [66, 67]. CK15 wird in den basalen KZ der Epidermis exprimiert und wird in aktivierter bzw. stark proliferierender Haut, wie z.B. Psoriasis oder hypertrophen Narben, herunterreguliert [68].

Besondere Bedeutung erlangte CK15 als 1998 Lyle et al. zeigten, dass die im TF-Wulst gelegenen potentiellen SZ spezifisch mit dem cluster of differentiation (CD)8-Antikörper (DAKO Klon C8/144B) angefärbt werden können und dieser mit CK15 kreuzreagiert [69]. Ein Jahr später stellten Waseem et al. einen weiteren, monoklonalen, CK15 Klon her (LHK15), der ein unspezifischeres Färbeprofil zeigte, da er zusätzlich zu den Wulstzellen auch diskontinuierlich die basale Epidermis färbte [68]. Pontiggia et al. demonstrierten, dass es sich dabei um potentielle SZ der IFE handeln könnte [70]. Weitere immunhistochemische Studien mit teils neuen und den bereits bekannten Klonen folgten mit uneinheitlichen Ergebnissen [71, 70]. Insgesamt gibt es einige Gründe, die für CK15 als möglichen SZ-Marker sprechen, wie z.B. die spezifische Anfärbung der fraglichen Wulst-SZ des C8/144 Klons [70], oder das die CK15 positiven (pos.) Wulst-Zellen unter homöostatischen Bedingungen den kompletten TF regenerieren können [19]. Zudem demonstrierten Wang et al. im PTCH +/- Mausmodell, dass das BCC aus den CK15 pos., potentiellen SZ des TF-Wulstes entstehen [35].

Wichtig ist es aufgrund der unterschiedlichen Färbeprofile die CK15-Antikörper getrennt zu betrachten. Auch wenn CK15 als potentieller SZ-Marker umstritten ist [72, 73], bleibt es einer der geeignetsten Wulstzell-Marker und ist somit von hohem Interesse hinsichtlich der

Herkunft des BCCs. In dieser Studie wird der meines Wissens noch nicht an BCCs getestete EPR1614Y-Klon vom C-Terminus des CK15 Proteins verwendet.

### 1.5.2. Lrig1

Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1 (Lrig1) wurde erstmals 2001 von Nilsson et al. als transmembranäres Zelloberflächenprotein im menschlichen Körper beschrieben [74]. Es besteht aus 15 leucin-reichen Regionen, 3 immunoglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne sowie einem zytoplasmatischen Anteil und zeigt sehr große Ähnlichkeit zu dem Lrig1 der Maus [74]. Es ist ubiquitär im menschlichen Körper verbreitet, z.B. in Epidermis und Drüsengewebe, wie der Talgdrüse oder der Prostata [75]. Lrig1 inhibiert den Epidermal growth factor (EGF)-Rezeptor der ErbB-Familie nach dessen Aktivierung, sodass ein negativer Feedbackmechanismus besteht. Somit hemmt es die EGF vermittelten Wachstums- und Proliferationsprozesse [76].

Lrig1 ist für die Kompartimente der Haut an der Maus weitaus besser erforscht. Es wird von potentiellen SZ, die in der sog. Junctionalzone des TFs (oberer Isthmus) zwischen Infundibulum, TD-Gang und dem Wulst liegen, exprimiert [23]. Sie sind klar getrennt von den CK15 und CD34 pos. Zellen des Wulstes. Die Lrig1 pos., potentiellen SZ können sich sowohl zu Zellen des Infundibulums als auch der TD differenzieren [23]. In der TD bilden sie den basalen Sebozyt, der bei weiterer Differenzierung Lrig1 verliert [77]. Eine weitere Lrig1 pos. Zellpopulation mit SZ-Potential befindet sich in der IFE, welche in vitro alle Zelllinien der Epidermis bilden kann [23]. Diese zwei möglichen SZ-Nischen scheinen außer im Rahmen der Wundheilung, wo Zellen des Isthmus in die IFE auswandern, unabhängig voneinander zu agieren [77]. Aufgrund dieser Eigenschaft wird Lrig1 als SZ-Marker vermutet. Zudem findet man Lrig1 in der Anagenphase des TFs auch in der äußeren HWS [23, 77]. Es wird angenommen, dass Lrig1 als Wachstums- und Proliferationshemmer die potentiellen SZ von Isthmus und IFE in Ruhe hält und somit wichtig für die Homöostase der IFE ist [23]. Dafür spricht der Fakt, dass es beim Fehlen von Lrig1, sowohl in Maushaut als auch in menschlichen KZ-Kulturen, zur Epidermishyperproliferation kommt [78, 23, 79]. Der TF und die TD zeigen im Lrig1-KO-Modell von Jensen et al. hingegen keine erhöhte Proliferationsbereitschaft [23]. Als potentieller SZ-Marker der IFE und des TF-Isthmus könnte die Expression von Lrig1 im BCC neue Erkenntnisse zu seiner Histogenese ermöglichen.

### 1.5.3. LGR5

Leucine-rich Repeat-containing, G-protein coupled Receptor (LGR) sind eine Untergruppe der großen 7-Transmembrandomänenrezeptoren [80]. LGR 5 gehört mit 16-18 Leucine-rich repeats zur B-Klasse der LGRs. Ihre sehr lange extrazelluläre Domäne dient als Bindestelle für ihre Liganden, die R-Spondine [81]. LGR 5 ist weit im menschlichen Körper verbreitet, am

stärksten in der Muskulatur, aber auch in Plazenta und ZNS [80]. Als potentieller SZ-Marker wurde es erstmals im Kolon der Maus [82] und später in zahlreichen weiteren Mausgeweben, u.a. dem TF [21] und der Brustdrüse [83] beschrieben. Hinsichtlich der Funktion von LGR5 wurde gezeigt, dass es ein Zielgen des Wnt-Signalweges im Kolonkarzinom ist [84, 85] und die Aktivierung von LGR5 pos. Zellen zu einem erhöhten  $\beta$ -Cateninumsatz führt [81].

Erstmalig wurde LGR5 mRNA in den Wulstzellen des telogenen Maus-TFs beschrieben [19]. Später zeigten Jaks et al., ebenfalls im Mausmodell, dass die LGR5 Expression auf eine sich aktiv teilende Zellpopulation im telogenen unteren Haarwulst und dem sekundären Haarkeim beschränkt ist. Interessanterweise ist es während der Anagenphase und der Embryogenese jedoch nur in der äußeren HWS des unteren TFs zu finden [21]. Jaks et al. vermuteten daher, dass in der frühen Anagenphase die Bildung der äußeren HWS des unteren TFs von LGR5 pos. Zellen des sekundären Haarkeims ausgeht und nicht wie bisher angenommen vom Wulst, da dieser in der Anagenphase nicht mehr LGR5 markiert ist [21].

In Transplantationsversuchen mit LGR5 pos. Zellen konnten diese alle regulären Schichten des TFs bilden, was ihr SZ-Potential sowie ihre regenerative Kapazität verdeutlicht [21]. Zudem wurde in den LGR5 pos. Zellen elevierte mRNA von Mediatoren des Wnt- und SHH-Weges gefunden [21], was die essentielle Rolle dieser Zellen in der TF-Differenzierung und möglicherweise der BCC-Entstehung bekräftigt. In Bezug auf die Herkunft des BCCs ist hervorzuheben, dass LGR5 (in der Maus) unter homöostatischen Bedingungen nur im unteren Bereich des TFs zu finden ist, nicht jedoch in Infundibulum oder IFE [21]. Allerdings wurde gezeigt, dass bei Verletzung der Epidermis LGR5 pos. Zellen aus dem unteren TF rekrutiert werden und zum Wundverschluss der IFE sowie verstärktem Haarwuchs beitragen [86].

Zusammengefasst markiert LGR5 eine sich aktiv teilende Zellgruppe im TF, welche unter normalen Bedingungen den sich teilenden, unteren Part des TFs aufrechterhält. Unter pathologischen Bedingungen können die LGR5 pos. Zellen jedoch auch Nachkommen bilden, welche sich an der Wundheilung des Infundibulums und der IFE beteiligen.

#### 1.5.4. SOX9

SOX9 steht für Sry(Sex-determining region of Y)-related HMG-box-transcriptionfactor 9 und ist eines von 24 bekannten Sox-Genen [87]. Es ist als wichtiger Transkriptionsfaktor u.a. regulierend wirksam für die Ausbildung des männlichen Geschlechtes in Vertebraten und wird während der weiblichen Embryogenese herunterreguliert [88]. Folglich kommt es bei SOX9 Mutationen zu Fehlbildungen in der Geschlechtsentwicklung, aber auch schweren Skelettfehlbildungen, wie der Campomele-Dysplasie [89]. Auch in der Chondrogenese und Bildung anderer Gewebe hat SOX9 eine herausragende Bedeutung [90].

Dass SOX9 auch für die Maushaut eine Rolle spielt, zeigten 2005 Vidal et al. zeigten. Erstmals in der embryonalen Haarplakode erscheinend initiiert es ein Programm für die follikuläre

Differenzierung der Zellen der äußeren HWS [91]. Wird SOX9 in der Haut ausgeknockt, entstehen haarlose Mäuse mit degenerierten Wulst-SZ, die kein CD34 mehr bilden und die äußere HWS zeigt eine epidermale Differenzierung [91]. Genauere molekulare Analysen erbrachten zudem, dass SOX9 durch den SHH-Signalweg reguliert wird, was seine Bedeutung für die Haardifferenzierung nochmals hervorhebt [91].

Letztlich ist SOX9 wahrscheinlich kein spezifischer SZ-Marker, aber es greift direkt in die Regulation der TF-SZ ein und könnte über den SHH-Weg auch eine entscheidende Bedeutung bei der BCC-Entstehung mittragen.

### 1.5.5. $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin wurde erstmals 1989 als Bestandteil von Zell-Zell-Verbindungen in Epithelien beschrieben [92]. Darüber hinaus ist es in diversen Signalkaskaden, bei der Tumorentstehung, der Embryogenese und an zahlreichen Wachstumsprozessen beteiligt [93].  $\beta$ -Catenin hat zwei Hauptfunktionen in epithelialen Geweben. Primär ist es das stabilisierende Bindeglied zwischen E-Cadherin, einem transmembranärem Protein der Zellmembran, und dem Aktinzytoskelett [92, 94]. Neben dieser membranären Lokalisation kommt es frei im Zytoplasma vor, wird jedoch unter normalen Bedingungen gleich von einem Zerstörer-Komplex gebunden und ubiquitinabhängig proteolysiert [95, 93]. Wird der Abbau durch den aktivierten kanonischen Wnt-Signalweg inhibiert, akkumuliert  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und wird auch in den Kern transportiert [95, 96]. Dort kann es die Transkription von Wnt-Zielgenen über TCF/LEF-1 Bindungen aktivieren, aber auch als Inhibitor wirken [97, 98, 93].

$\beta$ -Catenin nimmt als zentraler Baustein des kanonischen Wnt-Signalweges eine Schlüsselrolle in der TF-Entwicklung und -Differenzierung ein [99]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der ebenfalls für die Haarentwicklung bedeutsame SHH-Weg dem Wnt-Weg nachgeschaltet ist [7, 11].  $\beta$ -Catenin hat zwei wesentliche Funktionen am TF: Erstens ist es an der Formierung der embryonalen Haarplakode in der Maus beteiligt und zweitens vermittelt es eine follikuläre Differenzierung der TF-SZ im Wulst [7, 11]. Im Knock-Out und Knock-In Mausmodell der Haut konnte die Bedeutung von  $\beta$ -Catenin für den TF untermauert werden. Fehlt  $\beta$ -Catenin in der Embryogenese, wird keine Haarplakode angelegt und die Mäuse werden fast haarlos geboren [7]. Fehlt es bei der adulten Maus stoppt der Haarzyklus in der Katagenphase mit nachfolgender Bildung epidermaler Zysten [7]. Umgekehrt initiiert die erhöhte  $\beta$ -Catenin Expression in telogenen TF die Anagenphase [8, 100] und fördert die Entstehung von zahlreichen neuen aberranten TF [11, 100]. Bei exzessiver  $\beta$ -Catenin-Expression entstehen sogar Trichofollikulom- und Pilomatrixom-ähnliche Tumoren [11, 8].

$\beta$ -Catenin nimmt als wichtigster Mediator des Wnt-Weges in den epithelialen und mesenchymalen Zellen der Haut eine essentielle Bedeutung bei der TF-Entstehung ein. Da das BCC auch als fehlgeleitete Haarentwicklung diskutiert wird, soll in dieser Arbeit die  $\beta$ -Catenin Expression am BCC untersucht werden.

### 1.5.6. Ephrin B2 Rezeptor, N- und C-Terminus

Ephrinrezeptoren (Eph) sind die größte bisher bekannte Subfamilie der transmembran-tyrosinkinase Rezeptoren. Sie werden anhand ihrer Struktur und den bindenden Liganden in die Ephrin-A-Rezeptoren (EphA) 1-8, die Ephrin-A 1-5 binden, und die Ephrin-B-Rezeptoren (EphB) 1-4,6, die Ephrin-B 1-3 binden, eingeteilt [101, 102]. Der bidirektionale Signalfuss [103] erfolgt nur zwischen benachbarte Zellen, da sowohl Ligand als auch Rezeptor membranständig sind. Für Eph wurden zahlreiche Funktionen, z.B. im Aktinzytoskelett, bei Zellform und -bewegung sowie bei Zelldifferenzierung und -proliferation beschrieben [104, 105]. Insbesondere die EphB übernehmen eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Regulierung des ZNS [106] und der Vaskulogenese [107, 108]. Zudem ist ihre Expression in zahlreichen potentiellen SZ-Nischen, z.B. des Intestinuums [105] oder des Haarwulstes [29], beschrieben wurden.

EphB2 konnte an Maushaut in der IFE, der TD und im TF nachgewiesen werden [109]. Im TF markiert es die Wulstregion, die äußere HWS und die Haarmatrix unabhängig vom Haarzyklusstadium. Hervorzuheben ist zudem die Anfärbung der HP [109]. Allerdings bleibt fraglich ob sich diese Daten auf den Menschen übertragen lassen, da einzelne Eph und ihre Liganden ein unterschiedliches Expressionsmuster in Maus- und Menschenhaut zeigen [110] und ihre Expression stark vom Entwicklungsstadium der Haut abhängig ist [111]. Die genaue Funktion der Eph in der Haut ist unbekannt. Im Mausmodell konnte durch Injektionen von Eph oder Ephrinen gezeigt werden, dass der normale Eph/Ephrin Signalweg die Proliferation der KZ inhibiert, also negativ reguliert [109].

Zusammenfassend stellen die Eph eine heterogene Gruppe von membrangebundenen Rezeptoren dar, denen im Mausmodell eine Rolle als Proliferationsregulator von KZ zugewiesen wurde. EphB2 wurde meines Wissens noch nicht per Immunhistochemie an menschlicher Haut sowie am BCC untersucht, weshalb es in diese Studie aufgenommen wurde.

### 1.5.7. Nestin

Nestin ist ein Klasse VI Intermediärfilament, das im zentralen Nervensystem während der frühen Embryonalperiode in neuroepithelialen SZ exprimiert [112, 113] und mit zunehmender Differenzierung der Zellen durch andere Intermediärfilamente ersetzt wird [114]. Außerdem konnte es auch in Progenitorzellen anderer ausgewachsener Gewebe, wie z.B. mesenchymalen SZ des Knochenmarks [115], der Muskulatur [116] und der Lunge [117] sowie in Tumoren (Malignes Melanom [118, 119], Dermatofibrosarcoma protuberans [120], Glioblastom [121]) nachgewiesen werden. Im Rahmen der Angiogenese, vor allem in der Embryonalphase [122], wurde es zudem als Marker von Endothelzellen beschrieben und scheint in vielen Tumoren die Gefäßneubildung zu stimulieren, z.B. im Malignen Melanom [123] und Glioblastom [124].

Nestin ist in transgenen Mäusen mit Nestin gekoppeltem grün fluoreszierendem Protein als

Marker für potentielle Haarwulst-SZ beschrieben wurden [125]. Dabei variiert die genaue Lokalisation der Nestin exprimierenden Zellen mit dem Stadium des Haarzyklus. Während der Telogen- und der frühen Anagenphase befinden sie sich nur im Wulst, währenddessen sie in der weiteren Anagenphase auch in den oberen zwei Dritteln der äußeren HWS und den basalen Zellen der TD zu finden sind [125]. In später folgenden Transplantationsstudien konnte das SZ-Potential der Nestin pos. Wulstzellen weiter untermauert werden [126, 127]. Beispielsweise sind kultivierte Nestin+ Wulst-SZ in der Lage sich in Neurone, KZ, glatte Muskelzellen und Melanozyten zu differenzieren [128].

Allerdings zeigt sich beim Menschen ein komplett kontrastäres Muster. Nestin wird hier vornehmlich in den mesenchymalen Anteilen der Dermis exprimiert [129, 130, 131, 13]. Welche Rolle Nestin im dermalen Bindegewebe übernimmt und ob es in den mesenchymalen oder epithelialen Anteilen des BCCs exprimiert wird, soll in dieser Studie ermittelt werden.

### 1.5.8. CRABP1

CRABP1, cellular retinoic-acid binding protein 1, wurde erstmals 1975 als zelluläres lipid-bindendes Protein beschrieben [132]. Es ist im Körper von Vertebraten ubiquitär verbreitet [133] und zeigt wie sein verwandtes Protein CRABP2 eine starke Affinität für all-trans-Retinsäure (RA) aus der Familie der Retinoide [134]. RA vermittelt seine Funktion über Bindung an Kernrezeptoren, bekannt als RA Rezeptoren (RARs) und Retinoid X Rezeptoren (RXRs), und greift in Transkriptionsprozesse ein, die u. a. eine Schlüsselrolle in der Hautentwicklung und -differenzierung spielen [133]. Die genaue Funktion von CRABP1 ist bislang unklar. Einige Autoren vermuten, dass es den Abbau von RA induziert [135]. Andere nehmen an, dass CRABP1 eine Reservoir- und Transportfunktion von RA in der Zelle hat, da es sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma vorkommen kann [136, 137]. Interessant ist, dass im Tiermodell die Funktion von CRABP1 an der Haut entbehrlich zu sein scheint, wie Studien an KO-Mäusen zeigten [138, 139].

In der Maushaut wird CRABP1 initial in der frühen Embryonalperiode exprimiert. Dabei markiert es das dermale Zellkonvolut aus dem später die HP hervorgeht [140]. Zudem sind in der Embryonalperiode zahlreiche Fibroblasten-artige Zellen, die über die Dermis verstreut sind und auch dichter im Interface von Dermis zu Epidermis liegen, CRABP1 pos.. In adulter Haut markiert CRABP1 haarzyklusunabhängig die HP und eine dermale Zellgruppe direkt neben der TD [140]. Vermutlich handelt es sich dabei um neurogene mesenchymale Progenitorzellen. Hervorzuheben ist, dass die CRABP1 Expression durch RA, sowie den Wnt-Signalweg reguliert werden kann [140].

Insgesamt konnte CRABP1 im Mausmodell als Marker der initialen Zellen der HP dargestellt werden. Da diesen Zellen eine große Bedeutung in der TF-Entstehung zukommt, soll in dieser Arbeit die Rolle von CRABP1 im Stroma des BCCs untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte und Reaktionsstoffe

Siehe Tabelle A.1 (Verwendete Geräte) und Tabelle A.2 (Verwendete Reaktionsstoffe).

#### 2.1.2. Verwendete Primärantikörper

Primär-antikörper	Firma	Bestell-nummer	Ursprung	Klonalität	Klon
CK15	abcam	ab52816	Hase	Monoklonal	EPR1614Y
Lrig1	abcam	ab36707	Hase	Polyklonal	
SOX9	abcam	ab26414	Hase	Polyklonal	
LGR5	SIGMA	B33620	Hase	Polyklonal	
$\beta$ -Catenin	abcam	ab6302	Hase	Polyklonal	
EphB2N	Epitomics	T2599	Hase	Polyklonal	
EphB2C	Epitomics	T2600	Hase	Polyklonal	
Nestin	abcam	ab22035	Maus	Monoklonal	10C2
CRABP1	abcam	ab2816	Maus	Monoklonal	C-1

Tabelle 2.1.: Verwendete Primärantikörper

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Untersuchungskollektiv und Basalzellkarzinomtypisierung

An der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg wurden retrospektiv 45 Patientenakten mit BCCs herausgesucht. Alle Patienten wurden zwischen 2005 und 2009 in der Klinik für Dermatologie operativ versorgt und über die Entnahme und histologische Analyse der OP-Resektate aufgeklärt und haben dieser zugestimmt. Die Aufarbeitung des Tumormaterials erfolgte im Rahmen der histologischen Diagnostik sowie nach Empfehlung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Magdeburg

der Medizinischen Fakultät gemäß der Empfehlungen des zentralen Ethikrats der Deutschen Ärzteschaft. Die exziierten Tumoren wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Diagnose der Tumorentität erfolgte klinisch und histologisch an Hämatoxylin- und Eosin- gefärbten Paraffinschnittpräparaten in der konventionellen Lichtmikroskopie anhand der bekannten Kriterien eines BCCs durch einen Dermatohistopathologen. Gelegentlich wurde diese unter Verwendung anderer immunhistochemischer Färbungen zusätzlich gesichert. Alle Patientendaten wurden anonymisiert.

Aufgrund der morphologischen Vielfalt der BCCs erfolgte eine histologische Subtypisierung in die Kategorien: solide (n=13), superfiziell (n=8), sklerodermiform (n=9), adenoid (n=7, davon 3 trichoadenoide und 4 adenoid-zystische), verwildert (n=8). Da die BCCs oftmals nicht in Reinform auftreten, sondern mehrere Anteile verschiedener Subtypen aufweisen, erfolgte die Zuordnung dieser BCCs zu dem dominierenden histologischen Subtyp. Zudem wurden weit fortgeschrittene BCCs in Form eines Ulcus terebrans (n=8) mit in die Arbeit aufgenommen, sowie BCCs von Patienten, welche an einem angeborenen Gendefekt im PTCH1-Gen, dem Gorlin-Goltz-Syndrom (n=8) leiden. Diese BCCs sind entsprechend ihres histologischen Subtyps in der histologischen Klassifikation inbegriffen. Die Kriterien nach denen die histologische Einteilung erfolgte, sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

<b>Histologische Kriterien</b>	
BCC allgemein	<ul style="list-style-type: none"> <li>- noduläre basaloide Tumorzellproliferationen umgeben von einem meist in parallelen Bündeln angeordneten bindegewebigen, oft fibrosierten, Stroma</li> <li>- typische zystische Spalten zwischen Tumorstroma und peripheren Tumorzellen, sodass der Tumor scharf abgegrenzt ist</li> <li>- ausgeprägte Basophilie der Tumorzellen, ähnlich der Zellen des Str. basale (großer ovaler, basophiler Kern mit schmalem, kaum sichtbarem Zytoplasmasaum)</li> <li>- palisadenartige Zellaufreihung am Tumorrand, zentrale Zellen ungeordnet</li> <li>- Tumorzellen erscheinen uniform, viele Mitosen, wenige Nekrosen</li> <li>- unterschiedlich ausgeprägtes lymphoidzelliges Infiltrat</li> <li>- Differenzierungstendenzen zu den Hautanhangsgebilden, insbesondere dem TF, aber auch undifferenzierte Formen sind möglich</li> </ul>
Solide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- siehe allgemeine BCC-Kriterien, häufigster Subtyp</li> <li>- asymmetrisch knotiger Aufbau mit Kontakt zur Epidermis</li> <li>- scharf begrenzte Tumorknospen mit Eindringen ins Str. retikuläre</li> <li>- oft mit zentral zystischen oder keratotischen Degenerationen</li> </ul>
Superfiziell	<ul style="list-style-type: none"> <li>- multifokal auftretende tropfen- bis knospenförmige Tumorinseln, welche der dermoepidermalen Junktionszone anhaften</li> <li>- Palisadenzellen und Spaltbildung wie bei den soliden BCCs</li> <li>- reguläre Architektur der zwischen den Knospen liegenden Dermis und Epidermis</li> </ul>

Sklero- dermi- form	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hirschgeweihartige 1-2 zelllagige Basalzellkarzinomausläufer</li> <li>- oft tiefe dermale Infiltration mit stark fibrotischer Stromareaktion</li> <li>- unscharfe Begrenzung, meist ohne die typische Palisadenstellung</li> </ul>
Ade- noid	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unterscheidung in trichoadenoide (TF-Imitatoren) und adenoid-zystische BCCs (Imitatoren der apokrinen und ekkrinen SD), oft Verbindung zur Epidermis</li> <li>- viele schmale Epithelstränge die miteinander anastomosieren und netzförmig dazwischen liegende Bindegewebsinseln einschließen</li> <li>- innerhalb der verzweigten Tumorzellen sind drüsenartige Strukturen erkennbar, die meist Lumen mit umgebenden sekretorischen Zellen darstellen</li> </ul>
Verwil- dert	<ul style="list-style-type: none"> <li>- auch basosquamöses Karzinom genannt</li> <li>- atypische basaloide und dyskeratotische spinozelluläre Tumorzellverbände</li> <li>- Tumorzellen mit stärker entdifferenzierten Charakter und mehr Kernatypien</li> <li>- aggressives, infiltrierendes Wachstumsmuster (selten auch in Knochen) mit meist nur geringer Bindegewebsfibrose</li> </ul>

Tabelle 2.2.: Histologische Einteilung der BCCs [1, 2].

### 2.2.2. Immunhistochemie und Herovici-Färbung

#### Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden manuell 2 µm dicke Paraffinschnitte mit dem Leica SM 2000 R Schlittenmikrotom angefertigt, im Warmwasserbad bei ca. 35°C geglättet und anschließend auf Superfrost-Plus-Objektträger aufgetragen. Um einen besseren Vergleich der späteren Färbung zu erhalten, wurden je zwei Paraffinschnitte auf einen Objektträger aufgetragen. Im Anschluss erfolgte die Trocknung der Objektträger bei 60°C im Wärmeinkubator für eine Stunde. Bei der Entparaffinierung der Schnitte im Färbeautomat Shandon Varistain 24-4 (Programm 2) wurde eine dreimalige Behandlung mit Xylolersatz über vier Minuten und darauffolgend die jeweils eine Minute dauernde Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 75%) durchgeführt. Die Antigendemaskierung erfolgte Antikörper-abhängig mit Citrat-Puffer oder EDTA-Puffer. Zur Herstellung der Puffer wurden je 20ml der Zytomed Pufferlösung mit 180ml destilliertem Wasser im Inkubationsbehälter angesetzt. Die fertigen Puffer wurden für zehn Minuten im Dampfgerar vorgewärmt und anschließend mit den Schnitten in die Inkubationsbehälter gegeben und für weitere 25 Minuten im Dampfgerar inkubiert. Danach erfolgte die gründliche Spülung der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für zehn Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte vorsichtig abgetrocknet, mit dem Dako Pen wasseraberrierend umkreist und im Waschpuffer gelagert. Ggf. erfolgte vor Auftragen des Primärantikörpers noch ein Blocking und anschließendes dreimaliges Spülen mit dem Waschpuffer. Nach dieser Grundbehandlung wurde für jeden Antikörper nach einem speziellen Protokoll verfahren (Tabelle 2.3).

Alle Färbereaktionen entsprechen dabei der Streptavidin-Biotin-Methode:

1. Primärantikörper auf die Schnitte auftragen und bei der angegebenen Temperatur die vorgeschriebene Zeit inkubieren lassen. Dabei wird der Antikörper mit einer speziellen Verdünnungslösung verdünnt.
2. Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer.
3. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers und für 15 Minuten inkubieren.
4. Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer.
5. Auftragen des mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidins und für 15 Minuten in einer feuchten Kammer einwirken lassen.
6. Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer.
7. Den Chromogenfarbstoff Permanent AP Red Kit frisch herstellen ( 1ml Permanent AP Red Puffer und 16µl Permanent AP Red) und auf die Schnitte auftragen.
8. Abbruch der Färbereaktion nach Kontrolle unter dem Lichtmikroskop durch Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser.
9. Gegenfärben der Schnitte mit Hämatoxylin durch kurzes Eintauchen in die entsprechende Lösung und schnelles Spülen mit Wasser.
10. Dehydrieren der Schnitte am Färbeautomaten THERMO SHANDON Varistain 24-4 (Programm 3): Schnitte eine Minute mit Wasser spülen, anschließend Rehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe (80% für 20s, zweimal 96% für eine Minute, dreimal 100% für 1 Minute). Abschließend dreimalige Behandlung mit Xylolersatz für zweimal eine Minute und einmal 2,5 Minuten.
11. Eindecken der Schnitte am CONSUL Eindeckautomat.

### **Herovici-Färbung**

Für die Herovici-Färbung werden die Schnitte analog entparaffiniert und in Wasser gespült. Anschließend müssen die zu gleichen Anteilen aus Weigert A (1g Hämatoxylin in 100ml 96%igem Ethanol) und B (1.16g Eisen(III)-chlorid in 99ml destilliertem Wasser lösen und 1ml 25%ige Salzsäure zusetzen) bestehende Weigert-Hämatoxylinlösung und die aus 25ml Herovici-Lösung A und 30ml Lösung B angesetzte Herovici-Lösung frisch hergestellt werden. Zunächst werden die Schnitte für fünf Minuten in der Weigert-Lösung inkubiert und danach gründlich mit Wasser gespült. Im Anschluss erfolgt die je zweiminütige Inkubation in der Herovici-Lösung und Spülung der Schnitte mit 1% Essigsäure. Weiter wird mit Schritt zehn der oben genannten Anleitung verfahren.

Primär-antikörper	Vorbehandlung	Blockierlösung	Verdünnung	Einwirkzeit und -temperatur
CK15	Citrat	10min 10% Kalbsserum in PBS	1:400	1 h bei Raumtemperatur
Lrig1	Citrat	Keine	1:100	45 Minuten bei Raumtemperatur
SOX9	Citrat	30min in 0,25% Fischgelatine, 10% Kalbsserum, 1% humanem Serumalbumin in PBS	1:1000	1 h bei 37°C
LGR5	Citrat	Keine	1:250	45 Minuten bei 37°C
$\beta$ -Catenin	Citrat	Keine	1:1000	1 h bei Raumtemperatur
EphB2N	EDTA	Keine	1:50	1 h bei Raumtemperatur
EphB2C	EDTA	Keine	1:250	1 h bei Raumtemperatur
Nestin	Citrat	Keine	1:300	1 h bei Raumtemperatur
CRABP1	EDTA	Keine	1:1000	30 Minuten bei Raumtemperatur

Tabelle 2.3.:

Behandlung der Primärantikörper. Alle Antikörper ohne Blocking wurden mit der Standard-Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Die Antikörper mit Blocking wurden mit der entsprechenden Blockierlösung verdünnt.

### 2.2.3. Histologische Auswertung

#### Auswertung der Tumoren

Die Auswertung erfolgte an einem konventionellen Lichtmikroskop des Typs Leica Leitz DM-RB in 25-, 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung (Angabe unten rechts im Bild). Der Tumor wurde in zwei Anteile gegliedert: den epithelialen und den mesenchymalen Anteil. Der epitheliale Anteil ist der Tumor im eigentlichen Sinne und wurde für alle histologischen Varianten räumlich in die Tumorperipherie (Invasionsfront) und das Tumorzentrum unterteilt. Für jeden BCC-Subtyp erfolgte anschließend eine detailliertere Beschreibung der Verteilung des Antikörpers im Tumorgewebe. So wurde z.B. bei den soliden BCCs eine Differenzierung zwischen der Anfärbung der Palisadenzellen und der zentralen Tumorzellen vorgenommen oder bei den verwilderten BCCs der entdifferenzierten und der differenzierten Zellen.

Der mesenchymale Anteil der BCCs, das Tumorstroma, ist das vom Tumor rekrutierte bzw. das ihn umgebende Bindegewebe (BG) und wurde in Tumorsepten (TS), Tumorinterface (TI), Bindegewebsscheide (BGS) und umgebendes Infiltrat unterteilt. Mit den TS ist das zwischen den epithelialen Zellsträngen des Tumors gelegene BG gemeint. Die BGS beschreibt das äußere BG des Tumors, wobei die Zone des direkten Kontakts zwischen den äußersten epithelialen Tumorzellen und ihrem umgebenden BG als TI bezeichnet wird. Das Infiltrat ist das sich an die BGS angelagerte dermale BG mit eingewanderten Leukozyten.

Die Ermittlung der Färbestärke erfolgte für die epithelialen und mesenchymalen Tumoran-teile (mit Untergruppen) durch eine Schätzung der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweiligen Kategorie. Es konnten die Werte 0, 1, 2 oder 3 erreicht werden. Dabei steht 0 für einen geschätzten Anteil positiver Zellen im Bereich 0-1%, 1 für 1-33%, 2 für 34-66% und 3 für 67-100%. Aus den ermittelten Daten wurden das arithmetische Mittel und der Standardfehler berechnet. Abschließend wurde das Färbemuster, beispielsweise als gekörnt oder homogen, sowie die zelluläre Lokalisation beurteilt.

### **Auswertung der gesunden Haut**

Es wurden die Bereiche Epidermis (Str. corneum, Str. spinosum, Str. granulosum, Str. basale), Talgdrüsenfollikel (epidermale HWS, äußere HWS, innere HWS, Haarmatrix, Präsumptiver Cortex), Talgdrüse (basale Sebozyten, suprabasale Sebozyten) mit Ausführungsgang (luminale Zellen, basale Zellen) und ekkrine Schweißdrüse (SD) mit Ausführungsgang (Azini; luminale und basale Gangzellen) bewertet. Dabei wurde die Stärke der Anfärbung unterteilt in 0 für keine Anfärbung, 1 für schwache Anfärbung, 2 für mittelstarke Anfärbung, 3 für starke Anfärbung. Die Beurteilung des Färbemusters und der zellulären Lokalisation erfolgte nach denselben Kriterien wie bei den Tumoren.

#### **2.2.4. Statistische Methoden**

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg erfolgten weitere statistische Analysen. Für den Vergleich der histologischen BCC-Subtypen hinsichtlich der Expression eines Antikörpers wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test angewandt. Als statistisch signifikant gilt ein adjustiertes Signifikanzniveau kleiner als 0,05. Für den Vergleich der Expression der Antikörper untereinander wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Ein positiver Trend wurde ab einem Koeffizienten von 0,3 gewertet.

#### **2.2.5. Verwendete Software**

Für das Erstellen der Bilder wurde das Programm PixeLINK Capture OEM 2.3.5.0. verwendet. Die Verwaltung der Literatur erfolgte mit Citavi 3.4.0. Für die statistischen Berechnungen wurde SPSS 21 genutzt. Das Schreiben der Arbeit erfolgte mit dem Programm L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Expression von CK15 im BCC und in gesunder Haut

#### 3.1.1. CK15 Expression in gesunder Haut

CK15 wird in der Epidermis stark im Str. basale und vereinzelt in den unteren Zellschichten des Str. spinosum exprimiert. In den darüber liegenden epidermalen Schichten findet es sich nicht (Abbildung 3.1 b). Die Anfärbung der basalen Zellschichten setzt sich im TF-Infundibulum und dem TD-Ausführungsgang fort und geht in die äußere HWS über, welche ebenfalls nur in den basalen Schichten CK15 exprimiert (Abbildung 3.1 a, c). Die inneren Schichten und die innere HWS sind nicht angefärbt, jedoch zeigen die Haarmatrixzellen eine schwache CK15 Expression (Abbildung 3.1 d). Die basalen Sebozyten weisen eine starke Anfärbung auf, wohingegen die suprabasalen Stufen nicht homogen und nur schwächer pos. sind. In den Azini der ekkrinen SD kommen stark pos. und negative Zellen vor. In der Dermis wird CK15 nicht exprimiert. Das Färbemuster ist homogen zytoplasmatisch ohne nukleäre Reaktion, teilweise mit einer perinukleären Verdichtung, z.B. im Str. basale. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

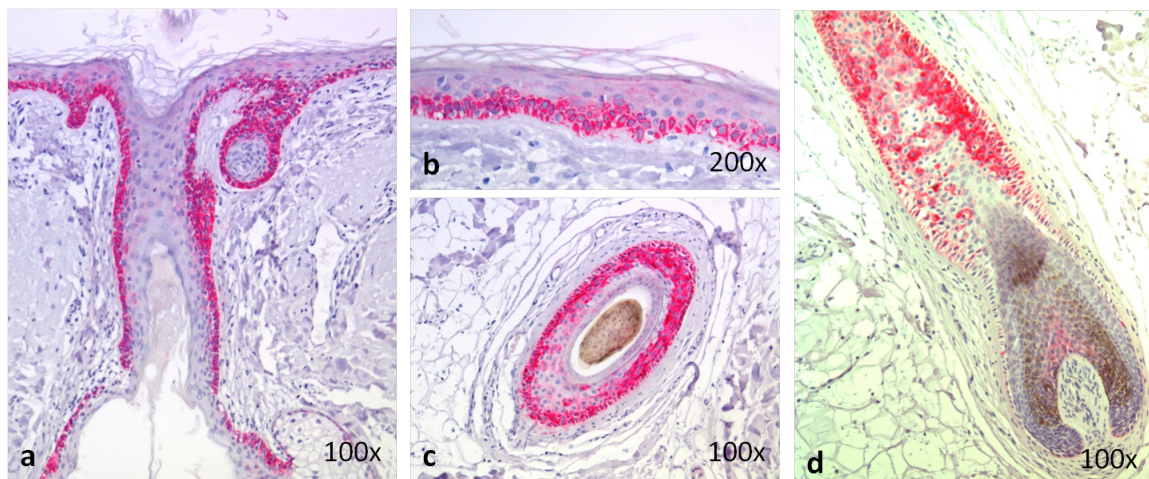


Abbildung 3.1.:

CK15 Expression in gesunder Haut. (a) TF-Infundibulum mit pos. basalen KZ und basalen Zellen des TD-Ausführungsganges. (b) IFE mit starker Anfärbung des Str. basale und des unteren Str. spinosum. (c) TF im Querschnitt mit kräftig pos. äußerer und negativer innerer HWS. (d) Haarbulbus mit negativer HP und schwach pos. Matrixzellen. Darüber beginnt die stark angefärbte äußere HWS.

### 3.1.2. CK15 Expression im BCC

Insgesamt exprimieren 38 der 45 BCCs komplett oder partiell CK15. Die genauen Zahlen zeigt Tabelle 3.1. Bei den soliden BCCs reagieren zunächst alle Tumoren fokal (6 von 13) oder komplett (7 von 13) pos.. Dabei zeigen die partiell pos. BCCs ein kontrastäres Muster im Vergleich zu den HWSen da hier die zentralen Tumorbereiche CK15 exprimieren. In der Tumorpheripherie verliert sich die Anfärbung, sodass die Palisadenzellen negativ sind (Abbildung 3.2 f, g). Auffällig ist der Verlust von CK15 in der peritumoralen Epidermis einiger BCCs (Abbildung 3.2 a, c). Die superfiziellen und verwilderten BCCs zeigen insgesamt die wenigstens pos. Reaktionen, jedoch ist bei den pos. Tumoren eine meist komplette Anfärbung zu verzeichnen. Die sklerodermiformen und adenoiden BCCs zeigen analog zum soliden Subtyp durchgängig eine starke Anfärbung (Abbildung 3.2 b, e). Wie bei den soliden BCCs verliert sich zum Teil die CK15 Expression in der Tumorpheripherie (Invasionszone). Besonders interessant sind die drei trichoadenoiden BCCs, welche peripher kräftig CK15 exprimieren aber zentral negativ bleiben und somit die Anfärbung des TFs imitieren (Abbildung 3.2 h, i). Dieses Muster ist komplett kontrastär zu den anderen Subtypen. Die adenoid-zystischen BCCs hingegen zeigen das bereits bekannte Muster mit Abschwächung der CK15 Expression in der Peripherie. Bei den klinischen Sondergruppen (Ulcus terebrans und Gorlin-Goltz-Syndrom) waren keine Besonderheiten im Vergleich zu den histologischen Subtypen festzustellen.

BCC-Subtyp	Positive Tumoren	Anfärbestärke
solide (13)	13/13(100%)	2,38 ± 0,16
superfiziell (8)	5/8(63%)	1 ± 0,33
sklerodermiform (9)	9/9(100%)	2,78 ± 0,15
adenoid (7)	7/7(100%)	2,86 ± 0,14
verwildert (8)	4/8(50%)	1,13 ± 0,48
Gorlin-Goltz-Syndrom (8)	5/8(63%)	1,38 ± 0,46
Ulcus terebrans (8)	7/8(88%)	2 ± 0,38
Gesamt (45)	38/45 (84%)	2,07 ± 0,16

Tabelle 3.1.:

CK15 Expression in BCCs. Spalte eins: histologische und klinische BCC-Gruppen, Spalte zwei: Pos. Tumoren absolut und in Prozent, Spalte drei: Mittelwert (0-3) und Standardfehler der Anfärbestärke.

Zusammenfassend ist CK15 verglichen mit den anderen Antikörpern dieser Arbeit außerordentlich stark in den BCCs exprimiert (84%). Nur bei einigen superfiziellen und verwilderten BCCs konnten keine pos. Reaktionen festgestellt werden. Hauptsächlich zeigen die Tumoren eine komplette Anfärbung oder eine Betonung des Tumorzentrums mit Abschwächung oder Verlust der CK15 Expression in der Peripherie. Analog zu gesunder Haut zeigt sich ein

zytoplasmatisches Färbemuster, teils mit Betonung der perinukleären Region.

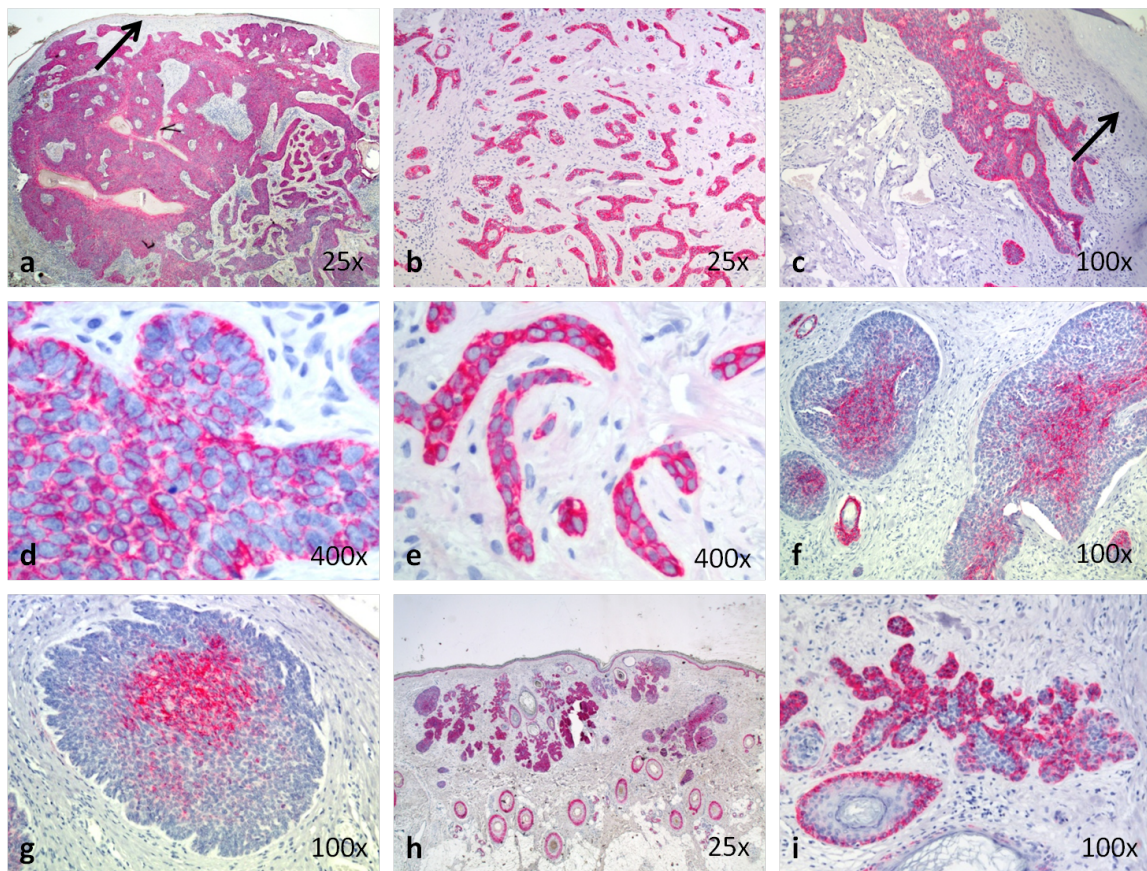


Abbildung 3.2.:

CK15 Expression im BCC. (a) Übersicht eines komplett pos. soliden BCCs mit Verlust von CK15 in der Epidermis (Pfeil) oberhalb des Tumors. (b) Übersicht eines komplett pos. sklerodermiformen BCCs. (c) Solides palmares BCC mit Verlust von CK15 in der Epidermis (Pfeil). (d) Detailaufnahme eines soliden BCCs mit zytoplasmatischem Färbemuster und perinukleärer Verdichtung. (e) Detailaufnahme eines sklerodermiformen BCCs mit homogen zytoplasmatischem Färbemuster. (f) und (g) Solide BCCs mit Anfärbung des Tumorzentrums und negativer -peripherie. (h) und (i) Partial pos. trichoadenoides BCC in Übersicht (h) und Nahaufnahme (i) mit einem TF ähnlichem CK15 Expressionsmuster.

## 3.2. Expression von Lrig1 im BCC und in gesunder Haut

### 3.2.1. Lrig1 Expression in gesunder Haut

Lrig1 zeigt ein nukleäres und zytoplasmatisches Verteilungsmuster. In der Epidermis findet sich in den suprabasalen Schichten eine starke zytoplasmatische Lrig1 Expression, wohingegen im Str. basale einzelne Zellen eine schwächere nukleäre Anfärbung aufweisen (Abbildung 3.3 b). Ein analoges Expressionsmuster zeigt sich in der epidermalen HWS des Infundibulums und dem TD-Ausführungsgang (Abbildung 3.3 a). In der TD werden nur die Kerne der

basalen und suprabasalen Sebozyten durch Lrig1 markiert, wo die proliferierenden Zellen zu erwarten sind. Die äußere HWS des unteren TFs zeigt eine homogene mittelstarke Anfärbung mit nukleärer und zytoplasmatischer Lokalisation (Abbildung 3.3 c). Die stärkste Expression von Lrig1 findet sich in der Scheidenkutikula der inneren HWS, etwas schwächer werden die Zellen der Haarmatrix angefärbt (Abbildung 3.3 d). In den Ausführungsgängen der ekkrinen SD konnte eine mittelstarke Lrig1 Expression festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

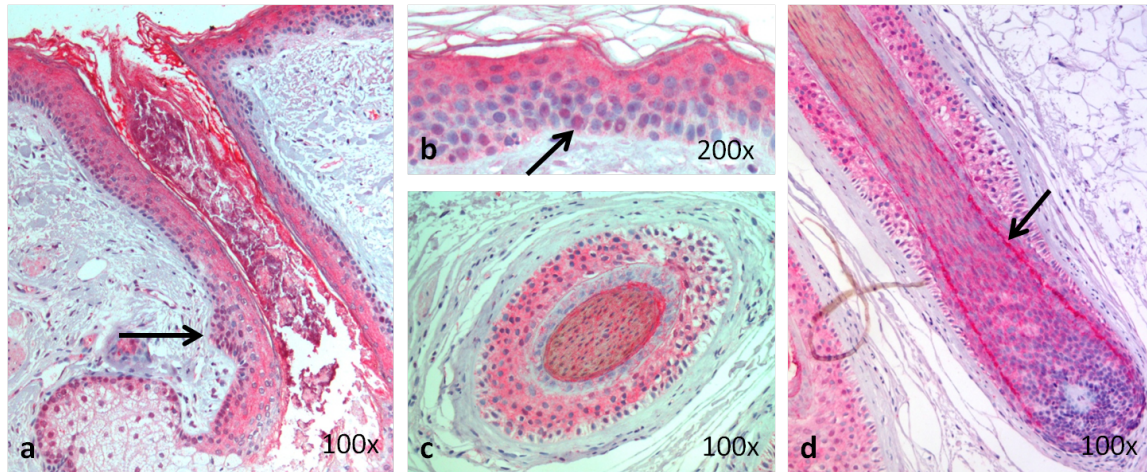


Abbildung 3.3.:

Lrig1 Expression in gesunder Haut. (a) TF-Infundibulum mit überwiegend nukleärer Anfärbung der basalen Schicht (Pfeil) und starker zytoplasmatischer Markierung der übrigen epidermalen HWS. Unten angeschnitten die TD mit pos. Kernfärbung der basalen und suprabasalen Sebozyten. (b) Epidermis mit analogem Muster zur epidermalen HWS. Pos. Nuklei (Pfeil) sind im Str. basale und Str. spinosum zu erkennen. (c) TF im Querschnitt mit mittelstarker Anfärbung der äußeren HWS. (d) TF-Bulbus mit stark pos. Scheidenkutikula (Pfeil) und mittelstark pos. präsumptiven Kortex.

#### 3.2.2. Lrig1 Expression im BCC

Lrig1 wird in 38 von 45 BCCs mit einer durchschnittlichen Färbestärke von 1,67 von 3 exprimiert (Tabelle 3.2). Von den 38 pos. BCCs zeigen 17 eine mehr kernbetonte Färbung und 21 ein zytoplasmatisch dominierendes Expressionsmuster, wobei jedoch meistens beide zellulären Verteilungen parallel auftreten (Abbildung 3.4 a-c). Die Lrig1 Expression ist bei den superfiziellen und den sklerodermiformen BCCs mehr nukleär lokalisiert und bei den soliden, adenoiden und verwilderten Subtypen hauptsächlich im Zytoplasma zu finden. Insgesamt zeigen die BCCs mit stärkerer zytoplasmatischer Anfärbung auch eine höhere Lrig1 Expression, vor allem die verwilderten und adenoiden (Abbildung 3.4 h, i) im Vergleich zu den sklerodermiformen und superfiziellen BCCs (Tabelle 3.2). Eine charakteristische Verteilung von Lrig1 im Tumorgewebe der einzelnen Subtypen ist nicht zu erkennen. Bei einigen BCCs verstärkt sich die Expression im Invasionsbereich (Abbildung 3.4 d) und verliert sich in den zentralen

Tumoranteilen, bei anderen verhält sich die Verteilung genau spiegelbildlich (Abbildung 3.4 e). Auffällig ist jedoch die inhomogene Anfärbung der superfiziellen BCCs: Die fortgeschrittenen superfiziellen BCCs zeigen im Durchschnitt eine schwache Lrig1 Expression, wohingegen die initiale Tumor-Knospe eine deutlich stärkere Anfärbung aufweist (Abbildung 3.4 d, f). Bei den klinischen Sondergruppen zeigten sich keine Auffälligkeiten.

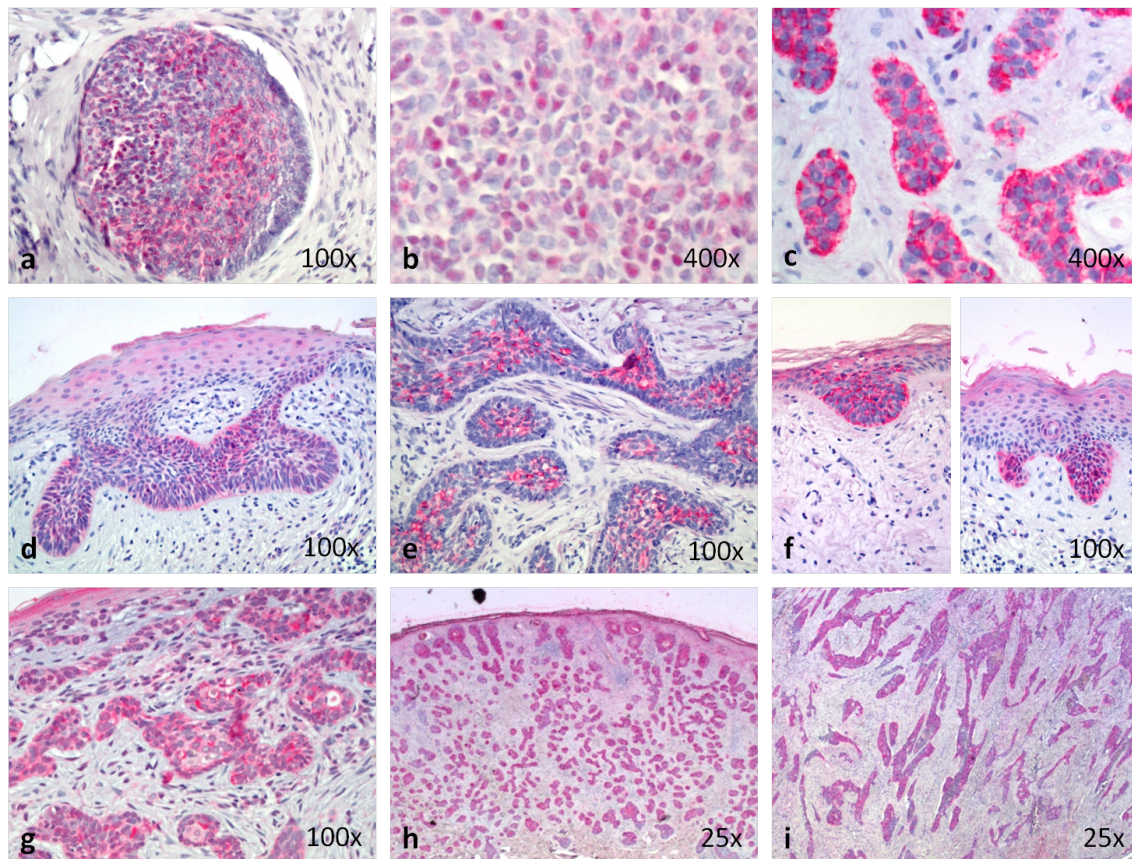


Abbildung 3.4.:

Lrig1 Expression im BCC. (a) Solides BCC mit nukleärem und zytoplasmatischem Expressionsmuster. (b) Detailaufnahme eines soliden BCCs mit starker Kernfärbung. (c) Detailaufnahme eines adenoiden BCCs mit rein zytoplasmatischer Expression von Lrig1. (d) Fortgeschrittenes superfizielles BCC mit schwacher Lrig1 Expression, Betonung der Invasionsfront. (e) Ausschnitt eines verwilderten BCCs mit Färbung der zentralen Anteile der Tumorinseln und Verlust von Lrig1 in der Peripherie. (f) Im Vergleich zu (d) zwei initiale superfizielle BCC-Knospen mit starker Lrig1 Expression. (g) Sklerodermiformes BCC mit homogen zytoplasmatischer Färbung. (h) Übersicht eines stark Lrig1 exprimierenden adenoiden BCCs. (i) Übersicht eines mittelstark pos. verwilderten BCCs.

Resümierend wird Lrig1 in 84% der BCCs exprimiert und zeigt die stärkste Anfärbung im adenoiden und verwilderten Subtyp. Auffällig sind die zwei verschiedenen Färbemuster (zytoplasmatisch und nukleär), welche in den Tumoren und auch in gesunder Haut zu finden sind. Es konnten jedoch keine Zusammenhänge zwischen der Lrig1 Verteilung und dem BCC-

Subtyp festgestellt werden.

BCC-Subtyp	Positive Tumoren	Anfärbestärke	Färbemuster
solide (13)	12/13(92%)	$1,69 \pm 0,26$	zytoplasmatisch betont (7/12)
superfiziell (8)	7/8(88%)	$1,25 \pm 0,31$	nukleär betont (5/7)
sklerodermiform (9)	6/9(67%)	$1,44 \pm 0,44$	nukleär betont (4/6)
adenoid (7)	6/7(86%)	$2 \pm 0,44$	zytoplasmatisch betont (4/6)
verwildert (8)	7/8(88%)	$2 \pm 0,38$	zytoplasmatisch betont (5/7)
Gorlin-Goltz-Syndrom (8)	8/8(100%)	$1,88 \pm 0,35$	Keine Betonung erkennbar
Ulcus terebrans (8)	7/8(88%)	$1,38 \pm 0,32$	Keine Betonung erkennbar
Gesamt (45)	38/45 (84%)	$1,67 \pm 0,16$	17 Kern-, 21 zytopl. betont

Tabelle 3.2.:

Lrig1 Expression in BCCs. Spalte eins: histologische und klinische BCC-Gruppen, Spalte zwei: Pos. Tumoren absolut und in Prozent, Spalte drei: Mittelwert (0-3) und Standardfehler der Anfärbestärke, Spalte vier: Überwiegende zelluläre Lokalisation von Lrig1.

### 3.3. Expression von LGR5 im BCC und in gesunder Haut

#### 3.3.1. LGR5 Expression in gesunder Haut

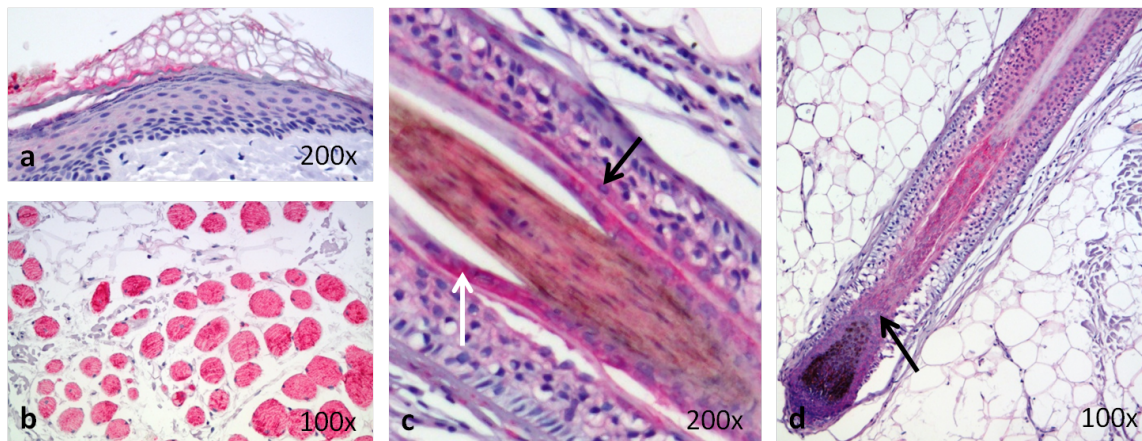


Abbildung 3.5.:

LGR5 Expression in gesunder Haut. (a) Die Epidermis exprimiert kein LGR5. (b) Quergestreifte Skelettmuskulatur mit starker LGR5 Expression. (c) Unterer TF im Längsschnitt. Innere HWS (vornehmlich Huxley-Schicht, weißer Pfeil) und innerste Schicht der äußeren HWS (schwarzer Pfeil) werden durch LGR5 markiert. (d) Unterer TF mit Bulbus im Längsschnitt. Innere HWS stark pos., schwache Reaktion in der äußeren HWS. Der präsumptive Kortex ist ebenfalls schwach pos. (Pfeil).

LGR5 zeigt ein homogen zytoplasmatisches Färbemuster und wird mit Betonung der innersten Schicht in der äußeren HWS des unteren TFs exprimiert (Abbildung 3.5 c, d). Die stärkste Anfärbung ist in der Huxley-Schicht der inneren HWS zu finden. Zudem konnte eine leichte LGR5 Expression in den Zellen des präsumptiven Kortex festgestellt werden (Abbildung 3.5 d). In der Epidermis und dem oberem TF zeigen sich keine pos. Reaktionen mit Ausnahme einer leichten Anfärbung der suprabasalen Sebozyten, die als Artefakt gewertet wird. Auffällig ist die starke Expression von LGR5 in der quergestreiften Muskulatur (Abbildung 3.5 b). Die ekkrinen SD und ihre Ducti sind negativ.

### 3.3.2. LGR5 Expression im BCC

BCC-Subtyp	Positive Tumoren	Anfärbestärke
solide (13)	3/13 (23%)	$0,23 \pm 0,12$
superfiziell (8)	0/8 (0%)	0
sklerodermiform (9)	2/9 (22%)	$0,44 \pm 0,29$
adenoid (7)	5/7 (71%)	$1,57 \pm 0,53$
verwildert (8)	1/8 (13%)	$0,38 \pm 0,38$
Gorlin-Goltz-Syndrom (8)	3/8 (38%)	$0,63 \pm 0,38$
Ulcus terebrans (8)	2/8 (25%)	$0,38 \pm 0,26$
Gesamt (45)	11/45 (24%)	$0,47 \pm 0,14$

Tabelle 3.3.:

LGR5 Expression in BCCs. Spalte eins: histologische und klinische BCC-Gruppen, Spalte zwei: Pos. Tumoren absolut und in %, Spalte drei: Mittelwert (0-3) und Standardfehler der Anfärbestärke.

Insgesamt zeigen nur 11 der 45 BCCs eine zytoplasmatische LGR5 Expression. Ein charakteristisches Verteilungsmuster konnte nicht festgestellt werden, jedoch ist die Anzahl der pos. Tumoren in den einzelnen Subtypen unterschiedlich. Die adenoiden BCCs zeigen die stärkste Expression von LGR5 mit 71 % pos. Tumoren (Abbildung 3.6 a-c). Innerhalb dieser Gruppe heben sich die vier pos. adenoid-zystischen BCCs von den trichoadenoiden BCCs ab, wo nur einer von drei Tumoren pos. ist. In den superfiziellen BCCs, von denen eine TF-unabhängige Entstehung diskutiert wird, findet sich gar keine LGR5 Expression (Abbildung 3.6 f). Die drei pos. BCCs der acht Patienten mit Gorlin-Goltz-Syndrom kommen durch zwei adenoide und ein solides BCC zustande. Ein Zusammenhang zwischen den wenigen pos. Tumoren der nicht-adenoiden Subtypen konnte nicht eruiert werden. Einlagerungen des LGR5-Antikörpers in die keratotischen Anteile einiger BCCs wurden als unspezifisch gewertet.

Im Vergleich zu den anderen potentiellen SZ-Markern dieser Arbeit zeigen die BCCs eine sehr schwache Expression von LGR5. Nur die adenoiden, insbesondere die zystisch differenzierten, BCCs fallen durch eine starke Anfärbung auf. LGR5 wird von den pos. Tumorzellen durchgängig zytoplasmatisch exprimiert.

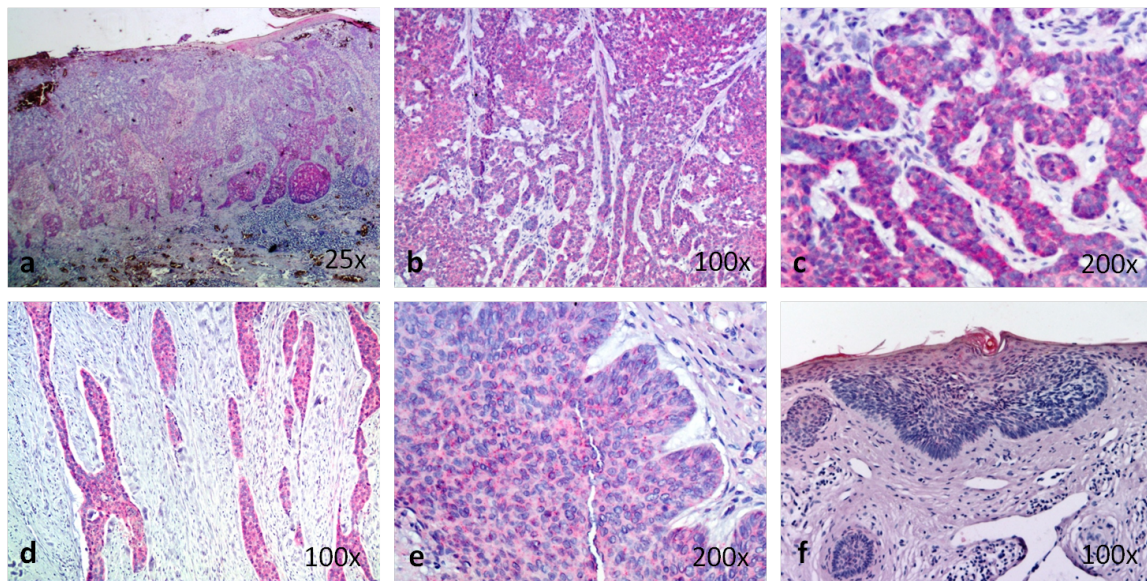


Abbildung 3.6.:

LGR5 Expression im BCC. (a) Adenoid-zystisches BCC mit mittelstarker Expression von LGR5 in der Übersicht. (b) Adenoides BCC mit starker LGR5 Expression. (c) Nahaufnahme eines adenoid-zystischen BCCs mit zytoplasmatischer Anfärbung. (d) Pos. verwildertes BCC (Ausnahme). (e) Nahaufnahme eines soliden BCCs mit homogener LGR5 Expression. (f) Negatives superfizielles BCC.

### 3.4. Expression von SOX9 im BCC und in gesunder Haut

#### 3.4.1. SOX9 Expression in gesunder Haut

SOX9 zeigt sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Anfärbung. Die genaue Verteilung der Färbemuster ist in Tabelle 3.9 aufgelistet. In der Epidermis zeigt sich das Str. basale negativ und in den darüber liegenden Schichten eine mittelstarke SOX9 Expression (Abbildung 3.7 a). Analog ist die SOX9 Verteilung in der epidermalen HWS des Infundibulums (Abbildung 3.7 b). Im mittleren TF findet sich in der äußeren HWS eine homogene Anfärbung mit Betonung der innersten Schicht und eine stärkere SOX9 Expression in der inneren HWS (Abbildung 3.7 c). Im unteren TF nimmt die SOX9 Expression in der äußeren HWS ab, aber die Zellen des präsumptiven Kortex zeigen eine schwache Reaktion (Abbildung 3.7 e). Am auffälligsten ist die Anfärbung der luminalen Schicht der SD-Ausführungsgänge, wohingegen die basale Schicht und die Azini negativ bleiben (Abbildung 3.7 d). Analog zeigt die luminal Schicht des TD-Ausführungsganges eine starke SOX9 Expression.

#### 3.4.2. SOX9 Expression im BCC

SOX9 zeigt insgesamt eine schwache Anfärbung mit einer mittleren Färbestärke von 0,47 bei nur 18 pos. Tumoren. Es finden sich primär zytoplasmatische Färbemuster und bei wenigen stärker SOX9 exprimierenden Tumoren auch Anfärbungen der Nuklei (Abbildung 3.8 d, c).

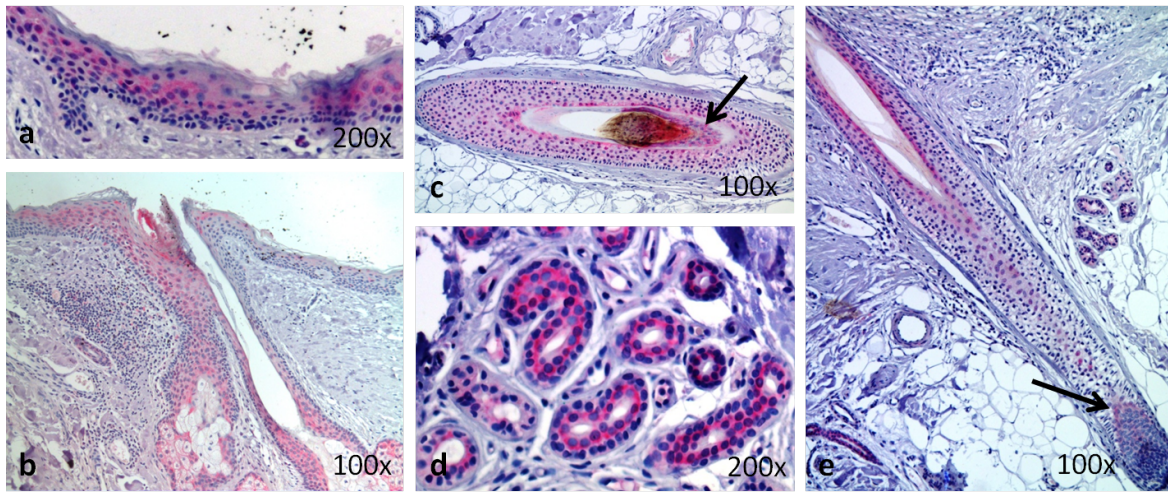


Abbildung 3.7.:

SOX9 Expression in gesunder Haut. (a) Epidermis mit negativem Str. basale aber SOX9 Expression in den suprabasalen Schichten. (b) TF-Infundibulum mit analoger Anfärbung im Vergleich zur Epidermis. (c) Mittlerer TF im Querschnitt. SOX9 markiert die äußere HWS mit Betonung der innersten Schicht. Die Innere HWS ist stärker angefärbt (Pfeil). (d) Ekkrine SD mit starker SOX9 Expression in der luminalen Schicht der Ducti. (e) Unterer TF im Längsschnitt. Die SOX9 Expression der äußeren HWS nimmt zum Bulbus hin ab. Der präsumptive Kortex ist leicht pos. (Pfeil).

Auffällig ist die SOX9 Verteilung in den Tumoren. Meistens sind nur die epidermisnahen Tumorbereiche gefärbt wohingegen die zentralen und in die Tiefe infiltrierenden Tumoran-teile SOX9 verlieren (Abbildung 3.8 a, b). Dieses Muster ähnelt der äußeren HWS des TFs, da hier auch im unteren Follikel-Bereich die SOX9 Expression abnimmt (Abbildung 3.7 e). Passend dazu exprimieren die stärker infiltrierenden verwilderten BCCs auch weniger SOX9 als die superfiziellen und initialen soliden BCCs (Tabelle 3.4). Andererseits zeigen die pos. sklerodermiformen BCCs und Ulcus terebrans die größte Anfärbestärke von allen Subtypen (Abbildung 3.8 e). Die Einlagerung von SOX9 in keratotische Einschlüsse der BCCs wurden als unspezifisch gewertet (Abbildung 3.8 f).

BCC-Subtyp	Positive Tumoren	Anfärbestärke
solide (13)	6/13 (46%)	0,54 ± 0,18
superfiziell (8)	4/8 (50%)	0,5 ± 0,19
sklerodermiform (9)	4/9 (44%)	0,67 ± 0,33
adenoid (7)	2/7 (29%)	0,29 ± 0,18
verwildert (8)	2/8 (25%)	0,25 ± 0,16
Gorlin-Goltz (8)	3/8 (38%)	0,38 ± 0,18
Ulcus terebrans (8)	3/8 (38%)	0,75 ± 0,41
Gesamt (45)	18/45 (40%)	0,47 ± 0,10

Tabelle 3.4.:

SOX9 Expression in BCCs. Spalte eins: histologische und klinische BCC-Gruppen, Spalte zwei: Pos. Tumoren absolut und in Prozent, Spalte drei: Mittelwert (0-3) und Standardfehler der Anfärbestärke.

Zusammenfassend wird SOX9 im Vergleich zu den anderen TF-Markern dieser Arbeit nur schwach und meistens in den epidermisnahen Bereichen der BCCs exprimiert. Die eher initialen superfiziellen und soliden BCCs zeigen absolut die häufigsten Anfärbungen, dafür sind die tiefer infiltrierenden sklerodermiformen BCCs und Ulcus terebrans stärker angefärbt. Insgesamt lässt sich kein durchgehend typisches Muster in den BCC-Subtypen erkennen.

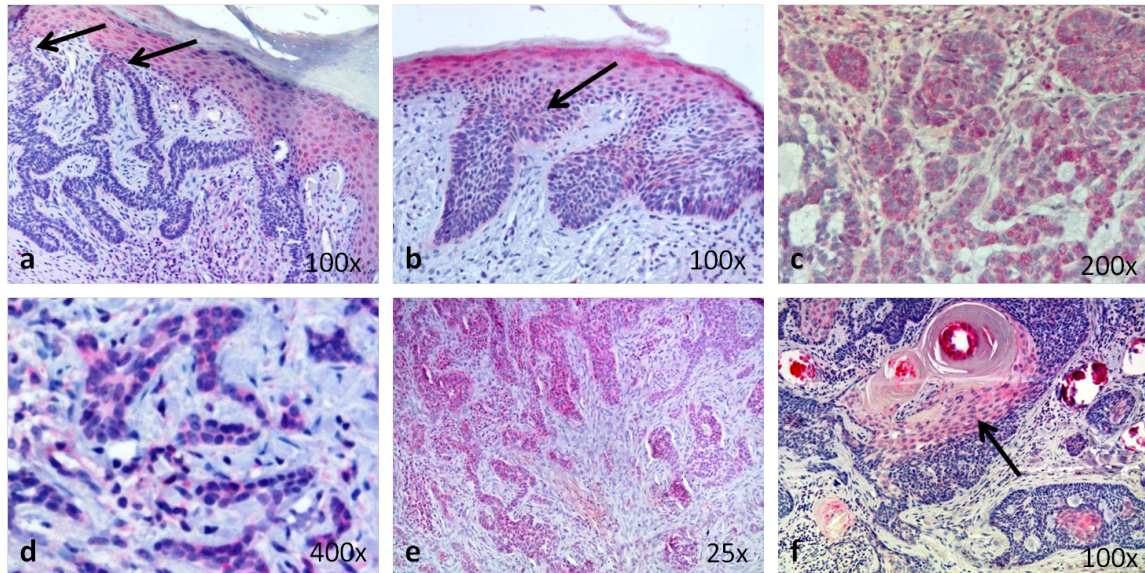


Abbildung 3.8.:

SOX9 Expression im BCC. (a) Solides palmar gelegenes BCC. Nur die Übergänge der aus der Epidermis ziehenden Tumorstränge sind schwach pos. (Pfeile). (b) Superfizielles BCC mit verstärkter SOX9 Expression am Übergang zur IFE (Pfeil). (c) Nahaufnahme eines stärker pos. adenoiden BCCs mit nukleärer Expression von SOX9. (d) Nahaufnahme eines schwach pos. sklerodermiformen BCCs mit zytoplasmatischer Anfärbung. (e) Tiefeninfiltrierende Bereiche eines Ulcus terebrans mit starker SOX9 Expression. (f) Anteile eines negativen soliden BCCs mit gefärbten keratotischen Einschlüssen.

### 3.5. Expression von $\beta$ -Catenin im BCC und in gesunder Haut

#### 3.5.1. $\beta$ -Catenin Expression in gesunder Haut

$\beta$ -Catenin ist als Strukturprotein der Zell-Zell-Kontakte und wichtiger Signalmediator nahezu ubiquitär in der Haut exprimiert. In der Epidermis zeigt sich im Str. basale und Str. spinosum eine starke membranäre Anfärbung, die zum Str. corneum hin abnimmt (Abbildung 3.9 b). In der epidermalen HWS des Infundibulums und der äußeren HWS des unteren TFs findet sich ebenfalls eine starke membranäre Expression (Abbildung 3.9 a, c, d). Im präsumptiven Kortex und den Haarmatrixzellen hingegen ist eine zytoplasmatische und nukleäre Verteilung von  $\beta$ -Catenin zu finden (Abbildung 3.9 d). In den Ausführungsgängen der ekkrinen SD und der TD zeigen primär die basalen Zellen eine starke  $\beta$ -Catenin Expression, die luminal deutlich

schwächer ausgeprägt ist. Die basalen Sebozyten und die Azini der ekkrinen SD färben sich ebenfalls stark pos. an. Die genauen Ergebnisse liefert Tabelle 3.9.

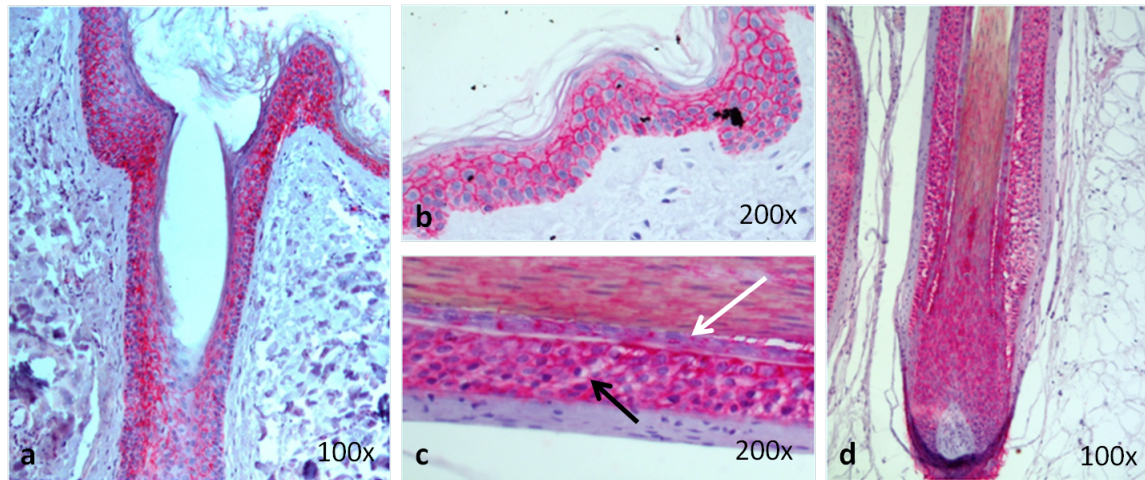


Abbildung 3.9.:

$\beta$ -Catenin Expression in gesunder Haut. (a) Infundibulum mit starker membranärer  $\beta$ -Catenin Expression in der epidermalen HWS. (b) Starke membranäre Anfärbung im Str. basale und Str. spinosum der Epidermis. (c) TF im Längsschnitt. Oben angeschnitten ist der Haarschaft mit darunterliegender pos. innerer HWS (weißer Pfeil) und kräftig pos. äußerer HWS (schwarzer Pfeil). (d) Unterer TF im Längsschnitt. Starke zytoplasmatische und nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin in den Haarmatrixzellen und dem präsumptiven Kortex.

#### 3.5.2. $\beta$ -Catenin Expression im BCC

$\beta$ -Catenin ist bei einer durchschnittlichen Anfärbestärke von 2,22 und 44 von 45 pos. BCCs der am stärksten exprimierte Marker dieser Arbeit. Trotz der scheinbar ubiquitären Verbreitung finden sich Unterschiede in der Verteilung von  $\beta$ -Catenin in den Tumoren. Im Vergleich zur Epidermis ist die Anfärbestärke in den BCCs meist eine Stufe schwächer (Abbildung 3.10 a-c). Auch beim Färbemuster zeigen sich deutliche Unterschiede.  $\beta$ -Catenin findet sich primär im Zytoplasma der Tumorzellen und bei starker Expression auch im Zellkern, wo es sich linienförmig im Randbereich ablagert (Abbildung 3.10 c-e). Daneben zeigt sich, vor allem in den keratotischen Einschlüssen, das bekannte membranäre Muster (Abbildung 3.10 i). Etwa die Hälfte aller BCCs exprimieren nukleäres  $\beta$ -Catenin, wobei meist nur einzelne Zellen pos. sind. Vor allem bei den soliden BCCs sammeln sich diese Zellen in der äußersten Schicht des Tumors (Palisadenzellen) an und bilden eine Art Invasionsfront (Abbildung 3.10 a, b, d). Daneben fallen die verwilderten BCCs auf, die eine diffuse Verteilung von nukleärem  $\beta$ -Catenin im Tumor zeigen (Abbildung 3.10 g). Die Anfärbestärke im BCC ist ebenfalls sehr inhomogen. Meist deckt sich eine stärkere Anfärbung mit einer nukleären  $\beta$ -Catenin Expression. Daher findet sich bei den soliden BCCs wieder eine deutliche Betonung der Palisadenzellen (Abbildung 3.10 a, b, d). Aber auch bei den anderen Subtypen ist eine Zunahme

der  $\beta$ -Catenin Expression in den peripheren Tumorbereichen zu erkennen (Abbildung 3.10 f). Die schwächer  $\beta$ -Catenin exprimierenden, meist zentralen, Tumorbereiche sind in der Regel zytoplasmatisch angefärbt. Unterschiede zwischen den einzelnen BCC-Subtypen zeigen sich primär in der Anzahl und Verteilung der angefärbten Tumornuklei (Tabelle 3.5).

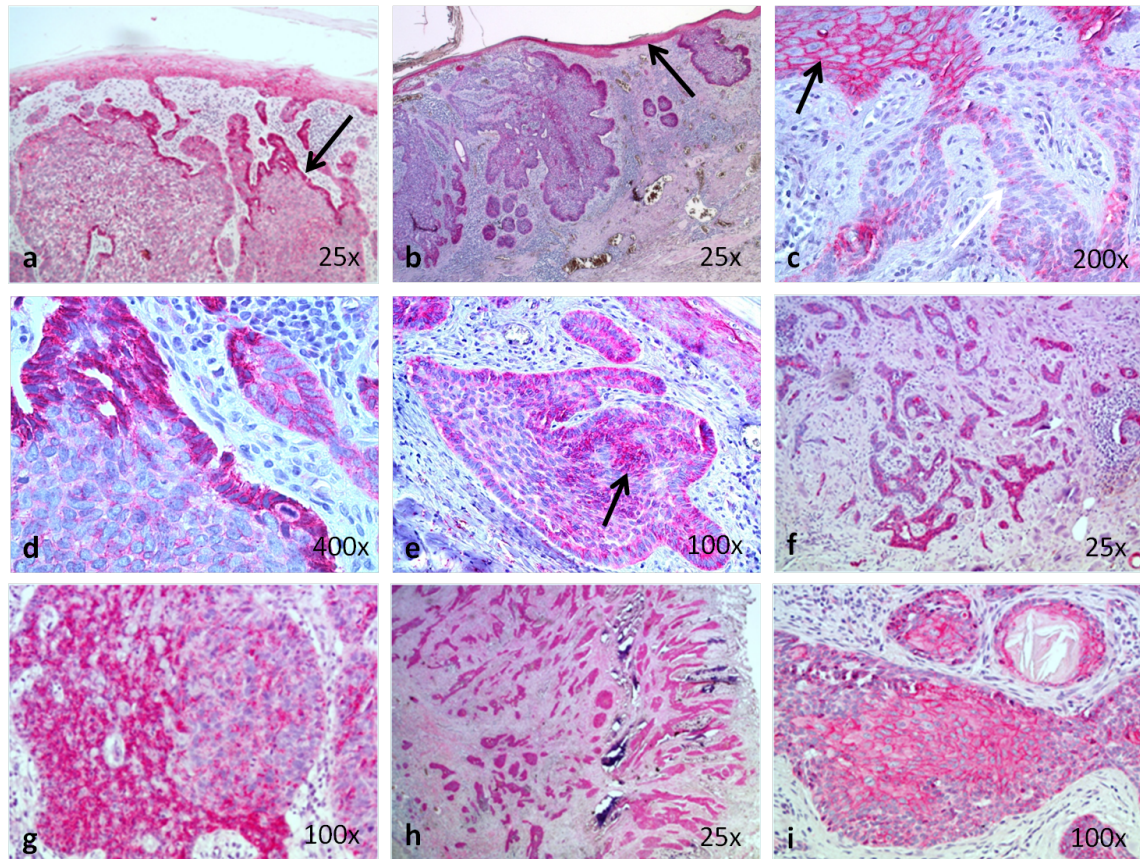


Abbildung 3.10.:

$\beta$ -Catenin Expression im BCC. (a) Solides BCC mit starker  $\beta$ -Catenin-Expression in den Palisadenzellen (Pfeil). (b) Solides BCC mit Betonung der Palisadenzellen. Die Epidermis (Pfeil) ist im Vergleich zum Tumorgewebe stärker pos.. (c) Palmares solides BCC. Auffällig ist der Übergang von Epidermis (schwarzer Pfeil) mit membranärer  $\beta$ -Catenin-Expression zum zytoplasmatisch gefärbten Tumorgewebe (weißer Pfeil). (d) Solides BCC mit nukleärer Färbung der Palisadenzellen und zytoplasmatischer Färbung der zentralen Tumorzellen. (e) Solides BCC mit teils nukleärer  $\beta$ -Catenin-Expression (Pfeil). (f) Sklerodermiformes BCC mit verstärkter  $\beta$ -Catenin-Expression in den tiefer infiltrierenden Tumoreinseln. (g) Überwiegend verwildertes BCC. Links im Bild sind die stärker gefärbten verwilderten Anteile, rechts die mehr knotigen Anteile. (h) Stark pos. verwildertes BCC. (i) Solides BCC mit keratotischen Einschlüssen. Auffällig ist die unterschiedliche Verteilung von  $\beta$ -Catenin.

Resümierend wird  $\beta$ -Catenin im Vergleich zu den anderen Markern dieser Arbeit sehr stark im BCC exprimiert. Es finden sich membranäre, zytoplasmatische (meist Tumorzentrum) und auch nukleäre (meist Tumorperipherie) Lokalisationen. Auffällig ist die stärkere Expression in den peripheren Tumorzellen im Vergleich zu den zentralen Tumorbereichen.

BCC-Subtyp	Positive Tumoren	Anfärbestärke	Kernfärbung
solide (13)	12/13 (92%)	2, 23 $\pm$ 0, 28	9/13 (69%)
superfiziell (8)	8/8 (100%)	2, 25 $\pm$ 0, 25	2/8 (25%)
sklerodermiform (9)	9/9 (100%)	2, 22 $\pm$ 0, 28	4/9 (44%)
adenoid (7)	7/7 (100%)	1, 86 $\pm$ 0, 34	2/7 (29%)
verwildert (8)	8/8 (100%)	2, 0 $\pm$ 0, 33	5/8 (63%)
Gorlin-Goltz-Syndrom (8)	7/8 (88%)	2, 13 $\pm$ 0, 40	3/8 (38%)
Ulcus terebrans (8)	8/8 (100%)	2, 38 $\pm$ 0, 26	4/8 (50%)
Gesamt (45)	44/45 (98%)	2, 13 $\pm$ 0, 13	22/45 (49%)

Tabelle 3.5.:

$\beta$ -Catenin Expression in BCCs. Spalte eins: histologische und klinische BCC-Gruppen, Spalte zwei: Pos. Tumoren absolut und in Prozent, Spalte drei: Mittelwert (0-3) und Standardfehler der Anfärbestärke. Spalte 4: Angefärbte Zellkerne im BCC

### 3.6. Expression von Ephrin B2-Rezeptor im BCC und in gesunder Haut

#### 3.6.1. Ephrin B2-Rezeptor Expression in gesunder Haut

##### EphB2 N-Terminus

EphB2N zeigt hinsichtlich der epithelialen Kompartimenten der Haut nur in der äußeren und inneren HWS, sowie den Haarmatrixzellen schwache zytoplasmatische Anfärbungen (Abbildung 3.11 a-c). Auffällig dagegen ist die starke EphB2N Expression in einer dermalen Zellgruppe, welche in gesunder und entzündlicher Dermis sowie in den BGSn der TF und Drüsen vorkommt. Vermutlich handelt es sich dabei um Mastzellen, da die als Kontrollfärbung dienende Mastozytose stark pos. ist (Abbildung 3.11 d). Angesichts dieser starken Anfärbung ist fraglich ob die follikulären Reaktionen spezifisch sind.

##### EphB2 C-Terminus

Das Färbeprofil von EphB2C unterscheidet sich deutlich vom N-Terminus. In der Epidermis hebt sich das Str. granulosum durch eine starke zytoplasmatische Anfärbung von den anderen Schichten ab (Abbildung 3.12 b). Dieses Muster setzt sich in der epidermalen HWS fort, wo sich nur die inneren Zellschichten pos. zeigen (Abbildung 3.12 a). Im unteren TF wird EphB2C stark im präsumptiven Kortex und der inneren HWS exprimiert. Die äußere HWS ist schwächer angefärbt, allerdings wieder im Bereich der innersten Schicht stärker pos. (Abbildung 3.12 c, d). Im Bereich der Drüsen und ihrer Ausführungsgänge sind keine spezifischen Reaktionen zu verzeichnen. Der C-Terminus-Antikörper zeigt keine Anfärbung der Mastzellen. Die genauen Ergebnisse für beide EphB2-Antikörper zeigt Tabelle 3.10.

### 3.6. EXPRESSION VON EPHRIN B2-REZEPTOR IM BCC UND IN GESUNDER HAUT

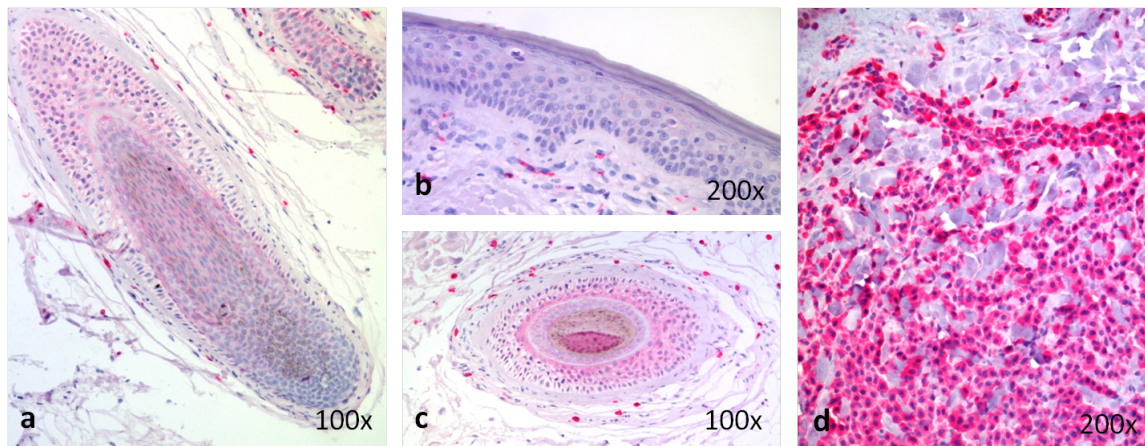


Abbildung 3.11.:

EphB2N Expression in gesunder Haut. (a) TF-Bulbus im Längsschnitt mit schwach pos. HWSn und epithelialem Bulbus. Im Haarbalg fallen die stark angefärbten Mastzellen auf. (b) Die Epidermis ist negativ. (c) TF im Querschnitt mit pos. HWSn. (d) Mastozytose mit sehr starker Anfärbung.

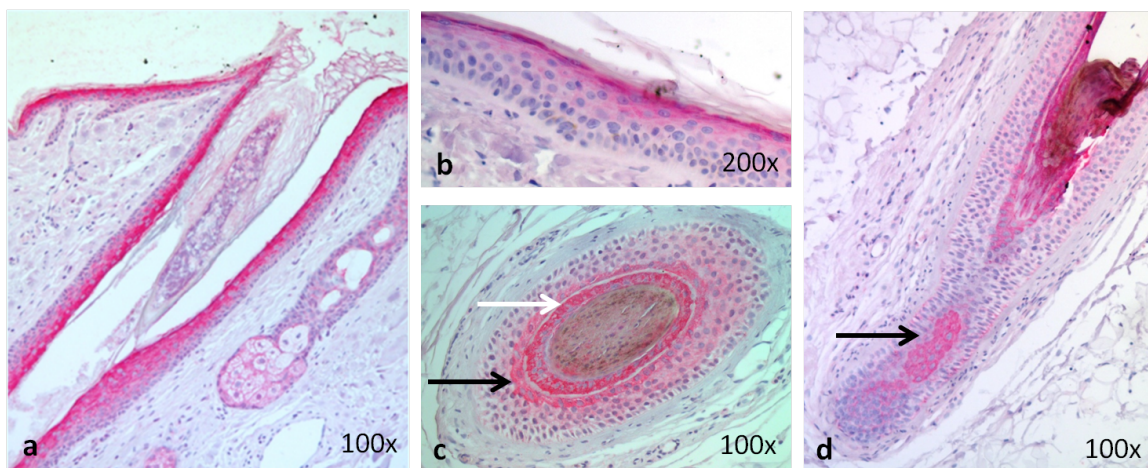


Abbildung 3.12.:

EphB2C Expression in gesunder Haut. (a) TF-Infundibulum mit starker EphB2C Expression in den inneren Schichten der epidermalen HWS. (b) Epidermis mit starker Anfärbung des Str. granulosum und schwacher Reaktion im oberen Str. spinosum. (c) TF im Querschnitt. Stark angefärbte innere HWS (weißer Pfeil) und schwächer pos. äußere HWS mit Betonung der innersten Schicht (schwarzer Pfeil). (d) Unterer TF im Längsschnitt mit stark pos. präsumptiven Kortex (Pfeil).

#### 3.6.2. Ephrin B2-Rezeptor Expression im BCC

##### EphB2 N-Terminus

Zunächst fällt auch im Tumorstroma die Anfärbung der verstärkt auftretenden Mastzellen auf (Abbildung 3.13 a). EphB2N wird in fast einem Drittel der BCCs exprimiert, wobei die verwilderten BCCs, gefolgt von den Ulcus terebrans eine deutlich stärkere Anfärbung als die anderen Subtypen zeigen. Die Anfärbungen der anderen Gruppen sind größtenteils kritisch

### 3.6. EXPRESSION VON EPHRIN B2-REZEPTOR IM BCC UND IN GESUNDER HAUT

zu werten, da meist nicht mehr als fünf Prozent der Tumormasse pos. reagieren (Vergleich der Anfärbestärken in Tabelle 3.6). Das Färbemuster ist insgesamt uneinheitlich. Bei etwa zwei Drittel der Tumoren finden sich zytoplasmatische Reaktionen, darunter alle verwilderten BCCs (Abbildung 3.13 e, f). Bei den restlichen BCCs zeigen sich Tumorinseln mit pos. Nuklei fraglicher Spezifität (Abbildung 3.13 b, c). Auffällig ist, dass sich EphB2N bei ca. 25% der Tumoren im hemidesmosomalen Kontaktbereich niederschlägt (Abbildung 3.13 d).

Insgesamt zeigt EphB2N eine starke Anfärbung der Mastzellen im BCC-Stroma und in gesunder Haut. Bei den Tumoren heben sich die verwilderten BCCs mit 75% pos. Reaktionen von den anderen Subtypen ab. Die Anfärbung ist zumeist homogen zytoplasmatisch.

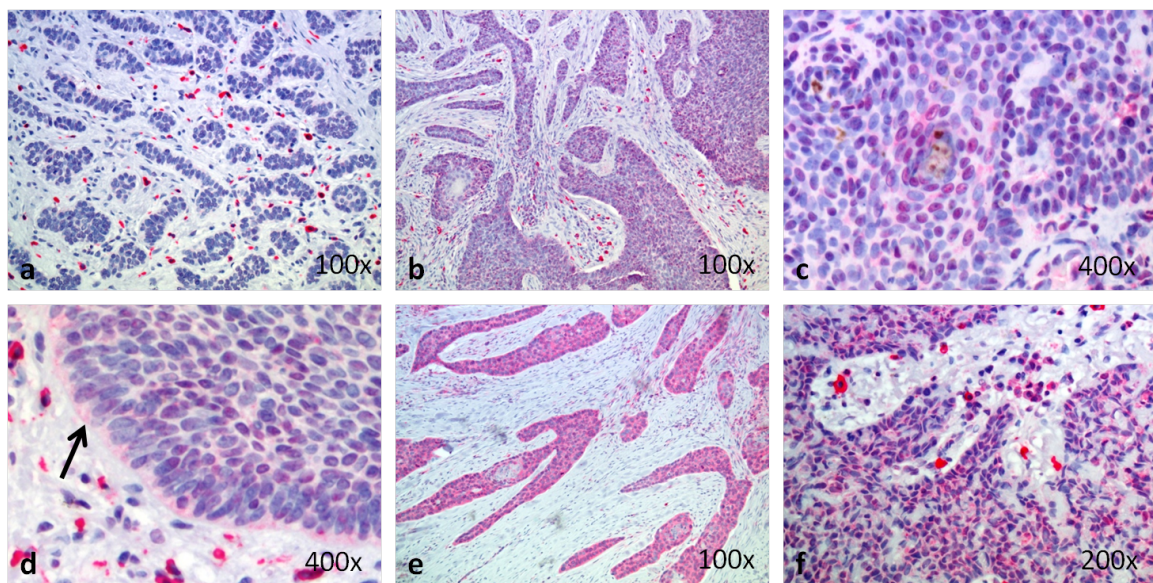


Abbildung 3.13.:

EphB2N Expression im BCC. (a) Negatives trichoadenoides BCC mit vielen angefarbten Mastzellen im Stroma. (b) Solides BCC mit schwacher Anfärbung der Nuklei. Im Vergleich sind die Mastzellen deutlich stärker pos.. (c) Schwach pos. BCCs mit angefarbten Nuklei. (d) Schwach pos. superfizielles BCC mit Betonung des hemidesmosomalen Kontaktbereiches (Pfeil). (e) Stark pos. verwildertes BCC mit zytoplasmatischer Anfärbung. (f) Mittelstark angefarbtes verwildertes BCCs.

#### EphB2 C-Terminus

Auch bei dem C-Terminus-Antikörper fällt die Affinität zu Zellen im Infiltrat um die BCCs auf. Morphologisch handelt es sich dabei am ehesten um Plasmazellen (Abbildung 3.14 a, b). Bei den BCCs finden sich keine spezifischen pos. Reaktion. Wie bereits bei gesunder Haut zeigt der EphB2C-Antikörper starke Affinität zu keratotischen Einschlüssen der BCCs (Abbildung 3.14 c). Zum Teil greift diese homogen zytoplasmatische Anfärbung auf die benachbarten Tumorzellen über, was aber nie mehr als ein Prozent der geschätzten Tumormasse ausmacht, sodass diese BCCs auch als negativ gewertet wurden.

BCC-Subtyp	EphB2N	Anfärbestärke	EphB2C	Anfärbestärke
solide (13)	3/13 (23%)	0,38 ± 0,21	0/13 (0%)	0
superfiziell (8)	1/8 (13%)	0,25 ± 0,25	0/8 (0%)	0
sklerodermiform (9)	2/9 (22%)	0,22 ± 0,15	0/9 (0%)	0
adenoid (7)	2/7 (29%)	0,43 ± 0,30	0/7 (0%)	0
verwildert (8)	6/8 (75%)	1,63 ± 0,46	0/8 (0%)	0
Gorlin-Goltz-Syndrom (8)	2/8 (25%)	0,5 ± 0,33	0/8 (0%)	0
Ulcus terebrans (8)	4/8 (50%)	0,63 ± 0,26	0/8 (0%)	0
Gesamt (45)	14/45 (31%)	0,56 ± 0,14	0/45 (0%)	0

Tabelle 3.6.:

EphB2 Expression in BCCs. Spalte eins: histologische und klinische BCC-Gruppen, Spalte zwei und vier: Pos. Tumoren absolut und in Prozent von EphB2N und C, Spalte drei und fünf: Mittelwert (0-3) und Standardfehler der Anfärbestärke von EphB2N und C.

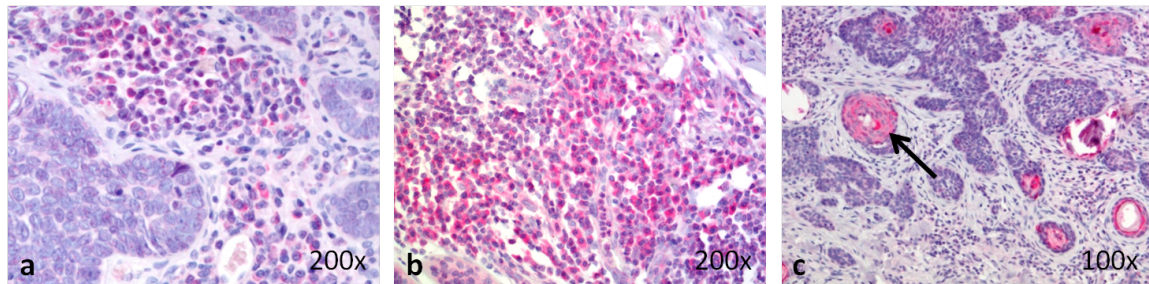


Abbildung 3.14.:

EphB2C Expression im BCC. (a) Leicht angefärbte Plasmazellen im Infiltrat um ein solides negatives BCC. (b) Nahaufnahme von mittelstark angefärbten Plasmazellen im umgebenden Infiltrat eines verwilderten BCCs. (c) Adenoides BCC. Nur die keratotischen Einschlüsse sind angefärbt.

## 3.7. Expression von Nestin im BCC und in gesunder Haut

### 3.7.1. Nestin Expression in gesunder Haut

Nestin konnte mit Ausnahme der innersten Schicht der äußeren HWS nicht in den epithelialen Kompartimenten der Haut gefunden werden (Abbildung 3.15 a, b). Dafür markiert es in den BGSn des TFs, der TD und der ekkrinen SD, sowie in der HP einzelne fibroblastenartige Zellen bei ansonsten negativer Dermis (Abbildung 3.15 b, c, e, f). Nur in den Gefäßen der Dermis und ihren umgebenden BGSn wird Nestin ebenfalls exprimiert (Abbildung 3.15 d). Die Anfärbung aller Zellen ist homogen zytoplasmatisch.

### 3.7.2. Nestin Expression im BCC und seinem Stroma

Analog zur Expression in gesunder Haut markiert Nestin vorwiegend Zellen im Stroma der BCCs. Jedoch wird auch in den BCCs eine Zellpopulation stark angefärbt, die durch ihre

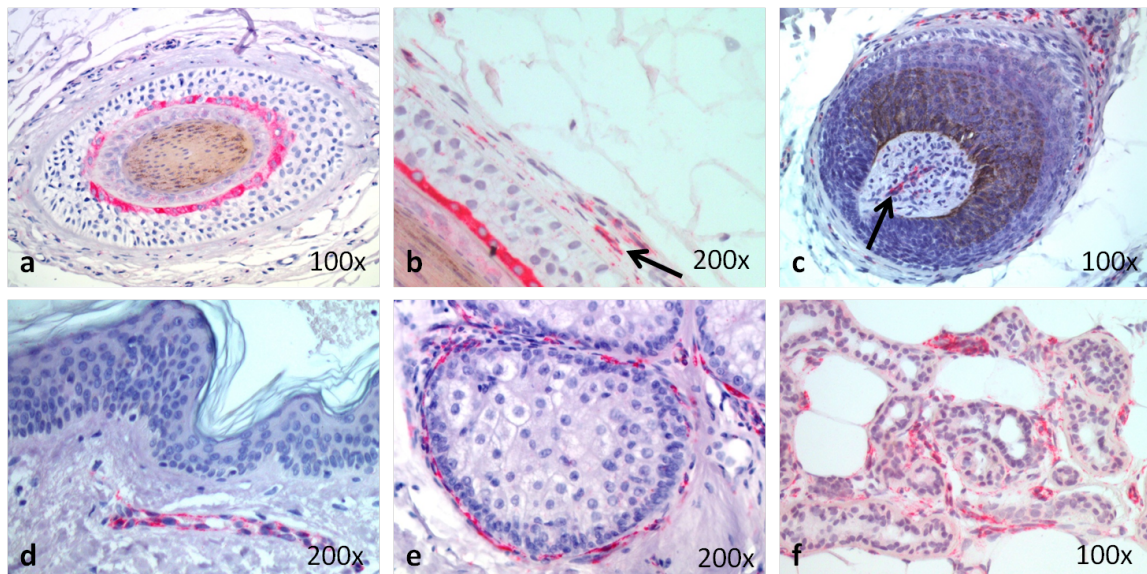


Abbildung 3.15.:

Nestin Expression in gesunder Haut. (a) TF im Querschnitt mit pos. innerster Schicht der äußeren HWS. (b) TF im Längsschnitt mit pos. fibroblastenartigen Zellen im Haarbalg (Pfeil). (c) Haarbulbus mit wenigen pos. Zellen in der HP (Pfeil). (d) Nestinexpression in der Wand dermalen Gefäße. Zum Vergleich die negative Epidermis. (e) Pos. Zellen in der BGS der TD. (f) Nestin Expression in Zellen und Gefäßen der BGS der ekkrinen SD.

dendritischen Ausläufer auffällt (Abbildung 3.16 a, b). Die Verteilung dieser Zellen im Tumor ist uneinheitlich und zeigt keine Häufung bei einem bestimmten Subtyp. Sie machen geschätzt nie mehr als fünf Prozent der Tumorzellen aus. Da diese Zellen sich von den epithelialen Tumorzellen unterscheiden und keine anderen Tumorzellen pos. sind, wurden alle BCCs als negativ gewertet und die pos. Zellen dem dermalen Kompartiment zugeordnet.

Bei den mesenchymalen Tumoranteilen wird Nestin am stärksten in den TS exprimiert. Dabei färben sich vor allem die den Tumor versorgenden Gefäße, wie bereits in gesunder Haut beschrieben, aber auch andere dermale Zellen an (Abbildung 3.16 c, d). Mehr als die Hälfte aller BCCs zeigen in ihren TS Nestin pos. Zellen, vor allem die superfiziellen BCCs. Im TI konnten vor allem bei den superfiziellen und den adenoiden BCCs pos. Reaktionen verzeichnet werden (Abbildung 3.16 e, f), wohingegen die verwilderten und sklerodermiformen BCCs fast gar keine angefärbten Zellen zeigten. Insgesamt waren bei 16 BCCs Nestin exprimierende Zellen im TI zu finden. In der BGS der BCCs konnten analog zu den TS pos. Gefäße und weitere dermale Zellen bei 14 BCCs gefunden werden (Abbildung 3.16 g, h). Hier zeigten ebenfalls die superfiziellen BCCs die höchste Färberrate. Im Infiltrat um die Tumoreinseln wird Nestin fast überhaupt nicht exprimiert. Das Färbemuster ist durchgängig zytoplasmatisch. Zusammengefasst wird Nestin in einer bestimmten Zellpopulation in den BCCs, sowie in den Tumor versorgenden und normalen Gefäßen exprimiert (Abbildung 3.16 i). Als potentieller mesenchymaler SZ-Marker findet es sich zudem in dermalen Zellen, die bei etwa einem Drittel

der Tumoren im TI oder der BGS und bei der Hälfte der BCCs in den TS liegen.

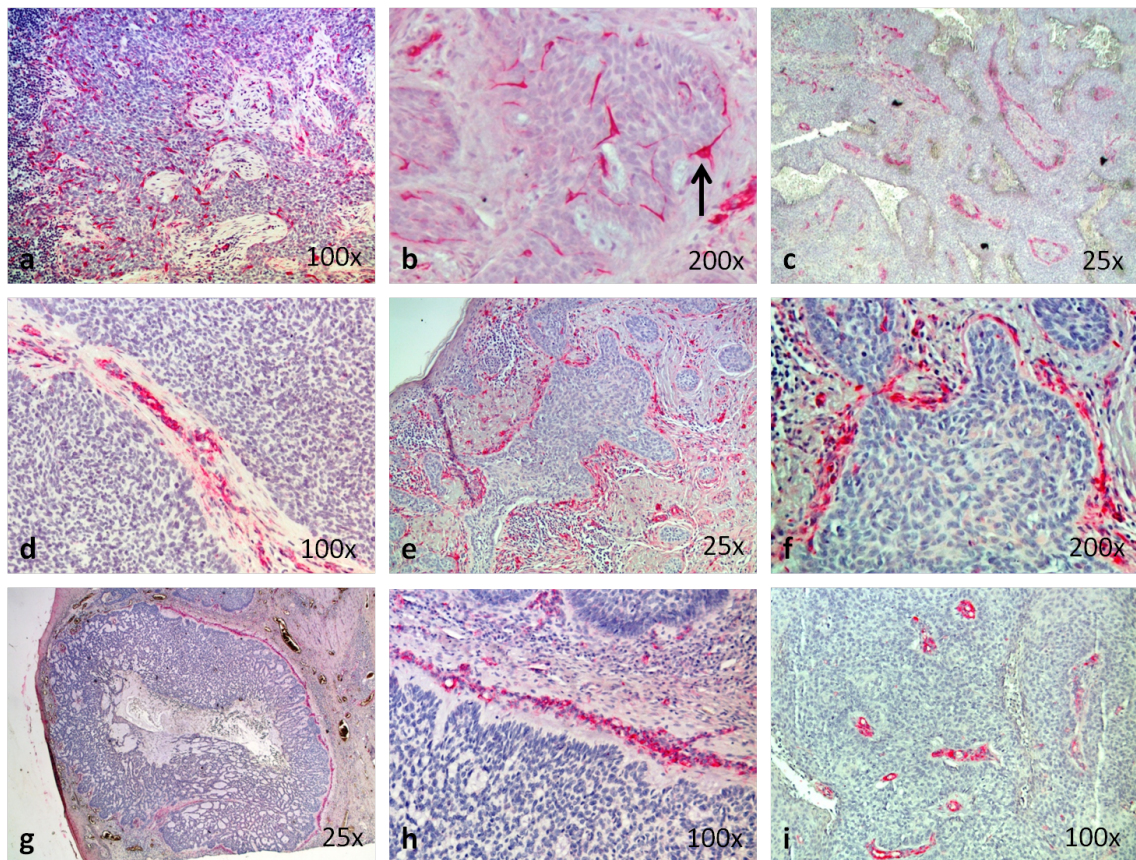


Abbildung 3.16.:

Nestin Expression im BCC und seinem Stroma. (a) Solides BCC mit zahlreichen Nestin exprimierenden dendritischen Zellen. (b) Nahaufnahme eines sklerodermiformen BCCs mit pos. dendritischen Zellen. (c) Ulcus terebrans in der Übersicht mit stark angefärbten TS. (d) Solides BCC mit pos. Gefäßen und dermalen Zellen in den TS. (e) Übersicht und Nahaufnahme (f) eines soliden BCCs mit starker Anfärbung des TI. (g) Übersicht und Nahaufnahme (h) eines adenoid-zystischen BCCs mit starker Anfärbung der BGS um den Tumor. (i) Pos. Gefäße in einem soliden BCC.

Auffällig ist, dass die Nestin pos. Zellen nur im Tumorstroma, aber nicht im übrigen dermalen BG vorkommen, was die Frage aufwirft ob sie am Aufbau des Stromas beteiligt sind. Mit der Herovici-Methode (Siehe Material und Methoden) kann junges kollagenes BG (blau gefärbt) von älterem BG (rot gefärbt) differenziert werden. Wie erwartet zeigen die BCCs einen den Tumor umgebenden Saum von jungem kollagenen BG, der sich vom älteren BG der Dermis abgrenzt (Abbildung 3.17 a, b). Das BG der TS ist insgesamt nochmal jünger, als das der umgebenden BGS (Abbildung 3.17 c). Auffällig ist, dass vor allem bei großen BCCs das junge Kollagen sehr inhomogen verteilt ist und sich meist an bestimmten Tumorarealen konzentriert. Insgesamt bestehen TS, TI und zum Teil auch die BGS der BCCs, und somit die Umgebung der Nestin pos. Zellen, überwiegend aus jungem Kollagen.

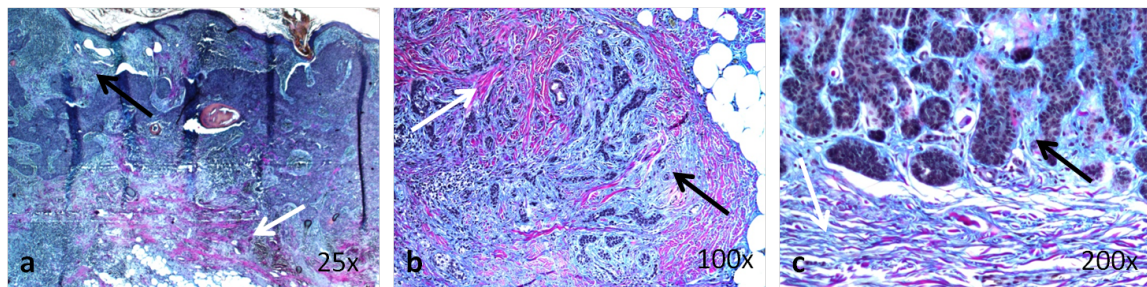


Abbildung 3.17.:

Herovici-Färbung im BCC und seinem Stroma. (a) Solides BCC. Das BCC-Stroma enthält junges BG (schwarzer Pfeil). Die dermalen Kollagenfasern unterhalb des Tumors sind älter (weißer Pfeil). (b) Sklerodermiformes BCC mit jungem BG um die Tumorinseln (schwarzer Pfeil) und älterem angrenzenden BG (weißer Pfeil). (c) Trichoadenoides BCC mit reichlich neuem Kollagen in den TS (schwarzer Pfeil) und gemischt älterem und neuerem Kollagen in der umgebenden BGS (weißer Pfeil).

BCC-Subtyp	Tumor-septen	Interface	Bindege-websscheide	Infiltrat	dendrit. Zellen pos.
sol (13)	8/13 (62%)	5/13 (38%)	3/13 (23%)	1/13 (8%)	6/13 (46%)
	0,92 ± 0,24	0,38 ± 0,14	0,23 ± 0,12	0,08 ± 0,08	
sup (8)	6/8 (75%)	5/8 (63%)	4/8 (50%)	0/8 (0%)	3/8 (38%)
	0,75 ± 0,16	0,75 ± 0,25	0,63 ± 0,26	0	
skl (9)	6/9 (67%)	2/9 (22%)	3/9 (33%)	2/9 (22%)	5/9 (56%)
	0,89 ± 0,26	0,33 ± 0,24	0,44 ± 0,24	0,22 ± 0,15	
ade (7)	4/7 (57%)	4/7 (57%)	2/7 (29%)	0/7 (0%)	3/7 (43%)
	0,57 ± 0,20	0,57 ± 0,20	0,43 ± 0,30	0	
ver (8)	4/8 (50%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	0/8 (0%)	1/8 (13%)
	0,5 ± 0,19	0	0,25 ± 0,16	0	
GGS (8)	2/8 (25%)	2/8 (25%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	3/8 (38%)
	0,25 ± 0,16	0,25 ± 0,16	0	0	
UT (8)	5/8 (63%)	2/8 (25%)	1/8 (13%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)
	0,75 ± 0,25	0,25 ± 0,16	0,13 ± 0,13	0	
Ges (45)	28/45 (62%)	16/45 (36%)	14/45 (31%)	3/45 (7%)	18/45 (40%)
	0,76 ± 0,10	0,4 ± 0,09	0,38 ± 0,09	0,07 ± 0,038	

Tabelle 3.7.:

Nestin Expression in BCCs und ihrem Stroma. Spalte eins: histologische und klinische BCC-Gruppen, Spalte zwei: Pos. Zellen in den TS; Spalte drei: Pos. Zellen im TI; Spalte vier: Pos. Zellen in der BGS; Spalte fünf: Pos. Zellen im Infiltrat um die BCCs; Spalte sechs: Angefärbte dendritische Zellen im BCC. Angabe jeweils absolut und in Prozent (oberes Zeilenfeld) sowie Mittelwert (0-3) und Standardfehler der Anfärbestärke (unteres Zeilenfeld).

### 3.8. Expression von CRABP1 im BCC und in gesunder Haut

#### 3.8.1. CRABP1 Expression in gesunder Haut

CRABP1 zeigt in den epithelialen Anteilen der Haut keine spezifischen Reaktionen. Hauptsächlich wird es in den dermalen Zellen der BGSn von TF, TD und Gefäßen, sowie im Interface der dermoepidermalen Junktionszone exprimiert (Abbildung 3.18 a, b). Das Färbemuster ist dabei sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär. Die meisten CRABP1 pos. Zellen sind in der HP und dem Haarbalg zu finden (Abbildung 3.18 c, d). Bei der TD fällt auf, dass primär die bindegewebigen Septen zwischen den einzelnen Läppchen und weniger die äußere BGS um die gesamte TD pos. Zellen enthält (Abbildung 3.18 e). Im umgebenden BG der ekkrinen SD sind nur wenige CRABP1 pos. Zellen zu finden (Abbildung 3.18 f). Die angefärbten Zellen im Interface der IFE fallen durch ihre dendritischen Ausläufer auf und unterscheiden sich morphologisch von den übrigen CRABP1 pos. Zellen.

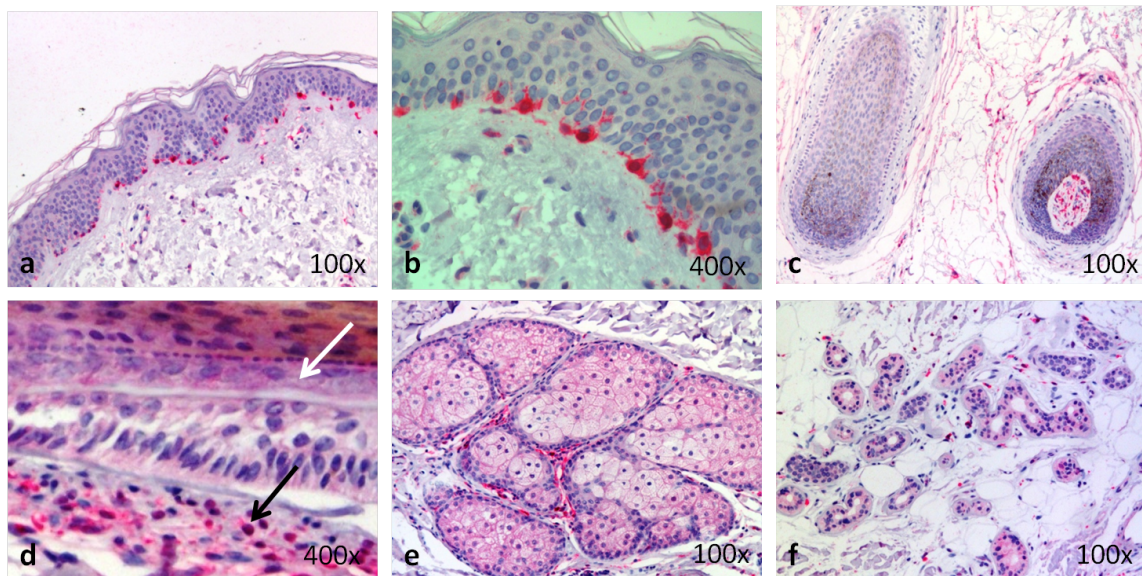


Abbildung 3.18.:

CRABP1 Expression in gesunder Haut. (a) Stark pos. dendritisch anmutende Zellen im Interface der IFE. (b) Detailaufnahme der Epidermis. (c) TF-Bulbus mit starker Anfärbung dermalen Zellen in der HP. (d) Detailaufnahme eines TFs im Längsschnitt mit pos. Zellen im Haarbalg. Von oben nach unten sind Haarschaft, innere HWS (weißer Pfeil), äußere HWS und Haarbalg (schwarzer Pfeil) angeschnitten. (e) TD mit pos. Zellen in den zentralen Septen der BGS. (f) Ekkrine SD mit wenigen pos. Zellen in der BGS.

#### 3.8.2. CRABP1 Expression im BCC und seinem Stroma

CRABP1 wird sowohl in den BCCs als auch den umgebenden Stromazellen exprimiert und zeigt dabei dasselbe zytoplasmatisch-nukleäre Färbemuster wie in gesunder Haut. Analog zu den pos. Zellen im Interface der IFE finden sich auch im TI von einigen BCCs, vor allem

den superfiziellen und initialen soliden, einzelne pos. Zellen (Abbildung 3.19 a, b). Mit der Herovici-Färbung konnte gezeigt werden, dass die CRABP1 pos. Zellen, analog zu Nestin, in jungem kollagenen BG liegen und somit am Aufbau des Tumorstromas beteiligt sein könnten. Bei den fortgeschrittenen soliden BCCs sowie den Ulcus terebrans und den verwilderten BCCs hingegen färben sich die epithelialen Tumoranteile kräftig an (Abbildung 3.19 d). Interessant dabei ist, dass die CRABP1 Expression mit zunehmender Tiefeninfiltration des BCCs zunimmt wohingegen die epidermisnahen Tumorinseln nicht angefärbt sind (Abbildung 3.19 c).

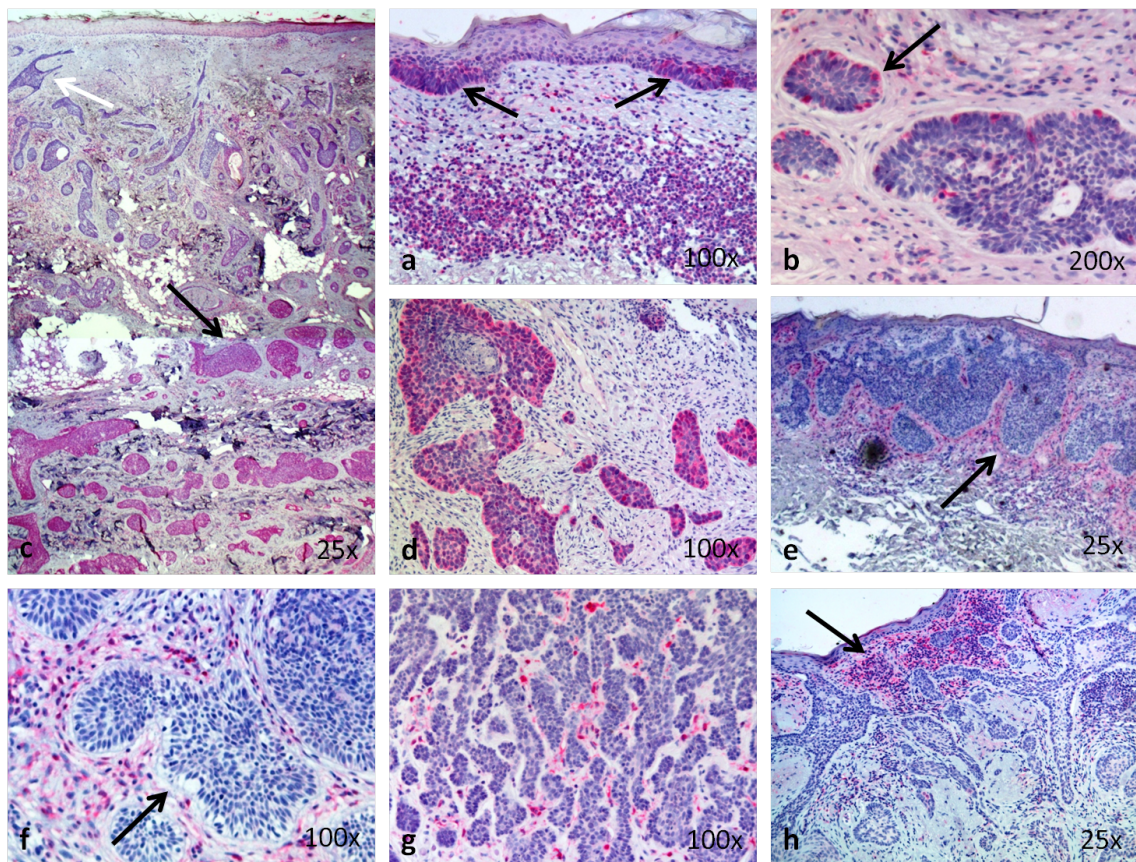


Abbildung 3.19.:

CRABP1 Expression im BCC und seinem Stroma. (a) Zwei initiale superfizielle BCCs mit einzelnen CRABP1 pos. Zellen (Pfeile). Das dermale Infiltrat enthält ebenfalls viele pos. Zellen. (b) Solides BCC mit einzelnen CRABP1 pos. Zellen im TI (Pfeil), negative BGS. (c) Übersicht eines tief infiltrierenden verwilderten BCCs. Die epidermisnahen Tumorinseln exprimieren kein CRABP1 (weißer Pfeil), dafür sind die tiefer gelegenen Tumorbereiche stark angefärbt (schwarzer Pfeil). (d) Verwildertes BCC mit zytoplasmatisch-nukleärer Anfärbung. (e) Negatives superfizielles BCC mit starker Reaktion in BGS und TS (Pfeil). (f) Frühes Solides BCC. Tumor und TI sind negativ. Die BGS ist stark angefärbt (Pfeil). (g) Negatives Adenoides BCC mit pos. Reaktionen in den TS. (h) Negatives sklerodermiformes BCC mit stark angefärbten Infiltratzellen (Pfeil).

BCC-Subtyp	Tumor-septen	Interface	Bindege-websscheide	Infiltrat	Tumor-gewebe
sol (13)	6/13 (46%) 0,54 ± 0,18	3/13 (23%) 0,23 ± 0,12	3/13 (23%) 0,23 ± 0,12	11/13 (85%) 1,15 ± 0,19	7/13 (54%) 0,77 ± 0,26
sup (8)	3/8 (38%) 0,5 ± 0,27	4/8 (50%) 0,5 ± 0,19	5/8 (63%) 0,75 ± 0,25	6/8 (75%) 1,0 ± 0,27	4/8 (50%) 0,63 ± 0,26
skl (9)	2/9 (22%) 0,22 ± 0,15	0/9 (0%) 0	0/9 (0%) 0	7/9 (78%) 1,11 ± 0,26	4/9 (44%) 0,89 ± 0,39
ade (7)	2/7 (29%) 0,29 ± 0,18	1/7 (14%) 0,14 ± 0,14	0/7 (0%) 0	5/7 (71%) 0,86 ± 0,26	0/7 (0%) 0
ver (8)	0/8 (0%) 0	0/8 (0%) 0	0/8 (0%) 0	6/8 (75%) 0,88 ± 0,23	7/8 (88%) 1,5 ± 0,27
GGs (8)	6/8 (75%) 0,75 ± 0,16	3/8 (38%) 0,38 ± 0,18	2/8 (25%) 0,25 ± 0,16	6/8 (75%) 0,75 ± 0,16	3/8 (38%) 0,63 ± 0,32
UT (8)	1/8 (13%) 0,13 ± 0,13	1/8 (13%) 0,13 ± 0,13	1/8 (13%) 0,13 ± 0,13	7/8 (88%) 1,13 ± 0,23	7/8 (88%) 1,63 ± 0,38
Ges (45)	13/45 (29%) 0,33 ± 0,08	8/45 (18%) 0,18 ± 0,06	8/45 (18%) 0,2 ± 0,07	35/45 (78%) 1,02 ± 0,10	22/45 (49%) 0,78 ± 0,14

Tabelle 3.8.:

CRABP1 Expression in BCCs und ihrem Stroma. Spalte eins: histologische und klinische BCC-Gruppen, Spalte zwei: Pos. Zellen in den TS; Spalte drei: Pos. Zellen im TI; Spalte vier: Pos. Zellen in der BGS; Spalte fünf: Pos. Zellen im Infiltrat um die BCCs; Spalte sechs: Pos. Tumoren. Angabe jeweils absolut und in Prozent (oberes Zeilenfeld) sowie Mittelwert (0-3) und Standardfehler der Anfärbestärke (unteres Zeilenfeld).

Im Tumorstroma wird CRABP1 vor allem in Zellen des Infiltrates exprimiert (Abbildung 3.19 a, h). Pos. Reaktionen im TI sind primär bei den soliden und superfiziellen BCCs zu finden, wobei bei einigen Tumoren nur schwer differenzierbar ist, ob die pos. Zellen im Randbereich des BCCs zum Tumor oder zum TI gehören (Abbildung 3.19 b). In den TS und den BGS sind deutlich weniger CRABP1 exprimierende Zellen im Vergleich zu Nestin zu erkennen. Bei den meisten pos. Zellen scheint es sich um eingewanderte Infiltratzellen zu handeln. Erstaunlich ist, dass die Anfärbung der epithelialen Tumorteile indirekt proportional zu der der Zellen in TS und BGS ist (vergleiche Abbildung 3.19 c und d mit f und g). So zeigen die besonders stark CRABP1 exprimierenden verwilderten BCCs sowie die Ulcus terebrans fast gar keine Anfärbung in ihren BGS und TS. Bei den negativen BCCs der Patienten mit Gorlin-Goltz-Syndrom und den nicht angefärbten soliden BCCs hingegen finden sich starke Reaktionen im Tumorstroma. Die adenoiden BCCs zeigten als einziger Subtyp keine CRABP1 Expression im Tumor und auch kaum Anfärbungen im umgebenden BG.

Insgesamt wird CRABP1 vor allem in den verwilderten BCCs und den Ulcus terebrans gefunden, wobei mit zunehmender Tiefeninfiltration des Tumors die CRABP1 Expression verstärkt

wird. Gleichzeitig zeigen die stärker angefärbten BCCs weniger CRABP1 pos. Zellen in ihren BGS und TS. In den Zellen des umgebenden Infiltrates ist CRABP1 unabhängig von der Tumoranfärbung stark exprimiert (78%). Sowohl bei den Infiltratzellen, als auch bei den Tumorzellen finden sich zytoplasmatische und nukleäre Färbemuster nebeneinander.

### 3.9. Vergleich der verwendeten Antikörper

In Abbildung 3.20 sind die Expressionsprofile der verwendeten Antikörper vergleichend dargestellt. Insgesamt wird  $\beta$ -Catenin am häufigsten in den BCCs exprimiert, gefolgt von CK15 und Lrig1. EphB2C und Nestin werden hingegen nicht spezifisch in den Tumorzellen angefärbt. Im Vergleich der Expressionsprofile der Antikörper untereinander zeigte sich im Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für CK15 und LGR5,  $r_s(\text{CK15-LGR5}) = 0,308$ , sowie für Lrig1 und LGR5,  $r_s(\text{Lrig1-LGR5}) = 0,390$ , ein pos. Trend. Schaut man sich die Verteilung der einzelnen Antikörper in den histologischen Subtypen an, so fällt besonders die hohe Expression von CRABP1 und EphB2N in den verwilderten und von LGR5 in den adenoiden BCCs auf. Im Vergleich dazu ist der superfizielle Subtyp bei LGR5 gar nicht und bei EphB2N nur schwach gefärbt. Im Kruskal-Wallis-Test konnte für die Verteilung von CK15, LGR5 und EphB2N zwischen den in Klammern angegebenen Subtypen statistisch signifikante Ergebnisse ermittelt werden: CK15 (superfiziell-sklerodermiform: 0,005; superfiziell-adenoid: 0,005; verwildert-sklerodermiform: 0,042; verwildert-adenoid: 0,037), LGR5 (superfiziell-adenoid: 0,011) und EphB2N (superfiziell-verwildert: 0,049).

Beim Vergleich der mesenchymalen Marker zeigt sich, dass Nestin bevorzugt TS und TI anfärbt, wohingegen CRABP1 vor allem Zellen des umgebenden Infiltrates markiert (siehe Abbildung 3.21). Allerdings konnte dies nicht statistisch belegt werden.

Zuletzt wurden die klinischen Gruppen (Gorlin-Goltz Syndrom und Ulcus terebrans) mit den histologischen BCC-Subtypen verglichen. Es konnten diesbezüglich keine signifikanten Ergebnisse eruiert werden. Häufig zeigten jedoch die Ulcus terebrans ähnliche Expressionsprofile wie der verwilderte Subtyp.

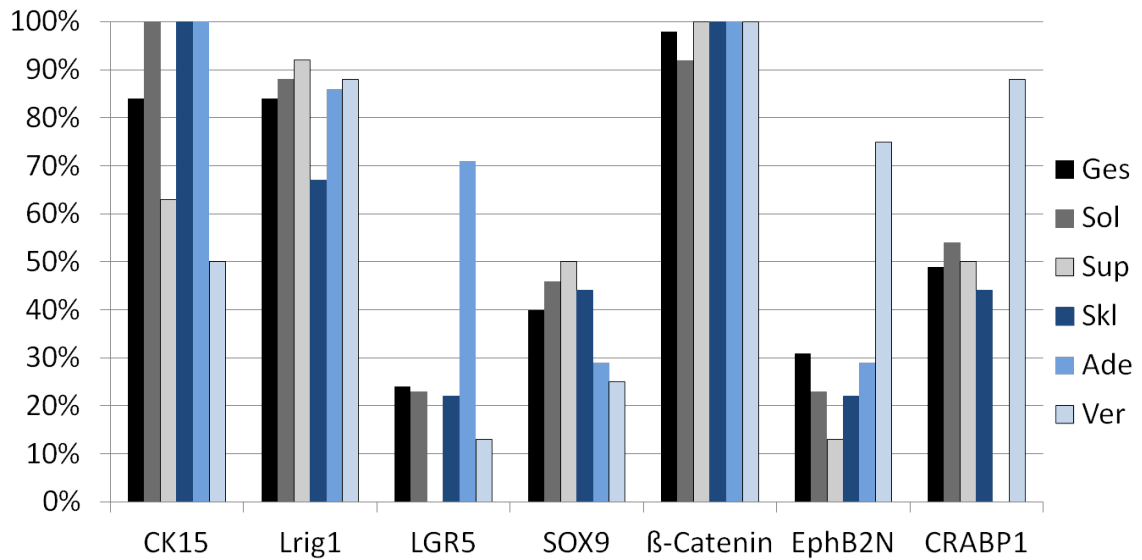


Abbildung 3.20.:

Expression von CK15, Lrig1, LGR5, SOX9,  $\beta$ -Catenin, EphB2N und CRABP1 in den histologischen BCC-Subtypen im Vergleich. Dargestellt ist der Anteil der pos. BCCs in Prozent (y-Achse) in den histologischen Subgruppen pro Antikörper (x-Achse). EphB2C und Nestin sind nicht gezeigt, da keine spezifischen Anfärbungen der Tumorzellen festgestellt wurden. Gesamt (Ges) Solide (Sol), Superfiziell (Sup), Sklerodermiform (Skl), Adenoid (Ade), Verwildert (Ver).

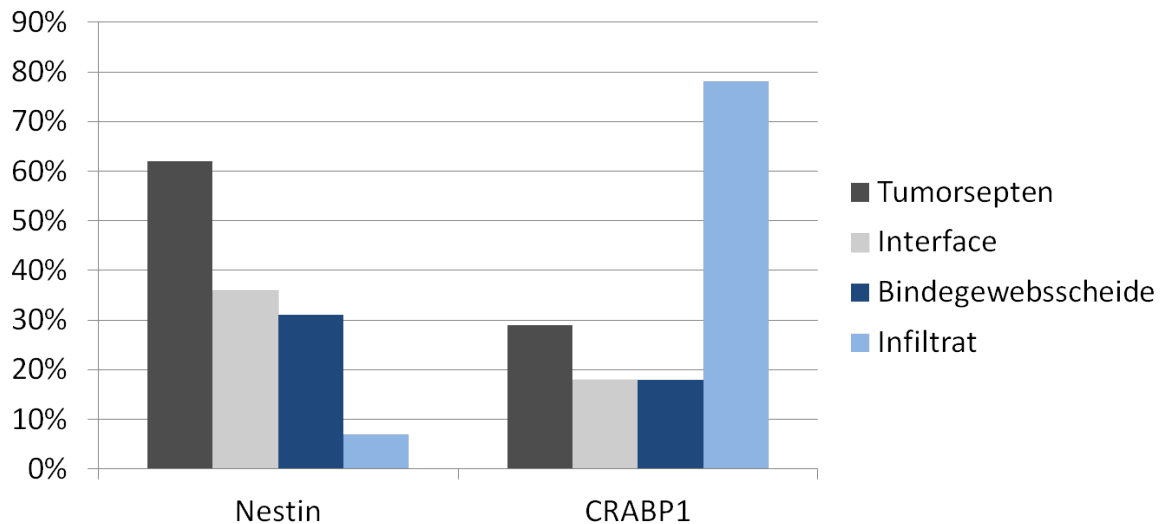


Abbildung 3.21.:

Expression von Nestin und CRABP1 in Tumorsepten, Interface, Bindegewebsscheide und Infiltrat des BCC-Stromas im Vergleich. Dargestellt ist der Anteil der pos. Färbungen in Prozent (y-Achse) in den Kategorien Tumorsepten, Interface, BGS und Infiltrat pro Antikörper (x-Achse).

Zellschicht/Antikörper	CK15	Lrig1	LGR5	SOX9	$\beta$ -Catenin
Epidermis					
Str. corneum	0	3	1	0	0
Str. granulosum	0	2 K, ZP	0	1 ZP	1 ZM
Str. spinosum	1	2 K, ZP	0	2 ZP	3 ZM
Str. basale	3	1 <sup>-</sup> K	0	0	3 ZM
Talgdrüsenfollikel					
epidermale HWS	3*	2 K, ZP	0	2 ZP	3 ZM
äußere HWS	3*	2 K, ZP	1, 2 <sup>+</sup>	1, 2 <sup>+</sup> K, ZP	3 ZM
Innere HWS					
Henle-Schicht	0	0	0	0	2 ZM
Huxley-Schicht	0	1 ZP	3	2 K, ZP	2 ZM
Scheidenkutikula	0	3 ZP	0	2 K, ZP	2 ZM
Haarmatrix	1	2 ZP	0	0	3 ZP, K
Präsumptiver Kortex	0	2 ZP	1	1 ZP	3 ZP, K
Talgdrüse					
suprabasaler Sebozyt	1 <sup>-</sup>	2 K	2	2 K, ZP	0
basaler Sebozyt	3	2 K	0	1 K, ZP	2 ZP, ZM
Ausführungsgang					
basale Zellen	3	1 <sup>-</sup> K	0	0	3 ZP, ZM
luminale Zellen	0	2 K	0	2 K, ZP	1 ZM
Ekkrine Schweißdrüse					
Azini	3 <sup>§</sup>	0	0	0	2 ZP, ZM
Ausführungsgang					
luminale Zellen	0	2 K, ZP	0	3 ZP	1 ZM
basale Zellen	0	2 K, ZP	0	0	3 ZM

Tabelle 3.9.:

Expression von CK15, Lrig1, LGR5, SOX9 und  $\beta$ -Catenin in gesunder Haut. 0-3 gibt die Anfärbestärke der jeweiligen Zellpopulation an. Die hochgestellten Zahlen beschreiben inhomogene Anfärbungen innerhalb einer Zellgruppe: \* bedeutet vornehmlich basale/äußerste Zellschicht, + bedeutet vornehmlich luminale/innerste Zellschicht, - bedeutet nur vereinzelte Zellen pos., § bedeutet ca. die Hälfte der Zellen pos.. Die Großbuchstaben stehen für sich ändernde Färbemuster zwischen den einzelnen Zellkompartimenten: K bedeutet Kernfärbung, ZP bedeutet Zytoplasmafärbung, ZM bedeutet Zellmembranfärbung.

Zellschicht/Antikörper	EphB2N	EphB2C	Nestin	CRABP1
Epidermis				
Str. corneum	0	0	0	0
Str. granulosum	0	3	0	0
Str. spinosum	0	1	0	0
Str. basale	0	0	0	0
Talgdrüsenfollikel				
epidermale HWS	0	3 <sup>+</sup>	0	0
äußere HWS	1	1, 2 <sup>+</sup>	2 <sup>+</sup>	0
Innere HWS				
Henle-Schicht	1	3	0	0
Huxley-Schicht	1	3	0	0
Scheidenkutikula	1	3	0	0
Haarmatrix	1	1	0	0
Präsumptiver Kortex	1	3	0	0
Talgdrüse				
suprabasaler Sebozyt	1	2	0	0
basaler Sebozyt	0	0	0	0
Ausführungsgang				
basale Zellen	0	0	0	0
luminale Zellen	0	2	0	0
Ekrine Schweißdrüse				
Azini	0	0	0	0
Ausführungsgang				
luminale Zellen	0	0	0	0
basale Zellen	0	0	0	0

Tabelle 3.10.:

Expression von EphB2N, EphB2C, Nestin und CRABP1 in gesunder Haut. 0-3 gibt die Anfärbestärke der jeweiligen Zellpopulation an. Die hochgestellten Zahlen beschreiben inhomogene Anfärbungen innerhalb einer Zellgruppe: \* bedeutet vornehmlich basale/äußerste Zellschicht, + bedeutet vornehmlich luminale/innerste Zellschicht, - bedeutet nur vereinzelte Zellen pos., § bedeutet ca. die Hälfte der Zellen pos.. Die Großbuchstaben stehen für sich ändernde Färbemuster zwischen den einzelnen Zellkompartimenten: K bedeutet Kernfärbung, ZP bedeutet Zytoplasmafärbung, ZM bedeutet Zellmembranfärbung.

## 4. Diskussion

Die histogenetische Herkunft des häufigsten Malignoms der Haut, des Basalzellkarzinoms (BCC), ist bis heute nicht abschließend geklärt. Es existieren verschiedene Theorien über seine möglichen Ursprungszellen von denen derzeit die Herkunft aus dem follikulären Epithelkeim als die wahrscheinlichere angesehen wird. Vor allem die potentiellen SZ im Haarwulst sowie die Zellen der äußeren HWS werden aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten und ähnlichen immunhistochemischen Antikörperprofilen am stärksten favorisiert. Im Folgenden soll diskutiert werden, ob die verwendeten (SZ)-Marker spezifisch genug sind, um weitere Hinweise über die Histogenese des BCCs zu erwerben.

### 4.1. Cytokeratin 15

Lyle et al. berichteten, dass die potentiellen SZ im Haarwulst spezifisch durch den mit CK15 kreuzreagierenden CD8-Antikörper (DAKO Klon C8/144B) angefärbt werden [69, 73, 70]. In drei von vier Studien zeigte sich jedoch keine Anfärbung der BCCs mit dem CD8-Klon [141, 142, 143] (Tabelle 4.1), weshalb einige Autoren die Entstehung des BCCs aus den fraglichen Wulst-SZ für unwahrscheinlich halten [141]. Mit dem LHK15-Klon hingegen färben sich insgesamt betrachtet deutlich mehr BCCs an, allerdings streut die Anfärbequote je nach verwendetem(n) BCC-Subtyp(en) von 0-71% (Tabelle 4.1). An gesunder Haut unterscheidet sich der LHK15- vom CD8-Klon durch eine zusätzliche Anfärbung der basalen Schicht von Epidermis und Infundibulum sowie der Endstücke der ekkrinen und apokrinen Drüsen [68, 144]. Wichtig ist daher, das Färbeprofil des verwendeten Antikörpers an gesunder Haut mit der Tumoranfärbung zu vergleichen, sowie auch das Epitop des Antikörpers zu berücksichtigen. Der in dieser Arbeit verwendete EPR1614Y-Klon zeigt in gesunder Haut ein ähnliches Profil wie der LHK15 Antikörper. Jedoch konnte eine kontinuierliche Anfärbung der basalen IFE, mit Ausnahme der IFE über einigen BCCs, festgestellt werden. Im TF zeigte sich eine kräftige Anfärbung der basalen äußeren HWS mit Abschwächung der Anfärbung zum Haarbulbus, was dem Färbemuster des CD8-Klons ab der Einmündungsstelle des TD-Ganges und des LHK15-Klons des gesamten TFs entspricht [69, 68]. Den von Kanoh et al. beschriebenen Verlust von CK15 in der äußeren HWS des mittleren TFs, konnte ich nicht bestätigen [146].

Von den 45 BCCs zeigten 38 komplett oder partiell pos. Reaktionen. Somit ist mit 84% angefärbten BCCs die bisher stärkste Markierung von allen monoklonalen berichteten CK15 Antikörper zu verzeichnen (Tabelle 4.1). Hinsichtlich der Verteilung von CK15 im Tumor sind fokale pos. BCCs mit Betonung des Tumorzentrums und Verlust in der Peripherie, sowie kom-

Klon	Epitop	BCC positiv in %	Kommentar	Referenz
C8/144B	13 C-terminale	27% (10/37)	nur fokal positiv	[145]
	Aminosäuren der	0% (0/17)		[141]
	zytoplasmatischen	0% (0/19)		[142]
	Domäne von CD8	0% (0/52)		[143]
LHK15	17 C-terminale	65% (17/26)	nur fokal positiv	[146]
	Aminosäuren von	71% (12/17)	zentraler Tumorteil pos.	[147]
	CK15	0% (0/10)	nur infiltrative BCCs	[148]
		30% (6/20)	nur superfizielle (12) und solide BCCs (8)	[149]
NCL-CK15	entspricht LHK15	64% (196/328)	51% komplett, 13% nur peripher	[150]
EPR1614Y	Residuen vom C-Term. von CK15	84% (38/45)	siehe Ergebnisse	diese Arbeit

Tabelle 4.1.:  
CK 15 Expression in BCCs

plett angefärbte Tumoren analog zu anderen Studien zu finden [146, 147, 150]. Zu diskutieren ist, ob diese Verteilung eine bestimmte Bedeutung hat. Waseem et al. demonstrierten, dass CK15 in stärker proliferierendem Gewebe herunterreguliert ist [68]. Patienten mit Psoriasis exprimieren sogar weder in kranker noch in klinisch gesunder Haut CK15 in der IFE [151]. Das würde bedeuten, dass CK15 überwiegend in den proliferationsinaktiven Basalzellen der IFE exprimiert wird, die bei der Psoriasis zugunsten der proliferationsaktiveren Progenitorzellen reduziert sind. Überträgt man diese These auf die BCCs, wären die zentral CK15 pos. Tumoren im Tumorzentrum eher proliferationsinaktiv und in der Tumorperipherie proliferationsaktiv, da hier weniger/kein CK15 exprimiert wird. Die verringerte CK15 Expression im verwilderten BCC spiegelt sich in dieser These ebenfalls wieder, da sich dieser Subtyp durch erhöhte Proliferation kennzeichnet und demnach CK15 herunterreguliert. Auch Hoang et al. konnten in den stärker proliferierenden infiltrativen BCCs kein CK15 nachweisen [148].

Überträgt man diesen Gedanken auf das Tumor-SZ-Modell, das davon ausgeht, dass ein Tumor von wenigen Tumor-SZ aus wächst und diese stärker proliferierende Tochterzellen bilden, dann lägen in den CK15 markierten Tumorbereichen vermutlich die Tumor-SZ, da sie weniger proliferativ aktiv sind. Die potentielle Markierung der Tumor-SZ bedeutet jedoch nicht, dass auch die ursprüngliche somatische Zelle durch CK15 markiert wird. CK15 könnte auch im Rahmen der molekularen Veränderungen der Karzinogenese neu gebildet werden.

Zu diskutieren bleibt warum auch die superfiziellen neben den verwilderten BCCs statistisch signifikant niedrigere Expressionen im Vergleich zu den anderen Subtypen zeigen. Auch Abbas et al. konnten mit nur 30% pos. BCCs bei überwiegend superfizielltem Subtyp ein ähnliches Ergebnis feststellen [149]. Eine mögliche Erklärung wäre, wie von einigen Autoren vermutet, eine andere Ursprungszelle der superfiziellen BCCs [34].

Angesicht der Verbreitung in den epithelialen Kompartimenten der Haut wird CK15 nicht spezifisch genug exprimiert, um als SZ-Marker Verwendung zu finden. Es werden nahezu alle diskutierten Ursprungszellen des BCCs durch CK15 gefärbt, wodurch die hohe Expression in den BCCs erklärt werden könnte. Hinsichtlich der Verteilung in den BCC-Subtypen zeigt CK15 die Tendenz mit zunehmender Entdifferenzierung herunterreguliert zu werden.

## 4.2. Lrig 1

Im Mausmodell wurde Lrig1 als Marker der potentiellen SZ der IFE und des oberen Isthmus beschrieben [23]. An menschlicher Haut ist noch offen ob Lrig1 mögliche SZ detektieren könnte. Jensen et al. konnten Lrig1 in humanen Zellkulturen in vereinzelt Zellgruppen der basalen Epidermis nachweisen [79]. Zudem konnte Lrig1 eine proliferationsregulierende Rolle zugewiesen werden, da bei Hoch- bzw. Runterregulierung von Lrig1 die epidermalen Zellen mit einer verringerten bzw. erhöhten Proliferation reagieren [79]. Folglich könnten auch in der menschlichen Epidermis SZ liegen, welche von Lrig1 in Ruhe gehalten werden [79].

In dieser Arbeit zeigte Lrig1 eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation in den epithelialen Kompartimenten der Haut. Dabei konnte Lrig1 in einzelnen Nuklei der Zellen des Str. basale und verstärkt im Zytoplasma der Zellen der suprabasalen Epidermisschichten gefunden werden. Einzelne Zellen des Str. spinosum und granulosum zeigten ebenfalls angefärbte Zellkerne. Diese Befunde gleichen den Ergebnissen von Karlsson et al., die per Immunhistochemie die Verteilung von Lrig1 in gesunder und psoriatischer humaner Haut untersuchten [152]. Im Vergleich dazu konnten Jensen et al. keine zytoplasmatische Anfärbung der suprabasalen Schichten finden [79]. Um die unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären ist es wichtig die verwendeten Antikörper zu differenzieren. In dieser Arbeit und der von Karlsson et al. wurde ein polyklonaler Antikörper gegen intrazytoplasmatische Abschnitte von Lrig1 (C-Terminal) verwendet, wohingegen Jensen et al. einen Antikörper gegen extrazytoplasmatische Anteile benutzten [152, 79]. Analog zu den Befunden der IFE konnten in dieser Arbeit einzelne pos. Nuklei in der basalen Schicht des Infundibulums nachgewiesen werden. Auch eine Anfärbung der basalen Sebozyten, der äußeren HWS des mittleren und unteren TFs sowie der Haarmatrixzellen, analog zu den Ergebnissen an Maushaut, konnte ich nachweisen [23, 77]. Auffällig und bisher unbekannt ist die starke Markierung der Scheidenkutikula.

Fraglich ist, ob den beiden zellulären Lokalisationen von Lrig1 eine Bedeutung zukommt. Karlsson et al. zeigten, dass in gesunder und psoriatischer Haut zwar ähnlich hohe Spiegel Lrig1 mRNA in der IFE zu finden sind, sich jedoch die Verteilung des Proteins ändert [152]. Während in gesunder IFE Lrig1 vor allem im Zytoplasma, aber auch membranär suprabasal sowie in einzelnen basalen Zellkernen vorkommt, findet man in psoriatisch veränderter Haut Lrig1 fast ausschließlich im suprabasalen Zytoplasma [152]. Die Reduktion von nukleärem Lrig1 in verstärkt proliferierender IFE und dessen Verteilung in gesunder Haut (basale Zell-

gruppen der IFE und oberer Isthmus) decken sich mit Lokalisation und der im Mausmodell vermuteten Funktion, dass Lrig1 potentielle SZ in Ruhe hält [23]. Bei der zytoplasmatischen Markierung von Lrig1 fällt eine zunehmende Expression mit zunehmender suprabasaler, also differenzierterer Zellschicht auf, was eine Markierung von SZ unwahrscheinlich macht. Eine Korrelation der Lrig1 Expression mit dem Differenzierungsgrad wurde auch bereits beim Plattenepithelkarzinom (SCC) beschrieben. So wird Lrig1 mit zunehmender Entdifferenzierung des Tumors herunterreguliert und umgekehrt [153, 154]. Folglich kann zytoplasmatisches Lrig1 als Differenzierungsmarker diskutiert werden. Aus diesen Überlegungen wird ersichtlich, dass die zelluläre Lokalisation über die Funktion von Lrig1 bestimmen könnte.

In den BCCs zeigt Lrig1 mit 84% pos. Tumoren insgesamt eine starke Expression. Analog zu gesunder Haut fallen die beiden zellulären Verteilungen (nukleär und zytoplasmatisch) auf. Dabei zeigen die superfiziellen, insbesondere die initialen BCC Knospen, und die sklerodermiformen BCCs eine verstärkte nukleäre Expression. Überträgt man darauf oben genannte Überlegungen so könnte die verstärkte nukleäre Lrig1 Expression im Sinne einer Gegenregulation gegen eine weitere Proliferation des Tumors interpretiert werden. Da gerade die initiale BCC-Knospe der superfiziellen BCCs eine stärkere Lrig1 Expression aufweist als die fortgeschritteneren superfiziellen BCCs, könnte der zunehmende Verlust als eine Art Selektion der Tumorzellen verstanden werden, die versuchen die proliferationshemmenden Signale von Lrig1 zu umgehen. Diese These passt zu der bereits beschriebenen pos. Korrelation von Lrig1 mit der Differenzierung von SCCs [153, 154]. Dazu passend zeigen die sklerodermiformen BCCs als stärker infiltrierender Subtyp im Vergleich zu den superfiziellen BCCs eine leicht reduzierte Lrig1 Expression, wenn auch nicht signifikant. Die adenoiden und verwilderten BCCs zeigen eine überwiegend zytoplasmatische Anfärbung, ohne das starke Expressionsunterschiede zu den anderen Subtypen erkennbar sind. Da der verwilderte Subtyp durch mehr Kernatypien und weitere Zeichen der Entdifferenzierung definiert ist, würde man eigentlich einen Rückgang der Lrig1 Expression erwarten. Lrig1 wird jedoch in einigen Tumoren wie z.B. dem Astrozytom oder dem Prostatakarzinom mit zunehmender Entdifferenzierung verstärkt exprimiert [155] und somit als Tumorpromotor bzw. Proliferationsaktivator diskutiert. Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich auch nicht zuordnen, ob das zweischneidige Schwert Lrig1 im BCC eher eine tumorpromotende oder eine tumorsupprimierende Funktion übernimmt. Weitere Studien sind notwendig um die molekularen Wirkungsmechanismen von Lrig1 besser zu verstehen.

Zusammenfassend wird nukleär exprimiertes Lrig1 vor allem in basalen Zellgruppen der IFE und dem oberen Isthmus gefunden. Dies entspricht den im Mausmodell beschriebenen potentiellen SZ-Nischen [23], sodass vielleicht auch an menschlicher Haut Lrig1 pos. SZ existieren. Eindeutige Rückschlüsse auf die Herkunft des BCCs konnte aufgrund der weiten Verbreitung von zytoplasmatischem Lrig1 in gesunder Haut und den BCCs nicht gezogen werden. Jedoch

ist Lrig1 mit 84% pos. BCCs der am dritt stärksten exprimierte Antikörper dieser Arbeit.

### 4.3. LGR5

Im Mausmodell wurden LGR5 pos. Zellen als potentielle SZ im sekundären Haarkeim des telogenen TFs beschrieben, die in der Lage sind alle Zelllinien des anagenen TFs aufzubauen [21]. An menschlicher Haut und dem BCC liegen meines Wissens bislang keine immunhistochemischen Studien vor.

An gesunder Haut konnte in dieser Arbeit, analog zu den im Mausmodell von Jaks et al. beschriebenen Daten, LGR5 in der äußeren HWS des unteren anagenen TFs nachgewiesen werden. Stärker wird es zusätzlich in der inneren HWS exprimiert. Die von Hsu et al. beschriebene starke LGR5 Expression in der Skelettmuskulatur konnte ebenfalls bestätigt werden [80]. LGR5 zeigte sich durchgängig im Zytoplasma der angefärbten Zellen. Huh et al. haben nachgewiesen, dass nach der Teilung der potentiellen LGR5 pos. SZ nur die Schwester-SZ nukleäres LGR5 behält, die sich nicht weiter teilende Zelle hingegen LGR5 zytoplasmatisch exprimiert [156]. Überträgt man diesen Befund auf die Ergebnisse dieser Arbeit, so sind die angefärbten Zellen lediglich Nachkommen der potentiellen LGR5 pos. SZ.

In verschiedenen Mausmodellen konnte zudem eine Bedeutung der LGR5 pos. Zellen für die BCC-Entstehung nachgewiesen werden. Kasper et al. demonstrierten, dass Nachkommen der LGR5 pos. Zellen des unteren TFs in die IFE auswandern können und dort die Bildung von BCC-artigen Tumoren initiieren [36]. Allerdings gilt dies nur für SHH-Weg aktivierte Mäuse mit verwundeter Epidermis. Analog dazu zeigten Da Silva-Diz et al., dass in proonkogen veränderten Mäusen SCCs ebenfalls aus Nachkommenzellen der LGR5 pos. Zellen des unteren TFs entstehen können [157]. In beiden Szenarien exprimierten die entstehenden Tumoren selbst jedoch kein LGR5. Falls diese Daten auf den Menschen übertragbar wären, so könnte das die insgesamt schwache LGR5 Expression der BCCs in dieser Arbeit erklären, obwohl man von LGR5, als Marker der äußeren HWS und der möglichen follikulären Herkunft des BCCs, stärkere Anfärbungen erwartet hätte. Fraglich ist, warum nur die adenoiden BCCs eine starke LGR5 Expression zeigen. Möglicherweise entstehen sie im Vergleich zu den anderen Subtypen aus tieferen Anteilen des TFs direkt aus den potentiellen LGR5 pos. SZ der äußeren HWS, wie ihre Morphologie vermuten lässt, und nicht aus deren Nachkommen. Vielleicht handelt es sich aber nur um eine zufällige Häufung und das BCC hat Subtyp-unabhängig mehrere Ursprungszellen. Demnach könnte man anhand des LGR5-Färbeprofiles postulieren, dass ca. ein Viertel aller BCCs aus der äußeren HWS des unteren TFs entstehen. Die komplett negativen superfiziellen BCCs halte ich für spezifisch, da für sie in der Literatur eine TF-unabhängige Entstehung diskutiert wird [34]. Stark widersprüchliche Ergebnisse zu meinen Befunden liefert eine Studie von Tanese et al.. Hier wurde mittels PCR-Analyse in 19 von 20 BCCs (superfiziell und nodulär) signifikant erhöhte LGR5 mRNA im Vergleich zu

gesunder Haut und anderen Hauttumoren gefunden [158]. Zudem korrelierte in Maus-BCC-Zelllinien der LGR5 mRNA Spiegel mit der Aktivierung des SHH-Signalweges (Gli1 und 2) [158]. Diese Unterschiede zu meiner Arbeit lassen sich nicht leicht erklären. Vielleicht korreliert der mRNA Spiegel nicht gleichermaßen mit dem LGR5 Protein. Denkbar wäre auch, dass der hier verwendete LGR5 Antikörper das Protein nicht in allen zellulären Kompartimenten, wie z.B. dem Zellkern, erreicht hat.

Zusammengefasst ist LGR5 an menschlicher Haut ein Marker für die Zellen der äußeren und inneren HWS des unteren anagenen TFs. Dies entspricht den beschriebenen Lokalisationen im Mausmodell [21]. Aufgrund der sehr eingeschränkten LGR5 Expression in gesunder Haut ist die Markierung einer potentiellen SZ im unteren TF denkbar. Auffällig ist die starke Anfärbung des adenoiden Subtyps, was dessen Abstammung aus der äußeren HWS des unteren TFs bedeuten könnte. Für die superfiziellen BCCs ist aufgrund der fehlenden LGR5 Expression eine TF-unabhängige Herkunft zu favorisieren.

## 4.4. SOX9

Im Mausmodell konnte die Bedeutung von SOX9 für die Haut, insbesondere für den TF und seine Entwicklung, bereits demonstriert werden [91]. Auch in menschlicher Haut spielt SOX9 für die Ausbildung der Hautanhangsorgane eine wichtige Rolle. Krahle et al. zeigten, dass SOX9 erstmals in der frühen Embryonalperiode in der Haarplakode, dem Nagelbett und den SD-Knospen exprimiert wird [37, 159]. Mit zunehmender Ausbildung des TFs verliert sich SOX9 in den Haarmatrixzellen und bleibt im adulten TF auf die untere äußere HWS (Wulst und zyklusabhängiger Teil des TFs) beschränkt [37]. Über die Expression von SOX9 in der IFE und dem Infundibulum gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Shi et al. demonstrierten in menschlichen epidermalen KZ-Kulturen, dass SOX9 in der basalen IFE exprimiert wird, nicht aber in den differenzierteren Schichten [160]. Gegenätzlich dazu konnten Krahle et al. keine spezifische SOX9 Expression, mit Ausnahme angefärbter Melanozyten, in der Epidermis nachweisen [37, 159]. In dieser Arbeit zeigten IFE und Infundibulum zwar eine zytoplasmatische Anfärbung, aber keine nukleäre Reaktion, die von anderen Autoren als spezifisch angesehen wird [37, 159]. Eine nukleäre SOX9 Expression in der äußeren HWS des unteren TFs konnte diskret, analog zu vorherigen Studien, bestätigt werden [37, 160]. Die starke Expression von SOX9 in den Gängen der ekkrinen SD konnte ebenfalls demonstriert werden [159].

SOX9 wurde bereits in mehreren Studien in BCCs nachgewiesen [161, 37, 160]. Dabei sind sich die Autoren einig, dass nur eine nukleäre Expression von SOX9, analog zu gesunder Haut, als spezifisch zu werten ist. Vidal et al. konnten per Immunfluoreszenz in allen BCCs eine starke SOX9 Expression in den Zellkernen, bei insgesamt heterogener Verteilung im Tumor finden [161]. Krahle et al. demonstrierten sogar, dass hinsichtlich der SOX9 Expression

die entstehende BCC-Knospe starke Ähnlichkeit mit der embryonalen Haarplakode aufweist [37]. Zudem wird vermutet, dass die SOX9 Expression im BCC und im TF durch den SHH-Weg reguliert wird und SOX9 daher als Marker für eine gemeinsame Entstehung von BCC und TF interessant ist [91, 161, 37]. Auch Krahle et al. berichteten, dass SOX9 hinsichtlich der histologischen BCC-Subtypen keine unterschiedlichen Expressionshäufigkeiten zeigt [37]. In dieser Arbeit waren deutlich schwächere Anfärbungen und primär zytoplasmatische Reaktionen in den BCCs zu finden. Nur drei stärker gefärbte Tumoren zeigten spezifische Kernfärbungen. Die Verteilung von SOX9 in den histologischen Subtypen streut relativ homogen, sodass es als klinischer Verlaufsparemeter oder Aggressionsmarker, wie z.B. beim Malignen Melanom [162], nicht in Frage kommen kann. Interessant ist allerdings die Verteilung von SOX9 im Tumor. Die fast isolierte Anfärbung der epidermisnahen Tumoranteile, vor allem der superfiziellen BCCs, und der Verlust von SOX9 in den tiefer infiltrierenden Tumoranteilen erinnert an die SOX9 pos. embryonale Haarplakode [37]. Vielleicht bedeutet das, dass SOX9 für die Tumorentstehung gebraucht und anschließend vom BCC herunterreguliert wird. Dazu passt, dass Shi et al. erhöhte SOX9 Konzentrationen in UVB bestrahlten KZ gefunden haben, wobei der erhöhte SOX9-Spiegel die KZ vor Apoptose zu schützen scheint [160]. Demnach könnte SOX9 den ersten entscheidenden Schritt der Tumorentstehung promoten und anschließend vom Tumor herunterreguliert werden.

Wertet man jedoch nur die BCCs mit nukleärer SOX9 Expression als spezifisch, wird SOX9 in dieser Arbeit, entgegen der vorher beschriebenen Studien, fast gar nicht im BCC exprimiert (nur 3/45 BCCs pos.). Ursächlich dafür könnten methodische Unterschiede, z.B. die geringere Antikörper-Verdünnung bei Krahle et al. (1:400) [37] oder die verwendete Blockierlösung sein. Andererseits könnten auch die verschiedenen SOX9-Primärantikörper (SOX9-Abnova Corp., Taipei, Taiwan [37, 159]; SOX9 sc- 20095, Santa Cruz, CA [160]) zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Insgesamt konnte in gesunder Haut das bereits bekannte SOX9 Expressionsmuster in geringerer Intensität bestätigt werden. Bei den BCCs zeigte sich eine deutlich niedrigere SOX9 Expression als in den vorausgegangenen Studien. SOX9 wird vornehmlichen in den initialen epidermisnahen BCC-Anteilen exprimiert und kann als Tumorpromotor diskutiert werden.

## 4.5. $\beta$ -Catenin

Die Bedeutung von  $\beta$ -Catenin für die TF-Entwicklung und -differenzierung wurde in verschiedenen Mausmodellen bereits demonstriert. Daher erfolgten auch an menschlicher Haut zahlreiche Studien über die Expression von  $\beta$ -Catenin. Bereits in der frühen Embryonalperiode konnte  $\beta$ -Catenin in Zytoplasma und Nuklei der epithelialen und mesenchymalen Haarknospenzellen nachgewiesen werden [59, 37]. Passend zur Abnahme der Aktivität des Wnt-Weges findet sich im adulten TF membranäres  $\beta$ -Catenin in den HWSn [163, 37]. Die

weiter proliferativ aktiven Zellen der Haarmatrix hingegen zeigen  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und Zellkern [163]. In der IFE findet sich von der frühen Embryonalperiode bis zur adulten Haut eine starke membranäre Anfärbung aller Schichten [37]. Zudem exprimieren einige Fibroblasten der HP  $\beta$ -Catenin im Kern [163]. Mit Ausnahme der Anfärbung der Fibroblasten der HP konnten in dieser Arbeit die Anfärbungen von  $\beta$ -Catenin an gesunder Haut bestätigt werden. Die unterschiedlichen zellulären Lokalisationen hängen mit der Funktion von  $\beta$ -Catenin zusammen. In Epidermis und HWSn kommt es vor allem als Verankerungsprotein der Zell-Zell-Kontakte vor. In den Matrixzellen des TFs hingegen ist es im Rahmen des Wnt-Weges mit verantwortlich für die Regulation des Haarzyklus und das Haarwachstum [164]. Angesichts der ubiquitären Verbreitung von  $\beta$ -Catenin in menschlicher Haut eignet es sich nicht als SZ-Marker. Allerdings wurde in KZ-Kulturen gezeigt, dass potentielle epidermale SZ über einen deutlich höheren freien  $\beta$ -Catenin Pool verfügen als differenziertere Zellen [165]. Zudem kann über ektope  $\beta$ -Catenin Zufuhr der SZ-Anteil sowie deren Proliferationsrate erhöht werden [165, 166]. Somit kommt  $\beta$ -Catenin eine potentielle Funktion als SZ-Verwalter zu. Gegensätzlich dazu sind im Mausmodell die diskutierten SZ von Wulst und sekundärem Haarkeim auch ohne  $\beta$ -Catenin überlebensfähig [164].

$\beta$ -Catenin hat auch bei der Karzinogenese zahlreicher Tumoren eine zentrale Bedeutung. In Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass der Verlust von E-Cadherin gebundenem  $\beta$ -Catenin einen wichtigen Teil der malignen Transformation darstellt, da sich die mutierten Zellen aus ihren benachbarten Zell-Kontakten lösen können [167, 168]. Dass der Verlust von membranärem  $\beta$ -Catenin mit einer erhöhten Malignität einhergeht, zeigen auch vergleichende Studien von SCCs (weniger membranäres  $\beta$ -Catenin) mit aktinischen Keratosen [169]. In schlechter differenzierten und stärker proliferativen SCCs konnte sogar verstärkt aberrantes, also im Kern und Zytoplasma lokalisiertes,  $\beta$ -Catenin gefunden werden [170].

$\beta$ -Catenin wurde bereits in mehreren Studien an BCCs untersucht. Analog zu meinen Befunden, konnten auch andere Arbeiten die ubiquitäre Expression von  $\beta$ -Catenin in BCCs feststellen [171, 172, 173, 174, 37, 175]. Wichtig ist jedoch die zelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin zu beachten. Überträgt man die beschriebenen Funktionen von  $\beta$ -Catenin auf die zelluläre Verteilung, dann sind zytoplasmatisches und nukleäres  $\beta$ -Catenin, solange es nicht mutiert ist, ein Zeichen eines aktivierten Wnt-Weges. Membranäres  $\beta$ -Catenin spricht für die Verankerung der Zellen in den Zell-Zell-Adhäsionskontakten. In dieser Arbeit findet sich  $\beta$ -Catenin überwiegend im Zytoplasma der BCCs und weniger membrangebunden. Die zunehmende Internalisierung von  $\beta$ -Catenin von der Zellmembran ins Zytoplasma in den BCCs legt somit eine Aktivierung des Wnt-Weges nahe. Saldanha et al. konnten bereits die erhöhte Expression von Wnt-Liganden in BCCs nachweisen [174]. Andere Arbeiten berichten über eine überwiegend membranäre Anfärbung der BCCs [175].

Etwa die Hälfte der BCCs meiner Studie fällt zudem durch eine nukleäre  $\beta$ -Catenin Expression auf. Der Anteil nukleär  $\beta$ -Catenin exprimierender BCCs anderer Arbeiten schwankt

zwischen 50 [173] und 0 Prozent [176]. Wie ist die Kernfärbung zu bewerten? Vielleicht ist nukleäres  $\beta$ -Catenin ein Zeichen verstärkter Proliferation, passend zu dem bevorzugten Auftreten in der Invasionsfront der soliden BCCs und in den infiltrativ wachsenden verwilderten BCCs. Saldanha et al. bestätigten den Verdacht, dass BCCs mit nukleärer  $\beta$ -Catenin Expression stärker proliferativ aktiv sind (mehr KI67 pos. Zellen). Allerdings liegen die stärker proliferierenden Zellen zentral in den Tumoren und decken sich nicht mit den nukleären  $\beta$ -Catenin pos. Zellen [174]. In drei weiteren Studien konnte zudem eine pos. Korrelation zwischen stärker infiltrierenden BCCs und der Anzahl der Zellen mit nukleozytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin gezeigt werden [173, 177, 175]. Auch in meiner Studie ist ein solcher Trend erkennbar. Durch genetische Analysen von Pilomatrixomen konnten  $\beta$ -Catenin-Gen-Mutationen nachgewiesen werden, die mit einer verstärkten nukleären Expression einhergehen [172]. Auch im Mausmodell führt eine exzessive  $\beta$ -Catenin Expression von epidermalen KZ zunächst zur Entstehung von TF-ähnlichen Strukturen und dann zur Bildung gutartiger TF-assoziiierter Tumore, wie z.B. Pilomatrixomen oder Trichofollikulomen [11, 8]. Im BCC konnten bisher keine  $\beta$ -Catenin-Mutationen gefunden werden, allerdings wären Mutationen anderer Wnt-Weg Proteine möglich [174]. Ebenfalls denkbar wäre, dass der in BCCs oftmals mutierte SHH-Weg den Wnt-Weg aktiviert und dadurch verstärkt nukleäres  $\beta$ -Catenin exprimiert wird. Letztlich ist noch nicht endgültig geklärt warum ein Teil der BCCs  $\beta$ -Catenin in den Nuklei exprimiert.

Insgesamt könnte nukleäres  $\beta$ -Catenin ein potentieller Marker für aggressive BCC-Subtypen sein. Anhand des ubiquitären Expressionsprofils in gesunder Haut und in den BCCs konnten keine Rückschlüsse auf die Ursprungszelle des BCCs gezogen werden, noch eignet sich  $\beta$ -Catenin als SZ-Marker.

## 4.6. Ephrin B2 Rezeptor, N- und C-Terminus

EphB2 konnte an der Maus in der IFE, dem TF-Wulst, der äußeren HWS, den Haarmatrixzellen, der TD und der HP nachgewiesen werden [109]. In menschlicher Haut konnte bisher nur EphB2 mRNA mittels PCR detektiert werden [178]. Verglichen mit den Ergebnissen im Mausmodell ist das Färbemuster des C-Terminus- deutlich ähnlicher als das des N-Terminus-Antikörpers. EphB2C wird primär in differenzierten KZ von IFE und TF angefärbt und fehlt, mit Ausnahme der äußeren HWS, in den basalen Schichten. Dies passt zu der im Mausmodell vermuteten Funktion, dass Eph/Ephrin-Aktivierung die epidermale und follikuläre Proliferation hemmt und Ephs daher Marker für Differenzierung sind [109]. Ein wichtiger Unterschied zur Maus ist, dass mit Ausnahme der Anfärbung von Mastzellen (N-Terminus) und Plasmazellen (C-Terminus) keine dermalen Zellen angefärbt werden. Der N-Terminus zeigt außer der schwachen Anfärbung des unteren TFs keine pos. Reaktionen und unterscheidet sich deutlich vom C-Terminus. Fraglich ist ob die follikulären Reaktionen angesichts der hohen verwendeten Konzentration des Antikörpers (1:50) überhaupt als spezifisch gewertet werden können.

Ob es sich bei der bisher unbekannten Markierung der Mastzellen tatsächlich um das EphB2N Epitop oder eine unspezifische Kreuzreaktion handelt, ist unklar. Analog verhält es sich mit der Plasmazellfärbung des C-Terminus-Antikörpers.

Für viele Ephs wurden Funktionen im Rahmen der Karzinogenese berichtet, was an ihren veränderten Expressionsprofilen in zahlreichen Tumoren, im Vergleich zu den Ursprungsgeweben, ersichtlich wird [179]. EphB2 ist bisher am Kolonkarziom am besten untersucht. Dabei wird es im initialen Tumor verstärkt exprimiert und mit zunehmendem Tumorstadium herunterreguliert, weshalb es als potentieller Tumorsuppressor angesehen wird [180, 181]. Dabei korreliert der Verlust von EphB2 sogar mit der Malignitäts- und Metastasierungsrate und damit auch mit der Prognose [181].

Am BCC wurde bisher nur die Expression von EphA1 untersucht. EphA1 wurde als Marker für differenzierte KZ beschrieben und war folglich in BCCs und auch SCCs im Vergleich zu gesunder Haut deutlich herunterreguliert [178]. Meine Ergebnisse an gesunder Haut sprechen ebenfalls dafür, dass EphB2C differenzierte KZ färbt und daher passend, mit Ausnahme der angefärbten keratotischen Einschlüsse, nicht im BCC exprimiert wird. Anhand des Färbemusters eignet sich EphB2C weder als Diagnostik- oder Prognosemarker, noch kann man durch ihn Rückschlüsse auf die Herkunft des BCCs schließen. Einzig der Ausschluss des präsumptiven Kortex als Ursprung des BCCs scheint möglich, da sich dessen starke Anfärbung in den BCCs wiederfinden müsste.

Analog zu gesunder Haut unterscheidet sich das Färbemuster des N-Terminus vom C-Terminus-Antikörper stark. Vielleicht spielt die zelluläre Lage und somit die Erreichbarkeit für den Antikörper eine entscheidende Rolle (N-Terminus extra-, C-Terminus intrazellulär). EphB2N wird in den verwilderten BCCs stark angefärbt und ist trotz der geringen Stichprobenanzahl signifikant stärker exprimiert als im superfiziellen Subtyp. Somit zeigt der N-Terminus-Antikörper eine kontrastäre Anfärbung im Vergleich zum C-Terminus, da dieser ja gerade differenzierte Zellen angefärbt hat und im BCC nicht exprimiert wurde. Eine mögliche Erklärung für dieses Expressionsmuster wäre, dass EphB2N (Protein) analog zur EphB2 mRNA in gesunder Haut in so niedriger Konzentration vorkommt [178], dass er per Immunhistochemie nicht spezifisch detektiert werden kann und erst durch eine Internalisierung des Rezeptors im BCC, wie für EphA1 in ulzerierenden Tumoren beschrieben [178], angefärbt wird. Auch denkbar wäre, dass der N-Terminus-Antikörper mit einem bisher unbekannten Epitop in den verwilderten BCCs kreuzreagiert, da dieses Verhalten im Widerspruch mit der bisher vermuteten Funktion von EphB2 als Tumorsuppressor steht. Unabhängig wie diese Anfärbung zustande kommt, könnte EphB2N ein guter Aggressionsmarker für das BCC sein, was noch an einer größeren Stichprobe untermauert werden müsste. Auf die Herkunft des BCCs lassen sich mit dem Färbeprofil von EphB2N keine Rückschlüsse ziehen.

Insgesamt betrachtet bringt EphB2 zwar keine neuen Impressionen für die Herkunft des

BCCs, jedoch konnte der N-Terminus als Marker von Mastzellen und als potentieller Aggressionsmarker des BCCs ermittelt werden. Der C-Terminus-Antikörper markiert primär differenzierte KZ sowie Plasmazellen und eignet sich nicht als BCC-Marker.

## 4.7. Nestin

Wie bereits angedeutet widersprechen sich die Ergebnisse der Nestinexpression in menschlicher Haut und im Mausmodell deutlich. In dieser Arbeit wurde Nestin mit Ausnahme der innersten Schicht der äußeren HWS nicht in den epithelialen Anteilen der Haut gefunden. Dafür zeigen sich in den BGSn des TFs und der Drüsen sowie in den dermalen Gefäßen und ihren BGSn starke Anfärbungen. Mit Ausnahme der Studie von Wang et al., die Nestin analog zum Mausmodell im Wulst und zudem in der IFE gefunden hat [182], konnten weitere Studien, mittels Immunhistochemie, die primär mesenchymale Lokalisation von Nestin bestätigen [129, 130, 131, 13]. Tiede et al. zeigten zudem, dass die follikulären epithelialen Anteile keine Nestin mRNA enthalten [131]. Vermutlich sind die Unterschiede der Wang-Studie auf technische Unterschiede zurückzuführen, da Sellheyer et al. Unterschiede im Färbeverhalten der drei bisher verwendeten Nestinklone (Nestin 10c2 Santa Cruz, Nestin 10c2 Chemicon, Nestin Polyclonal (rabbit) Atlas) ausschließen konnten [13].

Nun stellt sich die Frage, ob Nestin potentielle mesenchymale SZ in den BGSn der Hautanhangsorgane anfärbt. Toma et al. zeigten, dass isolierte Nestin pos. multipotente dermale Zellen, die sie „skin-derived precursor cells“ nannten, sowohl neuronale als auch mesenchymale Nachkommenzellen bilden konnten [183, 184] und somit SZ-Eigenschaften besitzen. Das im Haarbalg Zellen mit SZ-Charakter liegen, demonstrierten Jahoda et al.. Sie zeigten, dass sich aus Klonen der Haarbalgzellen und Zellen der HP adipozyten- und osteozytenartige Zellen bilden können [185]. Diese Fakten deuten daraufhin, dass Nestin in potentiellen mesenchymalen SZ des Haarbalgs exprimiert wird.

Was nicht so recht ins Bild passt, ist die Nestinexpression in der innersten Schicht der äußeren HWS („Companion Cell Layer“), die auch von einer anderen Studie bestätigt wurde [186]. Bekannt ist, dass sich diese Schicht im Aufbau vom Rest der äußeren HWS unterscheidet, aber auch Unterschiede zur anliegenden Henle-Schicht der inneren HWS aufweist [187, 188]. Ihr wird, als Gleitschicht für den herauswachsenden Haarschaft, eine bedeutende Funktion zugeschrieben [188, 189]. Nur welche Rolle spielt Nestin dabei? Vielleicht vermittelt das filamentäre Nestin eine Veränderung der Zellform (von äußerer zu innerer HWS) analog zu seiner vermuteten Funktion während der Neurogenese.

Da Nestin ursprünglich als Wulstzellmarker beschrieben wurde, erfolgten bereits einige immunhistochemische Studien über seine Expression im BCC. In dieser Arbeit zeigten sich mit Ausnahme einer dendritischen Zellpopulation keine Nestin pos. Zellen in den epithelialen Tumorteilen, analog zu vorhergehenden Studien [146, 149, 13, 190]. Sellheyer et al. berichteten,

dass es sich dabei um HMB45 pos. Zellen und somit um aktivierte Melanozyten handelt, die ebenfalls in den epithelialen Anteilen des TFs angefärbt werden [13]. Dieser Befund passt zu der starken Nestinexpression in melanozytären Tumoren [123]. Die von Sellheyer et al. bemerkte Häufung dieser Zellen an der Invasionsfront konnte ich nicht bestätigen [190].

Interessanter ist die Expression von Nestin in den Zellen des Tumorstromas, die in mehr als der Hälfte der untersuchten BCCs dieser Arbeit zu verzeichnen war. Dabei liegen die Nestin pos. Zellen in einer ein- bis zweilagigen Zellschicht direkt den epithelialen Tumoran-teilen an oder ungeordneter in der daran anschließenden BGS des Tumors. Zudem werden die Blutgefäße in den TS und den BGSn durch Nestin gefärbt. Das umgebende dermale BG ist mit Ausnahme der Blutgefäße Nestin negativ. Dieses Muster erinnert stark an die Anfärbung des TFs, wobei das negative BCC den epithelialen Anteil (äußere HWS) und das Tumorstroma dem Haarbalg entspricht. Dies deutet auf eine follikuläre Herkunft des BCCs oder eine Imitation des TFs hin. Allerdings finden sich auch Parallelen zum Embryonalstadium der Haut, wo Nestin im Gegensatz zu adulter Haut über die gesamte Dermis exprimiert wird [13]. Womöglich ist das erneute Auftreten Nestin pos. Zellen im BCC-Stroma ein Hinweis auf den Rückfall in ein embryonales Verhaltensmuster. Jedoch scheint Nestin nicht essenziell für die Aufrechterhaltung des Tumorstromas zu sein, da nicht alle BCC-Subtypen Nestin exprimierende Zellen im Tumorstroma aufweisen. Die verwilderten und sklerodermiformen BCCs zeigen keine bzw. weniger dieser Zellen im Interface als die restlichen Subtypen. Der superfizielle Subtyp, von dem am ehesten eine TF-unabhängige Entstehung angenommen wird, zeigt paradoxerweise die stärkste Nestinexpression im Interface. Warum unterscheidet sich die Nestinexpression im Stroma der BCC-Subtypen so auffällig? Das Tumorstroma der einzelnen BCC-Subtypen ist nicht homogen, sondern unterliegt strukturellen Veränderungen. Knaur et al. beobachteten eine verstärkte Fibrosierung oder den kompletten Verlust des Tumorstroma bei den infiltrativen und „morphoic“-BCCs (entsprechen den sklerodermiformen und verwilderten Subtypen), wohingegen um die superfiziellen und nodulären (entspricht den soliden) BCCs ein fibromyxoides Stroma dominierte [191]. Eine zum Teil ausgeprägte Neubildung von kollagenem BG (Abbildung 3.17 b) sowie auch das fast vollständige Fehlen einer Stromabildung um sklerodermiforme BCCs (Daten nicht gezeigt) konnte in dieser Arbeit mit der Herovici-Färbung bestätigt werden. Das infiltrative BCCs eine stärkere Fibrosierung im Stroma aufweisen als die weniger aggressiven Subtypen konnten weitere Studien belegen [192, 193]. Demnach könnte der Verlust von Nestin mit dem strukturellen Umbau des Tumorstromas zusammenhängen, z.B. wäre es möglich, dass Nestin in den Zellen des Tumorstromas mit zunehmender Aggressivität des BCCs herunterreguliert wird und somit vielleicht als Prognosemarker dienen könnte. Im Glioblastom und malignen Melanom konnte bereits eine pos. Korrelation der Nestinexpression mit der Prognose demonstriert werden [118, 121]. Vielleicht aber entscheidet auch bereits das initiale Tumorstroma um die BCC-Knospe mit dem Vorhandensein von Nestin pos. Zellen darüber welcher BCC-Subtyp entsteht.

Fraglich ist welche Funktion die Nestin pos. Zellen im Tumorstroma übernehmen. Die Bedeutung der Stromazellen für das Tumorwachstum konnte in verschiedenen Experimenten belegt werden. Z.B. fördert im Tiermodell bestrahltes Brustdrüsenstroma die Entartung von transplantierten Brustepithelzelllinien [194]. In einer anderen Studie wurden Fibroblasten aus dem Stroma von BCCs isoliert und mit epidermalen KZ-Kulturen zusammengebracht. Erstaunlicherweise exprimierten die KZ daraufhin CK19, ein CK was im BCC und TF aber nicht der Epidermis vorkommt. In der Kontrollgruppe, die dermale Fibroblasten statt BCC-Fibroblasten verwendete, war keine CK19 Expression zu verzeichnen [195]. Demzufolge könnten die Nestin pos. Zellen eine bedeutende Rolle bei der malignen Transformation oder dem Tumorwachstum spielen. Dass sie wahrscheinlich am Aufbau des Tumorstromas beteiligt sind, konnte durch die Herovici-Färbung gezeigt werden.

Insgesamt betrachtet konnte mit dieser Arbeit die Expression von Nestin in den mesenchymalen Anteilen der Haut und dem BCC-Stroma bestätigt werden. Zudem konnte mit der Herovici-Färbung demonstriert werden, dass die Nestin pos. Zellen konzentriert in jungem kollagenen BG um die BCCs liegen, sodass diese Zellen wahrscheinlich am Aufbau des Tumorstromas beteiligt sind. Ob die Nestin pos. Zellen über die Bildung des Stromas auch Einfluss auf den entstehenden BCC-Subtyp haben, ist denkbar aber nicht bewiesen. Somit könnte Nestin eine wesentliche Rolle als Prognosemarker beim BCC zukommen.

## 4.8. CRABP1

Collins et al. beschrieben CRABP1 als dermalen Zellmarker, der in der adulten Maus vornehmlich in Zellen der HP exprimiert wird [140]. In den epithelialen Anteilen der Haut wurde es nicht nachgewiesen [140]. In dieser Arbeit konnte CRABP1 als dermalen Marker bestätigt werden und zeigt ein deutlich breiteres Verteilungsmuster im Vergleich zum Mausmodell. CRABP1 wird in den Zellen der HP, den BGSn der TF und TDn und etwas schwächer auch in den Zellen der BGSn der SDn exprimiert. Zusätzlich sind auch vereinzelte Zellen in der interfollikulären Dermis und im Bereich der basalen IFE angefärbt. Letztere sind aufgrund ihres dendritischen Aussehens vermutlich Interfacezellen zwischen Dermis und Epidermis, welche von Collins et al. nur während der Embryogenese beschrieben wurden, sich aber postnatal verlieren [140]. An menschlicher Haut konnten Busch et al. CRABP1 ebenfalls in dendritischen Zellen der dermoepidermalen Junktionszone immunhistochemisch nachweisen [196]. Da diese Zellen Vimentin pos., S100 negativ und Makrophagen-Marker negativ (myeloid/histiocyte antigen) waren, nahmen Busch et al. einen mesenchymalen Ursprung an [196]. Zusätzlich konnten sie CRABP1 in den suprabasalen Schichten gesunder IFE nachweisen, sowie in den epithelialen Anteilen von TF, SD und TD [196]. Um diese meiner Ansicht nach unspezifische Anfärbung der epithelialen Anteile zu erklären, sind methodische Unterschiede zu favorisieren, z.B. die deutlich höhere Konzentration des verwendeten Primärantikörpers (1:1000 diese

Arbeit; 1:100 Busch et al.). Zudem bindet der Antikörper von Busch et al. nur an Rückstände (Aminosäuren 68-81) des CRABP1's der Kuh (der hier verwendete an das komplette Protein der Kuh) und könnte somit stärker kreuzreagieren, z.B. mit dem eng verwandten CRABP2. CRABP2 wurde von Siegenthaler et al. im Gegensatz zu CRABP1 in menschlichen epidermalen KZ-Kulturen nachgewiesen [197].

Bei den BCCs dieser Arbeit zeigte ca. die Hälfte der Tumoren CRABP1 pos. Zellen in den epithelialen Anteilen. Auffallend ist die starke CRABP1 Expression bei dem verwilderten Subtyp und dem Ulcus terebrans, die mit zunehmender Tiefeninfiltration des Tumors weiter zunimmt. Der adenoide Subtyp hingegen zeigt keine Anfärbung und die übrigen Subtypen nehmen eine Mittelstellung bei ca. 44-54% Positivität ein. CRABP1 wird eine Reservoir und Transportfunktion von RA zugeschrieben [137]. Zu dieser These passt der im Vergleich zu gesunder Haut in psoriatischer Epidermis deutlich verminderte CRABP1 mRNA Spiegel, da bei Psoriasis vermehrt undifferenzierte epidermale KZ entstehen [198]. Entsprechend wäre es also möglich, dass die pos. BCC-Anteile einen verstärkten RA-Metabolismus aufweisen. Allerdings würde man aufgrund der differenzierungsfördernden Funktion von RA eher einen Verlust in den stärker entdifferenzierten verwilderten BCCs erwarten. Gegensätzlich zur Reservoirfunktion konnte gezeigt werden, dass CRABP1 in teratogen anfälligen Zellen erhöht exprimiert wird, um als Puffer die schädliche RA zu binden und die Interaktion mit den Kernrezeptoren zu verhindern [137]. Fiorella et al. vermuteten sogar, dass CRABP1 den Katabolismus von RA initiiert, da der CRABP1-RA-Komplex ein Substrat von RA-metabolisierenden Enzymen ist [135, 137]. Überträgt man zuletzt genannte These auf die verwilderten BCCs, so ließe sich die stärkere Entdifferenzierung aufgrund der reduzierten Wirkung der RA erklären. Gegensätzlich dazu, konnte in mehreren Tumorstudien gezeigt werden, dass die CRABP1 Expression mit zunehmendem Tumorstadium und Entdifferenzierung abnimmt, sodass es als potentieller Tumorsuppressor gewertet wird [199, 200]. Busch et al. konnten paradoxerweise zu der fast ubiquitären Verteilung von CRABP1 in gesunder Haut, keine Expression in den epithelialen Anteilen der BCCs feststellen. Jedoch erfolgte hierbei keine Unterscheidung zwischen den Subtypen, sodass unklar ist ob auch infiltrierende BCCs untersucht wurden [196].

Neben der homogenen Anfärbung des verwilderten Subtyps konnten bei den superfiziellen und soliden BCCs vereinzelt randständige pos. Zellen, analog zur Färbung der Zellen der dermoepidermalen Junktionszone, beobachtet werden. Diese Ähnlichkeit, die auch von Collins et al. zwischen embryonaler Mausepidermis und Mauspapillomen festgestellt wurde [140], könnte ein Hinweis auf eine epidermale Herkunft dieser BCC-Subtypen sein. Unklar ist warum nur einige superfizielle und solide BCCs diese Muster zeigen und andere nicht, genauso wie nicht jeder Epidermisbereich diese Verteilung zeigt.

Im Tumorstroma zeigt CRABP1 eine auffallend starke Anfärbung der peritumoralen Infiltratzellen (78% pos. Reaktionen). Anhand der Morphe der angefärbten Zellen und dem Fakt, dass Lymphozyten über 50% der Infiltratzellen von BCCs ausmachen [191], handelt es sich am

ehesten um Lymphozyten. Die TS und die BGSn zeigten eher wenige CRABP1 pos. Zellen, die morphologisch den gefärbten Zellen im Infiltrat sehr ähnlich sind, sodass überwiegend von eingewanderten Infiltratzellen auszugehen ist. Interessanterweise verhielt sich die Anfärbung der Zellen in den BGSn und den TS umgekehrt zur Anfärbung der BCCs, d.h. wenn sich epitheliale Strukturen anfärbten, zeigten die Stromazellen wenige bis keine Reaktion, so z.B. bei den verwilderten BCCs (0%). Möglicherweise hängt diese Erscheinung mit der Stärke des Infiltrates bei dem jeweiligen BCC Subtyp zusammen, da superfizielle BCCs tendenziell die stärkste Infiltratreaktion zeigen, wohingegen infiltrativere BCCs von weniger Entzündungszellen umgeben sind [191] und entsprechend weniger Infiltratzellen in das Stroma einwandern. Mit der Herovici-Färbung konnte demonstriert werden, dass das Entzündungsinfiltrat überwiegend im Bereich um die BGS des Tumors liegt. Somit befindet sich der Hauptanteil der CRABP1 pos. Infiltratzellen außerhalb des vom Tumor neu gebildeten Stromas. Hinweise darauf, dass CRABP1 das Tumorstroma entscheidend mit aufbauen könnte, analog zu Nestin, wurden nicht gefunden.

Zusammengefasst konnte die Expression von CRABP1 in dermalen Zellen der BGSn der Hautanhangsorgane adulter menschlicher Haut nachgewiesen werden. Diese ist somit stärker als im Mausmodell. Zudem konnte meines Wissens nach erstmalig per Immunhistochemie die Expression von CRABP1 im BCC gezeigt werden. Dabei ist es aufgrund der starken Expression in den verwilderten BCCs und den Ulcus terebrans als Aggressionsmarker für das BCC zu diskutieren. Im Tumorstroma wird CRABP1 überwiegend in Infiltratzellen gebildet und scheint nicht primär am Aufbau dessen beteiligt zu sein.

## 4.9. Vergleich der Antikörper

Resümierend lässt sich festhalten, dass mit Ausnahme von Nestin und EphB2C die verwendeten potentiellen SZ-Marker auch im BCC beibehalten werden. CK15, Lrig1, LGR5, SOX9,  $\beta$ -Catenin und EphB2N werden dabei sowohl in Anteilen der epithelialen Kompartimente gesunder Haut als auch in den BCCs exprimiert. Abbildung 4.1 zeigt die Expression dieser 6 Marker schematisch an humaner Haut und den BCC-Subtypen gegenübergestellt. Welche Erkenntnisse lassen sich aus diesen Daten hinsichtlich der Histogenese des BCCs schließen?

Zunächst fällt auf, dass jeder der 6 Marker, mit Ausnahme von LGR5, der nicht in den superfiziellen BCCs nachgewiesen werden konnte, in jedem Subtypen exprimiert wird. Da sich die Expression von LGR5 maßgeblich auf die äußere HWS des unteren TF beschränkt, lässt sich schlussfolgern, dass der superfizielle Subtyp nicht aus den unteren TF-Anteilen rekrutiert wird. Besonders stark werden CK15, Lrig1 und  $\beta$ -Catenin im superfiziellen Subtyp exprimiert. Alle drei werden in den basalen Schichten von IFE, Infundibulum und Isthmus exprimiert, wo potentielle SZ liegen. Anhand der Expressionsprofile dieser Arbeit ist die Ent-

stehung des superfiziellen Subtyps aus diesen Zellen zu favorisieren. Bei dem adenoiden Subtyp fällt die starke Positivität für LGR5 auf. Demnach ist die Entstehung aus den Zellen der unteren äußeren HWS anzunehmen. Auch die starke Expression von CK15, Lrig1 und  $\beta$ -Catenin in den adenoiden BCCs findet sich in der unteren äußeren HWS wieder. Hinsichtlich der übrigen verwilderten, soliden und sklerodermiformen BCCs lassen sich keine wesentlichen Unterschiede in der Expression der epithelialen Marker erkennen, mit Ausnahme der hohen Expression von EphB2N in den verwilderten BCCs, die ich jedoch eher als Phänomen im Rahmen der zunehmenden Entdifferenzierung werte.

Fakt ist, dass CK15, Lrig1 und  $\beta$ -Catenin starke Expressionen in allen BCC-Subtypen zeigen und auch in den bisher diskutierten potentiellen epithelialen SZ-Nischen exprimiert werden (siehe Abbildung 1.6). Vermutlich hat nicht jeder histologische Subtyp eine eigene SZ-Population, jedoch scheint auch an den in dieser Arbeit gewonnen Daten (LGR5-Expression) eine Unterteilung der BCCs hinsichtlich der Ursprungszelle in superfiziell und nicht superfiziell sinnvoll. Anhand der in dieser Arbeit aufgezeigten Expressionsprofile ist die Entstehung des superfiziellen BCCs aus der IFE und des adenoiden Subtyps aus dem unteren Haarfollikel denkbar.

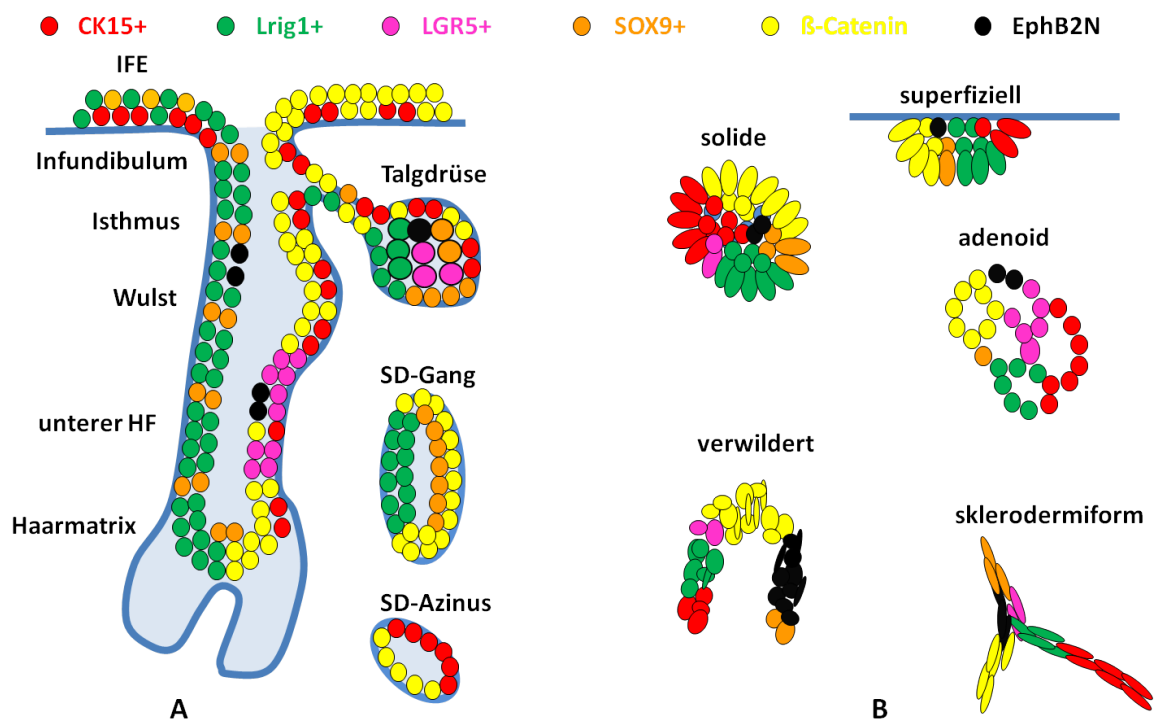


Abbildung 4.1.:

Expression von CK15, Lrig1, LGR5, SOX9,  $\beta$ -Catenin und EphB2N an gesunder Haut (A) und in den BCC-Subtypen (B) schematisch dargestellt.

## 5. Zusammenfassung

Die Haut unterliegt als größtes Organ des Menschen einer permanenten zellulären Erneuerung, die über potentielle Stammzellen (SZ) reguliert wird. Durch die Verwendung von SZ-Markern hat man die Möglichkeit Aussagen über die Histogenese von Tumoren zu machen, die über die Beurteilung der Morphologie von normaler Hautstruktur und Tumor hinausgehen. Das Basalzellkarzinom (BCC) als häufigstes kutanes Malignom wird hinsichtlich seiner Ätiopathogenese intensiv diskutiert. Ziel dieser Arbeit ist es zu überprüfen, ob potentielle SZ-Marker im BCC erhalten bleiben und sich darüber Rückschlüsse auf dessen Ätiopathogenese ziehen lassen. Dazu wurden 45 BCCs mit den Subtypen solide, superfiziell, sklerodermiform, adenoid und verwildert per Immunhistochemie auf die Expression von potentiellen SZ-Markern (CK15, Lrig1, LGR5, SOX9,  $\beta$ -Catenin, EphB2N und C, Nestin und CRABP1) untersucht und mit den Färbeprofilen gesunder Haut verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CK15, Lrig1, LGR5, SOX9,  $\beta$ -Catenin, EphB2N und CRABP1 auch im BCC erhalten bleibt.  $\beta$ -Catenin zeigt von allen verwendeten Antikörpern die stärkste Anfärbung (92% pos.) und weist bei knapp der Hälfte der BCCs eine nukleäre Expression auf. Auffällig ist die Differenz zwischen stärker angefärbten, nukleär betonten Basalzellen der Tumorperipherie und dem schwächer pos. Tumorzentrum mit überwiegend zytoplasmatisch exprimiertem  $\beta$ -Catenin. CK15 und Lrig1 werden nach  $\beta$ -Catenin mit 84% pos. BCCs am stärksten exprimiert und kommen in allen Subtypen vor. CK15 zeigt die Tendenz mit zunehmender Entdifferenzierung (Verwilderung) der BCCs herunterreguliert zu werden. Lrig1 findet sich insgesamt eher homogen verteilt in allen Subtypen. Neben der dominierenden zytoplasmatischen Anfärbung findet sich jedoch auch nukleär exprimiertes Lrig1, welches analog zu CK15 im verwilderten Subtyp herunterreguliert wird. Auch in gesunder Haut sind vereinzelt nukleär pos. Zellen im Str. basale der interfollikulären Epidermis (IFE) und dem Infundibulum zu finden. LGR5 findet sich in gesunder Haut nur in der inneren und äußeren Haarwurzelscheide des unteren Talgdrüsenfollikels (TF). Von den insgesamt 11 pos. BCCs sind die adenoid differenzierten mit 5 pos. Tumoren am stärksten, die superfiziellen als einziger Subtyp nicht vertreten. SOX9 wird in allen BCC-Subtypen schwach exprimiert. Häufig sind die epidermisnahen Tumoranteile etwas stärker pos. gefärbt. EphB2C färbt vornehmlich differenzierte Keratinozyten und wird nicht im BCC exprimiert. EphB2N fällt durch eine starke Anfärbung von Mastzellen auf. Bei einer moderaten Gesamtexpression in den BCCs (31%) stechen die stark gefärbten verwilderten BCCs mit 75% pos. Tumoren heraus. Nestin wird nicht in den epithelialen BCC-Anteilen gefunden, aber dafür in dem neu vom Tumor rekrutierten bindegewebigen Stroma. CRABP1 wird vor allem in den verwilderten BCCs und den Ulcus terebrans gefunden und mit zunehmender Tiefeninfiltration verstärkt exprimiert. Als dermaler Marker färbt es vorwiegend Zellen des peritumoralen Entzündungsinfiltrates. Die Ergebnisse meiner Arbeit sprechen eher für eine multilokuläre Entstehung des BCCs. Anhand der hier aufgezeigten Expressionsprofile ist eine Entstehung des BCCs aus der IFE sowie des oberen und unteren TFs denkbar. Das zeigt sich insbesondere für die Entstehung des superfiziellen Typs sowie des adenoiden Typs.

# Literaturverzeichnis

- [1] BURG, G., W. KEMPF, H. KUTZNER, J. FEIT und L. KARAI: *Atlas of dermatopathology: Practical differential diagnosis by clinicopathologic pattern*. pp. 321-350, Wiley, Oxford, 1. Auflage, 2015.
- [2] CERRONI, L., C. GARBE, D. METZE, H. KUTZNER und H. KERL: *Histopathologie der Haut*. pp. 73-86, 543-586, 651-670, Springer, Berlin Heidelberg, 2. Auflage, 2015.
- [3] FUJIWARA, H., M. FERREIRA, G. DONATI, D. K. MARCIANO, J. M. LINTON, Y. SATO, A. HARTNER, K. SEKIGUCHI, L. F. REICHARDT und F. M. WATT: *The Basement Membrane of Hair Follicle Stem Cells Is a Muscle Cell Niche*. Cell, 144(4):577-589, 2011.
- [4] LEGUE, E. und J. F. NICOLAS: *Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors*. Development (Cambridge, England), 132(18):4143-4154, 2005.
- [5] KRAUSE, K. und K. FOITZIK: *Biology of the hair follicle: the basics*. Seminars in cutaneous medicine and surgery, 25(1):2-10, 2006.
- [6] PAUS, R. und K. FOITZIK: *In search of the "hair cycle clock": a guided tour*. Differentiation; research in biological diversity, 72(9-10):489-511, 2004.
- [7] HUELSKEN, J., R. VOGEL, B. ERDMANN, G. COTSARELIS und W. BIRCHMEIER: *beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin*. Cell, 105(4):533-545, 2001.
- [8] LO CELSO, C., D. M. PROWSE und WATT F. M.: *Transient activation of -catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours*. Development, 131(8):1787-1799, 2004.
- [9] SATO, N., P. L. LEOPOLD und R. G. CRYSTAL: *Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog*. The Journal of clinical investigation, 104(7):855-864, 1999.
- [10] ALONSO, L. und E. FUCHS: *The hair cycle*. Journal of Cell Science, 119(3):391-393, 2006.
- [11] GAT, U., R. DASGUPTA, L. DEGENSTEIN und E. FUCHS: *De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin*. Cell, 95(5):605-614, 1998.
- [12] MOORE, K. L., T. V. N. PERSAUD und M. G. TORCHIA: *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik*. pp. 533-541, Urban & Fischer in Elsevier, München, 6 Auflage, 2013.
- [13] SELLHEYER, K. und D. KRAHL: *Spatiotemporal expression pattern of neuroepithelial stem cell marker nestin suggests a role in dermal homeostasis, neovasculogenesis, and tumor stroma development: A study on embryonic and adult human skin*. Journal of the American Academy of Dermatology, 63(1):93-113, 2010.
- [14] CHIANG, C.: *Essential Role for Sonic hedgehog during Hair Follicle Morphogenesis*. 1999.

- 
- [15] POTTEN, C. S.: *The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell*. Cell and tissue kinetics, 7(1):77–88, 1974.
- [16] JONES, P. H., S. HARPER und F. M. WATT: *Stem cell patterning and fate in human epidermis*. Cell, 80(1):83–93, 1995.
- [17] CLAYTON, E., D. P. DOUPE, A. M. KLEIN, D. J. WINTON, B. D. SIMONS und P. H. JONES: *A single type of progenitor cell maintains normal epidermis*. Nature, 446(7132):185–189, 2007.
- [18] COTSARELIS, G., T. T. SUN und R. M. LAVKER: *Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis*. Cell, 61(7):1329–1337, 1990.
- [19] MORRIS, R. J., Y. LIU, L. MARLES, Z. YANG, C. TREMPUS, S. LI, J. S. LIN, J. A. SAWICKI und G. COTSARELIS: *Capturing and profiling adult hair follicle stem cells*. Nature biotechnology, 22(4):411–417, 2004.
- [20] CLAUDINOT, S., M. NICOLAS, H. OSHIMA, A. ROCHAT und Y. BARRANDON: *Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(41):14677–14682, 2005.
- [21] JAKS, V., N. BARKER, M. KASPER, J. H. VAN ES, H. J. SNIPPET, H. CLEVERS und R. TOFTGÅRD: *Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells*. Nature Genetics, 40(11):1291–1299, 2008.
- [22] FUCHS, E. und V. HORSLEY: *More than one way to skin . .*. Genes & Development, 22(8):976–985, 2008.
- [23] JENSEN, K. B., C. A. COLLINS, E. NASCIMENTO, D. W. TAN, M. FRYE, S. ITAMI und F. M. WATT: *Lrig1 Expression Defines a Distinct Multipotent Stem Cell Population in Mammalian Epidermis*. Cell Stem Cell, 4(5):427–439, 2009.
- [24] SNIPPET, H. J., A. HAEGEBARTH, M. KASPER, V. JAKS, J. H. VAN ES, N. BARKER, M. VAN DE WETERING, M. VAN DEN BORN, H. BEGTHEL, R. G. VRIES, D. E. STANGE, R. TOFTGARD und H. CLEVERS: *Lgr6 Marks Stem Cells in the Hair Follicle That Generate All Cell Lineages of the Skin*. Science, 327(5971):1385–1389, 2010.
- [25] SOTIROPOULOU, P. A. und C. BLANPAIN: *Development and Homeostasis of the Skin Epidermis*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(7):a008383, 2012.
- [26] ITO, M., Y. LIU, Z. YANG, J. NGUYEN, F. LIANG, R. J. MORRIS und G. COTSARELIS: *Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis*. Nature medicine, 11(12):1351–1354, 2005.
- [27] GOMEZ, C., W. CHUA, A. MIREMADI, S. QUIST, D. J. HEADON und F. M. WATT: *The Interfollicular Epidermis of Adult Mouse Tail Comprises Two Distinct Cell Lineages that Are Differentially Regulated by Wnt, Edaradd, and Lrig1*. Stem Cell Reports, 1(1):19–27, 2013.

- 
- [28] ITO, M., K. KIZAWA, K. HAMADA und G. COTSARELIS: *Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen*. Differentiation; research in biological diversity, 72(9-10):548–557, 2004.
- [29] TUMBAR, T., G. GUASCH, V. GRECO, C. BLANPAIN, W. E. LOWRY, M. RENDL und E. FUCHS: *Defining the epithelial stem cell niche in skin*. Science (New York, N, 303(5656):359–363, 2004.
- [30] CLEARY, M. L.: *Regulating the leukaemia stem cell*. Best practice & research, 22(4):483–487, 2009.
- [31] NGUYEN, N. P., F. S. ALMEIDA, A. CHI, L. M. NGUYEN, D. COHEN, U. KARLSSON und V. VINH-HUNG: *Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical applications*. Cancer treatment reviews, 36(6):485–491, 2010.
- [32] YOUSSEF, K. K., A. VAN KEYMEULEN, G. LAPOUGE, B. BECK, C. MICHAUX, Y. ACHOURI, P. A. SOTIROPOULOU und C. BLANPAIN: *Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma*. Nature Cell Biology, 2010.
- [33] YOUSSEF, K. K., G. LAPOUGE, K. BOUVRÉE, S. RORIVE, S. BROHÉE, O. APPELSTEIN, J. C. LARSIMONT, V. SUKUMARAN, B. VAN DE SANDE, D. PUCCI, S. DEKONINCK, J.-V. BERTHE, S. AERTS, I. SALMON, V. DEL MARMOL und C. BLANPAIN: *Adult interfollicular tumour-initiating cells are reprogrammed into an embryonic hair follicle progenitor-like fate during basal cell carcinoma initiation*. Nature Cell Biology, 14(12):1282–1294, 2012.
- [34] GRACHTCHOUK, M., J. PERO, S. H. YANG, A. N. ERMILOV, L. E. MICHAEL, A. WANG, D. WILBERT, R. M. PATEL, J. FERRIS, J. DIENER, M. ALLEN, S. LIM, L. J. SYU, M. VERHAEGEN und A. A. DLUGOSZ: *Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations*. Journal of Clinical Investigation, 121(5):1768–1781, 2011.
- [35] WANG, G. Y., J. WANG, M. L. MANCIANTI und ERVIN H. EPSTEIN JR.: *Basal Cell Carcinomas Arise from Hair Follicle Stem Cells in Ptch1+/- Mice*. Cancer Cell, 19(1):114–124, 2011.
- [36] KASPER, M., V. JAKS, A. ARE, A. BERGSTROM, A. SCHWAGER, J. SVARD, S. TEG-LUND, N. BARKER und R. TOFTGARD: *Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(10):4099–4104, 2011.
- [37] KRAHL, D. und K. SELLHEYER: *Basal cell carcinoma and pilomatrixoma mirror human follicular embryogenesis as reflected by their differential expression patterns of SOX9 and  $\beta$ -catenin*. British Journal of Dermatology, 162(6):1294–1301, 2010.
- [38] LEAR, J. T. und A. G. SMITH: *Basal cell carcinoma*. Postgraduate medical journal, 73(863):538–542, 1997.
- [39] ROEWERT-HUBER, J., B. LANGE-ASSCHENFELDT, E. STOCKFLETH und H. KERL: *Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma*. British Journal of Dermatology, 157:47–51, 2007.

- 
- [40] LEVELL, N. J., L. IGALI, K. A. WRIGHT und D. C. GREENBERG: *Basal cell carcinoma epidemiology in the UK: the elephant in the room*. Clinical and experimental dermatology, 38(4):367–369, 2013.
- [41] SAMARASINGHE, V., V. MADAN und J. T. LEAR: *Focus on Basal Cell Carcinoma*. Journal of Skin Cancer, 2011(1):1–5, 2011.
- [42] GALLAGHER, R. P., G. B. HILL, C. D. BAJDIK, S. FINCHAM, A. J. COLDMAN, D. I. MCLEAN und W. J. THRELFALL: *Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma*. Archives of dermatology, 131(2):157–163, 1995.
- [43] DUMAZ, N., H. J. VAN KRANEN, A. DE VRIES, R. J. BERG, P. W. WESTER, C. F. VAN KREIJL, A. SARASIN, L. DAYA-GROSJEAN und F. R. DE GRUIJL: *The role of UV-B light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice*. Carcinogenesis, 18(5):897–904, 1997.
- [44] GRUIJL, F. R. DE: *Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation*. Skin pharmacology and applied skin physiology, 15(5):316–320, 2002.
- [45] VRIES, E. DE, M. TRAKATELLI, D. KALABALIKIS, L. FERRANDIZ, A. RUIZ-DE CASAS, D. MORENO-RAMIREZ, D. SOTIRIADIS, D. IOANNIDES, S. AQUILINA, C. APAP, R. MICALLEF, L. SCERRI, M. ULRICH, S. PITKANEN, O. SAKSELA, E. ALTSITSIADIS, B. HINRICHS, C. MAGNONI, C. FIORENTINI, S. MAJEWSKI, A. RANKI, E. STOCKFLETH und C. PROBY: *Known and potential new risk factors for skin cancer in European populations: a multicentre case-control study*. The British journal of dermatology, 167 Suppl 2:1–13, 2012.
- [46] BONIFAS, J. M., J. W. BARE, R. L. KERSCHMANN, S. P. MASTER und E. H. JR EPSTEIN: *Parental origin of chromosome 9q22.3-q31 lost in basal cell carcinomas from basal cell nevus syndrome patients*. Human molecular genetics, 3(3):447–448, 1994.
- [47] HAHN, H., L. WOJNOWSKI, G. MILLER und A. ZIMMER: *The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models*. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany), 77(6):459–468, 1999.
- [48] DONOVAN, J.: *Review of the Hair Follicle Origin Hypothesis for Basal Cell Carcinoma*. Dermatologic Surgery, 35(9):1311–1323, 2009.
- [49] GORLIN, R. J.: *Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome*. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 6(6):530–539, 2004.
- [50] HAHN, H., C. WICKING, P. G. ZAPHIROPOULOUS, M. R. GAILANI, S. SHANLEY, A. CHIDAMBARAM, I. VORECHOVSKY, E. HOLMBERG, A. B. UNDEN, S. GILLIES, K. NEGUS, I. SMYTH, C. PRESSMAN, D. J. LEFFELL, B. GERRARD, A. M. GOLDSTEIN, M. DEAN, R. TOFTGARD, G. CHENEVIX-TRENCH, B. WAINWRIGHT und A. E. BALE: *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Cell, 85(6):841–851, 1996.
- [51] ASZTERBAUM, M., J. EPSTEIN, A. ORO, V. DOUGLAS, P. E. LEBOIT, M. P. SCOTT und E. H. JR EPSTEIN: *Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of*

- BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice.* Nature medicine, 5(11):1285–1291, 1999.
- [52] BRASH, D. E., A. ZIEGLER, A. S. JONASON, J. A. SIMON, S. KUNALA und D. J. LEFFELL: *Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion.* The journal of investigative dermatology, 1(2):136–142, 1996.
- [53] KROMPECHER, E.: *der Basalzellenkrebs.* Jena: Fischer, 1903.
- [54] LEVER W. F.: *Pathogenesis of benign tumors of cutaneous appendages and of basal cell epithelioma.* Archives of dermatology and syphilology, 57(4):679–724, 1948.
- [55] ASADA, M., F. M. SCHAART, M. DETMAR, D. MISCHKE, H. L. DE JR ALMEIDA, H. GOLLNICK und C. E. ORFANOS: *Growth characteristics and differentiation of basal cell carcinoma in vitro-immunohistochemical, gel electrophoretic, and ultrastructural analysis.* The Journal of investigative dermatology, 99(4):474–481, 1992.
- [56] ASADA, M., F. M. SCHAART, H. L. DE JR ALMEIDA, B. KORGE, I. KUOKAWA, Y. ASADA und C. E. ORFANOS: *Solid basal cell epithelioma (BCE) possibly originates from the outer root sheath of the hair follicle.* Acta dermato-venereologica, 73(4):286–292, 1993.
- [57] PETROU, C. A.: *Expression von Zytokeratinen und Basamembranproteinen beim Basaliom: Eine Immunhistochemische Studie.* Doktorarbeit, Freie Universität, Berlin, 1994.
- [58] KRUGER, K., U. BLUME-PEYTAVI und C. E. ORFANOS: *Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle.* Archives of dermatological research, 291(5):253–259, 1999.
- [59] YANG, S. H., T. ANDL, V. GRACHTCHOUK, A. WANG, J. LIU, L. J. SYU, FERRIS J., T. S. WANG, A. B. GLICK, S. E. MILLAR und A. A. DLUGOSZ: *Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling.* Nature Genetics, 40(9):1130–1135, 2008.
- [60] SELLHEYER, K. und D. KRAHL: *Basal cell (trichoblastic) carcinoma.* Journal of the American Academy of Dermatology, 58(1):158–167, 2008.
- [61] BETTI, R., E. INSELVINI, M. CARDUCCI und C. CROSTI: *Age and site prevalence of histologic subtypes of basal cell carcinomas.* International journal of dermatology, 34(3):174–176, 1995.
- [62] BASTIAENS, M. T., J. J. HOEFNAGEL, J. A. BRUIJN, R. G. WESTENDORP, B. J. VERMEER und J. N. BOUWES BAVINCK: *Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors.* The Journal of investigative dermatology, 110(6):880–884, 1998.
- [63] MCCORMACK, C. J., J. W. KELLY und A. P. DOREVITCH: *Differences in age and body site distribution of the histological subtypes of basal cell carcinoma. A possible indicator of differing causes.* Archives of dermatology, 133(5):593–596, 1997.
- [64] GRACHTCHOUK, V., M. GRACHTCHOUK, L. LOWE, T. JOHNSON, L. WEI, A. WANG, F. DE SAUVAGE und A. A. DLUGOSZ: *The magnitude of hedgehog signaling activity defines skin tumor phenotype.* The EMBO journal, 22(11):2741–2751, 2003.

- 
- [65] SCOTT, E. J. VAN und R. P. REINERTSON: *The modulating influence of stromal environment on epithelial cells studied in human autotransplants*. The Journal of investigative dermatology, 36:109–131, 1961.
- [66] MOLL, R., W. W. FRANKE, D. L. SCHILLER, B. GEIGER und R. KREPLER: *The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 31(1):11–24, 1982.
- [67] MOLL, I., H. W. HEID, W. W. FRANKE und R. MOLL: *Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. III. Hair and nail formation during human fetal development*. Differentiation; research in biological diversity, 39(3):167–184, 1988.
- [68] WASEEM, A., B. DOGAN, N. TIDMAN, Y. ALAM, P. PURKIS, S. JACKSON, A. LALLI, M. MACHESNEY und I. M. LEIGH: *Keratin 15 expression in stratified epithelia: down-regulation in activated keratinocytes*. Journal of Investigative Dermatology, 112(3):362–369, 1999.
- [69] LYLE, S., M. CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, Y. LIU, D.E ELDER, S. ALBELDA und G. COTSARELIS: *The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells*. Journal of Cell Science, 111:3179–3188, 1998.
- [70] PONTIGGIA, L., T. BIEDERMANN, M. MEULI, D. WIDMER, S. BÖTTCHER-HABERZETH, C. SCHIESTL, J. SCHNEIDER, E. BRAZIULIS, I. MONTAÑO und C. REICHMANN E. MEULI-SIMMEN: *Markers to Evaluate the Quality and Self-Renewing Potential of Engineered Human Skin Substitutes In Vitro and after Transplantation*. Journal of Investigative Dermatology, 129(2):480–490, 2008.
- [71] POBLET, E., F. JIMENEZ, J. M. GODINEZ, A. PASCUAL-MARTIN und A. IZETA: *The immunohistochemical expression of CD34 in human hair follicles: a comparative study with the bulge marker CK15*. Clinical and experimental dermatology, 31(6):807–812, 2006.
- [72] COTSARELIS, G.: *Epithelial Stem Cells: A Folliculocentric View*. Journal of Investigative Dermatology, 126(7):1459–1468, 2006.
- [73] OHYAMA, M., A. TERUNUMA, C. L. TOCK, M. F. RADONOVICH, C. A. PISEMASISON, S. B. HOPPING, J. N. BRADY, M. C. UDEY und VOGEL J. C.: *Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells*. Journal of Clinical Investigation, 116(1):249–260, 2005.
- [74] NILSSON, J., C. VALLBO, D. GUO, I. GOLOVLEVA, B. HALLBERG, R. HENRIKSSON und H. HEDMAN: *Cloning, Characterization, and Expression of Human LIG1*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 284(5):1155–1161, 2001.
- [75] NILSSON, J., A. STAREFELDT und R. HENRIKSSON: *LRIG1 protein in human cells and tissues*. Cell Tissue Res, 312:65–71, 2003.
- [76] GUR, G., C. RUBIN, M. KATZ, I. AMIT, A. CITRI, J. NILSSON, N. AMARIGLIO, R. HENRIKSSON, G. RECHAVI, H. HEDMAN, R. WIDES und YARDEN Y.: *LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation*. The EMBO Journal, 23:3270–3281, 2004.

- [77] PAGE, M. E., P. LOMBARD, F. NG, B. GÖTTGENS und K. B. JENSEN: *The Epidermis Comprises Autonomous Compartments Maintained by Distinct Stem Cell Populations*. Cell Stem Cell, 13(4):471–482, 2013.
- [78] SUZUKI, Y., H. MIURA, A. TANEMURA, K. KOBAYASHI, G. KONDOH, S. SANO, K. OZAWA, S. INUI, A. NAKATA, T. TAKAGI, M. TOHYAMA, K. YOSHIKAWA und S. ITAMI: *Targeted disruption of LIG-1 gene results in psoriasiform epidermal hyperplasia*. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters, 521:67–71, 2002.
- [79] JENSEN, K. B. und WATT F. M.: *Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence*. PNAS, 103(32):11958–11963, 2006.
- [80] HSU, S. Y., S. G. LIANG und A. J. HSUEH: *Characterization of Two LGR Genes Homologous to Gonadotropin and Thyrotropin Receptors with Extracellular Leucine-Rich Repeats and a G Protein-Coupled, Seven-Transmembrane Region*. Molecular endocrinology (Baltimore, Md, 12(12):1830–1845, 1998.
- [81] CARMON, K. S., X. GONG, Q. LIN, A. THOMAS und Q. LIU: *R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ -catenin signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(28):11452–11457, 2011.
- [82] BARKER, N., J. H. VAN ES, J. KUIPERS, P. KUJALA, M. VAN DEN BORN, M. COZIJNSEN, A. HAEGEBARTH, J. KORVING, H. BEGTHEL, P. J. PETERS und H. CLEVERS: *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. Nature, 449(7165):1003–1007, 2007.
- [83] VISSER, K. E. DE, M. CIAMPRICOTTI, E. M. MICHALAK, D. W. M. TAN, E. N. SPEKSNIJDER, C. S. HAU, H. CLEVERS, N. BARKER und J. JONKERS: *Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland*. The Journal of pathology, 228(3):300–309, 2012.
- [84] WETERING, M. VAN DE, E. SANCHO, C. VERWEIJ, W. DE LAU, I. O Ving, A. HURLSTONE, K. VAN DER HORN, E. BATLLE, D. COUDREUSE, A. P. HARAMIS, M. TJON-PON-FONG, P. MOERER, M. VAN DEN BORN, G. SOETE, S. PALS, M. EILERS, R. MEDEMA und H. CLEVERS: *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*. Cell, 111(2):241–250, 2002.
- [85] FLIER, L. G. VAN DER, J. SABATES-BELLVER, I. O Ving, A. HAEGEBARTH, M. DE PA-LO, M. ANTI, M. E. VAN GIJN, S. SUIJKERBUIJK, M. VAN DE WETERING, G. MARRA und H. CLEVERS: *The Intestinal Wnt/TCF Signature*. Gastroenterology, 132(2):628–632, 2007.
- [86] LOUGH, D., H. DAI, M. YANG, J. REICHENSBERGER, L. COX, C. HARRISON und M. W. NEUMEISTER: *Stimulation of the Follicular Bulge LGR5+ and LGR6+ Stem Cells with the Gut-Derived Human Alpha Defensin 5 Results in Decreased Bacterial Presence, Enhanced Wound Healing, and Hair Growth from Tissues Devoid of Adnexal Structures*. Plastic and Reconstructive Surgery, 132(5):1159–1171, 2013.
- [87] WEGNER, M.: *From head to toes: the multiple facets of Sox proteins*. Nucleic acids research, 27(6):1409–1420, 1999.

- 
- [88] KENT, J., S. C. WHEATLEY, J. E. ANDREWS, A. H. SINCLAIR und P. KOOPMAN: *A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination*. Development (Cambridge, England), 122(9):2813–2822, 1996.
- [89] FOSTER, J. W., M. A. DOMINGUEZ-STEGLICH, S. GUIOLI, C. KWOK, P. A. WELLER, M. STEVANOVIC, J. WEISSENBACH, S. MANSOUR, I. D. YOUNG und P. N. GOODFELLOW: *Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene*. Nature, 372(6506):525–530, 1994.
- [90] KAWAKAMI, Y., J. RODRIGUEZ-LEON und J. C. I. BELMONTE: *The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis*. Current opinion in cell biology, 18(6):723–729, 2006.
- [91] VIDAL, V. P. I., M. C. CHABOISSIER, S. LÜTZKENDORF, G. COTSARELIS, P. MILL, C. C. HUI, N. ORTONNE, J. P. ORTONNE und A. SCHEDL: *Sox9 Is Essential for Outer Root Sheath Differentiation and the Formation of the Hair Stem Cell Compartment*. Current Biology, 15(15):1340–1351, 2005.
- [92] OZAWA, M., H. BARIBAULT und R. KEMLER: *The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species*. The EMBO journal, 8(6):1711–1717, 1989.
- [93] VALENTA, T., G. HAUSMANN und K. BASLER: *The many faces and functions of beta-catenin*. The EMBO journal, 31(12):2714–2736, 2012.
- [94] PEIFER, M., P. D. MCCREA, K. J. GREEN, E. WIESCHAUS und B. M. GUMBINER: *The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties*. The Journal of cell biology, 118(3):681–691, 1992.
- [95] ABERLE, H., A. BAUER, J. STAPPERT, A. KISPERT und R. KEMLER: *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. The EMBO journal, 16(13):3797–3804, 1997.
- [96] NOORT, M. VAN, J. MEELDIJK, R. VAN DER ZEE, O. DESTREE und H. CLEVERS: *Wnt Signaling Controls the Phosphorylation Status of beta -Catenin*. Journal of Biological Chemistry, 277(20):17901–17905, 2002.
- [97] MOLENAAR, M., M. VAN DE WETERING, M. OOSTERWEGEL, J. PETERSON-MADURO, S. GODSAVE, V. KORINEK, J. ROOSE, O. DESTREE und H. CLEVERS: *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. Cell, 86(3):391–399, 1996.
- [98] BEHRENS, J., J. P. VON KRIES, M. KUHL, L. BRUHN, D. WEDLICH, R. GROSSCHEDL und W. BIRCHMEIER: *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature, 382(6592):638–642, 1996.
- [99] AMBLER, C. A. und A. MÄÄTTÄ: *Epidermal stem cells: location, potential and contribution to cancer*. The Journal of Pathology, 217(2):206–216, 2009.
- [100] LOWRY, W. E., C. BLANPAIN, J. A. NOWAK, G. GUASCH, L. LEWIS und E. FUCHS: *Defining the impact of -catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells*. Genes & Development, 19(13):1596–1611, 2005.

- 
- [101] EPH NOMENCLATURE COMMITTEE: *Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins*. *Eph Nomenclature Committee*. Cell, 90(3):403–404, 1997.
- [102] PASQUALE, E. B.: *The Eph family of receptors*. Current opinion in cell biology, 9(5):608–615, 1997.
- [103] DAVY, A., N. W. GALE, E. W. MURRAY, R. A. KLINGHOFFER, P. SORIANO, C. FEUERSTEIN und S. M. ROBBINS: *Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion*. Genes & development, 13(23):3125–3135, 1999.
- [104] CHUMLEY, M. J., T. CATCHPOLE, R. E. SILVANY, S. G. KERNIE und M. HENKEMEYER: *EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 27(49):13481–13490, 2007.
- [105] HOLMBERG, J., M. GENANDER, M. M. HALFORD, C. ANNEREN, M. SONDELL, M. J. CHUMLEY, R. E. SILVANY, M. HENKEMEYER und J. FRISEN: *EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche*. Cell, 125(6):1151–1163, 2006.
- [106] QIU, R., X. WANG, A. DAVY, C. WU, K. MURAI, H. ZHANG, J. G. FLANAGAN, P. SORIANO und Q. LU: *Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B*. The Journal of cell biology, 181(6):973–983, 2008.
- [107] ADAMS, R. H., G. A. WILKINSON, C. WEISS, F. DIELLA, N. W. GALE, U. DEUTSCH, W. RISAU und R. KLEIN: *Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis*. Genes & development, 13(3):295–306, 1999.
- [108] GERETY, S. S. und D. J. ANDERSON: *Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis*. Development (Cambridge, England), 129(6):1397–1410, 2002.
- [109] GENANDER, M., J. HOLMBERG und J. FRISÉN: *Ephrins negatively regulate cell proliferation in the epidermis and hair follicle*. Stem cells (Dayton, Ohio), 28(7):1196–1205, 2010.
- [110] LIN, S, B. WANG und S. GETSIOS: *Eph/ephrin signaling in epidermal differentiation and disease*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 23(1):92–101, 2012.
- [111] EGAWA, G., M. OSAWA, A. UEMURA, Y. MIYACHI und S. NISHIKAWA: *Transient Expression of Ephrin B2 in Perinatal Skin Is Required for Maintenance of Keratinocyte Homeostasis*. Journal of Investigative Dermatology, 129(10):2386–2395, 2009.
- [112] LENDAHL, U., L. B. ZIMMERMAN und R. D. MCKAY: *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell, 60(4):585–595, 1990.
- [113] FREDERIKSEN, K. und R. D. G. MCKAY: *Proliferation and Differentiation of Rat Neuroepithelial Precursor Cells in viva*. Departments of Biology and Brain Science,, 8(4):1144–1151, 1988.

- 
- [114] LOO, D. T., M. C. ALTHOEN und C. W. COTMAN: *Down regulation of nestin by TGF-beta or serum in SFME cells accompanies differentiation into astrocytes*. Neuroreport, 5(13):1585–1588, 1994.
- [115] TONDREAU, T., L. LAGNEAUX, M. DEJENEFFE, M. MASSY, C. MORTIER, A. DEL-FORGE und D. BRON: *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation*. Differentiation; research in biological diversity, 72(7):319–326, 2004.
- [116] ZIMMERMAN, L., B. PARR, U. LENDAHL, M. CUNNINGHAM, R. MCKAY, B. GAVIN, J. MANN, G. VASSILEVA und A. MCMAHON: *Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors*. Neuron, 12(1):11–24, 1994.
- [117] SABATINI, F., L. PETECCHIA, M. TAVIAN, V. JODON DE VILLEROCHÉ, G. A. ROSSI und D. BROUTY-BOYE: *Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 85(8):962–971, 2005.
- [118] BRYCHTOVA, S., M. FIURASKOVA, A. HLOBILKOVA, T. BRYCHTA und J. HIRNAK: *Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi*. Journal of cutaneous pathology, 34(5):370–375, 2007.
- [119] FLORENES, V. A., R. HOLM, O. MYKLEBOST, U. LENDAHL und O. FODSTAD: *Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas*. Cancer research, 54(2):354–356, 1994.
- [120] MORI, T., N. MISAGO, O. YAMAMOTO, S. TODA und Y. NARISAWA: *Expression of nestin in dermatofibrosarcoma protuberans in comparison to dermatofibroma*. The Journal of dermatology, 35(7):419–425, 2008.
- [121] DAHLSTRAND, J., V. P. COLLINS und U. LENDAHL: *Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors*. Cancer research, 52(19):5334–5341, 1992.
- [122] MOKRY, J., D. CIZKOVA, S. FILIP, J. EHRMANN, J. OSTERREICHER, Z. KOLAR und D. ENGLISH: *Nestin expression by newly formed human blood vessels*. Stem cells and development, 13(6):658–664, 2004.
- [123] PIRAS, F., M. T. PERRA, D. MURTAS, L. MINERBA, C. FLORIS, C. MAXIA, P. DEMURTAS, J. UGALDE, D. RIBATTI und P. SIRIGU: *The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma*. Oncology reports, 23(1):17–24, 2010.
- [124] SUGAWARA, K. I., H. KURIHARA, M. NEGISHI, N. SAITO, Y. NAKAZATO, T. SASAKI und T. TAKEUCHI: *Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 82(3):345–351, 2002.
- [125] LI, L., J. MIGNONE, M. YANG, M. MATIC, S. PENMAN, G. ENIKOLOPOV und R. M. HOFFMAN: *Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(17):9958–9961, 2003.

- 
- [126] AMOH, Y., L. LI, M. YANG, A. R. MOOSSA, K. KATSUOKA, S. PENMAN und R. M. HOFFMAN: *Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(36):13291–13295, 2004.
- [127] AMOH, Y., L. LI, R. CAMPILLO, K. KAWAHARA, K. KATSUOKA, S. PENMAN und R. M. HOFFMAN: *Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(49):17734–17738, 2005.
- [128] AMOH, Y., L. LI, K. KATSUOKA, S. PENMAN und R. M. HOFFMAN: *Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(15):5530–5534, 2005.
- [129] KRUSE, C., E. BODO, A. E. PETSCHNIK, S. DANNER, S. TIEDE und R. PAUS: *Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin?* Experimental dermatology, 15(10):794–800, 2006.
- [130] KLOEPPER, J. E., S. TIEDE, J. BRINCKMANN, D. P. REINHARDT, W. MEYER, R. FAESSLER und R. PAUS: *Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche*. Experimental dermatology, 17(7):592–609, 2008.
- [131] TIEDE, S., J. E. KLOEPPER, N. ERNST, B. POEGGELER, C. KRUSE und R. PAUS: *Nestin in Human Skin: Exclusive Expression in Intramesenchymal Skin Compartments and Regulation by Leptin*. Journal of Investigative Dermatology, 129(11):2711–2720, 2009.
- [132] ONG, D. E. und F. CHYTIL: *Retinoic acid-binding protein in rat tissue. Partial purification and comparison to rat tissue retinol-binding protein*. The Journal of biological chemistry, 250(15):6113–6117, 1975.
- [133] ROOS, T. C., F. K. JUGERT, H. F. MERK und D. R. BICKERS: *Retinoid metabolism in the skin*. Pharmacological reviews, 50(2):315–333, 1998.
- [134] SAARI, J. C., L. BREDBERG und G. G. GARWIN: *Identification of the endogenous retinoids associated with three cellular retinoid-binding proteins from bovine retina and retinal pigment epithelium*. The Journal of biological chemistry, 257(22):13329–13333, 1982.
- [135] FIORELLA, P. D. und J. L. NAPOLI: *Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in Escherichia coli. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism*. The Journal of biological chemistry, 266(25):16572–16579, 1991.
- [136] TAKASE, S., D. E. ONG und F. CHYTIL: *Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus*. Archives of biochemistry and biophysics, 247(2):328–334, 1986.

- 
- [137] DONOVAN, M., B. OLOFSSON, A. L. GUSTAFSON, L. DENCKER und U. ERIKSSON: *The cellular retinoic acid binding proteins*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 53(1-6):459–465, 1995.
- [138] GORRY, P., T. LUFKIN, A. DIERICH, C. ROCHETTE-EGLY, D. DECIMO, P. DOLLE, M. MARK, B. DURAND und P. CHAMBON: *The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(19):9032–9036, 1994.
- [139] LAMPRON, C., C. ROCHETTE-EGLY, P. GORRY, P. DOLLE, M. MARK, T. LUFKIN, M. LEMEUR und P. CHAMBON: *Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal*. Development (Cambridge, England), 121(2):539–548, 1995.
- [140] COLLINS, C. A. und F. M. WATT: *Dynamic regulation of retinoic acid-binding proteins in developing, adult and neoplastic skin reveals roles for  $\beta$ -catenin and Notch signalling*. Developmental Biology, 324(1):55–67, 2008.
- [141] KANITAKIS, J., D. BOURCHANY, M. FAURE und A. CLAUDY: *Expression of the hair stem cell-specific keratin 15 in pilar tumors of the skin*. European journal of dermatology : EJD, 9(5):363–365, 1999.
- [142] KURZEN, H., L. ESPOSITO, L. LANGBEIN und W. HARTSCHUH: *Cytokeratins as Markers of Follicular Differentiation An Immunohistochemical Study of Trichoblastoma and Basal Cell Carcinoma*. The American Journal of Dermatopathology, 23(6):501–509, 2001.
- [143] ALESSI, E., L. VENEGONI, D. FANONI und E. BERTI: *Cytokeratin Profile in Basal Cell Carcinoma*. American Journal of Dermatopathology, 30(3):249–255, 2008.
- [144] MAHALINGAM, M., A. SRIVASTAVA und M. P. HOANG: *Expression of Stem-Cell Markers (Cytokeratin 15 and Nestin) in Primary Adnexal Neoplasms—Clues to Etiopathogenesis*. American Journal of Dermatopathology, 32(8):774–779, 2010.
- [145] JIH, D. M., S. LYLE, R. ELENITSAS, D. E. ELDER und G. COTSARELIS: *Cytokeratin 15 expression in trichoepitheliomas and a subset of basal cell carcinomas suggests they originate from hair follicle stem cells*. Journal of Cutaneous Pathology, 26(3):113–118, 1999.
- [146] KANO, M., Y. AMOH, Y. SATO und K. KATSUOKA: *Expression of the hair stem cell-specific marker nestin in epidermal and follicular tumors*. European Journal of Dermatology, 18(518-523), 2008.
- [147] CHOI, C. W., H. S. PARK, Y. K. KIM, S. H. LEE und K. H. CHO: *Elastic fiber staining and cytokeratin 15 expression pattern in trichoepithelioma and basal cell carcinoma*. The Journal of dermatology, 35(8):499–502, 2008.
- [148] HOANG, M. P., K. A. DRESSER, P. KAPUR, W. A. HIGH und M. MAHALINGAM: *Microcystic adnexal carcinoma: an immunohistochemical reappraisal*. Modern Pathology, 21(2):178–185, 2008.

- [149] ABBAS, O. und J. BHAWAN: *Expression of stem cell markers nestin and cytokeratin 15 and 19 in cutaneous malignancies*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 25(3):311–316, 2011.
- [150] TEBCHERANI, A. J., H. F. DE ANDRADE und M. N. SOTTO: *Diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing trichoepithelioma and basal cell carcinoma: evaluation using tissue microarray samples*. Modern Pathology, 25(10):1345–1353, 2012.
- [151] KORVER, J. E. M., M. W. F. M. VAN DUIJNHOFEN, M. C. PASCH, P. E. J. VAN ERP und P. C. M. VAN DE KERKHOF: *Assessment of epidermal subpopulations and proliferation in healthy skin, symptomless and lesional skin of spreading psoriasis*. British Journal of Dermatology, 155(4):688–694, 2006.
- [152] KARLSSON, T., E.B MARK, R. HENRIKSSON und H. HEDMAN: *Redistribution of LRIG Proteins in Psoriasis*. Journal of Investigative Dermatology, 128:1192–1195, 2008.
- [153] TANEMURA, A., T. NAGASAWA, S. INUI und S. ITAMI: *LRIG-1 provides a novel prognostic predictor in squamous cell carcinoma of the skin: immunohistochemical analysis for 38 cases*. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al, 31(4):423–430, 2005.
- [154] JENSEN, K. B., J. JONES und F. M. WATT: *A stem cell gene expression profile of human squamous cell carcinomas*. Cancer Letters, 272(1):23–31, 2008.
- [155] HEDMANA, H. und R. HENRIKSSONA: *LRIG inhibitors of growth factor signalling – double-edged swords in human cancer?* EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, 43:6 7 6 –6 8 2, 2007.
- [156] HUH, Y. H., J. KING, J. COHEN und J. L. SHERLEY: *SACK-Expanded Hair Follicle Stem Cells Display Asymmetric Nuclear Lgr5 Expression With Non-Random Sister Chromatid Segregation*. Scientific Reports, 1(176):1–9, 2011.
- [157] SILVA-DIZ, V. DA, S. SOLÉ-SÁNCHEZ, A. VALDÉS-GUTIÉRREZ, M. URPI, D. RIBA-ARTÉS, R. M. PENIN, G. PASCUAL, E. GONZÁLEZ-SUÁREZ, O. CASANOVAS, F. VIÑALS, J. M. PARAMIO, E. BATLLE und P. MUÑOZ: *Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis*. Oncogene, 32(32):3732–3743, 2012.
- [158] TANESE, K., M. FUKUMA, T. YAMADA, T. MORI, T. YOSHIKAWA, W. WATANABE, A. ISHIKO, M. AMAGAI, T. NISHIKAWA und M. SAKAMOTO: *G-Protein-Coupled Receptor GPR49 is Up-regulated in Basal Cell Carcinoma and Promotes Cell Proliferation and Tumor Formation*. The American Journal of Pathology, 173(3):835–843, 2008.
- [159] KRAHL, D. und K. SELLHEYER: *Sox9, more than a marker of the outer root sheath: spatiotemporal expression pattern during human cutaneous embryogenesis*. Journal of Cutaneous Pathology, 37(3):350–356, 2010.
- [160] SHI, G., K. C. SOHN, Z. LI, D. K. CHOI, Y. M. PARK, J.H KIM, Y. M. FAN, Y. H. NAM, S. KIM, M. IM, Y. LEE, Y. J. SEO, C. D. KIM, J. H. LEE und A. T. SŁOMINSKI: *Expression and Functional Role of Sox9 in Human Epidermal Keratinocytes*. PLoS ONE, 8(1):e54355, 2013.

- 
- [161] VIDAL, V. P. I., N. ORTONNE und A. SCHEDL: *SOX9 expression is a general marker of basal cell carcinoma and adnexal-related neoplasms*. Journal of cutaneous pathology, 35(4):373–379, 2008.
- [162] BAKOS, R. M., T. MAIER, R. BESCH, D. S. MESTEL, T. RUZICKA, R. A. STURM und C. BERKING: *Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma*. Experimental Dermatology, 19(8):e89–e94, 2010.
- [163] MORENO-BUENO, G., C. GAMALLO, L. PEREZ-GALLEGO, F. CONTRERAS und J. PALACIOS: *beta-catenin expression in pilomatrixomas. Relationship with beta-catenin gene mutations and comparison with beta-catenin expression in normal hair follicles*. The British journal of dermatology, 145(4):576–581, 2001.
- [164] CHOI, Y. S., Y. ZHANG, M. XU, Y. YANG, M. ITO, T. PENG, Z. CUI, A. NAGY, A. K. HADJANTONAKIS, R. A. LANG, G. COTSARELIS, T. ANDL, E. E. MORRISEY und S. E. MILLAR: *Distinct Functions for Wnt/ $\beta$ -Catenin in Hair Follicle Stem Cell Proliferation and Survival and Interfollicular Epidermal Homeostasis*. Cell Stem Cell, 13(6):720–733, 2013.
- [165] ZHU, A. J. und F. M. WATT: *beta-catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion*. Development (Cambridge, England), 126(10):2285–2298, 1999.
- [166] WATT, F. M. und C. A. COLLINS: *Role of beta-catenin in epidermal stem cell expansion, lineage selection, and cancer*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 73:503–512, 2008.
- [167] OYAMA, T., Y. KANAI, A. OCHIAi, S. AKIMOTO, T. ODA, K. YANAGIHARA, A. NAGAFUCHI, S. TSUKITA, S. SHIBAMOTO und F. ITO: *A truncated beta-catenin disrupts the interaction between E-cadherin and alpha-catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines*. Cancer research, 54(23):6282–6287, 1994.
- [168] KAWANISHI, J., J. KATO, K. SASAKI, S. FUJII, N. WATANABE und Y. NIITSU: *Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the beta-catenin gene in a human cancer cell line, HSC-39*. Molecular and cellular biology, 15(3):1175–1181, 1995.
- [169] BRASANAC, D., I. BORICIC, V. TODOROVIC, N. TOMANOVIC und S. RADOJEVIC: *Cyclin A and beta-catenin expression in actinic keratosis, Bowen’s disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin*. British Journal of Dermatology, 153(6):1166–1175, 2005.
- [170] PAPADAVID, E., M. PIGNATELLI, S. ZAKYNTHINOS, T. KRAUSZ und A. C. CHU: *Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin/catenin (alpha-, beta-, and gamma-) complex in premalignant and malignant non-melanocytic skin tumours*. The Journal of Pathology, 196(2):154–162, 2002.
- [171] YAMAZAKI, F., Y. ARAGANE, A. KAWADA und T. TEZUKA: *Immunohistochemical detection for nuclear beta-catenin in sporadic basal cell carcinoma*. The British journal of dermatology, 145(5):771–777, 2001.

- [172] DOGLIONI, C., S. PICCININ, S. DEMONTIS, M. G. CANGI, L. PECCIARINI, C. CHIARELLI, M. ARMELLIN, T. VUKOSAVLJEVIC, M. BOIOCCHI und R. MAESTRO: *Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation*. The American journal of pathology, 163(6):2277–2287, 2003.
- [173] EL-BAHRAWY, M., N. EL-MASRY, M. ALISON, R. POULSOM und M. FALLOWFIELD: *Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma*. The British journal of dermatology, 148(5):964–970, 2003.
- [174] SALDANHA, G., V. GHURA, L. POTTER und A. FLETCHER: *Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation*. British Journal of Dermatology, 151(1):157–164, 2004.
- [175] CIUREA, M. E., DANIELA CERNEA, C. C. GEORGESCU, O. S. COTOI, V. PATRASCU, H. PARVANESCU, D. POPA, V. PARVANESCU, RALUCA NICULINA CIUREA und R. MERCUT: *Expression of CXCR4, MMP-13 and beta-catenin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma*. Romanian journal of morphology and embryology, 54(4):939–951, 2013.
- [176] BOONCHAI, W., M. WALSH, M. CUMMINGS und G. CHENEVIX-TRENCH: *Expression of beta-catenin, a key mediator of the WNT signaling pathway, in basal cell carcinoma*. Archives of dermatology, 136(7):937–938, 2000.
- [177] OH, S.T, H. S. KIM, N. J. YOO, W. S. LEE, B. K. CHO und J. REICHRATH: *Increased immunoreactivity of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and  $\beta$ -catenin in high-risk basal cell carcinoma*. British Journal of Dermatology, 165(6):1197–1204, 2011.
- [178] HAFNER, C., B. BECKER, M. LANDTHALER und T. VOGT: *Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in non-melanoma skin cancer*. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 19(10):1369–1377, 2006.
- [179] GENANDER, M. und J. FRISÉN: *Ephrins and Eph receptors in stem cells and cancer*. Current Opinion in Cell Biology, 22(5):611–616, 2010.
- [180] BATLLE, E., J. BACANI, H. BEGTHEL, S. JONKHEER, A. GREGORIEFF, M. VAN DE BORN, N. MALATS, E. SANCHE, E. BOON, T. PAWSON, S. GALLINGER, S. PALS und H. CLEVERS: *EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression*. Nature, 435(7045):1126–1130, 2005.
- [181] GUO, D. LI, J. ZHANG, S. T. YUEN, W. Y. TSUI, A. S. Y. CHAN, C. HO, J. JI, S. Y. LEUNG und X. CHEN: *Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours*. Carcinogenesis, 27(3):454–464, 2006.
- [182] WANG, Y., Y. ZHANG, Y. ZENG, Y. ZHENG, G. FU, Z. CUI und T. YANG: *Patterns of nestin expression in human skin*. Cell biology international, 30(2):144–148, 2006.
- [183] TOMA, J. G., M. AKHAVAN, K. J. FERNANDES, F. BARNABE-HEIDER, A. SADIKOT, D. R. KAPLAN und F. D. MILLER: *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. Nature Cell Biology, 3(9):778–784, 2001.

- 
- [184] TOMA, J. G., I. A. MCKENZIE, D. BAGLI und F. D. MILLER: *Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin*. Stem cells (Dayton, Ohio), 23(6):727–737, 2005.
- [185] JAHODA, C. A. B., J. WHITEHOUSE, A. J. REYNOLDS und N. HOLE: *Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages*. Experimental dermatology, 12(6):849–859, 2003.
- [186] KRAHL, D. und K. SELLHEYER: *The neuroepithelial stem cell protein nestin is a marker of the companion cell layer of the adult and developing human hair follicle*. British Journal of Dermatology, 161(3):678–682, 2009.
- [187] ITO, M.: *The innermost cell layer of the outer root sheath in anagen hair follicle: light and electron microscopic study*. Archives of dermatological research, 279(2):112–119, 1986.
- [188] ITO, M.: *Biologic roles of the innermost cell layer of the outer root sheath in human anagen hair follicle: further electron microscopic study*. Archives of dermatological research, 281(4):254–259, 1989.
- [189] ROTHNAGEL, J. A. und D. R. ROOP: *Hair follicle companion layer: reacquainting an old friend*. The Journal of investigative dermatology, 104(5 Suppl):42S–43S, 1995.
- [190] SELLHEYER, K. und D. KRAHL: *Does the peritumoral stroma of basal cell carcinoma recapitulate the follicular connective tissue sheath?* Journal of Cutaneous Pathology, 38(7):551–559, 2011.
- [191] KAUR, P., M. MULVANEY und J. A. CARLSON: *Basal cell carcinoma progression correlates with host immune response and stromal alterations: a histologic analysis*. The American Journal of dermatopathology, 28(4):293–307, 2006.
- [192] LESACK, K. und C. NAUGLER: *Morphometric characteristics of basal cell carcinoma peritumoral stroma varies among basal cell carcinoma subtypes*. BMC Dermatology, 12(1):1, 2012.
- [193] ABBAS, O., J. E. RICHARDS und M. MAHALINGAM: *Fibroblast-activation protein: a single marker that confidently differentiates morpheaform/infiltrative basal cell carcinoma from desmoplastic trichoepithelioma*. Modern Pathology, 23(11):1535–1543, 2010.
- [194] BARCELLOS-HOFF, M. H. und S. A. RAVANI: *Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells*. Cancer research, 60(5):1254–1260, 2000.
- [195] LACINA, L., K. [JR] SMETANA, B. DVORANKOVA, R. PYTLIK, L. KIDERYOVA, L. KUCEROVA, Z. PLZAKOVA, J. STORK, H-J GABIUS und S. ANDRE: *Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes*. The British journal of dermatology, 156(5):819–829, 2007.
- [196] BUSCH, C., G. SIEGENTHALER, A. VAHLQUIST, H. NORDLINDER, J. SUNDELIN, P. SAKSANA und U. ERIKSSON: *Expression of cellular retinoid-binding proteins during normal and abnormal epidermal differentiation*. The Journal of investigative dermatology, 99(6):795–802, 1992.

- [197] SIEGENTHALER, G., I. TOMATIS, D. CHATELLARD-GRUAZ, S. JACONI, U. ERIKSSON und S. SAWAMPHAK: *Expression of CRABP-I and -II in human epidermal cells. Alteration of relative protein amounts is linked to the state of differentiation.* The Biochemical journal, 287 ( Pt 2):383–389, 1992.
- [198] SIEGENTHALER, G., I. TOMATIS, L. DIDIERJEAN, S. JACONI und J. H. SAURAT: *Overexpression of cellular retinoic acid-binding protein type II (CRABP-II) and down-regulation of CRABP-I in psoriatic skin.* Dermatology (Basel, Switzerland), 185(4):251–256, 1992.
- [199] TANAKA, K., I. IMOTO, J. INOUE, K. KOZAKI, H. TSUDA, Y. SHIMADA, S. AIKO, Y. YOSHIZUMI, T. IWAI, T. KAWANO und J. INAZAWA: *Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma.* Oncogene, 26(44):6456–6468, 2007.
- [200] MIYAKE, T., Y. UEDA, S. MATSUZAKI, T. MIYATAKE, K. YOSHINO, M. FUJITA, T. NOMURA, T. ENOMOTO und T. KIMURA: *CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma.* Journal of cancer research and clinical oncology, 137(4):715–722, 2011.

## Danksagung

Herr Prof. Dr. med. H. Gollnick möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich danken. Ich verdanke ihm darüber hinaus jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt auch Priv.-Doz. Dr. med. Dr. (PhD) S. Quist. Jederzeit gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit sachkundige und wertvolle Unterstützung. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen.

Für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei sämtlichen immunhistochemischen Arbeiten danke ich Frau Döring ganz herzlich. Mit großem Engagement hat sie mich jederzeit unterstützt und die experimentelle Arbeit entscheidend mitgestaltet.

Frau Ziems und Frau Herz gilt ein besonderer Dank für ihre wertvollen Hinweise und Anregungen während der Etablierung der verwendeten Antikörper. Zudem möchte ich mich für die zahlreichen praktischen Ratschläge bei der experimentellen Arbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gebührt Dr. med. I. Franke, der mit seinem großen histopathologischen und immunhistochemischen Wissen immer für konstruktive Gespräche zur Verfügung stand.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Kommilitonen und Freund Maximilian Eckardt mit dem ich unzählige Stunden über histologischen Lehrbüchern, englischsprachiger Fachliteratur und dem Mikroskop verbracht habe. Vielen Dank für die vielen gewinnbringenden Diskussionen und Feedbacks. Danke für die gegenseitige Unterstützung während der experimentellen Arbeit.

Bei meiner liebevollen Partnerin Franziska Richter möchte ich mich für ihr Verständnis und die viele Geduld, sowie die immer wieder aufbauenden Worte, die sie für mich übrig hatte bedanken. Sie hat mir stets den Rücken freigehalten und mich auch in angespannter und gestresster Laune ertragen.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten, möchte ich für die konsequente Unterstützung, mit der sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben, danken.

## Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

EXPRESSION VON STAMMZELLMARKERN IN DER HAUT UND IM BASALZELLKARZINOM DES  
MENSCHEN

in der **Klinik für Dermatologie und Venerologie**

mit Unterstützung durch meine Doktorväter **PD Dr. med. Dr. (PhD) Sven R. Quist**  
**und Prof. Dr. med. Harald Gollnick**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 21. Januar 2016

André Kriesche

## **Bildungsweg**

### **Schulbildung**

07/1995 - 06/1999

**Grundschule IV und V Hettstedt**

07/1999 - 06/2007

**Sekundarschule II und Gymnasium am Markt Hettstedt**

Abschluss: Abitur

### **Hochschulbildung**

10/2007 - 11/2013

**Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

Studium der Humanmedizin

Abschluss: Staatsexamen

11/2013 - 09/2014

**Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

Immatrikulation als Promotionsstudent

### **Berufstätigkeit**

seit 06/2014

**Klinik für Dermatologie und Allergologie Harzkrinikum**

**Dorothea Christiane Erxleben Quedlinburg**

Assistenzarzt in Weiterbildung

Magdeburg, den 21. Januar 2016

André Kriesche

# A. Anhang

## A.1. Tabellen

### A.1.1. Verwendete Geräte

Geräte	Modell/Typ	Firma, Ort, Land
Biopsiekassetten grün	Ultra-Biopsie-Kassetten mit Abbruchdeckel	Labonord, Templemars, Frankreich
Gewebeinfiltrationsautomat	Leica ASP 300S	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Paraffineinbettungsautomat	Shandon HistoCentre 2	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Laborabzug	Köttermann Laborabzug 2-410	Köttermann Systemlabor, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Schlittenmikrotom	Leica SM 2000 R	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotomklingen	FEATHER MICROTOME BLADE (Stainless Steel) A35	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Warmwasserbader	MEDAX Typ 25900	MEDAX Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Objektträger	Thermo SCIENTIFIC MENZEL-GLÄSER SUPERFROST PLUS	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pufferinkubationsbehälter	Chem Mate Inkubationscontainer S203030 mit Slide Holder Dako S202930	Dako, Hamburg, Deutschland
Färbeautomat	Kontinuierliches automatisches Objekt-träger-Färbegerät - Shandon Varistain 24-4	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Objektträgereindeckautomat	Shandon Consul Coverslipper Serienr. CN 2353-10W	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Wärmeinkubator	Inkubator BINDER Typ 15115300002020	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
Kühltruhe	Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Dampfgarer	MultiGourmet plus	BRAUN, Neu-Isenburg, Deutschland
Objektträgermarkierstift	Dako Cytomations Pen	Dako, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes 3810X	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen	epT.I.P.S.Set, Eppendorf Quality, 0.1-10 $\mu$ L epT.I.P.S.Set, Eppendorf Quality, 2-200 $\mu$ L epT.I.P.S.Set, Eppendorf Quality, 50-1000 $\mu$ L	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Reference, variabel, 0.5- 10 $\mu$ L Eppendorf Reference, variabel, 10- 100 $\mu$ L Eppendorf Reference, variabel, 100- 1000 $\mu$ L	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schutzhand- schuhe	MICRO-TOUCH, Ultra, Latex Powder-free, Size M	Ansell, München, Deutsch- land
Mikroskop	Hund Will Wilozyt V 365	Will KG (heute Helmut Hund GmbH), Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	Leica Leitz DMRB	Leica Microsystems, Wetz- lar, Deutschland
Mikroskopkamera	PL-B871	PixelINK, Ottawa, Kana- da

Tabelle A.1.: Verwendete Geräte

**A.1.2. Verwendete Reaktionsstoffe**

<b>Reagenz</b>	<b>Bestellname</b>	<b>Firma, Ort, Land</b>
Paraffin	Paraplast (Surgipath)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
EDTA Puffer	HIER T-EDTA Buffer ph 9,0	ZYTOMED Systems, Berlin, Deutschland
Citrat Puffer	HIER Citrate Buffer ph 6,0	ZYTOMED Systems, Berlin, Deutschland
Waschpuffer	ZYTOMED Systems Wash Buffer	ZYTOMED Systems, Berlin, Deutschland
Standard-Antikörperverdünnungslösung	Dako REAL Antibody Diluent	Dako, Hamburg, Deutschland
Roter Färbekit	Permanent AP Red Kit: Permanent AP Red Buffer und Permanent AP Red Chromogen	ZYTOMED Systems, Berlin, Deutschland
Biotinylierter Sekundärantikörper	ZytoChem-Plus AP Kit, Broad Spectrum Biotinylated Secondary Antibody polyvalent	ZYTOMED Systems, Berlin, Deutschland
Streptavidin-Enzym-Konjugat	Streptavidin-AP-Conjugate	ZYTOMED Systems, Berlin, Deutschland
96% Serumalbumin des Menschen	Albumin from human serum, $\geq 96\%$	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Fischgelatine	Gelatin from cold water fish skin	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Kalbsserum	FBS (Fetal Bovine Serum)	GIBCO life technologies, Darmstadt, Deutschland
Phosphat-Kochsalzpuffer	PBS (Phosphate Buffered Saline) -Dulbecco	BIOCHROM, Berlin, Deutschland
Herovici Färbelösung A	HEROVICI'S STAIN SOLUTION A	American MasterTech Scientific Incorporated, Lodi, USA
Herovici Färbelösung B	HEROVICI'S STAIN SOLUTION B	American MasterTech Scientific Incorporated, Lodi, USA
Weigert-Hämatoxylin A	WEIGERT'S HEMATOXYLIN A	American MasterTech Scientific Incorporated, Lodi, USA

Weigert-Häma- toxylin B	WEIGERT'S HEMATOXYLIN B	American MasterTech Scientific Incorporated, Lodi, USA
1% Essigsäure	1% ACETIC ACID	American MasterTech Scientific Incorporated, Lodi, USA
Alkohol 100%, Al- kohol 96%, Alko- hol 80%, Alkohol 75%		
Xylolersatz		
Hämatoxylin		
Eosin		

Tabelle A.2.: Verwendete Reaktionsstoffe