

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerd)

Expression von β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein im nodulären
und infiltrativen Basalzellkarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Birga Klingler

aus
Tuttlingen
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referentin: Frau Prof. Dr. med. Maria Gaiser

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Basalzellkarzinom	1
1.2 Die Adhäsionsmoleküle β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein	2
1.2.1 β -Catenin.....	3
1.2.2 E-Cadherin	3
1.2.3 Desmoglein.....	4
1.3 β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein im Tumorkontext	6
1.4 Fragestellung.....	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Hautproben	9
2.2 Immunhistochemie	9
2.2.1 Antikörper	9
2.2.2 Versuchsdurchführung	10
2.3 Mikroskopische Auswertung	11
2.4 Statistische Auswertung.....	12
3. Ergebnisse	13
3.1 Expression von β -Catenin.....	13
3.2 Expression von E-Cadherin	16
3.3 Expression von Desmoglein.....	18
4. Diskussion	19
4.1 Methodische Aspekte.....	19
4.1.1 Auswahl der Adhäsionsmoleküle.....	19
4.1.2 Immunhistochemie	21
4.2 Ergebnisse	22
4.2.1 Expression von β -Catenin	22
4.2.2 Expression von E-Cadherin.....	23
4.3 Ausblick: β -Catenin und E-Cadherin im therapeutischen Kontext.....	27
5. Zusammenfassung.....	28
6. Literaturverzeichnis	29
7. Lebenslauf.....	37
8. Danksagung	38

1. Einleitung

1.1 Das Basalzellkarzinom

Das Basalzellkarzinom (im Folgenden BCC, basal cell carcinoma) ist der häufigste Hautkrebs des Menschen. Mit jährlich steigender Inzidenz stellt es einen wachsenden Kostenfaktor für das weltweite Gesundheitssystem dar.¹ Zusammen mit dem Plattenepithelkarzinom der Haut (SCC, squamous cell carcinoma) und einigen selteneren nicht-epithelialen Tumoren bildet das BCC die Gruppe der nicht-melanozytären Hautkrebserkrankungen.² Der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung eines BCC ist die DNA-Schädigung durch UV-Strahlung, im Besonderen durch UVB-Strahlung. Des Weiteren spielen eine gestörte T-Zellfunktion, beispielsweise im Rahmen einer iatrogenen Immunsuppression, sowie die Exposition gegenüber ionisierenden Strahlungen und bestimmten Karzinogenen, wie z.B. Arsen, eine wichtige pathogenetische Rolle.³ Auch genetische Faktoren beeinflussen die Entstehung des BCC. Auslösend für das erbliche Basalzellnävussyndrom, auch als Gorlin-Goltz-Syndrom bekannt, in dessen Rahmen es bereits in jungen Jahren zur Entstehung von zahlreichen BCC kommt, ist eine Keimbahnmutation im PTCH1-Gen. In 70% der sporadisch auftretenden BCC liegt eine somatische und somit erworbene Mutation in eben diesem Gen vor. In weiteren 10% kommt es zu einer Mutation im SMOH-Gen.⁴ Der zelluläre Ursprung des BCC ist bis heute Gegenstand der Forschung. Während lange Zeit die Basalzellschicht der Epidermis als Ursprungsort angesehen wurde, wird aktuell eher davon ausgegangen, dass sich das BCC aus pluripotenten Stammzellen der interfollikulären Epidermis oder der äußeren Haarwurzelscheide des Haarfollikels entwickelt. Weiterhin wird dem peritumoralen Stroma eine große Bedeutung für das Tumorwachstum zugeschrieben.⁵ Prädilektionsstelle des BCC ist in über 80% der Fälle Kopf und Hals, gefolgt von Rumpf und Extremitäten.⁶ Unter dem Dermatoskop präsentiert sich das BCC zumeist als rosafarbener, glasig-glänzender Knoten mit baumartig verzweigten Teleangiektasien. Typische Merkmale sind ein perlschnurartiger Randsaum sowie eine zentrale Eindellung. Fortgeschrittene Tumoren können flächenhaft ulzerieren und verkrusten oder in tiefere Schichten einwachsen und werden dann als *Ulcus rodens* bzw. *Ulcus terebrans* bezeichnet.⁶⁻⁸ In einigen Fällen kann sich das BCC klinisch sehr diskret präsentieren, zum Beispiel in Form einer hellen, unscharf begrenzten, atrophischen Plaque. Eine Diagnosestellung kann bei dieser makroskopischen Variante häufig eine Herausforderung darstellen. Fehldeutung des Untersuchungsbefundes sowie ein verzögerter Therapiebeginn können in diesen Fällen besonders problematisch sein, da diese klinisch untypische Ausprägung zumeist bei Subtypen mit Tendenz zu invasiverem Wachstum zu beobachten ist.^{3, 9} Nur wenige Studien berichten von einer Metastasierung im Rahmen des BCC, häufiger zu beobachtende Merkmale hingegen sind lokal destruierendes Wachstum und Invasivität.¹⁰ Eine perineurale Invasion lässt sich laut Studien in bis zu 3,8 % aller BCC-Fälle nachweisen, mit höherer Inzidenz in aggressiv wachsenden Subtypen.^{11, 12} Anhand von histopathologischen Merkmalen können eine Vielzahl von Subtypen unterschieden werden, hierzu zählen vor allem

das noduläre (50-79%), das superfizielle (15%) und das infiltrative (5-10%) BCC.¹³ Als weitere histologische Varianten sind unter anderem das infundibulozystische, das mikronoduläre und das basosquamöse BCC zu nennen.¹⁴ In dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf dem nodulären und dem infiltrativen BCC. Histologisch kennzeichnend für das noduläre BCC (im Folgenden NBCC) sind umschriebene Tumormassen unterschiedlicher Form und Größe. Typisch sind palisadenartig angeordneten Zellkerne im Randbereich des Tumors sowie eine artifizielle Spaltbildung zwischen Tumorepithel und Stroma.^{14, 15} Das NBCC weist meist eine gut nachvollziehbare Verbindung zur Epidermis und ein klar begrenztes Wachstum auf. Folglich lässt sich das NBCC oft besser behandeln und neigt seltener zu rezidivierenden Verläufen als andere, aggressivere Subtypen.¹⁴ Zu diesen zählt das infiltrative BCC (im Folgenden IBCC), welches unregelmäßig begrenzte, zerklüftete Zellnester mit zapfenartigen Tumorsträngen bildet, welche die untersten Schichten der Epidermis durchdringen und sich über die Dermis hinaus in angrenzende Strukturen fortsetzen können. Die Palisadenstellung der Zellkerne sowie die Spaltbildung zwischen Tumor und Stroma ist zum Teil schwächer ausgeprägt oder kann gänzlich fehlen. Das umgebene Stroma weist dabei häufig fibröse Merkmale auf.¹⁶ Als Therapie der ersten Wahl für das BCC gilt die komplette, chirurgische Exzision des Tumors. Der Sicherheitsabstand wird Leitlinien-gemäß je nach Höhe des Rezidivrisikos gewählt und mit mikrographisch-kontrollierter Randschnittkontrolle so klein wie möglich gehalten.¹² Beim oberflächlich wachsenden BCC sowie im Falle von Inoperabilität kann eine topische Therapie mit Imiquimod oder 5-Fluorouracil in Erwägung gezogen werden. Weiterhin stehen derzeit im Falle von Inoperabilität sowie lokal fortgeschrittenen oder metastasierten BCC die systemische Therapie mit Hedgehog-Inhibitoren wie Vismodegib und Sonidegib zur Verfügung. Der Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren, insbesondere PD1-Antikörper wie Pembrolizumab und Nivolumab, befindet sich aktuell noch in der Zulassungsprüfung und erscheint vielversprechend.^{12, 17}

1.2 Die Adhäsionsmoleküle β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein

Verknüpfungen zwischen Zellen innerhalb der Epidermis halten einerseits die Barriere- und Stützfunktion und somit den Schutz der Haut gegen Umwelteinflüsse aufrecht, andererseits bilden sie die Grundlage für interzelluläre Kommunikation, zelluläre Signalwege, Zellproliferation und -migration.¹⁸ Haftkontakte zwischen benachbarten Zellen der Epidermis basieren auf spezialisierten Strukturen wie der Zonula adherens (gürtelförmige Adherens Junctions) und Desmosomen, sowie Punkt- und Hemidesmosomen.¹⁹ Keratinozyten der basalen epidermalen Schichten weisen entlang der apikalen und lateralen Membran Adherens Junctions (AJ) und Desmosomen auf, in suprabasalen Zellen sind sie entlang der kompletten Zelloberfläche zu finden. In Tierversuchen führte der Verlust von Molekülen, welche an der Bildung dieser interzellulären Bindestrukturen beteiligt sind, unter anderem zu Störungen der normalen Entwicklung von Haut, Schleimhaut und Haarfollikeln.²⁰ Zu diesen dort untersuchten Molekülen, auch Adhäsionsmoleküle genannt, zählen zum Beispiel β -Catenin und E-Cadherin, welche an der Bildung der Zonula adherens

beteiligt sind, sowie Desmoglein, ein Bestandteil von Desmosomen. Auf diese drei Moleküle und deren Bedeutung für zelluläre Funktionen wird im Folgenden detaillierter eingegangen.

1.2.1 β -Catenin

β -Catenin ist ein zytoplasmatisch und nukleär vorkommendes Protein, welches sowohl an der Vermittlung von Zelladhäsion beteiligt ist, als auch über den Wnt-Signalweg als Transkriptionsfaktor fungiert.²¹ β -Catenin leistet seinen Beitrag zur Bildung von interzellulären Kontakten über die Bindung an E-Cadherin. Über diese Bindung wird E-Cadherin indirekt an α -Catenin gebunden, welches wiederum mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts interagiert.²² (Abb. 1) Somit wirkt β -Catenin als Adapterprotein zwischen E-Cadherin und dem Zytoskelett der Zelle. Im Zytosol liegt β -Catenin als Teil der AJ nahe der Zellmembran verankert vor. Durch den Verlust von Cadherin-vermittelten Zellkontakten oder durch Aktivierung einer Proteinkinase kann β -Catenin aus dem Cadherin/Catenin-Komplex gelöst werden und folglich in den kanonischen Wnt-Signalweg eingespeist werden.²³ In Abwesenheit eines Wnt-Liganden wird neu synthetisiertes β -Catenin durch den sogenannten „destruction complex“ gebunden. Dies ist ein Komplex aus Proteinen wie das APC-Protein (Adenomatous-polyposis-coli) und Axin, welche freies β -Catenin einfangen, und zwei Kinasen (CK1, casein kinase-1 und GSK-3, glycogen synthase kinase-3), welche das gebundene β -Catenin phosphorylieren und so den Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau einleiten.²⁴ Wird der Wnt-Signalweg jedoch aktiviert, führt dies zur Hemmung des β -Cateninabbaus durch den „destruction complex“. Freies β -Catenin wird in den Zellkern transportiert, reichert sich dort an und induziert über die Bindung an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie die Expression von bestimmten Zielgenen.²⁵ Einige Studien weisen darauf hin, dass die Erhöhung des frei im Zytosol vorliegenden β -Catenin-Speichers den β -Catenin/Cadherin-Komplex auf unterschiedliche Weise beeinflussen kann. Es wurde beobachtet, dass eine Akkumulation von β -Catenin im Zytosol sowohl zu einer Verstärkung als auch zu einer Destabilisierung von AJs führen kann.²⁶

1.2.2 E-Cadherin

E-Cadherin (epithelial cadherin, CDH1 = classical cadherin 1) gehört zu den Typ 1 Cadherinen, auch klassische Cadherine genannt, und ist eines der am besten erforschten Moleküle der Cadherinfamilie. Zu den klassischen Typ 1 Cadherinen gehören neben dem Prototyp E-Cadherin weiterhin N-Cadherin (neuronal cadherin, CDH2), P-Cadherin (placental cadherin, CDH3) und R-Cadherin (retinal cadherin, CDH4).²⁷ Takeichi²⁸ stellte bereits 1988 die Hypothese auf, dass Cadherine calciumabhängig Homodimere bilden und so einander angrenzende Zellen verknüpfen, wodurch sie eine wichtige Rolle bei der Morphogenese tierischer Zellen spielen.²⁸ E-Cadherin verfügt über eine transmembranäre, eine extrazelluläre und eine zytoplasmatische Domäne. An der extrazellulären Seite bilden die E-Cadherine zweier

benachbarter Zellen durch homophile Interaktion stabile Dimere. Diese Dimerisierung stellt einen Trigger für die Bindung von β -Catenin und folglich von α -Catenin an der zytoplasmatischen Seite dar und führt so, wie bereits beschrieben, zu einer Verknüpfung mit dem Zytoskelett.²⁶ E-Cadherin gilt als Schlüsselmolekül in der Umwandlung von Epithelzellen in mesenchymale Zellen. Dieser Vorgang wird als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet und stellt einen wichtigen Bestandteil der Embryogenese dar. Im Rahmen der EMT kommt es zum Verlust von Mediatoren epithelialer Zellkontakte wie E-Cadherin und EpCAM sowie zu der vermehrten Expression von mesenchymalen Markern (N-Cadherin, Vimentin). Dies führt zur Auflösung von stabilen interzellulären Verbindungen und induziert ein Remodelling des Zytoskeletts. Zellen, die den Prozess der EMT durchlaufen, verlieren ihre apikal-basale Zellpolarität und es entstehen spindelförmige, locker in der extrazellulären Matrix eingebettete Zellen oder Zellverbände mit mesenchymalem Phänotyp.^{29, 30}

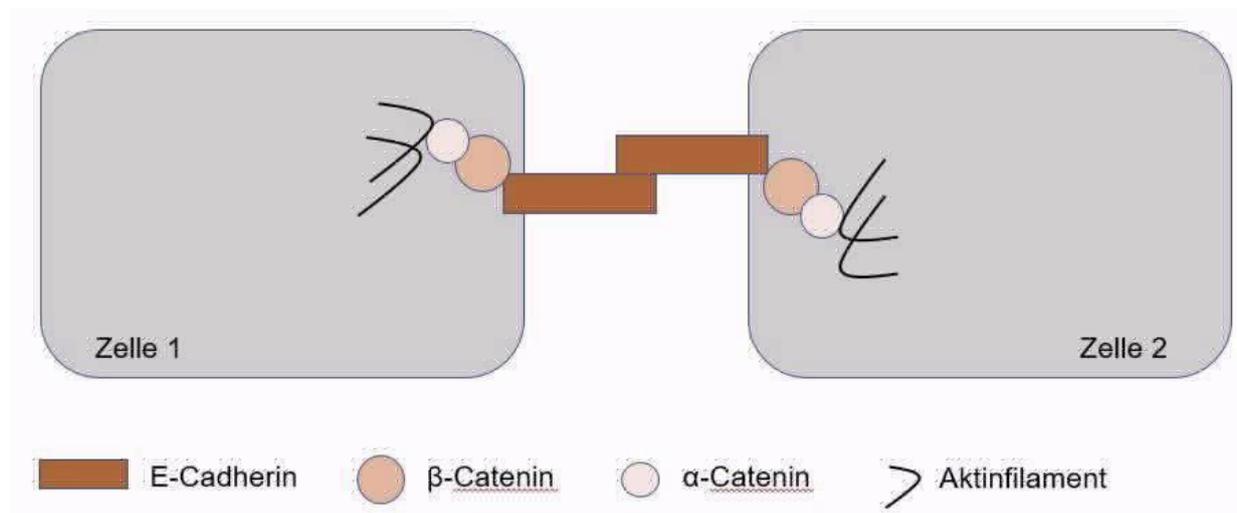


Abb.1 Schematischer Aufbau einer AJ, orientiert an Hirohashi ³¹

1.2.3 Desmoglein

Desmoglein gehört zu den desmosomalen Cadherinen, auch nicht-klassische Cadherine genannt, und ist an der Bildung von Desmosomen beteiligt, einer weiteren wichtigen Unterart der interzellulären Adhäsionskontakte.¹⁹ Desmoglein gehört zusammen mit Desmocollin zu den desmosomalen Adhäsionsmolekülen. Diese bilden durch heterophile Verknüpfungen das interzelluläre Verbindungsstück der Desmosomen.³² Über zwei Adapterproteine der Armadillofamilie, Plakoglobin und Plakophilin, die die desmosomale Plaque bilden, werden die Adhäsionsmoleküle Desmoglein und Desmocollin an Desmoplakin gebunden. Desmoplakin verbindet so indirekt die Adhäsionsmoleküle Desmoglein und Desmocollin an die Intermediärfilamente des Zytoskeletts und vervollständigt so die Verknüpfung zweier benachbarter Zellen durch Desmosomen.³³ Bis dato sind vier Isotypen (Desmoglein 1

bis 4) erforscht worden, welche je nach Gewebetyp in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert werden. Die Verteilung von Desmoglein 1 und 3 weist in den Schichten der Epidermis ein gegenläufiges Muster auf: Desmoglein 1 wird vorrangig im Stratum granulosum exprimiert, während Desmoglein 3 sich hauptsächlich in tieferen Schichten (Stratum spinosum und basale) findet lässt. Desmoglein 2 ist der am häufigsten vorkommende Isotyp und wird in allen einfachen Epithelien und Geweben exprimiert, die Desmosomen enthalten. In der Epidermis lassen sich Desmoglein 2 und Desmoglein 4 nur bedingt finden, Desmoglein 2 dabei in den basalen Schichten, Desmoglein 4 vor allem im Stratum corneum und granulosum.^{34, 35} (Abb.2)

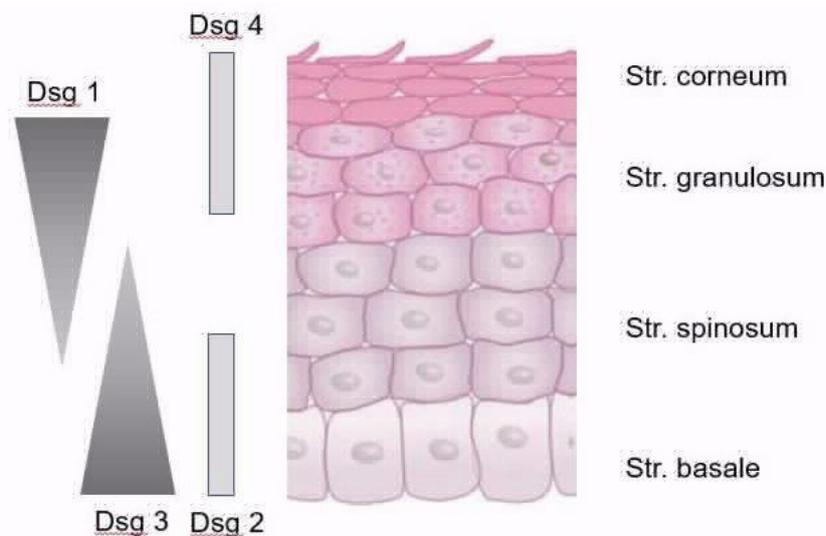


Abb. 2: Verteilung der Desmoglein-Isotypen (Dsg 1 – 4) innerhalb der Epidermis, orientiert an Green and Simpson³⁵

Der Verlust von Desmoglein stellte sich im Laufe der Zeit als Auslöser für verschiedenste dermatologische und internistische Erkrankungen heraus. Die phänotypischen Ausprägungen dieser Erkrankungen lassen sich den jeweils in dem betroffenen Gewebe vorkommenden Isotypen zuordnen. So entstehen durch den Verlust von Desmoglein 1 und Desmoglein 3 durch Bildung von Autoantikörpern die blasenbildenden Autoimmundermatosen Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus.³⁶ Hier kommt es an Haut und Schleimhaut zu Blasenbildung und Erosionen, was histologisch durch Akantholyse und Spaltbildung kurz oberhalb der Basalmembran gekennzeichnet ist. Beim Pemphigus foliaceus kommt es vor allem zur Antikörperbildung gegen Desmoglein 1, die Patient:innen leiden hier unter Blasen, welche ausschließlich an der verhornten Haut, insbesondere an seborrhoischen Hautbereichen, vorkommen.³⁷ Diese klinischen Aspekte lassen sich in Einklang bringen mit den Expressionsmustern von Desmoglein 1 und Desmoglein 3 (s.o.) und unterstützen die Theorie, dass ein Desmoglein-Isotyp den Verlust eines anderen kompensieren kann („desmoglein compensation hypothesis“).³⁸ Eine die Expression von Desmoglein 2 betreffende Mutation ist mitverantwortlich für die Pathogenese der

arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC).³⁹ Der Verlust von Desmoglein 4 wurde bei den genetischen Untersuchungen von Patient:innen mit einer autosomal-rezessiven Form von Hypotrichosis congenita circumscripta nachgewiesen.⁴⁰

1.3 β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein im Tumorkontext

β -Catenin erfüllt wie bereits oben erwähnt sowohl an der Zellmembran als auch im Zellkern zwei wesentliche Aufgaben: Einerseits spielt es durch Bindung an E-Cadherin eine wesentliche Rolle in der Bildung von AJ, andererseits fungiert es im Rahmen des Wnt-Signalweges als Transkriptionsfaktor.²³ Die Bedeutung von β -Catenin im Kontext der Tumorentstehung konnte bei einer Vielzahl von Karzinomentitäten nachgewiesen werden. So liegt beim Kolonkarzinom in fast 90% der Fälle eine Mutation im Wnt-Signalweg vor.⁴¹ Auch in der Entstehung des malignen Melanoms konnte die Aktivierung des Wnt-Signalweges als verstärkender Faktor nachgewiesen werden.⁴² Eine signifikant reduzierte Expression von β -Catenin entlang der Zellmembran konnte in mehreren malignen Tumoren der Epidermis beschrieben werden.⁴³ Die Expression von β -Catenin entlang der Tumordinvasionsfront des BCC wurde in histologischen Hochrisikotypen als stärker ausgeprägt beschrieben als in risikoärmeren Varianten.⁴⁴ Bei genauerer Betrachtung dieser Studien fällt auf, dass die Verteilung von β -Catenin innerhalb der Zelle von Bedeutung ist. In den Keratinozyten gesunder Epidermis wird die Lokalisation von β -Catenin als membranständig beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Fällen des BCC eine Verlagerung von β -Catenin von der Zellmembran in den Zellkern stattfindet und diese Verlagerung mit invasiveren Wachstumsmustern, gesteigerter Proliferation sowie aggressiveren histologischen Subtypen in Verbindung zu bringen ist.⁴⁵⁻⁴⁸ Es besteht weiterhin die Vermutung, dass β -Catenin durch Interaktion mit diversen Molekülen des dysregulierten Hedgehog-Signalweges vermehrt in den Wnt-Signalweg eingespeist wird, sich folglich im Zellkern anreichert und als Transkriptionsfaktor zur Entstehung des BCC beiträgt.⁴⁹

Der Verlust von E-Cadherin und somit die Auflösung der interzellulären Adhäsion durch AJ führt zu einer Reihe von Störungen innerhalb der Gewebearchitektur. In Tumorzellen kann dies ein entscheidender erster Schritt in Richtung Metastasierung sein.³¹ Schon früh wurde die Rolle von E-Cadherin als Tumorsuppressor beschrieben. Durch Einführung von E-Cadherin kodierenden Genen in invasive Krebszelllinien epithelialen Ursprungs konnte die invasionshemmende Wirkung dieses Moleküls bestätigt werden.⁵⁰ Der Verlust von E-Cadherin ist typisch für eine Vielzahl von invasiven Subtypen verschiedener Karzinome wie beispielsweise dem Pankreas-, Magen- und Mammakarzinom.⁵¹ Eine Erklärung hierfür liefert unter anderem der Mechanismus des „cadherin switch“: Studien zeigten neben dem Verlust von E-Cadherin eine gleichzeitig erhöhte Expression von N-Cadherin in Krebszellen des invasiven Mammakarzinoms. Dieser Expressionswechsel von einem typischen epithelialen Cadherin zu einem Cadherin, welches vor allem im mesenchymalen Kontext auftritt, kommt im Zuge der EMT vor, ein Prozess, der für die Progression von

Tumoren als bedeutend angesehen wird.⁵² So kommt es beispielsweise bei der Entstehung des malignen Melanoms zu einem Verlust von E-Cadherin und begleitend zu einer erhöhten Expression von N-Cadherin.⁵³ Dies wurde auch im SCC der Mundschleimhaut beobachtet: In Fällen mit höherem histologischen Grading wurde im Vergleich zu low-grade Dysplasien eine erheblich verringerte Ausprägung von E-Cadherin sowie eine verstärkte Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin und Vimentin nachgewiesen.^{54, 55} Eine verminderte Expression von E-Cadherin wurde im SCC der Haut weiterhin mit schlechter Differenzierung der Tumorzellen sowie regionaler Lymphknotenmetastasierung in Verbindung gebracht.⁵⁶ Im Mausmodell konnte durch Implantation von Tumorzellen eines low-grade SCC, welche durch genetische Manipulation eine inaktive Form von E-Cadherin exprimierten, der Übergang eines low-grade Karzinoms in ein high-grade Karzinom induziert werden. All diese Studienergebnisse verdeutlichen die Funktion von E-Cadherin als Tumorsuppressor.⁵⁷ In einer Vielzahl an Studien wurde die Expression von E-Cadherin im BCC untersucht, und es besteht eine hohe Übereinstimmung darüber, dass E-Cadherin in dieser Tumorentität im Vergleich zur gesunden Epidermis eher schwächer ausgeprägt ist. Weiterhin scheint der Verlust von E-Cadherin vor allem für Subtypen mit invasivem Wachstum bedeutend zu sein.^{45, 58, 59}

Es existieren einige Untersuchungen, welche von einer Korrelation zwischen einer veränderten Expression von Desmoglein und dem Entstehen sowie Fortschreiten maligner Tumoren berichten. Die Rolle der unterschiedlichen Isotypen in Bezug auf Zellproliferation und Tumorgenese scheint hingegen relativ vieldeutig zu sein. So wurde im SCC des Analkanals sowie der Haut im Vergleich zu gesundem Gewebe ein deutlich verringerter Nachweis von Desmoglein 1 beobachtet.^{60, 61} Der Verlust von Desmoglein 2 im Rahmen des Pankreaskarzinom führte in Studien zur Invasion und Migration von Tumorzellen.⁶² Bei einem Vergleich zwischen verschiedenen Typen des Lungenkarzinoms wurde deutlich, dass ein negativer Desmoglein 3-Status unabhängig vom histologischen Subtyp mit einer kürzeren 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert war als ein positiver Desmoglein 3-Status.⁶³ Im SCC wurde im Vergleich zu karzinomfreiem Gewebe der Verlust von membranständigem Desmoglein 3 entlang der Tumorinvasionsfront beobachtet und eine verstärkte Expression von Desmoglein 2 konnte mit einem erhöhten Risiko für Metastasierung in Verbindung gebracht werden.^{64, 65} Desmoglein 2 und Desmoglein 3 scheinen in enger Wechselwirkung miteinander zu stehen: In Keratinozyten mit einer durch Depletion beeinträchtigten Funktion von Desmoglein 3 wurde eine verstärkte lineare Anordnung von Desmoglein 2 entlang der Zellmembran beobachtet.⁶⁶ Über die Expression von Desmoglein-Isotypen im BCC gibt es nur wenige Berichte. Von Tada et al. wurde die Expression von Desmoglein 1 in verschiedenen Subtypen des BCC als schwach bis nicht vorhanden beschrieben.⁶¹ Weiterhin wurde im BCC im Vergleich zu gesunder Epidermis von einer vermehrten Expression von Desmoglein 2 sowie einem Verlust von Desmoglein 3 berichtet, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den histologischen Subtypen.⁶⁷

1.4 Fragestellung

Es ist bekannt, dass die Reduktion von Zelladhäsion das Loslösen von Tumorzellen aus ihrem Zellverband sowie die Infiltration des Stromas ermöglicht. Die hieraus entstehende Möglichkeit zu invasivem Wachstum und Metastasierung kennzeichnet den Verlust von interzellulärer Adhäsion als bedeutenden karzinogenen Mechanismus.³¹ Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression der Adhäsionsmoleküle β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein im nodulären und infiltrativen BCC zu untersuchen, sowie zu erläutern, inwiefern die variierende Ausprägung dieser Moleküle Einfluss auf das mikroskopische Wachstumsmuster des BCC nehmen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Hautproben

Die Hautproben entstammten dem Archiv der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie sowie des Instituts für Pathologie der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg und wurden zwischen den Jahren 2011 und 2012 durch chirurgische Exzision gesammelt. Ein durch die zuständige Ethikkommission bewilligter Ethikantrag lag vor. Gegenstand des Projektes waren 95 histologisch gesicherte BCC. Diese konnten in 47 NBCC und 48 IBCC eingeteilt werden. Aus den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Leica RM2065, Katalog-Nr. 043119669 der Firma Leica Instruments) ca. 3-4 μm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger gezogen, über Nacht in einem Wärmeschrank (max. 65°C) aufbewahrt und im Anschluss der weiteren immunhistochemischen Verarbeitung zugeführt.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Antikörper

Die für die Immunhistochemie verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den Tabellen 1 und 2 detailliert aufgelistet.

Tab.1: Liste der verwendeten primären Antikörper

Antigen	Antikörper	Firma	Artikel-/ Katalog-Nr.
β -Catenin	β -Catenin (D10A8) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	4903
E-Cadherin	E-cadherin (EP700Y) Rabbit Monoclonal Antibody	Sigma-Aldrich	246R-1
Desmoglein 3	Desmoglein 3 Monoclonal Antibody (5G11)	ThermoFisher Scientific	32-6300

Tab.2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Firma	Artikel-/ Katalog-Nr.
β-Catenin E-Cadherin	Anti-Rabbit aus Labelled Polymer EnVision+ System- HRP (Rabbit/AEC)	Agilent	K4009
Desmoglein 3	Anti-Mouse aus Labelled Polymer EnVision+ System- HRP (Mouse/AEC)	Agilent	K4005

2.2.2 Versuchsdurchführung

Als Vorbereitung für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 min in Xylol entparaffiniert, durch eine absteigende Ethanolreihe (100%, 90%, 80% und 70% für jeweils 3 min) dehydriert und in destilliertes Wasser überführt. Die Präparate wurden anschließend für 5-10 min in einem TBS-Puffer (Verdünnung 1:20 in destilliertem Wasser) gewaschen und zur thermischen Antigen-Demaskierung mit einem erwärmten EDTA-Puffer (Verdünnung 1:10 in destilliertem Wasser) in einem 96°C heißen Wasserbad für 60 min gekocht. Nachdem die Schnitte für ca. 20-30 min abgekühlt waren, wurden sie für ein gleichmäßigeres und sparsames Auftragen der Reagenzien mit dem Dako Pen umkreist und einem jeweils 5-minütigen Waschzyklus in TBS- und TBS-T-Puffer (TBS mit 0,05% TWEEN® 20) zugeführt. Die Schnitte wurden nachfolgend mit einem Peroxidase-Block versehen, für 10 min inkubiert und erneut in TBS- und TBS-T-Puffer für jeweils 5 min gewaschen. Vor dem Auftragen des primären Antikörpers wurde dieser mit Antibody Diluent verdünnt. Für das Verdünnungsverhältnis orientierten wir uns an den Vorgaben des Herstellers und wählten für Desmoglein ein Verhältnis von 1:150, für β-Catenin ein Verhältnis von 1:150 und für E-Cadherin ein Verhältnis von 1:50. Für die Negativkontrollen wurde kein primärer Antikörper verwendet. Nach dem Auftragen wurden die Schnitte über Nacht in einem Kühlschrank (ca. 4°C) gelagert. Am nächsten Tag wurde nach einem jeweils 5-minütigen Waschzyklus mit TBS- und TBST-Puffer der sekundäre Antikörper aufgetragen und für 60 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschzyklus (TBS- und TBS-T-Puffer, jeweils 5 min) wurden die Schnitte zur Markierung des Zielantigens mit je einem Tropfen AEC-Substrat-Lösung versehen. Nach ca. 3-5 min, oder sobald eine Rotfärbung aller Präparate mit primärem Antikörper sichtbar war, wurde die Reaktion durch Eintauchen in destilliertes Wasser gestoppt. Daraufhin wurden die Schnitte für 7 min in Haematoxylin-Eosin (Mayers Hämalaunlösung, Verdünnung 1:10 in destilliertem Wasser) gefärbt, für 3-5 min in Leitungswasser ausgewaschen und anschließend in destilliertes Wasser überführt. Abschließend wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium (Mounting Medium) versehen und mit einem Deckglas abgedeckt. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer (StainTray™)

durchgeführt. Alle zur immunhistochemischen Färbung verwendeten Produkte sind in Tabelle 3 detailliert aufgelistet.

Tab.3: Liste der für die immunhistochemische Färbung verwendeten Produkte

Produktname	Firma	Artikel-/ Katalog-Nr.
Xylol (Isomerengemisch) für die Histologie	Merck	108298
Ethanol	Sigma-Aldrich	32205
Tris-Wash Buffer, TBS	Zytomed	ZUC052-500
HIER EDTA Puffer pH 8,0	Zytomed	ZUC040-500
Dako Pen	Dako	S2002
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich	P7940
Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL	Agilent	Dako Kit K4009
StainTray™	Simport Scientific	M920-2
Dako Antibody Diluent	Agilent	SO809
Dako AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use	Agilent	K3464
Mayers Hämalaunlösung	Merck	109294
Dako Faramount Aqueous Mounting Medium Ready- to-use	Agilent	S3025

2.3 Mikroskopische Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch (Olympus BX51) begutachtet. Die in den Präparaten vorhandene tumorfreie Epidermis stellte eine interne Positivkontrolle dar. Die für jede Probe angefertigten Schnitte ohne primären Antikörper stellten die Negativkontrolle dar. Die Expression der drei Zielantigene entlang der Tumorinvasionsfront wurde jeweils mit positiv oder negativ bewertet. Als positiv wurden solche Schnitte gewertet, in denen das gesuchte Adhäsionsmolekül im Tumor ähnlich stark oder stärker exprimiert wurde als in der tumorfreien Epidermis. Häufig zeigte sich die Epidermis unmittelbar oberhalb des Tumors als sehr schwach angefärbt, hier wurden dementsprechend Teile der Epidermis in weiterer Entfernung des Tumors als die jeweilige Bezugsgröße herangezogen. Als negativ wurden solche Schnitte gewertet, in denen das gesuchte Adhäsionsmolekül entlang der Tumorinvasionsfront entweder gar nicht oder schwächer nachweisbar war als in der tumorfreien Epidermis. Einige Schnitte konnten nicht eindeutig als positiv oder negativ gewertet werden und wurden folglich als heterogen klassifiziert.

2.4 Statistische Auswertung

Ein Fall wurde aufgrund von nicht eindeutig identifizierbarer Tumormasse ausgeschlossen. So ergab sich ein vorläufiger Stichprobenumfang von 46 NBCC und 48 IBCC Basalzellkarzinomen. Aufgrund von heterogener Anfärbung wurden jeweils 2 Fälle aus jeder Gruppe (NBCC und IBCC) im Vorfeld der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Die endgültige statistische Berechnung wurden mit einem Stichprobenumfang von 44 NBCC und 46 IBCC durchgeführt. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der SAS Software (Version 9.4) durchgeführt. Der Chi-Quadrat-Test wurde verwendet, um den Zusammenhang zwischen der Expression der Adhäsionsmoleküle und dem histologischen Subtyp zu evaluieren.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von β -Catenin

In allen Fällen des NBCC und des IBCC konnte β -Catenin innerhalb der tumorfreen Epidermis, sowie in Drüsen und Haarfollikeln nachgewiesen werden. (Abb. 3) Entlang der Tumorinvasionsfront des NBCC wurde β -Catenin in 27 von 44 Fällen als positiv gewertet, zu einem Verlust kam es in 17 von 44 Fällen. Entlang der Tumorinvasionsfront des IBCC wurde β -Catenin in 20 von 46 Fällen exprimiert, zu einem Verlust kam es in 26 von 46 Fällen ($p = 0,0895$, siehe Tab. 4). Die Abbildungen 4 – 8 zeigen repräsentative Fälle des NBCC und IBCC mit positiver bzw. negativer Expression von β -Catenin. Um einen direkten Vergleich zwischen darüber liegender Epidermis und Tumor wiedergeben zu können, wurde in einem Teil der folgenden Abbildungen Ausschnitte gewählt, welche nicht die Tumorinvasionsfront zeigen. In diesen Fällen war die Expression des betroffenen Adhäsionsmoleküls in oberflächlich gelegenen Teilen des Tumors vergleichbar mit der Expression entlang der Tumorinvasionsfront.

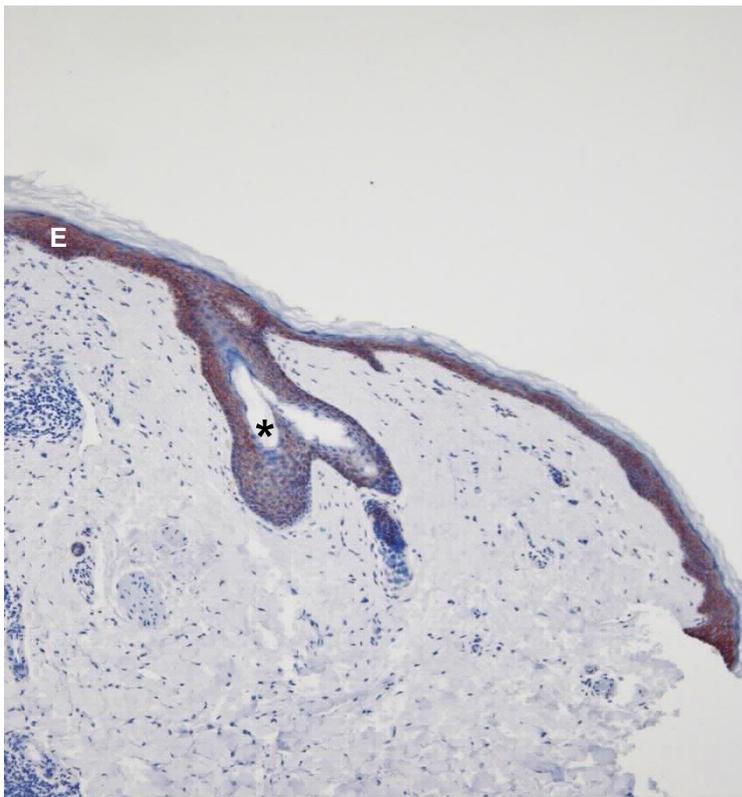


Abb. 3: Nachweis von β -Catenin innerhalb der Epidermis (E) sowie eines angeschnittenen Haarfollikels (*).

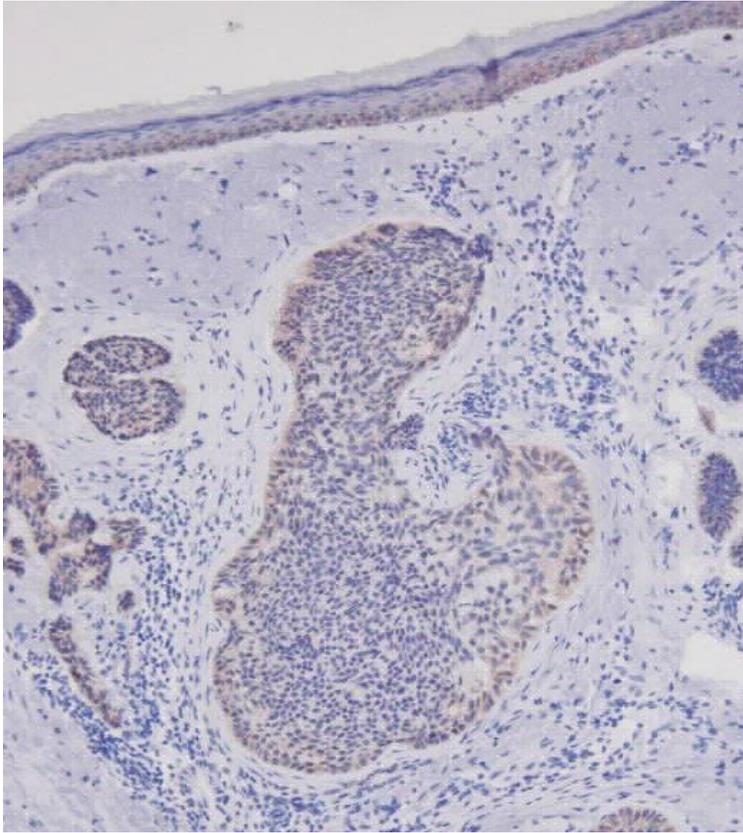


Abb. 4: positive Expression von β -Catenin im NBCC

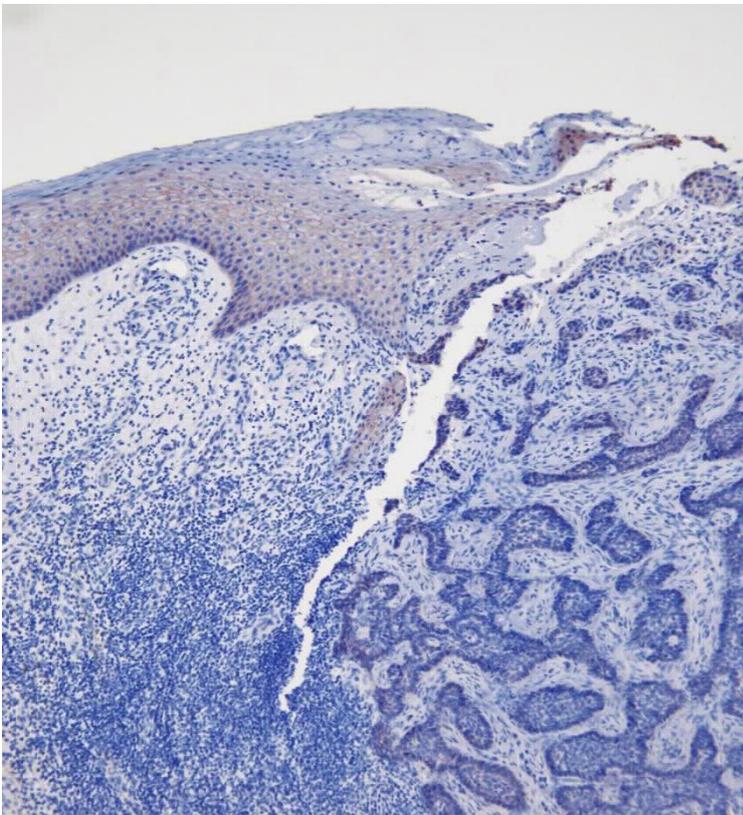


Abb. 5: negative Expression von β -Catenin im NBCC

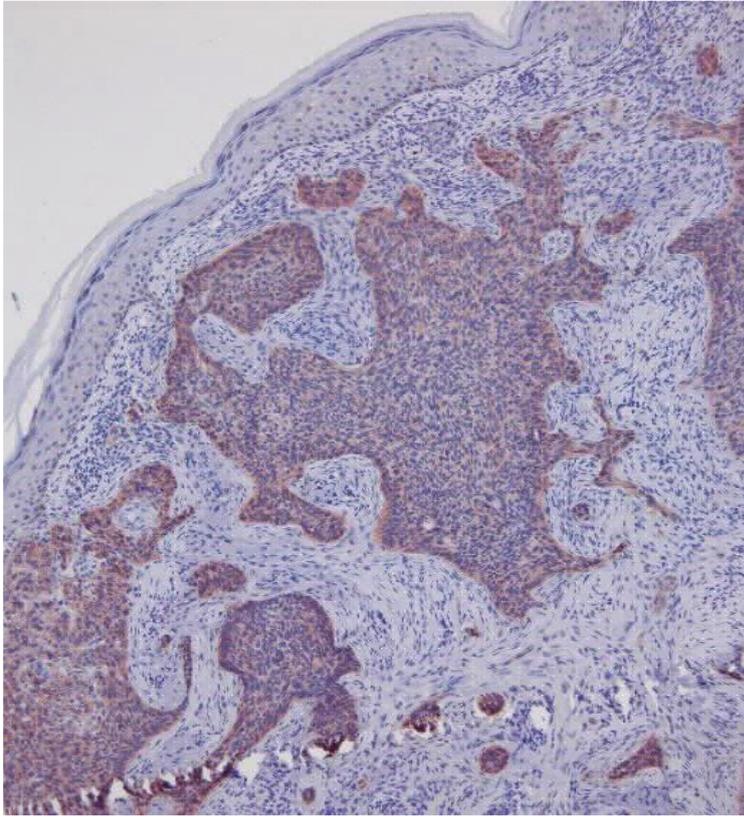


Abb. 6: positive Expression von β -Catenin im IBCC

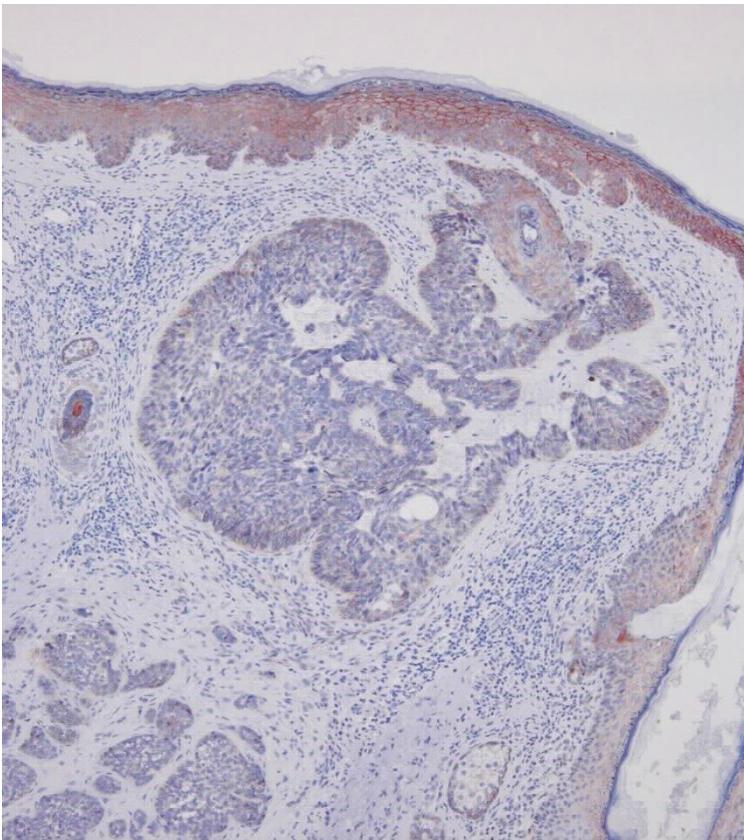


Abb. 7: negative Expression von β -Catenin im IBCC

3.2 Expression von E-Cadherin

In allen Fällen des NBCC und des IBCC konnte E-Cadherin innerhalb der tumorfreien Epidermis, sowie in Drüsen und Haarfollikeln nachgewiesen werden. (Abb. 9) Entlang der Tumorinvasionsfront des NBCC wurde E-Cadherin in 20 von 44 Fällen exprimiert, ein Verlust konnte in 24 von 44 Fällen nachgewiesen werden. Entlang der Tumorinvasionsfront des IBCC wurde E-Cadherin in 9 von 46 Fällen als positiv gewertet, zu einem Verlust kam es in 37 von 46 Fällen ($p = 0,0086$, siehe Tab. 4). Die Abbildungen 9 - 12 zeigen exemplarisch Fälle des NBCC und des IBCC mit positiver bzw. negativer Expression von E-Cadherin.

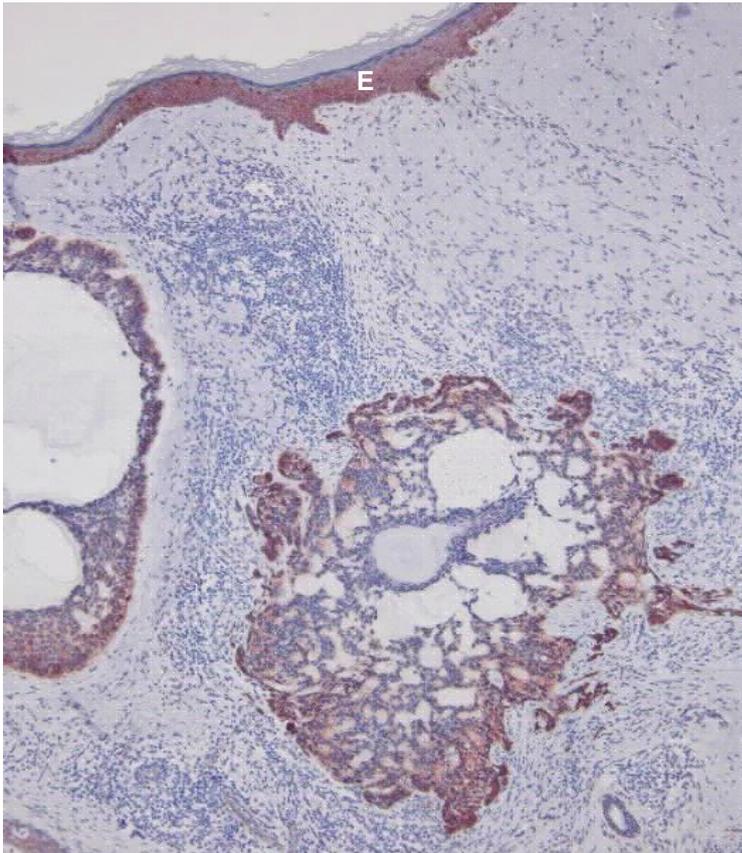


Abb. 9: Nachweis von E-Cadherin innerhalb der Epidermis (E) sowie positive Expression von E-Cadherin im NBCC

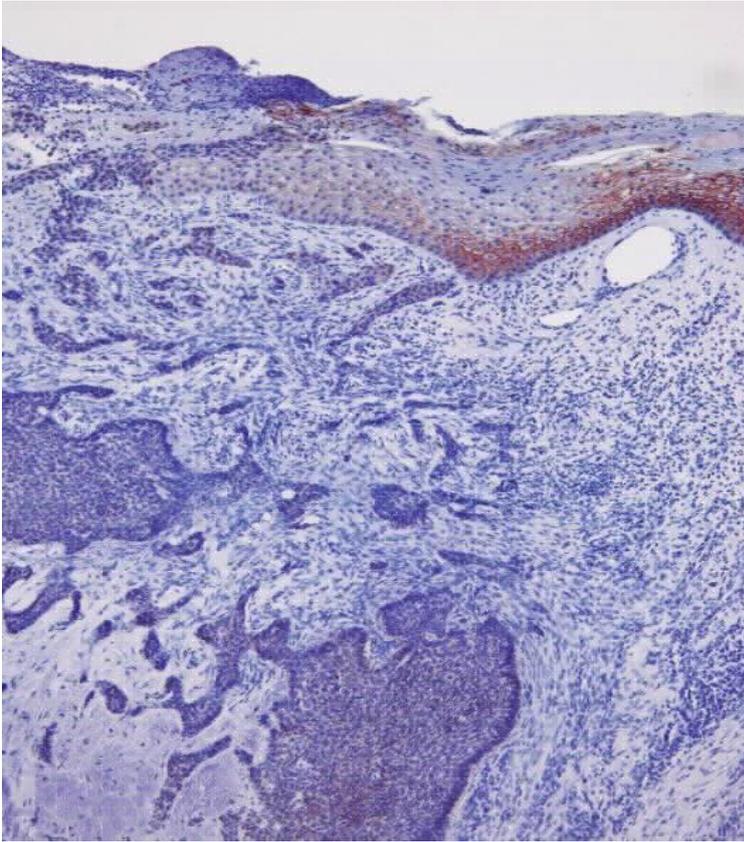


Abb. 10: negative Expression von E-Cadherin im NBCC

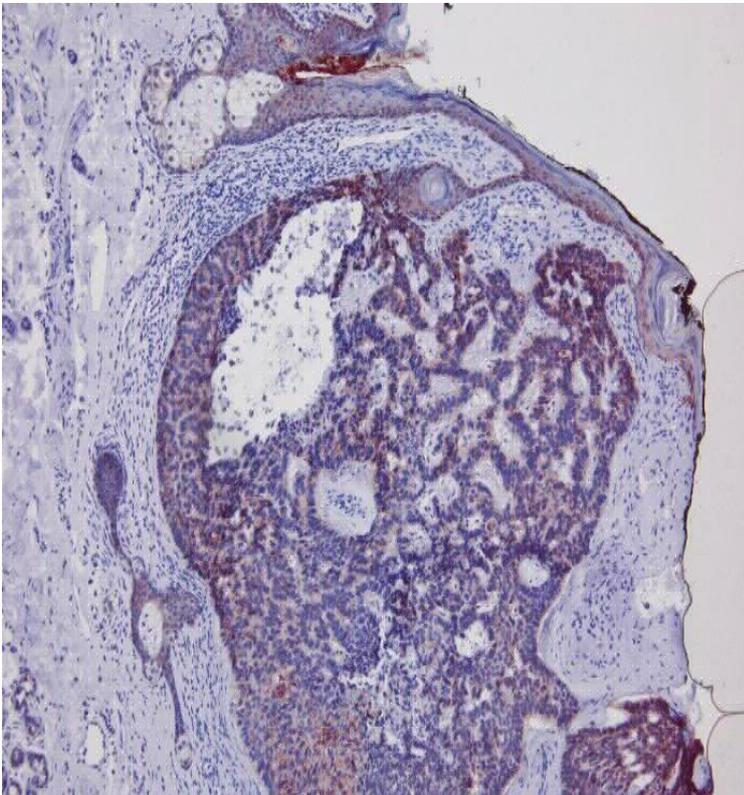


Abb.11: positive Expression von E-Cadherin im IBCC

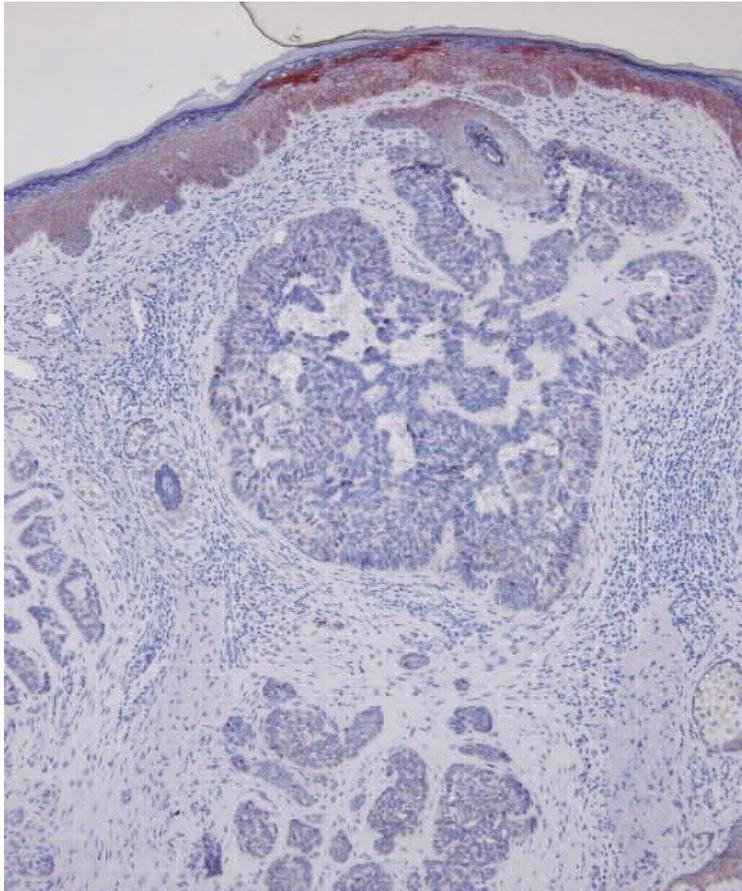


Abb. 12: negative Expression von E-Cadherin im IBCC

Tab. 4: Verlust von β -Catenin und E-Cadherin in Fällen des NBCC und IBCC

	β -Catenin	E-Cadherin
NBCC (n= 44)	17	24
IBCC (n= 46)	26	37
p-Wert	0,0895	0,0086

3.3 Expression von Desmoglein

Im Laufe der Versuchsreihe ergaben sich wiederholt Probleme mit der immunhistochemischen Testung der Schnitte auf die Expression von Desmoglein 3. Trotz korrekter Anwendung anhand der vom Hersteller angegebenen Gebrauchsinformationen sowie mehrmaligen Versuchsdurchführungen mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen konnten keine konstant zufriedenstellenden Färbungsergebnisse erzielt werden.

4. Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Auswahl der Adhäsionsmoleküle

Bei der Wahl der untersuchten Adhäsionsmoleküle orientierten wir uns unter anderem daran, welche Moleküle bereits in Publikationen zu epithelialen Tumoren Beachtung fanden. Die Studienlage für jedes der drei Adhäsionsmoleküle war reichhaltig an Informationen bezüglich der generellen Funktion sowie des Verhaltens im Tumorkontext (s.o.). Mehrere Autor:innen^{54, 68} untersuchten bereits die Expression von β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein im SCC. Gaiser et al.⁶⁹ untersuchten zuletzt anhand von Schnitten derselben Hautproben, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, die Expression von EpCAM im nodulären und infiltrativen BCC und verwiesen darauf, dass es Hinweise für die Koexpression von EpCAM und E-Cadherin gibt. Da sich E-Cadherin und β -Catenin in ihrer Funktion in hohem Maße beeinflussen und einen großen Einfluss auf Zelladhäsion und Tumorprogression haben, war die gleichzeitige Untersuchung dieser beiden Adhäsionsmoleküle naheliegend. Ausgehend von der Hypothese, dass der Verlust von Zelladhäsion die Invasivität von Tumoren begünstigen, erschien uns außerdem die Untersuchung von Desmoglein, einem zentralen Element der Desmosomen, als geeignet. Zur Klärung der Frage, was das invasive Wachstum des BCC beeinflusst, kommen neben der hier untersuchten Adhäsionsmoleküle zahlreiche Weitere zur Betrachtung in Frage. In der Literatur und den uns bekannten Studien, welche sich mit den von uns ausgewählten Adhäsionsmolekülen befassten, finden sich u.a. Untersuchungen zu α -Catenin und Plakoglobin, zwei Moleküle, welche Zelladhäsion vermitteln, sowie zu Vimentin, einem mesenchymalen Marker, welcher u.a. für die EMT eine große Rolle spielt.

Plakoglobin, teilweise auch als γ -Catenin bekannt, ist ein zu β -Catenin paraloges Protein der Armadillofamilie und ist vor allem bei der Bildung von Desmosomen von Bedeutung. Durch seine hohe strukturelle Übereinstimmung mit β -Catenin erscheint es schlüssig, dass Plakoglobin anstelle von β -Catenin an E-Cadherin binden und somit zur Entstehung von AJ beitragen kann.⁷⁰ Es gibt einige Theorien, inwiefern β -Catenin weiterhin in seinen Funktionen durch Plakoglobin beeinflusst wird. Durch den Ersatz von β -Catenin in AJ erhöht Plakoglobin indirekt die Menge an ungebundenem β -Catenin. Dieses wird im Zytoplasma entweder direkt abgebaut oder kann vermehrt in den Nukleus transportiert werden und dort als Transkriptionsfaktor wirken. Wenn überschüssiges Plakoglobin allerdings in den Zellkern gelangt, kann es entweder die Bindung von β -Catenin an Proteine der TCF/LEF Familie verhindern oder selbst mit diesen Proteinen interagieren und so die Transkription bestimmter Zielgene aktivieren.⁷¹ In einer Studie von Papadavid et al.⁷² wurde der Verlust von γ -Catenin/Plakoglobin mit einem erhöhten Proliferationsindex (Ki-67) des SCC in Verbindung gebracht. Kurzen et al.⁶⁵ konnten hingegen keine Korrelation zwischen der Expression von Plakoglobin und dem Metastasierungsrisiko des SCC finden. Tada et

al.⁶¹ fanden im SCC und BCC eine teils verminderte, teils komplett unterdrückte Expression von Plakoglobin. Die noch schwach nachweisbare Expression fand sich hierbei in Fällen des NBCC, während sich der komplette Verlust von Plakoglobin im morpheaformen und superfiziellen BCC zeigte. Eine umfassendere Untersuchung von Plakoglobin, evtl. in Verbindung mit weiteren desmosomalen Proteinen, im nodulären und infiltrativen BCC könnte zur Klärung der bisher uneindeutigen Rolle von Plakoglobin in Bezug auf das Wachstumsmuster von Hauttumoren von Interesse sein. Weiterhin sollten die Ergebnisse einer solchen Studie mit der Expression und intrazellulären Lokalisation von β -Catenin im BCC in Verbindung gebracht werden, um somit mehr über die Bedeutung von Plakoglobin und dessen Interaktion mit β -Catenin in dieser Tumorentität herauszufinden.

Wie bereits skizziert, werden Zellverbindungen unter anderem über die Verknüpfung von Cadherin/Catenin-Komplexen mit dem Zytoskelett gebildet. α -Catenin bildet hierbei die Brücke zwischen β -Catenin und den Aktinfilamenten des Zytoskeletts.²² Neben seinem Einfluss auf Zelladhäsion konnte α -Catenin eine signifikante Rolle im Tumorkontext zugeschrieben werden. So konnte in einer Vielzahl von Tumoren eine Korrelation zwischen dem Verlust von α -Catenin und dem häufigeren Vorkommen von invasivem Wachstum, Metastasierung und schlechter Differenzierung nachgewiesen werden.⁷³ Der Verlust von α -Catenin in nicht-melanozytären bösartigen Hauttumoren scheint, ebenso wie der Verlust anderer Moleküle des Cadherin/Catenin-Komplexes, mit einer erhöhten Proliferation und Invasivität des Tumors in Zusammenhang zu stehen.^{72, 74} Über die Expression von α -Catenin im BCC gibt es nur wenige Studien mit meist geringer Fallzahl. Kooy et al. konnte lediglich eine signifikant reduzierte Expression von α -Catenin in Zellen des nodulären und superfiziellen BCC im Vergleich zur umliegenden Epidermis beobachten.⁴⁵ Eine umfassendere Untersuchung der Expression von α -Catenin im nodulären und infiltrativen BCC könnte helfen, die bereits in anderen Hauttumoren beschriebene Rolle dieses Adhäsionsmoleküls zu überprüfen.

Vimentin ist ein Intermediärfilament, welches in mesenchymalen Zellen exprimiert wird. Als mesenchymaler Marker führt die verstärkte Expression von Vimentin zusammen mit dem Verlust von E-Cadherin im Rahmen der EMT zu den hierfür typischen Zellveränderungen. Hierzu gehören unter anderem der Verlust von interzellulärer Adhäsion sowie eine verstärkte Zellmotilität.⁵⁵ In einigen Untersuchungen wurde die Expression von Vimentin im Rahmen des kutanen SCC betrachtet. Hier konnte vorrangig festgestellt werden, dass Vimentin in schlecht differenzierten Tumorzellen mit höherem histologischem Grading signifikant stärker exprimiert wurde als in gut differenzierten Tumorzellen. Dieses verstärkte Vorkommen von Vimentin ging innerhalb der erwähnten Studien ebenfalls mit dem Verlust von epithelialen Markern (z.B. E-Cadherin) einher.^{54, 75} Gaiser et al.⁶⁹ nutzten die Anfärbung von Vimentin zur Abgrenzung kleinerer Tumorzellen des BCC gegen das Stroma. Es könnte daher weiterhin von Interesse sein, die Expression von Vimentin im NBCC und IBCC genauer zu untersuchen.

4.1.2 Immunhistochemie

Zur Untersuchung der Expression der gesuchten Adhäsionsmoleküle erwies sich eine Anfärbung mittels immunhistochemischer Methoden als geeignet. Für β -Catenin und E-Cadherin konnten zufriedenstellende und eindeutige auszuwertende Ergebnisse erzielt werden. Wie bereits erwähnt, ergaben sich jedoch im Laufe der Versuchsdurchführung einige Probleme mit der Handhabung des Desmoglein 3-Antikörpers. So konnten trotz Berücksichtigung aller Herstellervorgaben keine zufriedenstellende Anfärbung des Antigens erreicht werden. Auch die Variierung der Antikörperkonzentration sowie der absoluten Menge des verwendeten Antikörpers führte zu keinem Erfolg. Kurzen et al. beschrieben ähnliche Probleme mit dem gleichen Klon (5G11) des murinen Desmoglein 3-Antikörpers.⁶⁵ Da Desmoglein eine vielfältige Rolle im Kontext von Zelladhäsion und Tumorprogression spielt, wäre eine Untersuchung dieses Moleküls im BCC weiterhin interessant. Der in unserer Arbeit verwendete monoklonale Antikörper richtete sich ausschließlich gegen Desmoglein 3. Da die Desmoglein-Isotypen jeweils unterschiedliche Einflüsse auf Tumorzellen zu haben scheinen^{60-65, 67}, wäre eine umfassendere Betrachtung aller Isotypen im Kontext des BCC von Vorteil. Unseres Wissens existiert bisher noch keine Studie, welche die Ausprägung der Isotypen von Desmoglein in den unterschiedlichen histologischen Subtypen des BCC anhand einer ausreichend hohen Fallzahl untersucht. In vielen Studien über die Expression von Desmoglein im SCC oder BCC der Haut wurden zusätzlich weitere desmosomale Proteine wie bspw. Desmocollin und Plakoglobin untersucht.^{64, 65} Eine umfassende Untersuchung der Expression desmosomaler Moleküle im BCC sowie deren Auswirkung auf das Verhalten von Tumorzellen könnte daher auch im BCC von Interesse sein.

Für die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse wählten wir eine qualitative Einteilung in "positiv" oder "negativ". Durch die Verwendung der gesunden Epidermis als Bezugspunkt für die qualitative Einteilung konnte verhindert werden, dass eventuelle Unterschiede in der Farbintensität zu einer fehlerhaften Einstufung führten. Die immunhistochemische Auswertung mittels qualitativer Methoden wurde in anderen Studien bspw. durch die Einteilung der Expression in "normal" und "abnormal"⁴⁶ oder mittels Immunfluoreszenz⁷⁶ durchgeführt. Ein Großteil der hier zitierten Studien nutzte semiquantitative Ansätze. Häufig wurde der prozentuale Anteil der Zellen, in denen das gesuchte Molekül nachweisbar war, sowie die Intensität der Färbung einer bestimmten Ziffer zugeordnet und so ein Score für Immunreaktivität erstellt.^{45, 55} Als Bezugspunkt wurden, wie auch in unserer Arbeit, am häufigsten normale Keratinozyten innerhalb der gesunden Epidermis genutzt. Ein quantitativer Ansatz ließ sich nur selten finden. Rajabi et al.⁴⁷ analysierten den durchschnittlichen Prozentsatz der Anfärbung von β -Catenin, ohne jedoch genaue Angaben zu der dahinter liegenden Methode zu machen. Im Vergleich mit den von uns zitierten Studien lässt sich sagen, dass der hier gewählte qualitative Auswertungsansatz ausreichend für die Zielsetzung war, ein semiquantitativer Ansatz jedoch eine detailliertere Interpretation des statistischen Ergebnisses erlaubt hätte. Soweit angegeben, wurden in den meisten Studien die immunhistochemische Auswertung durch mindestens zwei unabhängige Untersucher:innen durchgeführt und eventuelle Diskrepanzen diskutiert.

Dies hätte auch in unserer Arbeit zur Objektivierung der Ergebnisse umgesetzt werden können. Ein weiterer Ansatz hierfür wäre die Verwendung einer digitalen Auswertungssoftware, was jedoch unseres Wissens in keiner der hier zitierten Studien zur Anwendung kam.

4.2 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedeutung der Expression von β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein im nodulären und infiltrativen BCC zu untersuchen. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von β -Catenin und dem histologischen Subtyp beobachtet werden; im IBCC zeigte sich jedoch tendenziell eine reduzierte Expression im Vergleich zum NBCC. Für E-Cadherin konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression und dem histologischen Subtyp des BCC beobachtet werden. Beim IBCC zeigte sich im Vergleich zum NBCC eine signifikant verminderte Expression von E-Cadherin entlang der Tumorinvasionsfront. Dies lässt sich gut in Einklang bringen mit der allgemein bekannten Funktion von E-Cadherin als potenten Invasions- und Tumorsuppressor. Die Untersuchung der Expression von Desmoglein wurde aufgrund von mangelhaften Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung eingestellt.

4.2.1 Expression von β -Catenin

Unsere Ergebnisse lassen keine eindeutige Aussage über den Zusammenhang zwischen der Expression von β -Catenin und dem histologischen Subtyp des Basalzellkarzinoms zu. Dennoch zeigte sich im IBCC häufiger ein Verlust von β -Catenin entlang der Tumorinvasionsfront als im NBCC, sodass hier von einer Tendenz gesprochen werden kann. So lässt sich anhand unserer Ergebnisse die Vermutung anstellen, dass die Expression von β -Catenin im BCC einen Einfluss auf die Invasivität und Aggressivität des Tumors hat. Wie bereits erwähnt, erfüllt β -Catenin an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle elementare Funktionen: an der Zellmembran fungiert es als Adhäsionsmolekül, innerhalb des Zellkerns als Transkriptionsfaktor.²¹ Bisher konnte jedoch kein einheitlicher Zusammenhang zwischen der Lokalisation von β -Catenin innerhalb der Zelle und dem Malignitätsgrad von Tumoren beschrieben werden. Ob die Verlagerung von β -Catenin von der Zellmembran in den Nukleus eher einen onkogenen oder tumorsuppressiven Einfluss auf die Zelle nimmt, hängt laut Studien von der jeweiligen Tumorentität ab. So wurde beim Prostatakarzinom der Verlust von nukleärem β -Catenin mit einem steigendem Gleason-Score in Verbindung gebracht.⁷⁷ Im malignen Melanom wurde nukleäres β -Catenin als Hindernis für Tumorinvasion identifiziert.⁷⁸ Weitaus häufiger jedoch hat eine verstärkte Expression von β -Catenin im Zellkern eine tumorfördernde Wirkung auf die Zelle: Eine erhöhte Konzentration von nukleärem β -Catenin wurde in einer Vielzahl von Tumoren, darunter das kolorektale (KRK), das hepatozelluläre und das Endometrium-Karzinom, gefunden.⁷⁹ In unserer Arbeit war der allgemeine Eindruck der Farbintensität entlang

der Tumorinvasionsfront ausschlaggebend für die Einteilung in "positiv" oder "negativ". Es wurde nicht zwischen membranöser und zytoplasmatischer bzw. nukleärer Anfärbung unterschieden. Bei nachträglicher Betrachtung der immunhistochemischen Ergebnisse befanden sich die farbintensiven Areale der Tumorzellen jedoch vorwiegend entlang der Zellmembran. Dies wird auch in den obigen Abbildungen (Abb. 3-5) ersichtlich. In einem Großteil der Studien, welche sich mit der Expression von β -Catenin im BCC beschäftigten, wurde ebenfalls die genaue Lokalisation von β -Catenin innerhalb der Zelle berücksichtigt. Hier scheint es eine positive Korrelation zu geben zwischen der Menge an nukleärem β -Catenin und der Invasivität des histologischen Subtyps.^{44, 46-48} So zeigten Saldanha et al.⁴⁸, dass auch im NBCC eine stärkere nukleäre Anreicherung von β -Catenin mit einer höheren Proliferationsrate einhergeht. Weiterhin wiesen El-Barahwy et al.⁴⁶ in einem Großteil der Fälle des NBCC eine Reduktion von membranständigem β -Catenin nach. Circa die Hälfte der Fälle zeigte zusätzlich eine nukleäre Anreicherung. Ein teilweiser bis vollständiger Verlust von membranständigem β -Catenin bei gleichzeitiger Anreicherung im Zytoplasma sowie im Zellkern wurde in allen Fällen des IBCC nachgewiesen. Sowohl im NBCC als auch im IBCC fiel die Expression von β -Catenin im Nukleus verstärkt in der Peripherie der Tumornester bzw. entlang der Tumorinvasionsfront ("invasive margins") sowie in kleineren Zellnestern mit komplettem Verlust von membranständigem β -Catenin auf.⁴⁶ Diese Ergebnisse decken sich mit unseren bezüglich der stärkeren Reduktion von membranständigem β -Catenin im IBCC verglichen mit dem NBCC und verdeutlichen weiterhin die Notwendigkeit, die genaue Lokalisation von β -Catenin innerhalb der Zelle zu berücksichtigen. Zu empfehlen wäre eine weitere Untersuchung unseres Probenmaterials auf die genaue Verteilung von β -Catenin innerhalb der Tumorzelle. Hier sollte bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbung vor allem auf eine regelrechte Gegenfärbung der Zellkerne geachtet werden.⁸⁰ Weiterhin sollte, wie auch in unserer Arbeit, besonderes Augenmerk auf die Tumorinvasionsfront gelegt werden. Von Interesse wäre außerdem, inwiefern sich der Verlust von membranständigem β -Catenin und dessen zytoplasmatische bzw. nukleäre Anreicherung gegenseitig beeinflussen.

4.2.2 Expression von E-Cadherin

Die Expression von E-Cadherin entlang der Tumorinvasionsfront des IBCC zeigte sich in unseren Ergebnissen signifikant reduziert im Vergleich zum NBCC. Dies lässt darauf schließen, dass der Verlust von E-Cadherin und der folglich reduzierten interzellulären Adhäsion ein bedeutender Faktor für das invasive und destruierende Wachstum des IBCC darstellt. Diese Resultate lassen sich mit den Studien von Pizarro et al.⁵⁸ und Tucci et al.⁸¹ in Einklang bringen, in deren Rahmen ebenfalls eine signifikante Reduktion von E-Cadherin im IBCC beobachtet wurde. In beiden Studien wurden jedoch kleinere Fallzahlen verwendet als in unserer Arbeit, so dass wir durch unseren Probenumfang die tumorsuppressive Wirkung von E-Cadherin im IBCC noch zuverlässiger nachweisen konnten. Die Ergebnisse einer Studie von Papanikolaou et al.⁸² wiesen ebenfalls auf die Korrelation zwischen dem Verlust von membranständigem E-Cadherin und dem invasiven Potential des BCC hin. Hier kam

es allerdings in 92% aller BCC-Fälle, darunter zu beinahe gleichen Teilen NBCC und IBCC zu einer Reduktion von membranständigem E-Cadherin und in 71% der Fälle zu einem kompletten Verlust. Dennoch konnte der Verlust von E-Cadherin eindeutig mit dem invasiven Potential und dem infiltrativen Subtyp in Verbindung gebracht werden. Interessant an dieser Studie war der Nachweis von zytoplasmatisch und nukleär vorkommendem E-Cadherin in einem Großteil der BCC-Fälle, wobei sich hier ein eindeutiger Zusammenhang zum IBCC zeigte. Gleichzeitig kam es signifikant häufig zu einem Verlust von membranständigem E-Cadherin bei gleichzeitiger nukleärer Anreicherung. Es wurde darauf hingewiesen, dass die Detektion von E-Cadherin im Zellkern davon abhängig ist, ob sich der verwendete Antikörper gegen die extrazelluläre oder zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin richtet.⁸² Ähnlich wie bei β -Catenin könnte die genaue Untersuchung von membranständigem, zytoplasmatischem und nukleärem E-Cadherin im BCC ein tieferes Verständnis für das invasive Verhalten infiltrativen Subtyps ermöglichen.

Da β -Catenin und E-Cadherin in engem funktionellen sowie örtlichen Zusammenhang miteinander stehen, erscheint es naheliegend, dass diese beiden Adhäsionsmoleküle einander in Expression und Lokalisation beeinflussen. Durch eine Phosphorylierung von Tyrosinresten von β -Catenin kann es sowohl zu einer Entkopplung des Cadherin/Catenin-Komplexes als auch zu einer Störung der Bindung zwischen β - und α -Catenin kommen. Die Mechanismen, welche einer solchen Phosphorylierung von β -Catenin zugrunde liegen, sind zahlreich und komplex. Klar ist jedoch, dass eine Auflösung der Cadherin/Catenin-Bindung in einer erhöhten Menge an frei verfügbarem und somit transkriptionell aktivem β -Catenin resultieren kann.⁸³ Orsulic et al.⁸⁴ konnten nachweisen, dass der Verlust von E-Cadherin in Stammzellen zu einer Erhöhung von freiem β -Catenin und somit zur Aktivierung des Wnt-Signalweges führt. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass E-Cadherin durch Bindung von β -Catenin an der Zellmembran dessen Anreicherung im Zellkern verhindern kann. Laut einer Studie von Saldanha et al.⁴⁸ kann dieser Vorgang jedoch nicht auf das BCC übertragen werden. Hier wurde keine Korrelation zwischen der Lokalisation von β -Catenin und der Expression von E-Cadherin beobachtet. 40% der Zellen, welche eine Anreicherung von β -Catenin im Zellkern zeigten, wiesen dennoch eine unverändert starke Expression von E-Cadherin auf. Dies scheint sich mit unseren Erkenntnissen zu decken: Obwohl es in unserer Arbeit im IBCC zu einer signifikant reduzierten Expression von E-Cadherin kam, war ein gleichermaßen ausgeprägter Verlust von membranständigem β -Catenin nicht zu beobachten. Diese Beobachtung sollte jedoch mit einer Untersuchung der nukleären Expression von β -Catenin anhand unserer Proben verknüpft werden. So ließe sich die Unabhängigkeit zwischen E-Cadherin und β -Catenin im BCC tatsächlich bestätigen. Dass es womöglich einen Adhäsions-unabhängigen Einfluss von E-Cadherin auf das Verhalten von β -Catenin geben könnte, beschrieben Gottardi et al.⁸⁵ anhand einer Untersuchung von KRK-Zellreihen. Hier konnte eine inhibierende Wirkung von E-Cadherin auf den Wnt-Signalweg beobachtet werden, die allerdings in keinem deutlichen Zusammenhang mit der Menge an ungebundenem β -Catenin im Zytosol steht. Dies könnte zusätzlich eine Erklärung für die von uns beobachtete Diskrepanz zwischen der Expression von E-Cadherin und β -

Catenin im BCC sein. Um diese Vermutung auf das BCC zu übertragen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) ist ein Zelloberflächenprotein, welches in einer Vielzahl von Epithelien exprimiert wird und darüber hinaus als Marker für zirkulierende und disseminierte Tumorzellen gilt. Die Expression von EpCAM ist für mehrere Tumorentitäten, darunter das Ösophaguskarzinom und das BCC, typisch und der Einfluss von EpCAM auf Zelladhäsion und -proliferation erscheint vieldeutig. Der Verlust von EpCAM wird, wie auch der Verlust von E-Cadherin, mit dem Prozess der EMT assoziiert.^{69, 86} Anhand von Schnitten aus denselben Hautproben wie in unserer Arbeit, untersuchten Gaiser et al.⁶⁹ die Expression von EpCAM im nodulären und infiltrativen BCC. Hierbei wurde deutlich, dass es im IBCC signifikant häufiger zu einem Verlust von EpCAM entlang der Tumorinvasionsfront kam als im NBCC. Dies wurde vor allem mit dem Verlust von interzellulärer Adhäsion durch verminderte EpCAM-Expression und der damit verbundenen Tendenz zu invasivem Wachstum erklärt. Des Weiteren wurde auf den modulierenden Einfluss von EpCAM auf Cadherin-basierte Zellverbindungen (wie z.B. AJs) hingewiesen.⁶⁹ Dieser Einfluss wurde von der Arbeitsgruppe um Litvinov et al. umfassend untersucht. Hier stellte sich heraus, dass EpCAM zwar keine Wirkung auf die absolute Menge an Cadherinen innerhalb der Zelle hat, sehr wohl aber die Interaktion zwischen Cadherinen und dem Zytoskelett negativ beeinflussen kann. Es konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte Expression von EpCAM zu einer Reduktion des zellulären α -Catenins sowie zu einer Unterbrechung der Verbindung zwischen α -Catenin und den Aktinfilamenten führt.^{87, 88} Balzar et al.⁸⁹ stellten die Vermutung an, dass EpCAM und E-Cadherin in sich verändernden bzw. proliferierenden Geweben mit noch unreifen Zellkontakten um die Bindungsstelle der Aktinfilamente konkurrieren. In epithelialen Zellreihen konnte hingegen eine Koexpression von EpCAM und E-Cadherin innerhalb von ausgereiften Zellkontakten nachgewiesen werden.⁸⁹ Beim Vergleich unserer Ergebnisse mit den Ergebnissen von Gaiser et al.⁶⁹ fiel auf, dass es im IBCC entlang der Tumorinvasionsfront sowohl zu einem deutlichen Verlust von EpCAM als auch von E-Cadherin kam. In 22 der 29 Fälle, in denen ein EpCAM-Verlust nachzuweisen war, fanden wir gleichzeitig einen Verlust von E-Cadherin (vgl. Abb. 13 und 14). Hieraus lässt sich jedoch keine allgemeingültige Aussage über einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Expression von E-Cadherin und EpCAM treffen. Dennoch scheinen beide Moleküle, bzw. deren Verlust großen Einfluss auf das Wachstumsmuster des BCC zu nehmen, sodass es hilfreich sein könnte, weitere Untersuchungen über den Mechanismus der EpCAM-basierten Modulation von Cadherinen anzustellen. Ob eine eventuelle Interaktion von EpCAM und E-Cadherin sowie deren Funktionen im Rahmen der EMT eine Bedeutung für die Entstehung und das Wachstumsmuster des BCC haben, muss noch untersucht werden.

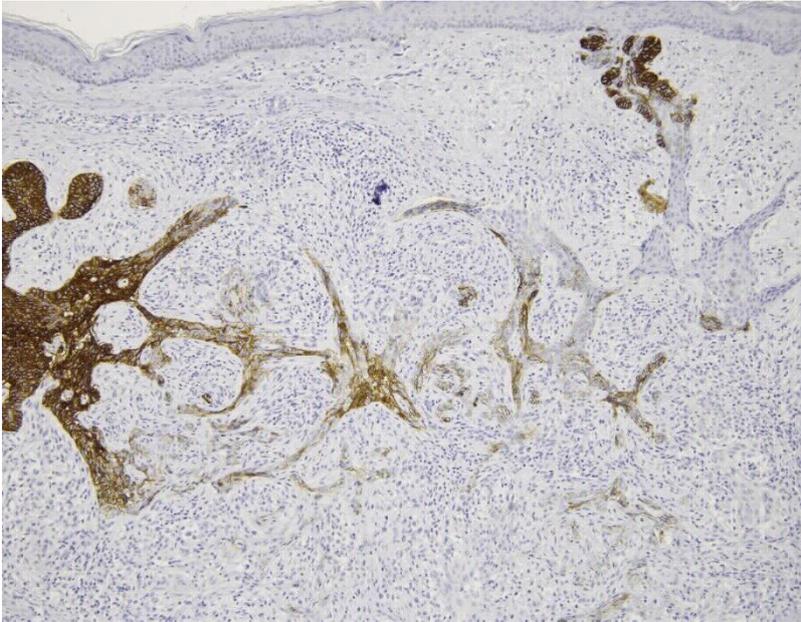


Abb. 13.: deutlicher Verlust von EpCAM in einem IBCC-Fall, übernommen von Gaiser et al.⁶⁹

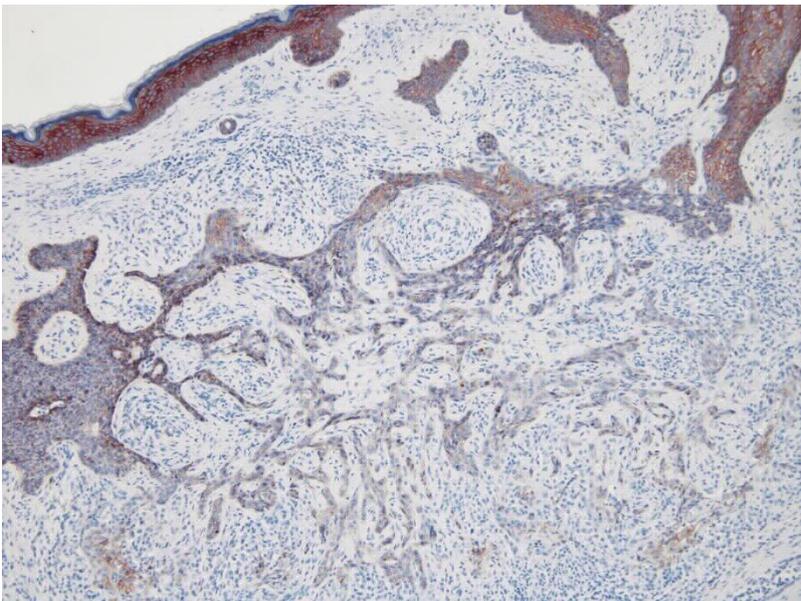


Abb. 14: deutlicher Verlust von E-Cadherin im selben IBCC-Fall (vgl. Abb. 13)

4.3 Ausblick: β -Catenin und E-Cadherin im therapeutischen Kontext

Derzeit stellen Substanzen, welche in den Hedgehog-Signalweg eingreifen, wie z.B. Vismodegib oder Sonidegib einen wichtigen Therapieansatz in der Behandlung des lokal fortgeschrittenen und metastasierten BCC dar.¹² Die Behandlung von Patient:innen mit Progress unter Therapie mit Hh-Signalweg-Inhibitoren mittels Checkpoint-Inhibitoren (aktuell Cemiplimab) wird derzeit in einer Phase-II-Studie geprüft.⁹⁰ Weiterhin existieren einige Studien, welche die Wirksamkeit von Antikörpern, die gegen bestimmte Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges gerichtet sind und somit die Funktion und Wirkungsweise von β -Catenin beeinflussen, untersuchen. Zu den Angriffspunkten dieser Antikörper gehören unter anderem die Proteinbiosynthese, die Proteininteraktion, die epigenetische Regulation sowie die Transkription bestimmter Zielgene von bzw. durch β -Catenin.⁹¹ Es ist bekannt, dass sich der Wnt- und der Hh-Signalweg vor allem durch gemeinsame Regulatorproteine sowie durch die Interaktion mit β -Catenin gegenseitig beeinflussen und in ihrer Wirkungsweise überschneiden.⁹² Anhand eines Mausmodells konnte festgestellt werden, dass Tumorzellen des BCC, welche resistent gegen eine Therapie mit Vismodegib waren, durch eine Behandlung mit einem Wnt-Signalweg-Inhibitor in ihrer Zahl weiterhin reduziert werden konnten.⁹³ In Zukunft könnte es von Interesse sein, die Expression von β -Catenin in den verschiedenen Subtypen des BCC detaillierter zu untersuchen, die Wichtigkeit des Wnt-Signalweges in dieser Tumorentität genauer zu beschreiben sowie aus diesen Erkenntnissen potentielle Therapiemöglichkeiten für fortgeschrittene Stadien des BCC abzuleiten.

Mutationen, welche zu einem Verlust von E-Cadherin führen, sind für einige Karzinome bekannt.⁵¹ EGFR-TKIs (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors), wie z.B. Gefitinib, stehen für die systemische Behandlung vieler dieser Tumorentitäten zur Verfügung. Studien haben gezeigt, dass die Expression von E-Cadherin essentiell ist für das Ansprechen von Tumorzellen auf eine Behandlung mit EGFR-TKIs, und dass der Verlust von E-Cadherin in Zusammenhang mit einer Therapieresistenz steht.^{94, 95} Im Bereich der malignen Hauttumoren kommen EGFR-TKIs leitliniengemäß lediglich für die Behandlung des fortgeschrittenen SCC der Haut zum Einsatz.^{96, 97} Ob dies auch für die Behandlung von fortgeschrittenen Stadien des BCC in Frage kommt, und ob der Verlust von E-Cadherin im IBCC Grundlage für eine solche Überlegung sein könnte, wurde unseres Wissens nach bisher in keiner Studie thematisiert.

5. Zusammenfassung

Das Basalzellkarzinom ist der häufigste Hautkrebs des Menschen und stellt ein zunehmendes Problem für das Gesundheitswesen dar. Obwohl Basalzellkarzinome selten metastasieren, kann es dennoch zu invasivem und destruierendem Wachstum kommen. Einige histologische Subtypen neigen zu häufigen Rezidiven, was oftmals wiederholte chirurgische Interventionen notwendig macht. Obwohl der zelluläre Ursprung des Basalzellkarzinoms noch nicht vollständig erforscht ist, weisen Studien darauf hin, dass dieser in Zellen der interfollikulären Epidermis oder der äußeren Schicht des Haarfollikels liegt. In mehreren Studien wurde eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen als eine mögliche Ursache für invasives Wachstum des Basalzellkarzinoms beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression von β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein entlang der Tumorinvasionsfront im nodulären und infiltrativen Basalzellkarzinom zu untersuchen und zu erläutern, inwiefern die unterschiedliche Ausprägung dieser Moleküle Einfluss auf das Wachstumsmuster des Basalzellkarzinoms nehmen könnte.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Expression von β -Catenin im nodulären und infiltrativen Basalzellkarzinom beschrieben werden. Es zeigte sich jedoch insofern eine Tendenz, dass der Verlust von membranständigem β -Catenin mit einem invasiven Wachstum einhergehen könnte. In Zusammenschau mit weiteren Studien ließ sich erörtern, dass die Lokalisation von β -Catenin innerhalb der Zelle einen Einfluss auf das Wachstumsmuster und die Progression des Basalzellkarzinoms hat. Bei der Betrachtung von E-Cadherin konnte im infiltrativen Basalzellkarzinom im Vergleich zum nodulären Subtyp eine signifikant reduzierte Expression festgestellt werden. Diese Beobachtung lässt sich gut mit der aktuellen Studienlage in Einklang bringen. Da sich im Laufe der Arbeit wiederholt Probleme im Umgang mit dem Antikörper gegen Desmoglein ergaben, entschieden wir uns, die Untersuchung dieses Adhäsionsmoleküls einzustellen.

Im Bereich der epithelialen Hauttumoren wird vor allem das Plattenepithelkarzinom als risikoreich eingestuft. Im Hinblick auf die stetig steigende Inzidenz des teils hochgradig destruierend wachsenden Basalzellkarzinoms, erscheint es jedoch aus wirtschaftlichen sowie aus gesundheitspräventiven Gesichtspunkten als sinnvoll, auch den Hintergrund dieser Tumorentität genauer zu betrachten. Unsere Beobachtungen weisen in Verbindung mit weiteren Studienergebnissen darauf hin, dass β -Catenin und E-Cadherin wichtige Faktoren für die Invasivität des Basalzellkarzinoms darstellen. Sowohl aus diagnostischer wie auch aus therapeutischer Sicht könnte der Fokus auf den Einfluss dieser und weiterer Adhäsionsmoleküle auf das Basalzellkarzinom von Nutzen sein. Ausführlichere Untersuchungen sind allerdings nötig, um weitere Erkenntnisse über Moleküle der interzellulären Adhäsion im Kontext des invasiven und destruierenden Wachstums des Basalzellkarzinom zu liefern.

6. Literaturverzeichnis

1. Cameron, MC, Lee, E, Hibler, BP, Barker, CA, Mori, S, Cordova, M, Nehal, KS, Rossi, AM: Basal cell carcinoma. Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. *J Am Acad Dermatol*, 80: 303-317, 2019.
2. Barysch, MJ: Nicht-melanozytärer Hautkrebs. *Praxis* 105: 1071-1077, 2016.
3. Reifenberger, J, Ruzicka, T: Basalzellkarzinom. In: *Dermatologie und Venerologie*. 5. ed. edited by Braun-Falco, O, Plewig, G, Wolff, HH, Burgdorf, WHC, Landthaler, M, Heidelberg, Springer, 2005, pp 1250-1257.
4. Bresler, SC, Padwa, BL, Granter, SR: Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Head Neck Pathol*, 10: 119-124, 2016.
5. Sellheyer, K: Basal cell carcinoma: cell of origin, cancer stem cell hypothesis and stem cell markers. *Br J Dermatol*, 164: 696-711, 2011.
6. Rubin, AI, Chen, EH, Ratner, D: Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 353: 2262-2269, 2005.
7. Kieker, F: Nävi und Tumoren der Haut. In: *Kurzlehrbuch Dermatologie*. edited by Sterry, W, Stuttgart, Thieme, 2011, pp 199-226.
8. Hauswirth, U: Basalzellkarzinom. In: *Duale Reihe Dermatologie*. 8. ed. edited by Moll, I, Stuttgart, Thieme, 2016, pp 315-338.
9. Xu, A, Patel, V, Sutton, L, Orengo, I: Infiltrative basal cell carcinoma mimicking tinea corporis. *Dermatol Online J*, 24, 2018.
10. Laga, AC, Schaefer, IM, Sholl, LM, French, CA, Hanna, J: Metastatic basal cell carcinoma. Molecular ancillary testing and reappraisal of histopathology within a rare entity. *Am J Clin Pathol*, 152: 706-717, 2019.
11. Ratner, D, Lowe, L, Johnson, TM, Fader, DJ: Perineural spread of basal cell carcinomas treated with Mohs micrographic surgery. *Cancer*, 88: 1605-1613, 2000.
12. Deutsche Dermatologische Gesellschaft, Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO) der Deutschen Krebsgesellschaft: *S2k-Leitlinie Basalzellkarzinom der Haut. Langfassung, 2018*, AWMF Registernummer 032 - 021, Online: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-021l_S2k_Basalzellkarzinom-der-Haut_2018-09_01.pdf, Stand: 07.06.2020.
13. Marzuka, AG, Book, SE: Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical Features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med*, 88: 167-179, 2015.
14. Prieto-Granada, C, Rodriguez-Waitkus, P: Basal cell carcinoma: Epidemiology, clinical and histologic features, and basic science overview. *Curr Probl Cancer*, 39: 198-205, 2015.

15. Alter, M, Hillen, U, Leiter, U, Sachse, M, Gutzmer, R: Current diagnosis and treatment of basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges*, 13: 863-874, 2015.
16. Walling, HW, Fosko, SW, Geraminejad, PA, Whitaker, DC, Arpey, CJ: Aggressive basal cell carcinoma: Presentation, pathogenesis, and management. *Cancer Metastasis Rev*, 23: 389-402, 2004.
17. Trakatelli, M, Morton, C, Nagore, E, Ulrich, C, del Marmol, V, Peris, K, Basset-Seguín, N: Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management. *Eur J Dermatol*, 24: 312-329, 2014.
18. Garcia, MA, Nelson, WJ, Chavez, N: Cell-cell junctions organize structural and signaling network. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10, 2018.
19. Welsch, U: Zelladhäsionsmoleküle und Zellkontakte. In: *Lehrbuch Histologie Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*. edited by Welsch, U, Kummer, W, München, Elsevier, 2018, pp 32-39.
20. Sumigray, KD, Lechler, T: Cell adhesion in epidermal development and barrier function. *Curr Top Dev Biol*, 112: 383-414, 2015.
21. Brembeck, F, Rosário, M, Birchmeier, W: Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*, 16: 51-59, 2006.
22. Xu, W, Kimelman, D: Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci*, 120: 3337-3344, 2007.
23. Valenta, T, Hausmann, G, Basler, K: The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J*, 31: 2714-2736, 2012.
24. Kretschmar, K, Clevers, H: Wnt/ β -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Dev Biol*, 428: 273-282, 2017.
25. Nelson, WJN, Roel: Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*, 303: 1483-1487, 2004.
26. Jamora, C, Fuchs, E: Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 4: 101-108, 2002.
27. van Roy, F, Berx, G: The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 64: 3765-3788, 2008.
28. Takeichi, M: The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102: 639-655, 1988.
29. Thiery, JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2: 442-454, 2002.
30. Lu, W, Kang, Y: Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. *Dev Cell*, 49: 361-374, 2019.
31. Hirohashi, S: Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*, 153: 333-339, 1998.

32. Garrod, DR, Merritt, AJ, Nie, Z: Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 14: 537-545, 2002.
33. Thomason, HA, Scothern, A, McHarg, S, Garrod, DR: Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J*, 429: 419-433, 2010.
34. Denning, MF, Guy, SG, Ellerbroek, SM, Norvell, SM, Kowalczyk, AP, Green, KJ: The expression of desmoglein isoforms in cultured human keratinocytes is regulated by calcium, serum, and protein kinase C. *Exp Cell Res*, 239: 50-59, 1998.
35. Green, KJ, Simpson, CL: Desmosomes: new perspective on a classic. *J Invest Dermatol*, 127: 2499-2515, 2007.
36. Amagai, M, Stanley, JR: Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol*, 132: 776-784, 2012.
37. Sadik, C, Zillikens, D, Hertl, M: Bullöse Autoimmundermatosen. In: *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. 7. ed. edited by Plewig, G, Ruzicka, T, Kaufmann, R, Hertl, M, Berlin, Heidelberg, Springer, 2018.
38. Hanakawa, Y, Matsuyoshi, N, Stanley, JR: Expression of desmoglein 1 compensates for genetic loss of desmoglein 3 in keratinocyte adhesion. *J Invest Dermatol*, 119: 27-31, 2002.
39. Pilichou, K, Nava, A, Basso, C, Beffagna, G, Bauce, B, Lorenzon, A, Frigo, G, Vettori, A, Valente, M, Towbin, J, Thiene, G, Danieli, GA, Rampazzo, A: Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*, 113: 1171-1179, 2006.
40. Kljuic, A, Bazzi, H, Sundberg, JP, Martinez-Mir, A, O'Shaughnessy, R, Mahoney, MG, Levy, M, Montagutelli, X, Ahmad, W, Aita, VM, Gordon, D, Uitto, J, Whiting, D, Ott, J, Fischer, S, Gilliam, TC, Jahoda, CAB, Morris, RJ, Panteleyev, AA, Nguyen, VT, Christiano, AM: Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell*, 113: 249-260, 2003.
41. Sebio, A, Kahn, M, Lenz, H-J: The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 18: 611-615, 2014.
42. Taciak, B, Pruszyńska, I, Kiraga, L, Bialasek, M, Krol, M: Wnt signaling pathway in development and cancer. *J Physiol Pharmacol*, 69: 185-196, 2018.
43. Fukumaru, K, Yoshii, N, Kanzaki, T, Kanekura, T: Immunohistochemical comparison of β -catenin expression by human normal epidermis and epidermal tumors. *J Dermatol*, 34: 746-753, 2007.
44. Oh, ST, Kim, HS, Yoo, NJ, Lee, WS, Cho, BK, Reichrath, J: Increased immunoreactivity of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and β -catenin in high-risk basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 165: 1197-1204, 2011.
45. Kooy, AJ, Tank, B, de Jong, AA, Vuzevski, VD, van der Kwast, TH, van Joost, T: Expression of E-cadherin, alpha- & beta-catenin, and CD44V6 and the

- subcellular localization of E-cadherin and CD44V6 in normal epidermis and basal cell carcinoma. *Hum Pathol*, 30: 1328-1335, 1999.
46. El-Bahrawy, M, El-Masry, N, Alison, M, Poulsom, R, Fallowfield, M: Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 148: 964-970, 2003.
 47. Rajabi, P, Heydarpoor, M, Maghsoudi, A, Mohaghegh, F, Mobarakeh, MD: The study for diagnostic value of β -catenin immunohistochemistry marker in distinction of aggressive and non-aggressive basal cell carcinoma. *Iran J Pathol*, 14: 52-60, 2018.
 48. Saldanha, G, Ghura, V, Potter, L, Fletcher, A: Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol*, 151: 157-164, 2004.
 49. Lang, CMR, Chan, CK, Veltri, A, Lien, W-H: Wnt signaling pathways in keratinocyte carcinomas. *Cancers (Basel)*, 11: 1216, 2019.
 50. Vleminckx, K, Vakaet Jr, L, Mareel, M, Fiers, W, van Roy, F: Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66: 107-119, 1991.
 51. Bruner, HC, Derksen, PW: Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion and the development and progression of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10, 2018.
 52. Hazan, RB, Qiao, R, Keren, R, Badano, I, Suyama, K: Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*, 1014: 155-163, 2004.
 53. Kuphal, S, Bosserhoff, AK: E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. *Arch Biochem Biophys*, 542: 43-47, 2012.
 54. Nagamine, E, Hirayama, K, Matsuda, K, Okamoto, M, Ohmachi, T, Uchida, K, Kadosawa, T, Taniyama, H: Invasive front grading and epithelial-mesenchymal transition in canine oral and cutaneous squamous cell carcinomas. *Vet Pathol*, 54: 783-791, 2017.
 55. Chaw, SY, Abdul Majeed, A, Dalley, AJ, Chan, A, Stein, S, Farah, CS: Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers – E-cadherin, beta-catenin, APC and vimentin – in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol*, 48: 997-1006, 2012.
 56. Koseki, S, Aoki, T, Ansai, S, Hozumi, Y, Mitsushashi, Y, Kondo, S: An immunohistochemical study of E-cadherin expression in human squamous cell carcinoma of the skin: relationship between decreased expression of E-cadherin in the primary lesion and regional lymph node metastasis. *J Dermatol*, 26: 416-422, 1999.
 57. Margulis, A, Zhang, W, Alt-Holland, A, Pawagi, S, Prabhu, P, Cao, J, Zucker, S, Pfeiffer, L, Garfield, J, Fusenig, NE, Garlick, JA: Loss of intercellular adhesion activates a transition from low- to high-grade human squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 118: 821-831, 2006.

58. Pizarro, A, Benito, N, Navarro, P, Palacios, J, Cano, A, Quintanilla, M, Contreras, F, Gamallo, C: E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *Br J Cancer*, 69: 157-162, 1994.
59. Pizarro, A, Gamallo, C, Benito, N, Palacios, J, Quintanilla, M, Cano, A, Contreras, F: Differential patterns of placental and epithelial cadherin expression in basal cell carcinoma and in the epidermis overlying tumours. *Br J Cancer*, 72: 327-332, 1995.
60. Myklebust, MP, Fluge, Ø, Immervoll, H, Skarstein, A, Balteskard, L, Bruland, O, Dahl, O: Expression of DSG1 and DSC1 are prognostic markers in anal carcinoma patients. *Br J Cancer*, 106: 756-762, 2012.
61. Tada, H, Hatoko, M, Tanaka, A, Kuwahara, M, Muramatsu, T: Expression of desmoglein I and plakoglobin in skin carcinomas. *J Cutan Pathol*, 27: 24-29, 2000.
62. Hütz, K, Zeiler, J, Sachs, L, Ormanns, S, Spindler, V: Loss of desmoglein 2 promotes tumorigenic behavior in pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog*, 56: 1884-1895, 2017.
63. Fukuoka, J, Dracheva, T, Shih, JH, Hewitt, SM, Fujii, T, Kishor, A, Mann, F, Shilo, K, Franks, TJ, Travis, WD, Jen, J: Desmoglein 3 as a prognostic factor in lung cancer. *Hum Pathol*, 38: 276-283, 2007.
64. Wang, L, Liu, T, Wang, Y, Cao, L, Nishioka, M, Aguirre, RL, Ishikawa, A, Geng, L, Okada, N: Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3, and β -catenin in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and cell proliferation. *Virchows Arch*, 451: 959-966, 2007.
65. Kurzen, H, Münzing, I, Hartschuh, W: Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin. *J Cutan Pathol*, 30: 621-630, 2003.
66. Arnold, E: Bedeutung von Desmoglein 2 und Desmoglein 3 für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten. Naturw. Dissertation. *Graduate School of Life Sciences*. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2014.
67. Pietkiewicz, P, Gornowicz-Porowska, J, Bowszyc-Dmochowska, M, Jagielska, J, Helak-Łapaj, C, Kaczmarek, E, Dmochowski, M: Discordant expression of desmoglein 2 and 3 at the mRNA and protein levels in nodular and superficial basal cell carcinoma revealed by immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Clin Exp Dermatol*, 39: 628-635, 2014.
68. Imai, K, Kumagai, S, Nakagawa, K, Yamamoto, E, Nakanishi, I, Okada, Y: Immunolocalization of desmoglein and intermediate filaments in human oral squamous cell carcinomas. *Head and Neck* 17: 204-212, 1995.
69. Gaiser, MR, Hirsch, D, Gaiser, T: Loss of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in infiltrative basal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 11: 406-412, 2018.

70. Nieset, JE, Redfield, AR, Jin, F, Knudsen, KA, Johnson, KR, Wheelock, M, J: Characterization of the interactions of α -catenin with α -actinin and β -catenin/plakoglobin. *J Cell Sci*, 110: 1013-1022, 1997.
71. Aktary, Z, Alaei, M, Pasdar, M: Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget*, 8: 32270-32291, 2017.
72. Papadavid, E, Pignatelli, M, Zakyntinos, S, Krausz, T, Chu, AC: Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin/catenin (α -, β - and γ -) complex in premalignant and malignant non-melanocytic skin tumours. *J Pathol*, 196: 154-162, 2002.
73. Benjamin, JM, Nelson, WJ: Bench to bedside and back again: molecular mechanisms of alpha-catenin function and roles in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*, 18: 53-64, 2008.
74. Kobiela, A, Fuchs, E: Links between alpha-catenin, NF-kappaB, and squamous cell carcinoma in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 2322-2327, 2006.
75. Lan, Y, Chen, H, Chen, J, Lei, Q, Zheng, M, Shao, Z: Immunolocalization of vimentin, keratin 17, Ki-67, involucrin, β -catenin and E-cadherin in cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 20: 263-266, 2014.
76. Yamazaki, F, Aragane, Y, Kawada, A, Tezuka, T: Immunohistochemical detection for nuclear β -catenin in sporadic basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 145: 771-777, 2001.
77. Whitaker, HC, Girling, J, Warren, AY, Leung, H, Mills, IG, Neal, DE: Alterations in beta-catenin expression and localization in prostate cancer. *Prostate*, 68: 1196-1205, 2008.
78. Arozarena, I, Bischof, H, Gilby, D, Belloni, B, Dummer, R, Wellbrock, C: In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion. *Oncogene*, 30: 4531-4543, 2011.
79. Kumar, R, Bashyam, MD: Multiple oncogenic roles of nuclear β -catenin. *J Biosci*, 42: 695-707, 2017.
80. Agilent: Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung. 2009.
81. Tucci, MG, Lucarini, G, Zizzi, A, Rocchetti, R, Brancorsini, D, Di Primio, R, Ricotti, F, Ricotti, G: Cdc42 is involved in basal cell carcinoma carcinogenesis. *Arch Dermatol Res*, 305: 835-840, 2013.
82. Papanikolaou, S, Bravou, V, Gyftopoulos, K, Nakas, D, Repanti, M, Papadaki, H: ILK expression in human basal cell carcinoma correlates with epithelial–mesenchymal transition markers and tumour invasion. *Histopathology*, 56: 799-809, 2010.
83. Lilien, J, Balsamo, J, Arregui, C, Xu, G: Turn-off, drop-out: Functional state switching of cadherins. *Dev Dyn*, 224: 18-29, 2002.

84. Orsulic, S, Huber, O, Aberle, H, Arnold, S, Kemler, R: E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci*, 112: 1237-1245, 1999.
85. Gottardi, CJ, Wong, W, Gumbiner, BM: E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol*, 28: 1049-1060, 2001.
86. Driemel, C, Kremling, H, Schumacher, S, Will, D, Wolters, J, Lindenlauf, N, Mack, B, Baldus, S, Hoya, V, Pietsch JM, Panagiotidou, Raba, K, Vay, C, Vallböhmer, D, Harréus, U, Knoefel, W, Stoecklein, N, Gires, O: Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*, 33: 4904-4915, 2014.
87. Litvinov, SV, Balzar, M, Winter, MJ, Bakker, HAM, Briaire-de Bruijn, IH, Prins, F, Fleuren, GJ, Warnaar, SO: Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell–cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol*, 139: 1337-1348, 1997.
88. Winter, MJ, Nagelkerken, B, Mertens, AEE, Rees-Bakker, HAM, Briaire-de Bruijn, IH, Litvinov, SV: Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*, 285: 50-58, 2003.
89. Balzar, M, Prins, FA, Bakker, HAM, Fleuren, GJ, Warnaar, SO, Litvinov, SV: The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res*, 246: 108-121, 1999.
90. Stratigos, AJ, Sekulic, A, Peris, K, Bechter, O, Prey, S, Kaatz, M, Lewis, KD, Basset-Seguín, N, Chang, ALS, Dalle, S, Orland, AF, Licitra, L, Robert, C, Ulrich, C, Hauschild, A, Migden, MR, Dummer, R, Li, S, Yoo, S, Mohan, K, Coates, E, Jankovic, V, Fiaschi, N, Okoye, E, Bassukas, ID, Loquai, C, De Giorgi, V, Eroglu, Z, Gutzmer, R, Ulrich, J, Puig, S, Seebach, F, Thurston, G, Weinreich, DM, Yancopoulos, GD, Lowy, I, Bowler, T, Fury, MG: Cemiplimab in locally advanced basal cell carcinoma after hedgehog inhibitor therapy: an open-label, multi-centre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 22: 848-857, 2021.
91. Katoh, M: Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review). *Int J Mol Med*, 42: 713-725, 2018.
92. Song, L, Li, Z-Y, Liu, W-P, Zhao, M-R: Crosstalk between Wnt/ β -catenin and Hedgehog/Gli signaling pathways in colon cancer and implications for therapy. *Cancer Biol Ther*, 16: 1-7, 2015.
93. Biehs, B, Dijkgraaf, GJP, Piskol, R, Alicke, B, Boumahdi, S, Peale, F, Gould, SE, de Sauvage, FJ: A cell identity switch allows residual BCC to survive Hedgehog pathway inhibition. *Nature* 562: 429-433, 2018.
94. Xing, RC, Zheng, J, Zheng, WH, Qin, ZP, Liu, W, Yao, RC: Relevance of E-cadherin expression to EGFR-TKI molecular targeted therapy sensitivity/resistance and its clinical significance. *Genet Mol Res*, 14: 5785-5792, 2014.

95. Xin, H, Yang, J, Nguyen, D: Sensitivity to epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor requires E-Cadherin in esophageal cancer and malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res*, 33: 2401-2408, 2013.
96. Gutzmer, R, Wiegand, S, Kölbl, O, Wermker, K, Heppt, M, Berking, C: Actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*, 116: 616-626, 2019.
97. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): *S3-Leitlinie Aktinische Keratose und Plattenepithelkarzinom der Haut, Langversion 1.1, 2020*, AWMF Registernummer: 032/022OL, Online: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/aktinische-keratosen-und-plattenepithelkarzinom-der-haut/>, Stand: 08.04.2022.

7. Lebenslauf

Personalien

Name: Birga Klingler
Geburtsdatum: 13.05.1996
Geburtsort: Tuttlingen

Schulischer Werdegang

2001-2013 Grundschole Hausen o.V. und Gymnasium Spaichingen
18.04.2013 Abitur

Universitärer Werdegang

2014 - 2016 Vorklinischer Teil des Medizinstudiums an der Universität Szeged, Ungarn
21.06.2016 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
2016 - 2020 Klinischer Teil des Medizinstudiums an der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
06.-08.10.2020 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
2020 – 2021 Praktisches Jahr
24.11.2021 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

8. Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Gaiser für die Überlassung des Themas, für zahlreiche konstruktive Gespräche sowie für ein immerzu offenes Ohr bei Fragen und Problemen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Arif-Said bedanken, die mir bei der Arbeit im Labor eine großartige Anleiterin und Unterstützung war.

Mein Dank geht auch an Frau Büttner aus der Abteilung für Medizinische Statistik, die mir mit viel Geduld und Expertise bei den statistischen Berechnungen eine große Hilfe war.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich auf meinem Weg begleitet und mir ermöglicht haben, meinen Traum zu verwirklichen.