

Aus der Klinik für Dermatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Homey

CCR10 und Morbus Paget

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Daria Nespeca
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Homey

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein

An meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (deutsch)	V
Zusammenfassung (englisch)	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Morbus Paget.....	1
1.2 Chemokine und ihre Rezeptoren.....	3
1.3 Die Rolle von CCL27 und CCR10 im Immunsystem	8
1.4 CCL27 und CCR10 bei der Tumorprogression und Metastasierung	9
1.5 Morbus Paget und CCR10 und CCL27 – Zielsetzung der Studie.....	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.2 Untersuchungsmaterial	15
2.3 Patientendaten	16
2.4 Protokoll für die immunhistochemische Färbung von CK7	17
2.5 Protokoll für die immunhistochemische Färbung von CCR10 und CCL27	18
2.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	20
3 Ergebnisse	22
3.1 Patientenkollektiv	22
3.2 CCR10-Expression.....	24
3.3 CCL27-Expression.....	31
4 Diskussion	36
4.1 Bedeutung der CCL27/CCR10-Interaktion für das Survival von Tumorzellen.....	36
4.2 Bedeutung des CCR10/CCL27-Signalings für das Survival und die Tumormigration in die epitheliale Nische.....	38
4.3 CCR10-Expression beim EMPD und MPD.....	39
4.4 Limitationen der Untersuchung.....	40
4.5 Ausblick.....	42
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	44
6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	49
7 Danksagung	51

Zusammenfassung (deutsch)

Der Morbus Paget ist ein seltenes Adenokarzinom der Haut, das 1874 erstmals von James Paget beschrieben wurde. Aktuell werden zwei Tumorentitäten unterschieden: der mammäre Morbus Paget (MPD) und der extramammäre Morbus Paget (EMPD). Paget-Zellen zeigen histopathologisch eine charakteristische intraepidermale Lokalisation. Sie treten überwiegend einzeln oder in Gruppen an der Basalmembran auf oder durchsetzen schrotschussartig die oberen Epithelschichten. Die Ursachen dieses Musters sind ungeklärt.

Chemokine sind eine Gruppe von Proteinen, die über Chemotaxis die Migration von Zellpopulationen steuern. Chemokine sind in zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse involviert. Die Interaktion des von Keratinozyten exprimierten Chemokins CC-Ligand 27 mit dem CC-Rezeptor 10 spielt bei der Einwanderung von Immunzellen in das Epithel eine Rolle. CCR10 ist auch auf der Oberfläche von verschiedenen Tumorzellen nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CCR10 und CCL27 bei Morbus Paget untersucht. Die CCR10-Expression der Paget-Zellen wurde über eine immunhistochemische Färbung bestimmt. Es wurden in Paraffin eingebettete Proben von 33 Patienten mit der Diagnose Morbus Paget ausgewertet. Die Mehrzahl der Paget-Zellen exprimierten CCR10. Bei 29 der 33 Proben trat eine schwache bis starke CCR10-Expression auf. MPD-Zellen zeigten im Vergleich zu EMPD-Zellen eine stärkere CCR10-Expression. Bei der Analyse von CCL27 wurde die schwache Expression in Keratinozyten erwartungsgemäß bestätigt. Somit ist eine Expression des Rezeptors (CCR10) durch die Tumorzellen und des Liganden (CCL27) durch den Tumor umgebende Zellen beim Morbus Paget gegeben.

Eine CCR10/CCL27-Interaktion wurde bei anderen Tumorentitäten bereits beschrieben und ist auch bei Morbus Paget vorstellbar. Diese Interaktion könnte bei der charakteristischen, histologisch nachweisbaren Verteilung von Paget-Zellen eine Rolle spielen. Die basalmembranbetonte Verteilung der CCR10-positiven Paget-Zellen wäre durch das erhöhte CCL27-Niveau in dieser epithelialen Nische zu erklären. Möglicherweise nutzen die Tumorzellen diese Interaktion für ihr Überleben und für ihre intraepidermale Ansiedlung. Diese Aspekte könnten in der Pathogenese des Morbus Paget eine entscheidende Rolle spielen und sollten weiter untersucht werden.

Zusammenfassung (englisch)

Paget's disease is a rare skin adenocarcinoma, which was first described by James Paget in 1874. Currently, two tumor types are distinguished: the Paget disease of the breast (also mammary Paget disease (MPD)) and the extra-mammary Paget disease (EMPD). Histopathologically, Paget cancer cells show characteristic intraepidermal localization. They occur mainly as single cells or in groups at the basal membrane of the skin. Some cells are detached from the basal membrane and ascend into the upper epithelial layers. The causes of this cell pattern are not understood.

Chemokines are a group of proteins that control the migration of cell populations via chemotaxis. Chemokines are involved in different physiological and pathological processes. The interaction of the chemokine CC-ligand 27 (CCL27), which is expressed by keratinocytes, with the CC-receptor 10 (CCR10) plays a role during the migration of immune cells into the epithelium. CCR10 is also detectable on the surface of various tumor cells.

In the present analysis, the expression of CCR10 and its ligand CCL27 in Paget's disease was investigated. The CCR10 expression of the Paget cells was determined by immunohistochemical staining. Paraffin-embedded samples of 33 patients with Paget disease were evaluated. The majority (29 of 33 samples) of the Paget cells expressed CCR10. MPD cells showed a stronger CCR10 expression compared to the EMPD cells. The analysis of CCL27 confirmed a weak expression in keratinocytes, as expected. Thus, the expression of both CCR10 (tumor cell) and CCL27 (surrounding cells) is present in Paget's disease.

The CCR10/CCL27-interaction has been outlined already in other tumor entities and is also conceivable in Paget's disease. This interaction may play a role in the typical histological pattern of tumor cells in Paget's disease. The basal membrane-biased conglomeration of CCR10-positive Paget cells could be explained by the increased CCL27-level in this epithelial niche. The tumor cells may use the CCR10/CCL27-interaction for their survival and intraepidermal settlement. These aspects may play a crucial role in the pathogenesis of Paget's disease and should be further investigated.

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Anti-CK7	Antikörper gegen Cytokeratin 7
CCR10	CC-chemokine receptor type 10
CK7	Cytokeratin 7
CCL27	CC-chemokine ligand 27
CL, CCL, CXCL, CX3CL	Chemokin-Subfamilien
CR, CCR, CXCR, CX3CR	Chemokinrezeptor-Subfamilien
EMDP	Extramammärer Morbus Paget
GPRP	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	hour
HE	Hämatoxylin/Eosin
HRP	Horse-radish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
medRSD	Medical Research School Düsseldorf
min	Minute
MIS	Melanoma <i>in situ</i>
MM	Malignes Melanom
MP	Morbus Paget
MPD	Mammärer Morbus Paget
mRNA	messenger ribonucleic acid
PBS	phosphate-buffered saline
PCA	Prostatakarzinom
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
UKD	Universitätsklinik Düsseldorf

1 Einleitung

1.1 Morbus Paget

Beim Morbus Paget handelt es sich um ein intraepidermales Adenokarzinom. 1874 beschrieb James Paget zum ersten Mal die Paget-Krankheit mit einem prädominanten Befall der Brustwarze (mammärer Morbus Paget, engl. mammary Paget's disease, nachfolgend MPD) [39]. Später entdeckte Radcliffe Crocker ein intraepidermales Adenokarzinom der Haut, das auch andere Körperregionen befällt (extramammärer Morbus Paget, engl. extramammary Paget's disease, nachfolgend EMPD) [9].

Beide Tumortypen kommen selten vor, haben gemeinsame klinische Merkmale und ähneln entzündlichen und infektiösen Hautkrankheiten [28]. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung gibt es nur wenige Studien zur Inzidenz des Morbus Paget [10] [53]. Die Häufigkeit beider Tumorentitäten ist unterschiedlich – in ca. 90 % der Fälle handelt es sich um ein MPD und in nur ca. 10 % um ein EMPD [10]. Der MPD ist häufig mit dem duktalem Mammakarzinom assoziiert [21]. Bei bis zu 4,3 % der Mammakarzinom-Patienten wird ein MPD als zweiter Tumor diagnostiziert [20].

Ein EMPD ist deutlich seltener als ein MPD und befällt meist die anogenitale Region [38]. In Europa liegt die Inzidenz des EMPD bei 0,7 pro 100.000 Personen im Jahr. Frauen sind etwas häufiger als Männer betroffen [52]. Das Durchschnittsalter bei Erkrankungsbeginn schwankt zwischen 50 und 60 Jahren. Der EMPD tritt in Hautarealen mit hohem Anteil an apokrinen Schweißdrüsen auf. Am häufigsten ist die Vulva befallen; 1–5 % aller malignen Tumoren der Vulva sind ein EMPD. Neben der Anogenitalregion (Perineum, Scrotum, perianale Region) sind in seltenen Fällen die Achselhöhlen betroffen. In Ausnahmefällen kann es zur Infiltration der Augenlider oder der Gehörgänge kommen [38].

Der EMPD ist häufig mit anderen Tumoren assoziiert. Beschrieben wurde die Assoziation mit kolorektalen Karzinomen, Basalzellkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Harnblasenkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und Vulva-Plattenepithelkarzinomen [1,42]. Aufgrund der geringen EMPD-Inzidenz konnte eine Koinzidenz mit den meisten viszeralen und urogenitalen Tumoren bis jetzt nicht genau evaluiert werden [42]. Die Koinzidenz mit Prostatakarzinomen (PCA) wird

auf 10,4 % geschätzt [47]. Interessanterweise weist der EMPD gewisse Ähnlichkeiten mit PCA-Zellen auf – EMPD-Zellen exprimieren z. T. das prostata-spezifische Antigen (PSA) [2,15]. In der Literatur wird diskutiert, dass das PCA möglicherweise bei der Entstehung des EMPD eine Rolle spielen könnte.

Histopathologisch weisen der MPD und EMPD zahlreiche Ähnlichkeiten auf. In einer meist hyperplastischen und parakeratotischen Epidermis finden sich häufig einzelne und regellos zerstreute, große, helle Zellen mit großen pleomorphen Kernen.

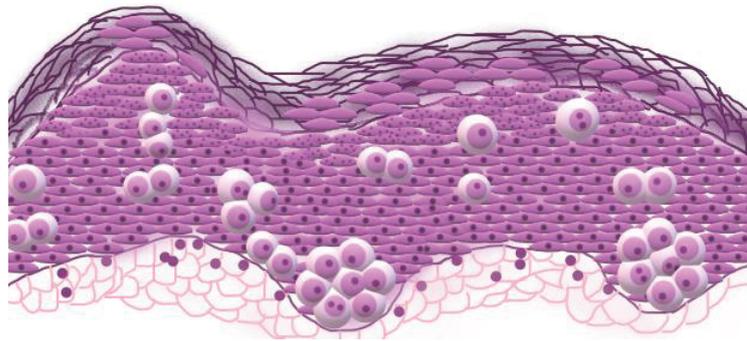


Abbildung 1: Paget Zellen – Hämatoxylin/Eosin-Färbung¹

Diese Paget-Zellen besitzen ein basophiles oder amphiphiles, feinkörniges Zytoplasma (s. Abb. 1). Sie zeigen einen großen, zentral gelegenen Zellkern mit einem prominenten Kleinkern. Außerdem können vereinzelt Siegelringzellen beobachtet werden. Die Mitoserate ist in der Regel hoch. Die Paget-Zellen können einzeln verteilt sein oder bilden eine Zellgruppe in Form einer Drüsenstruktur oder einzelne Nester. Seltener kann es zur Infiltration der oberen Schichten der Epidermis kommen. Das histologische Bild zeigt meist eine prädominante Ansammlung der Paget-Zellen im unteren Teil der Epidermis, z. T. können Paget-Zellen in Talgdrüsen oder Schweißdrüsenöffnungen vorkommen [11,28]. In die oberen Epidermisschichten steigen meistens einzelne Zellen auf. Der Grund für dieses intraepitheliale Muster ist aktuell noch ungeklärt.

Es werden bei den beiden Tumorarten auch zytoplasmatische Unterschiede beobachtet. Beim EMPD enthalten die Tumorzellen in über 90 % der Fälle ein Mucin, das mit der *Mucicarmin*- und Periodic-acid-Schiff-reaction-(PAS)-Färbung anfärbbar ist. Beim MPD trifft dies nur in 40 % der Fälle zu. Beide Färbungen fallen beim MPD generell schwächer aus, als beim EMPD [28]. Eine

¹ Die Grafik wurde in Paint 3D in Anlehnung an Amorim *et al.*(2015) [13] generiert

pathophysiologische Bedeutung dieses Unterschiedes wurde bis jetzt noch nicht gefunden.

Zur Diagnosestellung des MPD und EMPD existiert eine Vielzahl von immunhistochemischen Färbungen. Darunter hat sich Anti-Cytokeratin 7 (CK7) Antikörper als immunhistochemischer Marker der Wahl bei der Diagnostik der Paget-Krankheit etabliert. CK7 wird bekannterweise von einigen Adenokarzinomen exprimiert [24], was einen Hinweis auf die Herkunft der Paget-Zellen gibt. Da sich einzelne Paget-Zellen sehr deutlich anfärben lassen, wird CK7 auch zur Bestimmung der chirurgischen Ränder bei kleinen multifokalen Läsionen routinemäßig verwendet [49].

1.2 Chemokine und ihre Rezeptoren

Der Name "Chemokin" wurde für chemotaktisch wirkende Zytokine im Jahr 1992 auf dem dritten internationalen Symposium der chemotaktischen Zytokine in Baden geprägt. Der Name beschreibt eine typische Eigenschaft der Chemokine. Die Zytokine sind in der Lage eine zielgerichtete Zellbewegung zu induzieren, diese Fähigkeit wird als Chemotaxis bezeichnet [36,45].

Chemokine sind eine Gruppe von niedermolekularen Proteinen (8–14 Kd), die insbesondere bei der Regulation von Leukozyten eine wichtige Rolle spielen [14]. Bis heute wurden ca. 50 dieser Signalproteine entdeckt [6,36]. Die Aminosäuresequenzen der Chemokine weisen untereinander signifikante Homologien auf und sind zwischen 20 und 80 % identisch [22,29]. Die Chemokine werden in vier Subfamilien unterteilt. Die Zugehörigkeit zu einer dieser Familie hängt von der Zahl und der Position der Cysteinreste im Aminoterminus der Proteinsequenz ab (s. Abb. 2). Bei den Alpha-Chemokinen (CXC-Ligand-(CXCL)-Gruppe) werden die beiden ersten Cysteinreste durch eine Aminosäure getrennt. Bei den Beta-Chemokinen (CCL-Gruppe) fehlt diese Aminosäure und die Cysteinreste liegen direkt nebeneinander. Die CCL-Chemokingruppe ist die größte Chemokin-Subfamilie. Bei den Gamma-Chemokinen (CX3CL-Gruppe) liegen drei Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinresten [6,12,29]. In der CL-Gruppe befindet sich am Aminoterminus nur ein Cystein. Diese Gruppe beinhaltet nur ein Chemokin (Lymphotactin [6]).

Die Cysteine bilden Cystinbrücken, wodurch die Tertiärstruktur der Chemokine geprägt wird (s. Abb. 2). Von allen Domänen des Proteins verfügt der N-loop, der dem mittleren Anteil der aminoterminalen Domäne entspricht, über die höchste Flexibilität (s. Abb. 3). Dieser Anteil spielt bei der Chemokinrezeptorbindung und -aktivierung eine Rolle. In der Mitte der Proteine befinden sich drei konservierte Beta-Faltblätter, der C-terminale Bereich entspricht einer Alpha-Helix. Die Tertiärstruktur ist für alle Chemokine identisch [12].

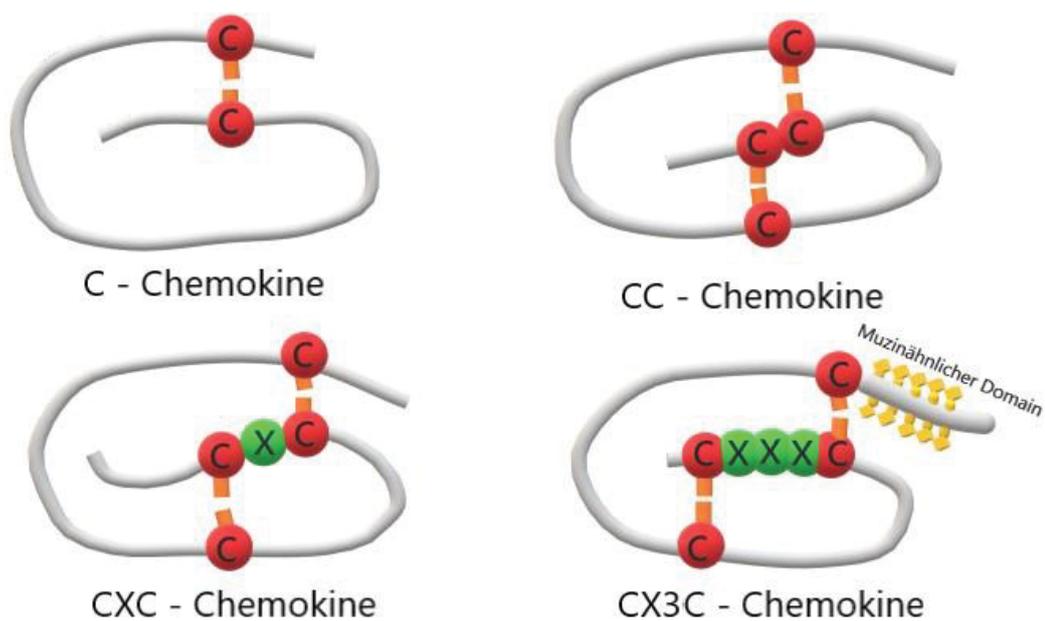


Abbildung 2: Chemokinstruktur – C-, CC-, CXC- und CX3C-Ligand-Gruppe ²

Chemokine werden in vier Subfamilien (C- oder γ , CC- oder β -, CXC oder α - und CX3C- oder δ -Chemokine) unterteilt. Dabei steht „C“ für Cystein und „X“ für andere Aminosäuren. In der C-Gruppe kommt nur ein konservierter Cysteinrest im aminoterminalen Bereich vor; in der CC-Gruppe liegen die Cysteinreste direkt nebeneinander; in der CXC-Gruppe werden die beiden Cysteinreste durch eine Aminosäure getrennt; in der CX3C-Gruppe liegen zwischen den beiden Cysteinresten drei Aminosäuren.

² Die Grafik wurde in Paint 3D in Anlehnung an Luster (1998) [29] generiert

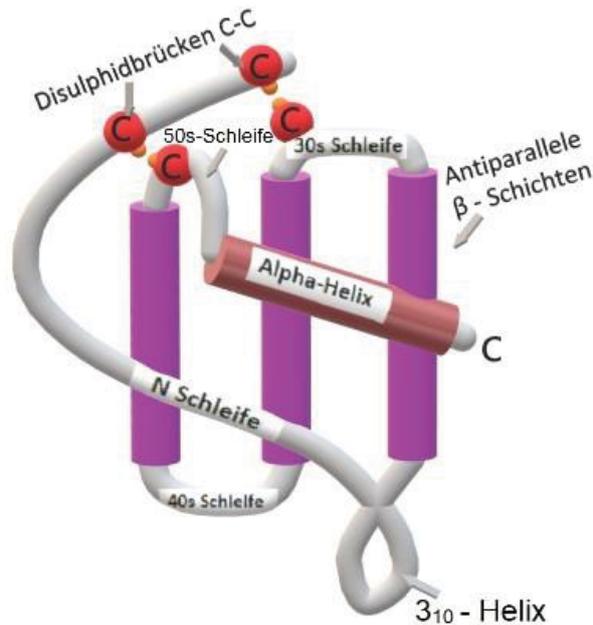


Abbildung 3: Tertiärstruktur der Chemokine³

In der Tertiärstruktur folgen nach der N-Schleife und 3₁₀-Helix antiparallel zueinander angeordnete β -Stränge und eine carboxy-(C)-terminale α -Helix. Jeder β -Strang ist durch eine flexible Windung (30s-, 40s-Schleife) mit dem nächsten β -Strang verbunden. Die 30s-Schleife ist für die Aktivität vieler Chemokine besonders wichtig. Der dritte β -Strang ist durch eine 50s-Schleife mit der C-terminalen α -Helix verbunden. Die Disulfidbrücken befinden sich zwischen den Cysteinresten der aminoterminalen-(N)-Schleife und den Cysteinresten der 30s- und 50s-Schleife.

Chemokine regulieren die zielgerichtete Bewegung von verschiedenen Leukozyten über die Interaktion mit einer Untergruppe von G-Protein-gekoppelten Sieben-Transmembran-Rezeptoren [6,36,59]. Diese Chemokinrezeptoren befinden sich auf der Oberfläche unterschiedlicher Zellen und werden durch die Chemokine aktiviert [37]. Als Folge der Bindung des Chemokins an seinen Rezeptor wird typischerweise eine Kaskade von intrazellulären Ereignissen induziert. Das wichtigste davon ist die Aktivierung von Phospholipase C, die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol generiert. Diese Second Messenger führen zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C. Außerdem werden andere intrazelluläre Enzyme, wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase, und Ras-Proteine aktiviert. Die Aktivierung dieser intrazellulären Signalmoleküle führt schließlich

³ Die Grafik wurde in Paint 3D in Anlehnung an Fernandez and Lolis (2002) [12] generiert

zur Umgruppierung der Aktinfilamente. Es kommt zu einer „Wanderungsbewegung“ der Zellen entlang des Konzentrationsgradienten der Chemokine [12,29,45].

Die Chemokinrezeptoren bestehen aus 340 bis 370 Aminosäuren [37]. Sie enthalten sieben Transmembrandomänen sowie drei intra- und drei extrazelluläre Loops (s. Abb. 4). Der Aminoterminus befindet sich im Extrazellulärraum und der Carboxyterminus im Zytoplasma.

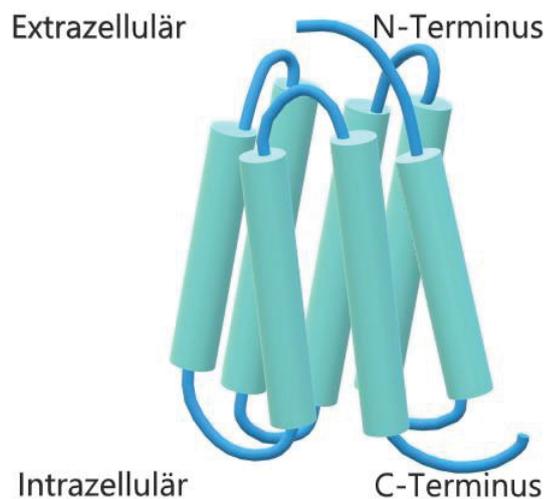


Abbildung 4: Dreidimensionale Struktur des Chemokinrezeptors am Beispiel von CXCR1⁴

Die dreidimensionale Struktur von CXCR1 entspricht einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPRP) mit sieben Transmembranhelices, die durch jeweils drei extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen verbunden sind. Extrazellulär liegen der Amino-(N)-Terminus und Cystein-haltige Aminosäuresequenzen und intrazellulär der Carboxy-(C)-Terminus.

1991 wurde der Rezeptor von CXCL8 und Interleukin-(IL)-8 als erster Chemokinrezeptor beschrieben [16,35]. Bis heute wurden insgesamt 19 Chemokinrezeptoren entdeckt. Die Chemokinrezeptoren werden nach ihren Liganden in unterschiedliche Klassen unterteilt (s. Abb. 5). Die erste Gruppe (CXCR) beinhaltet sechs Rezeptoren, die mit einem oder mehreren Chemokinen der CXC-Gruppe interagieren. Die zehn CCR binden an ein oder mehrere CC-Chemokine. Die Klassen CX3CR und XCR bestehen jeweils aus nur einem Mitglied [16,43].

⁴ Die Grafik wurde in Paint 3D in Anlehnung an Park *et al.* (2012) [41] generiert

Chemokine receptors	Chemokines systematic names
CXCR1	CXCL6
	CXCL8
CXCR2	CXCL1
	CXCL2
	CXCL3
	CXCL5
	CXCL7
CXCR3	CXCL9
	CXCL10
	CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CCR1	CCL3
	CCL5
	CCL7
CCR2	CCL2
	CCL7
	CCL8
	CCL13
CCR3	CCL5
	CCL11
	CCL13
	CCL28
CCR4	CCL17
	CCL22
CCR5	CCL4
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19
	CCL20
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL28
	CCL27
CCR11	CCL25
CX3CR1	CX3CL1
XCR1	XCL1

Abbildung 5: Chemokine und Chemokin-Rezeptoren – systematische Nomenklatur und Interaktionen⁵

⁵ Die Grafik wurde Excel in Anlehnung an Proudfoot (2002) [43] generiert

1.3 Die Rolle von CCL27 und CCR10 im Immunsystem

Als äußere Barriere zur Umgebung wird die Haut ununterbrochen durch physikalische, chemische und biologische Einflüsse beansprucht. Zum Schutz der Haut und zur Aufrechterhaltung der Homöostase sind unterschiedliche Immunprozesse erforderlich. Neben lokalen epithelialen Immunzellen, die die primäre Abwehr ermöglichen, werden im Falle von Noxen zirkulierende Immunzellen in das betroffene Gewebe rekrutiert. Die gewebsspezifische Migration von Immunzellen wird durch Chemokine und Chemokinrezeptoren reguliert. Im Rahmen der epithelialen Immunität spielen insbesondere der Chemokinrezeptor CCR10 und sein Ligand CCL27 eine Rolle [17,18,57].

Das hautassoziierte Chemokin CCL27 (auch cutaneous T-cell attracting chemokine (CTACK), ALP und ESKine) wird vorwiegend von Keratinozyten exprimiert. In der gesunden Haut liegt das CCL27 im Zytoplasma der Keratinozyten vor. Die höchsten Expressionsraten von CCL27 zeigen Keratinozyten in den basalen Schichten der Epidermis, wohingegen Keratinozyten der suprabasalen Schichten geringere Mengen an CCL27-Protein exprimieren. Insgesamt ist unter normalen physiologischen Bedingungen die CCL27-Expression relativ gering [18,32]. Außerdem wurde gezeigt, dass die CCL27-messenger-Ribonukleinsäure-(mRNA) auch im primären oralen Epithel exprimiert wird. Unter gewissen Bedingungen kommt es zur Steigerung der CCL27-Expression. Beispielsweise erhöhen der Tumornekrosefaktor-(TNF)- α und IL-1 β *in vitro* die CCL27-mRNA-Produktion in Keratinozyten [18]. Darüber hinaus steigt das Proteinniveau von CCL27 in oralen Primärzellen nach Interferon-(IFN)- γ -Behandlung an [30].

Der Rezeptor CCR10 (G-protein-coupled receptor-(GPR)-2)) wird auf der Zelloberfläche von Skin-homing, cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positiven T-Zellen, dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, Fibroblasten sowie Melanozyten exprimiert. Die Interaktion zwischen CCR10 und CCL27 steuert bei Entzündungsprozessen die Migration von Immunzellen in die Haut. Der Chemokinrezeptor CCR10 fördert den Skin-*homing*-Prozess von spezifischen T-Zellen, was zur Aufrechterhaltung der dermalen Immunabwehr beiträgt [17,18]. Einige Experimente belegen, dass CCR10 und sein Ligand an der dermalen Inflammation beteiligt sind, indem sie die T-Zell-Infiltration steigern. In Hautläsionen der akuten oder chronischen atopischen Dermatitis und bei Psoriasis zeigen die

epidermalen Keratinozyten eine gesteigerte CCL27-Expression und die meisten der hautinfiltrierenden Lymphozyten exprimieren CCR10. In *in vivo* Experimenten bewirkte die intrakutane CCL27-Injektion die Rekrutierung der Lymphozyten zur Injektionsstelle. Umgekehrt unterband eine Neutralisierung der CCL27/CCR10-Wechselwirkung die Rekrutierung von Lymphozyten in die Haut und unterdrückte somit eine Allergen-induzierte Hautentzündung. Zusammen belegen diese Befunde, dass die CCL27/CCR10-Interaktion eine Schlüsselrolle bei T-Zell-vermittelten Hautentzündungen spielt [18].

1.4 CCL27 und CCR10 bei der Tumorprogression und Metastasierung

Der Körper reagiert auf Tumoren mit der Ausschüttung von Chemokinen und aktiviert dadurch verschiedene Prozesse. Die Rolle von Chemokinen beim Tumorwachstum und bei der Tumorprogression rückt zunehmend in den Fokus der Forschung. Chemokine stimulieren die Proliferation von Tumorzellen, reduzieren die Apoptose und fördern somit das Tumorwachstum. Chemokine können wie bei Immunzellen eine Tumorzellmigration auslösen, was zur Metastasierung führt. Weiterhin beeinflussen Chemokine das Tumorwachstum durch ihre Wirkung auf Tumorstromazellen auch indirekt. Dabei spielt die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und pro-angiogenetischen Faktoren in die Mikroumgebung des Tumors eine Rolle [3,7]. Tumorzellen tragen Chemokinrezeptoren [3] und können sich entlang von Chemokingradienten bewegen [3,8]. Die Chemokin-Ligand/Rezeptor-Interaktion beeinflusst die Entwicklung sowohl in der Frühphase des Tumors als auch im fortgeschrittenen Stadium im Rahmen der Metastasierung [54]. Die involvierten Prozesse sind komplex und beinhalten eine für das Tumorstadium spezifische Chemokinsekretion. Dadurch entsteht eine geeignete Mikroumgebung für den Tumor, was die Überlebenschancen der Tumorzellen verbessert [3]. Beispielsweise interagiert CXCR4 auf Brustkrebszellen mit CXCL12, wodurch das Tumorwachstum und die Metastasierung unterstützt wird [23].

Einige maligne Zellen tragen selbst zum Aufbau der Tumormikroumgebung bei, indem sie Chemokine produzieren, die eigene Chemokinrezeptoren aktivieren. Durch diesen autokrinen Loop wird die Zellteilung und das Zellwachstum eventuell beschleunigt.

CXCR4 wird von Brustkrebszellen konstitutiv exprimiert [4]. Studien belegen, dass Brustkrebszellen in Organe mit einer hohen CXCL12-Produktion metastasieren [33,34]. Dazu zählen die Lunge, Lymphknoten und das Knochengewebe [56]. Daneben wurde gezeigt, dass Brustkrebszellen auch zur Sekretion von CXCL12 fähig sind. Die Expression erfolgt nur in frühen Brustkrebsstadien beim primären Mammakarzinom. Möglicherweise schaffen sich die Brustkrebszellen so über die CXCL12-Produktion selbst eine Mikroumgebung, die das Tumorstadium und die Verbreitung der Tumorzellen beschleunigen kann. Weiter wurde *in vitro* nachgewiesen, dass die CXCL12-Produktion die Apoptose von Tumorzellen hemmt [27].

Brustkrebszellen exprimieren auch andere Chemokine. Beim Mammakarzinom aktiviert die CCL27/CCR10-Wechselwirkung die extracellulär-regulierte Kinase (ERK)1/2-Aktivierung, was zu einer erhöhten Produktion der Matrixmetalloproteinase-(MMP)-9 führt und die Invasivität der Brustkrebszellen erhöht. Die CCR10-Expression ist mit der Kapselinvasion, dem Tumorstadium und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert [19].

Außerdem wurde die CCR10-Expression bei Plattenepithelkarzinomen [31] sowie bei Melanomen nachgewiesen. Bei malignen Melanomen (MM) wurde eine erhöhte Expression im fortgeschrittenen Stadium beobachtet. Demnach ist die CCR10/CCL27-Interaktion möglicherweise ein wichtiger Einflussfaktor der Tumorstadiumprogression bei MM [44]. Laut einer weiteren Studie ist die CCL27/CCR10-Expression bei Melanomen mit Tumordicken unter 1 mm deutlich erhöht. Bei fortgeschrittenen Tumoren zeigte sich eine verminderte Expression [31]. Aufgrund der teilweise kontroversen Ergebnisse konnte die Rolle von CCR10/CCL27 beim MM noch nicht abschließend geklärt werden. Wahrscheinlich ist jedoch, dass das Mikromilieu des MM durch die CCL27/CCR10-Interaktion mitgestaltet wird und zur Tumorentwicklung beiträgt.

1.5 Morbus Paget und CCR10 und CCL27 – Zielsetzung der Studie

Obwohl die Bedeutung von CCR10 und CCL27 in verschiedenen Tumorentitäten bekannt ist (s. Kapitel 1.4), gibt es in der Literatur keine Erkenntnisse zu dem Chemokin und seinem Rezeptor bei Morbus Paget.

Die histopathologische Struktur bei Morbus Paget ist durch ein besonderes Muster gekennzeichnet: überwiegend liegen die Paget-Tumorzellen an den Basalmembranen an. Einzelne Zellen kuppeln sich von der Basalmembran ab und steigen in die oberen Epithelschichten (Stratum spinosum und corneum). Dieses schrotschussartige Muster ähnelt dem histologischen Muster bei MM. Der Grund für diese besondere Zellverteilung bleibt bis heute unklar. Möglicherweise ist sie durch die Interaktion von CCR10 und CCL27 geprägt.

CCL27 wird primär in den basalen Schichten der Epidermis exprimiert. Die oberen Schichten der Epidermis enthalten nur wenig CCL27. Die Verteilung der CCL27-Konzentration in den Hautschichten ähnelt der Verteilung der Paget-Tumorzellen in der Epidermis.

Der einzige bekannte korrespondierende Rezeptor von CCL27 ist der CCR10. Wenn die CCL27/CCR10-Interaktion bei der Verteilung der Paget-Zellen eine Rolle spielt, müssen die Paget-Zellen CCR10 exprimieren. Dann könnten die erhöhten CCL27-Konzentrationen in den unteren Epidermisschichten die Paget-Zellen chemokingesteuert „festhalten“. Die minimale Anzahl von Paget-Zellen in den oberen epidermalen Schichten wäre in einem solchen Modell auf die reduzierte, aber dennoch vorhandene CCL27-Konzentration in diesem Bereich zurückzuführen.

In dieser Arbeit wurde die Expression der CCR10 und CCL27 bei Morbus Paget untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Name/TYP	Hersteller
Heizplatte	IKAMAG RCT/ Temp Moto	IKA-Labortechnik
Laborkühlschrank 4 °C – 21 °C	Liebherr Premium	Liebherr
Schnellkochtopf	Sicomatic T 4,5 l	Silit-Werke GmbH & Co
Analysewaage	E4000D	Bachofer, 7410 Reutlingen
Brutschrank	D 06062 Modell 600	Memmert GmbH + Co KG
Kleinschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Labormikroskop, invers	P 46 72 59 – 9901	ZEISS West Germany
Trockenschrank	Typ B 6030, 8914576	Heraeus D-6450 Hanau
Polypropylen Reagenzglas mit Rundboden (ohne Verschluss)	Stil 12 x 75 mm, Steril/gamma-bestrahlt.	Falcon 2053 Becton Dickinson
Fettstift (Dako Pen)	S2002	Dako Denmark A/S

Die in Tabelle 2 gelisteten Reagenzien wurden im Labor hergestellt/gemischt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der im Labor hergestellten Reagenzien

Phosphate Buffered Saline (PBS) – Lösung		
Natriumchlorid	160 g	Carl ROTH GmbH + Co. Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	28 g	Carl ROTH GmbH + Co. Karlsruhe
Kaliumchlorid	4 g	Carl ROTH GmbH + Co. Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat 1 kg	4 g	Carl ROTH GmbH + Co. Karlsruhe
Aqua Dest	ad 1 l	Demi-Wasser
Wasserstoffperoxid-Lösung (3 %)		
Wasserstoffperoxid 30 % ROTIPURAN p.a., ISO, stabilisiert	100 ml	Carl ROTH GmbH + Co. Karlsruhe
PBS-Lösung	900 ml	siehe oben
3-Amino-9-Ethylcarbazol-(AEC)-Lösung		
Peroxidase Substrate KIT SK – 4200 Buffer pH 5.3 Substrate reagent	300 ml	Vector laboratories
AEC Substrate reagent		
Hydrogen Peroxide Substrate reagent		
Buffer pH 5.3 Substrate reagent		

Die in Tabelle 3 aufgeführten Reagenzien wurden fertig von den jeweiligen Herstellern bezogen.

Tabelle 3: Fertige Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Ethanol 50%	Universitätsklinikum Düsseldorf Zentralapotheke
Ethanol 80%	Universitätsklinikum Düsseldorf Zentralapotheke
Ethanol 96%	Universitätsklinikum Düsseldorf Zentralapotheke
Ethanol 99%	Universitätsklinikum Düsseldorf Zentralapotheke
Xylen (Xylol)	AnalAR NORMAPUK
Pufferlösung pH 9	Dako Target Retrieval solution, pH 9 (10 x)
Pufferlösung pH 6	Dako Target Retrieval solution, pH 6 (10 x)
Peroxidase Goat IgG	PK 1005 Vectastain ABC KIT, Vector Laboratories Inc.
Peroxidase Mouse IgG	PK 4002 Vectastain ABC KIT, Vector Laboratories Inc.
Serum Horse	Biochrom # S9135 Lot:0533W; Exp: 05/2014
Hämalaunlösung Sauer nach Mayer für die Mikroskopie	Art. Nr. T 865.3 Roth GmbH
Lithiumcarbonat	Roth GmbH
Aqua Dest	PZN 04914151, Demi-Wasser
Kleber	Shandon Immu-Mount 20 ml, Thermo scientific, USA

In Tabelle 4 sind die verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Beschreibung		Spezialität	Ursprung
Anti-h-CCR10	Mouse IgG	Monoclonal	Human	DNAX Research, Palo Alto, CA, USA
Anti-CCL27	Monoclonal IgG2A	Mouse	Human	R&D Systems, Clone124302 MAB3761
IgG1 Isotype Control	Mouse IgG1	Monoclonal	Human	R&D Systems, Clone 11711R
IgG2A Isotype Control	Monoclonal IgG2A	Mouse	Human	R&D Systems, MAB003, Clone 20102

In Tabelle 5 sind die verwendeten Proteine aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Proteine

Proteine	Hersteller
GPR2/CCR10 peptide	Abcam, Cambridge, UK
Recombinant Human CCL27	R&D Systems, MN, USA

Die Auswertung der vorliegenden Daten erfolgte mit der Software ImageJ (Fiji Is Just ImageJ).

2.2 Untersuchungsmaterial

Für die vorgelegte Doktorarbeit wurden histologische Proben von Patienten mit der Diagnose Morbus Paget verwendet. Die Proben wurden im Rahmen einer diagnostischen und/oder therapeutischen Intervention entnommen. Die Schnitte wurden mit dem Antikörper gegen CK7 gefärbt und nach histopathologischen Kriterien kontrolliert. Bei vorliegendem Ethikvotum konnten diese Proben zu Forschungszwecken verwendet werden und standen für die Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung (Therapeutic Target & Diagnostic Discovery and Validation, Ethikvotum Nr. 1928).

Die in Paraffin eingebetteten Präparate stammten aus der Dermatologie der Universitätsklinik Düsseldorf (UKD). Für die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen wurden von einem Präparat im Durchschnitt vier Schnitte

angefertigt. Als Negativkontrollen wurden Gewebeproben aus gesunder Haut verwendet, die beispielsweise von Nachexzisionen bei malignen Tumoren oder von überschüssiger Haut bei Lappentransplantationen anfielen. Für die positive Kontrolle wurden Melanoma *in situ* (MIS) Proben sowie Hautgewebe mit Psoriasis vulgaris verwendet. Tabelle 6 bietet einen Überblick über das verwendete Untersuchungsmaterial.

Tabelle 6: Verwendete Paraffin-eingebettete Präparate

Diagnose	Material	Anzahl
Morbus Paget UKD	Paraffin	37
Gesunde Haut UKD	Paraffin	5
Malignes Melanom UKD	Paraffin	5
Psoriasis vulgaris UKD	Paraffin	4

Die Proben stammen aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD)

2.3 Patientendaten

Außerdem wurden die klinischen Daten der Patienten retrospektiv erhoben. Dies diente dazu, die epidemiologischen Aspekte zu dokumentieren und mögliche Koinzidenzen mit anderen Erkrankungen zu evaluieren. Dabei wurden die in Tabelle 7 gelisteten Parameter erfasst.

Tabelle 7: Patientendaten

Nummer	Patientendaten
1	Geschlecht
2	Lokalisation
3	Alter bei der Diagnosestellung
4	Morbus Paget Typ: EMPD und MPD
5	Angaben zu den weiteren Erkrankungen (unvollständig vorhanden)

Aus Datenschutzgründen erfolgte eine Pseudonymisierung der Probanden. Dafür wurden die Patientennamen durch eine zufällig generierte Nummer ersetzt. Am Ende der Durchführung dieser Arbeit wurden alle nicht mehr benötigten Daten unverzüglich gelöscht.

2.4 Protokoll für die immunhistochemische Färbung von CK7

Die Färbung der Schnitte mit Anti-CK7 Antikörper erfolgte im histopathologischen Routinelabor der dermatologischen Klinik nach einem Standardprotokoll (s. Tab. 8).

Tabelle 8: Protokoll für die immunhistochemische Färbung mit Anti-CK7

Schritt	Verwendete Reagenzien / Geräte	Dauer	Temperatur
1	Wärmeschrank	16 h	37°C
2	Xylol	2 x 15 min	bei RT
3	99% Isopropanol	2 x 5 min	bei RT
4	96% Isopropanol	2 x 5 min	bei RT
5	80% Isopropanol	2 x 5 min	bei RT
6	70% Isopropanol	1 x 5 min	bei RT
7	Aqua Dest	1 x 5 min	bei RT
8	In Puffer pH-9 + Aqua Dest (1:10)	20 min	Bei RT
9	In Puffer pH-9 + Aqua Dest (1:10) im Dampfgerar	20 min	bei 120 °C
10	Spülung in PBS	20 min	bei RT
11	Anti-CK7	15 min	bei RT
12	Spülung in PBS	3 x 5 min	bei RT
13	Sekundärantikörper	15 min	bei RT
14	Spülung in PBS	3 x 5 min	bei RT
15	Labeling Kit	15 min	bei RT
16	Spülung in PBS	3 x 5 min	bei RT
17	Dako Red Avidin	15 min	bei RT
18	Spülung in PBS	5 min	bei RT
19	Gegenfärbung Hämatoxylin	5 sek	bei RT
20	Aqua Dest	5 min	bei RT
21	96 % Isopropanol	2 x 2 sek	bei RT
22	99 % Isopropanol	2 x 2 sek	bei RT
23	Xylol	2 x 2 sek	bei RT
24	Eindeckeln		

2.5 Protokoll für die immunhistochemische Färbung von CCR10 und CCL27

Die Detektion von CCR10 und CCL27 erfolgte über einen indirekten immunhistochemischen Nachweis (s. Abb. 6). Etwa 5 μm dicke Gewebeschnitte wurden auf codierte Objektträger platziert und über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C belassen. Die vorbehandelten Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Für die Antigendemaskierung wurde eine basische Lösung verwendet. Dazu wurde die Pufferlösung pH-9 mit Aqua Dest im Verhältnis 1:10 gemischt. Die Schnitte wurden in dieser Lösung bei ca. 120 °C im Schnellkochtopf 15 min gekocht. Danach wurde eine 3 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung zur Blockade der endogenen Peroxidase zugegeben. Anschließend wurden die Schnitte mit Serum der Spezies des sekundären Antikörpers behandelt und 16 Stunden mit dem spezifischen (primären) Antikörper oder einem unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS-Lösung wurden die Schnitte mit dem sekundären biotinylierten Antikörper inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit Streptavidin/Horse-radish-peroxidase (HRP) und dem 3-Amino-9-ethylcarbazol-(AEC)-Peroxidase-Substrat. Abschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gefärbt und die überschüssige Farbe mit Lithiumcarbonat entfernt. Danach wurden die Schnitte mit einem Deckglas bedeckt und getrocknet (s. Tab. 9).

Für die Durchführung der CCR10-Färbung wurde ein polyklonaler Anti-GPR2/CCR10 Antikörper mit spezifischer Reaktivität gegen murines und humanes CCR10 verwendet. Die optimale Konzentration für die Anfärbung betrug 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die CCL27-Färbung erfolgte mit einem monoklonalen Maus Anti-human CCL27 Antikörper. Die optimale Konzentration zur Färbung der Keratinozyten betrug 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tabelle 9: Protokoll für die immunhistochemische Färbung mit Anti-h-CCR10 und Anti-CCL27

Schritt	Verwendete Reagenzien / Geräte	Dauer	Temperatur
1	Wärmeschrank	60 min	60°C
2	Xylol	2 x 15 min	bei RT
3	99 % Methanol	2 x 5 min	bei RT
4	96 % Methanol	2 x 5 min	bei RT
5	80 % Methanol	2 x 5 min	bei RT
6	70 % Methanol	1 x 5 min	bei RT
7	Aqua Dest	1 x 5 min	bei RT
8	Puffer pH-9 + Aqua Dest (1:10)	15 min	bei 120 °C
9	Spülung in PBS	3 x 5 min	bei RT
10	3 % H ₂ O ₂	10 min	bei RT
11	Spülung in PBS	3 x 5 min	bei RT
12	Normalserum 5% Horse	60 min	bei RT
13	Primärantikörper oder Isotypantikörper	über Nacht (ca. 16 Stunden)	bei 4 °C
14	Spülung in PBS	3 x 5 min	bei RT
15	Sekundärantikörper	45 min	bei RT
16	Spülung in PBS	3 x 5 min	bei RT
17	Streptavidin/HRP (1:500)	45 min	bei RT
18	Spülung in PBS	3 x 5 min	bei RT
19	AEC-Peroxidase-Substrat	10 min	bei RT
20	Spülung in PBS	1 x 5 min	bei RT
21	Hämatoxylin	2 min	bei RT
22	Spülung in Wasser	1 x 1 min 1 x 5 min	bei RT
23	Lithiumcarbonat	2 min	bei RT
24	Spülung in Wasser	2 x 5 min	bei RT
25	Eindeckeln		
26	Trocknen	60 min	bei auf 37 °C vorgewärmter Luft

2.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Expression von CCR10 und CCL27 wurde visuell durch die Bestimmung der Intensität der Anti-CCR10- und Anti-CCL27-Färbung erfasst.

Für die Evaluation wurde ein Immunhistochemie-(IHC)-Scoring mit verschiedenen Expressionsstärke-Kategorien verwendet. Das Scoring unterschiedete zwischen einer starken (2), schwachen (1) und einer fehlenden Expression (0). Einige Schnitte wurden bei der Färbung beschädigt oder enthielten keine Zellen mit einer für Morbus Paget typischen Morphologie. Diese Schnitte wurden der Kategorie (4) zugeordnet und bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Deshalb wurden von 37 Schnitten nur 33 ausgewertet. Die Evaluation der Intensitäten erfolgte durch drei Beobachter unabhängig voneinander. Von den Bewertungen der Beobachter wurde ein Mittelwert berechnet.

Für die digitale Darstellung der fertigen Schnitte wurde ein Nikon Eclipse E 200 Mikroskop mit motorisierter Objektauflage benutzt. Dieses wurde automatisch von der Software Nikon AW 2012 gesteuert.

Nach der Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung wurde die Beleuchtungsstärke angepasst, um die Darstellung der Schnitte zu vereinheitlichen. Zunächst wurde die Hintergrundhelligkeit bestimmt. Dazu wurde ein Abschnitt des Präparates ohne histologisches Material betrachtet. Dieser Abschnitt wurde der weißen Farbe so weit wie möglich angepasst. Dabei wurde der Helligkeitsregler auf die Maximaleinstellung eingestellt, was ca. 4 V entspricht.

Bei der Bildaufnahme wurden die Vergrößerungen 100x, 200x und 400x verwendet.

Die fertigen digitalen Bilder wurden in das Bilderbearbeitungsprogramm automatisch übertragen. Die Vergrößerungsstufe wurde auf jedem Bild mit einem Maßstab (10 μm , 50 μm oder 100 μm) gekennzeichnet.

Des Weiteren wurden alle Bilder im TIFF und PNG-Format auf einem Datenträger gespeichert.

Einige Bilder wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Poster Präsentation (Symposium der Medical Research School Düsseldorf (medRSD) 2018) verwendet. Für die Bearbeitung und Formatierung der Aufnahmen wurde die Software Power Point, Microsoft Word und Image J von Fiji Is Just ImageJ genutzt. Diese Soft-

ware wurde freundlicherweise von der medRSD zur Verfügung gestellt. Die Bearbeitung der Bilder umfasste die Beschriftung, die tabellarische Bilderanordnung sowie die Anpassung an das Standardformat der medRSD.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden die klinischen Daten von Probanden mit der Diagnose Morbus Paget erhoben. Dokumentiert wurden das Geschlecht, das Alter bei der Probeentnahme, der Tumortyp (EMPD oder MPD) sowie die Lokalisation der Läsion.

Das Kollektiv bestand aus 23 männlichen und 14 weiblichen Probanden.

Bei der Diagnosestellung lag das Alter der Probanden zwischen 26 und 94 Jahren. Das mittlere Patientenalter betrug 68,8 Jahre mit einer Standardabweichung von 14,6 Jahren.

Bei 26 Probanden wurde ein EMPD diagnostiziert und bei elf Probanden ein MPD. Bei beiden Geschlechtern wurden sowohl EMPD und MPD diagnostiziert. Jeweils sieben weibliche Probanden litten an einem EMPD oder MPD. Bei den Männern waren 19 Probanden an einem EMPD und vier Probanden an einem MPD erkrankt.

Die Patientencharakteristika sind nach dem Alter der Patienten sortiert in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Charakteristika der Patienten mit EMPD und MPD

Proband	Alter	Geschlecht	EMPD/MPD	Lokalisation
1	27	F	MPD	Mamille rechts
2	40	F	EMPD	Oberschenkel rechts
3	41	F	EMPD	Mons pubis
4	48	M	EMPD	Skrotum links
5	53	M	EMPD	Skrotum rechts/Leiste rechts
6	57	M	MPD	Mamille links
7	60	M	MPD	Mamille rechts
8	62	M	EMPD	Skrotum rechts
9	62	M	EMPD	Perineum
10	64	M	MPD	Brust links
11	66	M	EMPD	Perineum links
12	67	M	EMPD	Penisschaft medial
13	69	M	EMPD	Penisansatz, Leiste rechts
14	69	M	EMPD	keine Angaben
15	70	F	MPD	Submammär links
16	70	M	EMPD	Inguinal links
17	70	M	EMPD	Penisansatz
18	70	M	EMPD	Inguinal links
19	70	F	EMPD	Rima ani
20	71	F	EMPD	Keine Angaben
21	71	M	EMPD	Inguinal rechts
22	71	M	EMPD	Retroaurikulär rechts
23	72	F	MPD	Mamille rechts
24	73	M	EMPD	Mons pubis
25	74	M	EMPD	Inguinal links
26	74	F	EMPD	Scheide
27	76	M	MPD	Mamille links
28	76	F	EMPD	Rima ani
29	78	M	EMPD	Skrotum links
30	78	F	MPD	Brust rechts
31	81	F	EMPD	Vulva rechts
32	86	F	MPD	Mamille links
33	87	F	MPD	Brust links
34	90	M	EMPD	Skrotum beid-seits

Proband	Alter	Geschlecht	EMPD/MPD	Lokalisation
35	90	M	EMPD	keine Angaben
36	91	M	EMPD	Axillarregion
37	95	F	MPD	Brust rechts

Aufgeführt sind Alter (in Jahren), Geschlecht, Morbus Paget Typ und Lokalisation des Morbus Paget Befalls. F = weiblich, M = männlich

3.2 CCR10-Expression

Für die Etablierung der CCR10-Färbung erfolgte zunächst die Färbung der gesunden Haut sowie der MIS-Proben. Die CCR10-Expression wurde über eine immunhistochemische Färbung mittels Anti-CCR10-Antikörper analysiert.

Keratinocyten weisen keine CCR10-Expression auf und dienten als Negativkontrolle. Der Anti-CCR10-Antikörper färbte die dermalen mikrovaskulären Endothelzellen in gesunder Haut und in den MIS-Präparaten. Bei den MIS-Hautpräparaten wurden CCR10-positive Melanomzellen als Positivkontrollen verwendet.

Durch die Positiv- und Negativkontrollen wurde die Sensitivität und Spezifität der CCR10-Färbung überprüft. Die Reaktion mit dem Anti-CCR10-Antikörper war in den Schnitten als rötliche Färbung erkennbar.

Bei einigen Schnitten kam es bei der Färbung mit dem Anti-CCR10-Antikörper zu positiven Reaktionen der Talgdrüsen. Diese Färbung wurde als unspezifisch gewertet und in der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt.

Gesunde Haut (Negativkontrolle)

Die histologischen Befunde der gesunden Haut nach einer Färbung mit dem Anti-CCR10-Antikörper sind beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt. Diese Ansätze dienten in der vorliegenden Analyse als Negativkontrolle der CCR10-Expression verwendet wurden. Wie die Abbildung belegt, zeigten die Keratinocyten keine CCR10-Expression. Die positive Reaktion der intradermal liegenden endothelialen Zellen des vaskulären Plexus wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben [18].

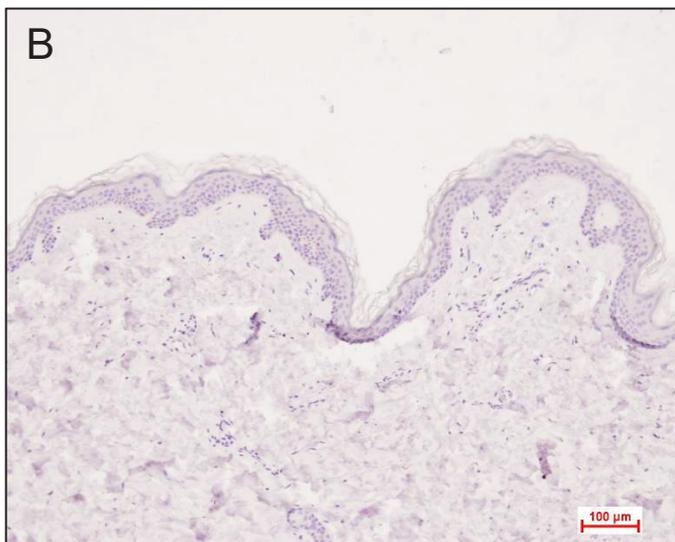


Abbildung 6: Immunhistochemische Analyse der CCR10-Expression in gesunder Haut

A. Repräsentativer Paraffinschnitt (5 μm) nach Färbung mit einem Antikörper gegen humanes CCR10 (Anti-CCR10, Mouse Monoclonal IgG) und Hämatoxylin-Färbung (Vergrößerung 100x). Der Pfeil markiert die dermal liegenden endothelialen Zellen des vaskulären Plexus, die sich rötlich-bräunlich anfärben. **B.** Isotyp-Kontrolle mit IgG1 Isotype-Control, Mouse Monoclonal IgG1 (Vergrößerung 100x)

Malignes Melanom (Positivkontrolle)

In den MIS-Präparaten ist die CCR10-Expression an den intraepidermal gelegenen Melanom-Zellen als rötlich/bräunliche Färbung erkennbar (s. Abb. 7). Auch in der Dermis zeigen die intradermal liegenden endothelialen Zellen des vaskulären Plexus eine schwachrote Färbung.

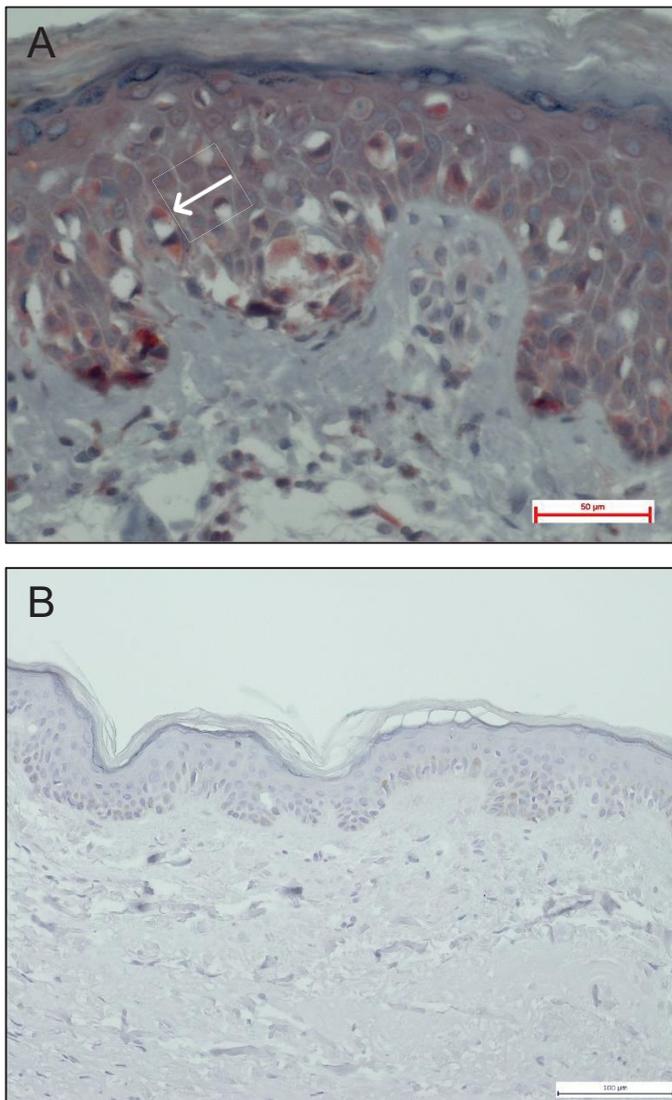


Abbildung 7: Immunhistochemische Analyse der CCR10-Expression in Melanoma *in situ* Präparaten

A. Repräsentativer Paraffinschnitt (5 µm) nach Färbung mit einem Antikörper gegen humanes CCR10 (Anti-CCR10, Mouse Monoclonal IgG) und Hämatoxylin-Färbung (Vergrößerung 400x). Die Pfeile markieren rötlich-bräunlich gefärbte Melanomzellen. **B.** Isotyp-Kontrolle mit IgG1 Isotype-Control, Mouse Monoclonal IgG1 (Vergrößerung 200x)

Morbus Paget, extramammäre Form (EMPD)

Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Beispiel eines EMPD-Präparates nach immunhistochemischer Färbung mit dem Anti-CCR10-Antikörper. Die rötlich angefärbten Zellen in der Epidermis sind Paget-Zellen, die einzeln oder in Zellnesten angeordnet sind.

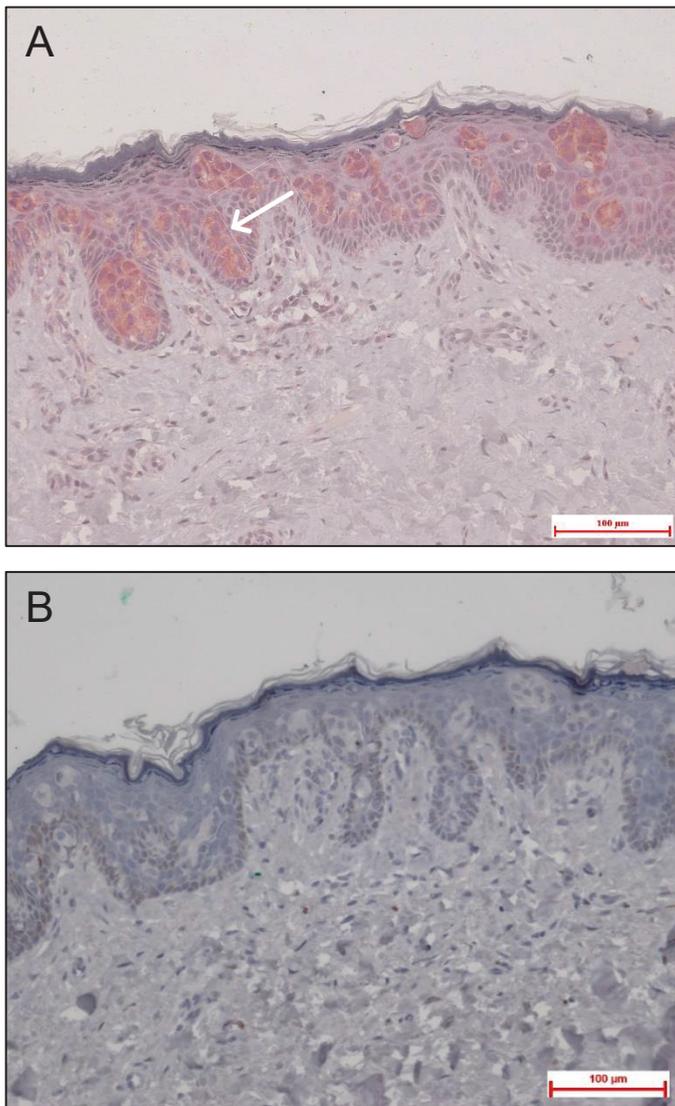


Abbildung 8: Immunhistochemische Analyse der CCR10-Expression in Morbus Paget Zellen (EMPD)

A. Repräsentativer Paraffinschnitt (5 µm) nach Färbung mit einem Antikörper gegen CCR10 (Anti-h-CCR10, Mouse Monoclonal IgG) und Hämatoxylin-Färbung (Vergrößerung 200x). Der Pfeil markiert rötlich-bräunlich gefärbte Paget-Zellen. **B.** Isotyp-Kontrolle mit IgG1 Isotype-Control, Mouse Monoclonal IgG1 (Vergrößerung 200x)

Morbus Paget, mammäre Form (MPD)

Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives MPD-Präparat nach immunhistochemischer Färbung mit dem Anti-CCR10-Antikörper. Die rötlich-orangefarbenen Zellen sind Paget-Zellen.

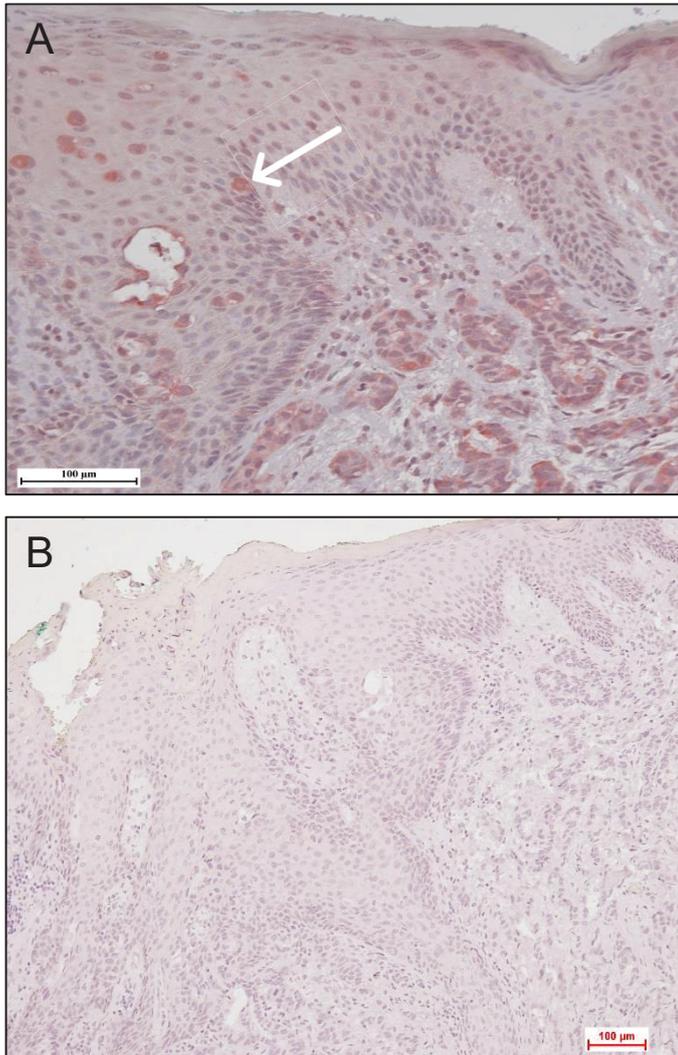


Abbildung 9: Immunhistochemische Analyse der CCR10-Expression in Morbus Paget Zellen (MPD)

A. Repräsentativer Paraffinschnitt (5 µm) nach Färbung mit einem Antikörper gegen CCR10 (Anti-CCR10, Mouse Monoclonal IgG) und Hämatoxylin-Färbung (Vergrößerung 200x). Der Pfeil markiert rötlich-bräunlich gefärbte Paget-Zellen. **B.** Isotyp-Kontrolle mit IgG1 Isotype-Control, Mouse Monoclonal IgG1 (Vergrößerung 100x)

Die CCR10-Expression wurde bei 33 der 37 Proben ausgewertet. Die Proben N° 3, 16 und 25 (Tab. 11) wurden bei der Färbung beschädigt, sodass die CCR10-Expression nicht beurteilt werden konnte. Die Probe N° 2 enthielt keine Zellen mit einer für Morbus Paget typischen Morphologie. Deshalb wurde auch diese Probe aus der Auswertung ausgeschlossen.

Die CCR10-Expression bei Morbus Paget wurde nach der Färbungsintensität in drei Gruppen (negativ „0“, schwach positiv „+“ und stark positiv „++“) eingeteilt (s. Abb. 10).

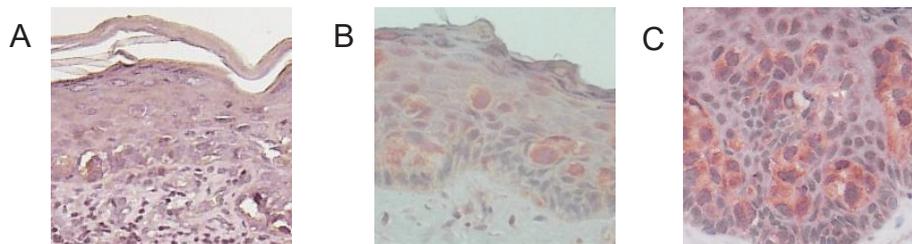


Abbildung 10: Scoring der CCR10-Expression in Paraffinschnitten von Probanden mit Morbus Paget – fehlender (A), schwacher (B) und starker Expression (C)

In Tabelle 11 ist die gruppierte CCR10-Expressionsstärke der 37 in die Studie eingeschlossenen Patienten gelistet.

Tabelle 11: CCR10-Expressionsstärke der 37 Patienten des Patientenkollektivs

Proband Nr.	Stärke der CCR10 - Expression	Proband Nr.	Stärke der CCR10 - Expression
1	+	20	++
2	Defekt bei Färbung	21	0
3	keine Paget-Zellen im Schnitt	22	0
4	+	23	++
5	+	24	++
6	+	25	Defekt bei Färbung
7	++	26	+
8	+	27	++
9	++	28	+
10	+	29	+
11	0	30	0
12	+	31	+
13	+	32	+
14	+	33	+
15	++	34	+
16	Defekt bei Färbung	35	+
17	+	36	+
18	++	37	++
19	+		

starke Expression (++) , schwache Expression (+) , fehlende Expression (0)

Tabelle 12 stellt die Häufigkeit der gruppierte CCR10-Expressionsstärken bei EMPD- und MPD-Patienten gegenüber.

Tabelle 12: CCR10-Expression bei Morbus Paget – Verteilung der Expressionsstärke bei EMPD- und MPD-Patienten

Typ (Anzahl) der Proben	Intensität der immunhistochemischen Färbung		
	fehlende Expression (0)	schwache Expression (+)	starke Expression (++)
EMPD (n = 22)	3	15	4
MPD (n = 11)	1	4	6

3.3 CLL27-Expression

Die CCL27-Expression wurde zunächst in gesunder Haut (Negativkontrolle) und an Psoriasis-befallenen Hautproben (Positivkontrolle) zur Evaluation der Sensitivität und Spezifität der verwendeten Methoden getestet.

In den Paraffin-eingebetteten Proben der gesunden Haut zeigte sich eine schwach positive CCL27-Expression. In den Schnitten mit Psoriasis-befallender Haut wurde eine starke CCL27-Expression beobachtet. Die starke CCL27-Expression zog sich durch alle Hautschichten, ohne eine Betonung basaler Anteile.

Anschließend wurde die CCL27-Expression in den Morbus Paget Schnitten analysiert. Die positive CCL27-Expression zeigte in diesen Schnitten eine basalbetonte Verteilung.

Gesunde Haut (Negativkontrolle)

Die Anfärbung der gesunden Haut mit Anti-CCL27 diente als Negativkontrolle. Dennoch zeigten die Keratinozyten eine schwach positive CCL27-Expression. Eine rötliche Färbung in der Isotypkontrolle wurde nicht beobachtet, wodurch eine unspezifische Färbung ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht dargestellt).

Psoriasis vulgaris (Positivkontrolle)

Abbildung 11 zeigt ein repräsentatives Beispiel der immunhistochemischen CCL27-Färbung bei Psoriasis vulgaris. Die CCL27-Expression ist als rötliche Färbung erkennbar. Die Keratinozyten sind stark angefärbt. Die Basalmembran zeigte im Vergleich zu den anliegenden Hautschichten keine vermehrte CCL27-Expression.

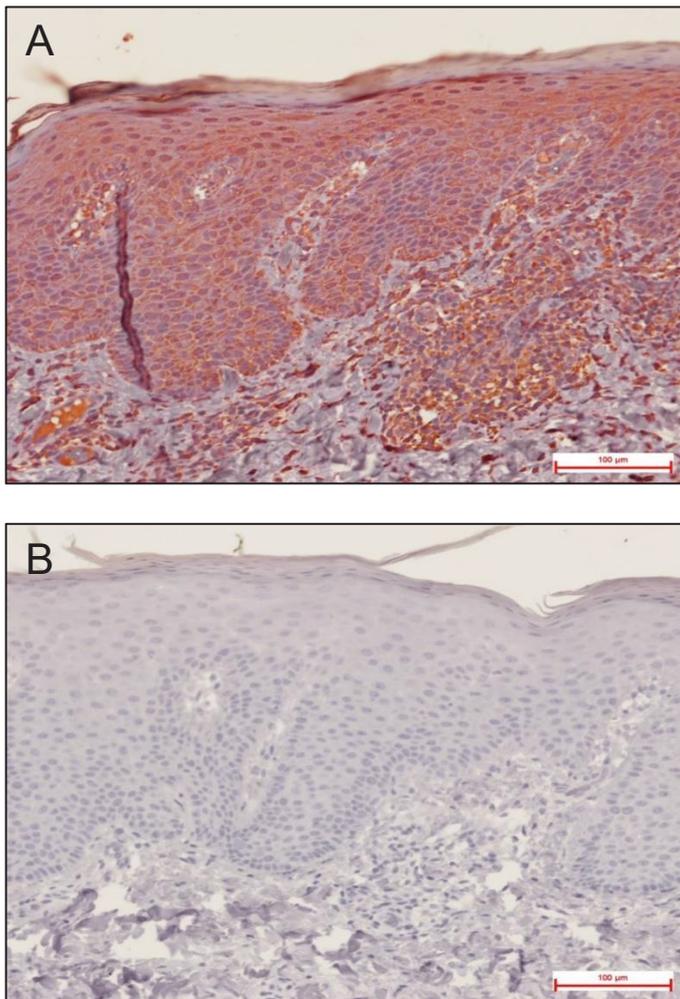


Abbildung 11: Immunhistochemische Analyse der CCL27-Expression in Psoriasis vulgaris
A. Repräsentativer Paraffinschnitt (5 µm) nach Färbung mit einem Antikörper gegen humanes CCL27 (Anti-CCL27, Monoclonal Mouse IgG2A) und Hämatoxylin-Färbung (Vergrößerung 200x)
B. Isotyp-Kontrolle unter Verwendung IgG2A Isotype-Control, Monoclonal Mouse IgG2A (Vergrößerung 200x)

Morbus Paget extramammäre Form (EMPD)

Abbildung 12 zeigt ein repräsentatives Beispiel eines EMPD-Präparates mit basalbetonter CCL27-Expression. Die rötlich-orangefarbene Zellen in der Epidermis sind Keratinozyten.

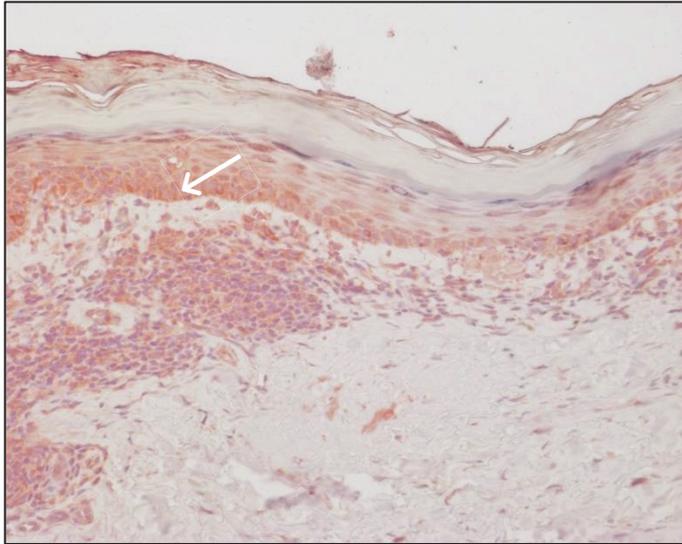


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung einer repräsentativen EMPD-Probe mit dem CCL27-Antikörper

Repräsentativer Paraffinschnitt (5 µm) nach Färbung mit einem Antikörper gegen humanes CCL27 (Anti-CCL27, Monoclonal Mouse IgG2A) und Hämatoxylin-Färbung (Vergrößerung 200x). Der Pfeil markiert rötlich-bräunlich gefärbte Keratinozyten. Isotyp-Kontrolle (Daten nicht dargestellt)

Morbus Paget mammäre Form (MPD)

Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives Beispiel eines MPD-Präparates mit basaltbetonter CCL27-Expression. Die rötlich-orangefarbene Zellen in der Epidermis sind Keratinozyten.

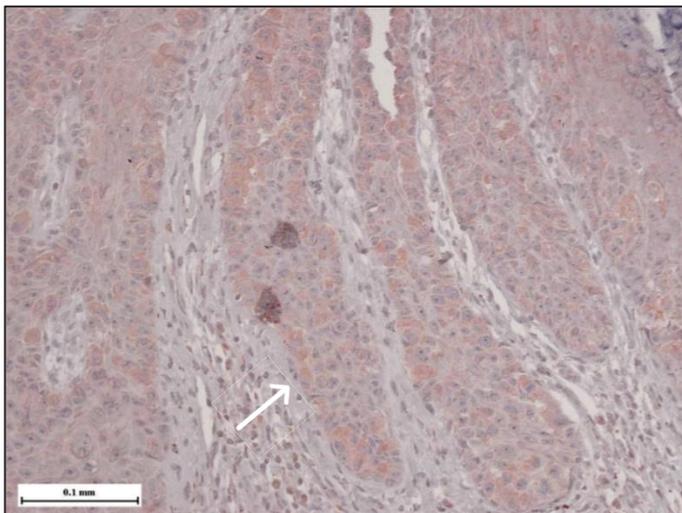


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung einer repräsentativen MPD-Probe mit dem CCL27-Antikörper

Repräsentativer Paraffinschnitt (5 µm) nach Färbung mit einem Antikörper gegen humanes CCL27 (Anti-CCL27, Monoclonal Mouse IgG2A) und Hämatoxylin-Färbung (Vergrößerung 200x). Der Pfeil markiert rötlich-bräunlich gefärbte Keratinozyten. Isotyp-Kontrolle (Daten nicht dargestellt)

Die CCL27-Expression wurde bei 33 von insgesamt 37 Proben ausgewertet. Die Proben N° 13, 20 und 34 (s. Tab. 13) wurden bei der Färbung beschädigt, sodass keine Aussage zur CCL27-Expression möglich war. Die Probe N° 3 enthielt keine Zellen mit einer für Morbus Paget typischen Morphologie. Deshalb wurde auch diese Probe aus der Auswertung ausgeschlossen.

Die CCL27-Expression bei Morbus Paget wurde nach der Färbungsintensität in drei Gruppen (negativ „0“, schwach positiv „+“ und stark positiv „++“) eingeteilt (s. Abb. 14).

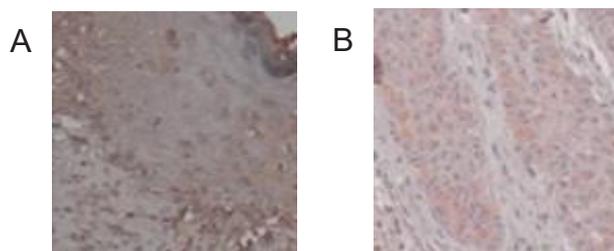


Abbildung 14: Scoring der CCL27-Expression in Paraffinschnitten von Probanden mit Morbus Paget – fehlender (A) und schwacher (B) Expression

In Tabelle 13 ist die gruppierte CCR10-Expressionsstärke der 37 in die Studie eingeschlossenen Patienten gelistet.

Tabelle 13: CCL27-Expressionsstärke der 37 Patienten des Patientenkollektivs

Proband	Stärke der CCL27 - Expression	Proband	Stärke der CCL27 - Expression
1	+	20	Defekt bei Färbung
2	+	21	0
3	keine Paget-Zellen im Schnitt	22	0
4	+	23	+
5	+	24	0
6	0	25	0
7	+	26	+
8	0	27	+
9	+	28	0

Proband	Stärke der CCL27 - Expression	Proband	Stärke der CCL27 - Expression
10	+	29	+
11	+	30	0
12	+	31	0
13	Defekt bei Färbung	32	0
14	+	33	0
15	+	34	Defekt bei Färbung
16	0	35	0
17	+	36	0
18	0	37	+
19	0		

schwache Expression (+), fehlende Expression (0)

Tabelle 14 stellt die Häufigkeit der gruppierte CCL27-Expressionsstärken bei EMPD- und MPD-Patienten gegenüber.

Tabelle 14: CCL27-Expression bei Morbus Paget – Verteilung der Expressionsstärke bei EMPD- und MPD-Patienten

Typ (Anzahl) der Proben	Intensität der immunhistochemischen Färbung		
	fehlende Expression (0)	schwache Expression (+)	starke Expression (++)
EMPD (n = 22)	7	15	0
MPD (n = 11)	5	6	0

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CCR10 und CCL27 in MPD- und EMPD-Hautproben untersucht. Dabei wurden sowohl die Expressionsstärke als auch das Expressionsmuster analysiert. Sowohl bei den MPD- als auch bei den EMPD-Proben konnte eine CCR10-Expression nachgewiesen werden. Die CCR10-Expression war aber in den MPD-Proben stärker als in den EMPD-Proben. Die Stärke der CCL27-Expression war in den EMPD-Proben negativ bis schwach positiv und in den MPD-Proben mehrheitlich schwach positiv ausgeprägt.

Die CCR10/CCL27-Interaktion wurde bereits bei diversen physiologischen und pathologischen Prozessen untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CCR10 und CCL27 in Hautarealen von Morbus Paget nachgewiesen. Möglicherweise spielt die CCR10/CCL27-Interaktion bei der Ausbildung des schrotschussartigen Verteilungsmusters der Paget-Zellen sowie bei der Entwicklung der Morbus Paget Erkrankung *in vivo* eine Rolle.

4.1 Bedeutung der CCL27/CCR10-Interaktion für das Survival von Tumorzellen

Die Entstehung, Entwicklung und Verbreitung eines Tumors werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Bereits 1874 stellte Paget die Hypothese auf, dass die Verbreitung von Tumorzellen ein zielgerichteter Vorgang ist, wodurch sich Metastasen nur in bestimmten Organen und nicht nach einem Zufallsprinzip ansiedeln [40]. Laut der "Adhäsionstheorie" fördern von Endothelzellen exprimierte, organspezifische Adhäsionsmoleküle die Invasion von Tumorzellen [44]. Außerdem kann das Tumorstadium an bestimmten Orten durch lokale Wachstumsfaktoren begünstigt werden [5,46] .

Die Erforschung von Triggern, die zur Tumorentwicklung beitragen, ist für die Entwicklung spezifischer Tumorthérapien von großer Bedeutung. Möglicherweise könnte eine Blockade der Expression oder der Aktivität solcher Trigger die Entwicklung und die Verbreitung des Tumors verhindern.

Zahlreiche Studien belegen, dass Chemokine und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei der Tumorstadium spielen [7]. Chemokine können die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen fördern. Bei Bindung

der Chemokine an Chemokinrezeptoren auf Tumorzellen werden intrazelluläre Signalwege (z. B. mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) Extracellular-regulated-kinase (ERK)) aktiviert, die wiederum wachstumsstimulierende Gene aktivieren [7,55]. Darüber hinaus können Chemokine das Überleben von Tumorzellen fördern, indem sie das Gleichgewicht zwischen pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Proteinen in Tumorzellen verschieben. Dies erfolgt beispielsweise durch eine gesteigerte Expression von Mouse double minute 2 homologue (Mdm2) [50], einer verminderten Expression von B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) oder der Hemmung der Caspase-3- und Caspase-9-Aktivierung [26]. Damit sind Chemokine an der Gestaltung der Mikroumgebung des Tumors beteiligt. Diese Mikroumgebung ist wiederum entscheidend für die Prognose.

CCR10 und CCL27 spielen eine Schlüsselrolle bei der zielgerichteten Wanderung von T-Zellen in entzündete Hautareale [18]. Auch bei Tumoren sind Chemokine und ihre Rezeptoren von Bedeutung. Die CCL27/CCR10-Interaktion wurde als prognostisch relevanter Faktor beim Multiplen Myelom beschrieben. Eine hohe CCL27-Konzentration korrelierte mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten. Darüber hinaus war der Chemokinspiegel bei Patienten, die sich in der Erstbehandlung gegen Bortezomib als therapierefraktär erwiesen, signifikant höher. Die Therapierefraktärität hing stark mit der Expression von CCR10 auf Stromazellen zusammen, die mit der Aktivierung von IL-10 in Verbindung steht. IL-10 fungiert als ein Überlebensfaktor der Myelomzellen. Durch die Modulation der proteasomalen Aktivität führt IL-10 zu einer reduzierten therapeutischen Antwort auf Proteasomen-Hemmer [51].

Weiterhin wurde beobachtet, dass die Tumorzellinvasion bei Gliomen große Ähnlichkeiten mit der Wanderung von Leukozyten aufweist, da auch bei der Steuerung der Tumorzellen Chemokine eine Rolle spielen. Beispielsweise wird der Chemokinrezeptor CCR10 im Glioblastom im Vergleich zu Kontrollhirngewebe verstärkt exprimiert. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von p-Akt durch die CCL27/CCR10-Interaktion die Proliferation und das invasive Verhalten der Tumorzellen fördert. Eine reduzierte Expression von CCR10 führte dagegen zu einer signifikanten Wachstumsreduktion bei Gliomen.

Die CCR10/CCL27-Interaktion ist für die Hautimmunität von Bedeutung. Daneben spielt sie auch bei Hauttumoren eine Rolle. Beim MM, das für 80 % aller

Todesfälle durch Hautkrebs verantwortlich ist [25], hat diese Interaktion eine besondere Bedeutung. Die Expression korreliert direkt mit der Breslow-Tiefe und mit dem Befall der Sentinel-Lymphknoten. Die Expressionsstärke von CCR10 ist mit dem Tumorstadium und der Metastasierungsrate assoziiert [48]. Diese Befunde lassen vermuten, dass die CCR10/CCL27-Interaktion eine besondere Mikroumgebung für den Tumor schafft, die das Tumorstadium fördert.

4.2 Bedeutung des CCR10/CCL27-Signalings für das Survival und die Tumormigration in die epitheliale Nische

Beim komplexen Chemokin-Signalweg sind verschiedene Kaskaden involviert. Zu den durch diese Kaskaden ausgelösten Effekten gehören die Produktion von Zytokinen, Chemotaxis, Migration, Zellformänderung, Metastasierung, zelluläres Wachstum und Differenzierung sowie zelluläres Überleben und Apoptose [7,14,29]. Die spezifische intradermale basaltbetonte Lokalisation von Paget-Zellen lässt die Vermutung zu, dass die intraepidermale Nische an diesem Ort bestimmte Bedingungen aufweist, die das Überleben und ggf. das Wachstum von Paget-Zellen fördern. In unserer Arbeitsgruppe wurde die CCL27/CCL10-Interaktion beim MM *in vitro* über μ -Slide-Chemotaxis untersucht. Die Inkubation mit CCL27 führte bei MM-Zellen zu einer signifikant stärkeren Chemotaxis als bei den Zellen der Kontrollgruppe [46]. Eine weitere Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen der CCR10-Expression und der Tumorprogression [31]. MIS-Zellen und Paget-Zellen zeichnen sich durch eine vergleichbare intraepidermale Lokalisation aus. Ein möglicher Grund für diese Übereinstimmung ist die Expression der gleichen Chemokine und Chemokin-Rezeptoren. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass Paget-Zellen, ähnlich wie MM-Zellen, über eine CCR10-Expression verfügen. Somit ist es theoretisch möglich, dass die CCR10/CCL27-Interaktion bei der Dynamik sowie bei der intraepidermalen Zellverteilung der Paget-Zellen, eine Rolle spielt. Der Einfluss der CCR10/CCL27-Interaktion auf die intraepidermale Migration wurde für MM-Zellen bereits *in vitro* gezeigt [46]. Somit könnte die CCR10/CCL27-Interaktion auch bei der intraepidermalen Migration der Paget-Zellen von Bedeutung sein (s. Abb. 15).

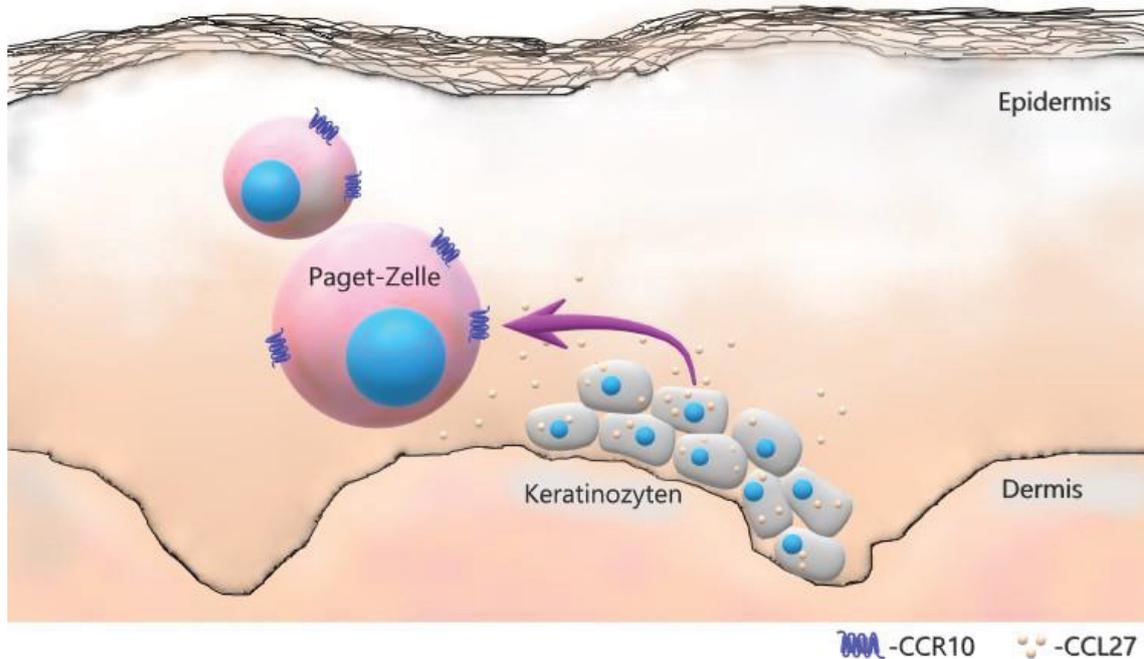


Abbildung 15: Survival und intraepitheliale Migration der Paget-Zelle in der epithelialen Nische – Modell für eine mögliche Beteiligung des CCR10/CCL27-Signalwegs (eigene Darstellung)

4.3 CCR10-Expression beim EMPD und MPD

In der vorliegenden Arbeit zeigten die EMPD- und MPD-Proben deutliche Unterschiede in der CCR10-Expression. Die EMPD-Proben zeigten mehrheitlich (15 von 22 Proben) eine schwache Expression. Nur vier Proben wiesen eine starke Expression auf. Bei weiteren drei Proben wurde keine Expression nachgewiesen. Dagegen waren die MPD-Proben mehrheitlich (6 von 11 Proben) stark positiv. Nur vier Proben waren schwach positiv und eine Probe negativ. Vier Proben beinhalteten keine Paget-Zellen und wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Die Gründe für diese Unterschiede und die sich daraus ergebenden Folgen sind derzeit noch nicht geklärt. Die klinisch-pathologischen Eigenschaften des Morbus Paget wurden bislang nur in wenigen Studien erfasst. Die Inzidenz des MPD liegt etwa um einen Faktor 10 höher als die des EMPD [10]. Die Ursachen für diese unterschiedliche Inzidenz sind unklar. Möglicherweise könnte die CCR10/CCL27-Interaktion das Überleben der Paget-Zellen positiv beeinflussen. Beim MM wird vermutet, dass eine erhöhte Expression von CCR10 und CCL27 mit der Wachstumsrate von neoplastischen Zellen, der Invasion in das Gewebe, der

Streuung in die Lymphknoten sowie mit einer reduzierten Immunantwort des Wirts korreliert [31]. Ähnliche Zusammenhänge könnten auch beim Morbus Paget existieren.

Die höhere CCR10- und CCL27-Expression beim MPD könnte theoretisch – wie auch beim MM – die Wachstumsrate, die Gewebsinvasion und die Metastasierung der Paget-Zellen fördern. Dies könnte eine Erklärung für die höhere Inzidenz des MPD im Vergleich zum EMPD sein. Die Gründe für die unterschiedliche CCR10- und CCL27-Expression bei den beiden Subtypen sollte in Folgestudien thematisiert werden. Möglicherweise haben beide Tumoren einen unterschiedlichen Ursprung und verschiedene genetische Grundlagen. Die bisherige Annahme, dass es sich beim MPD und EMPD um Subtypen einer Tumorentität handelt, basiert auf pathomorphologischen Ähnlichkeiten. Die genetische Verwandtschaft beider Subtypen wurde bislang in der Literatur nicht thematisiert und sollte in Zukunft erforscht werden.

Die intraepidermale Migration einiger Paget-Zellen in die oberen Hautschichten könnte ebenfalls durch einen Chemokingradienten erklärt werden. Für die Überprüfung dieser Annahme könnte der Einfluss von CCL27 auf CCR10-positive Paget-Zellen in einem humanen Hautmodell im Rahmen eines künftigen Forschungsprojektes beobachtet werden.

4.4 Limitationen der Untersuchung

Wie erwähnt, handelt es sich beim Morbus Paget um eine seltene Erkrankung. Daher war es eine Herausforderung, eine angemessene Fallzahl für die vorliegende Studie zu rekrutieren. Ein retrospektiver Ansatz der Studie war möglich, weil alle Gewebeproben in der Hautklinik Düsseldorf im dermato-histologischen Archiv aufbewahrt werden.

Eine weitere Herausforderung stellte die Nachweismethode der CCR10- und CCL27-Expression dar. Im Labor vorhandene und von den Herstellern zur Verfügung gestellte Protokolle für die immunhistochemische Färbung von CCR10 und CCL27 betrafen Kryomaterial. Im Rahmen der Arbeit wurde das immunhistochemische Färbeprotokoll für Paraffinschnitte angepasst. Die Erarbeitung eines Protokolls für Paraffin-eingebettete Proben erfolgte mit Hilfe einzelner Proben gesunder Haut sowie Psoriasis- und MM-Hautproben. Die CCR10- und

CCL27-Expression der Paraffinschnitte wurde dann mit der Expression des jeweiligen Proteins in den Kryoschnitten visuell verglichen. Dabei fielen deutliche Unterschiede auf. Bei den Kryoschnitten der Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe zeigte sich eine basalbetonte CCL27-Expression in den Proben der gesunden Haut sowie der Psoriasis-Proben. Bei den Paraffinschnitten wurde weder bei den Proben gesunder Haut noch bei den Psoriasis-Proben eine basalbetonte CCL27-Expression beobachtet.

Um die Expression von CCR10 und CCL27 besser beurteilen zu können, wäre in künftigen Studien die Verwendung von Kryoproben anzustreben. Für die Generierung einer ausreichenden Fallzahl in einer angemessenen Probenkollektionszeit wäre eine multizentrische, prospektive Studie sinnvoll. Zu den potenziellen Vorteilen der Anfärbung der Kryoproben gehört neben der möglicherweise besseren Darstellung der CCL27-Expression, die genauere morphologische Darstellung der Paget-Zellen. Ein weiterer Vorteil prospektiver Studien ist die Möglichkeit der lückenlosen Erhebung aller erforderlichen Patientendaten. In der vorliegenden retrospektiven Studie waren die Informationen zum Alter, zum Geschlecht und zur Lokalisierung der Tumoren vollständig. Die Daten zu den assoziierten Erkrankungen waren dagegen unvollständig. Klinische Daten über Begleiterkrankungen standen nur von 14 Probanden zur Verfügung. Morbus Paget ist aber häufig mit anderen Tumoren assoziiert [1,42]. Die Pathogenese des Morbus Paget wird derzeit kontrovers diskutiert. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Entität von anderen Tumoren abstammt. In einer prospektiven Studie wäre eine konsequente Erhebung der klinischen Daten (z. B. Begleiterkrankungen, andere Tumoren) der Paget-Patienten möglich. Somit könnte auch die Koinzidenz des Morbus Paget mit anderen Tumoren bestimmt werden.

Zwei Probanden hatten in der Vergangenheit ein Harnblasenkarzinom und vier EMPD-Probanden ein PCa. Laut einer Studie beträgt die Koinzidenz zwischen EMPD und PCa 10,4 % [47]. In zukünftigen Arbeiten sollten die Ursachen für die Korrelation von EMPD und PCa näher untersucht werden. Aktuell ist die molekulare Basis dieser Korrelation unklar. Möglicherweise spielt die CCR10/CCL27-Interaktion eine Rolle. Auch PCa-Zellen zeigen eine erhöhte CCR10-Expression [58]. Die CCR10/CCL27-Interaktion könnte die Migration von CCR10-positiven PCa-Zellen in die CCL27-exprimierende Haut und die intradermale Entwicklung zu manifesten Adenokarzinomen fördern. EMPD-Zellen weisen neben der

CCR10-Expression weitere Ähnlichkeiten mit PCa-Zellen auf. In einer Studie mit einer kleinen Kohorte exprimierte ein großer Anteil der EMPD-Patienten (5/16) das Prostata-spezifische Antigen (PSA) [2,15]. Zur Evaluation der Genese des Morbus Paget sollten diese Befunde an größeren Kohorten überprüft werden.

4.5 Ausblick

Weitere Erkenntnisse könnten immunhistochemische Doppelfärbungen liefern. Die Bestimmung der CK7-Expression ist eine sensitive, in der Diagnostik von Morbus Paget routinemäßig angewandte Methode. Daher könnte über ein Doppelfärbung mit CCR10 und CK7 die Spezifität und Sensitivität der CCR10-Expression analysiert werden [49].

Zur Analyse der chemotaktischen Zellmigration sind *in vitro* Versuche mit Paget-Zelllinien erforderlich. Eine kommerziell erhältliche Zelllinie ist derzeit nicht auf dem Markt. Grundsätzlich wäre die Extraktion von Paget-Zellen aus Kryogewebe via Laser-Mikrodissektion mit anschließender Anzucht in Nährmedien möglich. Bei einer fehlenden Proliferation dieser Zellen könnte eine Immortalisierung über eine Fusion mit Tumorzellen mit der Hybridom-Technik erfolgen. Die chemotaktischen Eigenschaften der CCR10-positiven Paget-Zelllinien könnten dann mit dem μ -Slide Verfahren beurteilt werden. Solche Analysen wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits für MM-Zellen durchgeführt [46].

Zur Untersuchung des Ursprungs der Paget-Zellen und der beteiligten Mutationen wären genetische Analysen notwendig. Solche Analysen sind erfahrungsgemäß ebenfalls mit Kryoproben und Laser-Mikrodissektion am besten umsetzbar. Im Vorfeld sollten aber die zu untersuchenden genetischen Targets festgelegt werden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Expression von CCR10 und CCL27 bei Morbus Paget beschrieben. Die CCR10/CCL27-Interaktion trägt zur Entwicklung und Verbreitung von MM-Zellen bei. Die vorliegenden Befunde lassen den Schluss zu, dass diese Interaktion bei Paget-Zellen eine ähnliche Rolle spielen könnte. Durch die CCR10/CCL27-Interaktion könnte eine Tumormikroumgebung geschaffen werden, die das Tumorstadium und die Lokalisation der Tumorzellen beeinflusst. Die vorliegenden Befunde liefern neue Ansatzpunkte für die Erforschung dieser seltenen Erkrankung.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Al Hallak, M. N. und N. Zouain. 2009. Extramammary perianal paget's disease. *Case Rep Gastroenterol* 3(3):332–337.
2. Allan, S. J., McLaren, K. und RD Aldridge. 1998. Paget's disease of the scrotum: a case exhibiting positive prostate-specific antigen staining and associated prostatic adenocarcinoma. *British Journal of Dermatology* 138(4): 689–691.
3. Balkwill, F. R., Capasso, M. und T. Hagemann. 2012. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125(Pt 23): 5591–5596.
4. Bruce, J., Carter, D. C. und J. Fraser. 1970. Patterns of recurrent disease in breast cancer. *The Lancet* 295(7644): 433–435.
5. Chambers, A. F., Groom, A. C. und I.C. MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2(8): 563–572.
6. Charo, I. F. und R. M. Ransohoff. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354(6): 610–621.
7. Chow, M. T. und A. D. Luster. 2014. Chemokines in cancer. *Cancer Immunol Res* 2(12): 1125–1131.
8. Clatworthy, M. R., Aronin, C. E., Mathews, R. J., Morgan, N. Y., Smith, K. G. und R. N. Germain. 2014. Immune complexes stimulate CCR7-dependent dendritic cell migration to lymph nodes. *Nat Med* 20(12): 1458–1463.
9. Crocker, H. R. 1889. Paget's disease affecting the scrotum and penis. *Trans. Path. Soc. London* 40, 187–91.
10. Fardal, R. W., Kierland, R. R., Clagett, O. T. und L:B. Woolner. 1964. Prognosis in Cutaneous Paget's Disease. *Postgraduate Medicine* 36(6): 584–593.
11. Feldmeyer, L., Kerl, K., Kamarashev, J., de Viragh, P. und L. E. French. 2011. Treatment of vulvar Paget disease with topical imiquimod: a case report and review of the literature. *J Dermatol Case Rep* 5(3): 42–46.
12. Fernandez, E. J. und E. Lolis. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469–499.
13. Amorim, A. G., Mendes, B. B. F., Ferreira, R. N. und A. C. Filho. 2015. Paget Disease of the Vulva: Diagnosis by Immunohistochemistry. *Case Rep Dermatol Med* 2015: 162483.
14. Graves, D. T. und Y. Jiang. 1995. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* 6(2): 109–118.
15. Hammer, A., Hager, H. und T. Steiniche. 2008. Prostate-specific antigen-positive extramammary Paget's disease--association with prostate cancer. *APMIS* 116(1): 81–88.

16. Holmes, W., Lee, J., Kuang, W., Rice, G.C. und W. I. Wood. 1991. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253(5025): 1278–1280.
17. Homey, B., Wang, W., Soto, H., Buchanan, M. E., Wiesenborn, A., Catron, D., Müller, A., McClanahan, T. K., Dieu-Nosjean, M. C., Orozco, R., Ruzicka, T., Lehmann, P., Oldham, E. und A. Zlotnik. 2000. Cutting Edge: The Orphan Chemokine Receptor G Protein-Coupled Receptor-2 (GPR-2, CCR10) Binds the Skin-Associated Chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *The Journal of Immunology* 164(7): 3465–3470.
18. Homey, B., Alenius, H., Müller, A., Soto, H., Bowman, E. P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A. I., Assmann, T., Bünemann, E., Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P. und A. Zlotnik. 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 8(2): 157–165.
19. Kai, H., Kadono, T., Kakinuma, T., Tomita, M., Ohmatsu, H., Asano, Y., Tada, Y., Sugaya, M. und S. Sato. 2011. CCR10 and CCL27 are overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 207(1): 43–48.
20. Kanitakis, J. 2007. Mammary and extramammary Paget's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21(5): 581–590.
21. Karakas, C. 2011. Paget's disease of the breast. *J Carcinog* 10: 31.
22. Kelner, G. S., Kennedy, J., Bacon, K. B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bazan, J. F., Moore, K. W. und T. J. Schall et al. 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266(5189): 1395–1399.
23. Kim, B., Kim, J.-H. und B, Park. 2016. Pomolic Acid Inhibits Invasion of Breast Cancer Cells Through the Suppression of CXC Chemokine Receptor Type 4 Expression. *J Cell Biochem* 117(6): 1296–1307
24. Kummar, S., Fogarasi, M., Canova, A., Mota, A. und T. Ciesielski. 2002. Cytokeratin 7 and 20 staining for the diagnosis of lung and colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 86(12): 1884–1887.
25. Kuphal, S. und A. Bosserhoff. 2009. Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J Pathol* 219(4): 400–409.
26. Lee, N. J., Choi, D. Y., Song, J. K., Jung, Y. Y., Kim, D. H., Kim, T. M., Kim, D. J., Kwon, S. M., Kim, K. B., Choi, K. E., Moon, D. C., Kim, Y., Han, S. B. und J. T. Hong. 2012. Deficiency of C-C chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF- κ B and inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 in urethane-induced lung tumor model. *Carcinogenesis* 33(12): 2520–2528.
27. Lin, H.-Y., Sun, S.-M., Lu, X.-F., Chen, P. Y., Chen, C. F., Liang, W. Q. und C. Y. Peng. 2017. CCR10 activation stimulates the invasion and migration of breast cancer cells through the ERK1/2/MMP-7 signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 51: 124–130.

28. Lloyd, J. 2000. Mammary and extramammary Paget's disease. *Journal of Clinical Pathology* 53(10): 742–749
29. Luster, A. D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338(7): 436–445
30. Marshall, A., Celentano, A., Cirillo, N., Mirams, M., McCullough, M. und S. Porter. 2018. Oral keratinocytes synthesize CTACK: A new insight into the pathophysiology of the oral mucosa. *Exp Dermatol* 27(2): 207–210.
31. Monteagudo, C., Ramos, D., Pellín-Carcelén, A., Gil, R., Callaghan, R. C., Martín, J. M., Alonso, V., Murgui, A., Navarro, L., Calabuig, S., López-Guerrero, J. A., Jordá, E. und A. Pellín. 2012. CCL27-CCR10 and CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor mRNA expression ratio: new predictive factors of tumor progression in cutaneous malignant melanoma. *Clin Exp Metastasis* 29(6): 625–637.
32. Morales, J., Homey, B., Vicari, A. P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., McEvoy, L. M. und A. Zlotnik. 1999. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *The Journal of Immunology* 96(25): 14470–14475.
33. Mukherjee, D. und J. Zhao. 2013. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res* 3(1): 46–57.
34. Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verástegui, E. und A. Zlotnik. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410(6824): 50–56.
35. Murphy, P. und H. Tiffany, H. 1991. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253(5025): 1280–1283.
36. Murphy, P. M. 1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 12: 593–633.
37. Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J. und C. A. Power. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52(1): 145–176.
38. Notter, N., Yanes B. 2015. Extramammärer Morbus Paget. *Schweizer Zeitschrift für Onkologie* 5:2015.
39. Paget ,J. 1971. On Disease of the Mammary Areola Preceding Cancer of the Mammary Gland. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 21(5): 303–304.
40. Paget, S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of breast. *The Lancet* 133(3421): 571–573.
41. Park, S. H., Das, B. B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H. J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A. A., Marassi, F. M. und S. J. Opella. 2012. Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* 491(7426): 779–783.

42. Pierie, J.-P., Choudry, U., Muzikansky, A., Finkelstein, D. M. und M. J. Ott. 2003. Prognosis and management of extramammary paget's disease and the association with secondary malignancies. *Journal of the American College of Surgeons* 196(1): 45–50.
43. Proudfoot, A. E. I. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology* 2: 106 EP.
44. Qian, F., Hanahan, D. und I. L. Weissman. 2001. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 3976–3981.
45. Raport, C. J. und P. W. Gray. 2003. Chemokines and Chemokine Receptors: Structure and Function. In: *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier, S. 149–153.
46. Schneider, C. 2014. Role of CCR10 in progression and metastasis of malignant melanoma, *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
47. Shi G, Ye D-W, Yao X., Zhang, S., Dai, B., Zhang, H., Shen, Y., Zhu, Y., Zhu, Y., Xiao, W. und C. Ma. 2010. Extramammary Paget's diseases in men from the Shanghai area: its association with PSA level increase. *APMIS* 118(10): 777–781.
48. Simonetti, O., Goteri, G., Lucarini, G., Filosa, A., Pieramici, T., Rubini, C., Biagini, G. und A. Offidani. 2006. Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape. *Eur J Cancer* 42(8): 1181–1187.
49. Smith, K. J., Tuur, S., Corvette, D., Lupton, G. P. und H. G. Skelton. 1997. Cytokeratin 7 staining in mammary and extramammary Paget's disease. *Mod Pathol* 10(11): 1069–1074.
50. Su, H., Sobrino Najul, E. J., Toth, T. A., Ng, C. M., Lelievre, S. A., Fred, M. und C. K. Tang. 2011. Chemokine receptor CXCR4-mediated transformation of mammary epithelial cells by enhancing multiple RTKs expression and deregulation of the p53/MDM2 axis. *Cancer Lett* 307(2): 132–140.
51. Thangavadivel, S., Zelle-Rieser, C., Olivier, A., Postert, B., Untergasser, G., Kern, J., Brunner, A., Gunsilius, E., Biedermann, R., Hajek, R., Pour, L., Willenbacher, W., Greil, R. und K. Jöhrer. (2016) CCR10/CCL27 crosstalk contributes to failure of proteasome-inhibitors in multiple myeloma. *Oncotarget* 7(48): 78605–78618.
52. van der Linden, M., Meeuwis, K. A. P., Bulten, J., Bosse, T., van Poelgeest, M. und J. A. de Hullu. (2016) Paget disease of the vulva. *Crit Rev Oncol Hematol* 101: 60–74.
53. van der Zwan, J. M., Siesling, S., Blokx, W. A., Pierie, J. F. und R. Capocaccia. 2012. Invasive extramammary Paget's disease and the risk for secondary tumours in Europe. *Eur J Surg Oncol* 38(3): 214–221.
54. Vincent, J. und J. M. Taube. 2011. Pigmented extramammary Paget disease of the abdomen: a potential mimicker of melanoma. *Dermatol Online J* 17(8): 13.

55. Wani, N., Nasser, M. W., Ahirwar, D. K., Zhao, H., Miao, Z., Shilo, K. und R. K. Ganju. 2014. C-X-C motif chemokine 12/C-X-C chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* 16(3): R54.
56. Wendt, M. K., Cooper, A. N. und M. B. Dwinell. 2008. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene* 27(10): 1461–1471.
57. Xia, M., Hu, S., Fu, Y., Jin, W., Yi, Q., Matsui, Y., Yang, J., McDowell, M. A., Sarkar, S., Kalia, V. und N. Xiong. 2014. CCR10 regulates balanced maintenance and function of resident regulatory and effector T cells to promote immune homeostasis in the skin. *J Allergy Clin Immunol* 134(3): 634-644.e10
58. Yang, L., Gao, L., Chen, Y., Tang, Z., Zhu, Y., Han, P., Li, X. und Q. Wei (2015) The Differential Expression and Function of the Inflammatory Chemokine Receptor CXCR5 in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *Int J Med Sci* 12(11): 853–861.
59. Zlotnik, A. und O. Yoshie. 2000. Chemokines. *Immunity* 12(2): 121–127.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1: Paget Zellen an der Basalmembran – Hämatoxylin/Eosin-(HE)-Färbung, 400-fache Vergrößerung (aus Amorim et al.(2015) [13]).....	2
Abbildung 2: Chemokinstruktur – C-, CC-, CXC- und CX3C-Ligand-Gruppe (modifiziert nach Luster (1998) [29])	4
Abbildung 3: Tertiärstruktur der Chemokine (modifiziert nach Fernandez and Lolis (2002)[12]).....	5
Abbildung 4: Dreidimensionale Struktur des Chemokinrezeptors am Beispiel von CXCR1 (modifiziert nach Park et al. (2012) [41])	6
Abbildung 5: Chemokine und Chemokin-Rezeptoren – systematische Nomenklatur und Interaktionen (modifiziert nach Proudfoot (2002) [43])	7
Abbildung 6: Immunhistochemische Analyse der CCR10-Expression in gesunder Haut	25
Abbildung 7: Immunhistochemische Analyse der CCR10-Expression in Melanoma in situ Präparaten	26
Abbildung 8: Immunhistochemische Analyse der CCR10-Expression in Morbus Paget Zellen (EMPD)	27
Abbildung 9: Immunhistochemische Analyse der CCR10-Expression in Morbus Paget Zellen (MPD)	28
Abbildung 10: Scoring der CCR10-Expression in Paraffinschnitten von Probanden mit Morbus Paget – fehlender (A), schwacher (B) und starker Expression (C)	29
Abbildung 11: Immunhistochemische Analyse der CCL27-Expression in Psoriasis vulgaris	32
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung einer repräsentativen EMPD-Probe mit dem CCL27-Antikörper	33
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung einer repräsentativen MPD-Probe mit dem CCL27-Antikörper	33
Abbildung 14: Scoring der CCL27-Expression in Paraffinschnitten von Probanden mit Morbus Paget – fehlender (A) und schwacher (B) Expression	34
Abbildung 15: Survival und intraepitheliale Migration der Paget-Zelle in der epithelialen Nische – Modell für eine mögliche Beteiligung des CCR10/CCL27-Signalwegs (eigene Darstellung)	39

Tabellen

Tabelle 1:	Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 2:	Zusammensetzung der im Labor hergestellten Reagenzien	13
Tabelle 3:	Fertige Reagenzien.....	14
Tabelle 4:	Verwendete Antikörper	15
Tabelle 5:	Verwendete Proteine	15
Tabelle 6:	Verwendete Paraffin-eingebettete Präparate	16
Tabelle 7:	Patientendaten.....	16
Tabelle 8:	Protokoll für die immunhistochemische Färbung mit Anti-CK7 .	17
Tabelle 9:	Protokoll für die immunhistochemische Färbung mit Anti-h-CCR10 und Anti-CCL27.....	19
Tabelle 10:	Charakteristika der Patienten mit EMPD und MPD.....	23
Tabelle 11:	CCR10-Expressionsstärke der 37 Patienten des Patientenkollektivs	30
Tabelle 12:	CCR10-Expression bei Morbus Paget – Verteilung der Expressionsstärke bei EMPD- und MPD-Patienten	31
Tabelle 13:	CCL27-Expressionsstärke der 37 Patienten des Patientenkollektivs	34
Tabelle 14:	CCL27-Expression bei Morbus Paget – Verteilung der Expressionsstärke bei EMPD- und MPD-Patienten	35

7 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernhard Homey ganz herzlich für das interessante Thema der Dissertation sowie für die intensive Betreuung bedanken.

Außerdem danke ich meinen Betreuern Dr. Stephan Braun und Dr. Doris Helbig für die Unterstützung und hilfreichen Inputs.

Großer Dank geht an das Laborteam, insbesondere an Anke van Lierop, für die Einarbeitung in die Labortechniken sowie für die Vermittlung der immunhistochemischen Färbetechnik.

Zum Schluss gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich bei der Durchführung der Arbeit motiviert hat.