Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Lars E. French

Differentialdiagnostische Abgrenzung basaloid differenzierter Neoplasien der Haut mittels immunhistochemischer Methoden

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Annika Marina Heukäufer

aus

München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Flaig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ortrud Steinlein

Prof. Dr. Peter Bartenstein

Prof. Dr. Nikolaus Plesnila

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. habil. Fritjof Eckert

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2022

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung ..... *- 1 -*

1.1 Vorstellung der untersuchten Hauttumore ..... **- 1 -**

1.1.1 Das Basalzellkarzinom ..... - 1 -

1.1.2 Das Trichoblastom ..... - 2 -

1.2 Epidemiologie ..... **- 3 -**

1.3 Lokalisation ..... **- 5 -**

1. 4 Malignität versus Benignität unter Betrachtung des Haarfollikels als Ursprung ..... **- 5 -**

2. Zielstellung der Arbeit ..... *- 10 -*

3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Literatur ..... *- 11 -*

3.1 Histomorphologische Charakteristika ..... **- 11 -**

3.2 Zusammenfassung immunhistochemischer Merkmale und Ergebnisse der Literatur ..... **- 13 -**

4. Material und Methoden ..... *- 22 -*

4.1 Material ..... **- 22 -**

4.1.1 Antikörper ..... - 22 -

4.1.2 Gewebeauswahl ..... - 23 -

4.1.3 Verwendete Puffer und Reagenzien ..... - 25 -

4.1.4 Verwendete Reagenzien und Lösungsmittel ..... - 26 -

4.2 Methoden ..... **- 26 -**

4.2.1 Herstellung der Schnitte ..... - 26 -

4.2.2 Vorbehandlung ..... - 27 -

4.2.3 Austestung der Vorbehandlung und Verdünnung ..... - 27 -

4.2.4 Immunhistochemische Färbung ..... - 28 -

4.3. Interne Positivkontrolle ..... **- 30 -**

4.4 Auswertung ..... **- 31 -**

4.4.1 Mikroskopie und Bewertung der Färbung ..... - 31 -

4.4.2. Fotografie ..... - 32 -

4.5 Statistik ..... **- 32 -**

5. Ergebnisse ..... *- 33 -*

5.1 Analyse und statistische Auswertung publizierter Studien ..... - 33 -
5.2 Eigene immunhistochemische Untersuchungen ..... - 35 -
5.2.1 Drebrin ..... - 38 -
5.2.2 Nestin ..... - 40 -
5.2.3 Androgenrezeptor ..... - 43 -
5.2.4 Laminin-gamma-5 ..... - 46 -
5.2.5 Bcl2 ..... - 48 -
5.2.6 CD34 ..... - 49 -
5.2.7 Cytokeratin 20 ..... - 51 -
5.2.8 Cytokeratin 8 ..... - 52 -
5.2.9 PHLDA1 ..... - 54 -
5.2.10 BerEP4 ..... - 57 -
5.2.11 Cytokeratin 15 ..... - 60 -
5.3 Statistische Bewertung der eigenen Versuche ..... - 61 -
5.3.1 Clusteranalyse mit Cramers V ..... - 61 -
5.3.1.1 Berechnung des Cramers V ..... - 61 -
5.3.1.2 Interpretation der Cramers V-Werte und statistische Bewertung der Methodik ..... - 63 -
5.3.1.3 Visualisierung der Werte des Cramers V ..... - 66 -
5.3.1.4 Trefferquote der Cramers V-Analyse und Aufstellung eines Kurzleitfadens ..... - 70 -
5.3.1.5 Anwendung des Cramers V und dessen Kurzleitfaden an der Testgruppe „F“ ..... - 76 -
5.3.2 Hierarchische Clusteranalyse ..... - 79 -
5.3.2.1 Berechnung des hierarchischen Clusters ..... - 79 -
5.3.2.2 Silhouetten-Analyse des hierarchischen Clusters und Aufstellung eines Kurzleitfadens ..... - 82 -
5.3.2.3 Interpretation der hierarchischen Clusteranalyse ..... - 83 -
5.3.3 Abschließende Analyse und Interpretation der Statistik ..... - 86 -
5.4 Diskussion ..... - 88 -
5.3.1. Drebrin ..... - 88 -
5.3.2 Nestin ..... - 89 -
5.3.3 Androgenrezeptor ..... - 89 -
5.3.4 LN5 ..... - 90 -
5.3.5 Bcl2 ..... - 90 -
5.3.6 CD34 ..... - 90 -
5.3.7 CK20 ..... - 91 -
5.3.8 CK8 ..... - 91 -

5.3.9 PHLDA1 ..... - 91 -
5.3.10 BerEP4 ..... - 92 -
5.3.11 CK15 ..... - 93 -

6. Zusammenfassung ..... - 98 -

7. Literatur-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis ..... - 100 -

7.1 Literaturverzeichnis ..... - 100 -

7.2 Tabellenverzeichnis ..... - 111 -

7.3 Abbildungsverzeichnis ..... - 113 -

8. Anhang ..... - 116 -

9. Danksagung ..... - 117 -

1. Einleitung

1.1 Vorstellung der untersuchten Hauttumore

1.1.1 Das Basalzellkarzinom

Das Basalzellkarzinom wurde synonym auch als Basaliom, Basalzellepitheliom oder trichoblastisches Karzinom bezeichnet (1). Es wird als eine „epitheliale Neoplasie mit basaloider Differenzierung der Tumorzellen“ beschrieben (2). Diese basaloide Differenzierung entsteht aus Stammzellen im Bereich der Haarfollikel und interfollikulären Epidermis (3) und lässt sich durch die große Ähnlichkeit der Tumorzellen zu normalen Zellen des Stratum basale der Epidermis gut erkennen. Dies gab dem Tumor seinen Namen. Vorwiegend erscheint dieser daher auch vor allem an Haarfollikel-tragenden Körperregionen (4) und „…entspricht dabei in seinen Differenzierungsmöglichkeiten denen des embryonalen Haarkeims.“, (5). Durch diese enge Beziehung zum Haarfollikel lässt sich das Basalzellkarzinom folglich nur schwer von anderen follikulären Tumoren, wie dem Trichoblastom, unterscheiden.

Das Basalzellkarzinom weist ein lokal destruktives und invasives Wachstum auf, während es in der Regel aber nicht metastasiert (6). Metastasen sind lediglich in 0,5% der Fälle aufzufinden (7). Diese geringe Neigung des Streuens ist wahrscheinlich durch die Stroma-Abhängigkeit zu erklären (8). Aufgrund der fehlenden Metastasen wird das Basalzellkarzinom auch oft als „semi-maligne“ bezeichnet. Charakteristisch ist ein langsam fortschreitendes Wachstum. Durch sein infiltratives Verhalten kann das Basalzellkarzinom jedoch nach längerer Zeit schließlich zu beträchtlichen Weichteilschäden und Knochendestruktion führen (9).

Das Basalzellkarzinom besitzt „eine ungewöhnlich große klinische Formenvielfalt und Variationsbreite“ (10). Klinisch unterscheidet man mehrere verschiedene Formen. Das solide, zystische, sklerodermiforme, superfizielle, multizentrische und das pigmentierte Basalzellkarzinom, sowie das exulzerierte Basalzellkarzinom mit den Formen des Ulcus rodens und des Ulcus terebrans (11, 12). Allerdings sind diese Subtypen nicht immer klinisch sicher zu diagnostizieren, da das Basalzellkarzinom klinisch sehr vielfältig erscheint und sogar in 10 bis 40 % der Fälle auch Mischformen aufweist (13). In dieser Arbeit wird vor allem auf das solide bzw. noduläre Basalzellkarzinom eingegangen, da dieses erhebliche Ähnlichkeiten mit dem Trichoblastom aufweist.

Derzeit wird die Diagnose des Basalzellkarzinoms histopathologisch durch einen HE[1]-Schnitt mit Hilfe des Mikroskops gesichert. Hierbei werden hauptsächlich histomorphologische Kriterien betrachtet. Durch die Morphologie ist das Basalzellkarzinom jedoch oft nicht eindeutig von anderen Entitäten abzugrenzen. Vor allem das Basalzellkarzinom mit adnexaler Differenzierung mit dem ICD-O Code 8089/3 der WHO Klassifikation ist schwer vom gutartigen Trichoblastom abzugrenzen (1). Die Bestimmung der Malignität ist ein wichtiger Bestandteil einer präzisen Diagnostik. Daher versuchte man in der Vergangenheit bereits eine immunhistochemische Differenzierung zur Hilfestellung bei der Diagnosestellung zu finden. Eine sichere immunhistochemisch basierte Differenzierungsmethode gibt es jedoch bislang nicht.

1.1.2 Das Trichoblastom

Das Trichoblastom zählt zu den Adnextumoren, welche ihren gemeinsamen Ursprung in den Hautanhangsgebilden haben. Im Falle des Trichoblastoms ist dies das Epithel eines Haarfollikels. Damit gehört das Trichoblastom zu der Klasse der epithelialen Tumoren (11) bzw. ist es eine „epitheliale trichogen differenzierte Neoplasie“ (2). Es ist ein dermaler und subkutaner Tumor der Basalzellen (14).

Bereits 1962 beschrieb Headington zusammen mit French einen sogenannten trichogenen Adnextumor. In den 1960er und 1970er Jahren erschienen umfangreiche Arbeiten von Headington, welche sich mit der Vielzahl der von Haarfollikeln ausgehenden Tumoren befassten und diese aufgrund ihrer histologischen Merkmale einteilten (15-17). 1976 wurden diese trichogenen Adnextumore dann von ihm in vier verschiedene Subtypen eingeteilt: das Trichoblastom, das trichoblastische Fibrom, das trichogene Trichoblastom und das trichogene Myxom.

Diese Klassifizierung wurde allerdings 1993 von Ackerman grundlegend erneuert (18). Er veröffentlichte 1993 die erste Auflage des Buches „Neoplamen mit follikulärer Differenzierung“, in dem er Tumore mit follikulärer Differenzierung genau untersucht, beschreibt und definiert. In diesem Buch führt er auch erstmals den Begriff „Trichoblastom“ als einen Sammelbegriff ein, welcher von ihm auch in seiner Monographie über follikuläre Adnextumore von 2001 (19), für alle aus follikulär germinativen Zellen abgeleiteten benignen Tumore benutzt wird. Ausgehend von mikroskopischen Bildern fasst Ackerman folgende Tumore unter dem Begriff

[1] Hämatoxylin-Eosin

Trichoblastom zusammen: den trichogenen Adnextumor, das Trichoblastom, das trichoblastische Fibrom, das trichogene Trichoblastom und das trichogene Myxom von Headington. Somit umfasst der neu eingeführte Sammelbegriff auch alle vier von Headington genannten Subtypen. Diese werden dann weiter nach ihrem morphologischen Wachstumsmuster unterteilt, sodass unter dem Begriff Trichoblastom eine ganze Gruppe von verschiedenen follikulären Adnextumoren zusammengefasst wird.

Aufgrund der unterschiedlichen Gewichtung der morphologischen Strukturen wird jedoch nicht von allen Autoren dieser Sammelbegriff verwendet. Daher verwenden verschiedene Autoren eine abweichende, nicht einheitliche Nomenklatur. So findet man auch die folgenden Bezeichnungen: trichogenes Trichoblastom, trichoblastisches Fibrom, trichoblastisches Trichoblastom, unreifes Trichoepitheliom, trichogenes Myxom, trichogenes Fibrom u.a.m. (5). Weitere Autoren schlagen wiederum andere Einteilungen vor: Kempf et al. zählt zu den verschiedenen Varianten des Trichoblastoms das Trichoepitheliom, das Lymphadenom und das Trichogerminom (2). Eine weitere mögliche Unterteilung soll das desmoplastische Trichoepitheliom, sowie das Panfollikulom darstellen (4). Diese variierenden Definitionen sind Vorschläge der verschiedenen Autoren und nicht allgemein anerkannt. So bestehen weiterhin unterschiedliche Nomenklaturen und Unterteilungen.

Klinisch handelt es sich um einen benignen Tumor, der sich in hautfarbenen, mäßig derben Knötchen bis Tumoren äußert (4). Vor allem das solitäre Tichoepitheliom kann klinisch differentialdiagnostisch als Basalzellkarzinom verkannt werden (11).

1.2 Epidemiologie

Das Basalzellkarzinom kommt weltweit vor und ist der häufigste maligne Hauttumor des Menschen in Mitteleuropa (20-23). Ein Auftreten vor dem 40. Lebensjahr ist selten. Trotzdem können auch Kinder betroffen sein (24). Die Inzidenz steigt etwa linear mit dem Lebensalter, wobei das Durchschnittsalter der Betroffenen bei 60 Jahren liegt (4).

Allerdings tritt es hauptsächlich in sonnengeschädigter Haut, sowie bei Menschen mit UV-empfindlicher bzw. heller Haut auf (25-27). So wurde das Basalzellkarzinom bereits bei hellhäutigen Menschen als die weltweit häufigste auftretende maligne Erkrankung genannt (28). Die Lebenszeitprävalenz eines hellhäutigen Menschen liegt bei bereits 30% (29). Bei dunkelhäutigen entsteht es zehnmal seltener als bei

hellhäutigen Völkern. Männer, die sich prozentual gesehen häufiger der UV-Strahlung aussetzen, sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen (4). Aufgrund der höheren UV-Strahlung werden in Australien deutlich höhere Inzidenzraten festgestellt. Beispielsweise kommen Giles et al. 1985 schon auf eine Inzidenzrate von 510 Basalzellkarzinom-Fällen pro 100.000 Personenjahre (30).

Das erhöhte Risiko für ein Basalzellkarzinom bzw. Hauttumore durch UV-Strahlen wird damit erklärt, dass sich Cyclo-butan-Pyrimidin-Dimere (CPD) vor allem in der Telomerregion der DNS bilden (31) und UV-Strahlen die T-Zellen des Körpers hemmen (32).

Rassner et al. erkannten nicht nur das Risiko für eine Neuerkrankung, sondern stellten auch einen Zusammenhang zwischen der UV-Belastung und der Häufigkeit des Auftretens eines Basalzellkarzinoms bei ein und demselben Patienten fest. „Da die meisten Basaliome UV-induziert sind, ist ihr multiples Auftreten nicht erstaunlich. Patienten mit Basaliomen zeigen in ca. 30% gleichzeitig zwei oder mehr Basaliome, bei weiteren ca. 30% kommen im Laufe der Jahre weitere Basaliome hinzu.“ (10). Auch Macil et al. beschrieben dieses Phänomen im Jahre 2000. Sollte ein Basalzellkarzinom festgestellt worden sein, sei die Wahrscheinlichkeit eines weiteren Basalzellkarzinoms um den Faktor 10 gesteigert (33). Fritsch beschreibt die anfängliche Wahrscheinlichkeit für ein weiteres Basalzellkarzinom mit ca. 50% und auch, dass diese mit jedem Basalzellkarzinom weiter steigt (4).

Insgesamt steigt die Inzidenz des Basalzellkarzinoms deutlich und stetig (23, 34-37). In Schweden beispielsweise stieg die Inzidenzrate zwischen 1971 bis 1980 jedes Jahr um ca. 11,9%. Dadurch hatte sich die Inzidenzrate über fast 10 Jahre mehr als verdoppelt (38). Im Saarländischen Krebsregister von 1989 lassen sich ähnliche Inzidenzen und deren Steigerungswerte finden (39). Eine Studie aus Wales erfasste in ihrer Untersuchung eine Zunahme der Basalzellkarzinome um 66% innerhalb von 10 Jahren (37). Laut der „American Cancer Society“ (2012) wiesen 8 von 10 Patienten mit Hauttumoren ein Basalzellkarzinom auf, bei mehr als 2 Millionen neuen Fällen pro Jahr. In Deutschland beläuft sich die Inzidenz aktuell auf etwa 200 pro 100.000 Einwohner und pro Jahr (40, 41).

Die Epidemiologie des Trichoblastoms ist weniger gut untersucht, wodurch es wenige Angaben gibt. Das Trichoblastom tritt erstmals nach der Pubertät auf und zeigt eine langsame Progredienz (4).

1.3 Lokalisation

Basalzellkarzinome können prinzipiell überall am Körper entstehen. Nicht-follikeltragende Regionen (Handflächen, Fußsohlen) und die Mund- und Genitalschleimhaut sind kaum betroffen. Bevorzugt ist vor allem der Kopf-Hals-Bereich mit einer 80%igen Wahrscheinlichkeit (21) und zumeist die Gesichtsmitte (Nase, Orbital- und Präaurikularregion). Dies hängt mit der dort höheren UV-Strahlenexposition zusammen.

Das Verteilungsmuster korreliert allerdings nicht streng mit der kumulativen UV-Belastung (4, 10). Nicht selten können Basalzellkarzinome daher auch an kaum UV-belasteten Körperstellen (Capillitium, retroaurikulär) oder auch an Körperstellen ohne deutliche aktinische Vorschäden (Rumpf) vorkommen (4).

Das Trichoblastom tritt überwiegend im Gesicht, vor allem am Sulcus nasolabialis auf, aber auch lumbosakral (4).

1. 4. Malignität versus Benignität unter Betrachtung des Haarfollikels als Ursprung

Die in dieser Arbeit herangezogene Klassifikation von Tumoren nach Ackerman orientiert sich an der follikulären Differenzierung der verschiedenen Proliferationen, da der Haarfollikel als Hautanhangsgebilde Ursprung der Adnextumore ist. Die Betrachtung der Haaranatomie ist somit Grundlage zum Verständnis der Adnextumore.

Der Haarfollikel wird synonym auch Folliculus pili oder Haarbalg genannt (42). Er umschließt von außen die Haarwurzel (Radix pili). Der Haarfollikel weist in der Histologie eine charakteristische, schichtartige Struktur auf.

Diese Schichten lassen sich in zwei Teile gliedern. Einem mesenchymalen Teil, aus dem Korium stammend und einem epithelialen Teil, aus der Epidermis stammend. Ersterer gliedert sich in drei weitere Schichten: eine dünne äußere Schicht aus Bindegewebsfasern und -zellen mit vielen Kapillaren und markhaltigen Nervenfasern und vereinzelten Fettzellen, die Längsfaserschicht (als Abkömmling der Lederhaut), sowie eine dicke Schicht aus kreisförmig angeordneten Fasern (Ringfaserhaut) und einer dichten inneren Hyalinschicht (42).

Insgesamt können sechs verschiedene Schichtungen erkannt werden, welche je nach Schnittrichtung des Gewebes einen unterschiedlichen Einblick in diese Schichtungen

bieten (s. Abb. 1 und 2). Die äußere Wurzelscheide wird von außen von einer glasartigen Basalmembran umgeben. Nach innen grenzt die äußere Wurzelscheide an die innere Wurzelscheide, welche aus Henle-Schicht, Huxley-Schicht und Kutikula besteht und das innerste Haarmark umschließen (43). Am unteren Ende des Haarfollikels bildet dieser eine knollenartige Verdickung, die Haarzwiebel (Bulbus pili).

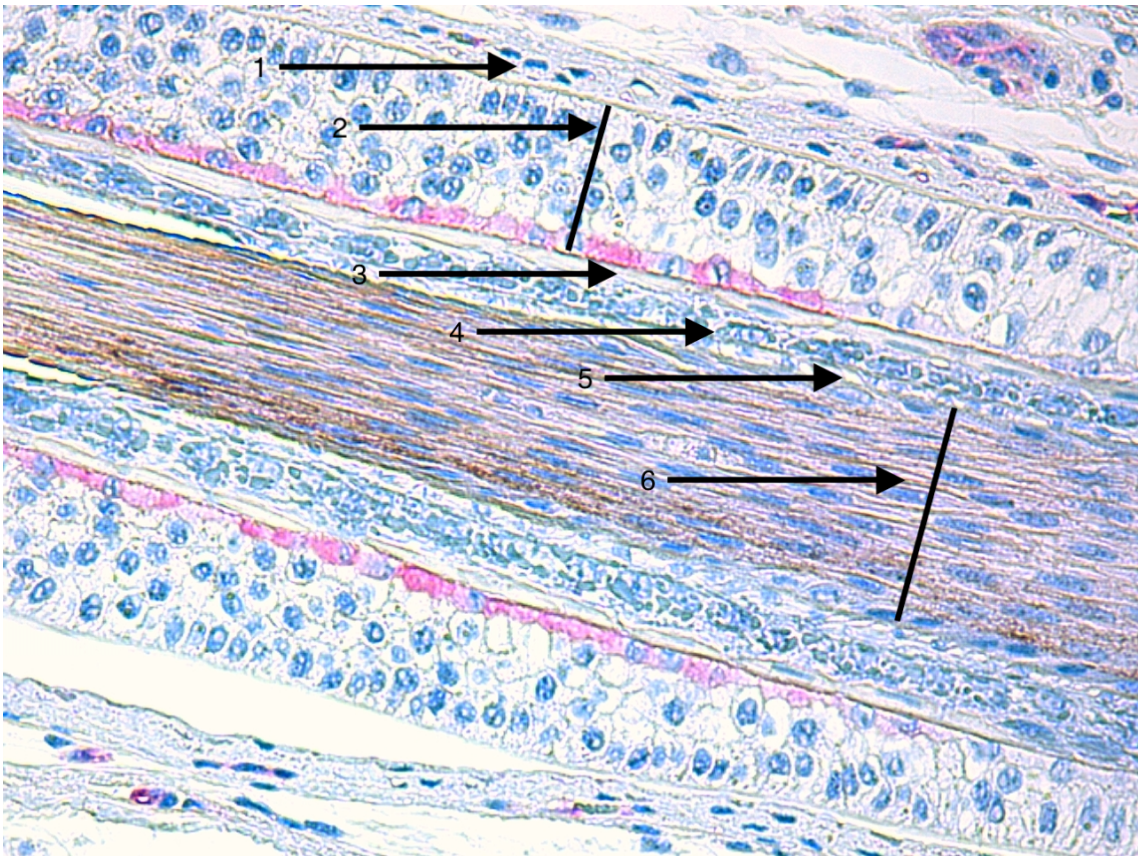


Abbildung 1: Längsschnitt eines Haarfollikels in einer Nestin-Färbung an normaler Kopfhaut in 200facher Vergrößerung: Von außen nach innen: glasartige Basalmembran (1), äußere Haar-Wurzelscheide (2), Henle-Schicht (3), Huxley-Schicht (4), Kutikula (5), Haarrinde mit Haarmark und Pigmenten (6).

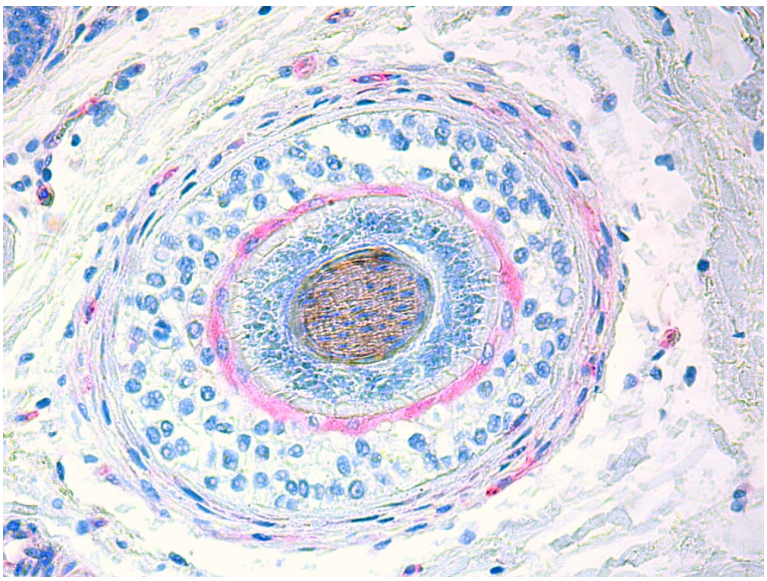


Abbildung 2: Querschnitt eines Haarfollikels in einer Nestin-Färbung an normaler Kopfhaut in 200facher Vergrößerung. Schichtung analog zur Abb. 1.

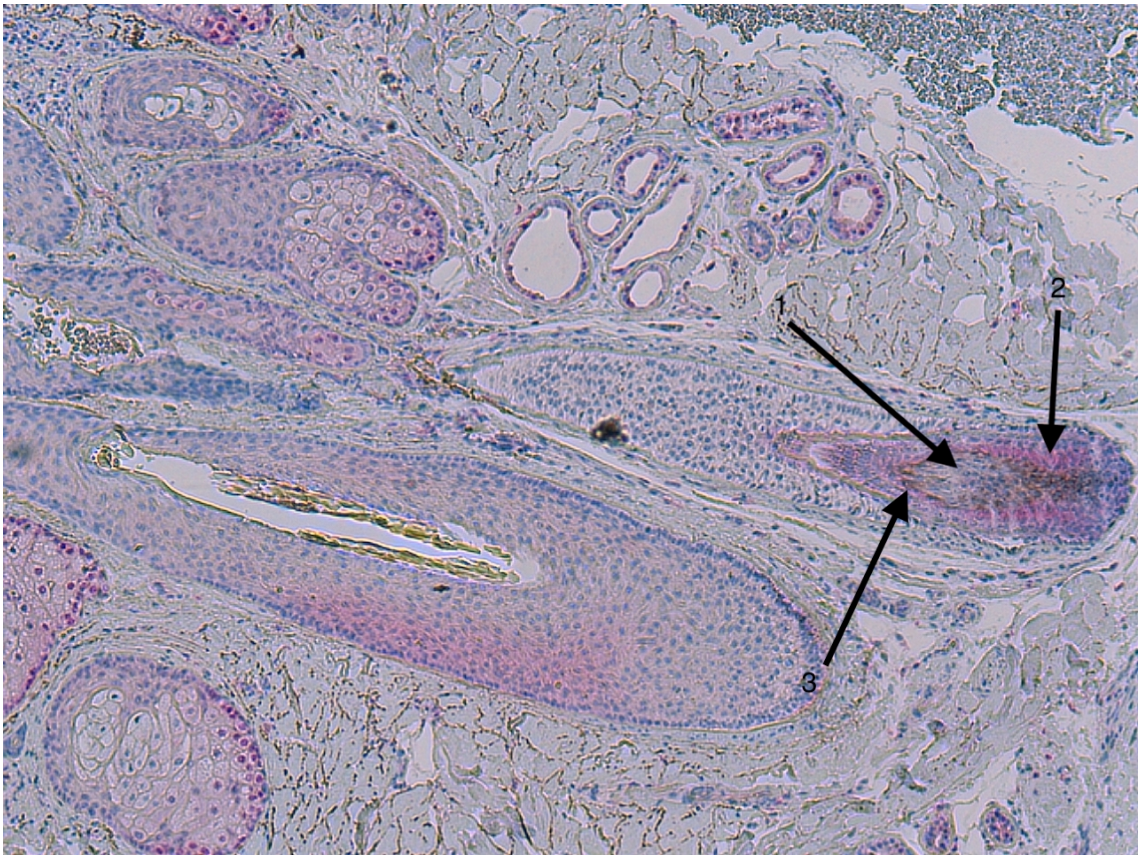


Abbildung 3: Androgenrezeptorfärbung an normaler Kopfhaut in 50facher Vergrößerung: Haarpapille (1) mit der diese umgebenden Haarmatrix (2) und den dort vorhandenen Pigmenten (3).

Der Haarfollikel weist eine enge Beziehung zu den hier besprochenen Tumoren auf und ist daher von großer Bedeutung:

So tritt das Basalzellkarzinom in Körperregionen, welche Haarfollikel tragen, auf (4) und entspricht in seinen Differenzierungsmöglichkeiten denen des embryonalen Haarkeimes (5). Einschränkend hierzu muss jedoch erwähnt werden, dass den neuesten Ergebnissen zufolge, das Basalzellkarzinom auch in Regionen gefunden wurde, die keine Haarfollikel trugen (Schleimhäute), aber sehr selten sind (44). So machen beispielsweise Basalzellkarzinome der Vulva jedoch nur 0,01-1,75% aller Basalzellkarzinome aus (45). Auch vom Basalzellkarzinom am Fußnagel wurde bereits berichtet (46).

Das Trichoblastom ist, wie das Basalzellkarzinom, ein Adnextumor ausgehend vom Haarfollikelepithel (23), bzw. nach der Definition von Headington ein Tumor des Haarkeimes (17).

Tumore mit einer eindeutig hochdifferenzierten follikulären Differenzierung lassen darauf schließen, dass es sich um eine benigne Neoplasie handelt. So kann man das

Trichoepitheliom histologisch gut klassifizieren. Beim Basalzellkarzinom kann die follikuläre Differenzierung histomorphologisch oft nicht erkannt werden (47), da vor allem bei den malignen Tumoren die eindeutige Verwandtschaft zu dem normalen Haarfollikelepithel zum Teil nicht nachzuvollziehen ist (47). Diese Gemeinsamkeit und auch dieser Unterschied sind wichtige differentialdiagnostische Merkmale. So weisen im histologischen Schnitt sichtbare primitive Haarpapillen auf einen gutartigen Tumor, in unserem Falle ein Trichoblastom, hin. Von besonderer diagnostischer Bedeutung ist hierbei der Nachweis eines organoiden Aufbaus der primitiven Haarpapille, bestehend sowohl aus einem epithelialen, als auch einem mesenchymalen Anteil. So ist der mesenchymale Anteil mit seinem fibrovaskulären Stroma, welches vor allem im Trichblastom zu finden ist, ein entscheidender differentialdiagnostischer Unterschied. Allgemein ist die Haarpapille eine kegelförmige Struktur, umgeben von der Haarmatrix, im Inneren der Haarzwiebel. Die Papille ist mit zahlreichen Kapillaren versorgt und weist ein muzinöses Bindegewebe mit Fibrozyten auf (sog.: fibrovaskulärer Anteil). In den angrenzenden Zellschichten finden Mitosen statt. Der Haarpapille wird vor allem die Funktion der Kontrolle der epithelialen Zellproduktion zugeschrieben.

Die Unterscheidung eines Basalzellkarzinoms oder Trichoblastoms anhand des histologischen Befundes entscheidet gleichzeitig darüber, ob der vorhandene Tumor als bösartig oder gutartig betrachtet wird. Dies ist von Bedeutung, sowohl für den Patienten, als auch für den Behandler, da es unterschiedliche Konsequenzen nach sich zieht:

Die Diagnose eines bösartigen Tumors ist für Patienten eine psychische Belastung. Die Nachkontrollen, Vorsorgeuntersuchungen, gegebenenfalls anfallenden Nachexzisionen und die Angst vor einem Rezidiv belasten den Patienten und stellen eine beträchtliche finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem dar. Eine Studie aus den Vereinigten Staaten von Amerika macht deutlich, dass durch die steigende Inzidenz, auch die Anzahl der Behandlungen zunimmt und das System mit steigenden Kosten immer weiter belastet wird (48). Doch auch die sozialen Konsequenzen sollten nicht vernachlässigt werden. So hat die Diagnose eines malignen Tumors weitreichende Folgen für den Betroffenen. Denn abgesehen von den psychologischen Folgen, haben derartige Diagnosen Einfluss auf die Kreditwürdigkeit oder die Vertragsmöglichkeiten bei Versicherungen. Dies kann die Lebensplanung eines Patienten beeinträchtigen und macht erneut deutlich, wie wichtig eine präzise Diagnosestellung ist.

Zu beachten ist, dass bei der Diagnosestellung an mögliche Syndrome (Basalzellkarzinomsyndrom, Bazex-Dupré-Christol-Syndrom, Rombo-Syndrom) gedacht werden muss, welche im Zusammenhang mit der Entstehung des malignen Tumors stehen können. Diese müssen im Einzelfall abgeklärt werden.

Nach wie vor sind die zur Beurteilung zusammengefassten Kriterien von Ackerman zur Differenzierung zwischen gutartigen und bösartigen Hautneoplasien relevant. Die in seinem Buch „Neoplasms with Follicular Differentiation“ beschriebenen Kriterien fasst die untenstehende Tabelle zusammen. Diese beziehen sich auf die Struktur und Architektur der Tumore.

Tabelle 1: Beschreibung von Benignität und Malignität nach Ackerman (18).

Benigne Neoplasien	**Maligne Neuoplasien**
symmetrisch	asymmetrisch
scharf abgegrenzt	-
v-förmig	-
glatte, stufenlose Ränder	irregulär, zerklüftete Ränder
kompaktes peripheres fibröses Gewebe	unkompaktes peripheres fibröses Gewebe
Spalten zwischen dem modifizierten Stroma, das neoplastische epitheliale Zellen und fibröses Gewebe einwickelt	Spalten zwischen neoplastisch epithelialen Zellen und dem modifizierten Stroma
„pops out“ oder „shells out“ nach der Inzision	-
-	neigt zur Ulzeration
Zellnester sind meist durch reichlich Stroma voneinander getrennt	Zellnester gedrängt: wenig Stroma
Zellnester relativ einheitlich in Form und Größe	Zellnester variieren deutlich in Form und Größe
einzelne Zellnester haben glatte, stufenlose Ränder	einzelne Zellnester haben zerklüftete Ränder
eigenständige Anordnung neoplastischer Zellen	Anordnung neoplastischer Zellen geschichtet
gut differenziert	-
normale Adnexstruktur	-
-	Nekrosen in Massen
-	neoplastische Zellen perineural episodisch
-	manchmal intravaskuläre neoplastische Zellen
-	epitheliale Zellen oft in Strängen zwischen Kollagenbündeln
einzelne Aggregationen neigen dazu deszendierend kleiner zu werden	-

Auch aktuelle Arbeiten beziehen sich auf diese Kriterien (vgl. Malignitätskriterien von C. Thoms, 2006).

Tabelle 2: Malignitätskriterien von C. Thoms, 2006:

Malignitätskriterien
Asymmetrie
ungleichmäßige Tumorzellformation
leichte bis mittelgradige Kernpolymorphie
vermehrte Mitosen

2. Zielstellung der Arbeit

Das Basalzellkarzinom kann vom Trichoblastom histomorphologisch oft nur schwer abgegrenzt werden (49, 50). Beides sind Adnextumore und haben ihren Ursprung im Haarfollikel. Sowohl klinisch, als auch histopathologisch gleichen sich die beiden Tumore in ihrer jeweiligen Charakteristik, sodass, zumal an einer Probe- oder Teilexzision, mitunter nur schwer eine eindeutige Diagnose getroffen werden kann.

Es wurde bereits mehrfach versucht, die beiden Tumore histomorphologisch zu differenzieren, allerdings führte dies bisher zu keinem eindeutigen Ergebnis. Nach wie vor gibt es keine eindeutige immunhistochemische Differenzierungsmöglichkeit, sodass der Pathologe im Einzelfall vor einer schwierigen Aufgabe steht.

In der folgenden Arbeit werden alle immunhistochemischen Differenzierungsmöglichkeiten, die in der Literatur als geeignet in Erwägung gezogen wurden, zusammengetragen und erneut untersucht und bewertet. Dies stützt sich auf die Eigenschaften und das Färbeverhalten der jeweiligen Antikörper. Es soll untersucht werden, ob es möglich ist, durch semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Schnitte dem Pathologen eine sichere Möglichkeit zur Differenzierung zu bieten. Dann wäre auch die Formulierung eines differentialdiagnostischen Leitfadens zur eindeutigen Diagnostik und Zuordnung (Basalzellkarzinom versus Trichoblastom) möglich.

Sollte es nicht möglich sein, durch die hier untersuchten immunhistochemischen Methoden eine Differenzierung zwischen Basalzellkarzinom und Trichoblastom vorzunehmen, so müsste die Einteilung der Adnextumore weitergehend kritisch hinterfragt werden (18, 19, 51, 52). Es stellt sich dann nämlich die Frage, ob es sich tatsächlich um zwei Entitäten handelt, welche voneinander differenziert werden können und sollen, oder gegebenenfalls um polare Enden eines diagnostischen Spektrums, an dessen einem Ende sich ein Trichoblastom und am anderen Ende ein solides oder

mikronoduläres Basalzellkarzinoms befindet. Diese Möglichkeit wird in dieser Arbeit abschließend diskutiert.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Literatur

3.1 Histomorphologische Charakteristika

Ackerman beschreibt die bemerkenswerte Übereinstimmung der histologischen Befunde des Basalzellkarzinoms und der des Trichoblastoms und grenzt das Trichoblastom vom Basalzellkarzinom durch histologische Merkmale anhand folgender Tabelle (s. Tab. 3) ab.

Tabelle 3: Histomorphologischer Vergleich des Trichoblastoms mit dem nodulären Basalzellkarzinom nach Ackerman (19):.

TRICHOBLASTOM	NODULÄRES BASALZELLKARZINOM
symmetrisch	asymmetrisch
Zellnester mit weichen Begrenzungen	Zellnester mit weichen oder zerklüfteten Begrenzungen
Spalten im Stroma	Spalten zw. Zellnestern und dem Stroma
fibrotisches Stroma	Stroma wie Granulationsgewebe
vertikale Orientierung	horizontale Orientierung
Hervortreten nach Inzision oberhalb davon	kein Hervortreten
wenig mitotische Bereiche	viele mitotische Bereiche
Kern von neoplastischen Zellen monomorph	Kern teils pleomorph
follikuläre Differenzierung	keine follikuläre Differenzierung
zystische Strukturen enthalten Korneozyten	keine zystischen Strukturen mit Korneozyten
nicht ulzerierend	ulzerierend
netzartiges Muster	kein netzartiges Muster
selten Zeichen einer talgdrüsigen Differenzierung	keinerlei Zeichen einer talgdrüsigen Differenzierung
Stoma gering bis üppig	geringes Stoma

Die Tabelle von Ackerman wird durch weitere histomorphologische Kriterien des Basalzellkarzinoms und des Trichoblastoms vervollständigt (2, 4-6, 11, 12, 14, 53, 54) (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammenfassung der histomorphologischen Kriterien des Basalzellkarzinoms und des Trichoblastoms (2, 4-6, 11, 12, 14, 53, 54):

Basalzellkarzinom:	**Trichoblastom:**
große, ovale, uniforme Kerne mit schmalem Zytoplasmasaum	
Drüsen- oder follikelartig angeordnete Tumorstränge, an deren Rand sich palisadenartig die Tumorzellen aneinanderreihen: Periphere Palisadenstellung	kleine Gruppen von basaloiden Zellen, die zur Peripherie hin häufig eine Palisadenstellung aufweisen
erinnern an basale Epidermiszellen	
zwischen den Basalzellkarzinomsträngen liegt das bindegewebige Stroma	das Stroma ist feinfaserig (dem normalen Bindegewebe der Follikelscheide entsprechend)
hohe Kern-Plasma-Relation (daher basophil)	intratumoröse Merkelzellen
scharf abgegrenzte lappige, strang- oder fingerförmige Zellnester	zahlreiche, gut umschriebene, basaloide Zellaggregate, umgeben von einem zellreichen fibrösen Stroma
halbmondförmige Retraktionsartefakte (Stroma-Reaktion), um den Tumor ist das Bindegewebe schalenartig verdichtet (fibrosierende Stromareaktion)	dazugehöriges Stroma, mit papillären, mesenchymalen Zellen
vom Oberflächenepithel ausgehende Proliferation basaloider monomorpher Zellen	scharf begrenzte Zellnester von zellreichem Stroma umgeben, symmetrisch angeordnet und vertikal wachsend
Spaltbildung zwischen dem Tumorparenchym und dem Stroma	keine Spalträume zwischen Tumorparenchym und Stroma
geringe Kernatypien	charakteristische Spaltbildung zwischen Tumorepithel und Tumorstroma
die Epidermis oberhalb von Basalzellkarzinomen ist meist atrophisch, oftmals auch erodiert oder ulzeriert	dichtes zellreiches, von Schrumpfspalten begrenztes Stroma
im angrenzenden Bindegewebe erkennt man meist Zeichen solarer Elastose	dazugehöriges Stroma, mit papillären, mesenchymalen Zellen
Muzin	kein Muzin
direkte Verbindung zur Epidermis	
intensiv basophile, scharf begrenzte, zellreiche Tumorverbände	Zeichen einer fortgeschrittenen Differenzierung (z.B. follikuläre Papillen, Trichohyalingranula, follikuläre Zysten).

Eine Studie von Brooke et. al (1989) untersuchte verschiedene histomorphologische Merkmale auf ihre Aussagekraft und Häufigkeit im Vergleich zwischen einem keratinisierten Basalzellkarzinom und einem Trichoepitheliom. Brooke et al. schlussfolgerten, dass vor allem drei Kriterien für die Differenzierung hilfreich seien. Zum einen zählt hierzu die Spaltbildung zwischen Tumorparenchym und Stroma,

welche in 77% der Basalzellkarzinome und in 7% der Trichoepitheliome zu finden war, sowie papilläre, mesenchymale Gebilde (einer Haarpapille ähnlich), welche in 93% der Trichoepitheliome und nur in 7% der Basalzellkarzinome aufzufinden waren. Zudem wurde das Vorhandensein einer Ulzeration als Kriterium genannt. Eine Ulzeration war in keinem der Trichoepitheliomfälle zu finden, aber in 40% der Basalzellkarzinome. (50)

3.2 Zusammenfassung immunhistochemischer Merkmale und Ergebnisse der Literatur

Die oben beschriebenen morphologischen Charakteristika sind leider oft nicht deutlich ausgeprägt und nicht spezifisch. Das Trichoblastom und das Basalzellkarzinom stimmen in Teilen der histomorphologischen Kriterien überein. Diese große Ähnlichkeit stellt eine Herausforderung in der Diagnosestellung für den Pathologen dar. Daher wurde bereits in zahlreichen Arbeiten versucht, einen immunhistochemischen Marker zu finden, welcher eine einfache Differenzierung, unabhängig von dem morphologischen Aufbau der Neoplasie, ermöglicht.

In der folgenden Tabelle werden die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse der Immunhistochemie zusammengefasst. Es werden in dieser Tabelle und der folgenden Diskussion Marker betrachtet, die sich als geeignetes Hilfsmittel erwiesen und somit erfolgversprechend seien könnten.

Die vorliegende Tabelle vergleicht die positiven Fälle mit der Gesamtanzahl der untersuchten Fälle:

Tabelle 5: Zusammenfassung der bisherigen experimentellen Ergebnisse:

Anti-körper	**Quelle**	**Diagnosen: Positive/gesamte Fallzahl**	
		Basalzellkarzinome (BCC):	Trichoblastische Tumore:
Drebrin	Mizutani et. al. (55)	solides BCC: 16/20, fibrosierendes BCC: 2/2, superfizielles BCC: 3/3	TB: 2/6, TE: 2/9
Nestin	Misago et al. (56)	BCC: 0/20	TB: 15/15
	Leblebici et al. (57)	BCC: 19/27	TB: 24/27
AR	Izikson et al. (58)	BCC: 25/32	TB: 0/4, TE: 0/6
	Katona et al. (59)	mBCC: 20/31	DTE: 2/15
	Bayer-Garner et al. (60)	BCC: 21/35	

Anti-körper	Quelle	Diagnosen: Positive/gesamte Fallzahl	
		Basalzellkarzinome (BCC):	Trichoblastische Tumore:
AR	Shimanovich et al. (61)		DTE: 0/21 Trichoadenomas: 0/19
	Ansai et al. (62)	BCC: 15/30	
	Leblebici etal. (57)	BCC: 22/27	TB: 7/27
LN5	Hamasaki et al. (63)	BCC: 50/52	TB: 3/26
Bcl2	Yan et al. (64)	BCC: 26/32	
	Poniecka et al. (65)	BCC: 9/10 diffus	TE: 10/10
	McNiff et al. (66)	BCC: 10/10	TB: 3/10, 7/10
	Patil et al. (67)	BCC: 9/9	
	Basarab et al. (68)	BCC: 1/15, 6/15	TB: 2/10, 3/10
	Ionescu et al. (69)	BCC: 13/14 metastasierendes BCC: 3/4	
	Swanson et al. (70)	BCC: 43/45	TE: 27/29 DTE: 6/7
	Sabeti et al. (71)	nBCC: 19/22	TE: 10/12
	Tebcherani et al. (72)	BCC: 311/317	TE: 142/143
	Verhaegh et al. (73)	BCC: 5/5	TE: 2/5
	Mills, A. E. (74)	SBCC: 10/10	
CD34	Schirren, C. G. (47)	sklBCC: 0/10, omBCC: 3/10, nBCC: 8/17	TB: 21/29, DTE: 6/9, TE: 4/12
	MicNiff et al. (66)	BCC: 3/10	TB: 4/10
	Smith et al. (75)	BCC: 0/10	DTE: 0/4
	Swanson et al. (70)	BCC: 6/45	TE: 18/29 DTE: 2/7
	Ishida et al. (76)	BCC: 2/20	
	Tebcherani et al. (72)	BCC: 137/302	TE: 109/144
	Kirchmann et al. (77)	BCC: 0/19	TE: 16/16
	Verhaegh et al. (73)	BCC: 2/5	TE: 4/4
CK20	Hoang et al. (78)	IBCC: 0/10	DTE: 1/8
	Katona et al. (59)	mBCC: 1/31	DTE: 15/15
	Schirren, C. G. (47)	sklBCC: 0/10, omBCC: 0/10, nBCC: 0/17	TB: 0/29, DTE: 0/9, TE: 0/11
	McNiff et. al. (66)	BCC: 0/10	TB: 7/10
	Misago et al. (79)		„TB with BCC-like foci“ 0/2, TB: 5/5
	Shimanovich et al. (61)		DTE: 21/21 Trichoadenomas: 18/19

Anti-körper	Quelle	Diagnosen: Positive/gesamte Fallzahl	
		Basalzellkarzinome (BCC):	Trichoblastische Tumore:
CK20	Abesamis-Cubillan et al. (80)	mBCC: 1/11	DTE: 14/14
	Sellheyer et al. (81)	BCC: 1/10	TE: 11/11, TB: 11/11
	Tebcherani et al. (72)	BCC: 14/311	TE: 29/151
	Leblebici et al. (57)	BCC: 1/27	TB: 23/27
CK8	Kurzen et al. (82)	sBCC & mn BCC: 0/7 SBCC: 0/5 sklerosierendes BCC: 0/6	TB: 13/13
	Schirren, C. G. (47)	nBCC: 0/17 omBCC: 0/10 sklBCC: 0/10	TB: 0/27
PHLDA1	Battistella et al. (83)	BCC: 0/4	TB: 5/5
	Sellheyer et al. (81)	BCC: 0/10	TE: 11/11, TB: 11/11
	Sellheyer et al. (84)	BCC: 0/17	DTE: 21/21
	Sellheyer & Krahl (85)	BCC: 0/14	DTE: 15/16
	Sellheyer & Nelson (86)	BCC: 0/11	TE: 19/19
	Leblebici et al. (57)	BCC: 5/27	TB: 26/27
BerEP4	Ansai et al. (87)	BCC: 30/31	TE: 5/8 nTB: 9/10 DTE: 0/2
	Ansai et al. (62)	BCC: 16/30	
	Swanson et al. (70)	BCC: 44/44	TE: 24/29 DTE: 5/7
	Smith et al. (75)	BCC: 10/10	DTB: 4/4
	Shimanovich et al. (61)		DTE: 21/21 Trichoadenomas: 4/19
	Beer et al. (88)	BCC: 39/39	
	Hoang et al. (78)	IBCC: 10/10	DTE: 4/8
	Krahl und Sellheyer (89)	IBCC: 28/28	DTE: 12/16
	Tellechea et al. (90)	BCC: 22/22	
	Fan et al. (91)	BCC: 51/51	
	Ishida et al. (76)	BCC: 20/20	
	Filho et al. (92)	BCC: 20/20	
	Dasgeb et al. (93)	BCC: 24/24	TE: 8/8
	Patil et al. (67)	BCC: 9/9	
	Sellheyer et al. (84)	BCC: 17/17	DTE: 16/21
	Karahan et al. (94)	BCC: 20/20	
	Mashhood et al. (95)	BCC: 29/29	

Anti-körper	Quelle	Diagnosen: Positive/gesamte Fallzahl	
		Basalzellkarzinome (BCC):	Trichoblastische Tumore:
BerEP4	Sellheyer et al. (81)	BCC: 10/10	TE: 11/11 TB: 11/11
CK15	Hoang et al. (78)	IBCC: 0/10	DTE: 8/8
	Kurzen et al. (82)	sBCC &mn BCC: 0/7 SBCC: 0/5 sklerosierendes BCC: 0/6	TB: 5/13
	Misago et al. (79)		„TB with BCC-like foci“: 0/2, TB: 5/5
	Sabeti et al. (71)	nBCC:1/ 22	TE: 8/12
	Jih et al. (96)	nBCC: 7/23 keratotisch BCC: 2/7 multizentrisch BCC: 0/3 ekkrin differenziertes BCC: 1/1 morpheaformes BCC: 0/1 iBCC: 0/1 Total: 10/37	TE: 13/13
	Choi et al. (97)	BCC: 12/17	TE: 8/11
CK6	Schirren, C. G. (47)	sklBCC: 8/8, omBCC:10/10, nBCC 12/12	TB: 21/21 DTE:7/7, TE:12/12
	Vega Memije (98)	BCC: 10/10	TB: 1/10
Ki-67	Lum und Binder (99)	BCCs: 10/20	TE: 2/16
	Vega Memije (98)	BCC: 10/10	TB: 2/10
	Ionescu et al. (69)	BCC: 14/14	
CD10	Yada et al. (100)	BCC: 44/51 (Tumorzellen); BCC: 32/51 (Stromazellen)	TB: 4/5 (Tumorzellen); TB: 3/5 (Stromazellen)
	Sengul et al. (101)	nBCC: 4/18, sBCC: 1/4, iBCC 1/2, „mixedBCC“: 5/6	TE: 15/21, TB: 3/5
	Pham et al. (102)	BCC: 20/23	TE: 12/13
	Wagoner et al. (103)	IBCC: 0/2, SBCC: 14/14	
	Hoang et al. (78)	IBCC: 6/10	DTE: 0/8
	Tebcherani et al. (72)	BCC: 307/310	TE: 137/144
	Leblebici et al. (57)	BCC: 5/27	TB: 26/27

Tabelle 6: Legende zur Tabelle 5:

BCC	Basalzellkarzinom
TB	Trichoblastome
nTB	noduläres TB
TE	Trichoepitheliome
IBCC	infiltratives BCC
DTE	desmoplastisches Trichoepitheliom
SBCC	superfizielles BCC
sklBCC	sklerodermiformes BCC
nBCC	noduläres BCC
omBCC	oberflächlich-multizentrisches BCC
mBCC	morphologisch multiformes BCC
sBCC	solides BCC
mnBCC	mikronoduläres BCC

Schon häufig wurden in verschiedenen Arbeiten **Cytokeratine** (CK) getestet: Die verschiedenen Cytokeratine werden mit arabischen Ziffern nummeriert. Am häufigsten beschrieben ist das Cytokeratin-20, ein Merkelzell-Marker. Das Trichoblastom soll vereinzelte CK20-positive, in der peripheren epidermalen Schicht gelegene Merkelzellen aufweisen. Merkelzellen sind nur spärlich in den basalen Schichten der Epidermis und in Haarfollikeln zu finden. Im Basalzellkarzinom sollen Merkelzellen nicht, oder nur vereinzelt vorkommen. Somit können Merkelzellen durch ihre Anwesenheit im Trichoblastom eventuell einen Hinweis auf dessen organoide follikuläre Differenzierung geben (57, 104, 105). Auch schon Schulz et al. stellten fest, dass Merkelzellen in der Basalzellschicht von Trichoblastomen, desmoplastischen Trichoepitheliomen, den zum Nävus sebaceus zugehörigen trichoblastischen Bereichen und dem Trichoblastom zu sehen sind. Im Basalzellkarzinom sollen diese Zellen gar nicht oder kaum zu finden sein (106). Aufgrund dieser Hypothese untersuchten auch Wiedemeyer et al. 2009 die immunhistochemische Differenzierbarkeit anhand von CK20. Ihr Ergebnis war, dass der Marker zu empfehlen sei und sie eine Merkelzellhyperplasie als starkes Indiz für ein Trichoblastom halten (105). Auch McNiff et al. erachten CK20 als ein gutes Diagnostikum, ebenso auch Tebcherani 2012 und Sellheyer et al. 2013. Allerding sind meist nur wenige CK20-positive Zellen vorhanden, wodurch vor allem bei kleinen Gewebeproben die Anwendung des Kriteriums zur Differenzierung schwierig ist und dies zu einer falsch negativen Einschätzung führen kann (57).

Doch auch weitere Marker wurden untersucht. Vielversprechend schien der **Androgenrezeptor (AR)** zu sein. Der Androgenrezeptor wurde in reifen epithelialen

Strukturen der Haut und in verschiedenen Neoplasien gefunden, so auch im Basalzellkarzinom und soll in trichogenen Tumoren fehlen (58).

Die Kombination aus der Androgenrezeptor- und Cytokeratin-20-Färbung ergaben in der Studie von Katona et al. sogar, dass eine Androgenrezeptor-Negativität und Cytokeratin-20-Positivität bei 87% (14/15) der desmoplastischen Trichoepitheliome und im Gegensatz dazu beim Basalzellkarzinom eine Androgenrezeptor-Positivität und Cytokeratin-20-Negativität bei 61% (19/31) zutraf. Keines der desmoplastischen Trichoepitheliome war AR-positiv und CK20-negativ und kein Basalzellkarzinom war AR-negativ, sowie CK20-positiv. Allerdings belegen neuere Studien, dass diese Untersuchungsweise zwar sehr hilfreich, jedoch zum Teil bei immunpositiven desmoplastischen Trichoepitheliomen schwer zu diagnostizieren ist (107).

Generell äußern sich jedoch nicht alle Autoren positiv zu den Ergebnissen der Färbungen mit Cytokeratinen. Schon 1995 stellt Schirren fest, dass anhand von Intermediärfilamenten die Dignität des Tumors nicht bestimmt werden kann (47). Die untersuchten Differenzierungsantigene CK1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 17, 18, 19, 20, sowie Involucrin, alpha-SMA, CD34 und Vimentin eignen sich demnach, laut Schirren, nicht zur Unterscheidung zwischen einem Trichoblastom und einem Basalzellkarzinom. 1997 kommt Schirren in einer neuen Studie zu ähnlichen Ergebnissen. Schirren, C. G. et al. untersuchten 30 Trichoblastome und 17 noduläre Basalzellkarzinome hinsichtlich CK5/6, CK7, CK8, CK13, CK14, CK17, CK18, CK19 und CD34. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der Immunhistochemie folgerten sie, dass Cytokeratine nicht zur Differenzierung geeignet sind (108). 2001 wurde dies durch Kurzen bestätigt. Die gefundenen Cytokeratine CK6hf, CK14 und CK17 wiesen in beiden Tumoren das gleiche Färbungsmuster auf (82). Variabel, und somit nicht aussagekräftig würden sich CK15 und CK19 verhalten. Auch Poniecka stellte fest, dass bei CK7 und CK20, sowie den Marker CEA, Ham56, HPCA-1 (CD34), CD30 (Ki-1), Cam5.2 kein einheitliches Schema zur Differenzierung zu erkennen ist (65). 2014 prüfte Battistella erneut die Antigene CK17, 19, 20, 6hf, sowie AE1/AE3 und kam zu demselben Ergebnis. Eine weitere Veröffentlichung von 2014 stellte die ähnliche Expression der Cytokeratine 1, CK5, CK7, CK14, CK19 und p53 in beiden Tumoren fest und schließt sie als Diagnostikum aus (98). Die schlechte Differenzierung des Basalzellkarzinoms vom Trichoblastom durch Merkelzellen erklärt man sich teils durch verschiedene Ausprägungen des Tumors: Einige Trichoblastome können eine Mutation erfahren, wodurch sie sich immunhistochemisch dem Basalzellkarzinom nähern und somit die

Expression des CK15 verlieren und Merkelzellen verloren gehen (79). So stellte Philip E. LeBoit in seiner Arbeit „Tichoblastoma, Basal Cell Carinoma, and Follikular Differentiation. What should we trust?“, im Gegensatz zu der vorherigen Aussage von Schulz T. und seinen Kollegen, fest, dass in seiner Untersuchung Merkelzellen häufiger in den Regionen des Basalzellkarzinoms, als in denen des Trichoblastoms vorkommen (49). Die Bedeutung der Cytokeratine für die Diffenrentialdiagnostik bleibt somit kontrovers diskutiert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Cytokeratine untersucht. Das CK20, CK8 und CK15. Die ersten beiden Cytokeratine färben Merkelzellen. CK8 soll lediglich in Merkelzellen des Trichoblastoms exprimiert werden und im Basalzellkarzinom fehlen (82). Das CK15 soll in langsamen, zyklischen Zellen des Haarfollikelwulstes vorkommen (82).

CD34 ist ein Transmembranprotein und ein sogenanntes Sialomucin, welches eine Expression an frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen und vaskulär assoziiertem Gewebe zeigt. Es wird von Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen gebildet. CD34 soll spindelförmige Zellen der Dermis, sowie das den Haarfollikel umgebende Stroma färben (77). Es soll ein gutes Diagnostikum sein, da CD34 beim Trichoepitheliom das peritumorale Stroma stark anfärbe, im Basalzellkarzinom hingegen Spindelzellen, welche den Tumorknoten umgeben, hierfür negativ seien (77, 109). Auch Hashimoto K. et al. beschreiben, dass CD34-positive Spindelzellen im Stroma des Trichoblastoms, aber nicht im Basalzellkarzinom nachgewiesen werden können (54).

Im Gegensatz dazu berichteten McNiff et al. jedoch, dass ihre Färbung mit CD34 zu keiner sicheren Differenzierung führte (66) und auch Basarab T. et al. schlussfolgerten, dass CD34 nicht geeignet sei, das Basalzellkarzinom von einem gutartigen Trichoepitheliom sicher zu unterscheiden (68). Eine Studie von 2012 von Tebcherani et al., welche eine deutlich größere Fallzahl als bei den bisherigen Arbeiten verwendete, schloss CD34 ebenfalls wegen schlechter Ergebnisse für eine Differenzierung aus (72).

Cordoba et al. stellte fest, dass der Marker CD10 durchaus ein gutes Hilfsmittel darstellen könnte. CD10 ist eine Metalloendopeptidase, welche bei der Inaktivierung mehrerer aktiver Peptide mitwirkt (110). Kanitakis et al. beschrieben dann im Jahr 2000 eine Expression in der Haut und vor allem im periadnexalen Mesenchym (111). Sei entsprechend Cordoba et al. das peritumorale Stroma gefärbt, so sei eine Zuordnung zu

einem Trichoblastom möglich. Bei Färbung des Epithels allein oder des Epithels zusammen mit dem Stroma entspreche es einem Basalzellkarzinom (112). Ein Jahr später 2010 bestätigte Sengul et al., dass CD10 ein gutes Hilfsmittel zur Differenzierung darstellen könnte. Auch hier waren die Ergebnisse der stromalen Färbung im Trichoblastom und Trichoepitheliom deutlich stärker als im Basalzellkarzinom (101). Auch drei weitere Arbeiten von 2006, 2012 und 2018, welche die Differenzierung zwischen einem Trichoepitheliom bzw. Trichoblastom und dem Basalzellkarzinom untersuchten, kamen zu der Schlussfolgerung, dass eine alleinige peritumorale CD10-Färbung des Stromas ein gutes diagnostisches Hilfsmittel seien könnte (57, 72, 102).

Bcl2 (engl.: B-cell lymphoma 2) wird als Protoonkogen mit einem programmierten Zelltod in Verbindung gebracht und hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Apoptose, durch Beeinflussung der Mitochondrienmembran. Immunhistochemisch werden basale Zellen der Epidermis angefärbt. Bei der Färbung mit Bcl2 lässt sich ein Färbemuster in basalen Keratinozyten, mesenchymalen Zellen der follikulären Papille, klaren Zellen der ekkrinen Drüsen und Melanozyten, sowie Lymphozyten in der Haut erkennen (110).

Poniecka et al. schließen aus ihrer Studie, dass Bcl2 wahrscheinlich von Nutzen bei der Differenzierung zwischen einem Basalzellkarzinom und einem Trichoepitheliom sein könnte, jedoch von der variierenden Qualität der Färbungen abhängig sei. Der wichtigste Grundbaustein zur Erhebung der Diagnose sei jedoch immer noch die HE-Färbung (65). Auch McNiff et al. halten 1999 Bcl2 für eine Möglichkeit der Differenzierung (66).

Dieser Ansicht widersprechen allerdings die Arbeiten von Pham et al. (102), sowie von Cordoba et al. 2009. Hier wies Bcl2 in beiden Tumoren das gleiche Färbungsmuster auf (112). Auch Tebcheranie et al. konnten mittels Bcl2 das Basalzellkarzinom nicht vom Trichoepitheliom mit jeweils 317 und 143 Fällen unterscheiden (72).

BerEP4 ist ein monoklonaler, epithelialer Antikörper, welcher zwei Glykopeptide mit einem Gewicht von 34 und 39kDa erkennt (113). Er wird ursprünglich in vielen Arbeiten zur Erkennung eines Basalzellkarzinoms bei der Differentialdiagnose eines Plattenepithelkarzinoms verwendet, da er spezifische Epithel-Glykoprotein-Adhäsionsmoleküle (EpCAM) von Zellen des Basalzellkarzinoms nachweisen soll (114).

In sehr vielen Studien (67, 70, 75, 76, 78, 84, 86, 88-95) war eine Expression in allen Basalzellkarzinomen zu erkennen, bei den Trichoblastomen waren es 134 positive Fälle von insgesamt 175. BerEP4 soll daher nicht zwischen einem Trichoblastom und einem Basalzellkarzinom unterscheiden. Beide Tumore seien stark positiv für diesen Marker (81).

Allerdings soll **PHLDA1** (engl.: pleckstrin homology-like domain, family A, member 1; TDAG52), durch das Färben von follikulären Stammzellen, eine sinnvolle Ergänzung zur Unterscheidung der beiden Tumoren sein (83). Das desmoplastische Trichoepitheliom und das Trichoblastom sind positiv für diesen Antikörper, das morpheaforme Basalzellkarzinom negativ (84-86).

2011 wurde dann erstmals von Hamasaki et al. eine differentialdiagnostische Untersuchung zwischen dem Basalzellkarzinom und dem Trichoblastom mit Hilfe eines Laminin-Markers durchgeführt. **Laminin (Ln)-5** ist eines der häufigsten Strukturen in der Basalmembran im Gewebe von Erwachsenen. Es besteht aus drei verschiedenen Ketten: alpha-3, beta-3 und gamma-2. Letzteres wird in Tumorzellen und im Bereich des invasiven Vorgehens exprimiert. Die Studie ergab, dass Ln5-gamma2 (LN5) ein nützlicher Marker seien könnte. Im Trichoblastom lässt sich LN5 lediglich vereinzelt in der Peripherie des Tumorknotens finden. Im Gegensatz dazu war LN5 beim Basalzellkarzinom diffus positiv, bzw. stark positiv im invasiven Bereich des Tumors, sowie am Übergang zur Epidermis (63).

Drebrin ist eines der neuesten Marker, die untersucht wurden. Es ist ein F-Aktin bindendes Protein. Es wurde angenommen, dass es spezifisch für neuronale Zellen ist. Neuerdings findet man jedoch Berichte über Drebrin in nicht-neuronalen Zellen. So reichert es sich beispielsweise stark in Adhäsionsverbindungen (AJs), in gezüchteten primären Keratinozyten und im Basalzellkarzinom an. Zudem wird diskutiert, ob Drebrin an einer Tumorentstehung beteiligt seien kann. Für diese Arbeit besonders interessant ist, dass Drebrin auch an follikulären Strukturen zu finden ist, wie der äußeren Haarwurzelscheide (115) und in Stammzellen der Schweißdrüsen (116). In der Arbeit von Mizutani et al. wird Drebrin als ein nützlicher Marker zur Differenzierung der beiden Tumoren beschrieben. Denn im Gegensatz zur starken und homogenen Drebrin-Expression des Basalzellkarzinoms, vor allem an Zell-Zell Übergängen, exprimiert das Trichoblastom Drebrin nur sehr schwach und inhomogen (55).

Nestin ist ein Antikörper, der genau wie das Drebrin erst selten untersucht wurde. Mit Hilfe von Nestin sollen die mesenchymalen Zellen der perifollikulären Hülle, sowie sich entwickelnde follikuläre Papillen von embryonalen Haarkeimen angefärbt werden (56).

Misago et al. sind 2010 zu sehr guten Ergebnissen gekommen, mit einer 100% stromalen Positivität des Tichoblastoms im Gegensatz zu 0% beim Basalzellkarzinom (56). Allerding konnte eine spätere Arbeit von Leblebici et al. in 2018 diesen Erfolg nicht signifikant ($p > 0,05$) nachweisen (57).

Auch viele weitere Antikörper und Proteine wurden untersucht, wie beispielsweise p27kip1 (117), 34BE12 (98), Ki-67 (69, 98, 99) oder auch Calretinin (118). Jedoch zeigten diese sich als nicht zur Differentialdiagnostik geeignet und würden den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Antikörper

Aus der Analyse der Literatur (s. 3.2) wurde für die hier vorliegende Arbeit die folgende Auswahl an Antikörpern (s. Tab. 7) getroffen.

Tabelle 7: Ausgewählte Antikörper:

Antikörper	Hersteller	Bestell-nummer	Isotyp	Klon	Beschreibung
Anti-Drebrin antibody	Abcam	ab12350	IgG1	M2F6	monoklonal, von der Maus
Anti-Nestin antibody	Abcam	ab105389	IgG	SP103	monoklonal, vom Hasen
Anti-Human Androgen Receptor	DAKO	M3562	Androgen bound receptor	AR441	monoklonal, von der Maus
Anti-Laminin-5 (gamma2 chain)	Sigma-Aldrich	MAB19562	IgG1	D4B5	monoklonal
Anti-Human BCL-2 Oncoprotein	DAKO	M 0887	IgG1, kappa	124	monoklonal, von der Maus

Antikörper	Hersteller	Bestell-nummer	Isotyp	Klon	Beschreibung
CD34	BECTON DICKENSON	347660	IgG1, heavy chains and kappa light chains	My10	monoklonal, von der Maus
Keratin-K20 (CK20)	PROGEN	61026	IgG2a	IT-Ks 20.8	monoklonal, von der Maus
Anti-Cytokeratin (Protein 8)	BECTON DICKENSON	349205	IgG2a	CAM 5.2	monoklonal, von der Maus
TDAG52 (PHLDA1)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-23866	IgG2a, kappa light chain	RN-6E2	monoklonal, von der Maus
Anti-Human Epithelial Antigen	DAKO	M 0804	IgG1, kappa	BerEP 4	monoklonal, von der Maus
Cytokeratin 15 Antibody	Invitrogen	MA5-11344	IgG2a, kappa	LHK 15	monoklonal, von der Maus

4.1.2 Gewebeauswahl

Es wurde formalinfixiertes und paraffin-eingebettetes, archiviertes Tumormaterial klassischer solider Basalzellkarzinome des Jahres 2012, sowie Trichoblastome ab dem Jahr 2000 der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, sowie aus einem externen histopathologischen Labor in München (PD Dr. med. habil. Fritjof Eckert) identifiziert. Die Fälle wurden vollständig anonymisiert, die bereits vorhandenen Schnitte mit einem neu angefertigten HE-Schnitt vergleichend mikroskopiert und verifiziert. Es wurden für die Versuchsreihe sowohl Basalzellkarzinome, als auch Trichoblastome ausgewählt, die in toto[2] exzidiert wurden und die für die Entität typischen morphologischen Merkmale aufwiesen. Dabei wurden letztendlich 17 prototypische Basalzellkarzinomfälle und 14 prototypische Trichoblastomfälle eingeschlossen (s. Tab. 8). Zusätzlich wurden 16 Fälle zu einer „Testgruppe“ zusammengefasst (s. Tab. 8). Hierbei handelt es sich um Fälle, die anhand ihrer Morphologie selbst für erfahrene Pathologen (PD Dr. med. habil. Fritjof Eckert und Prof. Dr. med. Michael J. Flaig) nicht zweifelsfrei einer der beiden Tumorgruppen zugeordnet werden konnten. Diese Fälle weisen teils Basalzellkarzinom-typische als auch Trichoblastom-ähnliche Strukturen auf oder verhalten sich sogar teils biphasisch. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, diese Fälle einer der beiden

[2] Der Tumor wird als Ganzes mit angrenzendem Gewebe entfernt

Tumorentitäten eindeutig zuzuordnen. Aus den in dieser Arbeit resultierenden Ergebnissen könnte ein diagnostischer Algorithmus abgeleitet werden, der die beiden Entitäten sicher differenziert. Gelingt das nicht, ist die Frage zu erörtern, ob diese Fälle das Kontinuum zwischen den polaren Enden einer Tumorgattung darstellen.

Tabelle 8: Klinik der ausgewählten Gewebeproben:

Fallbezeichnung T = Trichoblastom B = Basalzellkarzinom F = Testgruppe	**Geschlecht** m = männlich w = weiblich	**Lokalisation**	**Alter**
T1	w	Nase	40
T2	m	hochparietal	57
T3	w	supraaurikulär	27
T4	w	Nase	73
T5	w	Stirn	64
T6	m	Glabella	19
T7	w	Stirn	66
T8	w	Nase	48
T9	m	Scapula	64
T10	m	Ohr	73
T11	m	Kniekehle	73
T12	w	Hals	65
T13	m	Glabella	45
T14	w	Kinn	72
B1	m	Hals	61
B2	m	Brust	89
B3	m	sternal	72
B4	w	Brust	62
B5	m	Brust	52
B6	w	Stirn	84
B7	w	keine Angabe	28
B8	m	Gesicht	79
B9	m	Brust	79
B10	w	Stirn	81
B11	m	Stirn	70
B12	m	Auge	59
B13	w	Arm	74
B14	m	Brust	74
B15	m	keine Angabe	37
B16	w	parietal	31
B17	m	Stirn	80
F1	m	Nase	48
F2	w	Gesicht	84
F3	w	Nase	76
F4	w	Nase	61
F5	w	Nase	51
F6	w	Auge	41
F7	w	Stirn	39

Fallbezeichnung T = Trichoblastom B = Basalzellkarzinom F = Testgruppe	**Geschlecht** m = männlich w = weiblich	**Lokalisation**	**Alter**
F8	m	Rücken	81
F9	w	Hals	47
F10	w	Stirn	39
F11	w	Gesicht	51
F12	w	Bein	73
F13	w	parietal	59
F14	w	Nase	56
F15	w	Dekolleté	58
F16	m	Nase	57

4.1.3 Verwendete Puffer und Reagenzien

Tabelle 9: Die verwendeten Puffer:

Puffer	**Material und Methode**
Protease (Typ XXIV, Sigma) für enzymatische Vorbehandlung	5mg Protease + 10ml Tris-HCL-Puffer 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Immer frisch ansetzen.
EDTA-Kochpuffer pH 8,0	2ml 0,5M EDTA (fertige Lösung) in 1l Aqua dest. pH auf 8,0. Lagerung bei Raumtemperatur
Citrat pH 6,0	Stammlösung A: 5,25g Citronensäure-Monohydrat mit 250ml sterilem Aqua dest. Lagerung im Kühlschrank (4°C). Stammlösung B: 14,7g Tri-Na-Citrat-Dihydrat mit 500ml sterilem Aqua dest. Lagerung im Kühlschrank (4°C). Gebrauchslösung: 18ml Stammlösung A + 82ml Stammlösung B mit 1lml sterilem Aqua dest. Lagerung bei Raumtemperatur.
Tris-HCL-Puffer	10x-Tris-Stammlösung: 60,55g Trizma-Base + 87,66g NaCl auf ca. 900ml mit sterilem Aqua dest. (Aqua ad iniectabilia) auffüllen und auf den Magnetrührer stellen. Mit ca. 53ml 25%ige Salzsäure auf pH 7,6 einstellen und dann mit sterilem Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen. Gebrauchslösung: 100ml 10x-Tris-Stammlösung auf 1 Liter mit normalem Aqua dest. auffüllen und 500µl Tween zugeben.
1%ige KOH	8.0N Potassium Hydroxide 1:40 mit Aqua dest. verdünnen: 200µl 8.0N Potassium Hydroxide + 7800µl Aqua dest.
Blockierungslösung Tris+Milch (Blotto, non-fat dry milk)	0,1%ige Milch-Lösung aus Tris-HCL-Gebrauchslösung

4.1.4 Verwendete Reagenzien und Lösungsmittel

Tabelle 10: Die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel:

Reagenz	**Hersteller**
Dako REAL ™ Detection System Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse	DAKO
Trizma®base Primary Standard and Buffer, ≥99.9% (titration), crystalline	SIGMA-Aldrich®
Sodium chloride Puriss. P.a., ≥99.9% (AT)	SIGMA-Aldrich®
Aqua ad iniectabilia Lösungsmittel zur Herstellung von Parenteralia	BRAUN
Blockierungslösung mit Blotto (non-fat dry milk) 0,1%	Santa Cruz Biotechnology (sc-2335) 0,2g Blotto auf dem Magnetrührer in 200ml Tris-Gebrauchslösung lösen. Lagerung im Kühlschrank (4°C).
„Substrat + Levamisole“ für Chromogen	50ml Dako Real AP Substrat Buffer in Röhrchen geben und 5 Tropfen Dako Real Levamisole zugeben. Lagerung im Kühlschrank (4°C).
Chromogen	„Substrat+Levamisole“ + Chromogen Red 1C, 2D und 3E in Abhängigkeit vom Endvolumen. Immer frisch ansetzen.
Wasser zum Bläuen für Techmate	500ml Leitungswasser + 250µl Tween. Lagerung im Kühlschrank (4°C).
Hämalaun für Techmate	50ml Röhrchen mit 50ml „Hämalaunlösung sauer nach Mayer“ füllen und 25µl Tween zugeben. Lagerung bei Raumtemperatur.

4.2 Methoden

Folgende Literatur wurde zur Erarbeitung der Methoden verwendet: vgl.: (119, 120)

4.2.1 Herstellung der Schnitte

Von den jeweiligen Paraffinblöcken wurden, nach 10 Minuten Lagerung auf einer Kühlplatte, 4µm dicke Schnitte mit Hilfe des Mikrotoms hergestellt, anschließend im

Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgetragen. Es folgte das Trocknen im Brutschrank bei 37 Grad Celsius für je einen Tag.

4.2.2 Vorbehandlung

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte zweimal für jeweils 5 Minuten mit Xylol (Merck 8688), gefolgt von der Rehydrierung der Schnitte für jeweils 2 Minuten in Alkohol mit absteigender Konzentration (96%, 80%, 70%).

Anschließend wurden die Schnitte zweimal gewässert und in Abhängigkeit von dem jeweiligen Primär-Antikörper vorbehandelt (s. Tab. 11). Die Vorbehandlung demaskiert das spezifische Antigen/Epitop, sodass der später verwendete Antikörper dieses Antigen/Epitop erkennen und binden kann. Ermöglicht wird diese Demaskierung durch verschiedene Enzyme oder Hitze. Die entsprechenden Vorbehandlungen mit den Enzymen oder der Hitzedemaskierung wurden im Labor vor Beginn der Versuchsreihe ausgetestet und sind in Tabelle 11 aufgelistet.

4.2.3 Austestung der Vorbehandlung und Verdünnung

Die Antikörper CK15, Drebrin, Nestin, Anti-Laminin-5 und der Androgenrezeptor wurden neu etabliert. Die genannten Antikörper wurden mit verschiedenen Vorbehandlungen und mittels einer Verdünnungsreihe ausgetestet. Zur Verdünnung wurde ein Antikörper Diluent verwendet. Für die Austestung der jeweiligen Verdünnungskonzentrationen wurde Gewebe normaler Kopfhaut verwendet. An diesem Gewebe konnten die Färbungen der eingesetzten Antikörper, aufgrund der zahlreichen haarfollikulären Strukturen, gut nachvollzogen werden. Die Testreihen wurden anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet und beurteilt. So konnte schließlich die jeweils optimale Vorbehandlung und Verdünnung der Antikörper ermittelt werden:

Tabelle 11: Die jeweiligen Antikörper mit ihrer Vorbehandlung und Verdünnung:

Antikörper	**Vorbehandlung**	**Antikörper-Verdünnung**
Drebrin	Protease: Auf Schnitte auftragen und 10 Minuten inkubieren.	1:200
Nestin	Citrat: 15 Minuten im Dampfdrucktopf mit Kochpuffer in Kunststoffküvette kochen und anschließend 10 Minuten abkühlen.	1:20

Antikörper	Vorbehandlung	Antikörper-Verdünnung
Androgenrezeptor	EDTA: 15 Minuten im Dampfdrucktopf mit Kochpuffer in Kunststoffküvette (Choplin-Jar) kochen und anschließend 10 Minuten abkühlen.	1:50
LN5	Protease: (analog zu Zeile 1, Antikörper Drebrin)	1:10
CK15	EDTA: (analog zu Zeile 3, Androgenrezeptor)	1:400
Bcl2	Citrat: (analog zu Zeile 2, Nestin)	1:150
CD34	KOH: 1%ige KOH-Lösung auf Schnitte geben und 30 Minuten inkubieren.	1:100
CK20	Protease: (analog zu Zeile 1, Antikörper Drebrin)	1:30
CK8	Protease: (analog zu Zeile 1, Antikörper Drebrin)	1:25
PHLDA1	EDTA: (analog zu Zeile 3, Androgenrezeptor)	1:100
BerEP4	TRS 6,1: 15 Minuten im Dampfdrucktopf mit Kochpuffer in Kunststoffküvette kochen und anschließend 10 Minuten abkühlen.	1:2000

Für die Lagerung der entparaffinierten Schnitte bis zum Versuchsbeginn diente ein Tris-HCL-Gebrauchspuffer.

4.2.4 Immunhistochemische Färbung

Gefärbt wurde sowohl mit dem Autostainer TechMate 500 Plus der Firma DAKO-Cytomation, als auch von Hand.

Bei der manuellen Färbung wurde zur Inkubation der Schnitte eine Feuchtkammer verwendet. Nach den jeweiligen Inkubationsschritten wurde mit einem Tris-HCL-Puffer gespült. Dieser Puffer sättigt unspezifische Reaktionen zwischen Antikörpern und Proteinen und setzt die Oberflächenspannung herab.

Zuerst wurde allerdings das Blockungsreagenz mit Milchpulver 0,1%ig für 10 Minuten auf die Schnitte aufgetragen und danach abgegossen. Die hierbei stattfindende Blockierung ist wichtig, damit unspezifische Bindungen der Proteine und des Detektionssystems verhindert werden und so unter dem Mikroskop störende

Hintergrundfärbungen von unspezifischen Bindungen vermieden werden können und daher eine rein spezifische Bindung sichergestellt werden kann (120).

Danach wurde der jeweilige Primärantikörper mit der entsprechenden Verdünnung für 25 Minuten aufgetragen. Nachfolgend wurden die Schnitte mit dem Tris-HCL-Puffer drei Mal abgespült.

Es folgte die Detektion der gebundenen Primärantikörper mit dem oben genannten Detection-System von der Firma DAKO:

Dazu wurde als erstes „Link“, ein biotinylierter Sekundärantikörper für 5 Minuten aufgetragen. Dieser mit Biotin markierte Sekundärantikörper wird als Vermittler zwischen dem Primärantikörper und dem anschließend verwendeten Komplex benutzt. Aufgrund der vermittelnden Funktion wird dieser Sekundärantikörper auch Brückenantikörper genannt. (120)

Die verwendete Methode entspricht der Labeled (Strept) Avidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode). Hierbei ist keine Fluoreszenz direkt an den Primärantiköper gebunden, sondern es wird ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper benötigt, an welchen sich dann später folgend zusätzlich das an ein Enzym gebundene Avidin binden kann.

Nach den 5 Minuten mit dem aufgetragenen „Link“ wurden die Schnitte erneut drei Mal mit dem Tris-HCL-Puffer abgespült, um dann das an ein Enzym (alkalischen Phosphatase) gebundene (labeled) Streptavidin für 5 Minuten aufzutragen. Hier nutzt man die Affinität des Avidins zum Biotin. Das Streptavidin-Enzymkonjugat bietet nun am Sekundärantikörper vier Bindungsstellen für das Biotin.

Nach erneutem dreimaligen Abspülen wurde für 10 Minuten das mit Substrat angemischte Fast Red Chromogen aufgetragen. Die alkalische Phosphatase spaltet daraufhin hydrolytisch das Substrat Naphtholphosphatester in Phenolverbindungen und Phosphate. Die Phenole reagieren dann mit den Diazoniumsalzen des Chromogens. Es entstehen unlösliche Azofarbstoffe. Das Ergebnis ist eine rote Färbung und dient als Nachweis für das vom primären Antikörper erkannte Zielantigen bzw. den hier verwendeten Komplex. Die spezifische Färbung ist später unter dem Mikroskop rot zu erkennen.

Das Chromogen wurde daraufhin drei Mal mit dem Tris-HCL-Puffer abgespült.

Als letztes wurde Hämalaun für 30 Sekunden aufgetragen. Das Hämalaun bewirkt eine Gegenfärbung der Zellkerne, wodurch diese blau gefärbt sichtbar werden. Das Hämalaun wurde abgegossen und in Leitungswasser gespült. Die Schnitte blieben anschließend zum Bläuen für 5 Minuten im Leitungswasser stehen.

Danach wurden die Schnitte mit dem wässrigen Eindeckmedium Glycergel der Firma DAKO eingedeckt. Das Eindeckmedium musste eine kurze Zeit trocknen. Dann konnten die Ergebnisse der Färbung unter dem Mikroskop mit den verschiedenen Vergrößerungen betrachtet werden.

Die Färbung mit dem Autostainer TechMate 500 Plus der Firma DAKO-Cytomation erfolgte analog der oben geschilderten Methode. Die Automatisierung der Immunhistochemie wird hier durch die Methode des vertikalen Kapillar-Spalt-Systems ermöglicht. Dadurch müssen die Reagenzien und Lösungen nicht mit Hand auf die Schnitte pipettiert werden, sondern werden durch den Kapillarspalt zwischen zwei gegeneinander gestellte Schnitte automatisch aufgezogen und auf das Gewebe gebracht. Bei gleichem Versuchsablauf ist der Versuchsaufbau im Automaten abweichend zur Färbung von Hand und wird in Tabelle 12 dargestellt. Der Versuchsaufbau ist abweichend, da bei der automatisierten Methode aufgrund des Kapillarspalts keine Feuchtkammer benötigt wird.

Tabelle 12: Versuchsaufbau im Autostainer TechMate 500 Plus:

Position	1	2	3	4
D	Blockungsreagenz mit Milch	Tris-HCL-Puffer	Tris-HCL-Puffer	Leitungswasser + Tween
C	Pads	Pads	Pads	Pads
B	(ggf.: Protease) Je 300µl	-	Chromogen Je 300µl	Hämalaun Je 500µl
A	-	Primär-Antikörper Je 300µl	Link Je 300µl	AP-Streptavidin Je 300µl

4.3. Interne Positivkontrolle

Antikörper binden an die für sie jeweils spezifischen Antigene im Gewebe. Je nach Antikörper variieren die Strukturen, die angefärbt und als sogenanntes Kontrollgewebe dienen können. Dieses wird in Tabelle 13 für den entsprechenden Antikörper kurz vorgestellt. Diese Strukturen sind dann unter dem Mikroskop als rot gefärbt erkennbar.

Eine interne Positivkontrolle ist notwendig, um die Qualität der verwendeten Färbung und die Vergleichbarkeit der untersuchten Fälle zu sichern. Die internen Positivkontrollen wurden in dem tumorumgebenden Gewebe definiert. Dies ermöglicht eine reproduzierbare, auch semiquantitative Beurteilung der Antikörperfärbung.

Tabelle 13: Antikörper und ihr entsprechendes Kontrollgewebe (Positivkontrolle):

Antikörper	**Interne Positivkontrolle**
Drebrin	Epidermis
Nestin	Kapillaren, Nerven, innere Haarwurzelscheide
Androgenrezeptor	Talgdrüse
LN5	Haarfollikel (Äußere Henle-Schicht)
Bcl2	Lymphozyten
CD34	Basalmembran der Schweißdrüsen
CK20	Merkelzellen
CK8	Schweißdrüsen, Epidermis
PHLDA1	äußere Haarwurzelscheide
BerEP4	Schweißdrüsen
CK15	Basale Epidermiszellen

4.4 Auswertung

4.4.1 Mikroskopie und Bewertung der Färbung

Die Auswertung erfolgte semiquantitativ unter dem Mikroskop. Es wurden die rot gefärbten Bereiche betrachtet, welche Ausdruck einer Anreicherung des jeweiligen Antikörpers sind. Die Qualität der Färbung und ihre Intensität wurden mit der internen Positivkontrolle verglichen und entsprechend gewichtet.

Nach mehrmaligem Mikroskopieren wurden für jeden Antikörper spezifische, möglichst einfach zu reproduzierende Kriterien erarbeitet. Diese Kriterien wurden nochmals semiquantitativ vierstufig mit Werten von 0 bis 3 gewichtet. Der Wert 3 wurde übergreifend für alle Antikörper als „nicht auswertbar“ festgelegt. Die restlichen Werte von 0 bis 2 wurden für den jeweiligen Antikörper wie aus der Tabelle 14 ersichtlich definiert.

Tabelle 14: Legende der erarbeiteten mikroskopischen Bewertung mit den Werten 0 bis 2:

Antikörper:	**0**	**1**	**2**
Drebrin	negativ	schwächer positiv als die interne Positivkontrolle	stärker positiv als die interne Positivkontrolle
Nestin	negativ	einzelne Haarpapillen und ein kleiner Anteil des Tumorstromas	viele Haarpapillen und mehrere Anteile des Tumorstromas
Androgenrezeptor	negativ/vereinzelte Zellen	disseminiert positive Zellen ähnlich intensiv wie Talgdrüse	disseminiert positive Zellen intensiv wie Talgdrüse
LN5	<1/3 positiv	<2/3 positiv	≥2/3 positiv
Bcl2	negativ	<30% und schwächer als Lymphozyten	>30% und stärker als Lymphozyten
CD34	<1/3 positiv	<2/3 positiv	≥2/3 positiv
CK20	negativ	schwächer positiv als Positivkontrolle	stärker positiv als Positivkontrolle
CK8	negativ	positiv	-
PHLDA1	<1/3 positiv	<2/3 positiv	≥2/3 positiv
BerEP4	<1/3 positiv	<2/3 positiv	≥2/3 positiv
CK15	<10% positiv	<50% positiv	≥50% positiv

4.4.2. Fotografie

Die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen sind ausschließlich Fotografien von Gewebeschnitten eigener Versuche. Die Schnitte wurden mit dem Mikroskop Leica DMD 108 fotografiert und digitalisiert. Um eine optimale Darstellung der jeweiligen Strukturen zu ermöglichen wurden 50fache, 100fache, 200fache und 400fache Vergrößerungen verwendet.

4.5 Statistik

Nach Erstellen der Ergebnistabelle wurden die Basalzellkarzinome und die Trichoblastome jeweils statistisch analysiert.

Für die erste Betrachtung der Werte wurde das Programm Excel von Microsoft Office, sowie Python, in Kombination mit den Paketen NumPy, SciPy und k-Mode, verwendet. Es wurde versucht, den Zusammenhang zwischen Ausprägung der Antikörperfärbung und Tumorentitäten zu eruieren. Da es sich um nominal skalierte Variablen handelt,

eignet sich der Cramers V Kontingenzkoeffizient. Der Koeffizient leitet sich vom Chi-Quadrat-Test ab. Die Werte von Cramers V liegen zwischen 0 und 1, wobei 0 für keinen Zusammenhang steht und 1 für einen perfekten Zusammenhang.

Zusätzlich wurde zum Cramers V ein Vorhersagewert (p-Wert) angegeben. Dieser wurde nach dem exakten Test nach Fisher berechnet, um trotz einer geringen Fallzahl zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.

Darüber hinaus wurde ein sogenanntes Cluster mit den in dieser Arbeit festgelegten Kriterien durch eine Kategorisierung zu einer der beiden Tumorentitäten erstellt. Dazu wurde die Methode des k-Mode-Clustering verwendet (121). Diese Clusteranalyse soll die Tumorentitäten durch die entsprechenden Kriterien klassifizieren. Ziel des Verfahrens ist es, separierende Ausprägungen der Antikörperfärbung zu finden, um beide Tumorarten voneinander unterscheiden zu können und dadurch eine eindeutige Eingruppierung der Tumore vornehmen zu können.

Abschließend wurde eine hierarchische Clustermethode in dem Statistikprogramm R verwendet und eine sogenannte „Heatmap“ und Dendrogramme erstellt, um weitere Ähnlichkeiten bzw. differenzierende Gruppierungen zu erkennen. Diese Methode untersucht auch durch eine Silhouettenanalyse, ob und wie sicher eine Zuordnung zu den beiden Entitäten möglich ist.

5. Ergebnisse

5.1 Analyse und statistische Auswertung publizierter Studien

Es wurden die Ergebnisse der oben besprochenen Studien verglichen und deren positiven Fälle in Relation zu der Gesamtzahl der Fälle betrachtet (s. Tab. 5). Anschließend wurden jeweils die positiven und die negativen Fälle, sowie die Gesamtzahl der Fälle von den verschiedenen Untersuchungen addiert (s. Tab. 15). Abschließend wurde daraus ein kumulativ positiver (PPV = TP /(TP + FP))[3] und negativer Vorhersagewert (NPV = TN/ (TN + FN))[4] für den Nachweis eines trichogenen Tumors (T) oder eines Basalzellkarzinoms (B) berechnet.

[3] PPV = positiv predictive value; TP = true positive; FP = false negative
[44] NPV = negative predictive value; TN = true negative; FN = false negative

Tabelle 15: Auswertung der Ergebnisse der Literatur (47, 55-63, 66-68, 70-103):

Antikörper:	**BCC:**	**Trichogene Tumore:**	**PPV, NPV für den Nachweis von B bzw. T**
Drebrin:			
Kummulative Fallzahl:	25	15	
Positive:	21 (84%)	4 (26,67%)	PPV (B) = 84%
Negative:	4 (16%)	11 (73,33%)	NPV (B) = 73%
Nestin:			
Kummulative Fallzahl:	47	42	
Positive:	19 (40,43%)	39 (92,85%)	PPV (T) = 67%
Negative:	8 (17,02%)	3 (7,14%)	NPV (T) = 30%
Androgenrezeptor:			
Kummulative Fallzahl:	155	92	
Positive:	103 (66,45%)	9 (9,78%)	PPV (B) = 97%
Negative:	52 (33,55%)	83 (90,22%)	NP (B) = 61%
LN5:			
Kummulative Fallzahl:	52	26	
Positive:	50 (96,15%)	3 (11,54%)	PPV (B) = 94%
Negative:	2 (3,85%)	23 (88,46%)	NPV (B) = 8%
Bcl2:			
Kummulative Fallzahl:	508	246	
Positive:	465 (91,54%)	212 (86,18%)	PPV (B) = 69%
Negative:	43 (8,46%)	34 (13,82%)	NPV (B) = 44%
CD34:			
Kummulative Fallzahl:	448	255	
Positive:	161 (35,94%)	184 (72,15%)	PPV (T) = 53%
Negative:	287 (64,06%)	71 (27,84%)	NPV (T) = 80%
CK20:			
Kummulative Fallzahl:	447	343	
Positive:	18 (4,026%)	155 (45,20%)	PPV (T) = 90%
Negative:	429 (95,97%)	188 (54,81%)	NPV (T) = 70%
CK8:			
Kummulative Fallzahl:	55	40	
Positive:	0 (0%)	13 (32,5%)	PPV (T) =100%
Negative:	55 (100%)	27 (67,5%)	NPV (T) = 67%
PHLDA1:			
Kummulative Fallzahl:	83	110	
Positive:	5 (6,04%)	108 (98,19%)	PPV (T) = 96%
Negative:	78 (93,98%)	2 (1,82%)	NPV (T) = 98%
BerEP4:			
Kummulative Fallzahl:	414	175	
Positive:	399 (96,38%)	134 (76,57%)	PPV (B) = 75%
Negative:	15 (3,62%)	41 (23,43%)	NPV (B) = 73%
CK15:			
Kummulative Fallzahl:	104	64	
Positive:	23 (22,12%)	47 (73,44%)	PPV (T) = 67%
Negative:	81 (77,88%)	17 (26,56%)	NPV (T) =17%

Bei der kumulativen Betrachtung scheint PHLDA1 am besten das Trichoblastom (durch dessen Positivität mit 93,98% der Fälle) vom Basalzellkarzinom (mit einer PHLDA1-

Negativität in 98,19% der Fälle) zu differenzieren. Doch auch die anderen Antikörper scheinen laut Literatur gute Diagnostika zu sein. So war beispielsweise LN5 für Basalzellkarzinome zu 96,15% positiv und trichogene Tumore zu 88,46% LN5-negativ. Nestin wies eine Positivität trichogener Tumore (92,85%) und eine Negativität des Basalzellkarzinoms (17,02%) auf. Ähnlich verhält sich CK15 mit einer Positivität trichogener Tumore von 73,44% und einer Negativität der Basalzellkarzinome in 77,88% der Fälle.

Bei dieser Kumulation ist jedoch zu beachten, dass die Ergebnisse mancher Autoren sich in ihren Angaben stark unterscheiden. So sind beispielsweise bei Tebcheranie et. al. (72) nur 29 der 151 Trichoblastome mit dem Antikörper CK20 positiv, wohingegen bei weiteren 7 Autoren meist nahezu alle Trichoblastome positiv ausfielen. Somit ist dieses Ergebnis hier in Tabelle 15 stark durch eine einzelne Autorengruppe, hier Tebcherani et. al., beeinflusst. Ähnlich verhält es sich beispielsweise auch bei dem Antikörper Nestin, welcher lediglich bei zwei Publikationen untersucht wurde, deren Ergebnisse aber konträr sind. Außerdem ist zu beachten, dass die verschiedenen Subtypen der Basalzellkarzinome und der trichogenen Tumore in Tabelle 15 hier nicht mehr weiter unterschieden wurden. Zudem sind vereinzelt abweichende Auswertungskriterien bei den verschiedenen Veröffentlichungen zu beachten.

5.2 Eigene immunhistochemische Untersuchungen

Alle immunhistochemischen Präparate wurden vergleichend mikroskopiert und semiquantitativ ausgewertet. Im Zuge des umfangreichen Mikroskopierens und Auswertens der Färbemuster wurde ein eigener Kriterienkatalog erarbeitet, welcher eine unabhängige Auswertung ermöglichte. Hieraus ergab sich folgende Auswertungstabelle mit Antikörper-spezifischen Kriterien (s. Tab. 16).

Bei der Färbung von PHLDA1 wurden zusätzliche Melan-A- und SOX-10-Färbungen der Schnitte durchgeführt, zum bestätigendem Nachweis der Melanozyten (Kriterium B).

Tabelle 16: Übersicht der Antikörper und ihre erstellten Kriterien, analog zur Tabelle 14:

Antikörper	Nummerierung der Kriterien:	Kriterien der positiven Färbung
Drebrin	A	mesenchymale Hüllschicht
	B	<30% Tumorzytoplasma
	C	Epidermis über Tumor
	D	>90% Tumorzytoplasma
Nestin	A	fokal mesenchymale Hüllschicht
	B	Tumorknoten
Androgenrezeptor	A	Tumorzellkerne
LN5	A	zentrales Tumorzytoplasma
	B	peripheres Tumorzytoplasma
Bcl2	A	diffus im Tumorknoten
	B	palisadenartig im Tumorknoten
CD34	A	intratumorales Bindegewebe
	B	peritumorales Bindegewebe
CK20	A	Positivität ohne ein Kriterium
CK8	A	Positivität ohne ein Kriterium
PHLDA1	A	epithelial
	B	Melanozyten
	C	mesenchymale Papille
BerEP4	A	periphere Zellen des Tumorknotens
	B	zentrale Zellen des Tumorknotens
CK15	A	Positivität ohne ein Kriterium

Die Tabelle 16 ist die Basis der Beurteilung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Färbungen an den jeweiligen Gewebeproben. Anhand dieser Kriterien der Tabelle 16 wurden anschließend dessen Beurteilungsergebnisse mit den semiquantitativen Kriterien der Tabelle 14 bewertet. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle 17 zu sehen.

Tabelle 17: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Immunhistochemie mit Werten analog zu Tabelle 14:

Antikörper:	**Drebrin**				**Nestin**		**AR**	**LN5**		**Bcl-2**		**CD34**		**CK20**	**CK8**	**PHLDA1**			**Berep4**		**CK15**
Kriterien:	**A**	**B**	**C**	**D**	**A**	**B**	**A**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**A**	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**A**
T1	1	0	2	1	1	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	2	0	1	2	1	2
T2	0	0	2	1	2	0	0	2	2	1	2	2	2	1	0	2	0	1	2	1	2
T3	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0
T4	0	0	2	1	2	0	0	2	2	1	2	0	1	1	0	2	0	0	2	2	2
T5	0	0	2	0	1	2	0	1	0	2	1	2	2	1	0	2	0	0	0	0	2
T6	2	0	2	0	2	0	0	2	2	2	2	1	3	0	0	2	0	1	0	0	2
T7	3	3	3	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	1	1	0	1	0	1
T8	1	1	2	0	1	0	0	2	2	1	0	1	3	0	0	1	0	0	2	2	1
T9	1	0	2	0	3	3	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	1	1	2	0
T10	2	0	2	1	2	0	0	2	2	2	2	1	2	0	0	1	0	1	2	0	2
T11	2	0	2	1	2	0	0	2	2	0	2	1	1	1	0	0	0	1	2	2	2
T12	0	0	2	0	2	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
T13	1	0	3	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1
T14	1	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	2	0	1	0	0	1
B1	0	2	2	1	0	0	2	1	1	2	0	1	2	0	0	0	1	0	2	2	0
B2	0	1	2	0	0	0	2	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	1
B3	0	0	2	2	0	0	2	2	2	1	1	1	2	0	0	0	1	0	2	2	1
B4	0	2	2	1	0	0	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	1	0	2	2	1
B5	0	0	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0
B6	0	2	2	0	0	0	2	2	2	1	1	0	2	0	0	1	1	0	2	2	0
B7	0	0	2	2	0	0	0	2	2	3	3	2	2	1	0	0	1	0	2	2	1
B8	0	0	2	1	0	0	1	2	2	2	2	0	2	0	0	0	1	0	2	1	0
B9	0	0	2	1	0	0	2	2	2	1	1	1	2	0	0	0	1	0	2	1	2
B10	0	0	2	1	0	0	2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2
B11	0	1	2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	1	0	2	1	0
B12	2	0	2	1	0	0	2	2	2	1	1	0	2	0	0	0	1	0	2	2	0
B13	0	0	1	0	0	0	2	2	2	1	1	0	2	0	0	0	1	0	2	2	2
B14	0	1	2	0	0	0	1	0	1	2	2	0	2	0	0	0	1	1	2	2	0
B15	3	3	3	3	3	3	0	2	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0	2	2	0
B16	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	1	0	2	0	0	2	2	1
B17	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0

Die Ergebnisse der Tabelle 17 werden auf den folgenden Seiten analog zur aufgeführten Antikörper-Reihenfolge der Tabelle besprochen und jeweils exemplarisch mit fotografischen Abbildungen erläutert.

5.2.1 Drebrin

In der mikroskopischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung war bei dem Antikörper **Drebrin** eine Expression in der mesenchymalen Hüllschicht (Kriterium A) in 8 von 13 Trichoblastomen (s. Abb. 5 und 6) sichtbar und in lediglich 2 von 16 Basalzellkarzinomen. Bei 5 Trichoblastomen war diese mesenchymale Papille schwächer positiv als die interne Positivkontrolle, so auch bei einem Basalzellkarzinom.

Zusätzlich wurde das Tumorzytoplasma auf seine Expression untersucht sowie die direkt an den Tumor angrenzende Epidermis (s. Abb. 4). Die Epidermis (Kriterium C) war in beiden Entitäten markiert. In 11 der Trichoblastome war dieses Kriterium C stärker positiv, als die interne Positivkontrolle und wurde daher mit einem Wert 2 bewertet. Ebenso mit einer 2 konnten 13 der 17 Basalzellkarzinome bewertet werden.
Das Tumorzytoplasma wurde sowohl auf ein geringes (<30%, Kriterium B), als auch auf ein umfangreiches (>90%, Kriterium D) Ausmaß der Positivität in beiden Entitäten untersucht.

Das Kriterium B war lediglich in einem Trichoblastom und in 6 Basalzellkarzinomen positiv (davon waren 3 Basalzellkarzinome stärker positiv als die interne Positivkontrolle und 3 schwächer als diese).

In 7 Trichoblastomen war das Kriterium D schwächer als die interne Positivkontrolle und ansonsten negativ. So waren 9 der Basalzellkarzinome bei diesem Kriterium positiv (7 davon schwächer und 2 stärker als die interne Positivkontrolle).

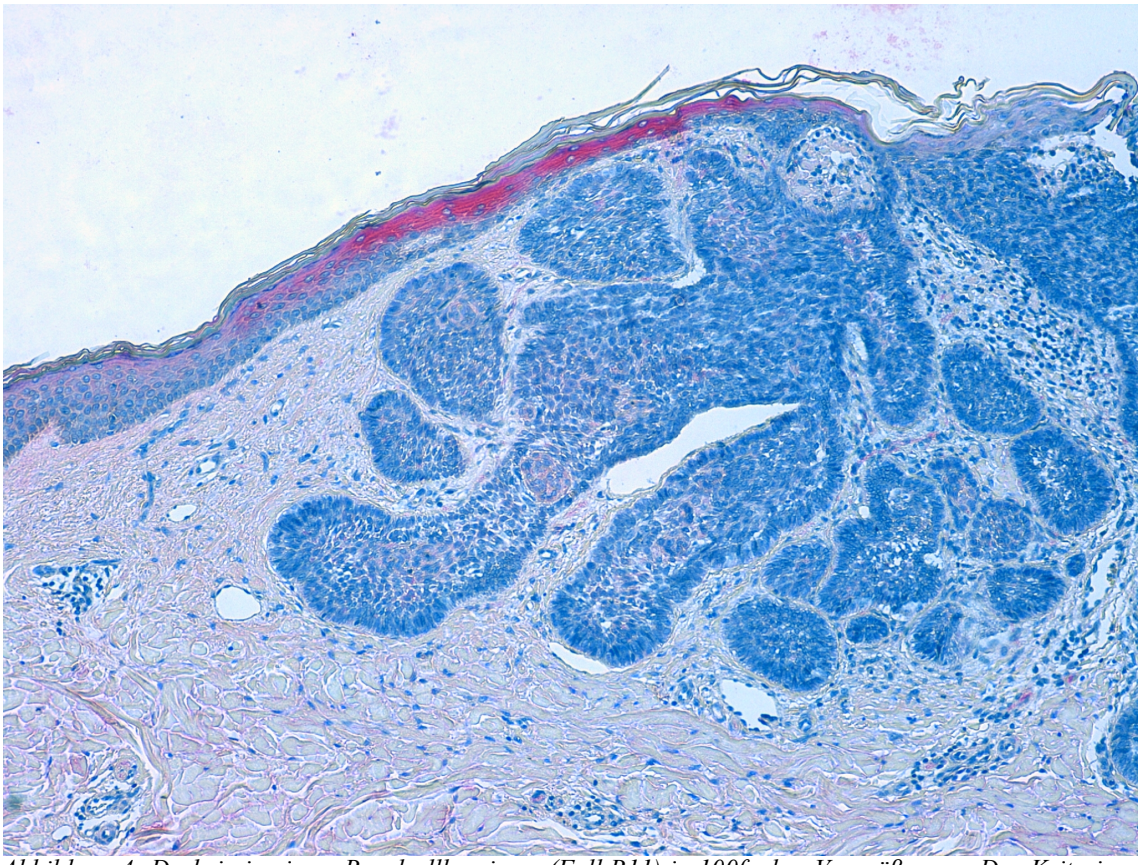


Abbildung 4: Drebrin in einem Basalzellkarzinom (Fall B11) in 100facher Vergrößerung. Das Kriterium C (positive Färbung in der Epidermis über dem Tumor) ist hier stark ausgeprägt.

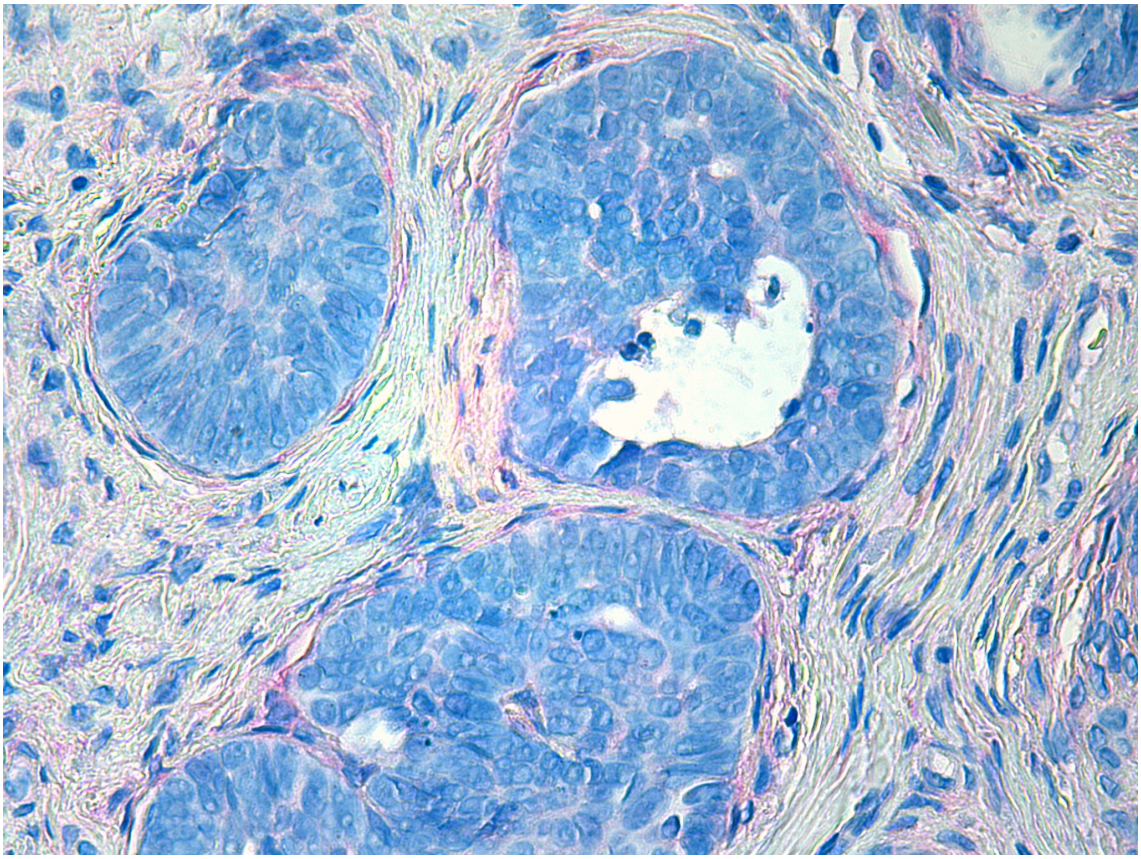


Abbildung 5: Drebrin in einem Trichoblastom (Fall T14) in 400facher Vergrößerung. Das Kriterium A (positive Färbung der mesenchymalen Hüllschicht) ist hier deutlich zu sehen.

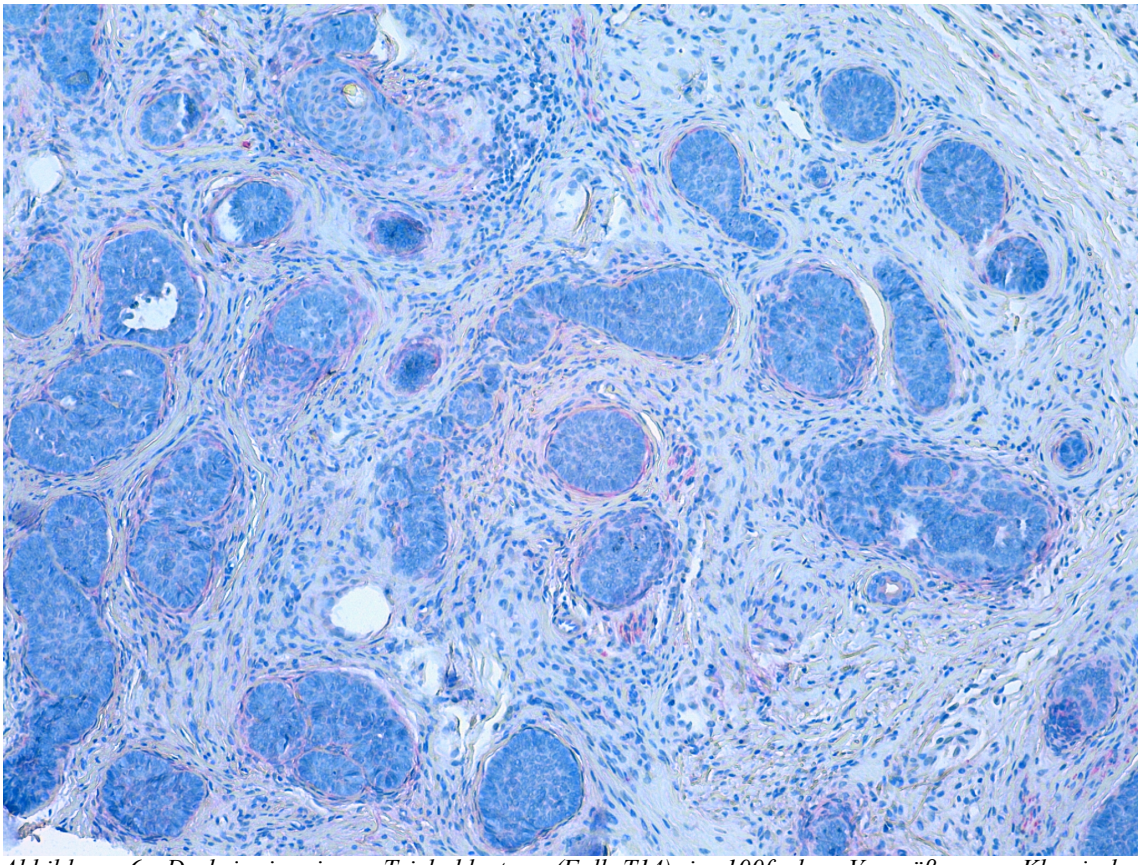


Abbildung 6: Drebrin in einem Trichoblastom (Fall T14) in 100facher Vergrößerung. Klassische Anordnung der Tumorknoten, ähnlich einer Haarpapille, mit positiver mesenchymaler Hüllschicht.

5.2.2 Nestin

Auch bei dem Antikörper **Nestin** war die mesenchymale Hüllschicht (Kriterium A) gut zu erkennen. Diese war hier sogar in 12 von 13 Trichoblastomen deutlich zu erkennen (s. Abb. 8, 9, 10 und 11). Hierbei wiesen 7 Trichoblastome eine Positivität von vielen Haarpapillen und einem großen Anteil des Tumorzytoplasmas auf. Im Gegensatz dazu fehlte diese Expression im Basalzellkarzinom (1/16 Fällen) fast vollkommen (s. Abb. 7).

Zusätzlich wurde noch der Bereich des Tumorknotens (Kriterium B) betrachtet. Dieses Kriterium erwies sich als unspezifisch und war bei beiden Tumorentitäten nur in je einem Fall positiv.

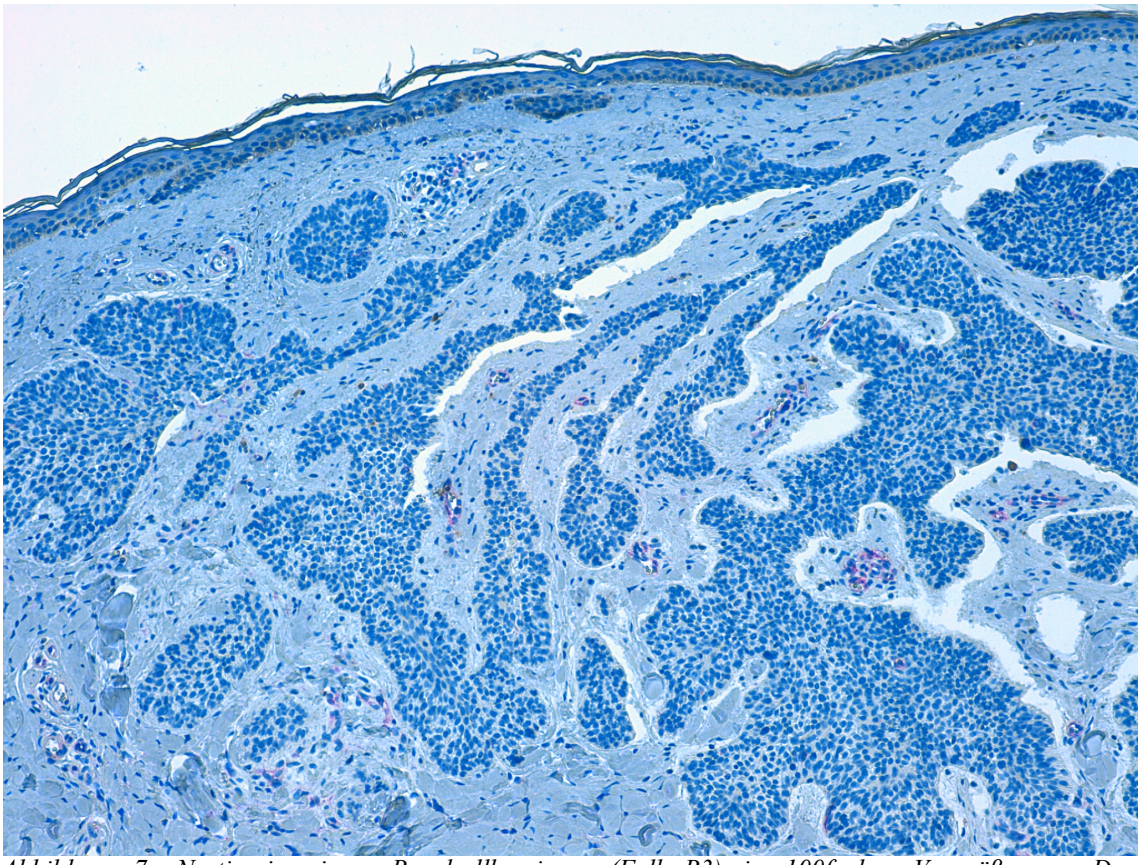


Abbildung 7: Nestin in einem Basalzellkarzinom (Fall B3) in 100facher Vergrößerung. Das Basalzellkarzinom war bei diesem Antikörper überwiegend negativ.

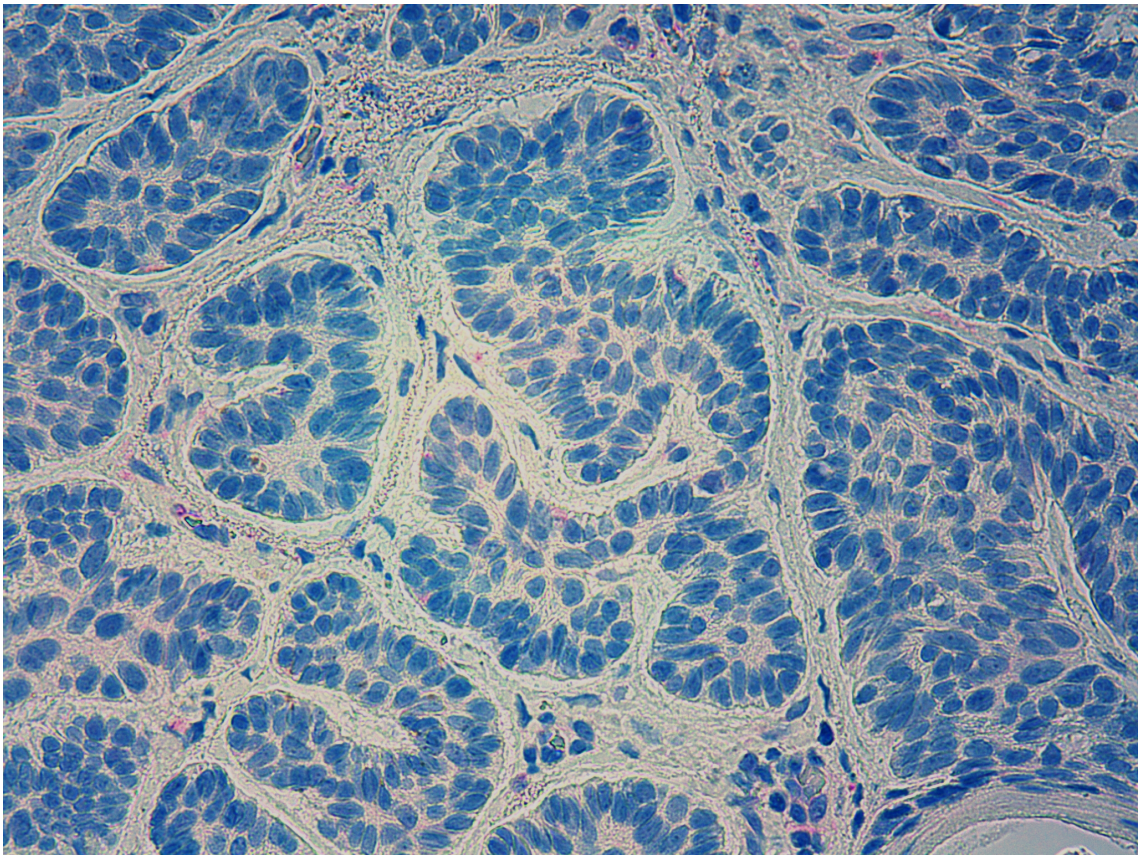


Abbildung 8: Nestin in einem Basalzellkarzinom (Fall B12) in 400facher Vergrößerung. Die mesenchymale Hüllschicht ist hier als Färbung nicht zu erkennen.

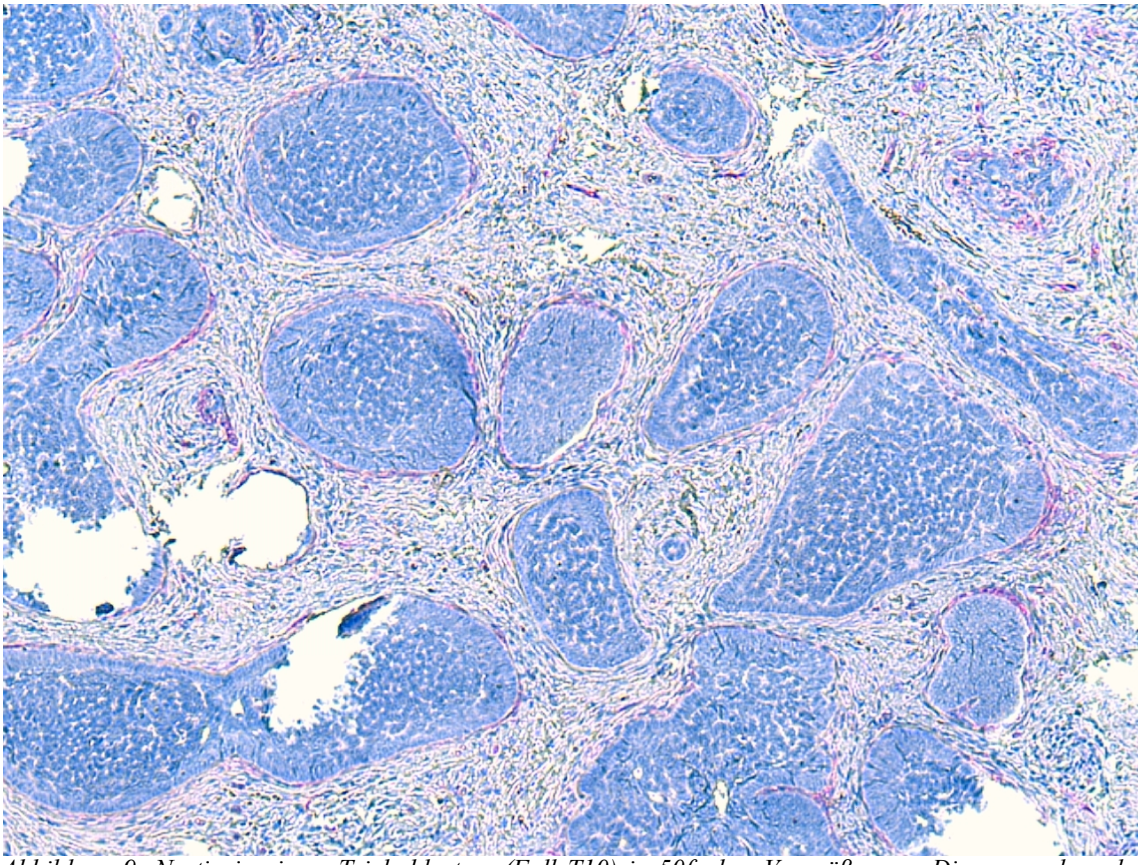


Abbildung 9: Nestin in einem Trichoblastom (Fall T10) in 50facher Vergrößerung. Die mesenchymale Hüllschicht ist hier deutlich positiv.

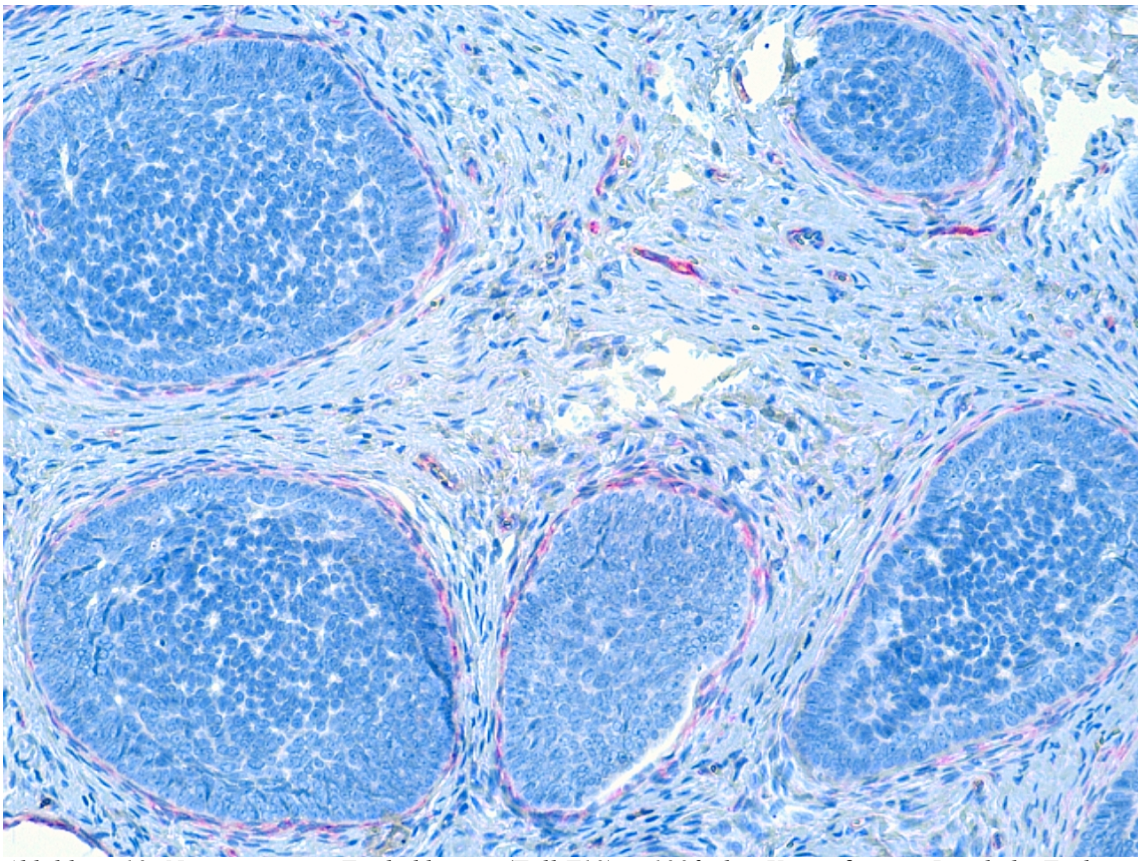


Abbildung 10: Nestin in einem Trichoblastom (Fall T10) in 100facher Vergrößerung. Deutliche Färbung der mesenchymalen Hüllschicht (Kriterium A des Nestins).

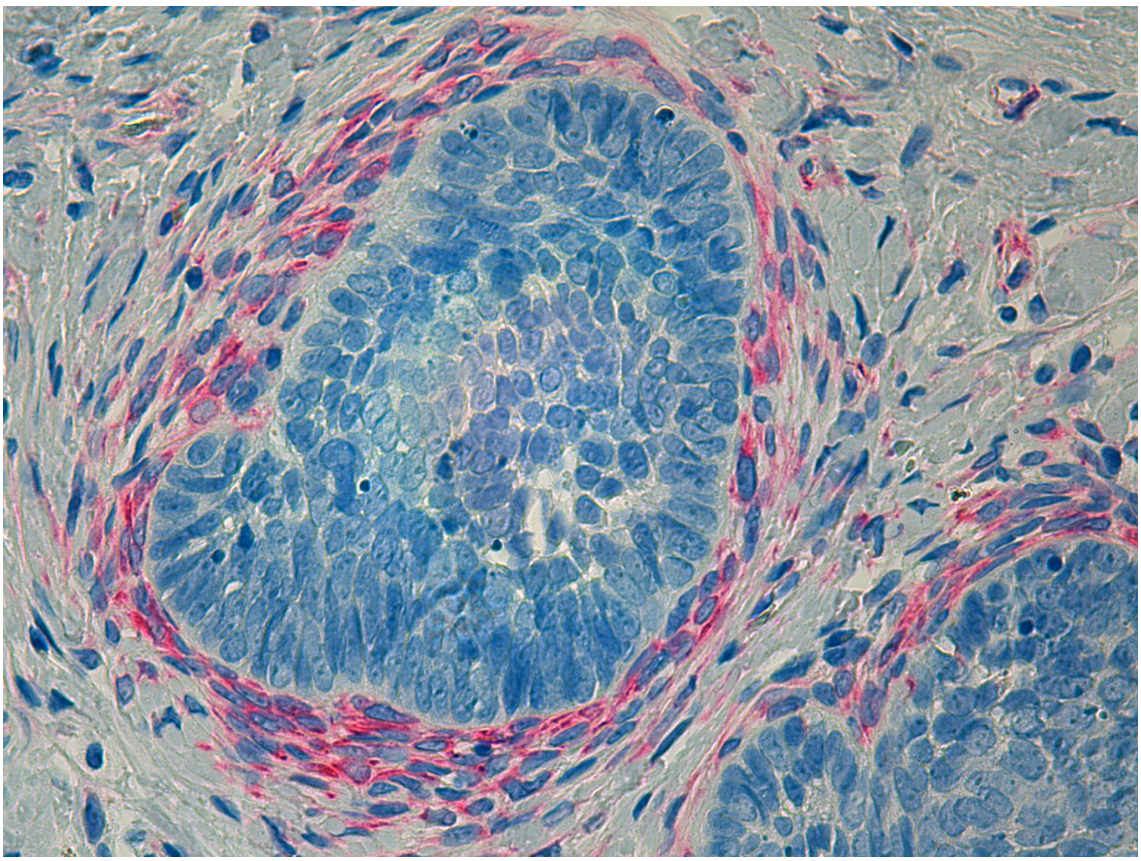


Abbildung 11: Nestin in einem Trichoblastom (Fall T10) in 400facher Vergrößerung.

5.2.3 Androgenrezeptor

Die **Androgenrezeptorfärbung** wurde bezüglich ihrer Positivität bzw. Negativität in Zellkernen beurteilt, da diese eindeutig als differenzierend zu erkennen war. Daher genügte ein Vergleich der Farbintensität mit der Positivkontrolle. Die Positivkontrolle, in diesem Fall die Talgdrüsen, konnten hier gut erkannt und so mit dem Tumorgewebe verglichen werden (s. Abb.12).

Bei der Färbung der verschiedenen Tumorgewebe-Präparate ließ sich ein deutlicher Unterschied der beiden Entitäten erkennen. Das Trichoblastom war in fast allen Fällen (13/14 Fällen) komplett negativ (s. Abb. 14), wohingegen das Basalzellkarzinom deutlich die Zellen des Tumorgewebes anfärbte (13/17 Fällen) (s. Abb. 13).

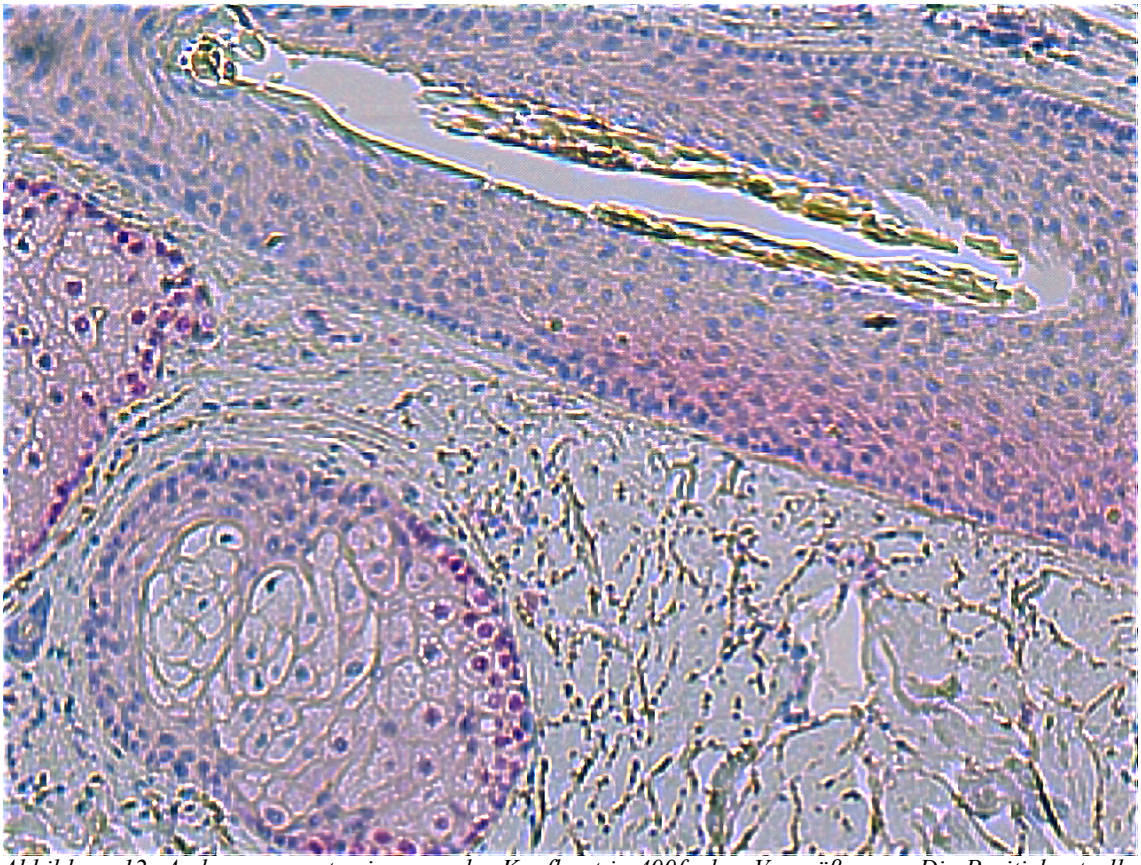


Abbildung 12: Androgenrezeptor in normaler Kopfhaut in 400facher Vergrößerung. Die Positivkontrolle (Talgdrüse) ist gut erkennbar.

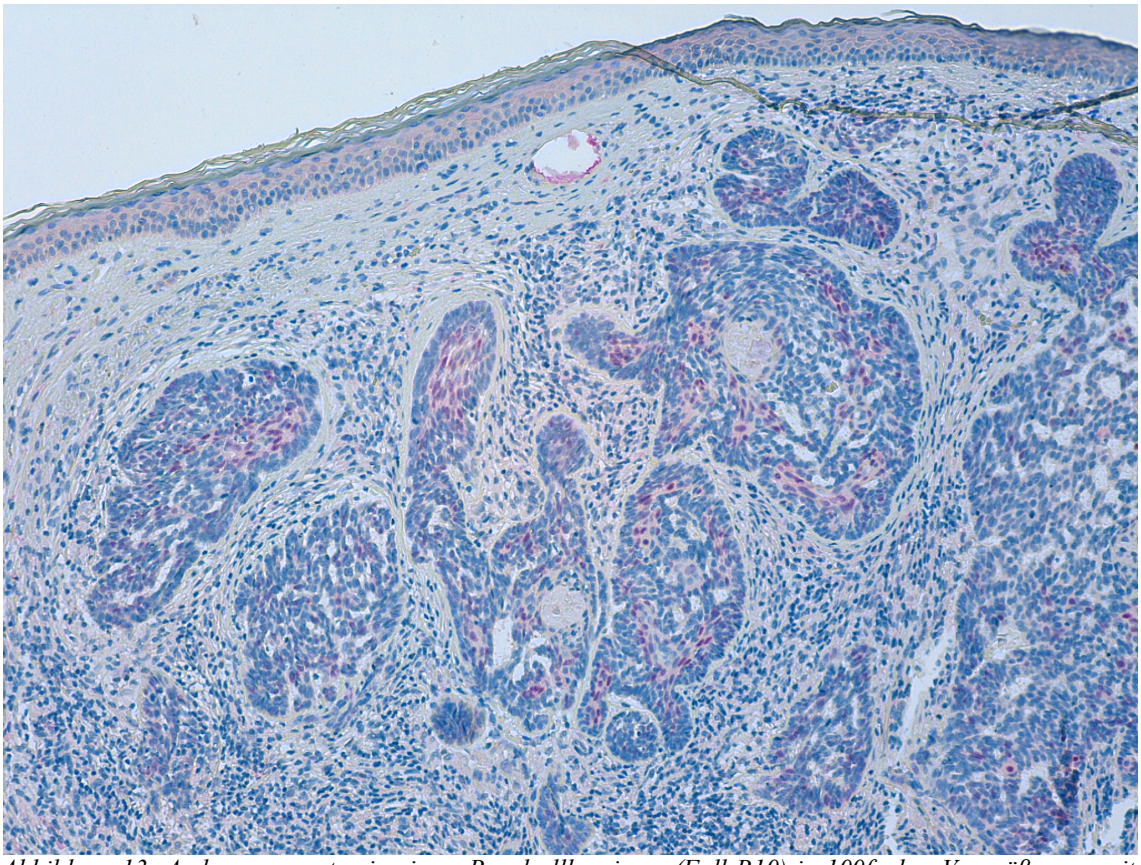


Abbildung 13: Androgenrezeptor in einem Basalzellkarzinom (Fall B10) in 100facher Vergrößerung mit deutlich positiver Färbung.

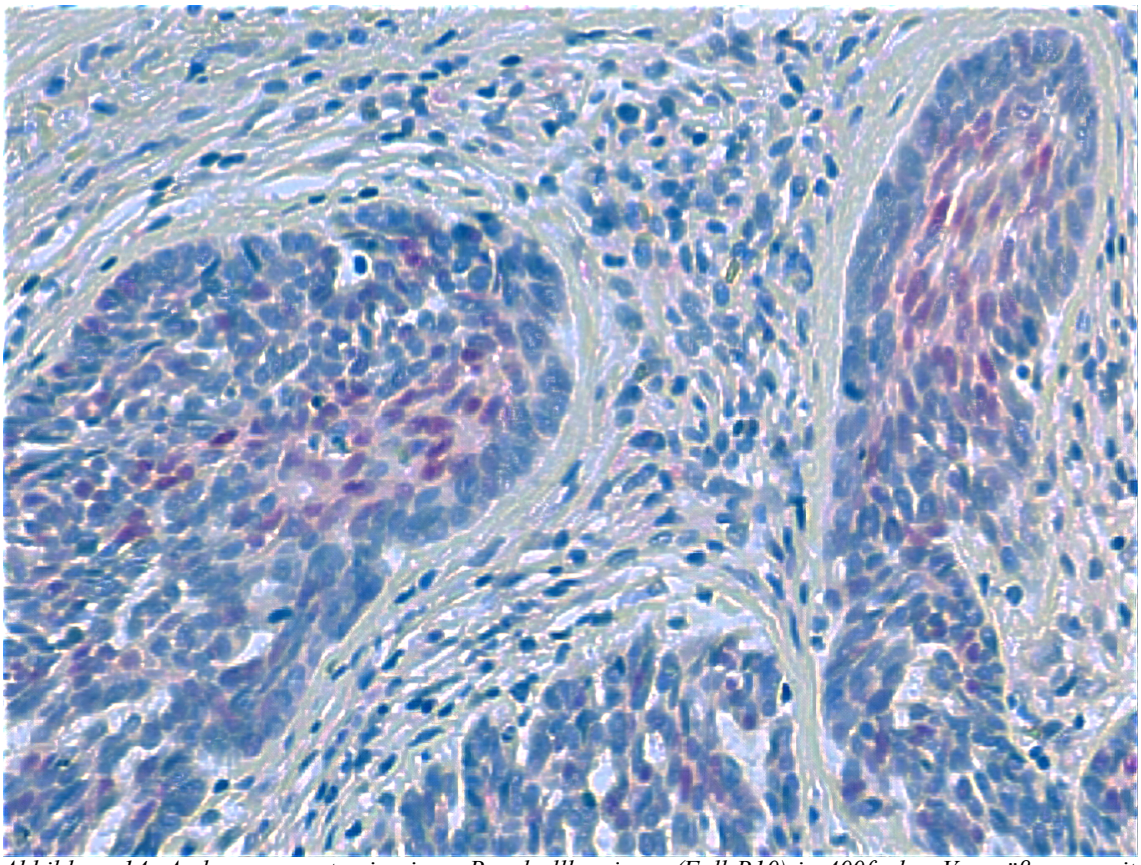


Abbildung 14: Androgenrezeptor in einem Basalzellkarzinom (Fall B10) in 400facher Vergrößerung mit deutlich positiver Färbung.

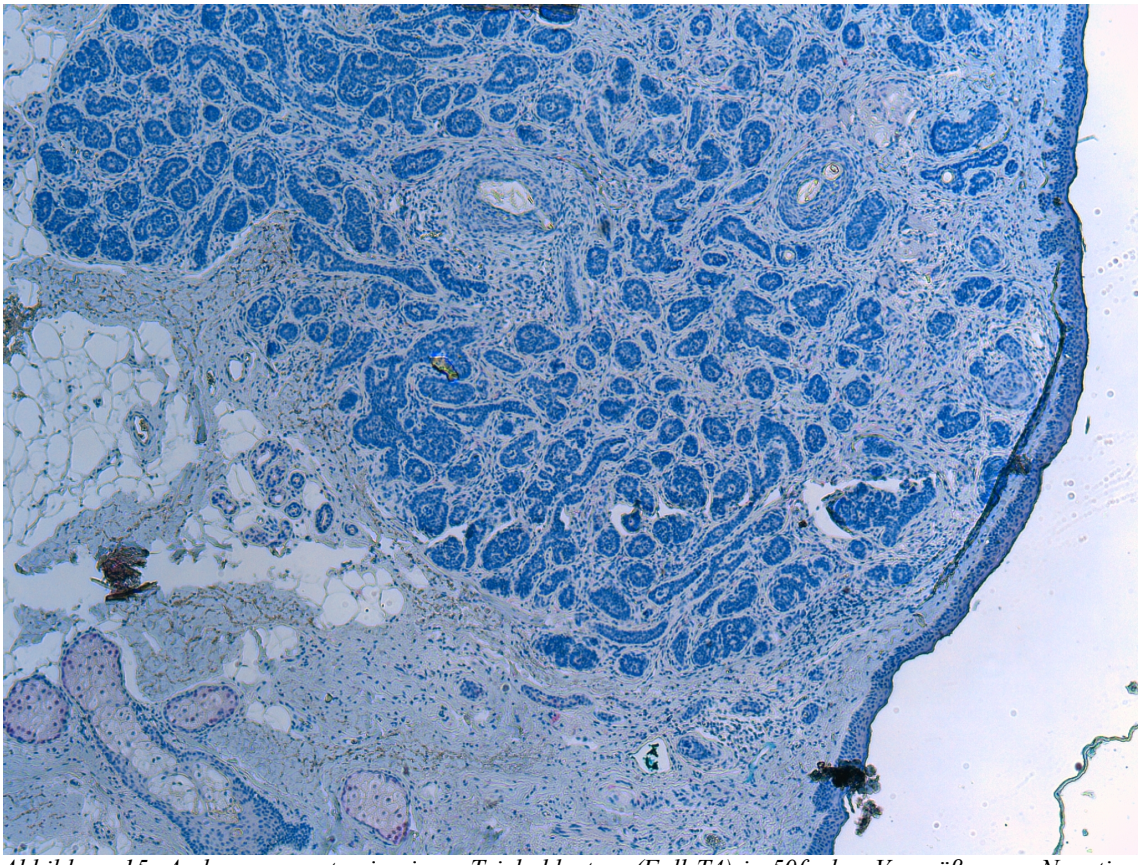


Abbildung 15: Androgenrezeptor in einem Trichoblastom (Fall T4) in 50facher Vergrößerung. Negative Expression des Markers bei deutlich positiver Positivkontrolle.

5.2.4 Laminin-gamma-5

Bei dem Antikörper **Laminin-gamma-5 (LN5)** beschränkte sich die Färbung lediglich auf das Zytoplasma der Tumorzellen (s. Abb. 15 und 16).

In der Auswertung war eine Unterscheidung der beiden Tumorentitäten schwer möglich. Zur besseren Differenzierung wurde das Tumorzytoplasma zusätzlich innerhalb eines Tumorknotens in zentral (Kriterium A) und peripher (Kriterium B) unterschieden und semiquantitativ (s. Tab. 14) bewertet. Trotz dieser Unterscheidung konnte bei der Auswertung jedoch kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Alle Fälle der beiden Entitäten wiesen eine Positivität auf. Daher wurde versucht durch die weitere Bewertung von 0 bis 2 (s. Tab. 14) eine Differenzierung zu ermöglichen.

Es waren 10 von 17 Basalzellkarzinome zu mehr als 2/3 positiv im zentralen Tumorknoten und im peripheren Tumoranteil in 10 von 17 Fällen. Das Trichoblastom wies ein ähnliches Färbemuster auf und war in 8 von 14 Fällen im zentralen Tumorknoten zu mehr als 2/3 positiv sowie im peripheren Tumorknoten in 8 von 14 Fälle zu mehr als 2/3 positiv. Mit einem Wert 1 (s. Tab. 14) wurde in 1 Trichoblastom und 4 Basalzellkarzinome bewertet. Ein Unterscheidungskriterium zum Basalzellkarzinom konnte nicht gefunden werden.

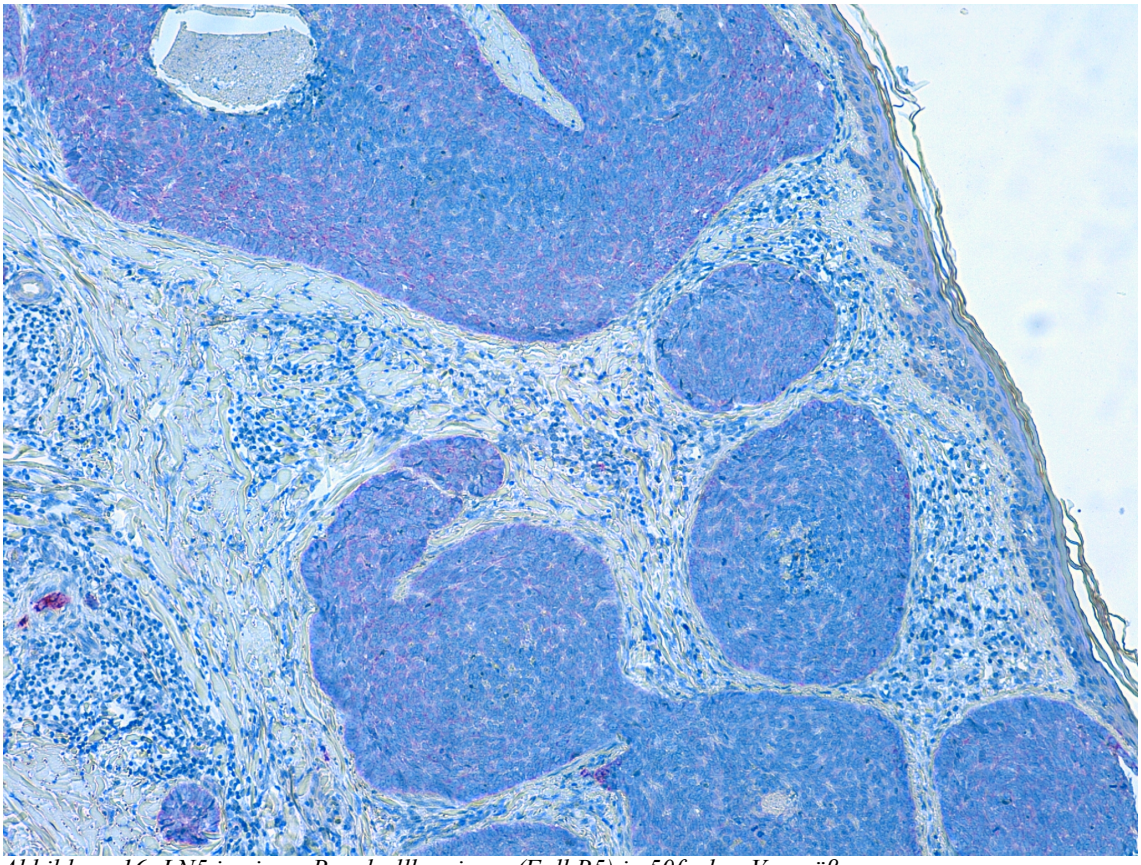


Abbildung 16: LN5 in einem Basalzellkarzinom (Fall B5) in 50facher Vergrößerung.

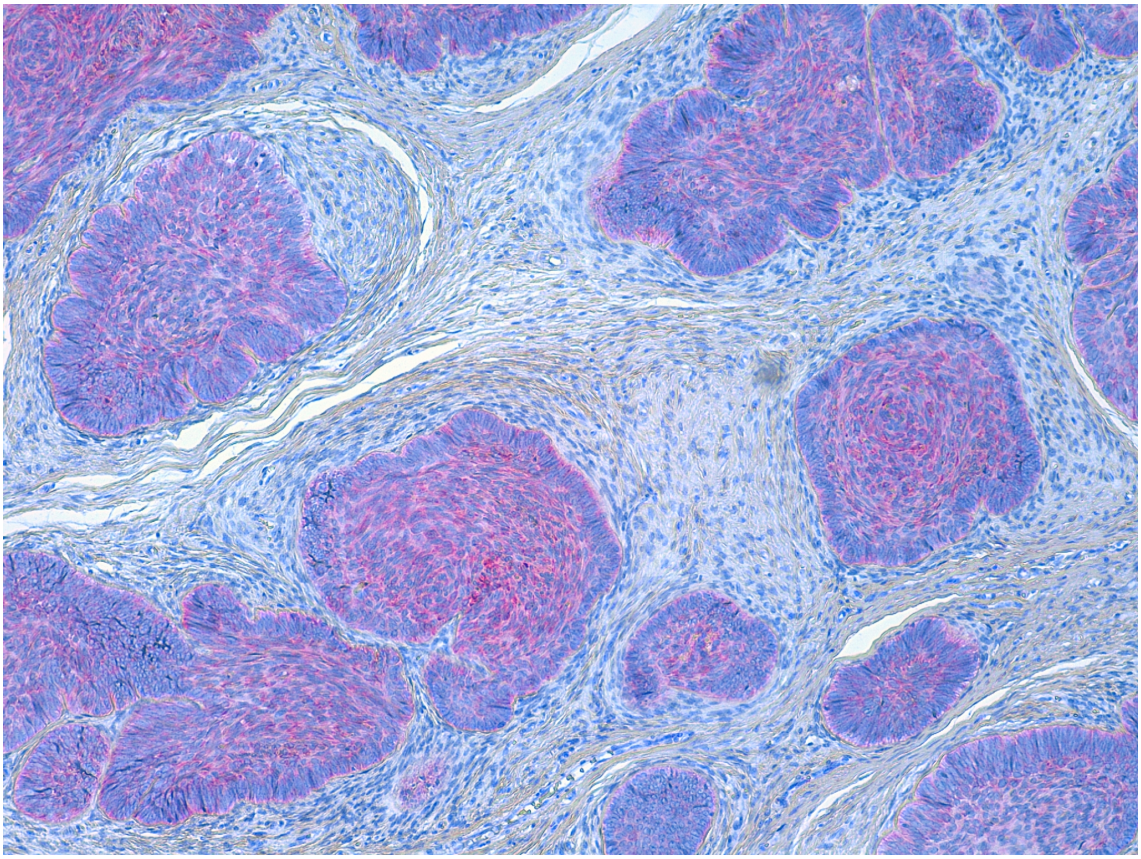


Abbildung 17: LN5 in einem Trichoblastom (Fall T11) in 50facher Vergrößerung.

5.2.5 Bcl2

Auch beim Antikörper **Bcl2** lag der Schwerpunkt auf den Tumorknoten und ihrer Expression. Diese wurden zuerst in ihrer Gesamtheit (Kriterium A) betrachtet. Anschließend wurden die peripher liegenden, palisadenförmig angeordneten Tumorzellen (Kriterium B) beurteilt. Das Kriterium A und B konnte bei 6 von 14 Trichoblastomen mit einem Wert 2 beurteilt werden. Dieser Wert 2 (s. Tab. 14) besagt, dass die Färbung stärker ist als die interne Positivkontrolle (hier: Lymphozyten) und dass mehr als 30% des Tumoranteils gefärbt ist. Im Vergleich dazu traf genau dies auch bei 7 (Kriterium A) bzw. 6 (Kriterium B) von 17 Basalzellkarzinomen zu. 2 Basalzellkarzinome und 1 Trichoblastom waren negativ im Kriterium A. Beim Kriterium B waren es 4 Trichoblastome und 3 Basalzellkarzinome. Daher ist eine Zuordnung zu einer der beiden Entitäten anhand von Bcl-2 nur schwer möglich. Überdies zeigte sich die Bewertung bzw. die Abgrenzung und Einteilung des Färbeverhaltens bei diesem Antikörper als vergleichsweise besonders schwierig.

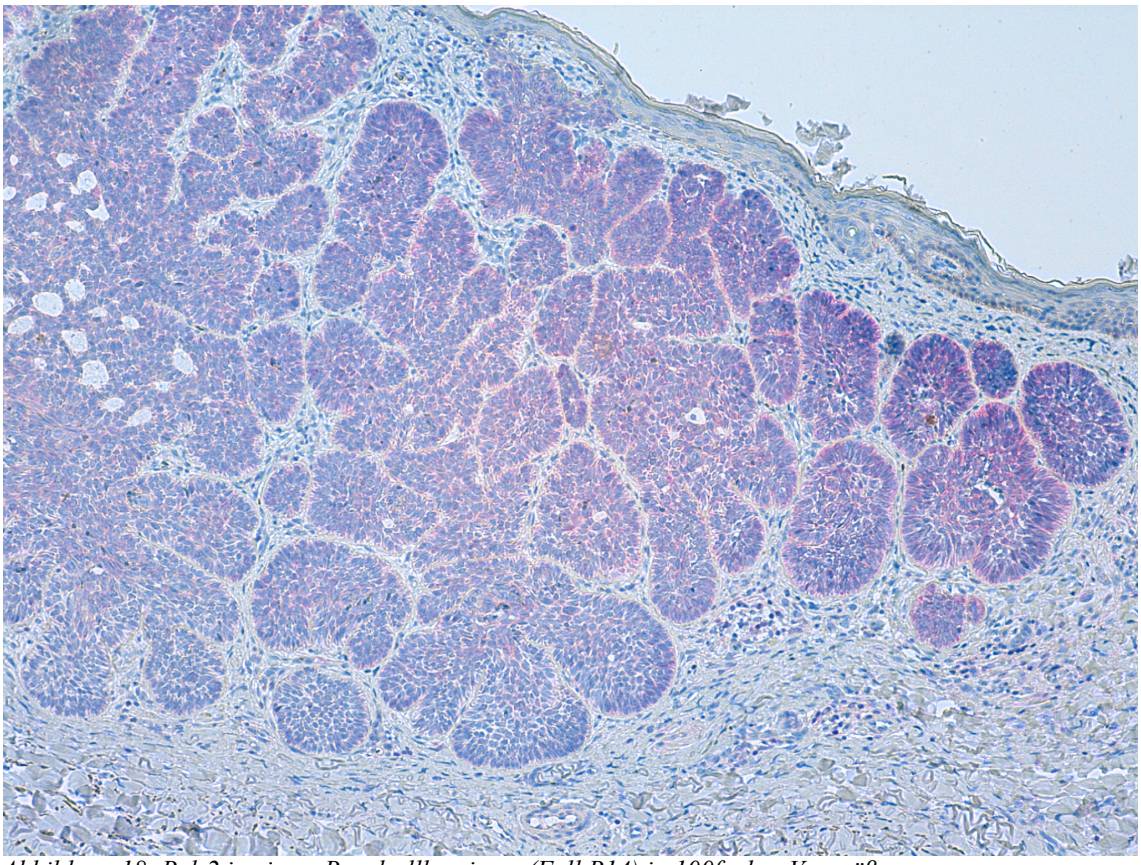


Abbildung 18: Bcl-2 in einem Basalzellkarzinom (Fall B14) in 100facher Vergrößerung.

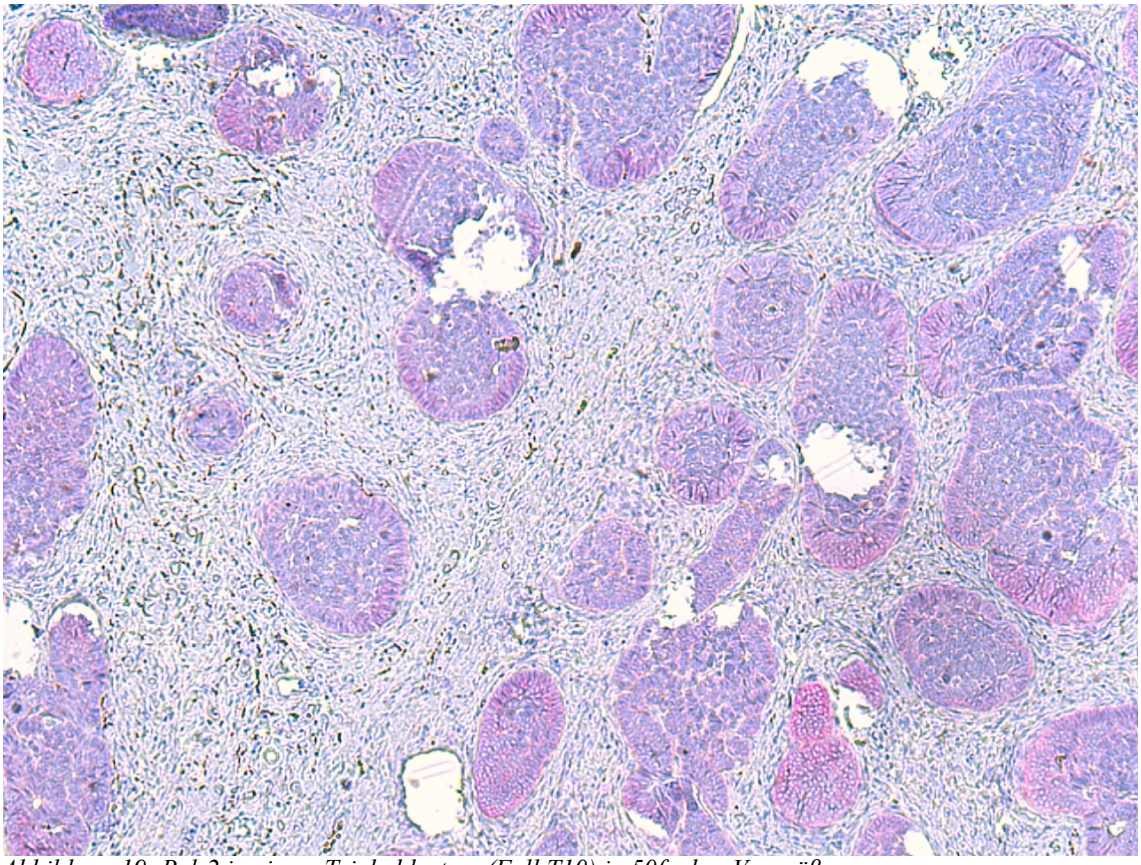


Abbildung 19: Bcl-2 in einem Trichoblastom (Fall T10) in 50facher Vergrößerung.

5.2.6 CD34

Im Gegensatz zu den letzten beiden Antikörpern wurde bei **CD34** nicht der Tumorknoten, sondern das umgebende Bindegewebe betrachtet (s. Abb. 19 und 20). Diese bindegewebigen Strukturen wurden anhand ihrer Lokalisation innerhalb der Gewebeprobe in intratumoral (Kriterium A) und in peritumoral (Kriterium B) unterteilt.

Betrachtet man zuerst das Kriterium A, so ließ sich ein ähnliches Färbeverhalten feststellen: beim Basalzellkarzinom waren 4 von 17 Fällen bis zu 2/3 positiv und 3 Fälle sogar in mehr als 2/3 der intratumoralen Bindegewebestrukturen positiv. Beim Trichoblastom waren es 5 von 14 Fällen mit bis zu 2/3 Positivität und ebenfalls 3 Fälle mit mehr als 2/3 Positivität.

Das Kriterium B (das peritumorale Bindegewebe) war in 10 von 17 Fällen des Basalzellkarzinoms zu mehr als 2/3 positiv und in 4 von 17 Fällen mit bis zu 2/3 positiv. Das Trichoblastom wies in etwas weniger Fällen eine Positivität des peritumoralen Bindegewebes auf. So waren 6 von 12 Fällen mit mehr als 2/3 positiv und nur 2 Fälle mit bis zu 2/3 positiv.

Eine klare mikroskopische Unterscheidung der beiden Tumorentitäten war nicht möglich.

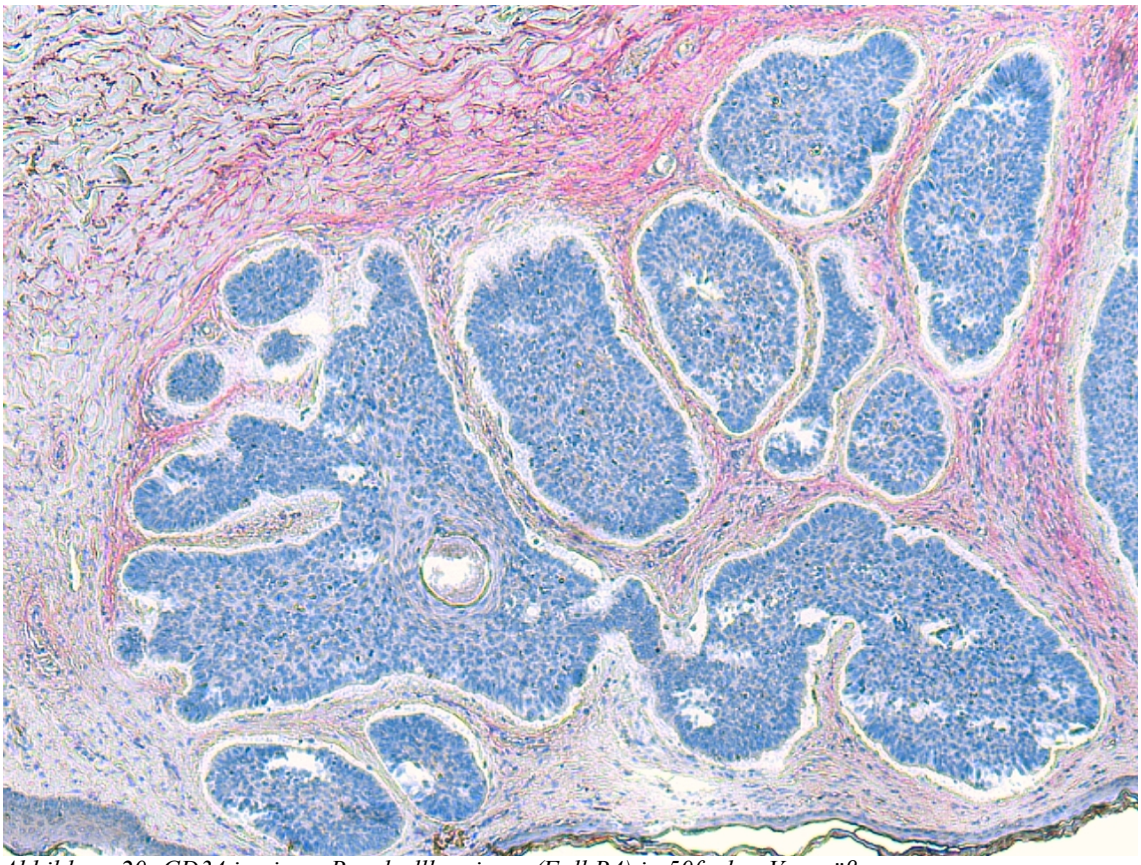


Abbildung 20: CD34 in einem Basalzellkarzinom (Fall B4) in 50facher Vergrößerung.

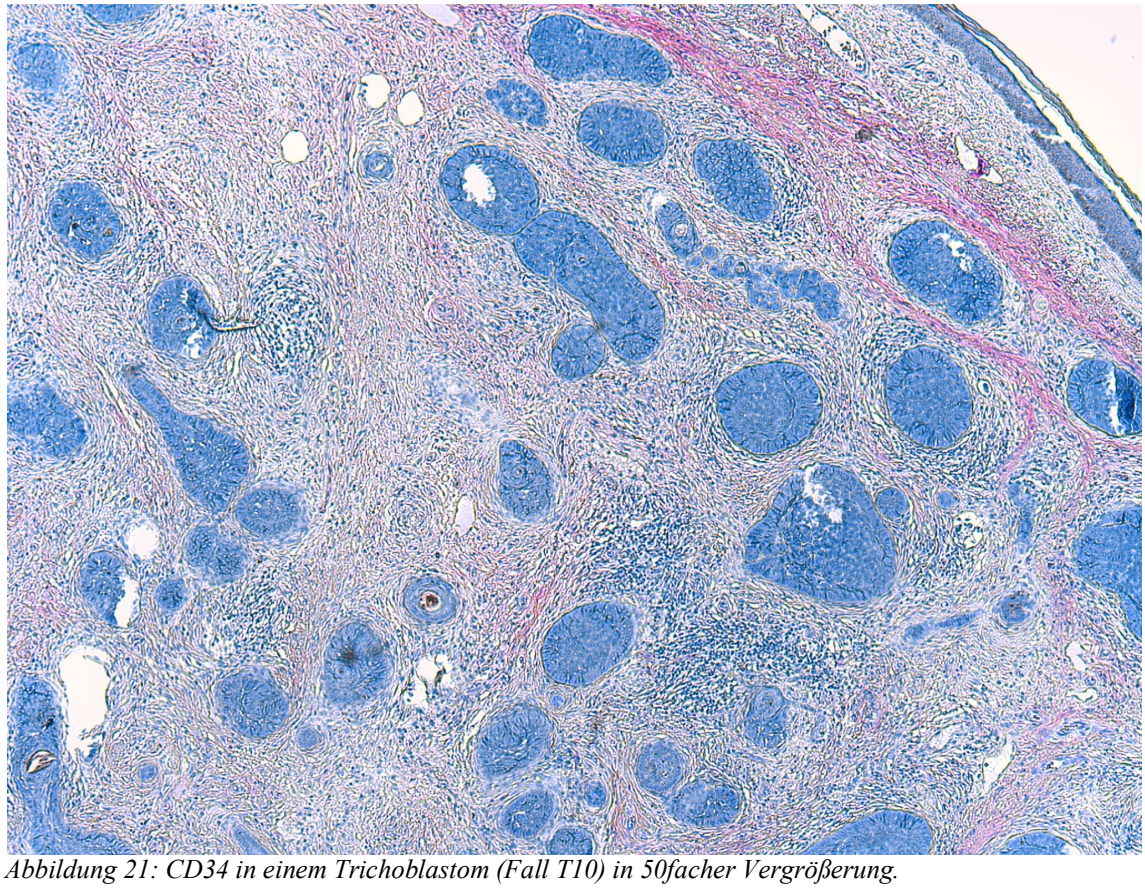


Abbildung 21: CD34 in einem Trichoblastom (Fall T10) in 50facher Vergrößerung.

5.2.7 Cytokeratin 20

Das **Cytokeratin 20** war in Einzelzellen in 4 von 17 der Basalzellkarzinome positiv und in 6 von 14 der Trichoblastome. Es erwies sich in jedem einzelnen Fall als sehr unterschiedlich und wurde daher lediglich hinsichtlich der Positivität bzw. Negativität der Expression im Vergleich zur Positivkontrolle beurteilt. Ein klar differenzierendes Muster konnte nicht erkannt werden. Exemplarisch hierfür sind die Abbildungen 21 und 22.

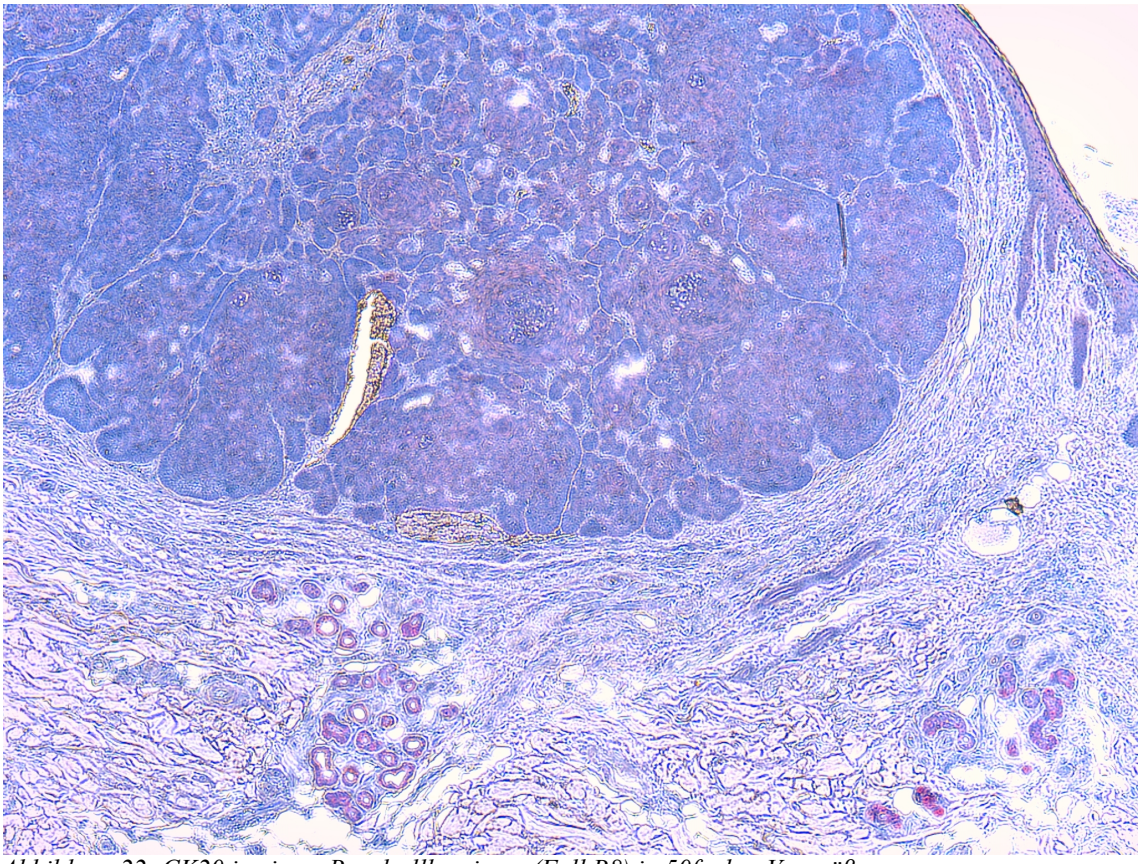


Abbildung 22: CK20 in einem Basalzellkarzinom (Fall B8) in 50facher Vergrößerung.

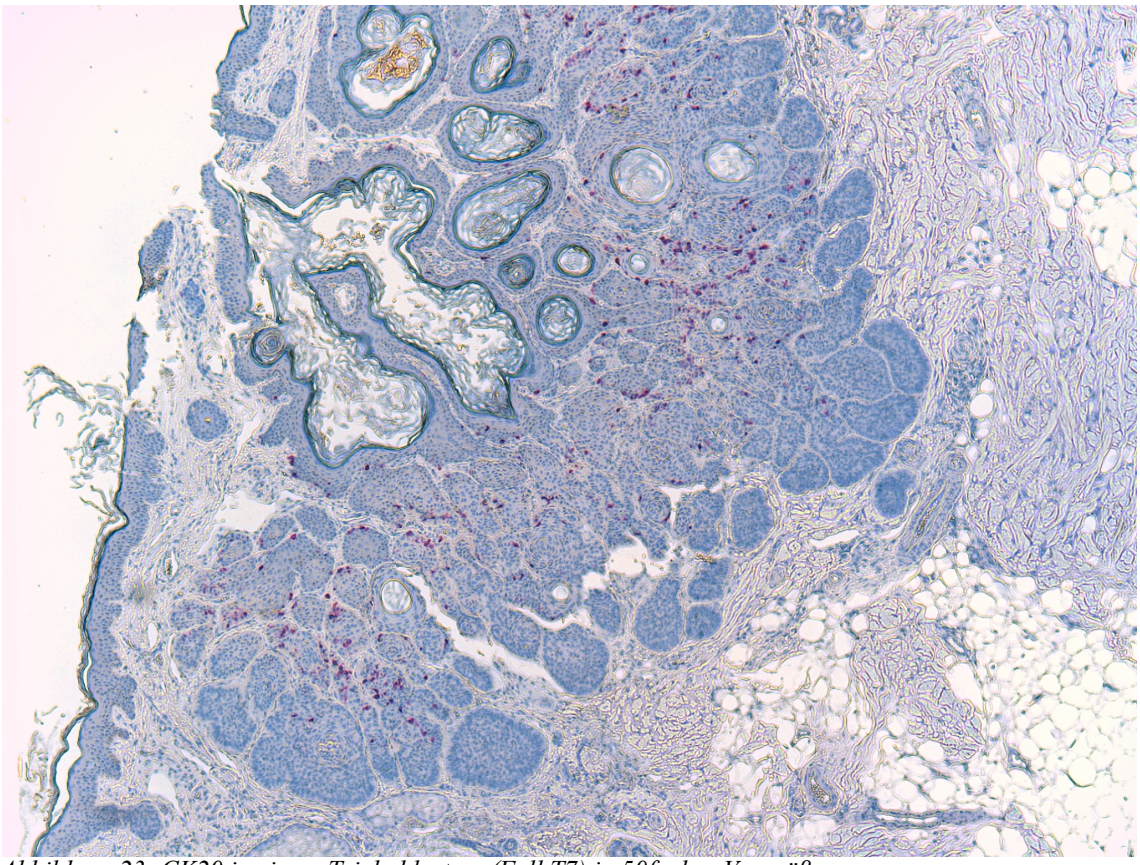


Abbildung 23: CK20 in einem Trichoblastom (Fall T7) in 50facher Vergrößerung.

5.2.8 Cytokeratin 8

Das **Cytokeratin 8** (CK8) erwies sich in allen Basalzellzellkarzinomen, sowie auch in allen Trichoblastomen, als negativ (s. Abb. 23 und 24). Somit war es nicht differenzierend.

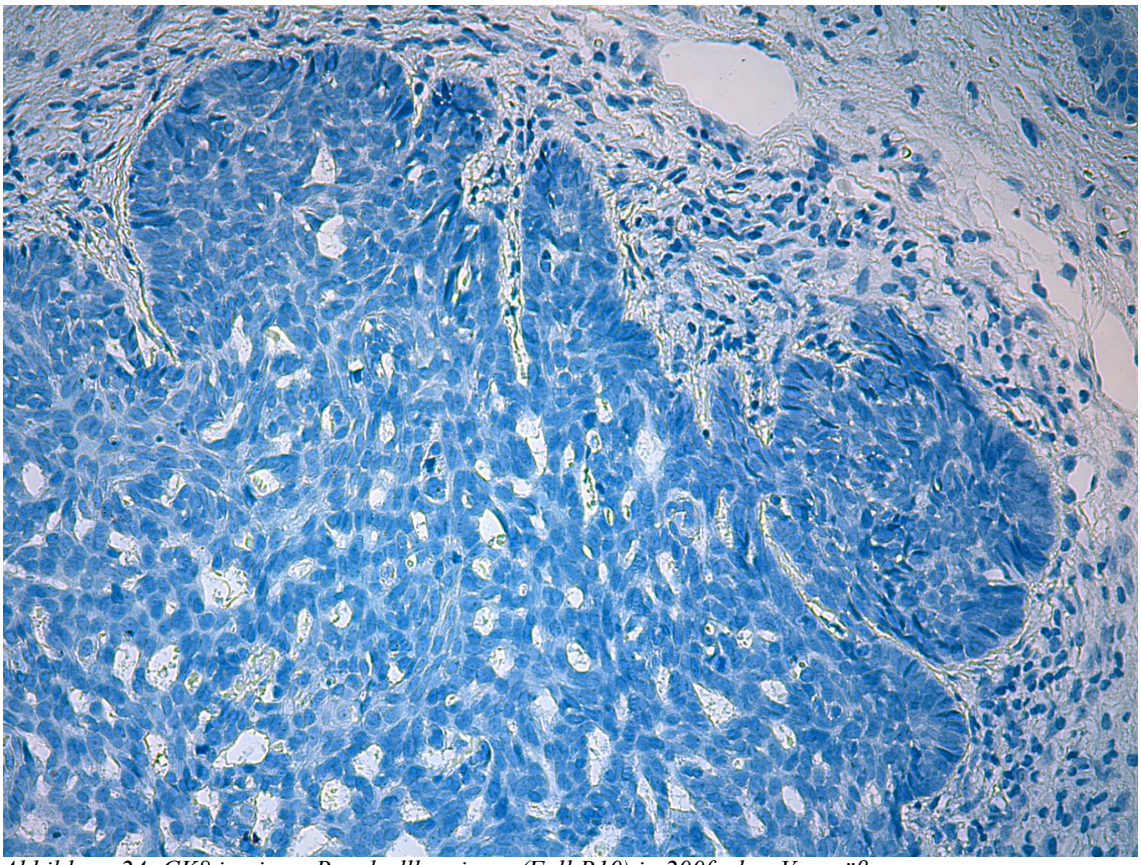


Abbildung 24: CK8 in einem Basalzellkarzinom (Fall B10) in 200facher Vergrößerung.

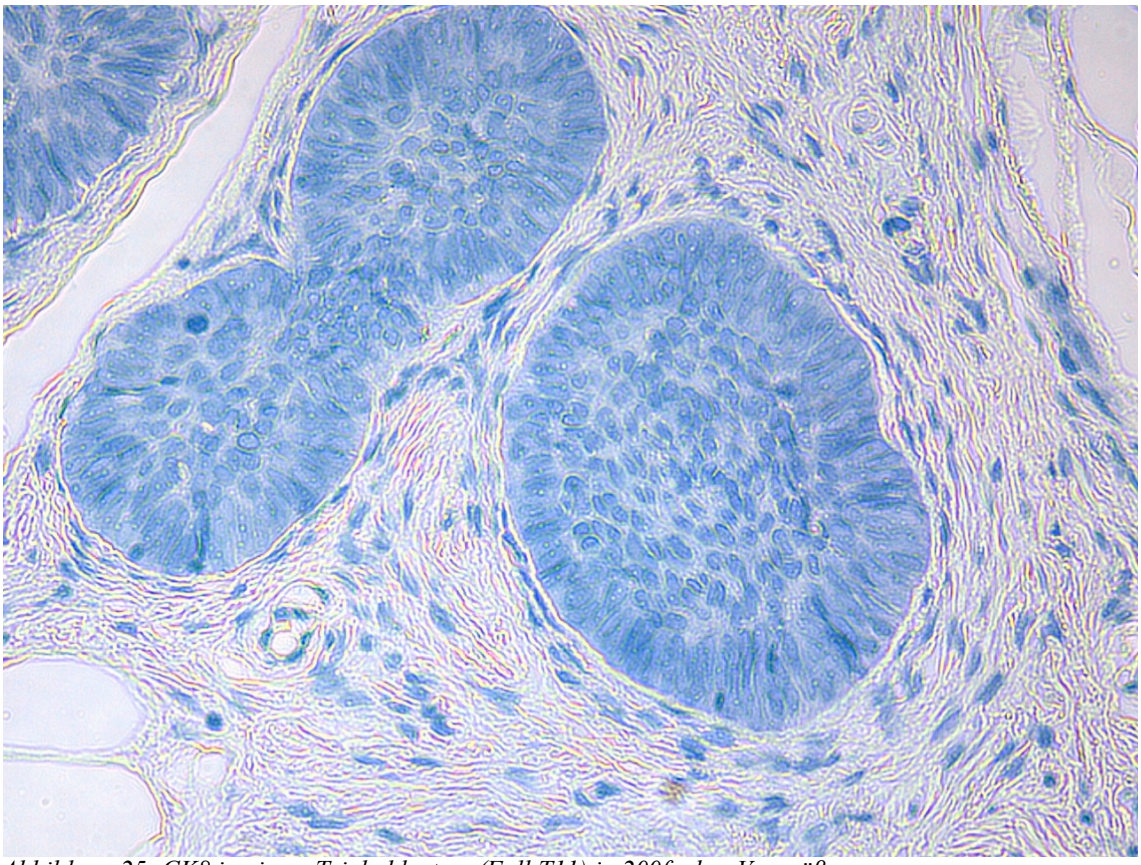


Abbildung 25: CK8 in einem Trichoblastom (Fall T11) in 200facher Vergrößerung

5.2.9 PHLDA1

Der Antikörper **PHLDA1** wurde auf die Färbungen der epithelialen Bereiche der Tumore (Kriterium A), auf angefärbte Melanozyten (Kriterium B) und auf die Markierung einer mesenchymalen Papille (Kriterium C) untersucht.

Die epithelialen Anteile der Trichoblastome wiesen eine starke Expression auf und waren in 9 von 14 Fällen in mehr als 2/3 der Tumoranteile positiv. Zusätzlich waren in 3 Fällen zumindest bis zu 2/3 der Tumoranteile positiv. Weniger als 1/3 der Tumoranteile war lediglich bei einem Trichoblastom zu erkennen.

Im Gegensatz dazu wiesen 15 von 17 Basalzellkarzinome eine Positivität von kleiner 1/3 der Tumoranteile im epithelialen Anteil auf. Nur ein Basalzellkarzinom zeigte eine Positivität größer als 1/3 und kleiner als 2/3 und eines mit einer Positivität größer gleich 2/3.

Sehr gut zu erkennen waren die Melanozyten im Basalzellkarzinom, welche sich als „wie gepfeffert“ unter dem Mikroskop darstellten (s. Abb. 25). 12 der 17 Basalzellkarzinome wiesen diese Melanozyten in mehr als 2/3 der Tumorfläche auf. Beim Trichoblastom zeigte sich dies in keinem der Fälle. Lediglich in einem der 14 Trichoblastome waren Melanozyten in bis zu 2/3 der Tumorfläche zu erkennen.
Bei den restlichen Trichoblastomen lag der Anteil der darstellbaren Melanozyten deutlich unter 1/3 der Tumorfläche, so wie bei 5 der 17 Basalzellkarzinome.

Eine Anfärbung mehrerer mesenchymaler Papillen, welches einem Wert 1 entspricht (s. Tab. 14), konnte in 7 der 14 Trichoblastome gut erkannt werden (s. Abb. 26 und 28). Im Gegensatz dazu waren es beim Basalzellkarzinom lediglich 2 der 17 Fälle mit einem Wert 1. Die restlichen Fälle beider Entitäten konnten mit einem Wert 0 bewertet werden.

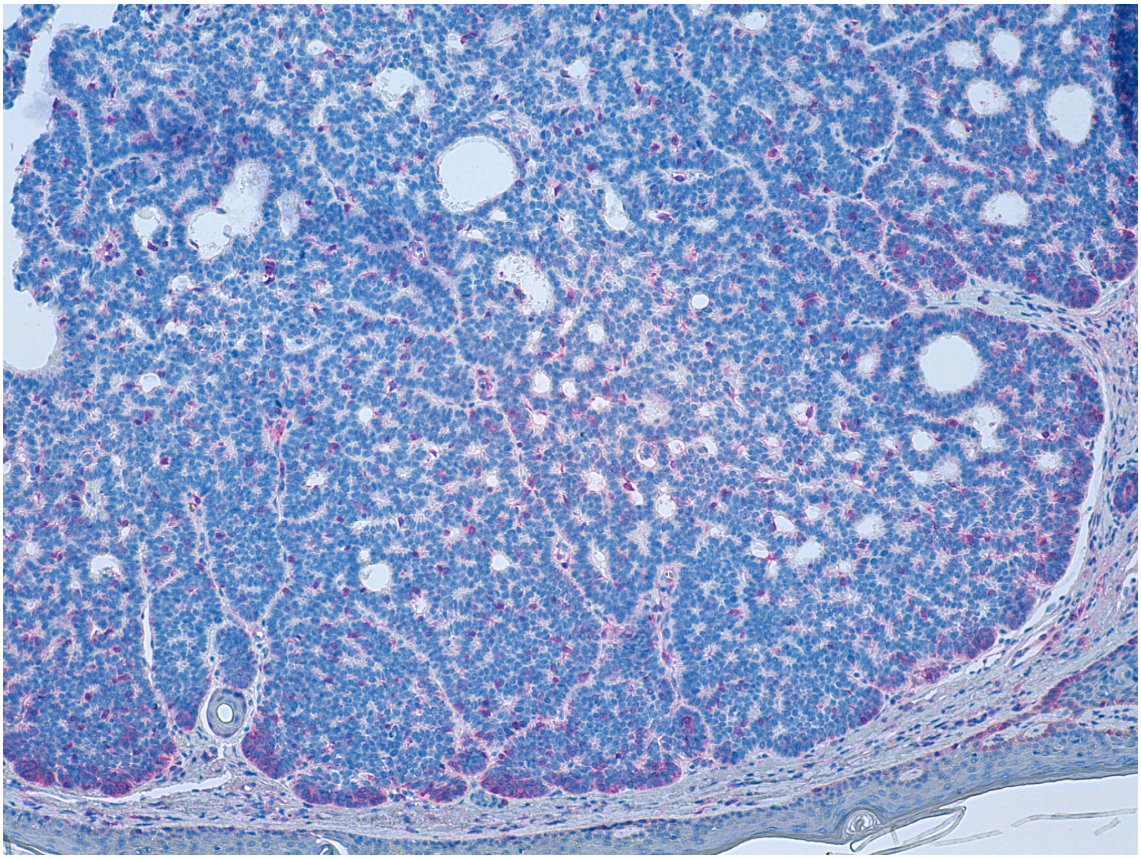


Abbildung 26: PHLDA1 in einem Basalzellkarzinom (Fall B17) in 100facher Vergrößerung. Die Expression der Melanozyten ist gut als eine „Pfefferung“ zu erkennen.

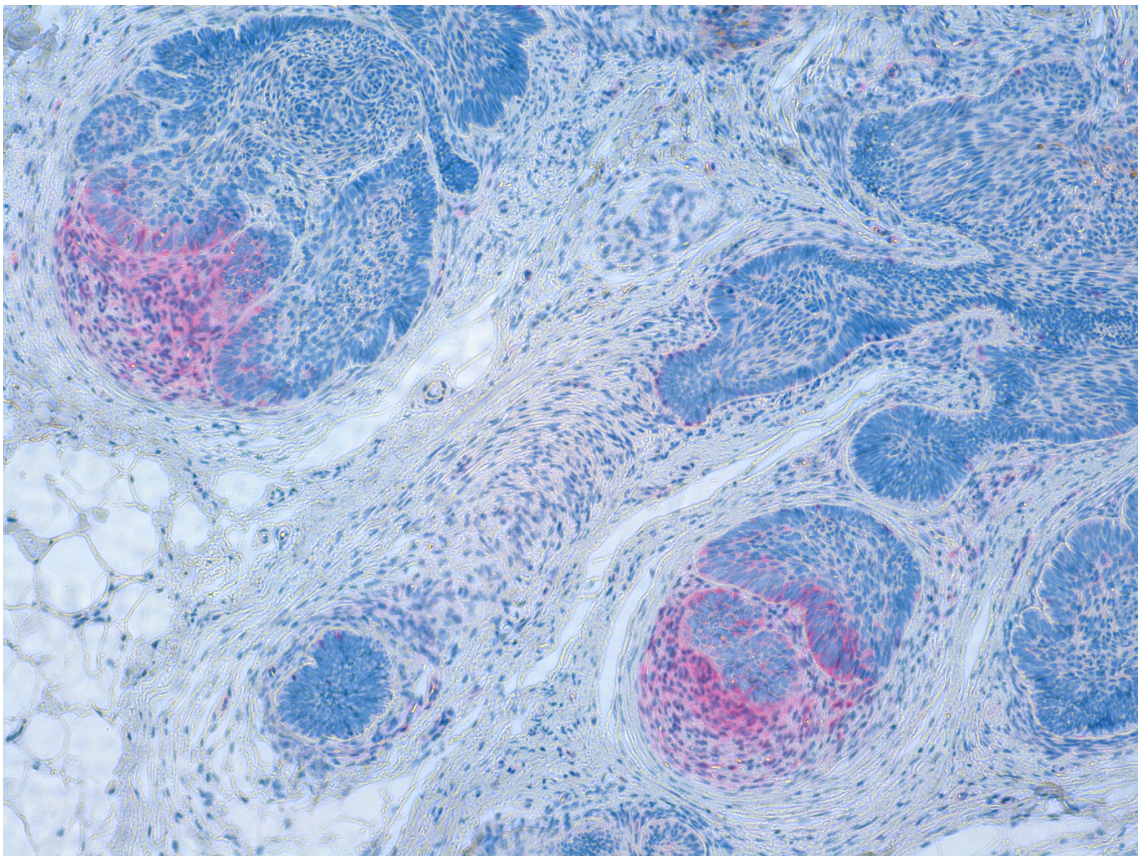


Abbildung 27: PHLDA1 in einem Trichoblastom (Fall T11) in 100facher Vergrößerung.

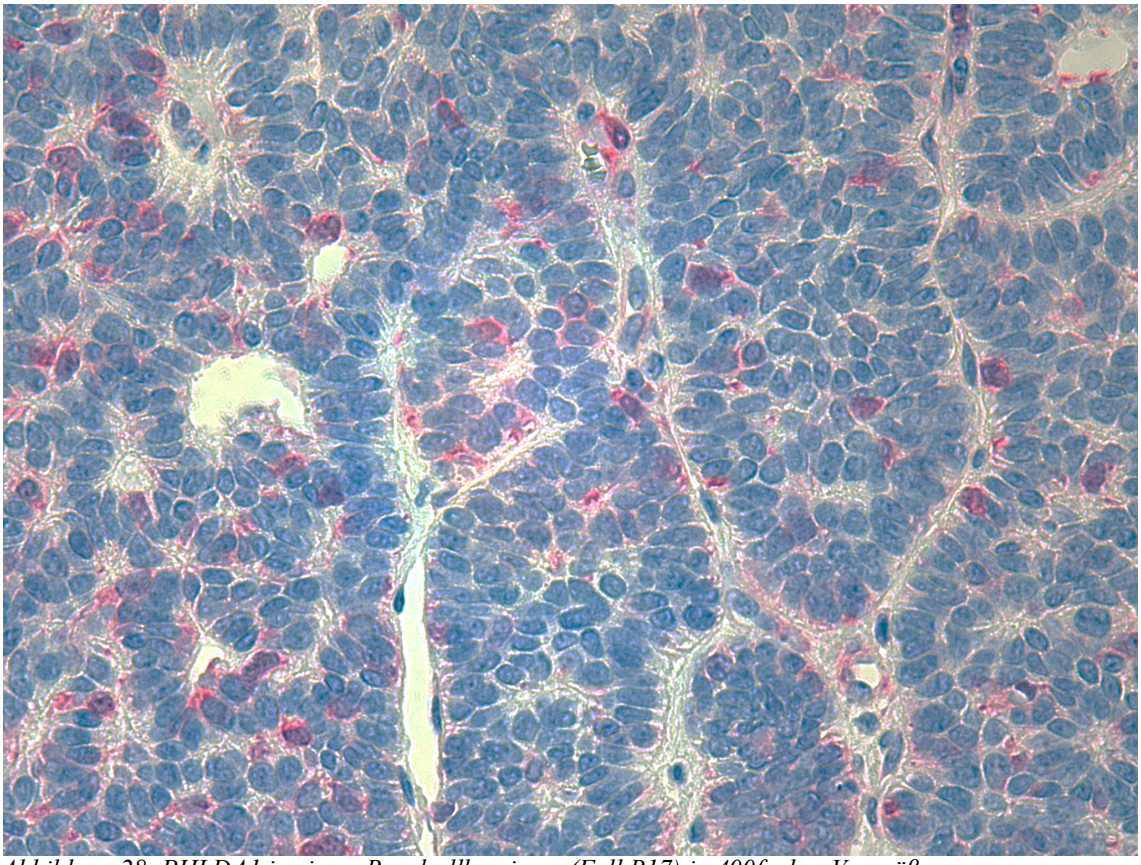


Abbildung 28: PHLDA1 in einem Basalzellkarzinom (Fall B17) in 400facher Vergrößerung.

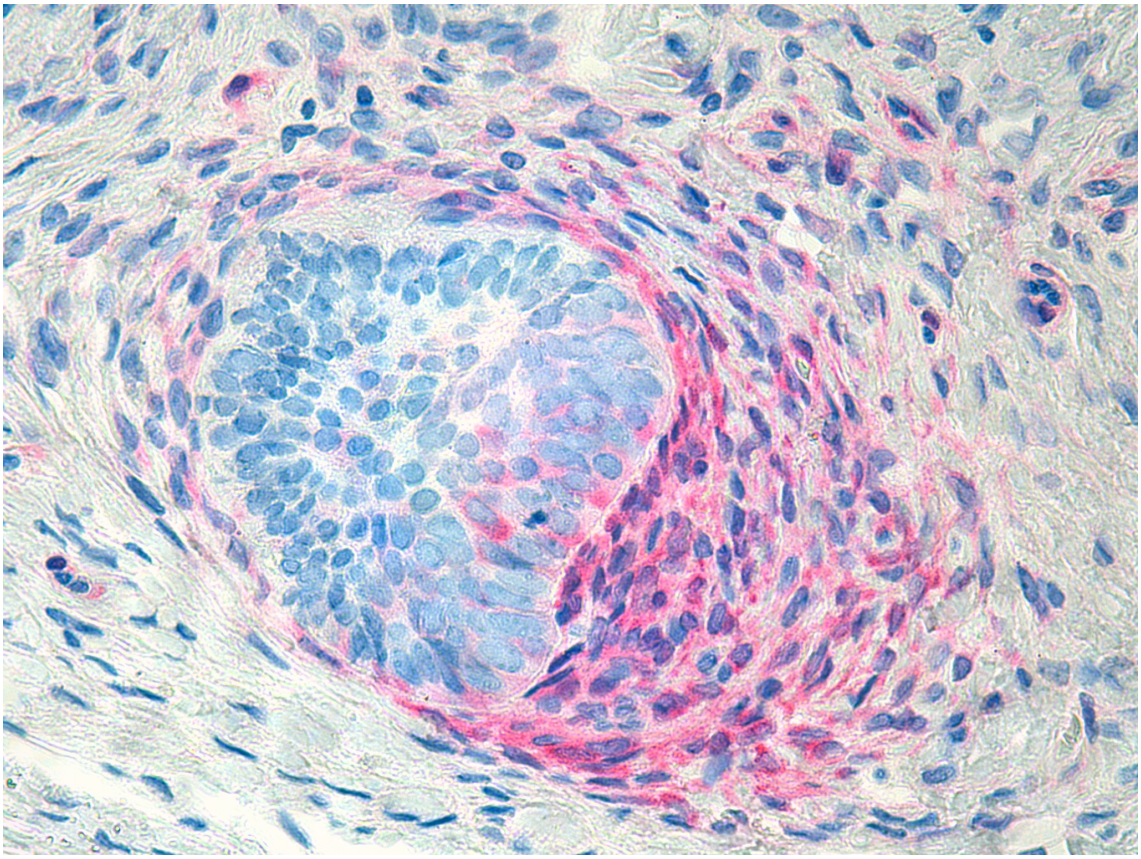


Abbildung 29: PHLDA1 in einem Trichoblastom (Fall T11) in 400facher Vergrößerung.

5.2.10 BerEP4

Der Antikörper **BerEP4** markierte Tumorknoten und wurde auf dessen peripheres (Kriterium A) und zentrales (Kriterium B) Färbeverhalten untersucht.

Der periphere Anteil des Tumors war beim Trichoblastom in 5/14 Fällen zu weniger als 1/3 positiv (Wert 0), beim Basalzellkarzinom in 1/17 Fällen. Bei den zentralen Tumoranteilen traf dies in 7/14 Trichoblastomfällen, aber in keinem Basalzellkarzinom zu.

Ein Wert 1, mehr als 1/3 aber weniger als 2/3 Positivität der Tumoranteile, war in den peripheren Anteilen in 2/14 Trichobastomen und in keinem der Basalzellkarzinome zu erkennen. Bei Betrachtung der zentralen Anteile waren es 3/14 Trichoblastome und 4/17 Basalzellkarzinome.

In 16 von 17 Basalzellkarzinomen war der periphere Tumorknotenanteil zu mehr als 2/3 markiert. Beim Trichoblastom waren es 7 von 14 (s. Abb. 31 und 32).
Im Gegensatz dazu zeigte sich im zentralen Tumoranteil beim Basalzellkarzinom eine Markierung zu mehr als 2/3 des Tumorknotens in 13 von 17 Fällen (s. Abb. 29 und 30) und nur bei 4 von 14 Trichoblastomen.

Dass beide Kriterien mit einer 2 (mehr als 2/3 Positivität) bewertet wurden, kam beim Basalzellkarzinom in 12 von 17 Fällen und beim Trichoblastom in nur 3 von 14 Fällen vor.

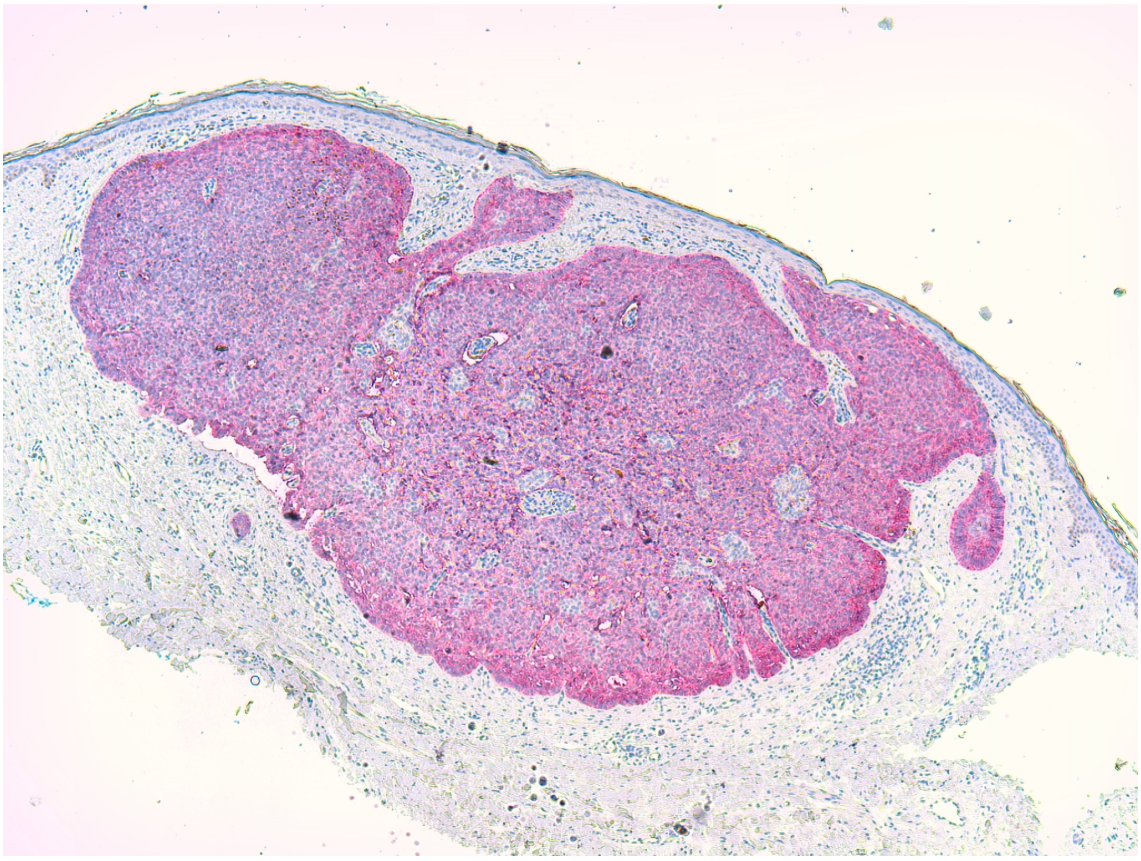


Abbildung 30: BerEP4 in einem Basalzellkarzinom (Fall B13) in 50facher Vergrößerung.

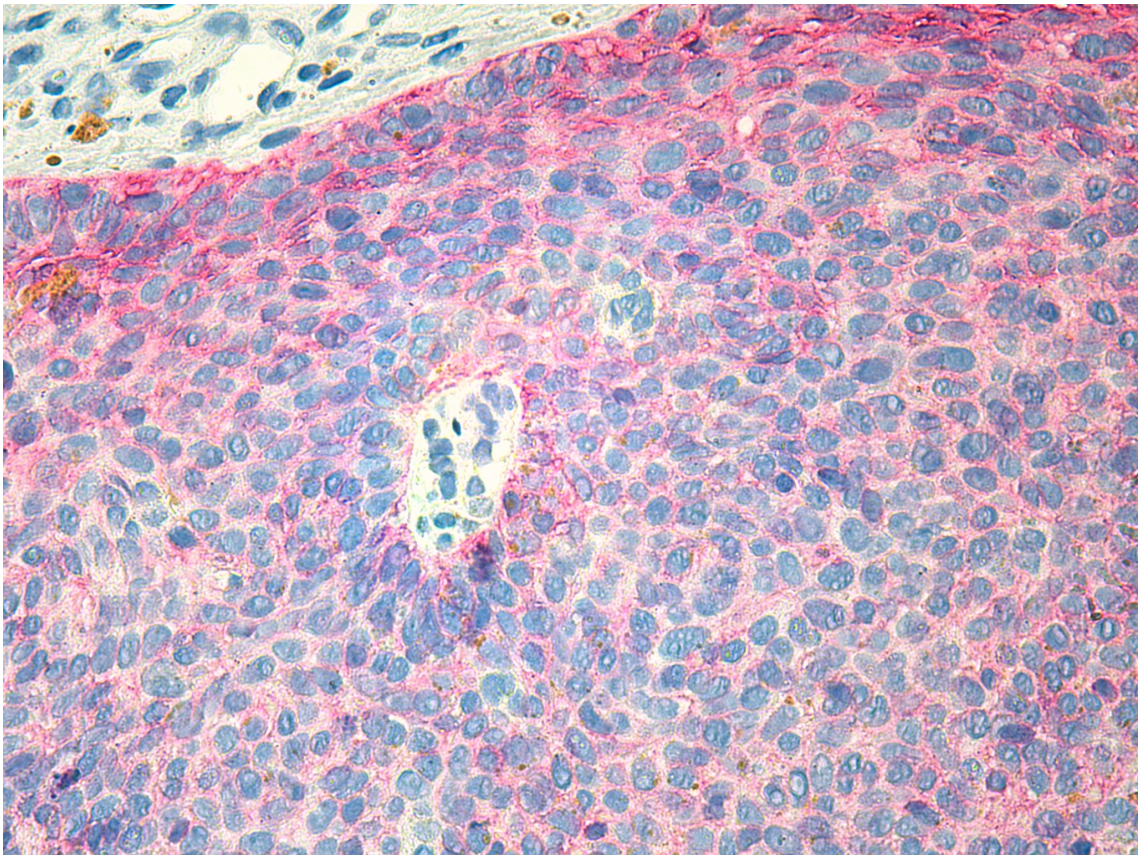


Abbildung 31: BerEP4 in einem Basalzellkarzinom (Fall B13) in 400facher Vergrößerung.

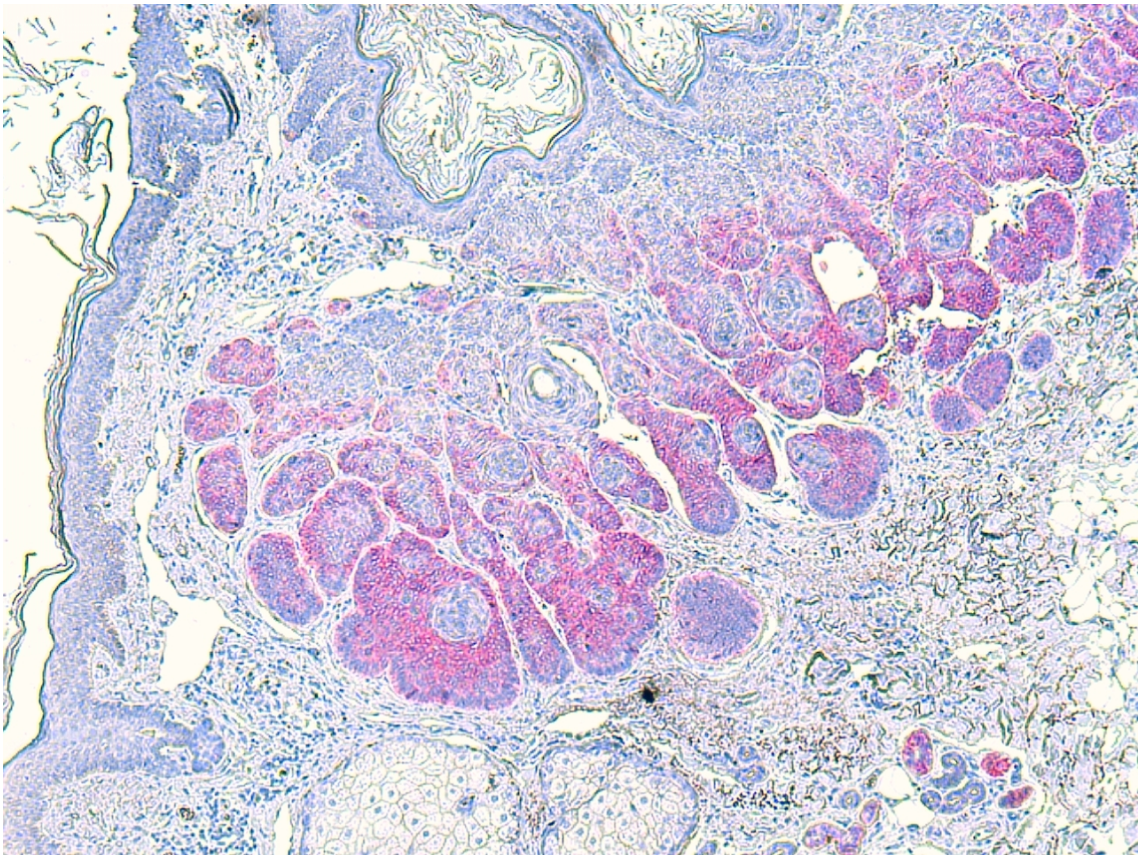


Abbildung 32: BerEP4 in einem Trichoblastom (Fall T7) in 50facher Vergrößerung.

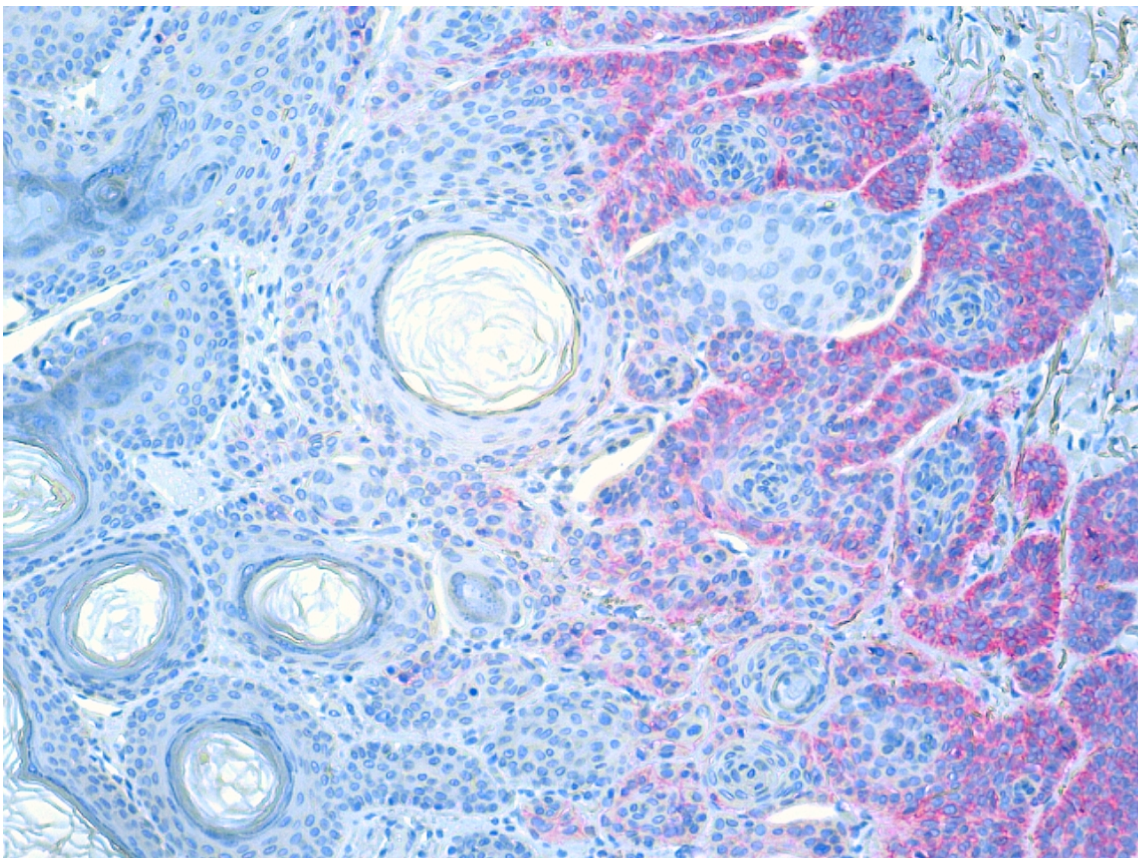


Abbildung 33: BerEP4 in einem Trichoblastom (Fall T7) in 100facher Vergrößerung.

5.2.11 Cytokeratin 15

Beim Antikörper **CK15** wiesen 3 von 17 Basalzellkarzinome eine positive Expression mit einem Anteil von größer als 50% auf. Im Gegensatz dazu waren dies beim Trichoblastom 7 von 14 Fällen.

5 der 17 Basalzellkarzinome zeigten eine Expression, die geringer als 50%, aber größer als 10% der Tumoranteile, war. Ebenso war diese Expression beim Trichoblastom in 5 der 14 Fälle sichtbar.

Eine sehr geringe Positivität (<10%) der Tumoranteile konnte bei 9 der 17 Basalzellkarzinome festgestellt werden. Beim Trichoblastom waren es 2 der 14 Fälle mit weniger als 10%.

Als Positivkontrolle wurden die basalen Zellen mit dem Tumorgewebe verglichen (s. Abb. 33).

Abbildung 34: CK15 in normaler Kopfhaut in 50facher Vergrößerung.

5.3 Statistische Bewertung der eigenen Versuche

Zur statistischen Betrachtung der Werte wurden zwei verschiedene Methoden des sogenannten „Clusterings“ verwendet. Hierbei wurden Zusammenhänge der Werte und damit eine Kategorisierung der Werte zu sogenannten Clustern bzw. Gruppen untersucht. Das Clustering soll einen Anhaltspunkt geben, wie gut die Zuordnung zu einem Trichoblastom und einem Basalzellkarzinom und dadurch auch eine Unterscheidung möglich ist.

5.3.1 Clusteranalyse mit Cramers V

5.3.1.1 Berechnung des Cramers V

Eine dieser Cluster-Methoden ist das „Cramers V“. Cramers V ist ein Kontingenzkoeffizient, der den Zusammenhang zwischen der Ausprägung eines Kriteriums eines Antikörpers und einer Tumorentität misst. Dies bedeutet in unserem Fall, dass versucht wurde, das mikroskopische Ergebnis des jeweiligen Kriteriums dem Trichoblastom bzw. Basalzellkarzinom zuzuordnen. Der Kontingenzkoeffizient soll einen Anhaltspunkt geben, wie gut diese Zuordnung möglich ist.

Im Folgenden wurden mit dieser Methodik des Cramers V die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung (Tabelle 17) der Trichoblastome und Basalzellkarzinome getestet. Daraus entstand die Tabelle 18.

Zusätzlich wurde zum Cramers V ein Vorhersagewert (p-Wert) angegeben. Dieser wurde nach dem exakten Test nach Fisher berechnet, um trotz einer geringen Fallzahl zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Das Signifikanzniveau liegt bei $p \leq 0{,}05$ (123).

Tabelle 18: Ergebnisse des Kontingenzkoeffizienten Cramers V und dessen Bewertung. Zusätzlich wurde jeweils ein p-Wert berechnet:

Antikörper	Kriterien		Cramers V (Kontin-genzkoef-fizient)	Bewertung des Cramers V (Farbe)[5]	p-Wert[6]
Drebrin	A	mesenchymale Hüllschicht	0,5153	übermäßig stark	0,01612051
	B	fokales Tumorzytoplasma	0,3673	sehr stark	0,09272031
	C	Epidermis über Tumor	0,0442	sehr schwach	-
	D	>90% Tumorzytoplasma	0,2500	mäßig	1,00000000
Nestin	A	fokal mesenchymale Hüllschicht	0,8678	übermäßig stark	0,00000308
	B	Tumorknoten	0,2655	mäßig stark	1,00000000
Androgen-rezeptor	A	Tumorzellkerne	0,7175	übermäßig stark	0,00017578
LN5	A	zentrales Tumorzytoplasma	0,2696	mäßig stark	0,41247641
	B	peripheres Tumorzytoplasma	0,3556	sehr stark	0,19754789
Bcl2	A	Tumorknoten	0,1373	sehr schwach	0,58620690
	B	palisadenartiger Tumorknoten	0,1665	schwach	0,67458493
CD34	A	intratumorales Bindegewebe	0,1635	schwach	0,47948776
	B	peritumorales Bindegewebe	0,1835	schwach	0,40285755
CK20	A	Positivität/Negativität	0,2559	mäßig stark	0,44136319
CK8	A	Positivität/Negativität	0,0000	kein Zusammenhang	-
PHLDA1	A	Epithel	0,6789	übermäßig stark	0,00025912
	B	Melanozyten	0,5742	übermäßig stark	0,00067915
	C	mesenchymale Papille	0,3478	stark	0,04387161
BerEP4	A	periphere Zellen des Tumorknotens	0,5071	übermäßig stark	0,06711161
	B	zentrale Zellen des Tumorknotens	0,6151	übermäßig stark	0,00130515
CK15	A	Positivität/Negativität	0,4332	extrem stark	0,05702633

[5] Begriffe dieser Bewertung analog einer Interpretationstabelle (s. Tab. 19) aus einer Veröffentlichung der Universität Toronto im Bereich „Computing in the Humanities and Social Sciences“ (POL242: Lab Manual: Exercise 3a).

[6] Vorhersagewert (p-Wert) nach dem „exakten Test nach Fisher“. Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0{,}05$ sind bei diesem Test Werte $\leq 0{,}05$ als signifikant anzusehen (hier farbig unterlegt).

5.3.1.2 Interpretation der Cramers V-Werte und statistische Bewertung der Methodik

Cramers V ist ein Kontingenzkoeffizient. Der Koeffizient leitet sich vom Chi-Quadrat-Test ab. Die Werte von Cramers V liegen zwischen 0 und 1, wobei 0 für keinen Zusammenhang steht und 1 für einen perfekten Zusammenhang (s. Tab. 19). Daher sollten die Werte möglichst nahe der 1 liegen, damit davon ausgegangen werden kann, dass das untersuchte Kriterium gut zwischen einem Trichoblastom und einem Basalzellkarzinom unterscheidet.

Die in Tabelle 18 aufgeführten Werte der Cramers V-Berechnung wurden analog einer Interpretationstabelle (s. Tab. 19) aus einer Veröffentlichung der Universität Toronto im Bereich „Computing in the Humanities and Social Sciences“ (POL242: Lab Manual: Exercise 3a) interpretiert (s.Tab. 18). Hierbei wird eine Abstufung der Zusammenhänge der Variablen vorgenommen, welche sich vom schlechtesten Ergebnis („kein Zusammenhang“) zum besten Ergebnis („bestmöglicher Zusammenhang“) erstreckt (s. Tab. 19).

Tabelle 19: Interpretationstabelle für die Werte des Cramers V:

Grad des Zusammenhangs/ Kontingenzkoeffizient:	**Bewertung des Zusammenhangs der Ausprägung eines Kriteriums und einer Tumorentität (T oder B)**
0,00	kein Zusammenhang
0,00 bis 0,15	sehr schwacher Zusammenhang
0,15 bis 0,20	schwacher Zusammenhang
0,20 bis 0,25	mäßiger Zusammenhang
0,25 bis 0,30	mäßig starker Zusammenhang
0,30 bis 0,35	starker Zusammenhang
0,35 bis 0,40	sehr starker Zusammenhang
0,40 bis 0,50	extrem starker Zusammenhang
0,50 bis 0,99	übermäßig starker Zusammenhang
1,00	maximaler, bestmöglicher Zusammenhang

Erst ab einem Wert von 0,20 ist das Ergebnis als „mäßig“ zu bewerten und somit akzeptabel. Wünschenswert wären jedoch Werte ab 0,25. Je größer der Wert ist und somit näher an 1 liegt, desto stärker ist der Grad des Zusammenhangs der Variablen:

Dies entspricht in dieser Arbeit dem Zusammenhang zwischen der Ausprägung eines Kriteriums eines Antikörpers und der Tumorentität. Daher sind vor allem die Antikörper mit einem Ergebnis nahe dem Wert 1 von Interesse, da sich diese wohl für eine Differenzierung der beiden Tumore eignen.

Zusätzlich wurde ein Vorhersagewert (p-Wert) für die Kriterien mit einem Wert des „Cramers V“ von größer als 0,15 angegeben. Dieser wurde nach dem „exakten Test nach Fisher“ berechnet, damit trotz der geringen Fallzahl zuverlässige Ergebnisse zu erwarten sind. Der exakte Test nach Fisher ist ein Signifikanztest für die Unabhängigkeit der Variablen und stellt dabei keine Forderungen an die Fallzahl. Bei einem angenommenen Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ sind bei diesem Test, die in der Tabelle 18 farbig unterlegten Werte als signifikant anzusehen. Somit sind nach der Berechnung nach Cramers V hier die Werte beim Drebrin (Kriterium A), dem Nestin (Kriterium A), dem Androgenrezeptor, dem PHLDA1 und dem BerEP4 (Kriterium B) signifikant und haben eine geringe Irrtumswahrscheinlichkeit. Die hier nicht farbig markierten Werte waren bei diesem Test nicht signifikant und ließen eine Unterscheidung mit dem Kontingenzkoeffizienten Cramers V nicht zu.

Im Folgenden wurde die Methodik des Clustering mit Cramers V bzw. k-Mode weitergehend statistisch bewertet (s. Tab. 20):

Tabelle 20: Statistische Bewertung der Clusteranalyse des k-Mode:

Statistik Bewertung des k-Mode: [7]	
Fehler	12,90%
Genauigkeit	87,10%
Spezifität = TN/(TN+FP)	85,72%
Sensitivität = TP/(TP+FN)	88,24%
PPV = TP/(TP+FP)	15/ (15+2) = 88,24%
NPV = TN/(TN+FN)	12/ (12+2) = 85,72%
Likelihood ratio LR-negativ: (1-SEN)/SPE = (1 – 0,8824) / 0,8572 = 0,1372	
Likelihood ratio LR-positiv: SEN/(1-SPE) = 0,8824 / (1 - 0,8572) = 6,1793	

[7] **Erklärung der Abkürzungen:**
TN = true negative, TP = true positive, FN = false negative, FP = false positive,
SEN = Sensitivität, SPE = Spezifität

Es zeigte sich insgesamt in der Untersuchung mit k-Mode bzw. dem Cluster (s. Tab. 18, 21) eine Fehlerquote von 12,90% (s. Tab. 20). Somit ergab die Untersuchung gleichzeitig eine Genauigkeit von 87,10%. Diese kann jedoch durch Kombinationen der Kriterien noch weiter verbessert werden. Ebenso würde eine größere Fallzahl die Ergebnisse belastbarer machen, da die hier verwendete Fallzahl mit insgesamt 31 Fällen der beiden Kategorien, Trichoblastom und Basalzellkarzinom, als gering einzuschätzen ist. Durch diese Limitation der Stichprobengröße ist die Robustheit des Modells als kritisch zu bewerten. Die in dieser statistischen Betrachtung berechneten Werte im k-Mode beziehen sich auf einen unbekannten bzw. neuen Tumor, welcher mit einer Blaupause gleichzusetzen ist. Aufgrund der geringen Fallzahl könnte sich bereits bei einem weiteren unbekannten Fall, (mit der Differentialdiagnose Basalzellkarzinom versus Trichoblastom) mit anderen Werten, die Genauigkeit um ca. 3% (1:31 Fälle x 100) verändern. Dadurch könnte das Modell für weitere unbekannte Fälle stark variieren. Aufgrund der geringen Stichprobengröße ist folglich die kritische Robustheit bei der Betrachtung von hier empfohlenen differentialdiagnostischen Hilfsmitteln zu beachten.

Anhand der Sensitivität (s. Methodik und Wert Tab. 20) kann geschlussfolgert werden, dass ein Basalzellkarzinom zu 88,24% auch als solches erkannt wird. Analog dazu wird durch die angegebene Spezifität ein Trichoblastom zu 85,72% erkannt.

Der positive und negative Vorhersagewert (PPV und NPV) gibt eine Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Trichoblastom nun tatsächlich einem solchen entspricht und analog dazu, ein Basalzellkarzinom tatsächlich ein solches ist. Da in unserer Untersuchung sich die falsch-positiven (FP) und die falsch-negativen (FN) Fälle in der Anzahl nicht unterscheiden, ergaben sich demnach auch die entsprechenden Werte der Sensitivität und Spezifität.

Die „Likelihood ratio“ gibt einen Anhaltspunkt für die Wahrscheinlichkeit eines positiven oder negativen Testresultates unabhängig von der Prävalenz. Sowohl das positive Wahrscheinlichkeitsverhältnis mit einem Wert von 6,1793, als auch das negative mit einem Wert von 0,1372 entspricht einer relativ hohen diagnostischen Evidenz.

5.3.1.3 Visualisierung der Werte des Cramers V

Durch die Untersuchung mit „k-Mode“ (121) konnte ein Cluster ermittelt werden, welches geeignet erscheint, in der Diagnostik die beiden Tumorkategorien korrekt zu differenzieren[8]: Das entstandene Cluster (s. Tab. 21) betrachtet mit Hilfe der k-Mode-Methode die Trichoblastome (T) und die Basalzellkarzinome (B) einzeln. Es teilt diesen beiden Entitäten einen sogenannten Modus zu. Dieser Modus entspricht den jeweiligen Eigenschaften bzw. festgelegten Kriterien, welche für den entsprechenden Tumor (T oder B) am häufigsten vorkamen. Somit ist der jeweils zugeteilte Modus, die Eigenschaft bzw. das Kriterium, welches am wahrscheinlichsten zutreffend für diesen Tumor sein könnte. Hierbei konnten einige Werte (**fett** und blau hinterlegt hinterlegt) ermittelt werden, welche eine Differenzierung ermöglichen könnten (s. Tab. 21).

Dieses Clustering soll eine Methode zur Differenzierung der beiden Entitäten liefern. Hierfür würden sich, aufgrund ihrer differenzierenden Werte (**fett** und blau hinterlegt), die Antikörper Drebrin, Nestin, der Androgenrezeptor, Bcl2, CD34, PHLDA1, BerEP4 und das CK15 eignen. Insgesamt kommt man mit diesen Antikörpern auf 10 differenzierende Kriterien. So könnte laut Tablle 21 beispielsweise bei Nestin die Färbung vieler fokaler mesenchymaler Hüllschichten (Kriterium A, Wert 2) darauf hinweisen, dass es sich hierbei um ein Trichoblastom handelt. Ist diese Färbung nicht zu erkennen (Wert 0), spricht dies für ein Basalzellkarzinom. Das Kriterium B des Nestins konnte allerdings nicht differenzieren und erhielt somit im k-Mode keinen Modus.

[8] Nicht eindeutig zu erkennende Ausprägungen der Antikörper wurden für das k-Mode Verfahren als unbekannt kodiert.

Tabelle 21: Clusteranalyse der Antikörper und ihrer Kriterien anhand des Cramers V:

Cluster Schwerpunkte:				
Antikörper	**Alphabetische Gliederung der Kriterien:**	**Kriterien**	**Entität mit ihrem Modus[9]**	
			T	**B**
Drebrin	A	mesenchymale Hüllschicht	0	0
	B	<30% Tumorzytoplasma	0	0
	C	Epidermis über Tumor	2	2
	D	>90% Tumorzytoplasma	**1**	0
Nestin	A	fokal mesenchymale Hüllschicht	**2**	0
	B	Tumorknoten	0	0
Androgenrezeptor	A	Tumorzellkerne	**0**	2
LN5	A	zentrales Tumorzytoplasma	2	2
	B	peripheres Tumorzytoplasma	2	2
Bcl2	A	Tumorknoten	2	**1**
	B	palisadenartig Tumorknoten	2	**1**
CD34	A	intratumorales Bindegewebe	1	**0**
	B	peritumorales Bindegewebe	2	2
CK20	A	Positivität/Negativität	0	0
CK8	A	Positivität/Negativität	0	0
PHLDA1	A	Epithel	**2**	0
	B	Melanozyten	0	**1**
	C	mesenchymale Papille	0	0
BerEP4	A	periphere Zellen des TK	2	2
	B	zentrale Zellen des TK	**0**	2
CK15	A	Positivität/Negativität	**2**	0

Zu beachten dabei ist, dass die Methodik des k-Mode in Python die Variablen der Auswertung (0, 1, 2) der Tabelle 14 unabhängig voneinander bewertet. Ist also bei der Auswertung eines Antikörpers eine der Variablen gleich oft vorhanden, so entscheidet sich k-Mode in Python für die kleinere Variable. Das bedeutet, dass beispielsweise Drebrin im Kriterium A kein differenzierender Modus zugeteilt wurde, da auch für das Trichoblastom ein Wert 0 festgelegt wurde und somit sowohl T, als auch B den Wert 0 aufweisen und sich nicht unterscheiden lassen.

[9] Den Entitäten (T= Trichoblastom, B= Basalzellkarzinom) wurde der sogenannte Modus zugeteilt. Dieser Modus ist ein Wert von 0 bis 2 analog der Tabelle 14, welcher für den entsprechenden Tumor am häufigsten vorkam.

Es kann gegebenenfalls mikroskopisch schwierig sein, zwischen einem Wert 1 und einem Wert 2 (siehe entsprechend festgelegte Kriterien aus der Tab. 14) zu differenzieren. Einfacher sollte es jedoch sein, einen Wert 0 von einem Wert 2, nach den jeweiligen Kriterien abzugrenzen. Daher könnten vor allem Nestin, der Androgenrezeptor, PHLDA1 und CK15 zur korrekten Diagnostik von großem Interesse sein.

Um dies zu überprüfen und besser zu visualisieren wurde die Tabelle 21 mit dem ursprünglich erhobenen Datensatz (Tab. 17) verglichen, wodurch die Tabelle 22 entstand. Hierzu wurden die erhobenen Variablen (Tab. 14) mit dem erstellten Cluster (Tab. 21) so verglichen, dass die entsprechenden Variablen einem Trichoblastom (T) oder einem Basalzellkarzinom (B) zugeordnet werden konnten. Für diese Kategorisierung bzw. die Veranschaulichung dieser Differenzierung wurden drei Farben gewählt: weiß = unter dem Mikroskop nicht auswertbar (entspricht dem Wert 3); grün = der Wert entspricht einem T; rot = der Wert entspricht einem B; gelb = der Wert liegt zwischen einem klarem T und B.

In der Spalte „Auswertung“ wurde die Anzahl der Kriterien angegeben, bei welchen die neu gewählte Kategorisierung (grün = Trichoblastom (T); rot = Basalzellkarzinom (B)), anhand des Modus des Clusters (s. Tab. 21), mit der ursprünglichen klinischen Diagnose übereinstimmt.

Tabelle 22: Veranschaulichung der Clusteranalyse anhand unserer Daten:

Farben:	**Erläuterung der Farbenbewertung:**
rot	der Wert entspricht einem Basalzellkarzinom
grün	der Wert entspricht einem Trichoblastom
weiß	Wert 3 (unter dem Mikroskop nicht auswertbar)
gelb	der Wert liegt zwischen einem klarem T und B

Antikörper:	**Drebrin**				**Nestin**		**AR**	**LN5**		**Bcl2**		**CD34**		**CK20**	**CK8**	**PHLDA1**			**Berep4**		**CK15**	**Auswertung:[10]**		**Vorhersage:**
Kriterien:	**A**	**B**	**C**	**D**	**A**	**B**	**A**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**A**	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**A**	Grün (T)	Rot (B)	
T1	1	0	2	1	1	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	2	0	1	2	1	2	7	0	T
T2	0	0	2	1	2	0	0	2	2	1	2	2	2	1	0	2	0	1	2	1	2	7	1	T
T3	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	4	4	T
T4	0	0	2	1	2	0	0	2	2	1	2	0	1	1	0	2	0	0	2	2	2	7	3	T
T5	0	0	2	0	1	2	0	1	0	2	1	2	2	1	0	2	0	0	0	0	2	6	2	T
T6	2	0	2	0	2	0	0	2	2	2	2	1	3	0	0	2	0	1	0	0	2	9	1	T
T7	3	3	3	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	1	1	0	1	0	1	**2**	5	B
T8	1	1	2	0	1	0	0	2	2	1	0	1	3	0	0	1	0	0	2	2	1	3	3	T
T9	1	0	2	0	3	3	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	1	1	2	0	**2**	7	B
T10	2	0	2	1	2	0	0	2	2	2	2	1	2	0	0	1	0	1	2	0	2	9	0	T
T11	2	0	2	1	2	0	0	2	2	0	2	1	1	1	0	0	0	1	2	2	2	7	2	T
T12	0	0	2	0	2	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	3	T
T13	1	0	3	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1	4	3	T
T14	1	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	2	0	1	0	0	1	7	0	T
B1	0	2	2	1	0	0	2	1	1	2	0	1	2	0	0	0	1	0	2	2	0	3	6	B
B2	0	1	2	0	0	0	2	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	1	1	7	B
B3	0	0	2	2	0	0	2	2	2	1	1	1	2	0	0	0	1	0	2	2	1	1	7	B
B4	0	2	2	1	0	0	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	1	0	2	2	1	3	5	B
B5	0	0	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	**5**	4	T
B6	0	2	2	0	0	0	2	2	2	1	1	0	2	0	0	1	1	0	2	2	0	0	9	B
B7	0	0	2	2	0	0	0	2	2	3	3	2	2	1	0	0	1	0	2	2	1	1	4	B
B8	0	0	2	1	0	0	1	2	2	2	2	0	2	0	0	0	1	0	2	1	0	3	5	B
B9	0	0	2	1	0	0	2	2	2	1	1	1	2	0	0	0	1	0	2	1	2	3	6	B
B10	0	0	2	1	0	0	2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	3	7	B
B11	0	1	2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	1	0	2	1	0	2	6	B
B12	2	0	2	1	0	0	2	2	2	1	1	0	2	0	0	0	1	0	2	2	0	1	9	B
B13	0	0	1	0	0	0	2	2	2	1	1	0	2	0	0	0	1	0	2	2	2	1	9	B
B14	0	1	2	0	0	0	1	0	1	2	2	0	2	0	0	0	1	1	2	2	0	2	6	B
B15	3	3	3	3	3	3	0	2	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0	2	2	0	1	6	B
B16	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	1	0	2	0	0	2	2	1	**5**	4	T
B17	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	1	6	B

[10] Anzahl der differenzierenden Kriterien, bei welchen die neu gewählte Kategorisierung (grün = Trichoblastom (T); rot = Basalzellkarzinom (B)) anhand des Clusters (s. Tab. 17) mit der ursprünglichen klinischen Diagnose übereinstimmt.

Antikörper:	Drebrin				Nestin		AR	LN5		Bcl2		CD34		CK20	CK8	PHLDA1			Berep4		CK15	Auswertung:[10]		Vorhersage:
Kriterien:	A	B	C	D	A	B	A	A	B	A	B	A	B	A	A	A	B	C	A	B	A	Grün (T)	Rot (B)	
Cramers V	0.5153	0.3673	0.0442	0.2500	0.8678	0.2655	0.7175	0.2696	0.3556	0.1373	0.1665	0.1635	0.1835	0.2559	0.0000	0.6789	0.5742	0.3478	0.5071	0.6151	0.4332			
Bewertung	übermäßig stark	sehr stark	sehr schwach	mäßig	übermäßig stark	mäßig stark	übermäßig stark	mäßig stark	sehr stark	sehr schwach	schwach	schwach	schwach	mäßig stark	Kein Z.	übermäßig stark	übermäßig stark	stark	übermäßig stark	übermäßig stark	beunruhigend stark			
p-Wert[11]	0.01612051	0.09272031		1	0.00000308	100,000,000	0.00017578	0.41247641	0.19754789		0.67458493	0.47948776	0.40285755	0.44136319		0.00025912	0.00067915	0.04387161	0.06711161	0.00130515	0.05702633			

Die durch unser Cluster (s. Tab. 21) vorhergesagte Diagnose eines Tumors, ob es sich bei dem entsprechenden Gewebe um ein Trichoblastom oder ein Basalzellkarzinom handelt (s. Tab. 22: Vorhersage), stimmt in 27 von insgesamt 31 Fällen mit dem rein morphologischen Gold-Standard überein.

5.3.1.4 Trefferquote der Cramers V-Analyse und Aufstellung eines Kurzleitfadens

Die Veranschaulichung des Clusters (Tab. 22) ermöglichte eine weitere Auswertung (s. Tab. 23) zur Darstellung einer „Trefferquote“ (= Anzahl der Werte der Tabelle 22 der jeweiligen Kriterien, welche der internen Diagnose entsprechen/ Gesamtanzahl der Fälle).

[11] Die Spalten p-Wert, Bewertung, Cramers V sind analog zur Tabelle 18, mit der Farbbewertung des Tabelle 19.

Tabelle 23: Darstellung der Trefferquote durch Auswertung der Tabelle 22 zusammen mit dem Cluster der Tabelle 21:

Tumor (T, B)	Antikörper und ihre differenzierenden Kriterien (A-D):									
	Drebrin	Nestin	AR	Bcl2		CD34	PHLDA1		BerEP4	CK15
	D	A	A	A	B	A	A	B	B	A
T	7/14	7/13	13/14	6/14	6/14	5/14	8/14	13/14	7/14	7/14
	50%	54%	93%	43%	43%	36%	57%	93%	50%	50%
B	7/16	15/16	11/17	9/16	7/16	10/17	15/17	12/17	13/17	9/17
	44%	94%	65%	56%	44%	58,82%	88%	71%	76%	53%

Die höchste Trefferquote ein Trichoblastom zu erkennen, wies mit der gleich hohen Trefferquote von 93% der Androgenrezeptor sowie der Antikörper PHLDA1 mit seinem Kriterium B auf. Zur Erkennung eines Basalzellkarzinoms überzeugte in dieser Untersuchung das Nestin mit einer Trefferquote von 94%, gefolgt vom PHLDA1 mit dem Kriterium A mit 88%.

Mit Hilfe dieser Trefferquote in Tabelle 23 konnte eine Reihenfolge bzw. Abstufung der als Indikatoren zu verwendenden Antikörper erstellt werden: Zu empfehlen wären demnach das Nestin, gefolgt vom Androgenrezeptor und PHLDA1 mit dem Kriterium B und dem Kriterium A. Hierbei stechen jedoch vor allem zur Erkennung eines Trichoblastoms der Androgenrezeptor und das PHLDA1 mit dem gewählten Kriterium B hervor, da diese in 13 von 14 Fällen das Vorhandensein eines Trichoblastoms durch eine negative Färbung erfolgreich bestätigen konnten. Allerdings waren auch 4 von 17 Basalzellkarzinomen negativ für den Androgenrezeptor und 5 von 17 PHLDA1 negativ im Kriterium B. In diesen Fällen konnte aber das Basalzellkarzinom durch ein Nestin negatives Ergebnis ausgeschlossen werden. 15 von insgesamt 16 Basalzellkarzinomen waren Nestin negativ, jedoch lediglich 1 von 14 Trichoblastomen.

Orientiert man sich an dem oben genannten Cluster (s. Tab. 21 und 22) konnte zu 100% die richtige Diagnosevorhersage rein immunhistochemisch gestellt werden, wenn mindestens 6 der 10 genannten differenzierenden Kriterien dem des jeweiligen Tumors entsprachen. Diese hier 100%ige Wahrscheinlichkeit scheint als Routinediagnostikmittel aufgrund der 10 benötigten Antikörper und den damit

verbundenen Kosten schwierig umsetzbar, zeigt aber die enormen Möglichkeiten einer Diagnosesicherheit mit Hilfe dieses Clusters auf.

Durch die Ergebnisse der Trefferquoten aus Tabelle 23 lässt sich ein diagnostischer „Kurzleitfaden“ zur differentialdiagnostischen Entscheidung zwischen dem Trichoblastom und dem Basalzellkarzinom erstellen (s. Tab. 24).

Tabelle 24: „Kurzleitfaden“ zur Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse des Androgenrezeptors (AR), PHLDA1 Kriterium B und Nestin Kriterium A:

Kurzleitfaden:				
Antikörper	Kriterium		Trichoblastom	Basalzellkarzinom
Nestin	A	fokal mesenchymale Hüllschicht	+	-
AR	A	Positivität	-	+
PHLDA1	B	Melanozyten	-	+
BerEP4	B	Zentrale Zellen des Tumorknotens	-	+

Die Diagnostik zusammen mit der Androgenrezeptor-Färbung überzeugte vor allem auch mikroskopisch. Die positiven Fälle waren sehr gut von den negativen abzugrenzen, genauso gut gelang dieses auch umgekehrt. Dies würde dem Pathologen eine leichte und schnelle mikroskopische Möglichkeit bieten, die klinische Verdachtsdiagnose abzugleichen.

Für diesen Kurzleitfaden (s. Tab. 24) wurde, analog der Methode in Tab. 20, der positive prädiktive Vorhersagewert (PPV) sowie ein negativer prädiktiver Vorhersagewert (NPV) der jeweiligen Trichoblastome und Basalzellkarzinome ermittelt. Zudem wurde eine Sensitivität und eine Spezifität angegeben (s. Tab. 25 unten).

Zusätzlich wurden in dieser Darstellung die Antikörperfärbungen nach den Werten des Cramers V (s. Tab. 18) und der Trefferquote (s. Tab. 23) kombiniert in einer nach rechts absteigenden Wertigkeit sortiert. Diese Wertigkeit wird mit Hilfe eines nach rechts zulaufenden Keils visualisiert (s. Tab. 25). Angefangen links mit den besten Werten des Cramers V (hier Nestin) und absteigend nach rechts: Nestin hat mit 0,8678 bei der Berechnung des Cramers V den besten Kontingenzkoeffezienten (mit dem größten Zusammenhang zwischen der Ausprägung eines Kriteriums und dem Trichoblastom oder Basalzellkarzinom) sowie eine hohe Trefferquote mit 93% für das Basalzellkarzinom. Der Androgenrezeptor folgt mit einem Cramers V von 0,7175 und einer Trefferquote für das Trichoblastom von 94%. PHLDA1 (Kriterium B) wurde an die dritte Stelle sortiert, denn obwohl der Wert des Cramers V mit 0,574 etwas geringer ist als der Wert bei BerEP4, so ist doch die Trefferquote mit 93% für ein Trichoblastom ähnlich hoch wie die Quoten des Nestins und Androgenrezeptors. Bei BerEP4 (Kriterium B) war die Trefferquote mit 76% für ein Basalzellkarzinom deutlich geringer. Daher wurde dieser Wert bei der Vorhersage als schwächstes gewertet und ganz rechts in der Tabelle 25 aufgeführt.

Die einzelnen Spalten bzw. Fälle wurden so sortiert, dass ganz oben der eindeutigste Trichoblastomfall und ganz unten der eindeutigste Basalzellkarzinomfall zu finden ist. Dabei wurden insbesondere die rot hinterlegten Werte (einem Basalzellkarzinom entsprechend) und die grün hinterlegten Werte (einem Trichoblastom entsprechend) berücksichtigt, da die gelb hinterlegten Werte nicht eindeutig einer der beiden Entitäten zugeordnet werden kann (s. Tab. 22).

Überzeugend hierbei sind vor allem die Werte des Nestins, welche bei allen Berechnungen bei größer 92% liegen.

Abschließend wurde die Aussagekraft des Kurzleitfadens bei Auswertung der vier Antikörperfärbungen bezüglich des Zutreffens der daraus abgeleiteten Diagnose bestimmt (s. Tab. 25, rechte Spalte: Enddiagnose/Vorhersage). Bei dieser Vorhersage wurde die festgelegte Reihenfolge der Kriterien, der gemeinsamen Wertigkeit aus Cramers V und der Trefferquote entsprechend, berücksichtigt. Daher wurde beispielsweise für den Fall B16 die Enddiagnose eines Basalzellkarzinoms getroffen, obwohl die Werte des Androgenrezeptors und des PHLDA1 (Kriterium B) für ein

Trichoblastom sprechen, weil die Nestinfärbung mit der höchsten Wertigkeit für ein Basalzellkarzinom spricht und somit als ausschlaggebend bewertet wurde.

Tabelle 25: Anwendung des „Kurzleitfadens“ an den Fällen des Trichoblastoms und Basalzellkarzinoms mit Treffen einer Enddiagnose/Vorhersage:

Wertigkeit der Kriterien ergebend aus:					**Kurzleit-faden:**
Cramers V:	0,8678	0,7175	0,5742	0,6151	
Trefferquote:	93% (B)	94% (T)	93% (T)	76% (B)	
Antikörper:	**Nestin**	**AR**	**PHLDA1**	**BerEP4**	
Kriterien:	**A**	**A**	**B**	**B**	**Enddiagnose / Vorhersage**
T6	2	0	0	0	T
T10	2	0	0	0	T
T12	2	0	0	0	T
T14	2	0	0	0	T
T2	2	0	0	1	T
T4	2	0	0	2	T
T11	2	0	0	2	T
T9	3	0	0	2	T
B15	3	0	0	2	**T**
T5	1	0	0	0	T
T1	1	0	0	1	T
T3	1	0	0	1	T
T8	1	0	0	2	T
T7	1	0	1	0	T
B5	1	2	0	2	B
B16	0	0	0	2	B
B17	0	0	1	1	B
B7	0	0	1	2	B
T13	0	1	0	0	**B**
B8	0	1	1	1	B
B14	0	1	1	2	B
B2	0	2	0	2	B
B10	0	2	0	2	B
B9	0	2	1	1	B
B11	0	2	1	1	B
B1	0	2	1	2	B
B3	0	2	1	2	B
B4	0	2	1	2	B
B6	0	2	1	2	B
B12	0	2	1	2	B
B13	0	2	1	2	B

Wertigkeit der Kriterien ergebend aus:					**Kurzleit-faden:**
Cramers V:	0,8678	0,7175	0,5742	0,6151	
Trefferquote:	93% (B)	94% (T)	93% (T)	76% (B)	
Antikörper:	**Nestin**	**AR**	**PHLDA1**	**BerEP4**	
Kriterien:	**A**	**A**	**B**	**B**	**Enddiagnose / Vorhersage**
PPV (T) TP/(TP+FP)	(12/ (12+1)) x 100 = 92%	(13/ (13+4)) x 100 = 76%	(13/ (13+5)) x 100 = 72%	(7/ (7+7)) x 100 = 50%	
NPV (T) TN/(TN+FN)	(15/ (15+1)) x 100 = 94%	(13/ (13+1)) x100 = 93%	(12/ (12+ 1)) x 100 = 92%	(13/ 13+4)) x 100 = 76%	
PPV (B) TP/(TP+FP)	(15/ (15+1)) x 100 = 94%	(13/ (13+1)) x100 = 93%	(12/ (12+1)) x 100 = 92%	(13/ (13+4)) x 100 = 76%	
NPV (B) TN/(TN+FN)	(12/ (12+1)) x 100 = 92%	(13/ (13+4)) x 100 = 76%	(13/ (13+5)) x 100 = 72%	(7/ (7+7)) x 100 = 50%	
Spezifität (T) TN/(TN+FP)	(15/ (15+1)) x 100 = 94%	(13/ (13+4)) x 100 = 76%	(12/ (12+5)) x 100 = 71%	(13/ (13+7)) x 100 = 65%	
Sensitivität (T) TP/(TP+FN)	(12/ (12+1)) x 100 = 92%	(13/ (13+1)) x100 = 93%	(13/ (13+1)) x 100 = 93%	(7/ (7+4)) x 100 = 64%	
Spezifität (B) TN/(TN+FP)	(12/ (12+1)) x 100 = 92%	(13/ (13+1)) x 100 = 93%	(13/ (13+1)) x 100 = 93%	(7/ (7+4)) x 100 = 64%	
Sensitivität (B) TP/(TP+FN)	(15/ (15+1)) x 100 = 94%	(13/ (13+4)) x 100 = 76%	12/ (12+5)) x 100 = 71%	(13/ (13+7)) x 100 = 65%	
Enddiagnose Vorhersage: **Richtige Enddiagnose/ Gesamtzahl**					29/31 X 100 = 94%

Infolgedessen sollte beachtet werden, dass die Kombination der Antikörper gegebenenfalls eher als eine Art Stufensystem zu verstehen ist, in welcher weitere Informationen zu der jeweiligen Charakteristik des Falles gesammelt werden, abnehmend in der Wertigkeit bzw. Aussagekraft des folgenden Antikörpers. Es könnte auch, aufgrund der abnehmenden Vorhersagekraft, bei jedem weiteren Antikörper zu einer weiteren Fehlerquelle kommen. Daher ist bei unklaren Fällen vor allem die Betrachtung des Nestins zu empfehlen.

Abschließend lassen sich aber sehr gute Ergebnisse nach dieser Vorgehensweise erkennen: es konnten als Enddiagnose 16 der 17 Basalzellkarzinome korrekt als solche klassifiziert werden sowie 13 der 14 Trichoblastome. Nur je 1 Fall der beiden Tumore wurde entgegen dem morphologischen Goldstandard vorhergesagt. Dies entspricht insgesamt einer Vorhersage von 94%.

5.3.1.5 Anwendung des Cramers V und dessen Kurzleitfaden an der Testgruppe „F“

Im Folgenden wurde das Cluster (Tab. 21) auch für die dritte Fallgruppe, welche die bereits vorgestellten mikroskopisch schwer zu diagnostizierenden bzw. morphologisch uneindeutigen Fälle (F-Fälle) umfasst, angewendet:

Tabelle 26: Clustering der F-Fälle:

Antikörper:	**Drebrin**				**Nestin**		**AR**	**LN5**		**Bcl-2**		**CD34**		**CK20**	**CK8**	**PHLDA1**			**BerEP4**		**CK15**	**Auswertung:**		**Vorhersage:**	**m. p. D.** [12]
Kriterien:	**A**	**B**	**C**	**D**	**A**	**B**	**A**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**A**	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**A**	Grün (T)	Rot (B)		
F1	0	0	2	1	2	0	0	1	1	0	0	2	2	1	0	2	0	0	1	1	2	6	0	T	T
F2	0	0	2	2	0	0	0	2	2	0	1	2	2	1	0	2	0	0	2	1	2	4	2	T	B
F3	0	0	2	1	3	3	0	2	2	2	2	3	3	1	0	2	0	3	2	2	2	7	1	T	T
F4	0	0	3	2	0	0	3	2	2	3	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	3	2	T	T
F5	0	0	2	2	0	0	1	2	2	1	1	0	2	0	0	0	1	0	2	1	0	0	7	B	B
F6	0	0	2	1	0	0	0	2	2	0	1	0	2	0	0	1	1	0	2	1	1	2	4	B	B
F7	0	0	2	1	0	0	3	0	0	2	2	0	0	2	0	2	1	0	0	0	1	5	3	T	B
F8	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	2	1	2	2	5	B	B
F9	0	1	2	0	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1	0	2	1	0	2	2	0	3	5	B	B
F10	0	0	2	1	0	1	0	2	0	2	2	1	2	2	0	2	1	0	0	1	1	6	2	T	B
F11	1	0	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	1	7	B	B
F12	0	0	2	0	2	0	0	2	2	2	2	0	0	1	0	1	0	0	2	2	0	5	4	T	T
F13	2	0	2	0	0	0	0	2	2	2	2	1	2	1	0	1	0	0	2	2	0	5	4	T	B
F14	2	0	2	1	1	1	0	2	2	1	1	0	1	1	0	2	0	1	0	1	2	5	3	T	B
F15	2	0	2	1	3	3	2	2	2	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	4	B	T
F16	2	1	2	0	2	0	0	2	2	1	2	0	0	2	0	2	0	1	2	2	2	6	4	T	B

[12] morphologisch präferierte Diagnose

Mit der Annahme der Richtigkeit der Werte des Clusters (Tabelle 21) konnte die Testgruppe F mit einer „Vorhersage“ einer der beiden Tumorentitäten zugeordnet werden. Zu beachten ist, dass die verwendeten „F-Fälle“ besonders schwer mikroskopisch zu diagnostizierende Fälle waren. Teilweise wiesen diese Fälle verschiedene Tumoranteile auf, welche auf ein biphasisches Verhalten hinweisen können.

In Anbetracht dessen stellt sich die Frage, ob es prinzipiell möglich ist, die beiden Entitäten, das Trichoblastom und das Basalzellkarzinom, voneinander präzise abzugrenzen und ob eine Zuordnung zu einer der beiden Entitäten durchgängig möglich ist. Eventuell handelt es sich um ein stufenloses, kontinuierliches Spektrum mit zwei polaren Enden. An dem einem Ende würde man dann das Trichoblastom, an dem anderen das solide oder mikronoduläre Basalzellkarzinom vorfinden. In diesem Fall sollte die Einteilung in zwei Tumorentitäten hinterfragt werden.

Zur genaueren Betrachtung dieser Fragestellung wurden die F-Fälle der Tabelle 26 in einer neuen Tabelle zu den anderen Fällen analog zur Tabelle 25 (Anwendung des Kurzleitfadens) hinzugefügt und sortiert (s. Tabelle 27). Tatsächlich lassen sich zwei polare Enden erkennen: Das polare Ende des Trichoblastoms (hier die Fälle: T6, T10, T12, T14) und das des Basalzellkarzinoms (hier die Fälle: B1, B3, B4, B6, B12, B13). Die F-Fälle verteilen sich zwischen diesen beiden Enden. Somit wird hier die Annahme eines Kontinuums gestützt.

Tabelle 27: Visualisierung des Kurzleitfadens. In den Spalten sortiert nach Antikörpern (links: Antikörper, die am besten ein Trichoblastom von einem Basalzellkarzinom unterscheiden). Die Fälle in den jeweiligen Spalten sind sortiert nach ihrer Auswertung (Oben: Fälle, bei welchen alle Werte eindeutig einem Trichoblastom entsprechen; Unten: Fälle, bei welchen alle Werte eindeutig einem Basalzellkarzinom entsprechen).

Wertigkeit der Kriterien ergebend aus:					**Kurzleitfaden:**
Cramers V:	0,8678	0,7175	0,5742	0,6151	
Trefferquote:	93% (B)	94% (T)	93% (T)	76% (B)	
Antikörper:	**Nestin**	**AR**	**PHLDA1**	**BerEP4**	
Kriterien:	**A**	**A**	**B**	**B**	**Enddiagnose/ Vorhersage**
T6	2	0	0	0	T
T10	2	0	0	0	T
T12	2	0	0	0	T
T14	2	0	0	0	T
T2	2	0	0	1	T
F1	2	0	0	1	T
T4	2	0	0	2	T
T11	2	0	0	2	T
F12	2	0	0	2	T
F16	2	0	0	2	T
T9	3	0	0	2	T
B15	3	0	0	2	**T**
F3	3	0	0	2	T
T5	1	0	0	0	T
T1	1	0	0	1	T
T3	1	0	0	1	T
F14	1	0	0	1	T
T8	1	0	0	2	T
T7	1	0	1	0	T
B5	1	2	0	2	B
F2	0	0	0	1	T
F4	0	3	0	0	B
B16	0	0	0	2	B
B17	0	0	1	1	B
B7	0	0	1	2	B
F8	0	1	0	1	B
T13	0	1	0	0	**B**
B8	0	1	1	1	B
B14	0	1	1	2	B
B2	0	2	0	2	B
B10	0	2	0	2	B
B9	0	2	1	1	B
B11	0	2	1	1	B
B1	0	2	1	2	B
B3	0	2	1	2	B
B4	0	2	1	2	B
B6	0	2	1	2	B
B12	0	2	1	2	B
B13	0	2	1	2	B

5.3.2 Hierarchische Clusteranalyse

5.3.2.1 Berechnung des hierarchischen Clusters

Um die Fragestellung der Entitäten bzw. eines kontinuierlichen Spektrums genauer zu betrachten, wurden weitere statistische Analysen des Datensatzes, unabhängig von der mikroskopisch gestellten Diagnosestellung erarbeitet:

Die folgende statistische Betrachtung mit der hierarchischen Clustermethode berücksichtigt somit nicht primär die Diagnose, sondern nur die Ergebnisse der immunhistologischen Auswertung. Die **hierarchische Clustermethode** wurde in dem statistischen Programm „R“ erstellt. Als Maß für den Abstand zwischen den verschiedenen Beobachtungen wurde die Gower´sche Distanz verwendet, da diese Distanz für kategorische Daten, im Vergleich zu beispielsweise der euklidischen Distanz, besser geeignet ist.

Hierbei entstanden Dendrogramme. Diese geben Aufschluss über die Distanz, bei welcher die Beobachtungen zusammengefasst oder getrennt werden. So wird diese Distanz, beispielsweise in dem entstandenen Dendrogramm der hier untersuchten Fälle, in verschieden großen Abständen („Height“ an der y-Achse) skaliert und visualisiert (s. Abb. 35).

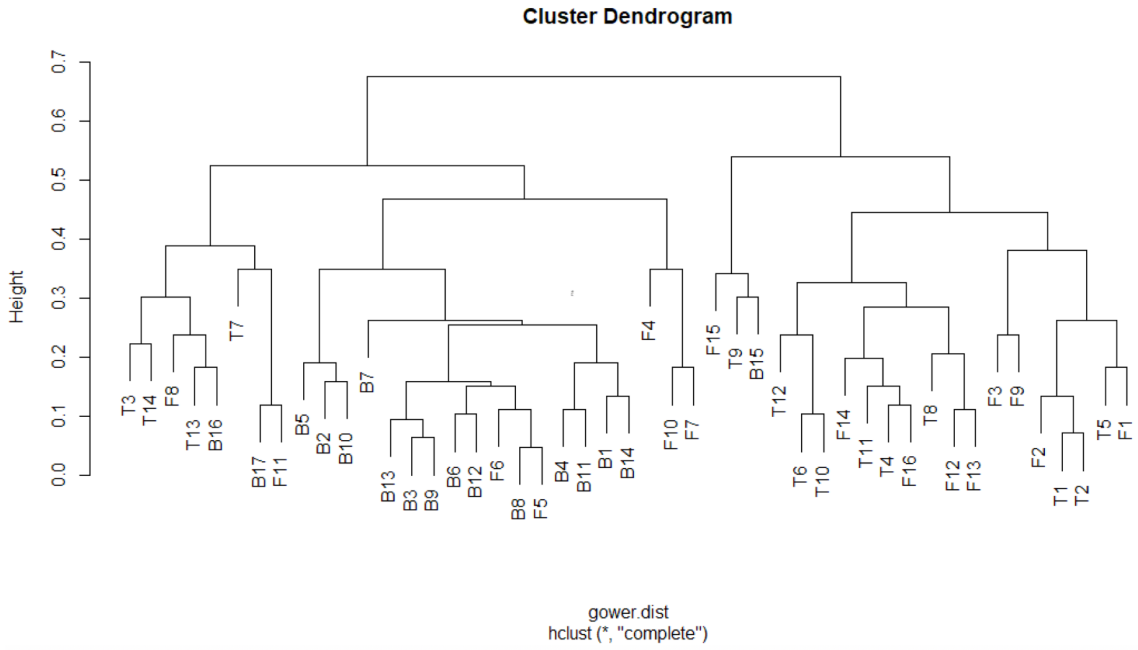


Abbildung 35: Dendrogramm der untersuchten Fälle des hierarchischen Clusters.

Die in dieser Arbeit entstandenen Abstände im Dendrogramm sind jedoch eher als gering anzusehen (s. Abb. 35). Ein geringer Abstand spricht für eine größere Ähnlichkeit der Werte bzw. einen geringeren Unterschied.

Insgesamt konnte durch die hierarchische Clusteranalyse eine sogenannte „Heatmap“ (engl.: heat = Hitze, Wärme; map = Karte) erstellt werden (s. Abb. 35). Das berechnete Dendrogramm der untersuchten Fälle (Abb. 35) kann in der Heatmap an der y-Achse wiedergefunden werden. Eine solches Diagramm als Heatmap hilft in einem Datensatz Ähnlichkeiten bzw. Gruppen als ein sogenanntes Cluster, analog zu einer Wärmebildkamera, schnell zu erkennen. In der hier entstanden Visualisierung fällt jedoch auf, dass eine klare Abgrenzung der Fälle (hier an der y-Achse der Heatmap) auf Anhieb nicht zu erkennen ist.

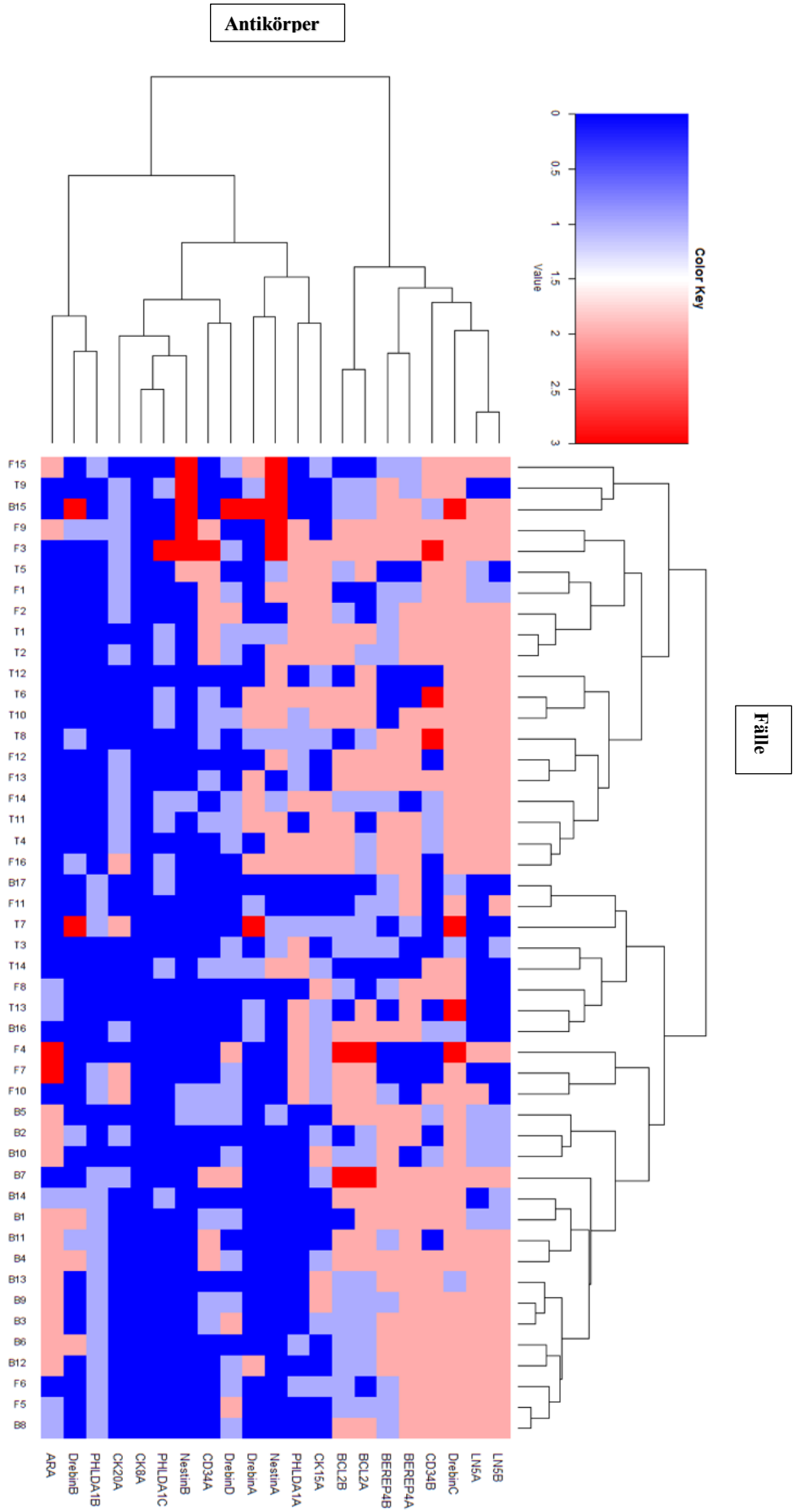


Abbildung 36: Heatmap mit der Gower´schen-Distanz. An der y-Achse befinden sich die Fälle. An der x-Achse die Antikörper mit dem jeweiligen Kriterium (A-D).

5.3.2.2 Silhouetten-Analyse des hierarchischen Clusters und Aufstellung eines Kurzleitfadens

Davon ausgehend, dass wir zwei Tumorentitäten unterscheiden wollen, wurde zusätzlich eine Silhouetten-Analyse mit dem hierarchischen Clustering durchgeführt. Dies gibt einen Anhaltspunkt wie gut die Zuordnung zu einem Clustern bzw. einer Gruppe, also hier den beiden Tumorentitäten, ist.

Für jede Beobachtung *i* wird die Silhouetten-Breite *s(i)* wie folgt definiert:

Hierbei sei *a(i)* die durchschnittliche Unähnlichkeit zwischen *i* und allen anderen Punkten des Clusters, zu dem *i* gehört. Wenn *i* die einzige Beobachtung in einem Cluster ist, dann ist *s(i):= 0*. Für alle anderen Cluster C sei *d(i, C)* die durchschnittliche Unähnlichkeit von *i* zu allen Beobachtungen von C. Das kleinste *d* gleich *mind(i, C)* ist die Unähnlichkeit zwischen *i* und seinem "Nachbar"-Cluster, d.h. dem nächstgelegenen, zu dem er nicht gehört. Daraus ergibt sich,

$$s(i) := \frac{b(i) - a(i)}{max(a(i), b(i))}.$$

Beobachtungen mit einem großen *s(i)* (fast 1) werden sehr gut geclustert, ein kleines *s(i)* (um 0) bedeutet, dass die Beobachtung zwischen zwei Clustern liegt, und Beobachtungen mit einem negativen *s(i)* werden wahrscheinlich in das falsche Cluster gesetzt.

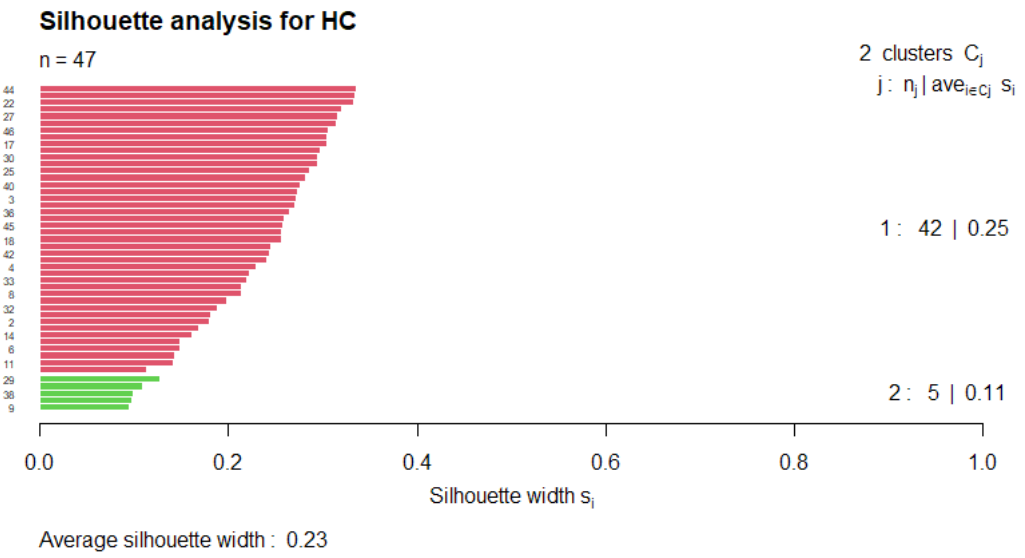


Abbildung 37: Silhouetten-Analyse mit zwei Clustern.

Der Silhouetten-Plot (Abb. 37) bestätigt, dass es sich hier um lediglich 2 Cluster, also zwei Tumorentitäten, handelt. Es sind keine negativen Werte vorhanden. Demnach konnten alle Werte dem einen oder dem anderen Cluster gut zugeordnet werden.

Die durchschnittliche Silhouetten-Breite *s(i)* ist mit 0,23 jedoch eher als klein zu bewerten, da sie näher an 0 liegt. Ein größerer durchschnittlicher Wert nahe 1 wäre wünschenswert, damit eine genaue Zuordnung der Fälle zu der jeweiligen Tumorentität möglich ist.

5.3.2.3 Interpretation der hierarchischen Clusteranalyse

Betrachtet man das Dendrogramm (Abb. 35), insbesondere die erste Ebene, genauer, lassen sich für alle 47 Fälle zwei Cluster erkennen (s. Abb. 38): Eines (hier: links, roter Kasten) mit hauptsächlich Basalzellkarzinomen (B-Fälle), aber 4 Trichoblastomen (hier: grüne Pfeile), und ein zweites Cluster (hier: rechts, grüner Kasten) mit hauptsächlich Trichoblastomfällen und einem Basalzellkarzinomfall (hier: roter Pfeil). So scheint es, dass ein Basalzellkarzinom mit einer besseren Sicherheit klassifiziert werden kann, als ein Trichoblastom. Die korrekte Klassifizierung von 16 der 17 Basalzellkarzinome scheint hier überzeugend. Die F-Fälle sind über beide Cluster annähernd gleich verteilt zu erkennen. Sie bilden aber, anhand der vorherigen Silhouetten-Analysen berechnet, keine eigene Gruppe, sondern lassen sich in die beiden Cluster einsortieren.

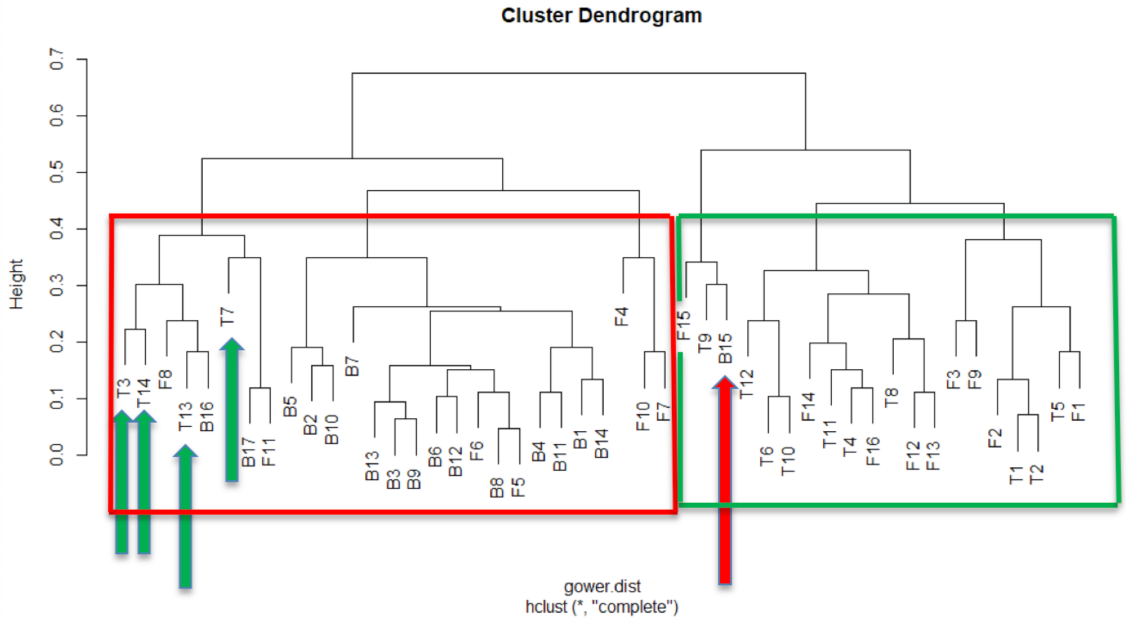


Abbildung 38: Cluster Dendrogramm mit der Gower´schen Distanz der Heatmap (s. Abb.: 34) und der Erkennung zweier Cluster bei der Analyse aller 47 Fälle.

In der vorher erstellten Heatmap (Abb. 38) lässt sich auf Anhieb keine klare Einteilung in zwei Tumorentitäten erkennen. Daher wurde in einem weiteren Schritt eine Abbildung erstellt, beschränkt auf die Kriterien, welche bei der hierarchischen Clustermethode differenzierend waren (s. Abb. 39): BerEP4 (Kriterium B), Androgenrezeptor, PHLDA1 (Kriterium B), PHLDA1 (Kriterium A), Nestin (Kiterium A).

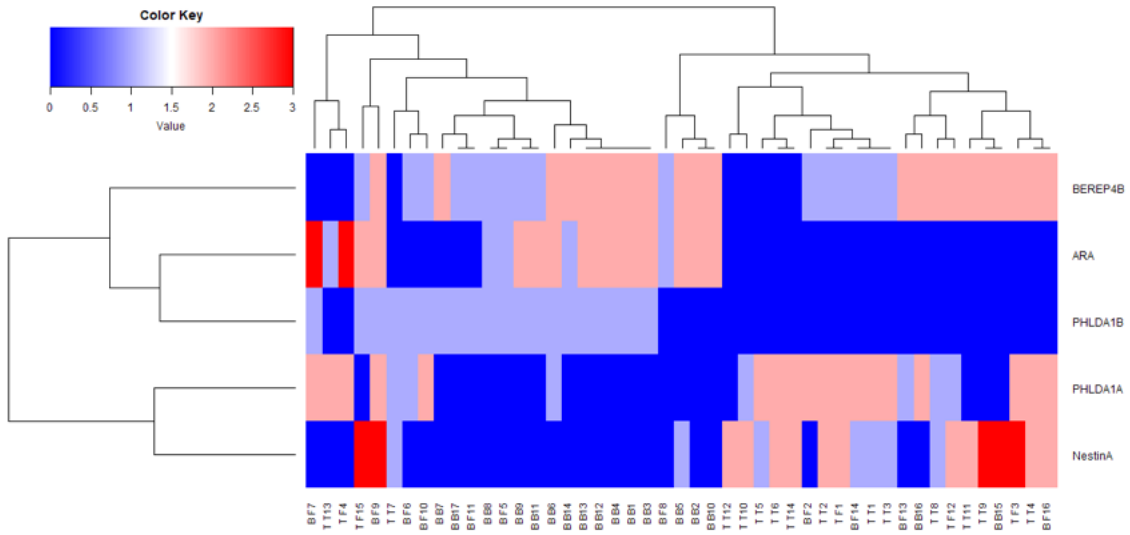


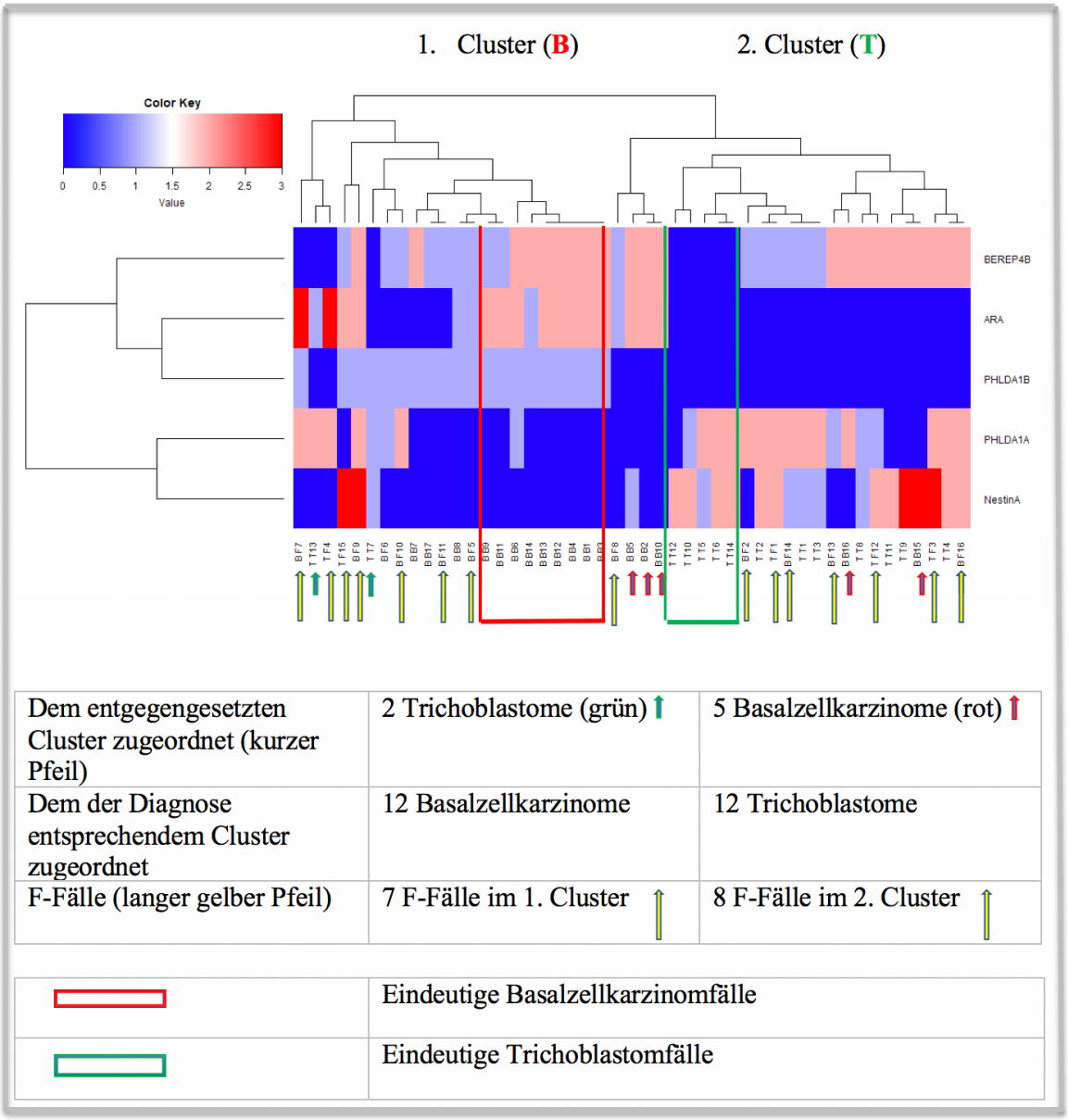
Abbildung 39: Heatmap mit differenzierenden Antikörpern

Betrachtet man diese neue Heatmap genauer, so können, wie bereits bei der Silhouetten-Analyse berechnet, zwei Cluster erkannt werden (s. Abb. 40). Das erste Cluster (links) mit hauptsächlich Basalzellkarzinomen und das zweite Cluster (rechts) mit hauptsächlich Trichoblastomen.

Doch trotz Selektierung der differenzierenden Antikörper ist insgesamt eine sichere Zuordnung der Fälle nicht möglich. So befinden sich in dem 1. Cluster auch 2 Trichoblastomfälle und dem 2. Cluster wurden 5 von 17 Basalzellkarzinome zugeordnet. Die F-Fälle sind in beiden Clustern, mit einer Fallzahl von 7 Fällen im ersten Cluster und 8 Fällen im zweiten Cluster, annähernd gleich verteilt.

Bei der Verteilung der Fälle, kann in dem jeweiligen Cluster zusätzlich eine Gruppe an Fällen erkannt werden, welche ähnliche Werte aufweisen. Diese beiden Gruppen wurden zur besseren Darstellung mit einem Kasten umrahmt. Es handelt sich dabei jeweils um eine Gruppe von Basalzellkarzinomen (roter Kasten) und Trichoblastomen

(grüner Kasten). Beim genaueren Betrachten fällt auf, dass diese Fälle den eindeutigen Fällen aus Tabelle 25 entsprechen bzw. den vermuteten polaren Enden.

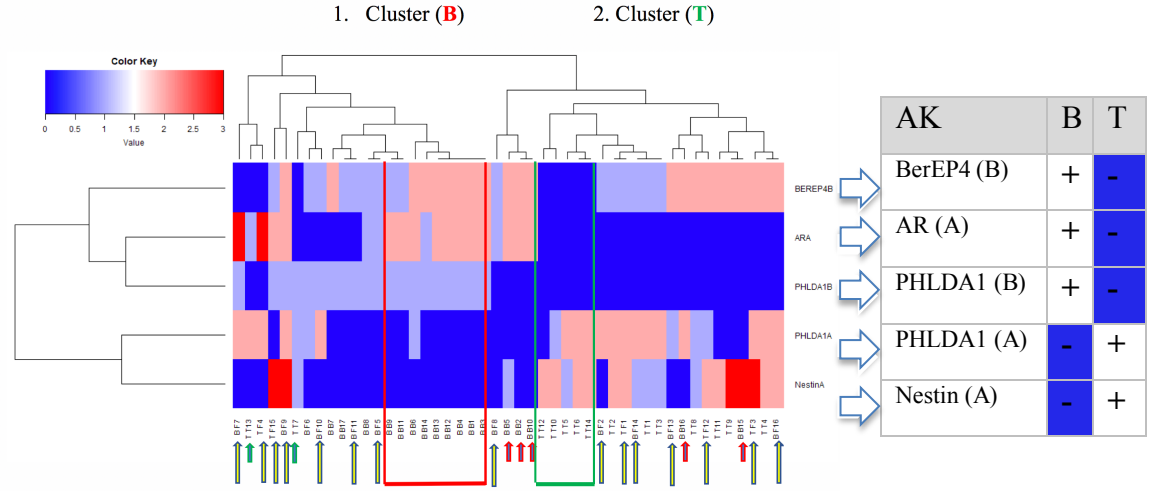


Dem entgegengesetzten Cluster zugeordnet (kurzer Pfeil)	2 Trichoblastome (grün) ↑	5 Basalzellkarzinome (rot) ↑
Dem der Diagnose entsprechendem Cluster zugeordnet	12 Basalzellkarzinome	12 Trichoblastome
F-Fälle (langer gelber Pfeil)	7 F-Fälle im 1. Cluster ↑	8 F-Fälle im 2. Cluster ↑

▭	Eindeutige Basalzellkarzinomfälle
▭	Eindeutige Trichoblastomfälle

Abbildung 40: Interpretation der Heatmap mit differenzierenden Antikörpern (Abb. 39).

Wendet man den Kurzleitfaden an der Heatmap an (s. Abb. 41), ist zu erkennen, dass sich diese „eindeutigen“ Fälle (hier im roten und grünen Kasten) klar durch den vorgeschlagenen Leitfaden zu einem Trichoblastom oder Basalzellkarzinom zuordnen lassen können.



AK	B	T
BerEP4 (B)	+	-
AR (A)	+	-
PHLDA1 (B)	+	-
PHLDA1 (A)	-	+
Nestin (A)	-	+

Abbildung 41: Visualisierung des Kurzleitfadens anhand der Heatmap mit differenzierenden Antikörpern.

Die restlichen Fälle sind, je weiter sie von diesen eindeutigen Fällen entfernt liegen, immer schwerer zuzuordnen. Es ist somit eher davon auszugehen, dass keine klare Trennlinie getroffen werden kann. Es scheint, dass die „eindeutigen Fälle“ ein polares Ende bilden und die Fragestellung eines Kontinuums bestätigen.

5.3.3 Abschließende Analyse und Interpretation der Statistik

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass in den meisten Fällen keine sichere Differenzierung zwischen einem Basalzellkarzinom und einem Trichoblastom vorgenommen werden kann. Vielmehr lässt sich durch die verschiedenen Visualisierungen ein Kontinuum mit polaren Enden erkennen.

An den Enden lassen sich die morphologisch eindeutigen Fälle des Trichoblastoms und des Basalzellkarzinoms verorten, welche ein eindeutiges immunhistochemisches Färbemuster aufweisen und sich so gut durch den erstellten Leitfaden zu einem der beiden Entitäten zuordnen lassen. Doch zwischen diesen beiden polaren Enden befindet sich eine große Anzahl an Fällen, die sich zur Mitte hin mit zunehmender Ungenauigkeit den beiden Entitäten zuordnen lassen. Somit erscheint es eher wie ein verschwimmendes Farbspektrum – ein Kontinuum (s. Abb. 42).

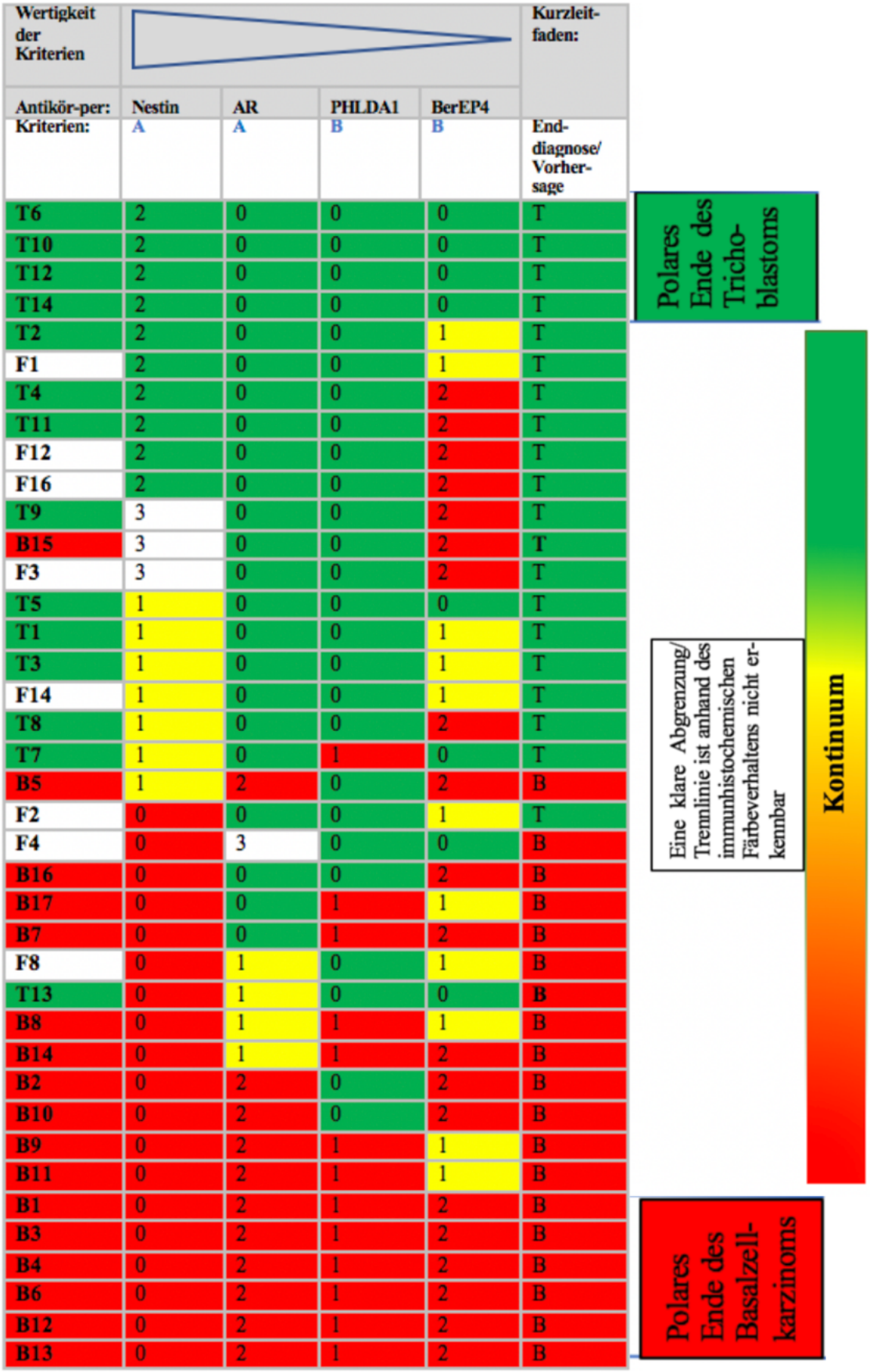


Abbildung 42: An der ursprünglichen Tabelle 27 können zwei polare Enden sowie ein Kontinuum erkannt werden. Die Farbe Rot entspricht einem Basalzellkarzinom, Grün einem Trichoblastom. Die Farbe Weiß entspricht dem Wert 3 (unter dem Mikroskop nicht auswertbar), Gelb dem Wert 1 (Wert liegt zwischen 0 und 2 (s. Tabelle 14)).

5.4 Diskussion

Das Trichoblastom und das Basalzellkarzinom weisen eine ähnliche histologische Morphologie auf. Deshalb gibt es bereits einige Literatur, in welcher versucht wurde, durch immunhistochemische Methoden dem Pathologen eine Differenzierung, einfach und unabhängig vom morphologischen Aufbau des Tumors, zu ermöglichen.

Die Ergebnisse der vorhandenen Literatur wurden aufgearbeitet und qualitativ, wie quantitativ verglichen (s. Tab. 5). Durch Kumulation der vorhandenen Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten (s. Tab. 15) konnte eine vergleichsweise große Gesamtzahl an Fällen im Sinne einer Metaanalyse betrachtet werden. Die meisten Autoren setzen positive Fälle mit der Gesamtzahl der Fälle in Beziehung, anders in dieser Arbeit, bei der auch auf semiquantitative Unterschiede eingegangen wurde. Nur wenige Autoren definieren Auswertungskriterien. Die Studien unterscheiden sich in ihren Aussagen stark und ihre Ergebnisse variieren. Tabelle 15 listet diese als Durchschnittswerte. Die Streuung der Ergebnisse und divergierende Schlussfolgerungen der verschiedenen Untersuchungen legen eine kritische Auseinandersetzung und Überprüfung der Untersuchungen nahe.

In dieser Arbeit wurden auf Grundlage der Literaturrecherche 11 Antikörperfärbungen (s. Tab. 7) ausgewählt, etabliert und auf ihre unterschiedliche immunhistochemische Anwendbarkeit im Trichoblastom und Basalzellkarzinom untersucht: Antikörper gegen Nestin, Drebrin, Androgenrezeptor, LN5, Bcl2, CD34, CK20, CK8, PHLDA1, CK15, und EpCAM (BerEP4). Die entsprechenden Methoden wurden etabliert (s. Absatz 4.2), die Färbungen anhand neu erarbeiteter Kriterien (s. Tab. 14) analysiert.

Im Folgenden werden Ergebnisse dieser Arbeit anhand der Antikörperauswahl kurz rekapituliert und diskutiert:

5.3.1. Drebrin

Im Gegensatz zu einer Arbeit von Mizutani et al. (2014) in der 21 von 25 Basalzellkarzinomen ein starke, homogene Drebrin-Expression vor allem an Zell-Zell-Übergängen aufwiesen und eine schwache und inhomogene Expression im Trichoblastom lediglich in 2 von 6 Fällen zu erkennen war (55), wiesen die eigenen Fälle für Zell-Zell-Übergänge keine derartig differenzierenden Ergebnisse auf. Die Färbung im Tumorzytoplasma beim Trichoblastom war ähnlich wie beim

Basalzellkarzinom. Allerdings konnte eine Expression der mesenchymalen Hüllschicht in 8 von 13 Trichoblastomen erkannt werden, welche beim Basalzellkarzinom in nur 2 von 16 Fällen zu erkennen war. Dies stellt einen signifikanten Unterschied dar (s. Tab. 18) und könnte eine Hilfe zur Differenzierung der beiden Tumore sein (vgl. Abb. 4, 5, 6).

5.3.2 Nestin

Der kumulativ positive Vorhersagewert der Literatur ergab für einen trichogenen Tumor 67% (s. Tab. 15). Dieser Wert ist in der vorliegenden Arbeit mit einem PPV (T) von 92% höher (s. Tab. 25). Bei Betrachtung der Literatur wiesen insbesondere die Versuche von Misago et al. 2010 sehr gute Ergebnisse auf. So konnte bei allen Trichoblastomen eine Färbung des Stromas erkannt werden, im Gegensatz dazu war dies bei keinem der Basalzellkarzinome möglich (56). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit annähernd bestätigt werden. So waren 12 von 13 Trichoblastome im Bereich der Haarpapillen und dem Tumorstroma positiv, wohingegen nur eines von 16 Basalzellkarzinomen eine Positivität in diesen Bereichen aufwies. Dieser Befund ergab im „Cramers V“ einen sehr guten Wert von 0,8678 mit einer hohen Signifikanz (p-Wert = 0.00000308). Eine Nestin-Expression im Bereich einer primitiven Haarpapille im Tumor ist somit ein Hinweis auf einen trichogenen Tumor.

5.3.3 Androgenrezeptor

Die Färbung mit Antikörpern gegen den Androgenrezeptor zeigte in einer Arbeit von 2005 (Ikizon, et. al.) sehr gute Ergebnisse. Hier wies keines der untersuchten Trichoblastome und Trichoepitheliome eine Expression des Androgenrezeptors auf, wohingegen 25 der 32 untersuchten Basalzellkarzinome eine Expression zeigten. Ikizon et al. (58) schlossen daraus, dass der Androgenrezptor ein gutes differentialdiagnostisches Hilfsmittel zur Unterscheidung eines Basalzellkarzinoms von einem Trichoblastom ist. Dies bestätigen auch weitere Arbeiten (59-61). Insgesamt waren 66% der bisher untersuchten Basalzellkarzinome in anderen Arbeiten positiv für den Androgenrezeptor, sowie nur 10% positiv bzw. 90% der trichogenen Tumore negativ (s. Tab. 15). Daraus ergab sich ein kumulativ positiver Vorhersagewert von 97% für ein Basalzellkarzinom. In der hier vorliegenden Arbeit war lediglich eines der untersuchten Trichoblastome schwach positiv für den Androgenrezeptor. Das Basalzellkarzinom exprimierte dagegen in 11 Fällen den Androgenrezeptor stark, in 2 Fällen schwach und in 4 Fällen gar nicht. Der gute positive Vorhersagewert für ein

Basalzellkarzinom konnte hier mit 93% bestätigt werden (s. Tab. 25). Eine starke Expression des Androgenrezeptors könnte somit ein Diagnostikum für ein Basalzellkarzinom sein und damit das Trichoblastom im Falle einer Differenzialdiagnose ausschließen.

5.3.4 LN5

LN5 wurde in einer Arbeit von Hamasaki et al. 2011 auf seine differentialdiagnostischen Fähigkeiten beim Trichoblastom und Basalzellkarzinom untersucht. Hierbei waren 50 der 52 Basalzellkarzinome positiv und 7 der 27 Trichoblastome. Allerdings soll die Expression im Trichoblastom lediglich peripher im Tumorknoten zu sehen gewesen sein, wohingegen beim Basalzellkarzinom der ganze Tumor eine diffuse Positivität aufwies. Sie schlussfolgerten, dass LN5 ein nützlicher Marker zur Differentialdiagnostik sein könnte (63). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Ein Unterschied der beiden Entitäten in der Expression von LN5 konnte auch bei differenzierter Analyse, mit Abgrenzung peripherer oder diffuser Expression im gesamten Tumorknoten, nicht herausgearbeitet werden.

5.3.5 Bcl2

Eine Arbeit von 1999 (Poniecka et al.) untersuchte das Basalzellkarzinom im Vergleich zum Trichoepitheliom und konnte einen Unterschied im Färbeverhalten der beiden Tumore erkennen (65). So waren 9 von 10 Basalzellkarzinomen diffus positiv, wohingegen 10 von 10 Trichoepitheliomen lediglich in der äußeren epithelialen Schicht positiv waren. Dieser Unterschied konnte in Übereinstimmung mit zwei weiteren Studien an den eigenen Fällen nicht nachvollzogen werden (72, 112). Bcl2 weist im Trichoblastom und im Basalzellkarzinom ein ähnliches Färbeverhalten auf.

5.3.6 CD34

Kirchmann et al. kam 1994 mit dem Antikörper gegen CD34 zu sehr guten Ergebnissen. Keines der 19 Basalzellkarzinome zeigte eine peritumorale Färbung im Stroma. Im Gegensatz dazu war dies in allen 16 Trichoepitheliomen der Fall. Auch dies konnte in der eigenen Arbeit nicht nachvollzogen werden. Sowohl peritumoral, als auch intratumoral, ließ sich auch bei differenzierter Analyse kein signifikanter Unterschied finden. 6 von 14 Trichoblastomen wiesen eine Expression von weniger als 1/3 des intratumoralen Bindegewebes auf. Beim Basalzellkarzinom zeigten dies 10 von 17 Fällen. Peritumoral wiesen 4 von 12 Trichoblastomen dieses Kriterium auf, sowie 3 von

17 Basalzellkarzinomen. Somit ähnelte sich das Expressionsmuster der beiden Tumore zu sehr, so dass eine Differenzierung nicht möglich erscheint. Die Ergebnisse anderer Autoren der bisherigen Literatur variieren stark (47, 66, 70, 72, 73, 75, 76). Zusammenfassend liegen, in Übereinstimmung mit der Literatur, zu divergierende Ergebnisse vor, als dass CD34 als geeignetes Differentialdiagnostikum betrachtet werden kann.

5.3.7 CK20

Die differentialdiagnostische Hypothese besagt, dass Merkelzellen das Trichoblastom, aber nicht oder kaum das Basalzellkarzinom kolonisieren. Alle Autoren der bisherigen Literatur empfehlen trotz unterschiedlich guter Ergebnisse den Antikörper (CK20**)** zur Differenzialdiagnostik (47, 57, 59, 66, 72, 78, 80, 81). In der hier vorliegenden Arbeit kann diese Empfehlung nicht bestätigt werden. So waren 4 von 17 Basalzellkarzinomen und 6 von 14 Trichoblastomen positiv. Die Unterschiede sind nicht signifikant, sodass sich CK20 nicht zur Differentialdiagnostik eignet.

5.3.8 CK8

Eine CK8-Färbung ergab in der Arbeit von Kurzen et al. (2001) sehr gute differentialdiagnostische Hinweise (82). Alle Basalzellkarzinome waren negativ, wohingegen alle Trichoblastome positiv ausfielen. Diese Ergebnisse konnten in der hier vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden. Alle Fälle, sowohl Basalzellkarzinome als auch Trichoblastome, waren negativ. Zum Ausschluss eines methodischen Fehlers wurde CK8 an normaler Kopfhaut mit unauffälliger Positivkontrolle regulär gefärbt. Zudem wurde ein Teil der Fälle wiederholt mit CK8 mit identem negativ Resultat gefärbt. Daher bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit eher die Beobachtung von Schirren (1995), der weder beim Basalzellkarzinom noch beim Trichoblastom, eine Expression feststellen konnte. Schlussfolgernd kann ein CK8 spezifischer Antikörper als Hilfestellung bei der Differentialdiagnostik nicht empfohlen werden.

5.3.9 PHLDA1

In zahlreichen Arbeiten überzeugte der Antikörper gegen PHLDA1 mit sehr gut differenzierenden Ergebnissen. Er soll im Basalzellkarzinom negativ und dafür im Trichoblastom positiv ausfallen (81, 83-86). Lediglich ein Autor berichtet über weniger signifikante Ergebnisse, kann sich aber dennoch der Meinung, dass PHLDA1 ein gutes Hilfsmittel zu Differentialdiagnostik ist, anschließen (57). In den eigenen Färbungen

ergab PHLDA1 sehr gute und signifikante Ergebnisse. In den epithelialen Anteilen der Trichoblastome ließ sich eine starke Färbung in 9 von 14 Fällen (mit mehr als 2/3 Positivität der Tumoranteile) erkennen, sowie in 3 von 14 Fällen (mit weniger als 2/3 Positivität der Tumoranteile). Beim Basalzellkarzinom waren bei 15 von 17 Fällen weniger als 1/3 der Tumoranteile positiv.

Anhand der eigenen Färbungen wurde ein neues differenzierendes Kriterium gefunden. Mikroskopisch ließen sich wie „gepfeffert“ (s. Abb. 26) eingestreute Zellen erkennen, welche wir durch eine Melanan-A- und Sox-10 Testung als Melanozyten identifizierten. Bei dem Basalzellkarzinomen waren die Melanozyten sehr gut erkennbar und wurden in 12 der 17 Basalzellkarzinome in einem Flächenanteil von bis zu 2/3 gefunden (vgl. Abb. 28). Im Gegensatz dazu war dies im Trichoblastom lediglich in einem der 14 Fälle in diesem Ausmaß zu erkennen. Bei den übrigen Trichoblastomen war der Flächenanteil deutlich unter 1/3 der Tumoranteile oder gar nicht zu erkennen.

Das Vorhandensein einer primitiven mesenchymalen Papille ist beim Trichoblastom öfter zu erkennen als beim Basalzellkarzinom (s. Abb. 27 und 29) und gilt als ein differentialdiagnostisches Kriterium für ein Trichoblastom. Dies ließ sich in der Färbung mit dem Antikörper gegen PHLDA1 gut nachvollziehen und wurde als Kriterium C definiert. Dies war in 7 von 14 Trichoblastomen in mehr als 2/3 des Tumoranteils aufzufinden. Im Gegensatz dazu traf dieses Kriterium lediglich bei 2 von 17 Basalzellkarzinomen zu, wovon eines mehr als 2/3 Positivität der mesenchymalen Papille im Verhältnis zum Tumoranteil aufwies und das andere weniger als 2/3. Unseren Ergebnissen zufolge liegt ein Trichoblastom vor, wenn mit PHLDA1 keine bzw. nur sehr wenige und vereinzelte Melanozyten, mesenchymale Papillen in mehr als 1/3 der Tumorfläche und gleichzeitig epitheliale Anteile des Tumors zu mehr als 1/3 erkennbar sind.

5.3.10 BerEP4

Das Färbemuster von BerEP4 sei bisher sowohl im Basalzellkarzinom, als auch im Trichoblastom stark positiv und nicht differenzierend. Die trichogenen Tumore zeigten sich in der hier besprochenen Literatur insgesamt zu 76% positiv, das Basalzellkarzinom zu 96% (67, 70, 75, 76, 78, 81, 84, 86, 88-95). Somit ergab sich ein kumulativer positiver Vorhersagewert für ein Basalzellkarzinom von 75% (s. Tab. 15). Der hier berechnete positive Vorhersagewert entspricht mit 76% dem kumulativen Wert der Literatur (s. Tab. 25).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht die beiden Tumore mittels einer differenzierten Analyse der peripheren und zentralen Tumorknotenanteile zu unterscheiden. So zeigten sich 7 von 14 periphere Anteile (vgl. Abb. 32, 33) und 4 von 14 zentrale Anteile des Tumorknotens im Trichoblastom positiv. Im Basalzellkarzinom waren 16 von 17 Tumore peripher (Kriterium A) und 13 von 17 zentral (Kriterium B) positiv (vgl. Abb. 30, 31). Das Kriterium B ergab in der Betrachtung der Statistik des Cramers V, welches eine genauere Betrachtung und Überprüfung der Werte durch die Berücksichtigung der verschiedenen Abstufungen vornimmt, ein signifikantes Ergebnis auch des p-Wertes (s. Tab. 17) und könnte somit ein guter Anhaltspunkt zur Differenzierung sein. Sind zentrale Tumoranteile in mehr als 2/3 BerEP4-positiv, so würde dieses Ergebnis für ein Basalzellkarzinom sprechen (vgl. Abb. 30, 31). Ist es zudem im peripheren Bereich stark positiv, würde dies die Diagnose des Basalzellkarzinoms weiterhin unterstützen.

5.3.11 CK15

Bei dem Cytokeratin 15 besteht die Hypothese, dass das Basalzellkarzinom eine schwache bis negative Expression und das Trichoepitheliom (71, 78, 96), sowie das Trichoblastom, eine positive Expression aufweisen (79, 82). Insgesamt war das Basalzellkarzinom zu 78% negativ und die trichogenen Tumore zu 73% positiv. In der Auswertung der hier vorliegenden Arbeit waren bei 9 von 17 Basalzellkarzinomen weniger als 10% des Tumoranteiles positiv oder negativ. Dafür waren die Tumoranteile des Trichoblastoms nur in 2 von 14 Fällen zu weniger als 10% positiv. 5 Trichoblastome wiesen eine Positivität der Tumoranteile mit einem Anteil von mehr als 10%, aber weniger als 50% auf und 7 Fälle mit mehr als 50%. Das CK15 könnte bezüglich seiner Expression daher einen Anhaltspunkt auf ein Trichoblastom geben und bei der differentialdiagnostischen Entscheidung helfen. Es erreichte jedoch im Vergleich zu den anderen untersuchten Antikörpern nicht so signifikante Werte.

Abschließend betrachtet lässt sich folgendes feststellen:

Der Antikörper LN5 konnte in dieser Arbeit nicht ausreichend gut differenzieren, ebenso wie die Antikörper Bcl2, CD34, CK20 und CK8. Aber es konnten die guten Ergebnisse von Nestin, AR, PHLDA1, Drebrin, sowie auch BerEP4 in dieser Arbeit bestätigt werden. Bei Nestin und dem Androgenrezeptor ergaben sich die besten Werte (s. Tab. 18, 21, 22, 23).

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen ein Leitfaden abgeleitet werden, welcher zur Differenzierung zwischen einem Trichoblastom und einem Basalzellkarzinom herangezogen werden kann (s. Tab. 28). Dieser Leitfaden deckt sich mit den Ergebnissen des oben besprochenen k-Mode-Clusters und dem des hierarchischen Clusters, bei welchen beispielsweise mit Hilfe des Kurzleitfadens 12 der 13 Trichoblastome und 16 der 17 Basalzellkarzinome mit der zutreffenden Enddiagnose vorhergesagt werden konnten (s. Abb. 25).

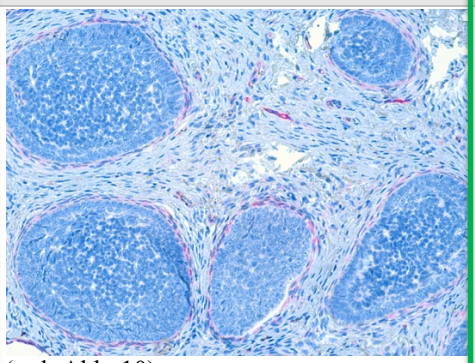
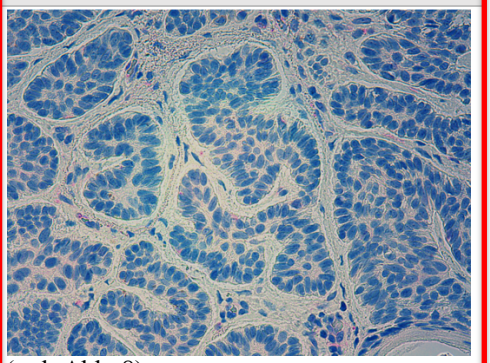
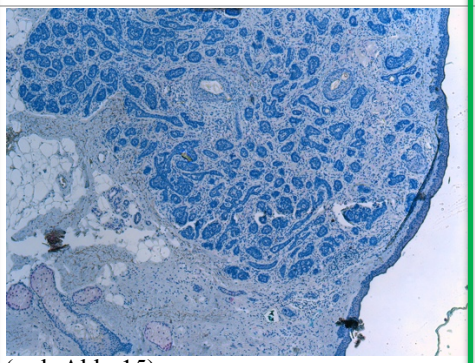
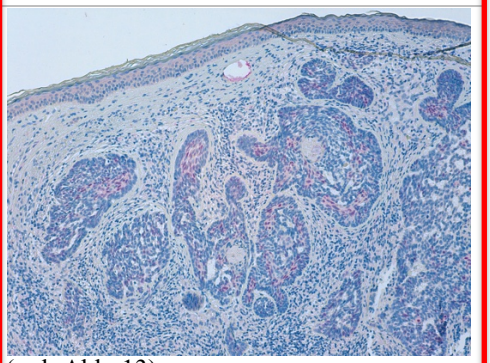
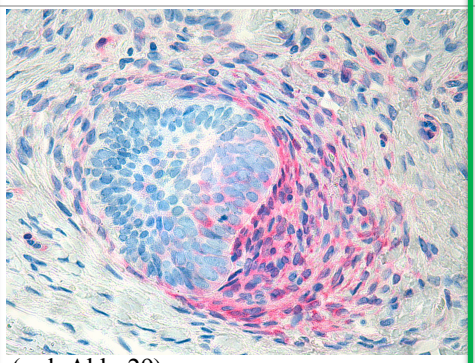
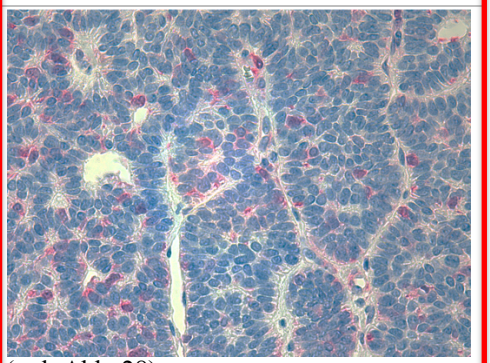
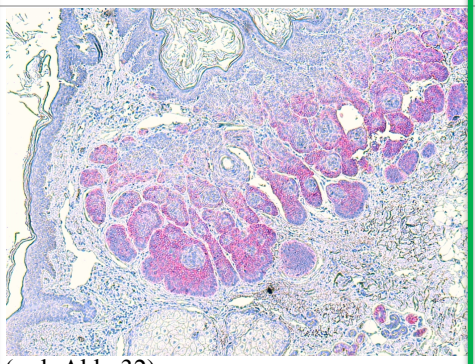
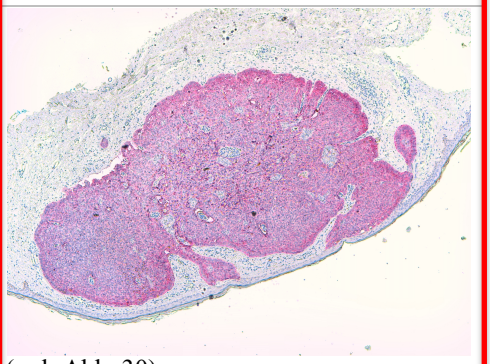
Zusätzlich zum oben erstellten Kurzleitfaden (Tab. 24) wurde hier das Drebrin hinzugefügt. Aufgrund der verschiedenen Cluster-Methodiken, welche unter anderem eine unabhängige Betrachtung der Werte vornehmen, konnte Drebrin nicht in den obigen Kurzleitfaden inkludiert werden. Betrachtet man jedoch analog, ohne eine statistische Methodik, die Auswertung des Drebrins und fasst die Werte 1 und 2 (analog der Tabelle 14) zusammen, so lassen sich mit diesen beiden Werten die Trichoblastome sehr gut von den Basalzellkarzinomen unterscheiden. Das Basalzellkarzinom war hier in der Färbung negativ.

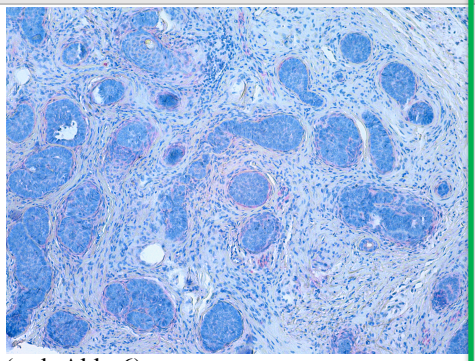
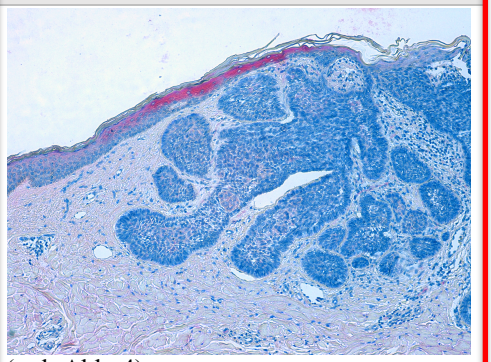
Tabelle 28: Empfohlener Leitfaden dieser Arbeit:

Möglicher Leitfaden:			
Antikörper:	**Kriterien der positiven Färbung**	**Trichoblastom**	**Basalzell-karzinom**
Nestin	fokal mesenchymale Hüllschicht	+	-
AR	Tumorzellkerne	-	+
PHLDA1	epithelial Melanozyten mesenchymale Papille	+ - (<1/3 positiv) +	- (<1/3 positiv) + - (<1/3 positiv)
BerEP4	epitheliale Tumorzellen	-	+
Drebrin	mesenchymale Hüllschicht	+	-

Zur Veranschaulichung wurde dieser Leitfaden (Tab. 28) in Tabelle 29 mit entsprechenden mikroskopischen Fotografien bebildert.

Tabelle 29: Immunhistochemische Visualisierung des möglichen Leitfadens:

Antikörper:	**Trichoblastom**	**Basalzellkarzinom**
Nestin	 (vgl. Abb. 10)	 (vgl. Abb. 8)
AR	 (vgl. Abb. 15)	 (vgl. Abb. 13)
PHLDA1	 (vgl. Abb. 29)	 (vgl. Abb. 28)
BerEP4	 (vgl. Abb. 32)	 (vgl. Abb. 30)

Antikörper:	Trichoblastom	Basalzellkarzinom
Drebrin	 (vgl. Abb. 6)	 (vgl. Abb. 4)

Die Ähnlichkeit von Trichoblastomen und Basalzellkarzinomen führt nicht nur zu Diskussionen bezüglich der morphologischen und immunhistochemischen Differenzierbarkeit, sondern auch zu Fragen der Klassifizierung. So entwickelte sich die Idee, das Basalzellkarzinom als „trichogenes Karzinom“ (19) oder „trichoblastisches Karzinom“ und das Trichoepitheliom sowie Varianten anderer gutartiger Tumore mit ähnlichen Merkmalen als Gruppe, mit der Bezeichnung „Trichoblastom“ zu benennen (124).

Doch nicht nur die Morphologie gibt Anlass für Überlegungen zu einer neuen Klassifikation, da auch über Fälle berichtet wird, in welchen das Trichoblastom maligne Veränderungen aufweist (125). Ein anfänglich benignes Trichoblastom wurde beschrieben, welches sich im Laufe klinisch aggressiv maligne entwickelte und auch zu Metastasen führte. Dies soll jedoch vor allem bei langem Bestehen des Tumors und bei immunsuppressiven Menschen auftreten. (126)

Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht, ob es sich bei diesen beiden Tumoren nicht eventuell um ein morphologisches Kontinuum mit zwei polaren Enden (dem Trichoblastom und dem soliden oder mikronodulären Basalzellkarzinom) handeln könnte, bei welchem keine klare Differenzierung erfolgen kann. Dazu wurde eine statistische Cluster-Analyse in dem Statistikprogramm R durchgeführt. Hierbei konnte anhand eines Dendrogramms (s. Abb. 35 und 37) und einer Heatmap (s. Abb. 35) die These eines Kontinuums unterstützt werden. Ergänzend dazu waren in der durchgeführten Silhouetten-Analyse (s. Abb. 36) die Werte der Silhouetten-Breite mit 0,23 näher am Wert 0, als am Wert 1 und lassen daher schlussfolgern, dass eine

Zuordnung der Fälle zu einer der beiden Entitäten nur schwer möglich ist. Die beiden polaren Enden des Kontinuums können jedoch, entsprechend des empfohlenen Kurzleitfadens, eindeutig zugeordnet werden, was wiederum mit den praktischen Erfahrungen der dermatopathologischen Routinediagnostik einhergeht. Somit entsteht der Eindruck, dass es sich ggf. nur um eine Entität handelt mit zwei Formen der Ausprägung.

Philip E. LeBoit stellte 2003 fest, dass man sich nicht allein auf die Immunhistochemie verlassen sollte. Man sollte sich eher darauf konzentrieren, wie sich das Karzinom klinisch verhält bzw. wie und ob es sich verändert. Offensichtlich lassen auch der klinische Verlauf und das klinische Erscheinungsbild Überlappungen erkennen. Ghigliotti et al. beschrieben 2016, dass im Dermatoskop blaue ovoide Nester bei 64% der trichoblastischen Basalzellkarzinome und bei 15% der Trichoblastome, vorkommen. Die Ähnlichkeit sei immens und die Histologie stets der Goldstandard zur genaueren Differenzierung (127).

Somit ist festzuhalten, dass sowohl klinisch, als auch histomorphologisch und immunhistochemisch, eine eindeutige Differenzierung nicht immer möglich ist. Vielmehr konnte hier ein Kontinuum erkannt werden, mit zwei polaren Enden (den beiden Entitäten entsprechend). Für die polaren Enden ergaben sich teils sehr gute und signifikante, sowie stark differenzierende Kriterien, wodurch sich ein Leitfaden ergab: Ein Trichoblastom kann durch eine Androgenrezeptor-, und Nestin- und Drebrin-positive Expression sowie durch eine PHLDA1 positive Expression der epithelialen Anteile und an der mesenchymalen Papille, bei gleichzeitiger geringer Kolonisierung an PHLDA1-positiven Melanozyten, charakterisiert werden. Das Basalzellkarzinom verhält sich dazu konträr.

6. Zusammenfassung

Schon Philip E. LeBoit hat sich 2003 die Frage gestellt, ob man die follikuläre Differenzierung als sichere Grundlage für die Differenzialdiagnose eines Trichoblastoms und eines Basalzellkarzinoms verwenden kann. Die histologische Unterscheidung der beiden Tumore sei nämlich für den Pathologen trotz diverser Untersuchungen immer noch ein Dilemma (49).

Das Basalzellkarzinom und das Trichoblastom weisen eine große histomorphologische Ähnlichkeit auf. Daher wurde versucht eine immunhistochemische Differenzierungsmöglichkeit mit einem Panel an spezifischen Antikörpern zu finden.

Hierfür wurden aus dem Archiv der Dermatologie und Allergologie der LMU-München, sowie aus einem externen Histopathologischen Labor (PD Dr. med. habil. Fritjof Eckert) Gewebeproben von 14 Trichoblastomen, 17 Basalzellkarzinomen und 16 differenzialdiagnostisch schwierigen Fällen identifiziert. Basierend auf einer umfassenden Literaturrecherche (s. Tab. 5) wurden abschließend 11 verschiedene Antikörper ausgewählt (s. Tab. 7). Mit dieser Auswahl wurden alle Fälle immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Hierbei wurden mikroskopische Bewertungskriterien festgelegt (s. Tab. 14, Werte 0 bis 2) und semiquantitative Differentialkriterien (s. Tab. 16, alphabetisch A bis D) erarbeitet. Anschließend erfolgte eine statistische Untersuchung anhand einer Clusteranalyse des „Cramers V“ und einer hierarchischen Clusteranalyse.

Hieraus konnte ein Leitfaden für das immunhistochemische Färbeverhalten und somit auch die Differenzierung des Trichoblastoms vom Basalzellkarzinom abgeleitet werden (s. Tab. 28 und 29). In diesen gehen qualitative und quantitative Kriterien des Färbeverhaltens der Antikörper gegen Nestin, Androgenrezeptor, PHLDA1, BerEP4 und das Drebrin ein. Besonders wertvoll scheint das Nestin. So kann in der hier vorliegenden Arbeit von einem Trichoblastom mit einem positiven Vorhersagewert von 92% ausgegangen werden, wenn der Tumor Nestin positiv ist. Ist Nestin negativ, so kann zu 94% von einem Basalzellkarzinom ausgegangen werden (s. Tab 25).

Auch bei der Aufstellung eines sogenannten Kurzleitfadens mit lediglich vier Antikörpern (Nestin, AR, PHLDA1, BerEP4) und je einem Kriterium dazu (s. Tabelle 16, 24, 25), konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden: Es konnten 16 der 17 Basalzellkarzinome als solche erkannt werden und 13 der 14 Trichoblastome. Dies

entspricht insgesamt einem Vorhersagewert der richtigen Enddiagnose von 94%. Sprechen alle vier Antikörperfärbungen gleichermaßen für einen der beiden Tumore (s. Tab. 25), so konnten hier alle Fälle sicher einem Trichoblastom oder Basalzellkarzinom zugeordnet werden. Dies entspricht einer 100%igen Sensitivität und Spezifität. Hierbei kann festgehalten werden, dass die Kombination Nestin-positiv (fokale mesenchymale Hüllschicht), Androgenrezeptor-negativ (Tumorzellkerne), PHLDA1-negativ (Melanozyten), BerEP4-negativ (Zellen des Tumorknotens) ein Trichoblastom beweist. Das Basalzellkarzinom verhält sich dazu konträr. Betrachtet man die Sensitivität so liegt diese beim Nestin für das Trichoblastom bei 92% und das Basalzellkarzinom bei 94%, gefolgt vom AR mit 93% (Sens. T) und 76% (Sens. B), PHLDA1 mit 93% (Sens. T) und 71% (Sens. B), sowie dem BerEP4 mit 64% (Sens. T) und 65%(sens. B) (s. Tab. 25). Dieser Kurzleitfaden soll helfen im Zusammenhang mit dem klinischen und histomorphologischen Erscheinungsbild die schwierige Differentialdiagnose zwischen einem Trichoblastom und einem Basalzellkarzinom zu optimieren (s. Kurzleitfaden Tab. 25 und Leitfaden Tab. 28, 29).

Trotz dieser guten Werte konnte durch die Visualisierungen der beiden Clusteranalysen des Cramers-V (s. Abb. 21, 22, 26, 27) und der hierarchischen Clusteranalyse (s. Abb. 36, 40, 42) festgestellt werden, dass es keine klare Trennlinie zur Unterscheidung der Entitäten gibt. Daher ist hier eine sichere Differenzierung derartiger basaloid differenzierter Neoplasien der Haut mit der Einteilung in zwei Entitäten nicht in allen Fällen möglich. Vielmehr lässt sich ein Kontinuum erkennen (s. Abb. 42), welches durch eindeutig als Basalzellkarzinom oder als Trichoblastom zu diagnostizierende Tumore aufgespannt wird. Dazwischen befindet sich ein kontinuierlich abgestuftes Spektrum an Fällen mit einem zunehmend von den Prototypen abweichenden Färbeverhalten und histomorphologischen Kriterien.

7 Literatur-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Literaturverzeichnis

1. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARCPress; 2006.

2. Kempf W, Hantschke M, Kutzner H, Burgdorf W. Dermatopathologie. 3. Auflage ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2015.

3. Peterson SC, Eberl M, Vagnozzi AN, Belkadi A, Veniaminova NA, Verhaegen ME, et al. Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. Cell stem cell. 2015;16(4):400-12.

4. Fritsch. Dermatologie und Venerologie. 2. Auflage ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2004.

5. Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff HH. Histopathologie der Haut. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2003.

6. Thomas C. Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzierung. 14. Auflage ed. Stuttgart: Schatthauer GmbH; 2006.

7. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. N Engl J Med. 2005;353:2262-9.

8. Pollack SV, Goslen JB, Sherertz EF, Jegasothy BV. The biology of basal cell carcinoma: a review. Journal of the American Academy of Dermatology. 1982;7(5):569-77.

9. Kaufmann R, Linhart C, Walter M. Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie des Basalzellkarzinoms: Diagnostik (klinisches Bild, Histologie, Dermatoskopie, Floureszenzdiagnostik). In: Szeimies RM, Hauschild A, Garbe K, Kaufmann R, Landtaler M, editors. Tumoren der Haut: Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009. p. 483-5.

10. Rassner G, Schlagenhauff B, Breuninger H. Der klinische Variantenreichtum der Basaliome und seine Bedeutung. In: Petres J, Lohrisch I, editors. Das Basaliom - Klinik und Therapie. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1993. p. 3-11.

11. Hengge/Ruzicka. Roter Leitfaden Dermatologie und Venerologie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2006.

12. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Pathologie. 4. Auflage ed. München: Elsevier GmbH; 2008.

13. Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. Lancet. 2010;673-685.

14. Brinster NK, Lui V, Diwan AH, McKee PH. Dermatopathologie. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.

15. Headinton JT. Differentiating neoplasm of hair germ. J Clin Pathol. 1970;23(6):464-71.

16. Headinton JT, French AJ. Primary neoplasms of the hair follicle. Archives of dermatology. 1962;86:430-41.

17. Headinton JT. Tumors of the hair follicle: A review. Am J Pathol. 1976;85(2):479-514.

18. Ackerman AB, DeViragh PA, Chongchitnant N. Neoplasms with follicular differentiation. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.

19. Ackerman AB, Reddy VB, Soyer HP. Neoplasm with follicular differentiation. New York: Ardor Scribendi; 2001.

20. Chinem VP, Miot HA. Epidemiology of basal cell carcinoma. Anais brasileiros de dermatologia. 2011;86(2):292-305.

21. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. The New England journal of medicine. 2005;353(21):2262-9.

22. Miller SJ. Etiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. Clinics in dermatology. 1995;13(6):527-36.

23. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. The British journal of dermatology. 2012;166(5):1069-80.

24. Rahbari H, Mehregan AH. Basal cell epithelioma (carcinoma) in children and teenagers. Cancer. 1982;49:350-3.

25. Buettner PG, Raasch BA. Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia. Int J Cancer. 1998;78:587-93.

26. Green A, Battistutta D, Hart V, Leslie D, Weedon D. Skin cancer in a subtropical Australian population: incidence and lack of association with occupation. The Nambour Study Group. Am J Epidemiol. 1996;144:1034-40.

27. Green A, Beardmore G, Hart V, Leslie D, Marks R, Staines D. Skin cancer in a Queensland population. Journal of the American Academy of Dermatology. 1988;19:1045-52.

28. Miller SJ. Aethiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. Clin Dermatol. 1995(13):527-36.

29. Ting PT, Kasper R, Arlette JP. Metastatic basal cell carcinoma: report of two cases and literature review. J Cutan Med Surg. 2005;9:10-5.

30. Giles GG, Marks R, Foley P. Incidence of non-melanocytic skin cancer treated in Australia. British medical journal (Clinical research ed). 1988;296(6614):13-7.

31. Rochette PJ, Brash DE. Human telomeres are hypersensitive to UV-induced DNA Damage and refractory to repair. PLoS genetics. 2010;6(4):e1000926.

32. Ouhtit A, Ananthaswamy HN. A Model for UV-Induction of Skin Cancer. Journal of biomedicine & biotechnology. 2001;1(1):5-6.

33. Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. Archives of dermatology. 2000;136(12):1524-30.

34. Wallberg P, Skog E. The increasing incidence of basal cell carcinoma. The British journal of dermatology. 1994;131(6):914-5.

35. Cinga E, Tarallo M, Maruccia M, al. e. Basal cell carcinoma: 10 years of experience. J Skin Cancer. 2011;47:63-2.

36. Dahl E, Aberg M, Rausing A, Rausing EL. Basal cell carcinoma. An epidemiologic study in a defined population. Cancer. 1992;70(1):104-8.

37. Holme SA, Malinovszky K, Roberts DL. Changing trends in non-melanoma skin cancer in South Wales, 1988-98. The British journal of dermatology. 2000;143(6):1224-9.

38. Wallberg P, Skog E. The incidence of basal cell carcinoma in an area of Stockholm County during the period 1971-1980. Acta dermato-venereologica. 1991;71(2):134-7.

39. Schön D, Bertz J, Hoffmeister H. Bevölkerungsbezogene Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland. bga Schriften. München; 1989.

40. Asgari MM, Moffet HH, Ray GT, Quesenberry CP. Trends in Basal Cell Carcinoma Incidence and Identification of High-Risk Subgroups, 1998-2012. JAMA dermatology. 2015;151(9):976-81.

41. Krebs in Deutschland 2013/2014 [Internet]. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). 2017.

42. Hirsch F. Das Haar des Menschen in Gesundheit und Krankheit unter spezieller Berücksichtigung der Keratinchemie. Ulm-Donau: Karl F. Haug-Verlag; 1956.

43. Alsaad KO, Obaidat NA, Ghazarian D. Skin adnexal neoplasms--part 1: an approach to tumours of the pilosebaceous unit. Journal of clinical pathology. 2007;60(2):129-44.

44. Garcia-de-la-Fuente MR, Santacana M, Vilardell F, Pujol RM, Gari E, Casanova JM. Vulvar Basal Cell Carcinoma: Four Case Reports With Immunohistochemical Study. Journal of cutaneous medicine and surgery. 2017;21(5):457-9.

45. Sakai T, Goto M, Kai Y, Kato A, Shimizu F, Okamoto O, et al. Vulvar basal cell carcinoma with bone metastasis. The Journal of dermatology. 2011;38(1):97-100.

46. Herzinger T, Flaig M, Diederich R, Rocken M. Basal cell carcinoma of the toenail unit. Journal of the American Academy of Dermatology. 2003;48(2):277-8.

47. Schirren CG. Intermediärfilamente als Marker der follikulären Differenzierung - Untersuchung zur Expression in follikulärem Neoplasien. Ludwig-Maximilians-Universität München 1995.

48. Guy GP, Jr., Machlin SR, Ekwueme DU, Yabroff KR. Prevalence and costs of skin cancer treatment in the U.S., 2002-2006 and 2007-2011. American journal of preventive medicine. 2015;48(2):183-7.

49. LeBoit PE. Trichoblastoma, basal cell carcinoma, and follicular differentiation: what should we trust? Am J Dermatopathol. 2003;25(3):260-3.

50. Brooke JD, Fitzpatrick JE, Golitz LE. Papillary mesenchymal bodies: a histologic finding useful in differentiating trichoepitheliomas from basal cell carcinomas. Journal of the American Academy of Dermatology. 1989;21(3 Pt 1):523-8.

51. Bowen AR, LeBoit PE. Fibroepithelioma of pinkus is a fenestrated trichoblastoma. The American Journal of dermatopathology. 2005;27(2):149-54.

52. Ackerman AB, Gottlieb GJ. Fibroepithelial tumor of pinkus is trichoblastic (Basal-cell) carcinoma. The American Journal of dermatopathology. 2005;27(2):155-9.

53. Jänner, Rohde, Wassilew. Hautkrankheiten mikroskopisch betrachtet. Bad Oldesloe: Glaxo GmbH; 1986.

54. Hashimoto K, Mehregan AH, Kumakiri M. Tumors of skin appendages. Butterworths: Stoneham, Mass; 1987.

55. Mizutani Y, Iwamoto I, Kanoh H, Seishima M, Nagata K. Expression of drebrin, an actin binding protein, in basal cell carcinoma, trichoblastoma and trichoepithelioma. Histol Histopathol. 2014;29(6):757-66.

56. Misago N, Mori T, Narisawa Y. Nestin expression in stromal cells of trichoblastoma and basal cell carcinoma. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010;24(11):1354-8.

57. Leblebici C, Bambul Sigirci B, Kelten Talu C, Koca SB, Huq GE. CD10, TDAG51, CK20, AR, INSM1, and Nestin Expression in the Differential Diagnosis of Trichoblastoma and Basal Cell Carcinoma. International journal of surgical pathology. 2018:1066896918781719.

58. Izikson L, Bhan A, Zembowicz A. Androgen receptor expression helps to differentiate basal cell carcinoma from benign trichoblastic tumors. Am J Dermatopathol. 2005;27(2):91-5.

59. Katona TM, Perkins SM, Billings SD. Does the panel of cytokeratin 20 and androgen receptor antibodies differentiate desmoplastic trichoepithelioma from morpheaform/infiltrative basal cell carcinoma? J Cutan Pathol. 2008;35(2):174-9.

60. Bayer-Garner IB, Givens V, Smoller B. Immunohistochemical staining for androgen receptors: a sensitive marker of sebaceous differentiation. The American Journal of dermatopathology. 1999;21(5):426-31.

61. Shimanovich I, Krahl D, Rose C. Trichoadenoma of Nikolowski is a distinct neoplasm within the spectrum of follicular tumors. Journal of the American Academy of Dermatology. 2010;62(2):277-83.

62. Ansai S, Takeichi H, Arase S, Kawana S, Kimura T. Sebaceous carcinoma: an immunohistochemical reappraisal. The American Journal of dermatopathology. 2011;33(6):579-87.

63. Hamasaki H, Koga K, Hamasaki M, Kiryu H, Nakayama J, Iwasaki H, et al. Immunohistochemical analysis of laminin 5-gamma2 chain expression for differentiation of basal cell carcinoma from trichoblastoma. Histopathology. 2011;59(1):159-61.

64. Yan L, Chen M, Yu G. Expression of bcl-2, bax, and p53 protein in the basal cell carcinoma. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 1999;24:179-80.

65. Poniecka AW, Alexis JB. An immunohistochemical study of basal cell carcinoma and trichoepithelioma. The American Journal of dermatopathology. 1999;21(4):332-6.

66. McNiff JM, Eisen RN, Glusac EJ. Immunohistochemical comparison of cutaneous lymphadenoma, trichoblastoma, and basal cell carcinoma: support for

classification of lymphadenoma as a variant of trichoblastoma. J Cutan Pathol. 1999;26(3):119-24.

67. Patil DT, Goldblum JR, Billings SD. Clinicopathological analysis of basal cell carcinoma of the anal region and its distinction from basaloid squamous cell carcinoma. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2013;26(10):1382-9.

68. Basarab T, Orchard G, Russell-Jones R. The use of immunostaining for bcl-2 and CD34 and the lectin peanut agglutinin in differentiating between basal cell carcinomas and trichoepitheliomas. The American Journal of dermatopathology. 1998;20(5):448-52.

69. Ionescu DN, Arida M, Jukic DM. Metastatic basal cell carcinoma: four case reports, review of literature, and immunohistochemical evaluation. Archives of pathology & laboratory medicine. 2006;130(1):45-51.

70. Swanson PE, Fitzpatrick MM, Ritter JH, Glusac EJ, Wick MR. Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens. Journal of cutaneous pathology. 1998;25(3):153-9.

71. Sabeti S, Malekzad F, Ashayer M, Fouladi RF, Hesari KK, Toutkaboni MP, et al. The rate and pattern of bcl-2 and cytokeratin 15 expression in trichoepithelioma and nodular Basal cell carcinoma: a comparative study. Indian journal of dermatology. 2013;58(5):331-6.

72. Tebcherani AJ, de Andrade HF, Jr., Sotto MN. Diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing trichoepithelioma and basal cell carcinoma: evaluation using tissue microarray samples. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2012;25(10):1345-53.

73. Verhaegh ME, Arends JW, Majoie IM, Hoekzema R, Neumann HA. Transforming growth factor-beta and bcl-2 distribution patterns distinguish trichoepithelioma from basal cell carcinoma. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]. 1997;23(8):695-700.

74. Mills AE. Solar keratosis can be distinguished from superficial basal cell carcinoma by expression of bcl-2. The American Journal of dermatopathology. 1997;19(5):443-5.

75. Smith KJ, Williams J, Corbett D, Skelton H. Microcystic adnexal carcinoma: an immunohistochemical study including markers of proliferation and apoptosis. The American journal of surgical pathology. 2001;25(4):464-71.

76. Ishida M, Kushima R, Okabe H. Immunohistochemical demonstration of D2-40 in basal cell carcinomas of the skin. Journal of cutaneous pathology. 2008;35(10):926-30.

77. Kirchmann TT, Prieto VG, Smoller BR. CD34 staining pattern distinguishes basal cell carcinoma from trichoepithelioma. Archives of dermatology. 1994;130(5):589-92.

78. Hoang MP, Dresser KA, Kapur P, High WA, Mahalingam M. Microcystic adnexal carcinoma: an immunohistochemical reappraisal. Mod Pathol. 2008;21(2):178-85.

79. Misago N, Satoh T, Miura Y, Nagase K, Narisawa Y. Merkel cell-poor trichoblastoma with basal cell carcinoma-like foci. Am J Dermatopathol. 2007;29(3):249-55.

80. Abesamis-Cubillan E, El-Shabrawi-Caelen L, LeBoit PE. Merkel cells and sclerosing epithelial neoplasms. The American Journal of dermatopathology. 2000;22(4):311-5.

81. Sellheyer K, Cribier B, Nelson P, Kutzner H, Rutten A. Basaloid tumors in nevus sebaceus revisited: the follicular stem cell marker PHLDA1 (TDAG51) indicates that most are basal cell carcinomas and not trichoblastomas. J Cutan Pathol. 2013;40(5):455-62.

82. Kurzen H, Esposito L, Langbein L, Hartschuh W. Cytokeratins as markers of follicular differentiation: an immunohistochemical study of trichoblastoma and basal cell carcinoma. Am J Dermatopathol. 2001;23(6):501-9.

83. Battistella M, Peltre B, Cribier B. PHLDA1, a follicular stem cell marker, differentiates clear-cell/granular-cell trichoblastoma and clear-cell/granular cell basal cell carcinoma: a case-control study, with first description of granular-cell trichoblastoma. Am J Dermatopathol. 2014;36(8):643-50.

84. Sellheyer K, Nelson P, Kutzner H, Patel RM. The immunohistochemical differential diagnosis of microcystic adnexal carcinoma, desmoplastic trichoepithelioma and morpheaform basal cell carcinoma using BerEP4 and stem cell markers. Journal of cutaneous pathology. 2013;40(4):363-70.

85. Sellheyer K, Krahl D. PHLDA1 (TDAG51) is a follicular stem cell marker and differentiates between morphoeic basal cell carcinoma and desmoplastic trichoepithelioma. The British journal of dermatology. 2011;164(1):141-7.

86. Sellheyer K, Nelson P. Follicular stem cell marker PHLDA1 (TDAG51) is superior to cytokeratin-20 in differentiating between trichoepithelioma and basal cell carcinoma in small biopsy specimens. Journal of cutaneous pathology. 2011;38(7):542-50.

87. Ansai S, Takayama R, Kimura T, Kawana S. Ber-EP4 is a useful marker for follicular germinative cell differentiation of cutaneous epithelial neoplasms. J Dermatol. 2012;39(8):688-92.

88. Beer TW, Shepherd P, Theaker JM. Ber EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin. Histopathology. 2000;37(3):218-23.

89. Krahl D, Sellheyer K. Monoclonal antibody Ber-EP4 reliably discriminates between microcystic adnexal carcinoma and basal cell carcinoma. Journal of cutaneous pathology. 2007;34(10):782-7.

90. Tellechea O, Reis JP, Domingues JC, Baptista AP. Monoclonal antibody Ber EP4 distinguishes basal-cell carcinoma from squamous-cell carcinoma of the skin. The American Journal of dermatopathology. 1993;15(5):452-5.

91. Fan YS, Carr RA, Sanders DS, Smith AP, Lazar AJ, Calonje E. Characteristic Ber-EP4 and EMA expression in sebaceoma is immunohistochemically distinct from basal cell carcinoma. Histopathology. 2007;51(1):80-6.

92. Filho LL, de Oliveira de Avelar Alchorne A, Pereira GC, Lopes LR, de Carvalho TC. Histological and immunohistochemical evaluation of basal cell carcinoma following curettage and electrodessication. International journal of dermatology. 2008;47(6):610-4.

93. Dasgeb B, Mohammadi TM, Mehregan DR. Use of Ber-EP4 and Epithelial Specific Antigen to Differentiate Clinical Simulators of Basal Cell Carcinoma. Biomarkers in cancer. 2013;5:7-11.

94. Karahan N. BS, Yildirim M., Barut I. The use of Ber-EP4 antigen in the differential diagnosis of basosquamous carcinoma from squamous and basal cell carcinoma. Türk Patoloji Dergisi. 2006;22(2):87–91.

95. Mashhood A. A. ST, Atique M., Asif M. Sensitivity and specificity of Ber-EP4 immunostaining in basal cell carcinoma cases in asian skin. Pakistan Armed Forces Medical Journal. 2011;3.

96. Jih DM, Lyle S, Elenitsas R, Elder DE, Cotsarelis G. Cytokeratin 15 expression in trichoepitheliomas and a subset of basal cell carcinomas suggests they originate from hair follicle stem cells. Journal of cutaneous pathology. 1999;26(3):113-8.

97. Choi CW, Park HS, Kim YK, Lee SH, Cho KH. Elastic fiber staining and cytokeratin 15 expression pattern in trichoepithelioma and basal cell carcinoma. The Journal of dermatology. 2008;35(8):499-502.

98. Vega Memije ME, Luna EM, de Almeida OP, Taylor AM, Cuevas Gonzalez JC. Immunohistochemistry panel for differential diagnosis of Basal cell carcinoma and trichoblastoma. International journal of trichology. 2014;6(2):40-4.

99. Lum CA, Binder SW. Proliferative characterization of basal-cell carcinoma and trichoepithelioma in small biopsy specimens. J Cutan Pathol. 2004;31(8):550-4.

100. Yada K, Kashima K, Daa T, Kitano S, Fujiwara S, Yokoyama S. Expression of CD10 in basal cell carcinoma. Am J Dermatopathol. 2004;26(6):463-71.

101. Sengul D, Sengul I, Astarci MH, Ustun H, Mocan G. CD10 for the distinct differential diagnosis of basal cell carcinoma and benign tumours of cutaneous appendages originating from hair follicle. Pol J Pathol. 2010;61(3):140-6.

102. Pham TT, Selim MA, Burchette JL, Jr., Madden J, Turner J, Herman C. CD10 expression in trichoepithelioma and basal cell carcinoma. J Cutan Pathol. 2006;33(2):123-8.

103. Wagoner J, Keehn C, Morgan MB. CD-10 immunostaining differentiates superficial basal cell carcinoma from cutaneous squamous cell carcinoma. Am J Dermatopathol. 2007;29(6):555-8.

104. Alhumaidi A. Practical immunohistochemistry of epithelial skin tumor. Indian journal of dermatology, venereology and leprology. 2012;78(6):698-708.

105. Wiedemeyer K, Hartschuh W. Trichoblastomas with Merkel cell proliferation in nevi sebacei in Schimmelpenning-Feuerstein-Mims syndrome--histological differentiation between trichoblastomas and basal cell carcinomas. J Dtsch Dermatol Ges. 2009;7(7):612-5.

106. Schulz T, Hartschuh W. Merkel cells are absent in basal cell carcinomas but frequently found in trichoblastomas. An immunohistochemical study. Journal of cutaneous pathology. 1997;24(1):14-24.

107. Costache M, Bresch M, Böer A. Desmoplastic trichoepithelioma versus morphoeic basal cell carcinoma: a critical reappraisal of histomorphological and immunohistochemical criteria for differentiation. Histopathology. 2008;52(7):865-76.

108. Schirren CG, Rutten A, Kaudewitz P, Diaz C, McClain S, Burgdorf WH. Trichoblastoma and basal cell carcinoma are neoplasms with follicular differentiation sharing the same profile of cytokeratin intermediate filaments. The American Journal of dermatopathology. 1997;19(4):341-50.

109. Kirchmann TT, Prieto VG, Smoller BR. Use of CD34 in assessing the relationship between stroma and tumor in desmoplastic keratinocytic neoplasms. Journal of cutaneous pathology. 1995;22(5):422-6.

110. Smoller BR, Van de Rijn M, Lebrun D, Warnke RA. bcl-2 expression reliably distinguishes trichoepitheliomas from basal cell carcinomas. The British journal of dermatology. 1994;131(1):28-31.

111. Kanitakis J, Bourchany D, Claudy A. Expression of the CD10 antigen (neutral endopeptidase) by mesenchymal tumors of the skin. Anticancer research. 2000;20(5b):3539-44.

112. Cordoba A, Guerrero D, Larrinaga B, Iglesias ME, Arrechea MA, Yanguas JI. Bcl-2 and CD10 expression in the differential diagnosis of trichoblastoma, basal cell carcinoma, and basal cell carcinoma with follicular differentiation. Int J Dermatol. 2009;48(7):713-7.

113. Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. Journal of clinical pathology. 1990;43(3):213-9.

114. Sunjaya AP, Sunjaya AF, Tan ST. The Use of BEREP4 Immunohistochemistry Staining for Detection of Basal Cell Carcinoma. Journal of skin cancer. 2017;2017:2692604.

115. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, et al. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(17):9958-61.

116. Petschnik AE, Klatte JE, Evers LH, Kruse C, Paus R, Danner S. Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. The British journal of dermatology. 2010;162(2):380-3.

117. Cesinaro AM, Migaldi M, Corrado S, Maiorana A. Expression of p27kip1 in basal cell carcinomas and trichoepitheliomas. The American Journal of dermatopathology. 2002;24(4):313-8.

118. Gonzalez-Guerra E, Kutzner H, Rutten A, Requena L. Immunohistochemical study of calretinin in normal skin and cutaneous adnexal proliferations. The American Journal of dermatopathology. 2012;34(5):491-505.

119. Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. 3. Auflage ed. Boenisch T, editor: DakoCytomation GmbH, Hamburg; 2003.

120. Noll S, Schaub-Kuhnen S. Praxis der Immunhistochemie. 1. Auflage ed: Urban & Fischer Verlag, München, Jena; 2000.

121. Huang Z. Extensions to the k-Means Algorithm for Clustering Large Data Sets with Categorical Values. Data Min Knowl Discov. 1998;2(3):283-304.

122. Yan L, Chen M, Yu G. [Expression of bcl-2, bax and p53 protein in the basal cell carcinoma]. Hunan yi ke da xue xue bao = Hunan yike daxue xuebao = Bulletin of Hunan Medical University. 1999;24(2):179-80.

123. Weiß C. Studien verstehen (2): Prüfen der Signifikanz – Woher kommt das kleine „p"? Via medici. 2007;12(03):54-6.

124. Misago N, Ackerman AB. Trichoblastic (basal-cell) carcinoma with trichilemmal (at the bulb) differentiation. Dermatopathology, practical & conceptual. 1999(5):200-4.

125. Rofagha R, Usmani AS, Vadmal M, Hessel AB, Pellegrini AE. Trichoblastic carcinoma: a report of two cases of a deeply infiltrative trichoblastic neoplasm. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]. 2001;27(7):663-6.

126. Regauer S, Beham-Schmid C, Okcu M, Hartner E, Mannweiler S. Trichoblastic carcinoma ("malignant trichoblastoma") with lymphatic and hematogenous metastases. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2000;13(6):673-8.

127. Ghigliotti G, De Col E, Parodi A, Bombonato C, Argenziano G. Trichoblastoma: is a clinical or dermoscopic diagnosis possible? Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2016;30(11):1978-80.

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beschreibung von Benignität und Malignität nach Ackerman (18). ..... - 9 -

Tabelle 2: Malignitätskriterien von C. Thoms, 2006:..... - 10 -

Tabelle 3: Histomorphologischer Vergleich des Trichoblastoms mit dem nodulären Basalzellkarzinom nach Ackerman..... - 11 -

Tabelle 4: Zusammenfassung der histomorphologischen Kriterien des Basalzellkarzinoms und des Trichoblastoms:..... - 12 -

Tabelle 5: Zusammenfassung der bisherigen experimentellen Ergebnisse: ... - 13 -

Tabelle 6: Legende zur Tabelle 5:..... - 17 -

Tabelle 7: Ausgewählte Antikörper:..... - 22 -

Tabelle 8: Klinik der ausgewählten Gewebeproben:..... - 24 -

Tabelle 9: Die verwendeten Puffer:..... - 25 -

Tabelle 10: Die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel:..... - 26 -

Tabelle 11: Die jeweiligen Antikörper mit ihrer Vorbehandlung und Verdünnung: ..... - 27 -

Tabelle 12: Versuchsaufbau im Autostainer TechMate 500 Plus: ..... - 30 -

Tabelle 13: Antikörper und ihr entsprechendes Kontrollgewebe (Positivkontrolle): ..... - 31 -

Tabelle 14: Legende der erarbeiteten mikroskopischen Bewertung mit den Werten 0 bis 2:..... - 32 -

Tabelle 15: Auswertung der Ergebnisse der Literatur:..... - 34 -

Tabelle 16: Übersicht der Antikörper und ihre erstellten Kriterien, analog zur Tabelle 14: ..... - 36 -

Tabelle 17: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Immunhistochemie mit Werten analog zu Tabelle 14: ..... - 37 -

Tabelle 18: Ergebnisse des Kontingenzkoeffizienten Cramers V und dessen Bewertung. Zusätzlich wurde jeweils ein p-Wert berechnet:..... - 62 -

Tabelle 19: Interpretationstabelle für die Werte des Cramers V:..... - 63 -

Tabelle 20: Statistische Bewertung der Clusteranalyse des k-Mode:..... - 64 -

Tabelle 21: Clusteranalyse der Antikörper und ihrer Kriterien anhand des Cramers V:..... - 67 -

Tabelle 22: Veranschaulichung der Clusteranalyse anhand unserer Daten:..... - 69 -

Tabelle 23: Darstellung der Trefferquote durch Auswertung der Tabelle 21 zusammen mit dem Cluster der Tabelle 20: ..... - 71 -

Tabelle 24: „Kurzleitfaden“ zur Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse des Androgenrezeptors (AR), PHLDA1 Kriterium B und Nestin Kriterium A: ..... - 72 -

Tabelle 25: Anwendung des „Kurzleitfadens“ an den Fällen des Trichoblastoms und Basalzellkarzinoms mit Treffen einer Enddiagnose/Vorhersage: ..... - 74 -

Tabelle 26: Clustering der F-Fälle: ..... - 76 -

Tabelle 27: Visualisierung des Kurzleitfadens. In den Spalten sortiert nach Antikörpern (links: Antikörper, die am besten ein Trichoblastom von einem Basalzellkarzinom unterscheiden). Die Fälle in den jeweiligen Spalten sind sortiert nach ihrer Auswertung (Oben: Fälle, bei welchen alle Werte eindeutig einem Trichoblastom entsprechen; Unten: Fälle, bei welchen alle Werte eindeutig einem Basalzellkarzinom entsprechen). ..... - 78 -

Tabelle 28: Empfohlener Leitfaden dieser Arbeit: ..... - 94 -

Tabelle 29: Immunhistochemische Visualisierung des möglichen Leitfadens - 95 -

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Längsschnitt eines Haarfollikels in einer Nestin-Färbung an normaler Kopfhaut in 200facher Vergrößerung: Von außen nach innen: glasartige Basalmembran (1), äußere Haar-Wurzelscheide (2), Henle-Schicht (3), Huxley-Schicht (4), Kutikula (5), Haarrinde mit Haarmark und Pigmenten (6). ..... - 6 -

Abbildung 2: Querschnitt eines Haarfollikels in einer Nestin-Färbung an normaler Kopfhaut in 200facher Vergrößerung. Schichtung analog zur Abb. 1. ..... - 6 -

Abbildung 3: Androgenrezeptorfärbung an normaler Kopfhaut in 50facher Vergrößerung: Haarpapille (1) mit der diese umgebenden Haarmatrix (2) und den dort vorhandenen Pigmenten (3). ..... - 7 -

Abbildung 4: Drebrin in einem Basalzellkarzinom (Fall B11) in 100facher Vergrößerung. Das Kriterium C (positive Färbung in der Epidermis über dem Tumor) ist hier stark ausgeprägt. ..... - 39 -

Abbildung 5: Drebrin in einem Trichoblastom (Fall T14) in 400facher Vergrößerung. Das Kriterium A (positive Färbung der mesenchymalen Hüllschicht) ist hier deutlich zu sehen. ..... - 39 -

Abbildung 6: Drebrin in einem Trichoblastom (Fall T14) in 100facher Vergrößerung. Klassische Anordnung der Tumorknoten, ähnlich einer Haarpapille, mit positiver mesenchymaler Hüllschicht. ..... - 40 -

Abbildung 7: Nestin in einem Basalzellkarzinom (Fall B3) in 100facher Vergrößerung. Das Basalzellkarzinom war bei diesem Antikörper überwiegend negativ. ..... - 41 -

Abbildung 8: Nestin in einem Basalzellkarzinom (Fall B12) in 400facher Vergrößerung. Die mesenchymale Hüllschicht ist hier als Färbung nicht zu erkennen. ..... - 41 -

Abbildung 9: Nestin in einem Trichoblastom (Fall T10) in 50facher Vergrößerung. Die mesenchymale Hüllschicht ist hier deutlich positiv. ..... - 42 -

Abbildung 10: Nestin in einem Trichoblastom (Fall T10) in 100facher Vergrößerung. Deutliche Färbung der mesenchymalen Hüllschicht (Kriterium A des Nestins). ..... - 42 -

Abbildung 11: Nestin in einem Trichoblastom (Fall T10) in 400facher Vergrößerung. ..... - 43 -

Abbildung 12: Androgenrezeptor in normaler Kopfhaut in 400facher Vergrößerung. Die Positivkontrolle (Talgdrüse) ist gut erkennbar. ..... - 44 -

Abbildung 13: Androgenrezeptor in einem Basalzellkarzinom (Fall B10) in 100facher Vergrößerung mit deutlich positiver Färbung. ..... - 44 -

Abbildung 14: Androgenrezeptor in einem Basalzellkarzinom (Fall B10) in 400facher Vergrößerung mit deutlich positiver Färbung. ..... - 45 -

Abbildung 15: Androgenrezeptor in einem Trichoblastom (Fall T4) in 50facher Vergrößerung. Negative Expression des Markers bei deutlich positiver Positivkontrolle. ..... - 45 -

Abbildung 16: LN5 in einem Basalzellkarzinom (Fall B5) in 50facher Vergrößerung. ..... - 47 -

Abbildung 17: LN5 in einem Trichoblastom (Fall T11) in 50facher Vergrößerung. ..... - 47 -

Abbildung 18: Bcl-2 in einem Basalzellkarzinom (Fall B14) in 100facher Vergrößerung. ..... - 48 -

Abbildung 19: Bcl-2 in einem Trichoblastom (Fall T10) in 50facher Vergrößerung. ..... - 49 -

Abbildung 20: CD34 in einem Basalzellkarzinom (Fall B4) in 50facher Vergrößerung. ..... - 50 -

Abbildung 21: CD34 in einem Trichoblastom (Fall T10) in 50facher Vergrößerung. ..... - 50 -

Abbildung 22: CK20 in einem Basalzellkarzinom (Fall B8) in 50facher Vergrößerung. ..... - 51 -

Abbildung 23: CK20 in einem Trichoblastom (Fall T7) in 50facher Vergrößerung. ..... - 52 -

Abbildung 24: CK8 in einem Basalzellkarzinom (Fall B10) in 200facher Vergrößerung. ..... - 53 -

Abbildung 25: CK8 in einem Trichoblastom (Fall T11) in 200facher Vergrößerung ..... - 53 -

Abbildung 26: PHLDA1 in einem Basalzellkarzinom (Fall B17) in 100facher Vergrößerung. Die Expression der Melanozyten ist gut als eine „Pfefferung“ zu erkennen. ..... - 55 -

Abbildung 27: PHLDA1 in einem Trichoblastom (Fall T11) in 100facher Vergrößerung. ..... - 55 -

Abbildung 28: PHLDA1 in einem Basalzellkarzinom (Fall B17) in 400facher Vergrößerung. ..... - 56 -

Abbildung 29: PHLDA1 in einem Trichoblastom (Fall T11) in 400facher Vergrößerung. ..... - 56 -

Abbildung 30: BerEP4 in einem Basalzellkarzinom (Fall B13) in 50facher Vergrößerung. ..... - 58 -

Abbildung 31: BerEP4 in einem Basalzellkarzinom (Fall B13) in 400facher Vergrößerung. ..... - 58 -

Abbildung 32: BerEP4 in einem Trichoblastom (Fall T7) in 50facher Vergrößerung. ..... - 59 -

Abbildung 33: BerEP4 in einem Trichoblastom (Fall T7) in 100facher Vergrößerung. ..... - 59 -

Abbildung 34: CK15 in normaler Kopfhaut in 50facher Vergrößerung. ..... - 60 -

Abbildung 35: Dendrogramm der untersuchten Fälle des hierarchischen Clusters. ..... - 80 -

Abbildung 36: Heatmap mit der Gower´schen-Distanz. An der y-Achse befinden sich die Fälle. An der x-Achse die Antikörper mit dem jeweiligen Kriterium (A-D)..... - 81 -

Abbildung 37: Silhouetten-Analyse mit zwei Clustern. ..... - 82 -

Abbildung 38: Cluster Dendrogramm mit der Gower´schen Distanz der Heatmap (s. Abb.: 34) und der Erkennung zweier Cluster bei der Analyse aller 47 Fälle. ..... - 83 -

Abbildung 39: Heatmap mit differenzierenden Antikörpern..... - 84 -

Abbildung 40: Interpretation der Heatmap mit differenzierenden Antikörpern (Abb. 39)..... - 85 -

Abbildung 41: Visualisierung des Kurzleitfadens anhand der Heatmap mit differenzierenden Antikörpern. ..... - 86 -

Abbildung 42: An der ursprünglichen Tabelle 27 können zwei polare Enden sowie ein Kontinuum erkannt werden. Die Farbe Rot entspricht einem Basalzellkarzinom, Grün einem Trichoblastom. Die Farbe Weiß entspricht dem Wert 3 (unter dem Mikroskop nicht auswertbar), Gelb dem Wert 1 (Wert liegt zwischen 0 und 2 (s. Tabelle 14)). ..... - 87 -

8. Anhang

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Annika Marina Heukäufer, geboren am 06.04.1993 in München, versichere an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Differentialdiagnostische Abgrenzung basaloid differenzierter Neoplasien

der Haut mittels immunhistochemischer Methoden“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige Hilfe) Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

München, den 05.06.2022 Annika Marina Heukäufer

9. Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die am Erstellen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. med. Michael J. Flaig für die Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit, sowie seine fortwährende Betreuung.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei dem Team des immunhistologischen Labors und der Abteilung der Histologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Einarbeitung in die immunhistochemischen Methoden und Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken. Besonders bedanke ich mich bei Frau Ursula Puchta, Frau Johanna Laude, Herr Sebastian Harraßer und Frau Brigitte Ott für die stetige Betreuung.

Zudem möchte ich mich für die Bereitstellung weiterer Gewebeproben und die Beratung bei Herrn PD Dr. med. habil. Fritjof Eckert bedanken.

Für die statistischen Anregungen und die Einweisung in statistische Methoden möchte ich mich bei Herrn Peter Quitta und Magdalena Murawska bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern für ihre stets liebevolle Unterstützung, den großen Rückhalt sowie das Ermöglichen des Studiums und dieser Arbeit. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.