

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen

Expressionsmuster von Par3 und E-Cadherin
im malignen Melanom und im Plattenepithel-Karzinom
der humanen Konjunktiva

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Rebecca Schmidt, geb. Busch
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 06. August 2020

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen

Expressionsmuster von Par3 und E-Cadherin
im malignen Melanom und im Plattenepithel-Karzinom
der humanen Konjunktiva

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Rebecca Schmidt, geb. Busch
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 06. August 2020

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln 2020

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. L. M. Heindl
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. rer. nat. C. M. Mauch

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Frau Dr. med. Simona L. Schlereth und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig M. Heindl.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 20.08.2019

Unterschrift:

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Univ.-Prof. Dr. L. Heindl, Frau Dr. S. Schlereth und der MTA M. Becker von mir selbst im Forschungslabor der Universitätsaugenklinik Köln ausgeführt worden. Die Nutzung des konfokalen Mikroskops erfolgte im Zentrum für Anatomie der Universität zu Köln.

Die Quantifizierung der exprimierten Proteine anhand des Bildmaterials erfolgte durch mich selbst, sowie unter Mitbeurteilung durch Herrn Univ.-Prof. L. Heindl und Frau Dr. S. Schlereth.

Bei der statistischen Auswertung erhielt ich Hilfe von Frau Dr. S. Schlereth.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Heindl vielmals für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe Ophthalmologische Onkologie, die Überlassung des Themas und die prompten Reaktionen bei Rückfragen. Außerdem möchte ich mich bei ihm für viele gute Anregungen und sein begeisterndes Engagement bei der Leitung der Arbeitsgruppe bedanken.

Ganz besonders herzlich möchte ich Frau Dr. med. Simona Schlereth für die exzellente und engagierte Betreuung bei dieser Arbeit danken. Besonders hervorheben möchte ich ihre geduldige Einarbeitung im Labor, die ständige Erreichbarkeit sowie die ansteckende Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten.

Mein Dank gilt auch im Besonderen Frau Martina Becker, die mir mit Erläuterungen und Hilfestellungen auf dem Gebiet der Histologie zur Seite stand. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit, in der wir eng zusammengearbeitet haben.

Für den Austausch und die Verfügbarkeit bei Nachfragen möchte ich der Arbeitsgemeinschaft des CECAD unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. Sanda Iden danken. Ein besonderer Dank richtet sich an Frau Sina Knapp.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Anatomie I der Uniklinik Köln unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Wodarz verdanke ich die Einarbeitung und durchgehende Unterstützung bei der konfokalen Mikroskopie.

Für die finanzielle Unterstützung, die ich über Jahre erfahren habe, möchte ich mich herzlich bei der Marie-Madeleine und Dr. Dieter Rahlwes Stiftung und der MariaPesch-Stiftung danken.

Schließlich möchte ich mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die bei einer operativen Gewebeentnahme der späteren wissenschaftlichen Verwendung zustimmen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für meine Eltern
Regina und Christoph Busch

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1. Anatomie und Physiologie der humanen Konjunktiva	11
1.1.1. Blutgefäßversorgung der Konjunktiva	13
1.1.2. Innervation der Konjunktiva	13
1.2. Molekulare Organisation des konjunktivalen Epithels	14
1.2.1. Par3 als Bestandteil des PAR-Komplexes	15
1.2.1.1. Physiologisches Expressionsmuster von Par3 in der Epidermis	17
1.2.2. Das Transmembranprotein E-Cadherin	17
1.2.2.1. Interzelluläre Verankerung via E-Cadherin	18
1.2.2.2. Physiologisches Expressionsmuster von E-Cadherin in der Epidermis	18
1.3. Tumorgenese	19
1.3.1. Epitheliale-Mesenchymale Transition	20
1.3.2. Par3 und Tumorgenese	21
1.3.3. E-Cadherin und Tumorgenese	23
1.4. Tumoren der Konjunktiva	25
1.4.1. Plattenepitheliale Neoplasien der Augenoberfläche	25
1.4.2. Melanozytäre Neubildungen der Konjunktiva	26
1.5. Herleitung der Fragestellung	27
2. Material und Methoden	29
2.1. Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung	29
2.2. Färbung der Bindehaut-Exzidaten	30
2.2.1. Untersuchungsmaterial	30
2.2.2. Aufbereitung des Untersuchungsmaterials	30

2.2.3.	Färbung mittels Hämatoxylin und Eosin	31
2.2.3.1.	Durchführung der Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin	32
2.2.3.2.	Dokumentation und Grading der HE gefärbten Präparate	32
2.2.4.	Immunhistochemische Färbung	34
2.2.4.1.	Durchführung der immunhistochemischen Färbung mit Fluoreszenz	35
2.3.	Quantifizierung und statistische Analyse	36
3.	<i>Ergebnisse</i>	38
<hr/>		
3.1.	Identifikation der vorliegenden Tumorentitäten	38
3.2.	Expressionsverhalten von E-Cadherin im konjunktivalen Plattenepithelkarzinom und dessen Vorläufern	39
3.2.1.	Semiquantitative Analyse	41
3.2.2.	Quantitative Analyse	42
3.3.	Expressionsverhalten von E-Cadherin im malignen Melanom und dessen Vorläufern	43
3.3.1.	Diskontinuität der membranären Expression von E-Cadherin	43
3.3.2.	Semiquantitative Analyse	45
3.3.3.	Quantitative Analyse	46
3.4.	Expressionsverhalten von Par3 im konjunktivalen Plattenepithelkarzinom und dessen Vorläufern	47
3.4.1.	Semiquantitative Analyse	49
3.4.2.	Quantitative Analyse	49
3.5.	Expressionsverhalten von Par3 im malignen Melanom und dessen Vorläufern	50
3.5.1.	Semiquantitative Analyse	52
3.5.2.	Quantitative Analyse	52
3.6.	Gegenüberstellung des Expressionsverhaltens innerhalb der Läsion und der benachbarten Keratinozyten	53

<u>4. Diskussion</u>	<u>56</u>
4.1. Expression von E-Cadherin im malignen Gewebe	57
4.1.1. Reduktion von E-Cadherin geht mit der Progression der squamösen Tumorgenese einher	58
4.1.2. Veränderte Expression von E-Cadherin im malignen Melanom	58
4.1.3. Abschließende Betrachtung im klinischen Kontext	60
4.2. Expression von Par3 im Plattenepithelkarzinom und Melanom	60
4.2.1. Reduktion von Par3 im Plattenepithelkarzinom	61
4.2.2. Par3 zeigt im malignen Melanom im Rahmen des Differenzierungsverlustes eine reduzierte und inhomogene Expression	62
4.2.3. Weitere Studienmodelle zur genaueren Funktionsanalyse von Par3 sind vonnöten	63
4.3. Gegenüberstellung der Expressionslevel der Läsionen und der benachbarten Keratinozyten	63
4.3.1. Par3 als Tumormarker im Microenvironment	65
4.4. Abschließende Betrachtung	65
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>66</u>
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	<u>68</u>
<u>7. Abbildungsverzeichnis</u>	<u>76</u>
<u>8. Tabellenverzeichnis</u>	<u>78</u>
<u>9. Lebenslauf</u>	<u>79</u>

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AJCC	American Joint Committee on Cancer
al.	alii
aPKC	atypische Proteinkinase
Aqua dest.	Aqua destillata
BH-KO	Bindehaut-Kontrolle
BSA	Bovine Serum Albumin
C. elegans	Caenorhabditis elegans
Ca ²⁺	Ionisiertes Kalzium
CALT	konjunktiva-assoziiertes lymphatisches Gewebe
CAM	Cell Adhesion Molecule
CCC	Cadherin-Catenin-Komplex
CDH1	Cadherin-1
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
c-ErbB2	Cellular avian ErythroBlastosis homologue B2
CIN	Conjunktivale intraepitheliale Neoplasie
CIS	Carcinoma in situ
C-MIN	Conjunctival Melanocytic Intraepithelial Neoplasia
Crb	Crumbs 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dlg	Discs-large
EC1-5	Extrazelluläre Domäne
ECad	E-Cadherin
EGF	Epithelial Growth Factor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
Fc	Fragment crystallizable
GTP	Guanosinriphosphat
HE	Hematoxylin-Eosin
HER2 / ErbB2	Human Epidermal Growth Receptor 2
HGF	Hepatocytes Growth Factor
IGF	Insulin like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G

Lgl	Lethal giant larvae
LOH	Loss of Heteozygosity
M.i.s.	Melanom in situ
MALT	Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe
MET	MNNG HOS transforming gene
MM	Malignes Melanom
MPED	Membrane Proximal Extracellular Domaine
N.	Nervus
n.s.	nicht signifikant
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinomen
OSSN	Ocular Surface Squamous Neoplasia
PAM	Primary Aquired Melanosis
PAR / Par	Partitioning defective (Gen / Genprodukt)
Patj	Pals1-associated tight junction protein
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
P-Cadherin	Plazentares Cadherin
PEC	Plattenepithel-Karzinom
pH	Potentia Hydrogenii
Rho	Ras homologue
RNA	Ribonucleinacid (<i>dt. Ribonukleinsäure</i>)
SCC	Squamous Cell Carcinoma
Scrib	Scribble
sE-Cad	soluble E-Cadherin
Shp2	Src homology 2
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Tj	Tight Junctions
TNM	Tumor - Nodus lymphoideus - Metastase
V.	Vena
Vv.	Venae
\bar{x}	arithmetisches Mittel (verwendet als $\bar{x}=00,00\pm$ Standardabweichung)
ZO1	Zonula occludens-1

1. Einleitung

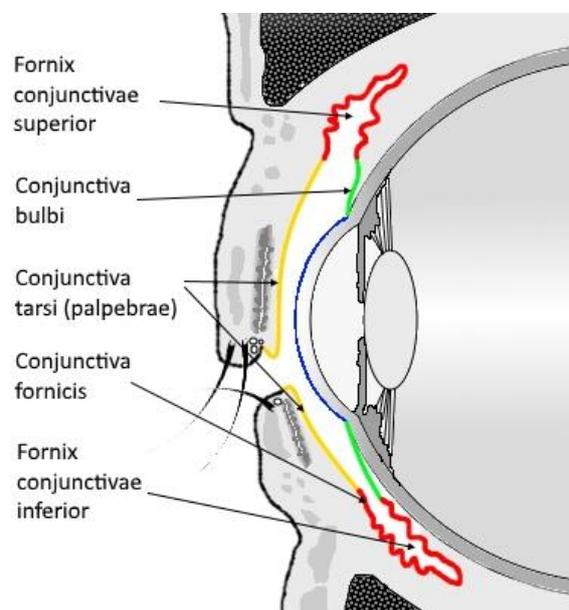
1.1. Anatomie und Physiologie der humanen Konjunktiva

Die Konjunktiva überspannt als eine wenige Mikrometer dicke Membran den vorderen Augenabschnitt.[1] Als Teil der äußeren Augenhaut zieht sie von der Sklera (Conjunctiva bulbi) über den Fornix conjunctivae auf die posteriore Oberfläche des Augenlids (Conjunctiva palpebrae).[2] Während sie dem Bulbus nur locker aufliegt, heftet sie sowohl fest an der Rückseite des oberen und unteren Tarsus' als auch am Musculus tarsalis (Müller-Muskel) des Oberlids und den zu diesem äquivalenten, glatten Muskelfasern des Unterlids. Weitere hervorzuhebende Strukturen sind die im medialen Kanthus gelegene Karunkel, welche zahlreiche Talgdrüsen und Haarfollikel aufweist, sowie die Plica semilunaris, die unmittelbar lateral der Karunkel liegt und durch eine vertikale Falte der Konjunktiva gebildet wird (siehe Abbildung 1).[3] So bedeckt die Bindehaut das Auge sowie die Lidinnenseite und stellt die reibungsfreie Beweglichkeit des Bulbus sicher.[4] Außerdem stellt sie eine Barriere zwischen der Bulbusoberfläche und der Orbita dar.[1] Durch die in sie eingelagerten Becherzellen ist sie maßgeblich an der Bildung des Tränenfilms beteiligt.[1, 3, 5, 6]

Während Sklera und Kornea dem Kopfmesenchym entstammen, sind die Konjunktiva sowie das Epithel der Kornea auf das Oberflächenektoderm zurückzuführen. Aus diesem geht auch die Linse hervor, sowie das Epithel der Haut und die Hautanhangsgebilde.

Abbildung 1: Schematischer Sagittalschnitt durch den menschlichen Bulbus. Farblich hervorgehoben sind die verschiedenen Abschnitte der Bindehaut (gelb, rot, grün), sowie die daran angrenzende Oberfläche der Cornea in blau.

Erstellt mit Paint.net 4.1.5



Mikroskopisch betrachtet handelt es sich bei der Bindehaut um ein mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel, welches auf einem lockeren Bindegewebe, der *Tela subconjunctivalis*, liegt (siehe Abbildung 2).[2] Nach Efron et al. beträgt die mittlere Dicke der Konjunktiva $32,9 \pm 1,1 \mu\text{m}$. [1] Sie besteht aus bis zu acht Schichten polygonaler Zellen (meist fünf bis sieben [7]), lediglich die *Conjunctiva palpebrae* weist nur zwei bis drei Reihen kleiner kubischer Zellen auf.[8] Das Stroma wiederum unterteilt Lawrenson et al. lichtmikroskopisch in eine oberflächlichere, drüsenhaltige Schicht mit Lymphozyten und Mastzellen sowie eine tief gelegene fibröse Schicht, die den Hauptteil der Nerven und Blutgefäße enthält.[9] Neben den Zellen, die die Grundstruktur des Epithels ausmachen, lassen sich Becherzellen und reife Langerhanszellen auffinden.[1]

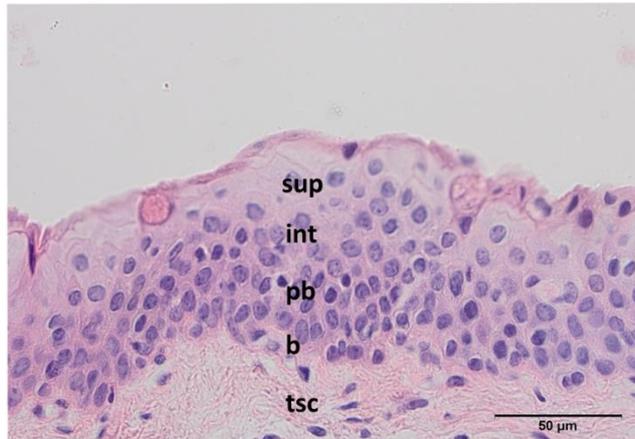


Abbildung 2: **Mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel der Konjunktiva.** sup = Stratum superficiale, int = Stratum intermedium, pb = Stratum parabasale, b = Stratum basale, tsc= Tela subconjunctivalis. (eigene Aufnahme)

Erwähnenswert ist weiterhin, dass die Konjunktiva reich an Zellen der Immunabwehr ist.[2, 6] Analog zum Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) enthält die Konjunktiva ein konjunktiva-assoziiertes lymphatisches Gewebe (CALT), welches sich durch intraepitheliale Lymphozyten, subepitheliale Lymphfollikel sowie benachbarte Lymph- und Blutgefäße auszeichnet. Makroskopisch kann es mithilfe einer Spaltlampe in vivo anhand von konjunktivalen Follikeln nachgewiesen werden.[10] Neben der Immunabwehr durch spezialisierte Zellen sind die Zellen der epithelialen Oberfläche dazu in der Lage bei Pathogenkontakt antimikrobielle Peptide, Zytokine, Lipide sowie Muzine zu produzieren, um die Augenoberfläche zu schützen.[5]

1.1.1. Blutgefäßversorgung der Konjunktiva

Die gesamte Konjunktiva wird hauptsächlich aus Endästen der *A. ophthalmica* versorgt. Diese entspringt der *A. carotis interna* und speist die Gefäße des vorderen Augenabschnittes (*Aa. ciliares anteriores*) und der Augenlider.[11] Abgänge dieser bilden über Anastomosen den komplexen anterioren episkleralen Gefäßkreislauf, von dem aus die limbalen Gefäßarkaden sowie die exzentrisch, radiär verlaufenden konjunktivalen Arteriolen gespeist werden.[12] Die zarten *Aa. conjunctivales anteriores* der *Tunica conjunctivalis bulbaris* sind mit der Konjunktiva verschieblich.[13]

Die venöse Drainage erfolgt über ein Netz feiner Venen, das zwischen den limbalen Arkaden und dem anterioren episkleralen Gefäßkreislauf verläuft. Dieses nimmt das Blut des konjunktivalen Gefäßplexus als auch der limbalen Arkaden auf und leitet es über radiäre Sammelvenen in die die Sklera durchbrechende Emissarvenen (Vortexvenen) weiter.[12] Diese konfluieren über die *Vv. ophthalmica superior et inferior* zu der *V. ophthalmica*, welche in den *Sinus cavernosus* mündet.[4]

1.1.2. Innervation der Konjunktiva

Die konjunktivale Innervation sorgt neben der sensiblen Versorgung auch für die Regulation der Gefäße und der sekretorischen Funktion. Die Nervenäste und freien Nervenenden der Konjunktiva stammen vom ersten (*N. ophthalmicus*) und zweiten Ast (*N. maxillaris*) des *N. trigeminus* (*N. V*) ab. Die relevanten Äste des *N. ophthalmicus* sind der *N. infratrochlearis*, *N. supratrochlearis*, *N. supraorbitalis* und der *N. lacrimalis*, der des *N. maxillaris* der *N. infraorbitalis*. Darüber hinaus werden die konjunktivalen Gefäße sowohl sympathisch über das *Ganglion cervicale superius* als auch parasympathisch über das *Ganglion pterygopalatinum* angesteuert.[14]

1.2. Molekulare Organisation des konjunktivalen Epithels

Das Wirken eines Epithels als Funktionseinheit beruht auf einer strengen Organisation und einem suffizienten Zusammenhalt der beteiligten Zellen. Neben Zellkontakten wie (Hemi-) Desmosomen und Adhärenzkontakten kommt den *Tight Junctions* zwischen den Superficialzellen der Konjunktiva eine besondere Bedeutung zu,[2] da diese maßgeblich an der Ausrichtung der Zellen beteiligt sind.[15]

Zellpolarität definiert sich durch die Asymmetrie von Zellen in Bezug auf ihre Form und ihre räumliche Separation von Proteinen und Zellfunktionen. Dieses Charakteristikum ist essentiell für zahlreiche biologische Vorgänge; von der Zygote bis zur gerichteten Migration, sowie für die apiko-basale Orientierung von Epithelzellen.[16] Um eine spezifische, asymmetrische Struktur der Zelle zu etablieren, sind hoch konservierte Protein-Komplexe von Nöten: der Par-, Crumbs- und Scribble Komplex (siehe Abbildung 3).[17] Aus dem Zusammenspiel dieser mit den Proteinen der interzellulär-Kontakte resultiert eine stabile apiko-basale Achse, die für die Integrität des Gewebes verantwortlich ist.[18]

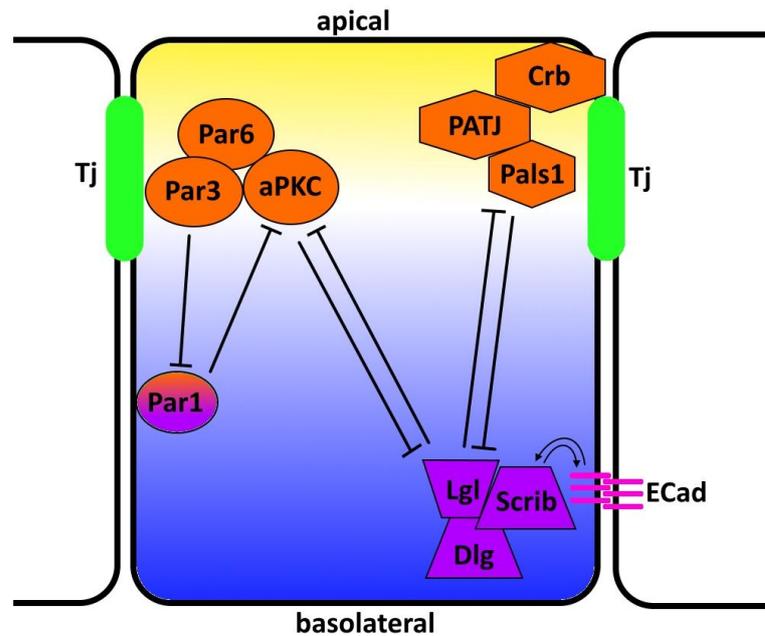


Abbildung 3: **Polarität-determinierende Protein-Komplexe.** Durch gegenseitige Wechselbeziehungen definieren die Protein-Komplexe Par, Crumbs und Scribble den apikalen und basolateralen Membranabschnitt und somit die Polarität der Epithelzelle. aPKC, atypische Proteinkinase; Crb, Crumbs 3; Dlg, Discs-large; Lgl, lethal giant larvae; Patj, Pals1-associated tight junction protein; Scrib, Scribble; ECad, E-Cadherin; Tj; Tight Junctions.

Erstellt mit Paint.net 4.1.5

1.2.1. Par3 als Bestandteil des PAR-Komplexes

Kemphues et al. beschrieben 1988 erstmals eine Gruppe von zunächst fünf Proteinen, die für Defekte in der Embryogenese von *Caenorhabditis elegans* verantwortlich zu machen waren: PAR1-5 (*partitioning defective*).[19] Als 1996 von einem sechsten PAR-Protein berichtet wurde, unterstrich man bereits die Bedeutung dieser Protein-Familie für die Polarisation einer Zelle und die Anordnung innerhalb dieser.[20] So sind die PAR Proteine unabdingbar für eine asymmetrische Zelltrennung, wie sie im frühen Entwicklungsstadium der einzelligen *C. elegans* Zygote zur Blastomere erfolgt.[21]

Der PAR-Komplex setzt sich aus Par3, in der Drosophila Bazooka genannt, Par6 und der atypischen Proteinkinase C, aPKC, zusammen (Par3/Par6/aPKC)[22] und ist gemeinsam mit dem Crumbs-Komplex vornehmlich an den apikalen Anteilen der lateralen Membran lokalisiert. Zusammen halten sie die Struktur dieser Region aufrecht und arbeiten hierbei antagonistisch zum Scribble-Komplex an der basolateralen Membran.[23] Die exklusive apikale Lokalisation von Par3 wird durch die Phosphorylierung mittels eines weiteren Par-Protein, *Par1b*, sichergestellt. Dieses befindet sich wiederum am basolateralen Membranabschnitt, auf welchen es wiederum mittels Phosphorylierung durch aPKC beschränkt wird. Der Crumbs-Komplex wiederum besteht aus dem Transmembranprotein *Crumbs 3* (Crb), *Pals1* sowie dem Pals1-assoziiertem Tight Junction Protein *Patj*. Im basolateralen Abschnitt bilden das Gerüstprotein *Scribble* (Scrib), *Discs-large* (Dlg) und das Adapterprotein *lethal giant larvae* (Lgl2) den Scribble-Komplex. Während die Komplexe des apikalen Abschnitts in enger Beziehung zu den Tight Junctions stehen, gilt dies in Bezug auf Scribble für E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte.[24]

Die Interaktion zwischen den drei Komplexen erfolgt über die einzelnen Bestandteile dieser. Über Mechanismen wie Konkurrenz und Phosphorylierung regulieren sie ihre Aktivität gegenseitig und bewirken somit eine räumliche Restriktion ihrer selbst. Dieser Vorgang ist Grundlage einer Asymmetrie, die für die weitere Polarisation der Zelle von Bedeutung ist. Weitere bedeutsame Interaktionspartner der *polarity complexes* sind offenbar die kleinen GTPasen (auch G-Proteine) der Rho Familie. Diese setzen Signale an der Zelloberfläche in zahlreiche Effekte innerhalb der Zelle um, die von Transkription über Differenzierung bis zu Adhäsion und Migration reichen, aber allesamt mit einem Rearrangement des Zytoskeletts verbunden sind.[17]

In Säugern wird Par3 durch die Gene PAR3A und PAR3B codiert, wobei die Interaktion von PAR3B mit Par6 ungewiss und mit der aPKC scheinbar nicht vorhanden ist. Die Isoformen werden in den verschiedenen Gewebetypen des murinen Organismus unterschiedlich stark exprimiert. Diesbezüglich lässt sich hervorheben, dass sich sowohl PAR3A als auch PAR3B in der Nähe von Zell-Zell-Kontakten, vergesellschaftet mit ZO1 (ein *Zonula occludens* Protein) der Tight Junctions, nachweisen lassen. Für PAR3A wurde gezeigt, dass es vor allem an der Initialphase der Ausbildung von Tight Junctions beteiligt ist und anschließend als *scaffold protein*, als Verbindung des transmembranären Proteins mit dem Zytoskelett, dient.[23] Darüber hinaus geht man davon aus, dass Par3/Par6/aPKC nicht nur in der Integrität des Komplexes funktionieren, sondern zumindest in der Epidermis auch individuelle Aufgaben erfüllen. So beispielsweise im Rahmen von Wundheilungsprozessen.[25]

1.2.1.1. Physiologisches Expressionsmuster von Par3 in der Epidermis

Eine Expression von Par3 lässt sich in gesunder Epidermis, in Haarfollikeln sowie geringfügig in der Dermis nachweisen. Färbungen von Epidermis-Schnitten mittels Immunhistochemie zeigen sich vor allem in den basalen und suprabasalen Zellschichten positiv für Par3. Dies gilt auch für Epidermis in unmittelbarer Nachbarschaft von Tumoren. Kohärent mit der Annahme, dass Par3 nahe Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist, präsentiert es sich in Kryoschnitten als eine membranäre Färbung, in Paraffin eingebetteten Schnitten hingegen eher als eine cytoplasmatische, nicht eindeutig membranäre, diffuse Färbung vorwiegend im unteren Drittel der Epithelzellschichten.[26] Auch Helfrich et al. konnte Par3 in Paraformaldehyd fixierten murinen Epithelpräparaten basal im Cytoplasma und suprabasal vornehmlich im Bereich der Zell-Zell-Kontakte nachweisen.[25]

1.2.2. Das Transmembranprotein E-Cadherin

Das Adhäsionsprotein E-Cadherin, CDH1, ist essentiell für die Ausbildung interzellulärer Kontakte, es spielt aber auch in zahlreichen anderen Prozessen eine Schlüsselrolle.[18] Als „klassisches“ Cadherin ist es das am besten untersuchte Mitglied der großen Familie der Cadherine. Bei diesen handelt es sich um transmembranäre oder membranassoziierte, kalziumabhängige Adhäsionsmoleküle. Ob seiner frühen Identifikation und gründlichen Beschreibung wird E-Cadherin auch als Prototyp aller Cadherine betrachtet.[27] Nach der mutmaßlichen Erstbeschreibung 1977 durch Takeichi [28] lag das Hauptaugenmerk des zunächst als Uvomorulin[29] oder auch CAM (Cell Adhesion Molecule)[30] bezeichneten Proteins auf seiner Funktion als Adhärenzmolekül. Später führte Takeichi den heute gebräuchlichen Begriff Cadherin (*Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule*) ein.[31] Das Präfix „E“ für Epithel ist aus den Funden verschiedener Cadherine erwachsen und betont die Gewebsspezifität.[27] Das Pendant zum humanen CDH1 ist in der *Drosophila melanogaster* das Protein *shotgun*. [18]

1.2.2.1. Interzelluläre Verankerung via E-Cadherin

Das durch das CDH1-Gen codierte humane E-Cadherin[32] ist ein phylogenetisch altes *single-pass* Transmembran-Glycoprotein.[18] Der extrazelluläre Part besteht aus fünf repetitiven Domänen (EC1-5), wobei die membranständige MPED, *Membrane Proximal Extracellular Domäne*, genannt wird. Dieser Abschnitt wird durch vier Cysteine charakterisiert. Die Reduktion der dort lokalisierten Disulfidbrücken führt zur Ausbildung starker Zell-Zell-Kontakte. Über die Ca^{2+} -Bindungsstellen der Ektodomänen kommt es zu einer homophilen Quervernetzung der E-Cadherine benachbarter Zellen.

Der intrazelluläre Abschnitt lässt sich in eine juxtamembranäre und eine Catenin-Bindende Domäne unterteilen.[27] Dieser Teil interagiert mit multiplen cytoplasmatischen Proteinen. Von besonderer Bedeutung ist die Assoziation mit α E- und β -Catenin, denn diese bilden gemeinsam mit E-Cadherin den sogenannten Cadherin-Catenin-Komplex (CCC).[18, 27]

Die auf E-Cadherin zurückzuführende Signalgebung, *Cell-Signaling*, wird im Wesentlichen indirekt über seine Interaktionspartner übermittelt. So kann zum Beispiel die Endodomäne des E-Cadherin das Proto-Onkogen β -Catenin binden und abbauen, woraus eine Reduktion der Proliferation resultiert.[33] Neben der Tatsache, dass E-Cadherin in etliche Signalwege involviert ist, ist es in der Lage die Liganden-abhängige Signalgebung einiger Tyrosin-Kinasen-Rezeptoren zu inhibieren. Dies trifft auf den *EGF*-Rezeptor (Epithelial Growth Factor), *HER2* (human epidermal growth receptor 2), den *IGF-1* Rezeptor (Insulin like Growth Factor) sowie *c-MET*, der den Hepatocytes Growth Factor *HGF* bindet, zu.[34] Weiterhin erwähnenswert ist, dass Adhärenzkontakte, an deren Ausbildung E-Cadherin wie bereits erwähnt, beteiligt ist, die Integrität des Gewebes nicht nur durch die mechanischen Verbindungen der Zellen untereinander aufrechterhalten, sondern auch als Ankerpunkte der apiko-basalen Orientierung dienen. Adhärenzkontakte und Polarität-definierende Protein-Komplexe regulieren somit reziprok ihre Lokalisation. Zugleich wird so die relative Höhe der basolateralen Membran und die asymmetrische Verteilung der Zellkompartimente bestimmt.[18]

1.2.2.2. Physiologisches Expressionsmuster von E-Cadherin in der Epidermis

Bereits für „Uvomorulin“, das später in E-Cadherin umgetauft wurde ließ sich eine Lokalisation nahe der Zell-Zell-Kontakte nachweisen.[35] In gesunder Epidermis wird E-Cadherin entlang der gesamten Zellmembran exprimiert. Ausnahmen bilden die basale Membranseite der

Basalzellschicht sowie die apikale Seite der obersten Zellschicht.[36] In Drüsengewebe findet sich E-Cadherin folglich lediglich an der basolateralen Oberfläche der Zelle, da die apikale Seite das Lumen abgrenzt.[37]

Die Lokalisation an der Membran ist für die Funktionalität des E-Cadherins unabdingbar. Sowohl eine Akkumulation im Endoplasmatischen Retikulum als auch die Endozytose via E3-Ubiquitin-Ligase Hakai bewirken einen Verlust der Zell-Adhäsion.[38, 39]

1.3. Tumorgenese

Die Entstehung von malignem Gewebe ist ein Prozess, der viele Zwischenschritte voraussetzt. Grundlegende Elemente sind genetische Aberrationen, auf deren Basis Zellen zu einer gesteigerten Proliferation übergehen. Charakteristisch ist, dass zugleich die Apoptoserate reduziert wird und es zu einer „Immortalisierung“ der Zellen kommt. Maligne Tumoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie neben dem autonomen Wachstum zu Invasion und Metastasierung neigen. Wesentliche Voraussetzungen für die Invasion sind das Auflösen von Zell-Zell-Kontakten, Um- und Abbau der extrazellulären Gewebematrix sowie die Migration der Zellen im Gewebe. Wesentliche Aspekte dieses Prozesses werden in der Epithelial-Mesenchymalen Transition widergespiegelt. Der erste Schritt der Metastasierung, die Intravasation, folgt den Prinzipien der Invasion. Anschließend kommt es in Folge der Verschleppung der malignen Zellen und der Extravasation dieser zur Ausbildung von Metastasen.[40]

1.3.1. Epitheliale-Mesenchymale Transition

Die Epitheliale-Mesenchymale Transition, kurz EMT, beschreibt einen Prozess, bei dem ursprünglich kohäsive, apiko-basal ausgerichtete Epithelzellen ihre Adhäsions-Kontakte verlieren, den Zellverband verlassen, die Basalmembran durchbrechen und sich frei, einer mesenchymalen Zelle ähnlich im darunterliegenden Stroma bewegen. Auf diesem Weg vermögen maligne Zellen die natürliche Barriere der Basalmembran zu überschreiten und von einem begrenzten in ein invasives Wachstum überzugehen.

Zahlreiche epigenetische sowie post-translationale Modifikationen sind in der Lage E-Cadherin zu reduzieren und EMT damit zu evozieren.[41] E-Cadherin kann folglich als ein zentrales Element der EMT betrachtet werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass es in manchen Tumorgeweben nicht nur zu einem einfachen Verlust, sondern zu einem Wechsel von E-Cadherin zu mesenchymalen N-Cadherin kommt. Dieses *Cadherin-Switching* unterstützt das Überleben der Tumorzellen und ihre Beweglichkeit in Bezug auf Invasion und Metastasierung.

Über welche intra- und extrazellulären Signalwege der Par-Komplex in die MET involviert ist, ist bisher noch wenig verstanden. Für aPKC, welches sich aus den Untereinheiten PKC ι und PKC ζ zusammensetzt, konnte eine beträchtliche Beteiligung in der Entwicklung von Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) nachgewiesen werden. Die Untereinheit PKC ι wird als humanes Onkogen betrachtet, da es mehrfach mit dem Prozess der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden konnte. Im Zusammenhang mit Par6 scheint der *Transforming Growth Factor β* (TGF β), welcher erwiesenermaßen EMT reguliert, eine Rolle zu spielen. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass Par6 ebenfalls an den TGF β -Rezeptor bindet und andererseits Par6 selbst durch TGF β phosphoryliert wird. Letzteres hat wiederum ein Re-Arrangement des Cytoskeletts sowie einen Verlust der Zell-Zell-Kontakte zur Folge und führt somit zur EMT und letztlich Metastasierung.[42] Auch eine Beziehung zwischen dem *Signaling* des Par3 und Tumorgenese wurde bereits nahegelegt. Im Gegensatz zu der bisher wenig untersuchten Konjunktiva liegen für die beiden häufigsten Tumorentitäten - das Prostatakarzinom beim Mann und das Mammakarzinom der Frau -[43] Ergebnisse vor, die auf einen Par3 geschuldeten Verlust der Polarität der jeweiligen Zellen hinweisen. In Bezug auf die Epithelzellen der Mamma kommt es durch eine Überexpression des Tyrosinkinase-Rezeptors ErbB2/HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) neben einer Interaktion mit Par6/aPKC auch zu einer destabilisierten Bindung zwischen Par3 und aPKC.[44] In entarteten Prostatazellen konnte *in vivo* und *in vitro* eine Überexpression der Tyrosin-Phosphatase *Shp2* nachgewiesen

werden, welche wiederum mit Par3 interagiert.[45] Als ein weiteres Beispiel lässt sich die durch das *Helicobacter pylori* Cytotoxin-assoziierte Gen A unterbundene Phosphorylierung von Par1 durch Par3 nennen, die zu einer Dissoziation von Par1 von dem basolateralen Kompartiment führt.[46] Par1 spielt jedoch eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Lokalisation des Par-Komplexes im apikalen Zellmembran-Abschnitt und somit der Symmetrie der Zelle (s. 1.2).

1.3.2. Par3 und Tumorgenese

Bisher durchgeführte Studien konnten für alle drei *polarity complexes* Hinweise darauf liefern, dass sie in die Tumorgenese involviert sind oder in Tumoren aberrante Expressionsmuster, wie Überexpression oder Runterregulation (*Up-* und *Downregulation*), dieser vorliegen. Bei dem am besten untersuchten Komplex Scribble weiß man um seine Eigenschaft als Tumorsuppressor. Auch für den Crumbs-Komplex nimmt man dies an. Anders verhält es sich jedoch bei dem PAR-Komplex, denn dieser scheint als Tumor-Promoter und Tumor-Suppressor einen ambivalenten Charakter zu besitzen.[17]

Die Überexpression der aPKC, wie sie in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte, geht mit einer gesteigerten Cyclin E Expression einher und ist ein Index für eine schlechte Prognose.[17] Ein Protein-Verlust unterdrückt hingegen die Ausbildung Ras-induzierter Lungentumoren in der Maus.[47]

Eine Überexpression von Par6 spielt in der Entwicklung des murinen als auch in der des humanen Brustkrebses eine Rolle und ist hier mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Im Gegensatz dazu weist eine vermehrte Expression im Stroma eines NSCLC auf eine günstigere Prognose hin.[17] Wird Par6 durch TGF β phosphoryliert, kommt es via Ubiquitin zum Abbau von Tight Junctions und konsekutiv zur EMT und zum Aufbrechen des Zellverbandes. Auch aPKC ist zur Phosphorylierung von Par6 fähig.[48] Die Aktivierung von ErbB2, welches HER2 kodiert, kann mit Par6/aPKC interagieren und so zur Störung der Gewebsarchitektur und einem Aufbrechen der Drüsenstrukturen in Brustgewebe führen.[44]

Ein vollständiger Verlust von Par3 ist bereits in der murinen Embryogenese letal.[49] Ein ausschließlich epidermaler Verlust ist dagegen mit einer vermehrten Differenzierung und Epitheldicke assoziiert.[50] Je nach Tumorentität wird kontrovers berichtet. So ist Par3 im Karzinom der Mamma runterreguliert und treibt in Interaktion mit ErbB2 die Tumordinvasion und Metastasierung voran.[51, 52] Ebenso zeigten Untersuchungen an ösophagealen Plattenepithelkarzinomen eine reduzierte Par3-Expression, welche jedoch mit Lymphknotenmetastasen und einer schlechteren Differenzierung einherging.[53] Im Kontrast dazu lässt sich eine Überexpression im klarzelligen Nierenzellkarzinom, im Besonderen bei einer aberranten, cytoplasmatischen Par3 Expression, mit einer infausten histopathologischen und klinischen Prognose sowie einem verkürzten tumorfreien Intervall und Überleben allgemein in Verbindung bringen.[54, 55] Eine ähnliche Konsequenz hat die Überexpression von Par3 im hepatozellulären Karzinom, welche sich bei über 100 untersuchten Fällen in fast 50% nachweisen ließ.[56] Das Karzinom der Konjunktiva wurde diesbezüglich noch nicht untersucht.

Iken et al. konnte in Mäusen, deren Par3 in der Epidermis sowie in den Haarfollikeln ausgeschaltet wurde, sowohl eine reduzierte Anzahl als auch Wachstumsrate von Ras-induzierten Papillomen nachweisen. Die Zahl der ebenfalls Ras-induzierten Keratoakanthome stieg hingegen signifikant an. Analog weisen auch humane Keratoakanthome eine reduzierte Par3 Expression vor. Die tumorfördernde Funktion von Par3 scheint auf der Regulation der Apoptose und des Wachstums zu beruhen, da diese bei Par3-Verlust gesteigert beziehungsweise reduziert sind.[26] So wie auch die Interaktionen der *polarity complexes* und die Effekte der von ihnen ausgelösten Kettenreaktionen stark vom Zelltyp und Kontext abhängen,[17] so unterstreichen die oben genannten Funde die Variabilität der Einflüsse von Par3 auf die Tumorgenese.

In Bezug auf maligne Melanome wurde Par3 jüngst ein nicht-Zell autonomer Effekt zugeschrieben. Das durch Keratinozyten exprimierte Par3 nimmt als ein extrinsischer Faktor über die Modulation direkter und Kalzium-abhängiger Zell-Zell-Kontakte mittelbar Einfluss auf die Proliferations- und Apoptoserate der benachbarten Melanozyten. Die mit einem Verlust von epidermalen Par3 assoziierte gesteigerte Expression von P-Cadherin forciert ihrerseits die Invasion und Metastasierung des Melanoms. Die Progression des malignen Melanoms scheint demnach negativ mit der Expression des epidermalen Par3 zu korrelieren.[57] Aber auch hier liegen bisher keine Ergebnisse zur humanen Konjunktiva vor.

Während sich die Expression von Par3 in squamösen Läsionen teilweise geradezu paradox verhält, ist ein Verlust von Par3 in malignen Melanomen der Haut nicht zu verzeichnen. Bemerkenswert ist jedoch, dass dies in den benachbarten Gewebeabschnitten, para-läsional, der Fall ist. Nach Mescher et al. zeigte sich in murinen Gewebeproben gegenüber der Kontrolle eine deutliche Reduktion des Immunfluoreszenz-Signals.[57]

1.3.3. E-Cadherin und Tumorgenese

Im Rahmen von Entartung gehen einige Adhäsionsmoleküle verloren, während die Aktivität anderer induziert wird. Die Reduktion von E-Cadherin scheint in der Tumorgenese sowie in späteren Stadien, bei der Tumorinvasion und der Metastasierung, eine erhebliche Rolle zu spielen. Die Kausalität, ob es sich bei der gestörten Expression von E-Cadherin um die Ursache des malignen Prozesses oder um ein Resultat dessen handelt, konnte anhand von Pankreaszellen im Mausmodell geklärt werden. Hier führt ein Proteinverlust zu Invasion und Metastasierung, während der Erhalt ein Sistieren der Entartung im Adenom-Stadium zur Folge hat.[58] Kohärente Resultate erzielte Vleminckx et al. durch die Transfektion von Zellen mit E-Cadherin kodierender cDNA beziehungsweise spezifischer anti-sense RNA.[59] Mit cDNA transfizierte Tumorzellen stellen ihr invasives Wachstum ein, während Anti-E-Cadherin-Antikörper dieses wieder provozieren.[59, 60]

Eine entscheidende Rolle bei der E-Cadherin-assoziierten Tumorgenese spielt der Verlust der Heterozygotie (*Loss of Heteozygosity, LOH*), wie er im Karzinom des Magens, des Ösophagus, der Leber, der Brust und der Prostata nachgewiesen wurde. Aber auch die Hypermethylierung der CDH1 Promoter-Region, Out-of-Frame und Miss-Sense Mutationen können zu einer teilweisen oder vollständigen Inaktivierung des E-Cadherins führen.[27] Post-transkriptional kann es durch den Abbau im Endoplasmatischen Retikulum im Sinne einer Qualitätskontrolle oder durch die Abspaltung der Ektodomäne durch Stromelysin zu einem funktionellen Verlust von E-Cadherin kommen.[38, 61]

Die Invasivität entarteter Zellen beruht zum Teil auf dem Verlust der Zell-Zell-Kontakte,[60] zu welchem die Störung des E-Cadherin beiträgt. Der anti-invasive und anti-metastatische

Charakter des funktionstüchtigen E-Cadherins[27] kommt darin zum Ausdruck, dass besonders aggressiv wachsende Karzinome, wie das diffus wachsende Magenkarzinom und das lobulären Mammakarzinom, negativ für E-Cadherin sind.[37, 62–64] Hingegen weisen ähnliche, aber weniger invasive Entitäten noch eine E-Cadherin-Expression auf.[37] Konsekutiv ist eine verminderte Expression des Adhärenzproteins mit einer schlechteren Prognose assoziiert.[65, 66] Darüber hinaus können Keimbahn-Mutationen des CDH1-Genes mit dem familiären Magenkarzinom (*Hereditary Diffuse Gastric Cancer*, HDGC) in Verbindung gebracht werden.[67, 68]

Wie bereits erwähnt, wirkt E-Cadherin inhibierend und somit antiproliferativ auf das Proto-Onkogen β -Catenin und die Tyrosinkinase-Rezeptoren, welche häufig in Tumoren aktiv sind.[33, 34] Letztere, wie c-Met und der EGF-Rezeptor, können ihrerseits über Phosphorylierung die Internalisierung und Degradation von E-Cadherin durch die oben genannte E3-Ubiquitin Ligase Hakai bewirken.

Die obigen Erläuterungen unterstreichen, dass der Prozess der Entwicklung von Karzinoma mit einem graduellen Verlust von E-Cadherin einhergeht; der Erhalt des Adhäsionsproteins hingegen lässt sich statistisch mit einer guten Prognose vereinbaren.[69]

Die Expression von E-Cadherin in melanozytären Läsionen ist differenzierter zu betrachten. In melanozytischen Nävi findet sich eine membranäre E-Cadherin Expression vornehmlich an der Grenze zu den Keratinozyten sowie in den oberflächlichen Anteilen. Einzeln vorliegende Melanozyten sind für E-Cadherin negativ. Erwähnenswert ist weiterhin die verminderte Immunoreaktivität Melanom-benachbarter Keratinozyten, während sich bei diesen in Nachbarschaft von melanozytischen Nävi eine membranäre E-Cadherin Expression nachweisen lässt. Metastasen des Melanoms zeigen sich bei Silve et al. ausnahmslos mit einer membranären E-Cadherin Expression.[36] Der Übergang von einem radiären zu einem vertikalen und somit invasivem Wachstum des Melanoms zeichnet sich durch den Verlust von E-Cadherin und dem Einsetzen einer aberranten N-Cadherin Expression aus.[70]

1.4. Tumoren der Konjunktiva

Die Tumorentitäten der Augenoberfläche sind vielfältig. Ihrer Herkunft nach lassen sie sich in stromal, epithelial, der Karunkel oder einem distanten Primarius entstammend gruppieren. Tumoren epithelialen Ursprungs lassen sich wiederum in melanozytäre und nicht-melanozytäre Läsionen unterteilen. Als benigne Entitäten sind hier unter anderem melanozytäre Nävi beziehungsweise verschiedenartige Papillome aufzuführen. Zu den malignen Tumoren zählen einerseits das Melanom andererseits auch die plattenepitheliale Neoplasie der Augenoberfläche (*Ocular Surface Squamous Neoplasia, OSSN*). Letztere umfasst sowohl die Vorläuferläsionen, die konjunktivale intraepitheliale Neoplasie (*Conjunctival Intraepithelial Neoplasia; CIN*), als auch das invasive Plattenepithelkarzinom (*PEC, Squamous Cell Carcinoma, SCC*).[71]

1.4.1. Plattenepitheliale Neoplasien der Augenoberfläche

Die OSSN ist die häufigste maligne Neubildung der Konjunktiva.[71, 72] Meist findet sich das Plattenepithelkarzinom in der limbalen Region (65%), wobei eher ältere männliche Patienten betroffen sind.[73] Beispiele für Risikofaktoren sind nicht nur UV-Exposition und ein heller Hauttyp, sondern auch chronische Infektionen mit dem HIV oder Hepatitis B- und C-Virus[72]. Analog zur Entstehung maligner Läsionen der *Cervix uteri* geht man davon aus, dass die humanen Papilloma Viren 16 und 18 an der Entwicklung der konjunktivalen intraepithelialen Neoplasie beteiligt sind.[74]

In der Regel tritt die OSSN einseitig auf, gelegentlich beim immunsupprimierten Patienten auch beidseitig. Sie imponiert häufig als eine fleischige oder knotige, breitbasige Erhabenheit, mit einsprossenden Gefäßkonvoluten und einer sekundären Entzündung und Rötung des Auges. Darüber hinaus kann die Läsion eine Keratinisierung oder eine Pigmentierung aufweisen. Es kann zu grau-opalen, nahezu avaskulären gelatinösen oder papilliformen Ausläufern kommen, die auf die Kornea übergreifen. Im fortgeschrittenen Stadium kann es zu Infiltrationen der Kornea und der Sklera kommen. Regionale oder Fernmetastasen sind möglich.[71]

Die Unterscheidung zwischen einer CIN und einem PEC kann klinisch nicht sicher getroffen werden, sondern erfolgt nach histologischen Kriterien. CIN-Läsionen werden ihrerseits in drei Schweregrade unterteilt. Für die Unterteilung ist der Anteil der Epithelhöhe, der von dysplastischen Zellen durchsetzt ist, entscheidend. Ist ein Drittel der Höhe betroffen, handelt es sich um ein CIN I, bei zwei Dritteln um ein CIN II und bei einem vollständig betroffenen Epithel um ein CIN III. Durchbrechen die entarteten Zellen die Basalmembran spricht man von einem invasiven PEC, welches nach der TNM-Klassifikation eingeteilt werden kann.[72] Im Falle von einer CIN III wird auch von einem *Carcinoma in situ*, CIS, gesprochen.[75]

Für eine kurative Therapie sollte die Läsion operativ vollständig entfernt werden. Adjuvant kommen eine Kryotherapie sowie eine topische Behandlung mit Mitomycin C, Interferon- α -2b oder 5-Fluouracil in Frage. Gelingt keine R0 Resektion, kann eine Brachytherapie in Betracht gezogen werden. Die Prognose ist insgesamt gut, wenngleich die lokale Rezidivrate bei etwa 5% liegt.[71] Die Mortalitätsrate wird mit bis zu 8% angegeben und ist durch Fernmetastasen bedingt.[72]

1.4.2. Melanozytäre Neubildungen der Konjunktiva

Zu den prinzipiell benignen Pigmentierungen der Konjunktiva zählt neben dem Nävus, der *racial* Melanosis und der *Melanosis oculi* auch die primär erworbene Melanose (*Primary Acquired Melanosis, PAM*). Man unterscheidet eine PAM danach, ob sie Zellatypien aufweist oder nicht. Erste weist in fast 50% der Fälle einen Progress zu einem Melanom vor, während eine PAM ohne Atypien kein Entartungsrisiko in sich birgt.[76] Wegen dieses Risikos wurde der Begriff C-MIN (*Conjunctival Melanocytic Intraepithelial Neoplasia*) mit und ohne Atypien eingeführt.[77]

Das maligne Melanom der Bindehaut lässt sich in etwa 75% der Fälle auf eine PAM und in 20% auf einen melanozytären Nävus zurückführen. Nur in etwa 5% entsteht das Melanom de-novo. UV-Exposition als Ursache ist umstritten, da Melanome auch im Fornix auftreten.[71] Laut Shields und Shields sind die Patienten im Median 62 Jahre alt.[76] Allerdings zeichnet sich keine Geschlechtspräferenz ab.[71]

Das konjunktivale Melanom tritt prinzipiell in der gesamten Bindehaut auf, bevorzugt jedoch in der limbalen und extralimbale bulbären Konjunktiva.[73] Trotz des konjunktivalen Ursprungs scheint es jedoch gelegentlich vornehmlich auf der Kornea lokalisiert zu sein. Charakteristisch sind die nicht immer pigmentierte erhabene Struktur, die radiär verlaufenden Blutgefäße sowie die benachbarte PAM.[76] Stammt das Melanom von einer PAM ab, kann es sich multifokal, diffus und weniger scharf begrenzt präsentieren. In seltenen Fällen kann es sich um eine Abtropfmetastase eines Melanoms des Lidrandes handeln.[71]

Die operative Entfernung des Tumors ist auch hier der Goldstandard. Umstritten ist jedoch die adjuvante Kryotherapie, der bei einem lokalen und gut zugänglichen Wachstum eine Brachytherapie mit Ruthenium¹⁰⁶ vorgezogen werden soll (Rezidivrate 50% vs. 19,4%). Des Weiteren wird eine lokale Mitomycin C Therapie empfohlen, die auch bereits bei PAM Anwendung findet.[72] Das Risiko trotz Therapie ein Rezidiv zu erleiden liegt in den ersten 10 Jahren bei 50-70% und die Mortalitätsrate in diesem Zeitraum wird mit rund 25% angegeben.[71] Auch die konjunktivalen Melanome können nach der AJCC-TNM-Klassifikation unterteilt werden.[72]

1.5. Herleitung der Fragestellung

Vorgänge rund um die Tumorgenese und den Tumorprogress sind Gegenstand vieler Forschungsarbeiten, doch lediglich eine Minderheit beschäftigt sich mit der Konjunktiva. Die dort am häufigsten vertretenen malignen Tumoren, das Plattenepithelkarzinom und das maligne Melanom, treten zwar relativ selten auf, können allerdings trotz multimodaler Therapie Rezidive oder den Tod zur Folge haben.[72]

Die Technik der Immunhistochemie erlaubt nicht nur Rückschlüsse auf die Entität eines Gewebes und somit dessen Herkunft, sondern auch auf die Prognose und die therapeutischen Möglichkeiten. Wie bereits geschildert lässt vor allem die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin Aussagen über die Prognose des Patienten zu. Aber auch eine Runter- oder

Hochregulation der Expression von Par3 korreliert je nach Tumorentität mit einem schlechteren Ausgang der Erkrankung. Bezüglich des Plattenepithelkarzinoms, welches meist am kutanen Plattenepithel untersucht wird, ist ein gradueller Verlust von E-Cadherin im Rahmen von Entartung bekannt,[69] während Par3 weitgehend erhalten zu sein scheint.[26] In malignen Melanomen der Haut konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin in Abhängigkeit von der Wachstumsphase progredient verloren geht.[70] Par3 hingegen ist in der melanozytären Läsion erhalten, wobei die benachbarten Keratinozyten eine deutlich reduzierte Expression aufweisen.[57] Für das maligne Melanom der Konjunktiva, sowie das Plattenepithelkarzinom der Konjunktiva ist die Expression von PAR3 und E-Cadherin bisher vollständig unbekannt.

Aus diesen Erörterungen lassen sich die wesentlichen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit herleiten:

(1) Deskriptive Analyse des Expressionsmusters von E-Cadherin und Par3. Im malignen Melanom und dem Plattenepithelkarzinom der Konjunktiva sowie deren Vorläuferläsionen soll (a) eine vermeintliche Reduktion von E-Cadherin im entarteten Gewebe nachgewiesen werden, während es (b) auf ein verändertes Expressionsmuster des Par3 zu prüfen gilt.

(2) (Semi-) Quantitative Analyse von E-Cadherin und Par3. Aufbauend auf A soll die Intensität der Färbung als Surrogat-Parameter für das Maß der Expression beider Proteine, E-Cadherin und Par3, dienen. Eine graduelle Runterregulation oder eine ebensolche Überexpression, welche proportional zum Grad der Entartung auftritt, könnte in der Beurteilung der Malignität sowie der Prognose an Bedeutung gewinnen.

([3] Vergleich der Protein-Expressionen innerhalb des atypischen Bereiches mit einem benachbarten, gesunden Bindehautabschnitt. Letzterer kann als interne Kontrolle gewertet werden, anhand dessen man die Intensität der Expression im Malignen bewerten kann.)

Um losgelöst vom murinen Modell eine Aussage über die menschliche Bindehaut treffen zu können, wurden intraoperativ entnommene, humane Präparate aufgearbeitet.

2. Material und Methoden

2.1. Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Die Funktionsweise der bereits in den 1940ern beschriebenen immunhistochemischen Färbung [78] basiert auf der antigen-spezifischen Bindung von Antikörpern (Antigen-Antikörper-Reaktion). Das Antigen ist hierbei die zu identifizierende und lokalisierende Struktur im untersuchten Gewebe, welche von dem Antikörper gebunden wird.[2] Im ersten Schritt des Färbeprozesses werden die Antigen-spezifischen Antikörper auf das Präparat gegeben. Nachdem diese ihr Epitop gebunden haben, werden die entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe wie folgend beschrieben sichtbar gemacht.

Zu unterscheiden sind die direkte und indirekte Nachweismethode sowie monoklonale und polyklonale Antikörper. Bei einem direkten Nachweis ist der Antikörper mit einem Markermolekül beladen, welches nach abgelaufener Reaktion nachgewiesen werden kann. Gibt man einen weiteren Antikörper (Zweit-Antikörper) hinzu, welcher spezifisch für das Fc-Fragment des zuvor verwendeten Antigen-spezifischen Antikörper (Erst-Antikörper) ist, handelt es sich um einen indirekten Nachweis. In diesem Fall ist das Markermolekül an den zweiten, anstatt an den ersten Antikörper gebunden. Besagte Marker können etwa Enzyme sein, die das dementsprechend zugesetzte Substrat in einen unlöslichen Farbstoff umsetzen, oder ein fluoreszierender Farbstoff, welcher durch Ultrablau oder -violettstrahlung zur Emission von Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden kann. So kann der Antigen-Antikörperkomplex im Gewebe mit einem Lichtmikroskop beziehungsweise einem speziellen Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.[40] Der Vorteil der indirekten gegenüber der direkten Immunhistochemie besteht in der Amplifizierung des Signals.[78]

Polyklonale Antikörper werden erzeugt, indem Tiere mit gereinigtem Antigen geimpft werden. Durch die provozierte Immunreaktion werden von mehreren B-Zellen Antikörper produziert, die dann dem später entnommenen Serum enthalten sind. Die Spezifität der monoklonalen Antikörper ist höher, da diese in vitro aus einem Stamm immortalisierter B-Zellen gewonnen werden, welche auf nur ein Epitop spezialisiert sind.[40] Die Kapazität verschiedene Epitope eines vielgestaltigen Antigens zu binden, die Avidität, des polyklonalen Antikörpers ist höher, sodass es häufiger zu unspezifischen Bindungen kommt. Dieses Phänomen ist verantwortlich für eine unerwünschte Färbung des Hintergrundes.[79]

2.2. Färbung der Bindehaut-Exzidaten

2.2.1. Untersuchungsmaterial

Die Bindehaut-Proben lagen als Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Blöcke im ophthalmopathologischen Archiv der Universitätsaugenklinik Köln vor. Die Gewebeproben wurden intraoperativ entnommen und nach der histopathologischen Befundung archiviert. Die Verwendung dieser erfolgte in Einklang mit den Vorgaben der Helsinki-Deklaration, sowie mit dem Einverständnis des lokalen Ethik-Komitees und dem der operierten Spender, beziehungsweise stellvertretend derer Angehörigen. Insgesamt standen 10 CIN-Läsionen, 3 Karzinome, 2 Melanoma in situ und 17 Melanome zur Verfügung. 2 Karzinome wurden aus Toronto (Division of Pathology, St. Michael's Hospital, 30 Bond Street, Toronto, Ontario, Kanada) zur Verfügung gestellt, ebenfalls nach den ethischen Vorgaben wie oben beschrieben, und haben einen äquivalenten Hintergrund zu den Präparaten aus Köln. Das Patientenalter betrug zum Zeitpunkt der Entnahme im arithmetischen Mittel $68,39 \pm 10,57$ Jahre. Eine genauere Aufschlüsselung ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

2.2.2. Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Mithilfe eines Schlittenmikrotoms (LEITZ, Wetzlar, Deutschland) wurden von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben 3 µm dicke Schnitte abgetragen. Diese wurden anschließend mit einem Pinsel von der Klinge in ein kaltes Wasserbecken transportiert, um sie dort kurz zwischenzulagern. Anschließend wurden sie in ein 50°C warmes Wasserbad gegeben und bis zur Streckung gebadet. Daraufhin erfolgte das Aufziehen auf einen Superfrost Objektträger. In

einem Trockenschrank wurden die Schnitte bei 37°C mindestens 48 Stunden gelagert bis sie zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung standen.

	Anzahl	Alter [Jahre]		
		Arithmetisches Mittel	Standardabweichung	Median
CIN 1-2	4	64,75	4,76	62
CIN 3	6	65,67	7,36	65
Karzinome	3	68,67	12,66	69
Melanoma in situ	2	68	17	68
Melanome	17	74,88	11,09	74
Gesamt	32	68,39	10,57	67,6

Tabelle 1: **Alter der Patienten in Abhängigkeit der exziierten Entität.**

2.2.3. Färbung mittels Hämatoxylin und Eosin

Die oben beschriebenen Schnitte wurden zunächst einer Färbung mittels Hämatoxylin und Eosin (HE) unterzogen, mit dem Ziel die histologischen Strukturen darzustellen und eine Beurteilung der Dignität zu erlauben.

Materialliste Hämatoxylin-Eosin Färbung:

Xylol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2- Propanol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Aqua dest., Ampuwa® Fresenius Kabi, Sevrès, Frankreich

Hämalaun nach Mayer, Merck, Darmstadt, Deutschland

Eosin 1%ig, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaisers Glyceringelatine, Merck, Darmstadt, Deutschland

Superfrost Objektträger, Thermo scientific, Braunschweig, Deutschland

2.2.3.1. Durchführung der Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin

Um die Schnitte für den folgenden Prozess vorzubereiten, wurden sie mittels Xylol entparaffiniert. Anschließend erfolgte über eine absteigende Alkohol-Reihe (2-Propanol, 70 und 50%) die Rehydrierung mit einer darauffolgenden Waschung in destilliertem Wasser. Für die eigentliche Färbung wurden die Objektträger für 10 min in Hämalaun gebadet, mit Aqua dest., anschließend mit Leitungswasser gewaschen und für weitere 10 min zum Bläuen in lauwarmes Leitungswasser gegeben. Nach einem weiteren Waschvorgang mit destilliertem Wasser erfolgte eine fünfminütige Färbung mit Eosin, welcher sich wiederum das Waschen mit destilliertem Wasser respektive 70%igem und 100%igem Propanol anschloss. Im Folgenden wurden die Objektträger für jeweils zweimal 2 min in 100%iges Propanol und anschließend in Xylol gegeben. Abschließend wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt und bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

2.2.3.2. Dokumentation und Grading der HE gefärbten Präparate

Repräsentative Ausschnitte des konjunktivalen Epithels wurden in 25-facher und 60-facher Vergrößerung fotografisch festgehalten. Hierzu wurde ein Leica DM 2500-Mikroskop (Leica GmbH, Wetzlar, Germany) in Kombination mit einer JVC Digitalkamera KY-F75U (JVC, Yokohama, Japan) verwendet. Bei weiteren Aufnahmen fand das motorisierte BX53/43 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit der dazu gehörigen Software CellSens Dimension (Version 1.14, Olympus, Hamburg, Deutschland) Anwendung. Anhand dieser Aufnahmen und die histopathologischen Befunde beachtend wurden die Präparate den Kategorien CIN1-2, CIN3, Karzinom, M.i.s. und Malignes Melanom zugeordnet (Abbildung 4). Kriterien hierfür stellten die

Höhe der entarteten Zellreihen im Epithel und der Durchbruch durch die Basalmembran dar (siehe auch 1.4.1.).

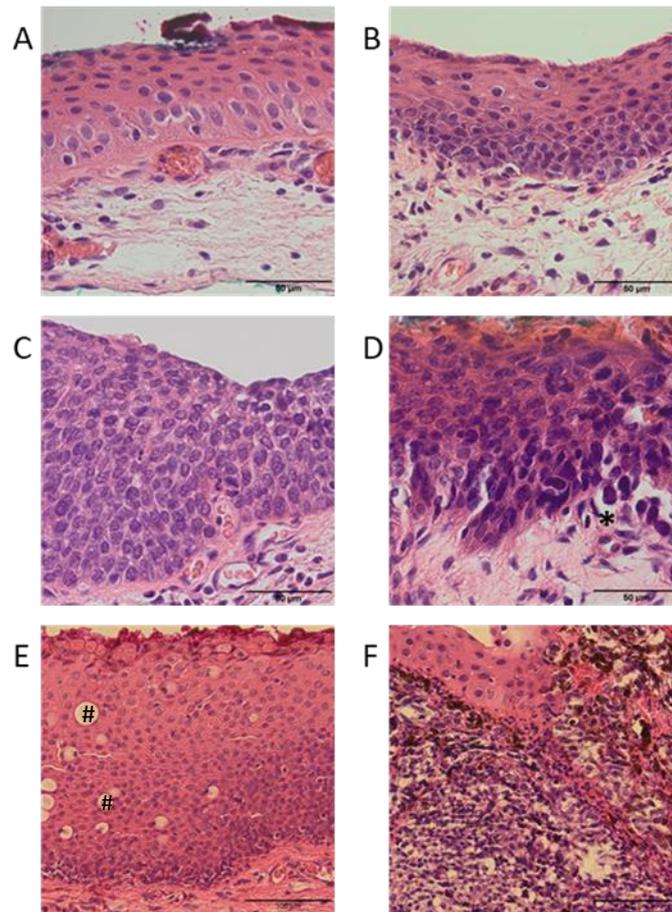


Abbildung 4: Hämatoxylin Färbungen der verschiedenen Entitäten. Maßstab A-D 50µm. Maßstab E-F 100 µm.

(A) gesunde Bindehaut als Kontrolle. (B) CIN 1-2. Die atypischen Zellen finden sich in der unteren Epithelhälfte (C) CIN 3. Die gesamte Epithelhöhe wird durch atypische Zellen gebildet (D) Karzinom. Hochgradig atypische Zellen weisen Invasivität auf und durchbrechen die Basalmembran (durch Stern markierte Stelle) (E) Melanom in situ. Vor allem basal gesteigerte Zelldichte und auffällige Melanocyten. Intraepitheliale Zysten als Nebenbefund (Zwei exemplarische Zysten mit # gekennzeichnet). (F) Malignes Melanom. Aggregation kleiner, atypischer Melanozyten und Pigmentproduktion.

2.2.4. Immunhistochemische Färbung

Um die Proteine E-Cadherin und Par3 im Gewebe in loco darzustellen, wurde die Methode der Immunfluoreszenz gewählt.

Materialliste der immunhistochemischen Färbung mit Fluoreszenz:

Xylol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2- Propanol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Aqua dest., aufbereitet durch die Uniklinik Köln, Deutschland

Zitronensäure Monohydrat (0,1 mol/l), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumcitrat (0,1 mol/l), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Aqua dest., Ampuwa® Fresenius Kabi, Sevrès, Frankreich

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

DAPI, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Fluorescence Mounting Medium, Dako, Glostrup, Dänemark

Superfrost Objektträger, Thermo scientific, Braunschweig, Deutschland

Antikörperpuffer (pH 7,4):

10 mmol Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

150 mmol Natriumchlorid, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

0,1% BSA (Bovine Serum Albumin), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

0,02% Natrium-Azid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Goat Serum (normal), DAKO, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland

Primär-Antikörper:

Anti-Par3 rabbit polyclonal IgG, Millipore, California, USA

Anti-CDH1 / E Cadherin Antibody LS-B8559, LifeSpan BioSciences, Seattle, Washington, USA

Sekundär-Antikörper:

Alexa Fluor Goat-anti-rabbit IgG, Life Technologies, Eugene, Oregon, USA

Anti-Mouse IgG (whole molecule)- FITC produced in Goat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.2.4.1. Durchführung der immunhistochemischen Färbung mit Fluoreszenz

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte zunächst wie unter 2.2.3.1. beschrieben entparaffiniert. In einem pH6-Puffer, bestehend aus mit destilliertem Wasser verdünnter Zitronensäure und Natriumzitat, wurden die histologischen Schnitte in einem Wasserbad bei 98,2°C für 20 min erhitzt, um die Antigenstrukturen zu demaskieren. Nachdem die Objektträger mindestens 20 min abkühlen konnten erfolgte eine dreimalige Waschung in PBS für jeweils 5 min. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mittels Ziegen Serum wurde für 60 min in einer dunklen Feuchtkammer durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung abgeschüttet und die Reste durch erneutes Waschen mit PBS (3 x 5 min) entfernt. In einem Antikörper-Puffer, welcher sich aus Tris, BSA, Natrium-Azid sowie Natriumchlorid zusammensetzte, wurden die Primärantikörper gegen Par3 und E-Cadherin 1:300 beziehungsweise 1:25 verdünnt und über Nacht dunkel in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Diese wurden für die Inkubation des Zweitantikörpers abgeschüttet und Überstände durch die Waschung mit PBS (3 x 5 min) bereinigt. Die jeweiligen Antikörper gegen Anti-Par3 und Anti-E-Cadherin, Alexa Fluor Goat-anti-rabbit IgG und Anti-Mouse IgG FITC (siehe auch Tabelle 2), wurden in einer Dilution mit dem Antikörper-Puffer in einem Verhältnis von 1:300 auf die Präparate gegeben und in einer dunklen Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 60 min bebrütet. Nach einem anschließenden Waschvorgang mit PBS (3 x 5 min) folgte die 10-minütige Kernfärbung mit DAPI, welches ebenfalls mit dem Antikörper-Puffer 1:2000 verdünnt wurde. Ein letztes Waschen mit PBS (3 x 5 min) und ein kurzes Abspülen mit Leitungswasser bereitete die Präparate auf das Abdecken mit dem Fluoreszenz Mounting-Medium vor. Im getrockneten Zustand lagerten die Objektträger bei 4°C und in Dunkelheit.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Par3 rabbit polyclonal IgG	1:300	Alexa Fluor Goat-anti-rabbit IgG	1:300
Anti-CDH1 / E-Cadherin AB	1:25	Anti-Mouse IgG - FITC	1:300

Tabelle 2: **Primärantikörper mit ihren korrespondierenden Sekundärantikörpern.**

2.3. Quantifizierung und statistische Analyse

Für die Auswertung der Immunfluoreszenz-gefärbten Schnitte wurde ein konfokales Mikroskop (LSM 880 AxioObserver, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) verwendet, welches durch das Prinzip des sequenziellen Erfassens des Bildes eine verbesserte Auflösung bietet. Zur Aufnahme und Bearbeitung der Bilder diente die dazugehörige Software ZEN 2.1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Von den Aufnahmen mit 10-, 25- und 63-facher Vergrößerung wurden vor allem letztere für die weitere Auswertung benutzt. Anhand dieser wurde das jeweilige Fluoreszenzsignal für E-Cadherin und Par3 unabhängig voneinander bewertet. Ein unspezifisches Hintergrundsignal konnte mittels Negativkontrollen, welche ohne Primärantikörper inkubiert wurden, weitgehend ausgeschlossen werden.

Im ersten Schritt der Analyse fand eine Graduierung der Intensität des Fluoreszenzsignals statt. Dies geschah in Anlehnung an den HercepTest™ der Firma Dako, welcher in der Zulassungsstudie von dem Anti-HER2-Rezeptor-Antikörper Herceptin Anwendung fand und gemeinsam mit der US-Zulassung von Herceptin als Testkit etabliert wurde. Hierbei wurden die Proben nach einem Score von 0, 1, 2 und 3 unterteilt, wobei ein Signal des Grades 1 als schwach, des Grades 2 als mäßig und des Grades 3 als stark zu werten gilt. Der Grad 0 kennzeichnet eine Probe, die sich negativ für das gesuchte Antigen zeigt.[80][JP16003-Studie] Der Grad 0 wurde in dieser Arbeit nicht vergeben. Zur Orientierung dienten die Kontrollen gesunder Bindehaut, welche zugleich das intensivste Signal lieferte. Beispiele der verschiedenen Intensitätsgrade sind der Abbildung 5 zu entnehmen.

Mit dem Ziel objektive Werte für die Intensität des Signals zu ermitteln, wurden die Graubilder der separierten Kanäle mit FIJI (FIJI is just ImageJ, Madison, Wisconsin, USA) analysiert. Zunächst wurde über die Funktion „Measure“ der mittlere Grauwert aller Pixel des Bildausschnitts erhoben. Ungefärbte oder sehr schwache aber unspezifische Signale wurden mit Hilfe des „Thresholds“ (Schwellenwert) aus der Wertung eliminiert. Da die Aufnahmen mit ZEN mit 8bit aufgenommen wurden, ergaben sich 0 bis 256 potentielle Grauwerte. Da in Kontrollen, welche nur mit dem Zweit- nicht aber mit dem Erstantikörper inkubiert wurden, ein unspezifisches Signal mit einem Mittelwert von 6 gemessen werden konnte, wurden die Grauskalenwerte 0 bis

inklusive 8 ausgeschlossen. Der Mittelwert der verbliebenen Grauwerte ging in die statistische Analyse ein.

Die jeweiligen Mittelwerte der Kontrollen sowie der verschiedenen Tumorentitäten und deren Vorläufer wurden gegenübergestellt. Unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) wurden im Rahmen eines T-Testes die P-Werte ermittelt. Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

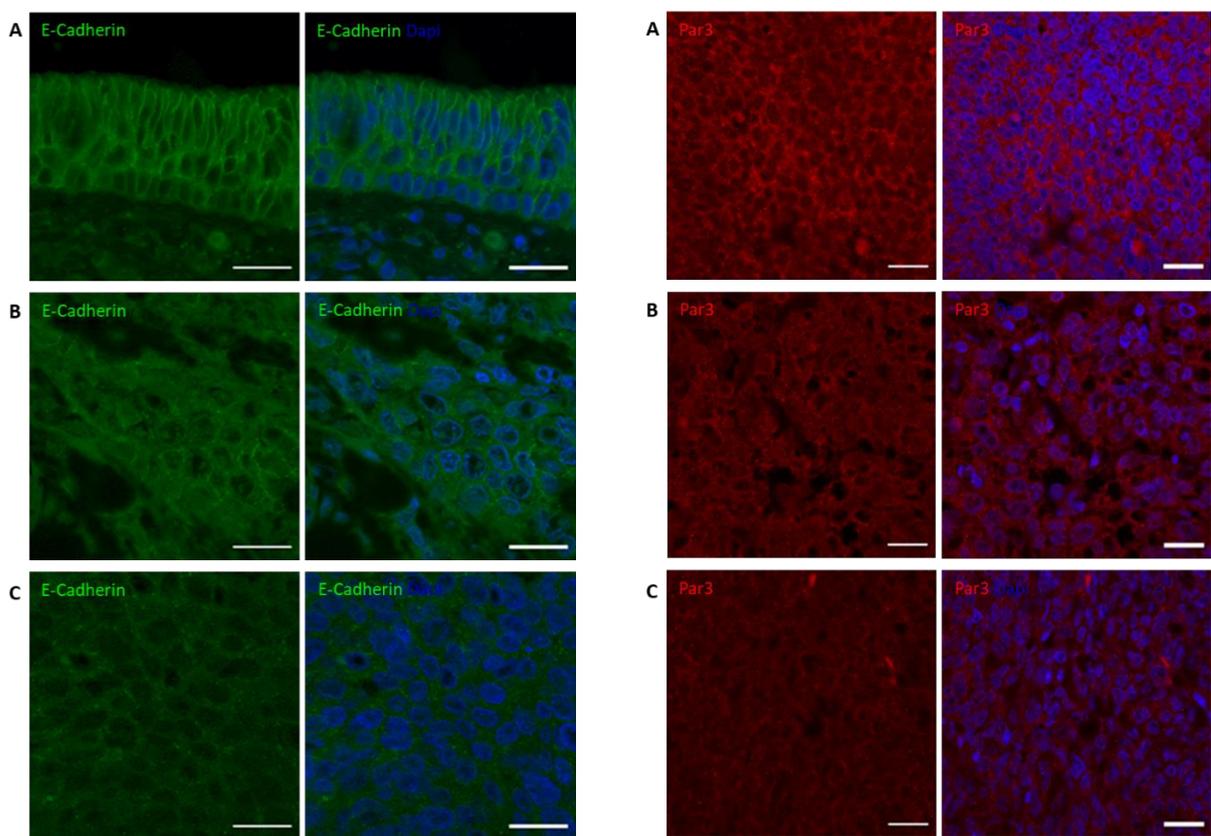


Abbildung 5: Signalintensitäten der Immun-fluoreszenz Färbung für E-Cadherin (links) und Par3 (rechts). Maßstab 20 μ . E-Cadherin: (A) Starke Farbintensität (+++) in blander Bindehaut. Die Färbung zeichnet die Kontur der Zellmembran nach. (B) Mäßig stark angefärbtes (++) Malignes Melanom. (C) CIN-Läsion mit schwacher Färbintensität (+). Par3: (A) Stark positive (+++) CIN-Läsion. (B) Mäßig starke Farbintensität (++) im Malignen Melanom. (C) Malignes Melanom mit schwacher Färbung (+).

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation der vorliegenden Tumorentitäten

Die in Paraffin eingebetteten humanen Bindehautpräparate wurden nach entsprechender Vorbereitung mit Anti-E-Cadherin- beziehungsweise Anti-Par3-Antikörpern inkubiert, um mittels Immunfluoreszenz die gesuchten Strukturen darzustellen. Anschließend wurde die Auswertung an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Die Generierung der Daten erfolgte auf zweierlei Weisen. Zum einen erfolgte eine Graduierung der Signalintensitäten in drei Abstufungen. Zum anderen wurden mittels ImageJ die Grauskalenwerte zwischen Null und 255, der am Mikroskop erzeugten Bilder, ermittelt. Werte unter 8 wurden hierbei nicht berücksichtigt, um eine unspezifische Signalgebung des Hintergrundes bzw. eine schwache Autofluoreszenz auszuklammern. Auf diese Art und Weise können nicht nur die absoluten Signalintensitäten, sondern auch morphologisch strukturelle Veränderungen berücksichtigt werden.

Bevor mit der eigentlichen Arbeit begonnen wurde, wurden die vorliegenden Präparate histologisch mittels HE-Färbung analysiert und auf ihre Dignität geprüft. Hierfür wurden als Referenz die durch die Pathologie Köln erstellten Befunde herangezogen. Abbildung 6 A zeigt exemplarisch das unverhornte Plattenepithel der Konjunktiva mit seinen Schichten Stratum basale, Stratum parabasale, Stratum intermedium Stratum superficiale.[2] Wie auch in 1.4.1. *Plattenepitheliale Neoplasien der Augenoberfläche* beschrieben, sind Carcinoma in situ Läsionen des ersten Types (CIN1) durch atypische Keratinozyten im unteren Epitheldrittel charakterisiert, während sich Typ 2 (CIN2) durch atypische Zellen in den unteren zwei Dritteln charakterisiert. In dieser Arbeit werden die zuletzt genannten beiden Typen unter CIN1-2 zusammengefasst, da der Übergang fließend ist (Abbildung 6 B). Teilbild C der Abbildung 6 weist eine CIN3-Läsion vor, bei welcher die gesamte Epithelhöhe durch atypische Zellen durchsetzt ist. Der Durchbruch durch die Basalmembran und somit Invasivität zeichnet das Karzinom aus, hier in D mit einem Stern markiert. Das Melanom in situ (E) sowie das Melanom (F) weisen atypische Melanozyten auf, wobei analog zum Karzinom bei letzterem die Invasivität ausschlaggebend ist.

Im Folgenden wurden die Verteilungsmuster der Expression von E-Cadherin und Par3 in den verschiedenen Entitäten und den Bindehautkontrollen beurteilt.

3.2. Expressionsverhalten von E-Cadherin im konjunktivalen Plattenepithelkarzinom und dessen Vorläufern

Die im Folgenden beschriebenen Befunde werden repräsentativ in der Abbildung 6 veranschaulicht. E-Cadherin wird an der Zellmembran lokalisiert exprimiert, wodurch sich mit der Immunfluoreszenztechnik die Zellmembranen ergo auch die Zellgrenzen detektieren lassen. Sortiert man die Entitäten aufsteigend ihrem Grad der Entdifferenzierung nach, zeichnet sich für die Expression von E-Cadherin eine Abnahme der Signalstärke ab. Generell bleibt die netzartige Kontur, welche die Zellmembranen demaskiert, jedoch bestehen. Vor allem in den Carcinoma in situ des Typs 1 und 2 wird deutlich, dass der Prozess der Karzinogenese von den proliferierenden Zellen des Stratum basale ausgeht. Wie zu erwarten, liegen hier die Zellen dichter, wirken pyknischer und schlechter differenziert (Siehe auch Definition der CIN1-2 1.4.1.). In diesem Zusammenhang ist das divergierende Expressionsmuster von E-Cadherin bei der in der Abbildung 6 dargestellten CIN1-2 Läsion zu unterstreichen. Während in den apikalen, ausdifferenzierten Epithelabschnitten ein netzartiges Signal die Zellmembranen demaskiert (mit B markiertes Areal), ist dieses in den basalen Abschnitten schwächer, sowie unspezifisch diffus (markiert mit A).

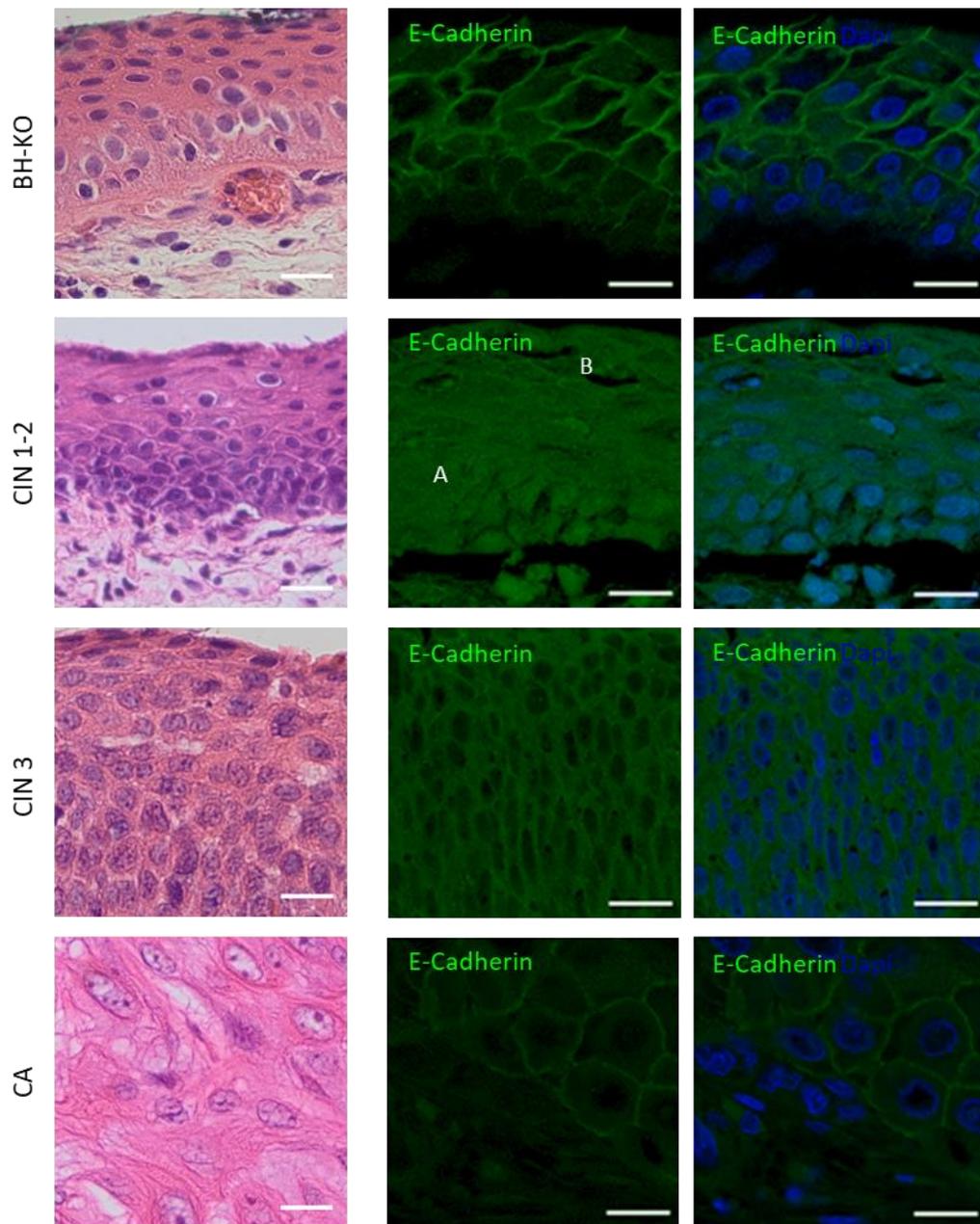


Abbildung 6: **HE- und immunhistochemische Färbung von E-Cadherin in squamösen Läsionen.** Histochemische Färbung mittels HE (links) sowie immunhistochemische Färbung mittels Fluoreszenz für E-Cadherin in gesunder Bindehaut als Kontrolle (erste Zeile), in CIN 1-2 (zweite Zeile), in CIN 3 (dritte Zeile) und in Karzinoma (vierte Zeile). Hervorzuheben bezüglich der Färbung von E-Cadherin ist, dass in der CIN 1-2 das Signal im basalen Bereich des Epithels (A) und somit deckungsgleich mit der Lokalisation der entarteten Zellen schwächer und weniger spezifisch ist als in den apikalen Abschnitten (B). Darüber hinaus lässt sich E-Cadherin auch in den weniger differenzierteren Stadien nachweisen, wenn auch deutlich reduzierter. Maßstab 20µm.

3.2.1. Semiquantitative Analyse

Dem Fluoreszenz-Signal der einzelnen Schnitte wurde ein ganzer Wert zwischen ≥ 1 und ≤ 3 zugeordnet, wobei 3 das intensivste, mit der Kontrolle vergleichbare Signal repräsentiert. Die Balken der Abbildung 7 repräsentieren jeweils den Mittelwert. Zusätzlich ist die Standardabweichung angetragen. Der höchste Wert ist stets bei den gesunden Bindehautkontrollen zu finden.

Die Expression von E-Cadherin in den squamösen Läsionen der Bindehaut ist gegenüber der Kontrolle deutlich reduziert (p-Wert gegenüber der Kontrolle kleiner 0,01). Zugleich kristallisiert sich jedoch keine klare Tendenz der Abnahme heraus. Während das Expressionslevel in den CIN1-2 ($\bar{x} = 1,25 \pm 0,43$) und in den Karzinomen ($\bar{x} = 1,33 \pm 0,47$) etwa ähnlich gegenüber der Kontrolle ($\bar{x} = 2,8 \pm 0,4$) um ~50% (0,55 bzw. 0,52) reduziert ist, ist dieses bei CIN3 im Schnitt geringfügig höher ($\bar{x} = 1,66 \pm 0,47$; Reduktion um 40% [0,41]).

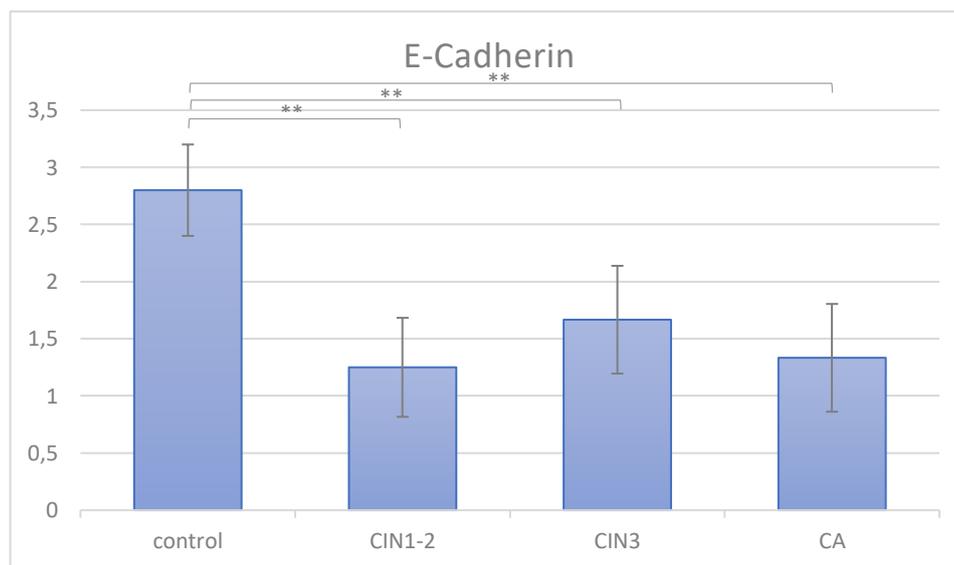


Abbildung 7: **Semiquantitative Analyse der Signalintensitäten für E-Cadherin in squamösen Läsionen.** P-Werte: * <0,05 ** <0,01

3.2.2. Quantitative Analyse

Die Auswertung erfolgte anhand der am konfokalen Mikroskop gewonnenen Aufnahmen der verschiedenen Läsionen. Mittels FIJI wurden die Grauwerte ermittelt, wobei auf einer Skala von 0 bis 255 nur jene Werte für die Signalstärke gewertet wurden, welche einen Wert >8 aufwiesen. Die Ergebnisse werden in Abbildung 8 dargestellt.

Im arithmetischen Mittel ist eine Signalabschwächung in den entarteten Geweben für E-Cadherin gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Darüber hinaus lässt sich auch ein gradueller Verlust proportional zu dem Grad der Entartung verzeichnen (Der Reihe nach $\bar{x}_{(\text{Control})}=18,5\pm 9,5$; $\bar{x}_{(\text{CIN1-2})}=12,5\pm 2,6$; $\bar{x}_{(\text{CIN3})}=11\pm 1,76$; $\bar{x}_{(\text{CA})}=10,33\pm 1,89$) Allerdings nimmt innerhalb der (prä-)kanzerösen Geweben das arithmetische Mittel der Signalintensitäten weniger stark ab als es dies im Vergleich mit der Kontrolle der Fall ist. Die Bedingung eines Signifikanzniveaus kleiner 0,05 wird nicht erfüllt.

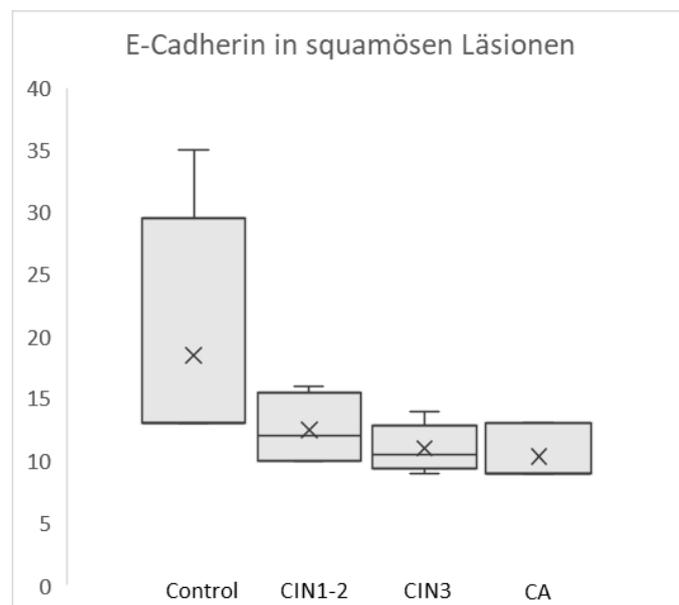


Abbildung 8: **Quantitative Analyse der Signalintensitäten mittels FIJI.**

3.3. Expressionsverhalten von E-Cadherin im malignen Melanom und dessen Vorläufern

Analog zu der Herangehensweise in 3.2. wurden die Signalcharaktere der melanozytären Läsionen gegenübergestellt (Abbildung 9). Das Expressionslevel für E-Cadherin nimmt über den Prozess der Entartung an Intensität ab, während die Zahl an unspezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen scheinbar zunimmt. Die Kontur der Zellen erscheint verwaschener, wobei es zugleich zu einer Signalanhebung im Bereich des Cytoplasmas kommt. Im konjunktivalen Melanom präsentiert sich die Expression ambivalent. Neben Abschnitten, in denen es nur zu wenigen und zum Teil unspezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen gekommen ist (Bereich B; Abbildung 9), lassen sich ebenfalls kleinere, inselartige Zellverbände mit spezifischer E-Cadherin Expression detektieren (Bereich A). Siehe hierzu auch 3.3.1.

3.3.1. Diskontinuität der membranären Expression von E-Cadherin

Neben den bereits in 3.3. erwähnten Unregelmäßigkeiten, welche sich auf die differente Expression von E-Cadherin in bestimmten Arealen bezieht, ist ebenfalls hervorzuheben, dass partial auch die Expression auf zellulärer Ebene unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Die durch Anti-E-Cadherin demaskierte Zellbegrenzung präsentiert sich nicht als homogenes Signalband, sondern weist Membranabschnitte stark reduzierter bis kräftiger Signalintensität auf, wie der Abbildung 10 entnommen werden kann. Dies lässt auf eine aberrante Expression von E-Cadherin sowohl auf interzellulärer Ebene im Gewebsverband als auch intrazellulärer Ebene schließen.

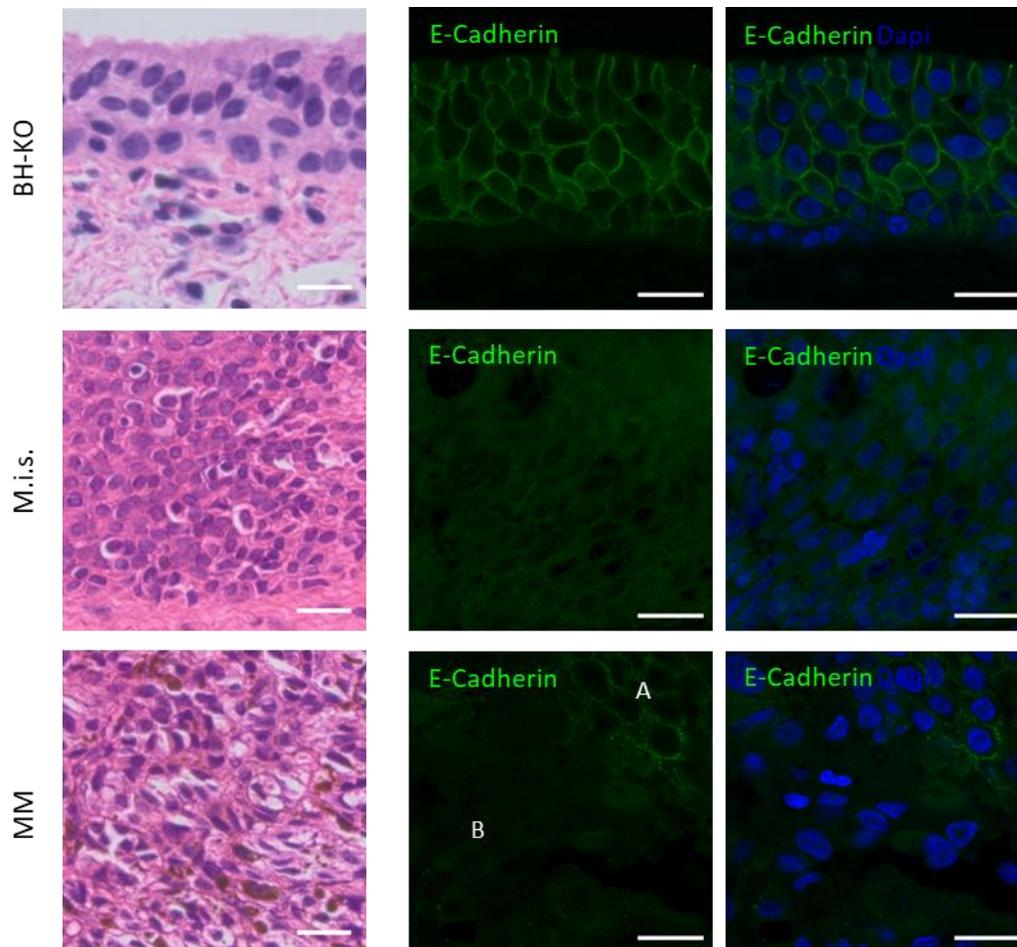


Abbildung 9: **HE- und immunhistochemische Färbung der melanozytären Läsionen für E-Cadherin.** Histochemische Färbung mittels HE (links) sowie immunhistochemische Färbung mittels Fluoreszenz für E-Cadherin in gesunder Bindehaut als Kontrolle (erste Zeile), in Melanoma in situ (zweite Zeile) und in Malignen Melanom (dritte Zeile). Im malignen Melanom ist zu beachten, dass die Anfärbbarkeit für E-Cadherin je nach Gewebeabschnitt unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Tendenziell geht die Entartung jedoch mit einem graduellen Verlust von E-Cadherin einher. Der mit A markierte Bereich zeigt eine intensive membranäre Färbung, während diese im Bereich um B deutlich reduziert, beziehungsweise abwesend ist. Maßstab 20µm.

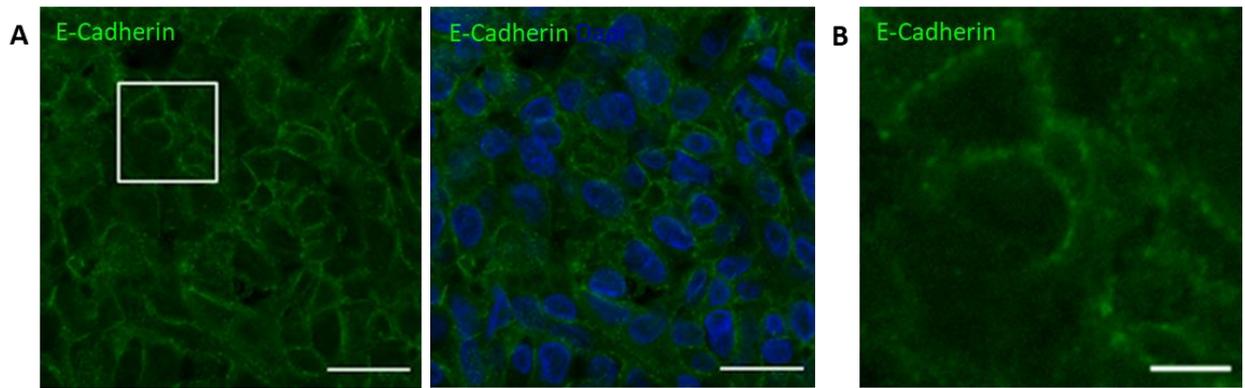


Abbildung 10: **Diskontinuierliches und heterogenes Expressionsmuster von E-Cadherin im Melanom.** (A) Maßstab 20µ. (B) Ausschnitt aus A. Maßstab 5µ.

3.3.2. Semiquantitative Analyse

Bei den melanozytären Läsionen ist in Bezug auf E-Cadherin ein gradueller Abfall der Intensität mit dem Grad der Entartung zu beobachten, wenngleich die Ergebnisse für das Melanom in situ mit einem p-Wert von 0,06 ($>0,05$) als nicht signifikant zu werten sind ($\bar{x} = 2 \pm 0$). Der Wert für das Melanom ($\bar{x} = 1,29 \pm 0,46$) fällt gegenüber der Kontrolle ($\bar{x} = 2,8 \pm 0,4$) um etwa 50% (0,54). Dargestellt in Abbildung 11.

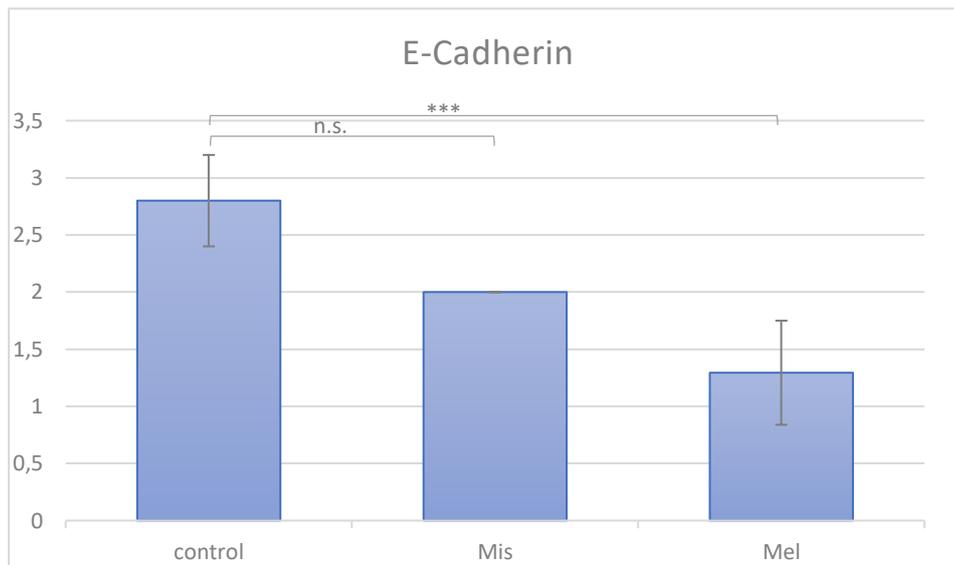


Abbildung 11: Semiquantitative Analyse der Signalintensitäten für E-Cadherin in melanozytären Läsionen. P-Werte: * <0,05 ** <0,1 * <0,001**

3.3.3. Quantitative Analyse

Bei einer geringen Anzahl an Präparaten der Melanoma in situ konnte kein signifikantes Ergebnis bezüglich einer quantitativen Reduktion der Signalstärken für E-Cadherin gewonnen werden ($\bar{x}_{(M.i.s.)}=31,5\pm 13,5$) (Abbildung 12). Hingegen sind die Melanome ($\bar{x}_{(MM)}=12,32\pm 0,83$) gegenüber der blanden Konjunktiva ($\bar{x}_{(Control)}=18,5\pm 9,53$) im Mittel deutlich in ihrer Signalintensität gemindert (p -Wert<0,5; siehe Abbildung 12). Auch in der Gegenüberstellung der Melanoma in situ und der malignen Melanome kann man von einer Reduktion der Expression ausgehen (p -Wert<0,001).

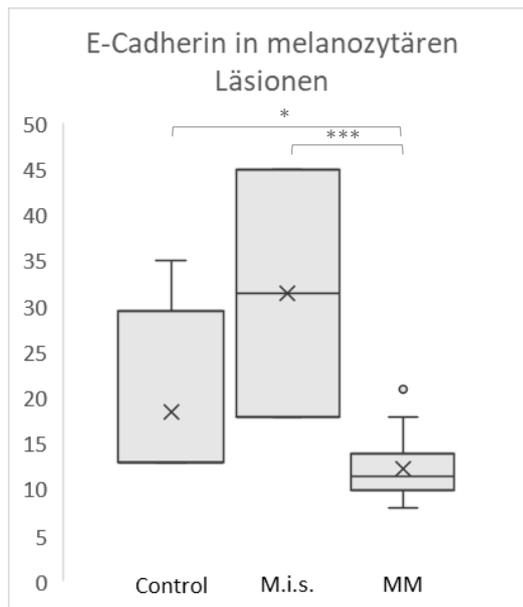


Abbildung 12: **Quantitative Analyse der Signalintensitäten mittels FIJI.** Markiert sind ebenfalls die p-Werte jeweils in Bezug auf die Kontrolle. * <0,5 ** <0,001

3.4. Expressionsverhalten von Par3 im konjunktivalen Plattenepithelkarzinom und dessen Vorläufern

Betrachtet man das Signalverhalten der verschiedenen squamösen Läsionen für Par3, stellt sich eine allgemeine Reduktion der detektierten Expression heraus. Dies zeigt Abbildung 13. Bemerkenswert ist, dass vor allem in der CIN1-2 Läsion, aber auch im CIN3, nur vereinzelte, schollenartige Spots positiv sind. In der Kontrolle hingegen zeigt sich das Signal geringfügig granulär, jedoch insgesamt homogener. Dies ist auch im Karzinom der Fall, wenngleich es hier zu einer Signalreduktion gegenüber der Kontrolle kommt.

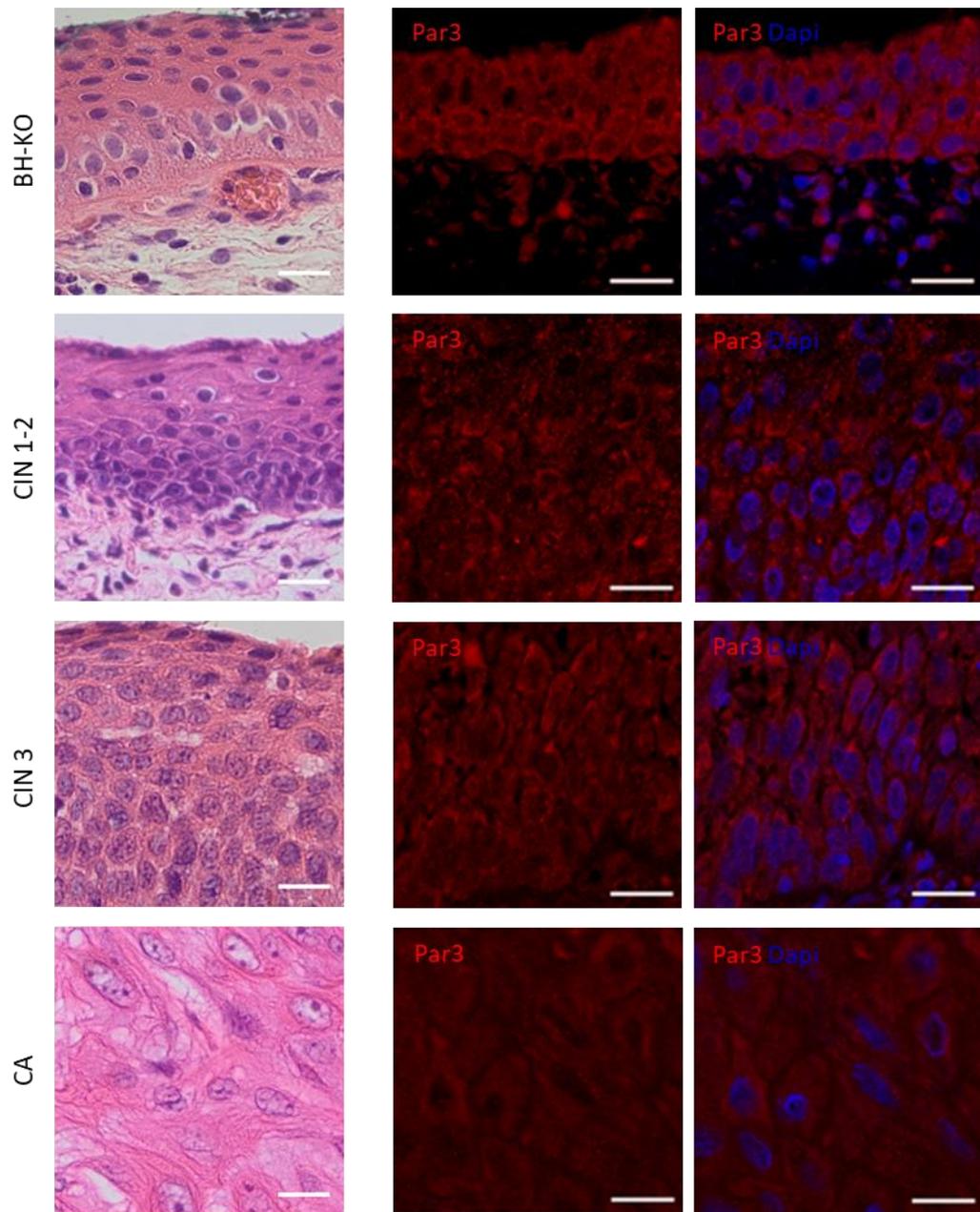


Abbildung 13: HE- und immunhistochemische Färbung der squamösen Läsionen für Par3. Histochemische Färbung mittels HE (links) sowie immunhistochemische Färbung mittels Fluoreszenz für Par3 in gesunder Bindehaut als Kontrolle (erste Zeile), in CIN 1-2 (zweite Zeile), in CIN 3 (dritte Zeile) und in Karzinoma (vierte Zeile). Par3 zeigt sich im Karzinom mit einer erhaltenen Expression, während sich in den Vorläufern eine transiente Reduktion zeigt. Maßstab 20µm.

3.4.1. Semiquantitative Analyse

Auch für das Gerüstprotein Par3 wurde eine Einstufung in dreierlei Intensitätsgrade vorgenommen (siehe 2.3., Abbildung 14). Insgesamt zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine Verminderung des Fluoreszenzsignals, welches in den immunhistochemisch untersuchten Prä-/Kanzerosen gemessen werden konnte ($\bar{x}_{(\text{Control})}=3\pm 0$; $\bar{x}_{(\text{CIN1-2})}=1,25\pm 0,43$; $\bar{x}_{(\text{CIN3})}=1,5\pm 0,5$; $\bar{x}_{(\text{CA})}=1,66\pm 0,47$). Wenngleich nicht signifikant reduziert, so lassen sich Anti-Par3-Antikörperbindungen auch im Karzinom nachweisen.

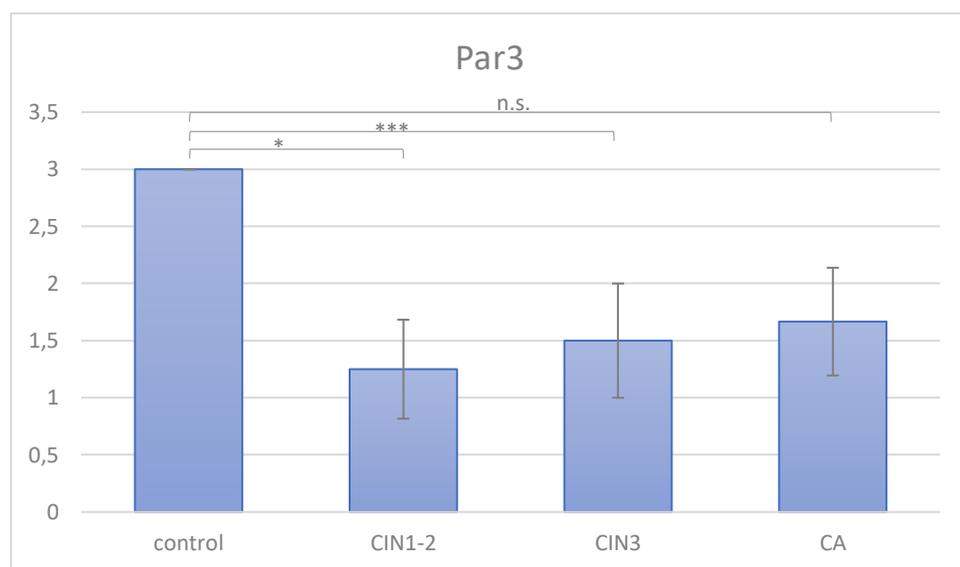


Abbildung 14: **Semiquantitative Analyse der Signalintensitäten für Par3 in Carcinoma in situ (CIN) und Carcinoma.** P-Werte: * <0,05 ** <0,01 *** <0,001

3.4.2. Quantitative Analyse

Nimmt man gesunde Bindehaut als Referenzwert, zeigt sich für Par3 lediglich in der Gegenüberstellung mit CIN3 eine signifikante Reduktion der erhobenen Signalintensitäten ($\bar{x}_{(\text{Control})}=52\pm 12,49$; $\bar{x}_{(\text{CIN3})}=15,83\pm 2,8$; p-Wert<0,05). (Abbildung 15) In Bezug auf die anderen beiden Entitäten, CIN1-2 sowie das Karzinom, zeigen sich Mittelwerte ähnlich dem der CIN3

Läsion ($\bar{x}_{(CIN1-2)}=17,25\pm 2,59$; $\bar{x}_{(CA)}=16\pm 1,41$), jedoch sind diese mit nicht als signifikant zu wertenden p-Werten assoziiert (p-Wert $_{(CIN1-2)}=0,075$; p-Wert $_{(CA)}=0,12$).

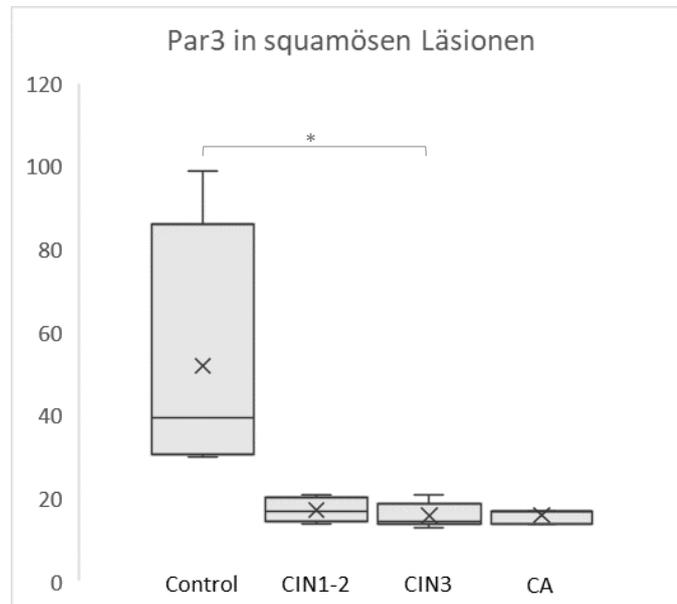


Abbildung 15: **Quantitative Analyse der Signalintensitäten mittels FIJI.** Markiert sind ebenfalls die signifikanten p-Werte jeweils in Bezug auf die Kontrolle. * <0,05

3.5. Expressionsverhalten von Par3 im malignen Melanom und dessen Vorläufern

Das Expressionsmuster von Par3 wird im Rahmen der Tumorgenese progredient inhomogener. Während sich die Signalintensität in einigen Spots mit der der Bindehautkontrolle vergleichen lässt, nimmt in den übrigen Arealen die Intensität gering ab. Aussparungen, welche durch die Lage der Nuklei bedingt sind, lassen sich unklarer abgrenzen. Dies ließe sich jedoch auch auf die erhöhte Zelldichte zurückführen. (Abbildung 16)

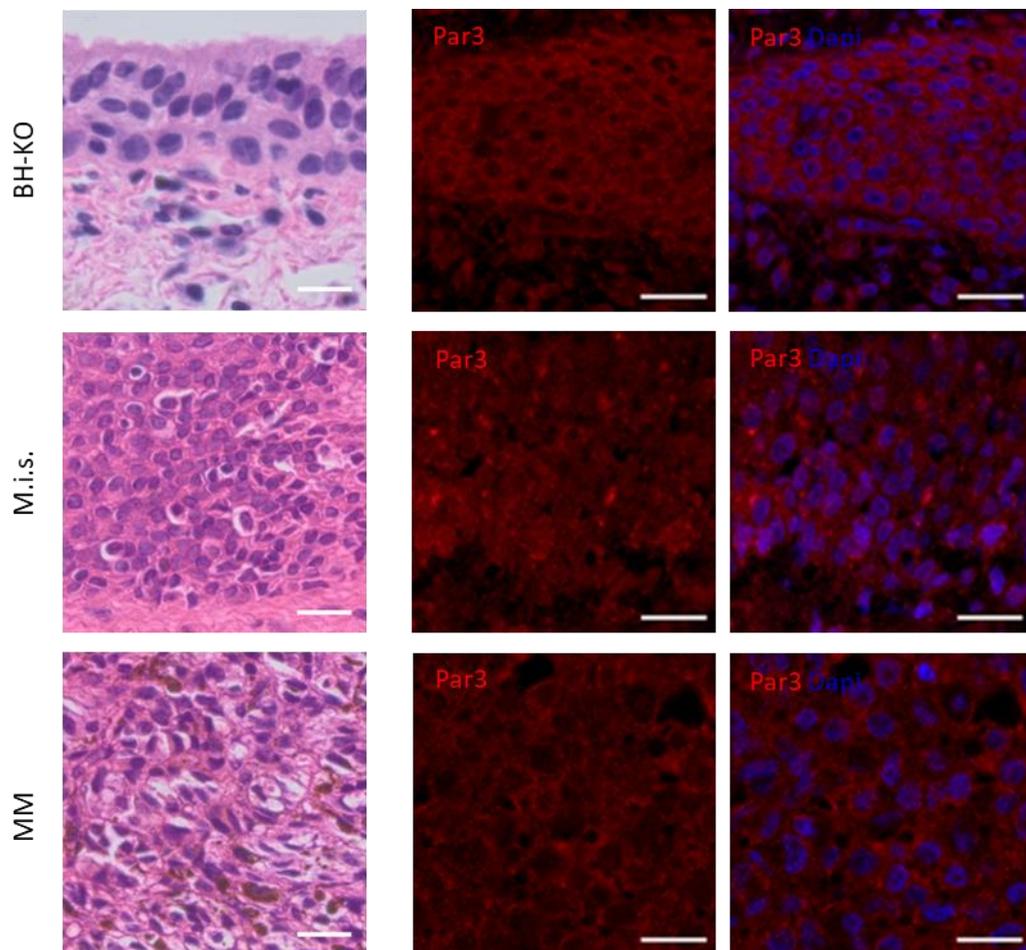


Abbildung 16: HE- und immunhistochemische Färbung der melanozytären Läsionen für Par3. Histochemische Färbung mittels HE (links) sowie immunhistochemische Färbung mittels Fluoreszenz für Par3 in gesunder Bindehaut als Kontrolle (erste Zeile), in Melanoma in situ (zweite Zeile) und in Malignen Melanoma (dritte Zeile). Par3-positive Zellen zeigen ein Signal im Bereich des Zytoplasmas, der Nucleus bleibt ausgespart. Auch mit dem Fortschreiten der Entdifferenzierung scheint Par3 erhalten zu sein. Maßstab 20 μ m.

3.5.1. Semiquantitative Analyse

Bei einer Wertung von eins bis drei der Signalintensitäten mit Bezug auf Par3 in melanozytären Entartungen lässt sich eine Reduktion der Mittelwerte verzeichnen ($\bar{x}_{(\text{Control})}=3\pm 0$; $\bar{x}_{(\text{M.i.s})}=2\pm 1$; $\bar{x}_{(\text{MM})}=1,71\pm 0,82$), welche für die malignen Melanoma signifikant ist (p-Wert<0,01), wie Abbildung 17 zu entnehmen ist.

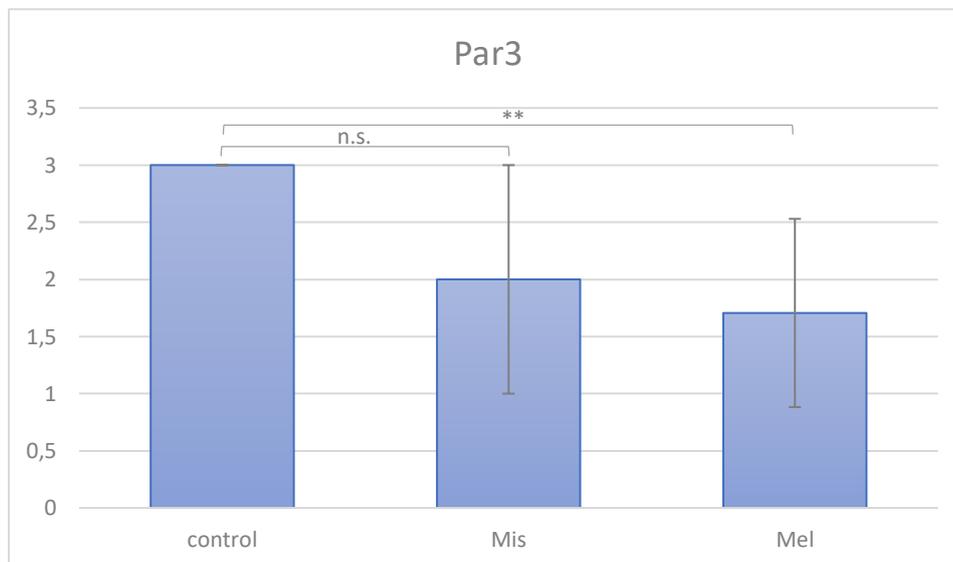


Abbildung 17: **Semiquantitative Analyse der Signalintensitäten für Par3 in melanozytären Läsionen.** P-Werte: n.s. Nicht signifikant * <0,05 ** <0,01

3.5.2. Quantitative Analyse

Die untersuchten melanozytären Malignome erweisen sich für Par3 in der Immunfluoreszenz-Untersuchung als signalschwächer als die ebenso behandelte konjunktivale Kontrolle ($\bar{x}_{(\text{Control})}=52\pm 24,97$; $\bar{x}_{(\text{MM})}=17,88\pm 4,95$; p-Wert<0,001; Abbildung 18). Die erhobenen Daten zu

den melanozytären in situ Läsionen lassen auf keinen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle schließen ($\bar{x}_{(M.i.s.)}=20\pm 7$; p-Wert=0,26). Trotzdem zeichnet sich auch hier eine Tendenz der Signalreduktion im Rahmen des Prozesses des Differenzierungsverlustes ab.

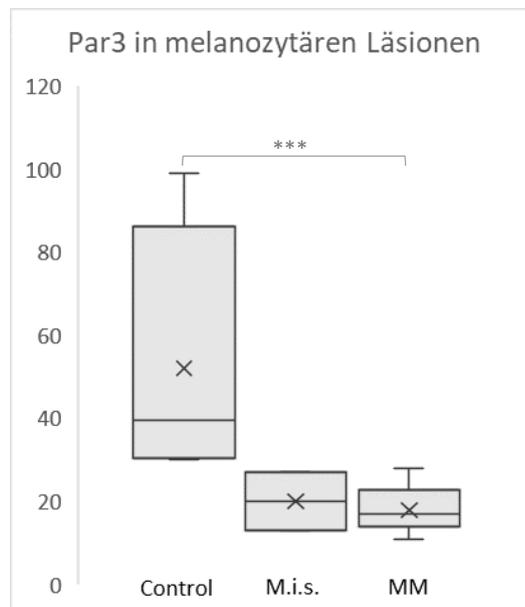


Abbildung 18: **Quantitative Analyse der Signalintensitäten mittels FIJI.** Markiert sind ebenfalls die p-Werte jeweils in Bezug auf die Kontrolle. *** <0,001

3.6. Gegenüberstellung des Expressionsverhaltens innerhalb der Läsion und der benachbarten Keratinozyten

Bereits in der immunhistochemischen Färbung zeichnete sich eine Differenz bezüglich der Signalintensität innerhalb der jeweiligen Läsion und im Bereich der angrenzenden Keratinozyten ab. In vereinzelt Präparaten ($n_{(CIN3)}=2$; $n_{(MM)}=1$) war es möglich, das Fluoreszenzsignal ausgehend von Par3 als antigener Struktur sowohl im Tumor als auch in den para-läsionalen Epithelzellen zu detektieren, da ein Anschnitt mit unmittelbarer räumlicher Beziehung gelungen war.

Abbildung 19 zeigt einen Ausschnitt aus einer CIN3-Läsion respektive aus einem malignen Melanom in Hämatoxylin-Eosin Färbung als auch das Korrelat mittels Immunfluoreszenz-Technik. Auffällig ist die reduzierte Signaldichte als auch -Intensität im Bereich der blanden Keratinozyten (Bereich markiert mit A), während rund um den Bereich B, welcher den Tumor kennzeichnet, das Signal deutlich wahrzunehmen ist.

Analog zu der Herangehensweise, wie in 2.3. beschrieben, wurde mithilfe von FIJI ein Wert der Signalintensität über eine definierte Fläche unter Ausschluss von Intensitäten kleiner als acht gemittelt. Setzt man die Werte, die sich nach dieser Methode für die Läsion beziehungsweise den Abschnitt phänotypisch blanden Epithels ergeben, in Relation, zeigt sich im Melanom eine Reduktion der Signalintensität für Par3 um 10% gegenüber den Keratinozyten. Untersucht man ebenso die CIN3-Läsionen lässt sich sogar eine Abschwächung von 23% feststellen.

Eine vergleichbare Aussage lässt sich zu E-Cadherin nicht machen. Stellt man die Werte der Signalintensitäten gegenüber, zeigen sich beide Typen von Läsionen, das Melanom sowie die CIN3-Läsionen, unwesentlich verändert (ohne Abbildung). Die Expression präsentiert sich nur vereinzelt reduziert, wenngleich das Expressionsmuster inhomogener wird. Letzteres wird bei dieser Art der Untersuchung nicht berücksichtigt.

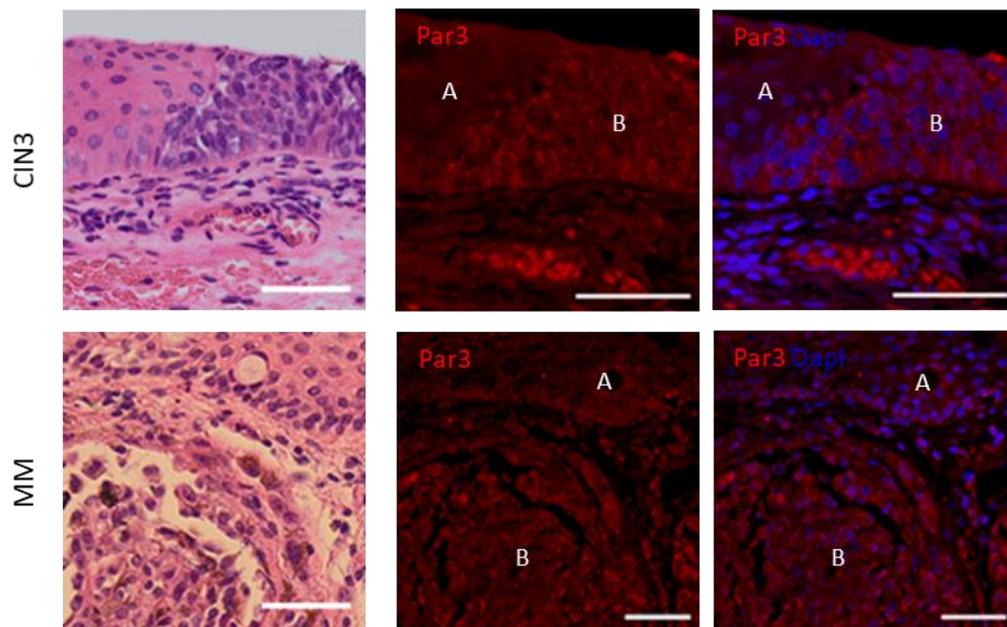


Abbildung 19: **Läsionen und benachbarte Keratinozyten.** Links jeweils HE gefärbt, rechts Par3 mittels Immunfluoreszenz. Im rechten Bildausschnitt eine CIN 3 angrenzend an gesunde Keratinozyten (links). Malignes Melanom unter einer intakten Epithelschicht gelegen. Mikrozysten als Nebendiagnose. Auffällig ist ein reduziertes Signal in der Immunfluoreszenz für Par3 der angrenzenden Keratinozyten (A) gegenüber dem entarteten Gewebeabschnitt (B). Maßstab 50µm

4. Diskussion

Wenngleich die Inzidenz des konjunktivalen Plattenepithelkarzinoms regional verschieden ist und zwischen 0,1 und 1,3 /100.000/Jahr variiert,[81] so handelt es sich dennoch um eine vergleichsweise seltene Tumorerkrankung. Ebenso verhält es sich mit einer Inzidenz von 0,03-0,08/100.000/Jahr beim malignen Melanom der Bindehaut.[82] Trotz allem handelt es sich bei beidem nicht nur um Erkrankungen, die potentiell den Visus gefährden, sondern die vor allem auch letal verlaufen können.

Von fundamentaler Bedeutung für ein funktionstüchtiges Organ ist die Organisation auf makro- und mikroskopischer Ebene. Letzteres spielt im Besonderen für Gewebe mit strikter apiko-basaler Ausrichtung, wie sie epitheliale Strukturen aufweisen, zu denen auch die Konjunktiva gehört, eine Rolle. Gewährleistet wird dies vornehmlich durch Zell-Zell-Kontakte, an welchen maßgeblich E-Cadherin, der epitheliale Abkömmling der Familie der Kalzium-abhängigen Adhäsionsmoleküle, beteiligt ist. Störungen in der Expression können zu einem Aufbrechen des Zellverbandes führen.[41] In malignen Prozessen lässt sich eine Korrelation zwischen der Aggressivität des Wachstums und der Reduktion der Expression von E-Cadherin beobachten. [37, 62–64] Lässt sich E-Cadherin nur vermindert nachweisen, spiegelt sich dies in einer schlechteren Prognose wieder.[65, 66] Diesbezüglich eine Aussage treffen zu können, ist sowohl für den betroffenen Patienten als auch für den Behandler von Interesse.

Aber nicht nur an der Adhärenz beteiligte Proteine, sondern auch solche, die an der Zellsymmetrie beteiligt sind, sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Insbesondere der Verlust oder die Fehlregulation dieser Proteine, welche sich in den drei Polaritätskomplexen Par, Scribble und Crumbs zusammenfassen lassen, steht im Mittelpunkt des Interesses. Obwohl es weiterer Klärung der involvierten Signalwege bedarf, besteht doch Einigkeit darüber, dass die sogenannten *Polarity Complexes* eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese und Metastasierung einnehmen.[52] Speziell Par3 als Teil des Par-Komplexes weist einen ambivalenten Charakter auf. Je nach Entität und Einbeziehung in die individuellen Signalwege scheint eine *Up-Regulation*[54–56] oder *Down-Regulation*[51–53] von Par3 mit einem höheren Grad der Entartung und einer schlechteren Prognose einherzugehen. Wenn auch das Plattenepithelkarzinom mit einer reduzierten Expression von Par3 assoziiert zu sein scheint,[53,

83–85] so ist der Zusammenhang hierbei bis heute nicht abschließend geklärt. Ergebnisse über das Expressionsverhalten von Par3 im squamösen Karzinom und malignen Melanom der humanen Konjunktiva liegen bis dato noch nicht vor.

Diese Arbeit zielt darauf ab, Korrelationen zwischen dem Grad der Aberration im konjunktivalen Epithel in Bezugnahme auf melanozytäre und squamöse Läsionen und dem Expressionsmuster von E-Cadherin beziehungsweise Par3 aufzuzeigen. Im Unterschied zu vielen Arbeiten, die im Tiermodell oder mit Zellkulturen arbeiten, finden in dieser Arbeit humane, im Rahmen der operativen Entfernung entnommene Proben, Verwendung. Diese wurden in Paraffin fixiert, entsprechend aufbereitet und unter Zuhilfenahme von Anti-E-Cadherin- und Anti-Par3-Antikörpern in Immunfluoreszenz-Technik gefärbt. Zur Gewinnung des Bildmaterials wurde ein konfokales Mikroskop der Firma Zeiss verwendet.

4.1. Expression von E-Cadherin im malignen Gewebe

In vitro konnte bereits nachgewiesen werden, dass E-Cadherin defiziente Epithelzellen ein malignes und invasives Wachstum zeigen.[58–60] Und auch die in vivo Befunde lassen sich hiermit in Einklang bringen: So unter anderem im Mammakarzinom [37, 62–64], dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom[86, 87] dem Karzinom der Magenschleimhaut[62, 65, 67, 68] oder dem Prostatakarzinom[88]. Aber nicht nur Tumoren epithelialer Herkunft weisen dieses Charakteristikum auf. Auch für das maligne Melanom liegen entsprechende Forschungsarbeiten vor. Rosenbaum et al. konnte im Mausmodell anhand des Braf/Pten Tumor-Modells ein verkürztes Überleben der Mäuse bei einer konditionierten Inaktivierung von E-Cadherin nachweisen. Zudem zeigen sich die Marker der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) verändert. Ein alleiniger Verlust von E-Cadherin führt jedoch nicht zur Entstehung von Melanomen.[89] In dieser Arbeit wird nun erstmals nicht nur die Expression von E-Cadherin im Karzinom als auch im malignen Melanom der humanen Bindehaut untersucht, sondern gleichfalls in deren Vorläufer-Läsionen.

4.1.1. Reduktion von E-Cadherin geht mit der Progression der squamösen Tumorgenese einher

E-Cadherin konnte mit Hilfe von immunfluoreszenz-histochemischen Verfahren in Paraffin konservierten Konjunktiva-Präparaten nachgewiesen und über eine Graduierung der erhobenen Signalintensitäten quantitativ beurteilt werden. Somit konnte eine Reduktion des untersuchten Proteins direkt im humanen Präparat nachgewiesen werden. Im Einklang mit dem aktuellen Wissensstand (s.o.) zeigte sich eine signifikante Reduktion von E-Cadherin gegenüber der Kontrolle sowohl in Bezug auf das Karzinom als auch auf die Präkanzerosen CIN1-3. Zudem konnte für die bisher wenig untersuchten obligaten Präkanzerosen Carcinoma in situ 1 und 2 gezeigt werden, dass sich in den nicht affizierten apikalen Keratinozyten weiterhin eine strukturierte E-Cadherin Expression nachweisen lässt, während sich das Expressionsmuster in den basalen Epithelabschnitten unspezifisch darstellt. Neben der quantitativen Reduktion kann man ebenfalls annehmen, dass eine dysfunktionale Lokalisation, welche sich durch eine cytoplasmatische Expression äußert, die Tumorprogression begünstigt.[38, 39]

Größere Studien sollten in Zukunft durchgeführt werden, um die hier noch kleinen n-Zahlen erneut zu validieren. Die geringe Anzahl ergibt sich aus der niedrigen Inzidenz der Erkrankung und der Einteilung in die einzelnen Stadien. Insgesamt unterstützen die Ergebnisse die Annahme, ein Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin gehe mit dem Verlust der Differenzierung und des Gewebezusammenhalts sowie mit Invasion und Metastasierung einher.[58, 60]

4.1.2. Veränderte Expression von E-Cadherin im malignen Melanom

Im malignen Melanom der humanen Bindehaut beziehungsweise dessen obligate Präkanzerose, dem Melanom in situ, ist eine Veränderung in der Expression von E-Cadherin feststellbar. Für

das maligne Melanom lässt sich sowohl in der semiquantitativen als auch in der quantitativen Analyse eine signifikante Reduktion nachweisen. An dieser Stelle gilt es jedoch das Expressionsmuster hervorzuheben und in Bezug auf die Importanz eventuell über die Intensität zu heben, denn es muss der Verlust der Spezifität der Expression hervorgehoben werden. Abbildung 10 zeigt im Melanom in situ eine Expression von E-Cadherin, welche sich nicht mehr klar auf die Zellmembranen begrenzen lässt. Innerhalb des malignen Melanoms kommen Areale unterschiedlich differenzierter und verschieden intensiver Expression vor. Zu diskutieren ist an dieser Stelle, ob es sich bei diesem Befund nicht um einen teilweisen Erhalt von E-Cadherin in vereinzelt Zellgruppen oder eventuell sogar eine Reaktivierung handelt. Bereits in Betracht gezogen wurde dieser Aspekt von De Marzo et al. in Bezug auf das metastasierte Prostatakarzinom. Hier zeigen sich für E-Cadherin positive Lymphknotenmetastasen, wenngleich der Primarius proportional zum Gleason-Score (Grad der Entartung) eine reduzierte oder veränderte Expression aufweist.[90] Dies spräche für einen epigenetischen Prozess der E-Cadherin-Regulation. Noch nicht beantwortet ist an dieser Stelle die Frage, ob es bezüglich der Metastasen des Prostatakarzinoms erst in der Absiedlung zu einer Reaktivierung von E-Cadherin kommt, oder dies Grundvoraussetzung für die Einnistung der malignen Zellen ist.

Ein weiterer Aspekt, den es zu berücksichtigen gilt, ist das Phänomen der Abspaltung der etwa 80 kDa großen Ektodomäne von dem Transmembranprotein E-Cadherin (120 kDa). Das hieraus resultierende lösliche E-Cadherin (soluble E-Cadherin; sE-Cad) ist nicht nur ein Marker für eine schlechte Prognose, sondern zugleich für eine reduzierte Expression von E-Cadherin an der Zelloberfläche verantwortlich.[91–94] Bedauerlicherweise macht der Hersteller, des in dieser Arbeit verwendeten Anti-E-Cadherin/ -CDH-1 Antikörpers des NCH-38 Klons, keine Angaben über das spezifische Epitop. Auch durch andere Vertreiber des gleichen Klons wird dies nicht näher eingegrenzt (Dianova; ThermoScientific: Cadherin-E / E-Cadherin Ab-4 (Clone NCH-38) Mouse Monoclonal Antibody [abgerufen am 12.05.2019]). Unter der Annahme, der hier verwendete Anti-E-Cadherin-Antikörper Klon bindet wie die Klone SHE78-7, HecD1 und H108 eine der Ektodomänen[95, 96], lässt sich nicht die alleinige Reduktion des funktionalen E-Cadherins konstatieren, sondern auch die Freisetzung des löslichen E-Cadherins.

4.1.3. Abschließende Betrachtung im klinischen Kontext

Die Bestimmung des Expressionsmusters von E-Cadherin in entarteten Geweben ausgehend vom Plattenepithel oder melanozytären Ursprungs ist nicht nur von rein wissenschaftlichem Interesse, sondern könnte in Zukunft für die Prognoseeinschätzung genutzt werden. Sowohl für das Plattenepithelkarzinom als auch das maligne Melanom gibt es bereits Daten dazu, dass eine reduzierte Expression des Adhäsionsmoleküls nicht nur mit einem höheren Grad des Differenzierungsverlustes einhergeht, sondern dies ebenfalls mit einem schlechteren Outcome korreliert.[65, 66, 97] Um diesen Zusammenhang auf die Konjunktiva übertragen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen, welche das Überleben des Patienten und das Metastasierungsmuster miteinbezieht.

Bei dem kommerziell produzierten hier verwendeten Antikörper gegen E-Cadherin ist von einer spezifischen Detektion des Antigens auszugehen, sodass ein Cadherin-Switching maskiert bleiben sollte. Um ein solches aufzudecken, wäre es jedoch weiterführend von Interesse neben E-Cadherin auch das etwaige Vorliegen von N- und P- Cadherin zu bestimmen, da dieses zur Mobilität und dem Überleben der Tumorzellen beiträgt.[98, 99].

4.2. Expression von Par3 im Plattenepithelkarzinom und Melanom

Iken et al. konnte anhand Par3-defizienter Mäuse die ambivalente Einflussnahme von Par3 auf die Entstehung von Papillomen und Keratoakanthoma durch die Regulation von Apoptose und Wachstum aufzeigen. Hier zeigte sich Par3 kontextbezogen als Proto-Onkogen beziehungsweise als Tumor-Suppressor.[26] Der Aspekt, dass ein Verlust oder eine Reduktion von Par3 sich förderlich auf die Tumorgenese auswirkt, wurde in jüngster Zeit vermehrt diskutiert. Losgelöst vom Mausmodell weist ebenfalls eine Reihe von Untersuchungen an humanen Tumorgeweben auf kontroverse Befunde bezüglich der Expression von Par3 hin.[51–56] Neben bereits vorliegenden Ergebnissen wie zum Beispiel zum Karzinom der Mamma, des Ösophagus oder der

Prostata schließt diese Arbeit nun unter anderem eine Lücke in Bezug auf das Karzinom der Bindehaut.

Während der Fokus der Forschung rund um Par3 in Karzinomen vornehmlich auf der Expression des *polarity proteins* in der Läsion selbst liegt, lenkte Mescher et al. das Augenmerk auf die Melanom-benachbarten Keratinozyten. Der Aspekt des sonst vernachlässigten Mikroenvironments des Tumors wird in dieser Arbeit aufgegriffen. Darüber hinaus werden erstmals Ergebnisse zur Expressionsmuster von Par3 im malignen Melanom der Konjunktiva präsentiert.

4.2.1. Reduktion von Par3 im Plattenepithelkarzinom

Von den bisher vorliegenden Arbeiten zu Par3 in Plattenepithelkarzinomen lässt sich als Gemeinsamkeit der tumorfördernde Einfluss einer Inaktivierung oder Reduktion des PARD3 auf die Karzinogenese beziehungsweise Tumor-Progression ableiten. [53, 83–85] Die Reihe der Entitäten für die dies gezeigt werden konnte, kann nun um das Karzinom der Konjunktiva erweitert werden. Im semiquantitativen Verfahren zeigt sich die Expression von Par3 sowohl in den Untergliederungen der Präkanzerosen als auch im Karzinom gegenüber der Kontrolle vermindert. Weiterhin wird diese These durch die signifikanten Ergebnisse aus der quantitativen Analyse, welche für CIN3 gegenüber der Kontrolle erzielt werden konnte, gestützt. Weitere Studien mit höheren Fallzahlen werden für die Carcinoma in situ benötigt, um einen Rückschluss für die Klinik schließen zu können.

4.2.2. Par3 zeigt im malignen Melanom im Rahmen des Differenzierungsverlustes eine reduzierte und inhomogene Expression

Anhand der Detektion mittels Immunfluoreszenz-Technik in mit Paraffin konservierten Präparaten konnte erstmals die Expression von Par3 in malignen Melanomen der humanen Bindehaut quantifiziert werden.

Wie bereits oben beschrieben kommt es im Verlauf des Entartungsprozesses im Plattenepithelkarzinom neben einer Reduktion der Par3 Expression zu einer Aberration dieser. Eine solche Beobachtung konnte bisher in Ermangelung entsprechender Untersuchungen in Bezug auf das maligne Melanom noch nicht gemacht werden. Betrachtet man nun die Färbungen mit Immunfluoreszenz-Technik gegen Anti-Par3, zeichnet sich dies auch für das maligne Melanom ab: Die Expression von Par3 persistiert bei Zunahme des Grades des Differenzierungsverlustes, lässt sich jedoch reduziert gegenüber der Kontrolle und dem Melanom in situ nachweisen. Zugleich wirkt das Signal im Bereich des Cytoplasmas inhomogener, wenngleich in Betracht gezogen werden muss, dass dieser Eindruck durch die mit der Entartung einhergehenden gestörten und übermäßigen Pigmentierung assoziiert sein könnte.

Nichtsdestotrotz lässt sich im semiquantitativen Verfahren als auch in der quantitativen Analyse mittels *ImageJ* eine signifikante Reduktion von Par3 im malignen Melanom gegenüber gesunder Bindehaut konstatieren.

Obwohl die dahinter stehenden Signalwege und ursächlichen Abweichungen der physiologischen Genexpression noch nicht abschließend geklärt sind und sich hieraus weiterer Forschungsbedarf ergibt, ist dies ein Indiz dafür, dass Par3 zum einen in der Tumorgenese des malignen Melanoms involviert ist und zum anderen womöglich analog zum Plattenepithelkarzinom der Verlust des PAR 3 eine tumorfördernde Wirkung hat.

4.2.3. Weitere Studienmodelle zur genaueren Funktionsanalyse von Par3 sind vonnöten

Aktuell lässt sich keine Aussage über die Beziehung zwischen dem Expressionslevel von Par3 im Plattenepithelkarzinom respektive dem malignen Melanom der Konjunktiva und der Prognose der Patienten treffen. Diese Arbeit konnte das antiproportionale Verhältnis zwischen Expressionslevel und Differenzierungsverlust aufzeigen, lässt allerdings den klinischen Aspekt des Patientenüberlebens außen vor. Um diese Beziehung herzustellen, wäre eine Möglichkeit die Initiierung einer prospektiven Studie.

Als Teil des *polarity complex* ist Par3 prinzipiell an der Zellmembran im apikolateralen Abschnitt lokalisiert. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist die scheinbare Lokalisation von der Fixierungsmethode abhängig. Das oben geschilderte Expressionsmuster manifestiert sich nur in Kryopräparaten, während Par3 in Paraffin eingebetteten Gewebeproben eher cytoplasmatisch zu detektieren ist.[25, 26] Darüber hinaus wäre in Frischpräparaten eine Quantifizierung beispielsweise per WesternBlot möglich. Aufgrund der Restriktion auf Nutzung von humanen Präparaten wird dies und die Kryofixation aus forensischen Gründen jedoch eher nicht zu realisieren sein, sodass an dieser Stelle gegebenenfalls auf das Mausmodell zurückgegriffen werden muss.

4.3. Gegenüberstellung der Expressionslevel der Läsionen und der benachbarten Keratinozyten

Während in Bezug auf die Tumorgenese das Hauptaugenmerk häufig auf gesteigerter und autonomer Proliferation, Immortalisierung, Neoangiogenese sowie Invasion liegt, gerät das den Tumor umgebende Mikro-Milieu meist aus dem Fokus. Dabei weist nicht nur das maligne Geschehen an sich Aberrationen auf, sondern wie unlängst bekannt ist, die ihn umgebenden Zellen und die Extrazellulärmatrix. Wenngleich die Interaktion während der Karzinogenese zwischen den entarteten Zellen und dem Umfeld bisher wenig verstanden ist, so geht man davon

aus, dass nicht nur die Tumorzellen ihr Umfeld zu ihren Gunsten beeinflussen, sondern auch beispielsweise durch chronische Entzündung entstandene Bedingungen prä-kanceröse Nischen darstellen, in denen sich im Rahmen von Anpassungsprozessen Tumorzellen entwickeln.[100, 101]

In Zusammenhang mit malignen Melanoma konnte Haass' schon 2005 beobachten, dass Melanocyten durch die sie umgebenden Keratinozyten über parakrine Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Kontakte kontrolliert werden. Gerät dieses fragile Gleichgewicht aus der Balance bedingt dies die Entstehung von Melanomen.

Weiterführend beschrieb Mescher et al. erst Anfang 2017 im Mausmodell, dass die Reduktion von Par3 in den an Melanoma angrenzenden Keratinozyten die Proliferation und das Überleben der Melanomzellen fördert und darüber hinaus mit Dedifferenzierung sowie Invasion und Metastasierung einhergeht.[57]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es möglich in einer geringen Anzahl an Präparaten (n(CIN3)=2; n(MM)=1) die Expression von E-Cadherin und Par3 in der jeweiligen Läsion und zugleich in den phänotypisch gesunden, benachbarten Keratinozyten zu beurteilen (siehe Abbildung 19). Konkordant zu den Funden von Mescher et al. konnte für das konjunktivale Melanom eine Reduktion der Expression von Par3 im angrenzenden Epithel nachgewiesen werden. Beachtenswert ist an dieser Stelle, dass sich ein korrespondierendes Phänomen auch für das Carcinoma in situ dritten Grades beschreiben lässt. Ein vergleichbarer Befund wurde bisher nur durch Huang et al. bezüglich des humanen kolorektalen Karzinoms gemacht. Seine Arbeitsgruppe untersuchte Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen sowie solche, welche einen zuvor definierten Abstand zum Tumor hatten, auf verschiedene Proteine, unter anderem Par3 und E-Cadherin. Bei beiden präsentierte sich das Expressionslevel bei einem Abstand von 2 cm geringer, als dies der Fall bei 10 cm war.[102]

Eine analoge Beobachtung ließ sich für E-Cadherin nicht machen.

4.3.1. Par3 als Tumormarker im Microenvironment

Anhand der Gegenüberstellung der malignen Gewebeabschnitte und der unmittelbar benachbarten Keratinozyten manifestierte sich eine aberrante Reduktion von Par3 im *Microenvironment* des Tumors. Wie auch Huang et al. annimmt[102] kann diese Erkenntnis zu einem späteren Zeitpunkt womöglich im Rahmen der Frühdiagnostik nützlich sein. Par3 in den adjazenten Zellen zu untersuchen, könnte ein weiterer Aspekt bei fraglich malignen Raumforderungen sein und als Indikator für einen malignen Prozess funktionieren.

Wenngleich die Chemotherapie des malignen Melanoms respektive Plattenepithelkarzinoms der Konjunktiva gegenüber der Resektion eine untergeordnete Rolle spielt, ist der Gesichtspunkt des veränderten Mikro-Milieus ferner relevant, als dass diese einen Einfluss auf das Ansprechen der Therapie haben kann.[103] Kenntnisse hierüber könnten folglich über die Wahl der Therapie entscheiden und die Prognose des Patienten beeinflussen.

Um die hier gemachten Resultate weiter verwerten zu können, bedarf es jedoch weiterer gezielter Forschung.

4.4. Abschließende Betrachtung

Die vorliegende Arbeit konnte gleichermaßen Wissenslücken in Bezug auf die Expression von E-Cadherin respektive Par3 im Plattenepithelkarzinom beziehungsweise im malignen Melanom der humanen Konjunktiva schließen als auch weiteren Forschungsbedarf aufdecken. Wohlmöglich trägt sie dazu bei, dass die Rolle des Microenvironments, welches den Tumor umgibt, vom Abseits vermehrt in den Fokus der Betrachtung gezogen wird.

Die Ergebnisse steuern ein kleines Puzzlestück zum Verständnis der Tumorgenese bei und bieten gar in Zukunft einen Ansatzpunkt der zielgerichteten individualisierten Tumorthherapie.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Expressionsmuster von Par3 und E-Cadherin im malignen Melanom und im Plattenepithel-Karzinom der humanen Konjunktiva untersucht. Beide Proteine sind maßgeblich an der Zellpolarität beziehungsweise an Zell-Zell-Kontakten beteiligt und weisen als solche Aberrationen im Rahmen der Tumorgenese auf.

In intraoperativ entnommenen Exzidaten beziehungsweise Resektaten von Plattenepithelkarzinomen respektive malignen Melanomen und deren jeweiligen präkanzerösen Vorläufern (M.i.s, CIN1-3) erfolgte die Demaskierung der antigenen Strukturen mittels Anti-E-Cadherin- und Anti-Par3-Antikörpern in Immunfluoreszenz-Technik. Über eine dreistufige Graduierung als auch eine absolute Erhebung der Signalintensitäten mit Hilfe von *ImageJ* konnten die Daten quantifiziert werden.

Zahlreiche Studien, welche die Expression von E-Cadherin im Plattenepithelkarzinomen zum Inhalt haben, konstatieren einen Verlust der Spezifität beziehungsweise die Reduktion dieser im Rahmen der Entartung. In der hier gezeigten Arbeit zeichnet sich ab, dass sich die Konjunktiva als mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel in dieses Muster einreicht.

Beim malignen Melanom suggerieren beide Analyseverfahren eine Reduktion von E-Cadherin im malignen Melanom gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$). Zudem zeigte sich das sonst streng auf die Zellmembran beschränkte Signal insgesamt inhomogener. Neben Abschnitten des Tumorgewebes mit schwacher und oder unspezifischer Expression von E-Cadherin konnten solche mit augenscheinlich erhaltener Spezifität nachgewiesen werden.

Vergleichbar zeigt sich eine signifikante Abnahme hinsichtlich des detektierten Signals für Par3 im malignen Melanom ebenso wie in den Carcinoma in situ, weshalb tendenziell von einem Verlust der Expression einhergehend mit einem Differenzierungsverlust ausgegangen werden kann. Eine vollkommene Abwesenheit des Antigens konnte nicht beobachtet werden.

Weiterhin konnte eine verminderte Immunreaktivität für Par3 im Bereich der adjazenten Keratinozyten gegenüber dem malignen Gewebeabschnitt beobachtet werden. Dies traf sowohl für das maligne Melanom als auch das Carcinoma in situ 3 zu.

Die gewonnenen Erkenntnisse fügen sich in die aktuelle Studienlage ein und ergänzen diese in Bezug auf die Verhältnisse in der humanen Konjunktiva. Das Wissen um einen graduellen Expressionsverlust lässt prognostische Schlüsse zu, welche für den Behandler als auch den Betroffenen von Relevanz sind. Hierzu bedarf es weiterer Untersuchungen, die unter anderem das Expressionslevel dem Outcome und prognostischen Faktoren wie Metastasierung gegenüberstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N (2009). In vivo confocal microscopy of the bulbar conjunctiva. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 37:335–344
2. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2012). Taschenlehrbuch Histologie, 4. Thieme, Stuttgart
3. Shams PN, Ortiz-Pérez S, Joshi N (2013). Clinical Anatomy of the Periocular Region. *Facial Plastic Surgery* 29:255–263
4. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2012). Prometheus. Lernatlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie, 3. Auflage Thieme, Stuttgart
5. Paulsen F (2008). Functional anatomy and immunological interactions of ocular surface and adnexa. *Dev Ophthalmol* 41:21–35
6. Potop V, Dumitrache M, Ciocalteu A (2009). The surface of the eye – a superficial entity with deep repercussions. *J Med Life* 2:66–71
7. Bron AJ, Tripathi RC, Tripathi BJ (1997). The Ocular Appendages: Eyelids, Conjunctiva and Lacrimal Apparatus. *Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit*
8. Messmer EM, Mackert MJ, Zapp DM, Kampik A (2006). In Vivo Confocal Microscopy of Normal Conjunctiva and Conjunctivitis: *Cornea* 25:781–788
9. Lawrenson JG (2004). Conjunctival Stroma. *Contact Lens Complications*
10. Steven P, Gebert A (2009). Conjunctiva-associated lymphoid tissue - current knowledge, animal models and experimental prospects. *Ophthalmic Res* 42:2–8
11. Schaser K-D, Settmacher U, Puhl G, Zhang L, Mittlmeier T, Stover JF, Vollmar B, Menger MD, Neuhaus P, Haas NP (2003). Noninvasive analysis of conjunctival microcirculation during carotid artery surgery reveals microvascular evidence of collateral compensation and stenosis-dependent adaptation. *J Vasc Surg* 37:789–797
12. Meyer PAR (1989). The circulation of the human limbus. *Eye* 3:121–127
13. Thiel W (2006). *Photographischer Atlas der Praktischen Anatomie*. Springer Science & Business Media
14. Bennett ES, Weissman BA (2005). *Clinical Contact Lens Practice*. Lippincott Williams & Wilkins
15. Shin K, Fogg VC, Margolis B (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:207–235
16. Nelson WJ (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422:766–774

17. Ellenbroek SIJ, Iden S, Collard JG (2012). Cell polarity proteins and cancer. *Seminars in Cancer Biology* 22:208–215
18. Coopman P, Djiane A (2016). Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cell Mol Life Sci* 73:3535–3553
19. Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52:311–320
20. Watts JL, Etemad-Moghadam B, Guo S, Boyd L, Draper BW, Mello CC, Priess JR, Kemphues KJ (1996). *par-6*, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development* 122:3133–3140
21. Cowan CR, Hyman AA (2004). Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:427–453
22. Kemphues K (2000). PARsing Embryonic Polarity. *Cell* 101:345–348
23. Assémat E, Bazellières E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D (2008). Polarity complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778:614–630
24. Chatterjee SJ, McCaffrey L (2014). Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 6:15–27
25. Helfrich I, Schmitz A, Zigrino P, Michels C, Haase I, Bivic A le, Leitges M, Niessen CM (2007). Role of aPKC Isoforms and Their Binding Partners Par3 and Par6 in Epidermal Barrier Formation. *Journal of Investigative Dermatology* 127:782–791
26. Iden S, van Riel WE, Schäfer R, Song J-Y, Hirose T, Ohno S, Collard JG (2012). Tumor type-dependent function of the *par3* polarity protein in skin tumorigenesis. *Cancer Cell* 22:389–403
27. Roy F van, Bex G (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65:3756–3788
28. Takeichi M (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75:464–474
29. Hyafil F, Babinet C, Jacob F (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26:447–454
30. Bertolotti R, Rutishauser U, Edelman GM (1980). A cell surface molecule involved in aggregation of embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4831–4835
31. Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Developmental Biology* 101:19–27
32. Bex G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers MJ, van Bokhoven A, van Roy F (1995). Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 26:281–289

33. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM (2001). E-Cadherin Suppresses Cellular Transformation by Inhibiting β -Catenin Signaling in an Adhesion-Independent Manner. *J Cell Biol* 153:1049–1060
34. Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 23:1739–1748
35. Boller K, Vestweber D, Kemler R (1985). Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 100:327–332
36. Silye R, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Poole S, Van Noorden S, Batchelor W, Regele H, Sega W, Boesmueller H, Krausz T, Pignatelli M (1998). E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 186:350–355
37. Cheuk W, Chan JKC (2004). Subcellular localization of immunohistochemical signals: knowledge of the ultrastructural or biologic features of the antigens helps predict the signal localization and proper interpretation of immunostains. *Int J Surg Pathol* 12:185–206
38. Simões-Correia J, Figueiredo J, Oliveira C, van Hengel J, Seruca R, van Roy F, Suriano G (2008). Endoplasmic reticulum quality control: a new mechanism of E-cadherin regulation and its implication in cancer. *Hum Mol Genet* 17:3566–3576
39. Bradshaw RA, Dennis EA (2003). *Handbook of Cell Signaling, Three-Volume Set*. Academic Press
40. Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004). *Pathologie, 3*. Elsevier GmbH, München
41. Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK (2016). Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer* 15:18
42. Gunaratne A, Thai BL, Di Guglielmo GM (2013). Atypical Protein Kinase C Phosphorylates Par6 and Facilitates Transforming Growth Factor β -Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Mol Cell Biol* 33:874–886
43. RKI - 2015 - Neue Daten zu Krebs in Deutschland.
https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2015/11_2015.html
l. (Zuletzt abgerufen am 11.03.2019)
44. Aranda V, Haire T, Nolan ME, Calarco JP, Rosenberg AZ, Fawcett JP, Pawson T, Muthuswamy SK (2006). Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol* 8:1235–1245
45. Zhang K, Zhao H, Ji Z, Zhang C, Zhou P, Wang L, Chen Q, Wang J, Zhang P, Chen Z, Zhu HH, Gao WQ (2016). Shp2 promotes metastasis of prostate cancer by attenuating the PAR3/PAR6/aPKC polarity protein complex and enhancing epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 35:1271–1282
46. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M (2007). *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447:330–333

47. Regala RP, Davis RK, Kunz A, Khor A, Leitges M, Fields AP (2009). Atypical protein kinase C{iota} is required for bronchioalveolar stem cell expansion and lung tumorigenesis. *Cancer Res* 69:7603–7611
48. Gunaratne A, Di Guglielmo GM (2013). Par6 is phosphorylated by aPKC to facilitate EMT. *Cell Adh Migr* 7:357–361
49. Hirose T, Karasawa M, Sugitani Y, Fujisawa M, Akimoto K, Ohno S, Noda T (2006). PAR3 is essential for cyst-mediated epicardial development by establishing apical cortical domains. *Development* 133:1389–1398
50. Ali NJA, Gomes MD, Bauer R, Brodesser S, Niemann C, Iden S (2016). Essential Role of Polarity Protein Par3 for Epidermal Homeostasis through Regulation of Barrier Function, Keratinocyte Differentiation, and Stem Cell Maintenance. *J Invest Dermatol* 136:2406–2416
51. Xue B, Krishnamurthy K, Allred DC, Muthuswamy SK (2013). Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nat Cell Biol* 15:189–200
52. McCaffrey LM, Montalbano J, Mihai C, Macara IG (2016). Loss of the Par3 Polarity Protein Promotes Breast Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Cell* 30:351–352
53. Zen K, Yasui K, Gen Y, Dohi O, Wakabayashi N, Mitsufuji S, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Okanoue T, Yoshikawa T (2009). Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 28:2910–2918
54. Dagher J, Dugay F, Rioux-Leclercq N, Verhoest G, Oger E, Bensalah K, Cabillic F, Jouan F, Kammerer-Jacquet SF, Fergelot P, Vigneau C, Arlot-Bonnemains Y, Berlaud-Rotureau MA, (2014). Cytoplasmic PAR-3 protein expression is associated with adverse prognostic factors in clear cell renal cell carcinoma and independently impacts survival. *Human Pathology* 45:1639–1646
55. Dugay F, Le Goff X, Rioux-Leclercq N, Chesnel F, Jouan F, Henry C, Cabillic F, Verhoest G, Vigneau C, Arlot-Bonnemains Y, Berlaud-Rotureau M (2014). Overexpression of the polarity protein PAR-3 in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 134:2051–2060
56. Jan Y-J, Ko B-S, Liu T-A, Wu Y-M, Liang S-M, Chen S-C, Wang J, Liou J-Y (2013). Expression of Partitioning Defective 3 (Par-3) for Predicting Extrahepatic Metastasis and Survival with Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 14:1684–1697
57. Mescher M, Jeong P, Knapp SK, Rübsam M, Saynisch M, Kranen M, Landsberg J, Schlaak M, Mauch C, Tüting T, Niessen CM, Iden S (2017). The epidermal polarity protein Par3 is a non-cell autonomous suppressor of malignant melanoma. *J Exp Med* 214:339–358
58. Christofori G, Semb H (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24:73–76
59. Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66:107–119

60. Behrens J, Weidner KM, Frixen UH, Schipper JH, Sachs M, Arakaki N, Daikuhara Y, Birchmeier W (1991). The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility. *EXS* 59:109–126
61. Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114:111–118
62. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Höfler H (1994). E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54:3845–3852
63. Mărgineanu E, Cotrutz CE, Cotrutz C (2008). Correlation between E-cadherin abnormal expressions in different types of cancer and the process of metastasis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 112:432–436
64. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F (1995). E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 14:6107–6115
65. Graziano F, Mandolesi A, Ruzzo A, Bearzi I, Testa E, Arduini F, Silva R, Muretto P, Mari D, Berardi R, Scartozzi M, Lai V, Cascinu S, Magnani M (2004). Predictive and Prognostic Role of E-Cadherin Protein Expression in Patients with Advanced Gastric Carcinomas Treated with Palliative Chemotherapy. *TBI* 25:106–110
66. Rajwar YC, Jain N, Bhatia G, Sikka N, Garg B, Walia E (2015). Expression and Significance of Cadherins and Its Subtypes in Development and Progression of Oral Cancers: A Review. *J Clin Diagn Res* 9:ZE05-07
67. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392:402–405
68. Suriano G, Oliveira C, Ferreira P, Machado JC, Bordin MC, De Wever O, Bruyneel EA, Moguilevsky N, Grehan N, Porter TR, Richards FM, Hruban RH, Roviello F, Huntsman D, Mareel M, Carneiro F, Caldas C, Seruca R (2003). Identification of CDH1 germline missense mutations associated with functional inactivation of the E-cadherin protein in young gastric cancer probands. *Hum Mol Genet* 12:575–582
69. Feuchtinger A, Stiehler T, Jütting U, Marjanovic G, Luber B, Langer R, Walch A (2015). Image analysis of immunohistochemistry is superior to visual scoring as shown for patient outcome of esophageal adenocarcinoma. *Histochem Cell Biol* 143:1–9
70. Miller AJ, Mihm MC (2006). Melanoma. *N Engl J Med* 355:51–65
71. Honavar SG, Manjandavida FP (2015). Tumors of the ocular surface: A review. *Indian J Ophthalmol* 63:187–203
72. Westekemper H, Schallenberg M, Tomaszewski A, Nüchel H, Sauerwein W, Meller D, Steuhl K (2011). Maligne epibulbäre Tumoren: Neue Strategien in Diagnostik und Therapie. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 228:780–792
73. Shields CL, Demirci H, Karatza E, Shields JA (2004). Clinical survey of 1643 melanocytic and nonmelanocytic conjunctival tumors. *Ophthalmology* 111:1747–1754

74. Scott IU, Karp CL, Nuovo GJ (2002). Human papillomavirus 16 and 18 expression in conjunctival intraepithelial neoplasia. *Ophthalmology* 109:542–547
75. Lang GK, Lang GE (2015). *Augenheilkunde essentials*. Georg Thieme Verlag
76. Shields CL, Shields JA (2004). Tumors of the conjunctiva and cornea. *Survey of Ophthalmology* 49:3–24
77. Damato B, Coupland SE (2008). Conjunctival melanoma and melanosis: a reappraisal of terminology, classification and staging. *Clin Experiment Ophthalmol* 36:786–795
78. Tucker RichardP, Gong Q (2014). Immunohistochemistry and In Situ Hybridization in the Developing Chicken Brain. In: Sprecher SG (ed) *Brain Development*. Humana Press, pp 217–233
79. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J* 46:258–268
80. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches (2001). Metastasiertes Mammakarzinom: Welche Patientinnen profitieren von einer Antikörper-Therapie? In: *Deutsches Ärzteblatt*. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/29458/Metastasiertes-Mammakarzinom-Welche-Patientinnen-profitieren-von-einer-Antikoerper-Therapie>. (Zuletzt abgerufen am 27.06.2019)
81. Gichuhi S, Sagoo MS (2016). Squamous cell carcinoma of the conjunctiva. *Community Eye Health* 29:52–53
82. Lommatzsch PK, Werschnik C (2002). Das maligne Melanom der Bindehaut. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 219:710–721
83. Rothenberg SM, Mohapatra G, Rivera MN, Winokur D, Greninger P, Nitta M, Sadow PM, Sooriyakumar G, Brannigan BW, Ulman MJ, Perera RM, Wang R, Tam a, Ma XJ, Erlander M, Sgroi DC, Rocco JW, Lingen MW, Cohen EEW, Louis DN, Settleman J, Haber DA (2010). A genome-wide screen for microdeletions reveals disruption of polarity complex genes in diverse human cancers. *Cancer Res* 70:2158–2164
84. Bonastre E, Verdura S, Zondervan I, Facchinetti F, Lantuejoul S, Chiara MD, Rodrigro JP, Carretero J, Condom E, Vidal A, Sidransky D, Villanueva A, Roz L, Brambilla E, Savola S, Sanchez-Cespedes M (2015). PARD3 Inactivation in Lung Squamous Cell Carcinomas Impairs STAT3 and Promotes Malignant Invasion. *Cancer Res* 75:1287–1297
85. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, Drummond JA, Peng SA, Saade RE, Tsai KY, Curry JL, Tetzlaff MT, Lai SY, Yu J, Muzny DM, Doddapaneni H, Shinbrot E, Covington KR, Zhang J, Seth S, Caulin C, Clayman GL, El-Nagger AK, Gibbs RA, Weber RS, Myers JN, Wheeler DA, Frederick MJ (2014). Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 20:6582–6592
86. Fan C, Miao Y, Zhang X, Liu D, Jiang G, Lin X, Han Q, Luan L, Xu Z, Wang E (2014). Btdb7 contributes to reduced E-cadherin expression and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 14:704

87. Yang Y-L, Chen M-W, Xian L (2014). Prognostic and Clinicopathological Significance of Downregulated E-Cadherin Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Meta-Analysis. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0099763
88. Barber AG, Castillo-Martin M, Bonal DM, Jia AJ, Rybicki BA, Christiano AM, Cordon-Cardo C (2015). PI3K/AKT pathway regulates E-cadherin and Desmoglein 2 in aggressive prostate cancer. *Cancer Med* 4:1258–1271
89. Rosenbaum L (2012). The Effect Of E-Cadherin Loss On Melanoma Formation And Metastasis. *Yale Medicine Thesis Digital Library*
90. De Marzo AM, Knudsen B, Chan-Tack K, Epstein JI (1999). E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. *Urology* 53:707–713
91. Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH (1987). Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *J Cell Biochem* 34:187–202
92. De Wever O, Derycke L, Hendrix A, De Meerleer G, Godeau F, Depypere H, Bracke M (2007). Soluble cadherins as cancer biomarkers. *Clin Exp Metastasis* 24:685–697
93. López-Verdín S, Soto-Avila J-J, Zamora-Perez A-L, Lazalde-Ramos B-P, Martínez-Fierro M-L, González-González R, Molina-Frechero N, Isiordia-Espinoza M-A, Bologna-Molina R (2017). Patients with advanced oral squamous cell carcinoma have high levels of soluble E-cadherin in the saliva. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 22:e694–e701
94. Tang MKS, Yue PYK, Ip PP, Huang R-L, Lai H-C, Cheung ANY, Tse KY, Ngan HYS, Wong AST (2018). Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface. *Nat Commun*. doi: 10.1038/s41467-018-04695-7
95. Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T, Robakis NK (2002). A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21:1948–1956
96. Shiraishi K, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Kumazawa C, Nozaki K, Abe T, Tsubota K, Takeuchi T (2005). Critical Role of the Fifth Domain of E-Cadherin for Heterophilic Adhesion with $\alpha E\beta 7$, But Not for Homophilic Adhesion. *The Journal of Immunology* 175:1014–1021
97. Yan S, Holderness BM, Li Z, Seidel GD, Gui J, Fisher JL, Ernstoff MS (2016). Epithelial–Mesenchymal Expression Phenotype of Primary Melanoma and Matched Metastases and Relationship with Overall Survival. *Anticancer Res* 36:6449–6456
98. Saitoh M (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *The Journal of Biochemistry* 164:257–264
99. Vieira AF, Paredes J (2015). P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol Cancer* 14:178
100. Guo J, Niu R, Huang W, Zhou M, Shi J, Zhang L, Liao H (2012). Growth factors from tumor microenvironment possibly promote the proliferation of glioblastoma-derived stem-like cells in vitro. *Pathol Oncol Res* 18:1047–1057

101. Brücher BLD, Jamall IS (2014). Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment, Carcinogenesis, and Anticancer Treatment. *CPB* 34:213–243
102. Huang C, Liu H, Gong X, Wen B, Chen D, Liu J, Hu F (2016). Analysis of different components in the peritumoral tissue microenvironment of colorectal cancer: A potential prospect in tumorigenesis. *Mol Med Rep* 14:2555–2565
103. Senthebane DA, Jonker T, Rowe A, Thomford NE, Munro D, Dandara C, Wonkam A, Govender D, Calder B, Soares NC, Blackburn JM, Parker MI, Dzobo (2018). The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: 3D Extracellular Matrices as Accomplices. *International Journal of Molecular Sciences* 19:2861

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Sagittalschnitt durch den menschlichen Bulbus.	11
Abbildung 2:	Mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel der Konjunktiva.	12
Abbildung 3:	Polarität-determinierende Protein-Komplexe.	15
Abbildung 4:	Hämatoxylin Färbungen der verschiedenen Entitäten.	33
Abbildung 5:	Signalintensitäten der Immunfluoreszenz Färbung für E-Cadherin und Par3.	37
Abbildung 6:	HE- und immunhistochemische Färbung von E-Cadherin in squamösen Läsionen.	40
Abbildung 7:	Semiquantitative Analyse der Signalintensitäten für E-Cadherin in squamösen Läsionen.	41
Abbildung 8:	Quantitative Analyse der Signalintensitäten mittels FIJI.	42
Abbildung 9:	HE- und immunhistochemische Färbung der melanozytären Läsionen für E-Cadherin.	44
Abbildung 10:	Diskontinuierliches und heterogenes Expressionsmuster von E-Cadherin im Melanom.	45
Abbildung 11:	Semiquantitative Analyse der Signalintensitäten für E-Cadherin in melanozytären Läsionen.	46
Abbildung 12:	Quantitative Analyse der Signalintensitäten mittels FIJI.	47
Abbildung 13:	HE- und immunhistochemische Färbung der squamösen Läsionen für Par3.	48

Abbildung 14: Semiquantitative Analyse der Signalintensitäten für Par3 in Carcinoma in situ (CIN) und Carcinoma.	49
Abbildung 15: Quantitative Analyse der Signalintensitäten mittels FIJI.	50
Abbildung 16: HE- und immunhistochemische Färbung der melanozytären Läsionen für Par3.	51
Abbildung 17: Semiquantitative Analyse der Signalintensitäten für Par3 in melanozytären Läsionen.	52
Abbildung 18: Quantitative Analyse der Signalintensitäten mittels FIJI.	53
Abbildung 19: Läsionen und benachbarte Keratinozyten.	55

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alter der Patienten in Abhängigkeit der exziierten Entität.	31
Tabelle 2: Primärantikörper mit ihren korrespondierenden Sekundärantikörpern.	35

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Rebecca Schmidt, geb. Busch
Geburtsdatum, -ort 19. Juli 1993 in Bergisch Gladbach
Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildungsverlauf

Schulbesuche 1999-2003 GGS-Asselbach - Grundschule Troisdorf
2003-2009 Am Heimbach - Realschule Troisdorf
2009-2012 Zum Altenforst - Gymnasium Troisdorf

Schulabschlüsse 18.06.2009 Mittlere Reife
29.06.2012 Abitur (Note: sehr gut [1,0])

Studium Okt. 2012 bis Nov. 2018 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln
Nov. 2017 bis Okt. 2018 Praktisches Jahr
1. Tertial Allgemeine Chirurgie, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Kolumbien
2. Tertial Nephrologie und Hämatookologie, Uniklinikum Aachen
3. Tertial Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Uniklinikum Aachen

Universitätsabschluss September 2014 Physikum (Note: sehr gut [1,38])
Oktober 2017 2. Staatsexamen (Note: gut [2,0])
15.11.2018 3. Staatsexamen (Note: gut [2,0])

Forschung

2015 bis 2017 Forschung zum Thema „Expressionsmuster von Par3 und E-Cadherin im malignen Melanom und im Plattenepithel-Karzinom der humanen Konjunktiva“, Arbeitsgruppe „Onkoophthalmologie“, Uniklinik Köln, (Leitung: Univ.-Prof. Dr. L. Heindl)

Beruflicher Werdegang

seit Januar 2019 Assistenzärztin in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie, Uniklinik Düsseldorf

Köln, den 21.09.2020