

Aus der Klinik für  
Dermatologie und Venerologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktorin: Fr. Prof. Dr. med. Ingrid Moll

**Charakterisierung von Merkelzellen  
in unterschiedlichen Lokalisationen der Haut**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Ann-Christin Eispert**  
aus Vechta

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 17.11.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Frau Prof. Dr. Ingrid Moll

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachterin: Frau PD Dr. Johanna Brandner

**Die Dissertation ist  
meinen Eltern  
Elisabeth und Gerhard Eispert  
gewidmet**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>10</b>
2.1	GEWEBE.....	10
2.2	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL.....	10
2.3	CHEMIKALIEN.....	12
2.4	MATERIAL IMMUNHISTOCHEMIE.....	12
2.4.1	Primärantikörper.....	12
2.4.2	Sekundärantikörper.....	13
2.4.3	Isotypenkontrollen.....	14
2.4.4	DNA-Färbung.....	14
2.4.5	Puffer und Lösungen.....	15
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>16</b>
3.1	ANFERTIGUNG VON KRYOSCHNITTEN UND FIXIERUNG.....	16
3.2	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG.....	16
3.2.1	Einzelfärbung.....	16
3.2.2	Doppelfärbung.....	17
3.2.3	Negativkontrolle.....	17
3.2.4	Positivkontrolle.....	17
3.3	AUSWERTUNG .....	18
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>19</b>
4.1	NEURONALE ANTIKÖRPER.....	19
4.1.1	CD 56 (N-CAM).....	19
4.1.2	NGF-Rezeptor.....	24
4.1.3	Nestin.....	29
4.1.4	Pan-Neurofilament.....	31
4.1.5	Synaptophysin.....	35
4.2	EPITHELIALE ANTIKÖRPER.....	40
4.2.1	Villin.....	40
4.3	PROTO-ONKOGENE.....	46
4.3.1	CD 117 (c-kit).....	46

4.4	VERGLEICH DER UNTERSUCHTEN MOLEKÜLE IN DEN VERSCHIEDENEN LOKALISATIONEN.....	51
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>53</b>
5.1	IDENTIFIZIERUNG VERSCHIEDENER NEUROLOGISCHER UND EPITHELIALER MARKER AUF IMMUNHISTOCHEMISCHER EBENE.....	53
5.2	VERGLEICH DER NORMALEN MERKELZELLE MIT MERKELZELLKARZINOMEN.....	59
5.3	FAZIT UND AUSBLICK.....	62
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>74</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>75</b>
<b>12</b>	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>76</b>

## 1 EINLEITUNG

Die **Merkelzelle** ist die neuroendokrine Zelle der Haut, die 1875 von Friedrich Merkel als sog. „Tastzelle“ entdeckt und später nach ihm benannt wurde. Sie ist eine ca. 10 µm durchmessende, leicht ovale, ausdifferenzierte Zelle, die sich in der Epidermis ausschließlich im Stratum basale befindet und über Desmosomen mit den umliegenden Keratinozyten verbunden ist. Ihre Dendriten sind bis zu 2,5 µm lange Zytoplasmfortsätze, die in den Interzellularraum zwischen die Keratinozyten reichen. Eine Merkelzelle kann bis zu 50 Fortsätze aufweisen, deren Funktion aber noch nicht geklärt ist [1]. Basal ist sie häufig mit Nervenendigungen assoziiert, mit denen sie eine klassische chemische Synapse ausbildet (Abb. 1).

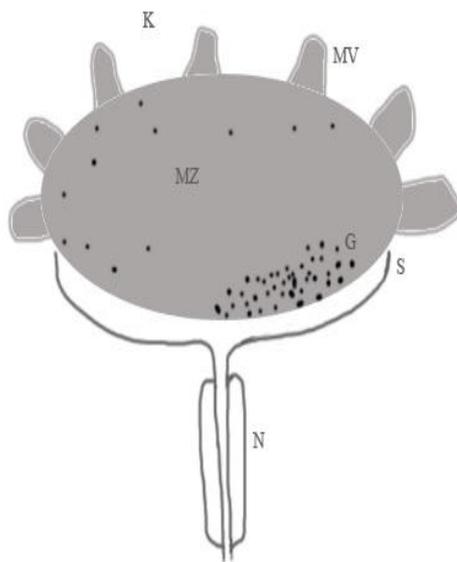


Abb. 1: Der Merkelzell-Nerv-Komplex in schematischer Darstellung. MZ = Merkelzelle, G = Granula, N = sensibler Nerv, MV = Zytoplasmfortsatz (Dendrit), S = Synapse, K = Keratinozyt

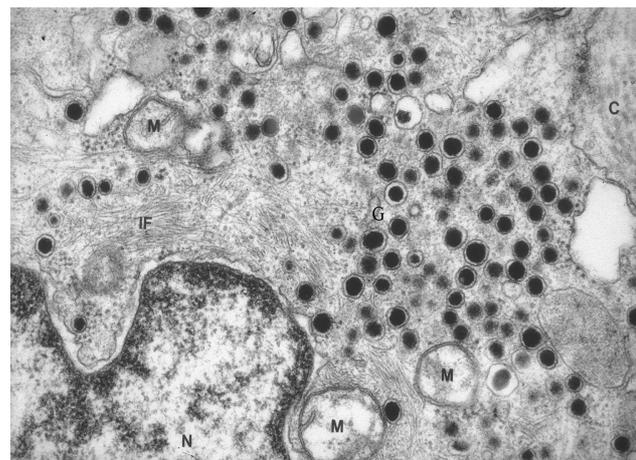
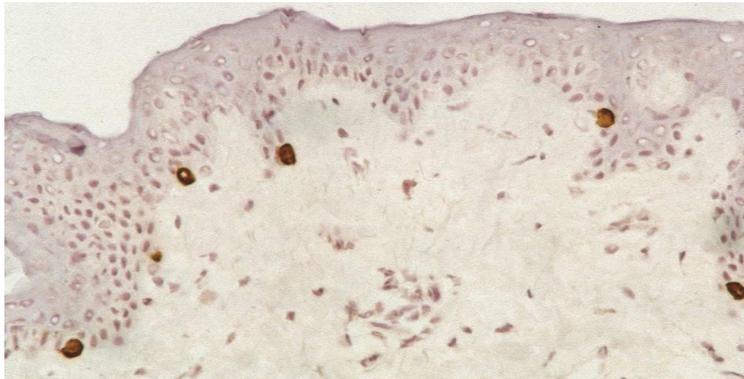


Abb. 2: Die Merkelzelle in elektronenmikroskopischer Darstellung. G = elektronendichte Granula, If = lose gepackte Intermediärfilamente, N = Zellkern

In ihrem Cytoplasma befinden sich multiple neuroendokrine Granula mit einem Durchmesser von 80-120 nm, die sich an der Basalseite akkumulieren und spezifische Neuropeptide und biogene Amine enthalten (Abb. 2) [1]. Die Funktion der Granula ist noch nicht vollständig geklärt [2].

Die Merkelzelle exprimiert Intermediärfilamente vom Cytokeratintyp (CK 8, 18, 19 und 20). Mit Hilfe spezifischer Antikörper kann die Merkelzelle so immunhistochemisch nachgewiesen werden. Besonders CK 20 ist ein verlässlicher Marker für Merkelzellen in der Haut, da in der menschlichen Haut keine weitere Zellart bekannt ist, die CK 20 exprimiert [1]. Ansonsten finden sich CK 20-positive Zellen physiologischerweise in intestinalem Gewebe, Urothelgewebe, in Geschmacksknospen der Zunge [3] und in verschiedenen Tumoren, wie z. B. dem Adenokarzinom des Colons [4] oder dem Urothelkarzinom [5]. Auch das Merkelzellkarzinom der Haut [2, 6] exprimiert CK 20. Hingegen werden CK 8 und 18 in allen einschichtigen Epithelien gefunden [7], so sind z. B. auch die Schweißdrüsenepithelien positiv [8].

Merkelzellen sind disseminiert im Stratum basale der interfollikulären Epidermis verteilt (Abb. 3), an Handinnenflächen und Fußsohlen sind sie akkumuliert in großer Zahl in der Nähe von Drüsenausführungsgängen vorzufinden.



*Abb. 3: Merkelzellverteilung im Stratum basale der interfollikulären Epidermis (lichtmikroskopisch)*

In Haarfollikeln findet man sie in der Basalzellschicht der äußeren Wurzelscheide sowohl ober- als auch unterhalb des Talgdrüsenausführungsgangs [9]. Dort ordnet sich die Merkelzelle in einer Anzahl von 30-200 gürtelförmig an. Im Haarbulbus dagegen lassen sich keine Zellen nachweisen (Abb. 4).

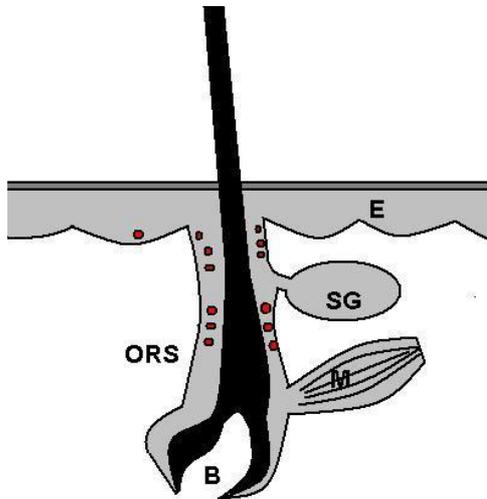


Abb. 4: Merkelzellverteilung im Bereich von Haarfollikeln (rote Punkte). B = Haarbulbus, E = Epidermis, M = Musculus erector pili, SG = Talgdrüse, ORS = äußere Wurzelscheide

Nahe der Haarfollikel gibt es in geringer Zahl sog. „Haar- oder Tastscheiben“, die auch als „Touch-Domes“ bezeichnet werden. Das sind pilzförmig verdickte Epidermisabschnitte, in denen Merkelzellen ebenfalls akkumuliert vorliegen. Die Keratinozyten der „Haarscheiben“ enthalten spezifisch CK 17 und Ber-EP 4 und lassen sich so immunhistochemisch identifizieren (Abb. 5) [1]. CK 17 ist außerdem ein Bestandteil der äußeren Wurzelscheide von Haarfollikeln [10]. Der Ber-EP 4-Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper gegen zwei epitheliale Zellmembranglykoproteine unbekannter Funktion. Das Protein befindet sich in einschichtigen Epithelien des Körpers und in Schweißdrüsen der Haut. In gewöhnlichen epidermalen Keratinozyten außerhalb der Haarscheiben ist es normalerweise nicht nachzuweisen [1].

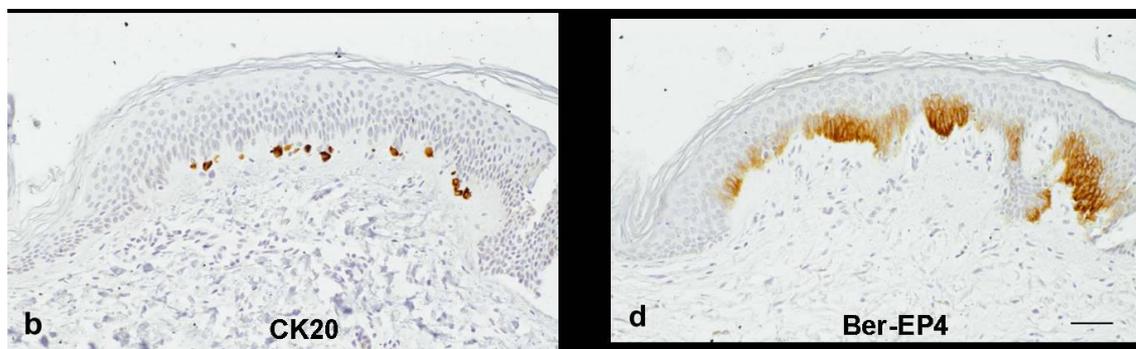


Abb. 5: b = lichtmikroskopische Darstellung von Merkelzellen in sog. Touch-Domes mit CK 20 angefärbt. d = lichtmikroskopische Darstellung von Keratinozyten in Touch-Domes mit Ber-EP 4 angefärbt.

Merkelzellen in **adulten** Haut sowohl in den Haarscheiben als auch in der Handinnenfläche und der Fußsohle sind gehäuft mit Nervenfasern assoziiert; dieser Merkelzell-Axon-Komplex funktioniert als ein langsam adaptierender Mechanorezeptor. Für diesen Prozess werden neurosekretorische Substanzen aus der Merkelzelle freigesetzt, die als Neurotransmitter im Merkelzell-Axon-Komplex dienen. Tachibana und Kollegen zeigten anhand von Proben von Ratten und Affen, dass in diese Neurotransmission spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren involviert sein könnten [11]. In den Lokalisationen, in denen die Merkelzelle keine Assoziation zu Nerven zeigt, scheint sie endokrine oder parakrine Sekretionsprozesse auszuüben. In Gaumenschleimhaut von Nagetieren wurde der ultrastrukturelle Beweis für die Exozytose von Granula aus der Merkelzelle von Tachibana und Kollegen erbracht [12], in menschlicher Haut fehlt der Nachweis bisher. Im adulten Haarfollikel könnten Merkelzellen im Bereich der Stammzellen für die Haarregeneration auch eine trophische Rolle im Regenerationsprozess spielen [13]. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Neuropeptide, wie z. B. das vasoaktive intestinale Polypeptid oder Substanz P, die auch in Merkelzellen vorkommen [1, 14], Zellwachstum und die Differenzierung verschiedener kutaner Zellen, wie z. B. Keratinozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen, fördern [15, 16]. Die Interaktion von Merkelzellen mit anderen dendritischen Zellen, besonders Langerhanszellen [17], lässt vermuten, dass sie auch eine funktionelle Rolle im neuroimmunologischen System der Haut haben könnten [18]. Auch die Interaktion von Merkelzellen mit Melanozyten wurde beobachtet [1]. Funktionelle Zusammenhänge sind aber noch nicht geklärt.

In **fetaler** Haut scheinen die Merkelzellen noch weitere Funktionen auszuüben. Hier wird diskutiert, ob die Präsenz von Nervenwachstumsfaktorrezeptoren (NGF-Rezeptor) an der Oberfläche der Merkelzellen im Bereich des Merkelzell-Axon-Komplexes wichtig für die periphere Nervenentwicklung ist und die Merkelzelle als Zielstruktur für einwachsende Nerven dient [2, 19]. In fetaler Haut befinden sich außerdem Anhäufungen von Merkelzellen in Bereichen, in denen Hautanhangsgebilde entstehen, woraus geschlossen werden könnte, dass die Zellen die Entwicklung dieser Strukturen fördern [8].

**Merkelzellkarzinome** (Merkel cell carcinoma, MCC) wurden erstmals 1972 von Toker beschrieben. Diese Karzinome befinden sich im Gegensatz zu Merkelzellen meist dermal und infiltrieren die Epidermis nicht. Prädilektionsstellen sind meist die sonnenexponierten Hautregionen bei älteren Personen. MCC sind aggressive maligne neuroendokrine Tumoren mit Metastasierungstendenz, die ebenso wie Merkelzellen das spezifische Intermediärfilament Cytokeratin (CK 20) enthalten. CK 20 ist somit, wie bereits erwähnt, auch ein verlässlicher Marker für MCC [3, 6].

Weiter ist bekannt, dass in MCC sowohl neuronale (z. B. N-CAM, Synaptophysin) [20, 21] als auch epitheliale (z. B. Villin) [22] Proteine sowie Proto-Onkogene (z. B. CD 117) [23] nachgewiesen werden können.

Bisher ist noch nicht geklärt, ob die Ursprungszellen der MCC Merkelzellen sind, da man sowohl Gemeinsamkeiten (der neuroendokrine Phänotyp beweisend durch die Anwesenheit von Chromogranin A und häufig Synaptophysin und die konstante Expression von CK 20) als auch Unterschiede (die Intermediärfilamente sind in MCC plaqueartig, in MC dagegen eher diffus angeordnet, MCC weisen sehr häufig den c-kit-Rezeptor CD 117 auf, Merkelzellen dagegen nicht) in der Expression verschiedener Moleküle finden kann [1]. Zudem weist die ausschließlich dermale Lokalisation von MCC auf einen nicht-epidermalen Ursprung hin.

Die Genese der Merkelzellen ist bisher ungeklärt. Es gibt sowohl Hinweise für eine epidermale als auch für eine neuronale Genese. Die epidermale Entstehungstheorie besagt, dass die Merkelzellen aus Stammzellen (Basalzellen) hervorgehen [2], die neuronale, dass die Merkelzellen im Laufe der Embryogenese aus der Dermis in die Epidermis einwandern [2, 9] und als Zielstrukturen für Nervenendigungen dienen. Für beide Theorien würde die Anwesenheit sowohl von neuronalen (z. B. NGF-Rezeptor) als auch von epithelialen (z. B. CK 20) Markern sprechen.

Des Weiteren ist unklar, ob es sich bei Merkelzellen tatsächlich um eine homogene Zellpopulation handelt, oder ob es eine Gruppe von Zellen ist, die allgemein durch die Anwesenheit der Cytokeratine 8, 18, 19 und 20 charakterisiert ist. Diese These wird von den unterschiedlichen für Merkelzellen beschriebenen Funktionen als auch durch ihre unterschiedlichen Zellformen (rund und dendritisch) [12, 24] unterstützt.

Die Zielsetzung meiner Doktorarbeit ist die immunhistochemische Charakterisierung von Merkelzellen in unterschiedlichen Lokalisationen der Haut und somit die Klärung der Frage, ob es in menschlicher Haut verschiedene Populationen von Merkelzellen gibt. Dazu werden die im Folgenden beschriebenen neuronalen und epithelialen Antikörper und Proto-Onkogene verwendet: Diese Ergebnisse werden dann mit aus der Literatur bekannten Erkenntnissen für MCC verglichen.

Bei **CD 56 (N-CAM)** handelt es sich um ein neuronales Zelladhäsionsmolekül, das zu den Immunglobulin-ähnlichen Zelladhäsionsmolekülen, einer Subgruppe der Immunglobulin-Superfamilie, gehört, das auf den meisten neuroektodermalen Zelllinien vorhanden ist. N-CAM wird z. B. von Neuronen, Gliazellen und Astrozyten exprimiert. Das Molekül existiert in verschiedenen Isoformen, die nach ihrem Molekulargewicht in N-CAM-180, N-CAM-140 und N-CAM-120 eingeteilt werden. Die Isoformen können sowohl homophile (N-CAM-N-CAM-Bindung) als auch heterophile Bindungen (N-CAM-Spektrin, N-CAM-extrazelluläre Matrix, u. a.) eingehen [25]. Die heterophilen N-CAM-Interaktionen initiieren verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege, die eine Reihe biologischer Antworten regulieren, wie z. B. zelluläre Differenzierung, Proliferation, Migration, Zellüberleben und synaptische Plastizität [25]. In Merkelzellen und Merkelzellkarzinomen konnte N-CAM in der Plasmamembran nachgewiesen werden [6, 21]. In dieser Arbeit wurde ein Antikörper verwendet, der alle drei N-CAM-Isoformen erkennt.

Der **NGF-Rezeptor** (nerve growth factor receptor) p75-NTR gehört zu einer großen Familie von Rezeptoren, die auch den Tumornekrosefaktorrezeptor einschließt. Er ist ein Zelloberflächenrezeptor, der Neurotrophine, z. B. den Nervenwachstumsfaktor (NGF), den vom Gehirn abstammenden Neurotrophinfaktor (BDNF) oder Neurotrophin NT-3 und NT-4/5 binden kann [26]. Der NGF-Rezeptor wird z. B. von neuronalen Vorläuferzellen im cerebralen Kortex gebildet [27]. Die wichtigste Funktion des NGF-Rezeptors ist die Induktion der Apoptose. Weiter ist er wichtig für die Entwicklung, Differenzierung und Aufrechterhaltung der Funktion peripherer sympathischer und sensibler Neurone.

In Merkelzellen wurde der Rezeptor in den sog. Tastscheiben gefunden, wo er für die periphere neuronale Entwicklung eine Rolle spielen könnte [1]. Außerdem konnte eine deutliche Expression des NGF-Rezeptors in dermalen Merkelzellen in fetaler Haut nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass NGF-R für die fetale Entwicklung peripherer Nerven eine Rolle spielen könnte [19].

**Nestin** ist ein Intermediärfilamentprotein (ca. 10 nm), das neben den Mikrofilamenten, wie z. B. Aktin (ca. 6-8 nm), und den Mikrotubuli (ca. 24 nm) eine zentrale Rolle für das dynamische Verhalten und die mechanische Stabilität der Zytoarchitektur der Zelle spielt [28]. Es liegt im Cytoplasma. Nestin hat ein Molekulargewicht von ca. 200 kD und ist spezifisch für neuronale Vorläuferzellen. Nach der terminalen neuronalen Differenzierung wird es herabreguliert und durch Neurofilamente ersetzt. Weder in Merkelzellen noch in Merkelzellkarzinomen konnte bisher Nestin nachgewiesen werden.

**Neurofilamentproteine** sind wie Nestin Intermediärfilamente. Sie können in differenzierten neuronalen Zellen nachgewiesen werden [29]. In menschlichen Zellen finden sich drei Neurofilamentsubtypen mit Molekulargewichten von 68 kD, 150 kD und 200 kD. Die leichteste Untereinheit NF-L wird vorwiegend zu Beginn der neuronalen Differenzierung gebildet, die mittlere NF-M kurz nach dem Auftreten neuronaler Formation und die schwerste NF-H zu dem Zeitpunkt, wenn das axonale Wachstum für die Reifung des Nervensystems benötigt wird [29]. Neurofilamente sind bei Nagetieren obligat Heteropolymere, gebildet jeweils von NF-L und entweder NF-M oder NF-H. Beim Menschen ist noch nicht genau geklärt, ob es auch Homopolymere gibt, da NF-L in vitro Homopolymere bilden kann. Neurofilamente sind als Bestandteil des Cytoskeletts wichtig für die strukturelle Integrität, die Zellform und die zelluläre und organelle Beweglichkeit. Die wichtigste Aufgabe der Neurofilamente ist es, den axonalen Durchmesser zu kontrollieren, was mit dem Phosphorylierungsstatus der Neurofilamente assoziiert ist [29]. In der Literatur wurden Neurofilamente sowohl in Merkelzellen [30] als auch in Merkelzellkarzinomen [20] nachgewiesen. Es gibt aber auch Berichte, die Neurofilamente in Merkelzellen als abwesend beschreiben [30]. In dieser Arbeit wurde ein Antikörper verwendet, der alle drei Neurofilament-Subtypen erkennt.

**Synaptophysin** ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 38 kD, das in allen Nervenendigungen vorkommt, wo es in der Membran neuronaler präsynaptischer Vesikel zu finden ist. Außerdem konnte es in neuroendokrinen Zellen nachgewiesen werden (z. B. in den Inselzellen des Pankreas), weshalb es ein Marker für normale neuroendokrine Zellen ist, und in Neoplasmen, wie z. B. dem Merkelzellkarzinom [31]. Synaptophysin spielt in den Nervenendigungen eine Rolle in der neuronalen Differenzierung. Die Funktion in den neuroendokrinen Zellen bzw. den Neoplasmen ist noch nicht geklärt [32]. Synaptophysin wurde in Merkelzellen beschrieben. Es befindet sich hier auf der dem Nerven abgewandten Seite in kleinen, klaren Vesikeln im Bereich der Golgi-Apparate.

**Villin** ist ein Zytoskelettprotein der Mikrovilli mit einem Molekulargewicht von 58 kD, das neben Gelsolin, Adseverin, CapG, Advillin, Supervillin und Flightless zur Gelsolinprotein-Superfamilie gehört und unter anderem in absorptiven Epithelzellen des Intestinums zu finden ist [33]. Die Hauptfunktion von Villin ist die Regulation der Dynamik von Aktin, das als Bestandteil des Zytoskeletts für die Stabilität der Zelle von Bedeutung ist. In der Literatur ist Villin in Merkelzellen [34] und in einigen Merkelzellkarzinomen beschrieben worden [22].

**CD 117**, auch **c-kit** genannt, ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 145 kD, der den Stammzellsfaktor, auch bekannt als Mastzellenwachstumsfaktor, binden kann. CD 117 wird z. B. von melanozytären Vorläuferzellen, Melanozyten, Mastzellen, eosinophilen und basophilen Leukozyten oder hämatopoetischen Stammzellen gebildet [35, 36], von denen Mastzellen und Melanozyten die einzigen kutanen Zellen sind, die den CD 117-Rezeptor bilden [37]. Das Ligand-Rezeptor-Paar Stammzellsfaktor-CD 117 reguliert eine Reihe biologischer Antworten in diesen Zellen, wie z. B. die Zellproliferation und Reifung von Mastzellen und Melanozyten, Adhäsionen von Mastzellen an extrazellulärer Matrix und Degranulation, was zur Expression und Ausschüttung von Histaminen und proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen führt [36]. Außerdem induziert der Komplex eosinophile Adhäsionen und Aktivierung. CD 117 konnte in Merkelzellkarzinomen nachgewiesen werden [20, 23]. Die Anwesenheit von CD 117 in Merkelzellen ist umstritten [38].

**CK 8/18** ist ein Cytokeratinpaar. Cytokeratine gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente. CK 8 und 18 werden in allen einschichtigen Epithelien gefunden [7], so sind auch die Schweißdrüsenepithelien positiv [8]. Auch in Merkelzellen wurden sie nachgewiesen [1].

**CK 20** ist ebenfalls ein Intermediärfilament vom Cytokeratintyp. Er ist ein verlässlicher Marker für Merkelzellen in der Haut, da in der menschlichen Haut keine weitere Zellart bekannt ist, die CK 20 exprimiert [1]. Ansonsten finden sich CK 20-positive Zellen physiologischerweise in intestinalem Gewebe, Urothelgewebe, in Geschmacksknospen der Zunge [3] und in verschiedenen Tumoren, wie z. B. dem Adenokarzinom des Colons [4] oder dem Urothelkarzinom [5]. Auch das Merkelzellkarzinom der Haut [6] exprimiert CK 20.

## **2 MATERIAL**

### **2.1 GEWEBE**

Es wurden kryokonservierte Proben menschlicher Körperhaut, behaarter Kopfhaut und der Fußsohle verwendet. Es handelte sich um gesunde Haut, die bei der Exzision von Tumoren, Cysten u. ä. aus operationstechnischen Gründen (sog. Spindelecken, gesundes Randgewebe der Probe) anfiel und verworfen wurde. Das verwendete Gewebe war mindestens 2 cm von allen Läsionen entfernt. Die Proben wurden in mit flüssigem Stickstoff auf -120°C vorgekühltem Isopentan schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Verwendung des Materials wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (Nr. 060900) genehmigt.

Im Einzelnen wurden folgende Gewebeproben verwendet:

- 1) 5 x Körperhaut
- 2) 7 x Kopfhaut
- 3) 5 x unbehaarte Haut (Fußsohle)

Bei vier Proben war das Alter der Probanden (53, 56, 59 und 75 Jahre) bekannt, von denen alle weiblich waren. Ein Proband war männlich ohne Altersangabe.

### **2.2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL**

Bildschirm:	Color Sync
Brenner:	BPREC Lacie
Computer:	Power Macintosh G3
Deckgläser:	Superior, 20 x 20 mm Superior, 24 x 60 mm (Marienfeld GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen)
Einmalspritzen:	Injekt 10ml (Braun Melsungen AG, Melsungen)
Feinwaage:	Sartorius BL3100 (Sartorius AG, Göttingen)
Filter (steril):	Millex <sup>®</sup> -GP, 0,22 µm Filter Unit (Bedford, USA)

---

Gefrierschrank:	- Heraeus HFU586STD-V14 (Heraeus Holding GmbH, Hanau) - Liebherr Öko Super
Kryostat:	Leica CM 3050 (Leica Camera AG, Solms)
Kühlschrank:	Heraeus Instruments BK-600 (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Linsenpapier	Assistent (90 x 72 mm), No.1019, Germany
Markierungsstift für	
Gefrierschnitte:	Liquid Blocker Super PAP Pen (Daido Sangyo Co., Ltd. Tokyo, Japan)
Messbecher:	Duran® Hirschmann® EM Techcolor (Germany)
Mikroskop:	- Olympus CH-2, Lichtmikroskop (Olympus Optical GmbH (Europa), Hamburg) - Axioplan 2, Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss GmbH, Jena) mit CCD-Kamera Hamamatsu C4742-95 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching)
Objektträger:	Menzel-Gläser Super Frost Plus, 25x75x1,0mm (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co.KG, Braunschweig) Superior Laboratory Glassware (Marienfeld GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen)
pH-Meter:	Knick 766 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH&Co., Berlin) Mettler Toledo MP 220 (Mettler GmbH, Greifensee)
Pipetten:	Eppendorf Research 0,5 - 10 µl Eppendorf Research 100 µl Eppendorf Research 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
Software-Programm:	Openlap 3.0.9 (Improvision, UK) Adobe Photoshop
Schüttler:	- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, USA) - RET basic (IKA Labortechnik)
Tischwaage:	Sartorius BL610 (Sartorius AG, Göttingen)
Tischzentrifuge:	Heraeus Biofuge pico (Heraeus Holding GmbH, Hanau)

## 2.3 CHEMIKALIEN

Aceton:	Biesterfeld Chemiedistribution, Hamburg
KCl:	Merck KGaA, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Merck KGaA, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O:	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl:	Mallinckrodt Baker B. V., Deventer
Einbettungsmedium:	Tissue freezing medium Jung (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany)
Eindeckungsmedium:	Fluoromount G <sup>TM</sup> (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham)
Immersol <sup>TM</sup> 518N:	Immersionsöl für die Mikroskopie (Zeiss, Oberkochen)
Methylenblaulösung:	Löfflers Methylenblaulösung für die Mikroskopie (Merck KGaA, Darmstadt)

## 2.4 MATERIAL IMMUNHISTOCHEMIE

### 2.4.1 Primärantikörper

Cytokeratin 8/18	pAb GP11 (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg) polyklonaler Ak vom Meerschweinchen, Ig-Klasse: IgG Endverdünnung 1:200
Cytokeratin 17	mAb K <sub>S</sub> 17.E3 (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg) monoklonaler Ak von der Maus, Ig-Klasse: IgG2b Endverdünnung 1:15
Cytokeratin 20	mAb IT-K <sub>S</sub> 20.10 (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg) monoklonaler Ak von der Maus, Ig-Klasse: IgG1 Endverdünnung 1:200
CD 117/c-kit	pAb A4502 (Dako Corporation, Carpinteria) polyklonaler Ak vom Kaninchen, Ig-Klasse: Ig Endverdünnung 1:400

CD 56/N-CAM Ab-1 mAb ERIC-1 (NeoMarkers Inc., Fremont)	monoklonaler Ak von der Maus, Ig-Klasse: IgG1 Endverdünnung 1:100
Nestin	mAb 5326 (Chemicon International Inc., Temecula) monoklonaler Ak von der Maus, Ig-Klasse: IgG1 Endverdünnung 1:50
NGF-R	mAb 8211 (Boehringer, Mannheim) monoklonaler Ak von der Maus, Ig-Klasse: IgG1 Endverdünnung 1:40
Pan-Neurofilament	mAb FNP7, DA2, RMd020.11 (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, USA) monoklonaler Ak von der Maus, Ig-Klasse: IgG1 Endverdünnung 1:700
Synaptophysin	mAb SY38 (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg) monoklonaler Ak von der Maus, Ig-Klasse: IgG1 Endverdünnung 1:20
Villin	mAb ID2C3 (Immunotech, Marseille, Frankreich) monoklonaler Ak von der Maus, Ig-Klasse: IgG1 Endverdünnung 1:10

#### **2.4.2 Sekundärantikörper**

An diese Antikörper ist ein Immunfluoreszenzfarbstoff gekoppelt, um den Primärantikörper und damit die Lokalisation des vom Primärantikörper erkannten Proteins im Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Dabei ist es wichtig, den Sekundär-Ak zu wählen, der spezifisch gegen die Spezies des Primär-Ak's gerichtet ist (z. B. Nestin/ms, Alexa 594/anti-ms). Alexa 488 wird bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt, die Emissionswellenlänge liegt mit 517 nm im grünen Bereich. Es wurde standardisiert für die CK's verwendet. Alexa 594 wird bei einer Wellenlänge von 590 nm angeregt, die Emissionswellenlänge liegt mit 617 nm im roten Bereich.

Alexa 488 F(ab') <sub>2</sub>	A11017 (MoBiTec) Ak von der Ziege gegen Maus Endverdünnung 1:600
Alexa 488 F(ab') <sub>2</sub>	A 11073 (MoBiTec) Ak von der Ziege gegen Meerschweinchen Endverdünnung 1:600
Alexa 594 F(ab') <sub>2</sub>	A11020 (MoBiTec) Ak von der Ziege gegen Maus Endverdünnung 1:1250
Alexa 594 F(ab') <sub>2</sub>	A11072 (MoBiTec) Ak von der Ziege gegen Kaninchen Endverdünnung 1:1250

### 2.4.3 Isotypenkontrollen

IgG1 (ms)	X 0931 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
IgG2b (ms)	X 0944 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
IgG (rb)	X 0903 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

### 2.4.4 DNA-Färbung

DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)  
(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)  
Endverdünnung 1:5000

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an die DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. Er wird bei einer Wellenlänge von 345 nm angeregt und emittiert mit 455 nm im blauen Bereich.

### 2.4.5 Puffer und Lösungen

PBS-Stammlösung	80,0 g NaCl, 2,0 g KCl, 11,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> → in 1000 ml Aqua dest. lösen, d. h. die Lösung enthält 1,37 mol/l NaCl, 0,03 mol/l KCl, 0,08 mol/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 0,01 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , d. h. die Lösung ist 1,5 molar.
PBS-Gebrauchslösung	PBS-Stammlösung mit Aqua dest. 1:10 verdünnen → pH 7,3 - 7,5 sonst: Puffern mit HCl bzw. Na(OH)

### **3                   METHODEN**

#### **3.1               ANFERTIGUNG VON KRYOSCHNITTEN UND FIXIERUNG**

Die Gewebeproben waren in vorgekühltem Isopentan schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Für die immunhistologische Charakterisierung wurden ca. 200 Schnitte pro Präparat (Dicke 6 µm) mit Hilfe eines Kryostaten bei -23°C, bei Kopfhautpräparaten aufgrund der schwierigeren Verarbeitung bei -28°C angefertigt. Dabei wurden stichprobenweise Schnitte mit Methylenblau angefärbt und zur Kontrolle mit Hilfe des Lichtmikroskops beurteilt. War die Epidermis vollständig, wurden von den übrigen Schnitten jeweils zwei auf einen Objektträger (Super Frost Plus) gelegt und bei RT 20-30 Minuten getrocknet.

Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten bei -20°C in Aceton fixiert. Nach weiteren 30 Minuten Trocknen wurden jeweils sechs Objektträger in Alufolie verpackt und bei -20°C bis zu ihrem Gebrauch tiefgefroren.

#### **3.2               IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG**

##### **3.2.1           Einzelfärbung**

Bei den Vorbereitungen zur Immunfluoreszenzfärbung wurden die zu färbenden Schnitte bei RT aufgetaut. Anschließend wurden alle Schnitte mit einem flüssigkeitsblockierenden Stift (Liquid Blocker Super PAP Pen) umrandet, um die benötigte Ak-Menge auf den Objektträgern zu begrenzen. Primär- und Sekundärantikörper wurden mit PBS verdünnt (siehe auch 2.4). Anschließend wurde 3 min bei 13000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und der Überstand für die Färbungen verwendet.

Der Primärantikörper wurde gleichmäßig aufgetragen und 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült, um den Ak zu entfernen. Danach folgte ein weiterer Spülvorgang 3 x 10 min in PBS.

Auch mit dem Sekundärantikörper wurden die Schnitte 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Dann wurden die Schnitte nochmals 1 x 5 min in PBS gegeben und anschließend 1 min in die DAPI-Kerngegenfärbung (1:5000) gelegt. Es folgten 2 x 5 min Spülung in PBS und 2 x 2 min in Aqua dest. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Fluoromount G eingedeckt und über Nacht getrocknet, bevor sie zur weiteren Lagerung bei 4°C in den Kühlschrank gelegt wurden.

Parallel zu dieser Färbung wurde zum Vergleich auf die Aqua dest.-Spülung nach der 30minütigen Inkubationszeit verzichtet. Da bei der Auswertung keine Unterschiede bemerkt wurden, wird in der Arbeit nicht zwischen beiden Färbemethoden unterschieden.

### **3.2.2 Doppelfärbung**

Bei der Doppelfärbung wurden die beiden Primär-Antikörper vor der Auftragung auf die Schnitte in doppelter Konzentration 1:1 gemischt, die weitere Färbung wurde exakt wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

### **3.2.3 Negativkontrolle**

Die Negativkontrollfärbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass statt des ersten Ak das entsprechende Immunglobulin in der gleichen Konzentration verwendet wurde.

### **3.2.4 Positivkontrolle**

Als Positivkontrolle wurde Gewebe verwendet, von dem bekannt ist, dass das zu untersuchende Protein darin vorhanden und somit die Antikörperreaktion positiv sein muss. Die Färbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

### 3.3 AUSWERTUNG

Nach dem Anfärben der Schnitte wurden sie mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskops ausgewertet. Der Nachweis der Merkelzellen wurde grundsätzlich über die Anwesenheit von Cytokeratin 20 bzw. Cytokeratin 8/18 geführt.

Es wurde die Zahl der Merkelzellen in der interfollikulären Epidermis der Körperhaut, den Haarfollikeln der Körperhaut, der interfollikulären Epidermis der Kopfhaut, den Haarfollikeln der Kopfhaut und der Epidermis der Fußsohle bestimmt.

Dann wurde die Zahl der Merkelzellen, die positiv mit dem zweiten Antikörper reagiert hatten, d. h. die das zu untersuchende Protein enthielten, festgestellt und das Verhältnis zur Gesamtzahl der Merkelzellen in einer spezifischen Lokalisation gebildet.

Aus den Ergebnissen der verschiedenen Gewebeproben einer Lokalisation von verschiedenen Spendern wurden der Mittelwert und die SEM bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student-T-Tests berechnet. Bei dem Student-T-Test handelt es sich um einen Test, der die Signifikanz der Ergebnisse überprüft. Ab  $p < 0,05$  ist das Ergebnis signifikant.

Körperhaut → 5 Präparate

Kopfhaut → 7 Präparate

Fußsohle → 5 Präparate

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 NEURONALE ANTIKÖRPER**

#### **4.1.1 CD 56 (N-CAM)**

Bei CD 56 (N-CAM) handelt es sich um ein Glykoprotein, ein neuronales Zelladhäsionsmolekül, das auf den meisten neuroektodermalen Zelllinien vorhanden ist. N-CAM konnte in dieser Doktorarbeit auf einem großen Teil der Merkelzellen identifiziert werden. Der N-CAM-Antikörper färbte dabei den Rand im Bereich der Plasmamembran der positiven Merkelzellen an. In dem untersuchten Bereich anwesende Nervenfasern ließen sich mit Hilfe des Ak ebenfalls darstellen. In unserer Arbeit konnten in der interfollikulären Körperhaut mit  $95,75 \pm 4,91$  % die meisten N-CAM-positiven Merkelzellen nachgewiesen werden. Danach folgt mit  $88,38 \pm 9,26$  % die Fußsohle. In den Haarfollikeln von Körper- und Kopfhaut sowie in interfollikulärer Kopfhaut sind etwas weniger Merkelzellen positiv, jedoch deutlich über 50 % (siehe Tabelle 1).

Generell ist sowohl in der Körperhaut als auch in der Kopfhaut die Zahl der N-CAM-positiven Merkelzellen in der Epidermis höher als in den Haarfollikeln (siehe Diagramm 1). Vergleicht man dagegen die Körper- mit der Kopfhaut, ist ersichtlich, dass die erstere insgesamt mehr positive Zellen aufweist.

Da Präparate mit nur einer Merkelzelle Werte verfälschen können, da die Merkelzelle nur komplett positiv (= 100 %) bzw. komplett negativ (= 0 %) sein kann, werden in einer zweiten Auswertung diese Präparate aus der Gesamtauswertung herausgenommen. Die Überarbeitung der Werte (bereinigt, d. h. unter Ausschluss der extremen Werte) zeigt keine bedeutenden Veränderungen bei der Verteilung N-CAM-positiver Merkelzellen (siehe Diagramm 2). Die Hauptaussage bleibt bestehen.

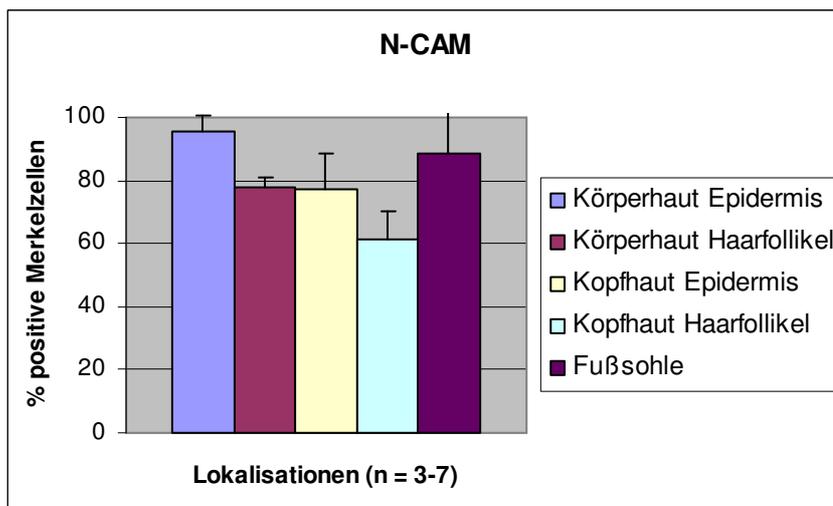


Diagramm 1: Zahl N-CAM-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen.

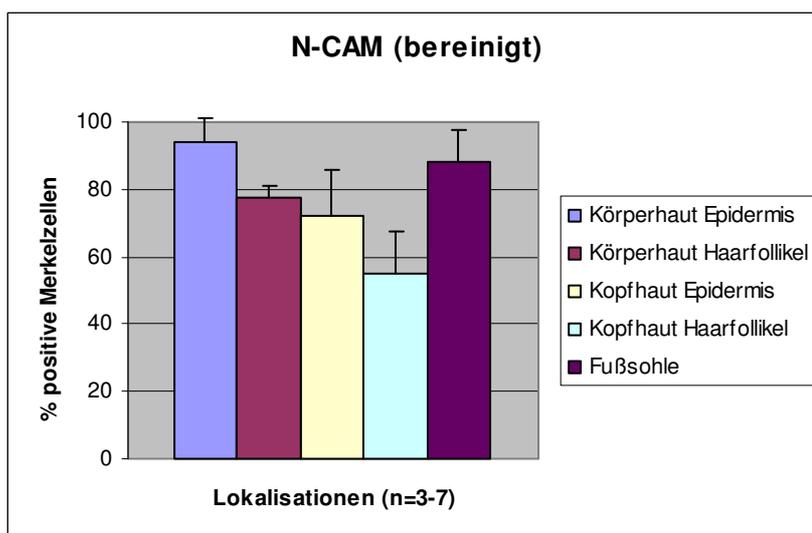


Diagramm 2: Zahl N-CAM-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen in bereinigter Form.

<i>Lokalisation</i>	<i>pos. Merkelzellen (%)</i>	<i>SEM</i>	<i>Merkelzellen (absolut)</i>
Körperhaut interfollikulär n=4 (3)	95,75 (94,33)	4,91 (6,94)	17 (16)
Körperhaut Haarfollikel n=3	77,67	3,27	34
Kopfhaut interfollikulär n=6 (5)	76,92 (72,3)	11,75 (13,26)	43 (42)
Kopfhaut Haarfollikel n=7 (6)	61,29 (54,83)	12,7 (12,74)	57 (56)
Fußsohle n=4	88,38	9,26	27

Tab. 1: Zahl N-CAM-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen (Werte in Klammern sind die bereinigten Werte).

Der Anteil N-CAM-positiver Merkelzellen in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut ist mit  $p = 0,0109$  statistisch signifikant höher als in den Haarfollikeln der Körperhaut. Auch im Vergleich zu den Haarfollikeln der Kopfhaut liegt mit  $p = 0,03123$  eine statistisch höhere Signifikanz vor (siehe Tabelle 2).

Nach Bereinigung der Werte liegen diese Paare weiterhin im signifikanten Bereich ( $p = 0,0282$  und  $p = 0,0289$ ). Hinzu kommen noch signifikant niedrigere Werte mit  $p = 0,0337$  beim Vergleich von Haarfollikeln der Kopfhaut mit der Epidermis der Fußsohle.

	Student-T-Test ungepaart:		Student-T-Test gepaart:	
	original	bereinigt	original	bereinigt
KhHf zu KhI	0,17684289	0,16188424	0,17464958	0,18335718
NhHf zu NhIf	<b>0,01089217</b>	<b>0,02815901</b>	0,21998752	/
Fs zu KhHf	0,07217572	<b>0,03367481</b>		
Fs zu KhIf	0,23105676	0,16245508		
Fs zu NhHf	0,16100189	*		
Fs zu NhIf	0,22374029	0,29927045		
KhHf zu NhHf	0,20278355	0,11194306		
KhHf zu NhIf	<b>0,03123409</b>	<b>0,0288628</b>		
KhIf zu NhIf	0,10514905	0,11322413		
KhIf zu NhHf	0,48173793	0,37389072		

Tab. 2: Student-T-Test (ungepaart/gepaart) N-CAM-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen. \* = der Wert hat sich nach Bereinigung nicht verändert.

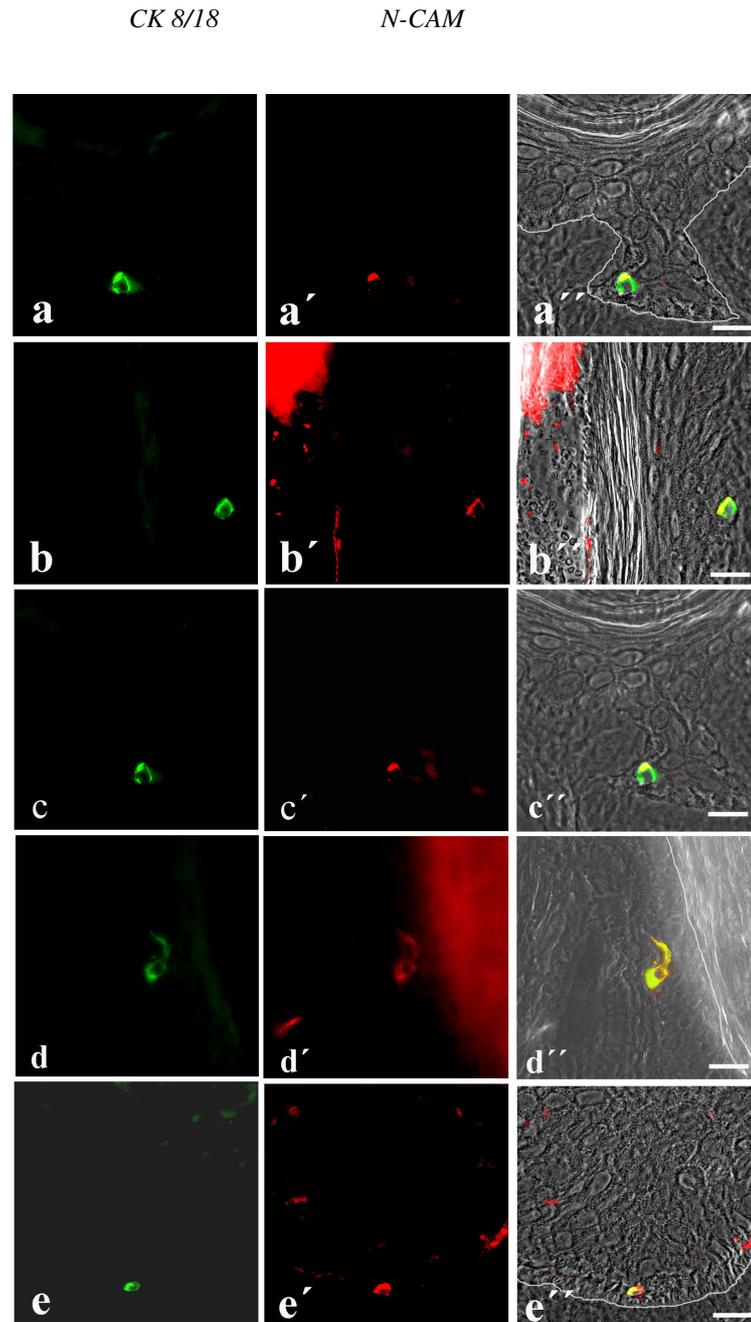


Abb. 6: **N-CAM-positive Merkelzellen.** Immunlokalisation von Cytokeratin 8/18 (a, a'', b, b'', c, c'', d, d'', e, e''); grün) und N-CAM (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''); rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b''), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c''), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d'') und in Fußsohle (e-e''). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20 µm.

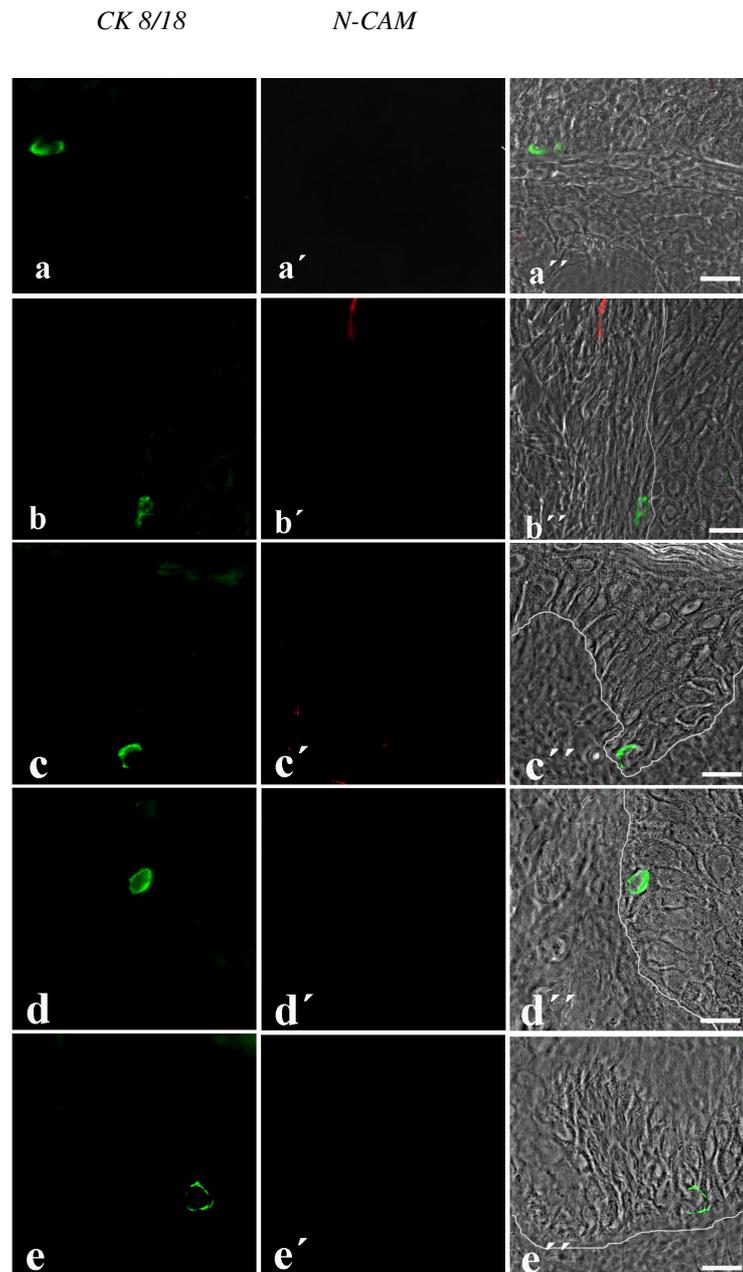


Abb. 7: **N-CAM-negative Merkelzellen.** Immunlokalisierung von Cytokeratin 8/18 (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e'; grün) und N-CAM (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''; rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a'), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b'), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c'), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d') und in Fußsohle (e-e'). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20 µm.

### 4.1.2 NGF-Rezeptor

Der NGF-Rezeptor (nerve growth factor receptor) ist ein Zelloberflächenrezeptor, der Nervenwachstumsfaktoren bindet. Diese Faktoren sind wichtig für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion peripherer sympathischer und sensibler Neurone. Wir konnten den NGF-Rezeptor auf Merkelzellen nachweisen. Der NGF-Rezeptor-Antikörper reagierte mit den positiven Merkelzellen im Bereich der Plasmamembran. Durchziehende Nervenfasern konnten mit dem NGF-R-Ak noch klarer als mit dem N-CAM-Ak dargestellt werden. Der größte Anteil NGF-R-positiver Merkelzellen konnte in der Fußsohle mit  $70,23 \pm 15,54 \%$  nachgewiesen werden. Bei den übrigen Lokalisationen ist die Anzahl der positiven Merkelzellen weitaus geringer und erreicht nie einen Anteil von  $50 \%$ . Dabei reichen die Werte von  $41,85 \pm 14,01 \%$  (interfollikuläre Körperhaut) bis  $17,26 \pm 8,88 \%$  (Haarfollikel der Kopfhaut) (siehe Tabelle 3). Insgesamt ist sowohl in der Körperhaut als auch in der Kopfhaut die Zahl der positiven Merkelzellen in der Epidermis höher als in den Haarfollikeln (siehe Diagramm 3). Vergleicht man dagegen die Körper- mit der Kopfhaut, zeigt sich, dass die erstere insgesamt mehr positive Zellen aufweist (siehe Diagramm 3).

Auch bei der Verteilung der NGF-R positiven Merkelzellen verändert sich nach der Bereinigung der Werte die Hauptaussage nicht (siehe Diagramm 4).

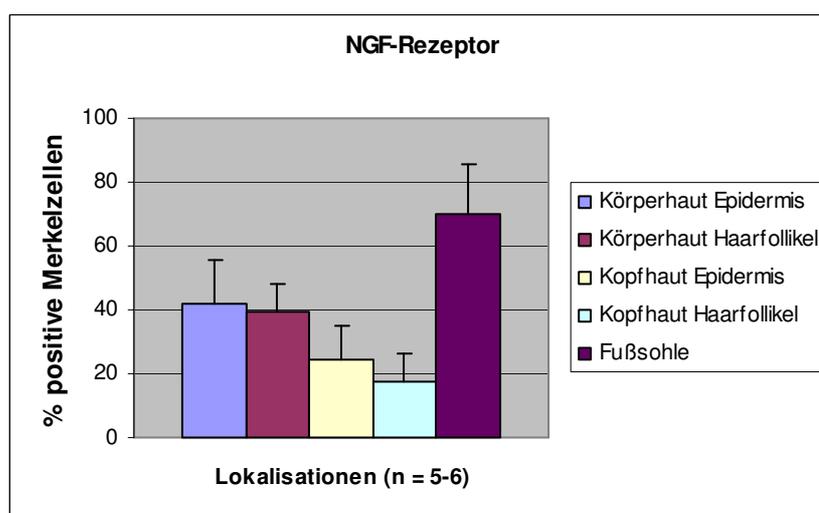


Diagramm 3: Zahl NGF-Rezeptor-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen.

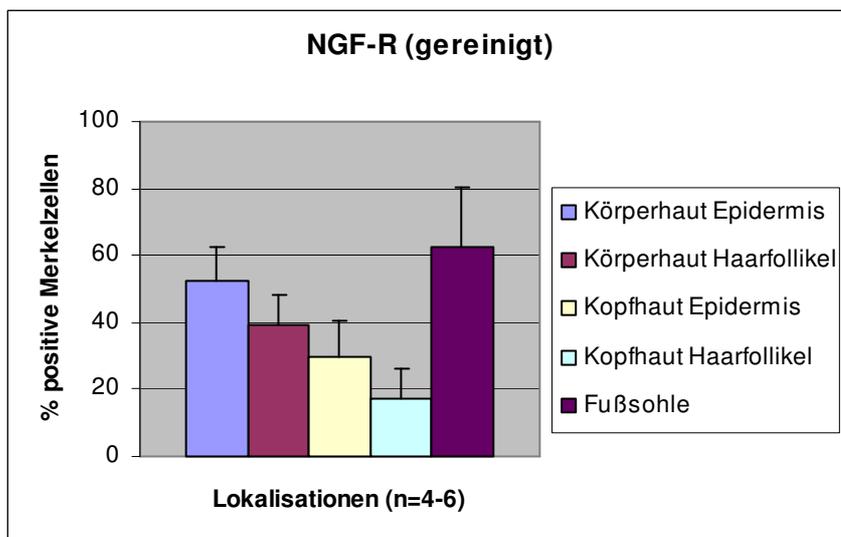


Diagramm 4: Zahl NGF-Rezeptor-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen in bereinigter Form.

<i>Lokalisation</i>	<i>pos. Merkelzellen (%)</i>	<i>SEM</i>	<i>Merkelzellen (absolut)</i>
Körperhaut interfollikulär n=5(4)	41,85 (52,31)	14,01 (10,27)	33 (32)
Körperhaut Haarfollikel n=5	39,17	8,77	39
Kopfhaut interfollikulär n=6 (5)	24,61 (29,53)	10,21 (10,83)	40 (39)
Kopfhaut Haarfollikel n=6	17,26	8,88	46
Fußsohle n=5 (4)	70,23 (62,79)	15,54 (17,5)	32 (31)

Tab. 3: Zahl NGF-Rezeptor-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen (Werte in Klammern sind die bereinigten Werte).

Die höhere Zahl NGF-R-positiver Merkelzellen der Fußsohle im Vergleich zu denen der Haarfollikel der Kopfhaut ( $p = 0,0037$ ), der interfollikulären Kopfhaut ( $p = 0,0102$ ) und den Haarfollikeln der Körperhaut ( $p = 0,0437$ ) ist statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Auch die höhere Zahl NGF-R-positiver Merkelzellen im Haarfollikel der Körperhaut im Vergleich zu denen im Haarfollikel der Kopfhaut ist statistisch signifikant ( $p = 0,0437$ ) (siehe Tabelle 4).

Nach Überarbeitung der Werte ist der höhere Anteil NGF-R-positiver Merkelzellen in der interfollikulären Körperhaut im Vergleich zu den Haarfollikeln der Kopfhaut mit  $p = 0,0109$  statistisch signifikant, während der Vergleich der Haarfollikel der Körperhaut mit der Fußsohle keine Signifikanz mehr aufzeigt ( $p = 0,0917$ ). Die Unterschiede zwischen Fußsohle und Kopfhaut (Haarfollikel und interfollikuläre Epidermis) bleiben signifikant.

	Student-T-Test ungepaart:		Student-T-Test gepaart:	
	original	bereinigt	original	bereinigt
KhHf zu KhIf	0,28260448	0,17645427	0,89984448	0,459256699
NhHf zu NhIf	0,43022278	0,15171099		
Fs zu KhHf	<b>0,00372386</b>	<b>0,00992992</b>		
Fs zu KhIf	<b>0,01017912</b>	<b>0,04766299</b>		
Fs zu NhHf	<b>0,04371504</b>	0,09173845		
Fs zu NhIf	0,08386907	0,2863456		
KhHf zu NhHf	<b>0,04372598</b>	*		
KhHf zu NhIf	0,06131782	<b>0,01089137</b>		
KhIf zu NhIf	0,14444303	0,06745627		
KhIf zu NhHf	0,13708009	0,23093889		

Tab. 4: Student-T-Test (ungepaart/gepaart) NGF-Rezeptor-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen. \* = der Wert hat sich nach Bereinigung nicht verändert.

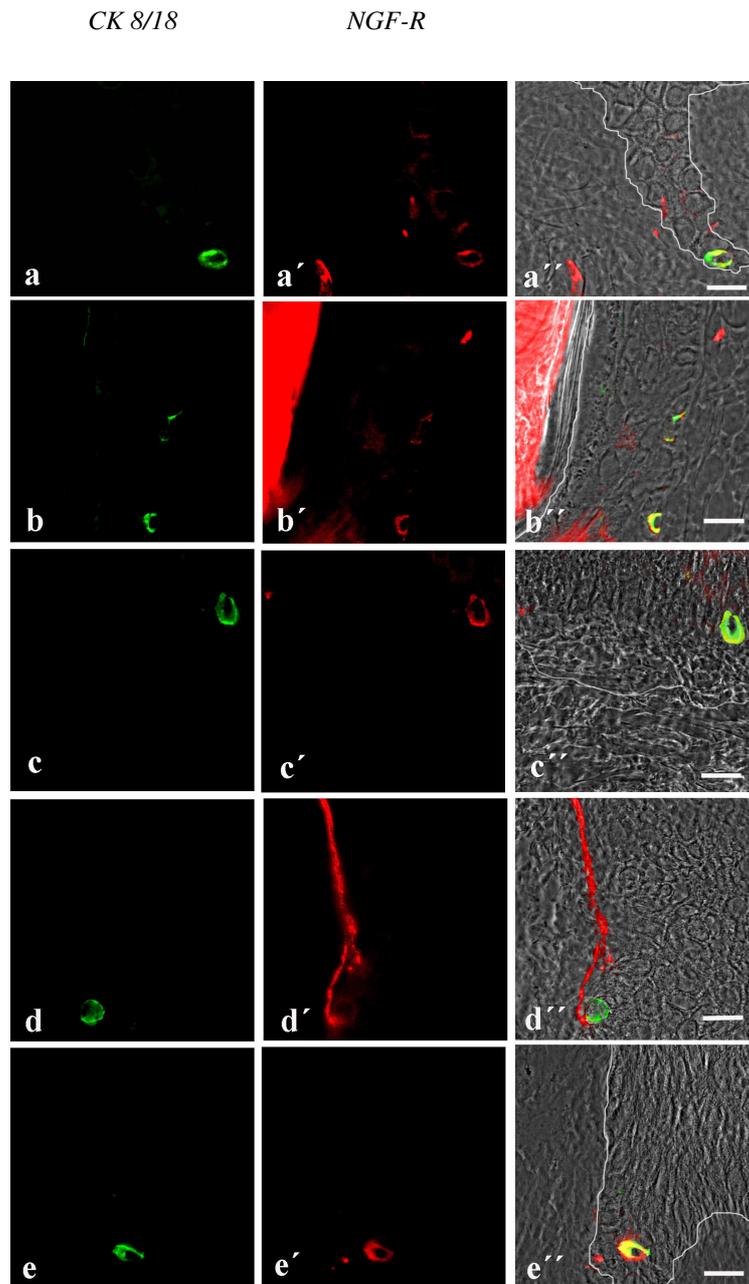
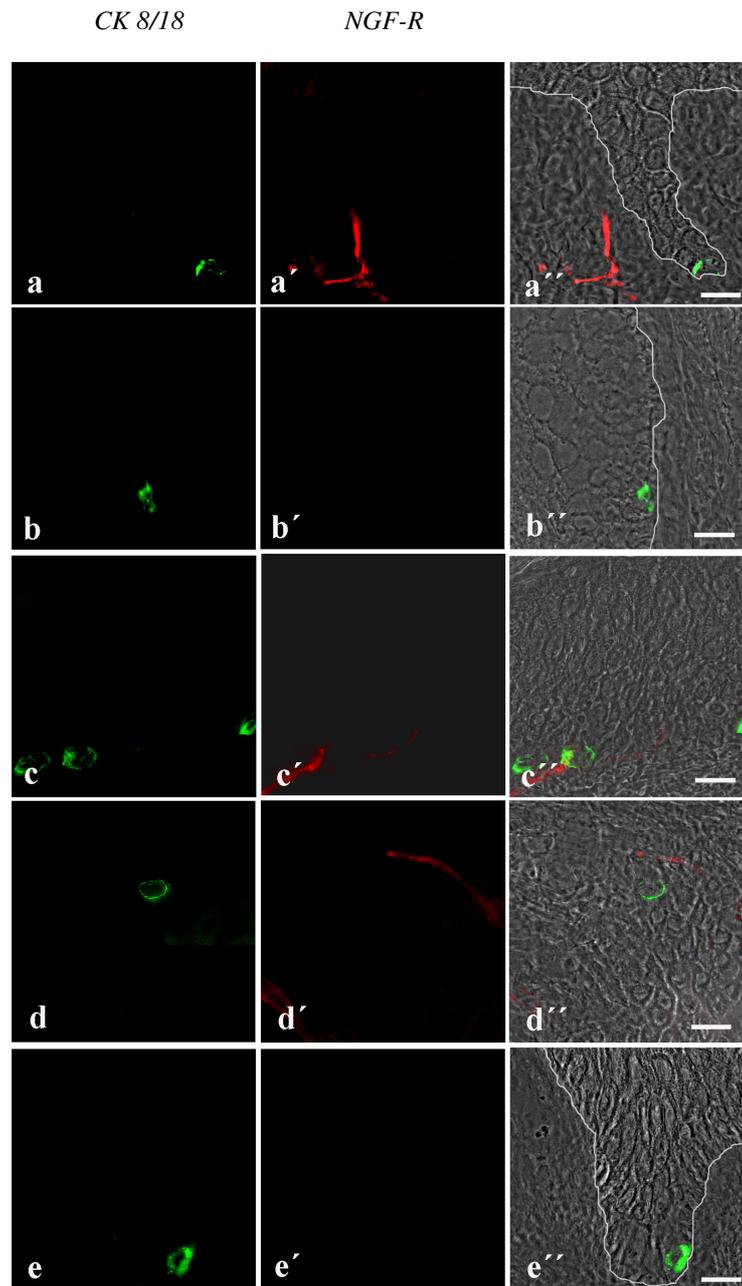


Abb. 8: **NGF-R-positive Merkelzellen.** Immunlokalisation von Cytokeratin 8/18 (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e'; grün) und NGF-Rezeptor (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''; rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b''), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c''), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d'') und in Fußsohle (e-e''). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20  $\mu$ m.



*Abb. 9: NGF-R-negative Merkelzellen. Immunlokalisation von Cytokeratin 8/18 (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e'; grün) und NGF-Rezeptor (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''; rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b''), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c''), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d'') und in Fußsohle (e-e''). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20 µm.*

### 4.1.3 Nestin

Nestin ist ein Intermediärfilament, das spezifisch ist für neuronale Zellen. Es wird meist in Stammzellen der neuronalen Reihe exprimiert. Nach der terminalen neuronalen Differenzierung wird es herabreguliert und durch Neurofilamente substituiert. In unseren Untersuchungen konnte in keiner der fünf Lokalisationen eine Nestin-positive Merkelzelle dargestellt werden (siehe Tabelle 5/Diagramm 5). In anderen epidermalen Zellen färbte sich aber das Zytoplasma an. Zusätzlich zeigten sich Nestin-positive Zellen auch in der Dermis.

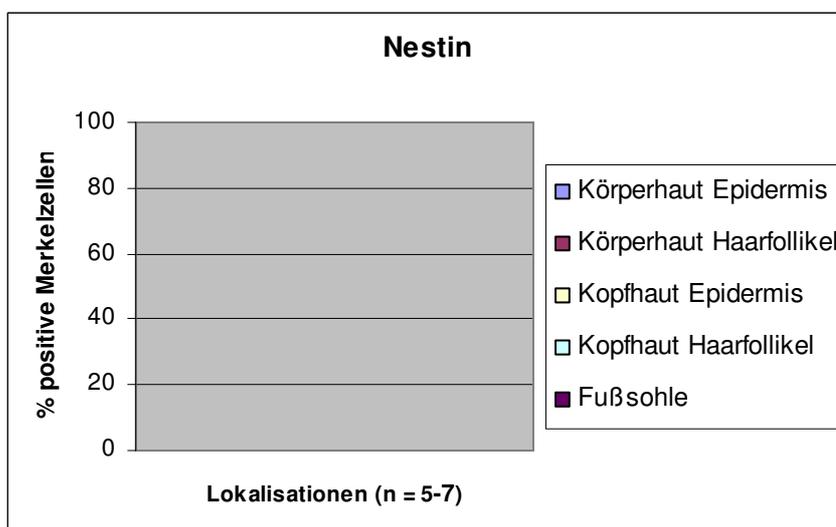
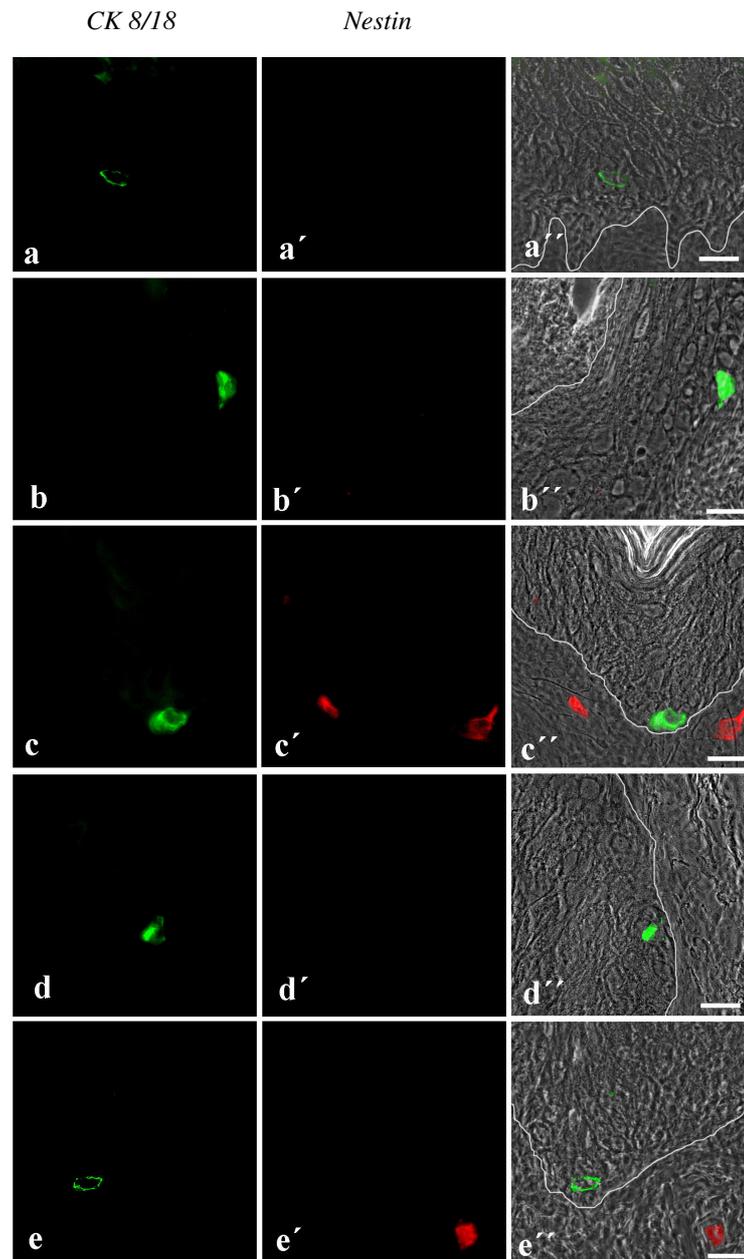


Diagramm 5: Zahl Nestin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen.

<i>Lokalisation</i>	<i>pos. Merkelzellen (%)</i>	<i>SEM</i>	<i>Merkelzellen (absolut)</i>
Körperhaut interfollikulär (n=5)	0	0	13
Körperhaut Haarfollikel (n=5)	0	0	36
Kopfhaut interfollikulär (n=7)	0	0	14
Kopfhaut Haarfollikel (n=7)	0	0	31
Fußsohle (n=5)	0	0	33

Tab. 5: Zahl Nestin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen.



*Abb. 10: Nestin-negative Merkelzellen. Immunlokalisation von Cytokeratin 8/18 (a, a'', b, b'', c, c'', d, d'', e, e''; grün) und Nestin (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''; rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b''), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c''), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d'') und in Fußsohle (e-e''). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20 µm.*

### 4.1.4 Pan-Neurofilament

Neurofilamente sind Intermediärfilamente in differenzierten neuronalen Zellen. Der Pan-Neurofilament-Antikörper konnte in dieser Studie in allen Merkelzellen nachgewiesen werden, der überwiegende Teil der Zellen (>75 %) war stark positiv (siehe Diagramm 6). Der Pan-Neurofilament-Antikörper reagierte mit allen Merkelzellen im Bereich des Zytoplasmas. Die Lokalisation, die nur  $76,67 \pm 18,26 \%$  stark Pan-Neurofilament-positive Merkelzellen aufweist, also die geringste Anzahl, ist die interfollikuläre Kopfhaut (siehe Tabelle 6). Die übrigen Merkelzellen waren schwächer positiv, jedoch noch klar zu erkennen.

Auch nach Überarbeitung der Werte ist die Tendenz noch klar zu erkennen. Alle Lokalisationen weisen hiernach mehr als 85 % stark Pan-Neurofilament-positive Zellen auf (siehe Diagramm 7/Tabelle 6).

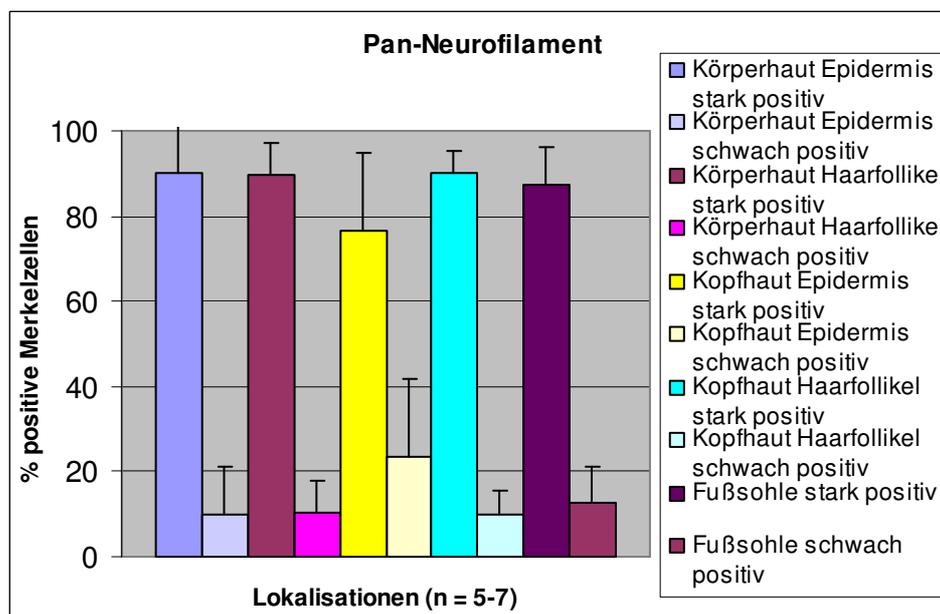


Diagramm 6: Zahl Pan-Neurofilament-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen.

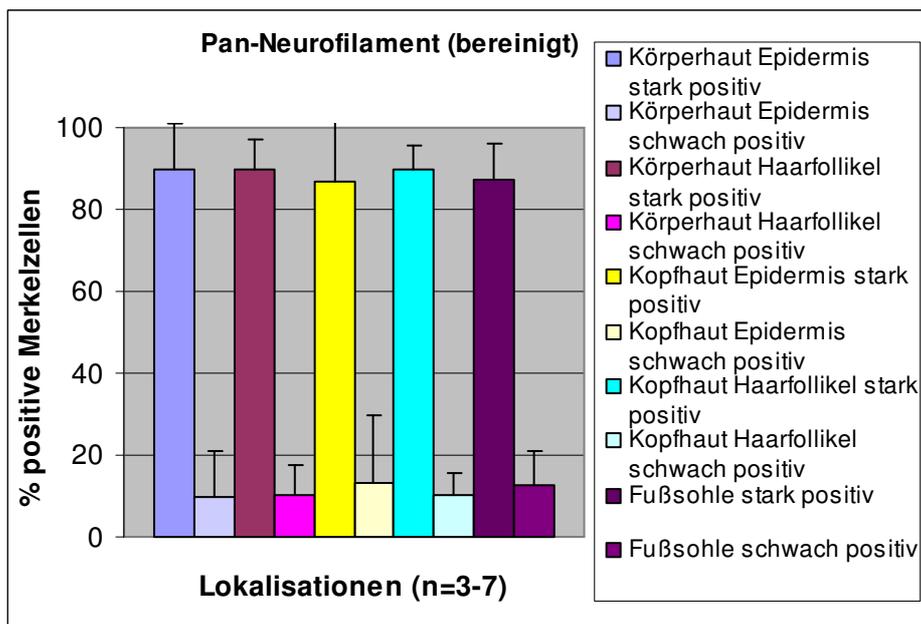


Diagramm 7: Zahl Pan-Neurofilament-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen in bereinigter Form.

Lokalisation	pos. Merkelzellen (%)		SEM		Merkelzellen (absolut)
	stark	schwach	stark	schwach	
Körperhaut interfoll. n=5	90	10	11,18	11,18	40
Körperhaut Haarfoll. n=5	89,75	10,25	7,41	7,41	114
Kopfhaut interfoll. n=6 (3)	76,67 (86,67)	23,33 (13,33)	18,26 (16,33)	18,26 (16,33)	49 (46)
Kopfhaut Haarfollikel n=7	89,92	10,08	5,5	5,5	31
Fußsohle n=5	87,45	12,55	8,62	8,62	43

Tab. 6: Zahl Pan-Neurofilament-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen (Werte in Klammern sind die bereinigten Werte).

Die Unterschiede der Anzahl Pan-Neurofilament-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen sind weder vor noch nach Bereinigung der Werte weder für die stark positiven, noch für die schwach positiven und noch für die Gesamtheit der Zellen statistisch signifikant (Tabelle 7).

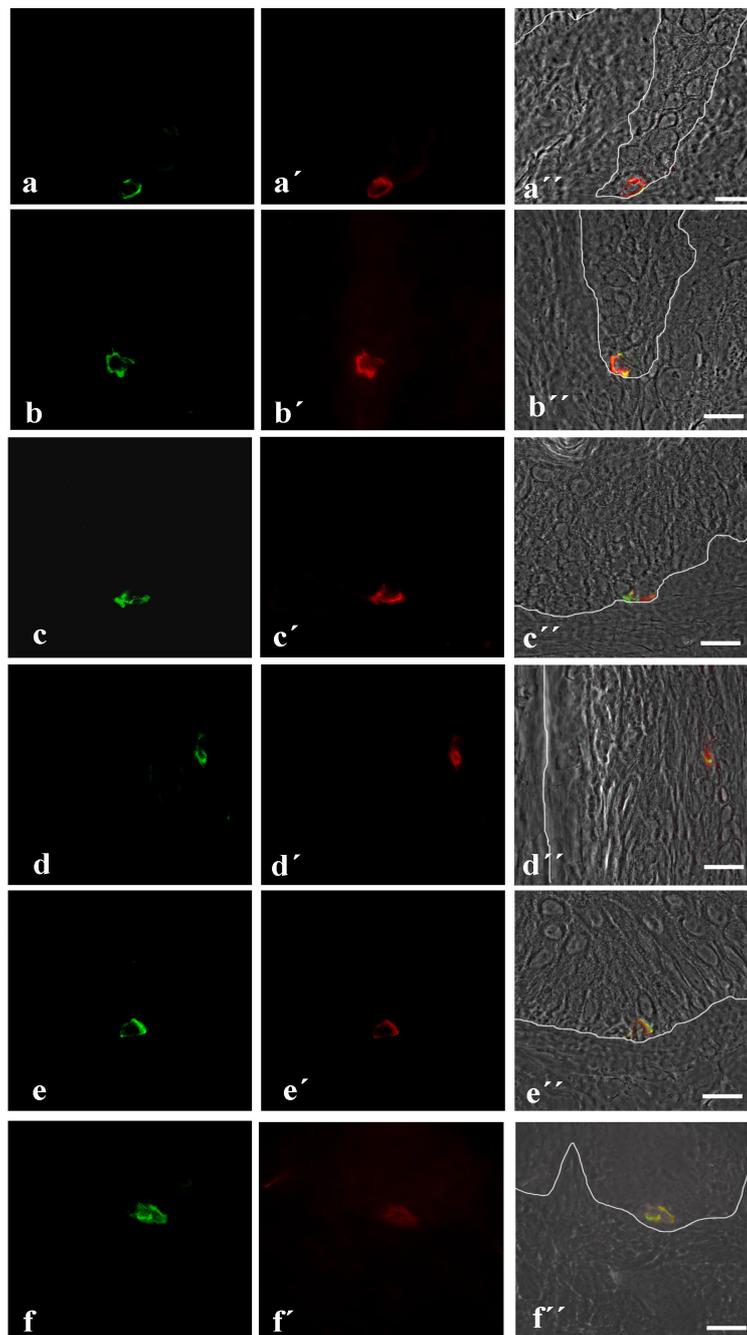
	<b>Student-T-Test ungepaart:</b>	
	<b>original</b>	<b>bereinigt</b>
KhHf stark pos. zu KhIf stark pos.	0,21653873	0,390758169
KhHf schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,21653873	0,390758169
NhHf stark pos. zu NhIf stark pos.	0,491786501	*
NhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,491786501	*
Fs stark pos. zu KhHf stark pos.	0,392981784	*
Fs schwach pos. zu KhHf schwach pos.	0,392981784	*
Fs stark pos. zu KhIf stark positiv	0,298662941	0,478812142
Fs schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,298662941	0,478812142
Fs stark pos. zu NhHf stark pos.	0,413552038	*
Fs schwach pos. zu NhHf schwach pos.	0,413552038	*
Fs stark pos. zu NhIf stark positiv	0,422527766	0,413552038
Fs schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,422527766	0,413552038
KhHf stark pos. zu NhHf stark pos.	0,491882046	0,413552038
KhHf schwach pos. zu NhHf schwach pos.	0,491882046	0,413552038
KhHf stark pos. zu NhIf stark positiv	0,496845769	0,413552038
KhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,496845769	0,413552038
KhIf stark pos. zu NhIf stark pos.	0,266015891	0,423335713
KhIf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,266015891	0,423335713
KhIf stark positiv zu NhHf stark pos.	0,2582821	0,411325586
KhIf schwach positiv zu NhHf schwach pos.	0,2582821	0,411325586

	<b>Student-T-Test gepaart:</b>	
	<b>original</b>	<b>bereinigt</b>
KhHf stark pos. zu KhIf stark pos.	0,561151291	0,848220089
KhHf schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,561151291	0,848220089
NhHf stark pos. zu NhIf stark pos.	0,953133208	*
NhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,953133208	*

Tab. 7: Student-T-Test (ungepaart/gepaart) Pan-Neurofilament-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen. \* = der Wert hat sich nach Bereinigung nicht verändert.

CK 8/18

Pan-Nf



**Abb. 11: Pan-Neurofilament-positive Merkelzellen.** Immunlokalisation von Cytokeratin 8/18 (a, a'', b, b'', c, c'', d, d'', e, e''; grün) und Pan-Neurofilament (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''; rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b''), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c''), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d'') und in Fußsohle (e-e''). Schwach positive Färbung (f-f''). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e, f, f') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'', f'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20 µm.

### 4.1.5 Synaptophysin

Synaptophysin ist ein Glykoprotein in der Membran von neuronalen präsynaptischen Vesikeln. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass alle Merkelzellen Synaptophysin-positiv waren (siehe Diagramm 8). Die Hauptfärbung lag im Bereich der basalen Seite der Merkelzelle. Außerdem ließen sich einige Nervenendigungen darstellen. Auch hier konnte man zwischen stark intensiv und schwächer intensiv gefärbten Zellen unterscheiden. Dabei konnten in den Haarfollikeln der Körperhaut  $89,57 \pm 4,16 \%$  stark Synaptophysin-positiv Merkelzellen nachgewiesen werden. Danach folgt die interfollikuläre Kopfhaut mit  $85,69 \pm 8,88 \%$ . Die anderen Lokalisationen wiesen eine geringere Anzahl stark positiver Merkelzellen auf, jedoch alle über 65 % (siehe Tabelle 8).

Nach Bereinigung verändern sich nur die Werte für die Fußsohle. Man findet nun  $59,52 \pm 7,72 \%$  aller Merkelzellen stark Synaptophysin-positiv (Diagramm 9); die Hauptaussage des Diagramms wird dadurch aber nicht verändert.

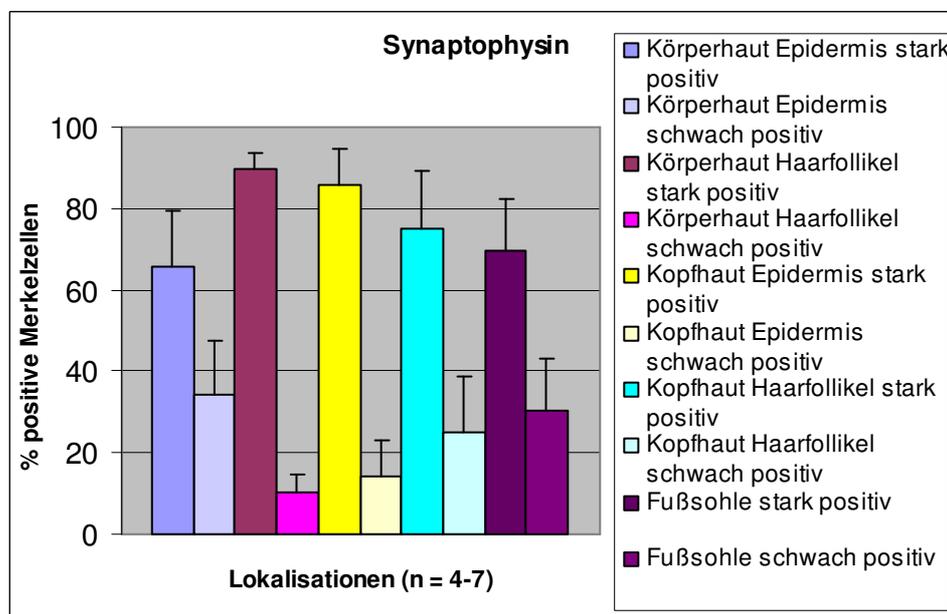


Diagramm 8: Zahl Synaptophysin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen.

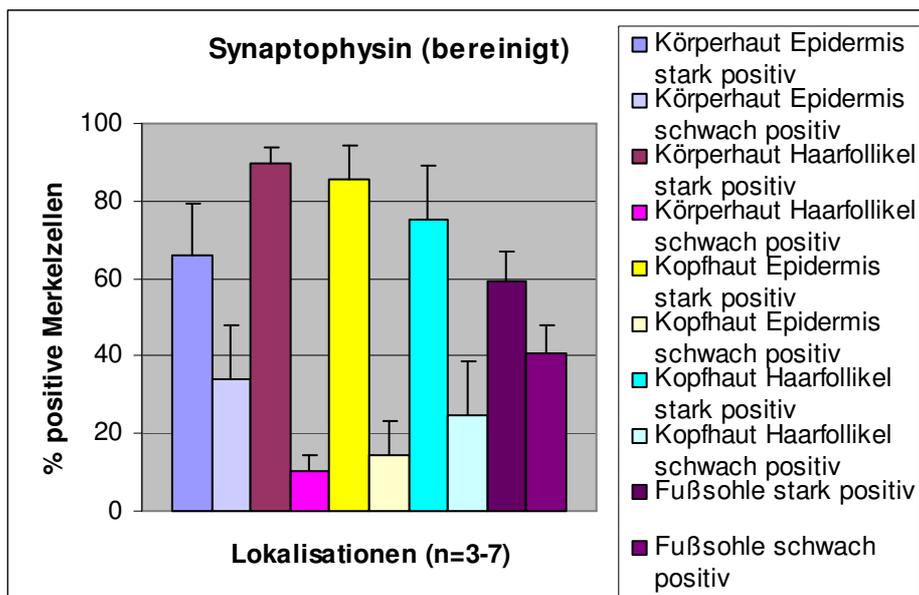


Diagramm 9: Zahl Synaptophysin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen in bereinigter Form.

<i>Lokalisation</i>	<i>pos. Merkelzellen (%)</i>		<i>SEM</i>		<i>Merkelzellen (absolut)</i>
	<i>stark</i>	<i>schwach</i>	<i>stark</i>	<i>schwach</i>	
Körperhaut interfolll. n=4	65,75	34,25	13,47	13,47	38
Körperhaut Haarfolll. n=5	89,57	10,43	4,16	4,16	64
Kopfhaut interfolll. n=6	85,69	14,31	8,88	8,88	54
Kopfhaut Haarfollikel n=7	75,21	24,79	14,06	14,06	93
Fußsohle n=4 (3)	69,64 (59,52)	30,36 (40,48)	12,77 (7,72)	12,77 (7,72)	19 (18)

Tab. 8: Zahl Synaptophysin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen (Werte in Klammern sind die bereinigten Werte).

Die Zahl stark Synaptophysin-positiver Merkelzellen in der interfollikulären Körperhaut ist im Vergleich zu denen in Haarfollikeln der Körperhaut statistisch signifikant niedriger, allerdings nur im ungepaarten Student-T-Test ( $p = 0,0343$ ; gepaarter Student-T-Test:  $p = 0,0893$ ). Alle anderen Unterschiede sind nicht statistisch signifikant.

Der geringere Anteil der Zahl stark Synaptophysin-positiver Merkelzellen der Fußsohle weist sowohl zur interfollikulären Kopfhaut ( $p = 0,0379$ ) als auch zu den Haarfollikeln der Körperhaut ( $p = 0,0022$ ) nach der Bereinigung der Werte ebenfalls eine statistische Signifikanz auf.

	<b>Student-T-Test ungepaart:</b>	
	<b>original</b>	<b>bereinigt</b>
KhHf stark pos. zu KhIf stark pos.	0,262768454	*
KhHf schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,262768454	*
NhHf stark pos. zu NhIf stark pos.	<b>0,034274507</b>	*
NhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	<b>0,034274507</b>	*
Fs stark pos. zu KhHf stark pos.	0,39010125	0,237470625
Fs schwach pos. zu KhHf schwach pos.	0,39010125	0,237470625
Fs stark pos. zu KhIf stark positiv	0,13237004	<b>0,03789997</b>
Fs schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,13237004	<b>0,03789997</b>
Fs stark pos. zu NhHf stark pos.	0,050882403	<b>0,002182488</b>
Fs schwach pos. zu NhHf schwach pos.	0,050882403	<b>0,002182488</b>
Fs stark pos. zu NhIf stark positiv	0,408332438	0,345453829
Fs schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,408332438	0,345453829
KhHf stark pos. zu NhHf stark pos.	0,194060997	*
KhHf schwach pos. zu NhHf schwach pos.	0,194060997	*
KhHf stark pos. zu NhIf stark positiv	0,319967273	*
KhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,319967273	*
KhIf stark pos. zu NhIf stark pos.	0,091810005	*
KhIf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,091810005	*
KhIf stark positiv zu NhHf stark pos.	0,347346516	*
KhIf schwach positiv zu NhHf schwach pos.	0,347346516	*

	<b>Student-T-Test gepaart:</b>	
	<b>original</b>	<b>bereinigt</b>
KhHf stark pos. zu KhIf stark pos.	0,793183551	*
KhHf schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,793183551	*
NhHf stark pos. zu NhIf stark pos.	0,089250949	*
NhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,089250949	*

*Tab. 9: Student-T-Test (ungepaart/gepaart) Synaptophysin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen. \* = der Wert hat sich nach Bereinigung nicht verändert.*

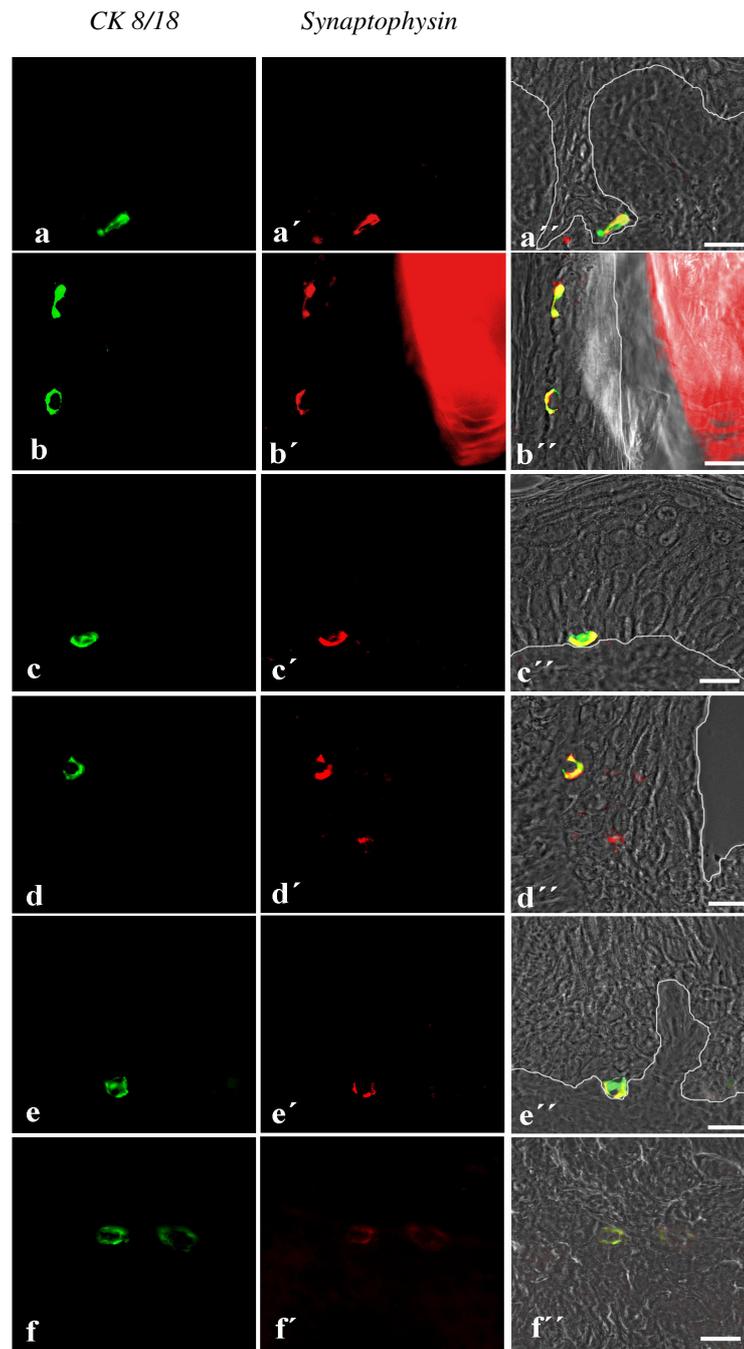


Abb. 12: **Synaptophysin-positive Merkelzellen.** Immunlokalisation von Cytokeratin 8/18 (a, a'', b, b'', c, c'', d, d'', e, e''; grün) und Synaptophysin (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''; rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b''), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c''), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d'') und in Fußsohle (e-e''). Schwach positive Färbung (f-f''). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e', f, f') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'', f'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20 µm.

## 4.2 EPITHELIALE ANTIKÖRPER

### 4.2.1 Villin

Villin ist ein Zytoskelettprotein der Mikrovilli, das unter anderem in absorptiven Zellen des Intestinums zu finden ist. Der Villin-Antikörper färbte das Zytoplasma speziell im Bereich der Dendriten der Merkelzellen positiv an. Bei der Auswertung der Färbungen wurde ersichtlich, dass alle Merkelzellen in der interfollikulären Epidermis sowohl von Körper- als auch von Kopfhaut Villin-positiv sind, wobei in der Körperhaut  $67 \pm 12,23$  % und in der Kopfhaut  $72,78 \pm 13,68$  % davon stark positiv und die übrigen schwach positiv angefärbt waren (siehe Diagramm 10). In den anderen Lokalisationen gab es auch Villin-negative Merkelzellen. In den Haarfollikeln der Körperhaut waren über 90 % aller Merkelzellen Villin-positiv, davon  $38,03 \pm 20,57$  % stark und  $55,25 \pm 21,7$  % schwach positiv. In der Fußsohle waren über 85 % positiv, wobei  $76,88 \pm 10,63$  % der Merkelzellen stark und  $11,04 \pm 5,73$  % schwach Villin-positiv waren (siehe Tabelle 10). Die niedrigste Anzahl an positiven Merkelzellen war mit unter 70 % in den Haarfollikeln der Kopfhaut nachzuweisen, wobei auch nur ein geringer Teil der Zellen ( $24,61 \pm 9,19$  %) eine stark positive Anfärbung zeigte. Der größere Teil der Zellen ( $45,02 \pm 7,18$  %) war nur schwach positiv.

Nach Bereinigung der Werte zeigte sich mit weniger als 90 % eine leichte Abnahme der Zahl Villin-positiver Merkelzellen in den Haarfollikeln der Körperhaut, jedoch eine deutliche Verschiebung hinsichtlich der Färbeintensität. Der überwiegenden Anteil aller positiven Zellen war stark positiv gefärbt ( $63,39 \pm 22,05$  %), während die schwach gefärbten nur noch ca. ein Viertel aller Merkelzellen darstellten ( $25,42 \pm 14,69$  %) (siehe Diagramm 11). In der interfollikulären Kopfhaut war mit  $67,33\% \pm 15,38$  % ebenfalls eine leichte Abnahme des Anteils der stark positiven Merkelzellen nachweisbar.

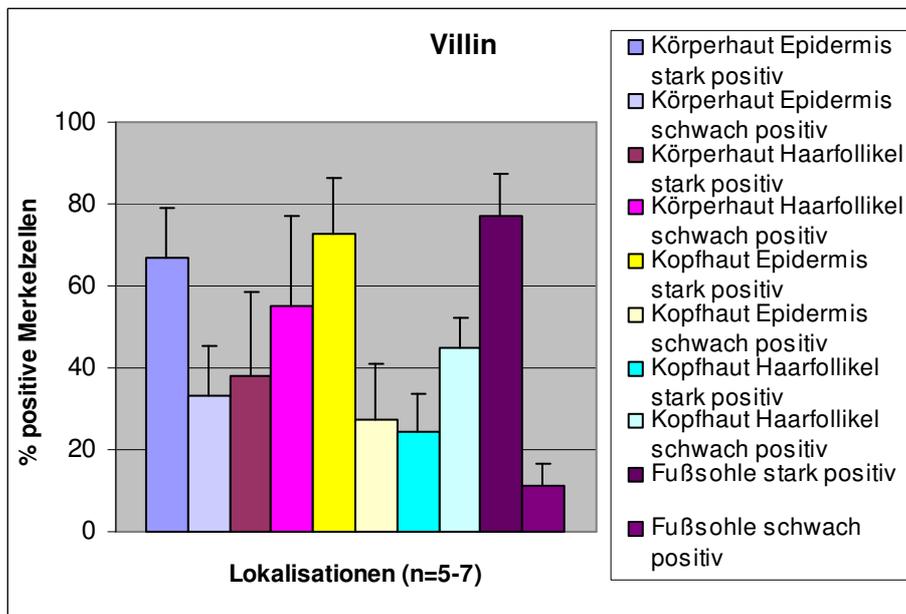


Diagramm 10: Zahl Villin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen.

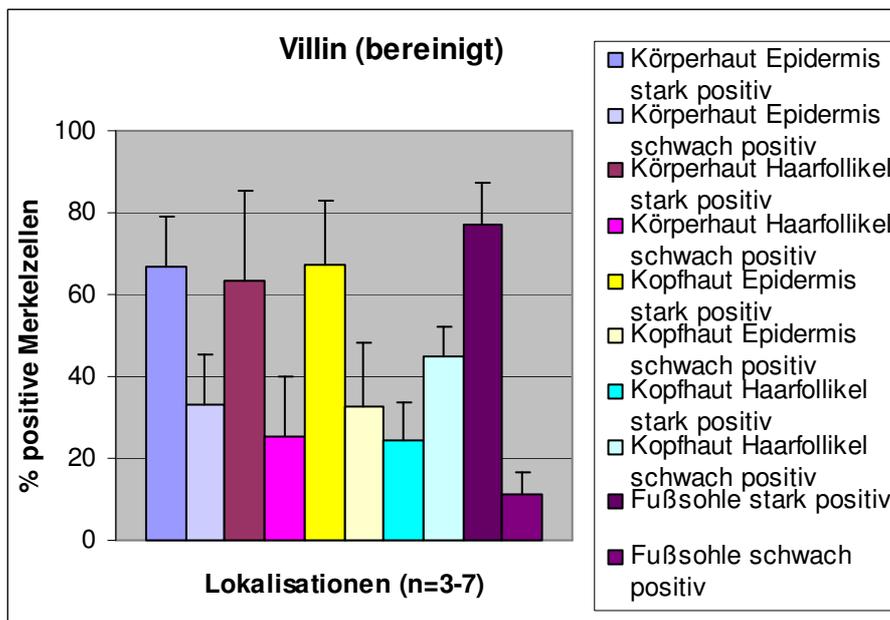


Diagramm 11: Zahl Villin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen in bereinigter Form.

<i>Lokalisation</i>	<i>pos. Merkelzellen (%)</i>		<i>SEM</i>		<i>Merkelzellen (absolut)</i>
	<i>stark</i>	<i>schwach</i>	<i>stark</i>	<i>schwach</i>	
Körperhaut interfol. n=5	67	33	12,23	12,23	102
Körperhaut Haarfol. n=5(3)	38,03 (63,39)	55,25 (25,42)	20,57 (22,05)	21,7 (14,69)	104 (102)
Kopfhaut interfol. n=6 (5)	72,78 (67,33)	27,22 (32,67)	13,68 (15,38)	13,68 (15,38)	43 (42)
Kopfhaut Haarfollikel n=7	24,61	45,02	9,19	7,18	136
Fußsohle n=5	76,88	11,04	10,63	5,73	55

Tab. 10: Zahl Villin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen (Werte in Klammern sind die bereinigten Werte).

Der Anteil stark Villin-positiver Merkelzellen in Haarfollikeln der Kopfhaut ist sowohl im gepaarten ( $p = 0,0030$ ) als auch im ungepaarten Student-T-Test ( $p = 0,0037$ ) statistisch signifikant niedriger als in der interfollikulären Kopfhaut, was sich nach Bereinigung der Werte auch nicht ändert. Der Anteil stark Villin-positiver Merkelzellen in der Fußsohle ist signifikant höher als der Anteil stark positiver Zellen in den Haarfollikeln der Kopf- ( $p = 0,0012$ ) und Körperhaut ( $p = 0,0487$ ). Der Vergleich der schwach positiven Zellen dieser Lokalisationen untereinander verhält sich umgekehrt ( $p = 0,0019$ ,  $p = 0,0294$ ). Nach Bereinigung der Werte der Körperhaut besteht die Signifikanz jedoch nicht mehr. Verglichen mit den stark positiven Zellen in den Haarfollikeln der Kopfhaut, weisen die ebenfalls stark positiven Zellen der interfollikulären Körperhaut auch statistisch signifikant höhere Werte auf.

Nach Bereinigung der Werte ergibt sich beim Vergleich der stark Villin-positiven Merkelzellen in den Haarfollikeln der Körperhaut zu den stark positiven Zellen in den Haarfollikeln der Kopfhaut ( $p = 0,0272$ ) eine statistisch höhere Signifikanz und zu den stark positiven Zellen in der interfollikulären Kopfhaut ( $p = 0,0424$ ) eine statistisch niedrigere Signifikanz, die zuvor nicht bestand (siehe Tabelle 11).

	<b>Student-T-Test ungepaart:</b>	
	<b>original</b>	<b>bereinigt</b>
KhHf stark pos. zu KhIf stark pos.	<b>0,003737068</b>	<b>0,009512323</b>
KhHf schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,108036768	0,197727466
NhHf stark pos. zu NhIf stark pos.	0,106436596	0,430038248
NhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,173640262	0,335702939
Fs stark pos. zu KhHf stark pos.	<b>0,001152804</b>	*
Fs schwach pos. zu KhHf schwach pos.	<b>0,001859261</b>	*
Fs stark pos. zu KhIf stark pos.	0,403140129	0,291869094
Fs schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,147517986	0,089475483
Fs stark pos. zu NhHf stark pos.	<b>0,048735627</b>	0,243947622
Fs schwach pos. zu NhHf schwach pos.	<b>0,029402048</b>	0,121469657
Fs stark pos. zu NhIf stark pos.	0,257280554	*
Fs schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,053260894	*
KhHf stark pos. zu NhHf stark pos.	0,240534137	<b>0,027227957</b>
KhHf schwach pos. zu NhHf schwach pos.	0,29054827	0,081001505
KhHf stark pos. zu NhIf stark pos.	<b>0,005565469</b>	*
KhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,171503463	*
KhIf stark pos. zu NhIf stark pos.	0,370630514	0,492635808
KhIf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,370630514	0,492635808
KhIf stark pos. zu NhHf stark pos.	0,071006453	<b>0,042420867</b>
KhIf schwach pos. zu NhHf schwach pos.	0,12028054	0,366814634

	<b>Student-T-Test gepaart:</b>	
	<b>original</b>	<b>bereinigt</b>
KhHf stark pos. zu KhIf stark pos.	<b>0,003006202</b>	<b>0,011494619</b>
KhHf schwach pos. zu KhIf schwach pos.	0,29443395	0,55321297
NhHf stark pos. zu NhIf stark pos.	0,294773935	0,928159636
NhHf schwach pos. zu NhIf schwach pos.	0,401332547	0,733106541

Tab. 11: Student-T-Test (ungepaart/gepaart) Villin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen. \* = der Wert hat sich nach Bereinigung nicht verändert.

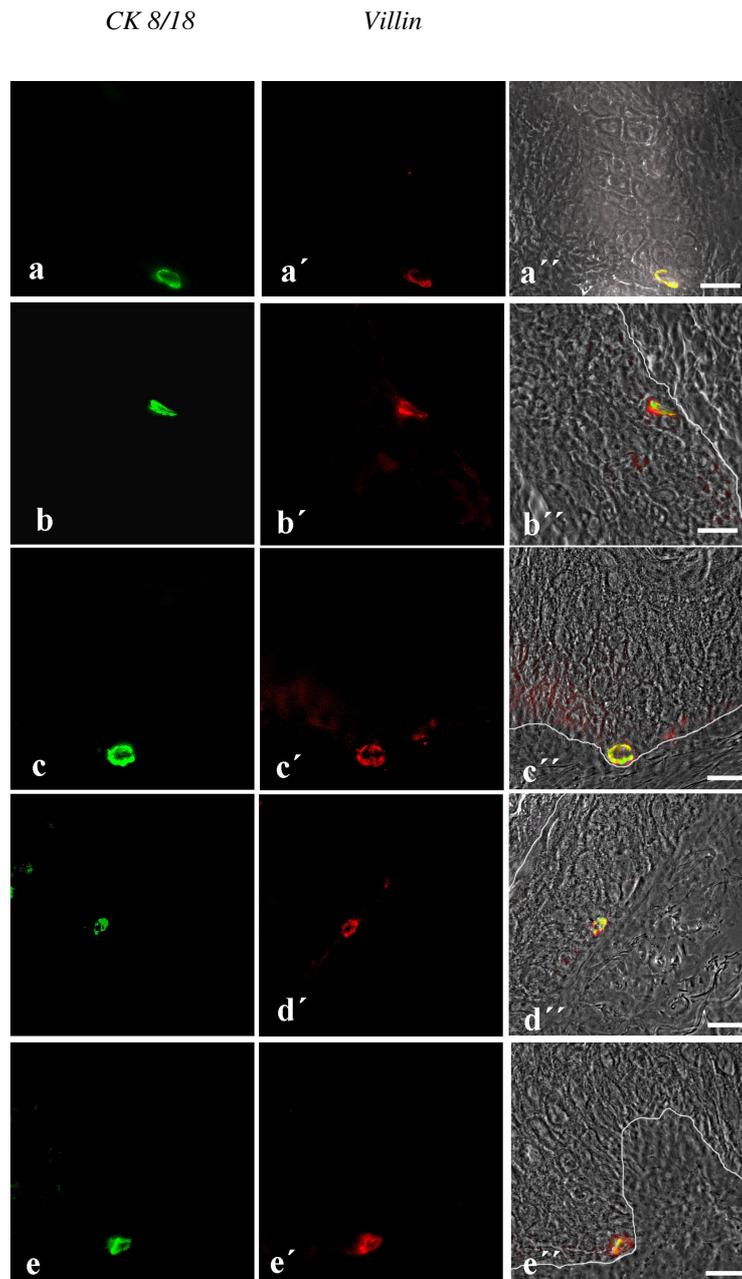
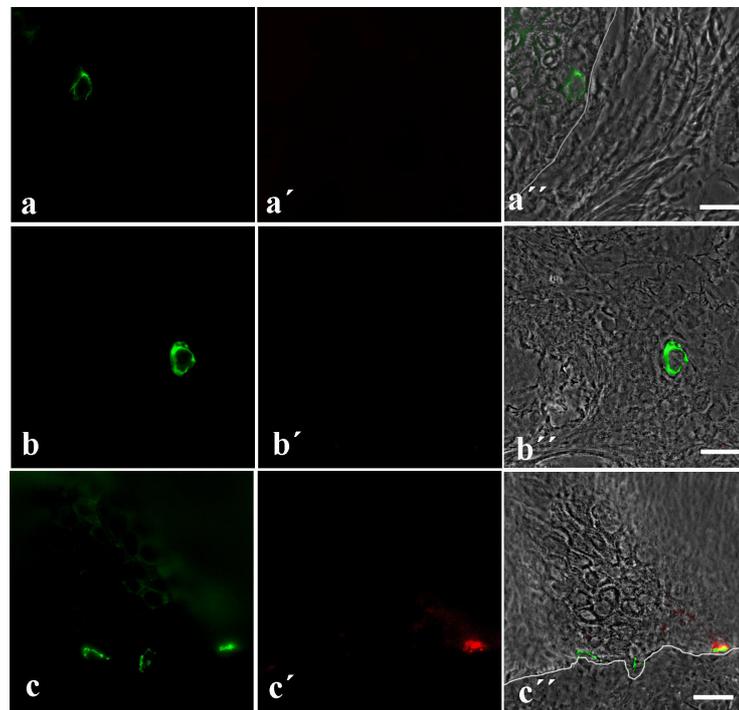


Abb. 13: **Villin-positive Merkelzellen.** Immunlokalisation von Cytokeratin 8/18 (a, a'', b, b'', c, c'', d, d'', e, e''); grün) und Villin (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''); rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b''), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c''), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d'') und in Fußsohle (e-e''). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20  $\mu$ m.

CK 8/18

Villin



*Abb. 14: Villin-negative Merkelzellen. Immunlokalisation von Cytokeratin 8/18 (a, a'', b, b'', c, c''; grün) und Villin (a', a'', b', b'', c', c''; rot) in Haarfollikeln der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Kopfhaut (b-b'') und in Fußsohle (c-c''). (a, a', b, b', c, c') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (c'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (a'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Sowohl in interfollikulärer Epidermis der Körper- als auch der Kopfhaut gibt es keine Villin-negativen Merkelzellen. Balken: 20 µm.*

### 4.3 PROTO-ONKOGENE

#### 4.3.1 CD 117 (c-kit)

CD 117, auch c-kit genannt, ist ein Rezeptor für Stammzelloktoren, der z. B. in Melanozyten, Mastzellen oder hämatopoetischen Stammzellen vorkommt. Er reguliert eine Reihe biologischer Antworten wie Zellproliferation, Apoptose, Chemotaxis oder Adhäsion. CD 117 konnte in meiner Arbeit in einer geringen Anzahl von Merkelzellen nachgewiesen werden. Hier lag die Hauptfärbung im Bereich der Plasmamembran. Der größte Anteil CD 117-positiver Zellen konnte in der interfollikulären Körperhaut ( $45,25 \pm 23,31$  %) identifiziert werden, der geringste Anteil in den Haarfollikeln der Kopfhaut ( $5,5 \pm 2,2$  %). In allen Lokalisationen war der Anteil geringer als 50 % (siehe Tabelle 12/Diagramm 12).

Nach Bereinigung der Werte stieg der Anteil CD 117-positiver Merkelzellen in der interfollikulären Körperhaut auf  $57 \pm 20,21$  %. Auch der Anteil positiver Zellen in der interfollikulären Kopfhaut erhöhte sich auf  $34,5 \pm 18,98$  % und liegt somit über dem Anteil der positiven Zellen in den Haarfollikeln der Körperhaut (siehe Diagramm 13).

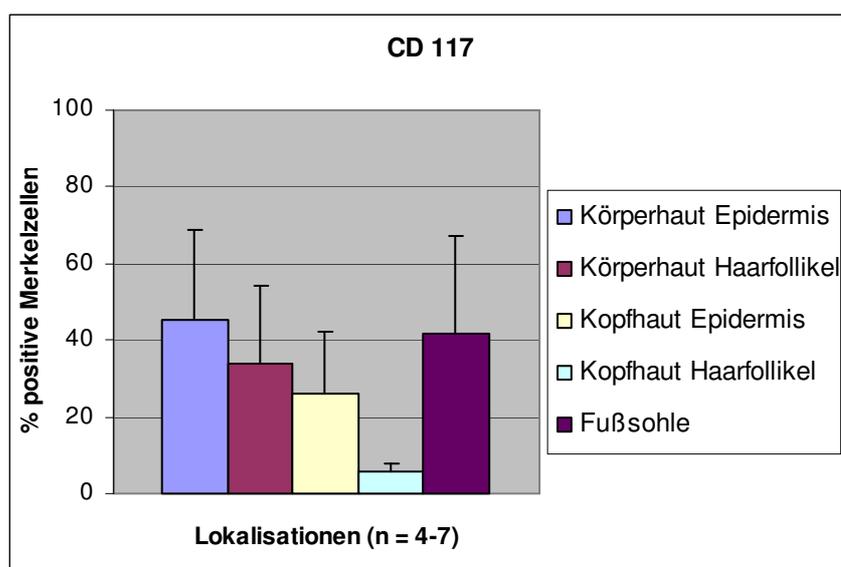


Diagramm 12: Zahl CD 117-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen.

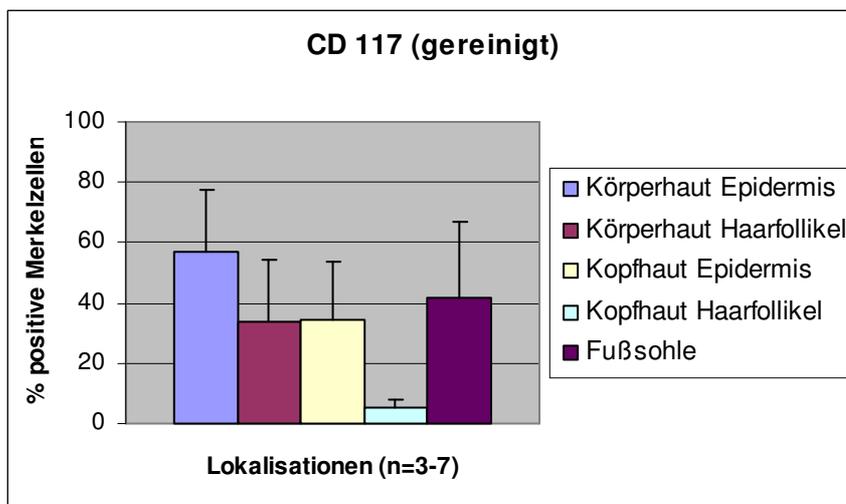


Diagramm 13: Zahl CD 117-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen in bereinigter Form.

<i>Lokalisation</i>	<i>pos. Merkelzellen (%)</i>	<i>SEM</i>	<i>Merkelzellen (absolut)</i>
Körperhaut interfollikulär n=4 (3)	45,25 (57)	23,31 (20,21)	19 (18)
Körperhaut Haarfollikel n=5	33,9	20,44	83
Kopfhaut interfollikulär n=4 (3)	25,88 (34,5)	16,1 (18,98)	34 (33)
Kopfhaut Haarfollikel n=7	5,5	2,2	141
Fußsohle n=4	41,63	25,48	26

Tab. 12: Zahl CD 117-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen (Werte in Klammern sind die bereinigten Werte).

Beim ungepaarten T-Test ist der Anteil CD 117-positiver Merkelzellen in den Haarfollikeln der Kopfhaut im Vergleich zu den anderen Lokalisationen immer statistisch signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 13).

Auch nach Bereinigung der Werte bleibt bei allen Vergleichen die statistische Signifikanz erhalten.

	Student-T-Test ungepaart:		Student-T-Test gepaart:	
	original	bereinigt	original	bereinigt
KhHf zu KhIf	<b>0,04167998</b>	<b>0,0091163</b>	0,21954154	0,23073425
NhHf zu NhIf	0,34490504	0,21409057	0,71696431	0,7797613
Fs zu KhHf	<b>0,02638237</b>	*		
Fs zu KhIf	0,28416865	0,40830657		
Fs zu NhHf	0,39664985	*		
Fs zu NhIf	0,45373989	0,31242975		
KhHf zu NhHf	<b>0,04686866</b>	*		
KhHf zu NhIf	<b>0,01274305</b>	<b>0,00055091</b>		
KhIf zu NhIf	0,22990512	018828488		
KhEpi zu NhHf	0,37433764	0,49145621		

Tab. 13: Student-T-Test (ungepaart/gepaart) CD 117-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen. \* = der Wert hat sich nach Bereinigung nicht verändert.

CK 20

CD 117

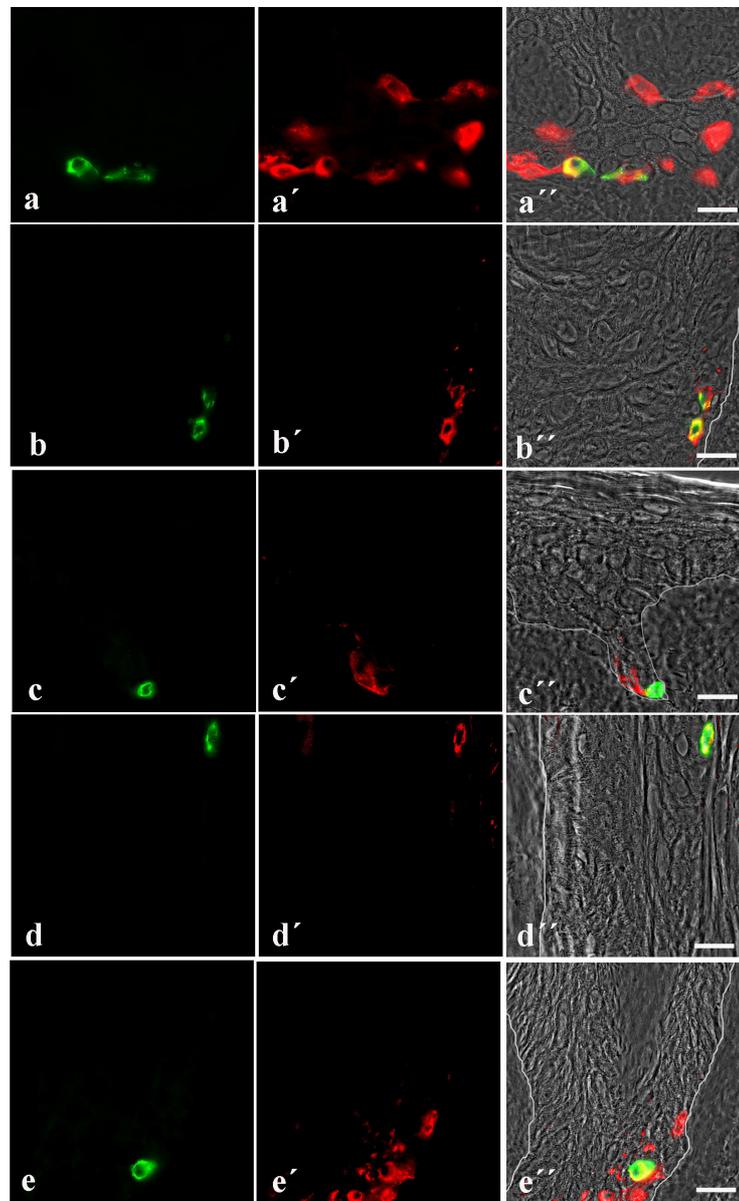


Abb. 15: **CD 117-positive Merkelzellen.** Immunlokalisierung von Cytokeratin 20 (a, a'', b, b'', c, c'', d, d'', e, e''; grün) und CD 117 (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''; rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a''), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b''), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c''), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d'') und in Fußsohle (e-e''). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20 µm.

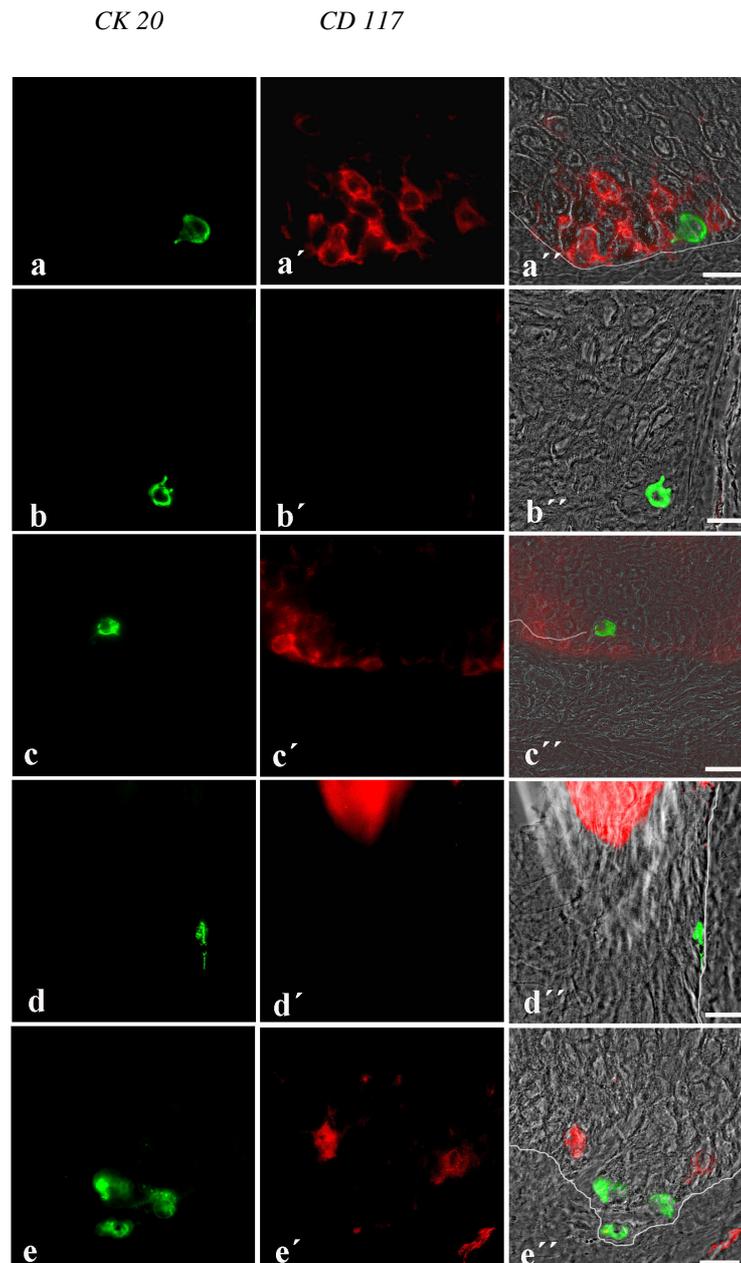


Abb. 16: **CD 117-negative Merkelzellen.** Immunlokalisation von Cytokeratin 20 (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e'; grün) und CD 117 (a', a'', b', b'', c', c'', d', d'', e', e''; rot) in interfollikulärer Epidermis der Körperhaut (a-a'), Haarfollikeln der Körperhaut (b-b'), interfollikulärer Epidermis der Kopfhaut (c-c'), Haarfollikeln der Kopfhaut (d-d') und in Fußsohle (e-e'). (a, a', b, b', c, c', d, d', e, e') Epifluoreszenzbilder, (a'', b'', c'', d'', e'') Überlagerung der Epifluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Bereiche, in denen die Proteine auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren, erscheinen gelb. Gestrichelte Linien in (a'', c'', e'') markieren die Grenze zwischen Epidermis und Dermis, in (b'', d'') die Grenze zwischen Haarfollikel (äußerer Wurzelscheide) und umgebender Dermis. Balken: 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 VERGLEICH DER UNTERSUCHTEN MOLEKÜLE IN DEN VERSCHIEDENEN LOKALISATIONEN

<i>Lokalisation</i>	<i>NhIf (%)</i>	<i>NhHf (%)</i>	<i>KhIf (%)</i>	<i>KhHf (%)</i>	<i>Fs (%)</i>
N-CAM	94	78	72	55	88
NGF-R	52	39	30	17	63
Nestin	0	0	0	0	0
Pan-Nf	100	100	100	100	100
Synaptophysin	100	100	100	100	100
Villin	100	89	100	70	88
CD 117	57	34	35	6	41

*Tab. 14: Zahl positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen in Abhängigkeit von den Antikörpern.*

In dieser Studie wiesen alle Merkelzellen der **Fußsohle** Pan-Neurofilament und Synaptophysin auf. Für die Marker N-CAM, Villin, NGF-Rezeptor und CD 117 waren sie aber heterogen. Während viele Merkelzellen N-CAM- und Villin-positiv waren, waren beim NGF-Rezeptor-Antikörper ca. 63 % und bei CD 117 nur 41 % der Zellen positiv. Alle Merkelzellen waren Nestin-negativ.

In der **interfollikulären Epidermis der Körperhaut** waren alle Merkelzellen sowohl Pan-Neurofilament- als auch Synaptophysin- und Villin-positiv. Fast alle Zellen (ca. 94 %) wiesen N-CAM auf. Bei den Markern NGF-Rezeptor (52 %) und CD 117 (57 %) war ungefähr jede zweite Zelle positiv anfärbbar. Wie in der Fußsohle waren alle Merkelzellen in dieser Lokalisation ebenfalls Nestin-negativ.

Auch in den **Haarfollikeln der Körperhaut** waren alle Merkelzellen Pan-Neurofilament- und Synaptophysin-positiv. Für die Marker Villin, N-CAM, NGF-Rezeptor und CD 117 waren sie heterogen. Während viele Merkelzellen Villin- (89 %) und N-CAM-positiv (78 %) waren, waren nur ca. 1/3 aller Zellen NGF-Rezeptor- (39 %) und CD 117-positiv (34 %). Alle Merkelzellen waren auch hier Nestin-negativ.

In der **interfollikulären Kopfhaut** wiesen alle Merkelzellen Synaptophysin, Pan-Neurofilament und Villin auf. Bei den Markern N-CAM, CD 117 und NGF-Rezeptor war das Färbeverhalten der Zellen erneut sehr heterogen. Während ca. 72 % N-CAM aufwiesen, waren nur 35 % CD 117- und nur 30 % NGF-Rezeptor-positiv. Wie in den anderen Lokalisationen gab es auch hier keine Nestin-positive Zelle.

Auch in den **Haarfollikeln der Kopfhaut** waren alle Merkelzellen Synaptophysin- und Pan-Neurofilament-positiv. Die übrigen Marker wiesen wieder das heterogene Färbemuster auf. Der Villin-Antikörper zeigte ca. 70 % positive Zellen, bei N-CAM waren es 55 % und beim NGF-Rezeptor 17 %. Bei der CD 117-Färbung waren nur 6 % der Merkelzellen positiv. Auch hier waren alle Zellen Nestin-negativ.

Generell wurden in den Haarfollikeln jeweils weniger N-CAM-, NGF-Rezeptor-, Villin- und CD 117-positive Zellen gefunden als in der interfollikulären Epidermis und in der Kopfhaut weniger als in der Körperhaut.

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 IDENTIFIZIERUNG VERSCHIEDENER NEUROLOGISCHER UND EPITHELIALER MARKER AUF IMMUNHISTOCHEMISCHER EBENE**

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Merkelzellen, die durch die Anwesenheit von CK 20 bzw. CK 8/18 identifiziert wurden, unterschiedliche Muster an neuronalen und epidermalen Markerproteinen bzw. Proto-Onkogenen wie CD 117 in Abhängigkeit von der Lokalisation - interfollikuläre Körperhaut, interfollikuläre Kopfhaut, Fußsohle, Haarfollikel der Körperhaut und der Kopfhaut - zeigen.

Es wurden heterogene Färbemuster innerhalb der verschiedenen Lokalisationen und zwischen den verschiedenen Lokalisationen gefunden. Vor allem der Anteil an Merkelzellen, in denen der NGF-Rezeptor, N-CAM, Villin oder CD 117 nachgewiesen werden konnte, schwankte sehr stark zwischen den untersuchten Lokalisationen. So sind nur 6% der Merkelzellen im Haarfollikel der Kopfhaut CD 117-positiv, während man das Protein in über 50 % der Merkelzellen der interfollikulären Epidermis der Körperhaut nachweisen kann.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es verschiedene Populationen von Merkelzellen gibt, z. B. Merkelzellen, die N-CAM+, NGF-R+, Pan-NF+, Villin+, Synaptophysin+ und CD 117+ sind, andere, die N-CAM+, NGF-R+, Pan-NF+, Villin+, Synaptophysin+ und CD 117- sind und wieder andere, die N-CAM-, NGF-R-, Pan-NF+, Villin+, Synaptophysin+ und CD 117- sind. Die hiermit postulierte Heterogenität wird unterstützt von der Tatsache, dass Merkelzellen mit unterschiedlicher Morphologie, d. h. runde und dendritische, die sich während des Haarzyklus unterschiedlich verhalten, beobachtet wurden [12, 24]. Auch Merkelzellen, die mit Nervenendigungen assoziiert sind und solche, bei denen man diese Assoziation nicht findet, weisen auf heterogene Populationen hin [11].

In der **Fußsohle** erkennt man einen sehr hohen Anteil an Merkelzellen, die in Bezug auf die neuronalen Antikörper N-CAM (88 %) und NGF-Rezeptor (63 %) positiv sind. Wenn man die wichtige Rolle von N-CAM und dem NGF-Rezeptor für die Funktion peripherer sympathischer und sensibler Neurone berücksichtigt, könnte dies darauf hindeuten, dass in der Fußsohle die Merkelzellen gehäuft mit Nervenendigungen assoziiert sind und in dieser Lokalisation überwiegend als Mechanorezeptoren fungieren [25, 27].

In der **interfollikulären Körperhaut** erkennt man tendenziell einen prozentual höheren Anteil an N-CAM- und NGF-R-positiven Merkelzellen als in der **interfollikulären Kopfhaut**. Diese Antikörperpräsenz könnte bedeuten, dass es in der Körperhaut mehr Synapsen zwischen Merkelzellen und Nervenendigungen gibt als in der Kopfhaut und folglich die Zellen in der Körperhaut eher als Mechanorezeptoren fungieren als die der Kopfhaut. Im Student-T-Test sind die Unterschiede für diese Antikörper sowohl für Körper- als auch für Kopfhaut jedoch nicht statistisch signifikant und müssten an einer größeren Zahl von Probanden überprüft werden.

Vergleicht man die Merkelzellen in den **Haarfollikeln der Körperhaut** mit denen in den **Haarfollikeln der Kopfhaut**, erkennt man ein ähnliches Muster wie beim interfollikulären Vergleich. Auch hier liegt in der Körperhaut ein prozentual höherer Anteil an N-CAM- und NGF-R-positiven Merkelzellen als in der Kopfhaut vor. Im Student-T-Test sind die Unterschiede bezüglich des NGF-Rezeptors statistisch signifikant.

Vergleicht man weiter die Merkelzellen innerhalb der Kopf- bzw. Körperhaut, so erkennt man sowohl in der Kopf- als auch in der Körperhaut einen prozentual höheren Anteil N-CAM- und NGF-R-positiver Merkelzellen in **interfollikulärer Haut** verglichen mit **Haarfollikeln**. Daraus kann man schlussfolgern, dass in der interfollikulären Haut mehr Merkelzellen mit Nervenendigungen assoziiert sind als in den Haarfollikeln, interfollikulär also mehr Merkelzellen eher die Funktion von Mechanorezeptoren übernehmen als in den Haarfollikeln, wie auch in der Fußsohle beschrieben.

Gallego und Kollegen (1995) beschreiben 100 % **N-CAM**-positive Merkelzellen sowohl in vier Schweinehaut-Proben der Schnauze (hier wurden Haarfollikel und Epidermis untersucht) als auch in vier Proben menschlicher Fingerkuppe [39]. Es wurden keine weiteren Körperlokalisationen in die Untersuchungen einbezogen. In unseren Ergebnissen liegt der Anteil N-CAM-positiver Merkelzellen niedriger (54,8 % - 94,3 %, abhängig von der jeweiligen Körperlokalisation). Die im Vergleich zu den oben beschriebenen Ergebnissen abweichenden Werte könnten in den abweichenden Körperlokalisationen bzw. Spezies begründet sein (unsere Arbeit beschreibt ausschließlich menschliche Proben; Proben der Fingerkuppe waren nicht vorhanden). Die hier vorliegende Arbeit ist die erste, die den Anteil N-CAM-positiver Merkelzellen in verschiedenen Körperlokalisationen des Menschen beschreibt.

Narisawa und Kollegen beschreiben einen Anteil von 60 % **NGF-Rezeptor**-positiven Merkelzellen in der Epidermis der Fußsohle fetaler menschlicher Haut [19]. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein. Auch für NGF-R ist die vorliegende Arbeit die erste, die verschiedene Körperlokalisationen miteinander vergleicht.

Es zeigte sich eine relativ hohe Diskrepanz zwischen dem in der Literatur beschriebenen und dem in meiner Arbeit gefundenen Anteil von Neurofilament-positiven Merkelzellen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass alle Merkelzellen vom **Pan-Neurofilament**-Antikörper erkannt wurden. Der größte Teil der Zellen war stark positiv (> 75 %), der übrige Teil deutlich positiv angefärbt. Zwischen den unterschiedlichen Lokalisationen ist kein deutlicher Unterschied hinsichtlich des Färbeverhaltens zu erkennen. Bei Narisawa und Kollegen (1994) liegen die Zahlen der Neurofilament-positiven Merkelzellen bei nur 5,9 % für NF 200 kD, 0,16 % für Nf 68 kD und 0,24 % für Nf 160 kD [30]. Es wurde hierbei adulte Fußsohle verwendet. Eine weitere Publikation beschreibt eine komplette Abwesenheit von Neurofilament in Merkelzellen bei Mäusen [8]. Allerdings wurden hier nur Antikörper gegen NF 200 kD und NF 68 kD benutzt, Nf 150 kD aber außer acht gelassen. Untersuchungen mit dem Pan-Neurofilament-Antikörper sind bisher nicht beschrieben.

Die Unterschiede zwischen den oben beschriebenen und den von uns gefundenen Ergebnissen könnten auf der Verwendung des Pan-Neurofilament erkennenden Antikörpers im Vergleich zu den einzelne Untereinheiten erkennenden Antikörpern beruhen. Auch die unterschiedlichen Spezies könnten eine Rolle spielen. Zum jetzigen Zeitpunkt kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass das von uns identifizierte Neurofilament zum Teil nicht in der Merkelzelle, sondern in damit assoziierten Nervenendigungen vorhanden ist, da die räumliche Auflösung des konventionellen Lichtmikroskops eine solche Unterscheidung nicht erlaubt. Auch eine – wenn auch ungewöhnliche – Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem anderen Protein, das spezifisch in Merkelzellen exprimiert wird, kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings waren die von uns durchgeführten Isotypen-Kontrollen negativ, und es finden sich keine weiteren, unspezifisch angefärbten Zellen in der Epidermis und in der Dermis. Allein die Nervenzellen waren spezifisch positiv gefärbt. Weitere Untersuchungen zur Klärung der Anwesenheit der verschiedenen Neurofilament-Untereinheiten in Merkelzellen sind nötig.

Auch der neuroendokrine Marker **Synaptophysin** wurde in meiner Studie in allen Merkelzellen aller Lokalisationen nachgewiesen, wenn auch in unterschiedlicher Intensität. García-Caballero und Kollegen (1989) beschrieben die Anwesenheit von Synaptophysin in Merkelzellen der Epidermis und des Haarfollikels in Schweineschnauzen, allerdings wurde - im Gegensatz zu unserer Arbeit - nicht der Anteil von positiven bzw. negativen Zellen bestimmt und nicht mit anderen Körperlokalisationen verglichen [31].

**Villin** findet man vorzugsweise in den Mikrovilli von absorptiven intestinalen Epithelzellen, wo es als Bestandteil des Zytoskeletts für die Stabilität der Zelle von großer Bedeutung ist. Dass der Villin-Antikörper je nach Körperlokalisation mit allen oder den meisten Merkelzellen reagierte und dabei vermutlich die Dendriten erkannte, spricht dafür, dass Villin diese Funktion auch in Merkelzellen ausüben könnte. Dabei könnten die Mikrovilli-ähnlichen Zytoplasmafortsätze zum einen als eine Art Sensor bei mechanischer Bewegung dienen, woraufhin Transmitter aus der Merkelzelle freigesetzt würden [34].

Die hohe Anzahl an Dendriten (häufig über 50 pro Merkelzelle) würde diese These unterstützen. Zum anderen könnte in den Haarfollikeln eher die trophische Rolle im Regenerationsprozess für den Haarzyklus im Vordergrund stehen [13]. Hierfür würde auch die Anwesenheit von Neuropeptiden sprechen [14]. Die Villin-negativen Zellen, die im Haarfollikel der Kopf- und Körperhaut gefunden wurden, könnten die Population der ovalen Merkelzellen (im Gegensatz zu den dendritischen Merkelzellen), die im Haarfollikel nachgewiesen wurden (Nakafusa et al., 2006 [24]) widerspiegeln. Auch Toyoshima und Kollegen (1998) haben die Anwesenheit von Villin in Merkelzellen beschrieben und den Antikörper als zuverlässigen Marker zur Merkelzellidentifikation dargestellt [34]. Allerdings wurde nicht der Anteil von positiven bzw. negativen Zellen bestimmt und die Untersuchungen wurden am Kaninchen und nicht an menschlicher Haut durchgeführt. Somit ist die hier vorliegende Arbeit die erste, die den Anteil Villin-positiver Merkelzellen in verschiedenen Körperlokalisationen des Menschen beschreibt.

**CD 117-positive** Merkelzellen wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Grichnik und Kollegen (1996) beschreiben die Anwesenheit von CD 117 in Melanozyten, schließen aber bei gleichzeitiger Merkelzell Darstellung mit Hilfe des Antikörpers CAM 5.2 eine Anwesenheit von CD 117 in Merkelzellen in menschlichem Gewebe definitiv aus [38]. In dieser Studie wurden Vorhaut (4 x), Brust (2 x), behaarte Kopfhaut (1 x) und Proben von Arm (1 x) und Nase (1 x) untersucht. Ich konnte in meiner Arbeit CD 117-positive Merkelzellen in allen Lokalisationen nachweisen, allerdings mit stark unterschiedlicher Heterogenität des Anteils CD 117-positiver Merkelzellen zwischen verschiedenen Lokalisationen und teilweise auch zwischen den einzelnen Präparaten. So findet man z. B. in den Haarfollikeln der Kopfhaut nur vereinzelt CD 117-positive Merkelzellen, in der Epidermis der Körperhaut dagegen 57 %. In meiner Studie wurden – im Gegensatz zu Grichnik und Kollegen - keine Proben von Arm, Nase oder Vorhaut untersucht. Somit könnte die unterschiedliche Lokalisation eine Rolle für die abweichenden Ergebnisse spielen. In der Kopfhaut konnten wir die niedrigsten Werte für den Anteil CD 117-positiver Merkelzellen beobachten.

Auch konnten wir in drei von sieben Präparaten der Kopfhaut keine CD 117-positive Merkelzelle zu beobachten. Da Grichnik und Kollegen nur eine Probe aus der Kopfhaut untersucht haben, könnte in diesem Fall die Zahl der untersuchten Fälle eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse sein. Darüber hinaus könnte die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und Färbeprotokolle die verschiedenen Ergebnisse erklären. Zukünftige Experimente mit einer parallelen Verwendung beider Antikörper müssen diese Diskrepanz weiter aufklären.

Es gibt bisher keine Veröffentlichung, die sich mit dem Vorhandensein von **Nestin** in Merkelzellen auseinandersetzt. Somit ist unsere Untersuchung die erste, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigt. Wir konnten in keiner der fünf Lokalisationen Nestin-positive Merkelzellen nachweisen. Nestin ist, wie bereits beschrieben, ein Intermediärfilament, das spezifisch ist für neuronale Vorläuferzellen. Charakteristika dieser Zellen sind Proliferation, Migration und ein breites Differenzierungspotential [45]. Nestin spielt folglich eine funktionelle Rolle während der Zelldifferenzierung und deren Entwicklung. Nach der terminalen neuronalen Differenzierung der Zelle wird Nestin herabreguliert und durch Neurofilamente ersetzt. Unsere Ergebnisse bestätigen die Theorie, dass es sich bei Merkelzellen um terminal differenzierte Zellen handelt. Sie zeigen auch, dass es keine Subpopulation an CK 20-positiven Merkelzellen gibt, die sich noch in der (neuronalen) Entwicklung befinden.

Wie in der Einleitung erläutert, ist die Genese der Merkelzellen bisher ungeklärt. Sowohl für eine epidermale als auch eine neuronale Genese gibt es Hinweise. Die vorliegende Arbeit zeigt heterogene Populationen von Merkelzellen. Allerdings findet man in den meisten Merkelzellen sowohl neuronale (Synaptophysin, Pan-Neurofilament, N-CAM) als auch epitheliale (CK 18, CK 8, CK 20 und Villin) Marker. Somit kann weder die neuronale noch die epidermale Genese ausgeschlossen werden. Die Abwesenheit von Nestin zeigt, dass es sich - zumindest bei CK 20-positiven Merkelzellen - nicht um noch in der Entwicklung befindliche neuronale Zellen handelt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es CK 20-negative Merkelzellvorläuferzellen gibt. Um diese Theorie zu untersuchen, müsste allerdings definiert werden, wann eine CK 20-negative Zelle als Merkelzelle bezeichnet wird.

## 5.2 VERGLEICH DER NORMALEN MERKELZELLE MIT MERKELZELLKARZINOMEN

Auch die Entwicklung von Merkelzellkarzinomen (MCC) ist noch umstritten, insbesondere, ob die Merkelzelle die Ursprungszelle ist. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zwischen Merkelzellen und Merkelzellkarzinomen. Stellt man die Ergebnisse meiner Arbeit bezüglich verschiedener Markerproteine in Merkelzellen mit Merkelzellkarzinomen in Beziehung, so sieht man, dass sich die Heterogenität der Expressionsmuster in Merkelzellen auch in Merkelzellkarzinomen widerspiegelt.

Gallego und Kollegen (1995) beschreiben 100 % **N-CAM**-positive MCC bei einer Fallzahl von neun [39]. McNiff und Kollegen (2005) berichten von ca. 94 % N-CAM-positiven MCC bei einer Fallzahl von 18 MCC [40]. Mott und Kollegen (2004) beschreiben N-CAM in allen 25 untersuchten MCC [41]. Kurokawa und Kollegen (2002) bestätigen diese Aussage in einer Studie mit fünf MCC [21]. Hingegen berichten Parrado und Kollegen (1998) von nur 40 % N-CAM-positiven MCC [42]. Wir fanden sowohl N-CAM-positive als auch N-CAM-negative Merkelzellen, wobei der Anteil positiver Merkelzellen in der interfollikulären Körperhaut besonders hoch, in den Haarfollikel der Kopfhaut besonders niedrig war. Es wäre möglich, dass die N-CAM-positiven bzw. -negativen MCC von verschiedenen Merkelzellpopulationen abstammen. Es ist aber auch möglich, dass die Expression im Laufe der Tumorprogression induziert oder abgeschaltet wurde.

**Synaptophysin** wurde in meinen Untersuchungen in allen Merkelzellen gefunden. Kurokawa und Kollegen (2002) konnten ebenfalls in allen fünf untersuchten MCC Synaptophysin nachweisen [21]. Acebo und Kollegen (2005) beschreiben in ihren Ergebnissen 75 % aller MCC bei einer Gesamtzahl von 11 MCC als Synaptophysin-positiv [20].

In der Literatur ist bei den MCC der Anteil der **Neurofilament**-positiven Tumoren unterschiedlich. Schmidt und Kollegen (1998) sprechen von 62,5 % Neurofilament-positiven MCC bei einer Fallzahl von 40, jedoch ohne Angabe der untersuchten Untereinheit [43]. Acebo und Kollegen (2005) konnten in allen 11 untersuchten MCC Pan-Neurofilament nachweisen, jedoch auch ohne die untersuchte Subeinheit zu nennen [20]. Interessanterweise werden Neurofilamente in MCC häufig nicht als über die Zelle ausgebreitetes Zytoskelett, sondern – wie auch bei Cytokeratinen beobachtet – als paranukleäre Plaques gefunden. Geht man davon aus, dass oben genannte Untersuchungen ebenfalls mit Antikörpern, die alle Neurofilament-Subtypen erkennen, durchgeführt wurden, würde das zum Teil für einen Verlust sowie für eine Umlagerung von Neurofilament in MCC im Vergleich zu Merkelzellen sprechen (mit den bereits oben beschriebenen Einschränkungen).

Zhang und Kollegen (1999) untersuchten neben anderen neuroendokrinen Tumoren sechs MCC, von denen nur eines **Villin**-positiv war (ca. 17 %) [22]. Alle anderen waren Villin-negativ. Da in meiner Arbeit Villin in sehr vielen Merkelzellen positiv war (zwischen 70 % aller Merkelzellen in den Haarfollikeln der Kopfhaut und 100 % in der interfollikulären Körperhaut und Kopfhaut), würde dies für einen Verlust von Villin in den Tumoren sprechen. Da MCC-Zellen im Vergleich zu Merkelzellen häufig keine dendritische Morphologie haben, könnte dies für die Funktion von Villin in den Dendriten der Merkelzellen sprechen. Wiederum kann natürlich durch diese Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei MCC nicht um einen Tumor aus Merkelzellen handelt, sondern aus einer anderen Zelle, die kein Villin exprimiert.

Im Fall von **CD 117** findet man in MCC einen prozentual höheren Anteil CD 117-positiver Tumore, als man positive Merkelzellen findet. Während in dieser Arbeit zwischen 5,5 % der Merkelzellen in den Haarfollikeln der Kopfhaut und 57 % in der interfollikulären Epidermis CD 117-positiv waren, berichten Acebo und Kollegen (2005) von 55 % CD 117-positiven MCC bei einer Fallzahl von 11 [20], Feinmesser und Kollegen (2004) von 84 % bei einer Fallzahl von 25 [44].

In der Veröffentlichung von Su und Kollegen (2002) waren sogar 95 % aller MCC CD 117-positiv bei einer Fallzahl von 22 [23]. Dies könnte entweder dafür sprechen, dass MCC bevorzugt aus CD 117-positiven Merkelzellen entstehen, dass dieses Molekül im Lauf der Tumorgenese induziert wird oder dass MCC nicht von Merkelzellen abstammen.

Die Anwesenheit von **NGF-Rezeptor** und **Nestin** wurde bisher noch nicht in MCC untersucht und kann somit nicht mit den hier gefundenen Ergebnissen für Merkelzellen verglichen werden.

Zusammenfassend sieht man somit auch eine hohe Heterogenität im Färbemuster von MCC. Geht man von unterschiedlichen Populationen von Merkelzellen aus, so könnte sich diese Heterogenität der MCC aus ihrem Entstehen aus unterschiedlichen Merkelzellpopulationen erklären. Darüber hinaus kann aber im Laufe der Tumorentstehung eine Veränderung des Expressionsmusters vor sich gehen. Schließlich kann nach wie vor nicht ausgeschlossen werden, dass MCC nicht aus Merkelzellen entstehen, sondern aus anderen Zellen.

### 5.3 FAZIT UND AUSBLICK

Es zeigte sich, dass alle Merkelzellen, die durch ihre Anwesenheit von CK 20 charakterisiert wurden, Synaptophysin-positiv und Nestin-negativ sind.

Das Färbemuster war für CK 20-positive Merkelzellen innerhalb einer Lokalisation (z. B. interfollikuläre Epidermis oder Haarfollikel) und auch zwischen Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen (Körper-/Kopfhaut, Fußsohle, interfollikuläre Epidermis und Haarfollikel) für N-CAM, NGF-Rezeptor, Villin und CD 117 heterogen. Man kann somit von unterschiedlichen Merkelzellpopulationen innerhalb einer Lokalisation sowie an unterschiedlichen Lokalisationen ausgehen.

Die Vermutung, dass unterschiedliche Populationen von Merkelzellen existieren, wird von der Tatsache unterstützt, dass es mit Nervenendigungen assoziierte und freie Merkelzellen gibt. Des Weiteren kann man morphologisch auch ovale und dendritische Merkelzellen unterscheiden und verschiedene Neuropeptid-Muster beobachten.

Geht man von unterschiedlichen Populationen von Merkelzellen aus, so könnte sich die Heterogenität der MCC aus unterschiedlichen Merkelzellpopulationen herleiten.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Merkelzelle wurde 1875 von Friedrich Merkel als sog. „Tastzelle“ entdeckt. Es handelt sich dabei um die neuroendokrine Zelle der Haut. Es ist unklar, ob es sich bei Merkelzellen tatsächlich um eine homogene Population einer Zellart handelt, oder ob sie eine Gruppe von Zellen darstellen, die allgemein durch die Anwesenheit der Cytokeratine 8, 18 und 20 charakterisiert ist. Letztere These wird auch von den unterschiedlichen für Merkelzellen beschriebenen Funktionen unterstützt.

Merkelzellkarzinome (MCC) wurden erstmals 1972 von Toker beschrieben. Trotz vieler Publikationen auf diesem Gebiet ist es bisher aber noch nicht gelungen, zu klären, ob die Ursprungszellen der MCC die Merkelzellen sind, da man sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede finden kann. Zudem weist die ausschließlich dermale Lokalisation von MCC auf einen nicht-epidermalen Ursprung hin.

Zur Klärung der Frage nach der Homogenität der Merkelzellpopulation und der Ähnlichkeit von Merkelzellen und MCC wurden kryokonservierte Proben gesunder adulter Haut unterschiedlicher Lokalisationen immunhistochemisch aufgearbeitet. Die hierzu benutzten Antikörper erkannten Antigene sowohl neuronaler (N-CAM, NGF-Rezeptor, Nestin, Pan-Neurofilament, Synaptophysin) als auch epithelialer Herkunft (Villin) und das Proto-Onkogen CD 117.

Es zeigte sich, dass das Färbemuster für die CK 20-positiven Merkelzellen innerhalb einer Lokalisation, z. B. in Haarfollikeln oder in der interfollikulären Epidermis, unterschiedlich war. Auch zwischen Merkelzellen in verschiedenen Lokalisationen (Körper-/Kopfhaut, Fußsohle, interfollikuläre Haut und Haarfollikel) gab es Unterschiede. Generell findet man in allen Merkelzellen Synaptophysin und Pan-Neurofilament. Nestin ist abwesend. Für N-CAM, NGF-Rezeptor, Villin und CD 117 ist die Verteilung unterschiedlich.

Man kann somit von unterschiedlichen Merkelzellpopulationen innerhalb einer Lokalisation sowie an unterschiedlichen Lokalisationen ausgehen, die bestimmte Charakteristika (die Anwesenheit von CK 20 und Synaptophysin sowie die Abwesenheit von Nestin) gemeinsam haben.

Die Vermutung, dass unterschiedliche Populationen von Merkelzellen existieren, wird auch von der Tatsache unterstützt, dass es mit Nervenendigungen assoziierte und freie Merkelzellen sowie morphologisch ovale und dendritische Merkelzellen gibt. Außerdem gibt es verschiedene Neuropeptid-Muster.

Geht man von einer unterschiedlichen Population von Merkelzellen aus, so könnte sich die Heterogenität der MCC aus dem Entstehen aus unterschiedlichen Merkelzellpopulationen erklären.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. MOLL I, ROESSLER M, BRANDNER JM, EISPERT A-C, HOUDEK P, MOLL R (2005) Human Merkel cells - aspects of cell biology, distribution and functions. *Eur J Cell Biol* 84 (2-3): 259-271.
2. MOLL I (1994) Die Merkelzelle. *Hautarzt* 45 (5): 352-358
3. SCOTT MP, HELM KF (1999) Cytokeratin 20: A marker for diagnosing Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 21 (1): 16-20.
4. PARK SY, KIM HS, HONG EK, KIM WH (2002) Expression of cytokeratins 7 and 20 in primary carcinomas of the stomach and colorectum and their value in the differential diagnosis of metastatic carcinomas to the ovary. *Hum Pathol* 33 (11): 1078-1085.
5. SAMARATUNGA H, KHOO K (2004) Micropapillary variant of urothelial carcinoma of the urinary bladder; a clinicopathological and immunohistochemical study. *Histopathology* 45 (1): 55-64.
6. MOLL I, KUHN C, MOLL R (1995) Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol* 104 (6): 910-915.
7. RAUL U, SAWANT S, DANGE P, KALRAIYA R, INGLE A, VAIDYA M (2004) Implications of Cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype. *Int J Cancer* 111 (5): 662-668.
8. MOLL I, PAUS R, MOLL R (1996) Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *J Invest Dermatol* 106 (2): 281-286.

9. MOLL I (1994) Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp. *Cell Tissue Res* 277 (1): 131-138.
10. TROYANOVSKY SM, GUELSTEIN VI, TCHIPYSHEVA TA, KRUTOVSKIKH VA, BANNIKOV GA (1989) Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *J Cell Sci* 93 (3): 419-426.
11. TACHIBANA T, ENDOH M, NAWA T (2001) Immunohistochemical expression of G protein alpha-subunit isoforms in rat and monkey Merkel cell-neurite complexes. *Histochem Cell Biol* 116 (3): 205-213.
12. TACHIBANA T, YAMAMOTO H, TAKAHASHI N, KAMEGAI T, SHIBANAI S, ISEKI H, NAWA T (1997) Polymorphism of Merkel cells in the rodent palatine mucosa: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Arch Histol Cytol* 60 (4): 379-389.
13. COTSARELIS G, SUN TT, LAVKER RM (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61 (7): 1329-1337.
14. FANTINI F, JOHANSSON O (1995) Neurochemical markers in human cutaneous Merkel cells. *Exp Dermatol* 4 (6): 365-371.
15. NILSSON J, von EULER AM, DALSGAARD CJ (1985) Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315 (6014): 61-63.
16. HAEGERSTRAND A, JONZON B, DALSGAARD CJ, NILSSON J (1989) Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (15): 5993-5996.

17. TAIRA K, NARISAWA Y, NAKAFUSA J, MISAGO N, TANAKA T (2002) Spatial relationship between Merkel cells and Langerhans cells in human hair follicles. *J Dermatol Sci* 30 (3): 195-204.
18. SCHOLZEN T, ARMSTRONG CA, BUNNETT NW, LUGER TA, OLERUD JE, ANSEL JC (1998) Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 7 (2-3): 81-96.
19. NARISAWA Y, HASHIMOTO K, NIHEI Y, PIETRUK T (1992) Biological significance of dermal Merkel cells in development of cutaneous nerves in human fetal skin. *J Histochem Cytochem* 40 (1): 65-71.
20. ACEBO E, VIDAURRAZAGA N, VARAS C, BURGOS-BRETONES JJ, DIAZ-PEREZ JL (2005) Merkel cell carcinoma: a clinicopathological study in 11 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19 (5): 546-551.
21. KUROKAWA M, NABESHIMA K, AKIYAMA Y, MAEDA S, NISHIDA T, NAKAYAMA F, AMANO M, OGATA K, SETOYAMA M (2003) CD 56: a useful marker for diagnosing Merkel cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 31 (3): 219-224.
22. ZHANG PJ, HARRIS KR, ALOBEID B, BROOKS JJ (1999) Immunoexpression of villin in neuroendocrine tumors and its diagnostic implications. *Arch Pathol Lab Med* 123 (9): 812-816.
23. SU LD, FULLEN DR, LOWE L, UHEROVA P, SCHNITZER B, VALDEZ R (2002) CD 117 (KIT receptor) expression in Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 24 (4): 289-293.
24. NAKAFUSA J, NARISAWA Y, SHINAGI T, TAIRA K, TANAKA T, INOUE T, MISAGO N (2006) Changes in the number of Merkel cells with the hair cycle in hair discs on rat back skin. *Br J Dermatol* 155 (5): 883-889.

25. WALMOD PS, KOLKOVA K, BEREZIN V, BOCK E (2004) Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transductions. *Neurochem Res* 29 (11): 2015-2035.
26. YAMASHITA T, FUJITANI M, HATA K, MIMURA F, YAMAGISHI S (2005) Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anat Sci Int* 80 (1): 37-41.
27. SCHOR NF (2005) The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* 77(3): 201-214.
28. HERRMANN H, AEBI U (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Cur Opin Cell Biol* 12 (1): 79-90.
29. LIU Q, XIE F, SIEDLAK SL, NUNOMURA A, HONDA K, MOREIRA PI, ZHUA X, SMITH MA, PERRY G (2004) Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* 61 (24): 3057-3075.
30. NARISAWA Y, HASHIMOTO K, KOHDA H (1994) Immunohistochemical demonstration of the expression of neurofilament proteins in Merkel cells. *Acta Derm Venereol* 74: 441-443.
31. GARCÍA-CABALLERO T, CUEVAS J, GALLEGRO R, ROSÓN E, FORTEZA J, BEIRAS A (1989) Synaptophysinlike immunoreactivity in the Merkel cells of pig-snout skin. *Ultrastruct Pathol* 13: 55-61.
32. WIEDENMANN B, FRANKE WW, KUHN C, MOLL R, GOULD VE (2006) Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci* 83: 3500-3504.

33. SILACCI P, MAZZOLAI L, GAUCI C, STERGIOPULOS N, YIN HL, HAYOZ D (2004) Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 61: 2614-2623.
34. TOYOSHIMA K, SETA Y, TAKEDA S, HARADA H (1998) Identification of Merkel cells by an antibody to villin. *J Histochem Cytochem* 46 (11): 1329-1334.
35. BERGER SA (2006) Signaling pathways influencing SLF and c-Kit-mediated survival and proliferation. *Immun Res* 35 (1-2): 1-11.
36. REBER L, DA SILVA CA, FROSSARD N (2006) Stem cell factor and its receptor c-Kit als targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 533 (1-3): 327-340.
37. PETERS EMJ, MAURER M, BOTCHKAREV VA, DE MASEY JENSEN K, WELKER P, SCOTT GA, PAUS R (2003) Kit is expressed by epithelial cells in vivo. *J Invest Dermatol* 121 (5): 976-984.
38. GRICHNIK JM, ALI WN, BURCH JA, BYERS JD, GARCIA CA, CLARK RE, SHEA CR (1996) KIT expression reveals a population of precursor melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol* 106 (5): 967-971.
39. GALLEGO R, GARCÍA-CABALLERO T, FRAGA M, BEIRAS A, FORTEZA J (1995) Neural cell adhesion molecule immunoreactivity in Merkel cells and Merkel cell tumours. *Virchows Arch* 426: 317-321.
40. MCNIFF JM, COWPER SE, LAZOVA R, SUBTIL A, GLUSAC EJ (2005) CD 56 staining in Merkel cell carcinoma and natural killer-cell lymphoma: magic bullet, diagnostic pitfall, or both? *J Cutan Pathol* 32 (8): 541-545.
41. MOTT RT, SMOLLER BR, MORGAN MB (2004) Merkel cell carcinoma: a clinicopathologic study with prognostic implications. *J Cutan Pathol* 31 (3): 217-223.

42. PARRADO C, BJORNHAGEN V, EUSEBI V, FALKMER UG, HOOG A, GARCÍA-CABALLERO T, PEREZ DE VARGAS I, FALKMER S (1998) Prognosticating tools in primary neuroendocrine (Merkel-cell) carcinomas of the skin: histopathological subdivision, DNA cytometry, cell proliferation analyses (Ki-67-immunoreactivity) and NCAM immunohistochemistry. A clinicopathological study in 25 patients. *Pathol Res Pract* 194: 11-23.
43. SCHMIDT U, MULLER U, METZ KA, LEDER LD (1998) Cytokeratin and neurofilament protein staining in Merkel cell carcinoma of the small cell type and small cell carcinoma of the lung. *Am J Dermatopathol* 20 (4): 346-351.
44. FEINMESSER M, HALPERN M, KAGANOVSKY E, BRENNER B, FENIG E, HODAK E, SULKES J, OKON E (2004) C-kit expression in primary and metastatic Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 26 (6): 458-462.
45. WIESE C, ROLLETSCHKEK A, KANIA G, BLYSZCZUK P, TARASOV KV, TARASOVA Y, WERSTO RP, BOHELER KR, WOBUS AM (2004) Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61: 2510-2522

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Merkelzell-Nerv-Komplex (Skizze)
- Abb. 2 Merkelzelle in elektronenmikroskopischer Darstellung [1]
- Abb. 3 Merkelzellverteilung im Stratum basale interfol. Epidermis (LM)
- Abb. 4 Merkelzellverteilung in Haarfollikeln (Skizze)
- Abb. 5 Merkelzelldarstellung in sog. Touch-Domes [1]
- Abb. 6 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 / N-CAM (positiv)
- Abb. 7 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 / N-CAM (negativ)
- Abb. 8 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 / NGF-Rezeptor (positiv)
- Abb. 9 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 / NGF-Rezeptor (negativ)
- Abb. 10 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 / Nestin (negativ)
- Abb. 11 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 /Pan-Neurofilament (positiv)
- Abb. 12 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 / Synaptophysin (positiv)
- Abb. 13 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 / Villin (positiv)
- Abb. 14 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 8/18 / Villin (negativ)
- Abb. 15 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 20 / CD 117 (positiv)
- Abb. 16 Immunfluoreszenz Doppelfärbung CK 20 / CD 117 (negativ)
- 
- Diagr. 1 Zahl N-CAM-positiver Merkelzellen in verschiedenen Lokalisationen
- Diagr. 2 Zahl N-CAM-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen (bereinigt)
- Diagr. 3 Zahl NGF-Rezeptor-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
- Diagr. 4 Zahl NGF-Rezeptor-pos.MC in verschiedenen Lokalisationen (bereinigt)
- Diagr. 5 Zahl Nestin-positiver Merkelzellen in verschiedenen Lokalisationen
- Diagr. 6 Zahl Pan-Nf-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
- Diagr. 7 Zahl Pan-Nf-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen (bereinigt)
- Diagr. 8 Zahl Synaptophysin-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
- Diagr. 9 Zahl Synaptophysin-pos.MC in verschiedenen Lokalisationen (bereinigt)
- Diagr. 10 Zahl Villin-positiver Merkelzellen in verschiedenen Lokalisationen
- Diagr. 11 Zahl Villin-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen (bereinigt)
- Diagr. 12 Zahl CD 117-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
- Diagr. 13 Zahl CD 117-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen (bereinigt)

---

Tab. 1	Zahl N-CAM-positiver Merkelzellen in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 2	Student-T-Test N-CAM-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 3	Zahl NGF-Rezeptor-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 4	Student-T-Test NGF-Rezeptor-pos. MC in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 5	Zahl Nestin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen
Tab. 6	Zahl Pan-Nf-positiver Merkelzellen in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 7	Student-T-Test Pan-Nf-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 8	Zahl Synaptophysin-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 9	Student-T-Test Synaptophysin-pos. MC in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 10	Zahl Villin-positiver Merkelzellen in den verschiedenen Lokalisationen
Tab. 11	Student-T-Test Villin-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 12	Zahl CD 117-positiver Merkelzellen in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 13	Student-T-Test CD 117-positiver MC in verschiedenen Lokalisationen
Tab. 14	Zahl positiver MC in den verschiedenen Lokalisationen in Abhängigkeit von den Antikörpern

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung bzw. Abbildungen
Ak	Antikörper
ca.	circa
CK	Cytokeratin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
d. h.	das heißt
evtl.	eventuell
Fs	Fußsohle
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Hf	Haarfollikel
If	interfollikulär
Ig	Immunglobulin
interfoll.	interfollikulär
Kh	Kopfhaut
LM	lichtmikroskopisch
mAb	monoclonal antibody
MC	Merkelzelle/n
MCC	Merkelzellkarzinom/e
ms	mouse
N-CAM	Neuronal cell adhesion molecule
Nf	Neurofilament
NGF-R	nerve growth factor receptor
Nh	Normalhaut (Körperhaut)
pAb	polyclonal antibody
PBS	phosphate buffered solution
rb	rabbit
RT	Raumtemperatur
sog.	sogenannt/e/er/en
u. a.	und andere
u. ä.	und ähnliche
z. B.	zum Beispiel

## 10 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Professor Moll für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas und für das Gewähren der großzügigen Arbeitsmöglichkeiten an der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Johanna Brandner, Leiterin des Labors für Zell- und Molekularbiologie der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Gerade in schwierigen Situationen haben mir ihre wertvollen Anregungen und konstruktiven Vorschläge immer wieder weitergeholfen. Ohne sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin bedanke ich mich bei den MTA's Frau Ewa Wladykowski, Frau Sabine Vidal und Frau Pia Houdek für die Einarbeitung in die Methoden der Immunhistologie und die vielen weiteren Hilfen und Hinweise bei Methoden und deren Durchführung. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Germar Schüring für seine Hilfe bei der Bereitstellung und dem Umgang mit den Computerprogrammen.

Auch möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer angespornt und unterstützt haben, sowohl finanziell als auch moralisch. Der Dank gilt ebenso meiner Schwester Julia und meinem Freund Klaas. Sie haben mich alle immer wieder aufgemuntert und motiviert und waren so wesentlich dafür verantwortlich, dass ich die Dissertation endgültig abschließen konnte.

## 11 LEBENS LAUF

<b>Name</b>	Ann-Christin Eispert
<b>Geburtsdatum</b>	15.04.1980
<b>Geburtsort</b>	Vechta
<b>Adresse</b>	Lottestraße 54 22529 Hamburg Tel: 040/57201342 E-Mail: <a href="mailto:ac_eispert@yahoo.de">ac_eispert@yahoo.de</a>
<b>Eltern</b>	Elisabeth Eispert, geb. Bergmann, Lehrerin Gerhard Eispert, Rektor a. D.
<b>Geschwister</b>	Julia Eispert, Rettungsassistentin
<b>Ausbildung</b>	
Schule	
01.08.86 - 31.07.90	Besuch der Grundschule Hagen in Vechta
01.08.90 - 31.07.99	Besuch des Gymnasiums Liebfrauenschule Vechta
28.06.99	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
Universität	
01.04.00 - 30.03.03	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
01.04.03 - 30.09.06	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
<b>Beruf</b>	
seit 01.12.06	Assistenzärztin in der allgemein- und visceralchirurgischen Abteilung des AK Altona in Hamburg

## 12 ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....

Ann-Christin Eispert