

# **Expression humaner Defensine und S100-Proteine in Basalzellkarzinomen: Potentielle Biomarker im Nachresektions-Management**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Eva Cécile Dröge**

aus Koblenz

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Dr. Matthias Heinrich Otto Wenghoefer
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Søren Jepsen

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.05.2024

Aus dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Helmut Stark

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	4
<b>1.</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung</b>	5
1.1	Einleitung	5
1.2	Material und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	12
1.4	Diskussion	22
1.5	Zusammenfassung	27
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	28
<b>2.</b>	<b>Veröffentlichung</b>	37
	Abstract	38
	Introduction	38
	Materials and Methods	40
	Results	41
	Discussion	46
	References	48

Teile dieser Dissertation wurden im peer-reviewed „Journal of Otorhinolaryngology, Hearing and Balance Medicine“ veröffentlicht:

Dröge E, Probstmeier R, Wenghoefer M, Winter J. Occurrence of Human Defensins and S100 Proteins in Head and Neck Basal Cell Carcinoma (BCC) Entities: hBD3 and S100A4 as Potential Biomarkers to Evaluate Successful Surgical Therapy. OHBM 2023; 4: 1

DOI: <https://doi.org/10.3390/ohbm4010001>

Die publizierte Version findet sich auf Seite 38 dieser Dissertation.

## Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielle Peptide
BZK	Basalzellkarzinom
DEFA	Humanes $\alpha$ -Defensin (defensin alpha)
H-Score	Histoscore: semiquantitativer Wert zur Auswertung der Färbeintensität
HBD	Humanes $\beta$ -Defensin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNP	Humanes Neutrophiles Peptid (= Humanes $\alpha$ -Defensin)
ICD	Internationale Klassifikation von Krankheiten (International Classification of Diseases)
MKC	Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
R <sub>0</sub>	kein Residualtumor
R <sub>1</sub>	mikroskopischer Residualtumor
RAGE	Rezeptor für glykierte Reaktionsprodukte (receptor of advanced glycation endproducts)
RGB	Rot-Grün-Blau
TLR	Toll-like Rezeptor

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Basalzellkarzinom ist einer der häufigsten malignen Tumoren des Menschen. In Deutschland erkranken pro Jahr zirka 180 Personen pro 100.000 Einwohner. In den letzten Jahren ist das Risiko an einem Basalzellkarzinom zu erkranken deutlich angestiegen und verdoppelt sich alle 25 Jahre (Kauvar et al., 2015; Robert Koch-Institut, 2021; Venables et al., 2019). Obwohl sich der Hauttumor durch eine niedrige Malignität, langsames invasives Wachstum und seltene Metastasierung auszeichnet, droht bei Nichtbehandlung Metastasierung, perineurale Infiltration, Destruktion von lokalen Geweben, Funktionsverlust und kosmetische Entstellung (Kauvar et al., 2015).

Der Hauptrisikofaktor für die Erkrankung ist UV-Strahlung, wobei vor allem eine hohe UV-Belastung in der frühen Kindheit zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko im Erwachsenenalter führt (Krickler et al., 2017). Ein heller Hauttyp erhöht das Risiko; stärker pigmentierte Hauttypen erkranken entsprechend seltener (Scotto et al., 1983). Männer sind häufiger betroffen als Frauen, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren (Scotto et al., 1983; Venables et al., 2019). Die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt statistisch bei Menschen, die in der Vergangenheit bereits an einem BZK erkrankt waren (AWMF, 2018). Betroffene Hautpartien liegen zu 80-95 % Prozent in der Kopf-Hals-Region (Scotto et al., 1983; Scrivener et al., 2002; Tan et al., 2015).

Während die vollständige Exzision des Tumorgewebes mit Sicherheitsabstand zur Verhinderung eines Rezidivs Vorrang haben, spricht eine Reihe von Argumenten (kosmetische Folgen, Vermeidung von Operationen für ältere und multimorbide Patienten, ökonomische Faktoren) für eine präzise Diagnose und Prognose, um potentiell unnötige Prozeduren zu vermeiden (Venables et al., 2019).

### 1.1.2 Histologie

Histopathologisch werden die BZK in indolent- versus aggressiv-wachsende Typen unterteilt (Crowson, 2006): Solide (= noduläre) und superfizielle BZK-Formen sind indolent, infiltrative, metatypische und morpheiforme bzw. sklerosierende BZK-Typen wachsen aggressiv. Ungefähr ein Drittel der Tumoren sind Mischformen, zeigen also gleichzeitig mehrere Ausprägungen (Sexton et al., 1990). Mit 21 % am häufigsten ist die solide Form, welche klinisch durch eine transluzente oder erythematöse Papel mit Teleangiektasien gekennzeichnet ist (Crowson, 2006; Sexton et al., 1990). Das superfizielle BZK ist mit 17 % die zweithäufigste Form und besteht aus einer rötlichen, variierend hypopigmentierten Plaque mit sich weit ausbreitendem, manchmal narbenähnlichem Rand (Johnson et al., 1994; Sexton et al., 1990). Das sklerodermiforme (8 %) BZK erscheint klinisch wie eine hautfarbene flache, fibrotische Narbe (Conforti et al., 2021; Goldberg, 1996; Sexton et al., 1990).

Die histologische Untersuchung von Biopsie- oder Exzisionsmaterial ist essentiell zur exakten Bestimmung der Tumorausbreitung (AWMF, 2018). Dies erfolgt generell durch pathologische Beurteilung von HE-gefärbten Schnittpräparaten. Schnell und einfach zu visualisierende Biomarker (meist Proteine) können hier diagnostische Protokolle vereinfachen.

### 1.1.3 Chirurgie und Randmanagement

Die „Leitlinie im Auftrag der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie“ empfiehlt zur Behandlung von BZK die vollständige Exzision und folgende histologische Aufarbeitung und Randkontrolle (AWMF, 2018). Dabei gewährt die Technik der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie (MKC) eine Resektion im Gesunden bei gleichzeitiger Schonung der umliegenden Gewebe. Während der Operation werden die Ränder lückenlos beurteilt und eventuell vorhandene Tumorausläufer topographisch zugeordnet (AWMF, 2018).

Weitere Behandlungsmöglichkeiten sind die Operation mit tumoradaptiertem Sicherheitsabstand und konventioneller Histologie, Kürettage, Radiotherapie, Kryotherapie, immunologische, photodynamische und die Chemotherapie. Letztere haben den Nachteil der fehlenden histologischen Kontrolle und sind der vollständigen Tumorsektion mit

Sicherheitsabstand unterlegen. Sie sollten nur in Ausnahmefällen Anwendung finden (AWMF, 2018).

Nach vollständiger Entfernung des Tumors hat das BZK eine gute Prognose. Die Rezidivhäufigkeit nach fünf Jahren beträgt nur zwischen 1,7 und 6,5 % für histologisch R<sub>0</sub>-resezierte BZK nach MKC (Julian und Bowers, 1997; Smeets et al., 2004; Walker und Hill, 2006; Wennberg et al., 1999).

Unvollständige Resektionen werden mit einer Lokalisation im Gesicht, hoher Infiltrationstiefe, nodulär-sklerosierender, sklerosierender und basosquamöser Histologie, Rezidiven und Nachresektionen in Zusammenhang gebracht (Codazzi et al., 2014). Die Rezidivrate für R<sub>1</sub>-resezierte Tumoren ist mit 26,8 % erheblich höher als für R<sub>0</sub>-Fälle (Codazzi et al., 2014). Rezidive wachsen häufig unterminierend und verhalten sich aggressiver (Kauvar et al., 2015). Außerdem können sie durch die Narbe der ersten Resektion verdeckt werden, was die klinische Diagnose erschwert. Dadurch verschlechtert sich die Prognose im Gegensatz zu Primärtumoren noch einmal deutlich (Kauvar et al., 2015; Rowe et al., 1989).

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, wie nach einer R<sub>1</sub>-Resektion vorgegangen werden sollte. Swetter et al. (2003) berichten in einer Studie, dass 24 % der BZK mit positivem Rand nach Flachexzision in der Nachresektion tumorfrei waren. Sie gehen davon aus, dass die übrigen Tumorzellen nach der ersten Biopsie durch einen noch unklaren Mechanismus, eventuell durch den Wundheilungsprozess, eliminiert wurden. Eine ähnliche Studie kam zu einem Ergebnis von 42 % tumorfreier Nachresektionen (Stewart et al., 2014). Trotz dieser hohen Zahlen raten sie generell vom Unterlassen einer Nachresektion ab (Stewart et al., 2014). Gurunluoglu et al. (2015) untersuchten, ob demographische Faktoren, Tumorgöße, Histologie, Zeitintervall zwischen primärer Biopsie und Nachresektion oder Rekonstruktion einen Einfluss auf das Vorhandensein von Residualtumor in der Nachresektion haben. Sie konnten in dieser Studie jedoch keine Faktoren identifizieren.

Da das BZK am häufigsten in der Kopf-Hals-Region auftritt, ist eine ästhetisch anspruchsvolle Rekonstruktion von besonderer Wichtigkeit. Dabei ist ein primärer Wundverschluss anzustreben und unnötige Nachresektionen sind zu vermeiden.

#### 1.1.4 Defensine

Humane Defensine sind Teil der angeborenen Immunabwehr und gehören zu den antimikrobiellen Peptiden (AMP). Sie sind kationische Peptide mit antibakterieller, antiviraler und antimykotischer Wirkung. Sie werden in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine unterteilt (Xu und Lu, 2020), wobei der Begriff  $\alpha$ -Defensine in der Literatur synonym mit DEFA (Defensin alpha) bzw. HNP (Humanes neutrophiles Peptid) verwendet wird.  $\beta$ -Defensine werden auch als hBDs (Humane  $\beta$ -Defensine) bezeichnet.

Die humanen  $\alpha$ -Defensine 1-4 (DEFA1/3, DEFA4) kommen physiologisch in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten vor. Sie fusionieren mit Phagolysosomen und eliminieren so phagozytierte Mikroben. Außerdem werden sie in den extrazellulären Raum sezerniert (Xu und Lu, 2020). DEFA1, -2 und -3 unterscheiden sich nur in einer Aminosäure (Mars et al., 1995) und werden deshalb immunhistochemisch mit dem gleichen Antikörper nachgewiesen.

Das  $\beta$ -Defensin hBD-1 wird physiologisch von vielen Epithelzelltypen exprimiert - unter anderem von Keratinozyten der Haut, vom Epithel der Niere und des Pankreas. hBD-2 und hBD-3, erstmals in der Haut von Psoriasis-Patienten nachgewiesen, werden von Epithelzellen bei Kontakt mit Mikroben und proinflammatorischen Zytokinen gebildet (Lehrer, 2004). Die antimikrobielle Wirkung von hBD-3 betrifft viele grampositive und gramnegative Bakterien, unter anderem auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistente *Enterococcus*-Bakterien (Lehrer, 2004).

Neben der antimikrobiellen Wirkung wurden in zahlreichen Studien das Vorkommen und die Wirkung von AMPs in unterschiedlichsten Krebsarten untersucht. So fungiert hBD-1 in vielen Fällen als Tumorsuppressor (durch Förderung von Apoptose und Zytolyse) bzw. seine Expression ist in Tumorzellen vermindert: unter anderem in BZKs, Nierenzellkarzinomen, oralen und kutanen Plattenepithelkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen, Kolonkarzinomen und Prostatakarzinomen (Bonamy et al., 2018; Donald et al., 2003; Gambichler et al., 2006; Joly et al., 2009; Li et al., 2021; Scola et al., 2012; Semlali et al., 2015; Sun et al., 2006; Wenghoefer et al., 2008b; Winter et al., 2011b).

HBD-2 zeigt in verschiedenen Tumorarten unterschiedliche Konzentrationsmuster (Gambichler et al., 2006; Winter et al., 2011b), hBD-3 wird dagegen oft überexprimiert und fördert Tumorwachstum und Migration, zum Beispiel in oralen Plattenepithelkarzinomen,



Zervixkarzinomen, Kaposisarkomen und in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Fathy et al., 2012; Kesting et al., 2009a; Mburu et al., 2011; Shuyi et al., 2011; Winter et al., 2011b; Xu et al., 2016).

#### 1.1.5 S100-Proteine

S100-Proteine sind eine Gruppe kalziumbindender Proteine des Zytosols, die sowohl intra- als auch extrazellulär verschiedene Funktionen in der Immunabwehr haben, zum Beispiel Steuerung und Vermittlung von Entzündungsreaktionen, Apoptose, Zellmigration und –proliferation (Xia et al., 2017).

S100A4 wird auch Metastasin genannt, da es Zellüberleben, Motilität und Invasion in verschiedenen Tumorarten z.B. Pankreas, Endometrium, Magen, Brust, Ovarial und Niere begünstigt. Darüber hinaus beeinflusst es die Leukozytenmigration und stimuliert die Zytokinproduktion (Bresnick et al., 2015; Donato et al., 2013).

S100A7 (Psoriasin) wird vermehrt in entzündlich veränderter Haut z.B. bei Psoriasis oder atopischer Dermatitis exprimiert (Xia et al., 2017).

S100A8 und S100A9 (Calgranulin A und B) bilden zusammen den Heterotetramerkomplex Calprotectin, welcher ein Ligand des TLR4 (Toll-like Rezeptor) und des RAGE (Rezeptor für glykierte Reaktionsprodukte/receptor of advanced glycation endproducts) ist und verschiedene Entzündungsreaktionen vermitteln kann (Xia et al., 2017). Beide Proteine finden sich in Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Keratinozyten (Xia et al., 2017).

### 1.1.6 Fragestellung

In der chirurgischen Praxis wird oft beobachtet, dass nach unvollständiger Resektion eines BZK keine vitalen Tumorzellen mehr im Nachresektat festgestellt werden können. Wir vermuten, dass sie durch eine noch unbekannte Reaktion des Immunsystems eliminiert werden. Da in der am häufigsten betroffenen und ästhetisch wichtigen Kopf-Hals-Region bei geringerem Sicherheitsabstand unnötige Nachresektionen unbedingt vermieden werden müssen, sind zusätzlich zur histologischen Unterscheidung von indolenten (soliden und superfiziellen) und aggressiven (sklerodermiformen) Tumoren weitere Marker erforderlich, um die Notwendigkeit und Ausdehnung einer Nachresektion zu beurteilen. So könnten den zunehmend älteren und multimorbiden Patienten weitere ausgedehnte Operationen erspart werden.

Da humane Defensine und S100-Proteine eine wichtige Rolle sowohl für die Immunabwehr als auch in der Karzinogenese spielen, sind sie mögliche Biomarker zur Beurteilung der weiteren Therapie und Prognose R<sub>1</sub>-resezierter Tumore. Daher untersucht die vorliegende Arbeit die Proteinexpression humaner Defensine (hBD-1, hBD-2, hBD-3, DEFA1/3, DEFA4) und S100-Proteine (S100A4, S100A7, S100A8, S100A9) immunhistologisch an Resektaten von primär R<sub>1</sub>-resezierten soliden, superfiziellen und sklerodermiformen BZK im Vergleich zu nicht-tumorösem Kontrollgewebe derselben Person.

## 1.2 Material und Methoden

Im Rahmen einer retrospektiven Studie wurden alle Basalzellkarzinome, die in der Praxis für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Göttfert/Wenghoefer in Koblenz vom 01.01.2013 bis 31.12.2015 reseziert wurden, aufgenommen. Die Resektionen wurden von vier verschiedenen Behandlern durchgeführt. Es wurden die histopathologische Befunde des Pathologischen Institutes Koblenz und der Dermatopathologie Friedrichshafen/Bodensee sowie die jeweiligen Patientenakten analysiert.

Zur tabellarischen Erfassung der Patientendaten diente das Programm Microsoft Excel. Die aufgenommenen Parameter waren unter anderem Alter, Geschlecht, Lokalisation, maximaler Durchmesser und maximale Dicke des Tumors, histologischer Typ sowie die ICD-Diagnose. In Bezug auf die Ränder wurde erfasst, ob sie tumorfrei waren und wie

groß der minimale Sicherheitsabstand des Tumors zum gesunden Gewebe war. Die gleichen Parameter wurden, falls erfolgt, für eine zweite, dritte und weitere Tumorresektion erfasst.

Für eine Nachuntersuchung wurden 30 der insgesamt 1246 Basalzellkarzinome ausgewählt, jeweils 10 der histologischen Typen solide, superfiziell (indolent wachsend) und sklerodermiform (aggressiv wachsend). Die Basalzellkarzinome wurden primär R<sub>1</sub>-reseziert und daraufhin am betroffenen Rand nachreseziert. Voraussetzung war außerdem, dass die Tumorgroße in der Erstresektion bekannt und ihr Exzisionsrand sicher nicht frei von Tumorzellen war. Fälle mit Probeexzisionen und eventuell in der Exzision vorhandene *In-situ*-Plattenepithelkarzinome wurden ignoriert. Es wurde nach Geschlecht, Alter und histologischem Typ gematcht. Die Patienten stimmten der wissenschaftlichen Untersuchung der histologischen Schnitte schriftlich zu und die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt (#067/18).

In der 5-fach vergrößerten HE-Färbung wurde die genaue Lokalisation des tumorösen Gewebes, falls vorhanden, markiert. Die Proben wurden immunhistochemisch gefärbt und 5-fach und 20-fach vergrößert fotografiert.

Die einzelnen immunhistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern (hBD-1, hBD-2, hBD-3, DEFA1/3, DEFA4, S100A4, S100A7, S100A8, S100A9) wurden quantitativ und qualitativ in repräsentativen Bereichen erfasst. Die Aufteilung innerhalb der Bilder erfolgte in nicht-tumorösen Bereichen nach Epithel vs. Stroma und innerhalb der Tumorzellen nach Rand vs. Zentrum. Tumoröses und nicht-tumoröses Kontrollmaterial stammten von der gleichen Person.

Aus 40 Zellen jeder Probe und jeder Färbung wurde der prozentuale Anteil an immunpositiven Zellen in Epithel, Stroma, Tumorrand und Tumorzentrum ermittelt.

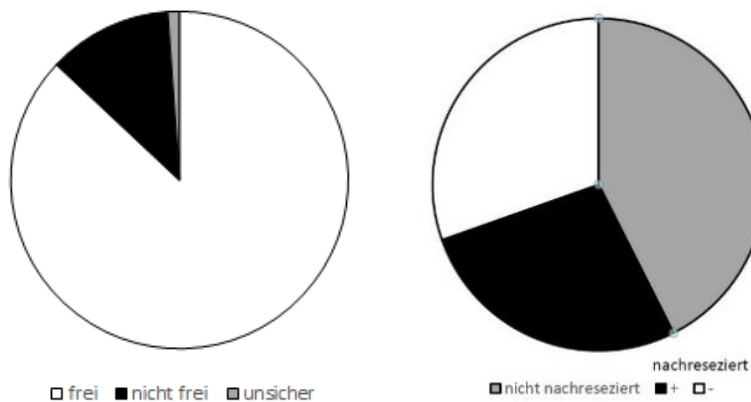
Für die qualitative Analyse mit einem RGB-basierten Modell wurde der Farbwert von Rot prozentual zum Gesamtfarbwert von Rot, Grün und Blau berechnet. Wir definierten vier Abstufungen in der Intensität der Färbung: keine Färbung (-) (rot unter 35 %), schwache Färbung (+) (rot = 36-38 %), moderate Färbung (++) (rot = 39-41 %) und starke Färbung (+++) (rot über 42 %).

Der berechnete H-Score (Histoscore) vereint die quantitative und qualitative Auswertung: Der Prozentsatz der schwach positiven Zellen wird mit der Zahl 1 multipliziert, der der moderat positiven mit 2 und der der stark positiven mit 3. So ergibt sich eine Höchstzahl von 300 (Ishibashi et al., 2003).

### 1.3 Ergebnisse

#### 1.3.1 Kohorte

Es wurden 1246 Basalzellkarzinome tabellarisch erfasst. Die Ränder der Exzidate der ersten Exzision waren in der Beurteilung der Pathologen in 87 % frei von Tumor, in 12 % (n = 148) nicht frei und bei 1 % war die Diagnose unsicher. 7 % (n = 85) wurden einer Nachresektion unterzogen, wobei in 53 % davon (n = 45) dieser Proben keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar waren, in 47 % (n = 40) jedoch schon (Abb. 1). Die für die Nachuntersuchung ausgewählten Fälle sind in Tabelle 1 dargestellt.



**Abb. 1:** links: Ränder der ersten Exzision

rechts: primär R<sub>1</sub>-resezierte Basalzellkarzinome in der Nachresektion: schwarzes Feld = vitale Tumorzellen im Nachresektat nachweisbar, weißes Feld = keine vitalen Tumorzellen im Nachresektat nachweisbar, graues Feld = nicht nachreseziert

**Tab. 1:** Untersuchte Resektate (m = männlich, f = weiblich) (modifiziert übernommen aus Dröge et al., 2023)

Patient	Geschlecht	Alter	Typ
1	m	76	Sklerodermiform
2	m	84	Sklerodermiform
3	m	82	Sklerodermiform
4	f	77	Sklerodermiform
5	f	81	Sklerodermiform
6	m	66	Sklerodermiform
7	f	81	Sklerodermiform
8	m	69	Sklerodermiform
9	f	72	Sklerodermiform
10	f	75	Sklerodermiform
11	m	76	Solide
12	f	84	Solide
13	m	81	Solide
14	f	89	Solide
15	f	62	Solide
16	m	73	Solide
17	f	71	Solide
18	m	71	Solide
19	f	53	Solide
20	m	65	Solide
21	f	85	Superfiziell
22	m	84	Superfiziell
23	m	82	Superfiziell
24	f	71	Superfiziell
25	f	80	Superfiziell
26	m	73	Superfiziell
27	f	72	Superfiziell
28	m	71	Superfiziell
29	f	84	Superfiziell
30	m	50	Superfiziell

### 1.3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die ausgewählten Proben wurden immunhistologisch hinsichtlich Färbungsintensität, Lokalisation und Quantität von hBD-1, hBD-2, hBD-3, DEFA1/3, DEFA4, S100A4, S100A7, S100A8, S100A9 ausgewertet (Tab. 2, Tab. 3).

HBD-1 hatte in fast allen Zellen aller drei Tumorarten mittlere Färbungsintensität im Zytoplasma (100 % der Zellen), sowohl im nicht-tumorösen Epithel als auch in tumorösen Anteilen, gleichmäßig in den Tumorzellnestern verteilt (Abb. 2, Abb. 3). Auffallen sind das Stroma des nicht-tumorösen Teiles (20 % positive Zellen) der beiden indolenten Tumortypen sowie das Zentrum des Tumorzellnestes der superfiziellen BZK (10 % positive Zellen, schwache Färbung). Außerdem wurden im Stroma der aggressiven BZK (nicht-tumoröser Anteil) nur 50 % der Zellen gefärbt.

HBD-2 hatte im nicht-tumorösen Epithel aller drei Tumortypen starke zytoplasmatische Färbung in 100 % der Zellen und im Stroma mittlere bis schwache Färbung in 30 % (solide und superfiziell) bis 70 % (sklerodermiform) der Zellen. Die soliden BZK exprimierten hBD-2 zytoplasmatisch in mittlerer Intensität in 100 % der Zellen, die sklerodermiformen und die superfiziellen im Zentrum der Zellnester jedoch nur 50 % bzw. 20 % mit schwacher Intensität.

HBD-3 fiel durch nukleäre Expression mittlerer Intensität in 50 % der randständigen Zellen der Tumorzellnester der sklerodermiformen und 25 % der zentralen Zellen der superfiziellen BZK auf. Das Zytoplasma dieser Bereiche war zwar auch gefärbt (schwache bis mittlere Intensität in 100 % bzw. 25 %), nukleäre und zytoplasmatische Färbung kamen jedoch bei den superfiziellen BZK nicht in denselben Zellen vor.

DEFA1/3 verhielt sich ähnlich wie hBD-1, wobei das nicht-tumoröse Stroma in allen Proben schwächere Färbung zeigte.

DEFA4 ähnelte ebenfalls hBD-1 und DEFA1/3, die schwache Stromafärbung war hier jedoch in weniger Zellen vorhanden (10 %).

S100A4 wurde von keinem der drei Tumortypen im Bereich der Zellnester gebildet, sondern ausschließlich im Stroma des nicht-tumorösen Bereichs (mit schwacher Intensität). Hier in den Schnitten der sklerodermiformen und soliden BZK zytoplasmatisch zu 50-70 % und in denen der superfiziellen zusätzlich nukleär zu 50 % (Abb. 4, Abb. 5).

S100A7 war ebenso wie S100A4 in keiner der tumorösen Zellen vorhanden. Im Gegensatz zu diesem AMP färbte die S100A7-Antikörperreaktion jedoch das Zytoplasma des Epithels von 80-90 % der Zellen des nicht-tumorösen Bereichs mittelstark an.

S100A8 konnte in keiner der drei Tumorarten im Stroma des nicht-tumorösen Bereiches nachgewiesen werden, im Epithel aber mit mittlerer bis starker Intensität bei 80-90 % der Zellen. Auch die tumorösen Bereiche wiesen zwischen den aggressiven und indolenten BZK kaum Unterschiede auf, hier war das Zytoplasma in 80-100 % der Zellen schwach gefärbt.

S100A9 wies im Gegensatz zu den beiden vorigen Proteinen wieder deutliche Unterschiede zwischen den Tumorentitäten auf: In den tumorösen Bereichen der superfiziellen BZK konnte S100A9 nicht nachgewiesen werden, in denen der soliden BZK zu 100 % schwach im Zytoplasma und in denen der sklerodermiformen BZK am Rand ebenso zu 100 % und im Zentrum der Zellnester zu 50 % schwach im Zytoplasma. Die Epithelien waren bei allen drei Entitäten zu fast 100 % zytoplasmatisch positiv, mit mittlerer (solide) bis starker (sklerodermiform und superfiziell) Intensität, die Stromata vollständig negativ.

Zusammenfassend fällt bei dieser immunhistologischen Auswertung auf, dass unter den antimikrobiellen Peptiden nur hBD-3 nukleär exprimiert wurde, sowohl in den sklerodermiformen als auch in den superfiziellen BZK. Von den S100-Proteinen trifft dies auch nur auf eines zu: S100A4 im Zellkern wurde im Stroma des nicht-tumorösen Bereiches der superfiziellen BZK gefunden. Bei den soliden BZK-Proben wurde keine Kernfärbung beobachtet. Außerdem sticht heraus, dass die Proteine S100A4 und S100A7 in keiner Tumorzelle unserer Proben nachgewiesen wurden.

**Tab. 2:** Gewebespezifische Immunfärbungsmuster und histomorphometrische Analysen von hBD-1, hBD-2, hBD-3, DEFA1/3, DEFA4, S100A4, -A7, -A8 und -A9 in nicht-tumorösen und tumorösen Geweben des sklerodermiformen, soliden und superfiziellen Basalzellkarzinoms (je n = 10).

Der Prozentsatz der Zellen mit gefärbtem Zytoplasma wurde quantitativ ausgewertet und ist als Mittelwert (%) mit Standardfehler in Klammern angegeben. Zusätzlich wurde der Anteil der angefärbten Zellkerne (n) für hBD3 und S100A4 berechnet (modifiziert übernommen aus Dröge et al., 2023).

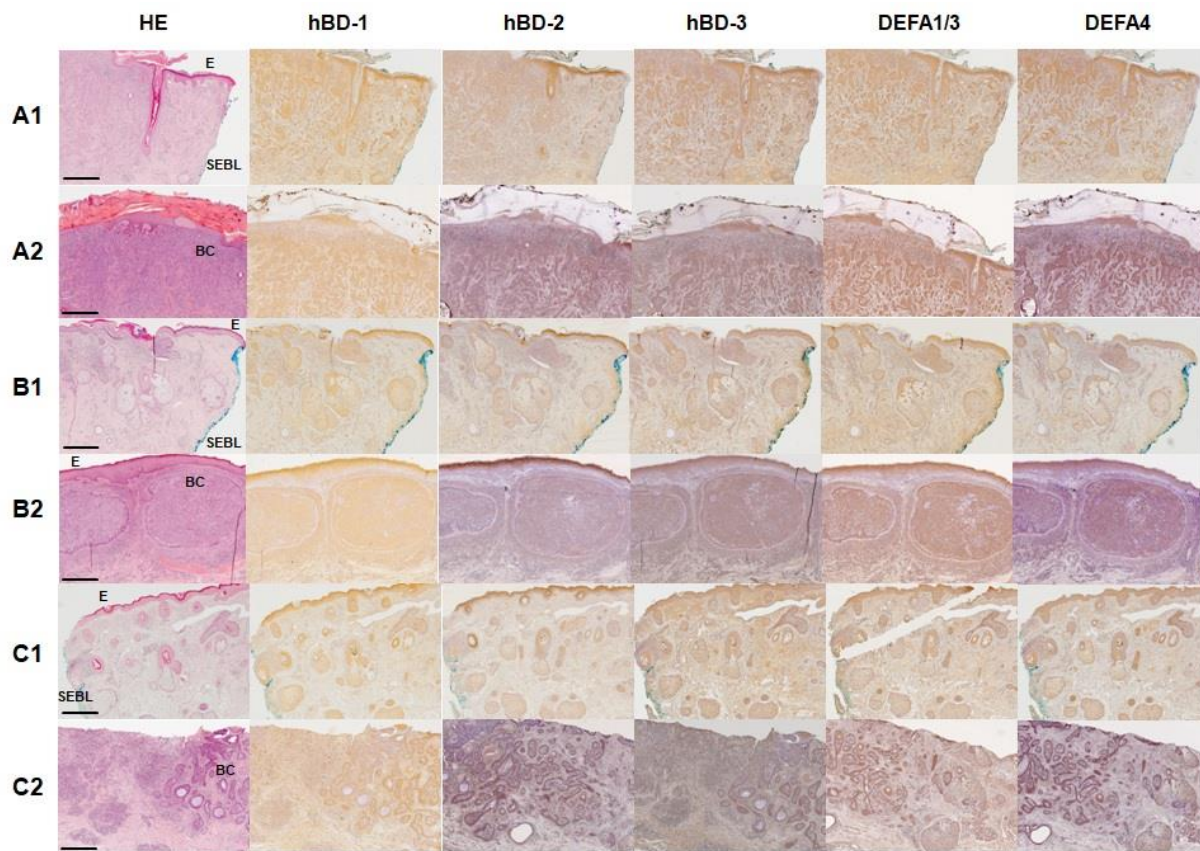
	Sklerodermiform				Solide				Superfiziell			
	Nicht-Tumorös		Tumor		Nicht-Tumorös		Tumor		Nicht-Tumorös		Tumor	
	Epithel	Stroma	Zentrum	Rand	Epithel	Stroma	Zentrum	Rand	Epithel	Stroma	Zentrum	Rand
hBD-1	98 (4)	49 (5)	99 (3)	100	100	18 (6)	98 (4)	97 (6)	100	22 (4)	11 (3)	99 (4)
hBD-2	100	71 (5)	53 (6)	100	99 (3)	31 (5)	100	100	100	31 (3)	22 (4)	97 (6)
hBD-3	100	99 (3)	97 (6)	100 n/52 (4)	100	12 (4)	97 (6)	99 (3)	100	98 (4)	23 (8) n/25 (5)	97 (3)
DEFA1/3	97 (6)	48 (6)	99 (3)	100	98 (4)	49 (7)	100	79 (5)	100	99 (3)	12 (4)	97 (6)
DEFA4	100	11 (3)	100	98 (4)	99 (3)	13 (4)	100	97 (6)	100	12 (4)	12 (4)	98 (4)
S100A4	0	68 (6)	0	0	0	53 (6)	0	0	0	51 (6) n/48 (4)	0	0
S100A7	81 (5)	0	0	0	89 (5)	0	0	0	82 (4)	0	0	0
S100A8	88 (4)	0	99 (3)	100	90 (6)	0	88 (6)	100	81 (5)	0	78 (6)	99 (3)
S100A9	100	0	51 (5)	99 (3)	98 (4)	0	99 (3)	100	97 (6)	0	0	0



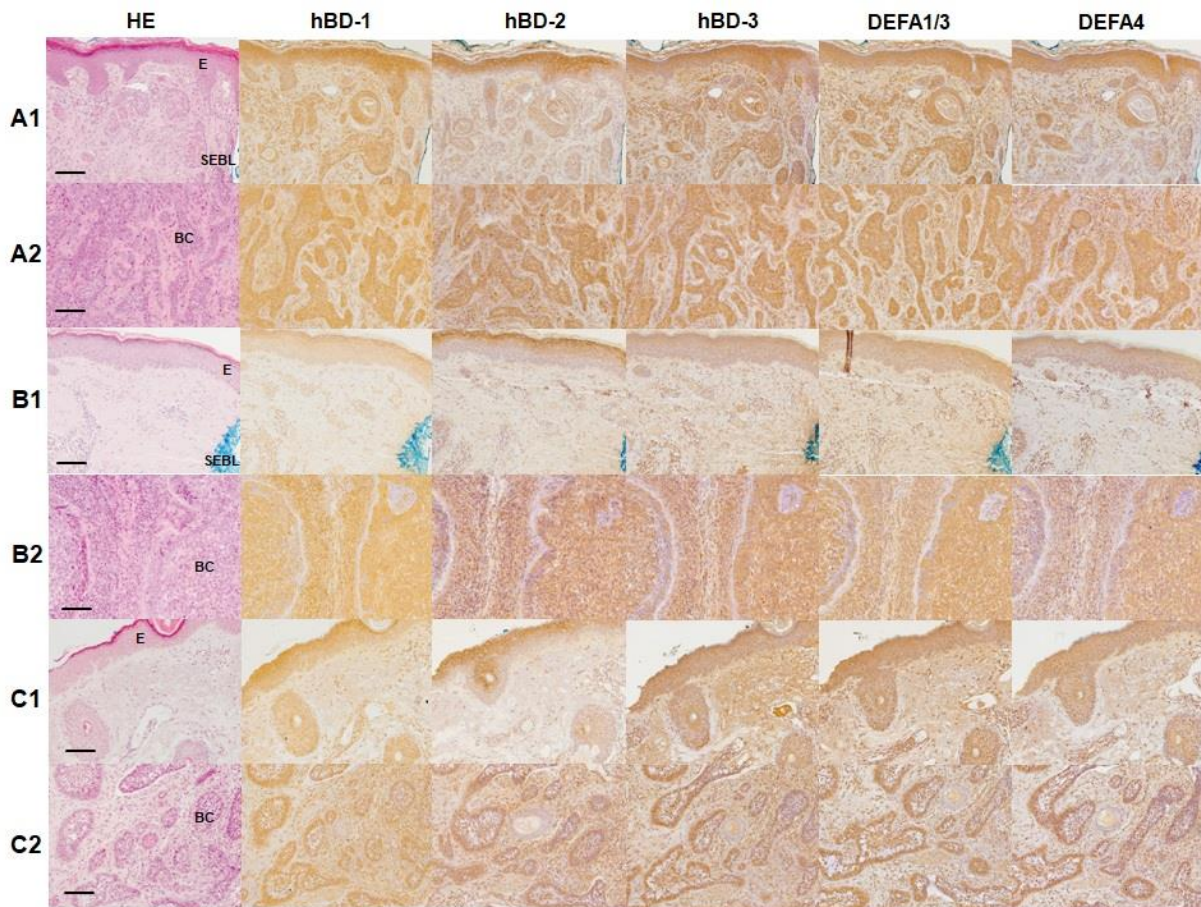
**Tab. 3:** Gewebespezifische Immunfärbungsmuster und histomorphometrische Analysen von hBD-1, hBD-2, hBD-3, DEFA1/3, DEFA4, S100A4, -A7, -A8 und -A9 in nicht-tumorösen und tumorösen Geweben des sklerodermiformen, soliden und superfiziellen Basalzellkarzinoms (je n = 10).

Die Farbintensität der zytoplasmatisch (c) positiven Zellen wurde bewertet, zusätzlich die nukleäre Färbung (n) für hBD3 und S100A4. Farbintensitäten sind als "-" (nicht nachweisbar), "+" (schwach), "++" (moderat) und "+++" (stark) dargestellt und der H-Score berechnet (modifiziert übernommen aus Dröge et al., 2023).

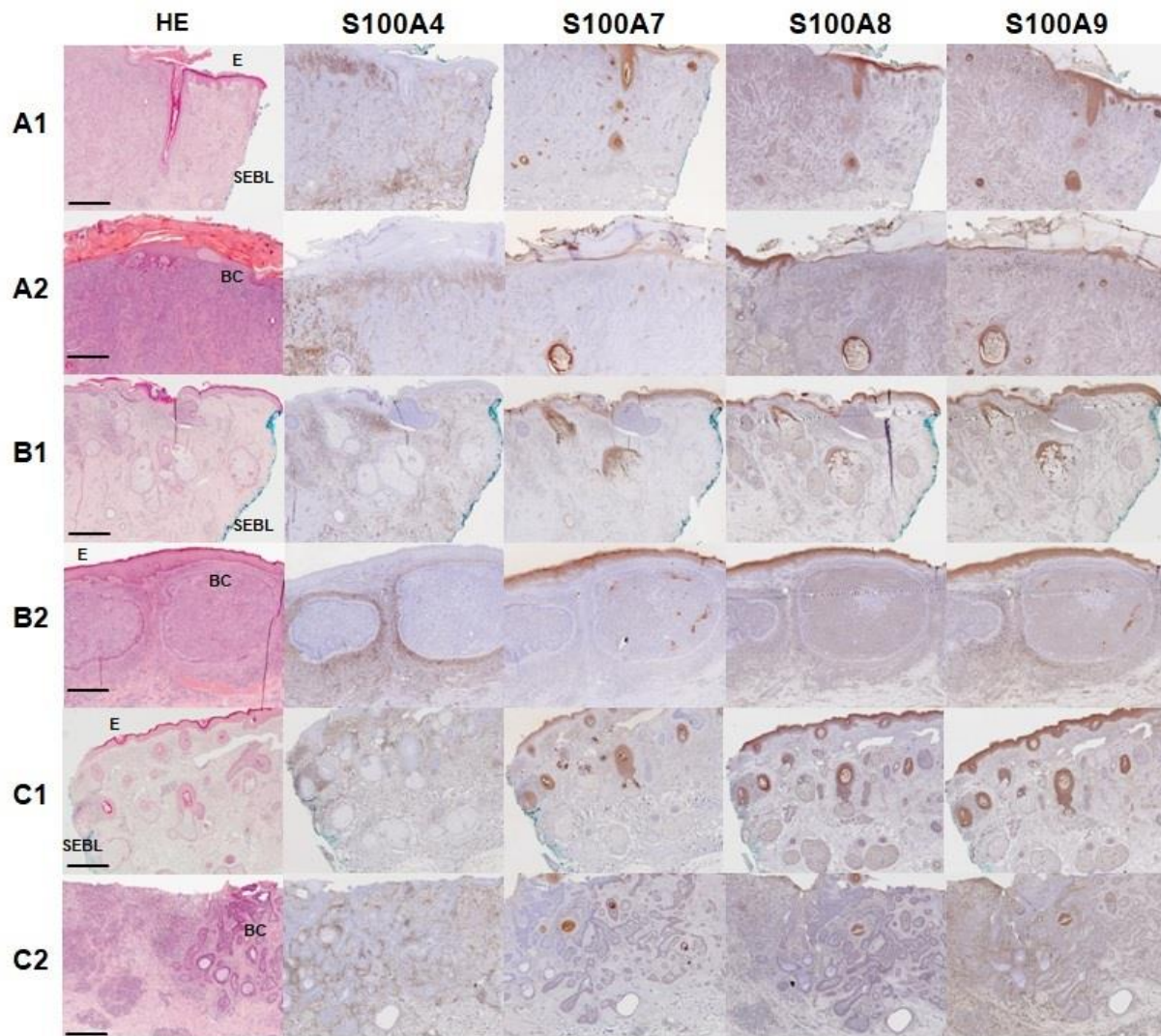
	Sklerodermiform				Solide				Superfiziell			
	Nicht-Tumorös		Tumor		Nicht-Tumorös		Tumor		Nicht-Tumorös		Tumor	
	Epithel	Stroma	Zentrum	Rand	Epithel	Stroma	Zentrum	Rand	Epithel	Stroma	Zentrum	Rand
hBD-1	++/196	++/98	++/198	++/200	++/200	++/36	++/196	++/194	++/200	++/44	+/11	++/198
hBD-2	+++/300	++/142	+/53	++/200	+++/297	+/31	++/200	++/200	+++/300	+/31	+/22	++/194
hBD-3	++/200	+/99	+/97	+/c/100 ++/n/104	++/200	+/12	++/194	++/198	++/200	++/196	++/c/46 ++/n/50	++/198
DEFA1/3	++/194	+/48	++/198	++/200	++/196	+/49	++/200	++/158	++/200	+/198	++/24	++/194
DEFA4	++/200	+/11	++/200	++/196	+/99	+/13	++/200	++/194	++/200	+/12	+/12	++/196
S100A4	-/0	+/68	-/0	-/0	-/0	+/53	-/0	-/0	-/0	+/c/51 +/n/48	-/0	-/0
S100A7	+/81	-/0	-/0	-/0	++/178	-/0	-/0	-/0	++/164	-/0	-/0	-/0
S100A8	++/176	-/0	+/99	+/100	++/180	-/0	+/88	+/100	+++/243	-/0	+/78	+/99
S100A9	+++/300	-/0	+/51	+/99	++/196	-/0	+/99	+/100	+++/291	-/0	-/0	-/0



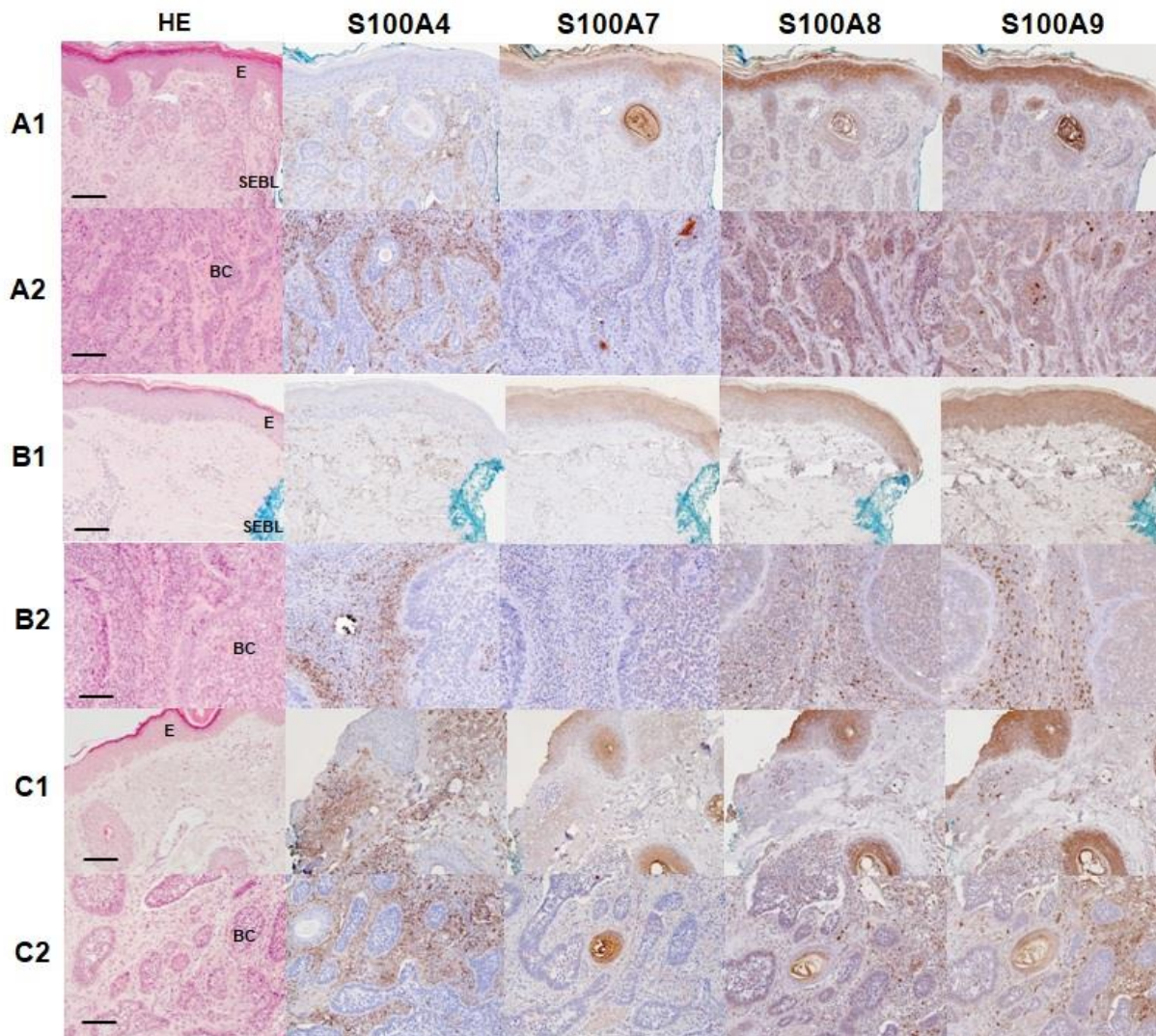
**Abb. 2:** Immunhistologischer Überblick über repräsentative Schnittserien aus nicht-tumorösen (A1) und tumorösen (A2) sklerodermiformen, nicht-tumorösen (B1) und tumorösen (B2) soliden sowie nicht-tumorösen (C1) und tumorösen (C2) superfiziellen Basalzellkarzinomen in HE, hBD-1, hBD-2, hBD-3, DEFA1/3 und DEFA4 Färbung. Der Balken repräsentiert 500  $\mu\text{m}$ , Vergrößerung 5-fach. Der Rand der chirurgischen Exzision (SEBL) ist blau gefärbt. Abkürzungen: E = Epithel; BC = Zellnester des BZK (modifiziert übernommen aus Dröge et al., 2023)



**Abb. 3:** Immunhistologische Detailaufnahmen von nicht-tumorösen (A1) und tumorösen (A2) sklerodermiformen, nicht-tumorösen (B1) und tumorösen (B2) soliden sowie nicht-tumorösen (C1) und tumorösen (C2) superfiziellen Basalzellkarzinomen in HE, hBD-1, hBD-2, hBD-3, DEFA1/3 und DEFA4 Färbung. Der Balken repräsentiert 100  $\mu$ m, Vergrößerung 20-fach. Der Rand der chirurgischen Exzision (SEBL) ist blau gefärbt. Abkürzungen: E = Epithel; BC = Zellnester des BZK (modifiziert übernommen aus Dröge et al., 2023)



**Abb. 4:** Immunhistologischer Überblick über repräsentative Schnittserien aus nicht-tumorösen (A1) und tumorösen (A2) sklerodermiformen, nicht-tumorösen (B1) und tumorösen (B2) soliden sowie nicht-tumorösen (C1) und tumorösen (C2) superfiziellen Basalzellkarzinomen in HE, S100A4, -A7, -A8 und -A9 Färbung. Der Balken repräsentiert 500  $\mu\text{m}$ , Vergrößerung 5-fach. Der Rand der chirurgischen Exzision (SEBL) ist blau gefärbt. Abkürzungen: E = Epithel; BC = Zellnester des BZK (modifiziert übernommen aus Dröge et al., 2023)



**Abb. 5:** Immunhistologische Detailaufnahmen von nicht-tumorösen (A1) und tumorösen (A2) sklerodermiformen, nicht-tumorösen (B1) und tumorösen (B2) soliden sowie nicht-tumorösen (C1) und tumorösen (C2) superfiziellen Basalzellkarzinomen in HE, S100A4, -A7, -A8 und -A9 Färbung. Der Balken repräsentiert 100  $\mu$ m, Vergrößerung 20-fach. Der Rand der chirurgischen Exzision (SEBL) ist blau gefärbt. Abkürzungen: E = Epithel; BC = Zellnester des BZK (modifiziert übernommen aus Dröge et al., 2023)

## 1.4 Diskussion

Das Basalzellkarzinom ist eine der häufigsten malignen Tumorarten in Deutschland, mit zirka 180 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Robert Koch-Institut, 2021). Obwohl der Goldstandard nach wie vor die vollständige chirurgische Exzision ist (AWMF, 2018), muss zwischen vollständiger Tumorfreiheit und der Vermeidung unnötiger Nachresektionen bei R<sub>1</sub>-Situationen im ästhetisch wichtigen Kopf-Hals-Bereich abgewogen werden, wozu es weiterer biologischer Marker bedarf.

In mehreren Studien wurde das Vorhandensein von Tumorzellen des primären BZK im Nachresektat untersucht. Zwei Studien fanden in 62,9 % (Masud et al., 2016) bzw. 50 % aller untersuchten Fälle (Mesbah Ardakani et al., 2017) noch Residualtumor. Die Zahlen sind etwas höher als unsere Ergebnisse (47 %, Abb. 1). McGrath et al. (2019) berichten von einem Prozentsatz von 18,6 % bei periokulären BZK.

Diese Variabilität zeigt, dass zusätzliche Marker gebraucht werden, um das Rezidivrisiko eines BZK besser einschätzen zu können und so eventuell unnötige Nachresektionen zu reduzieren. Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften in Immunabwehr und Karzinogenese wurden in dieser Studie AMPs und S100-Proteine im Nachresektat nach R<sub>1</sub>-Resektion immunhistologisch untersucht.

Die Expression von humanen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensinen wurde in vielen Studien im Zusammenhang mit benignen und malignen Tumoren untersucht. Dabei lässt sich noch kein einheitliches Bild erkennen: AMPs werden je nach Tumortyp unterschiedlich exprimiert und können im Vergleich zu gesundem Gewebe sowohl erhöht als auch erniedrigt vorkommen (Xu und Lu, 2020).

Wir konnten in unserer Studie die humanen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine sowie die S100-Proteine S100A7, -A8 und -A9 im nicht-tumorösen Kontrollepithel nachweisen.

Die  $\alpha$ -Defensine DEFA1/3 und DEFA4 wurden in Speicheldrüsentumoren nachgewiesen, entweder in erhöhter oder erniedrigter Konzentration (Winter et al., 2012). Lundy et al. (2004) zeigten, dass DEFA1/3-Konzentrationen in oralen Plattenepithelkarzinomen erhöht sind, dies aber auf die Infiltration neutrophiler Granulozyten ins Tumorgewebe zurückzuführen ist. DEFA1/3 sind erhöht im Serum von Patienten mit Kolonkarzinom (Kemik et al., 2013), DEFA4 in oralen Leukoplakien (Wenghoefer et al., 2010). In unserer Studie

gab es keine Unterschiede in der Expression von DEFA1/3 und -4 in sklerodermiformen und soliden BZK im Vergleich zum nicht-tumorösen Epithel, in superfiziellen jedoch zeigte sich eine drastische Verringerung (10 % positive Zellen) im Zentrum der Tumorzellnester. Aktuell ist diese Arbeit die erste publizierte Studie zur Quantifikation von  $\alpha$ -Defensinen in BZK.

In einer älteren Studie untersuchten Gambichler et al. (2006) die Genexpression der  $\beta$ -Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in soliden und superfiziellen BZK. HBD-1 war dabei signifikant erniedrigt und hBD-2 erhöht im Vergleich zu gesundem Gewebe, bei hBD-3 ließ sich kein Unterschied feststellen. HBD-1 war außerdem erniedrigt in Plattenepithelkarzinomen der Haut (Scola et al., 2012) und der Mundschleimhaut (Wenghoefer et al., 2010), für Maligne Melanome gibt es gegensätzliche Ergebnisse (Kiatsurayanon et al., 2022). In unserer Studie waren im Zentrum der superfiziellen BZK nur 10 % der Zellen schwach positiv für hBD-1 und somit deutlich niedriger als im gesunden Epithel, die anderen beiden BZK-Typen exprimierten hBD-1 in gleicher Zellanzahl und Färbungsintensität wie ihre gesunden Vergleichsproben. Dies deckt sich nicht mit der Beobachtung von Scola et al. (2012), der bei Plattenepithelkarzinomen der Haut postuliert, dass die hBD-1-Konzentration proportional zur Malignität des Tumors sinkt, da das superfizielle BZK eine weniger aggressive Entität darstellt.

Studien zeigten einen erhöhten hBD-2-Spiegel im Serum von BZK-Patienten, ebenso höhere Genexpression in den Tumorzellen selbst (Fijałkowska et al., 2021; Gambichler et al., 2006). *In-Situ*-Karzinome und Plattenepithelkarzinome der Haut zeigten ebenfalls eine höhere Proteinexpression (Scola et al., 2012), bei oralen Plattenepithelkarzinomzellen jedoch war das Niveau der hBD-2-mRNA erniedrigt (Kamino et al., 2014). Solide BZK-Proben hatten in unserer Studie im tumorösen Anteil und sklerodermiforme Proben im Stroma die höchste hBD-2-Positivrate und Intensität im Vergleich der Tumortypen. Da das solide BZK zu den niedrig malignen Subtypen gehört, könnte hBD-2 hier tumorsupprimierend wirken. Die stärkere hBD-2-Immunreaktion im Stroma des sklerodermiformen BZK könnte ebenfalls in diese Richtung weisen.

Drei Studien fanden für die hBD-3-Expression in Plattenepithelkarzinomen der Haut, BZK und Malignen Melanomen keine Veränderung im Vergleich zu gesunder Haut (Gambichler et al., 2006; Manarang et al., 2017; Scola et al., 2012). Orale Plattenepithelkarzinome

exprimierten jedoch vermehrt hBD-3-Peptide und -mRNA (Kesting et al., 2009a). In unserer Studie konnten wir nukleäre hBD-3-Färbung der Tumorzellen in superfiziellen und sklerodermiformen BZK nachweisen. Nukleäre Lokalisation von  $\beta$ -Defensinen wurde für hBD-1 in normaler Haut und Speicheldrüsentumoren gezeigt, eine Beobachtung, welche die Autoren verschiedener Studien mit einem maligneren Verlauf assoziieren (Bick et al., 2007; Pantelis et al., 2009; Wenghoefer et al., 2008a).

S100A4 (Metastasin) fördert in vielen verschiedenen Krebsarten Metastasierung und Invasion, unter anderem im Mammakarzinom, im Bronchialkarzinom und im Malignen Melanom (Allgöwer et al., 2020; Bresnick et al., 2015). Dies gilt auch für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals Bereich, deren Tumorstammzellen S100A4 enthalten - wobei eine erhöhte Expression mit erhöhter Malignität korreliert (Lo et al., 2011). Zhu et al. (2013) fanden jedoch kein Metastasin in epidermalen Tumoren, was sich auch in unserer Studie bestätigt, da in keiner der drei BZK-Typen S100A4 nachgewiesen werden konnte. Auch in nicht-tumorösem Epithel wurde kein Metastasin exprimiert (Dröge et al., 2023; Shrestha et al., 1998). Da das BZK extrem selten metastasiert, scheint diese Beobachtung logisch. Interessant wäre eine Studie zur Expression von S100A4 in metastasierenden BZKs, angelehnt an Mochel et al. (2021), die CD44, jedoch kein S100A4 untersucht haben. Metastasin ist unter anderem an der epithelial-mesenchymalen Transition beteiligt, welche eventuell auch bei metastasierenden BZK eine Rolle spielen könnte (Mochel et al., 2021). Wir fanden S100A4 im nicht-tumorösen Stroma aller drei BZK-Typen, beim superfiziellen zusätzlich bei 50 % der Zellen im Kern. Nukleäre Expression von S100A4 führt bei Ovarialkarzinomen zu einer schlechteren Überlebensrate als zytoplasmatische Expression (Kikuchi et al., 2006). Das Stroma des aggressiveren sklerodermiformen BZK zeigte die höchste Positivrate, was mit der Tumor-Mikroumgebung zusammenhängen und bei der Entscheidung über eine Nachresektion behilflich sein könnte (Donato et al., 2013).

Für S100A7 (Psoriasin) konnten antimikrobielle Eigenschaften gegen *Escherichia coli* nachgewiesen werden (Gläser et al., 2005). Auch dieses Protein zeigt in der Tumorgenese unterschiedliche Muster: Psoriasin-exprimierende Mammakarzinome haben eine schlechte Prognose (Bresnick et al., 2015). Orale Plattenepithelkarzinome *in situ* hatten einen erhöhten Level an S100A7, in invasiven und fortgeschrittenen Stadien wurde jedoch



sehr wenig Psoriasin exprimiert. Deshalb könnte dieses Protein eine maligne Transformation dieser Tumoren inhibieren (Kesting et al., 2009b; Winter et al., 2011a; Zhou et al., 2008). Die mRNA-Expression von S100A7 war in BZK signifikant erhöht, immunhistologisch jedoch nur in der Epidermis und nicht in den Zellnestern (Alowami et al., 2003; Moubayed et al., 2007). Dies deckt sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Studie.

Das Heterodimer Calprotectin (S100A8/A9) fördert Entzündungsreaktionen und beeinflusst dadurch die Tumor-Mikroumgebung (Chen et al., 2014): S100A8 (Calgranulin A) zeigte eine hohe Expression in dysplastischem oralem Plattenepithel und *In-situ*-Karzinomen, jedoch nicht in invasiv-wachsenden Plattenepithelkarzinomen (Driemel et al., 2010; Reckenbeil et al., 2016). So haben Patienten mit einer hohen Konzentration von S100A8 hier eine günstigere Prognose (Funk et al., 2015). Basalzellen von normaler oraler Mukosa zeigten keine S100A8- und S100A8/A9-Expression (Argyris et al., 2019; Driemel et al., 2010). Martinsson et al. (2005) konnten keine Proteinexpression von S100A9 (Calgranulin B) in Basaliomen nachweisen, was sich auch mit unseren Beobachtungen für superfizielle BZKs deckt. In soliden und sklerodermiformen BZKs jedoch färbten die Tumorzellen mit Antikörpern gegen S100A9 an, wenn auch nur in geringer Intensität. In unserer Studie waren S100A8 und S100A9 in allen nicht-tumorösen Epithelien vorhanden, in den Stromata nicht.

Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit die uneinheitliche Proteinexpression von humanen Defensinen und S100-Proteinen in Tumoren auch für die häufigen Basalzellkarzinome: Im Zytoplasma aller drei histologischen Tumortypen fanden sich humane Defensine, wohingegen S100A4 und S100A7 im Tumorgewebe nicht nachweisbar waren. Wir fanden jedoch nukleäre S100A4-Lokalisierung im tumornahen Stroma von superfiziellen BZKs, sodass dieses Protein als potentieller Marker für eine erfolgreiche chirurgische Therapie genutzt werden könnte. Nukleäre hBD-3-Expression in Tumorzellen von superfiziellen und sklerodermiformen BZK könnte eine noch unbekannte spezifische Funktion für diese beiden Subtypen haben. Solide BZKs weisen keine nukleäre Proteinexpression auf. Die Färbungsmuster von S100A8 und S100A9 ähneln sich bei soliden und sklerodermiformen BZK, unterscheiden sich aber bei superfiziellen.

Die beiden Marker hBD-3 und S100A4 erscheinen vielversprechend, um die Entscheidung für oder gegen eine Nachresektion primär R<sub>1</sub>-resezierter Basalzellkarzinome differenziert zu beurteilen und so unnötige Operationen im ästhetisch wichtigen Kopf-Hals-Bereich zu vermeiden.

Um diesen vielversprechenden Ansatz weiter zu verfolgen sind in jedem Fall weitere Studien nötig, die einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Rezidiven und der hBD-3/S100A4-Proteinexpression weiter analysieren.

## 1.5 Zusammenfassung

Exzidate aus Nachresektionen R<sub>1</sub>-resezierter Basalzellkarzinome beinhalten in vielen Fällen keine vitalen Tumorzellen mehr. In dieser Studie untersuchten wir das Vorkommen humaner Defensine und S100-Proteine in soliden, superfiziellen und sklerodermiformen Basalzellkarzinomen auf der Suche nach geeigneten Biomarkern, um unnötige Re-Operationen im ästhetisch wichtigen Kopf-Hals-Bereich zu vermeiden.

Hierzu wurden Nachresektate von 30 R<sub>1</sub>-resezierten Basalzellkarzinomen (solide n=10, superfizielle n=10 und sklerodermiforme n=10) histologisch nachuntersucht und immunhistochemisch mit humanen Defensinen (DEFA1/3, -4, hBD-1, -2, -3) und S100-Proteinen (S100A4, -A7, -A8 und -A9) gefärbt. Die Ergebnisse wurden mit tumorfreiem Gewebe derselben Person verglichen.

Humane Defensine kamen in Tumorzellen aller drei histologischen Subtypen vor, wohingegen S100A4 und S100A7 nicht nachweisbar waren. Nukleäre Färbung trat nur in Tumorzellen superfizieller und sklerodermiformer Basalzellkarzinome (hBD-3) und in tumor-nahem Stroma superfizieller Basalzellkarzinome (S100A4) auf.

HBD-3 und S100A4 sind aufgrund ihrer abweichenden Proteinexpression potentielle Biomarker im Nachresektions-Management R<sub>1</sub>-resezierter Basalzellkarzinome.

## 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Allgöwer C, Kretz A-L, Karstedt S von, Wittau M, Henne-Bruns D, Lemke J. Friend or Foe: S100 Proteins in Cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 2037

Alowami S, Qing G, Emberley E, Snell L, Watson PH. Psoriasin (S100A7) expression is altered during skin tumorigenesis. *BMC Dermatol* 2003; 3: 1

Argyris PP, Slama Z, Malz C, Koutlas IG, Pakzad B, Patel K, Kademani D, Khammanivong A, Herzberg MC. Intracellular calprotectin (S100A8/A9) controls epithelial differentiation and caspase-mediated cleavage of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2019; 95: 1–10

AWMF 2018: S2k-Leitlinie Basalzellkarzinom der Haut. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-021l\\_S2k\\_Basalzellkarzinom-der-Haut\\_2018-09\\_01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-021l_S2k_Basalzellkarzinom-der-Haut_2018-09_01.pdf) (Zugriffsdatum: 11.04.2023)

Bick RJ, Poindexter BJ, Buja LM, Lawyer CH, Milner SM, Bhat S. Nuclear localization of HBD-1 in human keratinocytes. *J Burns Wounds* 2007; 7: 25-32

Bonamy C, Sechet E, Amiot A, Alam A, Mourez M, Fraisse L, Sansonetti PJ, Sperandio B. Expression of the human antimicrobial peptide  $\beta$ -defensin-1 is repressed by the EGFR-ERK-MYC axis in colonic epithelial cells. *Sci Rep* 2018; 8: 18043

Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 96–109

Chen H, Xu C, Jin Q, Liu Z. S100 protein family in human cancer. *Am J Cancer Res* 2014; 4: 89–115

Codazzi D, van der Velden J, Carminati M, Bruschi S, Bocchiotti MA, Di Serio C, Barberis M, Robotti E. Positive compared with negative margins in a single-centre retrospective study on 3957 consecutive excisions of basal cell carcinomas. Associated risk factors and preferred surgical management. *J Plast Surg Hand Surg* 2014; 48: 38–43

Conforti C, Pizzichetta MA, Vichi S, Toffolutti F, Serraino D, Di Meo N, Giuffrida R, Deinlein T, Giacomel J, Rosendahl C, Gourhant JY, Zalaudek I. Sclerodermiform basal cell carcinomas vs. other histotypes: analysis of specific demographic, clinical and dermatoscopic features. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2021; 35: 79–87

- Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol* 2006; 19 Suppl 2: 127-147
- Donald CD, Sun CQ, Lim SD, Macoska J, Cohen C, Amin MB, Young AN, Ganz TA, Marshall FF, Petros JA. Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* 2003; 83: 501–505
- Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 2013; 13: 24–57
- Driemel O, Escher N, Ernst G, Melle C, Eggeling F von. S100A8 cellular distribution in normal epithelium, hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma and its concentration in serum. *Anal Quant Cytol Histol* 2010; 32: 219–224
- Dröge E, Probstmeier R, Wenghoefer M, Winter J. Occurrence of Human Defensins and S100 Proteins in Head and Neck Basal Cell Carcinoma (BCC) Entities: hBD3 and S100A4 as Potential Biomarkers to Evaluate Successful Surgical Therapy. *OHBM* 2023; 4: 1
- Fathy H, Amin MM, El-Gilany A-H. Upregulation of human  $\beta$ -defensin-3 and cathelicidin LL-37 in Kaposi's sarcoma. *F1000Res* 2012; 1: 38
- Fijałkowska M, Kowalski M, Koziej M, Antoszewski B. Elevated serum levels of cathelicidin and  $\beta$ -defensin 2 are associated with basal cell carcinoma. *Cent Eur J Immunol* 2021; 46: 360–364
- Funk S, Mark R, Bayo P, Flechtenmacher C, Grabe N, Angel P, Plinkert PK, Hess J. High S100A8 and S100A12 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2015; 136: 2037–2046
- Gambichler T, Skrygan M, Huyn J, Bechara FG, Sand M, Altmeyer P, Kreuter A. Pattern of mRNA expression of beta-defensins in basal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2006; 6: 163
- Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder J-M. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 2005; 6: 57–64
- Goldberg LH. Basal cell carcinoma. *Lancet* 1996; 347: 663–667

Gurunluoglu R, Kubek E, Arton J, Olsen A, Bronsert M. Nonpersistence of basal cell carcinoma after diagnostic shave biopsy: reconstruction when specimen is negative during surgery. *Ann Plast Surg* 2015; 74: 695–698

Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2309–2317

Johnson TM, Tschen J, Ho C, Lowe L, Nelson BR. Unusual basal cell carcinomas. *Cutis* 1994; 54: 85–92

Joly S, Compton LM, Pujol C, Kurago ZB, Guthmiller JM. Loss of human beta-defensin 1, 2, and 3 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 353–360

Julian CG, Bowers PW. A prospective study of Mohs' micrographic surgery in two English centres. *Br J Dermatol* 1997; 136: 515–518

Kamino Y, Kurashige Y, Uehara O, Sato J, Nishimura M, Yoshida K, Arakawa T, Nagayasu H, Saitoh M, Abiko Y. HBD-2 is downregulated in oral carcinoma cells by DNA hypermethylation, and increased expression of hBD-2 by DNA demethylation and gene transfection inhibits cell proliferation and invasion. *Oncol Rep* 2014; 32: 462–468

Kauvar ANB, Cronin T, JR, Roenigk R, Hruza G, Bennett R. Consensus for nonmelanoma skin cancer treatment: basal cell carcinoma, including a cost analysis of treatment methods. *Dermatol Surg* 2015; 41: 550–571

Kemik O, Kemik AS, Sumer A, Begenik H, Purisa S, Tuzun S. Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3): elevated serum levels in colorectal cancer and novel marker of lymphatic and hepatic metastasis. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32: 167–171

Kesting MR, Loeffelbein DJ, Hasler RJ, Wolff K-D, Rittig A, Schulte M, Hirsch T, Wagenpfeil S, Jacobsen F, Steinstraesser L. Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2009a; 27: 575–581

Kesting MR, Sudhoff H, Hasler RJ, Nieberler M, Pautke C, Wolff K-D, Wagenpfeil S, Al-Benna S, Jacobsen F, Steinstraesser L. Psoriasin (S100A7) up-regulation in oral

squamous cell carcinoma and its relation to clinicopathologic features. *Oral Oncol* 2009b; 45: 731–736

Kiatsurayanon C, Peng G, Niyonsaba F. Opposing Roles of Antimicrobial Peptides in Skin Cancers. *Curr Pharm Des* 2022; 28: 248–258

Kikuchi N, Horiuchi A, Osada R, Imai T, Wang C, Chen X, Konishi I. Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci* 2006; 97: 1061–1069

Kricker A, Weber M, Sitas F, Banks E, Rahman B, Goumas C, Kabir A, Hodgkinson VS, van Kemenade CH, Waterboer T, Armstrong BK. Early Life UV and Risk of Basal and Squamous Cell Carcinoma in New South Wales, Australia. *Photochem Photobiol* 2017; 93: 1483–1491

Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 727–738

Li X, Song W, Zhang M, Zhao P. Human  $\beta$ -defensin 1 Functions as a Tumor Suppressor via ER Stress-triggered JNK pathway in Hepatocellular Carcinoma. *J BUON* 2021; 26: 1365–1372

Lo J-F, Yu C-C, Chiou S-H, Huang C-Y, Jan C-I, Lin S-C, Liu C-J, Hu W-Y, Yu Y-H. The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. *Cancer Res* 2011; 71: 1912–1923

Lundy FT, Orr DF, Gallagher JR, Maxwell P, Shaw C, Napier SS, Gerald Cowan C, Lamey PJ, Marley JJ. Identification and overexpression of human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in squamous cell carcinomas of the human tongue. *Oral Oncol* 2004; 40: 139–144

Manarang JC, Otteson DC, McDermott AM. Expression of Antimicrobial Peptides by Uveal and Cutaneous Melanoma Cells and Investigation of Their Role in Tumor Cell Migration and Vasculogenic Mimicry. *Curr Eye Res* 2017; 42: 1474–1481

Mars WM, Patmasiriwat P, Maity T, Huff V, Weil MM, Saunders GF. Inheritance of unequal numbers of the genes encoding the human neutrophil defensins HP-1 and HP-3. *J Biol Chem* 1995; 270: 30371–30376

- Martinsson H, Yhr M, Enerbäck C. Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Exp Dermatol* 2005; 14: 161–168
- Masud D, Moustaki M, Staruch R, Dheansa B. Basal cell carcinomata: Risk factors for incomplete excision and results of re-excision. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016; 69: 652–656
- Mburu YK, Abe K, Ferris LK, Sarkar SN, Ferris RL. Human  $\beta$ -defensin 3 promotes NF- $\kappa$ B-mediated CCR7 expression and anti-apoptotic signals in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 2011; 32: 168–174
- McGrath LA, Meeney A, Currie ZI, Mudhar HS, Tan JH. Staged excision of primary periocular basal cell carcinoma: absence of residual tumour in re-excised specimens: a 10-year series. *Br J Ophthalmol* 2019; 103: 976–979
- Mesbah Ardakani N, Harvey NT, Mansford V, Wood BA. Pathological Sampling of Basal Cell Carcinoma Re-excision Specimens: How Much is Enough? *Am J Dermatopathol* 2017; 39: 824–828
- Mochel MC, Liaquat S, Moore JB, Hoang MP. Metastasizing basal cell carcinoma: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 22 cases. *J Cutan Pathol* 2021; 48: 374–383
- Moubayed N, Weichenthal M, Harder J, Wandel E, Sticherling M, Gläser R. Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 253–261
- Pantelis A, Wenghoefer M, Haas S, Merkelbach-Bruse S, Pantelis D, Jepsen S, Bootz F, Winter J. Down regulation and nuclear localization of human beta-defensin-1 in pleomorphic adenomas of salivary glands. *Oral Oncol* 2009; 45: 526–530
- Reckenbeil J, Kraus D, Probstmeier R, Allam J-P, Novak N, Frentzen M, Martini M, Wenghoefer M, Winter J. Cellular Distribution and Gene Expression Pattern of Metastasin (S100A4), Calgranulin A (S100A8), and Calgranulin B (S100A9) in Oral Lesions as Markers for Molecular Pathology. *Cancer Invest* 2016; 34: 246–254
- Robert Koch-Institut 2021: Krebs in Deutschland für 2017/2018. <https://edoc.rki.de/handle/176904/9042> (Zugriffsdatum: 11.04.2023)



Rowe DE, Carroll RJ, Day CL, JR. Mohs surgery is the treatment of choice for recurrent (previously treated) basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1989; 15: 424–431

Scola N, Gambichler T, Saklaoui H, Bechara FG, Georgas D, Stücker M, Gläser R, Kreuter A. The expression of antimicrobial peptides is significantly altered in cutaneous squamous cell carcinoma and precursor lesions. *Br J Dermatol* 2012; 167: 591–597

Scotto J, Fears TR, Fraumeni JF. Incidence of non-melanoma skin cancer in the United States. U.S. Dept. of Health and Human Services NIOH 1983: 83–2433

Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol* 2002; 147: 41–47

Semlali A, Al Amri A, Azzi A, Al Shahrani O, Arafah M, Kohailan M, Aljebreen AM, Alharbi O, Almadi MA, Azzam NA, Parine NR, Rouabhia M, Alanazi MS. Expression and new exon mutations of the human Beta defensins and their association on colon cancer development. *PLoS One* 2015; 10: e0126868

Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 1118–1126

Shrestha P, Muramatsu Y, Kudeken W, Mori M, Takai Y, Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW. Localization of Ca(2+)-binding S100 proteins in epithelial tumours of the skin. *Virchows Arch* 1998; 432: 53–59

Shuyi Y, Feng W, Jing T, Hongzhang H, Haiyan W, Pingping M, Liwu Z, Zwahlen RA, Hongyu Y. Human beta-defensin-3 (hBD-3) upregulated by LPS via epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways to enhance lymphatic invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112: 616–625

Smeets NWJ, Kuijpers DIM, Nelemans P, Ostertag JU, Verhaegh, M E J M, Krekels GAM, Neumann HAM. Mohs' micrographic surgery for treatment of basal cell carcinoma of the face--results of a retrospective study and review of the literature. *Br J Dermatol* 2004; 151: 141–147

Stewart CMM, Garlick J, McMullin J, Siddiqi F, Crombie C, Rockwell WB, Gociman B. Surgical Excision of Non-Melanoma Skin Cancer in an Elderly Veteran's Affairs Population. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2014; 2: e277

Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho S, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 8542–8549

Swetter SM, Boldrick JC, Pierre P, Wong P, Egbert BM. Effects of biopsy-induced wound healing on residual basal cell and squamous cell carcinomas: rate of tumor regression in excisional specimens. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 139–146

Tan ES, Ee M, Shen L, Chua H, Chan Y-H, Tan S-H. Basal cell carcinoma in Singapore: a prospective study on epidemiology and clinicopathological characteristics with a secondary comparative analysis between Singaporean Chinese and Caucasian patients. *Australas J Dermatol* 2015; 56: 175–179

Venables ZC, Nijsten T, Wong KF, Autier P, Broggio J, Deas A, Harwood CA, Hollestein LM, Langan SM, Morgan E, Proby CM, Rashbass J, Leigh IM. Epidemiology of basal and cutaneous squamous cell carcinoma in the U.K. 2013-15: a cohort study. *Br J Dermatol* 2019; 181: 474–482

Walker P, Hill D. Surgical treatment of basal cell carcinomas using standard postoperative histological assessment. *Australas J Dermatol* 2006; 47: 1–12

Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Götz W, Reich R, Bergé S, Martini M, Allam JP, Jepsen S, Merkelbach-Bruse S, Fischer HP, Novak N, Winter J. Nuclear hBD-1 accumulation in malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer* 2008a; 8: 290

Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Reich R, Martini M, Allam J-P, Novak N, Bergé S, Jepsen S, Winter J. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008b; 37: 660–663

Wenghoefer M, Pantelis A, Najafi T, Deschner J, Allam JP, Novak N, Reich R, Martini M, Bergé S, Fischer HP, Jepsen S, Winter J. Gene expression of oncogenes, antimicrobial

peptides, and cytokines in the development of oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 110: 351–356

Wennberg AM, Larkö O, Stenquist B. Five-year results of Mohs' micrographic surgery for aggressive facial basal cell carcinoma in Sweden. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 370–372

Winter J, Pantelis A, Allam J-P, Novak N, Reich R, Martini M, Bergé S, Deschner J, Jepsen S, Wenghoefer M. High  $\alpha$ -defensin and S100A7 expression and missing DOC-1 down-regulation characterize irritation fibromas of the oral cavity and may counteract malignant transformation. *J Craniofac Surg* 2011a; 22: 100–104

Winter J, Pantelis A, Kraus D, Reckenbeil J, Reich R, Jepsen S, Fischer H-P, Allam J-P, Novak N, Wenghoefer M. Human  $\alpha$ -defensin (DEFA) gene expression helps to characterise benign and malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer* 2012; 12: 465

Winter J, Pantelis A, Reich R, Martini M, Kraus D, Jepsen S, Allam J-P, Novak N, Wenghoefer M. Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *Cancer Invest* 2011b; 29: 196–201

Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Front Immunol* 2017; 8: 1908

Xu D, Lu W. Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Front Immunol* 2020; 11: 764

Xu D, Zhang B, Liao C, Zhang W, Wang W, Chang Y, Shao Y. Human beta-defensin 3 contributes to the carcinogenesis of cervical cancer via activation of NF- $\kappa$ B signaling. *Oncotarget* 2016; 7: 75902–75913

Zhou G, Xie T-X, Zhao M, Jasser SA, Younes MN, Sano D, Lin J, Kupferman ME, Santillan AA, Patel V, Gutkind JS, Ei-Naggar AK, Emberley ED, Watson PH, Matsuzawa S-I, Reed JC, Myers JN. Reciprocal negative regulation between S100A7/psoriasin and beta-catenin signaling plays an important role in tumor progression of squamous cell carcinoma of oral cavity. *Oncogene* 2008; 27: 3527–3538

Zhu L, Kohda F, Nakahara T, Chiba T, Tsuji G, Hachisuka J, Ito T, Tu Y, Moroi Y, Uchi H, Furue M. Aberrant expression of S100A6 and matrix metalloproteinase 9, but not S100A2,

S100A4, and S100A7, is associated with epidermal carcinogenesis. *J Dermatol Sci* 2013; 72: 311–319

## **2. Veröffentlichung**



Article

# Occurrence of Human Defensins and S100 Proteins in Head and Neck Basal Cell Carcinoma (BCC) Entities: hBD3 and S100A4 as Potential Biomarkers to Evaluate Successful Surgical Therapy

Eva Dröge <sup>1</sup>, Rainer Probstmeier <sup>2</sup>, Matthias Wenghoefer <sup>1,†</sup> and Jochen Winter <sup>3,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Practice for Oral & Maxillofacial Plastic & Aesthetic Surgery, Neversstr. 7, 56068 Koblenz, Germany

<sup>2</sup> Neuro- and Tumor Cell Biology Group, Department of Nuclear Medicine, University Hospital, Faculty of Medicine, University of Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

<sup>3</sup> Oral Cell and Tumor Biology Group, Department of Periodontology, Operative and Preventive Dentistry, University Hospital, Faculty of Medicine, University of Bonn, Welschonnenstr. 17, 53111 Bonn, Germany

\* Correspondence: jochen.winter@ukbonn.de; Tel.: +49-228-287-22011

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Background: The goal of this study is the identification of potential marker molecules for characterizing different basal cell carcinoma entities, to help improve clinical decisions for surgical resection therapy. Methods: Three different entities, sclerodermiform, solid and superficial basal cell carcinomas, were subjected to immunohistochemical microscopy and histomorphometric analyses for human  $\alpha$ - (DEFA1/3; DEFA4) and  $\beta$ -defensins (hBD1/2/3) and special S100 proteins (S100A4/7/8/9). Thirty specimens of the three entities were evaluated. Analyses were performed by comparing tissue and cellular localization and staining intensities of tumorous with non-tumorous areas. Staining intensities were semiquantitatively examined by using an RGB-based model. Results: Human defensins are present in all three entities of basal cell carcinomas. They all show cytoplasmic immunostaining in cells of the epithelium, stroma and tumor. Notably, human  $\beta$ -defensin3 is accumulated in the cell nuclei of sclerodermiform and superficial basal cell carcinomas. S100A4 and A7 are undetectable in tumor regions. However, S100A4 occurs in cancer-associated stroma cells with nuclear staining in superficial basal cell carcinomas. Conclusion: Two candidates, namely hBD3 and S100A4, might be used as potential clinical tools for evaluating successful surgical resection therapy to avoid aesthetic and functional facial deformation.

**Keywords:** basal cell carcinoma; molecular pathology; human defensins; S100 proteins; biomarker; surgical resection treatment



**Citation:** Dröge, E.; Probstmeier, R.; Wenghoefer, M.; Winter, J. Occurrence of Human Defensins and S100 Proteins in Head and Neck Basal Cell Carcinoma (BCC) Entities: hBD3 and S100A4 as Potential Biomarkers to Evaluate Successful Surgical Therapy. *J. Otorhinolaryngol. Hear. Balance Med.* **2023**, *4*, 1. <https://doi.org/10.3390/ohbm4010001>

Academic Editor: Norihiko Narita

Received: 28 January 2023

Revised: 17 February 2023

Accepted: 20 February 2023

Published: 22 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Basal cell carcinomas (BCCs) are well-recognized as the most common malignancy in humans, although cancer registries do not frequently collect data on this skin cancer [1,2]. Nevertheless, the American Cancer Society reported in a survey in 2010 a total of two million people treated with non-melanoma skin cancer (NMSC) in 2006, with an estimated risk of 3.5 million for NMSCs in this period [3,4]. The estimated lifetime risk to develop skin cancer in the United States is 20%. Most of this risk is associated with NMSCs [5].

BCCs are divided by their clinical features into several subtypes: nodular, superficial and morpheaform. The most frequent clinical subtype, nodular BCC (up to 80% of all BCCs), is found in 90% of the patients in the head and neck region, predominantly on the cheeks, forehead, nasolabial fold or around the eyes [1,6,7]. BCCs are slow-growing lesions of epidermal basaloid cells. Although this tumor entity only very rarely metastasizes, nevertheless BCCs can cause severe tissue destructions because of local invasion [8]. The main risk factor is exposure to ultraviolet radiation, which explains why BCCs mainly occur in sun-exposed areas [9]. The molecular explanation for this clinical observation is a genetic alteration/mutation in the so-called “UV signature” in the genome [10].

Based upon histopathological features, nodular and superficial BCCs are associated with an indolent growth type, whereas morpheaform, infiltrative, micronodular and basosquamous BCCs are correlated with an aggressive growth type, causing extensive local tissue destruction and recurrence [11,12].

Although a number of treatment options do exist—such as topical imiquimod application [13], photodynamic therapy [14], cryotherapy [15] or radiation [16]—the gold standard is the complete removal of the tumor by Mohs micrographically controlled surgery (MMCS) [1,17].

Bearing in mind that most of the BCCs occur in the head and neck region, it appears to be of tremendous importance that the resections are performed under the avoidance of unnecessary sacrifice of healthy tissue, on one hand, but also under the avoidance of re-resections after incomplete primary resections, on the other hand [18].

This dilemma of the plastic surgeon leads to the question of whether any additional markers do exist. Such tools could help to reduce the safety distance in resection margins and to avoid repeated re-resections [6,7,18].

A number of recent studies suggest that antimicrobial proteins (AMPs), like human defensins and members of the S100 protein family, seem to play a key role in carcinogenesis and tumor progression in head and neck cancers [19–31], e.g., in oral squamous cell carcinoma (OSCC) [20–22,25,28,30,31] or tumors of salivary glands [19,23,26–29]. The gene expression of human  $\beta$ -defensins has also already been described in BCCs, but on transcript level only [32]. However, so far no studies on cellular distribution and the occurrence of human defensins and specific S100 proteins in BCCs, nor any impacts on clinical application have been reported recently.

Human defensins belong to the large group of AMPs which are involved in host defense [33]. Besides this important function in innate immunity, it has become apparent over the last years that defensins play various relevant roles in further cellular processes, such as inflammation, wound healing, proliferation and differentiation [34]. There are two subgroups of human defensins, called  $\alpha$ - (DEFAs) and  $\beta$ -defensins (hBDs). DEFAs are primarily located in phagocytes, while hBDs are present in epithelial tissues [28,33–36]. However, these AMPs have also been found in benign, precancerous and tumor tissues [28,32]. Hence, tumor-related functions of these peptides were suggested [28,37,38], such as a tumor suppressor for hBD1 [19,37,38] or as ligands of epidermal growth factor receptor (EGFR) for DEFAs and hBDs based upon structure similarities to EGF [39,40].

The S100 protein family consists of at least 20 members, which are characterized by their calcium-binding properties and typical EF-hand-type motifs [41]. Despite their structural similarity, these proteins participate in various different cellular processes such as, e.g., host defense, inflammation, proliferation and malignant transformation [42]. Thus, S100 proteins play an important role in the axis of infection–inflammation–tumorigenesis [41–48]. As mentioned above, S100 proteins have already been identified in benign, premalignant and cancerous oral tissues [22,24,28–31,49,50]. The main focus in these studies was put on S100A4 (metastasin), S100A7 (psoriasin) and S100A8/A9 (calprotectin). The latter three show antimicrobial activities [47,51,52], whereas all four S100 proteins can serve as ligands for receptors of advanced glycation end-products (RAGE), which makes them to key players in the formation of an inflammation-based tumor-supportive microenvironment [43].

Research on AMPs, including human defensins and S100 proteins in head and neck cancer, is well-established within our group. Hence, we conducted this study to investigate whether there is a difference of expression and distribution in indolent growth type BCCs in comparison with aggressive growth type BCCs. For this reason, we compared the expression of human  $\beta$ -defensins (hBDs) 1-3, human  $\alpha$ -defensins (DEFA) 1-4 and S100A4/A7/A8/A9 in nodular (solid) and superficial BCCs (indolent growth type) with morpheaform, infiltrative, micronodular and basosquamous (sclerodermiform) BCCs (aggressive growth type). As the above mentioned defensins and S100 proteins seem to have diverse functional activities in innate immunity, we hypothesized that their expression

might also play a key role in anti-tumor immune mechanisms involved in tumor cell control after incomplete (R1) resection.

The standard in most clinics is that patients who underwent a primarily R1 resection on a BCC will receive an MMCS re-resection to achieve a complete removal (R0) of the tumor. A common observation during the histopathological investigation of these re-resection specimens is an absence of vital BCC tumor cells, a phenomenon which might be connected to autoimmune processes but is not completely understood at present [1]. For this reason, we investigated whether AMP and S100 proteins might be involved in anti-tumor immune cell control, and thus might serve as a marker to decide whether a re-resection must be performed or left undone in a certain patient. This is of importance in elderly patients with severely restricted health, who are therefore a high risk for surgery [3]. To achieve this aim, we compared the expression of the above described human defensins and S100 proteins in re-resection specimens of primarily R1 resected BCCs containing vital BCC tumor cells with those specimens without traces of BCC tumor cells, assuming that a lack of vital BCC cells is associated with a more sufficient immune response involving the AMPs.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. The Tissue Sampling

Procedures involving human tissue sampling followed a protocol approved by the ethical board of the University of Bonn (#067/18). All patients had been informed about the study and had signed a letter of informed consent. Non-cancerous and cancerous specimens were taken from the same individuals. Tumor tissue selection was based upon the following parameters (Table 1): sex, age and BCC type.

**Table 1.** Sex, age and BCC type of patients examined in the present study.

Patient	Sex	Age	BCC Type
1	m	76	sclerodermiform
2	m	84	sclerodermiform
3	m	82	sclerodermiform
4	f	77	sclerodermiform
5	f	81	sclerodermiform
6	m	66	sclerodermiform
7	f	81	sclerodermiform
8	m	69	sclerodermiform
9	f	72	sclerodermiform
10	f	75	sclerodermiform
11	m	76	solid
12	f	84	solid
13	m	81	solid
14	f	89	solid
15	f	62	solid
16	m	73	solid
17	f	71	solid
18	m	71	solid
19	f	53	solid
20	m	65	solid
21	f	85	superficial
22	m	84	superficial



**Table 1.** *Cont.*

Patient	Sex	Age	BCC Type
23	m	82	superficial
24	f	71	superficial
25	f	80	superficial
26	m	73	superficial
27	f	72	superficial
28	m	71	superficial
29	f	84	superficial
30	m	50	superficial

## 2.2. Immunohistology

Sequential tumor tissue sections of 2.5 µm thickness were deparaffinized, rehydrated and rinsed with Tris-buffered saline (TBS). Endogenous peroxidase was blocked in a methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. Unspecific binding sites were saturated with 1% BSA in TBS. Tissue slices were then incubated in a humid chamber at 4 °C overnight using the following antibodies: rabbit polyclonal anti-hBD1 (Santa Cruz Biotech., Heidelberg, Germany; #sc-20797; 1:25 dilution), rabbit polyclonal anti-hBD2 (Santa Cruz Biotech.; #sc-20798; 1:50 dilution), rabbit polyclonal anti-hBD3 (Santa Cruz Biotech.; sc-30115; 1:50 dilution), rabbit polyclonal anti-human DEFA1/3 (Biotrend, Cologne, Germany; #HDEFA11-S; 1:800 dilution), rabbit polyclonal anti-human DEFA4 (Biotrend; #HDEFA41-S; 1:400 dilution), rabbit monoclonal anti-human S100A4 (Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands; #13018S; 1:400 dilution), rabbit polyclonal anti-human S100A7 (Santa Cruz Biotech., #sc-67047; 1:100 dilution), rabbit polyclonal anti-human S100A8 (Santa Cruz Biotech.; #sc-20174; 1:50 dilution) and rabbit polyclonal anti-human S100A9 (Santa Cruz Biotech.; #sc-20173; 1:100 dilution). Antigen–antibody binding was visualized using EnVision Detection System Peroxidase/DAB goat anti rabbit from Dako (Hamburg, Germany; #K4002) [19,23,24,26,30,31]. Cell counterstaining was performed with Mayer’s haematoxylin. Immunohistochemical staining intensities were evaluated using an RGB-based model [53] in which staining intensities were measured as a percentage of the relative ratio of “R” compared to total “RGB”: - = no (“R” = 33–35%), + = weak (“R” = 36–38%), ++ = moderate (“R” = 39–41%) and +++ = strong (“R” = 42–44%). The quantification was carried out with AxioVision SE64 Rel. 4.9 version (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany). Histomorphometric analyses of non- and tumorous tissue sections of sclerodermiform, solid and superficial basal cell carcinoma (*n* = 10 each) were investigated by evaluating the ratio of positively and negatively immunostained cells within representative tissue areas. Forty cells of each specimen within a representative area were counted. The tissue sections were analyzed independently by eye [19,23,54]. The h-score was calculated using the staining intensities and percentage of positively stained cells [55].

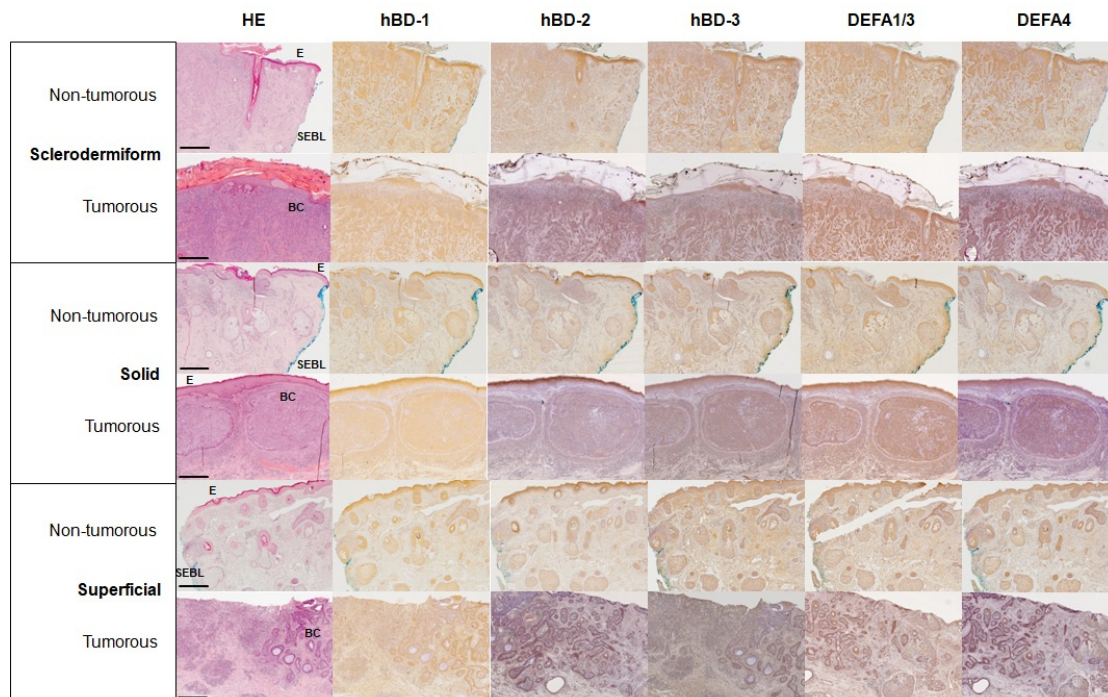
## 3. Results

One entity of aggressive-type, namely sclerodermiform BCC, and two entities of indolent-type, including solid and superficial BCCs (Table 1), were immunohistologically and histomorphometrically analyzed regarding the presence, cellular distribution and localization of the above described human defensins and S100 proteins (Tables 2 and 3).

HBD1 occurred with moderate immune intensity in the cytosol of the epithelium (100% positive cells) and stroma (50% positive cells) in the non-tumorous area (Figures 1 and 2) and also with the same grade of intensity in the tumor center (TC) and tumor edge (TE) (Figures 1 and 2) of sclerodermiform BCCs.

**Table 2.** Tissue-specific immunostaining pattern and histomorphometric analyses of hBD1, hBD2, hBD3, DEFA1/3, DEFA4, S100A4, A7, A8 and A9 in non- and tumorous tissues of sclerodermiform, solid and superficial basal cell carcinoma ( $n = 10$  each). The percentages of positively stained cells in the cytoplasm of epithelium (E), stroma (S) in non-tumorous, and tumor center (TC) or tumor edge (TE) in tumorous specimens were evaluated for quantification and designated as mean values with standard error means in brackets. Nuclear staining is shown with (n) for hBD3 in sclerodermiform and superficial BCCs and for S100A4 in non-tumorous stromal cells of superficial BCCs.

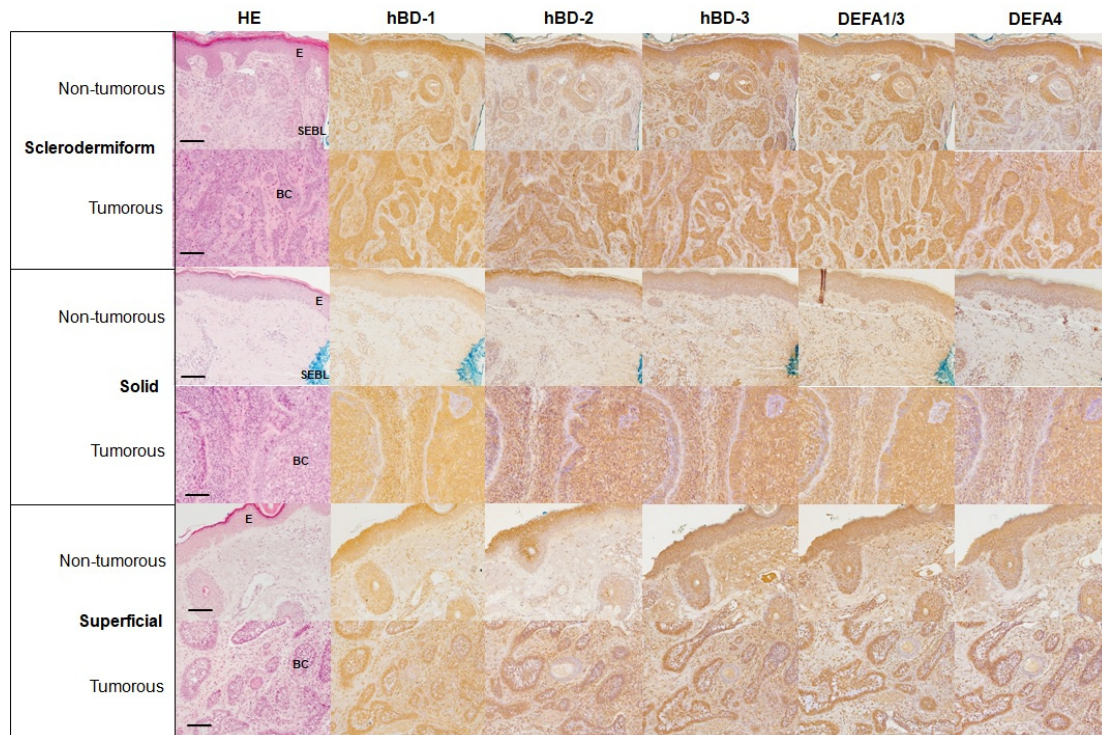
	Sclerodermiform				Solid				Superficial			
	Non-Tumorous		Tumor		Non-Tumorous		Tumor		Non-Tumorous		Tumor	
	Epith.	Stroma	Center	Edge	Epith.	Stroma	Center	Edge	Epith.	Stroma	Center	Edge
hBD1	98 (4)	49 (5)	99 (3)	100	100	18 (6)	98 (4)	97 (6)	100	22 (4)	11 (3)	99 (4)
hBD2	100	71 (5)	53 (6)	100	99 (3)	31 (5)	100	100	100	31 (3)	22 (4)	97 (6)
hBD3	100	99 (3)	97 (6)	100 <i>n</i> /52 (4)	100	12 (4)	97 (6)	99 (3)	100	98 (4)	23 (8)	97 (3) <i>n</i> /25 (5)
DEFA1/3	97 (6)	48 (6)	99 (3)	100	98 (4)	49 (7)	100	79 (5)	100	99 (3)	12 (4)	97 (6)
DEFA4	100	11 (3)	100	98 (4)	99 (3)	13 (4)	100	97 (6)	100	12 (4)	12 (4)	98 (4)
S100A4	0	68 (6)	0	0	0	53 (6)	0	0	0	51 (6) <i>n</i> /48 (4)	0	0
S100A7	81 (5)	0	0	0	89 (5)	0	0	0	82 (4)	0	0	0
S100A8	88 (4)	0	99 (3)	100	90 (6)	0	8 (6)	100	81 (5)	0	78 (6)	99 (3)
S100A9	100	0	51 (5)	99 (3)	98 (4)	0	99 (3)	100	97 (6)	0	0	0



**Figure 1.** Immunohistological overview of representative sections from non-tumorous and tumorous sclerodermiform, solid, and superficial basal cell carcinomas showing micrographs with HE, hBD1, hBD2, hBD3, DEFA1/3 and DEFA4 staining. The bar represents 500  $\mu$ m. Primary magnification was 5-fold. Surgery excision borderline (SEBL) is shown in blue staining. Abbr.: E = Epithelium; BC = Basaloid Cells.

**Table 3.** Tissue-specific immunostaining pattern and histomorphometric analyses of hBD1, hBD2, hBD3, DEFA1/3, DEFA4, S100A4, A7, A8 and A9 in non- and tumorous tissues of sclerodermiform, solid and superficial basal cell carcinoma (*n* = 10 each). The color intensity and h-scores in the cytoplasm (c) or nuclei (n) of epithelium (E), stroma (S) in non-tumorous, and tumor center (TC) or tumor edge (TE) in tumorous specimens were evaluated for quantification. Staining intensities are depicted as “-” (not detectable), “+” (weak), “++” (moderate) and “+++” (strong).

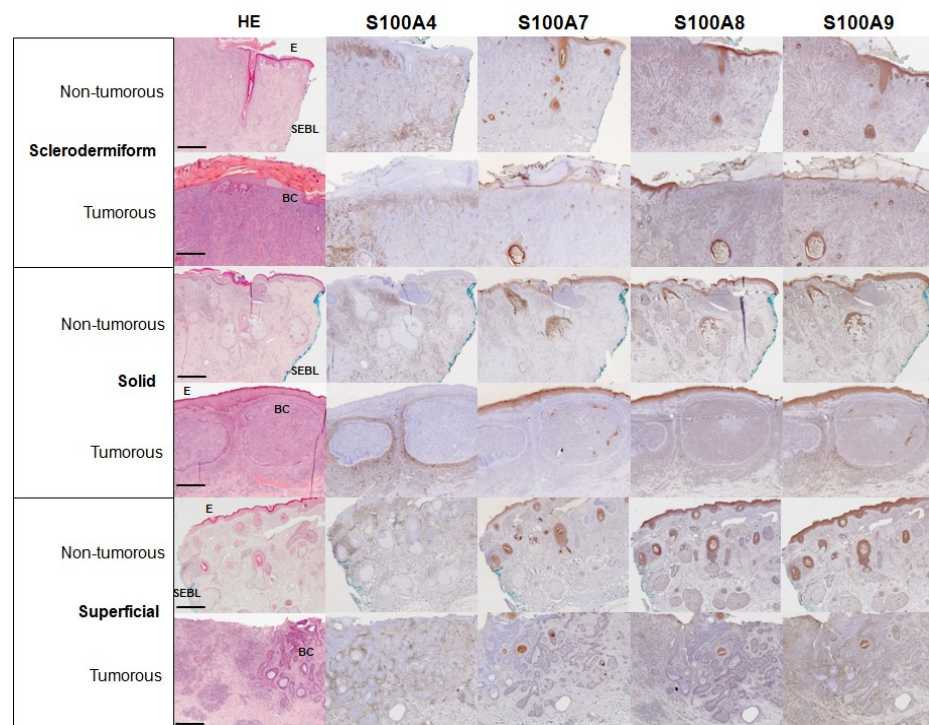
	Sclerodermiform		Solid		Superficial	
	Non-Tumorous	Tumor	Non-Tumorous	Tumor	Non-Tumorous	Tumor
hBD1	E/++/196S/+/98	TC/++/198TE/+/200	E/++/200S/+/36	TC/++/196TE/+/194	E/++/200S/+/44	TC/+/11TE/+/198
hBD2	E/+++/300S/+/142	TC/+/53TE/+/200	E/+++/297S/+/31	TC/++/200TE/+/200	E/+++/300S/+/31	TC/+/20TE/+/194
hBD3	E/++/200S/+/99	TC/+/97TE/+/c/100TE/+/n/104	E/++/200S/+/12	TC/++/194TE/+/198	E/++/200S/+/196	TC/++/46TC/+/c/198TE/+/n/50
DEFA1/3	E/++/194S/+/48	TC/++/198TE/+/200	E/++/196S/+/49	TC/++/200TE/+/158	E/++/200S/+/198	TC/++/24TE/+/194
DEFA4	E/++/200S/+/11	TC/++/200TE/+/196	E/+/99S/+/13	TC/++/200TE/+/194	E/++/200S/+/12	TC/+/11TE/+/196
S100A4	E/-/0S/+/68	TC/-/0TE/-/0	E/-/0S/+/53	TC/-/0TE/-/0	E/-/0S/+/c/51S/+/n/48	TC/-/0TE/-/0
S100A7	E/+/81S/-/0	TC/-/0TE/-/0	E/++/178S/-/0	TC/-/0TE/-/0	E/++/164S/-/0	TC/-/0TE/-/0
S100A8	E/++/176S/-/0	TC/+/198TE/+/100	E/++/180S/-/0	TC/+/88TE/+/100	E/+++/243S/-/0	TC/+/78TE/+/99
S100A9	E/+++/300S/-/0	TC/+/51TE/+/99	E/++/196S/-/0	TC/+/99TE/+/100	E/+++/291S/-/0	TC/-/0TE/-/0



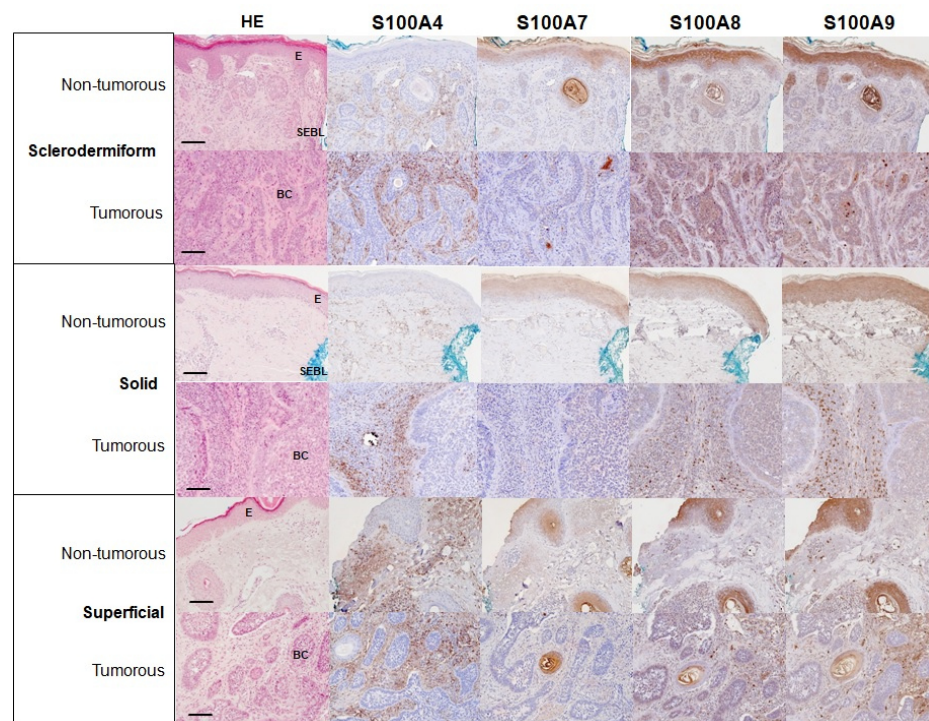
**Figure 2.** Immunohistological detailed microscopic photographs from non-tumorous and tumorous sclerodermiform, solid, and superficial basal cell carcinomas showing micrographs with HE, hBD1, hBD2, hBD3, DEFA1/3 and DEFA4 staining. The bar represents 100  $\mu$ m. Primary magnification was 20-fold. Surgery excision borderline (SEBL) is shown in blue staining. Abbr.: E = Epithelium; BC = Basaloid Cells.

Very similar observations could be seen for indolent BCCs (Figures 1 and 2), with the following exceptions: only 20% of hBD1-positive cells were detected in the stroma of non-tumorous areas (Figures 1 and 2), and only 10% of tumor center cells were hBD1-positive in superficial BCCs (Figures 1 and 2). Analyses for hBD2 presence (Figures 1 and 2; Tables 2 and 3) showed only marginal differences compared to hBD1: 1. Immunostaining intensity was generally higher in epithelium layers and to a slightly higher degree of hBD2-positive cell numbers in non-tumorous stroma in all types of BCCs (Figures 1 and 2); 2. In sclerodermiform tumor areas, only 50% of hBD2-positive cells were observed (Figure 2); 20% hBD2-positive cells in superficial tumor regions (Figure 2). In contrast, hBD3 analyses showed a different picture: in sclerodermiform BCCs, 50% of tumor edge cells were hBD3-positive for nuclear localization (Figure 2; Tables 2 and 3) while this AMP exhibited nuclear as well as cytosolic staining in 25% of tumor center cells in superficial BCCs, with nuclear and cytosolic staining remarkably not occurring in the same cells (Figure 2; Tables 2 and 3). The patterns of DEFA1/3s' presence were very similar to the above described hBDs (Figures 1 and 2). However, DEFA1/3 immunostaining intensities were weak in stroma cells of non-tumorous regions in all entities (Figures 1 and 2; Tables 2 and 3). The specific difference for DEFA4 occurrence in BCCs was the low amount of DEFA4-positive cell numbers in stroma of non-tumorous areas within all three entities (Figures 1 and 2; Tables 2 and 3).

In contrast to the above-described defensins, S100A4 could not be detected in epithelial cells of non-tumorous sclerodermiform BCCs, yet was present in the cytosol of 70% of stromal cells with weak intensity, but also completely absent in tumorous areas (Figures 3 and 4; Tables 2 and 3).



**Figure 3.** Immunohistological overview of representative sections from non-tumorous and tumorous sclerodermiform, solid, and superficial basal cell carcinomas showing micrographs with HE, S100A4, A7, A8 and A9 staining. The bar represents 500  $\mu$ m. Primary magnification was 5-fold. Surgery excision borderline (SEBL) is shown in blue staining. Abbr.: E = Epithelium; BC = Basaloid Cells.



**Figure 4.** Immunohistological detailed microscopic photographs from non-tumorous and tumorous sclerodermiform, solid, and superficial basal cell carcinomas showing micrographs with HE, S100A4, A7, A8 and A9 staining. The bar represents 100  $\mu$ m. Primary magnification was 20-fold. Surgery excision borderline (SEBL) is shown in blue staining. Abbr.: E = Epithelium; BC = Basaloid Cells.

Similar results were observed for S100A4 occurrence in non-tumorous and tumorous regions of solid BCCs (Figures 3 and 4; Tables 2 and 3). In the case of superficial BCCs, S100A4 immunohistological patterns were shown to be slightly different: the epithelium and tumorous areas were S100A4-negative, while 50% of non-tumorous stromal cells showed cytosolic and simultaneous nuclear staining (Figures 3 and 4; Tables 2 and 3). S100A7 was also not detectable in tumorous regions of all three BCC entities examined (Figures 3 and 4; Tables 2 and 3). However, S100A7 reactivity was monitored in the cytoplasm of epithelial cells in all three BCCs tested (Figures 3 and 4; Tables 2 and 3). S100A8 presence was not detectable in stroma cells, but with moderate or even high intensity in the cytoplasm of 80–90% of epithelial cells (Figures 3 and 4; Tables 2 and 3). In sclerodermiform BCCs, all cells of the tumor center and edge were S100A8 positive with cytoplasmic localization, which also applied, although to a marginally lower extent, for solid BCCs (80% of cells) and superficial (90%) BCCs (Figures 3 and 4; Tables 2 and 3). S100A9 showed the following patterns: non-tumorous stromal cells of all three BCCs were immunonegative for this protein, while the epithelium exhibited moderate to strong reactivity in the cytoplasm of all cells. S100A9 was detectable in sclerodermiform BCCs with weak intensity in 50% of cells of the tumor center and 100% in the tumor edge, whereas all cells in solid BCC tumor cells were S100A9 positive, also with weak immunostaining intensity. In contrast, no S100A9 could be detected in superficial BCC tumor areas (Figures 3 and 4; Tables 2 and 3).

#### 4. Discussion

As already mentioned above, human defensins and the S100 members S100A4/A7/A8/A9 play a pivotal role in tumorigenesis and malignant transformation, and also under inflammatory conditions [28,31,43,56]. All these different proteins, with the exception, of S100A4 have in common that they share antimicrobial activities [31,33,34]. However, remarkably, they also participate in cellular processes which are favorable to initiate or establish tumors, e.g., as ligands of EGFR (hBDs, DEFAs) [39,40] and RAGE (S100A4/A7/A8/A9) [43–45]. Furthermore, they also function as tumor suppressor proteins (hBD1/hBD2) [20,37,38] or as intracellular interacting partners, which drive epithelial–mesenchymal transition (EMT) (S100A4/A7) [43,46,56]. Hence, they are key players in the inflammation–tumorigenesis axis. In addition, these proteins have also already been described as useful tools for characterizing various lesions of different grades of malignancy in a number of tumor entities [19–26,28–32,37,38,40,50]. Therefore, this study has been performed to find out whether these molecules might serve as biomarkers for characterizing different BCC entities. This might help in improving clinical decisions for resection therapy. HBD1-3 has been detected in all three different entities of BCCs examined. It is present in the cytoplasm of epithelial, stromal and tumor cells. In addition, hBD3 also occurs in the nuclei of sclerodermiform and superficial BCCs. This observation might lead to the hypothesis that hBD3 has a yet unknown function specific for these two BCC entities. S100A4 and A7 are not detectable in tumor regions. Nevertheless, S100A4 shows a specific immunostaining property in cancer-associated stroma cells with nuclear occurrence in non-tumorous areas of superficial BCCs. Thus, these proteins might participate in tumor suppressing functions. S100A8 and A9 show similarities in expression profiles throughout sclerodermiform and solid BCCs, but differ in superficiales. Hence, these proteins could be involved in entity-specific yet unknown functions.

Human defensins have originally been discovered to be antimicrobial peptides. However, a huge number of studies indicate that these AMPs are involved in a wide variety of different cellular processes, including the initiation and progression of skin disorders and neoplasms [57]. Transcript levels of hBD1 are reduced in BCCs compared to those of healthy skin [32]. Additionally, the expression level of this AMP corresponds to the degree of malignancy with the lowest concentration found in the most malignant lesions in skin [58]. This observation has also been found in different stages of malignancies in various oral tissues [20,49]. In the present study, the examined BCC entities have also shown different staining intensities for hBD1: while sclerodermiform and solid BCCs exhibit the

same immunostaining profile, the number of hBD1-positive cells in the tumor center as well as the intensity is decreased in superficial BCCs. Although hBD2 expression is reduced in oral squamous cell carcinoma [59], it is enhanced in BCCs [32]. Our results show the highest expression for hBD2 in solid BCCs compared to the other two entities. This may support the assumption that hBD2 might function as a putative tumor suppressor, since solid BCC is the less malignant entity [10,17]. In contrast, hBD2 is more highly expressed in non-tumorous stroma areas of sclerodermiform BCCs, the most malignant of the three forms, compared to the other two entities. The overexpression of hBD3 has been shown in oral squamous cell carcinomas [21] and oral carcinoma in situ lesions [60]. Human BD3 is known to function as a chemoattractant for tumor-associated macrophages which are involved in tumor initiation and progression [60]. Human BD3 shows a different expression profile compared to the other hBDs: while hBD1 and hBD2 are located exclusively in the cytoplasm of tumor, epithelial and stromal cells, hBD3 appears at least partly in the nucleus of cells in the tumor edge in sclerodermiform BCCs and in the tumor center of superficial BCCs. Nuclear accumulations of hBDs have been reported for hBD1 in cells of salivary gland tumors [19,23] and in keratinocytes of burned skin [61]. HNP1 or  $\alpha$ -defensins (DEFAs) have been used as molecular tools to characterize various oral benign, premalignant and cancerous lesions and salivary gland tumors [26,49,50]. Whereas DEFA1/3 is up-regulated in benign oral irritation fibromas, DEFA4 expression is unaltered [50]. Transcript levels of DEFA1/3 in premalignant oral leukoplakias are unaltered, while DEFA4 is overexpressed [49]. Malignant salivary gland tumor entities show enhanced levels of DEFA1/3 and also DEFA4. In benign pleomorphic adenomas, DEFA1/3 is only slightly up-regulated but DEFA4 even decreased. In addition, both DEFAs are absent in pleomorphic adenomas, although present in healthy salivary gland cells. However, malignant cystadenolymphomas exhibit DEFA1/3 presence in cells of the tumor centers and edge, whereas DEFA4 only occurs in cells of the tumor edge [26]. In BCCs, both DEFAs show similar expression patterns in all three entities. However, DEFA4 is far less present in stroma cells.

Intracellular S100A4 is involved in various cellular processes such as cell migration, apoptosis and stemness maintenance. If present in the extracellular matrix, S100A4 participates in pro-inflammatory and metastasis-promoting processes, e.g., cell motility and epithelial–mesenchymal transition (EMT). It is able to bind to RAGE or EGFR, hence affecting immune modulation and cell growth. Therefore, this protein can link innate immunity with tumorigenesis [43], and might be a relevant player in BCC pathogenesis. S100A4 has been detected in different dermal tissue structures such as healthy skin, nevi and melanomas, with no significant differential expression in the two latter [62]. However, it has also been described that no S100A4 is present in epidermal tumors [63]. Our results support these results, since no positive S100A4 immunoreactivities have been found in BCCs. Nevertheless, cancer-associated stromal cells show S100A4 occurrence in all three BCC entities. Thus, this protein might serve as a potential clinical marker for evaluating successful resectional therapy. S100A7, also designated as “psoriasin”, was first isolated from psoriatic skin lesions as an antimicrobial protein [45,51,64,65]. It acts as an alarmin, chemoattractant and an amplifier of inflammation. Additionally, it affects proliferation and establishes a tumor-tolerogenic microenvironment [43,66]. S100A7 has been identified in various oral lesions. Its expression level correlates with the grade of lesional malignancies [22,24,29,50]. S100A7 expression has also been intensively studied in human skin. The results are similar to those in oral tissues, with the exception that S100A7 has been shown to be down-regulated in early steps of dermal tumor development, with the highest level in preinvasive SCCs but the lowest in invasive SCCs. Although transcript levels of S100A7 are enhanced in BCCs [54,66,67], notably S100A7 protein is absent in various immunohistological studies, including ours [67–69]. S100A8 (calgranulin A) is associated with inflammatory diseases and cancer. Its expression is induced inter alia by ultraviolet radiation. S100A8 is a modulator in inflammation, a natural ligand for RAGE and shows antimicrobial activity. S100A8 has been detected in oral and head and neck squamous cell carcinoma and various psoriatic lesions. Furthermore, calgranulin A is able to form a

heterocomplex with S100A9 [43–45]. S100A9 (calgranulin B) has an impact on immune cell migration, and also functions as an AMP [43,52]. It is often co-expressed with calgranulin A, forming a heterocomplex designated calprotectin. Furthermore, S100A8/A9 is involved in establishing a tumor-supportive microenvironment [70]. S100A9 is expressed in various oral and dermal lesions, but is absent in BCCs [24,30,31,50,69]. Our results indicate independent expression profiles for S100A8 and A9 in BCCs. This observation has also been found in dermal keratinocytes and airway tissues [69,71]. Both proteins are present in sclerodermiform, and solid BCCs S100A9 is absent in superficial BCCs, whereas, in contrast, S100A8 has been identified in this tumor entity, yet with weak intensity. Therefore, these proteins could be used as a marker to differentiate between the three entities.

In summary, human defensins have been identified in three different entities of BCCs. They all show cytoplasmic immunostaining in epithelial, stromal and tumor cells. In addition, hBD3 is accumulated in the cell nuclei of sclerodermiform and superficial BCCs. S100A4 and A7 are absent in tumor regions. Nevertheless, S100A4 shows a specific immunostaining in cancer-associated stroma cells, with nuclear occurrence in non-tumorous areas of superficial BCCs. S100A8 and A9 exhibit similar expression profiles throughout sclerodermiform and solid entities, but differ in superficial BCCs.

In conclusion, from the above-mentioned putative biomarker molecules, two candidates, namely hBD3 and S100A4, seem to be useful as potential clinical tools for evaluating successful resection therapy to avoid aesthetic and functional facial deformation. These two biomarkers help to make improved clinical statements of risk estimations for potential recurrence. It is essential to differentiate tumorous from non-tumorous cells to estimate the success of tumor resections. The use of more reliable biomarkers makes it possible to avoid putative re-resections, with all their undesirable consequences.

**Author Contributions:** M.W. and J.W. have made substantial contributions to the design, conception, methods and drafting of the manuscript. E.D. characterized and verified tissue specimens. E.D., R.P., M.W. and J.W. have examined tissue sections regarding immunohistomorphometry. All authors made substantial contributions to the acquisition, analysis, or interpretation of data, drafted the work or revised it critically for important intellectual content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The procedures for human tissue sampling followed a protocol approved by the ethical board of the University of Bonn (#067/18).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Supporting data and materials are available on request to the corresponding author due to privacy restrictions.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to D. Lalaoui for excellent technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Marzuka, A.G.; Book, S.E. Basal cell carcinoma: Pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J. Biol. Med.* **2015**, *88*, 167–179.
2. Cancer, Facts & Figures. 2010. Available online: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2010.html> (accessed on 15 May 2022).
3. National Comprehensive Cancer Network. Basal Cell Skin Cancer. Available online: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx) (accessed on 8 August 2019).
4. Rigel, D.S.; Russak, J.; Friedman, R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 301–316. [CrossRef]
5. Rogers, H.W.; Weinstock, M.A.; Feldman, S.R.; Coldiron, B.M. Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer (Keratinocyte Carcinomas) in the U.S. Population, 2012. *JAMA Dermatol.* **2015**, *151*, 1081–1086. [CrossRef]
6. Scrivener, Y.; Grosshans, E.; Cribier, B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br. J. Dermatol.* **2002**, *147*, 41–47. [CrossRef]



7. Soyer, H.P.; Rigel, D.; Wurm, E.M.T. Actinic Keratosis, Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. In *Dermatology*; Bologna, J.L., Jorizzo, J.L., Schaffer, J.V., Eds.; Elsevier Saunders: Edinburgh, Scotland, 2012; pp. 1773–1794.
8. Epstein, E.H. Basal cell carcinomas: Attack of the hedgehog. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 743–754. [[CrossRef](#)]
9. Baxter, J.M.; Patel, A.N.; Varma, S. Facial basal cell carcinoma. *BMJ* **2012**, *345*, e5342. [[CrossRef](#)]
10. Dika, E.; Scarfi, F.; Ferracin, M.; Broseghini, E.; Marcelli, E.; Bartolani, B.; Campione, E.; Riefolo, M.; Ricci, C.; Lambertini, M. Basal cell carcinoma: A comprehensive review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5572. [[CrossRef](#)]
11. Sexton, M.; Jones, D.B.; Maloney, M.E. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma: Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1990**, *23*, 1118–1126. [[CrossRef](#)]
12. Crowson, N.A. Basal cell carcinoma: Biology, morphology and clinical implications. *Mod. Pathol.* **2006**, *19* (Suppl. S2), S127–S147. [[CrossRef](#)]
13. Geisse, J.; Caro, I.; Lindholm, J.; Golitz, L.; Stampone, P.; Owens, M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: Results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2004**, *50*, 722–733. [[CrossRef](#)]
14. Arits, A.H.H.M.; Mosterd, K.; Essers, B.A.; Spoorenberg, E.; Sommer, A.; De Rooij, M.J.M.; van Pelt, H.P.A.; Quaedvlieg, P.J.F.; Krekels, G.A.M.; van Neer, P.A.F.A.; et al. Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: A single blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 647–654. [[CrossRef](#)]
15. Roozeboom, M.H.; Arits, A.H.H.M.; Nelemans, P.J.; Kelleners-Smeets, N.W.J. Overall treatment success after treatment of primary superficial basal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials. *Br. J. Dermatol.* **2012**, *167*, 733–756. [[CrossRef](#)]
16. Silverman, M.K.; Kopf, A.W.; Gladstein, A.H.; Bart, R.S.; Grin, C.M.; Levenstein, M.J. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 4: X-ray therapy. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **1992**, *18*, 549–554. [[CrossRef](#)]
17. Kim, D.P.; Kus, K.J.B.; Ruiz, E. Basal cell carcinoma review. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* **2019**, *33*, 13–24. [[CrossRef](#)]
18. Basset-Seguín, N.; Herms, F. Update in the Management of Basal Cell Carcinoma. *Acta Derm. Venereol.* **2020**, *100*, adv00140. [[CrossRef](#)]
19. Wenghoefer, M.; Pantelis, A.; Dommisch, H.; Götz, W.; Reich, R.; Bergé, S.; Martini, M.; Allam, J.P.; Jepsen, S.; Merkelbach-Bruse, S.; et al. Nuclear hBD-1 accumulation in malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 290. [[CrossRef](#)]
20. Wenghoefer, M.; Pantelis, A.; Dommisch, H.; Reich, R.; Martini, M.; Allam, J.P.; Novak, N.; Bergé, S.; Jepsen, S.; Winter, J. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2008**, *37*, 660–663. [[CrossRef](#)]
21. Kesting, M.R.; Loeffelbein, D.J.; Hasler, R.J.; Wolff, K.D.; Rittig, A.; Schulte, M.; Hirsch, T.; Wagenpfeil, S.; Jacobsen, F.; Steinstraesser, L. Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Investig.* **2009**, *27*, 575–581. [[CrossRef](#)]
22. Kesting, M.R.; Sudhoff, H.; Hasler, R.J.; Nieberler, M.; Pautke, C.; Wolff, K.D.; Wagenpfeil, S.; Al-Benna, S.; Jacobsen, F.; Steinstraesser, L. Psoriasin (S100A7) up-regulation in oral squamous cell carcinoma and its relation to clinicopathologic features. *Oral Oncol.* **2009**, *45*, 731–736. [[CrossRef](#)]
23. Pantelis, A.; Wenghoefer, M.; Haas, S.; Merkelbach-Bruse, S.; Pantelis, D.; Jepsen, S.; Bootz, F.; Winter, J. Down regulation and nuclear localization of human beta-defensin-1 in pleomorphic adenomas of salivary glands. *Oral Oncol.* **2009**, *45*, 526–530. [[CrossRef](#)]
24. Winter, J.; Pantelis, A.; Reich, R.; Jepsen, S.; Allam, J.P.; Novak, N.; Wenghoefer, M. Risk estimation for a malignant transformation of oral lesions by S100A7 and Doc-1 gene expression. *Cancer Investig.* **2011**, *29*, 478–484.
25. Winter, J.; Pantelis, A.; Reich, R.; Martini, M.; Kraus, D.; Jepsen, S.; Allam, J.P.; Novak, N.; Wenghoefer, M. Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *Cancer Investig.* **2011**, *29*, 196–201. [[CrossRef](#)]
26. Winter, J.; Pantelis, A.; Kraus, D.; Reckenbeil, J.; Reich, R.; Jepsen, S.; Fischer, H.P.; Allam, J.P.; Novak, N.; Wenghoefer, M. Human  $\alpha$ -defensin (DEFA) gene expression helps to characterise benign and malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 465. [[CrossRef](#)]
27. Winter, J.; Mohr, S.; Pantelis, A.; Kraus, D.; Allam, J.P.; Novak, N.; Reich, R.; Martini, M.; Jepsen, S.; Götz, W.; et al. IGF-1 deficiency in combination with a low basic hBD-2 and hBD-3 gene expression might counteract malignant transformation in pleomorphic adenomas in vitro. *Cancer Investig.* **2012**, *30*, 106–113. [[CrossRef](#)]
28. Winter, J.; Wenghoefer, M. Human Defensins: Potential Tools for Clinical Applications. *Polymers* **2012**, *4*, 691–709. [[CrossRef](#)]
29. Kesting, M.R.; Stoeckelhuber, M.; Kuppek, A.; Hasler, R.; Rohleder, N.; Wolff, K.D.; Nieberler, M. Human  $\beta$ -defensins and psoriasin/S100A7 expression in salivary glands: Anti-oncogenic molecules for potential therapeutic approaches. *BioDrugs* **2012**, *26*, 33–42. [[CrossRef](#)]
30. Reckenbeil, J.; Kraus, D.; Probstmeier, R.; Allam, J.P.; Novak, N.; Frentzen, M.; Martini, M.; Wenghoefer, M.; Winter, J. Cellular Distribution and Gene Expression Pattern of Metastasin (S100A4), Calgranulin A (S100A8), and Calgranulin B (S100A9) in Oral Lesions as Markers for Molecular Pathology. *Cancer Investig.* **2016**, *34*, 246–254. [[CrossRef](#)]
31. Probstmeier, R.; Kraus, D.; Wenghoefer, M.; Winter, J. S100 Proteins as Biomarkers in Risk Estimations for Malignant Transformation in Oral Lesions. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1929*, 763–771.

32. Gambichler, T.; Skrygan, M.; Huyn, J.; Bechara, F.G.; Sand, M.; Altmeyer, P.; Kreuter, A. Pattern of mRNA expression of beta-defensins in basal cell carcinoma. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 163. [[CrossRef](#)]
33. Ganz, T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 710–720. [[CrossRef](#)]
34. Lehrer, R.I. Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 727–738. [[CrossRef](#)]
35. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250. [[CrossRef](#)]
36. Hazlett, L.; Wu, M. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res.* **2011**, *343*, 175–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Donald, C.D.; Sun, C.Q.; Lim, S.D.; Macoska, J.; Cohen, C.; Amin, M.B.; Young, A.N.; Ganz, T.A.; Marshall, F.F.; Petros, J.A. Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab. Invest.* **2003**, *83*, 501–505. [[CrossRef](#)]
38. Sun, C.Q.; Arnold, R.; Fernandez-Golarz, C.; Parrish, A.B.; Almekinder, T.; He, J.; Ho, S.M.; Svoboda, P.; Pohl, J.; Marshall, F.F.; et al. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: Control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8542–8549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Niyonsaba, F.; Ushio, H.; Nakano, N.; Ng, W.; Sayama, K.; Hashimoto, K.; Nagaoka, I.; Okumura, K.; Ogawa, H. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 594–604. [[CrossRef](#)]
40. Hoppe, T.; Kraus, D.; Novak, N.; Probstmeier, R.; Frentzen, M.; Wenghoefer, M.; Jepsen, S.; Winter, J. Oral pathogens change proliferation properties of oral tumor cells by affecting gene expression of human defensins. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 13789–13798. [[CrossRef](#)]
41. Donato, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1450*, 191–231. [[CrossRef](#)]
42. Donato, R. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 637–668. [[CrossRef](#)]
43. Donato, R.; Cannon, B.R.; Sorci, G.; Riuzzi, F.; Hsu, K.; Weber, D.J.; Geczy, C.L. Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* **2013**, *13*, 24–57. [[CrossRef](#)]
44. Chen, H.; Xu, C.; Jin, Q.; Liu, Z. S100 protein family in human cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2014**, *4*, 89–115.
45. Halawi, A.; Abbas, O.; Mahalingam, M. S100 proteins and the skin: A review. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2014**, *28*, 405–414. [[CrossRef](#)]
46. Bresnick, A.R.; Weber, D.J.; Zimmer, D.B. S100 proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 96–109. [[CrossRef](#)]
47. Niyonsaba, F.; Kiatsurayanon, C.; Chieosilapatham, P.; Ogawa, H. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp. Dermatol.* **2017**, *26*, 989–998. [[CrossRef](#)]
48. Heizmann, C.W. S100 proteins: Diagnostic and prognostic biomarkers in laboratory medicine. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 1197–1206. [[CrossRef](#)]
49. Wenghoefer, M.; Pantelis, A.; Najafi, T.; Deschner, J.; Allam, J.P.; Novak, N.; Reich, R.; Martini, M.; Bergé, S.; Fischer, H.P.; et al. Gene expression of oncogenes, antimicrobial peptides, and cytokines in the development of oral leucoplakia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2010**, *110*, 351–356. [[CrossRef](#)]
50. Winter, J.; Pantelis, A.; Allam, J.P.; Novak, N.; Reich, R.; Martini, M.; Bergé, S.; Deschner, J.; Jepsen, S.; Wenghoefer, M. High  $\alpha$ -defensin and S100A7 expression and missing DOC-1 down-regulation characterize irritation fibromas of the oral cavity and may counteract malignant transformation. *J. Craniofac. Surg.* **2011**, *22*, 100–104. [[CrossRef](#)]
51. Gläser, R.; Harder, J.; Lange, H.; Bartels, J.; Christophers, E.; Schröder, J.M. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 57–64. [[CrossRef](#)]
52. Pirr, S.; Richter, M.; Fehlhaber, B.; Pagel, J.; Härtel, C.; Roth, J.; Vogl, T.; Viemann, D. High amounts of S100-alarmins confer antimicrobial activity on human breast milk targeting pathogens relevant in neonatal sepsis. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1822. [[CrossRef](#)]
53. Vrekoussis, T.; Chaniotis, V.; Navrozoglou, I.; Dousias, V.; Pavlakis, K.; Stathopoulos, E.N.; Zoras, O. Image analysis of breast cancer immunohistochemistry-stained sections using ImageJ: An RGB-based model. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 4995–4998.
54. Cizkova, K.; Foltynkova, T.; Gachechiladze, M.; Tauber, Z. Comparative Analysis of Immunohistochemical Staining Intensity Determined by Light Microscopy, ImageJ and QuPath in Placental Hofbauer Cells. *Acta Histochem. Cytochem.* **2021**, *54*, 21–29. [[CrossRef](#)]
55. Ishibashi, H.; Suzuki, T.; Suzuki, S.; Moriya, T.; Kaneko, C.; Takizawa, T.; Sunamori, M.; Handa, M.; Kondo, T.; Sasano, H. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 2309–2317. [[CrossRef](#)]
56. Hoppe, T.; Kraus, D.; Probstmeier, R.; Jepsen, S.; Winter, J. Stimulation with *Porphyromonas gingivalis* enhances malignancy and initiates anoikis resistance in immortalized oral keratinocytes. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 21903–21914. [[CrossRef](#)]
57. Kiatsurayanon, C.; Peng, G.; Niyonsaba, F. Opposing Roles of Antimicrobial Peptides in Skin Cancers. *Curr. Pharm. Des.* **2022**, *28*, 248–258. [[CrossRef](#)]
58. Scola, N.; Gambichler, T.; Saklaoui, H.; Bechara, F.G.; Georgas, D.; Stücker, M.; Gläser, R.; Kreuter, A. The expression of antimicrobial peptides is significantly altered in cutaneous squamous cell carcinoma and precursor lesions. *Br. J. Dermatol.* **2012**, *167*, 591–597. [[CrossRef](#)]

59. Kamino, Y.; Kurashige, Y.; Uehara, O.; Sato, J.; Nishimura, M.; Yoshida, K.; Arakawa, T.; Nagayasu, H.; Saitoh, M.; Abiko, Y. HBD-2 is downregulated in oral carcinoma cells by DNA hypermethylation, and increased expression of hBD-2 by DNA demethylation and gene transfection inhibits cell proliferation and invasion. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 462–468. [[CrossRef](#)]
60. Kawsar, H.I.; Weinberg, A.; Hirsch, S.A.; Venizelos, A.; Howell, S.; Jiang, B.; Jin, G. Overexpression of human beta-defensin-3 in oral dysplasia: Potential role in macrophage trafficking. *Oral Oncol.* **2009**, *45*, 696–702. [[CrossRef](#)]
61. Bick, R.J.; Poindexter, B.J.; Buja, L.M.; Lawyer, C.H.; Milner, S.M.; Bhat, S. Nuclear localization of HBD-1 in human keratinocytes. *J. Burns Wounds* **2007**, *7*, e3.
62. Böni, R.; Burg, G.; Doguoglu, A.; Ilg, E.C.; Schäfer, B.W.; Müller, B.; Heizmann, C.W. Immunohistochemical localization of the Ca<sup>2+</sup> binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *Br. J. Dermatol.* **1997**, *137*, 39–43. [[CrossRef](#)]
63. Zhu, L.; Kohda, F.; Nakahara, T.; Chiba, T.; Tsuji, G.; Hachisuka, J.; Ito, T.; Tu, Y.; Moroi, Y.; Uchi, H.; et al. Aberrant expression of S100A6 and matrix metalloproteinase 9, but not S100A2, S100A4, and S100A7, is associated with epidermal carcinogenesis. *J. Dermatol. Sci.* **2013**, *72*, 311–319. [[CrossRef](#)]
64. Watson, P.H.; Leygue, E.R.; Murphy, L.C. Psoriasin (S100A7). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 567–571. [[CrossRef](#)]
65. Gebhardt, C.; Riehl, A.; Durchdewald, M.; Németh, J.; Fürstenberger, G.; Müller-Decker, K.; Enk, A.; Arnold, B.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.P.; et al. RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 275–285. [[CrossRef](#)]
66. Hattinger, E.; Zwicker, S.; Ruzicka, T.; Yuspa, S.H.; Wolf, R. Opposing functions of psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in epithelial carcinogenesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 588–594. [[CrossRef](#)]
67. Alowami, S.; Qing, G.; Emberley, E.; Snell, L.; Watson, P.H. Psoriasin (S100A7) expression is altered during skin tumorigenesis. *BMC Dermatol.* **2003**, *3*, 1. [[CrossRef](#)]
68. Moubayed, N.; Weichenthal, M.; Harder, J.; Wandel, E.; Sticherling, M.; Gläser, R. Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2007**, *133*, 253–261. [[CrossRef](#)]
69. Martinsson, H.; Yhr, M.; Enerbäck, C. Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Exp. Dermatol.* **2005**, *14*, 161–168. [[CrossRef](#)]
70. Lukanidin, E.; Sleeman, J.P. Building the niche: The role of the S100 proteins in metastatic growth. *Semin. Cancer Biol.* **2012**, *22*, 216–225. [[CrossRef](#)]
71. Van Crombruggen, K.; Vogl, T.; Pérez-Novo, C.; Holtappels, G.; Bachert, C. Differential release and desposition of S100A8/A9 proteins in inflamed upper airway tissue. *Eur. Respir. J.* **2016**, *47*, 264–274. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.