

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen

Promotor-spezifische Methylierung des Apoptosis-
associated-Speck-like-Protein containing a caspase
recruitment domain (ASC) in kutanen
Plattenepithelkarzinomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Meier, Katharina

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A.S. Yazdi

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Hartkopf

Tag der Disputation: 14.08.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Tumoren der Haut.....	1
1.1.1 Nicht-melanozytäre Tumoren der Haut (NMSC).....	1
1.1.2 Plattenepithelkarzinom.....	1
1.1.3 Klinisches Bild und Differentialdiagnosen.....	3
1.1.4 Histologie.....	5
1.1.5 Klassifikation.....	6
1.1.6 Prognose.....	9
1.2 Pathophysiologie des kPEKs.....	10
1.2.1 Arten der Tumorentstehung.....	10
1.3 Epigenetik.....	11
1.3.1 DNA-Methylierung.....	12
1.3.2 Methylierung und therapeutische Ansätze.....	13
1.4 Apoptosis associated Speck like Protein containing a caspase recruitment domain (CARD).....	13
1.4.1 Inflammasom.....	15
1.4.2 ASC bei Tumor und Entzündung.....	18
2. Fragestellung und Zielsetzung.....	20
3. Material und Methoden.....	21
3.1 Patientenkollektiv.....	21
3.2 Reagenzien/ Materialien.....	22
3.2.1 Verbrauchsmaterialien.....	22
3.2.2 Nährmedien.....	22
3.2.3 Puffer und Lösungen.....	22
3.2.4 Reagenzien und Chemikalien.....	24
3.2.5 Primer.....	25
3.2.6 Geräte.....	25
3.2.7 Zelllinien.....	26
3.2.8 Antikörper.....	26
3.2.9 Proteasen.....	27
3.2.10 Kits.....	27
3.2.11 FFPE Schnitte kutaner Plattenepithelkarzinome.....	27
3.3 Methoden.....	30

3.3.1	Immunhistochemische Färbungen	30
3.3.2	DNA Isolation.....	31
3.3.3	RNA Extraktion	32
3.3.4	cDNA Synthese.....	32
3.3.5	Real-time PCR.....	33
3.3.6	Bisulfit Behandlung	33
3.3.7	Methylierungsspezifische PCR.....	35
3.3.8	Behandlung mit 5-Aza-2' -Deoxycytidin	36
3.3.9	Western Blot	36
3.3.10	Zellkultur und Zellgewinnung.....	37
3.3.11	UVB-Behandlung	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Epidemiologische Daten des Patientenkollektivs	39
4.2	ASC als Tumorsuppressor.....	40
4.2.1	ASC-Verlust in epidermalen Tumoren.....	40
4.2.2	ASC-Expression korreliert mit der Tumordifferenzierung.....	44
4.2.3	ASC-Expression korreliert nicht mit der Metastasierungsrate.....	52
4.2.4	ASC-Expression korreliert nicht mit der Tumordicke	53
4.3	ASC-Expression in primären humanen Keratinozyten und PEK-Zelllinien	56
4.4	Die ASC-Expression wird durch Promotor-spezifische Methylierungen herunterreguliert	57
4.5	Wiederherstellung der ASC Expression durch 5-Aza-2' -deoxycytidin	58
4.6	ASC-Methylierung führt zu reduzierter Inflammationaktivität	59
5.	Diskussion	61
5.1	Patientenkollektiv.....	61
5.2	Verlust von ASC in epidermalen Tumoren	62
5.3	ASC und Differenzierung	63
5.4	ASC und Prognose	65
5.5	ASC und Inflammation	67
5.6	ASC und Tumorthherapie	68
6.	Zusammenfassung	71
7.	Literaturverzeichnis.....	73
8.	Abbildungsverzeichnis	83

9. Tabellenverzeichnis.....	86
10. Erklärung zum Eigenanteil.....	87
11. Veröffentlichungen zu dieser Dissertation.....	88
12. Danksagung	89
13. Lebenslauf.....	90

Abkürzungsverzeichnis

AIM	Absent in Melanoma
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASC	Apoptosis associated speck like protein containing a CARD
BZK	Basalzellkarzinom
CARD	containing a caspase recruitment domain
cDNA	komplementäre DNA
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CpG	Desoxycytidin – Phosphorsäure – Desoxyguanosin
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DMBA	1,3-Dimethylbutylamin
DNA	Desoxynucleic acid (Deoxynukleinsäure)
DNMT	Dinukleotidmethyltransferase
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
FFPE	Formalin fixed and paraffin embedded
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus 1
IL	Interleukin
IPAF	Ice protease-activating factor
kPEK	kutanes Plattenepithelkarzinom
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDSC	Myelo-derived-suppressor-Zellen
NALP	NLR pyrin domain containing
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NLRP	nucleotide oligomerization domain leucine rich repeat-containing
NMSC	non melanocytic skin cancer, nicht melanoz. Tumoren der Haut
NOD	nucleotide oligomerization domain

NRL	NOD-like Rezeptor
NTC	No template control
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBST	Phosphate Buffered Saline mit Tween-20
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PD-1	Programmed cell death-1
PEK	Plattenepithelkarzinom
PYD	Pyrin-Domäne
R0	Komplettresektion nach histologischer Schnitttrandkontrolle
RF	Risikofaktor
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCCO	Squamous cell carcinoma oral
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TMS1	Target of Methylation 1
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
UV	Ultraviolett
UVA	Ultraviolette Strahlung A
UVB	Ultraviolette Strahlung B

1. Einleitung

1.1 Tumoren der Haut

1.1.1 Nicht melanozytäre Tumoren der Haut (NMSC)

Nicht melanozytäre Hauttumoren bilden weltweit die häufigste Tumorgruppe mit deutlich steigender Inzidenz. Sie bildet eine heterogene Gruppe aus etwa 80 verschiedenen Tumorentitäten. Diese wachsen überwiegend zunächst lokal destruierend, unterscheiden sich aber deutlich in ihrer Metastasierungsrate und Prognose. Betrachtet man alle Hautmalignome, ist das kutane Plattenepithelkarzinom (kPEK) nach dem Basalzellkarzinom die zweithäufigste Tumorentität und umfasst etwa 20% aller kutanen Malignome (Rogers et al., 2010).

1.1.2 Plattenepithelkarzinom

Das kutane Plattenepithelkarzinom (kPEK), auch spinözelluläres Karzinom oder Spinaliom genannt, ist charakterisiert durch eine maligne Proliferation von Keratinozyten. Es wächst lokal infiltrierend und destruierend.

Meist steht der Entwicklung eines invasiven kPEK eine Präkanzerose bevor, wie die aktinische Keratose, ein Morbus Bowen oder an den Schleimhäuten eine Erythroplasie Queyrat als Carcinoma in situ (Marks et al., 1988). Histologisch zeigen sich eine Aufhebung der regelmäßigen epithelialen Schichtung, Zellatypien und eine erhöhte Proliferation der Keratinozyten, die jedoch die Basalmembranzzone respektieren und nicht invasiv wachsen.

In Mitteleuropa liegt die Inzidenz des kutanen Plattenepithelkarzinoms bei 20-30 Neuerkrankungen pro 100.000 mit deutlicher Zunahme in den letzten 30 Jahren (Gray et al., 1997). Dies wird vor allem durch eine Änderung der Lebensweisen mit erhöhter UV-Exposition und dem Erreichen eines höheren Lebensalters erklärt (Stenbeck et al., 1990).

Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose liegt bei 60 – 70 Jahren (Que et al., 2018, Xiang et al., 2014). Das kPEK tritt in 90% der Fälle auf chronisch lichtexponierter Haut und somit zumeist im Gesicht auf. Vor allem die kumulative UV-Exposition gilt als Haupt-Risikofaktor (Que et al., 2018). Die

Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms korreliert mit der örtlichen Sonnexpositionsrates und ist bei Männern etwa 1,9-mal häufiger als bei Frauen. Dies ist vor allem durch vermehrte Außenaktivitäten von Männern und die häufigere Anwendung von Sonnenschutz bei Frauen zu erklären (Xiang et al., 2014). Eine neue Risikogruppe zeigt sich in den letzten 30 Jahren: Immunsupprimierte weisen nicht nur eine dramatisch erhöhte Inzidenz auf, auch das Erkrankungsalter liegt deutlich unter dem Durchschnitt und die Metastasierungsrate ist erhöht (Liddington et al., 1989, Lindelof et al., 2000).

Die Therapie der Wahl des kPEK ist die Exzision. Lokalrezidive treten bei 3-8% der kPEK auf und Metastasierungen bei 4-5% (Deutsches Krebsregister, GEKID 2013).

Besonders durch chronische Entzündungen, wie bei vorheriger Radiatio, bei chronisch inflammatorischen Hautkrankheiten oder chronischen Wunden ist eine vermehrte *de novo* Entwicklung von kPEK UV-unabhängig beschrieben (Moy and Eliezri, 1994) (Tabelle 1).

Tabelle 1 Risikofaktoren zur Entwicklung eines kutanen Plattenepithelkarzinoms (Alam et al, NEJM 2001 und S2 Leitlinie PEK)

Umweltfaktoren: Physikalische und chemische Karzinogene	Ultraviolette Strahlung (UVA, UVB) Phototherapie (Psoralen) Ionisierende Strahlung Arsen Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe Teer Chron. Zigarettenrauch Chron. Hitzeeinwirkung
Genetische Faktoren	Hauttyp I/II
Genodermatosen mit erhöhter UV-Empfindlichkeit	Okulokutaner Albinismus Xeroderma pigmentosum Muir-Torre-Syndrom
Viral	Infektionen mit humanen Papillomviren
Immunsuppressive Therapie	Organtransplantationen Autoimmunkrankheiten

Chronische Entzündungen	Chronische Wunden Ulzera Fisteln Osteomyelitis Radiodermatitis Narben
Chronische entzündliche Hauterkrankungen	Lichen ruber mucosae Lichen sclerosus et atrophicus Epidermolysis bullosa dystrophica Lupus vulgaris
Hämatologische Grunderkrankungen	Lymphome Leukämien

1.1.3 Klinisches Bild und Differentialdiagnosen

Das kPEK zeigt sich in der Regel als eine hautfarbene bis leicht erythematöse hyperkeratotische Plaque, oftmals verrukös oder papillomatös, zum Teil ulzeriert und mit aufgelagerten hämorrhagischen Krusten. Typischerweise ist diese derb palpabel. Das klinische Bild variiert in Abhängigkeit von der Lokalisation. An UV-exponierten Arealen entwickelt sich das kPEK oftmals auf der Basis eines Carcinoma in situ und zeigt daher zu Beginn meist ein sehr flaches nur leicht hyperkeratotisches Wachstum. Zum Teil imponiert es auch unter dem Bild eines Cornu cutaneum.

Das PEK ist meist schmerzlos und weist vor allem am Kapillitium bei zunehmender Verkrustung oftmals ein eitrig fötides Exsudat auf. Im Verlauf kommt es zum knotigen Wachstum und fällt neben Schmerzen bei Ulzeration durch Missempfindungen und Nervenausfälle bei Nerveninfiltration auf. Besonders auf Schleimhäuten manifestiert sich das kPEK als Leuko- oder Erythroplakie, die sich erst im Verlauf zu einem derben Knoten entwickelt.

Abbildung 1 zeigt unterschiedliche klinische Präsentationen eines kPEK als kleine hyperkeratotische Plaque an der Ohrhelix (Abbildung 1a), eine Cheilitis actinica mit hypertropher erosiver Plaques der Unterlippe (Abbildung 1b), als multiple zum Teil konfluierende derbe hautfarbene Knoten am Hals (Abbildung

1c) oder auch als solitärer großer zentral ulzerierter Knoten am Unterkiefer (Abbildung 1d).



Abbildung 1 *Unterschiedliche klinische Bilder des kutanen Plattenepithelkarzinoms*

Differentialdiagnostisch kommen beim Plattenepithelkarzinom je nach klinischer Darstellung verschiedene Erkrankungen in Betracht: Initial und bei sehr flachem Wachstum ist es vor allem von Carcinomata in situ wie aktinischen Keratosen oder ein M. Bowen abzugrenzen. Bei sehr schnellem, knotigem Wachstum muss besonders bei jungen Patienten das Keratoakanthom differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden. kPEK und Keratoakanthome sind sowohl klinisch als auch histologisch oftmals schwer abzugrenzen, so dass das Keratoakanthom auch als Variante eines kPEK angesehen wird (Leblebici et al., 2017). Bei älteren Patienten, insbesondere bei knotigem Wachstum im Gesicht kann das kPEK leicht mit einem Basalzellkarzinom verwechselt werden. Auch das Bild eines

Merkelzellkarzinoms oder Talgdrüsenkarzinom kann dem eines kPEK ähneln. Auch gutartige Hautveränderungen, wie eine Psoriasis, eine Verruca seborrhoica oder vulgaris können das klinische Bild imitieren. Im Zweifelsfall sollte stets eine Biopsie zur Diagnosesicherung entnommen werden. Klinische Beispiele der Differentialdiagnosen sind in Abbildung 2 dargestellt.

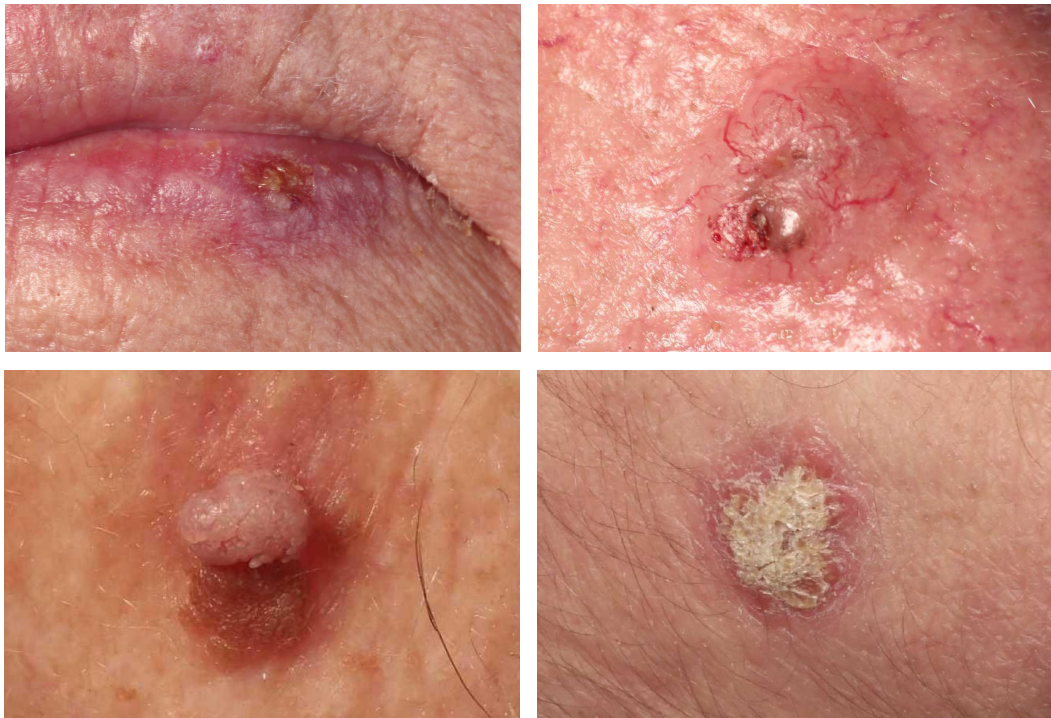


Abbildung 2 Differentialdiagnosen des Plattenepithelkarzinoms und das klinische Erscheinungsbild (Bilddatenbank der Hautklinik Tübingen): Von oben links beginnend im Uhrzeigersinn: aktinische Keratose, Basalzellkarzinom, Verruca vulgaris, Psoriasis vulgaris

1.1.4 Histologie

Das kutane PEK entspricht histologisch von der Epidermis (bzw. dem Schleimhautepithel) ausgehenden meist strangförmig in die tiefe Dermis und Subkutis ziehenden Keratinozyten. Sie weisen je nach Differenzierung einen unterschiedlichen Anteil an atypischen pleomorphen Zellen mit Hyperchromasie, Kernpolymorphien und Mitosen auf. Die Basalmembran ist durchbrochen. Gut differenzierte kPEK weisen im Tumorparenchym oftmals konzentrisch angeordnete parakeratotische Keratinozyten auf, die Hornperlen bilden. Meist ist ein den Tumor umgebendes lymphozytäres Infiltrat zu sehen.

Etwa 6% der Tumore weisen ein perineurales Wachstum auf. Diese sind häufiger bei Tumoren des Gesichts (Leibovitch et al., 2005) und mit sehr viel häufigeren Rezidiven assoziiert (Karia et al., 2017).

Histologisch werden gemäß der WHO Klassifikation folgende Subtypen des kutanen Plattenepithelkarzinoms unterschieden (Petter and Haustein, 2000):

1. Spindelzelliges Plattenepithelkarzinom der Haut: aggressives Wachstum, Ulzeration, spindelige Zellen
2. Akantholytisches (pseudoglanduläres) Plattenepithelkarzinom der Haut: Als Folge der Dyskeratose zeigen sich pseudoglanduläre Strukturen und eine ausgeprägte Akantholyse
3. Verruköses Plattenepithelkarzinom der Haut: papillomatös mit Akanthose, exophytisch (bzw. endophytisch), infiltrativ, nicht metastasierend
4. Plattenepithelkarzinom mit Hornbildung
5. Lymphoepitheliomartiges Plattenepithelkarzinom der Haut:

Das desmoplastische Plattenepithelkarzinom ist bei dieser Klassifikation nicht mit aufgenommen, sollte der Vollständigkeit halber aber auch erwähnt werden und hat einen hohen Anteil an desmoplastischem Stroma, Stränge atypischer Zellen und eine hohe Rezidiv- und Metastasierungsrate (Breuninger et al., 1997).

1.1.5 Klassifikation

Um das Risiko von Lymphknoten- und Fernmetastasierung besser abschätzen zu können, wurden klinisch-histologische Einteilungen etabliert. Diese sind neben etwaigen Tumortherapien vor allem für eine kontrollierte Nachsorge von großer Relevanz um Patienten stadiengerecht sowohl klinisch als auch apparativ nachzusorgen und das Metastasierungsrisiko einschätzen zu können. Die Stadieneinteilungen für das PEK der Haut orientierten sich traditionell an der TNM-Klassifikation, der Bewertung des Primärtumors (T), der regionalen Lymphknoten (N) und der Fernmetastasierung (M). Die aktuelle Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2010, 7.Auflage bzw. 8. Auflage (aktuell in press)) verfügt über 5T-Kategorien, 4N- und 2M-Kategorien (Canueto and Roman-Curto, 2017).

Im Gegensatz zum malignen Melanom, bei dem die T-Einteilung sich vorwiegend nach der vertikalen Tumordicke nach Breslow richtet, spielt die messbare vertikale Eindringtiefe in der T-Klassifikation des PEKs eine geringe Rolle. T1- und T2-Tumor werden stattdessen nach der horizontalen Tumorausdehnung von kleiner bzw. größer 2 cm und möglichen Risikofaktoren unterschieden. Die Risikofaktoren, die durch die systematische Auswertung klinischer Studien bestimmt wurden, beinhalten sowohl histopathologische (perineurales Wachstum, histologischer Differenzierungsgrad, „Clark level“ >IV, Breslow-Tumordicke > 2 mm) als auch anatomische (Lokalisation Lippe oder Ohr) Kriterien.

Während T1 und T2 sich durch die Risikofaktoren und/oder die horizontale Tumorausdehnung unterscheiden, sind T3- oder T4-Tumore durch eine Knocheninfiltration der Kalotte, Orbita oder Kieferknochen definiert, sodass der Anteil der T3- und T4-Tumore unter allen Plattenepithelkarzinomen sehr gering ist (Meier and Yazdi, 2013).

Daraus resultieren diverse alternative Tumor-Staging-Systeme. Tabelle 2 stellt die Klassifikationen der AJCC und exemplarisch die Alternativklassifikation von Breuninger et al (Breuninger et al., 2012) dar.

Tabelle 2 Klassifikationen der AJCC und exemplarisch die Alternativklassifikation von Breuninger et al (Breuninger et al., 2012) (T1-T4 = Tumor 1-4, RF = Risikofaktoren)

	AJCC (7.Auflage, 2010)	Breuninger et al.
T1	Tumordurchmesser ≤ 2 cm mit <2 Risikofaktoren (RF)	cT(„low risk“): Tumordurchmesser ≤ 2 cm pT („no risk“): Tumordicke (Breslow) ≤ 2 mm
T2	Tumordurchmesser > 2 cm mit 0 oder 1 RF oder: > 2 RF ohne Berücksichtigung des Tumordurchmessers	pT(„low risk“): Tumordicke (Breslow) 2 – 6mm
T3	Knocheninfiltration der Kieferknochen,	cT („high risk“): Tumordurchmesser

	der Orbita oder des Temporalbeins	> 2 cm pT („high risk“): Tumordicke (Breslow) > 6 mm
T4	Knocheninfiltration des Schädelknochens, auch durch perineurales Wachstum	
RF	Tumordicke (Breslow) > 2 mm; „Clark Level“ > IV; perineurales Wachstum; Lokalisation Ohr oder Lippe; histologisch Entdifferenzierung	Immunsuppression, histologisch Entdifferenziert/ Desmoplasie; Lokalisation Ohr

Broders veröffentlichte 1920 erstmalig eine Arbeit, die den Differenzierungsgrad in Klassen einteilte, um so die Prognose und Therapie anhand der Zelldifferenzierung zu stellen (Broders, 1921). Angelehnt an Broders Klassen wird jetzt eine dreistufige Einteilung (Tabelle 3) der Differenzierung in gut (<25% undifferenzierte Zellen), mäßig (<50% undifferenzierte Zellen) und schlecht differenzierte Plattenepithelkarzinome (>75% undifferenzierte Zellen) angewandt. Zur Beurteilung werden unter anderen die Kernpleomorphie, atypische Mitosen und der Grad der Keratinisierung mit entsprechender Verhornung herangezogen.

Tabelle 3 Differenzierungsgrade nach Broders (Broders, 1921)

	Differenzierung	Anteil undifferenzierter Tumorzellen
Gx	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar	
G1	Gut differenziert	< 25%
G2	Mäßig differenziert	< 50%
G3	Schlecht differenziert	≥ 75%
G4	Undifferenziert	> 75%

In unserer Studie wurde das Grading-System nach Broders leicht modifiziert, in dem Broders G3 und G4 zusammengefasst in einer Gruppe sind. Somit zeigen

gut differenzierte Tumoren hatten einen Anteil von < 25% dedifferenzierter Zellen (G1), G2 Tumoren weisen einen Anteil von 25 – 50% dedifferenzierter Zellen auf und G3 haben einen maximalen Anteil differenzierter Zellen von 50%, entsprechend Broders G3 und G4.

1.1.6 Prognose

Da wie oben beschrieben keine einheitliche Klassifikation vorliegt, ist das Vorhanden möglicher Risikofaktoren für die Prognose bedeutsam. Tabelle 4 fasst die prognostisch relevanten Risikomerkmale des kPEK zusammen. So zeigen kPEK der Ohrhelix und der Unterlippe mit einer Metastasierungsrate von 10% bzw. 8% eine schlechtere Prognose als die anderen Lokalisationen (Metastasierungsrate 6%) (Breuninger and Hawlitschek, 1995).

Die klinische Angabe einer eventuellen Immunsuppression ist von hoher Bedeutsamkeit. Lokalrezidive werden als prognostisch schlecht eingestuft und Nachsorgeregime laufen sehr viel engmaschiger ab (Eigentler et al., 2017, Eroglu et al., 1996).

Sowohl die horizontale als auch die vertikale Ausdehnung des Tumors sind von Bedeutung, da die Rezidivrate in Abhängigkeit von der Tumordicke (Tabelle 5), und das Metastasierungsrisiko mit zunehmender Tumorgöße (Tabelle 6) steigt (Brantsch et al., 2008).

Tabelle 4 Basismerkmale eines kPEK zur Risikoabschätzung (Stratigos et al., 2015, Brantsch et al., 2008)

Lokalisation
Histologischer Tumortyp/ Desmoplasie
Histologischer Differenzierungsgrad
Maximale Tumordicke
Clark Level
Klinische Tumorgöße
Rezidivtumor
Perineurales Wachstum
Immunsuppressive Therapie

Einbruch in Lymph- oder Blutgefäße
Resektionsränder R0/ R1
Minimaler Sicherheitsabstand

Tabelle 5 Rezidivraten kPEK in Abhängigkeit von der Tumordicke (Brantsch et al., 2008)

	Tumordicke (Breslow)	Rezidivrate
No Risk / T1	≤ 2,0 mm	0% (0/107)
Low Risk / T2	2,01 – 6mm	4% (12/318)
High Risk / T3	≥ 6mm	16% (14/90)

Tabelle 6 Metastasierungsrisiko kPEK nach der klinischen Tumorgroße (Brantsch et al., 2008)

Tumorgroße (klinisch)	Metastasierungsrisiko
Low Risk ≤ 2 cm	2% (8/425)
High Risk > 2 cm	9% (18/190)

1.2 Pathophysiologie des kPEKs

1.2.1 Arten der Tumorentstehung

In der normalen Zelle finden eine Vielzahl von Reparaturprozessen von DNA-Schädigungen (Mutationen und epigenetische Veränderungen) statt. Diese Schädigungen entstehen zum einen durch exogene Noxen wie chemische Agentien, ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung, Viren oder Bakterien. Zum anderen kann es durch die Zellreplikation zu DNA-Schäden kommen bei denen der Reparaturmechanismus versagt und es folgend zu Mutationen kommt. Man nimmt an, dass ein Großteil der Veränderungen an der DNA durch exogene Noxen verursacht ist.

Knudson hatte 1971 die „Two-Hit-Hypothese“ in der Karzinogenese formuliert, die Nordling bereits 1953 postulierte (Knudson, 1971, Nordling, 1953). Hiernach führt eine Kombination mehrerer Veränderungen im genetischen Code zur Malignomentstehung. Nordling und Knudson zeigten anhand des Retinoblastoms, dass die Schädigung eines Allels nicht zur Tumormanifestation

ausreicht. Erst nach Verlust der Heterozygotie mit der Mutation des zweiten Allels kam es zur unkontrollierten Proliferation (Knudson, 1971). Überträgt man diese Hypothese nun auf epigenetische Veränderungen, so muss der „Hit“ nicht auf einer Mutation des genetischen Codes basieren, sondern vielmehr auf dem An- oder Abschalten bestimmter Gene durch epigenetische Veränderungen, vermittelt z.B. durch Methylierungen. So konnte in vielen Tumorzellen gezeigt werden, dass bei bestehender Mutation eines Allels, die Promotorregion des anderen oftmals hypermethyliert ist und somit nur die Expression des mutierten Allels stattfindet (Myohanen et al., 1998, Grady et al., 2000).

1.3 Epigenetik

Waddington prägte 1942 erstmals den Begriff der Epigenetik mit dem von ihm postulierten Modell der „epigenetischen Landschaft“ (Waddington, 1942). Hierbei zeigte er ein Modell bestehend aus Hügeln und Tälern, in dem er Murmeln von den höchsten Punkten der Landschaft herunterrollen ließ. Das Herunterrollen symbolisierte die Entwicklung. Nahm eine Murmel einen Pfad auf, so änderte sich dieser nur, wenn die Einflüsse von außen stark genug waren, dass ein anderer Pfad gewählt wurde. Die Murmel rollte stetig weiter bis sie im Tal angekommen und am Ende ihrer Entwicklung stehen blieb. Zu der Zeit des Landschaftsmodells war die Struktur der DNA weitgehend unbekannt. Unser heutiges Verständnis der Epigenetik umfasst wie auch bei Waddington eine Reihe von Einflüssen, die die Entwicklung beeinflussen, ohne den genetischen Code (im Modell der Murmel entsprechend) zu verändern.

Die Epigenetik befasst sich somit mit der Aktivität der Gene und der Steuerung der Expression ohne die eigentliche DNA-Sequenz zu verändern. Hierbei handelt es sich nicht um Mutationen, also strukturelle Veränderungen der DNA-Sequenz, sondern um biochemische Modifikationen entlang der DNA und Chromatinstruktur die auch an Tochterzellen weitergegeben werden können. Zu den wichtigsten epigenetischen Veränderungen gehören die Seitenkettenmethylierung oder -acetylierung von Histonen, nicht kodierende RNA-Abschnitte, sowie die Methylierung von Cytidin-Basen in Cytosin-Guanosin-reichen Regionen.

1.3.1 DNA-Methylierung

Die Methylierung der DNA, nicht zu verwechseln mit der Histon-Methylierung, ist Teil varianter Zellprozesse, unter anderem in der Embryonalentwicklung, bei der Inaktivierung des X-Chromosoms, beim Genomic imprinting und ein wichtiger Teil der chromosomalen Stabilität.

Für die Methylierung im menschlichen Genom wurden vorherrschend zwei Enzyme beschrieben: DNMT1 (Dinukleotidmethyltransferase 1) dient der Beibehaltung von bereits bestehenden Methylierungen und fügt diese nach jeder Replikation erneut ein. DNMT3a und DNMT3b führen zu de novo Methylierungen und sind besonders in frühen Entwicklungsstadien aktiv (Goll and Bestor, 2005).

Ein Großteil der CpG (Desoxycytidin – Phosphorsäure – Desoxyguanosin)-Dinukleotide im menschlichen Genom sind methyliert. Unmethylierte Bereiche befinden sich im somatischen Bereich in den sogenannten CpG-Inseln die meist mit einem Gen assoziiert sind und deren Promotorregion beinhalten und einen ungewöhnlich hohen Anteil an 5'-CpG-3' haben (Gardiner-Garden and Frommer, 1987).

Bei der Promotorregionmethylierung wird mit Hilfe von Methyltransferasen am Ring des Cytosin am 5. Kohlenstoff Atom eine Methylgruppe (CH₃) angehängt: Es entsteht ein 5-Methylcytosin. Daneben liegt in der Regel ein Guanin, sodass zwei methylierte Cytosine zweier DNA-Stränge diagonal zueinander liegen. Hierdurch kommt es zu einer kondensierten und damit nicht mehr ablesbaren Chromatinstruktur und das folgende Gen kann folglich nicht mehr transkriptionell erfasst werden (Jaenisch and Bird, 2003), (Wolffe and Guschin, 2000).

Embryonal sind multiple de novo Methylierungen nachweisbar, die im Laufe der weiteren Differenzierung stark abnehmen. Später sind de novo Methylierungen fast ausschließlich in alternden Zellen und Tumoren nachweisbar (Baylin et al., 1998, Issa, 1999). Der erste Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Methylierungen und Tumorentstehung war eine signifikant geringere Konzentration von 5-Methylcytosin in der DNA von Tumorzellen eines hepatozellulären Karzinoms im Vergleich zu Normalgewebe (Issa, 1999).

Während der Karzinogenese wird das Genom der jeweiligen Tumorzellen weitestgehend demethyliert. Diese verminderte Methylierung ist überall, jedoch nicht in den CpG-Inseln zu finden, wo im Gegensatz zu einer normalen Zelle eine vermehrte Methylierung nachgewiesen werden kann (Feinberg and Vogelstein, 1983).

1.3.2 Methylierung und therapeutische Ansätze

Die ungewöhnlich hohe Anzahl an DNA-Methylierungen in CpG-Promotorregionen und die damit einhergehende Hemmung der Transkription und damit verbundener Verlust der Genfunktion gehören zu den am besten untersuchten epigenetischen Veränderungen bei Tumoren (Baylin et al., 1998, Esteller, 2008).

Dies wird auch therapeutisch genutzt, denn 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Decitabin) und 5-Azacytidin (Azacitidin) können die Promotorregionen demethylieren und so die Expression des Gens wiederherstellen, welche durch Methylierung zuvor abgeschaltet wurde (Jones and Taylor, 1980).

Zugelassen sind momentan Azacitidin und Decitabin. Azacitidin (Handelsname Vidaza®) hat eine Zulassung für das myelodysplastische Syndrome (MDS), die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) und die akute myeloische Leukämie (AML) bei Patienten, die nicht für eine Knochenmarktransplantation in Frage kommen. Decitabin (Handelsname Dacogen®) ist in Europa für die Therapie bei AML verfügbar.

1.4 Apoptosis associated Speck like Protein containing a caspase recruitment domain (CARD)

Das Apoptosis associated speck like Protein containing a CARD (ASC) oder auch Target of Methylation induced Silencing 1 (TMS1), sowie PYCARD genannt, liegt auf Chromosom 16p11.2-12.1 und kodiert für ein 22kDA-großes Protein (Abbildung 4).

ASC wurde erstmals von Matsumoto et al 1999 in humanen Leukämiezellen (HL-60) beschrieben. Diese überexprimieren die DNA Methyltransferase 1. Nach Apoptoseinduktion zeigte sich im Zytosol dieser Zellen ein Körnchen-ähnliches ("Speck-like") kernnahes Aggregat, wie in Abbildung 3 dargestellt.

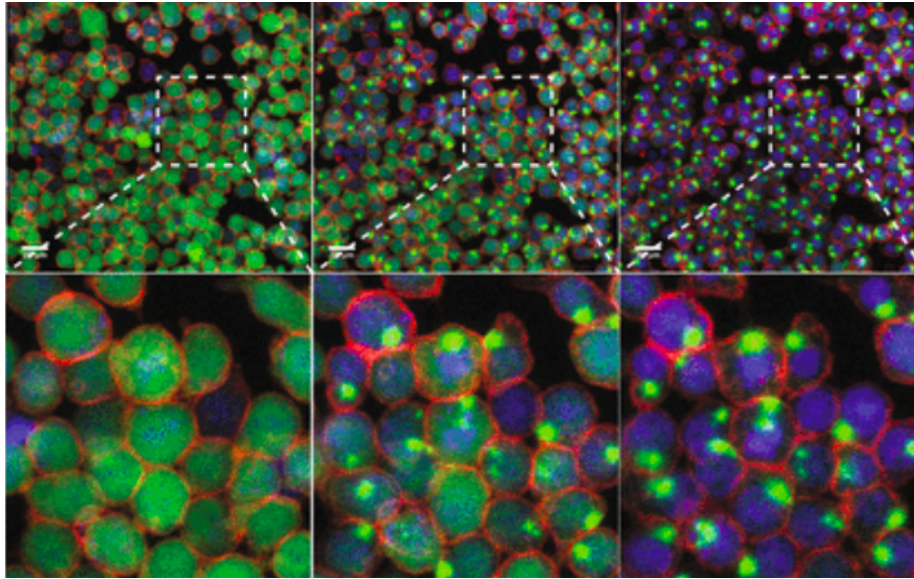


Abbildung 3 *Formation von ASC-Aggregaten nach Stimulation von humanen ASC-mCerulean-exprimierenden THP-1 Monozyten mit LPS und Nigericin. Rot: Plasmamembran, blau: Nuklei, grün: ASC-mCerulean. Die Abbildung zeigt einen zeitlichen Ablauf der Speck-like-Formation über zehn Minuten von links nach rechts. Die Graphik entstammt der Originalarbeit (Beilharz et al., 2016)*

Dessen vermindertes Vorkommen konnte mit einem schlechteren Ansprechen auf die Apoptoseinduktion mit Etoposid korreliert werden (Masumoto et al., 1999).

Die zwei verschiedenen Namen entstanden, als unabhängig von Matsumoto zeitgleich ASC als Target of Methylation 1 (TMS1) in humanen Fibroblasten beschrieben wurden. Diese exprimierten TMS1 im Unterschied zu anderen Fibroblasten, bei denen eine Überexpression von DNA-Methyltransferase-1 vorhanden war (Conway et al., 2000).

Die ASC-Proteinexpression konnte immunhistochemisch unter anderem im Plattenepithel der Haut, dem Epithel der Nierentubuli, dem Drüsengewebe des Kolons, in Makrophagen wie auch in neutrophilen Granulozyten (Masumoto et al., 2001, de Koning et al., 2012) nachgewiesen werden.

ASC verfügt über zwei verschiedenen Bindedomänen, die nach Interaktion mit jeweiligen Effektorproteinen einen aktiven Komplex bilden und somit Hinweise auf die jeweiligen Funktionen geben: eine Caspase Recruitment Domäne (CARD), die proapoptotisch wirkt und eine Pyrin-Domäne (PYD), die im NF- κ B

Signalweg involviert ist (Masumoto et al., 2003). Die CARD-Domäne liegt am C-Terminus, die PYD Domäne am N-Terminus von ASC. Diese sind dreidimensionale Strukturen, die dort eine Protein-Protein-Bindung ermöglichen. Sie bestehen jeweils aus sechs bis sieben alpha-Helices, die gegenläufig um einen hydrophoben Kern laufen (Weber and Vincenz, 2001). Die Interaktion findet typischerweise zwischen zwei Proteinen statt, die beide eine CARD-Domäne, bzw. beide eine PYD-Domäne beinhalten. Diese beiden bilden jeweils eine Bindedomäne, die Teil einer 6-helix bundle death domain superfamily sind und in Proteinen vorkommen, die bei apoptotischen und inflammatorischen Prozessen mitwirken (McConnell and Vertino, 2004).

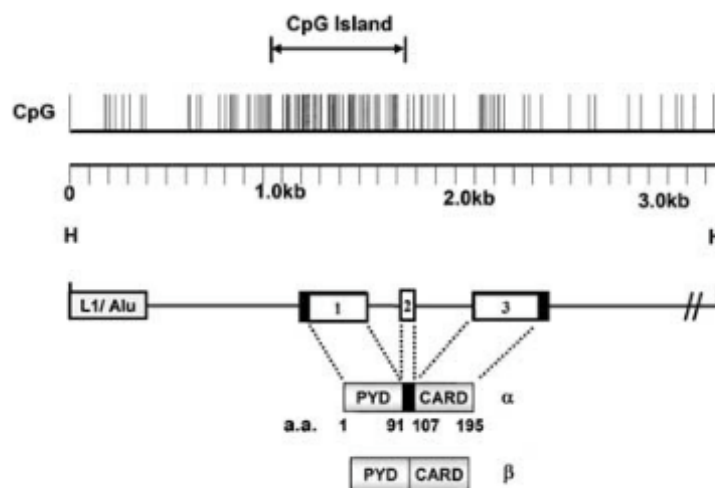


Abbildung 4 Proteinstruktur und Genlokus von ASC. Offene Boxen zeigen Exons. Es sind zwei Varianten beschrieben, die α - und die β -Variante, mit ähnlicher Expression. Die Graphik entstammt der Originalarbeit (McConnell and Vertino, 2004)

In mehreren Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Deacetylierung der Histone und die damit verbundene Änderung der Chromatinstruktur bei der Hemmung der Transkription von ASC keine Rolle spielt, da die Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A keine Induktion der Genexpression erbrachte (Das et al., 2006).

1.4.1 Inflammasom

Eine Vielzahl von Proteinen mit einer CARD Domäne spielt eine Rolle in der inflammatorischen Antwort auf zelluläre Stressoren, Bakterien oder Viren. Mittels seiner CARD-Domäne kann ASC an die CARD-Domäne von Caspasen

über CARD-CARD Interaktionen binden und so Pro-Caspasen (z.B. Pro-Caspase-1) autoproteolytisch in ihre aktive Form überführen. Um ASC und Pro-Caspase zusammenzubringen, ist die Bildung eines großen intrazellulären Komplexes zusammen mit einem NOD-like Rezeptor (NLR) (nucleotide oligomerization domain leucine rich repeat-containing Protein, NLRP, NOD-Like Rezeptor mit einer PYD-Domäne; NLRC, NOD-Like Rezeptor mit einer CARD-Domäne, NALP, nucleotide binding leucine rich Protein mit einer PYD-Domäne) notwendig. Dieser Komplex nennt sich Inflammasom und wurde erstmalig von Jürg Tschopp beschrieben (Martinon et al., 2002).

Die NLR sind wie auch Toll-like Rezeptoren (TLR) wichtige Immunrezeptoren. Von den zahlreichen beschriebenen NLR agieren die meisten ASC-unabhängig, da diese eigene PYD- oder CARD-Domänen besitzen. Aktuell sind vier Inflammasome gut untersucht, die ASC als Bindeprotein nutzen: NLRP3, NLRP1, NLRC4 (CARD12, IPAF) und AIM-2 (Davis et al., 2011, Mariathasan et al., 2004, Martinon et al., 2002). Sie unterscheiden sich hinsichtlich der jeweiligen Stimuli durch die sie mit der Inflammasomformation reagieren und gehören zur Gruppe der intrazellulären Pattern recognition Rezeptoren des Immunsystems. Diese reagieren auf eine ganze Bandbreite verschiedener Signale. Als Stimuli dienen sogenannte Pathogen associated molecular patterns (PAMP), wozu bakterielle Lipopolysaccharide, Flagellin sowie Lipoteichonsäure gehören. Aber auch bei Zellstress oder Verletzungen werden sogenannten DAMPs (Danger-associated molecular pattern) freigesetzt. Beispiele hierfür sind HMGB1, DNA oder RNA außerhalb des Nukleus der Mitochondrien oder auch S100A Proteine (Schroder and Tschopp, 2010).

Der Inflammasomaktivierung liegen zwei Schritte zu Grunde (Abbildung 4): Zunächst führt eine Stimulation von NF κ B (z.B. nach TLR-Stimulation) zur Transkription der einzelnen Inflammasomkomponenten (Latz et al., 2013), die dann wiederum durch eine Vielzahl von weiteren Faktoren (2. Schritt) zur Aktivierung und Komplexbildung führen (Bauernfeind et al., 2009). Hierbei bindet der jeweilige NLR an ASC über die PYD-Bindung, welches dann über die CARD Domäne Pro-Caspase-1 bindet und in biologisch aktive Caspase-1 spaltet. Diese aktivierte Protease besteht aus zwei Untereinheiten: einem

20kDa (p20) großen Heterodimer und einem 10kDa (p10) großen Teil, welche zusammen die katalytische Domäne bilden. Im weiteren Verlauf werden unter anderem die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 in ihre biologisch aktive Form konvertiert. IL-1 β wird aus der Zelle geschleust und triggert eine lokale oder auch systemische Entzündung durch Bindung an den IL-1-Rezeptor-1(Abb. 5).

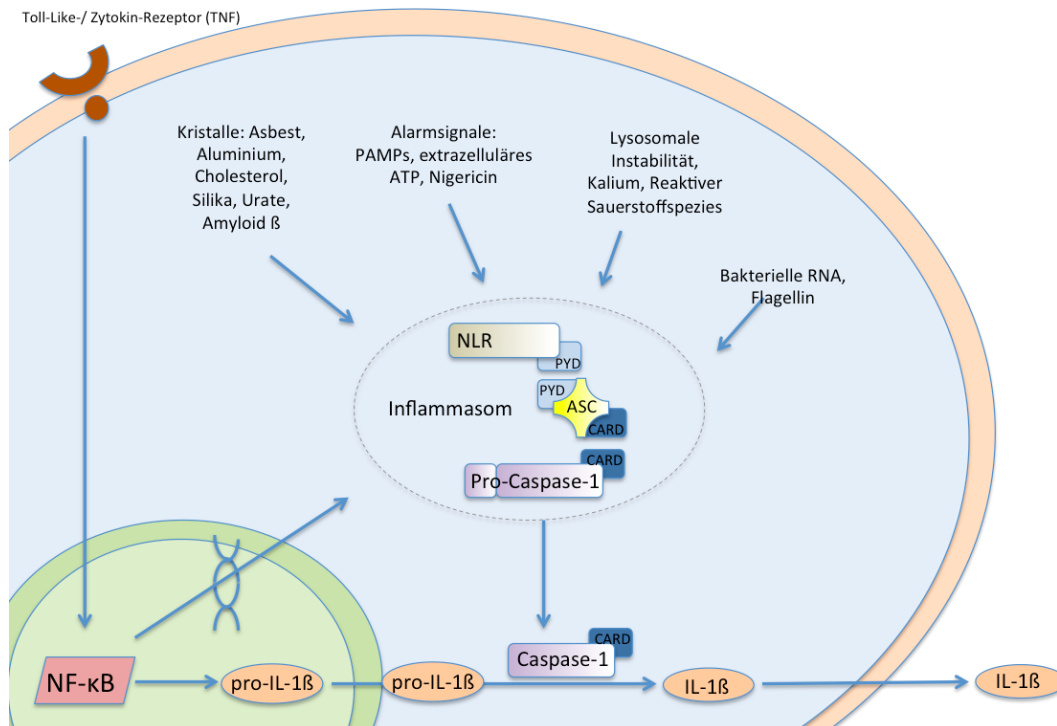


Abbildung 5 Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und von IL-1 β (angelehnt an Invivogen)

Das am besten untersuchte Inflammasom ist das NLRP3, auch NALP3 oder Cryopyrin genannt. Es wird mit einer Bandbreite verschiedener steriler Entzündungsprozesse assoziiert, wie beim Diabetes mellitus Typ II oder der Atherosklerose (Düwell et al., 2010, Jourdan et al., 2013) oder über zahlreiche DAMPs aktiviert (Abbildung 5), so auch von UVB-Strahlung.

Neben der Prozessierung von IL-1 β wird zudem das ebenfalls inflammatorisch wirkende IL-18 aktiviert. Zudem ist die Caspase-1 in der Lage Gasdermin-D zu spalten. Dies Protein kommt sowohl in den Geweben des Gastrointestinaltrakts wie auch in der Haut vermehrt vor (Shi et al., 2015). Nach Inflammasomaktivierung oder durch zytosolisch vorkommende

Lipopolysaccharide kommt es folgend zu einer Spaltung von Gasdermin-D an einer spezifischen Caspase-Recognition-Site. Gasdermin-D, welches sonst in einer autoinhibierenden Ringstruktur vorliegt, öffnet dann die N-terminale Seite (Gasdermin-N) und kann hiermit an die Lipide der Zellmembran binden und führt so zu einer Perforation der Membran (Ding et al., 2016). Dieser unmittelbar zum Zelltod führende Prozess nennt sich Pyroptose und umfasst im Unterschied zur klassischen Apoptose eine gleichzeitige inflammatorische Antwort über IL-1 β und IL-18.

1.4.2 ASC bei Tumor und Entzündung

Die Rolle des Inflammasoms ist bei entzündlich-bedingten Krankheiten wie Gicht oder bei hereditären Fiebersyndromen sehr gut untersucht, seine Rolle im Rahmen der Tumorgenese bleibt jedoch nach wie vor unklar. Das vermehrte Vorkommen von Promotor-spezifischen Methylierungen in Tumorzellen sowie die strenge Assoziation mit pro-apoptischen Signalwegen führte zu Untersuchungen von ASC in multiplen Tumoren. Conway et al zeigten zunächst eine fehlende Expression von ASC in Zelllinien, die aus Mammakarzinomen generiert wurden, gegenüber normalen Brustepithelzelllinien (Conway et al., 2000). Später wurde in zahlreichen Neoplasien eine vermehrte Methylierung von ASC nachgewiesen: Im Prostatakarzinom (Das et al., 2006), im Malignen Melanom (Guan et al., 2003), beim Glioblastoma multiforme (Stone et al., 2004), dem kleinzelligen und nicht kleinzelligem Lungenkarzinom (Virmani et al., 2003), beim Mammakarzinom (Conway et al., 2000), Ovarialkarzinom (Terasawa et al., 2004) und Cholangiokarzinom (Liu et al., 2012). Allen diesen Tumoren war gemeinsam, dass die vermehrte Methylierung von ASC tumorgewebespezifisch war und in gesundem Gewebe keine Methylierung nachweisbar war. Dies weist neben der Funktion des Inflammasoms bei der Entzündungskaskade vielleicht auf eine zusätzliche tumorsuppressive Rolle von ASC hin. Die genaue Rolle des Inflammasoms und von ASC bei der Tumorprogression bleibt jedoch nach wie vor unklar, da je nach Tumorart, Zelltyp, Tumorstadium und Tumormilieu unterschiedliche, zum Teil gegenläufige Funktionen beschrieben.

Erstmalig wurde 2010 bei Caspase-1-, ASC-, sowie auch NLRP3-defizienten Mäusen eine erhöhte Inzidenz von Darmtumoren gezeigt (Allen et al., 2010). Im Maus-Modell von "inflammation induced" kPEK zeigte sich, dass DMBA (1,3-Dimethylbutylamin)/ TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) -induzierter Hautkrebs IL-1-abhängig ist. Sowohl IL1R1- wie auch Caspase-1-defiziente Mäuse zeigten eine reduzierte Tumorzinzidenz. Erstaunlicherweise waren ASC-defiziente Mäuse nicht vor vermehrten Tumoren geschützt und zeigten keinen Unterschied zu Wildtyp-Mäusen (Drexler et al., 2012). Um diese Beobachtung weiter zu differenzieren, wurde die Funktion von ASC zum einen in Keratinozyten und zum anderen in myeloiden Zellen untersucht. Hier wurden Mäuse, die kein ASC in myeloiden Zellen exprimierten (ASC.ko^{ff-LysM-Cre+}) mit Mäusen verglichen, die bei normalen myeloiden Zellen jedoch in Keratinozyten kein ASC aufwiesen (ASC.ko^{ffK14-Cre+}). Die Mäuse, denen ASC in Keratinozyten fehlten, bekamen deutlich mehr Tumoren als die Kontrollgruppe, fehlte ASC aber in den myeloiden Zellen wurden diese Mäuse vor Tumoren geschützt. ASC könnte somit eine bimodale, Zelltyp-spezifische Rolle in der Tumorgenese spielen.

2. Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle von ASC beim kutanen Plattenepithelkarzinomen untersucht werden. Insbesondere, ob eine durch Methylierung in den Tumorzellen vermittelte tumorsuppressive oder tumorproliferative Funktion dominiert.

Von klinischem Interesse war, ob die ASC-Methylierung als prognostischer Marker für Differenzierung, Tumorinfiltration oder Metastasierung dient und ob diese Methylierung reversibel ist, um ASC gegebenenfalls zukünftig als therapeutisches Target nutzen zu können.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Retrospektiv wurden die histologischen Präparate von 72 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Hautklinik der Eberhard-Karls-Universität analysiert. Alle Patienten wurden an der Hautklinik Tübingen operiert und nachbeobachtet. Das FFPE-fixierte Gewebe (Formalin fixed and paraffin embedded) wurde zunächst nach unterschiedlicher Differenzierung sortiert und mit gleicher Tumordicke gepaart. Von den 72 Patienten wiesen siebzehn ein bereits metastasiertes Tumorstadium auf. Die Informationen wurden nach Zustimmung der Ethik-Kommission (Ethikvotum 317/2016BO2) aus den Gesundheitsakten der Patienten des SAP-Patientensystems des Universitätsklinikums Tübingen generiert. Die Patienten, deren Proben nach 2011 gewonnen wurden, gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Ferner wurden als Kontrollgruppe Präparate von Patienten mit Basalzellkarzinomen und Condylomata acuminata aus dem Archiv der Histologie der Hautklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen entnommen. Präparate gesunder Haut, sowie die Keratinozyten wurden aus gesunder Haut nach histologischer R0-Resektion von Hauttumoren aus überschüssigem Gewebe („Öhrchen“) beim Wundverschluss aus dem OP der Hautklinik gewonnen.

Der Differenzierungsgrad wurde in gut differenziert (G1) und schlecht differenziert (G3) angegeben und erneut ohne Kenntnisse des Vorbefundes von einem Dermatohistologen klassifiziert. In unserer Studie wurde das Grading-System nach Broders leicht modifiziert, in dem Broders G3 und G4 zusammengefasst in einer Gruppe sind. Somit zeigen gut differenzierte Tumoren hatten einen Anteil von < 25% dedifferenzierter Zellen (G1), G2 Tumoren weisen einen Anteil von 25 – 50% dedifferenzierter Zellen auf und G3 haben einen maximalen Anteil differenzierter Zellen von 50%, entsprechend Broders G3 und G4.

3.2 Reagenzien/ Materialien

3.2.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Superfrost Objektträger	Thermo Scientific
12-Well-Platten	Corning
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml & 2 ml	Eppendorf
Falcon 50 ml	Greiner
Zählkammer (C-Chip Einmalzählkammer)	NanoEnTek
Zellkulturschalen	Greiner
RT-PCR	Biozym
Pipettenspitzen (Safeseal Tips)	Biozym

3.2.2 Nährmedien

DMEM	Biochrom
RPMI	Biochrom
Penicillin/ Streptomycin (P/S)	Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
CnT-Medium	CellnTec

3.2.3 Puffer und Lösungen

Ethanol	Merck
DMSO	Applichem
Trypan blau	gibco (Life Technologies)
TBE-Puffer (einfach) (für Agarose)	89mM TRIS Base 10,8 g 89mM Borsäure 5,5 g 2mM EDTA-Na ₂ 0,7 g ad 1000 ml mit Aqua dest auf pH 8 einstellen
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Tris-Tween-Puffer	Tris Basic 60,55 g NaCl 87,66 g

	Aqua dest	900 ml
	Tween 20	500 µl
	mit HCl auf pH 7,6 einstellen	
Lysepuffer	1 mM EDTA (aus 0,5 M Stocklsg.)	100 µl
	0,005 % Tween-20	2,4 µl
	0,5 % Triton X-100	250 µl
	5 mM NaF (aus 0,5 M Stocklsg.)	500 µl
	6 M Urea	18 g
	dH ₂ O	ad 50 ml
	→ davon 10 ml + 1 Tablette Complete Protease Inhibitor (Roche)	
2xSDS-Probenpuffer	10 % Glycerin	1 ml
	100 mM DTT	0,7 g
	2 % SDS	0,2 g
	0,01 % Bromphenolblau	0,001 g
	125 mM Tris-HCl pH 6,8 (aus 0,5 M Stocklsg.)	2,5 ml
	dH ₂ O	ad 10 ml
10x SDS-Page Laufpuffer	250 mM Tris	30 g
	2 M Glycin	144 g
	pH 8,3 – 8,5 mit HCl einstellen	
	1 % SDS	10 g
	dH ₂ O	ad 1000 ml
Trenngelpuffer	1,5 M Tris	18,17 g
	0,4 % SDS (aus 10 % Stocklsg.)	4 ml
	pH 8,8 mit HCl einstellen	
	dH ₂ O	ad 100 ml
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris	6,06 g
	0,4 % SDS (aus 10 % Stocklsg.)	4 ml
	pH 6,8 mit HCl einstellen	
	dH ₂ O	ad 100 ml

PBST	0,1 % Tween-20 PBS	500 µl 500 ml
Citratpuffer 10mM pH 6,0	Stammlösung A 0,1M Citronensäure Monohydrat $C_6H_8O_7 \times H_2O$ 2,101 g in 100ml a.d. 1,35 ml Stammlösung B tri-Natriumcitrat-Dihydrat $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ 2,941g in 100 ml a.d. 6,15 ml a.d. 67,5 ml	

3.2.4 Reagenzien und Chemikalien

Immunhistologie	
Streptavidin Alkaline Phosphatase (A)	Dako K 5005
Xylol	VWR
Dako Protein Block	Dako X0909
Dako Detection System, Alkaline Phosphatase RED rabbit/ Mouse (B)	Dako K 5005
Hämatoxylin (1:4 mit Aqua dest)	Dako S 2020
Aquatex Eindeckmittel	Merck
Dako Antibody Diluent	Dako S 2022
Real-time-PCR	
SYBR-green qPCR Master Mix	Roche
q-PCR Mastermix	Roche
Methylierungsspezifische PCR	
dNTP	Sigma-Aldrich
Epimark Hot Start Taq Reaction Buffer	Epimark
Epimark Hot Start Taq DNA Polymerase	Epimark

Gel Red	Biotium
Agarose	Thermo Fisher Scientific
Ladder	Thermo Fisher Scientific
Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
Western Blot	
Roti®-Quant Reagenz	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Page Ruler	Thermofischer
Magic Mike	Thermofischer
Coomassie Brilliant Blue-G250	Sigma-Aldrich
Whatman Blotting Papers	Sigma-Aldrich
EDTA	Carl Roth
5-Aza-2'-deoxycytidine	Sigma-Aldrich

3.2.5 Primer

Primer	Primersequenz
ASC methyliert Methylierungsspezifische PCR (Ohtsuka T, 2006)	forward: 5'-CGA TTT TGG CGT TTT TCG ACG GTT -3' reverse: 5'-CCG CTC ACC CCG CTA CAA CCG C -3'
ASC unmethyliert Methylierungsspezifische PCR (Ohtsuka T, 2006)	forward: 5'-TTG TTG GAG GGT AAT GGA TT -3' reverse: 5'-CCC ACA AAA ATA CAC CCA TA-3'
Beta Aktin (RT PCR)	forward: 5'-ACC ATG GAT GAT GAT ATC GC -3' reverse: 5'-ACA GGC TGG GGT GTT GAA G -3'
ASC (RT PCR) (Segovia et al., 2012)	forward: 5'-GGA CGC CTT GGC CCT CAC CG-3' reverse: 5'-GGC GCG GCT CCA GAG CCC TG-3'

3.2.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Nanodrop Spectrophotometer	Thermo Scientific
Light Cycler 480	Roche
Westernblot Protein Transfer	Biostep GMBH
Western Blot Odyssey	Li-Cor
Mikroskop Axiovert 2000	Zeiss

Vortexer REAXtop	Heidolph
Pipetten	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Fresco 16	Thermo Scientific
Wärmeschrank Galaxy 170 S	New Brunswick
Dampfgarer Multigourmet	Braun
Thermomixer comfort	Eppendorf
Rocker 25	Labnet international
Waage	Kern
UV Stratalinker 2400	Stratagene

3.2.7 Zelllinien

Die Zellen wurden in RPMI 1649 Medium kultiviert, unter Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 U/l Streptomycin und bei 37° im Inkubator (CO₂ 5%) inkubiert.

Zellkultur	Zelltyp
HKC VC3	Humane Keratinozyten
HKC L	Humane Keratinozyten
HKC KLI	Humane Keratinozyten
ACC12	kutanes Plattenepithelkarzinom
SCC13	kutanes Plattenepithelkarzinom
A431	kutanes Plattenepithelkarzinom
SCCO9	orales Plattenepithelkarzinom
SCCO11	orales Plattenepithelkarzinom
SCCO22	orales Plattenepithelkarzinom
SCCO28	orales Plattenepithelkarzinom

3.2.8 Antikörper

pc rabbit anti-human ASC (Primärantikörper Immunhistologie)	Biomol AG-25B-0006-C100	1:1000 in Dako Antibody-Diluent (Dako S2022)
pc goat-anti rabbit/biotinyliert	Dako E 0432	1:800 in Dako Antibody-Diluent (Dako S2022)

(Sekundärantikörper Immunhistologie)		
---	--	--

3.2.9 Proteasen

Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Trypsin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dispase II	Roche

3.2.10 Kits

DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen
RNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Research
DyNAmo cDNA Synthesis Kit	Biozym

3.2.11 FFPE Schnitte kutaner Plattenepithelkarzinome

Das Patientenkollektiv wurde retrospektiv aus kutanen PEK des Archivs der Dermatohistologie gewonnen. Die Hauttumoren wurden zur histologischen Aufarbeitung initial nach Entnahme in Formalin fixiert und folgend in Paraffin eingebettet.

Es wurden 55 nicht metastasierte und 17 metastasierte kutane Plattenepithelkarzinome analysiert. Das Material wurde von der Universitäts-Hautklinik Tübingen in den Jahren 2009 bis 2012 nach Resektion mit kurativer Absicht gewonnen und in der Histologie archiviert.

Tabelle 7 *Klinisch-pathologische Parameter der nicht-metastasierten Tumoren*

Lokalisation	Grading	Tumordicke (mm)	Alter bei Diagnose
Prätibial	1	5,5	84
Kapillitium	3	9,5	81
Wange	1	7	78
Kapillitium	1	10	84
Ohr	1	10	86
Wange	1	7	83

Unterschenkel	3	10	51
Stirn	3	15	77
Schläfe	3	5,5	79
Ohrläppchen	3	7	90
Wange	3	5	81
Kinn	3	10	92
Ohr	3	11	86
Präaurikulär	3	13	93
Retroaurikulär	3	15	82
Unterlid	3	26	81
Unterlippe	1	3,5	85
Ohr	1	4,5	79
Wange	3	1,6	76
Kapillitium	3	4,5	79
Unterarm	1	5	70
Wange	3	5	84
Stirn	3	4	88
Stirn	3	2,1	83
Unterschenkel	1	1,9	72
Wange	3	1,75	77
Schläfe	1	2,2	75
Wange	1	1,5	74
Ohr	3	1,3	64
Ohr	1	3,5	82
Gesicht	3	3,5	86
Stirn	1	2,5	75
Stirn	1	0,7	74
Stirn	1	1	88
Ohr	1	1,12	87
Kapillitium	3	1,7	76
Kapillitium	3	2	79
Prästernal	3	1,87	81

Schläfe	3	3,5	63
Ohr	3	2,2	88
Kapillitium	1	14	69
Ohr	1	15	82
Ohr	1	3	76
Ohr	3	3	74
Oberlid	3	1,3	94
Retroaurikulär	3	9	81
Hand	3	1,9	69
Mittelfinger	3	36	54
Sternum	3	2	65
Kapillitium	1	20	94
Unterschenkel	1	9	49
Stirn, Tumor	1	9	93
Kapillitium	1	4	47
Schläfe	1	15	82
Ohr	1	1,6	77

Tabelle 8 *Klinisch-pathologische Parameter der metastasierten Tumoren*

Lokalisation	Grading Primarius	Tumordicke Primarius (mm)	Alter bei Diagnose
Präaurikulär	1	unbekannt	77
Schläfe	1	6	76
Präaurikulär	1	1,5	75
Schläfe	3	2,25	94
Unterlippe	1	4,5	70
Kapillitium	1	5	83
Nase	3	5	57
Unterlippe	1	5,5	75
Präaurikulär	3	14	72
Nasenseite	3	6	83
Wange	1	9	79

Kapillitium	3	12	75
Kapillitium	3	13	92
Wange	3	15	82
Ohr	1	2,3	70
Wange	3	10	93
Retroaurikulär	1	unbekannt	31

3.3 Methoden

3.3.1 Immunhistochemische Färbungen

Die Expression bestimmter Proteine und deren Vorkommen in verschiedenen Geweben sowie in den unterschiedlichen Zellkompartimenten kann mit Hilfe der Immunhistochemie spezifisch nachgewiesen werden. Durch Bindung eines markierten Antikörpers kann somit das gewünschte Antigen nachgewiesen und lokalisiert werden.

Aus den Paraffinblöcken werden zunächst Schnitte auf Superfrost Objektträgern von einer Dicke von 2 – 4 µm angefertigt. Zum Entparaffinieren werden die Objektträger im Wärmeschrank bei 60°C für 30 Minuten erhitzt. Folgend werden diese dreifach für je 10 Minuten in Xylol getaucht und für je zwei Minuten in Ethanolbäder absteigender Konzentration getaucht (100%, 100%, 96%, 80%, 70%) und in Aqua dest. zur Antigen-Demaskierung in 10 µm Citratpuffer (pH 6,0) für 15 Minuten im Dampfgerar erwärmt. Es folgt ein zweifacher Waschgang mit Tris-Tween-Puffer (pH 7,6) für je fünf Minuten. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden die Schnitte für zehn Minuten mit Dako Protein Block inkubiert. Als Primärantikörper wird über Nacht in feuchter Umgebung bei 4°C ein Kaninchen-anti-Human-ASC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Am Folgetag wird dieser dreifach mit Tris-Tween-Puffer für je fünf Minuten gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen/ biotinyliert, 1:800) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und folgend dreifach mit Tris-Tween-Puffer je fünf Minuten gewaschen. Um die Sensitivität des Antikörpers zu erhöhen, werden

die Schnitte mit Streptavidin Alkaline Phosphatase für 15 Minuten bei Raumtemperatur behandelt.

Anschließend wird mit dem Dako Detection System das Substrat für 5 – 10 Minuten aufgetragen und die Farbstoffentwicklung in regelmäßigen Abständen überprüft. Bei der Entstehung einer leichten Pink-Färbung wird die Reaktion durch zweimaliges fünfminütiges Waschen in Aqua dest. gestoppt. Zum Schluss werden die Schnitte noch mit Hämatoxylin in einer Verdünnung von 1:4 in Aqua dest. für fünf Minuten bei Raumtemperatur gegengefärbt, fünf Minuten unter laufendem Wasser gewaschen und abschließend mit Aquatex eingedeckelt.

Die Immunreaktivität von ASC wird nach Wei et al. in drei Stufen eingeteilt (Shimane et al., 2013, Wei et al., 2010):

1. weniger als 33% ASC-positiv gefärbte Tumorzellen (=0%)
2. 34 – 66% positiv gefärbte Tumorzellen (=50%)
3. 67 – 100% positiv gefärbte Tumorzellen (=100%)

Die Einteilung erfolgt von allen Schnitten vom gleichen Dermatohistologen ohne Kenntnis des Gradings des jeweiligen Tumors.

3.3.2 DNA Isolation

Mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) wird aus den Zellkulturen DNA gewonnen. Das gefrorene Gewebe oder die Zellpellets werden hierfür zunächst durch einfaches Auftauen auf Raumtemperatur gebracht. Jeweils maximal 5×10^6 Zellen werden zunächst 5 Minuten bei 300xg zentrifugiert und in 200 μ l Puffer resuspendiert. Zur Freisetzung der Nukleinsäuren werden 20 μ l Proteinase K hinzugegeben. Nach Hinzugabe weiterer 200 μ l Puffer AL und starkem Vortexen wird die Reaktion im Heizblock bei 56°C für zehn Minuten gestoppt. Um optimale DNA-Bindungskonditionen zu erreichen, werden 200 μ l EtOH (96%) hinzugegeben und erneut vermischt und das Gemisch auf eine DNeasy Mini Spin Säule pipettiert. Nach einer Zentrifugation von 6000 xg ist die DNA an der Säule gebunden und es folgen zwei Waschschriffe. Im ersten werden 500 μ l des ersten Waschpuffers Puffer auf die Säule gegeben und im folgenden bei 6000xg zentrifugiert. Der zweite Waschschriff erfolgt mit 500 μ l des zweiten Waschpuffers und folgender dreiminütigen Zentrifugation bei

20000 xg. Die an der Membran gebundene DNA wird dann nach einminütiger Inkubation in 200 µl Puffer AE eluiert (1 Minute bei 6000 xg).

3.3.3 RNA Extraktion

Die RNA der Zelllysate wird mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) gewonnen. Hierbei binden pro Säule bis zu 100 µg RNA mit mehr als 200 Basenpaaren an die RNeasy Silica-Membran. RNAsen werden schon in den ersten Schritten inaktiviert um eine unnötige Degradierung der RNA zu verhindern. Ferner wird in weiteren Waschschrritten die RNA aufgereinigt und zuletzt von der Membran in eine Elutionflüssigkeit überführt.

Dazu werden primäre Keratinozyten und Zellen der Zelllinien zunächst mit Trypsion von der Zellkulturschale abgelöst (0,2% Trypsin in PBS) und folgend mit 350 µl RLT-Puffer versetzt und für 15 Sekunden bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Das Lysat wird auf eine QIA-shredder-Säule überführt und für 2 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Nach Hinzufügen von 350 µl 70% Ethanol wird die Probe in eine RNeasy-Säule übertragen und für 15 Sekunden bei 10 000 rpm die darin enthaltenen RNA an die Säule gebunden. Anschließend werden zunächst einmalig 700 µl und zweimalig jeweils 500 µl RPE-Puffer hinzu pipettiert und dazwischen jeweils für 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert, im letzten Schritt für zwei Minuten. Zum Abschluss wird 55 µl Rnase-free-Water in die Säule pipettiert und mit offenem Deckel eine Minute bei 10 000 rpm eluiert. Die Konzentration und Qualität der extrahierten RNA wird mittels NanoDrop Spectrophotometer ermittelt.

3.3.4 cDNA Synthese

Nach Extraktion der RNA muss diese zur weiteren Analyse in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierbei wird der poly-A-Schwanz der mRNA mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers durch das virale Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der entstandene cDNA-Einzelstrang kann nach Auflösen des RNA-DNA-Doppelstranges in eine doppelsträngige DNA überführt werden. Eine cDNA enthält nur den transkribierten Bereich eines Gens, nicht jedoch seinen Promotor oder Introns.

Mit Hilfe des DyNAmo CDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific wird maximal 1 µg (eluiert in 7 µl) der zuvor gewonnenen RNA zusammen mit 10 µl Pufferlösung, 2 µl Reverser Transkriptase und Oligo-dT-Primern vermischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wird durch fünfminütiges Erhitzen der Probe auf 85°C die Reverse Transkriptase inaktiviert.

3.3.5 Real-time PCR

In der Real-time PCR wird die Vervielfältigung eines cDNA Abschnitts im Verlauf der Zeit dokumentiert. Zur Detektion werden Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt, die komplementär zu einem Abschnitt der zu analysierenden cDNA sind. Die Menge des entstehenden PCR-Produktes kann somit in Echtzeit als Zunahme des Fluoreszenzsignals verfolgt und quantifiziert werden.

Zum Ansatz wird 1 µl cDNA und jeweils 1 µl forward und reverse Primer gegeben. Hinzu kommen 5 µl SYBR Green PCR Master Mix sowie Nukleasefreies Wasser (2µl). Zum Reaktionsbeginn werden jeweils 10 µl pro Well pipettiert und herunterzentrifugiert und in den LightCycler 480 gesetzt.

Die relative Expression des ASC-Transcripts wird als Ratio von ASC und Beta-Aktin berechnet. Beta-Aktin läuft gleichzeitig als Kontrolle mit.

Tabelle 9 Programm der Real Time PCR

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Preincubation	95 °C	10 min	1x
Amplification	95 °C	10 s	50x
	60 °C	20 s	
Cooling	40 °C	10 s	1x
Hold	10 °C		

3.3.6 Bisulfit Behandlung

Die Natrium-Bisulfit-Behandlung hat zum Ziel methylierte gegenüber nicht-methylierten Basen in der DNA Sequenz für die folgende Polymerase-Ketten-Reaktion detektierbar zu machen. Hierbei wird eine unmethylierte Cytosin-Base

zu Uracil. Hängt an der Cytosin-Base eine Methylgruppe, so bleibt es in der Kopie ein Cytosin.

Die DNA, die aus Zellen mit Hilfe des DNA Blood and Tissue Kit (siehe DNA Isolation) gewonnen wurde (500 pg – 2 µg), wird mit 5 µl Dilution Buffer zur Denaturierung versetzt und auf 50 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Probe wird dann mit 100 µl CT Conversion Reagent des EZ DNA Methylation Kit (Zymo) versetzt und für 12 – 16 Stunden bei 50°C inkubiert. Die Behandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit, welches in dem Conversion Reagent enthalten ist, führt zu einer Umwandlung nicht-modifizierter Cytosine in Uracile. Methylierte Basen jedoch können nicht durch das Uracil konvertiert werden und bleiben somit unverändert.

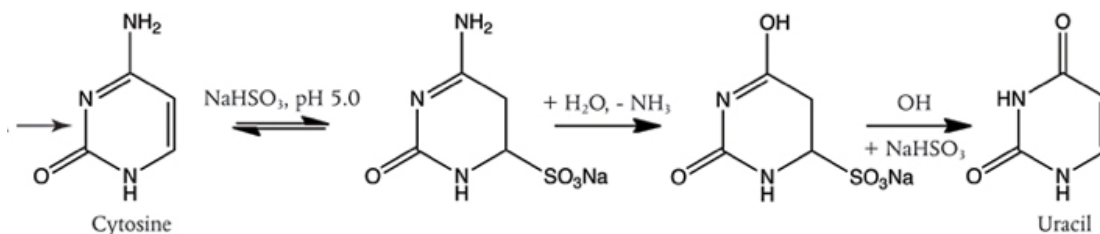


Abbildung 6 Bisulfidkonversion von Cytosin in Uracil ((c) New England Biomark, Bisulfit Conversion)

In den nun folgenden Schritten wird die konvertierte DNA aufgereinigt und für die PCR vorbereitet. Die erhitzte Probe aus der Bisulfit-Konversion wird zunächst 10 Minuten auf Eis heruntergekühlt und dann nach Befeuchtung der Zymo-Spin IC Säule mit 400 µl M-Binding Puffer hinzugegeben. Der Durchfluss wird mit maximaler Geschwindigkeit 30 Sekunden zentrifugiert und verworfen. Es folgt ein Wasch-Schritt mit 100 µl Wasch-Puffer und 30-sekundiger maximaler Zentrifugation. Die über Natrium-Bisulfit angehängte Schwefeltrioxidgruppe wird im kommenden Schritt mit 200 µl M-Desulphonations-Puffer durch Lagerung der Probe 20 Minuten im Dunkeln entfernt.

Die an die Säule gebundene Probe wird dann zweifach mit jeweils 100 µl Waschpuffer versetzt und erneut bei maximaler Geschwindigkeit eine halbe Minute zentrifugiert. Die an die Membran gebundene DNA wird dann in 10 µl M-Eluationspuffer bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und eluiert.

3.3.7 Methylierungsspezifische PCR

Die methylierungsspezifische PCR zeigt im Unterschied zur normalen PCR jeweils ein Primer-Set für das methylierte und ein Primer-Set für das unmethylierte DNA-Produkt. Es werden hierzu Primer angewandt, die die gleiche Region der DNA untersuchen, jedoch sequenzspezifische Unterschiede aufweisen: Die reversen Primer, die an nicht modifizierte DNA binden, weisen in ihrer Basenabfolge anstatt des Guanin ein Adenin, da dies mit Uracil (dem durch Natrium-Bisulfit deaminierten Cytosins) ein Basenpaar bildet. Zum anderen hat der forward-Primer für die nicht-methylierte Sequenz Thymin statt Cytosin.

Für die methylierungsspezifische PRC werden jeweils 2 µl template DNA verwendet. Es wird im Folgenden ein Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt, das neben den 2 µl DNA, 0,5 µl 10mM dNTPs, jeweils 0,5 µl 10 µM Forward und Reverse Primer Paare, 5 µl Epimark Hot Start Taq Reaction Buffer sowie 0,125 µl Epimark Hot Start Taq DNA Polymerase enthält. Als Kontrollen laufen neben NTC (Wasser), eine methylierte Kontroll-DNA (10 ng/µl) und eine unmethylierte Kontroll-DNA (10 ng/ µl).

Tabelle 10 Programm Thermocycler der methylierungsspezifischen PCR

Reaktion		Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung der DNA Polymerase		95 °C	30 s	
Touchdown	Denaturierung	95 °C	30 s	10x
	Annealing	61 – 1 °C	90 s	
	Elongation	68 °C	60 s	
Zyklen	Denaturierung	95 °C	30 s	30x
	Annealing	52 °C	30 s	
	Elongation	68 °C	30 s	
Finale Elongation		68 °C	15 min	
Hold		10 °C		

Die PCR-Produkte werden in einem 2%igen Agarosegel in TBE Puffer mit *GelRed* 1:10000 analysiert.

3.3.8 Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

5-Aza-2'-Deoxycytidin ist ein Cytosinanalogen, welches in die DNA eingebaut wird, eine irreversible Inaktivierung von Methyltransferasen zur Folge hat und somit die Methylierung des Cytosins verhindert.

Die Zellen werden über vier Tage mit 2,5µM oder 5µM 5-Aza-2'-deoxycytidine zusätzlich zum Medium (DMEM Medium mit 10% FCS 1% P/S) behandelt. Hierzu werden 30.000 Zellen/ Well in einer 12-Well-Platte bei 37°C kultiviert. 5-Aza-2'-deoxycytidine wird in DMSO gelöst und täglich das 5-Aza-2'-deoxycytidine-enhaltende Medium gewechselt. Folgend werden die geernteten Zellpellets in Lysepuffer eingefroren.

3.3.9 Western Blot

Zum Nachweis der Inflammasomaktivierung werden ASC und Caspase-1 als Proteine mit Hilfe der SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) im Zelllysate und im Überstand aufgetrennt. Hierbei richten sich die jeweiligen Proteine entsprechend ihrer Größe und Masse in einem elektrischen Feld aus und können somit zugeordnet werden und unter Zuhilfenahme eines Primär- und Sekundär-Antikörpers mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Die Zellen werden zunächst abzentrifugiert und in 1ml PBS resuspendiert und folgend erneut bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Zellyse werden die Zellen in 100 µl Lysepuffer mit einem Phosphatase-Inhibitor in einer Verdünnung von 1:100 aufgenommen und folgend dreifach in flüssigem Stickstoff eingefroren sowie bei jedem Auftauen einmalig gevortext.

Um den Proteingehalt der jeweiligen Probe zu bestimmen, wird mit Hilfe des *Roti[®]-Quant Reagenz* (Carl Roth) nach Bradford eine standardisierte Konzentrationsreihe mit BSA angelegt. Folgend wurde die Fluoreszenzintensität der Proben mit Coomassie Brilliant Blue-G250 verglichen.

Zur Auftrennung werden ein Sammelgel (5%) sowie ein Trenngel (12%) gegossen. Das Sammelgel wird aus 2,08 ml Tris HCl, 1,415 ml Acrylamid, 4,935 ml H₂O, 0,083 ml Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 0,083 ml APS (Ammoniumperoxodisulfat) und das Trenngel aus 5,0 ml Tris HCl, 8,085 ml Acrylamid, 7,015 ml H₂O, 0,13 ml TEMED und 0,1 ml APS hergestellt.

Die Proben werden dann für 5 Minuten bei 95°C gekocht in einer Verdünnung von 5:1 mit SDS-Proben-Puffer.

Nachdem das Gel in den Rahmen gespannt und in die Kammer gesetzt wird, wird die Kammer mit Laufpuffer befüllt. Auch die Beladekammern müssen mit Laufpuffer einmal gewaschen werden. Folgend werden die Beladekammern mit den Proben befüllt und diese in dem elektrischen Feld mit initial 80 V für 45 Minuten und folgend 120 V für weitere 15 Minuten aufgetrennt.

Zur Visualisierung werden die Gele aus dem Rahmen genommen und über einen nassen Transfer auf die Membran übertragen. Hierzu wird eine Polyvinylidendifluoridmembran in Methanol geschwenkt und folgend in Transferpuffer gelegt. Der Transfer findet nun bei konstanten 20 mA über 90 Minuten statt. Hierzu werden Gel und Membran direkt aufeinandergelegt. Die Membran muss folgend geblockt werden. Dies geschieht mithilfe von 10 ml Blocking-Puffer über eine Stunde bei Raumtemperatur. In der Vorbereitung wird der Primärantikörper über Nacht mit PBST in einer Verdünnung von 1:2 über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Sekundärantikörper wird dann für eine Stunde bei Raumtemperatur in ebenfalls 10 ml Blocking Puffer in der Verdünnung von 1:2 inkubiert. Beide Puffer werden dreimalig für zehn Minuten in PBST gewaschen und für eine Stunde gemeinsam inkubiert, um so eine Bindung mit dem Farbstoff zu gewährleisten.

Die Membran wird währenddessen für dreißig Minuten zwischen *Whatman Blotting Papers* getrocknet.

3.3.10 Zellkultur und Zellgewinnung

Humane Keratinozyten werden aus gesunder Haut nach histologischer R0-Resektion aus überschüssigem Gewebe („Öhrchen“) beim Wundverschluss aus dem OP der Hautklinik isoliert. Dies Gewebe wird hierzu in FCS-freiem Medium (RPMI) gesammelt und mit Penicillin (5000 U/mL) und Streptomycin (5 mg/mL)

versetzt. Die Subkutis wird mit einer Schere abgetragen. Mit der Epidermis nach oben wird das Gewebe in eine Zellkulturschale gelegt und diese vorsichtig mit Dispase II (8 mg/mL) geflutet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Epidermis von der Dermis mit einer Pinzette abgezogen, die Epidermis mechanisch zerkleinert und der bleibende Anteil mit 0.05% Trypsin und 1mM EDTA für zehn bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird dann mit 10ml RPMI / 10% FCS) gestoppt und die Lösung nach kräftiger Resuspension durch ein 100 µm-Zellsieb in ein Falcon gefiltert. Das Filtrat wird für 10 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird dann in CnT-Medium aufgenommen und in die Kulturschalen gegeben und wie oben beschrieben kultiviert.

3.3.11 UVB-Behandlung

Die humanen Keratinozyten werden nach dem Auftauen einmal passagiert. Nach 100%iger Konfluenz werden dem Medium 1mM CaCl₂ hinzugegeben. Folgend werden die Keratinozyten mit Hilfe des Stratalinker 2400 mit UVB-Strahlen (280 – 320nm) mit 50 mJ/cm² bestrahlt. Hierzu wird das Medium abgesaugt und unmittelbar nach Bestrahlung wieder den Zellen zugefügt. Nach 5 Stunden Inkubation folgt eine Methanol- / Chloroform-Fällung des Überstandes, um einen Western Blot des Überstandes und der lysierten Zellen durchzuführen.

4. Ergebnisse

4.1 Epidemiologische Daten des Patientenkollektivs

Das Alter der Patienten lag im Durchschnitt bei 78 Jahren (ältester Patient: 94 Jahre, jüngster Patient 47 Jahre), die Tumordicke bei 6,9 mm. Dabei sollte bedacht werden, dass zehn der 72 Plattenepithelkarzinome eine Tumordicke von über 10mm, die größte die Tumordicke lag bei 36 mm, das dünnste kutane Plattenepithelkarzinom hatte eine Dicke von 0,7 mm.

Die meisten kPEK waren Tumoren des Kapillitiums (63/72). Davon wiederum trat die Hälfte im Gesicht auf (30/72). Die nicht den Kopf betreffenden Plattenepithelkarzinom befanden sich an den Unterschenkel, an den Unterarmen, sternal sowie an den Händen.

Wie in Tabelle 11 gezeigt, wurden 34 Plattenepithelkarzinome als gut differenziert und 38 als schlechter differenziert eingestuft. Mäßig differenzierte (G2) Plattenepithelkarzinome wurden nicht eingeschlossen, um eine klare Abgrenzung im Differenzierungsgrad zu erreichen.

Tabelle 11 *Epidemiologische Daten des Patientenkollektivs*

	Mittleres Alter (Jahren)	Mittlere Tumordicke (mm)	Anzahl
kPEK	78	6,9	72
metastasierte kPEK	76	7,4	17
nicht metastasierte kPEK	78	6,8	55
gut differenzierte kPEK (G1)	76	6	34
schlecht differenziert (G3)	79	7,7	38
Kapillitium	79	6,8	63
Gesicht	80	6,6	30
weitere (nicht am Kapillitium)	66	9,4	9

4.2 ASC als Tumorsuppressor

4.2.1 ASC-Verlust in epidermalen Tumoren

Keratinocyten maturieren von den proliferierenden Zellen des Stratum basale in reife Keratinocyten in suprabasalen Epidermisetagen. Zuletzt bilden sich Korneozyten, die eine Hornschicht bilden und keine Zellkerne mehr enthalten. Analog hierzu sieht man in der ASC-Färbung der normalen Haut (Abb. 7) ein deutliches Anfärben der Epidermis, beginnend in den suprabasalen Schichten und Zunahme der Farbintensität im Verlauf nach oben. Dieses Färbemuster entspricht der nach außen zunehmenden Differenzierung und Keratinisierung. Die Basalmembran selber weist nur eine geringe Färbintensität auf. Das Stratum spinosum und die Granularzellschicht zeigt die stärkste und die obersten Keratinocyten, bzw. Korneozyten als avitale Hornzellen eine abnehmende Färbintensität auf (Abb. 7). Die Immunoreaktivität zeigt sich im Zytoplasma der Keratinocyten.

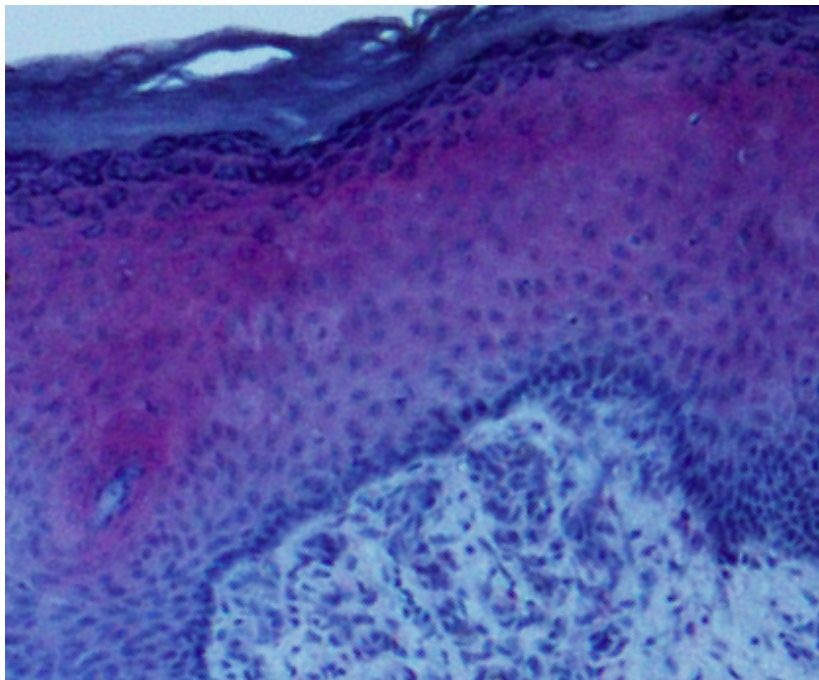


Abbildung 7 Normale Haut in der ASC Färbung. Zunahme der ASC-Proteinexpression in suprabasalen Epidermisetagen

In der Dermis oder den Adnexstrukturen, wie Drüsengewebe oder Haarfollikel fehlt die ASC-Expression (Abb. 8). Ebenfalls zeigt sich keine ASC-Expression in den avitalen Zellen der Hornschicht.

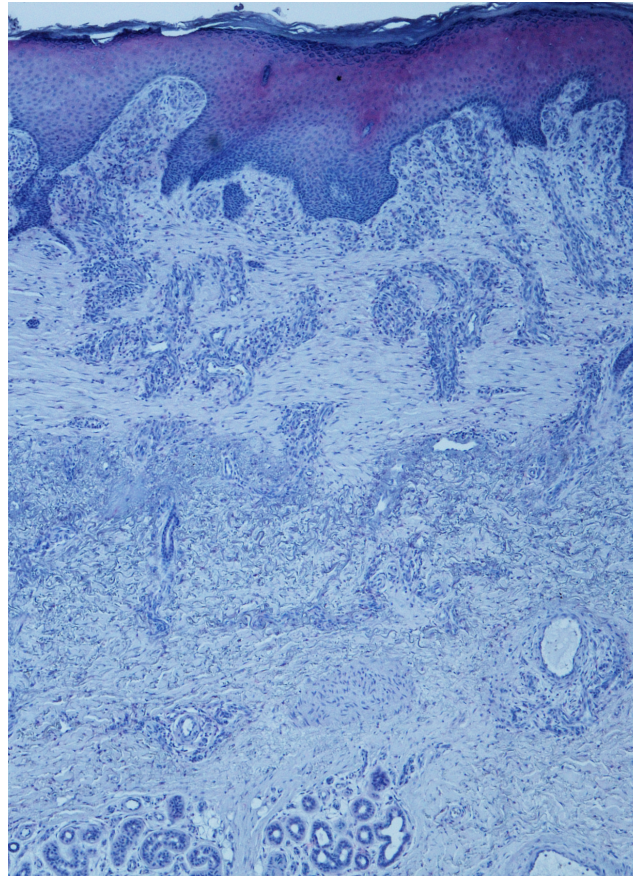


Abbildung 8 *Histologisches Bild sonnenexponierter Haut in der ASC-Färbung*

Auch in der Epidermis bei entzündlichen Dermatosen, wie z.B. bei der Psoriasis mit einer ausgeprägten Parakeratose und Akanthose (Abb. 9), ist ASC ebenfalls deutlich in der Epidermis nachweisbar.

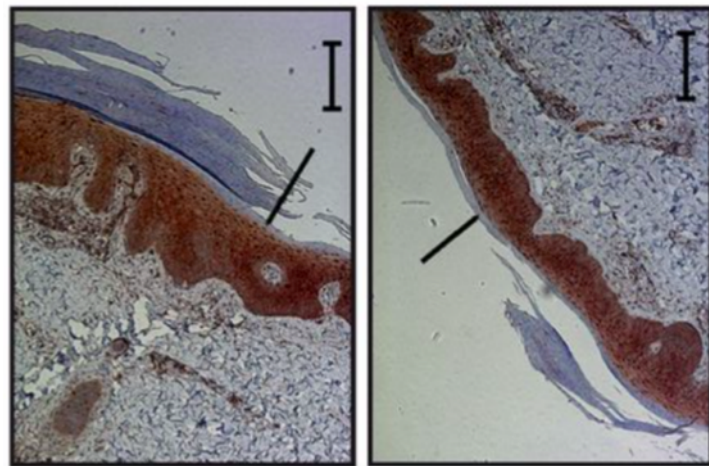


Abbildung 9 *Psoriasis vulgaris* in der ASC Färbung. Das Bild entstammt der zitierten Originalarbeit. (Drexler et al., 2012)

kPEK entstehen aus den Keratinozyten der Epidermis. In gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen der Haut wird ASC von den Tumorzellen homogen exprimiert, während die Fibroblasten des Tumorstromas eine schwächere Anfärbbarkeit zeigen (Abb. 10). Auch hier zeigt sich analog zur Epidermis sowie zu gesunder Haut das Zytoplasma der Zellen in der ASC Färbung positiv.

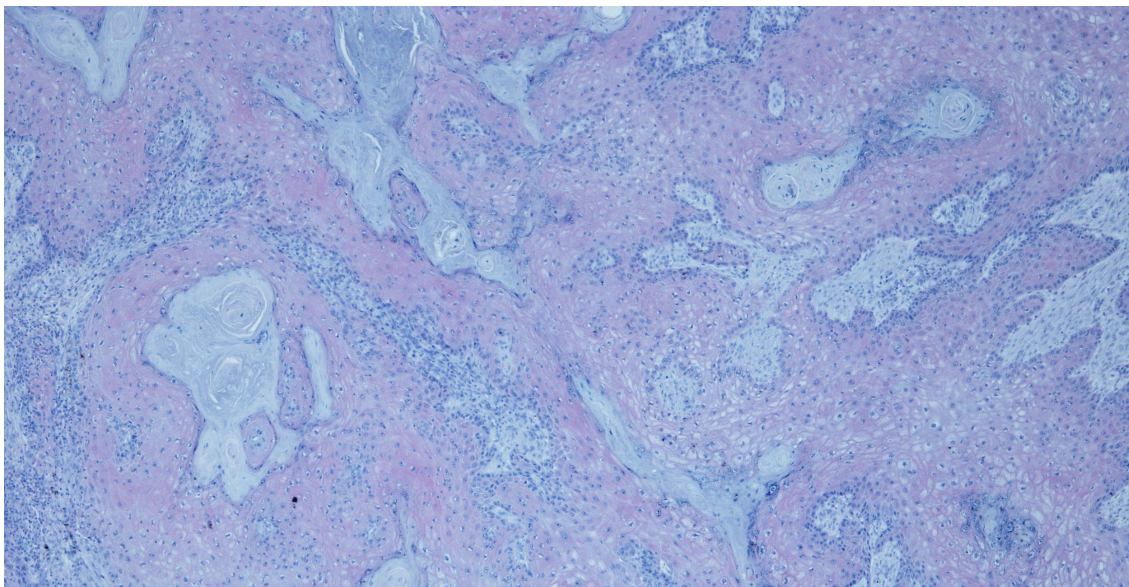


Abbildung 10 Immunhistologisches Bild eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms der Haut in der ASC-Färbung

Verglichen zur Epidermis ist in Basalzellkarzinomen, als dem häufigsten nicht-melanozytären Hauttumor, die Expression von ASC stark erniedrigt. Basalzellkarzinome (Abb.11) bilden sich von den untersten Schichten der Epidermis bzw. Haarfollikelregionen und weisen in der Regel nur einen geringen Grad an Keratinisierung auf. Dieses Bild zeigte sich bei allen der fünf untersuchten Basalzellkarzinome.

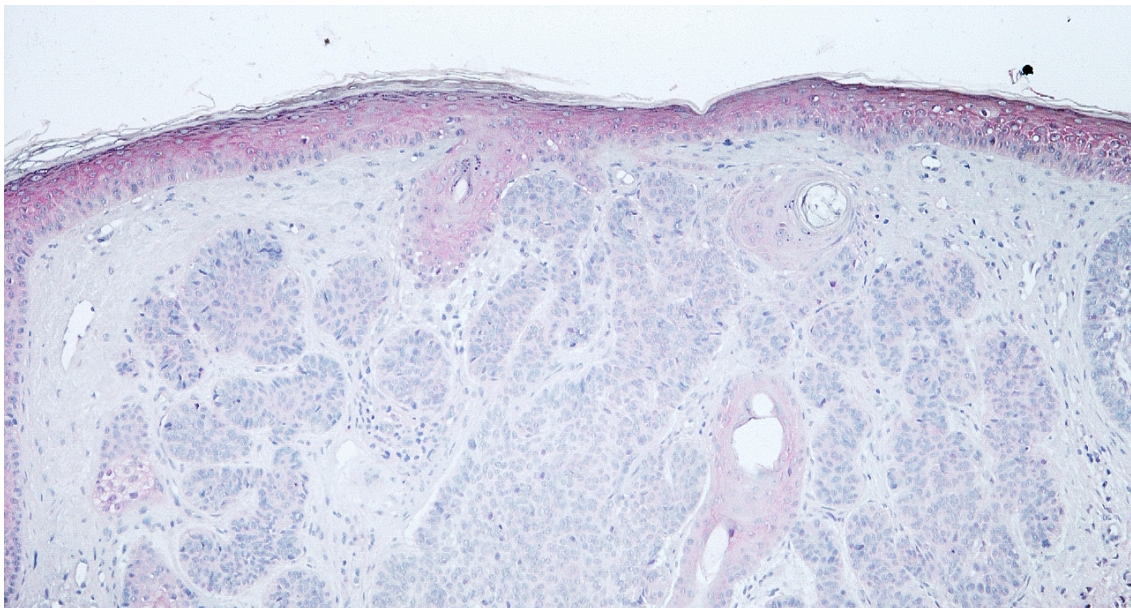


Abbildung 11 *Histologisches Bild eines Basalzellkarzinoms in der ASC-Färbung in der Übersicht*

Im Unterschied zu kPEK und Basalzellkarzinomen stellen Condylomata acuminata eine gutartige durch humane Papillomviren bedingte Hyperplasie von Keratinozyten mit ausgeprägter Keratinisierung dar. In dieser ausgeprägten Proliferation der Epidermis ist ASC in nahezu allen Zellen des Tumors vergleichbar mit der Epidermis gut nachweisbar (Abb. 12). Keine ASC Expression findet sich, wie auch in gesunder Haut in den tieferen Schichten unterhalb der Epidermis.

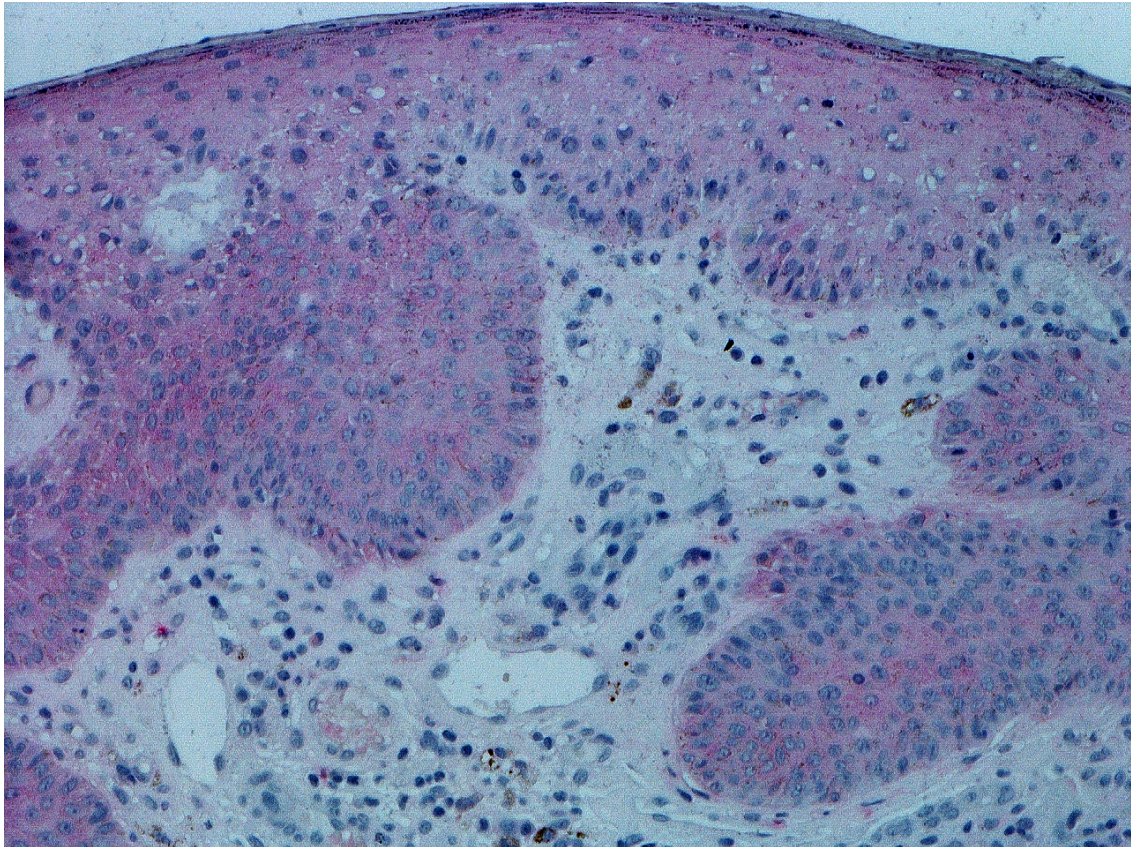


Abbildung 12 *Histologisches Bild eines Condyloms in der ASC-Färbung in der Nahaufnahme*

4.2.2 ASC-Expression korreliert mit der Tumordifferenzierung

Zur Evaluation der ASC-Expression in kPEK wurden Tumoren diese nach Differenzierungsgrad nach Broders unterschieden, nach ihren Tumordicken gepaart und in drei Gruppen eingeteilt: Gut differenziert, mäßig differenziert und schlecht differenziert. Zur besseren Abgrenzbarkeit wurden nur gut differenzierte (G1) und schlecht differenzierte (G3) Tumoren zur Analyse verwendet. Gut differenzierte Tumoren (G1) weisen meist konzentrisch angeordnete parakeratotische Keratinozyten („Verhornungszentren“) auf, die zum Teil Hornperlen bilden. Besonders in den Regionen mit ausgeprägter Keratinisierung, zeigt sich eine deutliche Färbeintensität in der ASC-Färbung (Abb. 13). In Tabelle 13 und 14 ist die ASC Expression der jeweiligen Tumoren, sowohl der nicht metastasierten Tumoren wie auch der metastasierten Tumoren aufgezeigt, sowie deren Lokalisation und Differenzierungsgrad.

Tabelle 12 ASC Expression der nicht metastasierten Tumoren

Lokalisation	Grading	Tumordicke (mm)	Alter bei Diagnose	ASC
Prätibial	1	5,5	84	100%
Kapillitium	3	9,5	81	0%
Wange	1	7	78	100%
Kapillitium	1	10	84	100%
Ohr	1	10	86	50%
Wange	1	7	83	0%
Unterschenkel	3	10	51	0%
Stirn	3	15	77	50%
Schläfe	3	5,5	79	0%
Ohrläppchen	3	7	90	50%
Wange	3	5	81	0%
Kinn	3	10	92	0%
Ohr	3	11	86	0%
Präaurikulär	3	13	93	0%
Retroaurikulär	3	15	82	50%
Unterlid	3	26	81	0%
Unterlippe	1	3,5	85	50%
Ohr	1	4,5	79	100%
Wange	3	1,6	76	50%
Kapillitium	3	4,5	79	50%
Unterarm	1	5	70	100%
Wange	3	5	84	50%
Stirn	3	4	88	50%
Stirn	3	2,1	83	0%
Unterschenkel	1	1,9	72	50%
Wange	3	1,75	77	100%
Schläfe	1	2,2	75	100%
Wange	1	1,5	74	50%
Ohr	3	1,3	64	0%

Ohr	1	3,5	82	100%
Gesicht	3	3,5	86	100%
Stirn	1	2,5	75	0%
Stirn	1	0,7	74	50%
Stirn	1	1	88	0%
Ohr	1	1,12	87	50%
Kapillitium	3	1,7	76	0%
Kapillitium	3	2	79	0%
Prästernal	3	1,87	81	0%
Schläfe	3	3,5	63	0%
Ohr	3	2,2	88	0%
Kapillitium	1	14	69	0%
Ohr	1	15	82	100%
Ohr	1	3	76	100%
Ohr	3	3	74	0%
Oberlid	3	1,3	94	0%
Retroaurikulär	3	9	81	0%
Hand	3	1,9	69	50%
Mittelfinger	3	36	54	0%
Sternum	3	2	65	0%
Kapillitium	1	20	94	100%
Unterschenkel	1	9	49	100%
Stirn, Tumor	1	9	93	100%
Kapillitium	1	4	47	100%
Schläfe	1	15	82	100%
Ohr	1	1,6	77	100%

Tabelle 13 ASC Expression der metastasierten Tumoren

Lokalisation	Grading Primarius	Tumordicke Primarius (mm)	Alter bei Diagnose	ASC
Präaurikulär	1	unbekannt	77	100%

Schläfe	1	6	76	100%
Präaurikulär	1	1,5	75	100%
Schläfe	3	2,25	94	0%
Unterlippe	1	4,5	70	100%
Kapillitium	1	5	83	100%
Nase	3	5	57	100%
Unterlippe	1	5,5	75	100%
Präaurikulär	3	14	72	0%
Nasenseite	3	6	83	0%
Wange	1	9	79	0%
Kopf	3	12	75	50%
Kapillitium	3	13	92	0%
Wange	3	15	82	50%
Ohr	1	2,3	70	100%
Wange	3	10	93	0%
Retroaurikulär	1	unbekannt	31	50%

Abbildung 13 und 14 zeigen das Bild eines gut differenzierten kPEK. Hier ist die Farbintensität der Tumorzellen nahezu vergleichbar mit der Intensität in der Epidermis. Typisch sind die einzelnen isoliert stehenden Tumorinseln. Tumorabschnitte mit geringer Differenzierung zeigen eine geringere ASC-Expression, so dass die Anfärbbarkeit mit der Verhornung und Differenzierung korreliert.

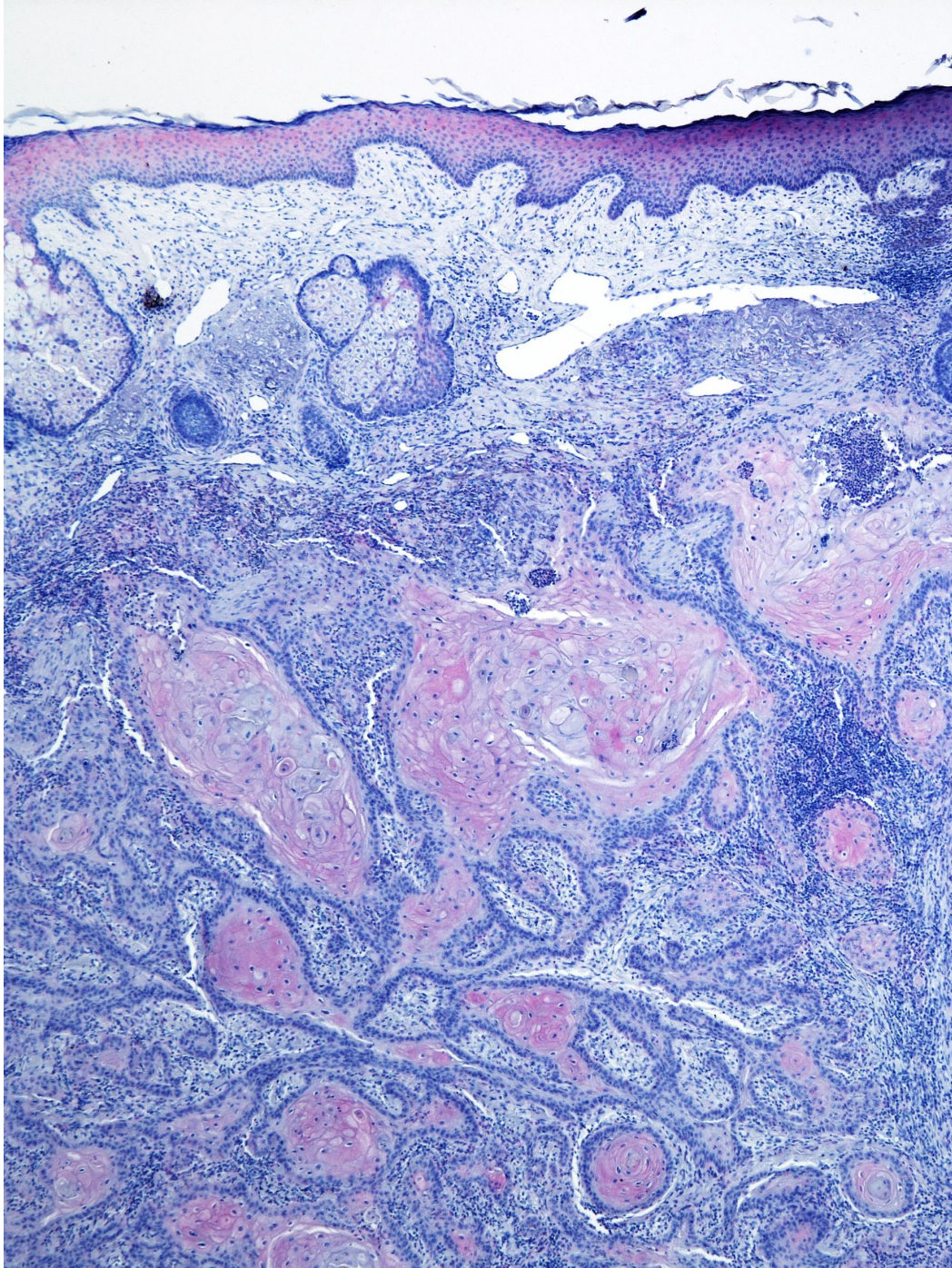


Abbildung 13 Übersicht eines histologischen Bildes eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms

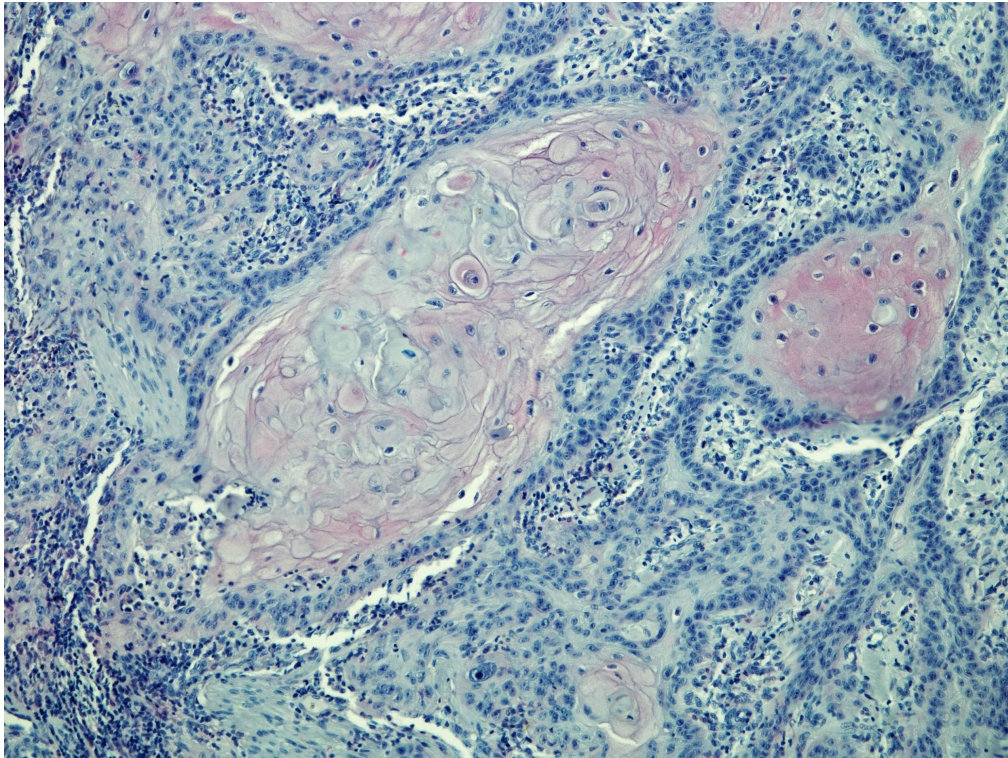


Abbildung 14 *Nahaufnahme des histologischen Bildes eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms*

Im Gegensatz dazu fehlt die ASC-Expression in weniger gut differenzierten Tumoren insbesondere in den Regionen mit schlechter Differenzierung mit Atypien und fehlender Keratinisierung.

So weist der Tumor in den Abbildungen 15 und 16 zwar im Randbereich noch eine geringe ASC-Expression auf, im Zentrum, welches eine schlechte Differenzierung zeigt, ist diese jedoch nicht mehr nachzuweisen.

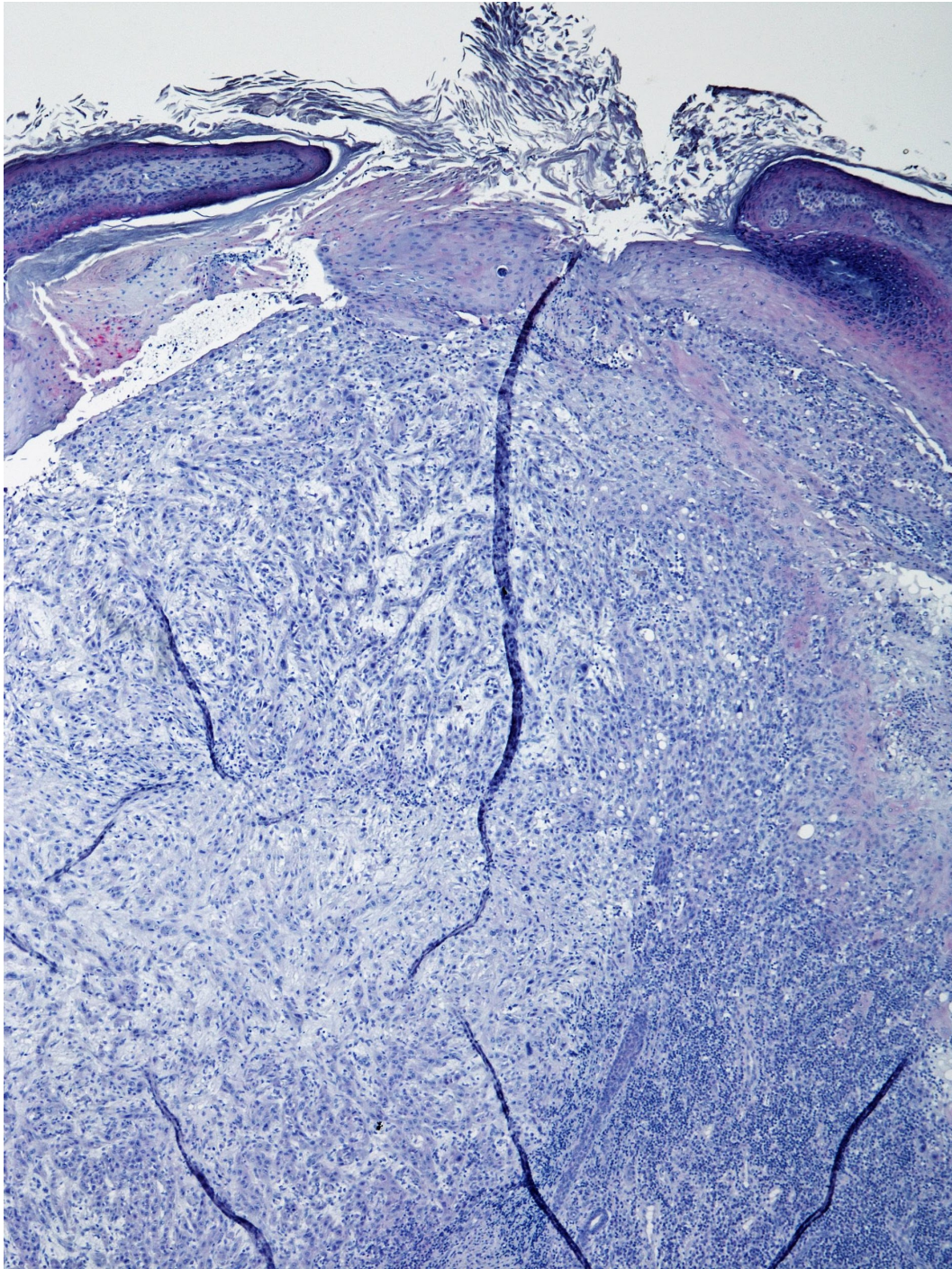


Abbildung 15 *Schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinom (G3) in der ASC Färbung*

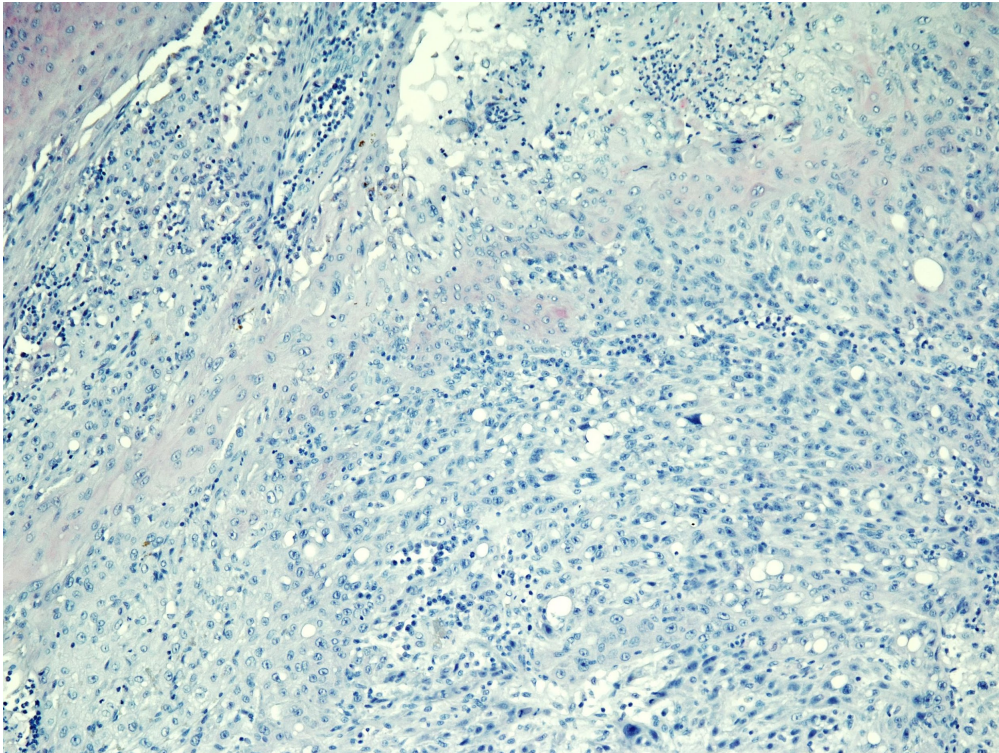


Abbildung 16 *Schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinom (G3) in der Nahaufnahme in der ASC-Färbung*

In der Untersuchung aller Tumoren (N = 72) korreliert die ASC-Expression deutlich mit der Differenzierung der Tumorzellen ($p \leq 0,0001$, Chi-Quadrat-Test). Während 22/34 (64,71%) gut differenzierten kPEK (G1) ASC voll exprimieren (ASC 100%), weisen nur 5/34 (14,71%) einen kompletten Verlust auf (ASC 0%). Die schlecht differenzierten kPEK (G3) zeigen überwiegend ein Verlust der ASC-Expression. Bei 25/38 (65,79%) G3-Tumoren lässt sich ASC nicht mehr nachweisen (ASC 0%), bei 3/38 (7,89%) ist ASC homogen im Tumor angefärbt (ASC 100%) (Abb. 17).

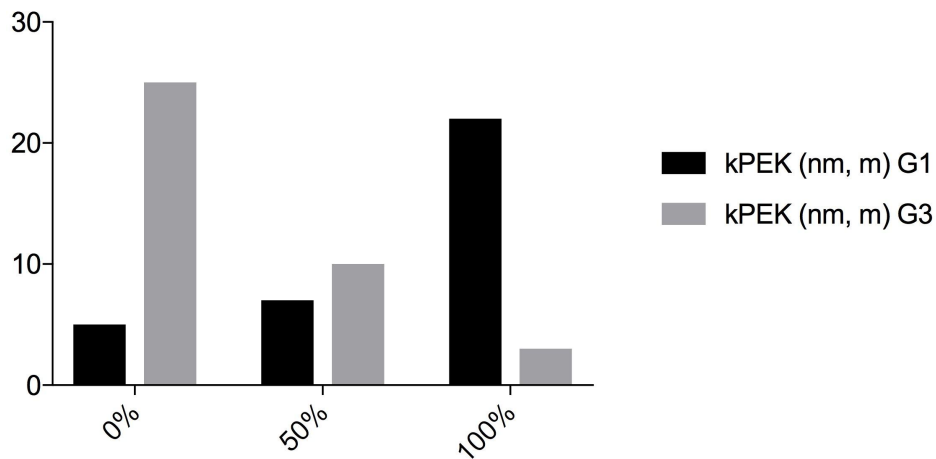


Abbildung 17 ASC-Expression aller Tumoren (N = 72, nicht-metastasiert und metastasiert) sowie deren Differenzierung. Auf der X-Achse ist die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) sowie die Differenzierung (G1, G3) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren

4.2.3 ASC-Expression korreliert nicht mit der Metastasierungsrate

Im Vergleich der metastasierten zu nicht metastasierten Tumoren besteht im Gegensatz zur Differenzierung kein Unterschied in der ASC Expression. Sowohl bei den metastasierten, als auch bei den nicht metastasierten kutanen Plattenepithelkarzinomen ist eine gute Differenzierung mit einer höheren ASC-Expression assoziiert. Bei 15/25 (60%) der gut differenzierten nicht metastasierten Tumoren ist ASC homogen anfärbbar. Hingegen ist bei 4/25 (16%) kein ASC immunhistochemisch nachweisbar. Auch in der Gruppe der nicht metastasierten kPEK weist der überwiegende Teil der schlecht differenzierten Tumoren (20/30, 6,67%) einen Verlust der ASC-Expression auf. Nur 2/30 (6,67%) exprimieren ASC vollständig (Abb. 18).

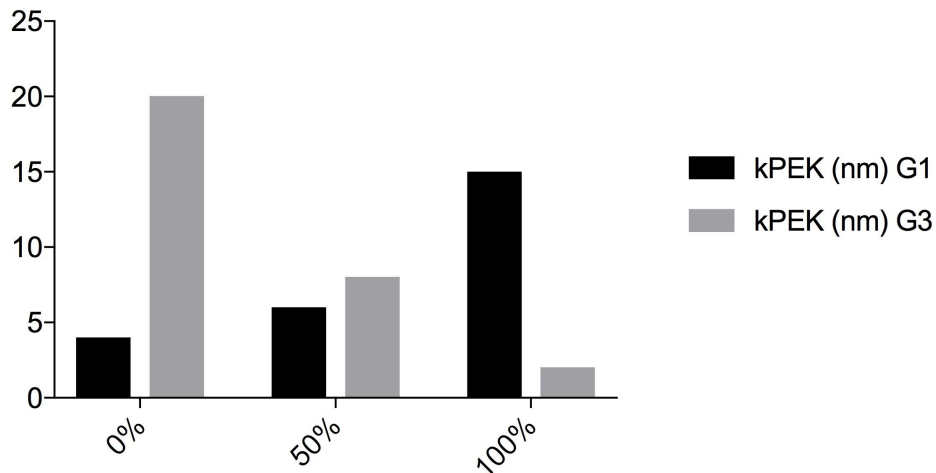


Abbildung 18 ASC-Expression der nicht metastasierenden Tumoren (N = 55), sowie deren Differenzierung. Auf der X-Achse ist die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) sowie die Differenzierung (G1, G3) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren

Das gleiche Bild zeigt sich bei den metastasierenden Tumoren: Während 7/9 (77,78%) der gut differenzierten kPEK und 1/8 (12,5%) der schlecht differenzierten Tumoren ASC voll exprimieren, zeigt nur 1/9 (11,11%) der G1-, jedoch 5/8 (62,5%) der G3-Tumoren einen kompletten ASC-Verlust (Abb. 19).

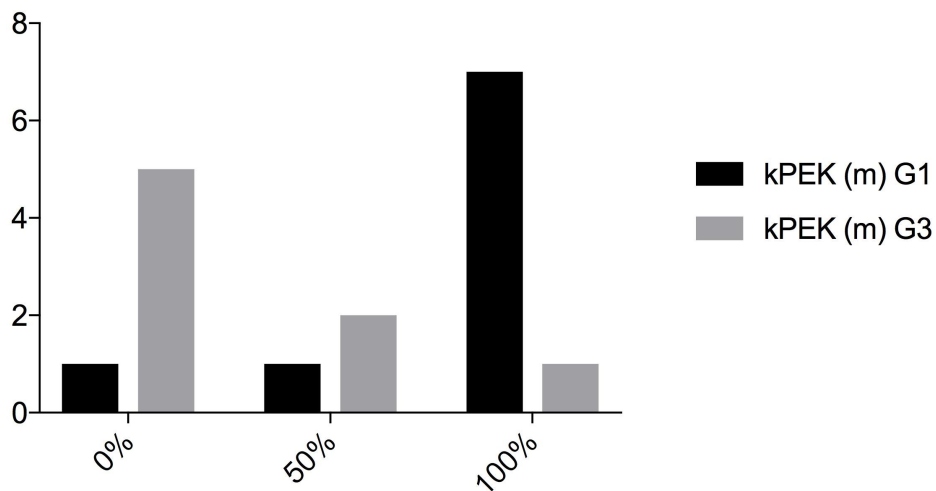


Abbildung 19 ASC-Expression der metastasierenden Tumoren (N = 17), sowie deren Differenzierung. Auf der X-Achse ist die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) sowie die Differenzierung (G1, G3) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren

4.2.4 ASC-Expression korreliert nicht mit der Tumordicke

Da ASC als Tumorsuppressor und Immunadapter die Proliferation beeinflussen könnte, wurde die ASC-Expression in Abhängigkeit von der Tumordicke

betrachtet. Bei zwei der insgesamt 17 metastasierten kPEK (11,76%) konnte die Tumordicke des Primarius nicht bestimmt werden. Insgesamt zeigte sich bei der Untersuchung aller Tumoren (N = 70, Abb. 20) keine signifikante Korrelation der ASC-Expression mit der Tumordicke ($p = 0,0976$, Chi-Quadrat-Test). Die Signifikanz der Untergruppen nicht metastasierter Tumoren und metastasierter Tumoren (Abb. 21 & 22) konnte auf Grund zu kleiner Einzelwerte nicht statistisch erfasst werden.

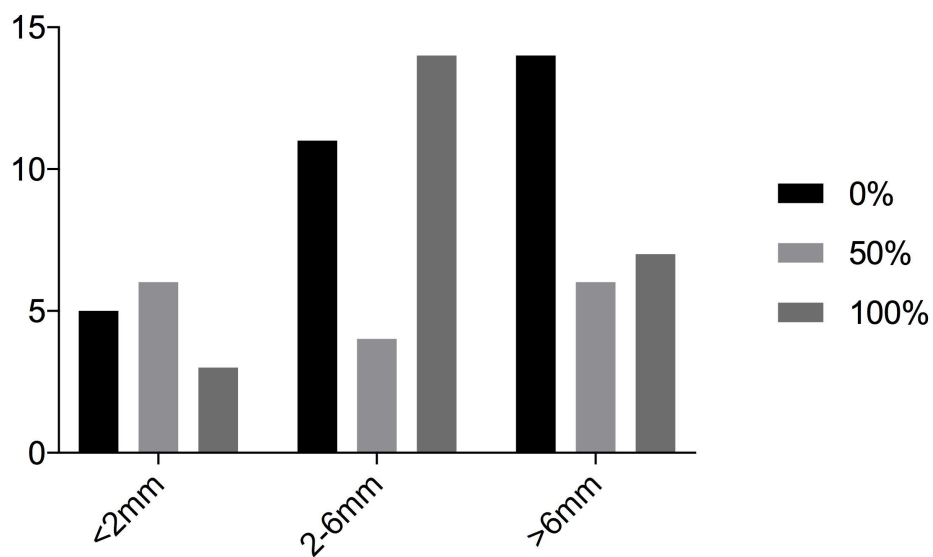


Abbildung 20 kPEK (N = 70) wurden in drei Gruppen bezüglich ihrer Tumordicke aufgeteilt und die ASC-Expression untersucht. Auf der X-Achse ist die Tumordicke in drei Gruppen aufgeteilt (< 2mm, 2- 6mm, > 6mm), sowie die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren

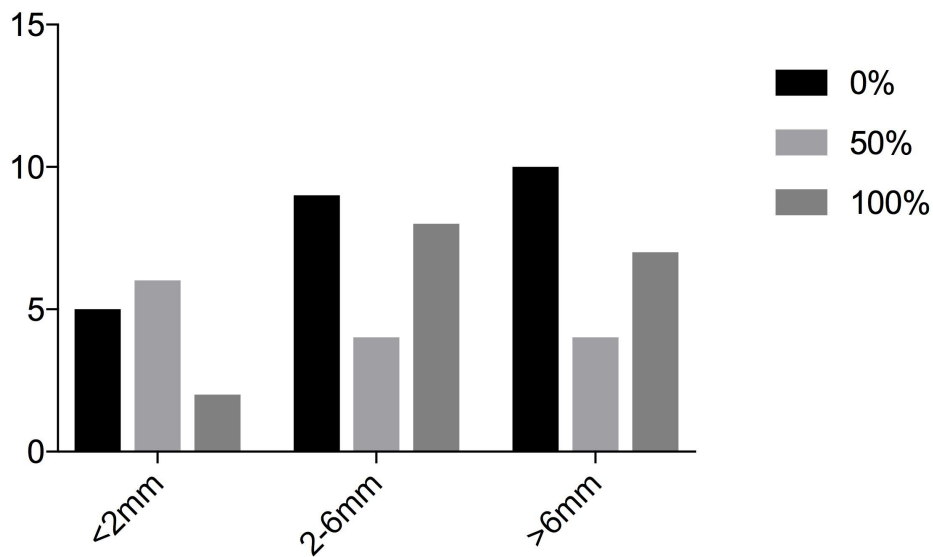


Abbildung 21 Die nicht metastasierenden kPEK (N = 55) wurden in drei Gruppen bezüglich ihrer Tumordicke differenziert und deren jeweilige ASC-Expression dargestellt. Auf der X-Achse ist die Tumordicke in drei Gruppen aufgeteilt (< 2mm, 2 – 6mm, > 6mm), sowie die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren

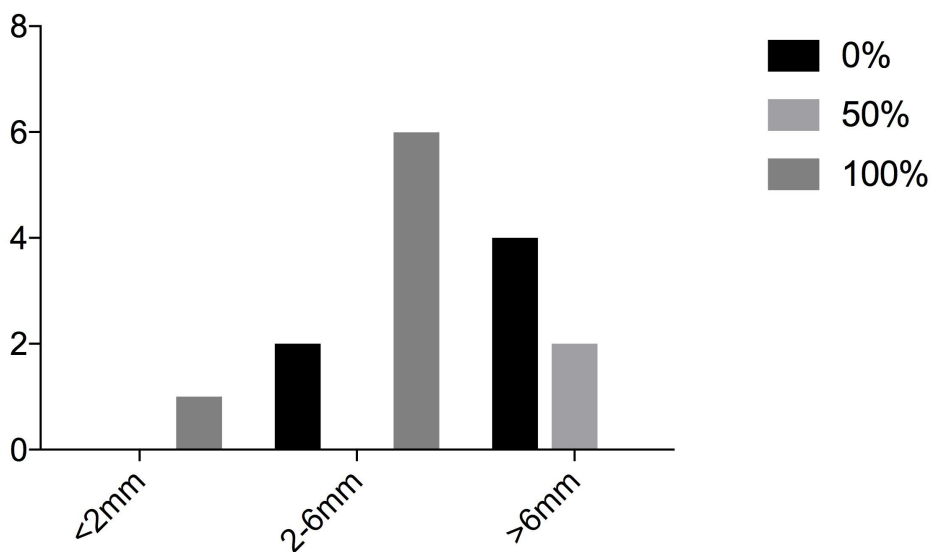


Abbildung 22 Die metastasierenden kPEK (N = 15) wurden in drei Gruppen bezüglich ihrer Tumordicke aufgeteilt und deren jeweilige ASC-Expression quantifiziert. Auf der X-Achse ist die Tumordicke in drei Gruppen aufgeteilt (< 2mm, 2 – 6mm, > 6mm), sowie die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) zu sehen. Fehlende Balken entsprechen einem Wert von 0. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren

4.3 ASC-Expression in primären humanen Keratinozyten und PEK-Zelllinien

Da in mehreren malignen kutanen Tumoren eine verringerte ASC-Expression zu sehen war, untersuchten wir humane kPEK-Zelllinien der Haut und Schleimhaut nach ihrer ASC-Expression. Diese wurden mit primären humanen Keratinozyten verglichen.

Zunächst wurde die Expression von ASC in der Real-time-PCR in 11 verschiedenen Zelllinien angeschaut. In primären Keratinozyten zeigt sich eine deutliche ASC-Expression, in einigen Tumorzelllinien von kPEK der Haut und der Schleimhaut jedoch ist diese verloren: fünf der acht untersuchten Zelllinien (62%) weisen eine deutliche verringerte ASC-Expression im Vergleich zu gesunden Zellen auf. Interessanterweise verloren die am schnellsten wachsende kPEK-Zelllinie ihre ASC-Expression am deutlichsten, was erneut auf die wichtige Rolle von ASC in der Proliferation von Tumorzellen hinweist.

Zur weiteren Analyse wurde zwei Zelllinien oraler PEK miteinander verglichen: SCCO2 mit einer sehr hohen ASC-Expression und SCCO28 mit der niedrigsten ASC-Expression (Abb. 23).

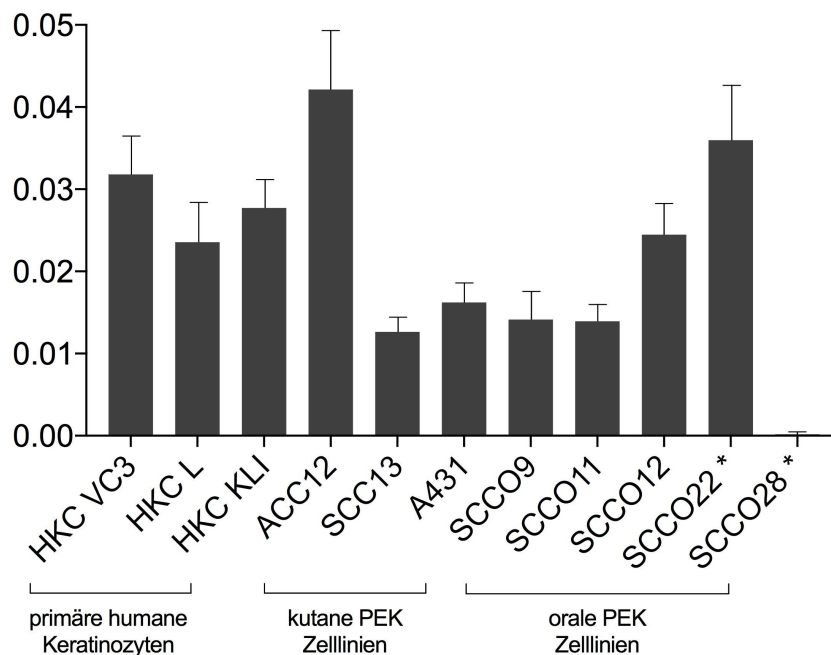


Abbildung 23 Expression von ASC verschiedener PEK-Zelllinien. Die mit * markierten Zelllinien SCCO22 und SCCO28 wurden zur weiteren Untersuchung exemplarisch herausgesucht. Die Graphik wurde ähnlich in der zur Arbeit gehörenden Veröffentlichung verwendet (Meier et al., 2016)

4.4 Die ASC-Expression wird durch Promotor-spezifische Methylierungen herunterreguliert

Um den Mechanismus herauszufinden, wie es zur verminderten Expression von ASC kommt, verglichen wir exemplarisch die Zelllinien mit einer sehr hohen ASC Expression (SCCO22) und mit der geringsten ASC-Expression (SCCO28). Nach der Behandlung mit Natrium-Bisulfit wurde eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt. Als Kontrollen dienten eine kommerziell verfügbare voll methylierte DNA-Sequenz und eine normale Kontroll-DNA. Wie erwartet, amplifizierte sich die methylierte DNA nur mit den Primern, die an methylierte ASC-Sequenzen binden (mASC). Die normale DNA zeigte sich mit einer Bande bei dem nicht-methylierten Primerpaar (ASC). Die Zelllinie SCCO22 exprimierte ASC als unmethylierte DNA ähnlich der ASC-Kontrolle. Diese ASC Sequenzen wurden jedoch bei SCCO28 transkriptionell nicht erfasst. Hier zeigt sich hingegen eine Bande ähnlich der methylierten Kontroll-DNA. Hiermit ist der Mechanismus einer Promotor-spezifischen Methylierung von ASC dargelegt (Abb. 24).

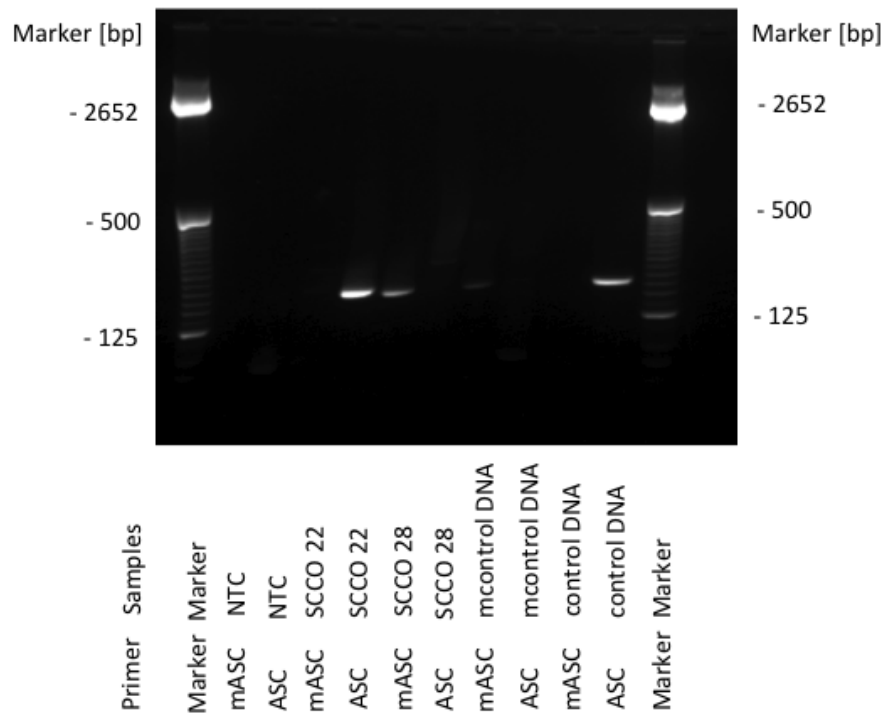


Abbildung 24 Methylierungsspezifische PCR nach Bisulfit-Behandlung. Als Primer wurden ASC spezifische Sequenzen (ASC) oder Primer einer methylierten ASC Sequenz (mASC) verwendet. Als Kontrollen standen neben einer leeren Probe (no template control, NTC) eine methylierte Kontroll DNA (mcontrol DNA) oder eine unmethylierte Kontroll DNA (control DNA) zur Verfügung. Die Graphik wurde so in der zur Arbeit gehörenden Veröffentlichung verwendet (Meier et al., 2016)

4.5 Wiederherstellung der ASC Expression durch 5-Aza-2'-deoxycytidin

Um herauszufinden, ob diese ASC-Methylierung reversibel und damit eine im Rahmen epigenetischer Veränderungen bestehende Methylierung ist, behandelten wir die Zelllinien erneut mit 5-Aza-2'-deoxycytidin. In beiden Zelllinien zeigt sich nach viertägiger Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin eine verstärkte (SCCO22) bzw. eine wiederhergestellte Expression (SCCO28) für ASC (Abb. 25).

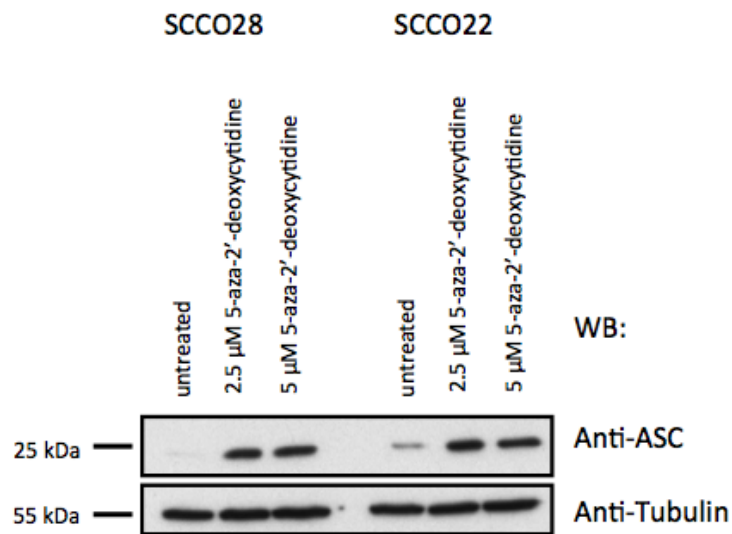


Abbildung 25 Wiederherstellung bzw. Verstärkung der Proteinexpression von ASC im Western Blot (WB) der PEK-Zelllinien SCCO22 und SCCO28 nach 5-Aza-2'-deoxycytidin Behandlung mit zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Ladekontrolle wurde Anti-Tubulin verwendet. Die Graphik wurde so in der zur Arbeit gehörenden Veröffentlichung verwendet. (Meier et al., 2016)

4.6 ASC-Methylierung führt zu reduzierter Inflammasomaktivität

Wie in der bisherigen Arbeit gezeigt, ist die ASC Expression in Plattenepithelkarzinom und deren Zelllinien durch Methylierungen verringert. Damit zeigt sich die tumorsuppressive Funktion von ASC in Tumorzellen. Ferner untersuchten wir, ob eine Methylierung von ASC in Tumoren auch zu einer reduzierten Inflammasomaktivierung führt.

Hierzu wurden die Zellen der beiden Zelllinien SCCO22 und SCCO28 wie zuvor erwähnt dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt. Hier bestätigte sich das zuvor gezeigte Bild, dass ASC nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin bei SCCO28 und SCCO22 nachgewiesen, bzw. vermehrt nachgewiesen werden konnte. Im Unterschied zum vorherigen Versuchskonzept, wurden hier die Zellen jedoch zusätzlich mit UVB bestrahlt, um so eine NLRP3-Inflammasomaktivierung zu forcieren. Diese wurde anhand gespaltener und somit aktivierter Caspase-1 im Überstand gemessen (p10-Antikörper). Zur Kontrolle diente der Nachweis von Anti-Caspase-1 im Zellextrakt, welche bei SCCO22 und SCCO28 sowohl bei den behandelten als auch den nicht behandelten Zellen vorhanden war. SCCO28 konnte

unbehandelt keine gespaltene Caspase-1 in den Überstand sekretieren. Nachdem diese jedoch mit UVB-Strahlung behandelt wurde, war Anti-Caspase-1 im Überstand nachweisbar. Die Zelllinie SCCO22 zeigte bereits vor Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin eine vermehrte zelleigene katalytische Aktivität von Caspase-1, die sowohl vor und nach Behandlung im Überstand nachgewiesen werden konnte, vergleichbar mit normalen Keratinozyten (Abb. 26).

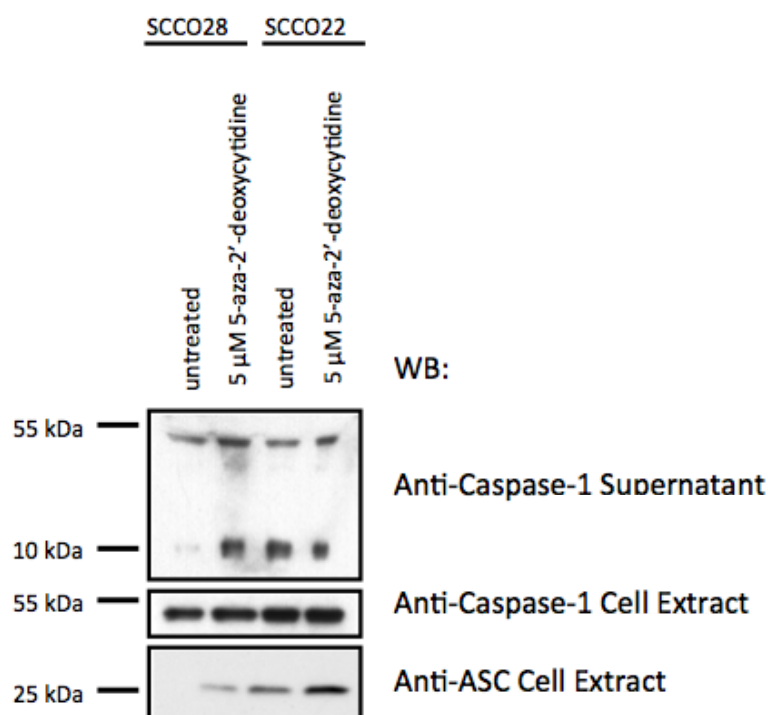


Abbildung 26 Western Blot der Zelllinien SCCO28 und SCCO22 vor und nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin und folgender Behandlung mit UVB-Licht. Gemessen wurde neben Anti-Caspase-1 im Zellextrakt als Kontrolle die p10-Anteile der Caspase-1 im Überstand sowie ASC im Zellextrakt. Die Graphik wurde so in der zur Arbeit gehörenden Veröffentlichung verwendet. (Meier et al., 2016)

5. Diskussion

In einer Analyse der ASC-abhängigen Gen-Expression zeigen Hasegawa et al die multimodalen Funktionen von ASC: Hier regulieren Downstream von ASC 23% der Gene die Transkription, 21% sind mit Entzündungskaskaden assoziiert und 16% mit dem programmierten Zelltod (Hasegawa et al., 2009).

Im Hinblick auf diese unterschiedlichen Funktionen untersuchten wir die Funktion von ASC in kutanen Plattenepithelkarzinomen und konnten zeigen, dass die tumorsuppressive Wirkung von ASC gegenüber der proinflammatorischen Funktion als Inflammasomadapter in kPEK überwiegt.

5.1 Patientenkollektiv

In dem Patientenkollektiv untersuchten wir zunächst den Differenzierungsgrad der Tumoren und deren jeweilige Tumordicke. Daraus resultierend zeigten sich eine durchschnittliche Tumordicke von 6,9 mm und ein mittleres Alter von 78 Jahren. Bei fünf der 72 Patienten lag das Alter unter 65, so dass die Tumoren überwiegend in der älteren Bevölkerung auftreten. In einer großen deutschen Metaanalyse nicht-melanozytärer Tumore der Haut (kPEK und BZK) treten 64% aller Tumoren in der Altersgruppe über 65 Jahre auf (Augustin et al., 2018). In einer Analyse des Krebs-Registers Schleswig-Holstein liegt das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose NMSC bei 71, sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern (Eisemann et al., 2014). Damit lag unser Kollektiv (Alter bei Diagnose 78 Jahre) leicht über dem durchschnittlichen Alter bei Erstdiagnose, was darauf beruht, dass die Tumorzinzidenz mit steigendem Alter zunimmt (Eisemann et al., 2014) und unsere Auswahl der Tumoren nicht auf Patienten beschränkt war, die erstmalig ein kPEK entwickelten. Die Gruppe der metastasierten Tumoren war im Vergleich zu den nicht metastasierten klein (17 metastasierte kPEK, 55 nicht metastasierte kPEK). Das kPEK metastasiert selten und eine vergleichbar große Gruppe metastasierter Tumoren hätte zu einer besseren Verwertbarkeit der Daten geführt. Da es sich bei Patienten mit metastasierten kPEK oftmals um Patienten mit multiplen Tumoren handelt, ist es jedoch schwierig retrospektiv den jeweiligen Primarius klar definieren zu

können. Somit war die Zahl der für die Studie passenden Patienten beschränkt, da wir die Tumordicke und ASC Expression im Primarius bestimmten.

Die kPEKs wuchsen bevorzugt an den UV-exponierten Arealen, wie dem Kapillitium, das den größten Anteil der Tumore ausmachte. Nur neun der 72 Tumore waren an ebenfalls UV exponierten Arealen außerhalb des Kopfes situiert. Dieses Verteilungsmuster entspricht den am häufigsten betroffenen Arealen des Körper, die Seebode et al. beschreiben (Seebode et al., 2016).

30 der 70 unserer untersuchten Tumoren trugen eine Tumordicke unter 6 mm. Eine Tumordicke größer oder gleich 6 mm wird als weiterer Risikofaktor bei kPEK gesehen und diese kPEK weisen eine deutlich höhere Rezidivrate auf (Brantsch et al., 2008). Eine repräsentative Analyse zu der Tumordicke von kPEK bei Erstdiagnose in Deutschland ist schwer zu finden, da sehr dünne kPEK dabei deutlich unterrepräsentiert sind. Zum einen ist ein sehr dünnes kPEK differentialdiagnostisch leicht zu verwechseln mit den unter 1.1.3. genannten Differentialdiagnosen und somit zu übersehen, zum anderen wurde in der Vergangenheit bei dünnen kPEK in der histologischen Beurteilung oftmals keine Tumordicke angegeben. Neben der fehlenden Bestimmung der Tumordicken werden initiale kPEK oftmals nicht histologisch untersucht, da sie durch nicht chirurgische Therapieoptionen wie Kryotherapien oder durch eine topische Therapie behandelt werden. Hinzu kommt, dass viele Krebsregister keine NMSC in ihrem Programm führen und kPEK somit nicht erfasst werden.

5.2 Verlust von ASC in epidermalen Tumoren

Inflammasome wurden zunächst in Immunzellen, wie dendritischen Zellen und Makrophagen beschrieben. Auch in den Zellen, die eine Barrierefunktion aufweisen, wie in den Epithelien des Colons oder auch der Haut werden Inflammasome nachgewiesen (Kostadinova et al., 2016). Die Schutzfunktion der Haut übernimmt neben der intakten Hautbarriere vor allem auch die angeborene Immunität. Hierbei stehen Keratinozyten mit ihrer mechanischen sowie auch ihrer immunologischen Barrierefunktion im Vordergrund. Dazu passend konnten wir in gesunder Haut eine vermehrte Expression von ASC in den oberen Epidermisschichten im Vergleich zu den tiefen zeigen. Die basalen Keratinozyten zeigen hier immunhistochemisch keine ASC-Expression, diese

beginnt in den darüber liegenden Zellen und nimmt an Intensität zur Hautoberfläche bis zur avitalen Hornschicht zu. In den tiefen Schichten der Epidermis ist in der Regel im Vergleich zu höherliegenden keine Differenzierung und somit auch keine Keratinisierung vorhanden. Die Proliferationsrate nimmt nach oben hin ab. Zwar zeigen Drexler et al., dass ASC-defiziente Keratinozyten deutlich erhöhte Proliferationsraten als normale Keratinozyten aufweisen (Drexler et al., 2012), dennoch lässt sich eine verminderte ASC-Expression nicht allein mit einer gesteigerten Proliferationsrate korrelieren. Im Unterschied dazu weisen Condylomata acuminata in allen untersuchten Proben eine ausgeprägte ASC Expression aller Zellen auf. Diese HPV-induzierte epidermale Hyperplasie zeigt sich histologisch als eine akanthotische gleichförmige Proliferation der Epidermis ohne Atypien oder Mitosefiguren. Auch in entzündlichen Dermatosen wie der Psoriasis, bei der neben der Entzündung vor allem auch eine starke Proliferation bei reduzierter Differenzierung auftritt, zeigt sich eine deutliche ASC-Expression in der Epidermis (Drexler et al., 2012).

Betrachtet man ferner die Keratinisierung nimmt diese in der gesunden Haut zur Hautoberfläche stetig zu. Ebenfalls zeigt sich in Kondylomen und der Psoriasis eine zunehmende Keratinisierung. In BZK und noch vielmehr in kPEK ist dies genau umgekehrt, die Tumoren verlieren zunehmend ihre Orthokeratose im Laufe der Tumorgenese. Basalzellkarzinome entstehen aus den tieferen Zellen der Epidermis nahe des Infundibulums der Haarfollikel. Diese Zellen weisen in gesunder Haut eine schwache ASC Intensität in der immunhistologischen Färbung auf. Basalzellkarzinome hingegen zeigen einen kompletten Verlust der ASC Expression. BZK gehören zu den häufigsten malignen Tumoren der Haut aber metastasieren praktisch nicht, obwohl bei ihnen eine Vielzahl von Methylierungen von p53 assoziierten Genen nachgewiesen wurde (Lodygin et al., 2003).

5.3 ASC und Differenzierung

Der Unterschied in den in 5.1. untersuchten Entitäten liegt vor allem in der Differenzierung der Zellen. So sind in Kondylomen und einer Psoriasis sehr gut differenzierte Zellen nachzuweisen, in Plattenepithelkarzinomen sind diese

jedoch sehr viel weniger gut differenziert. So konnten wir zeigen, dass mit einer zunehmenden Dedifferenzierung kutaner Plattenepithelkarzinome auch ein zunehmender signifikanter Verlust von ASC einhergeht. In den G1 Tumoren wurde ASC vor allem in den Regionen einer vermehrten Keratinisierung exprimiert. In den schlecht differenzierten Tumoren zeigte sich keine reguläre Keratinisierung mehr, sondern oftmals Narbengewebe sowie vermehrt mesenchymale Tumoranteile und die Expression von ASC ist verloren. Hierbei wird in oralen und kutanen Karzinomen die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) diskutiert (Guarino, 2007).

Daher wird postuliert, dass ASC indirekt einen Einfluss auf die EMT-ähnliche Dedifferenzierung der Keratinozyten hat: In der bereits zitierten Arbeit zeigen Drexler et al., dass ASC einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Keratinozyten via p53 nimmt, indem UVB-Strahlung zu einer ASC-abhängigen Phosphorylierung von p53 und deren Targetgenen führt (Drexler et al., 2012). p53 wiederum reguliert die EMT (Termen et al., 2013), die mit einer zunehmenden Dedifferenzierung assoziiert ist (Nagamine et al., 2017).

Besonders das vermehrte Vorkommen von metastasierenden kPEK bei Patienten, die mit einem Calcineurin-Inhibitor im Vergleich zu einem mTOR-Inhibitor behandelt wurden, weist erneut auf die wichtige Rolle von p53 in der Progression zu hochmalignen kPEK hin (Wheless et al., 2014). In diesem Zusammenhang ist es interessant, auch die ASC Expression in kPEK von immunsupprimierten im Vergleich zu kPEK immunkompetenten Patienten zu beleuchten. kPEK von immunkompromitierten Patienten weisen ein schnelleres Wachstum, eine erhöhte Rezidivrate und eine vermehrte Metastasierung auf (Harwood et al., 2017). Die Entwicklung eines kPEK beginnt meist mit einem Carcinoma in situ, z.B. einer aktinischen Keratose und ist mit einer zunehmenden Entzündungsreaktion assoziiert (Mittelbronn et al., 1998). Ab welchem Punkt in der Tumorentwicklung eine Entzündung zunächst tumorfördernd und im Verlauf ggf. tumorsuppressiv wirkt, bleibt weiterhin unklar.

5.4 ASC und Prognose

In einer Reihe von Tumorentitäten gibt es eine Assoziation der ASC-Expression auf die Aggressivität und somit Prognose eines Tumors. Beim Prostatakarzinom wurde eine Inaktivierung von ASC besonders in frühen Stadien von später aggressiven Tumoren gesehen (Collard et al., 2006). In Kontrast dazu sehen Martinez et al beim Glioblastom eine signifikant erhöhte Methylierungsrate von ASC, wenn diese Tumoren zur Gruppe der Glioblastomen gehörten, die ein erhöhtes Langzeitüberleben aufwiesen (Martinez et al., 2007). Machida et al. zeigen in Karzinomen der Lunge, dass die ASC-Expression eines niedrigmalignen Adenokarzinoms ähnlich der des gesunden Lungenparenchyms ist. Hochmaligne Tumoren jedoch verlieren die Expression (Machida et al., 2006). Auch in unseren Ergebnissen ist die ASC Expression gut differenzierter kPEK vergleichbar der Expression in gesunder Haut. Beim Cholangiokarzinom (Xiaofang et al., 2012) korreliert ein vermehrter Verlust von ASC mit einer schlechteren Prognose. Beim kPEK konnten wir keinen Unterschied in der ASC Expression im Vergleich metastasierter und nicht metastasierter Tumoren mit identischer Tumordicke beobachten und somit über die ASC Expression direkt auf die Prognose schließen. 2016 untersuchten Shimane et al. den Einfluss von ASC auf die Prognose in oralen Plattenepithelkarzinomen. Immunhistochemisch wurden diese leicht modifiziert nach Wei et al. in drei Gruppen eingeteilt und mit einer Lymphknotenmetastasierung im Rahmen der TNM-Klassifikation korreliert. Auch hier zeigt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (Wei et al., 2010, Shimane et al., 2013). Die meisten Tumorentitäten weisen eine IL-1 Produktion durch infiltrierende myeloide Zellen auf, selber können sie kein IL-1 β / IL-18 produzieren (Yazdi et al., 2010). Keratinozyten und die Zellen der Gingiva weisen hingegen funktionelle Inflammasome auf und können somit direkt IL-1 β / IL-18 produzieren. Es stellt sich die Frage, ob ASC exprimierende Zellen und deren Produktion entzündlicher Zytokine vielleicht eine möglicherweise tumorsuppressive Funktion von ASC ausbalancieren. Findet nun eine Herunterregulation der Expression von ASC im Rahmen der

Tumorentwicklung statt, steht wiederum die nun fehlende tumorsuppressive antiproliferative Funktion im Vordergrund und es kommt zum Tumorwachstum. Eine technische Schwäche unserer Arbeit ist die im Verhältnis kleine Kohorte metastasierter kPEK gegenüber der Gruppe der nicht metastasierten Plattenepithelkarzinome (17/72). Dies liegt an der vergleichsweise seltenen Metastasierung des kPEKs. Hier bedarf es größerer Fallzahlen um valide Aussagen über die Korrelation von ASC Expression und Prognose machen zu können.

Ein weiteres Merkmal zur Einschätzung der Prognose bei kPEK ist die Tumordicke. Eine höhere Tumordicke eines kutanen Plattenepithelkarzinoms ist mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert (Eigentler et al., 2017), während die Tumordicke unabhängig von der ASC-Immunoreaktivität war. Zeigt sich eine erhöhte Tumordicke, so weist der Tumor primär eine ausgeprägte Proliferation der dortigen Tumorzellen auf. Wie bereits in 5.1 erwähnt, lässt sich eine vermehrte Proliferation jedoch nicht mit einer vermehrten ASC-Expression korrelieren. In einer großen Metaanalyse untersuchen Thompson et al. verschiedenen Risikofaktoren beim kPEK im Zusammenhang mit unter anderem Tumordicke und Differenzierung (Thompson et al., 2016). Hierbei zeigt sich die vertikale Tumordicke als entscheidender Faktor bei Metastasierung und Lymphknoteninfiltration. Diese Ergebnisse zeigen sich analog zu der fehlenden Korrelation zwischen ASC und Tumordicke, sowie ASC und Prognose.

Eigentler et al. zeigen, dass das Vorkommen von Desmoplasie ein prognostisch wichtiger Faktor beim kPEK ist (Eigentler et al., 2017). In desmoplastischen kPEK ist die Lokalrezidivrate achtfach erhöht gegenüber Tumoren, denen eine Desmoplasie fehlt (Breuninger et al., 1997). Ebenfalls zeigen alle Tumoren in der zitierten Arbeit, die ein perineurales Wachstum aufwiesen, desmoplastische Tumoranteile. Bei dem desmoplastischen Plattenepithelkarzinom liegen die Tumorzellnester strangartig zwischen ausgeprägtem desmoplastischen Tumorstroma. Auch hier wird als ursächlicher Mechanismus zur vermehrten Infiltration die EMT vermutet.

5.5 ASC und Inflammasome

Bei der Erstellung dieser Arbeit fielen in der Literaturrecherche immer wieder unterschiedliche zum Teil gegenläufige Aussagen zur Expression und Funktion von ASC in den jeweiligen Tumorentitäten auf. Diese werden bestimmt durch die Zellart, in der ASC exprimiert wird, vom Stadium des jeweiligen Tumors und von den infiltrierenden Zellen. Drexler et al. zeigen eine gewebespezifische Funktion von ASC (Drexler et al., 2012): Analog zu unseren Ergebnissen wird ASC in den Tumorzellen eine tumorsuppressive Wirkung zugesprochen und im Mausmodell zeigen Mäuse, die spezifisch in Keratinozyten kein ASC exprimieren eine erhöhte Tumorzinzidenz. Wird die Expression von ASC in Tumor-infiltrierenden myeloiden Zellen unterdrückt, kommt es wiederum zu einem reduzierten Tumoraufreten. Damit zeigt ASC eine pro-inflammatorische tumorigene Wirkung in infiltrierenden myeloiden Zellen und eine tumorsuppressive in Keratinozyten. Die Arbeitsgruppe von Fujita weist sogar eine unterschiedliche Rolle von ASC je nach Tumorstadium bei Melanomen nach (Liu et al., 2013). Wie auch wir in Keratinozyten in kPEK zeigen konnten, ist ASC in den Melanozyten in Melanomen geringer exprimiert, bei sonst deutlicher Expression in Melanozyten gesunder Haut, analog den Keratinozyten im Plattenepithelkarzinom unseres Kollektivs. Ein Knock-down von ASC in primären und metastasierten Melanomzelllinien führt jeweils zu einer reduzierten Caspase-1-Aktivität. Interessanterweise jedoch unterscheiden sich die beiden Gruppen hinsichtlich ihrer NF- κ B-Aktivität. In den metastasierten Tumoren führt ASC durch eine vermehrte NF- κ B-Aktivität und einer Caspase-1-abhängigen IL-1 β -Sekretion zu einer erhöhten Zellviabilität und zu Tumorwachstum. In primären Melanomen hingegen führt eine erhöhte ASC-Expression zu einer verminderten NF- κ B-Aktivität und verringert die Zellviabilität (Liu et al., 2013). Vor diesem Hintergrund müssen die unterschiedlichen Rollen von ASC, sowohl als Teil des Inflammasoms, als auch dessen Inflammasom-unabhängige Wirkung untersucht werden.

In unserer Arbeit haben wir die Rolle von ASC als Teil des Inflammasoms über die Aktivierung von Caspase-1 bestimmt. Diese führt sowohl zu einer IL-1 β wie auch zu einer IL-18 Freisetzung. Nicht untersucht wurde, ob es je nach Gewebe

einen Unterschied in der Produktion von diesen beiden Effektorzytokinen gibt. In den Epithelien des Magens wird in einem ASC-defizienten Mausmodell zum Magenkarzinom eine verminderte IL-18-, nicht aber IL-1 β -Produktion im Tumorgewebe beschrieben (Deswaerte et al., 2017). Um also die genaue Wirkung von ASC in der Tumorprogression und -suppression bei kutanen Plattenepithelkarzinomen beurteilen zu können, sollten zudem die Rollen der jeweiligen Zytokine downstream von ASC beleuchtet werden.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass Tumore ASC via Promotor-spezifischer Methylierung ausschalten, untersuchten wir verschiedene Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen hinsichtlich ihrer ASC-Expression. Hierbei zeigten sich sowohl Zelllinien, die ASC komplett verloren haben und wiederum andere deren Expression ähnlich derer primärer Keratinozyten war. Analog zu der Methylierung von ASC war auch die Inflammasomaktivität eingeschränkt: Die Zelllinie mit deutlich verminderter ASC-Expression war nicht in der Lage Caspase-1 zu spalten oder IL-1 zu sekretieren. Die Varianz der ASC-Expression in den unterschiedlichen Zelllinien ist gut vereinbar mit dem klinischen Verlauf von PEK, da diese ein sehr unterschiedliches Wachstum aufweisen: Einige wachsen rasch destruierend und ulzerierend, andere wiederum weisen ein sehr langsames Wachstum auf.

5.6 ASC und Tumorthherapie

Da es nach wie vor an wirksamen Therapien bei dem nicht operablen kPEK, sowie dem metastasierten kPEK fehlt, untersuchten wir ob demethylierende Agenzien, wie z.B. 5-Aza-2'-deoxycytidin (Vidaza®) zu einer vollständigen Wiederexpression von ASC führen und somit die Aktivierung zu einer tumorsuppressiven Wirkung von ASC führt. Wir konnten durch Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin die ASC-Expression in den Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen wiederherstellen. Die Expression von ASC führte zu einem funktionsfähigem Inflammasom, da nach UVB-Aktivierung die behandelten in der Lage waren Caspase-1 zu spalten und IL-1 zu sekretieren. Die unbehandelten Zellen reagierten nicht. Hiermit zeigten wir erstmalig in Plattenepithelkarzinomen, dass die Promotormethylierung direkt die

Inflammasomaktivierung beeinflusst. Dies ist insbesondere von Relevanz, bezüglich der pro-inflammatorischen topischen Therapie des nicht-melanozytären Hautkrebses, die eine Immunaktivierung voraussetzen. Imiquimod wird als topische Therapie bei nicht melanozytären Hauttumoren wie kPEK, BZK oder auch Genitalwarzen verwendet. Es ist ein Ligand sowohl für TLR7 wie auch NLRP3 und induziert somit eine IL-1- als auch eine Typ-1-Interferon-gesteuerte Immunantwort. Ingenol mebutate wird bei der topischen Therapie von aktinischen Keratosen eingesetzt, dessen antitumorigenen Effekte auf eine IL-1-Freisetzung zurückgeführt werden (Le et al., 2016).

Die Systemtherapeutika insbesondere metastasierter kPEK sind bis dato in ihrer Wirksamkeit begrenzt. In den Zellen des Pankreasstumors zeigt sich ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapeutica Docetaxel und Gemcitabin, wenn diese zuvor mit 5-Aza-2'-deoxycytidin vorbehandelt wurden (Ramachandran et al., 2010). Durch die Inaktivierung von ASC in vielen Tumorentitäten wie auch in unseren Tumoren scheint der antiproliferative Effekt von ASC im Vordergrund zu stehen im Vergleich zur Funktion der inflammatorischen Antwort im Rahmen des Inflammasoms. Interessant wird dies insbesondere, wird die inflammatorische Antwort als Mechanismus der Tumortherapie genutzt. Das Feld der Immuntherapien wird auch beim kPEK gerade erst entdeckt. Bereits 2014 veröffentlichte Kim eine Arbeit, die im Mausmodell mit Colon-, bzw. Mammakarzinomen in der Kombination von einer Immuncheckpointblockade mit 5-Azacytidin oder 5-aza-2'-deoxyazacytidin (Decitabin) ein deutliches Überleben im Vergleich zu Immuntherapien (Anti-programmed cell death-1 (PD-1) oder Anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) Antikörper) allein zeigt (Kim et al., 2014). Selbst in weniger immunogenen Tumoren führte die Vorbehandlung zu einem verbesserten Ansprechen auf die Immuntherapien (Covre et al., 2015). Im Mausmodell des nicht kleinzelligen Bronchial-Karzinoms korrelieren erniedrigte Methyltransferasen sowohl im Transskript als auch auf Proteinebene als Folge epigenetischer Therapien mit einem besseren Ansprechen auf die Antitumortherapie (Liu et al., 2016). Der Mechanismus dahinter wird zum einen auf die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie auch ASC,

zurückgeführt, zum anderen führt eine Behandlung mit demethylierenden Agenzien zu einer Reduktion von Myelo-derived-suppressor-Zellen (MDSC). Deren Aktivität ist vor allem durch Entzündung gesteuert, unter anderem durch IL-1 β . Die Aktivierung von Inflammasomen und deren IL-1 β -Produktion führen zu einer vermehrten Infiltration von MDSC in das Tumorgewebe (Guo et al., 2016). Der größte Anteil von IL-1 β im Tumorgewebe kommt aus tumorinfiltrierenden myeloiden Zellen (Drexler et al., 2012). Die IL-1 β -Produktion der Inflammasome der Keratinozyten spielt wiederum eine untergeordnete Rolle. Dazu passend zeigten Drexler et al., dass eine Ablation von ASC in Keratinozyten im Rahmen eines ASC-defizienten Mausmodells keine signifikanten Änderungen des proinflammatorischen Zytokinprofils im Tumorextrakt verursachte, es aber vielmehr zu einem vermehrten Tumorwachstum kam.

Das Gleichgewicht zwischen tumorfördernden und tumorhemmenden Faktoren entscheidet über Tumorwachstum oder Tumorregression. Die in Keratinozyten inflammasomabhängige IL-1 β -Produktion spielt folglich in der Tumorprogression nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr ist es eine inflammasomunabhängige antiproliferative Wirkung von ASC, die im Vordergrund steht.

6. Zusammenfassung

Das Apoptosis associated Speck like Protein containing a caspase recruitment domain (ASC) wurde erstmalig in einer humanen Leukämie Zelllinie beschrieben, nachdem in dieser Apoptose induziert wurde. Parallel wurde ASC als Target of Methylation-induced-silencing (TMS1) beschrieben, welches in vielen Tumorentitäten via Methylierung herunterreguliert ist. Mittlerweile ist ASC besonders als Adapterprotein in verschiedenen Inflammasomen in den Zellen des angeborenen Immunsystems beschrieben und reguliert somit die Aktivierung der Caspase-1 und somit die Produktion von IL-1 β und IL-18.

Neben dem Vorkommen in den Zellen des angeborenen Immunsystems wurde ASC auch Zellen an epithelialen Barrieren nachgewiesen, wie in der Darmmukosa und in der Haut. Dies lässt sich auf den dort vermehrt vorkommen Kontakt zu Warnsignalen, PAMPs oder DAMPs zurückführen. Die Funktion von ASC liegt in der Bildung eines Proteinkomplexes, dem Inflammasom. Die Rolle von ASC in der Tumorgenese wurde in mehreren Zusammenhängen diskutiert und diversen Tumorentitäten evaluiert. Der Verlust von ASC via Promotorspezifischer Methylierung in diversen Tumoren spricht für eine tumorsuppressive Funktion.

Wir konnten zeigen, dass auch in kutanen Plattenepithelkarzinomen ASC in Abhängigkeit von der Differenzierung herunter reguliert wird. Je differenzierter die Zellen eines Tumors sind, desto eher ist auch die Expression von ASC vergleichbar derer normaler Epidermis. Verliert der Tumor jedoch zunehmend die Differenzierung, nimmt die Expression von ASC weiterhin ab. Die Tumordicke und die Tatsache ob ein Tumor bereits metastasiert war oder nicht, korrelierte nicht mit der ASC Expression Die Regulation der Expression von ASC findet im Rahmen von Promotor-spezifischen Methylierungen statt. Die Methylierung von ASC ist reversibel, wie wir nach der Behandlung mit demethylierenden Agenzien (5-Aza-2'-deoxycytidin) zeigen konnten, was sowohl ASC als auch die Inflammasomaktivität wiederherstellen konnte.

Die Funktion von ASC als Inflammasomadaptor prüften wir in Zelllinien humaner Plattenepithelkarzinome wo wir deren Fähigkeit Caspase-1 zu spalten untersuchten. Hierbei war diese in den Tumoren zunächst deutlich beeinträchtigt, jedoch nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin wieder herstellbar.

Zusammenfassend weist diese Arbeit darauf hin, dass die inflammatorische Funktion von ASC in kutanen Plattenepithelkarzinomen biologisch weniger relevant ist als dessen proapoptischer Einfluss auf die Proliferation, da ASC in kPEK via promotorspezifischen Methylierungen herunterreguliert ist, obwohl hierdurch ebenfalls die Inflammasomaktivität beeinträchtigt wird. Die therapeutische Demethylierung und damit Aktivierung von ASC durch 5-Aza-2'-deoxycytidin führt genauso auch wieder zu einer intakten Inflammasomaktivität. Mit dieser Arbeit zeigten wir erstmalig in Plattenepithelkarzinomen, dass die Promotormethylierung von ASC direkt die Inflammasomaktivierung beeinflusst.

7. Literaturverzeichnis

ALLEN, I. C., TEKIPPE, E. M., WOODFORD, R. M., URONIS, J. M., HOLL, E. K., ROGERS, A. B., HERFARTH, H. H., JOBIN, C. & TING, J. P. 2010. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*, 207, 1045-56.

ASHIDA, H., MIMURO, H., OGAWA, M., KOBAYASHI, T., SANADA, T., KIM, M. & SASAKAWA, C. 2011. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J Cell Biol*, 195, 931-42.

AUGUSTIN, J., KIS, A., SORBE, C., SCHAFER, I. & AUGUSTIN, M. 2018. Epidemiology of Skin Cancer in the German Population: Impact of Socioeconomic and Geographic Factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol*.

BAUERNFEIND, F. G., HORVATH, G., STUTZ, A., ALNEMRI, E. S., MACDONALD, K., SPEERT, D., FERNANDES-ALNEMRI, T., WU, J., MONKS, B. G., FITZGERALD, K. A., HORNUNG, V. & LATZ, E. 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, 183, 787-91.

BAYLIN, S. B., HERMAN, J. G., GRAFF, J. R., VERTINO, P. M. & ISSA, J. P. 1998. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*, 72, 141-96.

BEILHARZ, M., DE NARDO'S, D., LATZ, E. & FRANKLIN, B. S. 2016. Measuring NLR Oligomerization II: Detection of ASC Speck Formation by Confocal Microscopy and Immunofluorescence. *Methods Mol Biol*, 1417, 145-58.

BRANTSCH, K. D., MEISNER, C., SCHONFISCH, B., TRILLING, B., WEHNER-CAROLI, J., ROCKEN, M. & BREUNINGER, H. 2008. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*, 9, 713-20.

BREUNINGER, H., BRANTSCH, K., EIGENTLER, T. & HAFNER, H. M. 2012. Comparison and evaluation of the current staging of cutaneous carcinomas. *J Dtsch Dermatol Ges*, 10, 579-86.

BREUNINGER, H. & HAWLITSCHKE, E. 1995. Das Mikro staging des Plattenepithelkarzinoms der Haut und Lippen. *Tilgen W., Petzoldt D. (eds) Operative und konservative Dermato-Onkologie. Fortschritte der operativen und onkologischen Dermatologie, Springer, Berlin, Heidelberg*, 10.

BREUNINGER, H., SCHAUMBURG-LEVER, G., HOLZSCHUH, J. & HORNY, H. P. 1997. Desmoplastic squamous cell carcinoma of skin and vermilion surface: a highly malignant subtype of skin cancer. *Cancer*, 79, 915-9.

BRODERS, A. C. 1921. Squamous-Cell Epithelioma of the Skin: A Study of 256 Cases. *Ann Surg*, 73, 141-60.

CANUETO, J. & ROMAN-CURTO, C. 2017. Novel Additions to the AJCC's New Staging Systems for Skin Cancer. *Actas Dermosifiliogr*.

COLLARD, R. L., HARYA, N. S., MONZON, F. A., MAIER, C. E. & O'KEEFE, D. S. 2006. Methylation of the ASC gene promoter is associated with aggressive prostate cancer. *Prostate*, 66, 687-95.

CONWAY, K. E., MCCONNELL, B. B., BOWRING, C. E., DONALD, C. D., WARREN, S. T. & VERTINO, P. M. 2000. TMS1, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers. *Cancer Res*, 60, 6236-42.

COVRE, A., CORAL, S., NICOLAY, H., PARISI, G., FAZIO, C., COLIZZI, F., FRATTA, E., DI GIACOMO, A. M., SIGALOTTI, L., NATALI, P. G. & MAIO, M. 2015. Antitumor activity of epigenetic immunomodulation combined with CTLA-4 blockade in syngeneic mouse models. *Oncoimmunology*, 4, e1019978.

DAS, P. M., RAMACHANDRAN, K., VANWERT, J., FERDINAND, L., GOPISETTY, G., REIS, I. M. & SINGAL, R. 2006. Methylation mediated silencing of TMS1/ASC gene in prostate cancer. *Mol Cancer*, 5, 28.

DAVIS, B. K., WEN, H. & TING, J. P. 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*, 29, 707-35.

DE KONING, H. D., BERGBOER, J. G., VAN DEN BOGAARD, E. H., VAN VLIJMEN-WILLEMS, I. M., RODIJK-OLTHUIS, D., SIMON, A., ZEEUWEN, P. L. & SCHALKWIJK, J. 2012. Strong induction of AIM2 expression in human epidermis in acute and chronic inflammatory skin conditions. *Exp Dermatol*, 21, 961-4.

DESWAERTE, V., NGUYEN, P. M., WEST, A., BROWNING, A. F., YU, L., RUWANPURA, S., BALIC, J., LIVIS, T., GIRARD, C., PREAUDET, A., OSHIMA, H., FUNG, K. Y., TYE, H., NAJDOVSKA, M., ERNST, M., OSHIMA, M., GABAY, C., PUTOCZKI, T. L. & JENKINS, B. J. 2017. Inflammasome adaptor ASC suppresses apoptosis of gastric cancer cells by an IL-18 mediated inflammation-independent mechanism. *Cancer Res*.

DING, J., WANG, K., LIU, W., SHE, Y., SUN, Q., SHI, J., SUN, H., WANG, D. C. & SHAO, F. 2016. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 535, 111-6.

DREXLER, S. K., BONSIGNORE, L., MASIN, M., TARDIVEL, A., JACKSTADT, R., HERMEKING, H., SCHNEIDER, P., GROSS, O., TSCHOPP, J. & YAZDI, A. S. 2012. Tissue-specific opposing functions of the inflammasome adaptor ASC in the regulation of epithelial skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 18384-9.

DUEWELL, P., KONO, H., RAYNER, K. J., SIROIS, C. M., VLADIMIR, G., BAUERNFEIND, F. G., ABELA, G. S., FRANCHI, L., NUNEZ, G., SCHNURR, M., ESPEVIK, T., LIEN, E., FITZGERALD, K. A., ROCK, K. L., MOORE, K. J., WRIGHT, S. D., HORNUNG, V. & LATZ, E. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464, 1357-61.

EIGENTLER, T. K., LEITER, U., HAFNER, H. M., GARBE, C., ROCKEN, M. & BREUNINGER, H. 2017. Survival of Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Results of a Prospective Cohort Study. *J Invest Dermatol*, 137, 2309-2315.

EISEMANN, N., WALDMANN, A., GELLER, A. C., WEINSTOCK, M. A., VOLKMER, B., GREINERT, R., BREITBART, E. W. & KATALINIC, A. 2014. Non-melanoma skin cancer incidence and impact of skin cancer screening on incidence. *J Invest Dermatol*, 134, 43-50.

EROGLU, A., BERBEROGLU, U. & BERREROGLU, S. 1996. Risk factors related to locoregional recurrence in squamous cell carcinoma of the skin. *J Surg Oncol*, 61, 124-30.

ESTELLER, M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358, 1148-59.

FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301, 89-92.

FRIDMAN, J. S. & LOWE, S. W. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22, 9030-40.

GARDINER-GARDEN, M. & FROMMER, M. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196, 261-82.

GOLL, M. G. & BESTOR, T. H. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 74, 481-514.

GRADY, W. M., WILLIS, J., GUILFORD, P. J., DUNBIER, A. K., TORO, T. T., LYNCH, H., WIESNER, G., FERGUSON, K., ENG, C., PARK, J. G., KIM, S. J. & MARKOWITZ, S. 2000. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet*, 26, 16-7.

GRAY, D. T., SUMAN, V. J., SU, W. P., CLAY, R. P., HARMSSEN, W. S. & ROENIGK, R. K. 1997. Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992. *Arch Dermatol*, 133, 735-40.

GUAN, X., SAGARA, J., YOKOYAMA, T., KOGANEHIRA, Y., OGUCHI, M., SAIDA, T. & TANIGUCHI, S. 2003. ASC/TMS1, a caspase-1 activating adaptor, is downregulated by aberrant methylation in human melanoma. *Int J Cancer*, 107, 202-8.

GUARINO, M. 2007. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 2153-60.

GUO, B., FU, S., ZHANG, J., LIU, B. & LI, Z. 2016. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Sci Rep*, 6, 36107.

HARWOOD, C. A., ARRON, S. T., PROBY, C. M., ASGARI, M. M., BOUWES BAVINCK, J. N., GREEN, A. C., TOLAND, A. E. & KERACON, C. 2017. Organ transplantation and cutaneous squamous cell carcinoma: progress, pitfalls and priorities in immunosuppression-associated keratinocyte carcinoma. *Br J Dermatol*, 177, 1150-1151.

HASEGAWA, M., IMAMURA, R., MOTANI, K., NISHIUCHI, T., MATSUMOTO, N., KINOSHITA, T. & SUDA, T. 2009. Mechanism and repertoire of ASC-mediated gene expression. *J Immunol*, 182, 7655-62.

ISSA, J. P. 1999. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 32, 31-43.

JAENISCH, R. & BIRD, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 Suppl, 245-54.

JONES, P. A. & TAYLOR, S. M. 1980. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20, 85-93.

JOURDAN, T., GODLEWSKI, G., CINAR, R., BERTOLA, A., SZANDA, G., LIU, J., TAM, J., HAN, T., MUKHOPADHYAY, B., SKARULIS, M. C., JU, C., AOUADI, M., CZECH, M. P. & KUNOS, G. 2013. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat Med*, 19, 1132-40.

KARIA, P. S., MORGAN, F. C., RUIZ, E. S. & SCHMULTS, C. D. 2017. Clinical and Incidental Perineural Invasion of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Pooled Analysis of Outcomes Data. *JAMA Dermatol*, 153, 781-788.

KIM, K., SKORA, A. D., LI, Z., LIU, Q., TAM, A. J., BLOSSER, R. L., DIAZ, L. A., JR., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & ZHOU, S. 2014. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 11774-9.

KNUDSON, A. G., JR. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 820-3.

KOSTADINOVA, E., CHAPUT, C., GUTBIER, B., LIPPMANN, J., SANDER, L. E., MITCHELL, T. J., SUTTORP, N., WITZENRATH, M. & OPITZ, B. 2016. NLRP3 protects alveolar barrier integrity by an inflammasome-independent increase of epithelial cell adherence. *Sci Rep*, 6, 30943.

LATZ, E., XIAO, T. S. & STUTZ, A. 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, 13, 397-411.

LE, T. T., SKAK, K., SCHRODER, K., SCHRODER, W. A., BOYLE, G. M., PIERCE, C. J. & SUHRBIER, A. 2016. IL-1 Contributes to the Anti-Cancer Efficacy of Ingenol Mebutate. *PLoS One*, 11, e0153975.

LEBLEBICI, C., PASAOGLU, E., KELTEN, C., DARAKCI, S. & DURSUN, N. 2017. Cytokeratin 17 and Ki-67: Immunohistochemical markers for the differential diagnosis of keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, 13, 2539-2548.

LEIBOVITCH, I., HUILGOL, S. C., SELVA, D., HILL, D., RICHARDS, S. & PAVER, R. 2005. Cutaneous squamous cell carcinoma treated with Mohs micrographic surgery in Australia II. Perineural invasion. *J Am Acad Dermatol*, 53, 261-6.

LIDDINGTON, M., RICHARDSON, A. J., HIGGINS, R. M., ENDRE, Z. H., VENNING, V. A., MURIE, J. A. & MORRIS, P. J. 1989. Skin cancer in renal transplant recipients. *Br J Surg*, 76, 1002-5.

LINDELOF, B., SIGURGEIRSSON, B., GABEL, H. & STERN, R. S. 2000. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol*, 143, 513-9.

LIU, B., SONG, J., LUAN, J., SUN, X., BAI, J., WANG, H., LI, A., ZHANG, L., FENG, X. & DU, Z. 2016. Promoter methylation status of tumor suppressor

genes and inhibition of expression of DNA methyltransferase 1 in non-small cell lung cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, 241, 1531-9.

LIU, W., LUO, Y., DUNN, J. H., NORRIS, D. A., DINARELLO, C. A. & FUJITA, M. 2013. Dual role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in tumorigenesis of human melanoma. *J Invest Dermatol*, 133, 518-27.

LIU, X. F., JIANG, H., ZHANG, C. S., YU, S. P., WANG, Z. Q. & SU, H. L. 2012. Targeted drug regulation on methylation of p53-BAX mitochondrial apoptosis pathway affects the growth of cholangiocarcinoma cells. *J Int Med Res*, 40, 67-75.

LODYGIN, D., YAZDI, A. S., SANDER, C. A., HERZINGER, T. & HERMEKING, H. 2003. Analysis of 14-3-3sigma expression in hyperproliferative skin diseases reveals selective loss associated with CpG-methylation in basal cell carcinoma. *Oncogene*, 22, 5519-24.

MACHIDA, E. O., BROCK, M. V., HOOKER, C. M., NAKAYAMA, J., ISHIDA, A., AMANO, J., PICCHI, M. A., BELINSKY, S. A., HERMAN, J. G., TANIGUCHI, S. & BAYLIN, S. B. 2006. Hypermethylation of ASC/TMS1 is a sputum marker for late-stage lung cancer. *Cancer Res*, 66, 6210-8.

MARIATHASAN, S., NEWTON, K., MONACK, D. M., VUCIC, D., FRENCH, D. M., LEE, W. P., ROOSE-GIRMA, M., ERICKSON, S. & DIXIT, V. M. 2004. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 430, 213-8.

MARKS, R., RENNIE, G. & SELWOOD, T. 1988. The relationship of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas to solar keratoses. *Arch Dermatol*, 124, 1039-42.

MARTINEZ, R., SCHACKERT, G. & ESTELLER, M. 2007. Hypermethylation of the proapoptotic gene TMS1/ASC: prognostic importance in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, 82, 133-9.

MARTINON, F., BURNS, K. & TSCHOPP, J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 10, 417-26.

MASUMOTO, J., DOWDS, T. A., SCHANER, P., CHEN, F. F., OGURA, Y., LI, M., ZHU, L., KATSUYAMA, T., SAGARA, J., TANIGUCHI, S., GUMUCIO, D. L., NUNEZ, G. & INOHARA, N. 2003. ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 303, 69-73.

MASUMOTO, J., TANIGUCHI, S., AYUKAWA, K., SARVOTHAM, H., KISHINO, T., NIIKAWA, N., HIDAKA, E., KATSUYAMA, T., HIGUCHI, T. & SAGARA, J. 1999. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*, 274, 33835-8.

MASUMOTO, J., TANIGUCHI, S., NAKAYAMA, J., SHIOHARA, M., HIDAKA, E., KATSUYAMA, T., MURASE, S. & SAGARA, J. 2001. Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 49, 1269-75.

MCCONNELL, B. B. & VERTINO, P. M. 2004. TMS1/ASC: the cancer connection. *Apoptosis*, 9, 5-18.

MEIER, K., DREXLER, S. K., EBERLE, F. C., LEFORT, K. & YAZDI, A. S. 2016. Silencing of ASC in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*, 11, e0164742.

MEIER, K. & YAZDI, A. S. 2013. [Validity of the current classification of cutaneous squamous cell carcinoma]. *Hautarzt*, 64, 384-6.

MITTELBRONN, M. A., MULLINS, D. L., RAMOS-CARO, F. A. & FLOWERS, F. P. 1998. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol*, 37, 677-81.

MOY, R. & ELIEZRI, Y. D. 1994. Significance of human papillomavirus-induced squamous cell carcinoma to dermatologists. *Arch Dermatol*, 130, 235-8.

MYOHANEN, S. K., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 1998. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res*, 58, 591-3.

NAGAMINE, E., HIRAYAMA, K., MATSUDA, K., OKAMOTO, M., OHMACHI, T., UCHIDA, K., KADOSAWA, T. & TANIYAMA, H. 2017. Invasive Front Grading and Epithelial-Mesenchymal Transition in Canine Oral and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Vet Pathol*, 54, 783-791.

NORDLING, C. O. 1953. A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer*, 7, 68-72.

OHTSUKA T, L. X., KOGA Y, KITAJIMA Y, NAKAFUSA Y, HA CW, LEE SW, MIYAZAKI K. 2006. Methylation-induced silencing of ASC and the effect of expressed ASC on p53-mediated chemosensitivity in colorectal cancer. *Oncogene*, Mar 16, 1807-11.

PETTER, G. & HAUSTEIN, U. F. 2000. Histologic subtyping and malignancy assessment of cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg*, 26, 521-30.

QUE, S. K. T., ZWALD, F. O. & SCHMULTS, C. D. 2018. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *J Am Acad Dermatol*, 78, 237-247.

RAMACHANDRAN, K., MILLER, H., GORDIAN, E., ROCHA-LIMA, C. & SINGAL, R. 2010. Methylation-mediated silencing of TMS1 in pancreatic cancer and its potential contribution to chemosensitivity. *Anticancer Res*, 30, 3919-25.

ROGERS, H. W., WEINSTOCK, M. A., HARRIS, A. R., HINCKLEY, M. R., FELDMAN, S. R., FLEISCHER, A. B. & COLDIRON, B. M. 2010. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Arch Dermatol*, 146, 283-7.

SCHRODER, K. & TSCHOPP, J. 2010. The inflammasomes. *Cell*, 140, 821-32.

SEEBODE, C., LEHMANN, J. & EMMERT, S. 2016. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies. *Anticancer Res*, 36, 1371-8.

SEGOVIA, J., SABBAH, A., MGBEMENA, V., TSAI, S. Y., CHANG, T. H., BERTON, M. T., MORRIS, I. R., ALLEN, I. C., TING, J. P. & BOSE, S. 2012. TLR2/MyD88/NF-kappaB pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. *PLoS One*, 7, e29695.

SHI, J., ZHAO, Y., WANG, K., SHI, X., WANG, Y., HUANG, H., ZHUANG, Y., CAI, T., WANG, F. & SHAO, F. 2015. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526, 660-5.

SHIMANE, T., KOBAYASHI, H., TAKEOKA, M., KITAZAWA, M., MATSUMURA, T., HIDA, S., XIAO, T., KOIKE, T., TANIGUCHI, S. & KURITA, H. 2013. Clinical significance of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 115, 799-809.

STENBECK, K. D., BALANDA, K. P., WILLIAMS, M. J., RING, I. T., MACLENNAN, R., CHICK, J. E. & MORTON, A. P. 1990. Patterns of treated non-melanoma skin cancer in Queensland--the region with the highest incidence rates in the world. *Med J Aust*, 153, 511-5.

STONE, A. R., BOBO, W., BRAT, D. J., DEVI, N. S., VAN MEIR, E. G. & VERTINO, P. M. 2004. Aberrant methylation and down-regulation of TMS1/ASC in human glioblastoma. *Am J Pathol*, 165, 1151-61.

STRATIGOS, A., GARBE, C., LEBBE, C., MALVEHY, J., DEL MARMOL, V., PEHAMBERGER, H., PERIS, K., BECKER, J. C., ZALAUDEK, I., SAIAG, P., MIDDLETON, M. R., BASTHOLT, L., TESTORI, A., GROB, J. J., EUROPEAN DERMATOLOGY, F., EUROPEAN ASSOCIATION OF, D.-O., EUROPEAN ORGANIZATION FOR, R. & TREATMENT OF, C. 2015. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*, 51, 1989-2007.

TERASAWA, K., SAGAE, S., TOYOTA, M., TSUKADA, K., OGI, K., SATOH, A., MITA, H., IMAI, K., TOKINO, T. & KUDO, R. 2004. Epigenetic inactivation of TMS1/ASC in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 2000-6.

TERMEN, S., TAN, E. J., HELDIN, C. H. & MOUSTAKAS, A. 2013. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor beta. *J Cell Physiol*, 228, 801-13.

THOMPSON, A. K., KELLEY, B. F., PROKOP, L. J., MURAD, M. H. & BAUM, C. L. 2016. Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Recurrence, Metastasis, and Disease-Specific Death: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol*, 152, 419-28.

VIRMANI, A., RATHI, A., SUGIO, K., SATHYANARAYANA, U. G., TOYOOKA, S., KISCHEL, F. C., TONK, V., PADAR, A., TAKAHASHI, T., ROTH, J. A., EUHUS, D. M., MINNA, J. D. & GAZDAR, A. F. 2003. Aberrant methylation of TMS1 in small cell, non small cell lung cancer and breast cancer. *Int J Cancer*, 106, 198-204.

WADDINGTON, C. H. 1942. CANALIZATION OF DEVELOPMENT AND THE INHERITANCE OF ACQUIRED CHARACTERS. *Nature*, 150, 563-565.

WEBER, C. H. & VINCENZ, C. 2001. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci*, 26, 475-81.

WEI, Q., ZHOU, W., WANG, W., GAO, B., WANG, L., CAO, J. & LIU, Z. P. 2010. Tumor-suppressive functions of leucine zipper transcription factor-like 1. *Cancer Res*, 70, 2942-50.

WHELESS, L., JACKS, S., MOONEYHAM POTTER, K. A., LEACH, B. C. & COOK, J. 2014. Skin cancer in organ transplant recipients: more than the immune system. *J Am Acad Dermatol*, 71, 359-65.

WOLFFE, A. P. & GUSCHIN, D. 2000. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol*, 129, 102-22.

XIANG, F., LUCAS, R., HALES, S. & NEALE, R. 2014. Incidence of nonmelanoma skin cancer in relation to ambient UV radiation in white populations, 1978-2012: empirical relationships. *JAMA Dermatol*, 150, 1063-71.

XIAOFANG, L., KUN, T., SHAOPING, Y., ZAIQIU, W. & HAILONG, S. 2012. Correlation between promoter methylation of p14(ARF), TMS1/ASC, and DAPK, and p53 mutation with prognosis in cholangiocarcinoma. *World J Surg Oncol*, 10, 5.

YAZDI, A. S., DREXLER, S. K. & TSCHOPP, J. 2010. The role of the inflammasome in nonmyeloid cells. *J Clin Immunol*, 30, 623-7.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	<i>Unterschiedliche klinische Bilder des kutanen Plattenepithelkarzinoms</i>	4
Abbildung 2	<i>Differentialdiagnosen des Plattenepithelkarzinoms und das klinische Erscheinungsbild (Bilddatenbank der Hautklinik Tübingen): Von oben links beginnend im Uhrzeigersinn: aktinische Keratose Basalzellkarzinom, Verruca vulgaris, Psoriasis vulgaris</i>	5
Abbildung 3	<i>Formation von ASC-Aggregaten nach Stimulation von humanen ASC-mCerulean-exprimierenden THP-1 Monozyten mit LPS und Nigericin. Rot: Plasmamembran, blau: Nuklei, grün: ASC-mCerulean. Die Abbildung zeigt einen zeitlichen Ablauf der Speck-like-Formation über zehn Minuten von links nach rechts. Die Graphik entstammt der Originalarbeit (Beilharz et al., 2016)</i>	14
Abbildung 4	<i>Proteinstruktur und Genlokus von ASC. Offene Boxen zeigen Exons. Es sind zwei Varianten beschrieben, die α- und die β-Variante, mit ähnlicher Expression. Die Graphik entstammt der Originalarbeit (McConnell and Vertino, 2004)</i>	15
Abbildung 5	<i>Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und von IL-1β (angelehnt an Invivogen)</i>	17
Abbildung 6	<i>Bisulfidkonversion von Cytosin in Uracil ((c) New England Biomark, Bisulfit Conversion)</i>	34
Abbildung 7	<i>Normale Haut in der ASC Färbung. Zunahme der ASC-Proteinexpression in suprabasalen Epidermisetagen</i>	40
Abbildung 8	<i>Histologisches Bild sonnenexponierter Haut in der ASC-Färbung</i>	41
Abbildung 9	<i>Psoriasis vulgaris in der ASC Färbung. Das Bild entstammt der zitierten Originalarbeit. (Drexler et al., 2012)</i>	42
Abbildung 10	<i>Immunhistologisches Bild eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms der Haut in der ASC-Färbung</i>	42
Abbildung 11	<i>Histologisches Bild eines Basalzellkarzinoms in der ASC-Färbung in der Übersicht</i>	43
Abbildung 12	<i>Histologisches Bild eines Condyloms in der ASC-Färbung in der Nahaufnahme</i>	44

Abbildung 13 Übersicht eines histologischen Bildes eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms.....	48
Abbildung 14 Nahaufnahme des histologischen Bildes eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms.....	49
Abbildung 15 Schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinom (G3) in der ASC Färbung	50
Abbildung 16 Schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinom (G3) in der Nahaufnahme in der ASC-Färbung	51
Abbildung 17 ASC-Expression aller Tumoren (N = 72, nicht-metastasiert und metastasiert) sowie deren Differenzierung. Auf der X-Achse ist die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) sowie die Differenzierung (G1, G3) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren	52
Abbildung 18 ASC-Expression der nicht metastasierten Tumoren (N = 55), sowie deren Differenzierung. Auf der X-Achse ist die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) sowie die Differenzierung (G1, G3) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren.....	53
Abbildung 19 ASC-Expression der metastasierten Tumoren (N = 17), sowie deren Differenzierung. Auf der X-Achse ist die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) sowie die Differenzierung (G1, G3) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren.....	53
Abbildung 20 kPEK (N = 70) wurden in drei Gruppen bezüglich ihrer Tumordicke aufgeteilt und die ASC-Expression untersucht. Auf der X-Achse ist die Tumordicke in drei Gruppen aufgeteilt (< 2mm, 2- – 6mm, > 6mm), sowie die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren	54
Abbildung 21 Die nicht metastasierten kPEK (N = 55) wurden in drei Gruppen bezüglich ihrer Tumordicke differenziert und deren jeweilige ASC-Expression dargestellt. Auf der X-Achse ist die Tumordicke in drei Gruppen aufgeteilt (< 2mm, 2 – 6mm, > 6mm), sowie die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren.....	55
Abbildung 22 Die metastasierten kPEK (N = 15) wurden in drei Gruppen bezüglich ihrer Tumordicke aufgeteilt und deren jeweilige ASC-Expression	

quantifiziert. Auf der X-Achse ist die Tumordicke in drei Gruppen aufgeteilt (< 2mm, 2 – 6mm, > 6mm), sowie die ASC-Expression (0%, 50% oder 100%) zu sehen. Fehlende Balken entsprechen einem Wert von 0. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Tumoren.....	55
Abbildung 23 Expression von ASC verschiedener PEK-Zelllinien. Die mit * markierten Zelllinien SCCO22 und SCCO28 wurden zur weiteren Untersuchung exemplarisch herausgesucht. Die Graphik wurde ähnlich in der zur Arbeit gehörenden Veröffentlichung verwendet (Meier et al., 2016)	57
Abbildung 24 Methylierungsspezifische PCR nach Bisulfit-Behandlung. Als Primer wurden ASC spezifische Sequenzen (ASC) oder Primer einer methylierten ASC Sequenz (mASC) verwendet. Als Kontrollen standen neben einer leeren Probe (no template control, NTC) eine methylierte Kontroll DNA (mcontrol DNA) oder eine unmethylierte Kontroll DNA (control DNA) zur Verfügung. Die Graphik wurde so in der zur Arbeit gehörenden Veröffentlichung verwendet (Meier et al., 2016)	58
Abbildung 25 Wiederherstellung bzw. Verstärkung der Proteinexpression von ASC im Western Blot (WB) der PEK-Zelllinien SCCO22 und SCCO28 nach 5-Aza-2'-deoxycytidin Behandlung mit zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Ladekontrolle wurde Anti-Tubulin verwendet. Die Graphik wurde so in der zur Arbeit gehörenden Veröffentlichung verwendet.(Meier et al., 2016)	59
Abbildung 26 Western Blot der Zelllinien SCCO28 und SCCO22 vor und nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin und folgender Behandlung mit UVB-Licht. Gemessen wurde neben Anti-Caspase-1 im Zellextrakt als Kontrolle die p10-Anteile der Caspase-1 im Überstand sowie ASC im Zellextrakt Die Graphik wurde so in der zur Arbeit gehörenden Veröffentlichung verwendet.(Meier et al., 2016)	60

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>Risikofaktoren zur Entwicklung eines kutanen Plattenepithelkarzinoms (Alam et al, NEJM 2001 und S2 Leitlinie PEK)</i>	2
Tabelle 2 <i>Klassifikationen der AJCC und exemplarisch die Alternativklassifikation von Breuninger et al (Breuninger et al., 2012) (T1-T4 = Tumor 1-4, RF = Risikofaktoren)</i>	7
Tabelle 3 <i>Differenzierungsgrade nach Broders (Broders, 1921)</i>	8
Tabelle 4 <i>Basismerkmale eines kPEK zur Risikoabschätzung (Stratigos et al., 2015, Brantsch et al., 2008)</i>	9
Tabelle 5 <i>Rezidivraten kPEK in Abhängigkeit von der Tumordicke (Brantsch et al., 2008)</i>	10
Tabelle 6 <i>Metastasierungsrisiko kPEK nach der klinischen TumorgroÙe (Brantsch et al., 2008)</i>	10
Tabelle 7 <i>Klinisch-pathologische Parameter der nicht-metastasierten Tumoren</i>	27
Tabelle 8 <i>Klinisch-pathologische Parameter der metastasierten Tumoren</i>	29
Tabelle 9 <i>Programm der Real Time PCR</i>	33
Tabelle 10 <i>Programm Thermocycler der methylierungsspezifischen PCR</i>	35
Tabelle 11 <i>Epidemiologische Daten des Patientenkollektivs</i>	39
Tabelle 12 <i>ASC Expression der nicht metastasierten Tumoren</i>	45
Tabelle 13 <i>ASC Expression der metastasierten Tumoren</i>	46

10. Erklärung zum Eigenanteil

Erklärung zum Eigenanteil an der Dissertationsschrift von

Katharina Meier, geb. am 28. 02. 1986 in Hannover

zum Thema Promotor-spezifische Methylierung des Apoptosis-associated-Speck-Like-Protein containing a caspase-recruitment domain (ASC) in kutanen Plattenepithelkarzinomen, aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Herr PD Dr. med. Amir Yazdi hat die Studie konzipiert, er hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert. Das Votum der Ethikkommission wurde von PD Dr. med. Amir Yazdi eingeholt.

Die Daten und das histologische Gewebe wurden überwiegend von der Universitäts-Hautklinik Tübingen zur Verfügung gestellt, einzelne Proben von dem Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen. Die Daten-Recherche und die Archivarbeit leistete Frau Katharina Meier. Die Erstellung der immunhistochemischen Schnitte und Färbungen wurden von Katharina Meier unter Mithilfe von Ingrid Kumbier durchgeführt. Die ASC Expression auf den immunhistologischen Färbungen wurde von Herrn PD Dr. med. Amir Yazdi festgelegt. Die Experimente zu den Zelllinien wurden von Tabea Maier durchgeführt. Alle weiteren Ergebnisse dieser Arbeit sind durch eigenständige Durchführung und Auswertung von Katharina Meier erstellt worden.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

gez. Katharina Meier

11. Veröffentlichungen zu dieser Dissertation

Meier, K. and A.S. Yazdi, *Validity of the current classification of cutaneous squamous cell carcinoma.*

Hautarzt, 2013. **64**(5): p. 384-6.

Meier, K. et al., *Silencing of ASC in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma.*

PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164742.

12. Danksagung

Ich danke Amir Yazdi für sein Vertrauen, seine Motivation, Geduld und unbegrenzte Hilfe. Schön, dass ich in ihm ein Vorbild mehr habe.

Auch Tabea Maier und Ingrid Kumbier waren zur Verwirklichung dieser Arbeit ein unersetzliches Standbein. Ferner danke ich den Damen der Dermatohistologie der Tübinger Hautklinik für Ihren Rat und Unterhaltung sowie Franziska Ghoreschi für Ihre Unterstützung.

Ich danke der Pathologie der Universität Tübingen zur Bereitstellung der Gewebeprobe.

Meiner Familie gilt der Dank für die Unterstützung, Kritik, und stete Freude.

13. Lebenslauf

Name	Katharina Meier
Geburtstag/ -ort	28. Februar 1986 in Hannover
Kontakt	Katharina Meier

10/2005 - 11/2012

Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

02/2010 – 10/2010

Auslandssemester an der Brown University Providence, RI, USA

10/2011 – 01/2012

Auslandssemester an der McGill University Montreal, QC, Canada

22.11.2012

Ärztliche Prüfung

Seit 01/2013 bis heute

Assistenzärztin an der Universitätshautklinik Tübingen

03/2016-06/2016

Assistenzärztin am katholischen Kinderkrankenhaus Wilhelmstift in
Hamburg im dermatologischen Team von Prof. Höger.