

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen

**Prävalenz von Mutationen im Exon 1 des NLRP1-Gens
bei Keratoakanthomen und Plattenepithelkarzinomen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Frese, Stefanie

2019

Dekan: Professor Dr. med. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. S. Yazdi
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Süsskind

Tag der Disputation 09.05.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Maligne Tumore der Haut	1
1.2 Primär kutanes Plattenepithelkarzinom	3
1.2.1 Epidemiologie	3
1.2.2 Klinik	4
1.2.3 Histopathologie	4
1.2.4 Stadien	5
1.2.5 Differenzialdiagnosen	8
1.2.6 Therapie	8
1.2.7 Nachsorge	9
1.3 Keratoakanthom	10
1.4 Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors, NLR	12
1.5 NLR-Leucine-rich Repeat and Pyrin Domain Containing, NLRP	13
1.6 NLR-Family Pyrin Domain Containing 1, NLRP1	14
1.7 Multiple Self-healing Palmoplantar Carcinoma, MSPC	15
2. Fragestellung	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Kollektiv	19
3.2 Histopathologie	20
3.3 DNA-Extraktion	22
3.3.1 Erstellen von Gewebeschnitten	22
3.3.2 Entparaffinieren	22
3.3.3 DNA-Extraktion aus Gewebe	23
3.3.4 Quantifizierung der DNA	24
3.4 Polymerase Kettenreaktion, PCR	25
3.5 Gelelektrophorese	28
3.6 Aufreinigung des PCR-Produkts	30
3.7 Sequenzierung	31
4. Chemikalien und Reagenzien	32
5. Ergebnisse	35
5.1 Probenkollektiv	35
5.1.1 Gesamtkollektiv	35
5.1.2 Verwendetes Kollektiv	46
5.2 Evaluation des entzündlichen Infiltrates	55
5.3 DNA-Konzentration	58
5.4 Ergebnis der Sequenzierungsanalyse	63

6. Diskussion	66
7. Zusammenfassung	71
8. Literatur	73
9. Erklärung zum Eigenanteil	78
10. Danksagung	79

Abkürzungsverzeichnis:

A:	Adenin
AJCC:	American Joint Committee of Cancer
ASC:	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase activation and recruitment domain
bp:	Basenpaare
BZK:	Basalzellkarzinom(e)
C:	Cytosin
CARD:	Caspase Activation and Recruitment Domain
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DAMP:	Damage-Associated Molecular Pattern
FKLC	Familial Keratosis Lichenoides Chronica
G:	Guanin
HE- :	Hämatoxylin-Eosin-gefärbte(r)
H ₂ O:	Wasser
IL:	Interleukin
KA:	Keratoakanthom
kb:	Kilobasen
mM:	Millimolar
MSPC:	Multiple Self-Healing Palmoplantar Carcinoma-Syndrom
MSSE:	Multiple Self-Healing Squamous Epithelioma

NLR:	Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptor(s), NOD-Like Receptor(s)
NLRP:	NLR-Leucine-rich Repeat and Pyrin domain containing protein (NLR-family, pyrin domain containing)
NMSC:	Non-Melanoma Skin Cancer
NOD:	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
PCR:	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDT:	Photodynamische Therapie
PEK:	Plattenepithelkarzinom(e)
PYD:	Pyrin Domain
R0-Resektion:	Resektion ohne Tumorgewebe im Resektionsrand (freie Schnittränder)
rpm:	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
T:	Thymin
TLR(s):	Toll-Like Rezeptor(en)
TNM:	Tumor, Node, Metastasis (Stadieneinteilung maligner Tumore)
UV-:	Ultraviolet-, ultraviolette(r, s)
WHO:	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

1. Einleitung

1.1 Maligne Tumore der Haut

Die Inzidenz von Hautkrebs nimmt weltweit seit einigen Jahren stark zu. Dies ist unter anderem begründet durch verändertes Freizeitverhalten in den letzten 50 Jahren, vermehrte Durchlässigkeit der Ozonschicht für Ultraviolettstrahlung (UV-Strahlung) sowie durch die gesteigerte Lebenserwartung (Röcken et al., 2010, Robert Koch-Institut, 2015). Zu den häufigsten malignen Tumoren der Haut gehören das Basalzellkarzinom (BZK), das Plattenepithelkarzinom (PEK) und das maligne Melanom (MM) (Moll et al., 2016).

Das BZK ist die häufigste maligne Neoplasie der Haut (Inzidenz in Europa und den USA: 100-200/100.000/Jahr, in Australien: über 1.000/100.000/Jahr). Es wird auch als „Basaliom“ bezeichnet und von manchen Autoren als „semimaligne“ eingestuft (Röcken et al., 2010). Das BZK metastasiert praktisch nie, kann aber destruierend wachsen und dadurch zu kosmetisch und funktionell großen Defekten, oder selten, zum Beispiel durch Gefäßarrosionen, zum Tode führen (Netter and Technau, 2006). Ein wichtiger Risikofaktor ist neben einer genetischen Prädisposition (vor allem ein heller Hauttyp; I und II nach Fitzpatrick) die hohe UV-Exposition (Ravnbak, 2010). Aber auch andere Risikofaktoren wie Immunsuppression, ionisierende Strahlung oder Arsenexposition begünstigen die Entwicklung eines BZK. Bei einem Erkrankungsalter von < 35 Jahren und dem Vorkommen multipler Tumoren ist an ein Gorlin-Goltz-Syndrom (Nävöides BZK-Syndrom, Basalzellnävussyndrom) zu denken (Spiker and Ramsey, 2017).

Therapeutisch sollte beim BZK stets die Totalexzision des Tumors als Standardverfahren angestrebt werden. Alternativ können bei inoperablen Tumoren Röntgenbestrahlung oder Lasertherapie angewandt werden. Insbesondere superfizielle Tumore können gegebenenfalls mit Kryotherapie, topischer Chemotherapie (5-Fluorouracil) sowie mit photodynamischer Therapie behandelt werden (Lv and Sun, 2017).

Das PEK der Haut (Spinozelluläres Karzinom, Spinaliom) zählt mit dem BZK zum sogenannten „weißen Hautkrebs“ bzw. „nicht-melanozytären Hautkrebs“ (Non Melanoma Skin Cancer, NMSC). Zusammen stellen sie mit einer Inzidenz von > 119.000/Jahr registrierten Neuerkrankungsfällen die häufigste maligne Tumorgruppe weltweit dar (BZK: circa 80 %, PEK: circa 20 % der NMSC-Fälle) (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014, Veness, 2008).

So entspricht das PEK dem zweithäufigsten malignen Tumor der Haut. Prädilektionsstellen sind vor allem das Gesicht, die Handrücken oder bei Männern das Kapillitium als sonnenexponierte Stellen. Neben UV-Licht tragen auch andere Faktoren wie Humane Papillomaviren (HPV) (Mizumachi 2017), Immunsuppression (Arron et al., 2011), Karzinogene (Arsen, Tabak u.v.a.) (Moll et al., 2016), chronisch-entzündliche Dermatosen (zum Beispiel Akne inversa (Makris et al., 2017), Lichen ruber (Friedl et al., 2011)), chronische Hauterosionen und -ulzera oder Narben der Pathogenese bei. Dem PEK geht meist eine Präkanzerose (aktinische Keratose, Morbus Bowen) voran, so dass die rechtzeitige Vor- und Nachsorge von hoher Relevanz ist (Breuninger et al., 2013).

Neben dem PEK und BZK gibt es noch weitere, seltenere NMSC wie Merkelzellkarzinome oder Adnextumore, die im Folgenden aber nicht näher beschrieben werden (Robert Koch-Institut, 2015).

Im Gegensatz zum NMSC entsteht das maligne Melanom, auch „schwarzer Hautkrebs“ genannt, aus den pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten, und metastasiert deutlich schneller und häufiger als ein PEK.

Neben genetischer Disposition gilt das UV-Licht als wichtigster Risikofaktor und ist verantwortlich für die steigende Melanominzidenz (in Mitteleuropa: 10-12/100.000/Jahr).

Dunkelhäutige (Hauttyp V-VI) haben ein deutlich geringeres Risiko als Hellhäutige (Moll et al., 2016, Ravnbak, 2010).

1.2 Primär kutanes Plattenepithelkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz des kutanen PEK ist weltweit stetig steigend und liegt aktuell in Mitteleuropa bei etwa 30/100.000/Jahr. Sie nimmt im Alter und mit der damit verbundenen kumulativen UV-Exposition zu. Der Altersgipfel beim PEK liegt bei über 70 Jahren (Brantsch et al., 2008). Die weiße Bevölkerung ist weltweit deutlich häufiger betroffen als die dunkelhäutige Bevölkerung, wobei das PEK unter den Dunkelhäutigen die häufigste Hautkrebsart darstellt. Etwa 90 % der PEK sind im Kopf-/Halsbereich lokalisiert. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Moll et al., 2016).

Im Jahr 2015 veröffentlichte das Robert-Koch-Institut Zahlen zum nicht-melanozytären Hautkrebs (BZK und PEK): Im Jahr 2012 erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland circa 26.400 Männer und 17.900 Frauen neu an einem PEK. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei Frauen bei 79 und bei Männern bei 76 Jahren (Robert Koch-Institut, 2015). Es besteht eine Meldepflicht der diagnostizierten BZK und PEK an das Landeskrebsregister (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014).

Die Mortalität und die Metastasierungsrate des PEK sind höher als beim BZK, aber deutlich niedriger als die des malignen Melanoms. Die Gesamtrate der metastasierten PEK liegt bei 3 – 6 % aller Tumore. Unter einer vertikal gemessenen Tumordicke von 2 mm kommt es fast nie zu Metastasen. Etwa 4 % aller Tumore bei einer Tumordicke von 2-6 mm und circa 20 % der Fälle bei einer Tumordicke von > 6 mm metastasieren hauptsächlich lymphogen in regionäre Lymphknoten. Fernmetastasen (zum Beispiel in der Lunge) sind selten. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei metastasierten PEK beträgt 25-50 % (Röcken et al., 2010).

Die Prognose hängt außerdem von der Lokalisation der Tumore ab. Die durch chronische UV-Belastung bedingten PEK haben im Gegensatz zu PEK der Schleimhaut eine bessere Prognose.

Die schlechteste Prognose besitzen die oralen und genitalen Tumore.

Insgesamt liegt die Heilungschance durch Exzision bei 95 % (Röcken et al., 2010, Breuninger et al., 2013).

1.2.2 Klinik

Das PEK imponiert klinisch als indolente, hyperkeratotische Plaque oder als flacher Knoten, der gelegentlich blutet oder krustig belegt ist. Prädilektionsstellen sind die sogenannten „Sonnenterrassen“, UV-Licht-exponierte Stellen im Gesicht und auf unbehaarter Kopfhaut sowie am Handrücken und Unterschenkel. Des Weiteren treten Tumore häufig an Übergangsschleimhäuten (Lippe, Genital) auf. Im Mundschleimhautbereich präsentiert sich ein PEK häufig als derbe Leukoplakie (Breuninger et al., 2013).

1.2.3 Histopathologie

Das PEK entsteht aus Keratinozyten des Stratum spinosum, die stark proliferieren. Histologisch imponiert eine irregulär aufgebaute Epidermis mit Tumorzellsträngen, die in die Dermis reichen und die Basalmembran durchbrechen. Entlang dieser Tumorstränge können oft sogenannte Hornperlen erkannt werden („squamous eddies“), Tumorzellen mit reichlichen Mitosefiguren, Zell- und Zellkernatypien (Röcken et al., 2010).

Der desmoplastische Typ wurde noch nicht in die internationale Klassifikation aufgenommen und stellt eine Sonderform der PEK dar. Er wächst stark infiltrativ und geht mit einer erhöhten Rezidiv- und Metastasierungsrate einher (Breuninger et al., 2013).

1.2.4 Stadien

Die Einteilung der PEK in Stadien (Tabelle 3) erfolgt, mit wenigen Ausnahmen (Vulva, Penis, Augenlid), anhand der TNM-Klassifikation der American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Tabelle 1) (Farasat et al., 2011).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von PEK, 7. Edition der AJCC-Klassifikation (2010) (Farasat et al., 2011).

T: Primärtumor (maximale Dimension)	N: Regionäre Lymphknoten- metastasen	M: Fernmetastasen
Tx: kann nicht beurteilt werden	Nx: kann nicht beurteilt werden	Mx: kann nicht beurteilt werden
T0: kein Anhalt auf einen Primärtumor	N0: kein Anhalt für regionären Lymphknotenbefall	M0: kein Anhalt für Fernmetastase(n)
Tis: Carcinoma in situ		
T1: ≤ 2 cm mit < 2 Risikofaktoren	N1: solitärer, ipsilateraler Lymphknoten, ≤ 3 cm maximaler Durchmesser	M1: Fernmetastase(n) vorhanden
T2: > 2 cm + maximal ein Risikofaktor oder ≥ 2 Risikofaktoren bei beliebiger Größe	N2a: ipsilateraler Lymphknoten, 3-6 cm N2b: multiple ipsilaterale Lymphnoten, ≤ 6 cm N2c: bi- /kontralaterale Lymphknoten, ≤ 6 cm	

T: Primärtumor (maximale Dimension)	N: Regionäre Lymphknoten- metastasen	M: Fernmetastasen
T3: invasives Wachstum der Maxilla, Mandibular, Orbita oder des Os Temporale	N3: solitärer Lymphknoten, > 6 cm	
T4: skelettale oder perineurale Invasion der Schädelbasis		

Risikofaktoren sind eine hohe vertikale Eindringtiefe (2 mm Tumordicke; Clark-Level \geq IV), perineurale Invasion, Lokalisation (insbesondere Ohr), Immunsuppression, wenig/keine Differenzierung sowie ein desmoplastisches Wachstum (Mayo et al., 2017, Farasat et al., 2011). Insbesondere das desmoplastische Wachstum und die Immunsuppression stellten bei der Analyse der Risikofaktoren eines Tübinger Kollektivs kutaner PEK wichtige prognostische Kriterien dar (Brantsch et al., 2008).

Der Differenzierungsgrad und die horizontale Tumorausdehnung wurden bislang als die wichtigsten Prognosefaktoren vermutet. Neuere Daten weisen jedoch darauf hin, dass die vertikale Tumordicke der wichtigste Prognosefaktor bezüglich der Metastasierung ist (Tabelle 2) (Meier et al., 2016, Breuninger et al., 2013).

Tabelle 2: Klassifikation nach vertikaler Tumordicke mit Angaben der Metastasierungsrate (Breuninger et al., 2013).

Vertikales Tumorwachstum	Metastasierungsrate
≤ 2 mm	0 %
> 2 mm ≤ 6 mm	4 %
> 6 mm	16 %

Tabelle 3: Stadieneinteilung (Staging) kutaner Plattenepithelkarzinome anhand der TNM-Klassifikation (Farasat et al., 2011).

Stadium	T	N	M
0	in situ	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
III	T4	N1	M0
	T1-T4	N1	M0
IV	T1-T4	N0 oder N1	M1

1.2.5 Differenzialdiagnosen

Folgende klinische Differenzialdiagnosen müssen gegen ein PEK abgegrenzt werden:

Verruca vulgaris oder Verruca seborrhoica

KA (siehe Kapitel 1.3.)

BZK

amelanotisches Melanom

maligner Adnextumor (zum Beispiel Talgdrüsenkarzinom)

Hautmetastasen

Präkanzerosen: Morbus Bowen, aktinische Keratosen, Erythroplasie Queyrat

(Moll et al., 2016, Meves and Albrecht, 2006, Shim et al., 2008)

1.2.6 Therapie

Goldstandard der Therapie ist aufgrund der asymmetrischen Infiltration mit vertikalen und horizontalen Ausläufern die vollständige Exzision mit histologischer Kontrolle der Schnittränder (Mikroskopisch Kontrollierte Chirurgie, MKC) (Lv and Sun, 2017, Brantsch et al., 2008).

Bei superfiziellen PEK kann alternativ eine „Shave-Exzision“ (Horizontalexzision) mit konventioneller Histologie durchgeführt werden (Breuninger et al., 2013).

Ist der Tumor nicht operabel (zum Beispiel aufgrund der Lokalisation) oder ist eine R0-Resektion nicht möglich, ist eine Strahlentherapie anzuraten.

Weitere lokale Therapieverfahren wie Kryotherapie (mit flüssigem Stickstoff), PDT oder lokale Chemotherapie (mit 5-Fluorouracil-Creme) sind als Oberflächenbehandlung den Präkanzerosen vorbehalten.

Bei ausgedehnten/metastasierten Tumoren kann eine systemische Chemotherapie als palliative Behandlung erwogen werden. Zwar liegt bei dieser Therapie die Ansprechrate der PEK bei 80 %, sie kann aber wegen der hohen Rezidivrate nicht als kurativ angesehen werden. Aufgrund umstrittener Studienlage existiert zurzeit noch kein Standardschema (Moll et al., 2016).

Eine zielgerichtete Therapie bietet die Blockade von Wachstumsfaktoren (Epidermal Growth Factors, EGF) in Kombination mit 5-Fluorouracil und/oder platinhaltigen Zytostatika.

Eine Polychemotherapie ist bezüglich der Ansprechrate einer Monotherapie mit Methotrexat (20-40 % Remissionsrate) oder mit 5-Fluorouracil (circa 60 % Remissionsrate) überlegen. Allerdings scheint sie hinsichtlich des Gesamtüberlebens keinen Vorteil zu bieten (Breuninger et al., 2013).

1.2.7 Nachsorge

Die Nachsorge bei PEK sollte dem Risiko entsprechend angepasst werden. Bei Tumoren mit einem niedrigen Metastasierungs- und Rezidivrisiko werden halbjährige Nachsorgeuntersuchungen für fünf Jahre durchgeführt. Bei höherem Risiko (zum Beispiel große Tumorgöße oder Eindringtiefe) sind die Untersuchungen in verkürzten Intervallen durchzuführen. Patienten mit einem sehr hohen Risiko für Rezidive oder Metastasen (zum Beispiel durch Immunsuppression) sollten gegebenenfalls lebenslang nachkontrolliert werden. Die Nachsorgeuntersuchung beinhaltet eine klinische Inspektion des Lokalbefundes mit Palpation der Exzisionsstelle sowie der Intransitstrecke mit regionären Lymphknoten (gegebenenfalls mit sonographischer Kontrolle). Wichtig ist außerdem die Anleitung des Patienten zur Selbstinspektion sowie die Vermeidung von Risikofaktoren (zum Beispiel UV-Licht) (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014, Breuninger et al., 2013).

1.3 Keratoakanthom

(griechisch k eras = Horn;  akanthos = Stachel)

Das KA ist ein epithelialer Tumor der Haut mit kontrovers diskutierter Klassifikation. Es wacht ausgehend von Keratinozyten und ahnel sowohl klinisch als auch histologisch einem PEK. Manche Autoren bezeichnen das KA deswegen auch als eine prognostisch günstige Variante eines hochdifferenzierten PEK (Röcken et al., 2010, Nobeyama and Nakagawa, 2016) und nicht als eigene Entität.

Klinisch imponiert das KA als solitärer, scharf begrenzter, umschriebener Knoten mit zentralem Hornpfropf und tritt bevorzugt an sonnenexponierten Stellen auf (Misago et al., 2017). Es nimmt rasch (über wenige Wochen) an Größe zu und kann sich anschließend spontan (über wenige Monate) zurückbilden (Fernandez Figueras, 2017).

Die klinische Verdachtsdiagnose muss histologisch gesichert werden und ist dabei oft schwierig vom PEK abzugrenzen. Daher sollte stets eine komplette Exzision angestrebt werden um die Architektur und Symmetrie als histologisches Kriterium zu evaluieren. Das KA kann selten aggressiv wachsen (in 2 % der Fälle) (Röcken et al., 2010) und auch die Ätiologie gleicht der eines PEK. Aufgrund des Risikos des invasiven und aggressiven Wachstums orientiert sich die operative Therapie an der eines PEK (Röcken et al., 2010). Meist treten KA solitär auf, in seltenen Fällen können sie aber auch in multipler Form vorkommen, zum Beispiel unter Immuntherapie mit Pembrolizumab (Freites-Martinez et al., 2017) oder assoziiert mit Syndromen (Leblebici et al., 2017). Bislang wurden multiple KA bei unterschiedlichen syndromalen Erkrankungen beschrieben, wie bei Multiple Self-healing Squamous Epithelioma (MSSE), Muir-Torre-Syndrom und Xeroderma Pigmentosa. Ein sporadisches Auftreten von multiplen Keratoacanthoma centrifugum marginatum (KCM) werden beim sogenannten Grzybowski-Syndrom gefunden (Dogra et al., 2017).

Ein weiteres Syndrom, das mit multiplen KA einhergeht und hier näher beschrieben wird, ist das Multiple Self-healing Palmoplantar Carcinoma-Syndrom (MSPC). Hier sind Mutationen im NLRP1-Gen die Ursache.

Dieses Syndrom zeigt Ähnlichkeiten zum MSSE (Neigung zur malignen Entartung der KA) und wird aufgrund klinischer und genetischer Unterschiede als eigenständiges Syndrom betrachtet (Mamai et al, 2014).

1.4 Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors, NLR

Die Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLR) gehören zur Familie der Pattern-Recognition-Receptors (PRRs) und dienen dem angeborenen Immunsystem als intrazelluläre Sensoren. Sie befinden sich primär im Zytosol myeloider Zellen sowie in Keratinozyten. Ähnlich den Toll-like-Rezeptoren (TLRs) dienen sie der Aktivierung entzündlicher Prozesse durch Erkennung bestimmter Oberflächenmerkmale (Yazdi et al. 2016). Die TLRs, welche als Transmembranproteine auf der Zelloberfläche oder in Endosomen sitzen, detektieren extrazelluläre mikrobielle Strukturen von Bakterien und Viren, die sogenannten Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), und lösen eine Immunaktivierung aus (Thompson et al., 2011). NLR hingegen erkennen nicht nur mikrobiologische Strukturen, sondern bevorzugen Damage-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs sind sterile Noxen nicht mikrobiellen Ursprungs, die zum Beispiel beim Zelltod entstehen (Yazdi et al., 2016, Franchi et al., 2009).

Die NLR-Familie kann anhand der funktionellen Gruppe am N-Terminus in drei Untergruppen eingeteilt werden:

Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)

NLR-leucine-rich repeat and pyrin domain containing (NLRP)

NLR-leucine-rich repeat and pyrin domain containing a CARD (NLRC)

(Kersse et al., 2011)

1.5 NLR-Leucine-rich Repeat and Pyrin Domain Containing, NLRP

Die NLRP-Familie stellt die größte Gruppe der NLR dar und hat aktuell 14 Mitglieder, welche sich strukturell ähneln. Manche NLRP-Proteine, wie NLRP1 und NLRP3, können Inflammasome ausbilden. Diese können Caspase-1 als pro-entzündliche Protease aktivieren und führen so zu einer Ausschüttung von Interleukin (IL)-1 β und IL-18 (Kersse et al., 2011). NLRP1 aktiviert Caspase-1 direkt, da es über die Caspase Activation and Recruitment Domain (CARD) direkt Caspase-1 binden kann, während NLRP3 das Adapterprotein ASC zur Aktivierung der inflammatorischen Caspase benötigt (Kim et al., 2016).

Eine Inflammasomaktivierung und somit eine Aktivierung von Caspase-1 mit konsekutiver IL-1 Sekretion erfolgt zum Beispiel durch das bakterielle Toxin Nigericin, durch metabolischen Stress (zum Beispiel durch Harnsäure bei Gicht) oder durch extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP), welches bei Zelltod freigesetzt wird (Franchi et al., 2009, Mariathasan et al., 2006).

Die Rolle der Inflammasome bei der Karzinogenese ist komplex: Zum einen ist die Inflammasom-abhängige Entzündung und die Pyroptose als inflammatorischer Zelltod essenziell für die Kontrolle der Tumorentwicklung, zum anderen kann eine Ausschüttung der Entzündungsmediatoren auch zur malignen Entartung führen (Yazdi and Drexler, 2015).

Die Hemmung von IL-1 β zeigt einen protektiven Effekt bezüglich der Karzinogenese (Lin and Zhang, 2017).

1.6 NLR-Family Pyrin Domain Containing 1, NLRP1

NLRP1 wurde als erstes Mitglied der NLRP-Subfamilien identifiziert, ist aber im Gegensatz zu NLRP3 bisher weniger charakterisiert (Franchi et al., 2009). In der folgenden Abbildung wird der Aufbau des Proteins und dessen Domänen schematisch dargestellt (Abbildung 1). Die höchste Expression von NLRP1 wurde in der menschlichen Haut nachgewiesen, sodass dessen Zusammenhang zu Psoriasis oder Vitiligo diskutiert wird (Grandemange et al., 2016). Aber auch bei anderen Autoimmunreaktionen, wie systemischer Lupus Erythematoses (SLE) und Diabetes mellitus Typ 1, wurden Polymorphismen von NLRP1 beschrieben (Grandemange et al., 2016). Eine kausale Rolle kommt NLRP1 beim kürzlich neu beschriebenen NLRP1-associated autoinflammation with arthritis and dyskeratosis (NAIAD)-Syndrom zu, bei dem es zu Hautveränderungen mit Arthritis kommt (Grandemange et al., 2016).

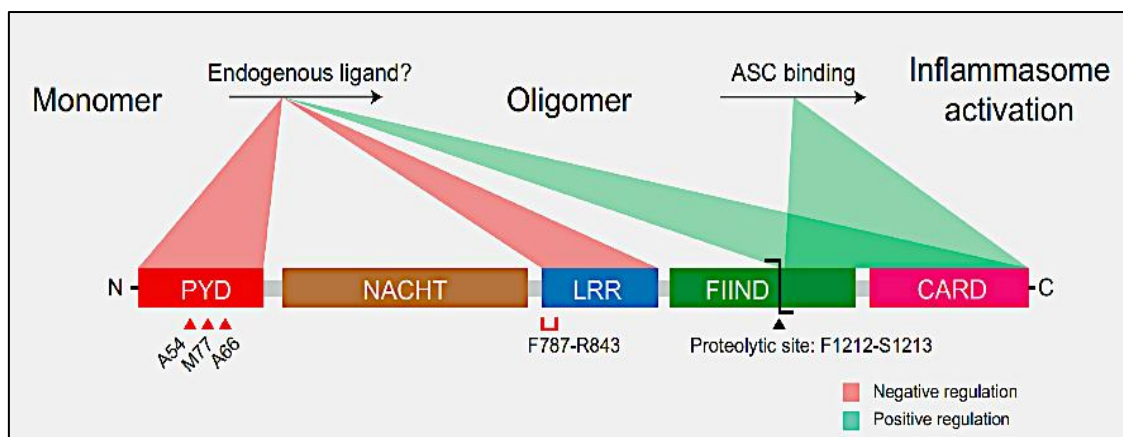


Abbildung 1: Ein Modell von NLRP1 und dessen Domänen mit positiver (grün) und negativer (rot) Regulation der Aktivität über die Bindung mit ASC und endogenen Liganden (nach Zhong et al., 2016).

1.7 Multiple Self-healing Palmoplantar Carcinoma, MSPC

MSPC ist ein seltenes hereditäres Syndrom, das insbesondere durch das Auftreten multipler KA charakterisiert ist. Diese Hautläsionen treten primär palmoplantar sowie konjunktival (80 %) auf. Bislang wurde das Syndrom des MSPC-Syndroms mit der Mutation MSPC-TN-1 bei 27 Individuen einer tunesischen Familie beschrieben, in welcher die Hautläsionen autosomal-dominant über fünf Generationen vererbt wurden (Abbildung 2).

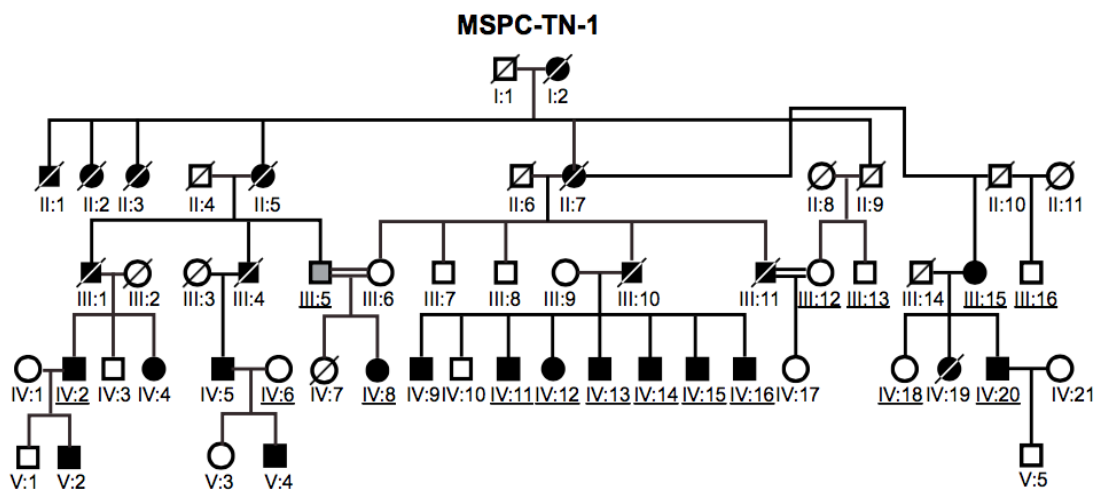


Abbildung 2: Stammbaum der ersten beschriebenen Familie mit MSPC und der Mutation MSPC-TN-1, Generation I-V.

■: betroffener Mann, ●: betroffene Frau, □; nicht-betroffener Mann, ○: nicht-betroffene Frau, ■: unbekannter Phänotyp (nach Zhong et al., 2016).

Zwei weitere Familien zeigten ebenfalls das MSPC-Syndrom mit ähnlichen Mutationen: MSPC-RO-1 und MSPC-FR-1 (Abbildung 3 und 4). Insgesamt wurde bei 36 Individuen die Diagnose MSPC beschrieben.

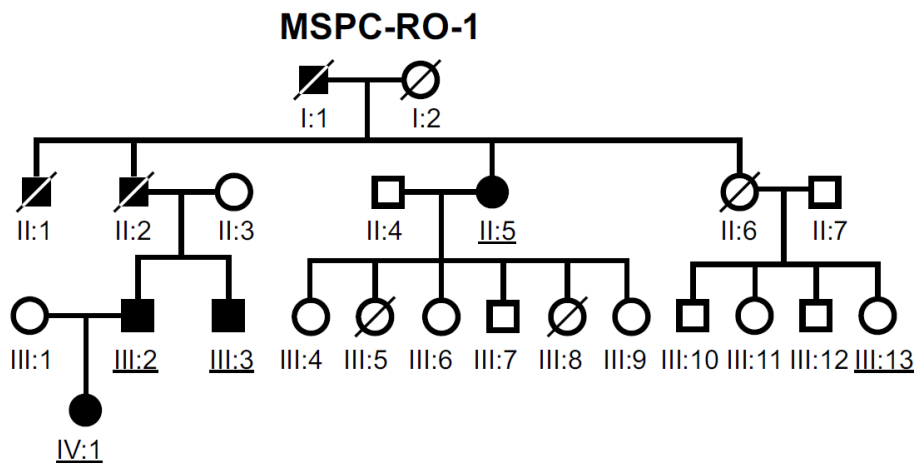


Abbildung 3: Stammbaum der zweiten Familie mit MSPC und der Mutation MSPC-RO-1, Generation I-IV. ■: betroffener Mann, ●: betroffene Frau, □: nicht-betroffener Mann, ○: nicht-betroffene Frau (nach Zhong et al., 2016).

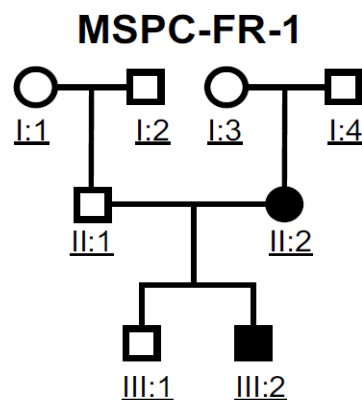


Abbildung 4: Stammbaum der dritten Familie mit MSPC und der Mutation MSPC-FR-1, Generation I-III. ■: betroffener Mann, ●: betroffene Frau, □: nicht-betroffener Mann, ○: nicht-betroffene Frau (modifiziert nach Zhong et al., 2016).

Das durchschnittliche Alter bei Erstmanifestation liegt bei 8,8 Jahren und variiert zwischen 1-25 Jahren, sodass die Tumore meistens bereits im Kindesalter auftreten. Die ulzerierten Knoten nehmen bis zu drei Monate lang an Größe zu, um sich anschließend meistens nach etwa sechs Monaten narbig zurückzubilden. Bemerkenswert sind das junge Erkrankungsalter, die ungewöhnliche Lokalisation (unbehaarte Haut), sowie die Größe der KA (5-50 mm Durchmesser). Anhand von Genanalysen konnten bei MSPC-Patienten Missense-Mutationen im NLRP1-Gen (Chr.17p13.2, Exon 1, PYD: p.A54T MSPC-TN-1, p.A66V MSPC-RO-1, p.M77T MSPC-FR-1) nachgewiesen werden.

Durch den Einbau falscher Aminosäuren im NLRP1-Protein führen die Mutationen zur Fehlfaltung und Destabilisierung der inhibitorischen Pyrin-Domäne (PYD). Die erhöhte Autoaktivierung führt zu einer spontanen Oligomerisierung des NLRP1-Inflammasoms und so über Caspase-1 zur vermehrten Zytokinausschüttung von IL-1 β und IL-18. Dieser Pathomechanismus wurde kürzlich als ursächlich zur Ausbildung von KA bei MSPC beschrieben (Zhong et al., 2016).

2. Fragestellung

Keratoakanthome treten beim Syndrom der „Multiple Self-Healing Palmoplantar Carcinoma“ (MSPC) auf. Diese zeigen Mutationen im NLRP1-Gen. Die aktivierenden Mutationen könnten als Erklärung dafür dienen, dass diese Tumore sich spontan zurückbilden. Ziel der Arbeit ist es, nicht-MSPC-assoziierte, spontane KA auf das Vorliegen der spezifischen NLRP1-Punktmutationen, die bei MSPC beschrieben wurden, zu untersuchen. Der Vergleich klarer, teils regressiver KA mit PEK könnte so eine mögliche Erklärung der spontanen Rückbildung von KA im Gegensatz zu PEK liefern.

3. Material und Methoden

3.1 Kollektiv

Anhand einer Datenbank des Histologiemoduls der Universitäts-Hautklinik Tübingen wurden 32 KA und 26 PEK identifiziert, die zwischen 2005 und 2011 an der Universitäts-Hautklinik Tübingen histologisch beurteilt wurden.

Von diesen Präparaten wurden die Tumordicke, das Geschlecht und Alter der Probanden zum Zeitpunkt der Exzision (Datum der Exzision – Geburtsdatum) erfasst.

Die PEK wurden anhand ihrer Differenzierungsgrade (GI, II, III) sortiert und bezüglich ihrer jeweiligen Entzündungszeichen mikroskopiert.

Die KA wurden anhand vorhandener und nicht-vorhandener Regression eingeteilt und ebenfalls bezüglich Entzündungszeichen analysiert.

3.2 Histopathologie

Die histologischen Präparate der Tumore wurden erneut mikroskopiert. Zunächst wurden die Tumordicke und der Differenzierungsgrad der PEK am Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitt (HE-Schnitt) bestimmt. Die KA wurden bezüglich vorhandener Regression betrachtet.

In beiden Gruppen erfolgte anschließend eine Klassifizierung der Präparate bezüglich des entzündlichen Infiltrates. Hierfür wurden die jeweiligen Entzündungszellen (Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten) quantifiziert und anhand deren Ausbreitung in verschiedene Grade (++, +, -) eingeteilt.

Um die Immunreaktion zu quantifizieren, wurde eine Einteilung analog Tabelle 4 und 5 gewählt (Tabelle 4 und 5). Zunächst wurde das gesamte Infiltrat betrachtet. Lagen im Vergleich zu den Tumorzellen > 20 % Entzündungszellen vor, wurde es als +++, bei 10 - 20 % als ++ bewertet. Eine Ratio von 5 - 10 % Infiltrat zu Tumorzellen wurde als +, weniger als 5 % als (+) eingeteilt.

Tabelle 4: Quantifizierung des entzündlichen Infiltrates im Schnittpräparat.

Klassifikation des entzündlichen Infiltrates	Prozentualer Anteil der Entzündungszellen im Vergleich zu Tumorzellen
+++ (stark)	> 20 %
++ (mäßig stark)	10-20 %
+ (schwach)	5-10 %
(+) (kaum)	< 5 %

Um das Infiltrat weiter zu typisieren, wurden die infiltrierenden Zellen analysiert. Hier wurde nach Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophilen Granulozyten und neutrophilen Granulozyten differenziert. Mehr als 50 Zellen des Zelltyps pro Hauptgesichtsfeld (HPF), entsprechend einer insgesamt 400-fachen Vergrößerung) des Zelltyps entsprachen einer starken Häufigkeit (++) , 10-50 % einer mittleren (+), während weniger als 10 % der Zellen als negativ (-) gewertet wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Quantifizierung mit prozentualer Angabe des jeweiligen Entzündungszelltyps (Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten) im jeweiligen Tumorschnitt.

Anteil der Entzündungszellen im Hauptgesichtsfeld [Zellen/HPF]	Menge	Lokalisation
> 50 %	++	fokal dominant
10-50 %	+	fokal
< 10 %	-	-

3.3 DNA-Extraktion

3.3.1 Erstellen von Gewebeschnitten

Von den Paraffinblöcken des Formalin-fixierten Gewebes wurden mit Hilfe des Mikrotoms 18 µm dicke Schnittpräparate erstellt. Direkt nach dem Schneiden wurden diese jeweils im kalten Wasserbad gefestigt, im warmen Wasserbad (circa 40°C) auf einen Objektträger gezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.2 Entparaffinieren

Die angefertigten Objektträger wurden für ein bis zwei Stunden bei 60 °C im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurden die Objektträger unter dem Abzug in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert:

- 2x für 10 min in Xylol
- 2x für 1 min in 100 %-igem Ethanol
- 2x für 1 min in 95 %-igem Ethanol
- 2x für 1 min in 70 %-igem Ethanol
- 2x für 1 min in destilliertem H₂O

3.3.3 DNA-Extraktion aus Gewebe

Nachdem das Gewebe entparaffiniert vorlag, stand es für den anschließenden Verdau bereit. Hierfür wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 180 µl QIAGEN® ATL Puffer und 20 µl Proteinase K vorbereitet.

Das entsprechende Gewebe wurde nun mit einer Kanüle vorsichtig vom Objektträger entfernt und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Zur Orientierung des gesuchten Gewebes dienten von einem Dermatohistologen markierte HE-Schnitte, um so möglichst reines Tumorgewebe zu gewinnen. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 56 °C und 300 Umdrehungen pro Minute (rpm) im Thermomixer inkubiert.

Am Folgetag wurden die Proben für 30 Sekunden bei 6000 xg zentrifugiert und auf vollständigen Gewebeverdaulichkeit überprüft.

Befand sich im Sediment noch sichtbares unverdautes Gewebe, wurden erneut 20 µl Proteinase K hinzugegeben und für weitere 3 Stunden bei 56°C inkubiert und zentrifugiert. Dieses Vorgehen wurde solange wiederholt bis keine Gewebereste mehr sichtbar waren.

Zur Inaktivierung der Proteinase wurden die Proben für 10 min bei 95 °C im Thermomixer inkubiert.

Nach kurzem Abkühlen wurde dasselbe Volumen QIAGEN® AL Puffer hinzugegeben wie zuvor QIAGEN® ATL Puffer + Proteinase K. QIAGEN®. Die Proben wurden für 15 sec gevortext und bei 6000 xg für 30 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde dasselbe Volumen 100 %-iges Ethanol hinzugegeben (wie AL Puffer), für 15 Sekunden gevortext und bei 6000 xg für 30 Sekunden zentrifugiert.

Das gesamte Lysat wurde auf eine QIAamp MiniElute Column® mit Collection-Tube gegeben und bei 6000 xg 1 min lang zentrifugiert.

Dabei wurde die DNA an der Säule gebunden und das Collection-Tube wurde anschließend samt Durchfluss verworfen. Die Säule wurde in ein neues Collection-Tube platziert.

Zum Waschen der DNA wurden 500 µl QIAGEN® AW1 Puffer auf die Säule gegeben und bei 6000 xg für 1 min zentrifugiert.

Das Collection-Tube samt Durchfluss wurde verworfen und durch ein neues ersetzt. Dieser Schritt wurde mit 500 µl QIAGEN® AW2 Puffer wiederholt. Anschließend wurde für 3 min bei 14000 xg zentrifugiert, um die Säule zu trocknen.

Das Collection-Tube wurde verworfen und die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert.

Zum Eluieren der DNA wurden 30 µl QIAGEN® ATE Puffer auf das Zentrum der Säulenmatrix gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Säule für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um eine maximale DNA-Ausbeute zu erlangen, wurde nach 5-minütiger Inkubation erneut 1 min bei 14000 xg zentrifugiert.

3.3.4 Quantifizierung der DNA

Mit einem Nanodrop-Spektralphotometer wurde die DNA-Konzentration gemessen. Hierfür wurde zu Beginn der Sensor mit 2 µl reinem Wasser (Ampuwa®) benetzt und initialisiert. Anschließend wurden 2 µl QIAGEN® ATE Puffer auf den Sensor gegeben und als Nullwert geeicht. Nach Säubern des Sensors konnten die jeweiligen Proben aufgetragen werden, um deren DNA-Konzentration zu ermitteln.

3.4 Polymerase Kettenreaktion, PCR

Für die Amplifikation der DNA ist die Polymerase Kettenreaktion (PCR) die Methode der ersten Wahl. Das klassische PCR-Programm besteht aus drei Teilschritten (Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation), bei der die DNA-Fragmente in vitro bei bestimmten Temperaturen vervielfältigt werden. Nach Spaltung der Doppelstränge (erster Schritt) lagern sich komplementäre Oligonukleotide (Primer) an die DNA-Einzelstränge an (zweiter Schritt). Hierfür werden möglichst spezifische Primer benötigt, um weitere PCR-Produkte zu vermeiden (Tabelle 6). Ausgehend von der Primersequenz wird der DNA-Strang mit Hilfe der DNA-Polymerase weiter zum Doppelstrang komplementiert (dritter Schritt).

Zur Herstellung einer Stammlösung für die PCR wurden die Oligonukleotide in nukleasefreiem Wasser gelöst und eine einheitliche Konzentration von 100 pmol/µl wurde hergestellt.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primer A: Adenin, T: Thymin, G: Guanin, C: Cytosin.

Primernamen	Sequenz (5'Ende - 3'Ende)
NLPR1 Exon 1 forward Primer	CTC GCC AAT AAA GCG CAC TC (20)
NLRP1 Exon 1 reverse Primer	CAG GGA GGG CTC AGT GGT (18)

Die Stammlösung der Primer wurde für die PCR 1:10 verdünnt. Die Arbeitslösung wurde wie auch alle anderen Komponenten bei -20 °C eingefroren und für die weiteren Arbeitsschritte verwendet.

Der Mastermix beinhaltet notwendige Komponenten zur Aktivierung und Unterstützung der PCR. Hierfür wurden Nukleotide, Magnesium, Puffer, eine Polymerase, zwei Primer und Wasser benötigt.

Für die Amplifikation wurde ein 50 µl Ansatz durchgeführt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Die Komponenten der PCR mit eingesetzten Volumina und Konzentrationen.

PCR-Mastermix	Menge /Probe	Konzentration /Probe	Menge für 10 Proben + Negativkontrolle + 20% Reserve
10 mM dNTP-Mix	1 µl	jeweils 0,2 mM	13 µl
MgCl ₂	3 µl	3 mM	39 µl
10X PCR Buffer	5 µl	1 X	65 µl
Platinum™ Taq DNA Polymerase	0,2 µl	2 U/rxn	2,6 µl
10 µM-Forward-Primer	1 µl	0,2 µM	13 µl
10 µM Reverse-Primer	1 µl	0,2 µM	13 µl

Nuklease-freies H₂O für 13 Ansätze: 650 µl - 145,6 µl = 504,4 µl

Die jeweiligen Komponenten wurden zuvor aufgetaut, gevortext und kurz zentrifugiert.

Anschließend wurden elf neue 1,5 ml Tubes jeweils mit 50 µl Mastermix gefüllt und beschriftet. Zusätzlich wurde Tube 1-10 mit 300 ng der entsprechenden DNA versehen, gemischt und zentrifugiert. Tube 11 entspricht der Negativkontrolle.

Eine DNA-Konzentration von > 50 ng/µl war notwendig für ein gutes PCR-Ergebnis. Die folgende Tabelle zeigt die einzelnen Temperaturzyklen für die Durchführung der PCR im PCR-Block (Tabelle 8).

Die Proben niedrigerer Konzentration (< 50 ng/µl) wurden verworfen.

Tabelle 8: Die einzelnen Schritte im PCR-Block mit Temperaturangabe und Dauer.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	120 sec
Denaturierung	94°C	30 sec
Hybridisierung	59°C	30 sec
Elongation (1 min/kb)	72°C	30 sec
Kühlung	4°C	2-24 Stunden

35 Zyklen

3.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese entspricht der Standardmethode zur Darstellung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge. Die Fragmente wandern durch das Gel zur Anode. Ihre Wandergeschwindigkeit ist abhängig von der Länge und Konformation der DNA. Die kürzesten Fragmente wandern am schnellsten, sodass, anhand eines mitlaufenden Markers, dessen Länge bekannt ist, die genaue Länge der DNA-Fragmente ermittelt werden kann.

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurde ein 1 %-iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde in einem Erlenmeyerkolben 1 g Agarosepulver in 100 ml TAE-Puffer aufgelöst und vorsichtig in der Mikrowelle aufgeköcht bis die Lösung klar war. Anschließend wurde die Lösung in eine Gelform mit Taschenkamm gegossen und für 30 min polymerisiert. Das entstandene Gel wurde in die Laufkammer mit TAE-Puffer gelegt und die Taschen wurden gefüllt. Zuvor wurden jeweils 3 µl Ladepuffer + Gel Red Nucleic Acid Stain (10.000x) zu 3 µl PCR-Produkt gegeben, gemischt und kurz zentrifugiert.

In die erste Tasche des Gels wurden 7 µl des Längenstandards (QIAGEN[®], GelPilot 50 bp Ladder) gegeben. In die letzte Tasche wurde die Negativkontrolle (ebenfalls beladen mit Ladepuffer + Gel Red) gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 140 Volt für 45 Minuten. Hierbei wanderte das Produkt durch das Gel in Richtung Anode und ließ sich anschließend unter UV-Licht visualisieren.

Ansetzen des Ladepuffers + Gel Red:

- Ladepuffer
- 25 ml Glycerin (erschwert das Produkt)
- 25 ml TAE-Puffer (Trennmedium)
- 1 Spatelspitze Orange-G-Pulver

Alle Komponenten wurden in einem 50 ml Falcon gemischt und dunkel gelagert.

1 ml des hergestellten Ladepuffers + 0,5 µl Gel-Red → Ladepuffer GR

Ansetzen des DNA-Markers (0,1-10,0 KB; NEB N3200)

- 1.500 µl H₂O
 - 500 µl Ladepuffer
 - 500 µl DNA-ladder
- 200 µl DNA-Marker + 50 µl Ladepuffer GR

3.6 Aufreinigung des PCR-Produkts

Mit dem QIAquick PCR Purification Kit ließ sich das PCR-Produkt bis zu einer DNA-Menge von 10 µg aufreinigen. Die DNA-Fragmente (zwischen 100 bp – 10 kb) wurden von Primern, freien Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt.

Vor Gebrauch des Aufreinigungs-Kits:

- 24 ml 100%-iges Ethanol zu PE-Puffer geben
- 120 µl pH-Indikator I auf 30 ml PB-Puffer geben

Jeweils 20 µl des PCR-Produkts wurden in einem 1,5 ml Tube gegeben und mit 100 µl (5-faches Volumen) PB-Puffer gemischt. Ein orangefarbener oder violetter Farbumschlag spricht für einen pH-Wert von > 5,0.

In diesem Fall wurden zusätzlich 10 µl Natriumazetat hinzugegeben. Dadurch sank der pH-Wert auf < 5,0 und es zeigte sich ein gelber Farbumschlag.

Die Probe wurde auf eine QIAquick spin column (+ 2 ml Collection-Tube) gegeben und für 1 Minute zentrifugiert*. Hierbei wurde die DNA in der Säule gebunden und der Durchfluss im Collection Tube konnte verworfen werden.

Für den Waschvorgang wurden nun 750 µl QIAGEN® PE-Puffer auf die QIAquick-Säule gegeben und für 1 Minute zentrifugiert*. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule wurde in dasselbe Tube gesteckt und zum Trocknen erneut für 1 Minute zentrifugiert. *

Anschließend wurde das Collection-Tube mit Durchfluss verworfen und die Säule wurde in ein 1,5 ml Tube platziert.

Zum Eluieren der DNA wurden 30 µl Elutionspuffer (EB, 10mM Tris-Cl, pH 8,5) auf das Zentrum der Säulenmatrix gegeben, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert*.

* Jeder Zentrifugationsschritt wurde bei 13.000 rpm (17.900 xg) durchgeführt.

3.7 Sequenzierung

Zur Detektion der beschriebenen Punktmutation erfolgt eine DNA-Sequenzierung. Dazu wurden diese vor dem Verschicken der Proben zur Sequenzierung erneut auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt.

Die Proben, bei denen keine oder nur eine schwache Bande sichtbar war, wurden nicht verwendet. Die Konzentrationen der übrigen Proben wurden erneut mittels Photospektrometer (Nanodrop) gemessen.

Anschließend wurden jeweils 15 µl der verwertbaren, aufgereinigten Proben sowie der beiden Primer (Primer NLRP1 Exon 1 forward und Primer NLRP1 Exon 1 reverse) in ein 1,5 ml Tube pipettiert, mit einem entsprechendem Etikett (free label) der Firma Eurofins Genomics versehen und an das Eurofins Genomics Sequencing Department Deutschland versendet.

Im Online-Account von Eurofins Genomics wurden nun die einzelnen Proben und Primer mit deren Barcode-Nummer und Konzentration eingegeben.

Es folgte eine Sanger-Sequenzierung (nach europäischem Standard). Die Ergebnisse waren nach 2-7 Tagen im Online-Account abrufbar.

4. Chemikalien und Reagenzien

In der folgenden Tabelle sind die Chemikalien und Reagenzien gelistet, die für die einzelnen Arbeitsschritte im Labor benötigt wurden (Tabelle 9).

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Zusammensetzung, Menge/Konzentration und Bezugsquelle.

Name	Zusammensetzung	Menge /Konzentration	Bezugsquelle
Xylol	Isomers	> 99 %	VWR Chemicals
Ethanol	Absolute for Analysis	> 99 %	MERCK KG aA
Primer forward		100 pmol/μl	
	Primer-Oligonukleotide	89 μg (14,7 nmol)	Eurofins Genomics
	H ₂ O, nukleasefrei	147 μl	Thermo Scientific
Primer reverse		100 pmol/μl	
	Primer-Oligonukleotide	86 μg (15,4 nmol)	Eurofins Genomics
	H ₂ O, nukleasefrei	154 μl	Thermo Scientific

Name	Zusammensetzung	Menge /Konzentration	Bezugsquelle
10x High Fidelity Buffer			Invitrogen
MgCl ₂		25 mM	Peqlab
dNTP-Mix		10 mM	PeqLab
Platinum® Taq DNA Polymerase		5 U/μl	Invitrogen
Agarose (SeaKem®LE)			LONZA
TAE-Puffer 50x		1 l	
	Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	242 g	ROTH
	EDTA (pH 8,0)	14,6 g	ROTH
	Acetat	57,1 ml	ROTH
	H ₂ O, destilliert	ad 1 l	Fresenius Kabi
Glycerin			ROTH

Name	Zusammensetzung	Menge /Konzentration	Bezugsquelle
Orange-G			ROTH
Gel-Red Loading Dye			New England BioLabs
DNA-Ladder 2-log		1,000 µg/ml	New England BioLabs
Natriumacetat (pH 5,0)		3 M	
	Natriumacetat (M = 82,03g/mol)	12,3 g	MERCK KG aA
	H ₂ O, destilliert	ad 50 ml	Fresenius Kabi
Ampuwa® (H ₂ O für Injektionszwecke)			Fresenius Kabi
Wasser, nukleasefrei			Thermo Scientific

QIAamp DNA FFGE Tissue Kit (QIAGEN®)

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®)

5. Ergebnisse

5.1 Probenkollektiv

5.1.1 Gesamtkollektiv

Das Untersuchungsmaterial umfasste 58 Gewebeproben aus dem Archiv der Universitäts-Hautklinik Tübingen: 26 kutane PEK und 32 KA. Die HE-gefärbten Schnittpräparate der Gewebeproben wurden mikroskopiert und ausgewertet.

Das Gesamtkollektiv der PEK-Proben wurde bezüglich der Differenzierungsgrade (GI: 8 Tumore, GII: 8 Tumore, GIII: 10 Tumore), der Tumordicke sowie bezüglich Alter und Geschlecht der Probanden gruppiert und dargestellt (Tabelle 10 und Abbildung 5). Die unterschiedlichen Merkmale der Differenzierungsgrade wurden in mikroskopischen Abbildungen exemplarisch dargestellt (Abbildung 6-8).

Die Tumordicke variierte zwischen 2,1-26,0 mm mit einem Mittelwert von 5,9 mm.

Tabelle 10: Gesamtkollektiv der Plattenepithelkarzinome mit Angabe des jeweiligen Differenzierungsgrades und der jeweiligen Tumordicke.

Probe	Differenzierungsgrad	Tumordicke [mm]	Alter der Probanden [Jahre]	Geschlecht m: männlich w: weiblich
P1	G I	4,0	69	w
P2	G I	7,0	95	w
P3	G III	2,5	77	m
P4	G I	4,0	77	m
P5	G I	5,0	77	m
P6	G I	4,0	82	m
P7	G I	3,0	80	m
P8	G II	12,0	46	m
P9	G I	7,5	46	m
P10	G I	5,0	49	m
P11	G III	26,0	81	m
P12	G II	11,0	83	m
P13	G II	3,5	82	m
P14	G II	2,5	57	w
P15	G II	2,1	83	w
P16	G II	3,5	71	m
P17	G III	3,3	71	m
P18	G III	2,3	83	m
P19	G II	3,5	71	m
P20	G III	6,0	69	m
P21	G III	4,0	89	m
P22	G III	3,0	78	w
P23	G III	4,6	78	w
P24	G III	15,0	96	m
P25	G II	5,0	89	m
P26	G III	3,0	74	m

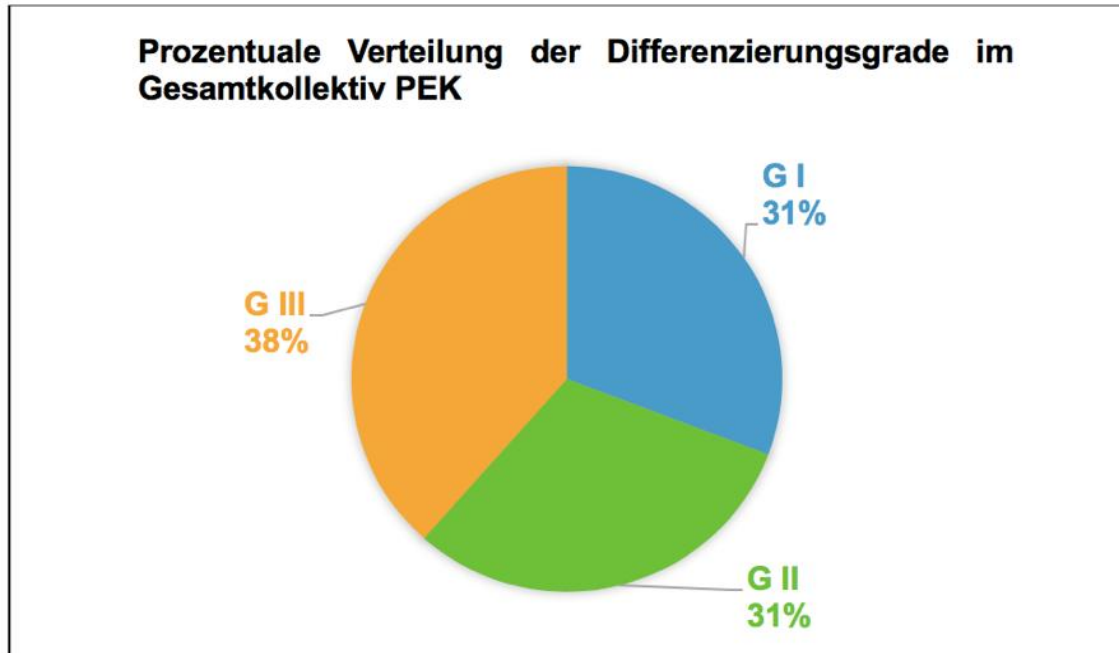


Abbildung 5: Prozentuale Verteilung der Differenzierungsgrade G I, G II und G III im Gesamtkollektiv der Plattenepithelkarzinome.

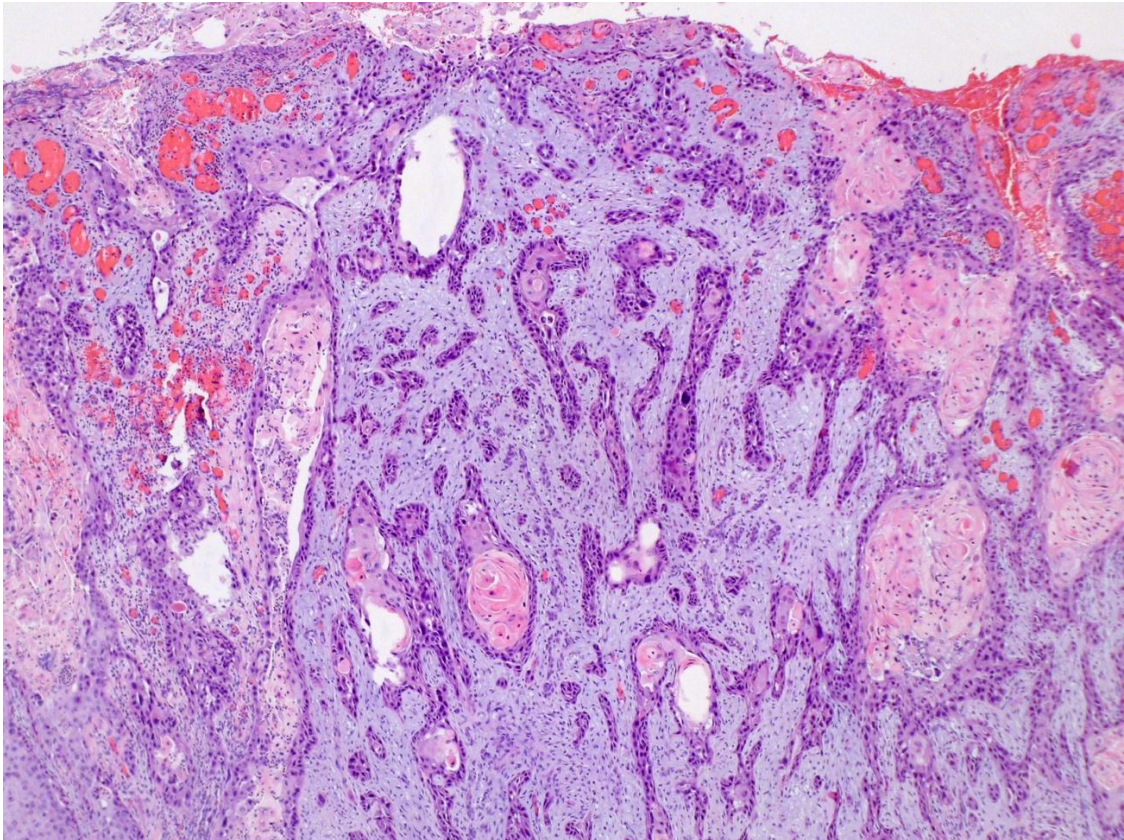


Abbildung 6: Plattenepithelkarzinom mit guter Differenzierung (G I), mit zahlreichen Hornperlen als Zeichen der guten Differenzierung. Kaum entzündlich verändertes Infiltrat.

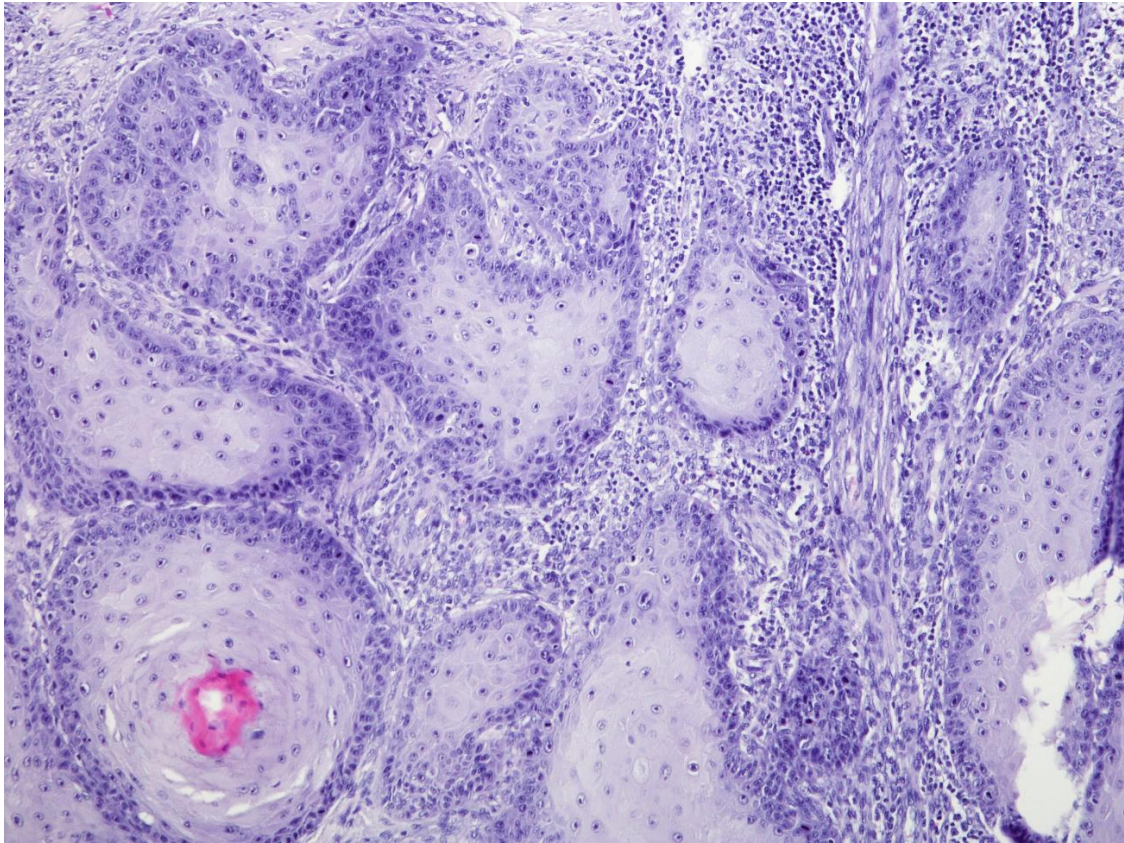
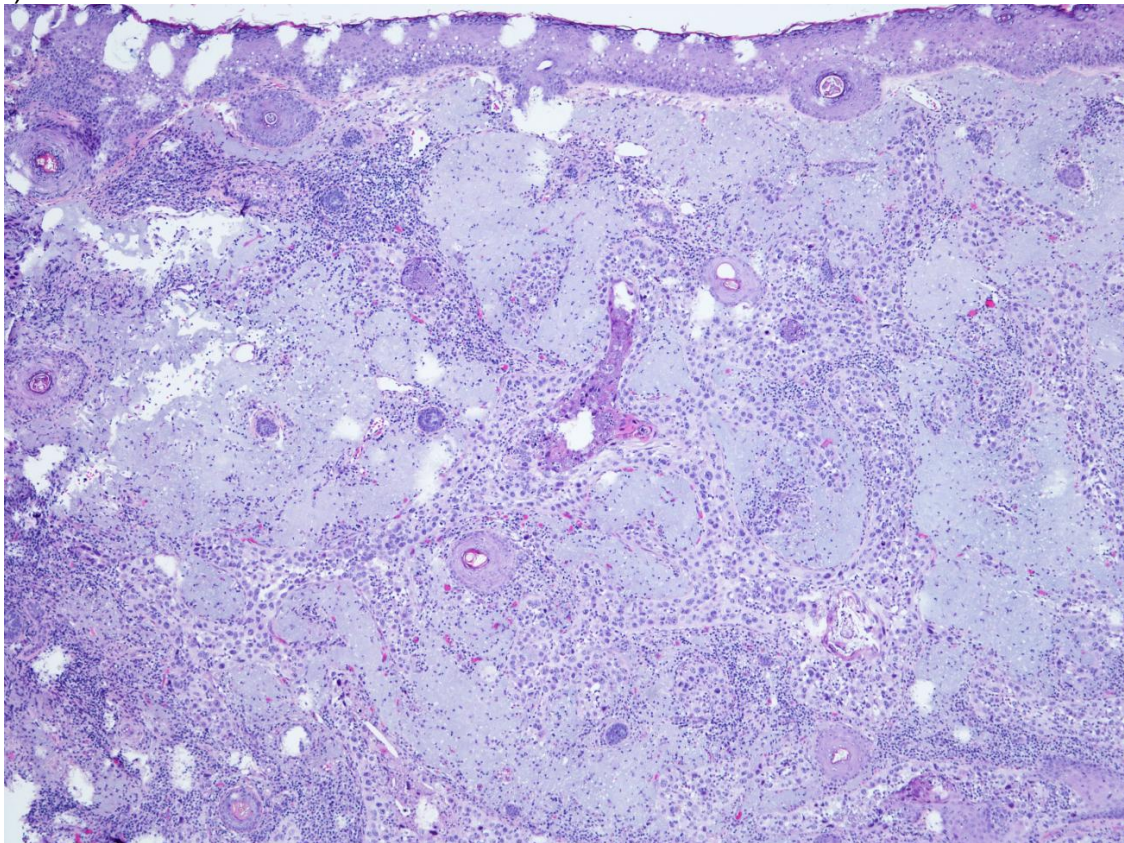


Abbildung 7: Detailaufnahme eines Plattenepithelkarzinoms mit guter Differenzierung (G1) und dichtem lymphozytärem Infiltrat um die Tumorzellverbände.

a)



b)

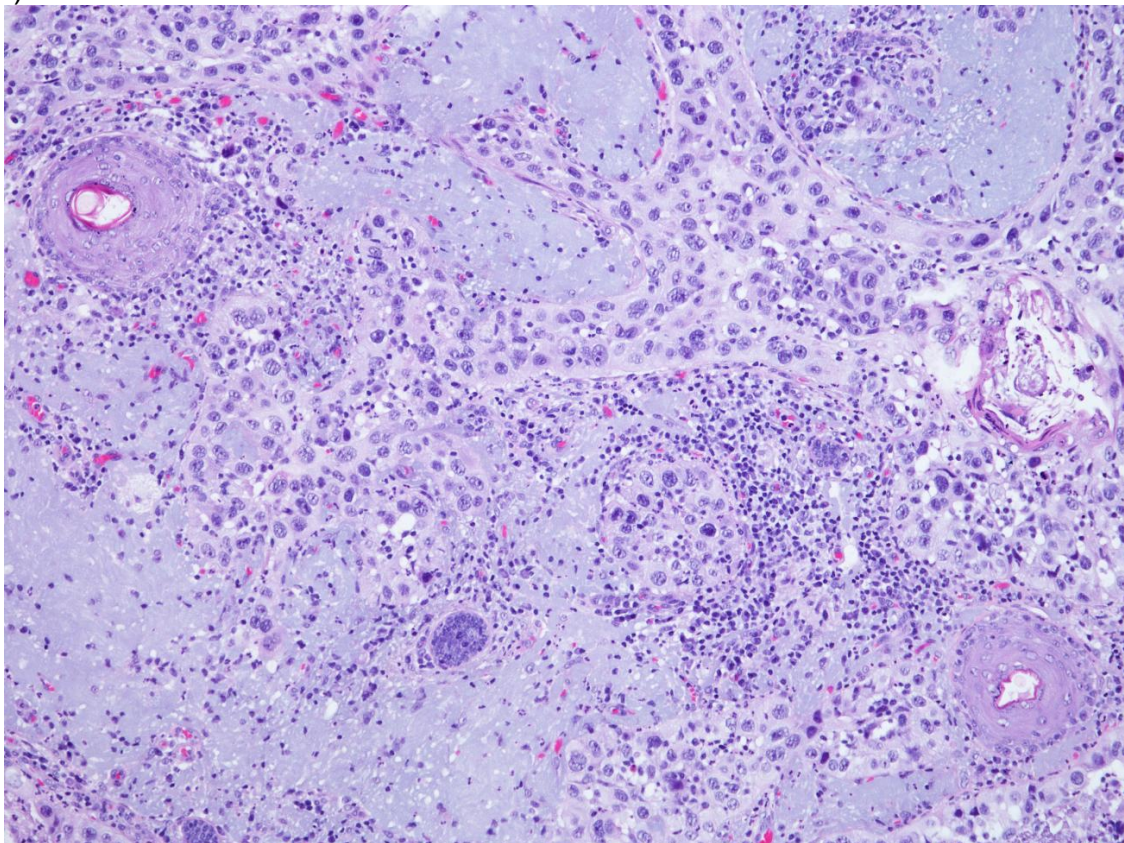


Abbildung 8: Entdifferenziertes Plattenepithelkarzinom (GIII). In der Übersicht (a) infiltratives Wachstum. (b) Die Tumorzellen sind pleomorph und zeigen keine Verhornungszentren mehr.

Das Gesamtkollektiv der KA-Proben wurde ebenfalls mikroskopiert und nach nicht-vorhandener und vorhandener Regression (Abbildung 10 und 11) sowie Alter und Geschlecht der Probanden eingeteilt und dargestellt (Tabelle 11 und Abbildung 9).

Tabelle 11: Gesamtkollektiv der Keratoakanthome mit Angabe zur vorhandenen (= ja) und nicht-vorhandenen (= nein) Regression sowie Alter und Geschlecht der Probanden zum Zeitpunkt der Exzision.

Probe	Regression vorhanden	Alter der Probanden [Jahre]	Geschlecht m: männlich w: weiblich
K1	nein	64	w
K2	nein	70	m
K3	nein	93	w
K4	nein	75	w
K5	nein	85	w
K6	nein	82	m
K7	nein	74	m
K8	nein	67	m
K9	nein	82	w
K10	nein	79	w
K11	nein	74	m
K12	nein	77	m
K13	nein	55	m
K14	nein	75	m
K15	nein	17	w
K16	nein	77	m
K17	nein	82	w
K18	nein	87	w
K19	nein	87	w
K20	ja	66	w
K21	ja	72	m

K22	ja	74	m
K23	ja	91	w
K24	ja	64	w
K25	ja	90	w
K26	ja	90	w
K27	ja	78	m
K28	ja	72	w
K29	ja	75	w
K30	ja	76	w
K31	nein	22	w
K32	nein	85	w

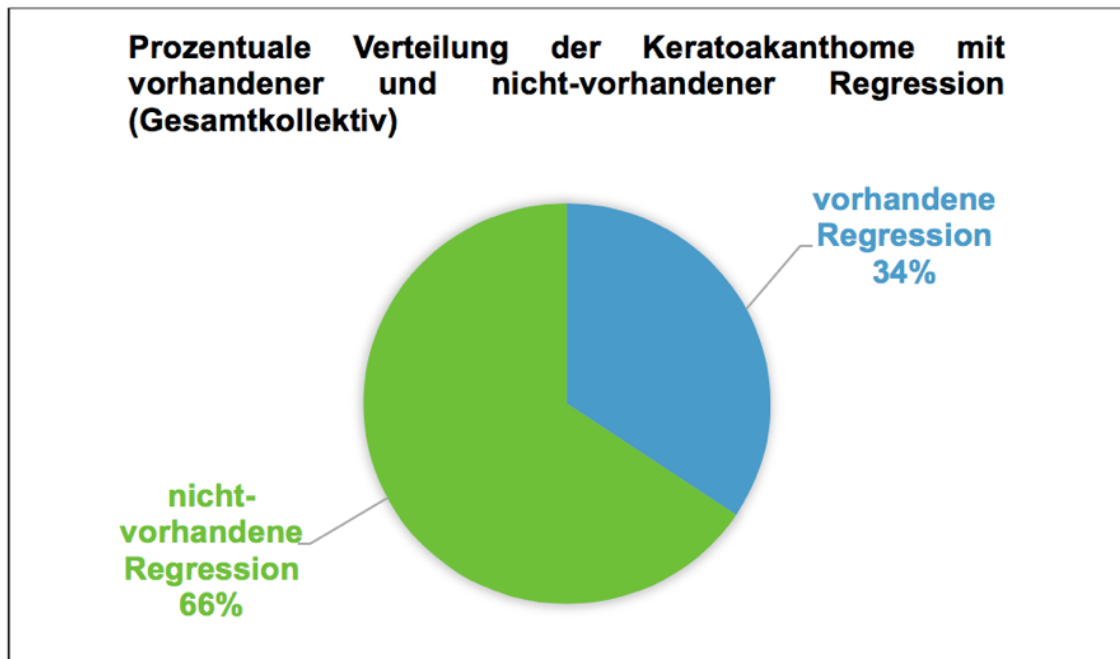


Abbildung 6: Prozentuale Verteilung der KA mit Zeichen von Regression und KA ohne Zeichen von Regression im Gesamtkollektiv.

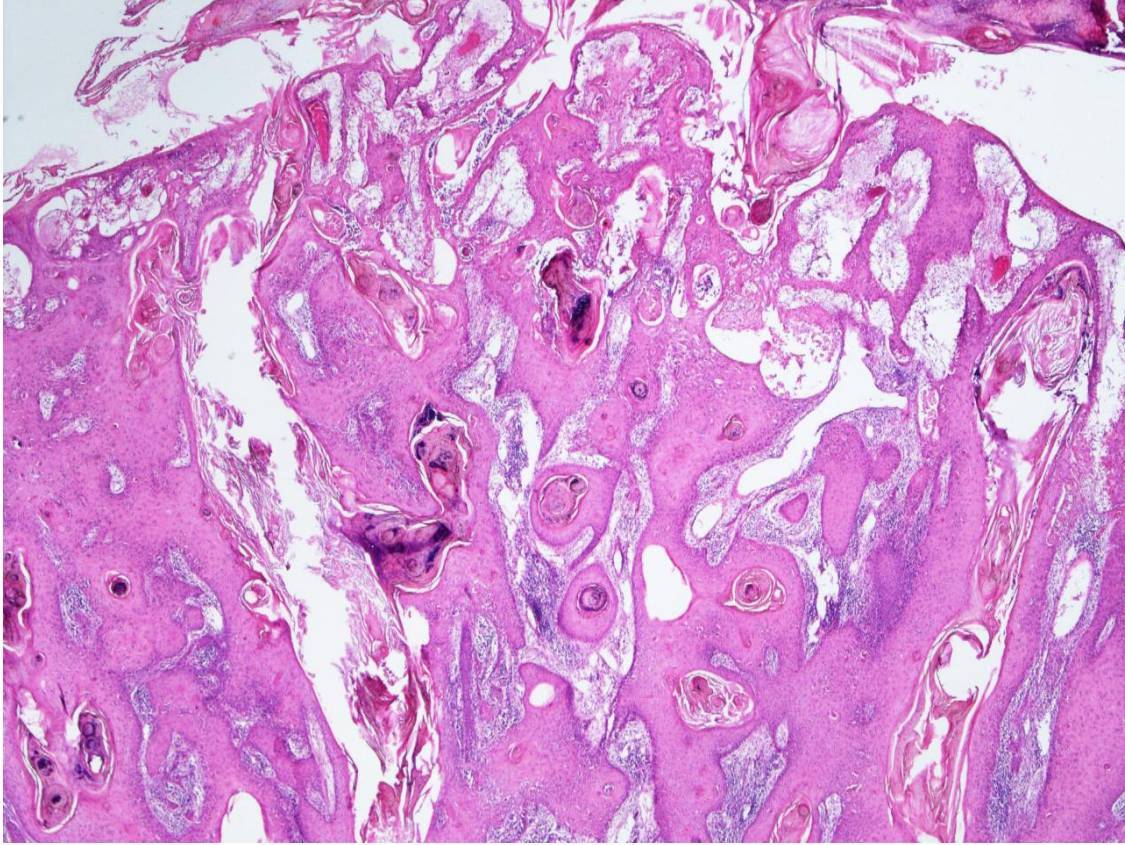


Abbildung 10: Keratoakanthom mit symmetrischem Aufbau und Hornkrater.

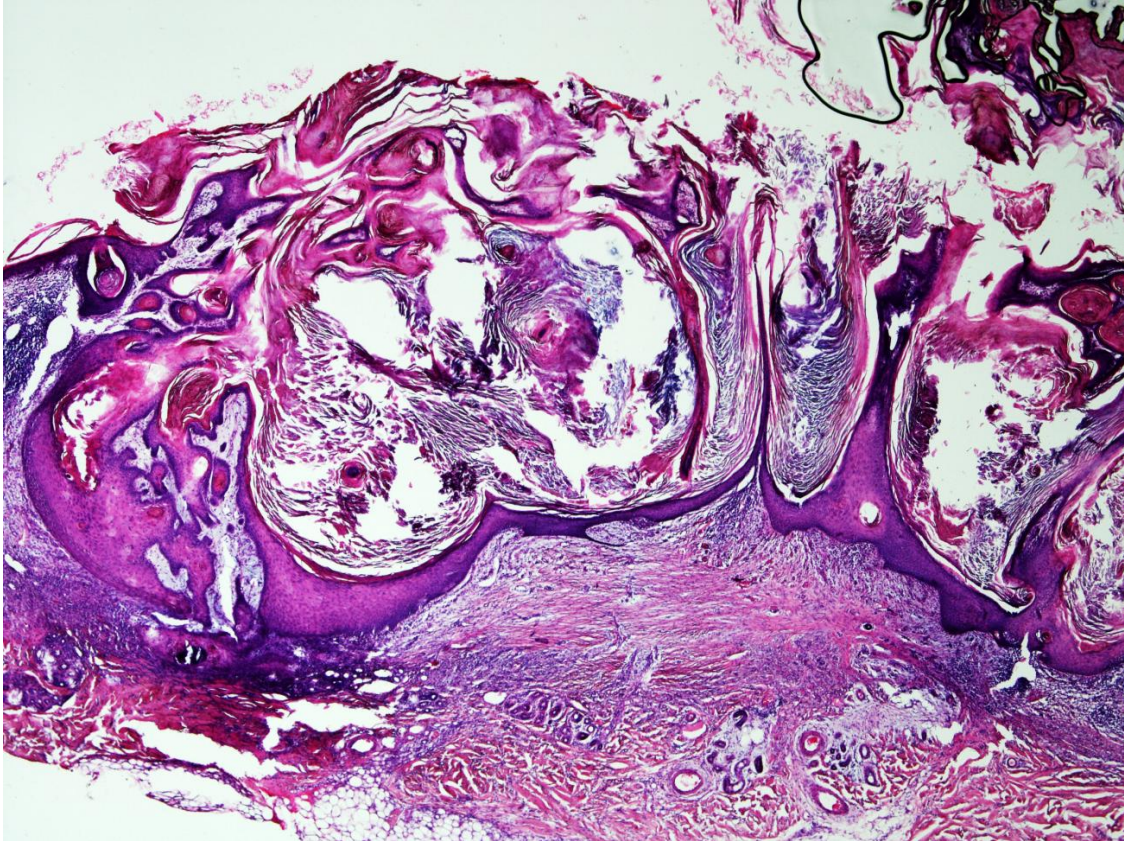


Abbildung 11: Keratoakanthom mit Regression. Der Hornkrater wird klauenartig von Epidermis umfasst, das obere Korium ist fibrotisch ersetzt. Im Randbereich entzündliches Infiltrat.

Es erfolgte eine Mikrodissektion der 58 Gewebeproben, um möglichst reines Tumorgewebe zu erhalten. Von diesem Gewebe wurde DNA wie zuvor beschrieben isoliert und aufgereinigt.

Eine DNA-Konzentration von $< 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ nach der ersten Aufreinigung stellte sich für die weiteren Schritte (Aufreinigung des PCR-Produkts und Sequenzierung) als zu niedrig heraus. Aufgrund dessen wurden ausschließlich die Proben mit einer DNA-Konzentration von $> 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (insgesamt 32) für die folgenden Schritte verwendet. Die übrigen 26 Tumore wiesen eine zu geringe Tumormasse von $< 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ auf und konnten nicht in die Sequenzierungsstudie eingeschlossen werden.

5.1.2 Verwendetes Kollektiv

Verwendete Plattenepithelkarzinome:

Von dem Gesamtkollektiv der 26 PEK-Proben konnten folgende 15 Proben (mit einer DNA-Konzentration von > 50 ng/μl) sequenziert werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Proben des verwendeten PEK-Kollektivs mit entsprechendem Differenzierungsgrad, der entsprechenden Tumordicke sowie Alter und Geschlecht der Probanden zum Zeitpunkt der Exzision.

Probe	Differenzierungsgrad	Tumordicke [mm]	Alter der Probanden [Jahre]	Geschlecht [m/w]
P3	G III	2,5	77	m
P5	G I	5,0	77	m
P6	G I	4,0	82	m
P7	G I	3,0	80	m
P8	G II	12,0	46	m
P9	G I	7,5	46	m
P12	G II	11,0	83	m
P13	G II	3,5	82	m
P14	G II	2,5	57	w
P17	G III	3,3	71	m
P19	G II	3,5	71	m
P20	G III	6,0	69	m
P22	G III	3,0	78	w
P23	G III	4,6	78	w
P25	G II	5,0	89	m

Die verwendeten Proben der PEK wiesen drei Differenzierungsgrade GI, GII und GIII mit folgender prozentualer Verteilung auf (Abbildung 12).

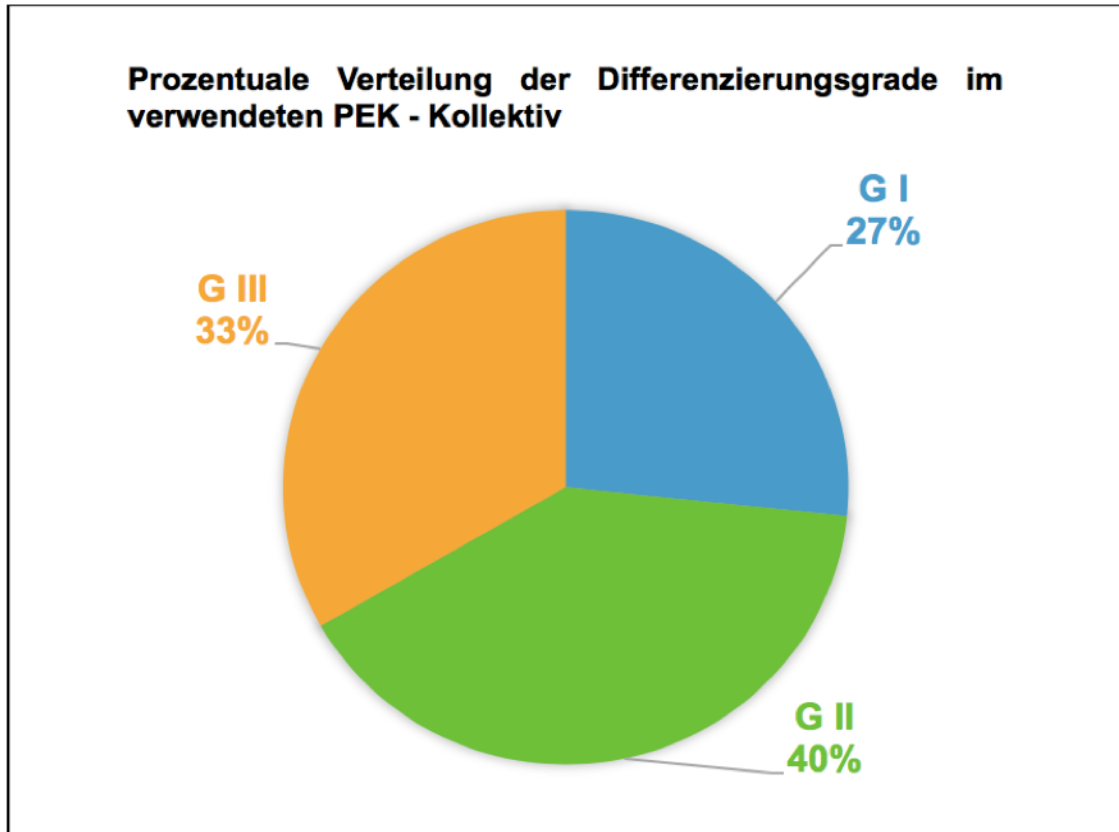


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der Differenzierungsgrade G I, GII und GIII im verwendeten Kollektiv der Plattenepithelkarzinome.

Die Tumordicke der verwendeten PEK variierte zwischen 2,5 mm und 12,0 mm mit einer mittleren Tumordicke von 5,1 mm (Abbildung 13).

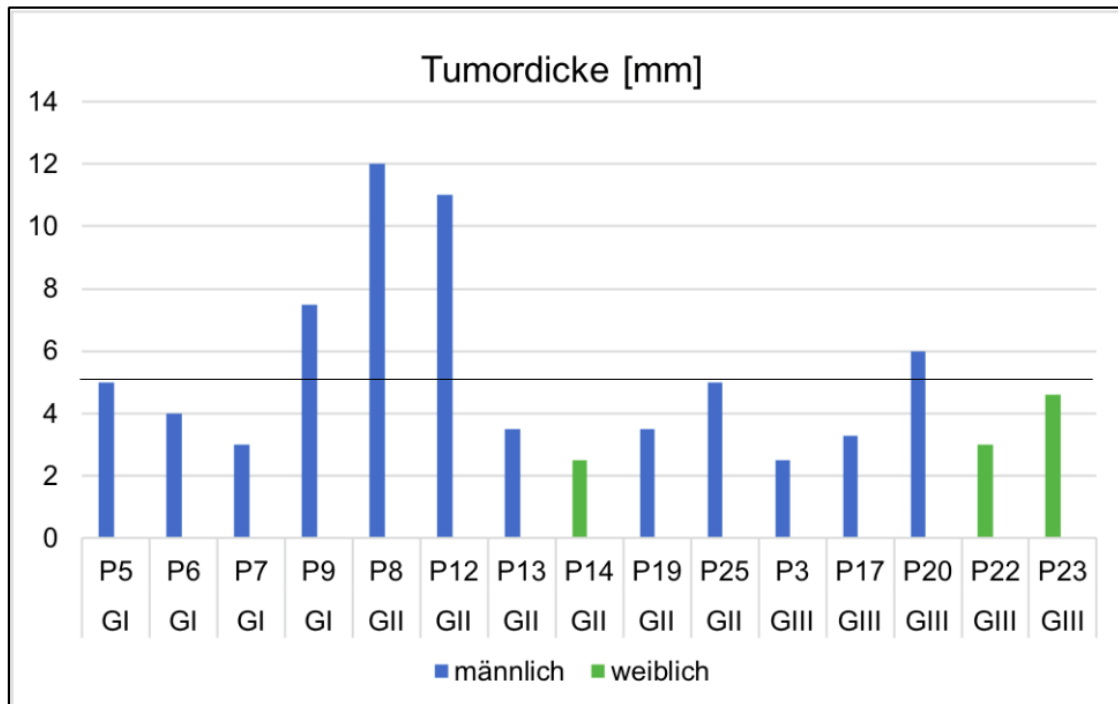


Abbildung 8: Tumordicke der verwendeten PEK mit Angabe des Geschlechts und der Probennummer mit entsprechendem Differenzierungsgrad, sortiert nach GI, GII, GIII. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der Tumordicke von 5,1 mm.

Das Alter der Probanden der verwendeten PEK variierte zwischen 46 und 89 Jahren mit einem mittleren Probandenalter von 72,4 Jahren (Abbildung 14).

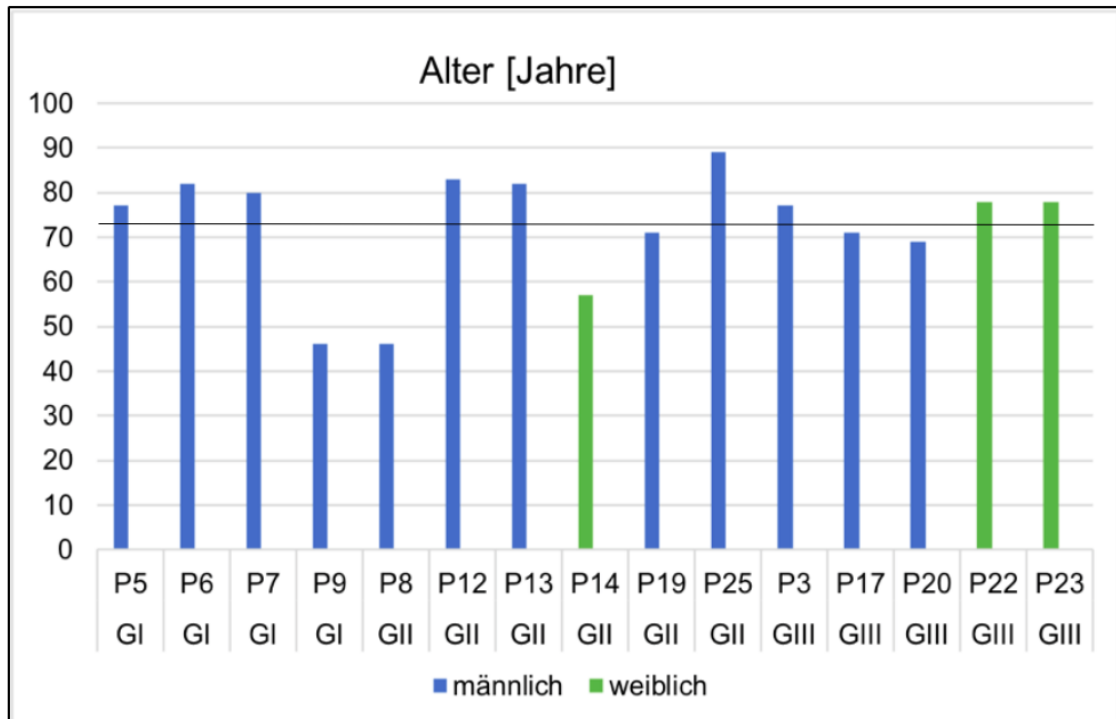


Abbildung 14: Das Alter der Probanden im verwendeten Kollektiv der PEK-Proben mit Angabe des Geschlechts und der Probennummer mit entsprechendem Differenzierungsgrad, sortiert nach GI, GII, GIII. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert des Probandenalters von 72,4 Jahren.

Das Probandenkollektiv der verwendeten PEK wies eine prozentuale Geschlechterverteilung von männlich 80 % (12 Probanden) und weiblich 20 % (3 Probandinnen) auf (Abbildung 15).

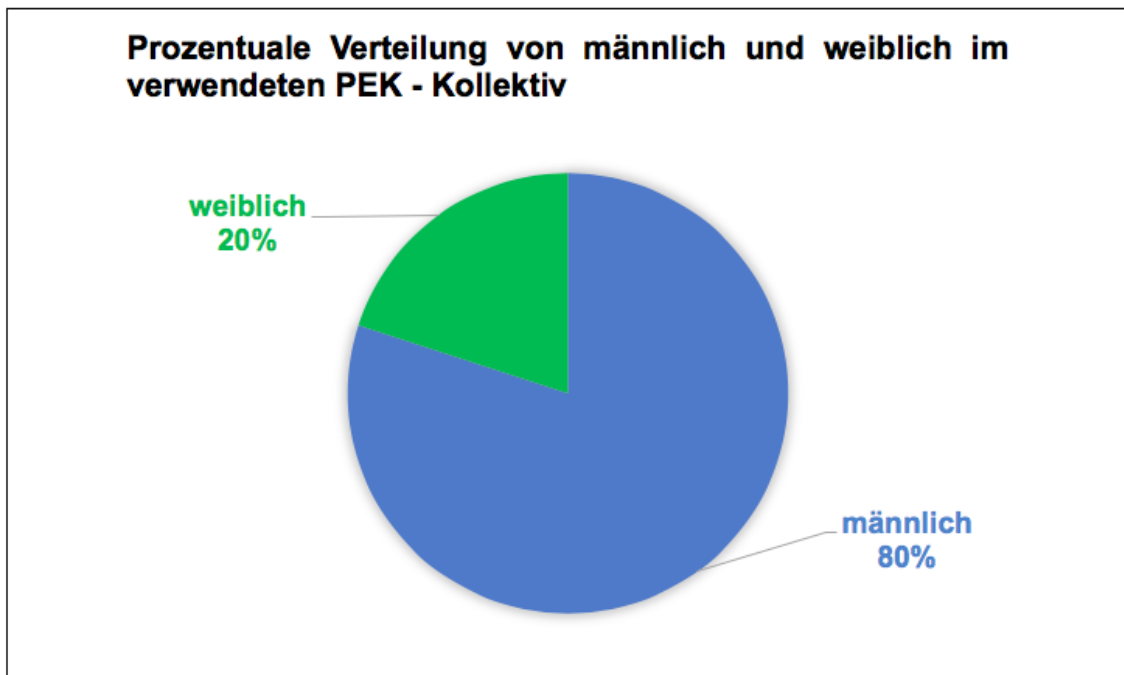


Abbildung 15: Geschlechterverteilung (männlich/weiblich) im verwendeten Kollektiv der Plattenepithelkarzinome.

Verwendete Keratoakanthome:

Auch aus dem Gesamtkollektiv der KA mussten Proben aufgrund niedriger DNA-Konzentration verworfen werden: 17 von 32 Gewebeproben wiesen eine ausreichende Konzentration auf und konnten sequenziert werden. Im Folgenden werden die verwendeten Proben aufgelistet und dargestellt (Tabelle 13, Abbildung 16).

Tabelle 13: Probennummern der verwendeten Keratoakanthome vom Gesamtkollektiv mit Angabe zur Regression (ja/nein), Alter und Geschlecht (m: männlich, w: weiblich) der Probanden zum Zeitpunkt der Exzision

Probe	Regression vorhanden	Alter der Probanden [Jahre]	Geschlecht m: männlich w: weiblich
K2	nein	70	m
K3	nein	93	w
K4	nein	75	w
K7	nein	47	m
K8	nein	67	m
K10	nein	79	w
K11	nein	74	m
K12	nein	77	m
K13	nein	55	m
K16	nein	77	m
K17	nein	82	w
K19	nein	87	w
K20	ja	66	w
K22	ja	74	m
K30	ja	76	w
K31	nein	22	w
K32	nein	85	w

Das verwendete Kollektiv der KA-Proben beinhaltete mehr KA ohne Zeichen von Regression als KA mit Zeichen von Regression (Abbildung 16).

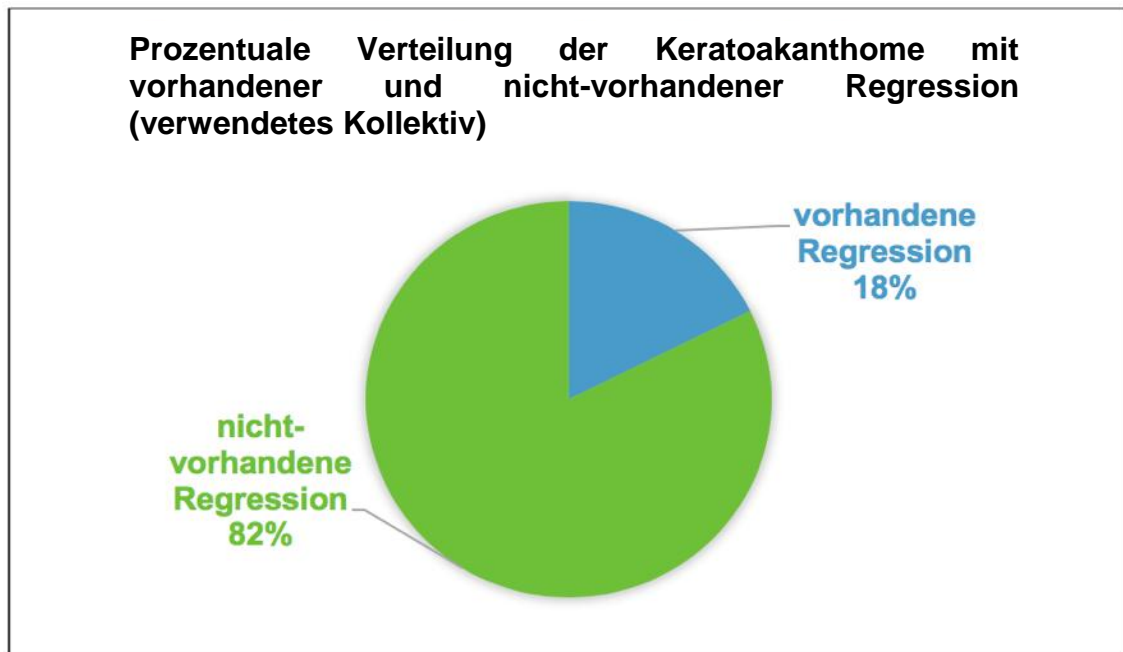


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der verwendeten KA mit Zeichen von Regression und KA ohne Zeichen von Regression.

Das Alter der Probanden der verwendeten KA variierte zwischen 22 und 93 Jahren mit einem Mittelwert von 71 Jahren (Abbildung 17).

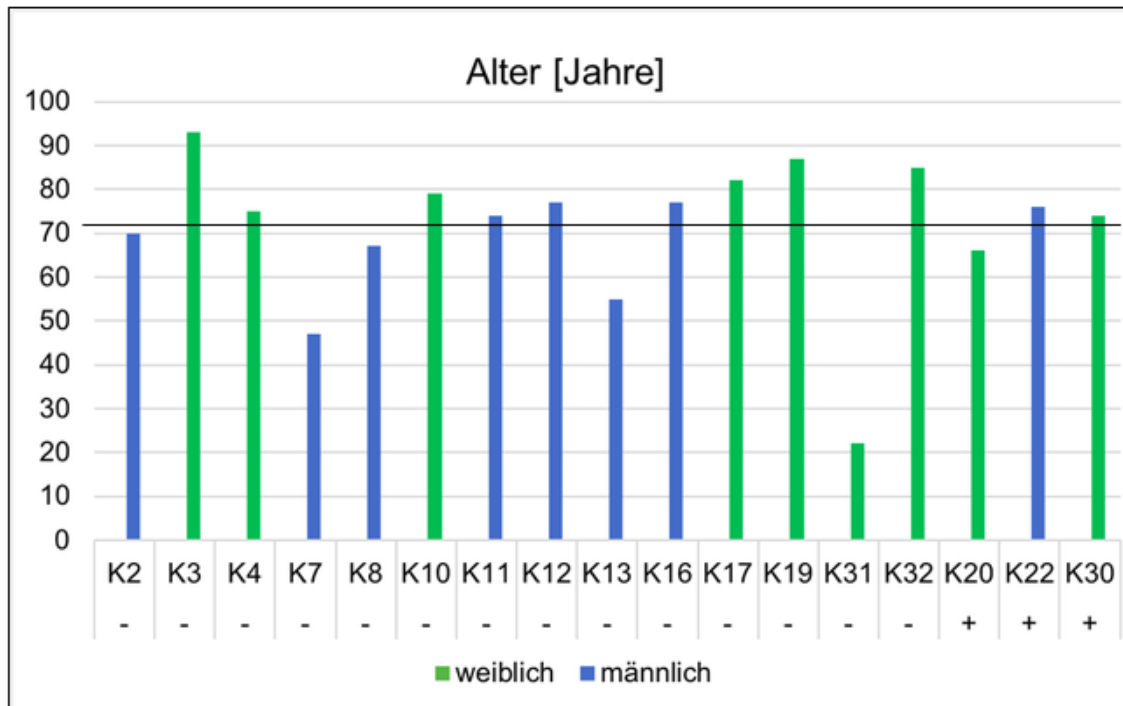


Abbildung 17: Das Alter der Probanden im verwendeten Kollektiv der KA-Proben mit Angabe des Geschlechts, der Probennummer und mit Bemerkung zur Regression (+ : Regression vorhanden, - : Regression nicht vorhanden). Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert des Probandenalters von 71 Jahren.

Das Probandenkollektiv der verwendeten KA wies eine prozentuale Geschlechterverteilung von männlich 47 % (acht Probanden) und weiblich 53 % (neun Probandinnen) auf (Abbildung 18).

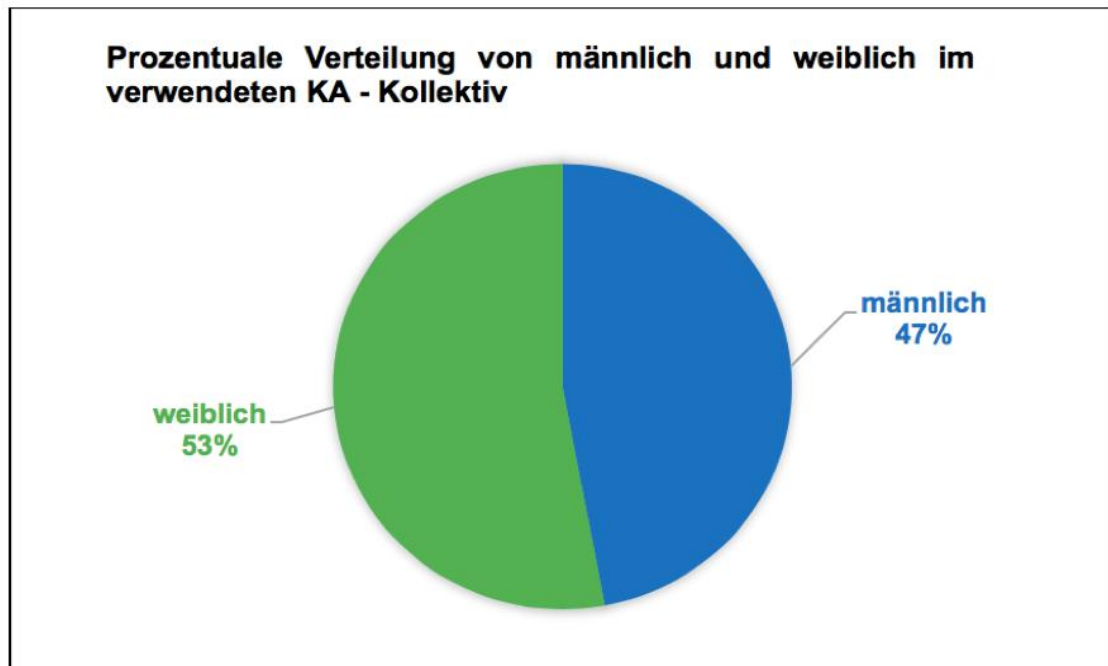


Abbildung 18: Geschlechterverteilung (männlich/weiblich) im verwendeten Kollektiv der Keratoakanthome.

5.2 Evaluation des entzündlichen Infiltrates

Die Proben des verwendeten Kollektivs wurden mikroskopiert und bezüglich der Entzündungszellen charakterisiert (Tabelle 14 und 15).

Allgemein waren vorwiegend Lymphozyten und relativ wenig neutrophile Granulozyten an der Entzündungsreaktion beteiligt. Ein Unterschied zwischen PEK und KA ließ sich jedoch nicht erkennen, auch nicht zwischen regressiven und nicht-regressiven Tumoren. Andere Zelltypen wie Plasmazellen und eosinophile Granulozyten kamen nur sehr spärlich zur Darstellung. Insbesondere gab es weder im Gesamtinfiltrat, noch in den jeweiligen Populationen einen Unterschied zwischen den Tumordicken, dem Differenzierungsgrad oder der vorhandenen Regression.

Tabelle 14: Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats nach Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im verwendeten PEK-Kollektiv.

Probe	Differenzierungsgrad	Entzündung	Lymphozyten	Plasmazellen	Neutrophile Granulozyten	Eosinophile Granulozyten
P5	G I	++	+	(+)	(+)	+
P6	G I	+	+	+	-	-
P7	G I	(+)	(+)	-	-	-
P9	G I	+	+	-	-	-
P12	G II	(+)	-	-	-	-
P13	G II	++	+	+	+	-
P14	G II	++	+	+	+	+
P25	G II	+	+	+	(+)	-
P19	G II	++	++	-	-	+
P8	G II	+	+	-	(+)	-
P3	GIII	+	+	+	-	-
P17	GIII	++	++	-	-	+
P20	GIII	+++	++	+	-	-
P22	GIII	(+)	-	-	-	-
P23	GIII	(+)	-	-	-	-

Tabelle 15: Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats nach Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im verwendeten PEK-Kollektiv und im verwendeten KA- Kollektiv.

Probe	Regression (+/-)	Entzündung	Lymphozyten	Plasma-zellen	Neutrophile Granulozyten	Eosinophile Granulozyten
K2	-	++	+	++	-	++
K3	-	(+)	(+)	-	-	-
K4	-	+	+	+	-	+
K7	-	++	+	+	+	++
K8	-	++	+	+	+	-
K10	-	(+)	+	(+)	-	-
K11	-	(+)	-	-	-	-
K12	-	+	(+)	-	++	++
K13	-	+	+	+	+	-
K16	-	(+)	+	-	-	-
K17	-	++	++	+	-	-
K19	-	+	+	-	-	-
K31	-	(+)	(+)	-	-	-
K32	-	(+)	-	-	-	-
K20	+	(+)	-	-	-	-
K22	+	++	++	-	-	-
K30	+	+	+	+	-	-

5.3 DNA-Konzentration

Das Isolieren der DNA aus den Gewebeschnitten und die Aufreinigung der ausgewählten DNA verlief bei den genannten Proben erfolgreich. Die DNA-Konzentration und die DNA-Reinheit wurden mit Hilfe des Spektrometers ermittelt. Die sogenannte „260/280-Ratio“ entspricht dem Extinktionsverhältnis bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm und gibt die Reinheit des DNA-Gehaltes der Probe an. Ein Wert von circa 1,8 spricht für einen hohen bzw. „reinen“ DNA-Gehalt. Ein Wert von $< 1,8$ weist auf Protein- oder Phenolverunreinigung hin.

Die Werte der Proben lagen zwischen 1,59-1,99, mit einem durchschnittlichen Wert von 1,71. Dies entspricht einem relativ reinen bzw. hohen DNA-Gehalt der Proben (Tabelle 16 und 17).

Die gemessene DNA-Konzentration der jeweiligen Proben lag nach der Aufreinigung des PCR-Produkts (zweite Aufreinigung) im Schnitt bei 18 ng/ μ l.

Diese Konzentrationsabnahme der DNA ist auf Primer-Dimere zurückzuführen, die bei der zweiten Aufreinigung entfernt wurden.

Tabelle 16: PEK-Proben des verwendeten Kollektivs mit ermittelter DNA-Konzentration und der dazugehörigen 260/280-Ratio (gemessen am Spektrometer).

Probe	DNA-Konzentration	260/280-Ratio
P3	14 ng/μl	1,72
P5	14 ng/μl	1,68
P6	10 ng/μl	2,24
P7	11 ng/μl	1,92
P8	13 ng/μl	1,86
P9	18 ng/μl	1,74
P12	11 ng/μl	1,70
P13	17 ng /μl	1,64
P14	8 ng/μl	1,68
P17	10 ng/μl	1,94
P19	11 ng/μl	1,61
P20	14 ng/μl	1,79
P22	16 ng/μl	1,66
P23	13 ng/μl	1,86
P25	11 ng/μl	1,91

Tabelle 17: KA-Proben des verwendeten Kollektivs mit ermittelter DNA-Konzentration und der dazugehörigen 260/280-Ratio (gemessen am Spektrometer).

Probe	DNA-Konzentration	260/280-Ratio
K2	24 ng/µl	1,66
K3	24 ng/µl	1,73
K4	40 ng/µl	1,67
K7	22 ng/µl	1,62
K8	12 ng/µl	1,54
K10	22 ng/µl	1,61
K11	22 ng/µl	1,69
K12	21 ng/µl	1,56
K13	30 ng/µl	1,71
K16	27 ng/µl	1,60
K17	24 ng/µl	1,69
K19	17 ng/µl	1,62
K20	23 ng/µl	1,58
K22	20 ng/µl	1,66
K30	18 ng/µl	1,69
K31	20 ng/µl	1,62
K32	26 ng/µl	1,62

KA und PEK konnte in der Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Abbildung 19).

Die Größe des Reaktionsproduktes der jeweiligen DNA-Proben von circa 300 Basenpaaren (bp) stimmte mit der Größe des gesuchten Produktes überein.

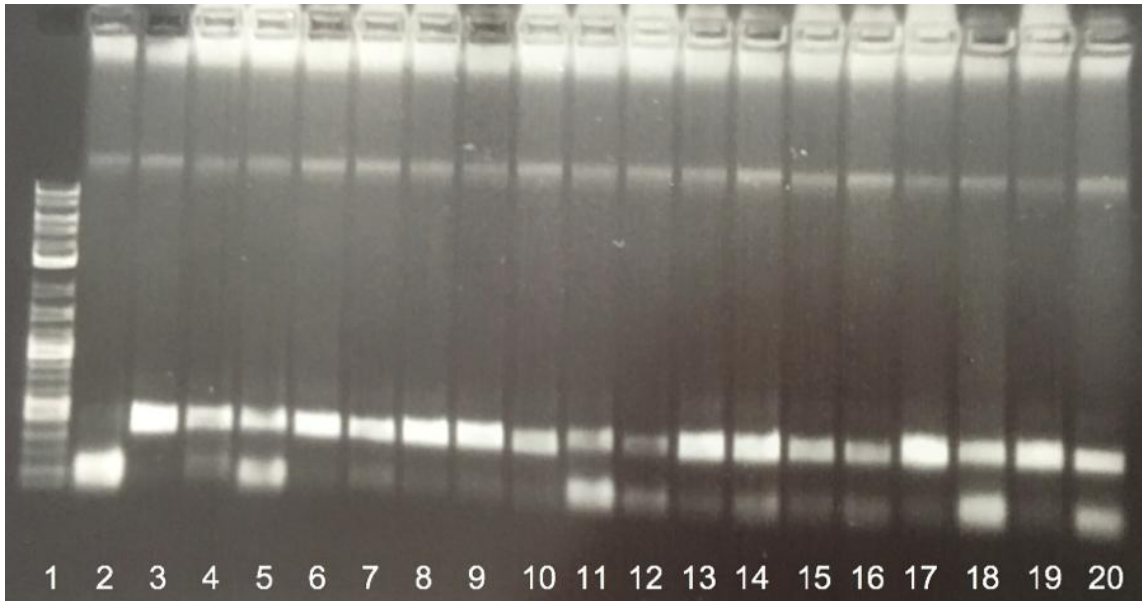


Abbildung 19: Gelelektrophorese und Visualisierung der Amplifikationsprodukte vor Aufreinigung der DNA. 1: Leiter (Längenstandard), 2: Negativkontrolle, 3-20: DNA-Probe 1-18.

Nach erneuter Aufreinigung der jeweiligen Proben entstand ein reines DNA-Produkt (Abbildung 20) mit folgendem Sequenzierungsergebnis (Abbildung 21).

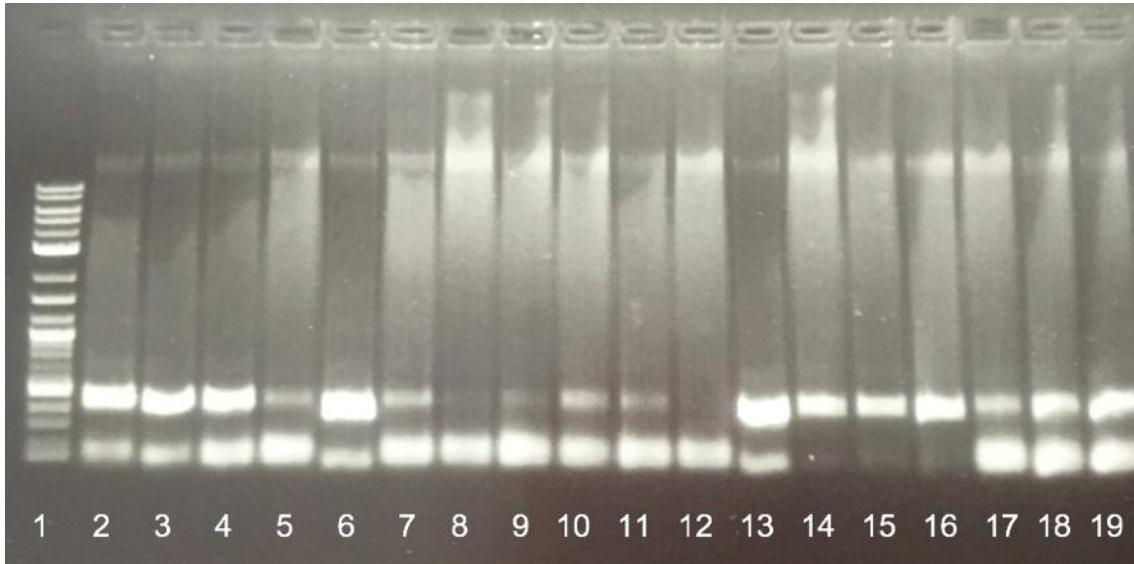


Abbildung 10: Gelelektrophorese und Visualisierung der Amplifikationsprodukte **nach** Aufreinigung der DNA. 1: Leiter (Längenstandard), 2-19: DNA-Probe 1-18.

5.4 Ergebnis der Sequenzierungsanalyse

Die Sequenzierung der 32 Proben über die Firma Eurofins Genomics verlief nach Aufreinigung der DNA-Proben erfolgreich. Alle 32 Proben (15 PEK und 17 KA) zeigten folgende Sequenz (Abbildung 21).

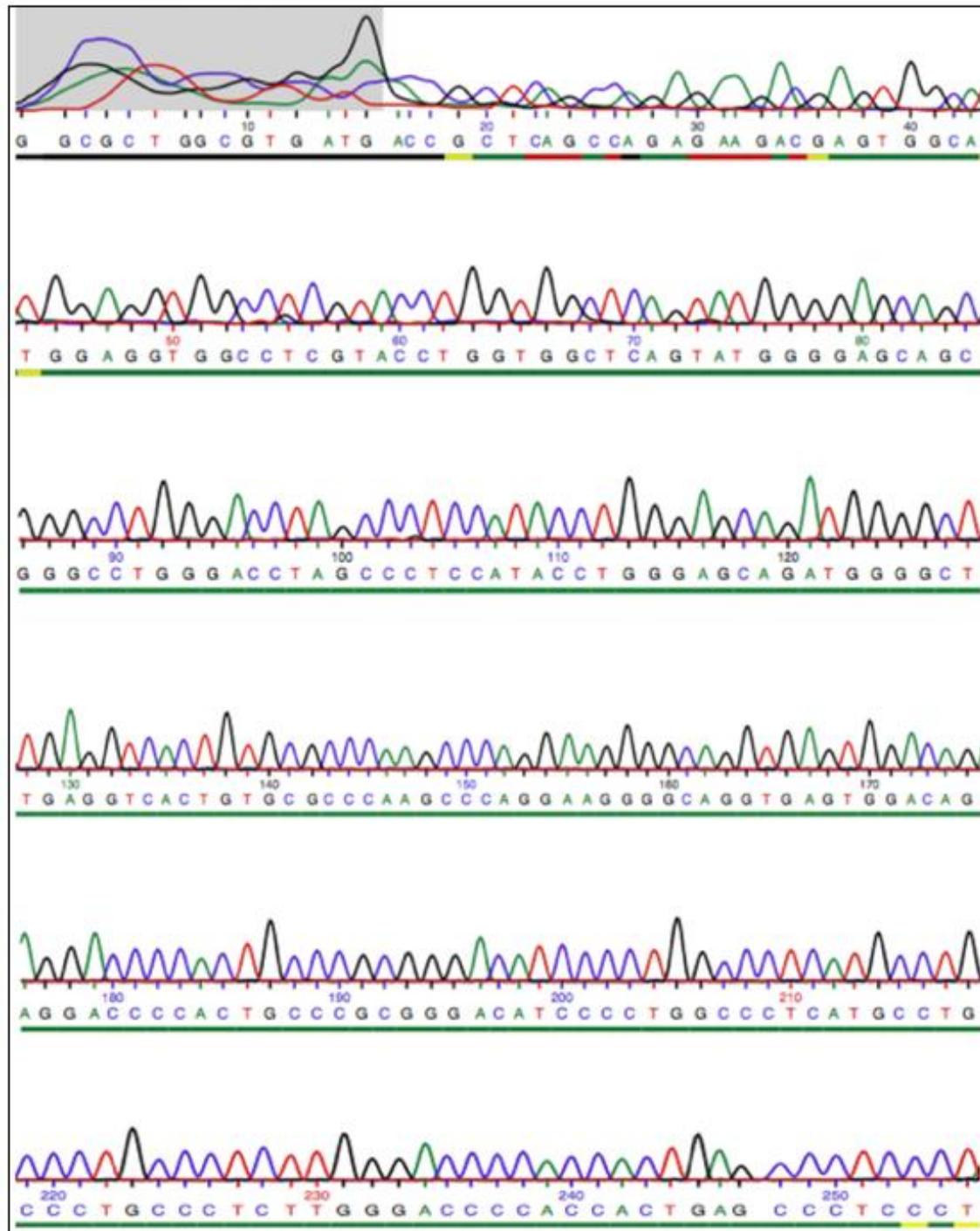


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der DNA-Sequenz eines Keratoakanthoms, NLRP1, Exon 1; die Farben der Peaks entsprechen folgenden Basen: grün = Adenin, blau = Cytosin, schwarz = Guanin, rot = Thymin

Es wurden die Sequenzierungsergebnisse der einzelnen Proben mit der Wildtypsequenz des entsprechenden Genabschnitts verglichen (Abbildung 22), um diese auf potenzielle Mutationen zu überprüfen.

```
CTCGCCAATAAAGCGCACTCCAGGAGCTCTTCGGGTG
AGACACCCGCTCAGCCAGAGAAGACGAGTGGCATGGA
GGTGGCCTCGTACCTGGTGGCTCAGTATGGGGAGCAG
CGGGCCTGGGACCTAGCCCTCCATACCTGGGAGCAGA
TGGGGCTGAGGTCACTGTGCGCCCAAGCCCAGGAAG
GGGCAGGTGAGTGGACAGAGGACCCCACTGCCCGCG
GGACATCCCCTGGCCCTCATGCCTGCCCTGCCCTCTT
GGGACCCCACTGAGCCCTCCCTG
```

Abbildung 12: Die Nukleotidsequenz des Wildtyps von NLRP1, Exon 1 (NG_011651.1, 2018).

Zu erwarten waren folgende drei Punktmutationen (Abbildung 23), die in Assoziation mit dem genannten MSPC-Syndrom stehen und zum Austausch von Aminosäure führen (Missense-Mutation):

1. Mutation: p.A54T MSPC TN-1; ALA54THR, G>A:
Base Adenin (statt Guanin) → Aminosäure Threonin (statt Alanin)
2. Mutation: p.A66V MSPC RO-1; ALA66VAL, C>T
Base Thymin (statt Cytosin) → Aminosäure Valin (statt Alanin)

3. Mutation: p.M77T MSPC FR-1; MET77THR, T>C

Base Cytosin (statt Thymin) → Aminosäure Threonin (statt Methionin)

(Zhong et al., 2016)

ctc gcc aat aaa gcg cac tcc agg agc tct tcg ggt gag aca ccc gct cag cca gag aag
L A N K A H S R S S S G E T P A Q P E K
acg agt ggc atg gag gtg gcc tgg tac ctg gtg gct cag tat ggg gag cag cgg gcc tgg
T S G M E V A S Y L V A Q Y G E Q R A W
gac cta gcc ctc cat acc tgg gag cag atg ggg ctg agg tca ctg tgc gcc caa gcc cag
D L A L H T W E Q M G L R S L C A Q A Q
gaa ggg gca ggt gag tgg aca gag gac ccc act gcc cgc ggg aca tcc cct ggc cct cat
E G A G E W T E D P T A R G T S P G P H
gcc tgc cct gcc ctc ttg gga ccc cac
A C P A L L G P H

Abbildung 13: Die DNA-Sequenz von NLRP1 Exon 1 (in Basentriplets) mit entsprechender Aminosäuresequenz. Zu erwarten waren Mutationen der rot-markierten Aminosäuren, die in Verbindung mit MSPC beschrieben wurden (Zhong et al., 2016).

A: Alanin, C: Cystein, D: Aspartat, E: Glutamat, G: Glycin, H: Histidin, K: Lysin, L: Leucin, M: Methionin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, T: Threonin, V: Valin, W: Tryptophan, Y: Tyrosin

Die untersuchten Proben wiesen im entsprechenden Genabschnitt (NLRP1, Exon 1) keine Mutation auf und entsprechen dem Wildtyp.

6. Diskussion

Die Abgrenzung eines KA von einem PEK ist oftmals schwierig, da die Tumore meist vor der spontanen Regression operativ entfernt werden. Das MSPC-Syndrom weist als Hauptsymptomatik multiple KA auf, die sich teilweise zurückbilden, teilweise stagnieren oder in einzelnen Fällen auch maligne entarten. Makroskopisch und histologisch imitieren die KA auch bei dem seltenen Syndrom ein PEK, sodass hier die Diagnose PEK aufgrund der Vielzahl der Tumore zugunsten des KA verworfen wird.

Beim MSPC-Syndrom wurden Punktmutationen im NLRP1 Exon 1 nachgewiesen. Diese könnten die Regression von KA erklären.

Ob eine Zelle entartet oder nicht hängt von genetischen und nicht-genetischen Faktoren ab. Es ist bekannt, dass entzündliche Prozesse eine vielseitige Rolle bei der Tumorgenese spielen. Aber es ist nicht bekannt, warum KA zur Regression neigen und „klassische“ PEK nicht (Zhong et al., 2016, Mamai et al., 2015).

Das Ziel dieser Arbeit war es, spontane KA auf aktivierende Punktmutationen, welche bei MSPC beschrieben wurden, zu untersuchen, und somit den Einfluss von NLRP1 auf die Regression des Tumors zu bestimmen.

In der Regel verhindern Immunzellen die Entstehung von Krebs, indem sie alte und entartete Zellen (Krebszellen) rechtzeitig erkennen und diese eliminieren. Kommt es dennoch zum Wachstum eines Tumors, versucht das Immunsystem den Körper zu schützen, indem es die Apoptose der Tumorzellen einleitet und deren Proliferation inhibiert (Dajon et al., 2017). Ein geschwächtes Immunsystem führt zu einem erhöhten Krebsrisiko, insbesondere für NMSC. Nach einer Organtransplantation ist vor allem das Risiko für PEK erhöht (PEK: 65-fach höheres Risiko, BZK: 10-fach höheres Risiko) (Yu et al., 2014).

Die Immuntherapie kommt seit einigen Jahren in der Onkologie vermehrt zum Einsatz und stellt neben der Resektion, Radiatio und systemischer Chemotherapie eine weitere Therapieoption dar (Gadkaree et al., 2017).

Im Gegensatz zur systemischen Chemotherapie, bei der das Immunsystem supprimiert wird, wird bei der Immuntherapie die Abwehr des Körpers durch Antikörper und Zytokine gestärkt (Salazar et al., 2017). Insbesondere kommt die Immuntherapie bei malignen Melanomen zum Einsatz, vermehrt wird ein anti-tumoraler Mechanismus auch bei anderen Tumorarten nachgewiesen und eingesetzt (Sanlorenzo et al., 2014).

In einer Studie mit therapie-refraktären Mamma-Karzinomen zeigen die Tumore ein deutliches Ansprechen auf die topische Therapie mit dem TLR-7 Agonisten Imiquimod in Kombination mit einer systemischen Gabe von Nab-Paclitaxel (Salazar et al., 2017).

Beide Medikamente modulieren die Immunantwort unter anderem durch vermehrte Aktivierung von T-Zellen und Stimulierung der Interferon- γ -Produktion.

Zahlreiche Studien zeigen einen positiven Effekt auf die Tumorregression durch die Stimulierung des körpereigenen Immunsystems.

In vielen soliden Tumoren erweist sich eine erhöhte Immunzellendichte als ein prognostisch günstiger Marker (Dajon et al., 2017).

Allerdings zeigt die erhöhte Entzündungsbereitschaft des Körpers nicht in allen Fällen eine Hemmung bzw. einen Rückgang des Tumorwachstums. Eine chronische Entzündung führt bekanntlich zu einem erhöhten Krebsrisiko (Hoesel and Schmid, 2013) und eine nicht-chronische Stimulierung des Immunsystems kann auch zur Tumorprogression führen (Dajon et al., 2017).

Dajon und Kollegen überprüften den Einfluss verschiedener TLRs bezüglich der Prognose von Tumoren und stellten fest, dass die Aktivierung dieser Rezeptoren sowohl pro- als auch anti-tumorale Effekte haben (Dajon et al., 2017).

Die unterschiedlichen Effekte der Immunreaktion (pro-tumoral oder anti-tumoral) sind von verschiedenen Faktoren abhängig: TLR- und Tumortyp, Tumor-Subtyp sowie von der Mikroumgebung des Tumors. Teilweise exprimieren die Tumorzellen selbst TLRs, sodass eine Aktivierung der Rezeptoren zur Tumorprogression führt (Dajon et al., 2017).

Es ist bekannt, dass eine chronische Entzündungsaktivität zur Entartung der Zellen und somit zu einer Transformation der benignen Hautläsion in einen malignen Tumor führen kann (Dajon et al., 2017).

Die Dignität und auch das KA als eigenständige Entität werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Vermehrt werden unklare histologische Befunde als „Keratom-ähnliches Plattenepithelkarzinom“ bezeichnet. Laut aktueller Terminologie der WHO ist ein KA ein hochdifferenziertes PEK und wird somit als „maligne“ eingestuft (Stadium GI) (Nobeyama and Nakagawa, 2016). Schon vor vielen Jahren wurde die Frage, ob ein KA benigne oder maligne eingestuft werden soll, von mehreren Autoren kontrovers diskutiert (Butcher, 1979, Sanders and Miller, 1982). Einige Autoren plädierten dafür, dass die Malignität bei KA eine Fehldiagnose sei (Butcher, 1979). Andere berichteten über die Tendenz von KA zu metastasieren (Sanders and Miller, 1982). Im Jahr 1889 wurde erstmals von Hutchinson das KA als ein nicht-aggressiver Tumor definiert und als solcher fortan von weiteren Autoren übernommen (Takai, 2017).

Es ist zu erwähnen, dass KA allgemein mit einer erhöhten Entzündungsbereitschaft vergesellschaftet sind. Zum Beispiel werden sie vermehrt unter der Immuntherapie mit Pembrolizumab beschrieben (Freites-Martinez et al., 2017). „Klassische“ PEK hingegen werden vermehrt im Zusammenhang mit einer Immunsuppression, zum Beispiel nach Organtransplantation und unter Cyclosporin A beobachtet (Santana et al., 2017, Abikhair et al., 2016).

Letztlich bleibt die Frage bestehen, inwiefern die Immunlage verantwortlich für die Ausbildung des „klassischen“ PEK oder des KA ist. Zur Klärung, ob die Immunlage entscheidend für die Regression des KA ist, müssten noch weitere Studien durchgeführt werden.

NLR erkennen Noxen und haben, wie TLRs, die Aufgabe das Immunsystem zu regulieren. Das NLRP1-Protein gehört zur Familie der NLR und kommt insbesondere in Keratinozyten vor (Zhong et al., 2016). Dieses Protein aktiviert unter anderem den Signalweg von IL-1, welches ein wichtiges Zytokin des angeborenen Immunsystems darstellt (Kim et al., 2016).

Die bereits erwähnten drei Punktmutationen von NLRP1 befinden sich in der Domäne PYD. Diese Domäne besitzt eine autoregulierende Funktion und bremst in der Regel die Selbst-Oligomerisation des Proteins. Im mutierten Zustand sinkt der Schwellenwert der Auto-Inhibition und es werden vermehrt Inflammasome gebildet („Gain-of-function“-Mutation) (Zhong et al., 2016). Dadurch findet eine erhöhte Entzündungsaktivität statt, die zur Hyperplasie der Haut führt. Im Zuge dieser Untersuchung wurde die Sequenz des entsprechenden Genabschnitts (NLRP1, Exon 1) von insgesamt 32 Gewebeproben (17 KA und 15 PEK) analysiert und keine Mutation nachgewiesen werden.

Das Ergebnis dieser Arbeit ergab keinen Hinweis auf einen Unterschied zwischen den beiden Hauttumoren, dem spontanen KA und dem „klassischen“ PEK. Die Sequenzanalysen des oben genannten Abschnitts aller Proben waren identisch, sodass das spontane KA anhand der Analysen nicht von einem „klassischen“ PEK zu differenzieren ist.

Das spontane KA, welches als niedrig-malignes PEK definiert wird (Nobeyama and Nakagawa, 2016), unterscheidet sich jedoch auf molekularer Ebene von dem Syndrom-assoziierten bzw. MSPC-assoziierten KA. Ebenso spricht die Lokalisation für zwei verschiedene Entitäten: Das spontane/solitäre KA entsteht vorwiegend auf sonnenexponierten Arealen (Takai, 2017), das MSPC-assoziierte KA kommt hauptsächlich an Hand- und Fußflächen vor (Mamai et al., 2015). Daher ist das spontan auftretende KA, welches bis heute makroskopisch und histologisch schwer von einem „klassischen“ PEK abzugrenzen ist und eine rein klinische Diagnose darstellt, vermutlich vom Syndrom-assoziierten zu differenzieren. Ferner wäre es möglich, dass eine entsprechende Mutation beim spontanen KA in einem anderen Abschnitt des NLRP1-Gens liegt (außerhalb von Exon 1). Es könnte folglich die

Sequenzierungsanalyse auf einen weiteren bzw. benachbarten Genabschnitt erweitert werden, wie etwa auf die vierte Mutation (p.F787 R843del FKLC-EG-1), welche ebenfalls in der Arbeit von Zhong und Kollegen beschrieben wird.

Diese Mutation (in Exon 5, LRR-Domäne) ist mit einem Syndrom assoziiert, welches mit multiplen KA einhergeht, dem sogenannten FKLC-Syndrom (Zhong et al., 2016).

Die kontroversen Effekte der Immuntherapie zeigen wie komplex die Rolle des Immunsystems bei der Karzinogenese ist und wie individuell die Tumore selbst sind. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass die Mutationen im NLRP1-Gen die Ausbildung der Hautläsionen zum einen begünstigen, aber unter bestimmten Umständen auch wieder zur Regression bzw. zur Remission führen. Da die Tumorentwicklung nicht nur abhängig vom Tumor selbst ist, sondern auch von dessen Mikroumgebung, müsste diese zusätzlich näher untersucht werden. Interessant wäre außerdem, ob die betroffenen MSPC-Patienten weitere Infektionen im Körper tragen, wie zum Beispiel Listerien, welche nachweislich die Immunreaktion bei Tumorerkrankungen modulieren (Dajon et al., 2017). Allgemein ist festzustellen, dass eine Stimulierung des Immunsystems vorwiegend einen positiven Effekt auf die Tumorregression hat. Trotzdem ist zu beachten, dass eine Stimulierung des Immunsystems unter einigen genannten Umständen, über bestimmte Zytokine beim entsprechenden Tumor, zum Tumorwachstum führen kann (pro-tumorale Wirkung). Auf der einen Seite schafft es der Körper bzw. das Immunsystem von MSPC-Betroffenen nicht, die Tumorzellen rechtzeitig zu erkennen und zu eliminieren, sodass multiple KA/PEK entstehen. Auf der anderen Seite gehen einige der Tumore spontan in Regression über. Es scheint, als ob die Mutationen im NLRP-1-Gen sowohl die Progression, als auch die Regression des Tumors verantworten und begünstigen. Die Funktion des NLRP1-Proteins zeigt demnach eine ähnlich kontroverse Wirkung bei der Tumorgenese wie TLRs (Dajon et al., 2017).

Aus dem Ergebnis dieser Arbeit geht hervor, dass innerhalb der untersuchten Hautläsionen (spontane KA/PEK und MSPC-assoziierte KA/PEK) unterschiedliche Entitäten bestehen. Dies spielt eine wichtige Rolle in der Erforschung neuer Therapieansätze.

7. Zusammenfassung

Das kutane Plattenepithelkarzinom (PEK) gehört zum „weißen Hautkrebs“ und stellt die zweitgrößte Gruppe aller malignen Hauttumore dar (Moll et al., 2016). Das Keratoakanthom (KA) entspricht nach heutigem Stand einem niedrigmalignen PEK und unterscheidet sich vom PEK durch die Fähigkeit der spontanen Remission (Takai, 2017).

Bei dem Krankheitsbild des MSPC-Syndroms treten multiple KA auf, die teils in Regression übergehen und teilweise entarten. Dieses Syndrom wurde erstmals im Jahr 2014 von Mamai und Kollegen beschrieben (Mamai et al., 2015). Es zeigt neben den klinischen Symptomen der genannten Hautveränderungen eine hohe Inzidenz von Mutationen im sogenannten NLRP1-Gen. Das entsprechende NLRP1-Protein ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems und befindet sich hauptsächlich in der Haut (Zhong et al., 2016). Es besitzt, wie einige andere NLRP-Proteine, die Fähigkeit, Inflammasome zu bilden, und dient somit dem Prozess der Entzündungsreaktion (Drexler and Yazdi, 2013).

Beim Syndrom des MSPC wurden folgende drei Punktmutationen auf Chromosom 17 beschrieben (sogenannte „Gain-of-function“-Mutation):

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Hauttumore PEK und KA, welche unabhängig vom genannten MSPC-Syndrom auftreten, auf Mutationen im NLRP1-Gen zu untersuchen. So sollte überprüft werden, ob NLRP1 Mutationen für die Regression der KA kausal verantwortlich sind.

Daher wurden von 32 Gewebeproben (17 KA und 15 PEK) von Probanden ohne MSPC Paraffinschnitte zur Mutationsanalyse erstellt. Das Tumorgewebe wurde identifiziert und die DNA aus dem Tumorgewebe extrahiert. Diese wurde mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde das Amplifikationsprodukt aufgereinigt und sequenziert.

Bei der Sequenzierung der 32 Proben zeigte sich keine Mutation im NLRP1-Gen, weder in spontanen KA, noch in „klassischen“ PEK. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass speziell syndromassoziierte KA Mutationen im NLRP1-Gen aufzeigen und auf molekularer Ebene von spontanen KA, welche dem niedrigmalignen PEK zugeordnet werden, zu differenzieren sind. Das syndromassoziierte KA könnte somit eine eigenständige Entität darstellen.

8. Literatur

- Abikhair, M.; Mitsui, H.; Yanofsky, V.; Roudiani, N.; Ovits, C.; Bryan, T.; Oberyszyn, T. M.; Tober, K. L.; Gonzalez, J.; Krueger, J. G.; Felsen, D.; Carucci, J. A. (2016). Cyclosporine a immunosuppression drives catastrophic squamous cell carcinoma through IL-22. *JCI Insight*, 1, e86434.
- Arron, S. T.; Jennings, L.; Nindl, I.; Rosl, F.; Bouwes Bavinck, J. N.; Seckin, D.; Trakatelli, M.; Murphy, G. M.; Viral Working Group Of The International Transplant Skin Cancer Collaborative and Skin Care In Organ Transplant Patients, Europe (2011). Viral oncogenesis and its role in nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, 164, 1201-13.
- 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. E., T.; Bootz, F.; Hauschild, A.; Kortmann, R.-D.; Wolff, K.; Stockfleth, E.; Szeimies, R.-M.; Rompel, R.; Tischendorf, L.; Becker, J. C.; Löser, C.; Vordermark, D.; Pistner, H.; Garbe, C.; Grabbe, S. 2013. Kurzleitlinie - Plattenepithelkarzinom der Haut Update (2012). AWMF, online unter: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-022l_S2k_Plattenepithelkarzinom_2013-verlaengert (abgerufen am 09.02.2018).
- Butcher, R. B., 2nd (1979). Malignant potential of keratoacanthoma. *Laryngoscope*, 89, 1092-8.
- Dajon, M.; Iribarren, K. ; Cremer, I. (2017). Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology*, 222, 89-100.
- Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., Awmf: S3-Leitlinie , AWMF (2014). Online unter: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032052OLI_Prävention_von_Hautkrebs_2014-04 (abgerufen am: 04.02.2018). S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs; Leitlinienprogramm Onkologie, Prävention von Hautkrebs. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e. V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe e. V. (DKH).
- Dogra, S.; Vinay, K.; Saikia, U. N.; De, D.; Handa, S. (2017). Multiple keratoacanthoma centrifugum marginatum in a young boy, and review of the literature. *Clin Exp Dermatol*.
- Drexler, S. K.; Yazdi, A. S. (2013). Complex roles of inflammasomes in carcinogenesis. *Cancer J*, 19, 468-72.

- Farasat, S., Yu, S. S., Neel, V. A., Nehal, K. S., Lardaro, T., Mihm, M. C., Byrd, D. R., Balch, C. M., Califano, J. A., Chuang, A. Y., Sharfman, W. H., Shah, J. P., Nghiem, P., Otley, C. C., Tufaro, A. P., Johnson, T. M., Sober, A. J.; Liegeois, N. J. (2011). A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: creation and rationale for inclusion of tumor (T) characteristics. *J Am Acad Dermatol*, 64, 1051-9.
- Fernandez Figueras, M. T. (2017). From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: pathophysiology revisited. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 31 Suppl 2, 5-7.
- Franchi, L.; Warner, N.; Viani, K.; Nunez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*, 227, 106-28.
- Freites-Martinez, A.; Kwong, B. Y.; Rieger, K. E.; Coit, D. G.; Colevas, A. D.; Lacouture, M. E. (2017). Eruptive Keratoacanthomas Associated With Pembrolizumab Therapy. *JAMA Dermatol*, 153, 694-697.
- Friedl, T. K.; Flaig, M. J.; Ruzicka, T.; Rupec, R. A. (2011). [Verrucous squamous cell carcinoma complicating hypertrophic lichen planus. Three case reports and review of the literature]. *Hautarzt*, 62, 40-5.
- Gadkaree, S. K.; Fu, J.; Sen, R.; Korrer, M. J.; Allen, C.; Kim, Y. J. (2017). Induction of tumor regression by intratumoral STING agonists combined with anti-programmed death-L1 blocking antibody in a preclinical squamous cell carcinoma model. *Head Neck*, 39, 1086-1094.
- Grandemange, S.; Sanchez, E.; Louis-Plence, P.; Tran Mau-Them, F.; Bessis, D.; Coubes, C.; Frouin, E.; Seyger, M.; Girard, M.; Puechberty, J.; Costes, V.; Rodiere, M.; Carbasse, A.; Jeziorski, E.; Portales, P.; Sarrabay, G.; Mondain, M.; Jorgensen, C.; Apparailly, F.; Hoppenreijts, E.; Touitou, I.; Genevieve, D. (2016). A new autoinflammatory and autoimmune syndrome associated with NLRP1 mutations: NAIAD (NLRP1-associated autoinflammation with arthritis and dyskeratosis). *Ann Rheum Dis*.
- Hoesel, B.; Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*, 12, 86.
- Kersse, K.; Bertrand, M. J.; Lamkanfi, M.; Vandenabeele, P. (2011). NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22, 257-76.
- Kim, Y. K.; Shin, J. S.; Nahm, M. H. (2016). NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*, 57, 5-14.

- 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.
- Lin, C.; Zhang, J. (2017). Inflammasomes in Inflammation-Induced Cancer.
Front Immunol, 8, 271.
- Lv, R.; Sun, Q. (2017). A Network Meta-analysis of Non-melanoma Skin
Cancer (NMSC) Treatments: Efficacy and Safety Assessment. *J Cell
Biochem*.
- Makris, G. M.; Poulakaki, N.; Papanota, A. M.; Kotsifa, E.; Sergentanis, T. N.;
Psaltopoulou, T. (2017). Vulvar, Perianal and Perineal Cancer After
Hidradenitis Suppurativa: A Systematic Review and Pooled Analysis.
Dermatol Surg, 43, 107-115.
- Mamai, O.; Boussofara, L.; Denguezli, M.; Escande-Beillard, N.; Kraeim, W.;
Merriman, B.; Ben Charfeddine, I.; Stevanin, G.; Bouraoui, S.; Amara, A.;
Mili, A.; Nourira, R.; H'mida, D.; Sriha, B.; Gribaa, M.; Saad, A.;
Reversade, B. (2015). Multiple self-healing palmoplantar carcinoma: a
familial predisposition to skin cancer with primary palmoplantar and
conjunctival lesions. *J Invest Dermatol*, 135, 304-8.
- Mariathanan, S.; Weiss, D. S.; Newton, K.; McBride, J.; O'rourke, K.; Roose-
Girma, M.; Lee, W. P.; Weinrauch, Y.; Monack, D. M.; Dixit, V. M. (2006).
Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP.
Nature, 440, 228-32.
- Mayo, E.; Sharma, S.; Horne, J.; Yuen, H. M.; Lee, A.; Gulati, A. (2017).
Squamous cell carcinoma of the pinna: which histological features could
be used to predict prognosis? *Br J Oral Maxillofac Surg*.
- 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.
- Meves, A.; Albrecht, J. (2006). *Intensivkurs Dermatologie : mit ... 153 Tab*,
München; Jena, Elsevier, Urban & Fischer.
- Misago, N.; Ansai, S. I.; Fukumoto, T.; Anan, T.; Nakao, T. (2017).
Keratoacanthoma en plaque/nodule: A brief report of the
clinicopathological features of five cases. *J Dermatol*.
- Moll, I.; Augustin, M.; Jung, E. G. (2016). *Dermatologie, Duale Reihe; 8. Auflage*,
S. 15-340; Stuttgart, Thieme.

- Netter, F. H.; Technau, K. (2009). *Netters Dermatologie*, 2. Auflage, S 1-388; Stuttgart, Thieme.
- NG_011651.1, N. R. S. (2018). Homo sapiens NLR family pyrin domain containing 1 (NLRP1), RefSeqGene on chromosome 17.
- Nobeyama, Y.; Nakagawa, H. (2016). Aberrant DNA Methylation in Keratoacanthoma. *PLoS One*, 11, e0165370.
- Ravnbak, M. H. (2010). Objective determination of Fitzpatrick skin type. *Dan Med Bull*, 57, B4153.
- Robert Koch-Institut, G. D. E. K. I. D. E. V. (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012. Zentrum für Krebsregisterdaten*, 10. Ausgabe ed. Berlin.
- Röcken, M. S., Martin; Sattler, Elke; Burgdorf, Walter (2010). *Taschenatlas Dermatologie : Grundlagen, Diagnostik, Klinik*, 1. Auflage, S. 2-262; Stuttgart; New York, Thieme.
- Salazar, L. G.; Lu, H.; Reichow, J. L.; Childs, J. S.; Coveler, A. L.; Higgins, D. M.; Waisman, J.; Allison, K. H.; Dang, Y.; Disis, M. L. (2017). Topical Imiquimod Plus Nab-paclitaxel for Breast Cancer Cutaneous Metastases: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 3, 969-973.
- Sanders, G. H.; Miller, T. A. (1982). Are keratoacanthomas really squamous cell carcinomas? *Ann Plast Surg*, 9, 306-9.
- Sanlorenzo, M.; Vujic, I.; Posch, C.; Dajee, A.; Yen, A.; Kim, S.; Ashworth, M.; Rosenblum, M. D.; Algazi, A.; Osella-Abate, S.; Quaglino, P.; Daud, A.; Ortiz-Urda, S. (2014). Melanoma immunotherapy. *Cancer Biol Ther*, 15, 665-74.
- Santana, A. L.; Felsen, D.; Carucci, J. A. (2017). Interleukin-22 and Cyclosporine in Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Dermatol Clin*, 35, 73-84.
- Shim, T. W.; Naidu, S.; Lim, J.; Lim, T. C. (2008). Common benign and malignant neoplasms of the skin. *Singapore Med J*, 49, 6-17; quiz 18.
- Spiker, A. & Ramsey, M. (2017). Gorlin Syndrome (Basal Cell Nevus). *StatPearls*.
- Takai, T. (2017). Advances in histopathological diagnosis of keratoacanthoma. *J Dermatol*, 44, 304-314.
- Thompson, M. R.; Kaminski, J. J.; Kurt-Jones, E. A.; Fitzgerald, K. A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*, 3, 920-40.

- Veness, M. J. (2008). Time to rethink TNM staging in cutaneous SCC. *Lancet Oncol*, 9, 702-3.
- Yazdi, A. S.; Drexler, S. K. (2015). The two faces of the inflammasome adaptor ASC in epithelial skin carcinogenesis. *Clin Exp Rheumatol*, 33, S94-6.
- Yazdi, A. S.; Rocken, M.; Ghoreschi, K. (2016). Cutaneous immunology: basics and new concepts. *Semin Immunopathol*, 38, 3-10.
- Yu, S. H.; Bordeaux, J. S.; Baron, E. D. (2014). The immune system and skin cancer. *Adv Exp Med Biol*, 810, 182-91.
- Zhong, F. L.; Mamai, O.; Sborgi, L.; Boussofara, L.; Hopkins, R.; Robinson, K.; Szeverenyi, I.; Takeichi, T.; Balaji, R.; Lau, A.; Tye, H.; Roy, K.; Bonnard, C.; Ahl, P. J.; Jones, L. A.; Baker, P.; Lacina, L.; Otsuka, A.; Fournie, P. R.; Malecaze, F.; Lane, E. B.; Akiyama, M.; Kabashima, K.; Connolly, J. E.; Masters, S. L.; Soler, V. J.; Omar, S. S.; Mcgrath, J. A.; Nedelcu, R.; Gribaa, M.; Denguezli, M.; Saad, A.; Hiller, S.; Reversade, B. (2016). Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell*, 167, 187-202 e17.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Erklärung zum Eigenanteil an der Dissertationsschrift von:

Frau Stefanie Frese

geb. am 15.09.1987 in Homberg/Efze,

zum Thema: Prävalenz von Mutationen im Exon 1 des NLRP1-Gens bei Keratoakanthomen und Plattenepithelkarzinomen.

Herr Professor Dr. med. Amir Yazdi hat die Studie konzipiert. Er hat zusammen mit Dr. rer. nat. Marc Burian die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Die Daten und das histologische Gewebe wurden von der Universitäts-Hautklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Daten-Recherche und Archivarbeit wurde von Frau Stefanie Frese erbracht.

Die Sequenzierung der Proben wurde durch die Firma Eurofins Genomics durchgeführt. Die Interpretation der Sequenzen erfolgte durch Herrn Professor Amir Yazdi und Frau Stefanie Frese.

Tumorgewebe auf den HE-Schnittpräparaten wurde von Herrn Professor Amir Yazdi markiert.

Alle weiteren Versuche dieser Arbeit wurden von Frau Stefanie Frese eigenständig durchgeführt und ausgewertet.

Frau Stefanie Frese hat das Manuskript selbstständig verfasst.

Datum und Unterschrift der Antragstellerin:

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Amir Yazdi, der mir während der praktischen Tätigkeit, der Analyse und während des schriftlichen Teils der Arbeit stets zur Seite stand und mich geduldig beraten, angeleitet und motiviert hat.

Mein Dank gilt auch meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Marc Burian und der Arbeitsgruppe mit Nikola Smatlik, Stefanie Müller und Ramona Stach für die fachliche Unterstützung.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen der Universitäts-Hautklinik Tübingen möchte ich ebenso für ihre tatkräftige Hilfe danken.

Vielen Dank an Frau Julia Holzer für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft.

Und ein großes Dankeschön an meine Familie & Freunde Lore, Philipp, Lisa, Karsten und Jule, Helle, Christiane und Annika für ihre liebevolle Unterstützung und Ermutigung während der Dissertation, während des Studiums und darüber hinaus.