

UniversitätsSpital Zürich
Dermatologische Klinik
Direktor: Prof. Dr. med. Lars French

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. Günther Hofbauer

Potenzielle Schmerzmediatoren in spinozellulären Karzinomen der Haut von organtransplantierten Patienten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Sara Regina Frauenfelder

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. Lars French
Zürich 2017

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Abkürzungsverzeichnis	5
3. Einleitung	7
4. Material und Methodik	9
4.1. Ethikantrag	9
4.2. Studiendesign	9
4.3. Gewebeproben	9
4.4. mRNA-Isolation aus FFPE Proben und cDNA-Synthese	10
4.5. Quantitative PCR	10
4.6. Statistik	11
5. Resultate	12
5.1 Basischarakteristika	12
5.2 Resultate der quantitativen PCR	13
6. Diskussion	17
7. Literaturverzeichnis	20
8. Danksagung	25
9. Curriculum vitae	26

1. Zusammenfassung

In der 2014 publizierte SCOPE ITSCC PAIN Studie wurde Schmerz als klinischer Prädiktor spinocellulärer Karzinome (squamous cell carcinoma, SCC) in Empfängern solider Organtransplantate (organ transplant recipients, OTR) identifiziert. Das SCC gehört zur Gruppe der weissen Hautkrebsarten und ist im Unterschied zum Basalzellkarzinom (basal cell carcinoma, BCC) mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko assoziiert. Zudem ist es die häufigste Krebsform in OTR. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die möglichen Mediatoren dieser Schmerzwahrnehmung zu finden.

Um potentielle Schmerzmediatoren in SCC von OTR aufzudecken, habe ich mittels einer Literaturrecherche sechs Kandidaten, welche für ihre Beteiligung in Inflamationsprozessen oder in der Schmerzwahrnehmung der Haut bekannt sind, ausgesucht. Namentlich sind dies Prostaglandin E₂ (PGE₂), Proopiomelanocortin (POMC), Tumor necrosis factor α (TNF α), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Nerve growth factor (NGF). Aus den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben der SCOPE ITSCC PAIN Studie habe ich mRNA von schmerzhaften und nicht schmerzhaften SCC isoliert und mittels quantitativer PCR analysiert.

Es wurden 34 SCC von OTR getestet, achtzehn Proben aus schmerzhaften SCC und sechzehn Proben aus SCC ohne Schmerz. Multivariable Analysen assoziierten schmerzhaftes SCC Proben mit einer erhöhten Expression von PGE₂ (odds ratio (OR) adjustiert für Alter und Geschlecht 1.9; 95% CI 1.1 bis 3.4; p < 0.05), POMC (OR adjustiert 1.5; 95% CI: 1.1 bis 2.2; p < 0.05) und TNF α (OR adjustiert 1.4, 95%

CI: 0.99 bis 2.0, $p = 0.054$). Die weiteren Kandidaten CGRP (OR adjustiert 1.6; 95% CI: 0.96 bis 2.6; $p > 0.05$), IL-1 β (OR adjustiert 1.4; 95% CI: 0.96 bis 2.0; $p > 0.05$) und NGF (OR adjustiert 0.88; 95% CI: 0.65 bis 1.2; $p > 0.05$) zeigten keine Unterschiede in der mRNA – Expression zwischen schmerzhaften SCC und SCC ohne Schmerz. Nachdem frühere Studien diese und weitere Mediatoren als Schmerzvermittler generell identifiziert hatten, deuten meine Daten, basierend auf der lokalen Mikroumgebung des Tumors, neu auf eine wahrscheinliche Rolle dieser drei Mediatoren PGE 2, POMC und TNF α in der Schmerzwahrnehmung bei SCC hin und könnten somit die hohe Treffsicherheit in der klinischen Einschätzung eines Hauttumors als SCC basierend auf der wahrgenommenen Schmerzhaftigkeit erklären.

2. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
BCC	basal cell carcinoma, Basalzellkarzinom
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CI	Konfidenzintervall
COX – 2	Cyclooxygenase – 2
CRH	Corticotropin–releasing Hormone
CRP	C–reaktives Protein
C _T	threshold cycle (Beginn der exponentiellen Amplifikation bei PCR)
DOR	δ - Opioid Rezeptor
FFPE	Formalin–fixed and paraffin–embedded tissue
HPA	hypothalamic–pituitary–adrenal, Hypothalamus–Hypophysen– Nebennierenrindenachse
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
LPH	Lipotrophin
MSH	Melanotropin
NGF	Neural growth factor
NMSC	Non-melanoma skin cancer, weisser Hautkrebs
OR	Odds ratio
OTR	organ transplant recipients, Empfänger solider Organtransplantate
PCR	Polymerase–Kettenreaktion
PGE 2	Prostaglandin E 2
POMC	Proopiomelanocortin

SCC	squamous cell carcinoma, spinozelluläres Karzinom
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TNFR2	TNF Rezeptor 2
TNF α	Tumor necrosis factor α

3. Einleitung

Weisser Hautkrebs, oder Non-Melanoma Skincancer (NMSC), ist die häufigste Krebsart des Menschen ¹. In der immunkompetenten Population ist das Basalzellkarzinom (basal cell carcinoma, BCC) die häufigste Krebsform, während das spinozelluläre Karzinom (squamous cell carcinoma, SCC) der häufigste Krebs in Empfängern solider Organtransplantate (organ transplant recipients, OTR) ist ²⁻⁴. SCC tragen ein Metastasierungsrisiko in Relation zu ihrem Oberflächendurchmesser, ihrer Dicke, ihrer Lokalisation und ihrem Differenzierungsgrad ⁵, wogegen BCC selten metastasieren. Schmerz ist ein weit verbreitetes Symptom in NMSC ^{6,7}. Besonders SCC sind assoziiert mit spontan ausgelöstem Schmerz oder Schmerzempfindung auf Druck oder Berührung. Der Zusammenhang zwischen NMSC und Schmerzsymptomen wurde sowohl im Allgemeinen als auch speziell bei OTR berichtet ^{6,8}. In der 2014 veröffentlichten PAIN Study zeigte sich, dass Schmerz als Symptom in der Hochrisikopopulation von organtransplantierten Patienten die histologische Diagnose eines spinozellulären Karzinoms in 75% der Biopsien prognostiziert. Zusätzlich konnten spinozelluläre Karzinome durch das Symptom Schmerz klar von anderen Hautläsionen wie dem Basalzellkarzinom, der seborrhoischen Keratose, von Morbus Bowen und der aktinischen Keratose separiert werden ⁸. Die Schmerzintensität in SCC korreliert mit der Invasionstiefe und einem höheren Inflammationsgrad ⁹.

Schmerz im Zusammenhang mit Hautkrebs kann mit diversen Ursachen oder Faktoren assoziiert sein. Meist wird dieser Schmerz mit perineuraler Invasion assoziiert, und es wird angenommen, dass er durch direkte Infiltration des neuralen Gewebes durch die malignen Zellen entsteht ¹⁰⁻¹². Allerdings wird auch bei Karzinomen ohne beobachtbare perineurale Infiltration von Schmerzempfindung berichtet ¹². Im Falle

des SCC wissen wir, dass Schmerz und Druckempfindlichkeit möglicherweise ohne perineurale Infiltration vorhanden ist ^{8,9}. Eine Hypothese besagt, dass die Schmerzempfindung in SCC ohne perineurale Infiltration durch inflammatorische Prozesse verursacht wird. Endogener Tumor necrosis factor α (TNF α) wird als Schlüsselmediator in Karzinom – assoziierter Hyperalgesie und Schmerzwahrnehmung angenommen ¹³. Ausserdem sind die Serumspiegel von Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und TNF α höher in Patienten mit SCC als in der Kontrollgruppe ¹⁴. Zusätzliche Daten wurden publiziert, die Tumorschmerz deutlich von inflammatorischem Schmerz unterscheiden ¹². Cannabinoid-Agonisten können Tumorschmerzen effizient reduzieren ¹². In einem SCC – Mausmodell wurden durch die Blockade des Neural growth factors (NGF) mit anti-NGF das Tumolvolumen in vivo sowie die Plasmaspiegel von TNF α und IL-6 reduziert ¹⁵.

Bereits in meiner Masterarbeit “Schmerz als Marker von spinozellulären Karzinomen” untersuchte ich den Schmerz in SCC mittels Immunhistochemiefärbungen an Formalin – fixierten und Paraffin – eingebetteten (FFPE) Schnitten¹⁶. Es zeigte sich allerdings, dass die Methode der Immunhistochemie für diese Fragestellung nicht geeignet war. Das Ziel meiner Doktorarbeit war nun, potentielle Schmerzmediatoren in SCC zu identifizieren um den Mechanismus der SCC – assoziierten Schmerzen besser verstehen zu können. Dazu untersuchte ich mögliche Mediatoren, die ich aufgrund ihres bekannten Vorkommens in entzündlichen Mechanismen oder in der Schmerzwahrnehmung der Haut gewählt habe, mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – Analysen. Die analysierten spinozellulären Karzinome der Haut stammen aus dem Pool der gesammelten Proben für die SCOPE ITSCC PAIN Studie ⁸. Die Resultate dieser Dissertation wurden im Dezember 2016 als Research Letter im Journal of the American Medical Association - Dermatology publiziert ¹⁷.

4. Material und Methodik

4.1. Ethikantrag

Die Verwendung der in den pathologischen Laboratorien aufbewahrten Hautproben wurde durch die kantonale Ethikkommission Zürich (EK549) bewilligt. Die Einwilligungen nach erfolgter Aufklärung zur Verwendung persönlicher Daten wurden von den Patienten sowohl mündlich als auch schriftlich eingeholt.

4.2. Studiendesign

Die prospektive PAIN Kohortenstudie wurde in 2 Schritten durchgeführt. Zwischen Juli 2008 und Dezember 2009 wurden die Hautproben im Rahmen der SCOPE ITSCC PAIN Studie ⁸ gesammelt. Alle Diagnosen der Hautproben wurden durch anerkannte Dermatohistopathologen bestätigt. Von Januar 2013 bis April 2014 habe ich die FFPE – Proben wie unten beschrieben mittels PCR – Analysen ausgewertet. Um mögliche Zielstrukturen der Schmerzwahrnehmung in SCC der Haut zu identifizieren führte ich zuvor eine Literaturrecherche in Pubmed durch. Die potentiellen Ziele habe ich mit wissenschaftlichen Experten der Schmerzwahrnehmung diskutiert. Dadurch zeigten sich sechs Gene als geeignete Zielobjekte, welche möglicherweise diesen Schmerz leiten können.

4.3. Gewebeproben

Die SCC Gewebeproben stammen aus den Archiven der pathologischen Laboratorien des Universitätsspitals Zürich und des University Medical Center of Leiden. Die Proben wurden durch die Laboranten in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschliessend wurden pro Tumorprobe vier 40µm – Schnitte zur Analyse verwendet. Zur histologischen Identifizierung des Tumors und des peritumoralen Gewebes wur-

de ein 4µm – Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Das Gewebe habe ich mittels Nadel-Mikrodissektion der 40µm – Schnitte für die Genexpressionsanalyse gesammelt.

4.4. mRNA-Isolation aus FFPE Proben und cDNA-Synthese

Die Hautproben habe ich nach Anleitung des miRNeasy – Herstellers durch Erhitzen deparaffinisiert (Qiagen, 09/2010, catalogue no. 217504). Zur mRNA-Isolation aus den Gewebeproben verwendete ich das miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, 09/2010, catalogue no. 217504), zur reversen Transkription der mRNA in cDNA das GoScript™ Reverse Transcription System gemäss dem Protokoll des Herstellers (A5000, Promega). Für jede Reaktion habe ich auf diese Weise 500ng cDNA vorbereitet.

4.5. Quantitative PCR

Für die quantitative PCR habe ich den Master Mix FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, 04913914001) verwendet. Alle Primer wurden von Microsynth bezogen: *36B4* fwd: 5'-GCA ATG TTG CCA GTG TCT GT-3', *36B4* rev: 5'-GCC TTG ACC TTT TCA GCA AG-3'; *TNFα* fwd: 5'-CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT-3', *TNFα* rev: 5'-AAA GTA GAC CTG CCC AGA CTC G-3'; *IL-1β* fwd: 5'-TCC AGG GAC AGG ATA TGG AG-5', *IL-1β* rev: 5'-TCT TTC AAC ACG CAG GAC AG-3'; *CGRP* fwd: 5'-AGG GCT CCA GAA TCA TTG-3', *CGRP* rev: 5'-GAC CTT CTT GAG TCA TTC AG-3'; *POMC* fwd: 5'-CTC CCG AGA CAG AGC CTC-3', *POMC* rev: 5' CTG ACA CTG GCT GCT C-3'; *NGF* fwd: 5' ACA CTG AGG TGC ATA GCG TA 3', *NGF* rev: 5' TTT AGT CCA GTG GGC TTG GG-3'; *PGE2* fwd: 5' ATC AAG ATG TAC GTG GTG GC 3'; *PGE2* rev: 5' GAG CTG GGC CAG GGT GTA GG 3'. Die Daten wurden zum housekeeping gene *36B4* normalisiert, als interne Kontrolle. Eine Amplifikation unter einer Zykluszahl von 45 habe ich als negativ interpretiert.

4.6. Statistik

Um das primäre Ziel dieser Studie, die Beurteilung des Zusammenhangs zwischen der Expression potentieller Schmerzmediatoren und der Wahrnehmung von Schmerz, zu erreichen, wurde eine Kohortenstudie durchgeführt und standardisierte Daten zu demographischen Basischarakteristika und medizinischen Risikofaktoren gesammelt. Genexpressionslevels der PCR-Analysen sind durch Cycling – Time Werte (CT, housekeeping gene *36B4* minus target gene) quantifiziert. Die statistischen Auswertungen wurden von Prof. Dr. Andreas Serra durchgeführt.

Er verwendete ANOVA, korrigiert für multiples Testing, um Genexpressionslevels in Gewebeproben von schmerzhaften versus nicht schmerzhaften Tumoren zu vergleichen und Pearson's χ^2 – Test für den Vergleich kategorialer Variablen. Ebenfalls wurde eine univariate Analyse zur Identifikation schmerz-assoziiierter Faktoren durchgeführt. Basierend auf bestehender wissenschaftlicher Evidenz über Risikofaktoren von weissem Hautkrebs und medizinischen Erfahrungen wurden diese Risikofaktoren gewählt. Zudem wurden Kovariaten im multivariablen logistischen Regressionsmodell durchgeführt um mögliche Confounder zu kontrollieren. Zweiseitige p-Werte sind aufgeführt für die statistischen Tests. Für alle Analysen wurde von Prof. Dr. Andreas Serra die SAS Software (Version 9.4, SAS Institute, Cary, North Carolina) verwendet.

5. Resultate

5.1 Basischarakteristika

Aus der SCOPE ITSCC SCC PAIN study⁸ konnte ich 34 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete SCC Biopsien aus Zürich und Leiden verwenden. Die Basischarakteristika der Patienten zeigt Tabelle 1: Achtzehn SCC sind assoziiert mit Schmerz und sechzehn nicht. In beiden Gruppen ist das mediane Alter 62 Jahre mit einem medianen Tumordurchmesser von 11mm.

	Alle Patienten	Ohne Schmerz	Mit Schmerz
Anzahl Patienten	34	16	18
Geschlecht: n (%)			
Frauen	9 (26)	4 (25)	5 (28)
Männer	25 (74)	12 (75)	13 (72)
Alter: Jahre (25%; Median; 75%)	54; 62; 69	57; 65; 70	54; 59; 65
Transplantationsorgan: n (%)			
Niere	27 (79)	12 (75)	15 (83)
Herz	3 (9)	2 (13)	1 (6)
Leber	2 (6)	2 (13)	0 (0)
Lunge	2 (6)	0 (0)	2 (11)
Zeit seit der Transplantation: Jahre (25%; Median; 75%)	12; 25; 30	22; 30; 33	11; 18; 23
SCC Lokalisation: n (%)			
Kopf	8 (24)	4 (25)	4 (22)
Rumpf	5 (15)	3 (19)	2 (11)
Obere Extremität	14 (41)	6 (38)	8 (44)
Untere Extremität	7 (21)	3 (19)	4 (22)
SCC Durchmesser: mm (25%; Median; 75%)	7; 11; 12	5; 10; 12	9; 12; 12
SCC Dicke (Breslow): mm (25%; Median; 75%)	1; 2; 4	1; 2; 4	1; 3; 4
SCC Differenzierungsgrad: n (%)			
Hoch	29 (85)	13 (81)	16 (89)
Mässig	5 (15)	3 (19)	2 (11)
Wenig	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SCC Exzision: n (%)			
Kurettage	17 (50)	7 (44)	10 (56)

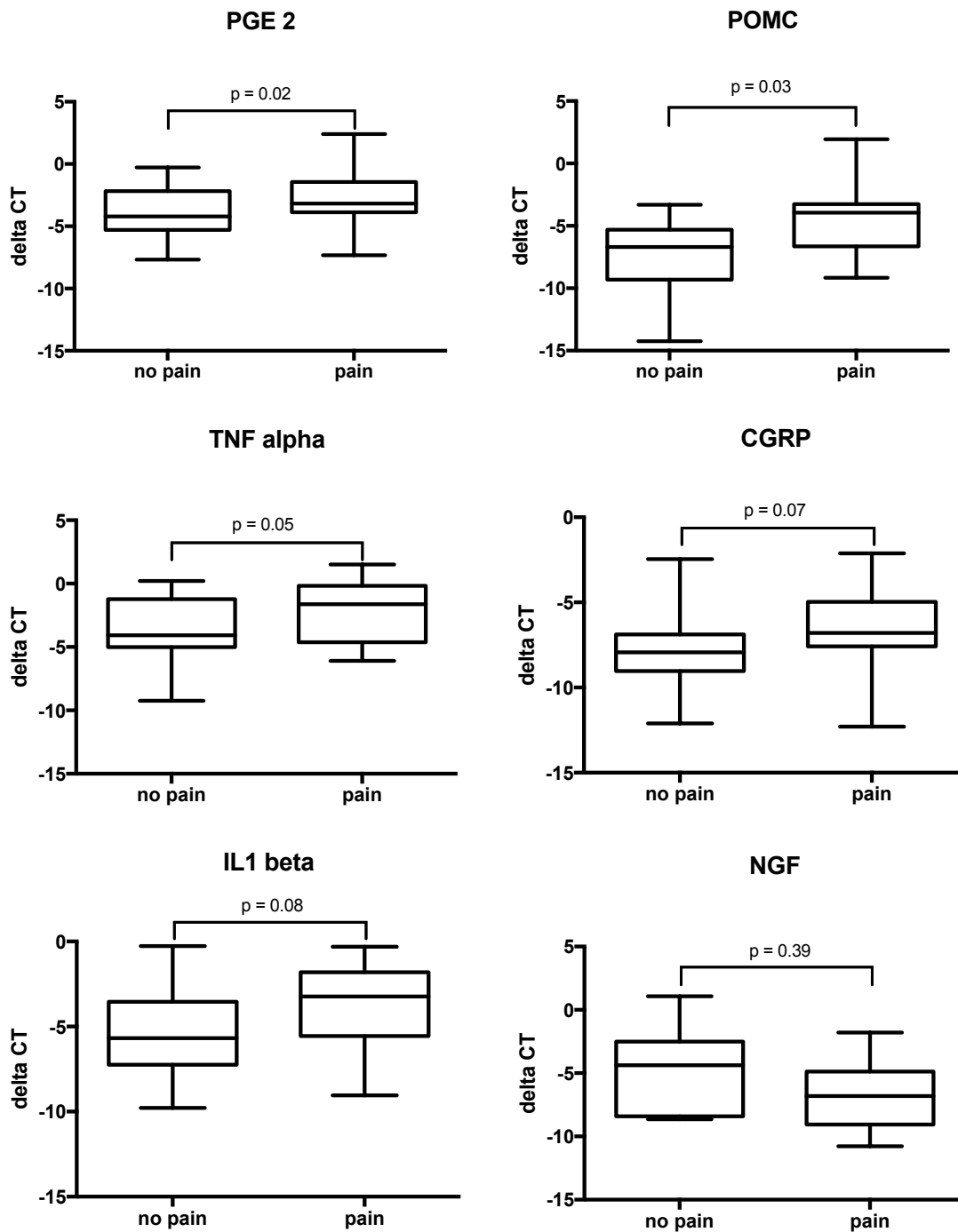
Exzision	17 (50)	9 (56)	8 (44)
Visuelle Analogskala des Tumorschmerzes ¹ : n (%)			
0	16 (47)	16 (100)	0 (0)
1-3	10 (29)	0 (0)	10 (56)
4-6	7 (21)	0 (0)	7 (39)
7-10	1 (3)	0 (0)	1 (6)

¹Die Schmerzintensität wurde durch die Patienten auf einer visuellen Analogskala von 0 entsprechend keinem Schmerz bis 10 entsprechend einem maximal vorstellbarem Schmerz bewertet.

Tabelle 1: Basischarakteristika der organtransplantierten Patienten (OTR) mit spinozellulärem Karzinom der Haut (squamous cell carcinoma, SCC) entsprechend der Präsenz von lokalem Schmerz.

5.2 Resultate der quantitativen PCR

Basierend auf einer Literaturrecherche und einer Expertenbefragung habe ich sechs zu untersuchende Gene ausgesucht, die möglicherweise den Schmerz in SCC vermitteln^{12-15,18,19}. Figur 1 zeigt die mRNA Expression der sechs Zielgene Prostaglandin E 2 (PGE 2), Proopiomelanocortin (POMC), Tumor necrosis factor α (TNF α), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Nerve growth factor (NGF) in SCC entsprechend der Präsenz von lokalem Schmerz. PGE2, POMC und TNF α zeigen eine höhere mRNA Expression in schmerzhaften SCC. Die Mittelwertdifferenzen der CT Werte (schmerzhaft versus nicht schmerzhaft) untersucht durch ANOVA mit Bonferroni Korrektur sind in der Tabelle 2 dargestellt.



Figur 1: Prostaglandin E 2 (PGE 2), Proopiomelanocortin (POMC), Tumor necrosis factor α (TNF α), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Nerve growth factor (NGF) und Interleukin 1 β (IL-1 β) messenger RNA gemessen durch real-time PCR in Cycling – Time Werten (housekeeping gene *36B4* minus target gene) in schmerzhaften und nicht schmerzhaften spinözellulären Karzinomen der Haut. Die Box-plot Grafik zeigt den Median als Linie in der Box, 25% und 75% der Werte am unteren und oberen Ende der Box und 95% der Werte als Fehlerbalken ¹⁷.

	PGE 2	POMC	TNF alpha
Mittelwertdifferenz	-1.876	-2.168	-2.037
95% CI	-3.315 bis -0.436	-4.440 bis 0.104	-3.902 bis -0.172
p - Wert	0.012	0.061	0.033
	CGRP	IL1 beta	NGF
Mittelwertdifferenz	-1.327	-1.664	-1.736
95% CI	-3.160 bis 0.507	-4.361 bis 1.034	-3.861 bis 0.389
p - Wert	0.149	0.214	0.106

Tabelle 2: Quantitative PCR der mRNA Expression für die potentiellen Schmerzmediatoren. Die Mittelwertdifferenzen der CT Werte (schmerzhaft versus nicht schmerzhaft) analysiert durch ANOVA mit Bonferroni Korrektur sind aufgelistet für Prostaglandin E2 (PGE 2), Proopiomelanocortin (POMC), Tumor necrosis factor α (TNF α), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Interleukin 1 β (IL1 beta), und Nerve growth factor (NGF). CT: threshold cycle.

Die non-adjusted Odds ratio (OR) für PGE 2 zwischen SCC assoziiert mit Schmerz verglichen zu SCC ohne Schmerz war 1.6 (95% Konfidenzintervall (CI) 1.1 bis 2.5; $p < 0.05$). Weitere Resultate für die anderen Ziele: POMC: non-adjusted OR 1.3 (95% CI: 0.97 bis 1.7; $p = 0.082$); TNF α : non-adjusted OR 1.4 (95% CI: 1.0 bis 1.9; $p < 0.05$); CGRP: non-adjusted OR 1.3 (95% CI: 0.90 bis 1.9; $p = 0.155$); IL-1 β ; non-adjusted OR 1.2 (95% CI: 0.90 bis 1.6; $p = 0.210$); NGF: non-adjusted OR 0.8 (95% CI: 0.62 bis 1.1; $p = 0.111$). Multivariable Analysen zeigten in SCC assoziiert mit Schmerz erhöhte Levels von PGE 2 verglichen zu nicht schmerzhaften SCC, erwiesen durch die Odds ratio von 1.9 (95% CI: 1.1 bis 3.4; $p < 0.05$), korrigiert für Alter und Geschlecht. Die gleiche Assoziation zeigt sich für POMC (korrigierte OR 1.5;

95% CI: 1.1 bis 2.2; $p < 0.05$) und $TNF\alpha$ (korrigierte OR 1.4, 95% CI: 0.99 bis 2.0, $p = 0.054$). Tabelle 3 zeigt die Resultate der univariaten und multivariablen Analysen.

		nicht adjustiert			adjustiert für Alter und Geschlecht		
	n	OR	95%CI	p – Wert	OR	95%CI	p – Wert
PGE 2							
schmerzlos	16	1			1		
schmerzhaft	18	1.6	1.1 to 2.5	0.025	1.9	1.1 to 3.4	0.019
POMC							
schmerzlos	14	1			1		
schmerzhaft	18	1.3	0.97 to 1.7	0.082	1.5	1.1 to 2.3	0.025
TNF alpha							
schmerzlos	15	1			1		
schmerzhaft	17	1.4	1.0 to 1.9	0.047	1.4	0.99 to 2.0	0.054
CGRP							
schmerzlos	11	1			1		
schmerzhaft	17	1.3	0.90 to 1.9	0.155	1.6	0.96 to 2.6	0.074
IL1 beta							
schmerzlos	14	1			1		
schmerzhaft	10	1.2	0.90 to 1.6	0.210	1.4	0.96 to 2.0	0.081
NGF							
schmerzlos	14	1			1		
schmerzhaft	17	0.81	0.62 to 1.1	0.111	0.88	0.65 to 1.2.	0.394

Table 3: Univariate and multivariable Analysen für assoziierte Faktoren der schmerzhaften SCC. Nach crude, Geschlecht, Alter und Geschlecht & Alter korrigierte Odds Ratios (OR), p-Werte und 95% Konfidenzintervalle (95% CI) sind aufgelistet für Prostaglandin E2 (PGE 2), Proopiomelanocortin (POMC), Tumor necrosis factor α ($TNF\alpha$), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Nerve growth factor (NGF) ¹⁷.

6. Diskussion

Erfolgreiche mRNA Isolierung aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe erlaubte eine technisch korrekte PCR Amplifikation, in welcher sich in schmerzhaften SCC eine höhere mRNA Expression von PGE 2, TNF α und POMC zeigte. Die weiteren Kandidaten CGRP, IL-1 β und NGF zeigten keine unterschiedliche mRNA Expression in schmerzhaften SCC verglichen mit SCC ohne Schmerz. Wir zeigen also in dieser Studie neu potenzielle Schmerzmediatoren in spinozellulären Karzinomen des Menschen auf.

In schmerzhaften SCC konnte man deutlich höhere PGE 2 mRNA Expression beobachten als in SCC ohne Schmerz. Dieses bioaktive Lipid aus der Familie der Prostanoiden, bekannt für seine entzündungsfördernden Effekte und seine Rolle in der Schmerzwahrnehmung und in der Hyperalgesie¹⁹⁻²², wirkt über vier G – Protein – gekoppelte Rezeptoren: EP 1, EP 2, EP 3 und EP 4^{23, 24}. Neben seinen etablierten Rollen in Entzündungsprozessen und Schmerzentstehung wird PGE 2 auch eine Funktion in der Tumorpromotion und dem Krebswachstum zugesprochen^{19,23,25,26}. Rundhaug et al. stellten fest, dass durch Induktion der Cyclooxygenase – 2 (COX – 2) und eines ihrer Produkte, PGE 2, Tumor Promotion in NMSC vermittelt werden kann²³. Es gibt Hinweise, dass PGE 2 in Plattenepithelkarzinomen sezerniert werden²⁷. Frühere Beobachtungen zeigten erhöhte Spiegel von Cyclooxygenasen und PGE 2 in SCC – Mausmodellen verglichen zu benignen Papillomzelllinien²⁶.

TNF α zeigte ebenfalls eine höhere mRNA Expression in schmerzhaften SCC. Dieses proinflammatorische Zytokin ist bestens bekannt für seine zentrale Rolle in Entzün-

dung, Immunreaktion, Apoptose und im Zellüberleben²⁸. Keratinozyten, Lymphozyten und Makrophagen sezernieren $\text{TNF}\alpha$ ^{28,29}, welches dann über die zwei Rezeptoren TNF Rezeptor 1 und 2 (TNFR1 und TNFR2) wirkt^{28,30}. 1997 beobachteten Jablonska et al. erhöhte $\text{TNF}\alpha$ Spiegel, einher mit erhöhten Spiegel von IL - 1 β , IL - 6 und löslichem TNFR1 im Serum von Patienten mit SCC der Mundhöhle¹⁴. Meine Untersuchungsergebnisse in der Mikroumgebung der Tumore decken sich mit Messungen von höheren Serumspiegeln von $\text{TNF}\alpha$ und CRP (C - reaktives Protein), welche von Oliveira et al. in schmerzhaften SCC des Kopf - Hals - Bereiches berichtet wurden⁷. In dieser Studie konnte CRP mit dem Tumorstadium der SCC assoziiert werden, $\text{TNF}\alpha$ allerdings nicht.

Auch POMC ist in schmerzhaften SCC höher exprimiert als in SCC ohne Schmerz. POMC wird primär im Hypophysenvorderlappen gebildet und durch verschiedene enzymatische Spaltungen können die Produkte Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Melanotropine (MSH), Endorphine und Lipotrophine (LPH) resultieren^{31,32}. Corticotropin - releasing hormone (CRH) kontrolliert die Produktion von POMC. CRH Rezeptoren sind in der Hypophyse, in anderen Arealen des Gehirns und in vielen verschiedenen peripheren Geweben, einschliesslich der Haut, lokalisiert³². POMC wird neben dem Hypophysenvorderlappen ebenfalls in diversen peripheren Geweben exprimiert, unter anderem in der Haut, wo das Vorläuferprotein durch epidermale Keratinozyten, Melanozyten, Lymphozyten und Mastzellen sezerniert wird³¹⁻³³. Eines seiner Spaltungsprodukte ist das Molekül β - Endorphin. Dieses Peptid wirkt analgetisch durch die primäre Bindung an den μ - Opioid Rezeptor^{32,34,35}. Intuitiv würde man eine verminderte Expression von POMC in schmerzhaften SCC erwarten. Allerdings zeigte sich in meiner Studie das Gegenteil. Ein Grund könnte die Rolle der

Haut als peripheres neuroendokrines Organ mit ihrem kutanen Äquivalent der Hypothalamus–Hypophysen–Nebennierenrinden–Achse (hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis) sein^{36,37}. Wissenschaftler glauben, dass die Haut die gleichen hormonellen Effektoren wie die HPA–Achse produziert, welche dann als lokale neuroendokrine Stress – Antwort auf verschiedene Stressoren wie physikalische (z. B. UV Licht), biologische und chemische Faktoren wirken³⁶⁻³⁹. SCC entstehen hauptsächlich auf Grund von Schädigung durch UV Licht^{40,41}. Somit könnte UV Licht als physikalischer Stressor der Haut höhere POMC Spiegel induzieren, wie in den humanen SCC Proben dieser Studie gezeigt. Neben dem μ - Opioid Rezeptor binden β - Endorphine auch an den δ - Opioid Rezeptor (DOR)⁴². Neumann et al. zeigten kürzlich in Zellkulturen von Keratinozyten mit DOR Überexpression eine blockierte Proliferation und Formation von atropher Epidermis⁴³.

Zusammenfassend zeigt diese Studie eine höhere mRNA Expression von PGE 2, TNF α und POMC in schmerzhaften SCC von OTR verglichen zur Kontrollgruppe. Während frühere Studien diese und weitere Mediatoren auf systemischem Niveau im Zusammenhang mit Schmerzhaftigkeit identifiziert hatten, deuten meine Daten, basierend auf der lokalen Mikroumgebung des Tumors, neu auf eine wahrscheinliche Rolle dieser drei Mediatoren in der Schmerzwahrnehmung in SCC hin. Es ist gut möglich, dass diese Mediatoren ursächlich in der klinisch nützlichen Schmerzhaftigkeit als Kriterium zur Identifikation von spinozellulären Karzinomen der Haut beteiligt sind.

7. Literaturverzeichnis

1. Rogers HW, Weinstock MA, Feldman SR, Coldiron BM. Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer (Keratinocyte Carcinomas) in the US Population, 2012. *JAMA Dermatol.* 2015.
2. Bordea C, Wojnarowska F, Millard PR, Doll H, Welsh K, Morris PJ. Skin cancers in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation.* 2004;77(4):574-579.
3. Ghaninejad H, Ehsani AH, Ghiasi M, et al. Benign and malignant skin lesions in renal transplant recipients. *Indian J Dermatol.* 2009;54(3):247-250.
4. Hofbauer GF, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S. Organ transplantation and skin cancer: basic problems and new perspectives. *Exp Dermatol.* 2010;19(6):473-482.
5. Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2008;9(8):713-720.
6. Askari SK, Schram SE, Wenner RA, et al. Evaluation of prospectively collected presenting signs/symptoms of biopsy-proven melanoma, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and seborrheic keratosis in an elderly male population. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(5):739-747.
7. Oliveira KG, von Zeidler SV, Lamas AZ, et al. Relationship of inflammatory markers and pain in patients with head and neck cancer prior to anticancer therapy. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(7):600-604.
8. Bouwes Bavinck JN, Harwood CA, Genders RE, et al. Pain identifies squamous cell carcinoma in organ transplant recipients: the SCOPE-ITSCC PAIN study. *Am J Transplant.* 2014;14(3):668-676.

9. Yosipovitch G, Mills KC, Nattkemper LA, et al. Association of pain and itch with depth of invasion and inflammatory cell constitution in skin cancer: results of a large clinicopathologic study. *JAMA Dermatol.* 2014;150(11):1160-1166.
10. Carter RL, Pittam MR, Tanner NS. Pain and dysphagia in patients with squamous carcinomas of the head and neck: the role of perineural spread. *J R Soc Med.* 1982;75(8):598-606.
11. Ceyhan GO, Bergmann F, Kadihasanoglu M, et al. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology.* 2009;136(1):177-186.e171.
12. Schmidt BL. The neurobiology of cancer pain. *Neuroscientist.* 2014;20(5):546-562.
13. Constantin CE, Mair N, Sailer CA, et al. Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model. *J Neurosci.* 2008;28(19):5072-5081.
14. Jablonska E, Piotrowski L, Grabowska Z. Serum Levels of IL-1b, IL-6, TNF-a, sTNF-RI and CRP in Patients with Oral Cavity Cancer. *Pathol Oncol Res.* 1997;3(2):126-129.
15. Ye Y, Dang D, Zhang J, et al. Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(9):1667-1676.
16. Frauenfelder S. Schmerz als Marker von spinozellulären Karzinomen. Universität Zürich; 2013. Zentralbibliothek Zürich, Z ZzM Med 223.
17. Frauenfelder SR, Freiburger SN, Bouwes Bavinck JN, et al. Prostaglandin E2, Tumor Necrosis Factor α , and Pro-opiomelanocortin Genes as Potential Mediators of Cancer Pain in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of Organ Transplant Recipients. *JAMA Dermatol.* 2016.

18. Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, et al. The efficacy of nerve growth factor antibody in a mouse model of neuropathic cancer pain. *Exp Anim*. 2016.
19. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE₂ in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol*. 2013;35(2):123-137.
20. Natura G, Bär KJ, Eitner A, et al. Neuronal prostaglandin E₂ receptor subtype EP₃ mediates antinociception during inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(33):13648-13653.
21. Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, et al. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med*. 1996;184(3):883-891.
22. Sciberras DG, Goldenberg MM, Bolognese JA, James I, Baber NS. Inflammatory responses to intradermal injection of platelet activating factor, histamine and prostaglandin E₂ in healthy volunteers: a double blind investigation. *Br J Clin Pharmacol*. 1987;24(6):753-761.
23. Rundhaug JE, Simper MS, Surh I, Fischer SM. The role of the EP receptors for prostaglandin E₂ in skin and skin cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30(3-4):465-480.
24. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007;282(16):11613-11617.
25. Surh I, Rundhaug JE, Pavone A, et al. The EP₁ receptor for prostaglandin E₂ promotes the development and progression of malignant murine skin tumors. *Mol Carcinog*. 2012;51(7):553-564.
26. Thompson EJ, Gupta A, Vielhauer GA, Regan JW, Bowden GT. The growth of malignant keratinocytes depends on signaling through the PGE₂ receptor EP₁. *Neoplasia*. 2001;3(5):402-410.

27. Alcolea S, Antón R, Camacho M, et al. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE₂. *J Lipid Res.* 2012;53(4):630-642.
28. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.
29. Wei T, Guo TZ, Li WW, Hou S, Kingery WS, Clark JD. Keratinocyte expression of inflammatory mediators plays a crucial role in substance P-induced acute and chronic pain. *J Neuroinflammation.* 2012;9:181.
30. Mathew SJ, Haubert D, Krönke M, Leptin M. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 12):1939-1946.
31. Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE, et al. Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *FASEB J.* 2007;21(8):1844-1856.
32. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev.* 2000;80(3):979-1020.
33. Artuc M, Böhm M, Grützkau A, et al. Human mast cells in the neurohormonal network: expression of POMC, detection of precursor proteases, and evidence for IgE-dependent secretion of alpha-MSH. *J Invest Dermatol.* 2006;126(9):1976-1981.
34. Finley MJ, Happel CM, Kaminsky DE, Rogers TJ. Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. *Cell Immunol.* 2008;252(1-2):146-154.

35. Hartwig AC. Peripheral beta-endorphin and pain modulation. *Anesth Prog.* 1991;38(3):75-78.
36. Nejati R, Kovacic D, Slominski A. Neuro-immune-endocrine functions of the skin: an overview. *Expert Rev Dermatol.* 2013;8(6):581-583.
37. Slominski A. Neuroendocrine system of the skin. *Dermatology.* 2005;211(3):199-208.
38. Skobowiat C, Dowdy JC, Sayre RM, Tuckey RC, Slominski A. Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: regulation by ultraviolet radiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(3):E484-493.
39. Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Tobin DJ, Theoharides TC, Rivier J. Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocr Rev.* 2013;34(6):827-884.
40. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2001;344(13):975-983.
41. Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2012;122(2):464-472.
42. Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol.* 2011;22(5-6):405-414.
43. Neumann C, Bigliardi-Qi M, Widmann C, Bigliardi PL. The δ -opioid receptor affects epidermal homeostasis via ERK-dependent inhibition of transcription factor POU2F3. *J Invest Dermatol.* 2015;135(2):471-480.

8. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Betreuer Herr Prof. Dr. med. G. Hofbauer für die engagierte Unterstützung während meiner gesamten Dissertationszeit. Alle Fragen und Probleme wurden durch ihn immer rasch und zielorientiert angegangen. Ebenfalls möchte ich mich bei Sandra Freiberger, Ph.D., und Dr. med. Piotr Dziunycz für ihre grosszügige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten im Labor bedanken.

9. Curriculum vitae

Sara Regina Frauenfelder

22.09.1990	geboren in Zürich, ZH
1997 – 2003	Primarschule Sonnenberg, Dübendorf
2003 – 2009	Kantonsschule Glattal, Dübendorf (Maturitätsschwerpunktfach Musik)
2009 – 2015	Medizinstudium an der Universität Zürich
10/2015	Eidgenössisches Examen Humanmedizin an der Universität Zürich
Seit 01/2016	Assistenzärztin Frauenklinik, GZO Spital Wetzikon