

-Dissertation-

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE
PROF. DR. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EXPRESSION PROFILES OF ASIC1/2 AND TRPV1/TRPV4
IN COMMON SKIN TUMORS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kirsten Ackermann

2021

-Dissertation-

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE
PROF. DR. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EXPRESSION PROFILES OF ASIC1/2 AND TRPV1/TRPV4
IN COMMON SKIN TUMORS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kirsten Ackermann

2021

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. Stephan Schreml

2. Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. Dr. Peter Proff

Tag der mündlichen Prüfung:

28.02.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	8
2.1. Gewebeproben	8
2.2. Immunhistochemie	8
2.3. Gewebe-Mikroarray (TMA)	9
2.4. Scoring	9
3. Ergebnisse	11
3.1. ASIC1	11
3.2. ASIC2	10
3.3. TRPV1	12
3.4. TRPV4	12
4. Zusammenfassung	14
4.1. ASIC1	14
4.2. ASIC2	15
4.3. TRPV1	16
4.4. TRPV4	17
5. Literaturverzeichnis	19
6. Anhang	22
7. Publikation	28
7.1. Expression Profiles of ASIC1/2 and TRPV1/4 in Common Skin Tumors	28
Supplementary information	39
8. Danksagung	66
9. Lebenslauf	67

1. Einleitung

In dieser Arbeit untersuchten wir mithilfe immunhistochemischer Färbungen die Expressionsprofile der Protonen-sensitiven Ionenkanäle ASIC1 und ASIC2 (= acid-sensing ion channels) sowie von TRPV1 und TRPV4 (= transient receptor potential vanilloid receptors) in häufigen Hauttumoren. Hierbei handelt es sich um Basalzellkarzinome (BCC), spinözelluläre Karzinome (SCC), Nävuszellnävi (NCN) und Melanome (MM).

Weltweit kann man eine steigende Inzidenz von Hauttumoren beobachten, die zu hoher Morbidität und umfangreichen Kosten für unser Gesundheitssystem führt [1]. Dabei gehören das maligne Melanom und der nicht-melanozytäre Hautkrebs (NMSC) zu den häufigsten Krebsarten bei Menschen mit heller Hautfarbe [2]. Die WHO zählt zwischen 2 bis 3 Millionen neue Fälle von NMSC pro Jahr, was etwa 20 mal höher ist als beim Melanom. Aufgrund seines Metastasierungsrisikos ist das maligne Melanom jedoch für 90 % der Todesfälle unter den Hautkrebsarten verantwortlich [3]. Die Gruppe der NMSC umfasst Basalzellkarzinome, die etwa 80 % der NMSC ausmachen, und Plattenepithelkarzinome mit etwa 20 % der NMSC [4]. BCCs zeichnen sich meist durch ein langsames, aber lokal invasives Wachstum aus und metastasieren sehr selten [5]. SCCs haben ebenfalls ein geringes Risiko der Metastasierung und des Rezidivs, wenn sie richtig behandelt werden [6]. Nävuszellnävi (nevus cell nevi, NCN) sind gutartige, angeborene oder erworbene Neoplasien und ihre Exzision ist nicht zwingend erforderlich. Allerdings entwickeln sich 10-30 % aller Melanome aus melanozytären Nävi [7,8]. Auch wenn die Sterblichkeitsrate und das Metastasierungspotential von NMSCs gering sind, können diese Tumoren bei den Betroffenen teils zu erheblichen Beeinträchtigungen der Lebensqualität führen. Daher ist es essentiell, die Entstehungsmechanismen von Melanomen und NMSCs besser zu verstehen, um weitere therapeutische Strategien für zukünftige Behandlungen von MMs und NMSCs zu finden.

Bei der Entstehung von Tumoren kommt es zu metabolischen Veränderungen im Mikromilieu des Gewebes, dem sogenannten tumor microenvironment (TME) [9-11]. Geringe vaskuläre Perfusion, Hypoxie und der nachfolgende anaerobe Glukosestoffwechsel führen zu einer Anreicherung von Laktat und damit zu

extrazellulärer Azidose [10]. Unter physiologischen Bedingungen ist der extrazelluläre pH (pH_e) höher (7,2-7,4) als der intrazelluläre pH_i (6,9-7,2). Im Tumormilieu entsteht allerdings der sogenannte inverse pH-Gradient ($pH_e < pH_i$), bei dem der pH_e auf 6,5 fallen kann [12-14]. Dieser inverse pH-Gradient (oder „inside-out“ pH-Gradient) ist für normale Zellen schädlich, da die zelluläre Azidose normalerweise zur Apoptose führt. In Tumorzellen hingegen fördert er demgegenüber Migration sowie Invasivität von Tumorzellen und begünstigt somit das Tumorstadium [10]. Im Gegensatz zu normalen Zellen adaptieren sich Tumorzellen an das Überleben bei niedrigem pH-Wert [15]. Für mehrere Protonen-Transporter und Pumpen wurde bereits nachgewiesen, dass sie eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Tumormikromilieus spielen, wie z.B. Carboanhydrasen (CA2, CA9, CA12), V-ATPasen (vakuoläre H^+ -ATPasen), Monocarboxylat-Transporter (MCT 1-4) oder Na^+/H^+ -Austauscher 1 (NHE1) [9]. Durch Veränderungen ihrer Expression und/oder ihrer Aktivität fördern diese Plasmamembranproteine den H^+ -Ausstrom und führen so zu dem typischen alkalischen pH_i und dem sauren pH_e bei Tumorzellen [9,12-14].

Um diese zellulären Mechanismen zu aktivieren, müssen Tumorzellen allerdings auch diesen dysregulierten pH-Wert durch zelluläre Sensoren erkennen. pH-abhängige Transmembranrezeptoren leiten Signale an das Zytoplasma und den Zellkern weiter und beeinflussen so intrazelluläre Signaltransduktionswege und die Genexpression [9]. Eine Gruppe dieser Sensoren sind die Protonen-sensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (pH-GPCRs) [16,17]. Es wurden kürzlich von der Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik Regensburg erste Daten zu den Expressionsprofilen von pH-GPCRs in verschiedenen Hauttumoren veröffentlicht [18,19]. Weitere wichtige Protonen-sensitive Sensoren in der Plasmamembran sind TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1) und TRPV4 sowie ASIC1 (Acid-sensing ion channels) und ASIC2. Über ihre Expression und Rolle in Hauttumoren ist jedoch wenig bekannt.

Die transient receptor potential channels (TRPs) sind eine Familie von membranständigen Kationenkanälen, die sich in sieben Untergruppen unterteilt. Eine von ihnen sind die TRPV Kanäle (= transient receptor potential vanilloid). Zu ihnen

gehören die Ca^{2+} -permeablen, nicht-selektiven Thermo-TRPs TRPV1 und TRPV4 [20,21]. Diese membranständigen Proteine werden beide durch extrazelluläre Protonen aktiviert [10]. Darüber hinaus wird TRPV1 durch Vanilloide (Capsaicin und Resiniferatoxin), Hitze ($\geq 43\text{ }^{\circ}\text{C}$) und einige Eicosanoide stimuliert [22]. TRPV4 wird durch warme Temperaturen ($>24\text{ }^{\circ}\text{C}$) und durch hypoosmolare Stimuli aktiviert [22]. TRPV1 und TRPV4 wurden in einer Vielzahl von Zelltypen nachgewiesen, unter anderem in epidermalen Keratinozyten [23]. Keratinozyten durchlaufen bis zur Apoptose eine kontinuierliche Zelldifferenzierung, die mit einem zunehmenden intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom einhergeht. Eine Beeinflussung dieses intrazellulären Ca^{2+} -Einstroms verändert das Wachstum und die Differenzierung der Keratinozyten und damit die physikalische und chemische Barrierefunktion der Haut. Werden TRPV1 Kanäle aktiviert, können sie den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle steigern und dadurch das Zellwachstum bremsen und eine Apoptose induzieren [20]. TRPV1 wird in der Haut in epidermalen sowie Haarfollikel-Keratinozyten, dermalen Mastzellen, Talgdrüsen und dendritischen Zellen exprimiert [22]. TRPV4 ist beispielsweise in basalen und suprabasalen Keratinozyten lokalisiert [22]. Des Weiteren trägt TRPV4 zur Aufrechterhaltung der Hautpermeabilitätsbarriere bei, indem es Tight-Junction-Proteine moduliert [24]. Seine Aktivierung fördert die Regeneration der Barriere, was dadurch gezeigt wurde, dass bei TRPV4-defizienten Mäusen eine mangelnde epidermale Barriere gefunden wurde [20].

Die Protonen-aktivierten acid-sensing ion channels (ASICs) sind Ionenkanäle, die zur ENaC/Degenerin-Familie gehören und durch extrazelluläre Protonen aktiviert werden können. Sie werden hauptsächlich im zentralen Nervensystem und in peripheren sensorischen Neuronen exprimiert. Es gibt sieben Untereinheiten (nämlich ASIC1a, ASIC1b1, ASIC1b2, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 und ASIC4), von denen jede aus zwei Transmembrandomänen besteht, die mit einer großen extrazellulären cysteinreichen Schleife miteinander verbunden sind [9]. Jeweils drei ASIC-Untereinheiten verbinden sich zu einem funktionsfähigen Kanal [25]. ASIC1 ist für Na^{+} - und Ca^{2+} -permeabel, während die restlichen ASIC-Kanäle nur für Na^{+} permeabel sind [10]. ASICs haben vielfältige Funktionen im peripheren und zentralen Nervensystem sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Prozessen. Im ZNS sind ASIC1-Kanäle an der Neuroplastizität, der Regulation von Angstverhalten, Lernen, Gedächtnisfunktionen und Schmerzempfindung beteiligt [26]. ASIC2 spielt eine Rolle

für die retinale Integrität und das Überleben von Neuronen bei zerebraler Ischämie [27]. Im peripheren Nervensystem sind sie an der Nozizeption und Mechanorezeption beteiligt [25]. Relevanter für unsere Studie ist jedoch, dass ASICs auch in nicht-neuronalen Zellen exprimiert werden (z. B. Keratinozyten, Knochen, dendritische Zellen, vaskuläre glatte Muskulatur [10]), wo sie unter anderem an der zellulären Migration und an Entzündungsreaktionen beteiligt sind [28].

Es gibt bereits diverse Studien über die Expression und die Funktion von TRPVs und ASICs in verschiedenen Tumorentitäten [29-34]. Dennoch gibt es keine ausreichenden Informationen über ihr Vorkommen und ihre Rolle in Hauttumoren. In dieser Studie untersuchen wir die Expressionen von ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 in Plattenepithelkarzinomen (SCC), Basalzellkarzinomen (BCC), malignen Melanomen (MM) und in Nävuszellnävus (NCN).

2. Material und Methoden

2.1. Gewebeproben

Für unsere Studie verwendeten wir pro Tumorentität jeweils fünf paraffineingebettete Gewebeproben und je weitere 20 - 30 TMA-Proben (= Tissue Microarray) vom dermatopathologischen Labor der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg. Die untersuchten Gewebeproben stammten ausschließlich von Biopsien, die älter als 10 Jahre waren.

Als Positivkontrollen dienten für ASIC1 und ASIC2 Gewebe des Cerebellums der Maus, humanes Nierengewebe für TRPV1 und humanes Pankreasgewebe für TRPV4. Als Negativkontrollen verwendeten wir Ovarialgewebe für ASIC1, Prostatagewebe für ASIC2, Uterusgewebe für TRPV1 und Lebergewebe für TRPV4. Die Positiv- und Negativkontrollen, sowie allgemeine Patienteninformationen werden in der nachfolgend angehängten Publikation unter dem Abschnitt der ergänzenden Informationen (Supplementary information, Abb. S18, Tab. S1) dargestellt.

2.2. Immunhistochemie

In Paraffin eingebettete und fixierte Gewebeproben sowie die Positiv- und Negativkontrollen wurden in 2 µm dünne Schichten geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Objektträger für 30 Minuten bei 77 °C erhitzt und dann in einer absteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur behandelt: 2 × Xylol, 2 × 100 % Ethanol, 2 × 96 % Ethanol, 2 × 70 % Ethanol, jeweils für 5 Minuten. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidase mit 3 % Wasserstoffperoxid (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) für 10 Minuten neutralisiert und danach die Objektträger wieder in destilliertem Wasser gewaschen. Während der vorangegangenen Schritte wurde Citratpuffer (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) für 20 Minuten vorgekocht, so dass die Gewebeschnitte unmittelbar für 30 Minuten in bereits heißem Citratpuffer gekocht werden konnten (außer ASIC2). Danach wurden die Objektträger für 20 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend für 10 Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) gewaschen. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, inkubierten wir die Gewebeschnitte in einer Blocking-Lösung (ZytoChemPlusHRP Kit/Rabbit, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) für 10 min und wuschen sie erneut in PBS.

Anschließend folgte die Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper in der jeweiligen Verdünnung bei 4 °C über Nacht (ASIC1: 1:400, Thermofisher, ASIC1 Polyclonal Antibody, Nr. PA5-26278; ASIC2: 1:200, Thermofisher, ASIC2 Polyclonal Antibody, Nr. PA5-26222; TRPV1: 1:500, Thermofisher Polyclonal Antibody, Nr. PA5-34288; TRPV4: 1:300, Abcam, Anti-TRPV4 Antibody, Nr. ab219192). Am folgenden Tag wuschen wir die Gewebeschnitte dreimal jeweils 5 Minuten in PBS und inkubierten die Objektträger anschließend für 30 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Zytochem Plus HRP Kit/Rabbit, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland). Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurden sie für 30 Minuten mit Streptavidin-HRP-Konjugat (horseradish peroxidase) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit AEC plus (Dako, Glostrup, Dänemark) gefärbt. Sobald die gewünschte Färbung der Positivkontrollen eingetreten war, wurde die Reaktion mit destilliertem Wasser gestoppt und die gleiche Prozedur mit den Gewebeschnitten und Negativ-Kontrollen durchgeführt. Zur Gegenfärbung der Schnitte verwendeten wir Mayers Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

2.3. Gewebe-Mikroarray (Tissue Microarray = TMA)

Durch die Methode des TMAs (= tissue microarray) vermieden wir experimentelle Variabilität, indem wir mehrere Gewebeproben gleichzeitig unter identischen Versuchsbedingungen auf einem einzigen Objektträger färbten. Dabei erhielten wir repräsentatives Tumormaterial von 20-30 Stanzproben pro Tumortyp unter Anwendung des oben beschriebenen Immunfärbeprotokolls. Die Bandbreite unserer Proben variierte, da einige Proben keine Tumorzellnester auf dem angeschnittenen Gewebe zeigten und daher nicht für die Auswertung verwendet werden konnten.

2.4. Scoring

Abschließend beurteilten wir visuell die Intensität der Färbung sowie die Tumorzellanzahl in den jeweiligen Schnitten und bewerteten folgendermaßen: ++ für eine stark positive/positive Reaktion mit >80 % positiver Zellen und/oder hoher Farbintensität, + für 20-80 % der Zellen mit einer schwach positiven/teilweise positiven Reaktion und - für <20 % der Zellen mit sehr schwacher Färbung (= negative Reaktion).

Außerdem wurden bei Bedarf zusätzliche Informationen angegeben, die mit hochgestellten Zahlen gekennzeichnet waren: ⁽¹⁾ Einige Proben zeigten eine abnehmende Expression im tieferen dermalen Tumorgewebe. ⁽²⁾ Einzelne Tumorzellen waren stark positiv gefärbt, andere erschienen negativ, sodass sich insgesamt ein teilweise positiver Score (+) ergab.

3. Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der immunhistochemischen (IHC) Präparate und der TMAs zusammengefasst. Die Abbildungen 1-4 im Anhang zeigen eine Auswahl unserer IHC-Färbeergebnisse, Abbildung 5 stellt eine Übersicht der Ergebnisse dar. Weitere Bilder, ausgewählte repräsentative TMAs, sämtliche Scores sowie allgemeine Patienteninformationen sind in der angehängten Publikation unter dem Abschnitt der ergänzenden Informationen (Abbildungen S1-S18 und Tabellen S1-S5) dargestellt.

3.1. ASIC1

Insgesamt zeigten 42,4 % der SCC-Schnitte eine stark positive Expression von ASIC1, 53,8 % eine schwach positive und nur 3,8 % zeigten keine Expression (Abb. 1a,e und 5a, sowie in den ergänzenden Abbildungen der angehängten Publikation Abb. S1-S3 erste Spalte und Abb. S16). Die Hälfte der BCC-Proben war stark positiv für ASIC1, die andere Hälfte war schwach positiv (Abb. 2a,e und 5b, Abb. S4-S7 erste Spalte und Abb. S16). NCN zeigte epidermal in 44,4 % eine stark positive Färbung und in 55,6 % eine schwach positive Färbung. Die dermalen Anteile waren überwiegend schwach positiv gefärbt (76 %), die restlichen 24 % waren stark positiv (Abb. 3a,e und 5c, Abb. S8-S11 erste Spalte und Abb. S16). Einige Nävi (markiert mit einer ¹⁾) zeigten eine abnehmende Expression im tieferen dermalen Tumorgewebe. Epidermales Melanomgewebe zeigte in 55 % eine schwach positive Färbung, stark positiv waren 24 % und negativ 21 %. Die dermalen MM-Anteile zeigten in 45,8 % eine stark positive und in 45,8 % eine schwach positive Expression. Nur 8,4 % waren negativ (Abb. 4a,e und 5d, Abb. S12-S15 erste Spalte und Abb. S16). Im Gegensatz zum NCN war beim MM auch in tieferen dermalen Bereichen eine gleichmäßige Expression von ASIC1 vorzufinden.

3.2. ASIC2

57,7 % der SCCs zeigten eine schwach positive oder partielle Expression von ASIC2. 30,8 % der SCC wiesen eine stark positive Expression auf, während 11,5 % ASIC2 nicht exprimierten (Abb. 1b,f und 5a, sowie Abb. S1-S3 zweite Spalte und Abb. S16). BCC wies in 56 % keine Expression von ASIC2 auf, in 44 % zeigte sich eine schwache Expression (Abb. 2b,f und 6b, Abb. S4-S7 zweite Spalte und Abb. S16).

Die epidermalen Anteile des NCN zeigten überwiegend eine schwach positive Expression (57,9 %), 10,5 % der Proben waren stark positiv und 31,6 % waren negativ. Die dermalen Anteile waren in 45,8 % stark positiv und in 54,2 % schwach positiv. Vergleichbar zur ASIC1-Expression beobachteten wir auch eine abnehmende Expression von ASIC2 im tieferen dermalen Tumorgewebe (Abb. 3b,f und 5c, Abb. S8-S11 zweite Spalte und Abb. S16). In den epidermalen Teilen des MM war die Mehrheit der Gewebeproben schwach positiv für ASIC2 (60 %), während 24 % stark positiv und 16 % negativ waren. In den dermalen MM-Anteilen exprimierte die Hälfte unserer Schnitte ASIC2 stark (50 %), 45 % schwach und nur 5 % zeigten keine Expression (Abb. 4b,f und 5d, Abb. S12-S15 zweite Spalte und Abb. S16).

3.3. TRPV1

SCC zeigte mehrheitlich eine stark positive TRPV1-Expression (69 %), 27 % zeigten eine schwache Expression und nur 4 % waren negativ (Abb. 1c,g und 5a, sowie in Abb. S1-S3 dritte Spalte und Abb. S16). Bezüglich BCC war die Hälfte unserer Proben stark positiv für TRPV1, die andere Hälfte erschien schwach positiv (Abb. 2c,g und 5b, Abb. S4-S7 dritte Spalte und Abb. S16). Die überwiegende Mehrheit der epidermalen sowie dermalen Teile von NCN wies eine stark positive Färbung auf (epidermal: 73,6 %, dermal: 63,6 %), der Rest war schwach positiv (epidermal: 26,4 %, dermal: 36,4 %) (Abb. 3c,g und 5c, Abb. S8-S11 dritte Spalte und Abb. S16). Beim MM beobachteten wir in 62,9 % eine starke positive Expression in der Epidermis, in der Dermis sogar in 79 % (Abb. 4c,g und 5d, Abb. S12-S15 dritte Spalte und Abb. S16).

3.4. TRPV4

46,2 % unserer SCC-Gewebeproben waren stark positiv für TRPV4, der Rest wies eine schwach positive Expression auf (Abb. 1d,h und 5a, Abb. S1-S3 vierte Spalte und Abb. S16). BCC zeigte in 15,4 % eine stark positive Expression, 84,6 % waren schwach positiv (Abb. 2d,h und 5b, Abb. S4-S7 vierte Spalte und Abb. S16). In den epidermalen Bereichen des NCN waren 40 % der Gewebeproben negativ für TRPV4, 35 % waren schwach positiv und 25 % stark positiv. Die dermalen Abschnitte zeigten in 78,9 % eine schwach positive Färbung, in 15,8 % eine stark positive und in 5,3 % eine negative Expression (Abb. 3d,h und 5c, Abb. S8-S11 vierte Spalte und Abb. S16). MM wies in der Epidermis keine stark positive Färbung auf, eine schwach

positive Färbung in 86,3 % und keine Expression in 13,7 %. Die dermalen Anteile des MM zeigten jedoch in 35 % der Gewebeproben stark positive Ergebnisse, 60 % waren schwach positiv und nur 5 % negativ (Abb. 4d,h und 5d, Abb. S12-S15 vierte Spalte und Abb. S16).

4. Zusammenfassung

Wir untersuchten die Expressionsprofile von ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 in den Hauttumoren SCC, BCC, NCN und MM. Jeder Tumor zeigte spezifische Expressionsmuster. Wesentliche Ergebnisse unserer Studie sind, dass BCCs oft keine Expression von ASIC2 aufweisen, allerdings fast alle SCCs. Während ASIC1 in epidermalen Anteilen des MM teilweise nicht exprimiert wird, weisen im Gegensatz dazu die epidermalen Anteile des NCN eine positive Expression auf. Dermale Gewebe des MM zeigen häufiger eine starke Expression von TRPV1 als dermale NCN-Gewebe. In einigen NCNs nimmt die ASIC1/2-Expression mit zunehmender Tiefe im dermalen Tumorgewebe ab, während MMs in tieferen dermalen Anteilen ASIC1/2 weiterhin gleichmäßig exprimieren.

4.1. ASIC1

ASIC1 wird in SCC, BCC und in NCN sowohl in epidermalen als auch in dermalen Anteilen stark exprimiert. Epidermale und dermale MM variieren im Expressionsniveau. Auch wenn über die Expression von ASIC1 in Melanomen und NMSC in der Literatur wenig zu finden ist, wurde in anderen Tumorentitäten bereits nachgewiesen, dass ASIC1 eine begünstigende Rolle auf deren Tumorstadium hat. Bei malignen Gliomen spielt ASIC1 eine Rolle für das Wachstum und die Migration der Tumorzellen [31,35]. Es wurde herausgefunden, dass der Knock-down von ASIC1 in Mäusen die Migration von Glioblastomzellen verhindert [9]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Gupta et al. in ihrer Studie zum Mammakarzinom. Sie fanden heraus, dass ASIC1 zur Pathogenese von Brustkrebs beiträgt und dass ASIC1-Inhibitoren zu einer signifikanten Reduktion des Tumorstadiums in Mäusen führen [36]. Die Autoren stellten fest, dass die Aktivierung von ASIC1 durch das saure Tumormikromilieu und damit der Anstieg des intrazellulären Kalziums reaktive Sauerstoffspezies erzeugt, die die Tumorentwicklung und die Metastasierung fördern [36]. Auch in Lungen-Adenokarzinomzellen (Zelllinie A549) könnte ASIC1 ein prognostischer Marker sein [10]. Wu et al. fanden heraus, dass eine Überexpression von ASIC1 die Proliferation und Migration von Lungenkrebszellen signifikant erhöht, während der Knock-down von ASIC1 zu einer Verhinderung der Azidose-induzierten Zellproliferation und Migration führt [10]. Mit Hinblick auf unsere Ergebnisse könnte ASIC1 demnach als potentielles therapeutisches Ziel dienen, jedoch sind weitere

Studien erforderlich, um die Rolle von ASIC1 in der Tumorprogression vollständig zu verstehen und mögliche therapeutische Einsatzmöglichkeiten von ASIC1-Inhibitoren zu prüfen.

4.2. ASIC2

ASIC2 zeigt in BCC ein negatives Expressionsprofil, während der dermale Anteil von NCN eine starke Expression aufweist. Diese inhomogenen Ergebnisse entsprechen den bisherigen Erkenntnissen über ASIC2 in anderen Tumoren. Die geringere Expression von ASIC2 stimmt mit den Überlegungen von Berdiev et al. überein, die ASIC2 in malignen Gliomen untersucht haben [31]. Die Autoren fanden heraus, dass ASIC2 in der Plasmamembran von Gliazellen nicht exprimiert wird, während ASIC1 durchaus auf diesen Tumorzellen exprimiert wird, analog zu unseren Befunden in BCCs. Ihnen zufolge werden ASIC1 und ASIC2 in normalen Zellen gemeinsam exprimiert und das Fehlen von ASIC2 in Tumorzellen führt zu einem erhöhtem Kationen-Einwärtsstrom. Die Hemmung dieses Stroms reduzierte das Gliomwachstum und die Zellmigration [35]. Eine andere Studie, ebenfalls an Gliomzellen (Gliom C6 Zelllinie), fand heraus, dass der Knock-down von ASIC2 eine Verschlimmerung der säurebedingten ischämischen neuronalen Schädigung durch erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} induziert. Dies impliziert, dass ASIC2 Gliomzellen vor einer Kalziumüberladung schützt und damit diese Zellen vor einer Verletzung durch extrazelluläre Azidose im Rahmen des inversen pH-Gradienten bewahrt [37].

Unsere Ergebnisse bezüglich der positiven Expression von ASIC2 im dermalen NCN stimmen mit den Erkenntnissen von Zhou et al. überein. Sie wiesen eine Hochregulierung von ASIC2 im kolorektalen Karzinom nach, die zu einer erhöhten Zellproliferation führte, während ein Knock-down den gegenteiligen Effekt hatte [38]. Die ASIC2-Expression korrelierte mit der Tumorprognose bezüglich T-Stadium, Metastasierung und Rezidivrisiko [38].

Dies unterstreicht einmal mehr, dass diese Protonen-sensitiven Ionenkanäle in manchen Tumoren das Tumorwachstum fördern, während sie in anderen Tumoren protektiv wirken.

4.3. TRPV1

In allen von uns untersuchten Tumoren war die Expression von TRPV1 hoch. Wie bereits erwähnt, spielt TRPV1 eine Rolle bei Entzündungsprozessen und bei der Kalziumsignaltransduktion. Die Kalziumregulierung ist essentiell für viele zelluläre Prozesse, einschließlich Proliferation und Apoptose, und es ist erwiesen, dass Krebszellen eine veränderte Kalzium-Homöostase haben [23,39]. Die Rolle von TRPV1 bei Entzündungen ist jedoch widersprüchlich. Es gibt Studien, die auf eine proinflammatorische Assoziation der TRPV1-Aktivierung hindeuten, andere suggerieren eine antiinflammatorische Wirkung von TRPV1 [23]. Bujak et al. stellen die Hypothese auf, dass die Aktivierung von TRPV1 zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) und Substanz P führt. Auf der anderen Seite kann die Aktivierung von TRPV1 aber auch zur Freisetzung von entzündungshemmenden Neuropeptiden, wie Somatostatin, führen [23]. Bei verschiedenen chronischen Erkrankungen, wie z. B. erosiver Ösophagitis oder chronischem Asthma, wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von TRPV1 nachgewiesen. Durch Gabe von TRPV1-Antagonisten konnten Entzündungsreaktionen reduziert werden [23]. Da sowohl chronische Entzündungen als auch eine abnorme Kalziumsignalisierung eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen, erscheint es plausibel, dass TRPV1 an der Tumorprogression beteiligt ist. Dennoch muss die genaue Rolle von TRPV1 bei der Tumorentstehung in weiteren Studien genauer erforscht werden.

Marincsák et al. fanden eine stark erhöhte Expression von TRPV1 in SCCs der Zunge und in präkanzerösen Läsionen [40]. Auch in anderen Kopf-Hals-SCCs, die im Mundboden oder auf der Gingiva lokalisiert sind, ist die TRPV1-Expression hochreguliert [41]. Weber et al. zeigten, dass TRPV1 in verschiedenen Mammakarzinomen erhöht exprimiert ist und dass dessen Aktivierung durch seinen Agonisten Capsaicin einen anti-proliferativen, Apoptose-induzierenden Effekt hervorruft. Dies deutet darauf hin, dass eine TRPV1-Aktivierung ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre [33]. Eine weitere Strategie zur Behandlung von Brustkrebszellen war die Verabreichung einer gängigen Chemotherapie (5-Fluorouracil) zusammen mit dem TRPV1-Aktivator Capsaicin, was zu einer Hemmung des Tumorwachstums und erhöhter Apoptose führte [42].

Obwohl man im Umkehrschluss annehmen könnte, dass die Antagonisierung von TRPV1 mit einer erhöhten Tumorentwicklung einhergehe, fanden Park et al. heraus,

dass der Einsatz von kompetitiven Antagonisten (AMG-9810 und SB-705498) an TRPV1 in epidermalen Keratinozyten keine karzinogene Wirkung hat [43]. Auch wenn wir zeigen konnten, dass TRPV1 in allen von uns untersuchten Tumoren ein höheres Expressionsniveau aufweist, sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die genaue Rolle von TRPV1 bei der Bildung von Hauttumoren besser zu verstehen, um es als potentiell therapeutisches Ziel nutzen zu können.

4.4. TRPV4

TRPV4 ist sowohl in SCC als auch in BCC überexprimiert. MM wiesen eine gemischte Expression auf und die epidermalen Anteile des NCN waren überwiegend negativ für TRPV4. Andere Studien wiesen nach, dass TRPV4 an der Tumorbildung bei verschiedenen Krebsarten beteiligt ist, wie z. B. beim Ösophagus-Plattenepithelkarzinom, wo eine Hochregulierung von TRPV4 zu sehen ist [44]. Huang et al. aktivierten TRPV4 in Ösophagus-SCCs mit Hilfe von hypotonen Lösungen, was zu einer Migration der Tumorzellen führte [44].

Darüber hinaus ist TRPV4 auch in Magenkrebszellen überexprimiert und mit höherer Tumorinvasion, Lymphknotenmetastasierung und schlechteren Überlebensraten assoziiert [45]. Der in vitro Knock-down von TRPV4 in Magenkrebszellen verhindert die Proliferation und Invasion der Tumorzellen. Außerdem wird TRPV4 in Brustkrebsmetastasen sowie in Endothelzellen von Brusttumoren überexprimiert, was die Vermutung nahelegt, dass TRPV4 eine bedeutende Rolle bei der Angiogenese und Extravasation spielt. Die Autoren fanden heraus, dass die Hochregulierung von TRPV4 zu einer höheren Verformbarkeit der Zellen führt, da TRPV4 direkt mit dem Zytoskelett interagieren kann. Diese beweglicheren Krebszellen können dann leichter das Gefäßsystem durch lockere endotheliale Verbindungen verlassen, was die Zellmigration fördert [24,46,44].

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte eine andere Arbeitsgruppe eine Herabregulation von TRPV4 bei bestimmten NMSC, wie dem Morbus Bowen (BD), solarer Keratose (SK), aber auch BCC und SCC nachweisen [22]. Unsere Ergebnisse widersprechen diesen Befunden, da unsere Färbungen eine positive und sogar höhere Expression von TRPV4 in SCC und BCC im Vergleich zu normalen Keratinozyten zeigen. Auf dieser Grundlage ist es plausibel zu spekulieren, dass die Expression und Rolle von TRPV4 bei unterschiedlichen Patienten, Art und Subtyp des Krebses sowie Mikro- und Makroumgebung variiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 von den meisten Hauttumoren exprimiert werden. Allerdings gibt es, wie oben erwähnt, einige interessante Expressionsmuster und Unterschiede. Unsere Ergebnisse müssen durch weitere Stichprobengrößen, RNA-Expressionsanalysen, Western-Blots und durch gezielte Zellkulturstudien, die die genaue Rolle der Ionenkanäle bei der Tumorbildung untersuchen, untermauert werden. Die zugrunde liegenden Ergebnisse und weiterführende Studien könnten zu Medikamenten führen, die die untersuchten Ionenkanäle als therapeutisches Ziel für die Behandlung von Hauttumoren nutzen. Die bisherigen Ergebnisse, insbesondere zu ASIC1/2, bieten einen weiteren histologischen Unterscheidungsmarker zwischen NCN und MM ähnlich HMB45, das ebenfalls häufig auch in tiefen dermalen Anteilen von MM, aber nicht von NCN exprimiert wird.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Z. Apalla, A. Lallas, E. Sotiriou, E. Lazaridou, and D. Ioannides, “Epidemiological trends in skin cancer”. *Dermatol. Pract. Concept.*, vol. 7, no. 2, pp. 1–6
- [2] Z. Apalla, D. Nashan, R. B. Weller, and X. Castellsagué, “Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches”. *Dermatol. Ther.*, vol. 7, no. Suppl 1, pp. 5–19
- [3] W. H. Ward, J. M. Farma, "Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy". Codon Publications, 2017, pp. xi–xiv.
- [4] N. Eisemann *et al.*, “Non-Melanoma Skin Cancer Incidence and Impact of Skin Cancer Screening on Incidence”. *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 1, pp. 43–50
- [5] B. McDaniel, T. Badri, and R. B. Steele, “Basal Cell Carcinoma”. *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- [6] R. Gutzmer, S. Wiegand, O. Kölbl, K. Wermker, M. Heppt, and C. Berking, “Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma”. *Dtsch. Arzteblatt Int.*, vol. 116, no. 37, pp. 616–626
- [7] W. E. Damsky and M. Bosenberg, “Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship”. *Oncogene*, vol. 36, no. 42, pp. 5771–5792
- [8] B. C. Bastian, “The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia”. *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 9, pp. 239–271
- [9] M. Damaghi, J. W. Wojtkowiak, and R. J. Gillies, “pH sensing and regulation in cancer”. *Front. Physiol.*, vol. 4
- [10] Y. Wu, B. Gao, Q.-J. Xiong, Y.-C. Wang, D.-K. Huang, and W.-N. Wu, “Acid-sensing ion channels contribute to the effect of extracellular acidosis on proliferation and migration of A549 cells”. *Tumor Biol.*, vol. 39, no. 6, p. 1010428317705750
- [11] N. N. Pavlova and C. B. Thompson, “The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism”. *Cell Metab.*, vol. 23, no. 1, pp. 27–47
- [12] D. Neri and C. T. Supuran, “Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy”. *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 10, pp. 767–777
- [13] R. A. Cardone, V. Casavola, and S. J. Reshkin, “The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis”. *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 10, pp. 786–795
- [14] B. A. Webb, M. Chimenti, M. P. Jacobson, and D. L. Barber, “Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression”. *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 9, pp. 671–677
- [15] N. Rohani *et al.*, “Acidification of Tumor at Stromal Boundaries Drives Transcriptome Alterations Associated with Aggressive Phenotypes”. *Cancer Res.*, vol. 79, no. 8, pp. 1952–1966
- [16] K. T. Weiß *et al.*, “Proton-sensing G protein-coupled receptors as regulators of cell proliferation and migration during tumor growth and wound healing”. *Exp. Dermatol.*, vol. 26, no. 2, pp. 127–132
- [17] J. B. Rowe, N. J. Kapolka, G. J. Taghon, W. M. Morgan, and D. G. Isom, “The evolution and mechanism of GPCR proton sensing”. *J. Biol. Chem.*, vol. 296, p. 100167
- [18] W. Klatt, S. Wallner, C. Brochhausen, J. A. Stolwijk, and S. Schreml, “Expression profiles of proton-sensing G-protein coupled receptors in common skin tumors”. *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 15327
- [19] A. Nassios, S. Wallner, S. Haferkamp, C. Klingelhöffer, C. Brochhausen, and S. Schreml, “Expression of proton-sensing G-protein-coupled receptors in selected skin tumors”. *Exp. Dermatol.*, vol. 28, no. 1, pp. 66–71
- [20] B. I. Tóth, A. Oláh, A. G. Szöllösi, and T. Bíró, “TRP channels in the skin”. *Br. J.*

- Pharmacol.*, vol. 171, no. 10, pp. 2568–2581
- [21] B. Nilius, J. Vriens, J. Prenen, G. Droogmans, and T. Voets, “TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity”. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 286, no. 2, pp. C195–205
- [22] C. Fusi *et al.*, “Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is downregulated in keratinocytes in human non-melanoma skin cancer”. *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 9, pp. 2408–2417
- [23] J. K. Bujak, D. Kosmala, I. M. Szopa, K. Majchrzak, and P. Bednarczyk, “Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel”. *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 1087
- [24] W. H. Lee *et al.*, “TRPV4 Regulates Breast Cancer Cell Extravasation, Stiffness and Actin Cortex”. *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 27903
- [25] T. W. Sherwood, E. N. Frey, and C. C. Askwith, “Structure and activity of the acid-sensing ion channels”. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 303, no. 7, pp. C699–C710
- [26] Y. Huang, N. Jiang, J. Li, Y.-H. Ji, Z.-G. Xiong, and X. Zha, “Two aspects of ASIC function: Synaptic plasticity and neuronal injury”. *Neuropharmacology*, vol. 94, pp. 42–48,
- [27] E. Boscardin, O. Alijevic, E. Hummler, S. Frateschi, and S. Kellenberger, “The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na⁺ channel (ENaC): IUPHAR Review 19”. *Br. J. Pharmacol.*, vol. 173, no. 18, pp. 2671–2701
- [28] Q. Gu and L.-Y. Lee, “Acid-Sensing Ion Channels and Pain”. *Pharm. Basel Switz.*, vol. 3, no. 5, pp. 1411–1425
- [29] Giorgio Santoni, Sara Caprodossi, Valerio Farfariello, Sonia Liberati, Angela Gismondi, Conduelo Amantini, “Antioncogenic Effects of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in the Progression of Transitional Urothelial Cancer of Human Bladder.”
- [31] B. K. Berdiev *et al.*, “Acid-sensing ion channels in malignant gliomas”. *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 17, pp. 15023–15034,
- [32] Y. Li *et al.*, “Alteration of ASIC1 expression in clear cell renal cell carcinoma”. *OncoTargets Ther.*, vol. 8, pp. 2121–2127
- [33] L. V. Weber *et al.*, “Expression and functionality of TRPV1 in breast cancer cells”. *Breast Cancer Dove Med. Press*, vol. 8, pp. 243–252
- [34] C. Kalogris *et al.*, “Expression of transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) in urothelial cancers of human bladder: relation to clinicopathological and molecular parameters”. *Histopathology*, vol. 57, no. 5, pp. 744–752
- [35] W. H. Vila-Carriles *et al.*, “Surface Expression of ASIC2 Inhibits the Amiloride-sensitive Current and Migration of Glioma Cells”. *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 28, pp. 19220–19232
- [36] S. C. Gupta *et al.*, “Regulation of breast tumorigenesis through acid sensors”. *Oncogene*, vol. 35, no. 31, pp. 4102–4111
- [37] X.-Y. Liu *et al.*, “Knockdown of ASIC2a subunit aggravates injury of rat C6 glioma cells in acidosis”. *J. Physiol. Biochem.*, vol. 67, no. 2, pp. 275–281
- [38] Z.-H. Zhou *et al.*, “The acid-sensing ion channel, ASIC2, promotes invasion and metastasis of colorectal cancer under acidosis by activating the calcineurin/NFAT1 axis”. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 36, no. 1, p. 130
- [39] C. Cui, R. Merritt, L. Fu, and Z. Pan, “Targeting calcium signaling in cancer therapy”. *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 7, no. 1, pp. 3–17
- [40] R. Marincsák *et al.*, “Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue”. *Oral Dis.*, vol. 15, no. 5, pp. 328–335
- [41] F. Kiss, K. Pohóczky, A. Szállási, and Z. Helyes, “Transient Receptor Potential (TRP)

- Channels in Head-and-Neck Squamous Cell Carcinomas: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potentials”. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 17
- [42] H. A. Deveci, M. Nazırođlu, and G. Nur, “5-Fluorouracil-induced mitochondrial oxidative cytotoxicity and apoptosis are increased in MCF-7 human breast cancer cells by TRPV1 channel activation but not *Hypericum perforatum* treatment”. *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 439, no. 1–2, pp. 189–198
- [43] M. Park *et al.*, “Do TRPV1 antagonists increase the risk for skin tumourigenesis? A collaborative in vitro and in vivo assessment”. *Cell Biol. Toxicol.*, vol. 34, no. 2, pp. 143–162,
- [44] R. Huang *et al.*, “Recurrent activations of transient receptor potential vanilloid-1 and vanilloid-4 promote cellular proliferation and migration in esophageal squamous cell carcinoma cells”. *FEBS Open Bio*, vol. 9, no. 2, pp. 206–225
- [45] H. Wang *et al.*, “TRPV4 Overexpression Promotes Metastasis Through Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer and Correlates with Poor Prognosis”. *OncoTargets Ther.*, vol. 13, pp. 8383–8394
- [46] J. M. Hope, J. D. Greenlee, and M. R. King, “Mechanosensitive Ion Channels: TRPV4 and P2X7 in Disseminating Cancer Cells”. *Cancer J. Sudbury Mass*, vol. 24, no. 2, pp. 84–92,

6. Anhang

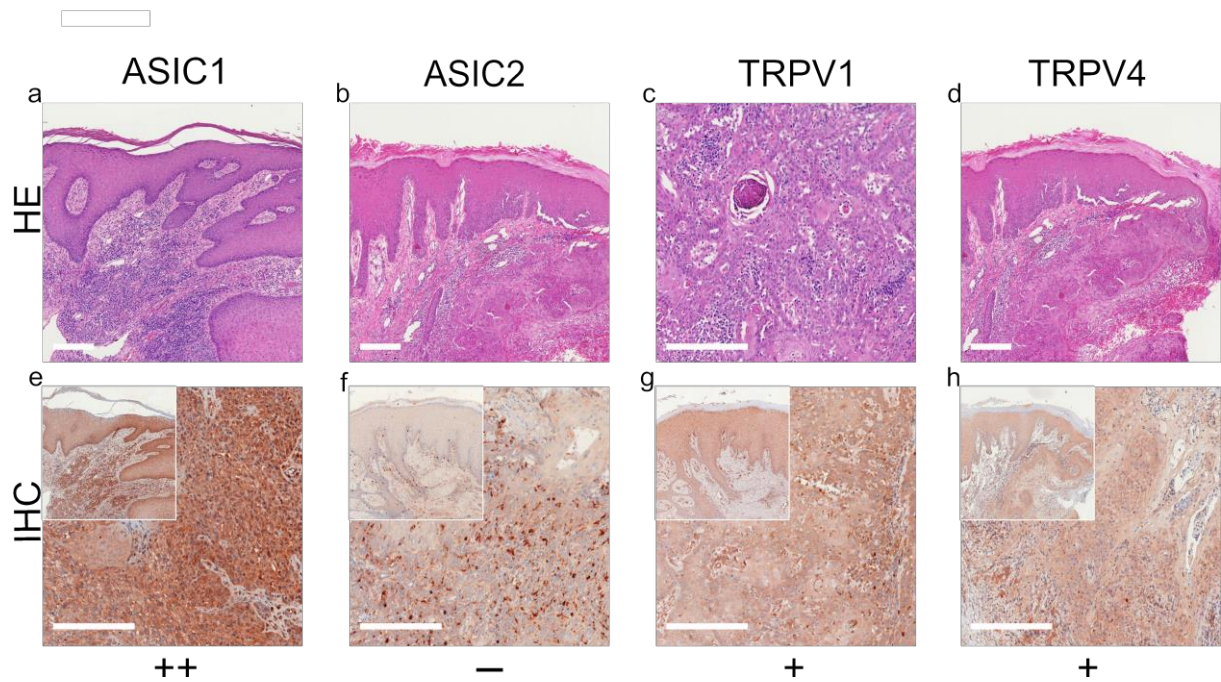


Abbildung 1. Immunhistochemie von SCC.

Immunhistochemische Färbung für ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 an SCC-Gewebe. (a-d) H&E-Färbung, (e-h) immunhistochemische Färbung, die eingefügten kleineren Bilder oben links stellen eine zweifach größere Perspektive dar. Maßstabsbalken entsprechen 200 μm . (a-h) Patient 8. Dieses SCC zeigt keine Expression von ASIC2, nur einige peritumorale Lymphozyten erscheinen positiv. Die Tumorzellen zeigen eine schwache, positive Expression von TRPV1 und TRPV4. ASIC1 wird von den Tumorzellen stark exprimiert. Weitere Färbungen von anderen SCCs finden Sie in den ergänzenden Abbildungen S1-S3 der angehängten Publikation.

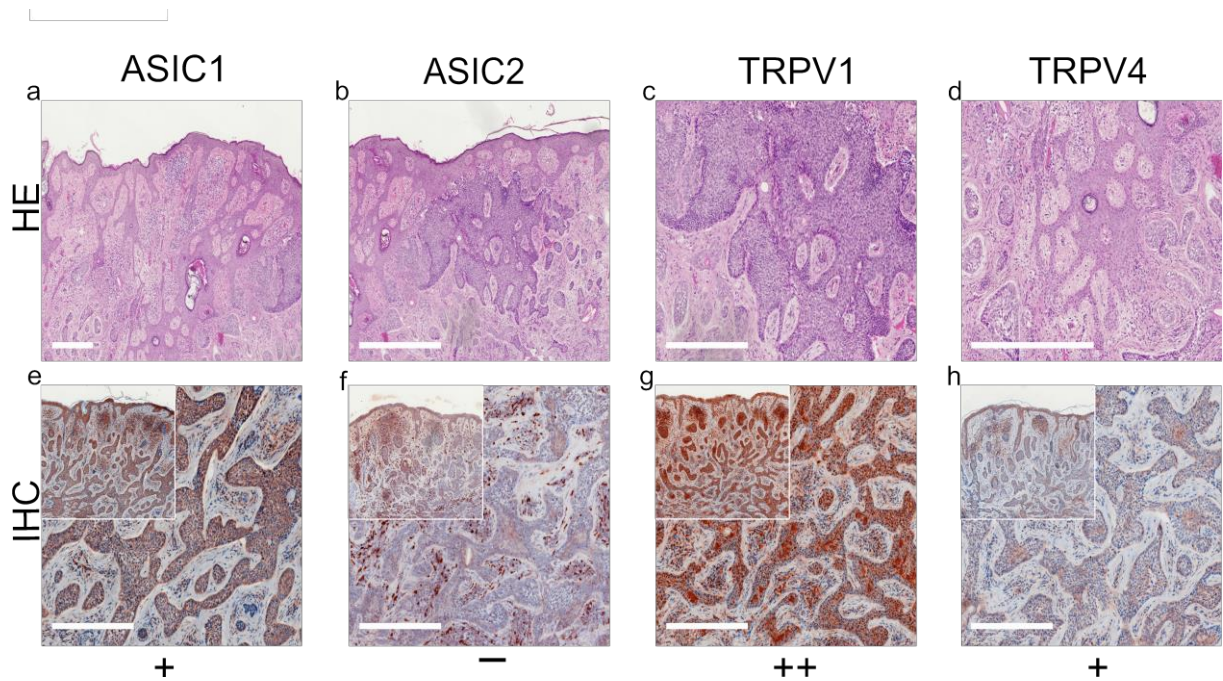


Abbildung 2. Immunhistochemie von BCC.

Immunhistochemische Färbung für ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 an BCC-Gewebe. (a-d) H&E-Färbung, (e-h) immunhistochemische Färbung, die eingefügten kleineren Bilder oben links stellen eine zweifach größere Perspektive dar. Maßstabsbalken entsprechen 200 μm . (a-h) Patient 10. Dieses BCC zeigt eine starke Expression von ASIC1 und TRPV1. Die Expression von TRPV4 ist schwach positiv, ASIC2 wird allerdings nicht exprimiert. Für weitere Färbungen anderer BCCs, siehe ergänzende Abbildungen S4-S7 der angehängten Publikation.

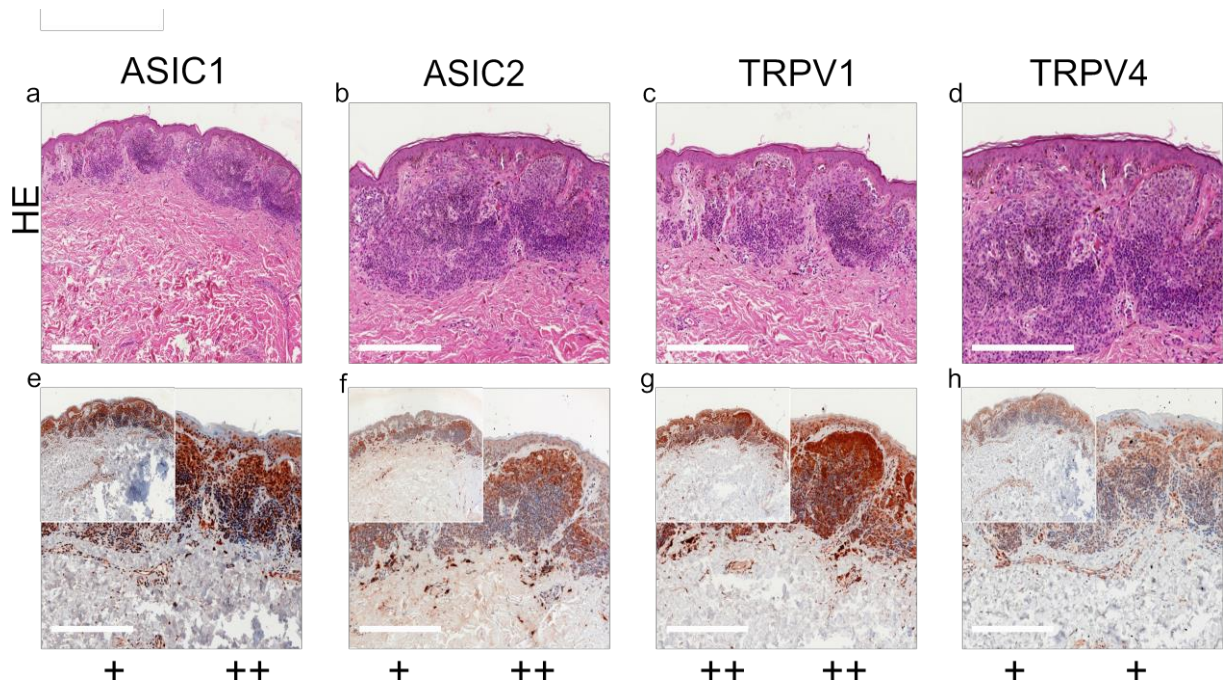


Abbildung 3. Immunhistochemie von NCN.

Immunhistochemische Färbung für ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 an NCN-Gewebe. (a-d) H&E-Färbung, (e-h) immunhistochemische Färbung, die eingefügten kleineren Bilder oben links stellen eine zweifach größere Perspektive dar. Maßstabsbalken entsprechen 200 µm. (a-h) Patient 14. Dieses NCN zeigt eine schwach positive Expression von ASIC1, ASIC2 und TRPV4 in den epidermalen Anteilen. TRPV1 ist in der Epidermis stark exprimiert. Im dermalen Bereich zeigen ASIC1, ASIC2 und TRPV1 eine starke Expression, während TRPV4 eine schwache Färbung aufweist. Interessanterweise weist dieses NCN für alle Kanäle eine abnehmende Expression im tieferen dermalen Tumorgewebe auf. Für weitere Färbungen anderer NCN, siehe ergänzende Abbildungen S8-S11 der angehängten Publikation.

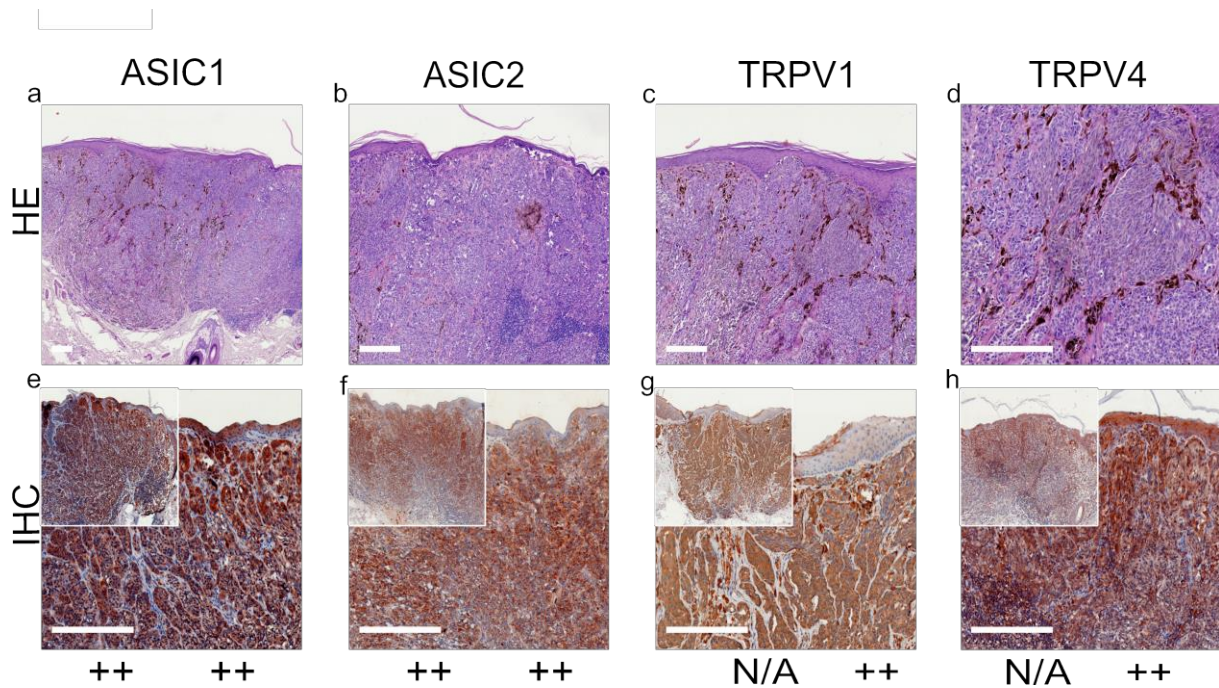


Abbildung 4. Immunhistochemie von MM.

Immunhistochemische Färbung für ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 in MM-Gewebe. (a-d) Histochemische H&E-Färbung, (e-h) immunhistochemische Färbung, die eingefügten kleineren Bilder oben links stellen eine zweifach größere Perspektive dar. Maßstabsbalken entsprechen 200 μm . (a-h) Patient 30. Dieses MM zeigt eine stark positive epidermale Expression von ASIC1 und ASIC2. In der Dermis zeigen ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 eine signifikant hohe Expression. Für weitere Färbungen anderer MM, siehe ergänzende Abbildungen S12-S15 der angehängten Publikation.

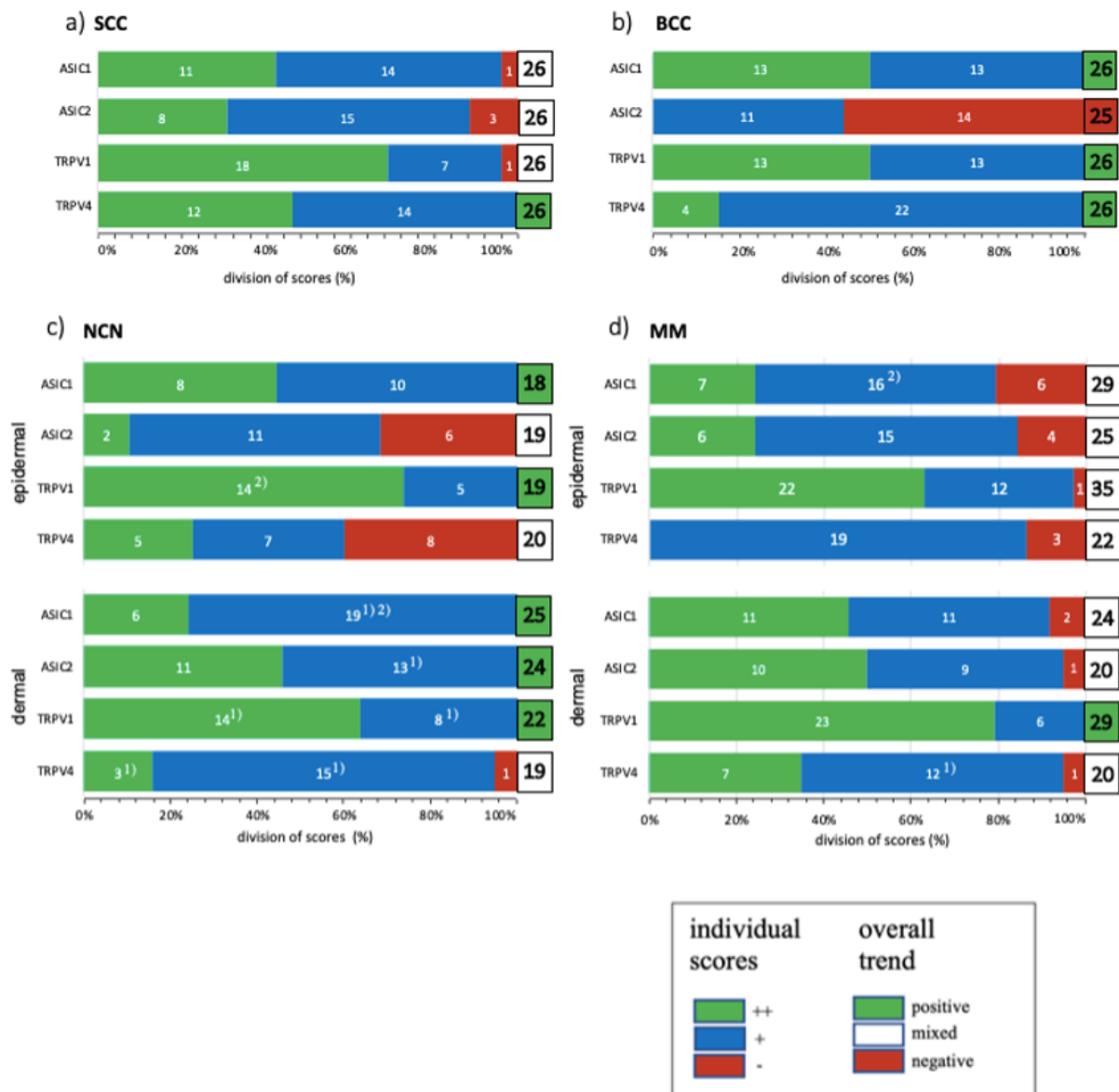


Abbildung 5. Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Gewebeschnitte- und TMA-Scores für ASIC1, ASIC2, TRPV1 und TRPV4 auf (a) SCC, (b) BCC, (c) NCN und (d) MM.

++/grüner Balken: stark positive Färbung mit >80% der Zellen positiv und/oder die Färbeintensität ist hoch; +/blauer Balken: 20-80% der Zellen zeigen eine schwach positive/teilweise positive Reaktion; -/roter Balken: <20% der Zellen mit schwacher Färbung (=negative Reaktion). NCN und MM sind in epidermale und dermale Anteile unterteilt. Die Zahlen in den Balken stehen für das Auftreten des jeweiligen Scores. Hochgestellte Zahlen geben zusätzliche Informationen: (1) Einige Proben zeigen eine abnehmende Expression im tieferen dermalen Tumorgewebe. (2) Einzelne Tumorzellen sind stark positiv gefärbt, andere erscheinen negativ, so dass sich insgesamt ein teilweise positiver Score (+) ergibt. Der Gesamttrend wird durch ein

grünes, weißes oder rotes Kästchen mit der Anzahl der untersuchten Proben angezeigt; grünes Kästchen: allgemein positive Reaktionen; weißes Kästchen: gemischte Reaktionen; rotes Kästchen: überwiegend negative Reaktionen. Weitere Informationen zu den einzelnen TMA-Scores finden Sie in den ergänzenden Tabellen S2-S5 in der angehängten Publikation.



Article

Expression Profiles of ASIC1/2 and TRPV1/4 in Common Skin Tumors

Kirsten Ackermann ¹, Susanne Wallner ¹, Christoph Brochhausen ² and Stephan Schreml ^{1,*}

¹ Department of Dermatology, University Medical Center Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; kirsten.ackermann@gmx.net (K.A.); susanne.wallner@ukr.de (S.W.)

² Institute of Pathology, University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; christoph.brochhausen@ukr.de

* Correspondence: stephan.schreml@ukr.de

Abstract: The acid-sensing ion channels ASIC1 and ASIC2, as well as the transient receptor potential vanilloid channels TRPV1 and TRPV4, are proton-gated cation channels that can be activated by low extracellular pH (pH_e), which is a hallmark of the tumor microenvironment in solid tumors. However, the role of these channels in the development of skin tumors is still unclear. In this study, we investigated the expression profiles of ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in malignant melanoma (MM), squamous cell carcinoma (SCC), basal cell carcinoma (BCC) and in nevus cell nevi (NCN). We conducted immunohistochemistry using paraffin-embedded tissue samples from patients and found that most skin tumors express ASIC1/2 and TRPV1/4. Striking results were that BCCs are often negative for ASIC2, while nearly all SCCs express this marker. Epidermal MM sometimes seem to lack ASIC1 in contrast to NCN. Dermal portions of MM show strong expression of TRPV1 more frequently than dermal NCN portions. Some NCN show a decreasing ASIC1/2 expression in deeper dermal tumor tissue, while MM seem to not lose ASIC1/2 in deeper dermal portions. ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in skin tumors might be involved in tumor progression, thus being potential diagnostic and therapeutic targets.

Citation: Ackermann, K.; Wallner, S.; Brochhausen, C.; Schreml, S. Expression Profiles of ASIC1/2 and TRPV1/4 in Common Skin Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6024. <https://doi.org/10.3390/ijms22116024>

Academic Editors: Balazs Istvan Toth and Thomas Voets

Received: 3 May 2021
Accepted: 28 May 2021
Published: 2 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: melanoma; squamous cell carcinoma; basal cell carcinoma; proton-sensitive ion channels

1. Introduction

Melanoma and non-melanoma skin cancers (NMSCs) are the most prevalent cancers among the white population, exhibiting an increasing incidence rate worldwide [1]. The WHO counts between 2 to 3 million new cases of NMSC per year, being 18–20 times higher than melanoma. However, due to its risk of metastasis, the malignant melanoma (MM) is responsible for 90% of deaths among skin cancers, with a yearly increasing incidence rate between 4 and 6% [2]. The group of NMSC includes basal cell carcinomas (BCCs), which account for around 80% of NMSC, and squamous cell carcinomas (SCCs), with around 20% of NMSC. Only 1% can be classified as other skin tumors [3]. Nevus cell nevi (NCN) are benign neoplasms, but about 10–30% of melanomas arise from NCN [4]. Even if the mortality rate and metastatic potential of NMSCs are low, those tumors lead to enormous morbidity and extensive costs for our health system [5]. Therefore, it is important to find new therapeutic targets in MM and NMSC for future treatments.

Tumor formation changes the physical microenvironment in the tissue. Little vascular perfusion, regional hypoxia and the subsequent anaerobic glucose metabolism lead to lactic acid and, hence, to extracellular acidosis in tumors with extracellular pH (pH_e) as low as 6.5 [6]. Furthermore, membrane-bound transporters (monocarboxylate transporters MCTs 1–4, carboanhydrases CA2/9/12, sodium hydrogen exchanger 1 NHE, vacuolar

type ATPases V-ATPases, sodium bicarbonate symporters) contribute to the acidified tumor microenvironment (TME) [7]. In physiological conditions, the pH_e is higher (7.2–7.4) than the intracellular pH_i (6.9–7.2), whereas in a tumor environment, the so-called reversed pH gradient ($pH_e < pH_i$) develops [8]. This reversed pH gradient (or inside-out pH gradient) is harmful to normal cells, as cellular acidification in general leads to apoptosis. In tumor cells, however, it causes migration and invasion and, hence, benefits tumor growth [6]. In contrast to normal cells, tumor cells can adjust to survive in low pH by increasing glycolytic activity and expression of proton transporters, which stabilize intracellular pH [9]. Several of these transporters and pumps have already been detected to play a role in the maintenance of TME, such as carbonic anhydrases (CA2, CA9, CA12), V-ATPases (vacuolar-type H^+ ATPases), Na^+/HCO_3^- -Co-transporters, the monocarboxylate transporters MCT 1–4 or Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1) [10]. Through changes in their expression or activity, these plasma membrane proteins promote H^+ efflux, thus leading to the typical alkaline pH_i and the acidic pH_e in tumor cells [10]. Cancer cells need to detect the dysregulated pH by sensors to mediate adequate cellular response. Acid-sensing proteins transmit signals to the cytoplasm and nucleus, hence influencing intracellular signal transduction pathways and gene expression [10]. One group of these sensors is the proton-sensitive G-protein coupled receptors (pH-GPCRs) [11]. We recently published first data on the expression profiles of pH-GPCRs in various skin tumors [8,12].

Other proton-sensing sensors in the plasma membrane are the transient receptor potential vanilloid channels (TRPVs) as well as the acid-sensitive ion channels (ASICs). Little is, however, known on their expression and role in skin tumors.

Transient receptor vanilloid potential ion channels (TRPVs) are a group of subfamilies numerous and diversely expressed in several tissues and organs, where they perform pleiotropic physiological and pathological functions. These nonselective cation channels were originally characterized as “polymodal cellular sensors” in neurons, being activated by chemical, physical and thermal stimuli [13]. A subgroup of these channels are the Ca^{2+} -permeable, nonselective thermo-TRPs TRPV1 and TRPV4 [14]. These proton-sensing proteins are both activated by extracellular acidity [10]. Furthermore, TRPV1 is stimulated by vanilloid compounds (capsaicin and resiniferatoxin), injurious heat ($\geq 43^\circ C$) and some eicosanoids [15]. TRPV4 is activated by lower temperature ($>24^\circ C$) and by hypoosmotic stimulation [15]. Apart from neuronal cells, the expression of TRPV1 and TRPV4 has been proven in a wide range of tissues, amongst others in epidermal keratinocytes [16]. Moreover, they play a role in the regulation of cell apoptosis and survival by regulating calcium signaling, which is essential for the apoptosis-driven differentiation program of keratinocytes [16]. TRPV1 has been found within the skin in epidermal and hair follicle keratinocytes, dermal mast cells, in sebaceous glands and dendritic cells [15]. TRPV4 contributes additionally to cell survival after skin exposure to heat and to the control of skin permeability barrier by modulating tight junction proteins [17]. Its activation promotes barrier regeneration, which was demonstrated by the fact that an inferior epidermal barrier (e.g., untight cell–cell junctions) was found in TRPV4-deficient mice [13]. TRPV4 has been identified in basal and suprabasal keratinocytes [15].

Acid-sensing ion channels (ASICs) are cation channels that belong to the degenerin/epithelial Na^+ channel (DEG/ENaC) superfamily and can be activated by extracellular acidification. They are mostly expressed in the central nervous system and in peripheral sensory neurons. There are seven subunits from four genes (namely ASIC1a, ASIC1b1, ASIC1b2, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 and ASIC4) [10]. Each subunit comprises two transmembrane domains, connected with a large extracellular cysteine-rich loop, which are trimeric assemblies. ASIC1 is Na^+ - and Ca^{2+} -permeable, whereas other types of ASICs are only permeable to Na^+ [6]. ASICs have different functions in the peripheral and central nervous system in physiological as well as in pathological processes. In the CNS, ASIC1 channels participate in neuroplasticity, regulation of fear behaviors, learning, memory functions and pain sensation [18]. ASIC2 plays a role in retinal integrity and neuronal viability in cerebral ischemia [19]. In the peripheral nervous system, they are involved in

nociception and mechano-sensation [20]. More relevant for the current study, however, is the fact that these ASICs are also expressed in non-neuronal cells (e.g., keratinocytes, bone, dendritic cells, vascular smooth muscle [6]), where they contribute to pH homeostasis, cellular migration and inflammation [21].

There are a few reports about the expression and the functions of TRPVs and ASICs in other tumors [22]. Nevertheless, there is no sufficient information about their presence and function in skin tumors. In this study, we investigate the expressions of ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in squamous cell carcinoma (SCC), basal cell carcinoma (BCC), malignant melanoma (MM) and in nevus cell nevi (NCN).

2. Results

We summarized our results of standard histological samples and TMAs with about 20–30 samples per tumor type. Figures 1–4 show representative IHC staining results, and the other samples are depicted in the Supplementary Figures S1–S18. An overview of staining results/scores for regular IHC and TMA is shown in Figure 5. Additional TMA and scores, as well as general patient information, is given in Supplementary Figure S16 and Supplementary Tables S1–S5.

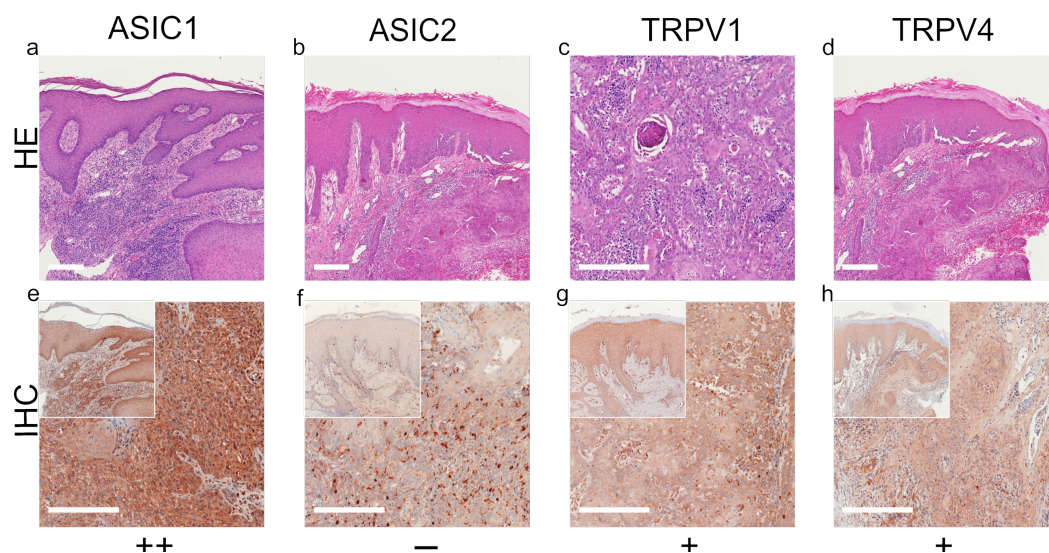


Figure 1. Immunohistochemistry of SCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in SCC tissue. (a–d) H&E staining, (e–h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μ m. (a–h) Patient 8. This SCC shows no expression of ASIC2, only some peritumoral lymphocytes appear positive. The tumor cells show a weak, positive expression of TRPV1 and TRPV4. ASIC1 is expressed strongly on tumor cells. For more stainings of other SCCs, see Supplementary Figures S1–S3.

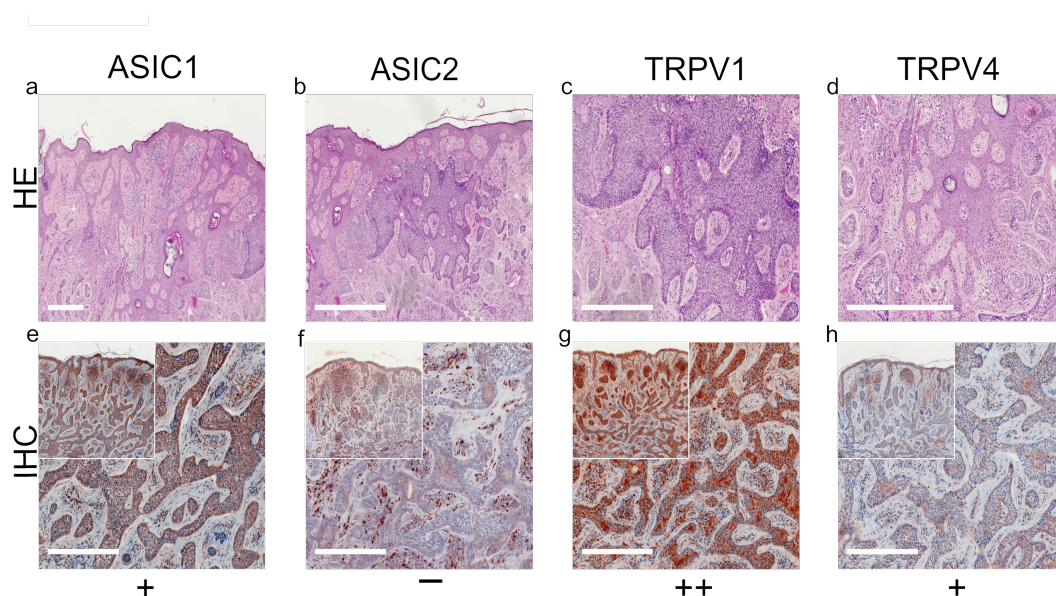


Figure 2. Immunohistochemistry of BCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in BCC tissue. (a–d) H&E staining, (e–h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures give an overview. Scale bars represent 200 μm. (a–h) Patient 10. This BCC shows a strong expression of ASIC1 and TRPV1. The expression of TRPV4 is weak and positive, but this BCC shows no expression of ASIC2. For more stainings of other BCCs, see Supplementary Figures S4–S7.

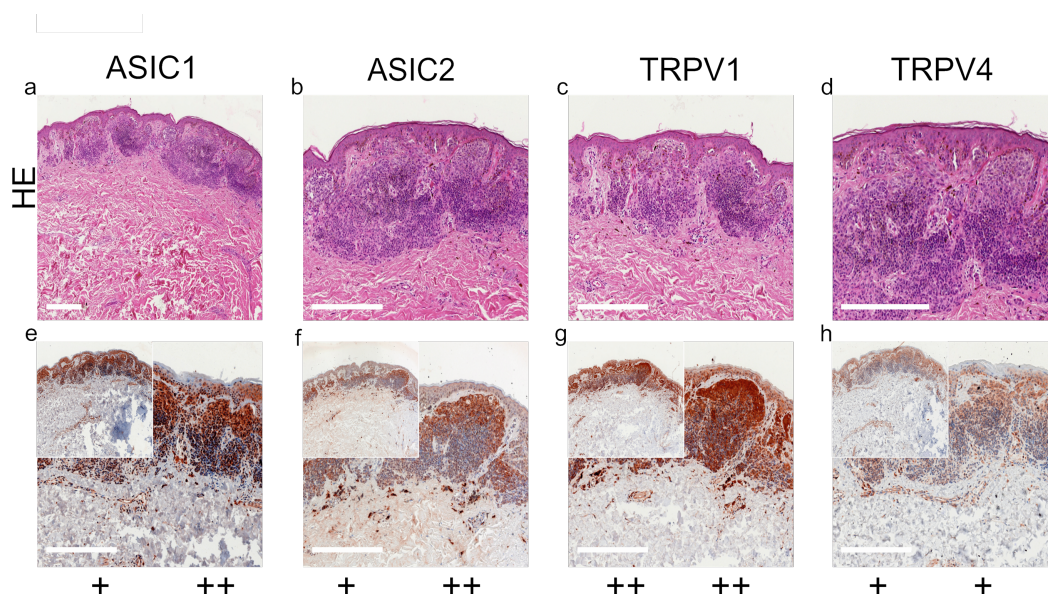


Figure 3. Immunohistochemistry of NCN. (a–d) H&E staining, (e–h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures show an overview. Scale bars represent 200 μm. (a–h) Patient 14. This NCN shows weak, positive expressions of ASIC1, ASIC2 and TRPV4 on the epidermal sections. TRPV1 is expressed strongly in the epidermis. Regarding the dermal area, ASIC1, ASIC2 and TRPV1 show strong expressions, whereas TRPV4 reveals a weak staining. It has to be mentioned that this NCN shows a decreasing expression in deeper dermal tumor tissue for all channels. For more stainings of other NCN, see Supplementary Figures S8–S11.

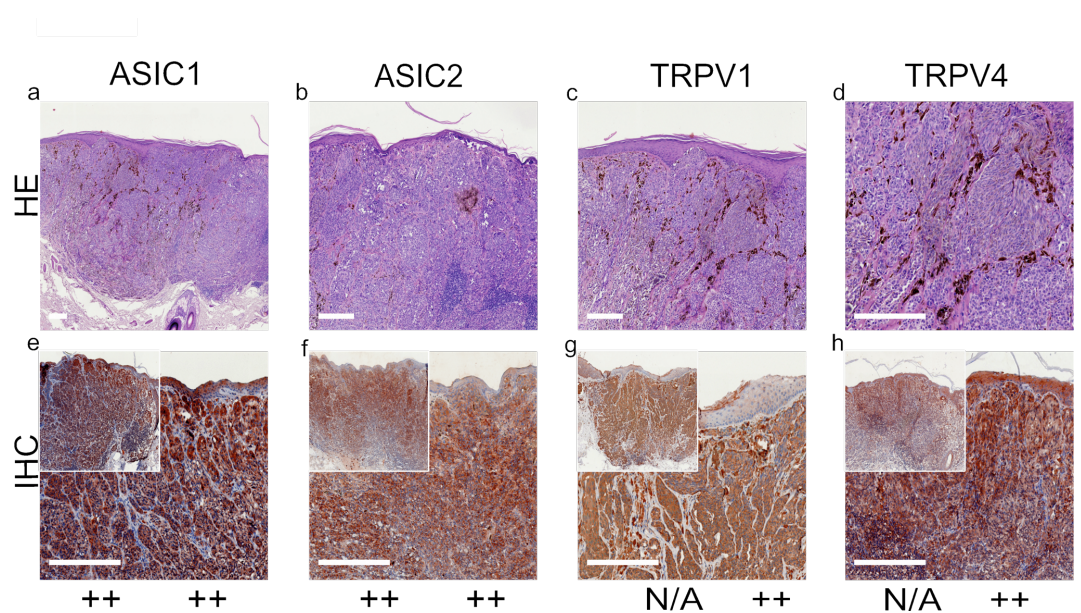


Figure 4. Immunohistochemistry of MM. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in MM tissue. (a–d) Histochemical H&E staining, (e–h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . (a–h) Patient 30. This MM shows a strong positive epidermal expression of ASIC1 and ASIC2. Concerning the dermis, ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 show significantly high expressions. For more stainings of other MM, see Supplementary Figures S12–S15.

ASIC1. A total of 42.4% of the SCC tissues were strong positive, 53.8% were weak positive and only 3.8% showed no expression (Figures 1a,e and 6a, Supplementary Figures S1–S3 first column, Figure S16). Half of the BCC samples showed a strong expression, and the other half was weak positive (Figures 2a,e and 6b, Supplementary Figures S4–S7 first column, Figure S16). The epidermal sections of NCN showed a strong positive staining in 44.4%, whereas in 55.5% we found a weak positive staining. The dermal sections were mainly stained weak positive (76%), the other 24% were strong positive (Figures 3a,e and 6c, Supplementary Figures S8–S11 first column, Figure S16). We observed some nevi (marked with a ¹⁾) with a decreasing expression in deeper dermal tumor tissue. In contrast, MM seem to not lose ASIC1 expression in deeper dermal portions. Epidermal melanoma tissues showed a weak positive staining in 55%, strong positive represented 24% and negative 21%. The dermal MM portions revealed 45.8% of strong positive and 45.8% of weak positive expression. Only 8.4% were negative (Figures 4a,e and 6d, Supplementary Figures S12–S15 first column, Figure S16).

ASIC2. A total of 57.7% of SCCs showed a weak positive or partial expression of ASIC2. A total of 30.8% of SCC exhibited a strong positive expression, whereas 11.5% did not express ASIC2 (Figures 1b,f and 6a, Supplementary Figures S1–S3 second column, Figure S16). In BCC, we observed no expression of ASIC2 in 56%, and 44% revealed a weak expression (Figures 2b,f and 6b, Supplementary Figures S4–S7 second column, Figure S16). The epidermal portions of NCN showed mainly weak positive expression (57.9%); 10.5% of the samples were strong positive and 31.6% were negative. The dermal portions were strong positive in 45.8%, and weak positive in 54.2%. Just as with ASIC1 expression, we also observed a decreasing expression of ASIC2 in deeper dermal tumor tissue (Figures 3b,f and 6c, Supplementary Figures S8–S11 second column, Figure S16). Concerning the epidermal parts of MM, the majority were weak positive (60%), whereas 24% were strong positive and 16% were negative. In dermal MM portions, half of our tissues expressed ASIC2 strongly (50%), 45% expressed it weakly and only 5% showed no

expression (Figures 4b,f and 6d, Supplementary Figures S12–S15 second column, Figure S16).

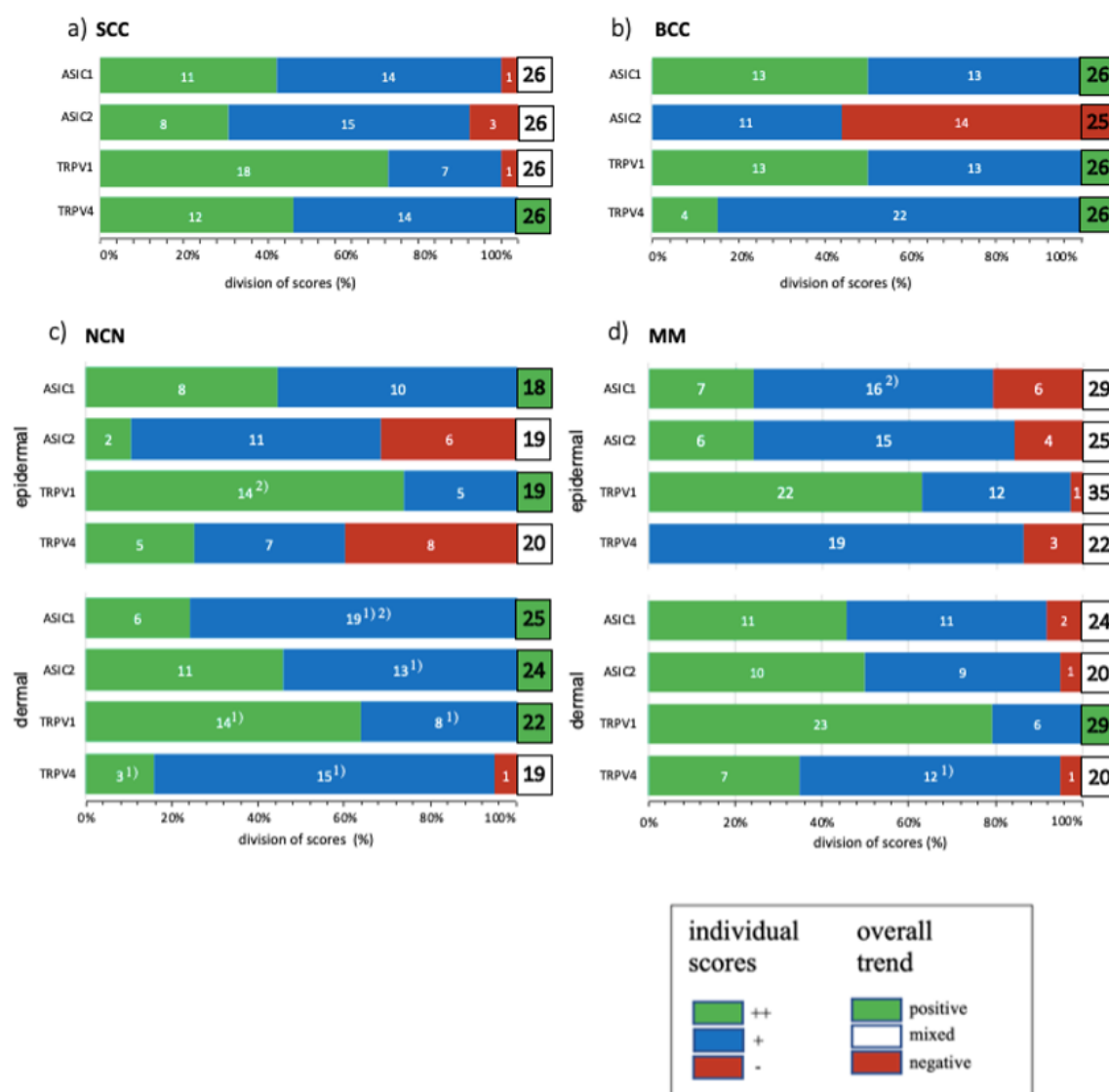


Figure 5. Summary of standard immunohistochemical and TMA score results for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 on (a) SCC, (b) BCC, (c) NCN and (d) MM. ++/green bar: strong positive staining with >80% of cells positive and/or staining intensity is high; +/blue bar: 20–80% of cells show a weak positive/partial positive reaction; -/red bar: <20% of cells with weak staining (=negative reaction). NCN and MM are subdivided into epidermal and dermal portions. Numbers in bars represent the occurrence of the particular score. Superscript numbers give additional information: (1) some samples showed a decreasing expression in deeper dermal tumor tissue. (2) Single tumor cells are stained strong positive, others appear negative, resulting in an overall partial positive score (+). Overall trend is indicated by a green, white or red box with the number of samples investigated; green box: general positive reactions; white box: mixed reactions; red box: mainly negative reactions. For additional information on the individual TMA scores, see Supplementary Tables S2–S5.

TRPV1. In SCC, the majority showed a strong positive expression (69%), 27% exhibited a weak expression and only 4% were negative (Figures 1c,g and 6a, Supplementary Figures S1–S3 third column, Figure S16). In BCC, half of our samples were strong positive,

the other half appeared weak positive (Figures 2c,g and 6b, Supplementary Figures S4–S7 third column, Figure S16). The vast majority of the epidermal as well as the dermal parts of NCN appeared strong positive (epidermal: 73.6%, dermal: 63.6%), the rest was weak positive (epidermal: 26.4%, dermal: 36.4%) (Figures 3c,g and 6c, Supplementary Figures S8–S11 third column, Figure S16). In MM, we also observed strong positive expression in the epidermis in 62.9% and in the dermis in even 79% (Figures 4c,g and 6d, Supplementary Figures S12–S15 third column, Figure S16).

TRPV4. In SCC samples, 46.2% were strong positive for TRPV4, and the rest showed a weak positive expression (Figures 1d,h and 6a, Supplementary Figures S1–S3 fourth column, Figure S16). In BCC, 15.4% revealed a strong positive expression, and 84.6% were weak positive (Figures 2d,h and 6b, Supplementary Figures S4–S7 fourth column, Figure S16). In the epidermal parts of NCN, 40% of the tissue samples were negative, as compared to the majority of samples, with 35% weak positive and 25% strong positive staining. The dermal sections revealed 78.9% weak positive staining, 15.8% strong positive and 5.3% negative expression (Figures 3d,h and 6c, Supplementary Figures S8–S11 fourth column, Figure S16). Concerning MM, we observed no strong positive staining of the epidermis, weak positive staining in 86.3% and no expression in 13.7%. However, the dermal portions of MM showed strong positive results in 35% of tissue samples, 60% were weak positive and only 5% negative (Figures 4d,h and 6d, Supplementary Figures S12–S15 fourth column, Figure S16).

3. Discussion

In our study, we investigated the expressions of ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in common skin tumors, namely SCC, BCC, NCN and MM. Every tumor shows specific expression patterns of the ion channels.

Striking results were that BCCs are often negative for ASIC2, while nearly all SCCs express this marker. Epidermal MM sometimes seem to lack ASIC1 in contrast to NCN. Dermal portions of MM show strong expression of TRPV1 more frequently than dermal NCN portions. Some NCNs show a decreasing ASIC1/2 expression in deeper dermal tumor tissue, while MMs seem to not lose ASIC1/2 in deeper dermal portions.

3.1. ASIC1

Concerning the tumor tissues investigated in this study, ASIC1 is strongly expressed in SCC, BCC and in NCN in both epidermal and dermal portions. Epidermal and dermal MM varied in expression levels. Even though in the literature there is little information about the expression of ASIC1 in melanomas and NMSC, the role in cancer progression has been proven in other tissues. In malignant glioma ASIC1 plays a role in the growth and migration of the tumor cells [23]. Gupta et al. detected that ASIC1 contributes to breast cancer pathogenesis and that ASIC1 inhibitors lead to a significant reduction in tumor growth in mice [24]. Even in human lung adenocarcinoma cells (cell line A549) ASIC1s might be a prognostic marker [6]. Taking these considerations and our results together, ASIC1 might serve as a potential therapeutic target, but further functional studies are required to fully understand the role of ASIC1 in tumor progression.

3.2. ASIC2

ASIC2 shows a negative expression profile in BCC, whereas the dermal portion of NCN is strongly expressed. These inhomogeneous results mirror previous knowledge concerning ASIC2 in other tumors. ASIC2 being less expressed is consistent with findings by Berdiev et al., who investigated ASIC2 in malignant gliomas [23]. The authors found that ASIC2 is not expressed in the plasma membrane of glial cells, whereas ASIC1 is indeed expressed on these tumor cells, analogous to our findings in BCC. According to them, ASIC1 and ASIC2 are co-expressed in normal cells, and the lack of ASIC2 in tumor cells leads to a large inward cation current. Inhibiting this current reduces glioma growth

and cell migration [25]. It remains to be investigated if these voltage-independent cation currents present in gliomas are also existent in BCC, making the inhibition of this conductance a potential therapeutic target. Our results regarding the positive expression of ASIC2 in dermal NCN are in accordance with findings by Zhou et al. They detected an up-regulation of ASIC2 in colorectal cancer, leading to increased cell proliferation, whereas a knockdown had the opposite effect [26].

3.3. TRPV1

In all of our investigated tumors, expression of TRPV1 was high. As mentioned before, TRPV1 is associated with the processes of inflammation and calcium signaling [16]. As both chronic inflammation as well as abnormal calcium signaling play a role in tumorigenesis, it seems plausible that TRPV1 is involved in tumor progression. Marincsák et al. detected a drastic elevated expression of TRPV1 in SCC of the human tongue and in pre-cancerous lesions [27]. Additionally, in other head-and-neck SCC localized on the oral floor or the gingiva, TRPV1 expression is upregulated [28]. To investigate the effect of TRPV1 antagonists on skin tumor formation, Park et al. treated TRPV1 in keratinocytes with competitive antagonists (AMG-9810 and SB-705498) to potentially use TRPV1 as a pharmacological target, but they could not find skin tumor promotion in epidermal keratinocytes treated by the antagonists [29]. Research linking TRPV1 to carcinogenesis treatment needs to be further conducted, as the evidence from the literature seems controversial so far. Thus, even if we could show that TRPV1 shows a higher expression level in all our investigated tumors, further studies need to be conducted to better understand the exact role of TRPV1 in skin tumor formation to use it as a potential therapeutic target.

3.4. TRPV4

TRPV4 is overexpressed in SCC, and in BCC it also shows a positive expression profile. In MM it shows mixed reactions, and in the dermal portion of NCN negative expression is predominant. Previous studies reported that TRPV4 was involved in tumorigenesis in different kinds of cancers, such as in esophageal squamous cell carcinoma, where we can see an upregulation of TRPV4 [30]. Huang et al. activated TRPV4 in esophageal SCC, which resulted in cellular migration of the tumor cells [30]. Additionally, in gastric cancer TRPV4 is upregulated and is even associated with higher tumor invasion, lymph node metastasis and poor survival [31]. Contradictory to our results, another research group detected a downregulation of TRPV4 in specific NMSC, as Bowen's disease (BD), solar keratosis (SK), and also BCC and SCC [15]. We cannot support these findings, as our stainings deliver positive and even higher expression of TRPV4 in SCC and BCC compared to normal keratinocytes. Based on this, it is plausible to speculate that the expression of TRPV4 (as well as the other channels) varies between patients, types and subtypes of cancer and micro- and macroenvironments.

In conclusion, ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 are expressed by most common skin tumors. However, there are some interesting expression patterns and differences, as noted above. Our findings need to be reinforced by a larger sample size, RNA expression analysis (e.g., RNAScope) and by functional studies that investigate the precise roles of the ion channels in tumor formation. This could potentially lead to drugs that target the investigated ion channels in order to manipulate the TMA and/or the cellular response towards the inside-out pH gradient in solid skin cancers.

4. Materials and Methods

For our study, we utilized five standard paraffin-embedded tissue samples and a further 20–30 tissue microarray (TMA) samples per tumor entity, which were provided by the dermatopathological laboratory of the Department of Dermatology, University

Medical Center Regensburg. Staining of normal skin is shown in all figures as well as in Figure S17 separately. As positive controls, we assumed mouse cerebellum for ASIC1 and ASIC2, kidney for TRPV1 and pancreas for TRPV4 (Supplementary Figure S18). For negative controls, we used ovary for ASIC1, prostate for ASIC2, uterus for TRPV1 and liver for TRPV4 (Supplementary Figure S18).

General patient information is shown in Supplementary Table S1. The investigated tissue samples were from biopsies older than 10 years, hence free to use according to German legislation.

4.1. Immunohistochemistry

Paraffin-embedded and fixed tissues along with the positive and negative controls were sliced and fixed on object plates. To remove the paraffin, the specimen slides were heated for 30 min at 77 °C followed by a descending alcohol series at room temperature: 2 × Xylool, 2 × 100% ethanol, 2 × 96% ethanol, 2 × 70% ethanol, each for 5 min. To prevent false-positive results, the endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 min and washed in distilled water. During the preceding steps, a citrate buffer at pH 6 was cooked for 20 min, so the tissue sections could be immediately boiled for 30 min (except ASIC2). After that, the slides were cooled on ice for 20 min and rested in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. In order to prevent unspecific antibody binding, we blocked the tissue sections with a blocking solution (ZytoChemPlusHRP Kit/Rabbit, Zytomed Systems GmbH, Schwerte, Germany) for 10 min and washed in PBS again. Subsequently, the slides were incubated with the primary antibody in the specific concentration and rested overnight at 4 °C (ASIC1: 1:400, Thermofisher, ASIC1 Polyclonal Antibody, No. PA5-26278; ASIC2: 1:200, Thermofisher, ASIC2 Polyclonal Antibody, No. PA5-26222; TRPV1: 1:500, Thermofisher Polyclonal Antibody, No. PA5-34288; TRPV4: 1:300, Abcam, Anti-TRPV4 Antibody, No. ab219192). The following day, we washed the tissue sections three times with PBS and then incubated the slides with the biotinylated secondary antibody for 30 min. After washing them again three times in PBS, they were incubated with Streptavidin HRP conjugate for 30 min and then washed three times with PBS. In the end, the tissue sections were stained with AEC plus (Dako, No. K 3469). When the required staining of the positive-control occurred, the reaction was stopped by distilled water, and the same procedure was performed with tissue sections and negative controls. To counterstain the sections, we used Mayers Haemalm (Roth, No. T865.3).

The slides were scanned with PreciPoint M8, and the digital images were edited with ViewPoint online (PreciPoint, Freising, Bavaria). Finally, we assessed the staining of the sections by visual inspection, and we scored ++ for strong positive/positive reaction with >80% of cells positive and/or staining intensity is high, + for 20–80% of cells with a weak positive/partial positive reaction, and – for <20% of cells with weak staining (=negative reaction). The epidermis was used as a reference structure to determine scoring.

4.2. Tissue MiroArray (TMA)

By using TMA, we avoided experimental variability by staining multiple tissue samples simultaneously on a single slide. Thereby, we obtained representative tumor material from 20–30 samples per tumor type using the immunostaining protocol above. The range of our samples varied, as some samples did not show tumor cell nests on the sliced tissue and therefore could not be used for evaluation.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22116024/s1>, Figures S1–S3: Immunohistochemistry of SCC, Figures S4–S7: Immunohistochemistry of BCC, Figures S8–S11: Immunohistochemistry of NCN, Figures S12–S15: Immunohistochemistry of MM, Figure S16: Tissue microarray of SCC, BCC, NCN, MM and Met, Figure S17: normal skin stained for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4, Figure S18: Tissue controls for IHC/TMA

staining, Table S1: patient data, Table S2: Scores of TMA-SCC, Table S3: Scores of TMA-BCC, Table S4: Scores of TMA-NCN, Table S5: Scores of TMA-MM.

Author Contributions: Conceptualization, S.S.; methodology, S.W., S.S.; formal analysis, K.A., C.B., S.S.; investigation, K.A., S.W.; writing—original draft preparation, K.A., S.S.; writing—review and editing, C.B.; funding acquisition, S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Research Foundation DFG via grant SCHR 1288/6-1.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The investigated tissue samples were from biopsies older than 10 years, and hence free to use according to German legislation.

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

References

1. Apalla, Z.; Nashan, D.; Weller, R.B.; Castellsagué, X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol. Ther.* **2017**, *7*, 5–19, doi:10.1007/s13555-016-0165-y.
2. Ward, W.H.; Farma, J.M. (Eds.) Contributors. In *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*; Codon Publications: Singapore, 2017; pp. xi–xiv.
3. Eisemann, N.; Waldmann, A.; Geller, A.C.; Weinstock, M.A.; Volkmer, B.; Greinert, R.; Breitbart, E.W.; Katalinic, A. Non-Melanoma Skin Cancer Incidence and Impact of Skin Cancer Screening on Incidence. *J. Investig. Dermatol.* **2014**, *134*, 43–50, doi:10.1038/jid.2013.304.
4. E Damsky, W.; Bosenberg, M. Melanocytic nevi and melanoma: Unraveling a complex relationship. *Oncogene* **2017**, *36*, 5771–5792, doi:10.1038/onc.2017.189.
5. Apalla, Z.; Lallas, A.; Sotiriou, E.; Lazaridou, E.; Ioannides, D. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol. Pract. Concept.* **2017**, *7*, 1–6, doi:10.5826/dpc.0702a01.
6. Wu, Y.; Gao, B.; Xiong, Q.-J.; Wang, Y.-C.; Huang, D.-K.; Wu, W.-N. Acid-sensing ion channels contribute to the effect of extracellular acidosis on proliferation and migration of A549 cells. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, doi:10.1177/1010428317705750.
7. Neri, D.; Supuran, C.T. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 767–777, doi:10.1038/nrd3554.
8. Nassios, A.; Wallner, S.; Haferkamp, S.; Klingelhöffer, C.; Brochhausen, C.; Schreml, S. Expression of proton-sensing G-protein-coupled receptors in selected skin tumors. *Exp. Dermatol.* **2018**, *28*, 66–71, doi:10.1111/exd.13809.
9. Rohani, N.; Hao, L.; Alexis, M.S.; Joughin, B.A.; Krismer, K.; Moufarrej, M.N.; Soltis, A.R.; Lauffenburger, D.A.; Yaffe, M.B.; Burge, C.B.; et al. Acidification of Tumor at Stromal Boundaries Drives Transcriptome Alterations Associated with Aggressive Phenotypes. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1952–1966, doi:10.1158/0008-5472.can-18-1604.
10. Edamaghi, M.; Wojtkowiak, J.W.; Gillies, R.J. pH sensing and regulation in cancer. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 370, doi:10.3389/fphys.2013.00370.
11. Weiß, K.T.; Fante, M.; Köhl, G.; Schreml, J.; Haubner, F.; Kreutz, M.; Haverkamp, S.; Berneburg, M.; Schreml, S. Proton-sensing G protein-coupled receptors as regulators of cell proliferation and migration during tumor growth and wound healing. *Exp. Dermatol.* **2017**, *26*, 127–132, doi:10.1111/exd.13209.
12. Klatt, W.; Wallner, S.; Brochhausen, C.; Stolwijk, J.A.; Schreml, S. Expression profiles of proton-sensing G-protein coupled receptors in common skin tumors. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–12, doi:10.1038/s41598-020-71700-9.
13. Tóth, B.I.; Oláh, A.; Szöllösi, A.G.; Bíró, T. TRP channels in the skin. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 2568–2581, doi:10.1111/bph.12569.
14. Nilius, B.; Vriens, J.; Prenen, J.; Droogmans, G.; Voets, T. TRPV4 calcium entry channel: A paradigm for gating diversity. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2004**, *286*, C195–C205, doi:10.1152/ajpcell.00365.2003.
15. Fusi, C.; Materazzi, S.; Minocci, D.; Maio, V.; Oranges, T.; Massi, D.; Nassini, R. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Is Downregulated in Keratinocytes in Human Non-Melanoma Skin Cancer. *J. Investig. Dermatol.* **2014**, *134*, 2408–2417, doi:10.1038/jid.2014.145.
16. Bujak, J.K.; Kosmala, D.; Szopa, I.M.; Majchrzak, K.; Bednarczyk, P. Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1087, doi:10.3389/fonc.2019.01087.
17. Lee, W.H.; Choong, L.Y.; Mon, N.N.; Lu, S.; Lin, Q.; Pang, B.; Yan, B.; Krishna, V.S.R.; Singh, H.; Tan, T.Z.; et al. TRPV4 Regulates Breast Cancer Cell Extravasation, Stiffness and Actin Cortex. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27903, doi:10.1038/srep27903.
18. Huang, Y.; Jiang, N.; Li, J.; Ji, Y.-H.; Xiong, Z.-G.; Zha, X.-M. Two aspects of ASIC function: Synaptic plasticity and neuronal injury. *Neuropharmacol.* **2015**, *94*, 42–48, doi:10.1016/j.neuropharm.2014.12.010.
19. Boscardin, E.; Alijevic, O.; Hummler, E.; Frateschi, S.; Kellenberger, S. The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na⁺ channel (ENaC): IUPHAR Review 19. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 2671–2701, doi:10.1111/bph.13533.

20. Sherwood, T.W.; Frey, E.N.; Askwith, C.C. Structure and activity of the acid-sensing ion channels. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2012**, *303*, C699–C710, doi:10.1152/ajpcell.00188.2012.
21. Gu, Q.; Lee, L.-Y. Acid-Sensing Ion Channels and Pain. *Pharm.* **2010**, *3*, 1411–1425, doi:10.3390/ph3051411.
22. Santoni, G.; Caprodossi, S.; Farfariello, V.; Liberati, S.; Gismondi, A.; Amantini, C. Antioncogenic Effects of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in the Progression of Transitional Urothelial Cancer of Human Bladder. *ISRN Urol.* **2012**, *2012*, 1–11, doi:10.5402/2012/458238.
23. Berdiev, B.K.; Xia, J.; McLean, L.A.; Markert, J.M.; Gillespie, G.Y.; Mapstone, T.B.; Naren, A.P.; Jovov, B.; Bubien, J.K.; Ji, H.-L.; et al. Acid-sensing Ion Channels in Malignant Gliomas. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15023–15034, doi:10.1074/jbc.m300991200.
24. Gupta, S.C.; Singh, R.; Asters, M.; Liu, J.; Zhang, X.; Pabbidi, M.R.; Watabe, K.; Mo, Y.-Y. Regulation of breast tumorigenesis through acid sensors. *Oncogene* **2016**, *35*, 4102–4111, doi:10.1038/ncr.2015.477.
25. Vila-Carriles, W.H.; Kovacs, G.G.; Jovov, B.; Zhou, Z.-H.; Pahwa, A.K.; Colby, G.; Esimai, O.; Gillespie, G.Y.; Mapstone, T.B.; Markert, J.M.; et al. Surface Expression of ASIC2 Inhibits the Amiloride-sensitive Current and Migration of Glioma Cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 19220–19232, doi:10.1074/jbc.m603100200.
26. Zhou, Z.-H.; Song, J.-W.; Li, W.; Liu, X.; Cao, L.; Wan, L.-M.; Tan, Y.-X.; Ji, S.-P.; Liang, Y.-M.; Gong, F. The acid-sensing ion channel, ASIC2, promotes invasion and metastasis of colorectal cancer under acidosis by activating the calcineurin/NFAT1 axis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 1–12, doi:10.1186/s13046-017-0599-9.
27. Marincsák, R.; I Tóth, B.; Czifra, G.; Márton, I.; Redl, P.; Tar, I.; Tóth, L.; Kovács, L.; Bíró, T. Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis.* **2009**, *15*, 328–335, doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01526.x.
28. Kiss, F.; Pohóczky, K.; Szállási, A.; Helyes, Z. Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Head-and-Neck Squamous Cell Carcinomas: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potentials. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6374, doi:10.3390/ijms21176374.
29. Park, M.; Naidoo, A.A.; Burns, A.; Choi, J.K.; Gatfield, K.M.; Vidgeon-Hart, M.; Bae, I.-H.; Lee, C.S.; Choi, G.; Powell, A.; et al. Do TRPV1 antagonists increase the risk for skin tumourigenesis? A collaborative in vitro and in vivo assessment. *Cell Biol. Toxicol.* **2018**, *34*, 143–162, doi:10.1007/s10565-017-9407-8.
30. Huang, R.; Wang, F.; Yang, Y.; Ma, W.; Lin, Z.; Cheng, N.; Long, Y.; Deng, S.; Li, Z. Recurrent activations of transient receptor potential vanilloid-1 and vanilloid-4 promote cellular proliferation and migration in esophageal squamous cell carcinoma cells. *FEBS Open Bio* **2018**, *9*, 206–225, doi:10.1002/2211-5463.12570.
31. Wang, H.; Zhang, B.; Wang, X.; Mao, J.; Li, W.; Sun, Y.; Yuan, Y.; Ben, Q.; Hua, L.; Qian, A. TRPV4 Overexpression Promotes Metastasis Through Epithelial–Mesenchymal Transition in Gastric Cancer and Correlates with Poor Prognosis. *OncoTargets Ther.* **2020**, *ume 13*, 8383–8394, doi:10.2147/ott.s256918

Supplementary Information:

Supplementary figures:

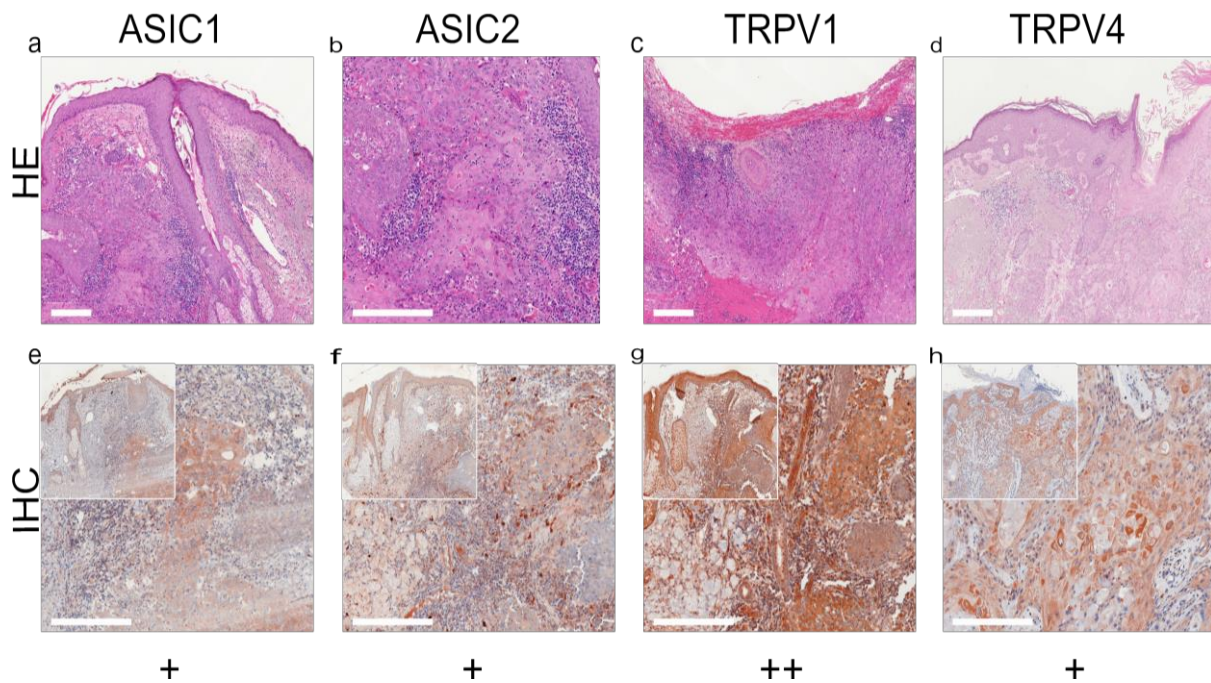


Figure S1 Immunohistochemistry of SCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in SCC tissue. (a-d) H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-c & e-g: patient 7; d, h: patient 1. This SCC shows a weak positive expression of ASIC1 and ASIC2. The expression of TRPV1 is high in tumor cells. For TRPV4, the representative SCC shows a weak expression, even if some tumor cells are stained intensely. For more stainings of other SCC, see supplementary figures S2-S3.

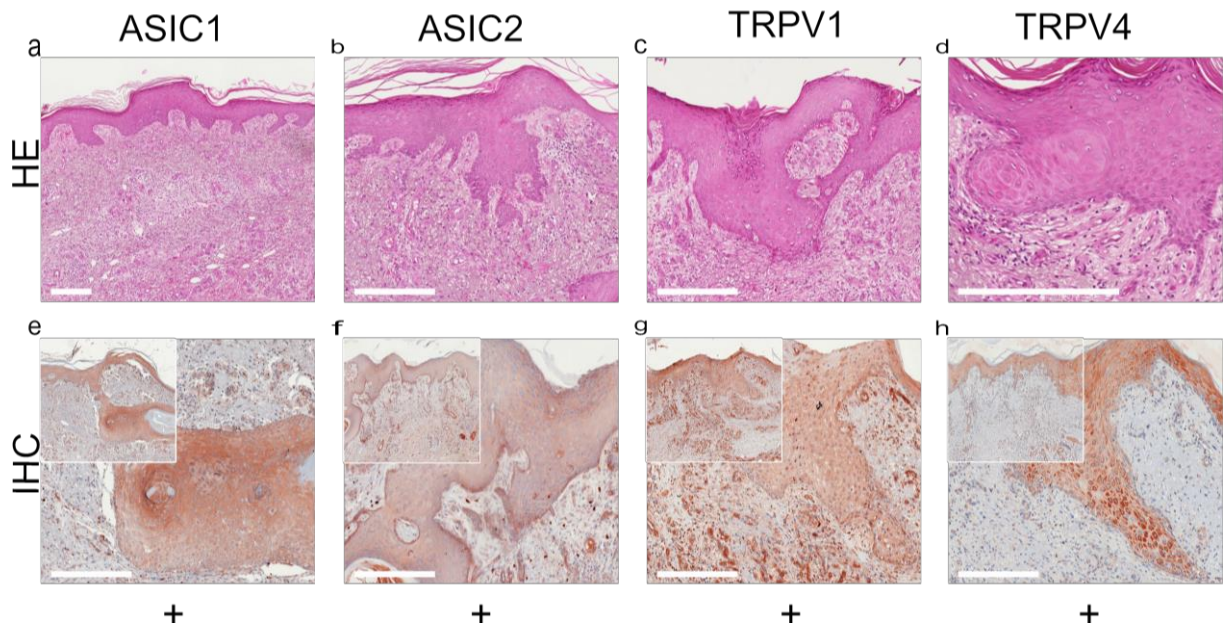


Figure S2. Immunohistochemistry of SCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in SCC tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-h: patient 4. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining. This SCC shows a weak positive staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4. For more stainings of other SCC, see figures S1, S3.

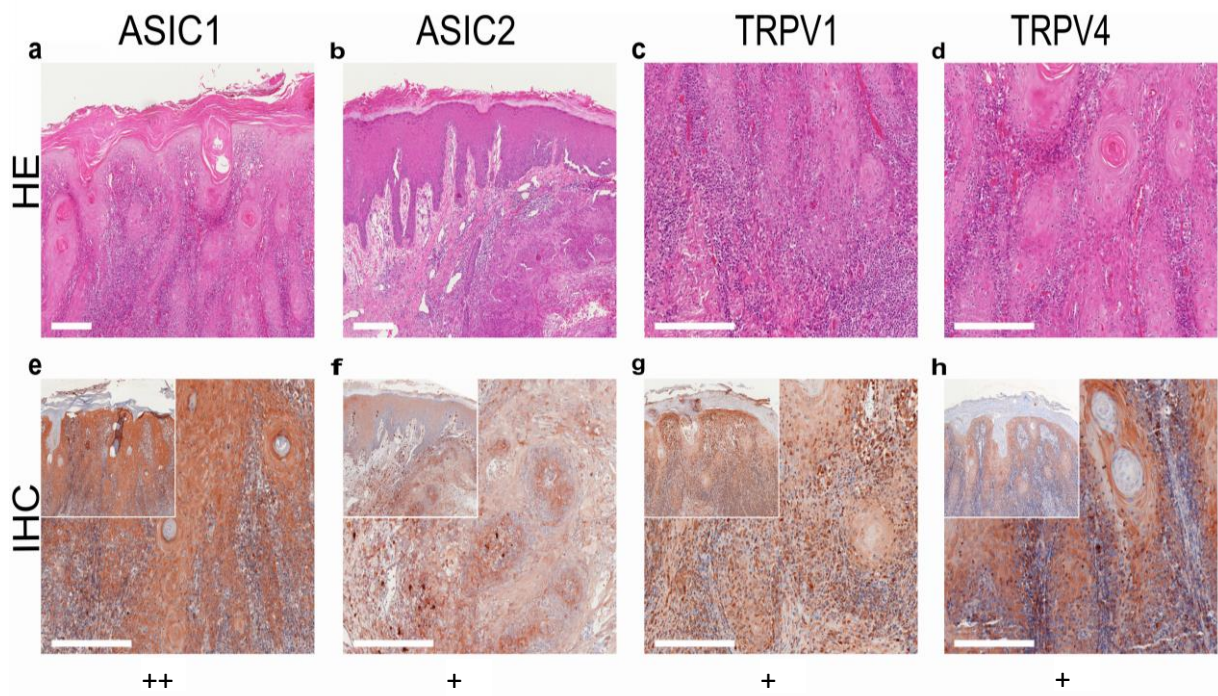


Figure S3. Immunohistochemistry of SCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in SCC tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a,c,d,e,g,h: patient 5; b,f: patient 2. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining. This SCC shows a strong positive expression of ASIC1. The expression of ASIC2, TRPV1 and TRPV4 is partial positive. For more stainings of other SCC, see figures S1-S2.

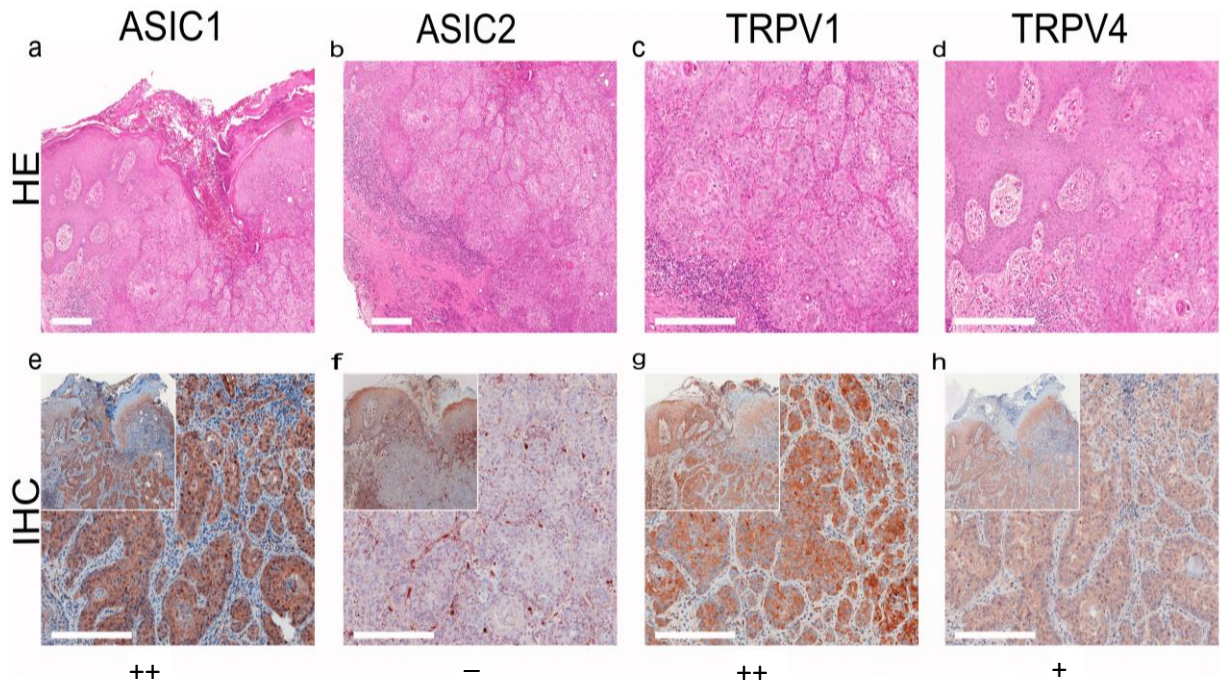


Figure S4. Immunohistochemistry of BCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in BCC tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-h: patient 9. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining. This BCC shows a strong expression of ASIC1 and TRPV1. The expression of TRPV4 is weak positive, but this BCC shows no expression of ASIC2. For more stainings of other BCC, see figures S5-S7.

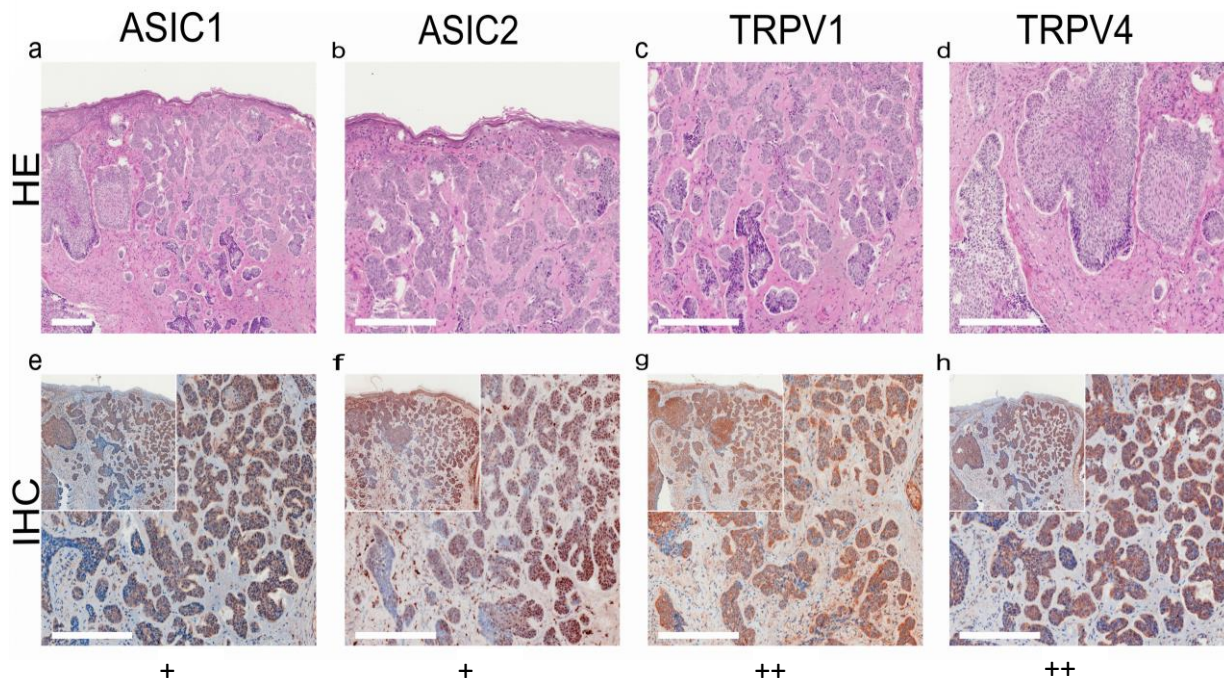


Figure S5. Immunohistochemistry of BCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in BCC tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-h: patient 11. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining. This BCC shows a weak expression of ASIC1 and ASIC2. The expression of TRPV1 and TRPV4 is significantly increased in tumor cells.. For more stainings of other BCC, see figures S4,S6-S7.

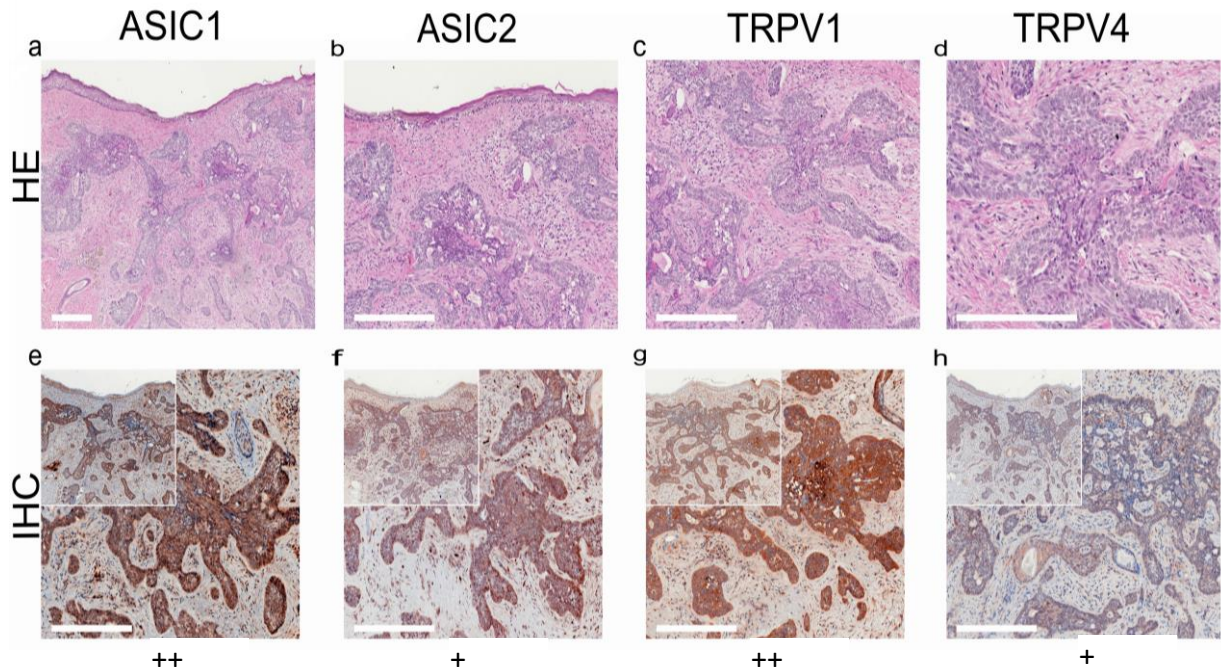


Figure S6. Immunohistochemistry of BCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in BCC tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-h: patient 12. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining. ASIC1 and TRPV1 are strongly expressed on this BCC. The expression of ASIC2 and TRPV4 is weak positive. For more stainings of other BCC, see figures S4-S5, S7.

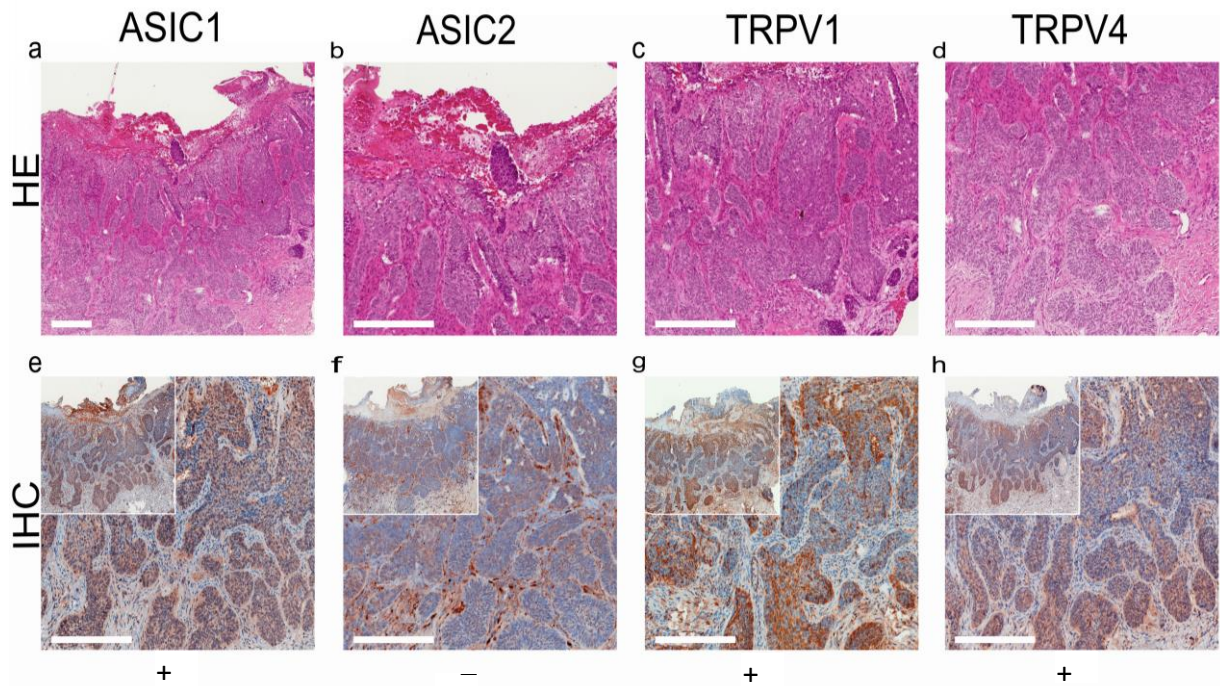


Figure S7. Immunohistochemistry of BCC. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in BCC tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-h: patient 13. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining. This BCC shows no expression of ASIC2. The expression of ASIC1, TRPV1 and TRPV4 is weak positive. For more stainings of other BCC, see figures S4-S6.

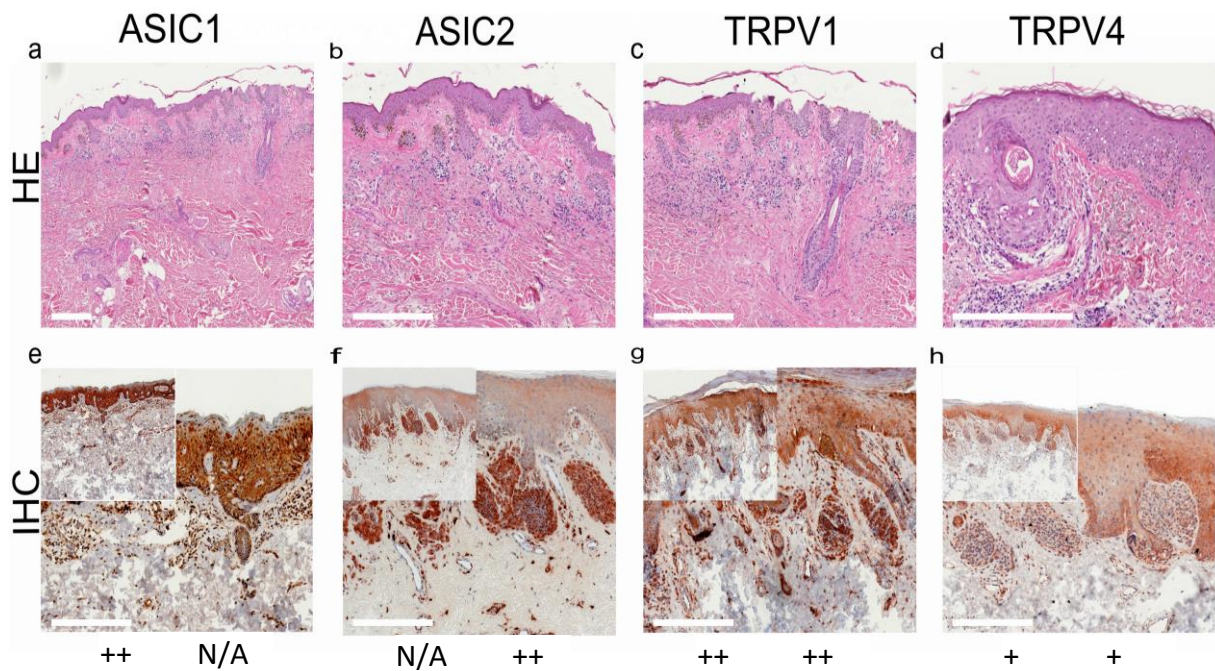


Figure S8. Immunohistochemistry of NCN. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in NCN tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . b-d, f-h: patient 16; a, e: patient 20. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining for the epidermal (left score) and the dermal (right score) portion. This NCN shows a strong positive expression of ASIC1 and TRPV1 on the epidermal sections. TRPV4 is expressed weakly and ASIC2 cannot be assessed in this epidermal section, as we see no tumor cell nests (N/A). The same counts for the dermal part in ASIC1. The expression of ASIC2 and TRPV1 is significantly increased in dermal tumor cells. TRPV4 shows a weak dermal expression. For more stainings of other NCN, see figures S9-S11.

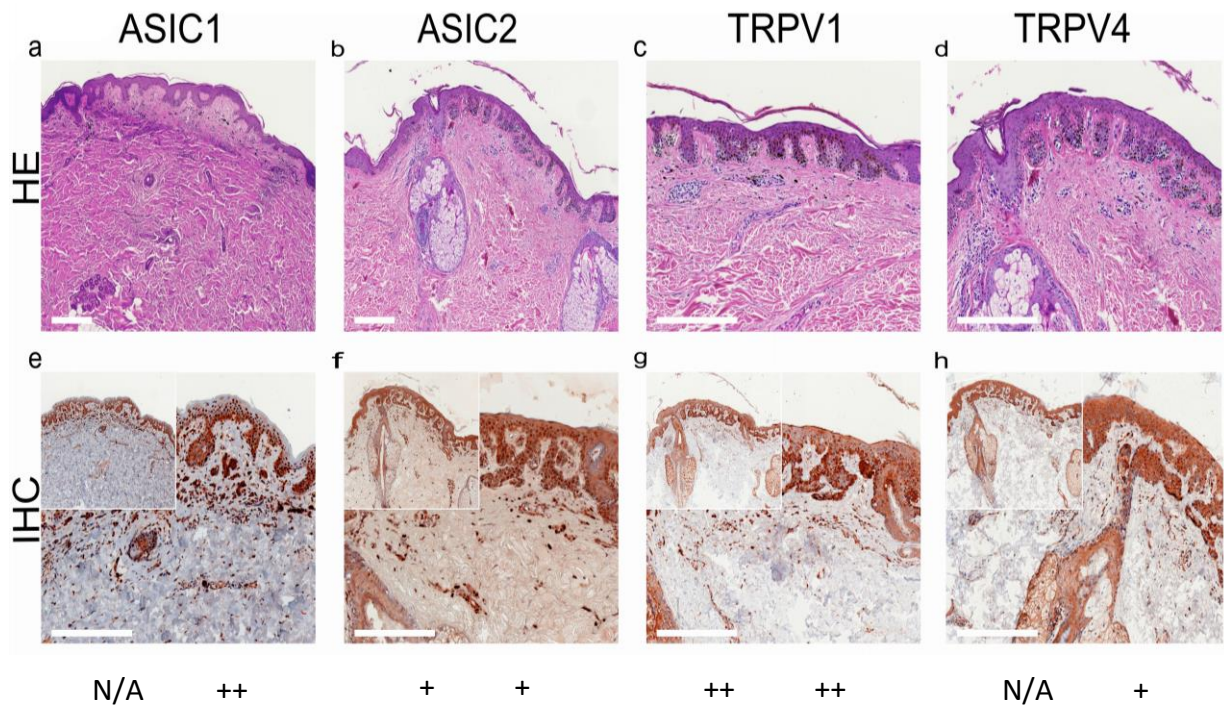


Figure S9. Immunohistochemistry of NCN. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in NCN tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a, e: patient 19; b-d & f-h: patient 17. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining for the epidermal (left score) and the dermal (right score) portion. This NCN shows a strong positive expression of TRPV1 on the epidermal sections and a weak positive expression of ASIC2. ASIC1 and TRPV1 cannot be assessed in this epidermal section, as we see no tumor cell nests (N/A). The expression of ASIC1 and TRPV1 is significantly increased in dermal tumor cells. ASIC2 and TRPV4 show a weak positive dermal expression. For more stainings of other NCN, see figures S8, S10-S11.

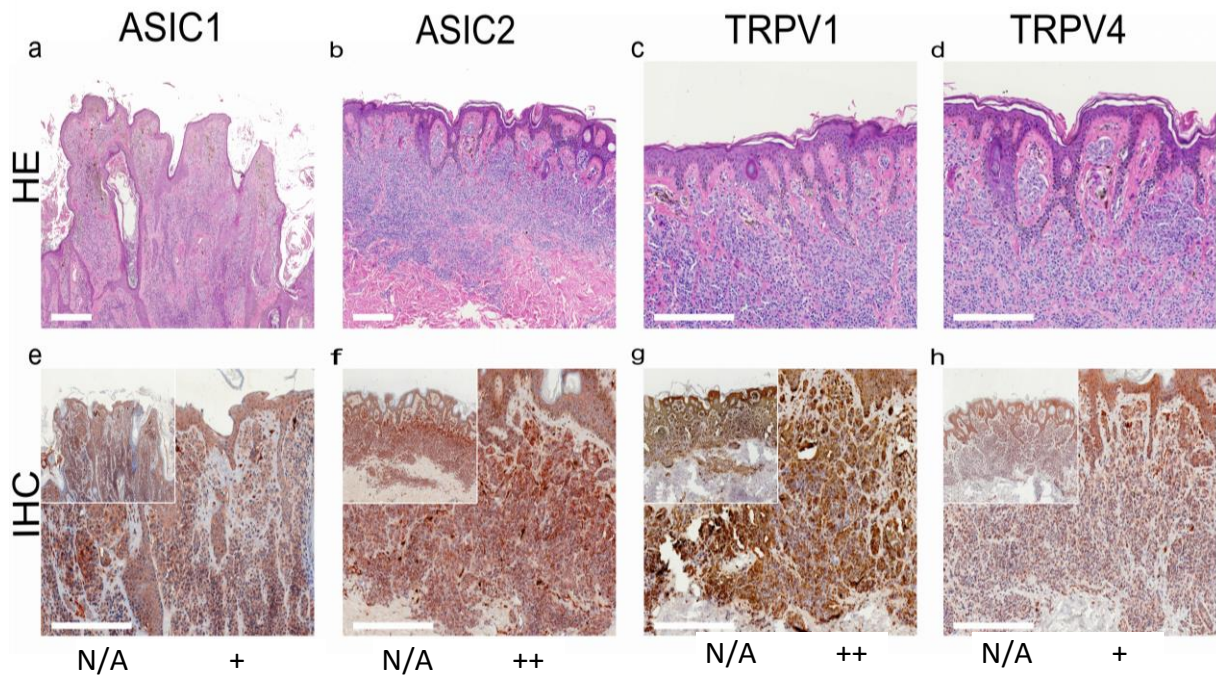


Figure S10. Immunohistochemistry of NCN. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in NCN tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . b-d, f-h: patient 18; a, e: patient 21. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining for the epidermal (left score) and the dermal (right score) portion. In this NCN we can only assess the dermal portion, as we see no tumor cell nests in the epidermis (N/A). The expression of ASIC2 and TRPV1 is significantly increased in dermal tumor cells. ASIC1 and TRPV4 show a weak positive expression in the dermis. For more stainings of other NCN, see figures S8-S9, S11.

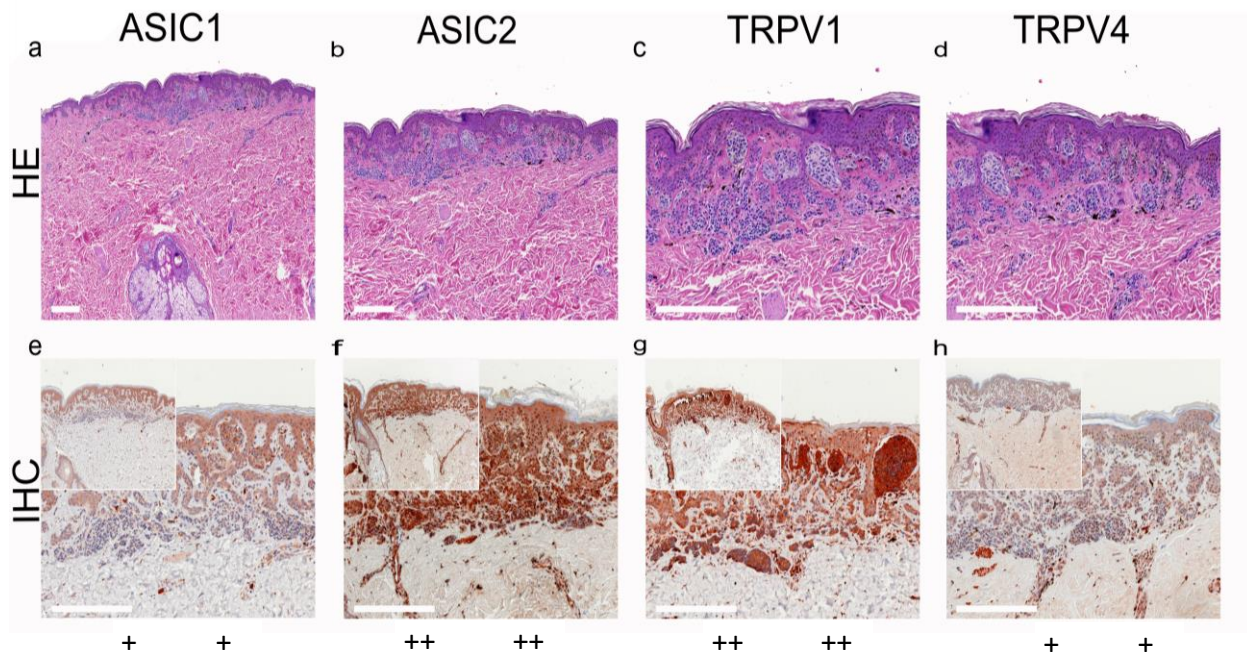


Figure S11. Immunohistochemistry of NCN. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in NCN tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-h: patient 15. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining for the epidermal (left score) and the dermal (right score) portion. This NCN shows a strong positive expression of ASIC2 and TRPV1 on the epidermal sections and a weak positive expression of ASIC1 and TRPV4. Concerning the dermis, the expression of ASIC2 and TRPV1 is significantly increased in dermal tumor cells. ASIC1 and TRPV4 show a weak positive dermal expression. For more stainings of other NCN, see figures S8-S10.

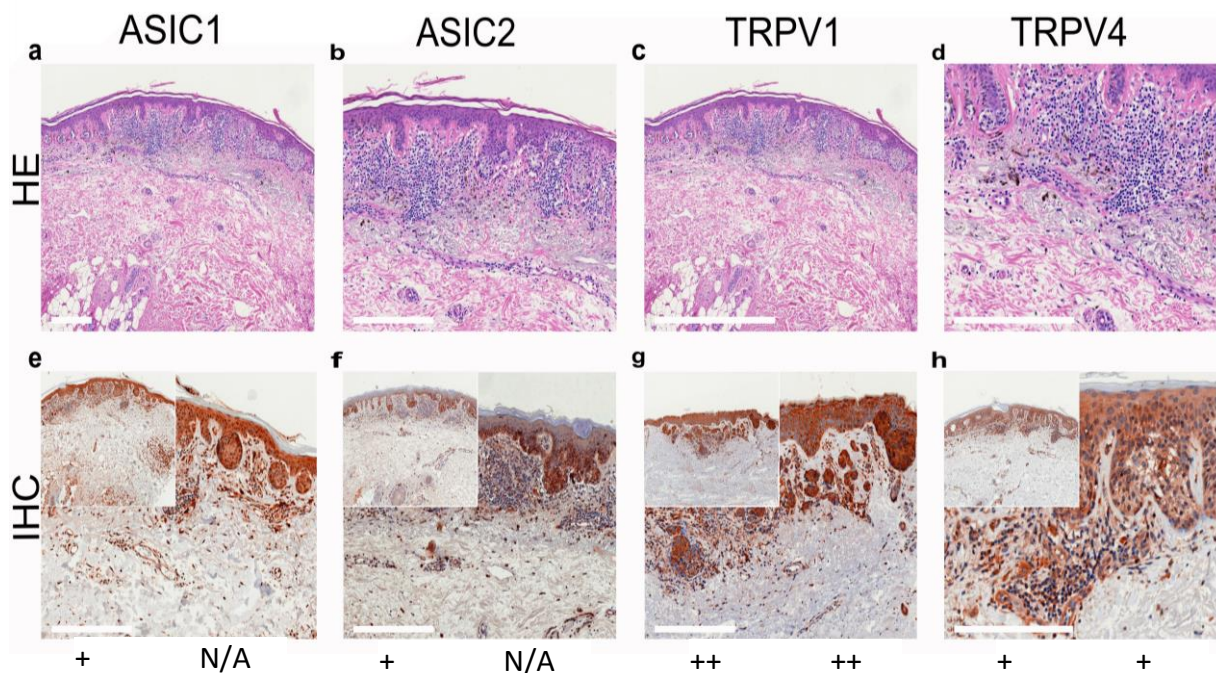


Figure S12. Immunohistochemistry of MM. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in MM tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-h: patient 25. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; - : < 20 % cells with weak staining for the epidermal (left score) and the dermal (right score) portion. This MM shows a weak positive expression of ASIC1, ASIC2 and TRPV4 on the epidermal sections and a strong positive expression of TRPV1. Concerning the dermis, the expression of TRPV1 is significantly increased in dermal tumor cells, TRPV4 shows a weak positive expression. In this MM we can not assess the dermal portion concerning ASIC1 and ASIC2, as we see no tumor cell nests. For more stainings of other MM, see figures S13-S15.

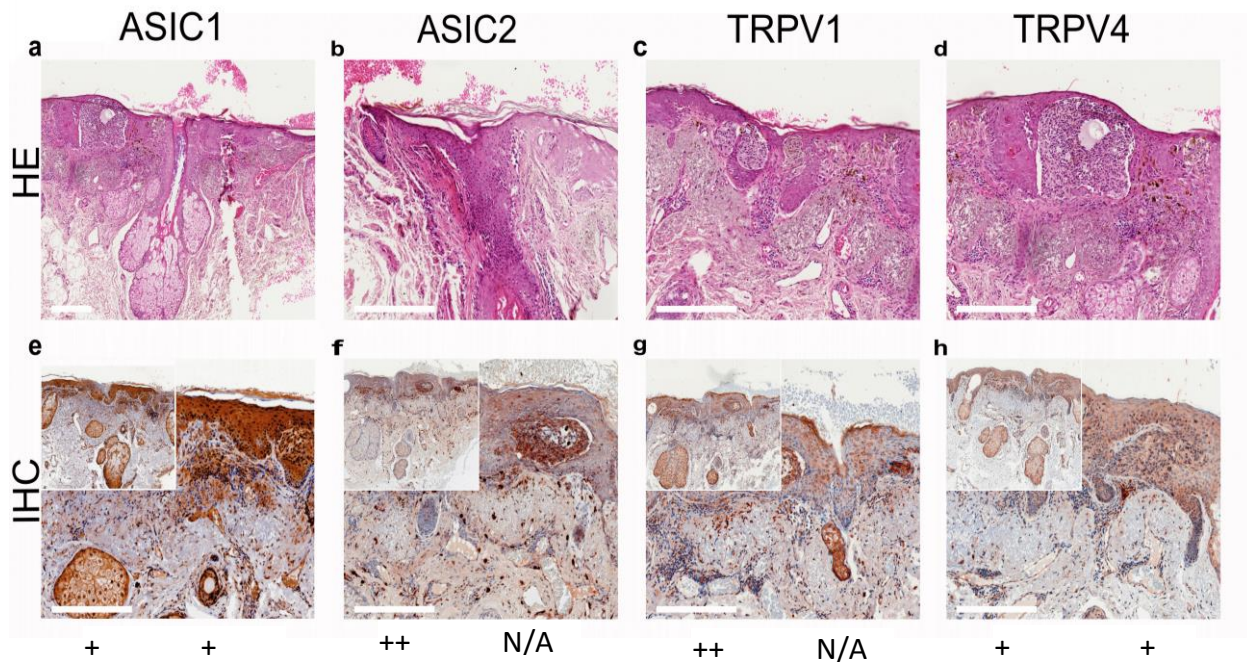


Figure S13. Immunohistochemistry of MM. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in MM tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a-h: patient 29. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining for the epidermal (left score) and the dermal (right score) portion.

This MM shows a weak positive epidermal expression of ASIC1 and TRPV4 and a strong positive expression of ASIC2 and TRPV1 in the epidermal sections. Concerning the dermis, ASIC1 and TRPV4 show a weak positive expression. In this MM we cannot assess the dermal portion concerning ASIC2 and TRPV1, as we see no tumor cell nests. For more stainings of other MM, see figures S12,S14-S15.

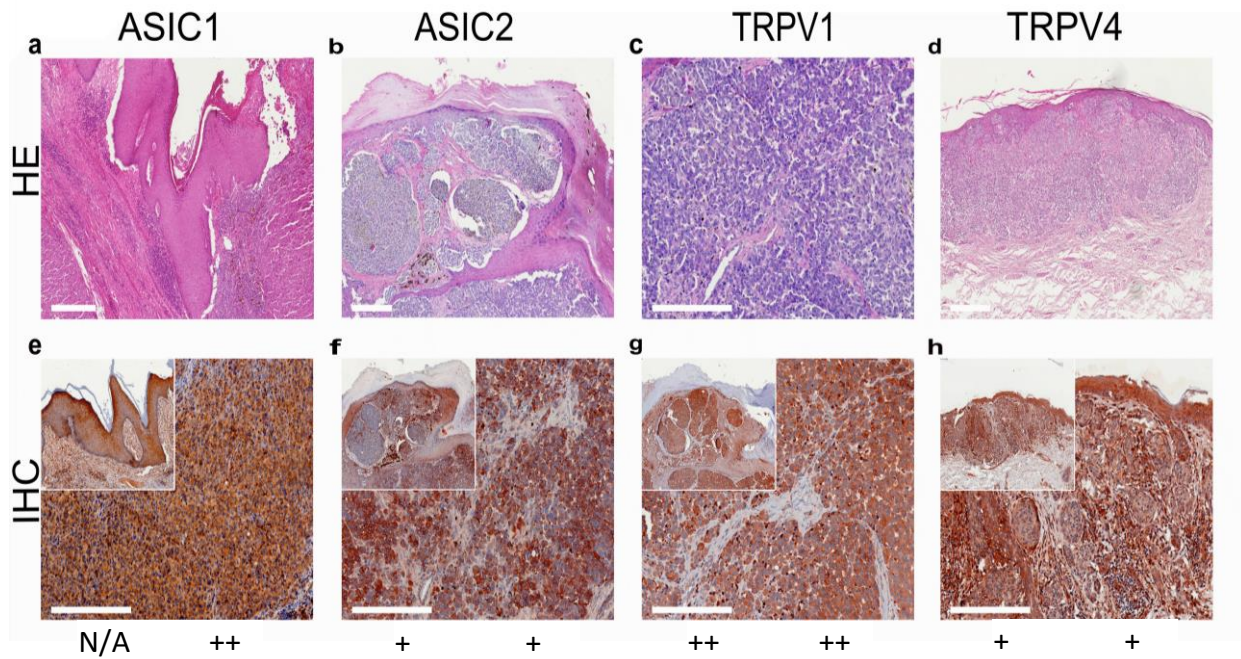


Figure S14. Immunohistochemistry of MM. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in MM tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a,e: patient 23, b,c,f,g: patient 22, d,h: patient 24. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining for the epidermal (left score) and the dermal (right score) portion.

This MM shows a weak positive epidermal expression of ASIC2 and TRPV4 and a strong positive expression TRPV1 in the epidermal sections. In this MM we cannot assess the epidermal portion concerning ASIC1, as we see no tumor cell nests (N/A). In the dermis, ASIC1 and TRPV1 show a significantly increased expression. ASIC2 shows some strongly and weakly stained tumor cells giving an overall impression of a weak expression. TRPV4 is weakly expressed in the dermis. For more stainings of other MM, see figures S12-S13, S15.

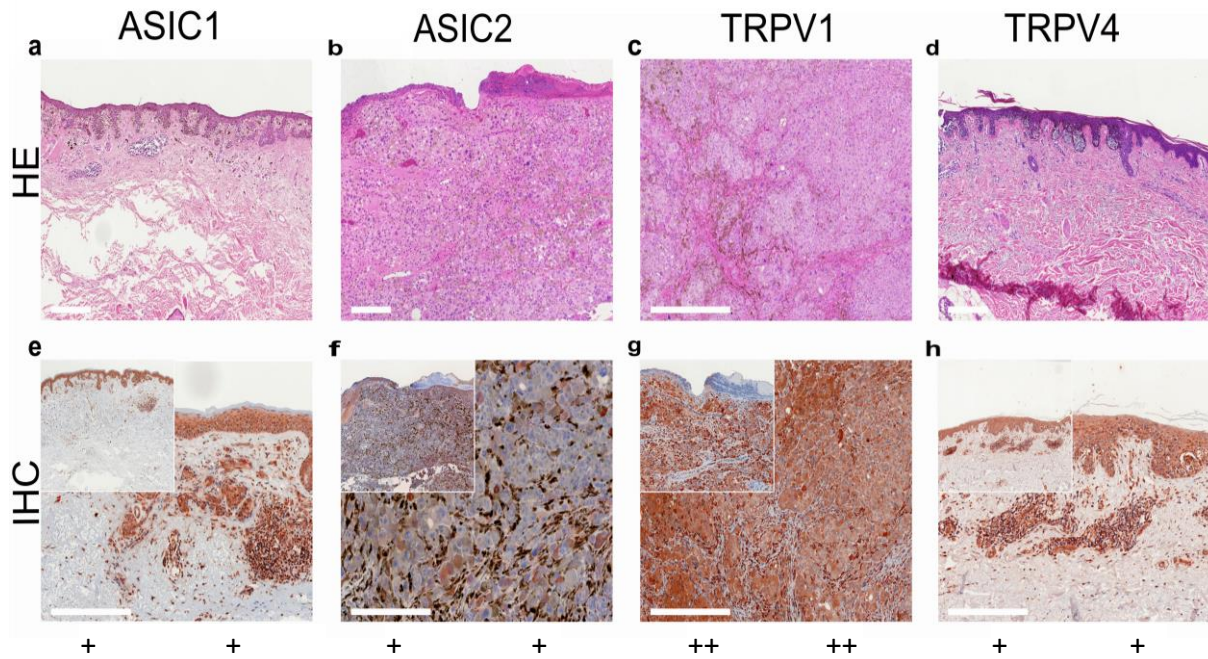


Figure S15. Immunohistochemistry of MM. Immunohistochemical staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4 in MM tissue. (a-d) histochemical H&E staining, (e-h) immunohistochemical staining, inserted smaller pictures represent a two times larger perspective. Scale bars represent 200 μm . a,d,e,h: patient 27; b,c,f,g: patient 26. Scores in the bottom row were evaluated for ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining for the epidermal (left score) and the dermal (right score) portion.

This MM shows a weak positive epidermal expression of ASIC1, ASIC2 and TRPV4 and a strong positive expression TRPV1 in the epidermal sections. Concerning the dermis, ASIC1, ASIC2 and TRPV4 show a weak positive expression. It has to be mentioned that ASIC2 shows tumor cells with a very strong staining and some hardly stained tumor cells giving an overall impression of a weak expression. TRPV1 is strongly expressed in the dermis. For more stainings of other MM, see figures S12-S14.

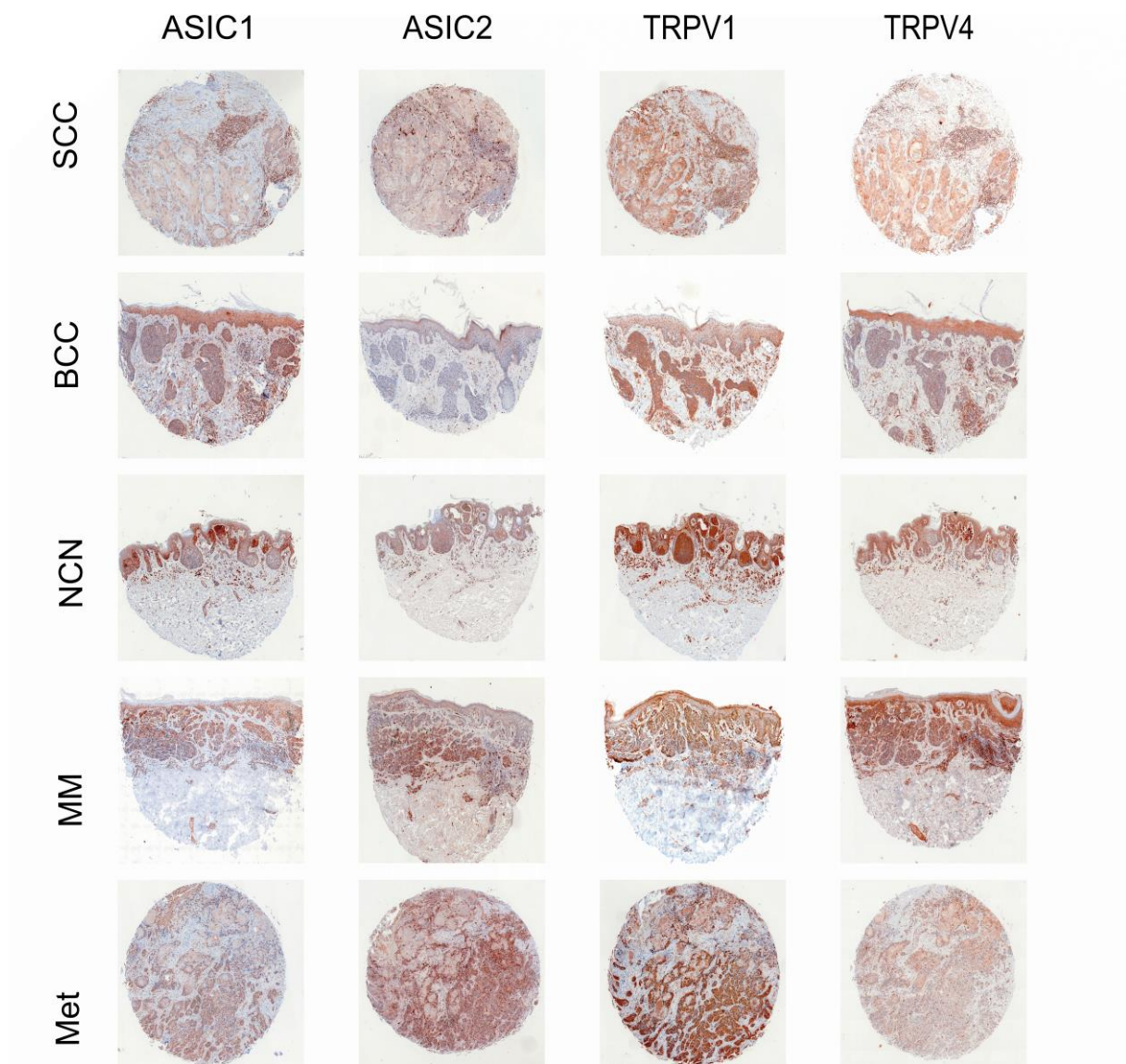


Figure S16: Tissue microarray of SCC, BCC, NCN, MM and Met. Selection of Immunohistochemical tissue microarray staining for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4.

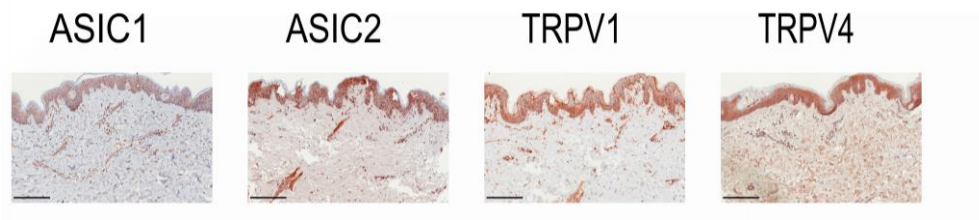


Figure S17: normal skin stained for ASIC1, ASIC2, TRPV1 and TRPV4.

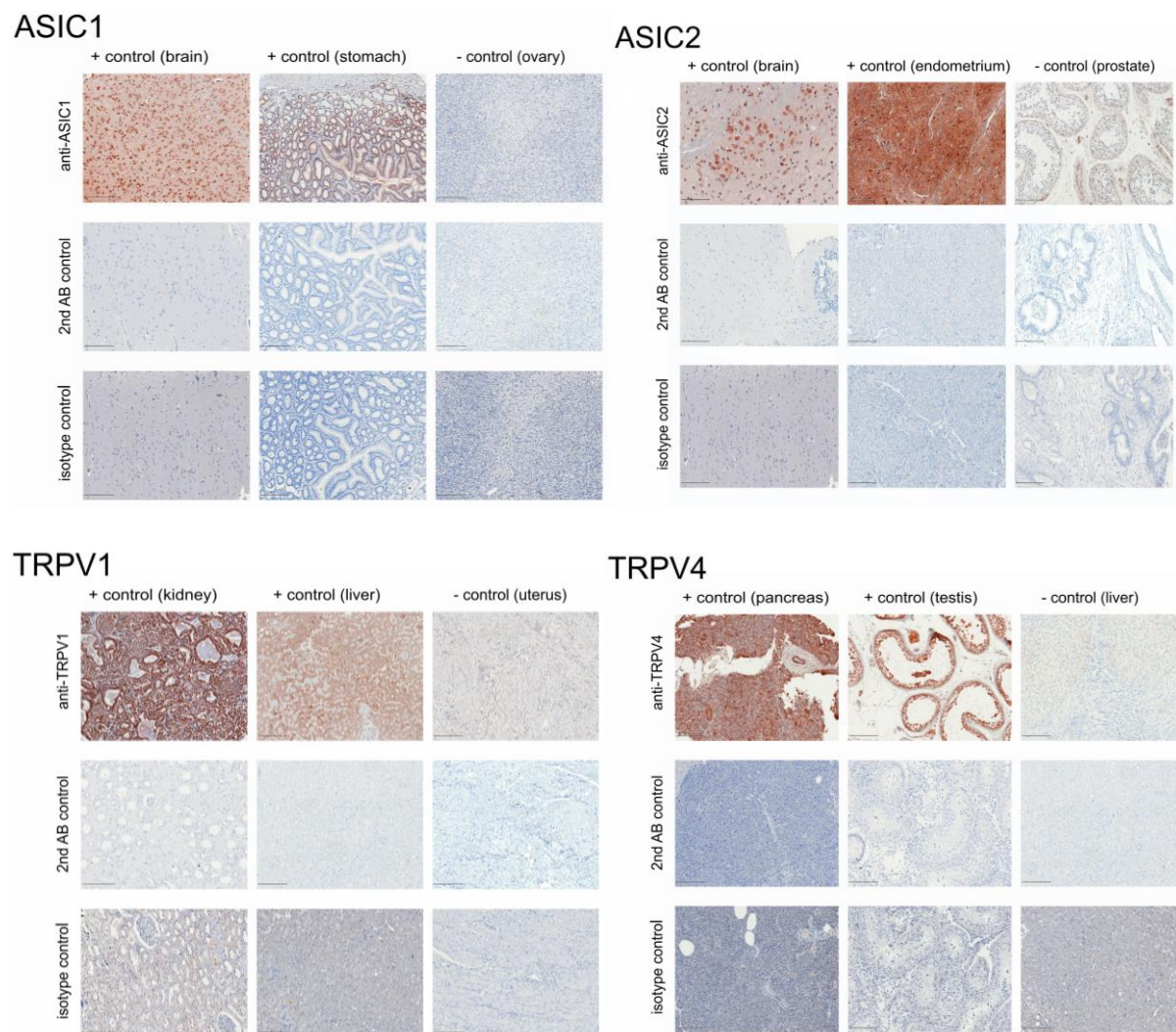


Figure S18: Tissue controls for IHC/TMA staining. IHC staining on positive and negative control tissues. We selected one positive control (“+ control”) tissue according to the primary antibody datasheet and a second positive control and a negative control (“- control”) for each cation channel (ASIC1/ASIC2/TRPV1/TRPV4) according to the database “The Human Protein Atlas” (www.proteinatlas.org). Control tissue were stained with the respective antibody, without primary antibody (secondary antibody control: “2nd AB control”) and with the isotype control antibody. Scale bars correspond to 100 μ m.

Supplementary tables:**Table S1.** patient data: age and gender of the patients, the tissue samples were taken from.

patient	gender	age
1	♀	71
2	♂	59
3	♂	82
4	♀	87
5	♂	60
6	♂	75
7	♂	70
8	♀	45
9	♂	74
10	♀	95
11	♂	65
12	♀	72
13	♂	66
14	♂	40
15	♀	20
16	♂	40
17	♂	61
18	♀	11
19	♀	36
20	♀	36
21	♂	18
22	♂	62
23	♂	83
24	♀	36
25	♀	80
26	♀	43
27	♀	74
28	♂	75
29	♀	60
30	♂	89
31	♂	49
32	♀	80
33	♀	52
34	♂	40
35	♂	66
36	♂	71
37	♂	68
38	♀	36
39	♂	53
40	♂	16
41	♀	26

42	♀	48
43	♀	59
44	♀	21
45	♀	24
46	♀	71
47	♀	27
48	♀	28
49	♂	85
50	♀	46
51	♂	69
52	♂	68
53	♂	66
54	♀	44
55	♀	38
56	♀	54
57	♀	82
58	♂	67
59	♂	44
60	♀	72
61	♂	71
62	♀	78
63	♀	67
64	♂	44
65	♀	70
66	♂	60
67	♂	60
68	♀	63
69	♂	61
70	♀	78
71	♂	55
72	♀	38
73	♂	55
74	♀	54
75	♂	67
76	♂	44
77	♀	72
78	♂	71
79	♂	36
80	♂	71
81	♂	69
82	♀	78
83	♀	67
84	♂	44
85	♀	70
86	♂	87
87	♂	60
88	♂	60

89	♂	40
90	♂	72
91	♂	67
92	♂	59
93	♀	76
94	♀	79
95	♂	72
96	♂	68
97	♂	72
98	♀	45
99	♀	69
100	♂	68
101	♀	76
102	♀	79
103	♂	46
104	♀	56
105	♀	59
106	♂	65
107	♀	77
108	♀	53
109	♂	64
110	♀	67
111	♀	83
112	♂	65
113	♀	66
114	♂	63
115	♂	65
116	♂	81
117	♂	80
118	♂	80
119	♂	84
120	♂	74
121	♀	94
122	♀	51
123	♂	67
124	♀	89
125	♂	51
126	♂	48
127	♂	73
128	♂	63
129	♀	19
130	♂	69
131	♀	45
132	♀	93
133	♂	69
134	♀	45
135	♀	45

136	♂	83
137	♀	45
138	♂	83
139	♂	54
140	♂	77
141	♂	77
142	♂	64
143	♀	84
144	♂	78
145	♀	65
146	♀	75
147	♀	85
148	♀	83
149	♂	66
150	♂	69
151	♂	89
152	♀	55
153	♀	65
154	♀	71
155	♀	59
156	♀	76
157	♂	64
158	♀	69
159	♀	67
160	♀	63
161	♂	66
162	♀	50
163	♀	50
164	♀	19
165	♂	57
166	♀	19
167	♀	28
168	♀	43
169	♂	40
170	♂	64
171	♀	72
172	♂	44
173	♀	17
174	♂	66
175	♂	52
176	♀	67
177	♀	45
178	♂	25
179	♀	30
180	♀	8
181	♂	58
182	♂	37

183	♀	58
184	♂	36
185	♂	18
186	♀	33
187	♂	24
188	♂	64
189	♀	40
190	♂	37
191	♂	48
192	♀	37
193	♂	46
194	♂	52
195	♀	47

Table S2. Scores of TMA-SCC: Staining scores for ASIC1, ASIC2, TRPV1, TRPV4 on SCC tissues. ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining; N/A: not available, TMA_{SCC} 1-22: patient 53-79

TMA _{SCC}	ASIC1	ASIC2	TRPV1	TRPV4
1	+	+	+	+
2	++	++	+	++
3	++	+	++	+
4	+	+	++	+
5	+	++	++	+
6	-	-	+	+
7	+	+	++	++
8	++	+	++	+
9	+	+	++	+
10	+	+	++	+
11	++	++	++	++
12	+	++	++	++
13	+	+	++	+
14	++	+	++	++
15	+	++	+	++
16	+	+	++	++
17	++	+	++	++
18	+	++	++	++
19	++	+	++	++
20	+	-	-	+
21	++	++	++	++
22	++	++	++	++

Table S3. Scores of TMA-BCC: Staining scores for ASIC1, ASIC2, TRPV1, TRPV4 on BCC tissues. ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining; N/A: not available, TMA_{BCC} 1-22: patient 80-104

TMA _{BCC}	ASIC1	ASIC2	TRPV1	TRPV4
1	++	+	++	+
2	++	+	+	+
3	-	+	++	+
4	++	-	++	+
5	+	-	+	+
6	++	-	+	++
7	+	-	+	+
8	+	-	++	+
9	N/A	-	+	++
10	+	N/A	N/A	+
11	++	N/A	+	++
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+
14	++	+	++	+
15	++	+	++	+
16	++	-	++	+
17	++	-	++	+
18	++	-	+	+
19	+	+	++	+
20	+	-	+	+
21	+	+	+	+
22	+	-	+	N/A

Table S4. Scores of TMA-NCN: Staining scores for ASIC1, ASIC2, TRPV1, TRPV4 on NCN tissues. ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining; N/A: not available, TMA_{NCN} 1-25: patient 105-128

TMA _{NCN}	ASIC1		ASIC2		TRPV1		TRPV4	
	epidermal	dermal	epidermal	dermal	epidermal	dermal	epidermal	dermal
1	+	+	N/A	+* ¹	N/A	++	-	+
2	N/A	+* ¹	N/A	+* ¹	N/A	+* ¹	N/A	+* ¹
3	N/A	+* ¹	N/A	+* ¹	N/A	+* ¹	N/A	+
4	+	N/A	-	N/A	++	N/A	-	N/A
5	++	+* ¹	-	+	+	+	-	+
6	++	++	+	++	N/A	++	++	++
7	N/A	N/A	-	N/A	++	N/A	-	N/A
8	+	+* ¹	-	+	+	+	+	+
9	+	+* ¹	+	++	++	+	+	+
10	N/A	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	N/A
11	N/A	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	N/A
12	N/A	N/A	N/A	N/A	+	N/A	++	N/A
13	++	+	+	+	++	++	-	++* ¹
14	+	+	+	++	++	++	-	++
15	+	N/A	+	++	+	++	-	N/A
16	+	+	+	+	++	++	+	+
17	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
18	++	++	+	++	++	++	++	+
19	++	+	+	++	++	+	++	-
20	N/A	+	-	+	+	++	N/A	N/A
21	++	+	+	++	++	+	+	+
22	N/A	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
23	N/A	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
24	N/A	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
25	N/A	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
27	N/A	+* ²	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
28	N/A	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
29	N/A	N/A	-	+* ¹	N/A	N/A	N/A	N/A
30	N/A	N/A	++	+* ¹	N/A	N/A	N/A	N/A
31	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	++* ¹	N/A	N/A
32	N/A	N/A	N/A	N/A	++* ²	+	N/A	N/A
33	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	++	+* ¹
34	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	+* ¹

*¹ expression level decreases with increasing tissue depth.

*² single tumor cells appear strong positive, others negative, giving the overall impression of weak positive expression.

Table S5. Scores of TMA-MM: Staining scores for ASIC1, ASIC2, TRPV1, TRPV4 on MM tissues. ++: > 80 % of cells positive and / or staining intensity is high; +: 20-80 % of cells positive and staining weak or only partially strong; -: < 20 % cells with weak staining; N/A: not available, TMA_{MM} 1-27: patient 1-27

TMA _{MM}	ASIC1		ASIC2		TRPV1		TRPV4	
	epidermal	dermal	epidermal	dermal	epidermal	dermal	epidermal	dermal
1	N/A	N/A	+	+	N/A	N/A	+	++
2	+	++	+	++	++	++	+	++
3	-	N/A	-	++	+	N/A	+	+
4	+	++	+	+	++	++	N/A	N/A
5	-	N/A	+	N/A	++	N/A	+	++
6	-	+	+	++	++	++	+	+
7	+	++	+	N/A	+	N/A	+	N/A
8	-	-	-	N/A	N/A	N/A	+	++
9	-	N/A	-	-	++	N/A	+	N/A
10	-	-	++	++	++	++	+	+
11	N/A	N/A	++	++	N/A	N/A	+	+
12	N/A	N/A	-	++	++	++	N/A	N/A
13	N/A	N/A	+	+	++	++	+	++
14	+	++	+	+	+	++	+	+
15	+	+	+	+	+	+	-	-
16	+	+	+	++	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	++
18	+	++	+	++	+	++	+	++
19	++	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
20	++	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
21	++	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
22	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
23	++	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
24	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
25	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26	+* ¹	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
27	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
28	++	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
29	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
30	+	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
31	N/A	N/A	++	++	N/A	N/A	N/A	N/A
32	N/A	N/A	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A
33	N/A	N/A	++	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
34	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	N/A	N/A
35	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	N/A	N/A
36	N/A	N/A	N/A	N/A	+	++	N/A	N/A
37	N/A	N/A	N/A	N/A	++	+	N/A	N/A
38	N/A	N/A	N/A	N/A	++	++	N/A	N/A
39	N/A	N/A	N/A	N/A	-	+	N/A	N/A

40	N/A	N/A	N/A	N/A	+	++	N/A	N/A
41	N/A	N/A	N/A	N/A	++	++	N/A	N/A
42	N/A	N/A	N/A	N/A	+	++	N/A	N/A
43	N/A	N/A	N/A	N/A	++	++	N/A	N/A
44	N/A	N/A	N/A	N/A	++	N/A	N/A	N/A
45	N/A	N/A	N/A	N/A	++	N/A	N/A	N/A
46	N/A	N/A	N/A	N/A	++	++	N/A	N/A
47	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	++	N/A	N/A
48	N/A	N/A	N/A	N/A	++	+	N/A	N/A
49	N/A	N/A	N/A	N/A	++	++	N/A	N/A
50	N/A	N/A	N/A	N/A	++	N/A	N/A	N/A
51	N/A	N/A	N/A	N/A	+	++	N/A	N/A
52	N/A	N/A	N/A	N/A	+	++	N/A	N/A
53	N/A	N/A	N/A	N/A	++	++	N/A	N/A
54	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	+
55	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	+* ²
56	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+	N/A

*¹ single tumor cells appear strong positive, others negative, giving the overall impression of weak positive expression.

*² expression level increases with increasing tissue depth.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Schreml, Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg, für die ausgezeichnete Betreuung und die immer währende Unterstützung. Die zahlreichen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren eine große Hilfe und haben mich stets positiv beeinflusst und ermutigt.

Vielen Dank an Susanne Wallner für die großartige Anleitung zur wissenschaftlichen Forschung und die engagierte Betreuung. Danke für die entgegengebrachte Freundlichkeit, Geduld, Hilfsbereitschaft und herzliche Atmosphäre. Auch bei Barbara Schwertner möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, die mich mit ihrer bedingungslosen Liebe und grenzenlosem Verständnis immer unterstützt hat. Ohne ihre Hilfe, Geduld und Aufmunterungen wäre die Promotion und mein Studium nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr mir immer den Rücken gestärkt habt!

Zu guter Letzt spreche ich meinem Freund Dominik ein großes Dankeschön für seine entgegengebrachte Rücksichtnahme, Geduld sowie jede einzelne aufmunternde Umarmung während der gesamten Dissertation aus.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kirsten Ackermann
Adresse	Steyrerweg 3 93049 Regensburg
E-Mail	Kirsten.Ackermann@gmx.net
Geburtsdatum	24. September 1992
Geburtsort	Mainz
Familienstand	ledig

Schulischer und beruflicher Werdegang

04/2021	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dres. Bär in Neumarkt
01/2021	Erhalt der Approbation als Zahnärztin
11/2020	Staatsexamen der Zahnmedizin
10/ 2018 – 2021	Promotion am Lehrstuhl Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg
04/2018	Zahnärztliche Vorprüfung
03/2017	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
03/2016	Weiterführung des Zahnmedizin-Studiums am Universitätsklinikum Regensburg
09/2014 - 02/2016	Beginn des Zahnmedizin-Studiums an der „Universidad Europea Valencia“ in Valencia, Spanien
04/2011 – 06/2014	Studium der Wirtschaftswissenschaften an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit dem Abschluss Bachelor of Science
03/2011	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Nieder-Olm