

Aus der Klinik für Dermatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Homey

**Antineoplastische Modulation des kutanen Mikromilieus durch
Ingenolmebutat**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Baran

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Peter Arne Gerber

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Edwin Bölke

Moim kochanym Rodzicom

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Braun, SA., Baran, J., Schrumpf, H., Buhren, BA., Bölke, E., Homey, B., Gerber, PA., (2018), Ingenol mebutate induces a tumor cell-directed inflammatory response and antimicrobial peptides thereby promoting rapid tumor destruction and wound healing. *European Journal of Medical Research*, (23) 45-55

Braun, SA., Bünemann, E., Baran, J., Homey, B., Gerber, PA., (2018), Time-lapse imaging points towards a non-toxic, mainly immune-driven mode of action of ingenol mebutate in the treatment of anogenital warts. *Experimental dermatology*, (27) 675-677

Zusammenfassung

Ingenolmebutat (IM) ist in Europa seit 2012 für die Behandlung nicht-hypertropher, nicht-hyperkeratotischer aktinischer Keratosen (AK) zugelassen. Ferner zeigen aktuelle Einzelfallberichte und kleinere Fallserien, dass IM auch effektiv bei der topischen Therapie von Condylomata acuminata (CA) angewendet werden kann. Auch wenn die genaue Wirkungsweise von IM bis heute nicht vollständig verstanden ist, wird derzeit ein dualer Wirkungsmechanismus propagiert. So führen hohe Konzentrationen von IM zu einer rapiden Zellnekrose, während IM in niedrigen Konzentrationen eine komplexe Immunantwort induziert. Klinisch zeigt sich unter der Behandlung eine ausgeprägte Entzündungsreaktion, die sich insbesondere im Bereich zuvor sichtbarer AK oder CA zeigt. Therapiebedingte Erosionen heilen rasch und ohne Zeichen einer Superinfektion mit exzellenten kosmetischen Ergebnissen ab. Die Entzündungsreaktion lässt sich histopathologisch durch ein dichtes Entzündungszellinfiltrat charakterisieren, welches von T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten dominiert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die diesen klinischen und histopathologischen Beobachtungen zugrundeliegenden molekularen und zellulären Mechanismen näher aufzuklären. Hierzu wurden zunächst primäre humane Keratinozyten und eine Reihe epithelialer Tumorzelllinien *in vitro* mit IM inkubiert und anschließend die Regulation verschiedener Chemokine und antimikrobieller Peptide (AMP) mittels qPCR und ELISA untersucht. Des Weiteren erfolgten qPCR-Analysen von Genen des Hyaluronanstoffwechsels sowie Scratch-Assays, um den Einfluss von IM auf die extrazelluläre Matrix und die Wundheilung zu untersuchen. Schließlich wurden Reaktionen *in vivo* oder *ex vivo* mit IM behandelte CA verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass IM das Chemokin CXCL8 in Tumorzellen signifikant stärker induziert als in gesunden primären humanen Keratinozyten. In geringerem Ausmaß konnte dieser Effekt auch für die Chemokine CCL2 und CCL5 beobachtet werden. Analoge Untersuchungen der Expression von AMP zeigten, dass IM sowohl HBD3 als auch Rnase7 in primären humanen Keratinozyten und Tumorzellen induziert. Ein Effekt auf die Expression von Genen des Hyaluronanstoffwechsels konnte nicht nachgewiesen werden. Ergebnisse der Scratch-Assays zeigten, dass die Zellmigration, respektive die Wundheilung *in vitro*, durch IM lediglich in einer Konzentration von 10^{-7} Molar gestört wird. Für *ex vivo* mit IM behandelte CA schließlich zeigte sich die für die klinische *in-vivo*-Behandlung charakteristische massive Entzündung und rasche Induktion einer Nekrose mit einer Denaturierung des CA-Gewebes nicht. In Zusammenschau deuten die Ergebnisse dieser Arbeit also daraufhin, dass IM im Sinne eines *Immune Response Modifier* einen läsionsgerichtete Entzündungsreaktion induziert. Die Beobachtung, dass CA, die *ex vivo*, also nach Trennung vom Immunsystem, auf eine Behandlung mit IM praktisch nicht mehr reagieren, impliziert ferner, dass klinische Effekte von IM in erster Linie gezielt immun- und nicht unspezifisch toxisch vermittelt sind. Die rasche und komplikationslose Abheilung IM-behandelter Läsionen schließlich, könnte zum einen durch eine Induktion von AMP, welche Superinfektionen verhindern, sowie zum anderen dadurch begünstigt werden, dass IM die Zellmigration und in der Folge die kutane Wundheilung vermutlich lediglich in einer einzigen Konzentration stört.

Summary

Ingenuol mebutate (IM)-gel is approved for the treatment of non-hypertrophic and non-hyperkeratotic actinic keratoses (AK). Recently, it was also shown that IM-gel effectively and rapidly erases anogenital warts (AGW). Whereas the complete mode of action still remains to be elucidated, current hypotheses for the effect of IM propose a dual mechanism of action: high concentrations of IM lead to a rapid cell necrosis, whereas low concentrations of IM initiate a specific immunologic response. Patients treated with IM develop intensified inflammatory responses and erosions on sites of clinically manifested AK or AGW that heal fast without any signs of superinfection. Histopathologic analyses of IM-treated AK and AGW show a dense inflammatory infiltrate, which is dominated by T cells and neutrophil granulocytes.

This thesis aims at assessing the molecular and cellular effects underlying these clinical and histopathological observations: primary human keratinocytes and various epithelial tumor cell lines were treated with IM *in vitro* and the regulation of various chemokine ligands was measured by qPCR and ELISA. Furthermore, genes of the hyaluronan-metabolism and antimicrobial peptides were investigated and scratch-assays were performed to investigate the effect of IM on wound healing and the extracellular matrix. Finally, AGW were treated with IM *in vivo* and *ex vivo* in order to quantify immunomodulatory and cytotoxic effects of IM. Notably, the results of this thesis show that IM induces the expression of *CXCL8* in tumor cells stronger as compared to primary human keratinocytes. To a lesser extent this effect was also detected for *CCL2* and *CCL5*. The expression of the antimicrobial peptides *HBD3* and *RNase7* was induced by IM in tumor cells and keratinocytes. Scratch-assays show that IM inhibits the cell migration only at a concentration of 10^{-7} M. Finally, as opposed to the clinical application of IM-gel on AGW *in vivo*, the analogue *ex-vivo*-incubation did not result in any signs of significant necrosis or tissue denaturation. To conclude, the data presented in this thesis indicate that IM induces a lesion-directed inflammatory reaction and that IM can be regarded as an immune response modifier. In fact, the observation that *ex-vivo*-AGW show no significant alterations when incubated with IM, after being detached from the immune system, suggests that clinical effects of IM are rather immune driven and not unspecific toxic. The fast clinical healing of lesions treated with IM could be favored by the induction of antimicrobial peptides, which prevent bacterial superinfections and by the fact that IM appears to interfere with cell migration only at one specific concentration.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	cm²	Quadratzentimeter
°C	Grad Celsius	CO₂	Kohlenstoffdioxid
5-FU	5-Fluorouracil	Ct-Wert	<i>Threshold cycle</i> (Schwellenwertzyklus)
Abb.	Abbildung	CX3C	Chemokine der CX3C-Familie (C=Cystein, X=austauschbare Aminosäure)
ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i> (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)	CXC	Chemokine der CC-Familie (C = Cystein, X = austauschbare Aminosäure)
AGW	<i>Anogenital warts</i> (Anogenitale Warzen)	CXCL	Chemokine der CXC-Familie (C = Cystein, X = austauschbare Aminosäure, L = Ligand)
AK	<i>actinic keratoses</i> (Aktinische Keratosen)	DEPC	Diethylpyrocarbonat
ALA	Aminolävulinsäure	dH₂O	Destilliertes Wasser
AMP	Antimikrobielle Peptide	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
B16	Murine Melanomzelllinie	DMSO	Dimethylsulfoxid
BSA	Bovines Serum Albumin	DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
C	Chemokine der C-Familie (C=Cystein)	dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
CA	<i>Condylomata acuminata</i> , Feigwarzen	DTT	Dithiothreitol
CC	Chemokine der CC-Familie (C=Cystein)	DZ	Dendritische Zelle
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppe)	EDTA	Ethylen-diamintetraacetat
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (Komplementäre DNA)		

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)	HE	Hämatoxylin Eosin
engl.	Englisch	HeLa	Tumorzelllinie
Er-YAG	Erbium-Yttrium-Aluminium-Granat	HPV	humane Papillomviren
et al.	<i>et alii</i> (und andere)	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
EZM	Extrazellulärmatrix	HSC	Tumorzelllinie
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)	HYAL	Hyaluronidase
g	Gramm	ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i> (Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül)
GvHD	<i>Graft -versus-Host-Disease</i> (Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit)	IL	Interleukin
h	<i>Hour(s)</i> (Stunde(n))	IM	<i>Ingenol mebutate</i> (Ingenolmebutat)
H₂O	Wasser	INF	Interferon
HA	Hyaluronan	IRM	<i>Immune Response Modifier</i> (Immunantwort-modifikator)
HaCat	Keratinozyten-Zelllinie	kDa	Kilo-Dalton
HAS	Hyaluronan-Synthase	l	Liter
HBD	Humanes Beta-Defensin	lat.	Lateinisch
hCAP	<i>Human cationic antimicrobial protein</i> (Humanes kationisches antimikrobielles Peptid)	LK2	Tumorzelllinie
HCl	<i>Hydrogen chloride</i> (Chlorwasserstoff, Salzsäure)	LL37	Cathelicidin
		M	Molar

MAL	Aminolävulinsäure-methylester	nmol	Nanomol
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i> (Mitogen-aktiviertes Protein)	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
Me105 38	Melanomzelllinie	pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>	PDT	Photodynamische Therapie
min	Minute(n)	PEK	Plattenepithelkarzinom
ml	Milliliter	pg	Picogramm
mm	Millimeter	PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
mM	Millimolar	PKB	Proteinkinase B
MM96L	Melanomzelllinie	PKC	Proteinkinase C
MMP	Matrix-Metalloproteasen	PLC	Phospholipase C
MØ	Makrophage	qPCR	<i>Real time quantitative polymerase chain reaction</i> (Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
mol	Mol	RAS	<i>Rat sarcoma protein</i> Proto-Onkogen
MTT	Tetrazoliumbromid	RE	Relative Einheiten
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>	RLT	Produktbezeichnung der Firma Qiagen
ng	Nanogramm	RNase	Ribonuklease
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten	RNasin	Produktbezeichnung der Firma Promega
nm	Nanometer	ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
nM	Nanomolar	RPE	Produktbezeichnung der Firma Qiagen

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure	UV	Ultraviolettstrahlung
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i> (Echtzeit Polymeraseketten- reaktion)	µg	Mikrogramm
RW1	Produktbezeichnung der Firma Qiagen	µl	Mikroliter
S	Svedberg-Einheit (z.B. in 18S rRNA)	µM	Mikromolar
SCC	Squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom)		
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)		
sec	<i>Second(s)</i> (Sekunde)		
SFM	<i>Serum Free Medium</i> (Serumfreies Medium)		
t	Zeit		
Tab.	<i>Tabelle</i>		
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>		
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)		
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)		
TNF	Tumornekrosefaktor		
TP	Tumorprotein		
Tween®-20	Polyoxyethylen(20)- sorbitan-monolaurat		
U	<i>Units</i> (Einheiten)		
UD-SCC	Tumorzelllinie		
UpM	Umdrehungen pro Minute		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ingenolmebutat.....	1
1.2	Aktinische Keratosen.....	2
1.3	Condylomata acuminata.....	6
1.4	Wirkmechanismus von Ingenolmebutat	7
1.4.1.	Direkte Zytotoxizität.....	8
1.4.2.	Immunreaktion	8
1.5	Chemokine	11
1.6	Antimikrobielle Peptide.....	13
1.6.1.	Defensine	13
1.6.2.	Cathelicidine.....	14
1.6.3.	Ribonukleasen	14
1.7	Hyaluronan	14
1.8	Ziele der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material (Reagenzien und Puffer)	17
2.2	Zellkultur.....	18
2.3	Passagieren und Ernten der Zellen.....	19
2.4	Zellstimulation	19
2.5	MTT-Assay	20
2.6	Wundheilungs-Assay (Scratch-Assay).....	21
2.7	Quantitative <i>real-time</i> PCR- (qPCR-) Analyse	22
2.7.1.	RNA-Isolation	22
2.7.2.	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	23
2.7.3.	cDNA-Synthese.....	23
2.7.4.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	24
2.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	29
2.9	Time-lapse Aufnahmen von <i>ex vivo</i> stimulierten CA.....	31
2.10	Hämatoxylin- Eosin- Färbung	31
2.11	Statistische Auswertung.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Effekt verschiedener Konzentrationen von Ingenolmebutat auf die Zellviabilität	33
3.2	Effekt von Ingenolmebutat auf die kutane Wundheilung	34
3.3	Effekt von Ingenolmebutat auf die Regulation von Chemokinen in verschiedenen Zelllinien	36
3.4	Effekt von Ingenolmebutat auf die Regulation von Genen des Hyaluronsäuremetabolismus in verschiedenen Zelllinien	43

3.5	Effekt von Ingenolmebutat auf die Regulation antimikrobieller Peptide in verschiedenen Zelllinien	43
3.6	Effekt von Ingenolmebutat auf Condylomata acuminata unter <i>in-vivo</i> - sowie <i>ex-vivo</i> -Stimulation	45
4	Diskussion.....	47
5	Literaturverzeichnis.....	60

1 Einleitung

1.1 Ingenolmebutat

Ingenolmebutat (IM) ist der internationale Freiname für Ingenol-3-Angelat, welches chemisch einen Ester aus der Gruppe der Diterpene darstellt (Abb. 1). Es handelt sich um die Wirksubstanz des Safts der Pflanze Garten-Wolfsmilch (lat.: *Euphorbia peplus*), welche als Neophyt auf Äckern und Gärten weltweit verbreitet ist. Die aktuell übliche Substanzgewinnung beinhaltet das Trocknen und Mahlen der oberirdischen Anteile der Pflanze (1), die Extraktion und anschließende Aufreinigung des Wirkstoffes sowie letztlich die Kristallisation zu einem weiß bis hellgelbem kristallinen Pulver (1, 2). Neben dem direkten Herstellungsprozess aus der Pflanze, ermöglicht die Semisynthese von IM aus der Grundstruktur Ingenol eine effizientere Gewinnung des Wirkstoffes (3, 4). Des Weiteren ist ein Verfahren für die chemische Synthese von Ingenol etabliert worden, welches die Grundlage für die Totalsynthese von IM ermöglicht (5).

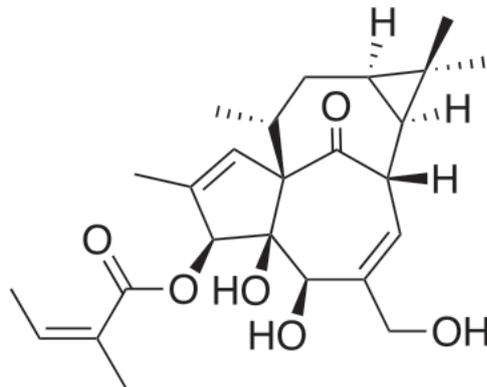


Abb. 1: Strukturformel von Ingenolmebutat (C₂₅H₃₄O₆). Der Ester sowie die vier Isoprene (C₅H₈) bilden eine komplexe Ringstruktur.

Wolfsmilchgewächse sind bereits seit langer Zeit als Arzneipflanzen bekannt. So beschrieb Hippokrates die *Euphorbia peplus* bereits im vierten vorchristlichen Jahrhundert als Abführmittel für die innere Reinigung des Körpers (6). Der griechische Arzt Dioskurides (1. Jahrhundert) empfahl die Anwendung des Saftes der Wolfsmilcharten sowie der getrockneten Blätter des Unkrautes zur Behandlung von Warzen sowie zur Schmerzlinderung bei

Zahnbeschwerden (7). Im Jahre 1986 wurde in Australien eine rund 2000 Patienten umfassende Studie über die häusliche Behandlung von aktinischen Keratosen (AK) sowie weißen Hautkrebs durchgeführt. Acht Personen gaben hierbei den Milchsaft der *Euphorbia peplus* als verwendetes Hausmittel an und berichteten über eine Abheilung ihrer AK (8).

Seit November 2012 ist IM in der Europäischen Union als Wirkstoff in einer Gelformulierung (Picato[®], Leo Pharma GmbH, Ballerup, Dänemark) für die Behandlung nicht-hyperkeratotischer, nicht-hypertropher AK bei Erwachsenen zugelassen (1, 9).

1.2 Aktinische Keratosen

AK stellen eine häufige, durch kumulierte Sonnenexposition hervorgerufene Hauterkrankung dar. Während diese früher als Präkanzerosen galten, wird heutzutage die Klassifizierung als in-situ-Plattenepithelkarzinome der Epidermis bevorzugt (10, 11). Die Prävalenz der AK in der älteren, kaukasischen Bevölkerung ist sehr hoch und liegt für Männer bei 49% und für Frauen bei 28% (12). AK treten bevorzugt bei hellhäutigen Patienten mit Hauttyp I oder II nach Fitzpatrick auf (13) und entstehen an Hautarealen des Körpers, die vermehrt einer chronischen UV-Exposition ausgesetzt sind. Häufig betroffen sind insbesondere die „Sonnterrassen“ wie Stirn, Ohrhelix, Handrücken, die Außenseite der Unterarme sowie die unbehaarte Kopfhaut beim männlichen Geschlecht (14).

Bei der Entstehung der AK stellt besonders UVB-Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 280 bis 320 nm einen Risikofaktor dar (15), die durch Bildung von Pyrimidin-Dimeren direkte Schäden an der DNA der Keratinozyten verursacht (16, 17). Dies kann Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 zur Folge haben (18), welches an der Einleitung der Apoptose mutierter Zellen und deren Reparaturmechanismen beteiligt ist. Weitere molekulare Veränderungen, die bei der Ätiopathogenese von AK eine Rolle spielen, sind Mutationen des Protoonkogens RAS, die zu einer unkontrollierten Zellteilung führen (19). Als Kofaktor bei der Entstehung von AK werden ferner humane Papillom-Viren (HPV) diskutiert (20, 21).

Klinisch imponieren AK als hautfarbene bis erythematöse, teils bräunliche bis gelbliche hyperkeratotische Papeln oder Plaques, die einen Durchmesser von

einem Millimeter bis hin zu wenigen Zentimetern betragen. Es handelt sich um vorwiegend symptomfreie Hauterscheinungen, die in seltenen Fällen Beschwerden wie Juckreiz oder Brennen verursachen können (22).

AK können solitär auftreten, oder in einem umschriebenen Hautareal in multipler Anzahl als sogenannte Feldkanzerisierung erscheinen (siehe auch Abb. 2A). Dieser Begriff wurde 1953 erstmals durch Slaughter *et al.* beschrieben und umfasst neben klinisch ersichtlichen Herden auch subklinische Läsionen (23). Diese liegen in der unmittelbaren Tumorperipherie und sind dadurch gekennzeichnet, dass sie histologisch bereits transformierte Keratinozyten unterschiedlicher Ausprägung in der Epidermis aufweisen (24, 25).

AK können sich unbehandelt in drei verschiedene Richtungen weiterentwickeln. Sie können entweder eine spontane Remission zeigen, jahrelang unverändert beständig bleiben oder in ein invasiv wachsendes Plattenepithelkarzinom (PEK; spinözelluläres Karzinom, engl. *squamous cell carcinoma*, SCC) übergehen (26). Die Wahrscheinlichkeit für die Transformation in ein invasives PEK bei einem durchschnittlichen Patienten mit sieben bis acht AK liegt über einen Zeitraum von zehn Jahren bei 6,1%- 10,2% (27). Patienten, die aufgrund einer Organtransplantation eine immunsupprimierende Medikation erhalten, weisen ein über 20-fach erhöhtes Risiko auf, ein invasiv wachsendes PEK zu entwickeln (28). Mittlerweile ist außerdem bekannt, dass auch aus subklinischen Läsionen und geringergradigen AK PEK entstehen können (29). Der mögliche Übergang der AK in einen invasiven Tumor zeigt die Notwendigkeit der Behandlung dieser Läsionen auf.

Zur Behandlung der AK stehen eine Vielzahl von Therapieoptionen zur Verfügung, die sich in der Behandlungsdauer und der Ausprägung der Begleiterscheinungen unterscheiden. Bei der Wahl des Vorgehens muss zwischen läsionsgerichteter und feldgerichteter Therapie unterschieden werden. Bei der läsionsgerichteten Behandlung isolierter AK können Verfahren wie die Exzision mit anschließender histopathologischer Untersuchung, die Laserablation mit einem CO₂- oder Er-YAG-Laser sowie die Kryotherapie mit flüssigem Stickstoff (-196°C) zur Anwendung kommen.

Zu den etablierten topischen Wirkstoffen bei der feldgerichteten Therapie der AK gehören Diclofenac-Natrium, Imiquimod, die Photodynamische Therapie (PDT) sowie 5-Fluorouracil (5-FU). Als neuere Therapieoption steht seit 2012 IM zur Verfügung.

Der Wirkstoff Diclofenac-Natrium wird als 3%iges Gel (Solaraze[®], Almirall S.A., Barcelona, Spanien) zweimal täglich über 60 bis 90 Tage angewendet. Doppeltverblindete, placebokontrollierte Phase-III-Studien zeigten bei einer Behandlungsdauer von 60 Tagen bei 33% der Patienten eine vollständige Abheilung der AK (30). Bei einer Anwendungsdauer von 90 Tagen wurden Abheilungsraten von 50% beschrieben (31).

Der Immunmodulator Imiquimod ist in 5%iger Wirkkonzentration als Creme (Aldara[®], Meda Pharma GmbH, Solna, Schweden) zugelassen und wird dreimal wöchentlich über vier Wochen angewendet. Nach einem vierwöchigen behandlungsfreien Intervall kann eine weitere Behandlung über vier Wochen durchgeführt werden. In einer Phase-III-Studie über einen Zeitraum von 16 Wochen zeigten sich Abheilungsraten von 45,1% (32). Alternativ wird Imiquimod als 3,75%ige Creme (Zyclara[®], Meda Pharma GmbH, Solna, Schweden) einmal täglich in zwei 14-tägigen Intervallen, die durch eine zweiwöchige Pause unterbrochen werden, verabreicht. Die Auswertung von zwei doppelverblindeten, placebokontrollierten und randomisierten klinischen Studien zeigte acht Wochen nach der Behandlung eine vollständige Abheilung der Läsionen bei 35,6% der Patienten (33).

Bei der PDT werden Photosensibilatoren wie 5-Aminolävulinsäure (ALA; Ameluz[®], Biofrontera Pharma GmbH, Leverkusen, Deutschland) oder 5-Aminolävulinsäuremethylester (MAL; Metvix[®], Galderma Laboratorium GmbH, Lausanne, Schweiz) selektiv von geschädigten Hautzellen aufgenommen und zu photoaktivierbarem Protoporphyrin IX verstoffwechselt. Durch die Bestrahlung mit Rotlicht mit einer Wellenlänge von 635 nm erfolgt die Bildung hochreaktiver Sauerstoffmoleküle, die eine Schädigung neoplastischer Zellen verursachen (34). Phase-III-Studien beschreiben für beide Wirkstoffe Abheilungsraten um die 90% (35-38).

Topisches 5-FU (Efudix[®]-Creme 5%, Meda Pharma GmbH, Solna, Schweden) wird zweimal täglich über einen Behandlungszeitraum von bis zu acht Wochen

appliziert, wobei in einer Meta-Analyse von Gupta *et al.* eine durchschnittliche Abheilung in $52 \pm 18\%$ der Fälle nachgewiesen werden konnte (39).

Obwohl verschiedene Wirkstoffe bei der feldgerichteten Behandlung von AK effektiv sind, zeichnet sich IM insbesondere durch die kurze Behandlungsdauer aus. Das farblose Picato[®]-Gel wird in zwei Konzentrationen, 150 µg/g sowie 500 µg/g, angewandt. Die Gelformulierung wird im Bereich des Gesichtes und der Kopfhaut in 0,015%iger Konzentration einmal täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen appliziert, während am Körper und an den Extremitäten die 0,05%ige Konzentration an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zur Anwendung kommt. In der Zulassungsstudie konnte eine vollständige klinische Abheilung von AK für Gesicht und Kapillitium in 42,2% sowie für Areale an Stamm und Extremitäten in 34,1% der Fälle gezeigt werden. Eine partielle Rückbildung der Läsionen wurde bei 63,9% der Patienten mit AK im Kopfbereich sowie 49,1% der Probanden mit Läsionen an Körper und Extremitäten beschrieben (40). Im *Follow-up* nach einem Zeitraum von zwölf Monaten nach der Behandlung zeigte sich eine Reduktion der Läsionen um 87% (41). Als Nebenwirkungen zeigten sich Erytheme sowie Schuppung, Krusten, Schwellungen, Pustelbildungen, Erosionen und Ulzerationen, die mit Schmerzen, Juckreiz und Brennen einhergingen (Abb. 2B und D) (40, 42). Die lokalen Begleiterscheinungen zeigten ihr Maximum nach drei bis vier Tagen, waren aber bereits nach acht Tagen stark abgeklungen und nach 29 Tagen narbenlos abgeheilt. Die kurze Behandlungsdauer sowie das rasche Abklingen von Begleiterscheinungen führt zu einer höheren Patientenzufriedenheit und besseren Adhärenz der Patienten (40).



Abb. 2: Entzündungsreaktion bei der Behandlung aktinischer Keratosen bzw. einer Cheilitis actinica mit Ingenolmebutat. Dargestellt sind Läsionen an der Stirn sowie der Unterlippe vor der Behandlung (A und C) sowie am vierten Tag nach Applikation von IM an drei aufeinander folgenden Tagen (0,015% IM einmal täglich) (B und D) (43).

1.3 Condylomata acuminata

Bei Condylomata acuminata (Feigwarzen, CA) handelt es sich um eine häufige, sexuell übertragbare Virusinfektion, die durch HP-Viren, meist die *Low-risk*-HPV-Typen 6 und 11, verursacht wird (44-46). Die Prävalenz beträgt bei sexuell aktiven 15- bis 49-Jährigen etwa 1-2 % (47). Klinisch imponieren CA als weißliche, rötliche oder gelb-gräuliche verruköse Papeln. Die stecknadelkopfgroßen Warzen können einzeln auftreten, erscheinen aber häufiger disseminiert in multipler Anzahl und können zu blumenkohlartigen Wucherungen konfluieren. Die Manifestation zeigt sich meist am äußeren Genital sowie perianal (48) (siehe auch Abb. 3A).

Bei der Therapie der CA stehen zum einen chirurgische Verfahren wie die Kryotherapie mit flüssigem Stickstoff, die Laserbehandlung, die Kürettage sowie die elektrophysikalische Abtragung zur Verfügung (49). Weitere Behandlungsoptionen stellen die Anwendung von Trichloressigsäure (TCA), Podophyllotoxin, Sinecatechine (Grünteeextrakte) sowie Imiquimod dar (49).

Die Therapie der CA ist häufig sehr langwierig und durch hohe Rezidivraten von 20-30% und höher gekennzeichnet (46). In 2015 wurde erstmals über die erfolgreiche Behandlung von CA mit IM berichtet (50). Die Anwendung erfolgt hierbei außerhalb des Zulassungsbereiches (*off-label*). Hierbei kommt es nach dem Auftragen geringer Mengen von IM innerhalb von Stunden zu einer gräulich-weißlichen Verfärbung und schließlich zur Ablederung der Läsionen. In der Folge zeigt sich dann eine rasche, komplikationslose Wundheilung der entstandenen Erosionen (Abb. 3).

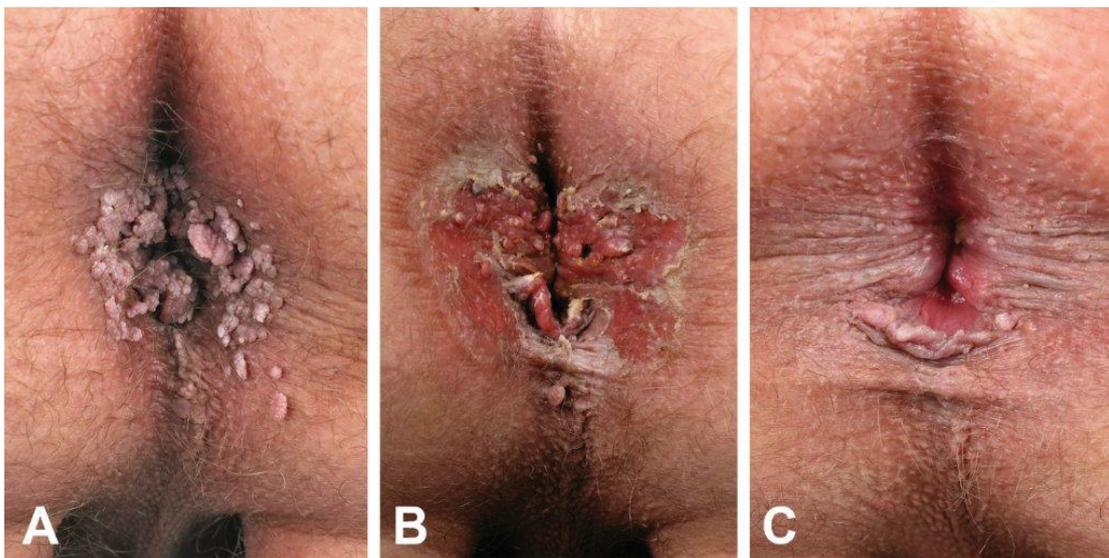


Abb. 3: Erfolgreiche Behandlung von Condylomata acuminata mit Ingenolmebutat. Multiple CA am Anus eines 53-jährigen Patienten (A). Einen Tag nach Behandlung mit 0,05% IM zeigt sich eine ausgeprägte Entzündungsreaktion mit Ablederung zuvor sichtbarer CA (B). Nach vier Wochen sind die Läsionen vollständig abgeheilt (einmalige Anwendung mit 0,05% IM sowie zweimalige Anwendung von 0,015% IM in wöchentlichem Abstand) (C) (51).

1.4 Wirkmechanismus von Ingenolmebutat

Der detaillierte Wirkmechanismus von IM ist heute noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene *in-vitro*- sowie *in-vivo*-Studien propagieren, dass IM einen dualen Wirkmechanismus aufweist. Dieser besteht neben einer direkten Zytotoxizität mit schnell auftretender Zellnekrose aus der Induktion einer Neutrophilen-reichen Immunantwort, die eine anhaltende Tumorkontrolle ermöglicht (52, 53).

1.4.1 Direkte Zytotoxizität

IM wirkt in hohen Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) zytotoxisch und verursacht hierdurch eine initiale, schnell auftretende Nekrose von Zellen. Stimulierte B16-Melanomzellen der Maus zeigten *in vitro* bei einer verwendeten Konzentration von $230 \mu\text{M}$ einen rapiden Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, eine Schwellung der Mitochondrien, einen Zerfall der Plasmamembran sowie eine Auflösung von Zellorganellen (54). *In-vitro*-Versuche an Lewis-Lungenkarzinom-Zellen sowie *in-vivo*-Experimente mit einer topisch aufgetragenen Einzeldosis von 42 nmol IM an Mäusen mit subkutan injizierten B16-Maus-Melanomzellen wiesen hierbei ähnliche Ergebnisse auf (54). Stahlhut *et al.* konnten an primären humanen Keratinozyten, einer Zervixkarzinom-Zelllinie (HeLa), immortalisierten Keratinozyten (HaCat) sowie an einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (HSC-5) einen 50%igen Abfall der Mitochondrienaktivität bei Stimulation mit hohen Konzentrationen von IM ($214\text{-}289 \mu\text{M}$) nachweisen. In einem weiteren Versuch erwiesen sich primäre humane Keratinozyten nach Induktion zur Differenzierung weniger sensibel auf hohe Konzentrationen von IM (267 und $400 \mu\text{M}$) als nicht differenzierte Vergleichszellen (55).

Die Ursache dieses zytotoxischen Einflusses von IM liegt vermutlich in einer intrazellulären Calcium-Erhöhung, die durch Ionenströme aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma verursacht wird (55). Diese zytosolische Calcium-Erhöhung zeigte sich in den Studien von Stahlhut *et al.* stärker in der HeLa-Tumorzelllinie als in primären humanen Keratinozyten. Des Weiteren wiesen Keratinozyten erst nach einem längeren Zeitraum eine Reduktion der Zellviabilität auf als die drei anderen untersuchten Zelllinien (HeLa, HSC-5, HaCat). Diese Beobachtungen legen die Hypothese nahe, dass Keratinozyten im Vergleich zu Tumorzellen über einen längeren Zeitraum zytotoxischen Konzentrationen von IM ausgesetzt sein können.

1.4.2 Immunreaktion

Neben der Induktion einer Zellnekrose verursacht IM in niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen ($10\text{-}1000 \text{ nM}$) zusätzlich eine immunologische Reaktion. Das rekrutierte Entzündungszellinfiltrat besteht hierbei vorwiegend

aus neutrophilen Granulozyten, die eine entscheidende Rolle bei der Tumorbekämpfung durch IM spielen (56). Mikrophotographische Aufnahmen UV-induzierter Tumoren (B16- und LK2-Tumoren) sowie normaler Haut von Mäusen wiesen bereits sechs Stunden nach der Behandlung mit IM eine Dilatation kleiner Blutgefäße sowie eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten nach, die sich nach 24 Stunden auch in der Tumorperipherie zeigten (56). An zwei murinen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von neutrophilen Granulozyten in über 70% der Fälle zu einem Tumorrezidiv führte, wohingegen eine Beeinträchtigung natürlicher Killerzellen oder Makrophagen keinen Einfluss auf das Wiederkehren des Tumors hatte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass neutrophile Granulozyten maßgeblich an der antitumoralen Wirkung von IM beteiligt sind und insbesondere für eine andauernde Tumorkontrolle entscheidend sind (56).

IM bewirkt in niedrigen Konzentrationen eine Aktivierung und Translokation des Enzyms Proteinkinase C Delta (PKC δ) in den Nukleus der Zelle (57, 58). Die Isoform des Enzyms spielt eine wichtige Rolle in der Tumorpromotion und hat vor allem proapoptotische (59, 60) und antiproliferative Effekte (61). Die proapoptotische Wirkung konnte in verschiedenen mit IM behandelten Tumorzelllinien gezeigt werden (57, 62, 63) und wird mit der Aktivierung des Enzyms in Zusammenhang gebracht (57, 58). Die Aktivierung der PKC δ sowie der durch IM verursachte Zelltod führen außerdem zu einer Immunstimulation des behandelten Areals, bei der eine erhöhte lokale Produktion inflammatorischer Mediatoren wie Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β), beobachtet wird (56). Diese wiederum beeinflussen die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die über Endothelzellen der postkapillaren Venolen in das betroffene Areal migrieren (64, 65) (Abb. 4). *In-vitro*-Experimente mit Zellüberständen humaner Keratinozyten, Fibroblasten, neutrophiler Granulozyten und einer humanen Melanomzelllinie (Me10538) zeigten nach Stimulation mit IM eine Induktion von Interleukin-8 (IL-8, syn.: CXCL8) (56), welches ebenfalls ein potentes Chemoattraktans für neutrophile Granulozyten ist (66).

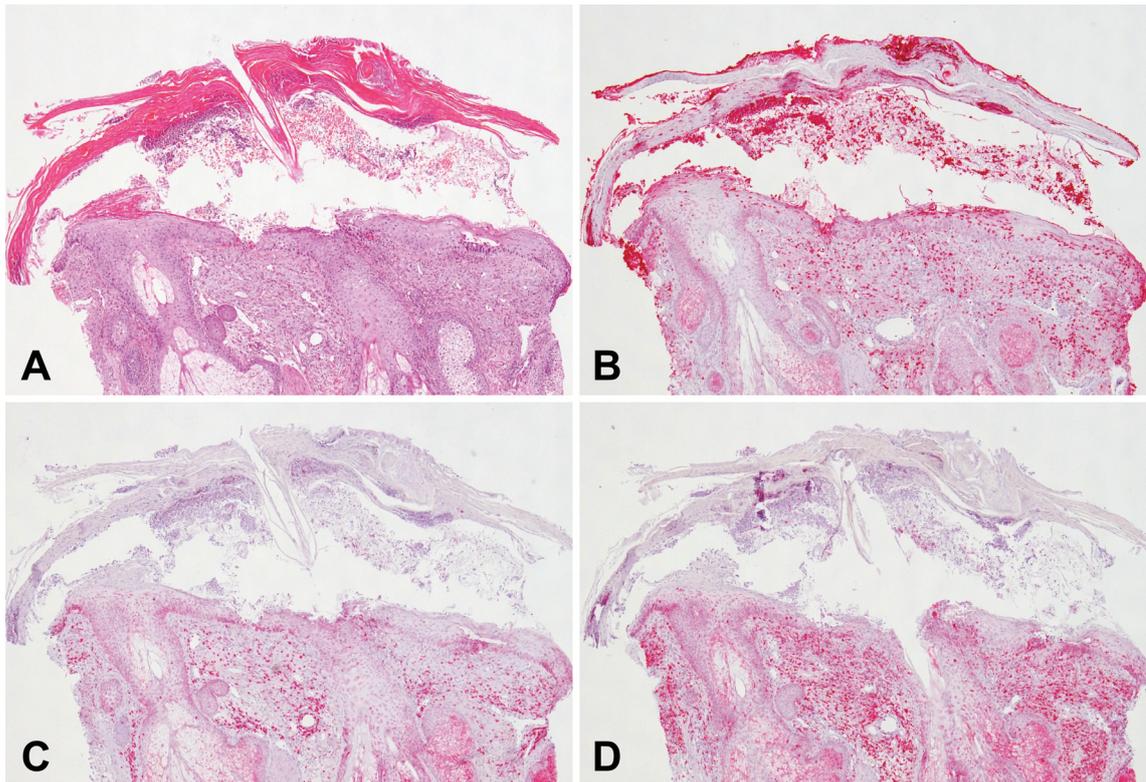


Abb. 4: Ingenolmebutat (IM) induziert ein gemischtzelliges Entzündungsinfiltrat. Histologisches Bild einer aktinischen Keratose 4 Tage nach einer Behandlung mit 0,015%igem IM-Gel. IM rekrutiert ein Neutrophilen-reiches Entzündungsinfiltrat (A) (Hämatoxylin und Eosin Färbung). In der Myeloperoxidase Färbung werden die zahlreichen Neutrophilen angefärbt (B). CD3 färbt die zusätzlich einwandernden T Zellen (C), CD68 markiert neben den Neutrophilen auch zahlreiche Makrophagen (D) (43).

Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch IM scheint neben dieser Signalkaskade über verschiedene Botenstoffe auch durch die direkte Aktivierung von Endothelzellen zu erfolgen (56). Hampson *et al.* konnten zeigen, dass IM in Endothelzellen neben einer erhöhten Expression von IL-8/CXCL8 auch eine gesteigerte Bildung der Zelladhäsionsmolekülen E-Selectin und ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) bewirkte (67). Diese sind für die Adhäsion und Transmigration von Neutrophilen notwendig (68, 69). Weiterführende Analysen demonstrieren, dass dieser Mechanismus im direkten Zusammenhang mit der Aktivierung der PKC δ in Endothelzellen steht (67).

Cozzi *et al.* konnten die Wirksamkeit von IM im Mausmodell bestätigen. Die Behandlung von zuvor mit UVB bestrahlten Tieren mit IM (0,05%) führte zu einer Reduktion von nachfolgend entstehenden Hautläsionen um ca. 70% im Vergleich zur Placebogruppe. Immunhistochemische Analysen der Epidermis

konnten außerdem zeigen, dass sich die Anzahl der p53-mutierten Keratinozyten nach Anwendung von IM um ca. 70% reduzierte (70).

Neben der hohen Wirksamkeit von IM beobachteten Ogbourne *et al.* außerdem, dass die Behandlung UV-induzierter Tumoren von Mäusen mit einem sehr guten kosmetischen Ergebnis der Haut einherging (54). Auch klinische Fallbeispiele deuten auf eine Verbesserung der Hautstruktur sowie eine Reduktion von Alterungserscheinungen der Haut hin (71). Ein potentiell positiver Einfluss von IM auf die kutane Wundheilung könnte insbesondere auf die Expression erwähnter Mediatoren wie IL-1 β , TNF- α und IL-8 zurückzuführen sein, die maßgeblich am physiologischen Wundheilungsprozess beteiligt sind (72). Weitere Studien an dermalen Fibroblasten zeigten außerdem, dass die narbenlose Abheilung unter IM durch eine Modulation von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (EZM), wie Hyaluronan, herbeigeführt werden könnte (73).

Zusammenfassend vermittelt IM seine Effekte vermutlich über eine Vielzahl von Mechanismen. Hierbei scheint ein Zusammenspiel aus Chemoablation und immunologischen Prozessen entscheidend für eine anhaltende Tumorkontrolle zu sein.

1.5 Chemokine

Chemokine sind Signalproteine, die eine Unterfamilie der Zytokine bilden (**chemotaktische Zytokine**). Es handelt sich um kleine Polypeptide, die eine Molmasse von 8-10 kDa aufweisen. Chemokine beeinflussen die Migration diverser Zellen, wie Lymphozyten, neutrophiler Granulozyten, Monozyten, eosinophiler Granulozyten sowie dendritischer Zellen zu ihrem Zielort (74, 75). Die erste Charakterisierung eines Chemokins erfolgte 1989 mit der Beschreibung des CXCL8 (IL-8) als Neutrophile-aktivierendes Protein (66). Heute sind ca. 50 verschiedene Moleküle bekannt.

Chemokine spielen eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen, Autoimmunerkrankungen, Infektionserkrankungen sowie bei der Tumorentstehung (75, 76). Sie bedingen durch Aufbau eines Konzentrationsgradienten die zielgerichtete Migration von Zellen entlang des Gefälles (75). Bei den hierbei beteiligten Chemokinrezeptoren handelt es sich

um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (Tabelle 1) (77, 78).

Die Struktur der Chemokine weist typischerweise vier konservative Cysteine auf, die durch Bildung von Disulfidbrücken die tertiäre Struktur des Moleküls bestimmen. Anhand der beiden am N-Terminus befindlichen Cysteine lassen sie sich in vier Unterfamilien gliedern, die C-, CC-, CXC- sowie CX3C-Chemokine. Die CC-Familie, bei denen die Cysteinreste unmittelbar aufeinander folgen, sowie die CXC-Familie, die durch Einschub einer Aminosäure charakterisiert sind, stellen hierbei die beiden größeren Untergruppen dar (74, 75).

Neben ihrer chemischen Struktur können Chemokine auch funktionell eingeteilt werden. Hierbei erfolgt die Unterteilung in proinflammatorisch sowie homöostatisch. Homöostatische Chemokine werden konstitutiv während der Hämatopoese im Knochenmark und im Thymus, bei der Bildung des erworbenen Immunsystems in den Lymphknoten und der Milz sowie im gesunden peripheren Gewebe exprimiert. Die Bildung der proinflammatorischen Moleküle erfolgt erst durch bestimmte Stimuli wie Pathogene oder Zytokine, um eine Einwanderung von Effektorzellen in Infektionen, traumatischen Wunden sowie Tumoren zu bewirken. Proinflammatorische Chemokine bilden den größeren Anteil, wobei auch Proteine bekannt sind, die beiden Gruppen zuzuordnen sind (79).

Rezeptor	Rezeptor-exprimierende Zielzellen	Liganden
CXCR1	Neutrophile Granulozyten, MØ	CXCL8
CXCR2	Neutrophile und eosinophile Granulozyten, MØ	CXCL1
CXCR3	T- und B-Zellen	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CCR1	Neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, MØ, NK-Zellen, T-Zellen, unreife DZ, Monozyten	CCL5
CCR2	Neutrophile Granulozyten, MØ, T- und B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten	CCL2
CCR3	T-Zellen, Eosinophile und basophile Granulozyten	CCL5

CCR5	MØ, T- und B-Zellen, unreife und reife DZ, Monozyten	CCL5
CCR6	T- und B-Zellen, unreife DZ	CCL20
CCR10	Melanozyten, dermale Fibroblasten, dermale Endothelzellen, T-Zellen der Haut	CCL27
unbekannt	-	CXCL14

Tabelle 1: Ausgewählte Chemokine, ihre Rezeptoren und Zielzellen (75, 77, 80, 81). DZ, Dendritische Zelle; MØ, Makrophage.

1.6 Antimikrobielle Peptide

Zum Schutz vor eindringenden Mikroorganismen dienen dem Menschen neben der physikalischen Barriere der Haut auch antimikrobielle Peptide (AMP). Diese stellen als körpereigene Antibiotika einen wichtigen Abwehrmechanismus des Organismus gegen Krankheitserreger wie Bakterien, Viren und Pilze dar und bilden somit einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems (82). Die wichtigsten Familien der AMP bilden die Defensine, die Cathelicidine sowie die Ribonukleasen.

1.6.1 Defensine

Defensine sind kleine AMP (2-6 kDa), die durch hydrophobe und kationische Aminosäuren in ihrem Aufbau gekennzeichnet sind (82). Anhand der Anordnung ihrer drei intramolekularen Disulfidbrücken lassen sie sich in α -, β - sowie θ -Defensine unterteilen (83), wobei letztere lediglich bei Affenarten isoliert werden konnten (84). Während die sechs verschiedenen α -Defensine von Neutrophilen und Panethzellen des Magendarmtraktes exprimiert werden, erfolgt die Bildung der vier β -Defensine (HBD1-4) vorwiegend in Epithelzellen und Keratinozyten (83, 85, 86). HBD1 wird konstitutiv gebildet, wohingegen die Expression von HBD2 und HBD3 durch proinflammatorische Mediatoren nach Kontakt mit Mikroorganismen induziert wird (86-88). Der detaillierte Wirkmechanismus der Defensine ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Peptide aufgrund ihrer kationischen Aminosäurereste mit negativ geladenen Membranmolekülen verschiedener Erreger interagieren. Hierbei werden besonders anionische Phospholipide bakterieller Membranen

angegriffen, wobei durch den unspezifischen Ansatzpunkt ein breites Wirkspektrum erzielt wird (82).

1.6.2 Cathelicidine

Cathelicidine sind charakterisiert durch eine hoch konservierte N-terminal gelegene Cathelin-Domäne sowie durch eine variable, antimikrobielle C-terminale Domäne (89). Das einzige bisher identifizierte humane Cathelicidin ist das LL-37 (90, 91). Es entsteht durch enzymatische Spaltung (Proteinase 3) aus dem Vorläuferprotein hCAP-18 (18 kDa *human cationic protein*), welches in den Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert wird (92). Neben der konstitutiven Bildung des Peptids durch verschiedene Zellen wie neutrophile Granulozyten, Mastzellen und Epithelzellen des Respirationstraktes, wird die Expression in Keratinozyten der Haut durch Entzündungen, Infektionen und Verletzungen der Haut induziert (93).

1.6.3 Ribonukleasen

Die RNase A-Superfamilie umfasst im Menschen acht verschiedene Moleküle (86). Die in dieser Arbeit untersuchte RNase7 weist durch ihre Ribonuklease-Aktivität eine hohe antimikrobielle Potenz gegenüber zahlreichen Pathogenen auf. Hierbei wurde auch ein Effekt auf Vancomycin-resistente Enterokokken beobachtet (*Enterokokkus faecium*) (94). RNase7 wird von Keratinozyten der Haut exprimiert und wird sowohl konstitutiv, als auch durch Mediatoren sowie Bakterien induziert, gebildet (94).

1.7 Hyaluronan

Bei Hyaluronan (Syn. Hyaluronsäure, HA) handelt es sich um ein Glykosaminoglykan, das einen Hauptbestandteil der EZM bildet. Die Synthese des Moleküls erfolgt durch membranständige Enzyme, die das Produkt von der Innenseite der Plasmamembran in den Extrazellulärraum ausstoßen (95). Beim Menschen sind heute drei Isoenzyme dieser Hyaluronan-Synthase, HAS 1-3, bekannt (96-100), die jeweils unterschiedlich große Hyaluronanfragmente bilden (101). Der Abbau von HA erfolgt durch Hyaluronidasen (HYAL). Hierbei wird das hochmolekulare HA durch die an der Plasmamembran lokalisierte

HYAL-2 zu einer Größe von etwa 20 kDa gespalten und im weiteren Verlauf durch die intralysosomale HYAL-1 zersetzt (102).

HA spielt eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung, wobei die genaue Funktion maßgeblich von der Größe des gebildeten Fragmentes abhängt (103). Es nimmt Einfluss auf die entstehende Entzündungsreaktion, die nachfolgende Granulation, Reepithelisierung und die Remodellierung. HA bewirkt eine erhöhte Zellinfiltration und moduliert über Oberflächenrezeptoren (CD44) die Ausschüttung proinflammatorischer Signalstoffe. Des Weiteren führt die HA-reiche Matrix zu einem stabileren Granulationsgewebe, fördert die Neoangiogenese und begünstigt die Zellmigration (104-106). Durch verminderte Kollageneinlagerung wird außerdem die Narbenbildung vermindert (107-109).

Besonders kleinere Moleküle, die durch HYAL entstehen, werden mit der Tumorgenese und Metastasierung in Zusammenhang gebracht (103, 110, 111). Ein erhöhtes Vorkommen von HA sowie HYAL konnte in einer Reihe von verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden, wie auch in *in-situ*-Karzinomen der Haut (112) sowie im Speichel von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion (113). HA fördert insbesondere durch Unterdrückung der Apoptose sowie Stimulation der Transkription von Matrix-Metalloproteasen (MMP) die Tumorentstehung und –invasion (103). Ferner begünstigt HA das adhäsionsunabhängige Zellwachstum, indem es die physiologische Einleitung der Apoptose von Zellen verhindert, die den Kontakt zur EZM verlieren. Dieser Vorgang bildet neben der durch HA verursachten Stimulation der Angiogenese die Voraussetzung für die Metastasierung transformierter Zellen (114).

1.8 Ziele der Arbeit

Als Ziel der vorliegenden Arbeit galt es, die molekularen und zellulären Wirkmechanismen von IM bei der Behandlung epithelialer Tumoren und in diesem Zusammenhang insbesondere die Effekte auf das kutane Tumormikromilieu näher zu charakterisieren. Hierbei sollte eine mögliche differentielle Regulation verschiedener Chemokine und AMP in gesunden Hautzellen im Vergleich zu Tumorzellen durch IM *in vitro* untersucht werden. Des Weiteren wurde ein *ex-vivo*-Ansatz gewählt, um die Bedeutung des

Immunsystems für die Wirkung von IM herauszuarbeiten. Schließlich galt es, den Einfluss von IM auf die EZM und die Wundheilung *in vitro* zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material (Reagenzien und Puffer)

MTT-Lösung

- 25 mg Tetrazoliumbromid (MTT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)
- 5 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Merck Millipore, Billerica, USA)

MTT-Stopplösung

- 49,7 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 0,3 ml Salzsäure (HCL, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)
 - 5 g Natriumlaurylsulfat (SDS, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- pH-Wert: 7,4

ELISA-Puffer (CXCL8)

- 0,5 g Bovines Serum Albumin (BSA, Merck Millipore, Billerica, USA)
 - 250 µl Tween®-20 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 4,38 g Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 1,214 g Trizma base (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)
 - 500 ml destilliertes Wasser
- pH-Wert: 7,2 - 7,4

ELISA-Puffer (CCL5) / Blockpuffer

- 5 g Bovines Serum Albumin (BSA, Merck Millipore, Billerica, USA)
- 500 ml PBS (Merck Millipore, Billerica, USA)

Scott-Puffer

- 40 mg Magnesiumsulfat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 2 g Natriumhydrogencarbonat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 1000 ml destilliertes Wasser (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.2 Zellkultur

Die Experimente wurden an humanen Zell- und Tumorzelllinien durchgeführt. Es wurden die folgenden Zellen verwendet: Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF), humane immortalisierte Keratinozyten der HaCaT-Zelllinie, aus Plattenepithelien der Kopf- Halsregion gewonnenen Zellen der UD-SCC 8-, UD-SCC 2-, UD-SCC 1- und UD-SCC 7A-Zelllinien (Tabelle 2), primäre humane Fibroblasten und Keratinozyten sowie aus Zervixkarzinomen etablierte Zellen der HeLa-Linie. Die Verwendung der primären humanen Keratinozyten und Fibroblasten wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gebilligt (Studiennummer: 1928).

Zelllinie	Alter	Geschlecht	TNM-Stadium	Ursprung	HPV-Status
UD-SCC 1	64	männlich	pT3pN2b	Tonsilla palatina	negativ
UD-SCC 2	58	männlich	pT1pN3	Hypopharynx	positiv
UD-SCC 7A	71	männlich	T2N2b	Vallecula	negativ
UD-SCC 8	43	männlich	T2N0M0	Larynx	negativ
HeLa	31	weiblich	unbekannt	Zervix	positiv

Tabelle 2: Charakteristika der Tumorzelllinien

Alle Zellen wurden nach dem Ausfrieren in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) in ihrem spezifischen Medium unter sterilen Bedingungen kultiviert. Primäre Keratinozyten wurden hierbei in serumfreiem Keratinozyten-Medium (SFM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) unter Zugabe von 1% antibiotischer Lösung (100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin, PAA, Pasching, Österreich), sowie L-Glutamin (2 mM, PAA, Pasching, Österreich), gehalten. Die Zellen der HeLa-Linie wurden in *Minimum Essential Medium* (MEM, PAA, Pasching, Österreich) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) gezüchtet. Alle weiter genannten Zellen wurden in Dulbeccos

modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) mit einem Zusatz von 10% FCS, 1% Natrium-Pyruvat (Merck Millipore, Billerica, USA), 1% L-Glutamin sowie 1% Penicillin-Streptomycin zur Vermeidung von Kontaminationen kultiviert. Die Zellen wurden bei 95% Luftfeuchtigkeit, 5% Kohlenstoffdioxid sowie 37°C in einem Brutschrank (INCO 2, Memmert, Schwabach, Deutschland) inkubiert.

2.3 Passagieren und Ernten der Zellen

Für das Passagieren der Zellen wurde zunächst bei vollständiger Konfluenz des Zellrasens das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellkulturflasche mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Merck Millipore, Billerica, USA) gespült. Anschließend erfolgte zur Ablösung der Zellen die Zugabe von Trypsin-EDTA (Merck Millipore, Billerica, USA), woraufhin die Kulturflasche leicht geschwenkt und für 5 - 10 Minuten im Brutschrank inkubiert wurde. Die Flüssigkeit wurde aus der Zellkulturflasche in ein Falcon-Röhrchen (Corning, Inc., USA) überführt, in 40 ml Zellkulturmedium verdünnt und für 10 Minuten bei 1150 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert (Rotanta 46 RC, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Nachfolgend wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und das die Zellen enthaltende Pellet in frischem Medium gelöst. Abschließend konnten die Zellen im gewünschten Verhältnis (1:2 - 1:10) erneut in Zellkulturflaschen oder auf Well-Platten ausgesät werden.

2.4 Zellstimulation

Für die Experimente wurden die verschiedenen Zellen aus den Zellkulturflaschen auf Well-Platten (BD Bioscience, San Jose, USA) umgesetzt und für die Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion-(qPCR-) Analysen und der MTT-Assays bei einer Konfluenz von 80% für einen Zeitraum von 24 Stunden stimuliert. Die Stimulation für nachfolgende Wundheilungs-Assays erfolgte bei vollständiger Konfluenz. Das hierbei verwendete IM wurde von LEO Pharma (Ballerup, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden für qPCR-Analysen und Scratch-Assays mit fünf verschiedenen Konzentrationen IM stimuliert (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), wobei für jede der Konzentrationen sowie die nicht mit dem Wirkstoff stimulierte Kontrolle je zwei technische Replikate angesetzt wurden. Für die Anfertigung

der MTT-Assays wurden des Weiteren höhere Konzentrationen (10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} M) benutzt. Das als Pulver vorliegende IM (Molekulargewicht: 430,53 g/mol) wurde hierfür in zwei Stocklösungen (10 mM und 100 mM) angesetzt, wobei eine Lösung von 5 g Pulver in 1.160 μ l beziehungsweise 116 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte. Zur Stabilisierung des Wirkstoffes wurde das für die Zellen spezifische Medium mit bovinem Serumalbumin (BSA, Merck Millipore, Billerica, USA) versetzt, sodass dieses in einer Konzentration von 0,05% enthalten war. Um eine Ausfällung des Wirkstoffes zu verhindern, wurde jeweils die Hälfte des angewendeten Mediums doppelt so hoch konzentriert wie gewünscht und anschließend zu einer gleich großen Menge reinen Mediums hinzugegeben. Die Zellen wurden nach der Stimulation im Brutschrank inkubiert.

2.5 MTT-Assay

Um die Viabilität der Zellen unter Einfluss der verschiedenen Konzentrationen von IM zu untersuchen, wurden MTT-Tests durchgeführt. Der gelbe, membrangängige Farbstoff Tetrazoliumbromid (MTT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) wird bei diesem Versuch durch Dehydrogenasen lebender Zellen durch Reduktion in blau-violette Kristalle umgewandelt. Diese Formazan-kristalle bilden das nicht membrangängige Produkt der Reaktion und reichern sich im Inneren der Zellen an. Durch anschließende Zelllyse und Lösung der Kristalle kann im Photometer eine Quantifizierung des freigesetzten Farbstoffes erfolgen. Die Menge des erfassten Farbstoffes weist eine proportionale Beziehung zu der Anzahl der lebenden Zellen auf (115).

Für die Durchführung des Experimentes wurden die Zellen in 96-Well-Platten (BD Bioscience, San Jose, USA) umgesetzt. Es erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit neun verschiedenen Konzentrationen an IM (siehe 3.4). Weitere Zellen wurden mit Kontrollmedium behandelt, wobei zum einen reines Medium zugeführt wurde sowie zur Überprüfung des Vehikels Medium unter Zugabe von DMSO (1.000 μ M).

Anschließend wurde aus jedem ursprünglich mit 200 μ l Medium gefülltem Well die Hälfte der Flüssigkeit entfernt und je 50 μ l der MTT-Lösung hinzugefügt. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C im Brutschrank sowie eine mikroskopische Überprüfung der Kristallbildung. Nachfolgend wurde die

Zellkulturplatte ausgeklopft und 100 µl der MTT-Stopplösung in jedes Well pipettiert. Nach Lösung der Kristalle wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm in einem Photometer (Muliskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) erfasst.

Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 5.03, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) in einem Punktdiagramm dargestellt. Hierbei wurde der Mittelwert der optischen Dichten der Mediumkontrollen als 100% festgelegt und die restlichen Werte auf diesen bezogen. Die technischen Replikate wurden jeweils mit Standardfehler dargestellt. Um eine Beeinflussung der Zellviabilität durch das Vehikel DMSO bei der Lösung des IM-Pulvers auszuschließen, wurde der Mittelwert der optischen Dichten dieser behandelten Zellen mit dem Mittelwert der Daten von denjenigen Zellen verglichen, die reinem Kulturmedium ausgesetzt waren.

2.6 Wundheilungs-Assay (Scratch-Assay)

Für die Durchführung des Versuches wurden die Zellen in eine 12-Well-Platte (BD Bioscience, San Jose, USA) überführt. Zu Beginn des Versuches wurde mit einer 10 µl-Pipettenspitze (Starlab, Hamburg, Deutschland) in jedem Well ein etwa 1 mm breiter Defekt durch den konfluent gewachsenen Zellrasen verursacht. Daraufhin wurde zur Entfernung losgelöster Zellen das Medium abgesaugt und nachfolgend die Zellen stimuliert (siehe 3.4). Anschließend erfolgte bei 10-facher Vergrößerung (Mikroskop: Zeiss STEMI 200-C, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) eine Fotodokumentation der Zellbewegungen (Kamera: Zeiss AxioCam MRc, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland; Software: AxioVision 4.5, Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland). Die Aufnahmen wurden hierbei in einem Intervall von 5 Minuten über einen Zeitraum von 40 Stunden aufgezeichnet. Während dieser Zeit wurde eine Temperatur von 37°C sowie eine CO₂-Konzentration von 5% gewährleistet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software TScratch (Version 1.0, ETH Zürich, Schweiz), die für jedes einzelne Foto die Breite des Spaltes ermittelt. Die Daten bei Beginn des Versuches (t=0) wurden als 100% gesetzt und die nachfolgenden Werte auf diese bezogen. Die Ergebnisse wurden in einem Liniendiagramm mit Standardfehler dargestellt.

2.7 Quantitative *real-time* PCR- (qPCR-) Analyse

Um eine quantitative Analyse der Transkriptionslevel der zu untersuchenden Gene in der qPCR durchzuführen, wurden die Zellen in 6-Well-Platten (BD Bioscience, San Jose, USA) ausgesät und 24 Stunden lang stimuliert (siehe 3.4). Nach anschließender Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und eine Umschreibung in komplementäre Desoxy-Ribonukleinsäure (cDNA) vorgenommen, die als Ausgangspunkt für die qPCR-Analysen diente.

2.7.1 RNA-Isolation

Bei der RNA-Extraktion wurde zunächst der Kulturüberstand aus jedem Well abgenommen und für weitere Experimente bei -20°C gelagert. Die weitere RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Quiagen, Hilden, Deutschland). Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Zugabe von 350 µl des Lyse-Puffers (RLT-Puffer), der zur Denaturierung von RNasen mit 1%igem β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) versetzt wurde. Anschließend wurde dem Lysat für die Absorption der RNA an der Silicamembran 70%iges Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt und die Proben jeweils auf eine RNeasy Mini Säule gegeben, die sich auf einem Zentrifugationsröhrchen befand. Diese wurden mit 10.000 UpM für 15 Sekunden zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die durch die Membran durchgetretene Flüssigkeit wurde anschließend verworfen. Nachfolgend wurden zur Waschung der membrangebundenen RNA 500 µl RW1-Puffer hinzugefügt und die Röhrchen bei 10.000 UpM für 15 Sekunden zentrifugiert. In zwei weiteren Reinigungsschritten wurden je 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben und die Proben mit 10.000 UpM zunächst 15 Sekunden und anschließend 2 Minuten zentrifugiert. Um eine absolute Trocknung der Membranen zu gewährleisten, folgte ein weiterer, einminütiger Zentrifugationsschritt bei maximaler Umdrehungszahl von 13.200 UpM. Die RNeasy Mini Säulen wurden nachfolgend von den Zentrifugationsröhrchen abgenommen und auf ein neues Gefäß gesetzt. Für die Elution der RNA erfolgte die Zugabe von 30 µl RNase-

freien Wassers mit anschließender Zentrifugation für eine Dauer von 1 Minute. Die gewonnene RNA wurde sofort auf Eis gekühlt.

2.7.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop™ 2000c, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Hierbei wurden 1,2 µl der isolierten RNA-Proben verwendet, um die Absorption bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm sowie 320 nm zu bestimmen. Der Absorptionsquotient A260/A280 sollte in einem Bereich von 1,9 und 2,1 liegen und beschreibt die Reinheit der Proben. Die RNA wurde während der Messung auf Eis gekühlt und anschließend bei -20°C tiefgefroren oder direkt für die cDNA-Synthese verwendet.

2.7.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der komplementären DNA-Sequenz erfolgte im Rahmen der RT-PCR aus der isolierten, einzelsträngigen RNA mittels Superscript II, einem Enzym aus der Gruppe der reversen Transkriptasen. Die Proben wurden während aller nachfolgend beschriebenen Schritte auf Eis gekühlt und unter sterilen Bedingungen behandelt.

Ausgehend von bis zu 4 µg Gesamt-RNA wurde zur Eliminierung vorliegender genomischer DNA zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden der RNA folgende Reagenzien zugefügt:

- 1,5 µl 5x first strand buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- 1 µl rekombinante Desoxyribonuclease (10 U/µl, Roche, Mannheim, Deutschland)
- 1 µl RNasin Plus (40 U/µl, Promega, Madison, USA)
- 2,5 µl DEPC-H2O (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Die Proben wurden anschließend im Thermocycler (Biometra TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) für zunächst 20 Minuten bei 37°C und nachfolgend für eine Dauer von 10 Minuten bei 70°C für die Inaktivierung der DNase inkubiert und schließlich bei 4°C gekühlt.

Im nächsten Schritt wurde die RNA mit folgenden Primern versetzt und für 10 Minuten bei 70°C im Cycler inkubiert:

- 1 µl Oligo(dT)Primer12-18 (0,5 µg/µl, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- 0,4 µg Random Hexamer Primer (500 µg/ml, Promega, Madison, USA)
- 2,6 µl DEPC- H₂O (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Im Anschluss wurden weitere Substanzen beigemischt und eine Inkubation im Thermocycler für 2 Minuten bei 42°C angeschlossen:

- 4,5 µl 5x first strand buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- 1 µl Dithiothreitol (DTT, 0,1 M, Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 1 µl RNasin Plus (40 U/µl, Promega, Madison, USA)
- 1,5 µl Desoxyribonukleotid-Triphosphat (dNTP)-Mix (10 mM, Bioline, Luckenwalde, Deutschland)
- 1,5 µl DEPC- H₂O (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Für die Synthese des komplementären cDNA-Einzelstranges wurde nachfolgend jeder Probe 1 µl Superscript II (200 U/µl, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) hinzugefügt. Anschließend wurden sie im Thermocycler für 50 Minuten bei 42°C, für weitere 10 Minuten bei 70°C zur Inaktivierung des Enzyms inkubiert und schließlich bei 4°C gekühlt. In einem letzten Schritt wurde die cDNA auf eine einheitliche Konzentration von 10 ng/µl verdünnt und bei -20°C tiefgefroren.

2.7.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die PCR stellt ein *in-vitro*-Verfahren dar, mit dessen Hilfe es möglich ist, Nukleinsäuren zu vervielfältigen. Diese Amplifikationsmethode besteht grundsätzlich aus drei verschiedenen Schritten, die sich zyklisch wiederholen. Zunächst erfolgt hierbei durch Erhitzung die Denaturierung der DNA mit Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen. In einem weiteren Schritt wird die Primerhybridisierung gewährleistet, bei der sich die Oligonukleotide an ihre jeweils komplementäre DNA-Sequenz anlagern können. Schließlich findet durch thermostabile DNA-Polymerasen wie die *Taq*-Polymerase die Elongation

des komplementären Stranges in 5'→3' Richtung statt. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt, wobei die Amplifikation der DNA exponentiell verläuft.

Bei der qPCR erfolgt die mengenmäßige Darstellung der spezifischen PCR-Produkte über Messung der Fluoreszenz. Dieses Fluoreszenzsignal wird hierbei nach jedem Elongationsschritt der Amplifikation gemessen und stellt die Reaktion somit in Echtzeit dar (*real time*). Die Stärke des gemessenen Signals weist eine proportionale Beziehung zur entstandenen DNA-Menge auf. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt entweder über eine fluoreszenzmarkierte TaqMan[®]-Sonde oder über Fluoreszenzfarbstoffe, wie bei der Anwendung von SYBR[®] Green.

Bei der TaqMan[®]-Sonde handelt es sich um eine Hydrolyse-Sonde, bei der ein am 5'-Ende befindlicher Reporterfarbstoff von einem am anderen Ende lokalisierten, sogenannten Quencher, unterschieden wird. Letzterer bewirkt eine Unterdrückung der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes. Während des PCR-Zyklus hingegen wird bei Bindung der Sonde an ihre komplementären Basen der DNA durch die 5'3'Exonukleaseaktivität der eingesetzten *Taq*-Polymerase eine Hydrolyse der Sonde hervorgerufen, wodurch sich Quencher und Reporterfarbstoff voneinander trennen und keine gegenseitige Beeinflussung der Strukturen mehr stattfindet. Das dadurch entstehende Fluoreszenzsignal kann nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden und steigt proportional mit der Menge der PCR-Produkte an.

SYBR[®] Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der unspezifisch und hochaffin an doppelsträngige DNA bindet, indem er in der kleinen Furche der Nukleinsäure interkaliert. Der DNA-Farbstoff-Komplex emittiert bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 522\text{nm}$ grünes Licht, das nach jedem Zyklus gemessen wird. Nach der PCR kann bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Hierbei erfolgt durch eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur die Aufschmelzung der doppelsträngigen DNA, wodurch bei einer für jedes Produkt spezifischen Schmelztemperatur der zu erfassende Farbstoff freigesetzt wird.

Die jeweiligen Messsysteme der unterschiedlichen verwendeten Primer für die Genexpressionsanalyse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Gene	System	Gene	System
HAS1	SYBR [®] Green	CCL2	SYBR [®] Green
HAS2	SYBR [®] Green	CXCL8	SYBR [®] Green
HAS3	SYBR [®] Green	CCL5	SYBR [®] Green
HYAL1	SYBR [®] Green	CXCL1	TaqMan [®]
HYAL2	SYBR [®] Green	CXCL11	SYBR [®] Green
CXCL10	TaqMan [®]	HBD1	TaqMan [®]
CCL27	TaqMan [®]	HBD2	TaqMan [®]
CXCL9	TaqMan [®]	HBD3	TaqMan [®]
CXCL14	TaqMan [®]	RNase7	SYBR [®] Green
CCL20	TaqMan [®]	LL37	TaqMan [®]

Tabelle 3: Messsysteme der verwendeten Primer. Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Das gemessene Fluoreszenzsignal wird bei der qPCR logarithmisch gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Bei der Amplifikation der cDNA eines Zielgens verläuft die hierbei entstehende Kurve zunächst flach, da nur wenige PCR-Produkte entstehen. Nach diesem initialen Verlauf folgt eine exponentielle Phase, die nach Verbrauch der Reagenzien in ein Endplateau übergeht (Abb. 5).

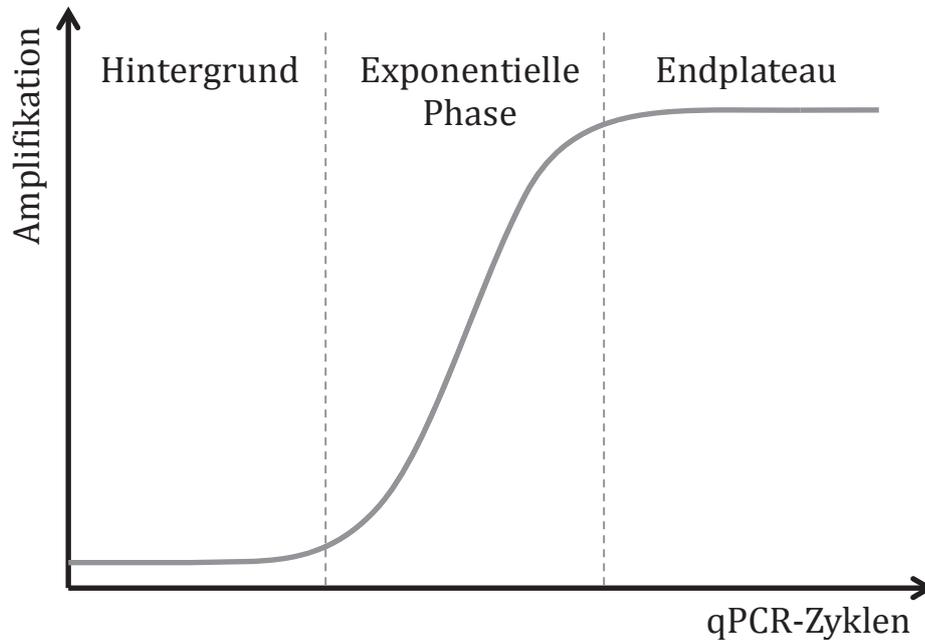


Abb. 5: Schematische Darstellung der Phasen während der qPCR. Nach einer initialen, flachen Phase verläuft die Kurve anschließend exponentiell und endet nach Verbrauch der Reagenzien in einem Endplateau.

Der Übergang der Fluoreszenzkurve in die exponentielle Phase wird als Schwellenwert-Zyklus bezeichnet (engl. *Cycle Theshold*, (Ct)-Wert). Dieser ist dadurch gekennzeichnet, dass sich die gemessene Fluoreszenz deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Gene, die eine höhere Menge an Produkten exprimieren, weisen früher eine größere Anzahl an Kopien der Zielsequenz auf und zeichnen sich somit durch niedrigere Ct- Werte aus. Demnach sind die Ct- Werte umgekehrt proportional zu der Menge an amplifizierten Produkten.

Um die quantitative Expression des jeweiligen Zielgens zu verdeutlichen, wird diese auf ein Referenzgen bezogen. Bei diesem *housekeeping*-Gen handelt es sich um das ribosomale 18S RNA-Gen (TaqMan[®], Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), welches als Standardgen eingesetzt wird und in den Zellen nicht reguliert und konstitutiv exprimiert wird.

Die beschriebene qPCR wurde mit Hilfe des QuantStudio[™] 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) durchgeführt. Hierbei wurden in einer 96-Well-Platte unter Verwendung von Taqman[®] Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) sowie SYBR[®] Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

genspezifische Reaktionsansätze mit einem Volumen von 25 µl angesetzt (Tabelle 4).

	Vorwärts- primer	Rückwärts- primer	Master- mix	Ziel- sonde	cDNA [25 ng/ µl]	DEPC
18S rRNA (Taqman®)	0,15 µl [10 µM]	0,15 µl [10 µM]	12,5 µl	0,15 µl [10 µM]	10 µl	2,05 µl
SYBR® Green	2,5 µl [2 µM]		12,5 µl		10 µl	
Taqman®	0,6 µl [45 µM]	0,6 µl [45 µM]	12,5 µl	0,15 µl [10 µM]	10 µl	2,05 µl

Tabelle 4: Auflistung der genspezifischen Reaktionsansätze.

Die Platten wurden anschließend mit einer hochtransparenten, selbst-adhäsiven Polyolefin-Folie (Starlab, Hamburg, Deutschland) verschlossen und nachfolgend für eine Dauer von 2 min bei 1200 UpM zentrifugiert (Heraeus™ Labofuge™ 400, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Die qPCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

95°C	10 min	
50°C	2 min	} 40 Zyklen
60°C	1 min	
95°C	15 sec	

Nach Bestimmung der Ct-Werte der zu untersuchenden Gene wurden diese mit dem Referenzgen nach folgender Formel verglichen:

$$\Delta Ct = 10^5 * 2^{Ct_{18S rRNA} - Ct_{spezifische Probe}}$$

Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 5.03, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) als Balkendiagramme mit Standardfehler dargestellt.

2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Um den Proteingehalt der untersuchten Chemokine in den Zellüberständen nach der Stimulation mit IM zu bestimmen, wurden Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren handelt es sich um den sogenannten *Sandwich-ELISA*. Hierbei bindet das gesuchte Protein zunächst an einen auf dem Boden der Mikrotitrierplatte gebundenen primären Antikörper (*Capture-Antikörper*) (Abb. 6 A und B). Dieser Komplex wird anschließend von einem sekundären Antikörper (*Detection-Antikörper*) gebunden (Abb. 6 C). Daraufhin bindet das Protein Streptavidin an das Biotin des *Detection-Antikörpers* (Abb. 6D). Streptavidin ermöglicht durch Kopplung an das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) die Umsetzung des Substrates Tetramethylbenzidin, wodurch sich die Proben türkis färben (Abb. 6E). Die Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt, wobei ein Farbumschlag auf gelb erfolgt. Durch photometrische Messung kann die Färbung erfasst werden, wobei eine proportionale Beziehung zur Menge des gebundenen Proteins vorliegt. Durch Ansetzen einer Standardkurve kann die Proteinkonzentration berechnet werden.

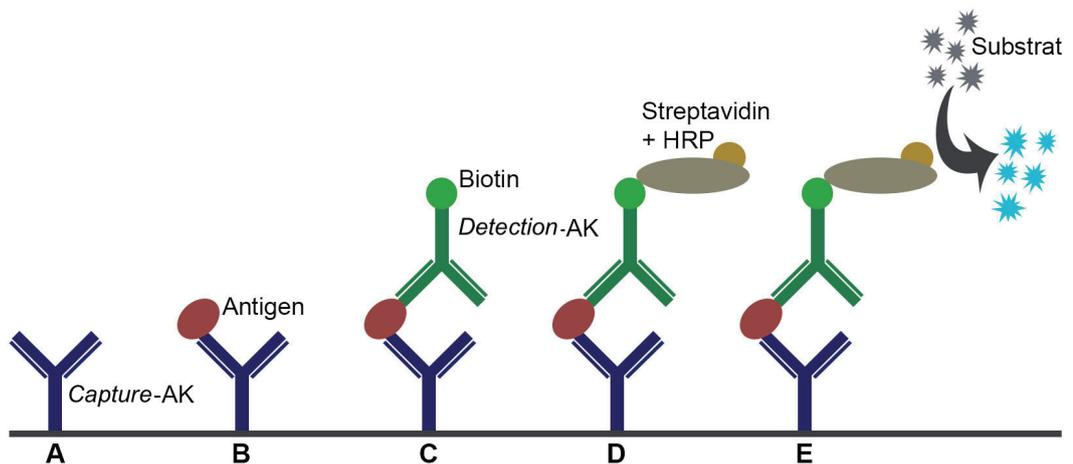


Abb. 6: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA. Das gesuchte Antigen bindet zunächst an den *Capture-AK*, der auf der Mikrotitrierplatte fixiert ist (A und B). Anschließend bindet der *Detection-AK* an das Antigen (C). Das Protein Streptavidin, gekoppelt an das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP), erkennt das Biotin des *Detection-AKs* und ermöglicht die Umsetzung des Substrates in einen türkisen Farbstoff (D und E).

Der Versuch erfolgte mit dem ELISA DuoSet Development Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) nach dem Protokoll des Herstellers. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wurde eine 96-Well-Mikrotitrierplatte mit je 100 µl in PBS gelöstem primärem Antikörper (4,00 µl/ml) versetzt, mit einer Folie bedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Platte in drei Waschschritten mit jeweils 200 µl Waschpuffer (0,05% Tween® in PBS) pro Loch von überschüssigem Antikörper befreit. Anschließend wurden je 250 µl Blockpuffer pro Well zugefügt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Platte für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben in Doppelbestimmung zugegeben (jeweils 100 µl). Diese wurden zuvor im gewünschten Verhältnis (1:2 - 1:40) in Reagenzlösung verdünnt. Um im weiteren Verlauf die Proteinkonzentration errechnen zu können, wurde eine Standard-Verdünnungsreihe angesetzt (4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62,5 pg/ml), ebenfalls in die Platte pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Nach dem Waschen wurden 100 µl des sekundären Antikörpers hinzugefügt (20,0 ng/ml) und erneut für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde nach weiterem Waschen für 20 min mit Streptavidin-HRP inkubiert, wobei die Platte vor direktem Lichteinfall geschützt wurde. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Substratlösung (Tetramethylbenzidin) zugegeben, die durch das Enzym in einen türkisen Farbstoff umgesetzt wird. Nach 5-10 min Inkubation ohne Lichteinfall wurde durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) die Enzymreaktion gestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb zu beobachten ist. Letztlich wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge 450 nm in einem ELISA-Reader erfasst (Muliskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Die Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 540 nm.

Für die Auswertung der Versuche wurde die Software GraphPad Prism (Version 5.03 GraphPad Prism Software, Inc., La Jolla, USA) verwendet. Hierbei wurden die gemessenen optischen Dichten der seriell verdünnten Standardreihe mit definiertem Antikörpergehalt (y-Achse) gegen die entsprechenden Konzentrationen (x-Achse) aufgetragen. Nach Logarithmieren der x-Werte wurde eine sigmoidale Funktion an die Daten gefittet. Anschließend wurde aus

den optischen Dichten der Proben die jeweilige Proteinkonzentration errechnet. Die Ergebnisse wurden in einem Balkendiagramm mit Standardfehler dargestellt.

2.9 Time-lapse Aufnahmen von *ex vivo* stimulierten CA

Vor den *ex-vivo*-Untersuchungen wurden von 5 freiwilligen Probanden nach ausführlicher mündlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung oberflächliche CA entfernt. Die Entnahme der Proben wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studennummer: 5767R). Bei den Probanden handelte es sich ausschließlich um Männer zwischen 20 und 31 Jahren mit CA am Penischaft oder Mons pubis, die bisher keine Vortherapien erhalten haben. Die oberflächlich exzidierten CA wurden direkt nach der Entfernung in 6-Well-Platten platziert. Die Proben wurden anschließend mit einer geringen Menge an Keratinozyten-Wachstumsmedium (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) bedeckt. Durch ein feines Gitter wurden die Proben angehoben, sodass sie sich nicht vollständig in Zellkulturmedium befanden und an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultiviert werden konnten. Daraufhin wurde ein Tropfen (etwa 0,1-0,2 g) von 0,05%igen IM-Gel auf die CA appliziert. Nachfolgend wurden die Proben 24 Stunden gefilmt (Mikroskop: Zeiss STEMI 200-C, Kamera: Zeiss AxioCam MRc, beide Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland; Software: AxioVision 4.5, Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland). Als Positivkontrolle wurde TCA (85% (m/V), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Im Anschluss wurden die Proben histologisch aufgearbeitet.

2.10 Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Für die histologischen Untersuchungen der CA-Proben erfolgte unmittelbar nach den Videoaufnahmen die Fixierung der Proben in 4% Formaldehydlösung (Otto Fische GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland). Für die Einbettung erfolgte die Entwässerung des Gewebes mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie die Durchtränkung mit Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland). Xylol dient hierbei als Intermedium, in dem sich sowohl Alkohol als auch Paraffin lösen lassen. Anschließend

erfolgte die Einbettung in Paraffin. Die Entwässerung und Paraffineinbettung erfolgten im Vakuuminfiltrationsprozessor Tissue-Tek VIP® AI (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, Niederlande). Anschließend wurde das Gewebe in Paraffinblöcke ausgegossen.

Daraufhin wurden die Proben mit einem Mikrotom (1150/ Autocut, Reichert-Jung, Wetzlar, Deutschland) geschnitten und auf Glasobjektträger (Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland) aufgezogen. Anschließend erfolgte die Färbung in einem Färbeautomaten (Tissue-Tek®, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, Niederlande). Hierfür wurden die Schnitte in Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) entparaffiniert (10 min) und einer in der Konzentration absteigenden Alkoholreihe (99%, 96%, 70% Isopropanol, Merck, Darmstadt, Deutschland, je 40 sec) rehydriert und daraufhin in Leitungswasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin nach Harris (Shandon™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, 10 min) sowie eine kurze Spülung mit Leitungswasser. Anschließend erfolgte die Zugabe von Scott-Puffer sowie eine erneute Spülung mit Leitungswasser und nachfolgend mit destilliertem Wasser (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Daraufhin wurde die Färbung mit Eosin (Shandon™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, 40 sec) durchgeführt. Anschließend werden die Proben mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (96%, 99% Isopropanol, je 40 sec) sowie Xylol (2 min) behandelt. Abschließend wurden die Proben in einem Eindeckautomaten (Tissue-Tek®, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, Niederlande) unter Zugabe von Xylol mit einem Deckglas (Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland) eingedeckt.

2.11 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prism (Version: 5.03 GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) angewendet. Die Überprüfung der Daten auf statistische Signifikanz erfolgte mittels des ungepaarten t-Tests. Dabei wurden Werte mit $p > 0,05$ als nicht signifikant, Werte mit $p < 0,05$ als signifikant (*p), Werte mit $p < 0,01$ als sehr signifikant (**p) und Werte mit $p < 0,001$ als höchst signifikant (***) beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Effekt verschiedener Konzentrationen von Ingenolmebutat auf die Zellviabilität

Für die Viabilitätsbestimmung der Zellen bei der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von IM (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} M) wurden für ausgewählte Zellen (humane Keratinozyten und Fibroblasten) sowie Zell- und Tumorzelllinien (HaCat-, HeLa-Zelllinie, UD-SCC-8, UD-SCC-2) MTT-Assays durchgeführt (Abb. 7). Die Mediumkontrolle wurde hierbei auf 100% normalisiert und die ermittelten Werte für IM-Behandlungen relativ auf diese bezogen.

Bei allen Zellen zeigte sich im Bereich niedriger Konzentrationen eine Erhöhung des Zellstoffwechsels bei Stimulation mit IM. Diese war bei Fibroblasten, Keratinozyten und Zellen der UD-SCC-2-Linie (Abb. 7 A, B und F) bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M sowie bei HaCat-, HeLa- und UD-SCC-8-Zellen (Abb. 7 C, D und E) bis 10^{-5} M erkennbar. Am stärksten war dieser Effekt bei HeLa-Zellen (Abb. 7 D) ausgeprägt. Ein eindeutiger Abfall der Zellviabilität unter die Mediumkontrolle wurde bei Fibroblasten, Keratinozyten und HeLa-Zellen (Abb. 7 A, B und D) bei $4 \cdot 10^{-4}$ M, bei HaCat-Zellen und UD-SCC-2-Zellen (Abb. 7 C und F) bei 10^{-5} M sowie für Zellen der UD-SCC-8-Linie (Abb. 7 E) bei 10^{-4} M beobachtet. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Zellviabilität durch Stimulation mit IM bis zu einer Konzentration von 10^{-5} M nicht beeinträchtigt wird.

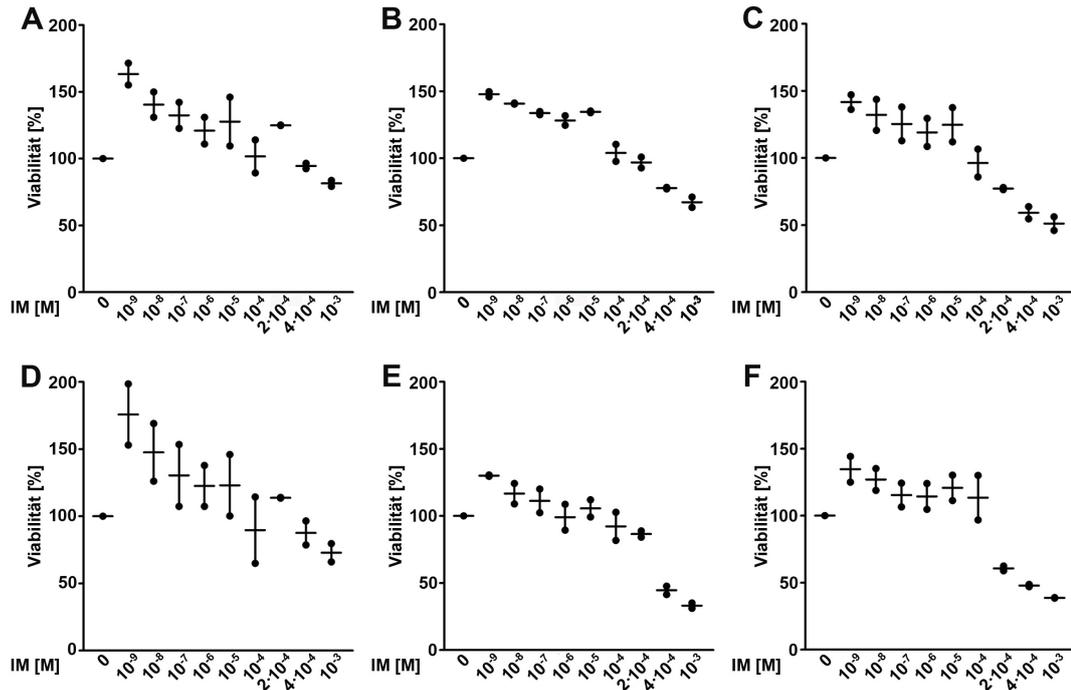


Abb. 7: Konzentrationsabhängiger Effekt von Ingelolmebutat auf die Viabilität verschiedener Zelllinien *in vitro*. Analyse des Effekts von IM auf die Viabilität verschiedener Zelllinien mittels MTT-Assay. Getestet wurden Fibroblasten (A), primäre Keratinozyten (B), HaCat-Zellen (C), HeLa-Zellen (D), Zellen der Linie UD-SCC-8 (E) sowie UD-SCC-2 (F). Die Mediumkontrolle wurde auf 100% festgelegt und die weiteren Daten auf diese bezogen. Alle Zellen zeigten im Bereich niedriger Konzentrationen bis 10^{-4} M (Fibroblasten, Keratinozyten, UD-SCC-2-Zellen) beziehungsweise 10^{-5} M (HaCat-, HeLa- und UD-SCC-8-Zellen) eine erhöhte Zellviabilität im Vergleich zur Mediumkontrolle. Ein eindeutiger Abfall der Stoffwechselaktivität war bei $4 \cdot 10^{-4}$ M (Fibroblasten, Keratinozyten und HeLa-Zellen), 10^{-5} M (HaCat- und UD-SCC-2-Zellen) sowie 10^{-4} M (UD-SCC-8-Zellen) zu beobachten. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus zwei (Fibroblasten und Keratinozyten) oder einem Versuch (HaCat-, HeLa-, UD-SCC-8- und UD-SCC-2-Zellen). IM, Ingelolmebutat; M, Molar.

3.2 Effekt von Ingelolmebutat auf die kutane Wundheilung

Die Auswertung der Wundheilungs-Assays (Scratch-Assays) zeigte, dass IM in fast allen untersuchten Konzentrationen die Migration von Keratinozyten und folglich die Wundheilung nicht signifikant beeinträchtigte (Abb. 8 A-L). Lediglich für die Stimulation mit 10^{-7} M IM ließ sich eine (hoch-) signifikante Inhibition des Wundverschlusses demonstrieren (Abb. 8 H und M). Gleichsam ließ sich für alle Konzentration von IM mit Ausnahme von 10^{-7} M nach 21,33 Stunden ein fast kompletter und bis spätestens nach 40 Stunden ein kompletter Wundverschluss nachweisen (Abb. 8 B, D, F, H, J, L und M).

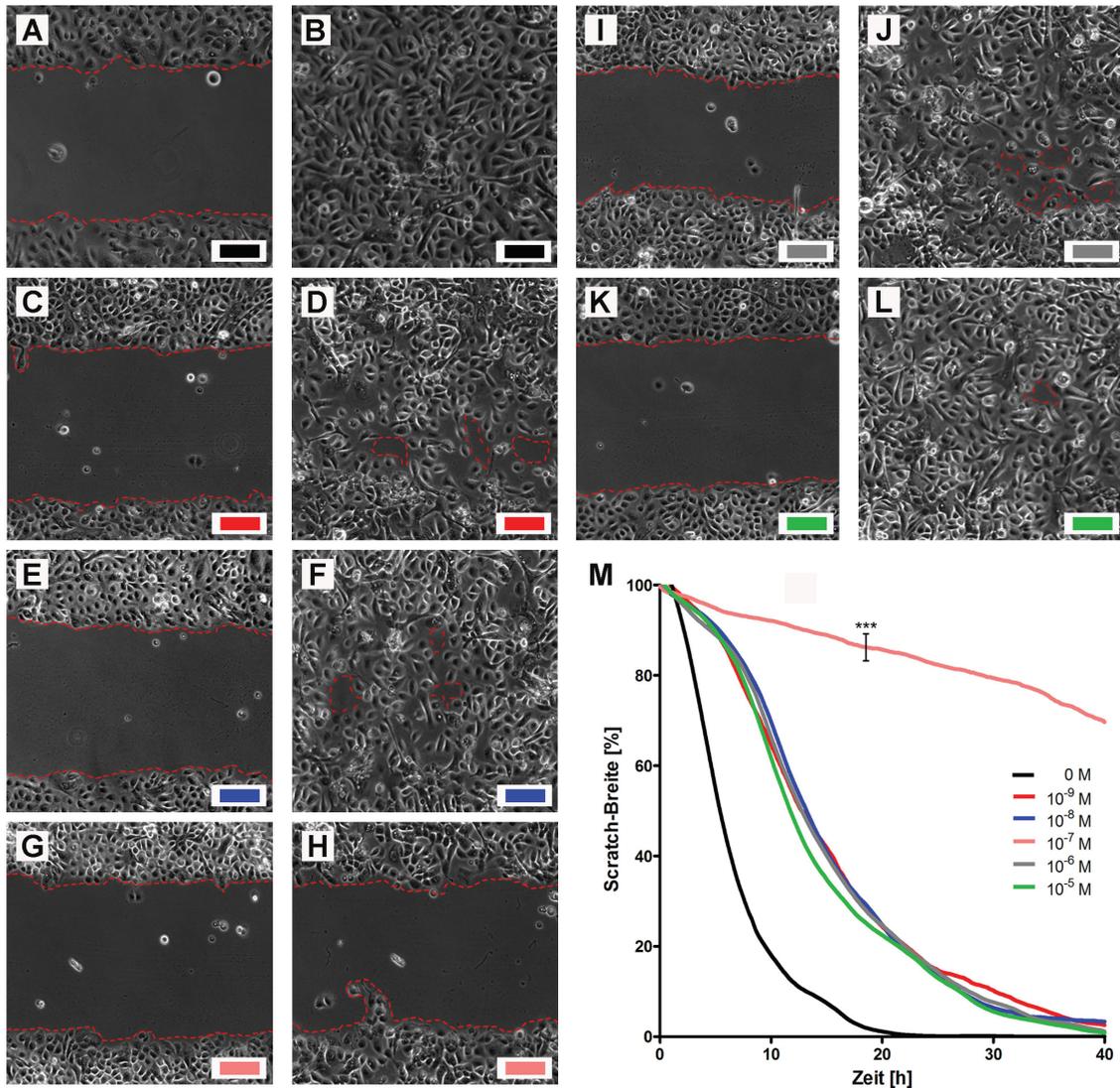


Abb. 8: Konzentrationsabhängiger Effekt von Ingenolmebutat auf die Wundheilung primärer humaner Keratinozyten *in vitro*. Analyse der Zellmigration, respektive der Wundheilung, von primären humanen Keratinozyten unter Einfluss von IM mittels Scratch-Assay. Abgebildet sind Aufnahmen der Zellen bei den Zeitpunkten t=0 h und t=21,33 h für unstimulierte Zellen (Kontrolle, A und B) sowie bei Stimulation mit IM mit 10⁻⁹ M (C und D), 10⁻⁸ M (E und F), 10⁻⁷ M (G und H), 10⁻⁶ M (I und J) und 10⁻⁵ M (K und L) sowie die Darstellung der Scratch-Breite [%] aller Versuchsansätze über einen Zeitraum von bis zu 40 h (M). Die Scratch-Breite bei Versuchsbeginn (t=0 h) wurde hierbei auf 100 % normalisiert und die nachfolgenden Werte auf diese bezogen (M). Bei allen Konzentrationen außer 10⁻⁷ M zeigte sich eine tendenzielle Inhibition der Zellmigration im Vergleich zur Kontrolle (M), wobei sich die Wunde beim Zeitpunkt t=21,33 h bis auf wenige Lücken schloss (D, F, J und L). Lediglich bei der Stimulation mit 10⁻⁷ M IM zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant inhibierte Wundheilung (M). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus Versuchen mit drei verschiedenen Spendern. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten t-test errechnet (*p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001). IM, Ingenolmebutat; h, Stunden; M, Molar.

3.3 Effekt von Ingenolmebutat auf die Regulation von Chemokinen in verschiedenen Zelllinien

Zur Untersuchung einer möglichen Regulation verschiedener Chemokine durch IM *in vitro* wurde deren Genexpression in verschiedenen Zelllinien mittels qPCR- Analysen untersucht. Hierbei wurden primäre humane Keratinozyten, primäre humane Fibroblasten, Normale Humane Dermale Fibroblasten (NHDF), immortalisierte Keratinozyten der HaCat-Zelllinie, aus Zervixkarzinomen etablierte Zellen der HeLa- Linie sowie verschiedene Plattenepithelkarzinomlinien der Kopf- und Halsregion (UD-SCC-8, UD-SCC-1, UD-SCC-2 und UD-SCC-7A) verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit fünf verschiedenen Konzentrationen von IM (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} M) stimuliert. In den qPCR- Analysen wurden Primer für zehn verschiedene Chemokin-Gene getestet (*CXCL1*, *CXCL8*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL14*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL20*, *CCL27*). Hierbei wurden für die Zell- und Tumorzelllinien drei unabhängige Versuche durchgeführt und für primäre humane Keratinozyten Zellen dreier verschiedener Donoren verwendet. Neben NHDF wurden bei den Fibroblasten Zellen zweier weiterer Spender untersucht.

Insbesondere für *CXCL8* ließ sich eine Änderung der Genexpression durch IM nachweisen (Abb. 9). Um die relative Genregulation zwischen gesunden primären humanen Keratinozyten (Abb. 9 A) und den Tumorzelllinien UD-SCC-8 (Abb. 9 B), HeLa (Abb. 9 C), UD-SCC-1 (Abb. 9 D), UD-SCC-2 (Abb. 9 E) und UD-SCC-7A (Abb. 9 F) direkt vergleichen zu können, wurden Expressionswerte als *fold change* zur Mediumkontrolle dargestellt.

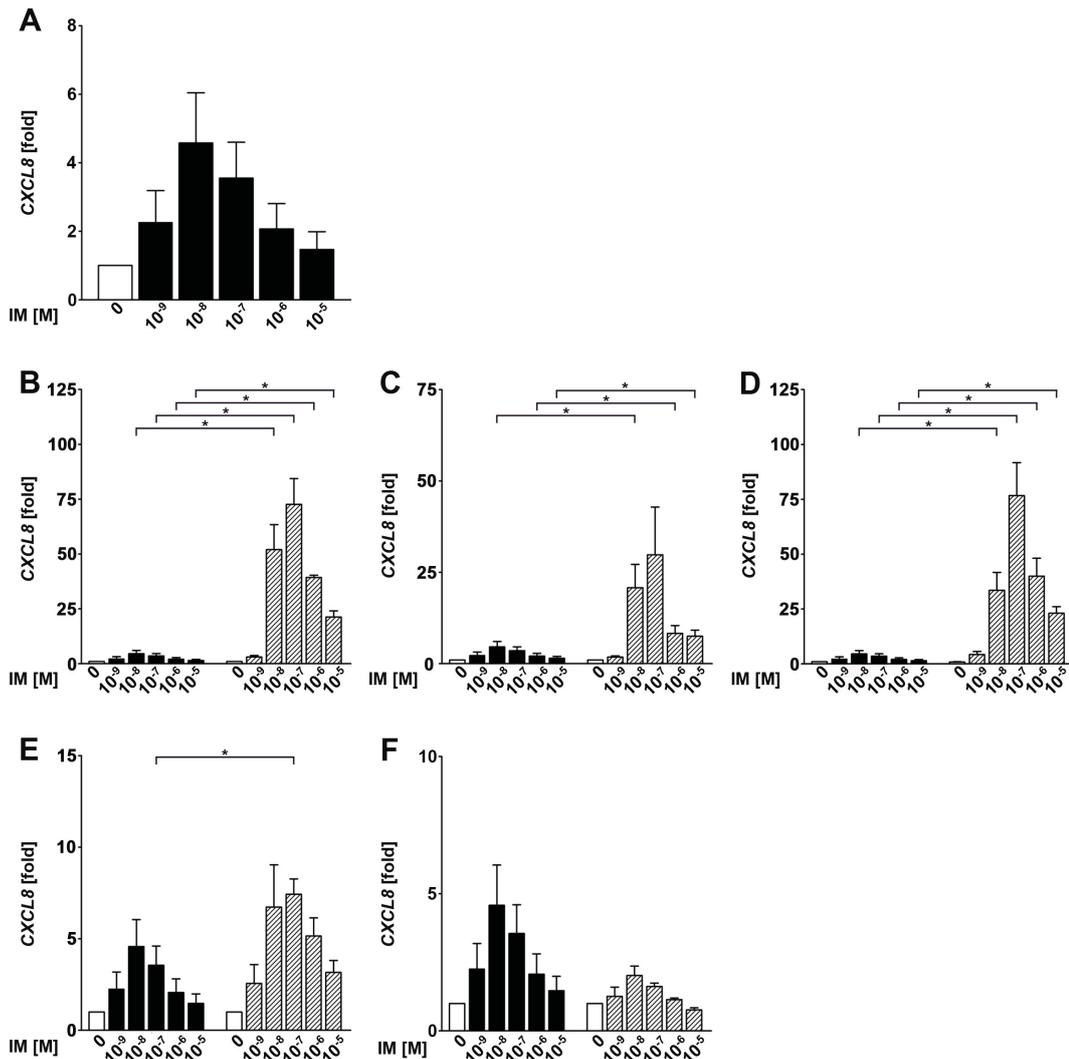


Abb. 9: Ingenolmebutat induziert die Expression von CXCL8 in verschiedenen Zelllinien *in vitro*. Analyse der Expression von CXCL8 mittels qPCR in primären humanen Keratinozyten (A) im Vergleich zu den Tumorzelllinien UD-SCC-8 (B), HeLa (C), UD-SCC-1 (D), UD-SCC-2 (E) und UD-SCC-7A (F) (Tumorzellen schraffiert abgebildet) nach Stimulation mit IM. Primäre Keratinozyten wiesen nur auf niedrigem Expressionsniveau eine Erhöhung von CXCL8 auf (A). In den Tumorzelllinien UD-SCC-8 und UD-SCC-1 zeigte sich im Vergleich zu Keratinozyten eine signifikante Erhöhung der Expressionsrate bei 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} sowie 10^{-5} M (B und D). Bei Zellen der HeLa-Linie war diese bei 10^{-8} , 10^{-6} und 10^{-5} M (C), bei der UD-SCC-2-Linie bei 10^{-7} M IM (E) zu beobachten. Die meisten mRNA-Produkte wurden hierbei von Zellen der UD-SCC-8-, HeLa-, UD-SCC-2-Linie produziert (B, C und D). Die Zellen der UD-SCC-7A-Linie zeigten eine erniedrigte Expression im Vergleich zu den Keratinozyten (F). Die Expression der Zielgene wurde als *fold change* zur Mediumkontrolle \pm Standardfehler dargestellt. Als Referenzgen diente das ribosomale 18S RNA-Gen. Für alle Tumorzelllinien wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei den Keratinozyten handelte es sich um vier verschiedene Donoren. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten t-test errechnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$). IM, Ingenolmebutat; M, Molar.

Bei den Analysen wiesen primäre humane Keratinozyten eine erhöhte Expression von CXCL8 bei niedrigen Expressionsleveln auf (Abb. 9 A). Die Tumorzelllinien UD-SCC-8 und UD-SCC-1 zeigten im Vergleich zu

Keratinocyten bei Konzentrationen von 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} sowie 10^{-5} M IM eine signifikante Genexpressionserhöhung von *CXCL8* auf (Abb. 9 B und D). Diese war bei Zellen der HeLa-Linie bei 10^{-8} , 10^{-6} und 10^{-5} M ersichtlich (Abb. 9 B), sowie bei der UD-SCC-2-Linie bei 10^{-7} M (Abb. 9 E). Bei den Tumorzellen UD-SCC-7A wiesen hingegen Keratinocyten ein höheres Expressionmuster von *CXCL8* auf (Abb. 9 F). Bei allen untersuchten Zellen zeigte sich hinsichtlich der fünf verwendeten Konzentrationen von IM ein glockenförmiges Verteilungsmuster mit höchsten Expressionsraten bei 10^{-8} M (Keratinocyten und UD-SCC-7A) oder 10^{-7} M (restliche Zellen).

In den durchgeführten qPCR-Analysen konnte des Weiteren eine erhöhte Expression von *CCL5* nachgewiesen werden. Hierbei wurden primäre humane Keratinocyten mit Tumorzellen der UD-SCC-8-Zelllinie verglichen. Die Daten wurden als *fold change* zu ihrer Mediumkontrolle abgebildet. Sowohl primäre humane Keratinocyten als auch Tumorzellen zeigten eine erhöhte Expressionsrate von *CCL5* unter Stimulation mit IM im Vergleich zu reinem Medium (Abb. 10).

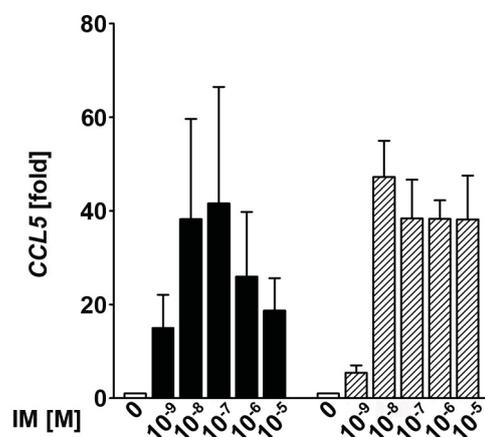


Abb. 10: Ingolmebutat induziert die Expression von *CCL5* in primären humanen Keratinocyten und der Tumorzelllinie UD-SCC-8 *in vitro*. Analyse der Genexpression von *CCL5* mittels qPCR in primären humanen Keratinocyten (schwarz) und der Tumorzelllinie UD-SCC-8 (schraffiert) nach Stimulation mit IM. Sowohl primäre humane Keratinocyten als auch die Tumorzellen wiesen erhöhte Genexpressionslevel von *CCL5* im Vergleich zur Mediumkontrolle auf. Die Expression von *CCL5* wurde als *fold change* zur Mediumkontrolle \pm Standardfehler dargestellt. Als Referenzgen diente das ribosomale 18S RNA-Gen. Bei den Tumorzellen wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, bei den Keratinocyten drei verschiedene Donoren untersucht. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten t-test errechnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$). IM, Ingolmebutat; M, Molar.

Neben einer erhöhten mRNA-Expression von *CXCL8* und *CCL5* konnte in allen untersuchten Tumorzelllinien eine Induktion von *CCL2* gemessen werden (Abb. 11).

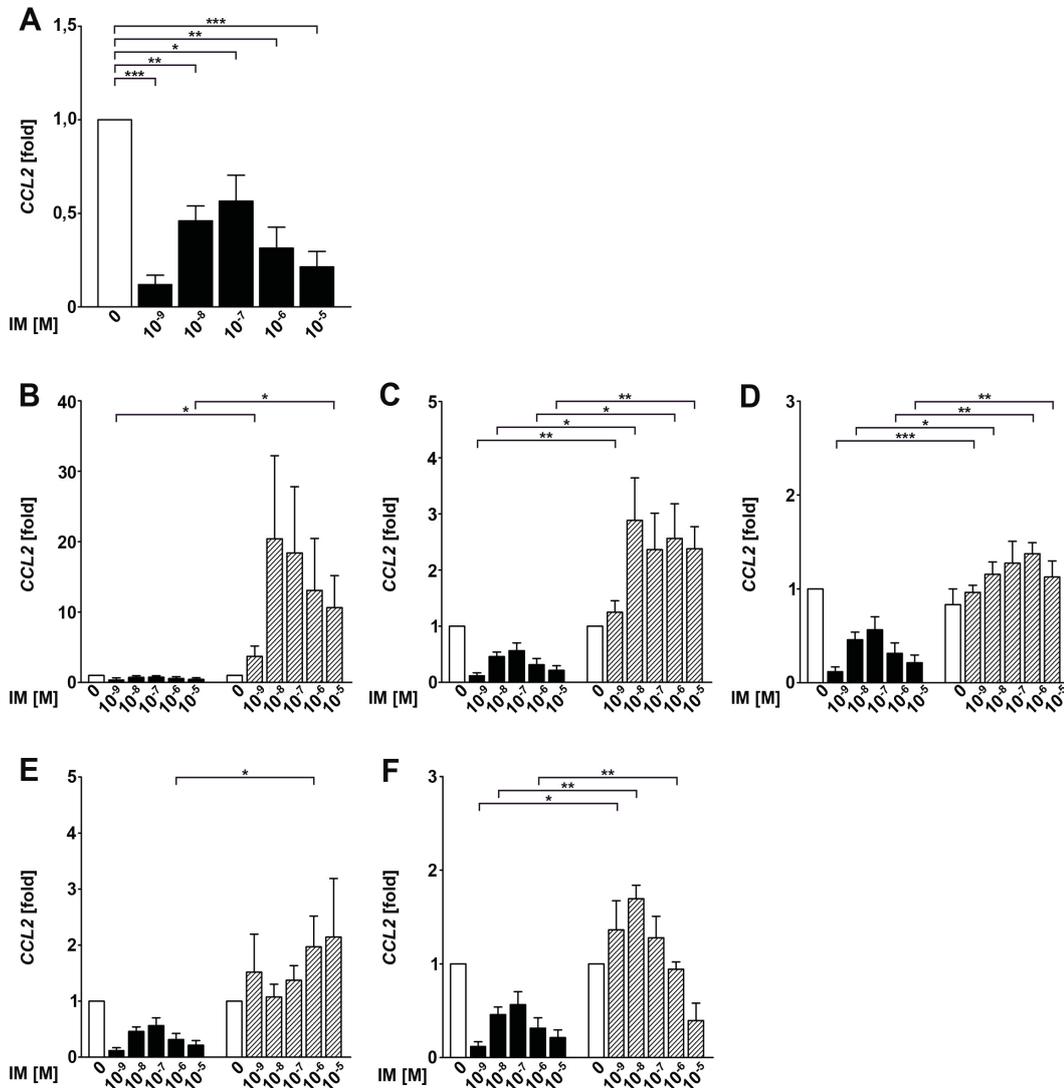


Abb. 11: Ingelmebutat induziert die Expression von *CCL2* in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro*. Analyse der Expression von *CCL2* mittels qPCR in primären humanen Keratinozyten (A) sowie diese im Vergleich zu den Tumorzelllinien UD-SCC-8 (B), HeLa (C), UD-SCC-1 (D), UD-SCC-2 (E) und UD-SCC-7A (F) (Tumorzellen schraffiert abgebildet) nach Stimulation mit IM. Alle Tumorzellen zeigten im Vergleich zu Keratinozyten eine signifikant erhöhte Expression von *CCL2* auf. Bei den UD-SCC-8-Zellen war diese bei 10⁻⁹ und 10⁻⁵ M festzustellen, bei HeLa- und UD-SCC-1-Zellen bei 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁶ und 10⁻⁵ M IM. UD-SCC-2-Zellen wiesen eine signifikante Erhöhung bei 10⁻⁶ M auf, UD-SCC-7A-Zellen bei 10⁻⁹, 10⁻⁸ und 10⁻⁶ M IM. Die Genexpression wurde als *fold change* zur Mediumkontrolle ± Standardfehler abgebildet. Als Referenzgen diente das ribosomale 18S RNA-Gen. Für alle Tumorzelllinien wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, sowie bei den Keratinozyten drei unterschiedliche Spender verwendet. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten t-test errechnet (*p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001). IM, Ingelmebutat; M, Molar.

Primäre humane Keratinozyten wiesen bei allen fünf verwendeten Konzentrationen von IM signifikant erniedrigte Genexpressionslevel von *CCL2* im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle auf (Abb. 11 A). In allen Tumorzellen hingegen war die Expression von *CCL2* im Vergleich zur Mediumkontrolle erhöht. Eine signifikante Genexpressionserhöhung zeigte sich zwischen Tumorzellen und Keratinozyten für Zellen der UD-SCC-8-Linie bei 10^{-8} und 10^{-5} M sowie für die HeLa- und UD-SCC-1-Linie bei 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-6} und 10^{-5} M IM (Abb. 11 B, C und D). Bei den UD-SCC-2-Zellen war diese bei 10^{-6} M, bei der UD-SCC-7A-Linie bei 10^{-9} , 10^{-8} und 10^{-6} M IM zu beobachten (Abb. 11 E und F).

Für die Chemokine *CXCL1*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL14*, *CCL20* und *CCL27* schließlich, ließ sich keine signifikante Regulation durch die Stimulation mit IM nachweisen (Daten nicht aufgeführt).

Um nun zu untersuchen ob die signifikante Induktion der Expression von *CXCL8* und *CCL5* sich auch auf Proteinebene widerspiegelt, führten wir im nächsten Schritt ELISA-Analysen konditionierter Zellkulturüberstände der IM-stimulierten Zellen durch (Abb. 12). Hierbei wurden primäre humane Keratinozyten untersucht (Abb. 12 A) und diese mit den Tumorzelllinien UD-SCC-8 (Abb. 12 B) und HeLa (Abb. 12 C) verglichen.

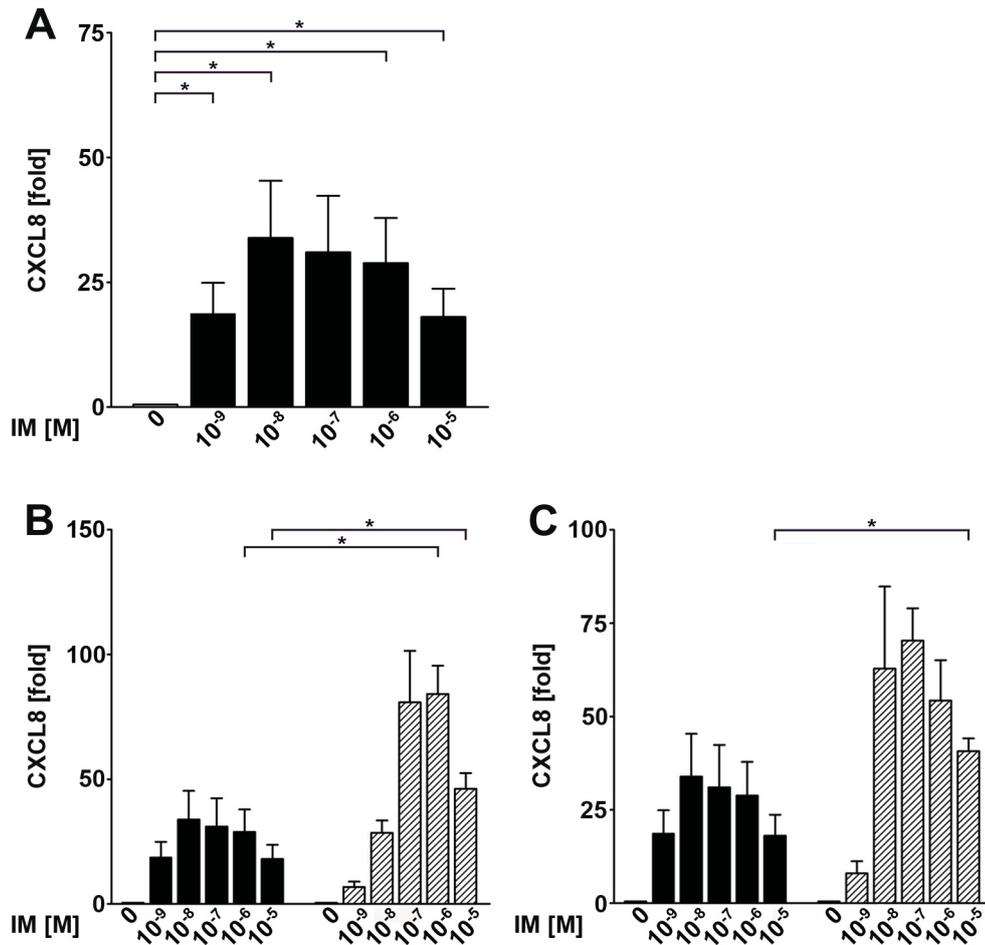


Abb. 12: Ingenolmebutat induziert konzentrationsabhängig die Sekretion von CXCL8-Protein *in vitro*. Analyse der Proteinkonzentrationen von CXCL8 mittels ELISA in konditionierten Zellkulturüberständen primärer humaner Keratinozyten (A) sowie diese im Vergleich zu den Tumorzelllinien UD-SCC-8 (B) und HeLa (C) (Tumorzellen schraffiert abgebildet) nach Stimulation mit IM. Die Proteinkonzentration von CXCL8 war in primären humanen Keratinozyten im Vergleich zur Mediumkontrolle bei 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁶ und 10⁻⁵ M signifikant erhöht (A). In den Tumorzelllinien war diese Steigerung im Vergleich zu Keratinozyten bei verwendeten Konzentrationen von 10⁻⁶ und 10⁻⁵ M (UD-SCC-8, B) sowie bei 10⁻⁵ M (HeLa, C) signifikant. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardreihe berechnet und wurde als *fold change* zur Mediumkontrolle ± Standardfehler dargestellt. Bei den Tumorzelllinien wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt sowie bei den primären humanen Keratinozyten drei verschiedene Donoren verwendet. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten t-test errechnet (*p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001). IM, Ingenolmebutat; M, Molar.

Es konnte gezeigt werden, dass primäre humane Keratinozyten durch Stimulation mit IM bei verwendeten Konzentrationen von 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁶ und 10⁻⁵ M zur unbehandelten Mediumkontrolle eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration von CXCL8 aufwiesen (Abb. 12 A). In den untersuchten Tumorzelllinien konnte ebenfalls ein gesteigerter Proteingehalt verzeichnet werden. Eine signifikante Erhöhung des Proteins CXCL8 im Überstand lag bei

Zellen der UD-SCC-8-Linie im Vergleich zu Kerationzyten bei 10^{-6} und 10^{-5} M (Abb. 12 B), bei HeLa-Zellen bei 10^{-5} M vor (Abb. 12 C).

Analog zu den Analysen von CXCL8 wurden aufgrund der erhöhten Expressionsmuster auf Genebene auch für CCL5 Untersuchungen mit den Kulturüberständen der mit IM stimulierten Zellen durchgeführt, um die Proteinkonzentration des Chemokins nachzuweisen. In diesem Versuch wurden primäre humane Keratinozyten (schwarz dargestellt) mit Zellen der Tumorzelllinie UD-SCC-8 (schraffiert dargestellt) verglichen (Abb. 13). In beiden Fällen konnte eine Erhöhung des Proteingehaltes im Vergleich zur Mediumkontrolle beobachtet werden. In der Gegenüberstellung zwischen Tumor- und gesunden Zellen zeigten sich hierbei allerdings keine signifikanten Unterschiede.

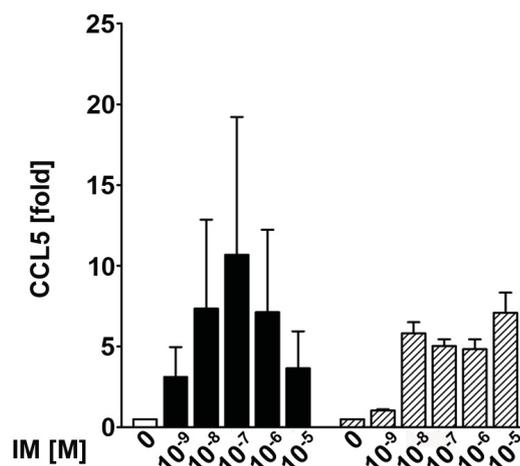


Abb. 13: Ingenolmebutat induziert konzentrationsabhängig die Sekretion von CCL5-Protein *in vitro*. Analyse der Proteinkonzentrationen von CCL5 mittels ELISA in Zellkulturüberständen primärer humaner Keratinozyten (schwarz) sowie Tumorzellen der UD-SCC-8-Zelllinie (schraffiert) nach Stimulation mit IM. Bei beiden wurde eine erhöhte Proteinkonzentration von CCL5 im Vergleich zur Mediumkontrolle nachgewiesen. Der Proteingehalt wurde anhand einer Standardreihe berechnet und ist als *fold change* zur Mediumkontrolle \pm Standardfehler abgebildet. Bei den Tumorzelllinien wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt sowie bei den primären human Keratinozyten drei verschiedene Donoren verwendet. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten t-test errechnet (*p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001). IM, Ingenolmebutat; M, Molar.

3.4 Effekt von Ingenolmebutat auf die Regulation von Genen des Hyaluronsäuremetabolismus in verschiedenen Zelllinien

Neben der Analyse des Effekts von IM auf die Expression von Chemokinen wurden Enzyme des Hyaluronan-Stoffwechsels untersucht. Hierbei wurden qPCR-Analysen mit Genen für die Hyaluronan-Synthasen (*HAS1*, *HAS2* und *HAS3*) sowie für die degradierenden Hyaluronidasen (*HYAL1* und *HYAL2*) durchgeführt. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um primäre humane Keratinozyten, NHDF, primäre humane Fibroblasten, immortalisierte Keratinozyten der HaCat-Zelllinie, Zervixkarzinom-Zellen der HeLa-Linie sowie verschiedene aus Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion etablierte Zelllinien (UD-SCC-8, UD-SCC-1, UD-SCC-2 und UD-SCC-7A). Bei allen Zellen wurden entweder drei verschiedenen Spender verwendet (primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten) beziehungsweise drei unabhängige Versuche durchgeführt (Zelllinien).

Die Auswertung der qPCR-Experimente zeigte bei den aufgeführten Zellen für keines der fünf gestesteten Gene des Hyaluronan-Stoffwechsels eine relevante Regulation der Genexpression unter Einfluss von IM (Daten nicht aufgeführt).

3.5 Effekt von Ingenolmebutat auf die Regulation antimikrobieller Peptide in verschiedenen Zelllinien

Um den Einfluss von IM auf die Expression von AMP zu untersuchen, wurden qPCR-Analysen mit Primern für Gene der Defensine *HBD1*, *HBD2*, *HBD3* sowie für das Cathelicidin *LL37* und für *RNase7* durchgeführt. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um primäre humane Keratinozyten sowie um die Tumorzelllinie UD-SCC-8. IM induzierte die Expression von *HBD3* und *RNase7* im Vergleich zur Mediumkontrolle sowohl in Keratinozyten als auch in der untersuchten Tumorzelllinie dosisabhängig signifikant (Abb. 14). Eine signifikante Steigerung der Genprodukte war bei primären humanen Keratinozyten für *RNase7* bei IM-Konzentrationen von 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} M (Abb. 14 A), für *HBD3* bei 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-6} M zu beobachten (Abb. 14 B). Bei den Zellen der Linie UD-SCC-8 war die Genexpression von *RNase7* sowie *HBD3* bei 10^{-7} M IM signifikant erhöht (Abb. 14 C und D). Die

Untersuchungen zeigten ferner keinen singifikanten Effekt von IM auf die Genregulation von *HBD1*, *HBD2* und *LL37* (Daten nicht aufgeführt).

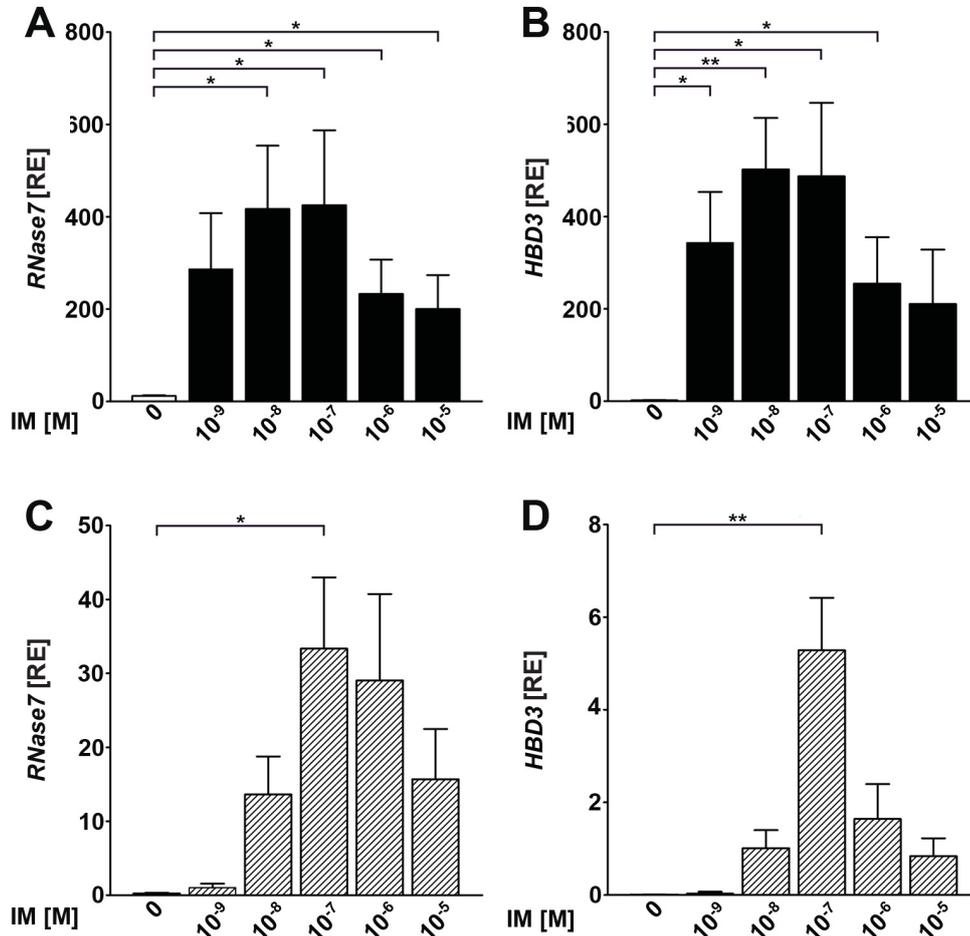


Abb. 14: Ingenolmebutat induziert die Expression von *RNase7* und *HBD3* in primären humanen Keratinozyten und der Tumorzelllinie UD-SCC-8 *in vitro*. Analyse der Genexpression von *RNase7* und *HBD3* mittels qPCR in primären humanen Keratinozyten (A und B) sowie der Tumorzellen UD-SCC-8-Linie (C und D) nach Stimulation mit IM. Die Genexpression wurde in relativen Einheiten (RE) dargestellt. Sowohl primäre humane Keratinozyten als auch UD-SCC-8-Zellen zeigten für die beiden untersuchten Gene eine signifikante Steigerung der Genexpression im Vergleich zur Mediumkontrolle. Als Referenzgen wurde das ribosomale 18S RNA-Gen verwendet. Für die Tumorzelllinie wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei den Keratinozyten wurden vier unterschiedliche Spender verwendet. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten t-test errechnet (*p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001). IM, Ingenolmebutat; M, Molar.

3.6 Effekt von Ingenolmebutat auf Condylomata acuminata unter *in-vivo*- sowie *ex-vivo*-Stimulation

Um zu untersuchen, ob die Wirkung (rasch auftretende Nekrose) von IM auf Condylomata acuminata primär durch einen rein zytotoxischen Prozess bedingt ist, oder ob immunologische Prozesse führend sind, wurden Analysen sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* stimulierter CA durchgeführt und diese anschließend histologisch ausgewertet (116). Es konnte gezeigt werden, dass IM bei *in-vivo*-Stimulation zu einer gräulichen Veränderung der Läsionen führt, die auf eine Nekrose hinweisen (Abb. 15 B). In der nachfolgend durchgeführten Histologie zeigte sich eine Blasenbildung sowie eine vollständig nekrotische Epidermis (Abb. 15 C).

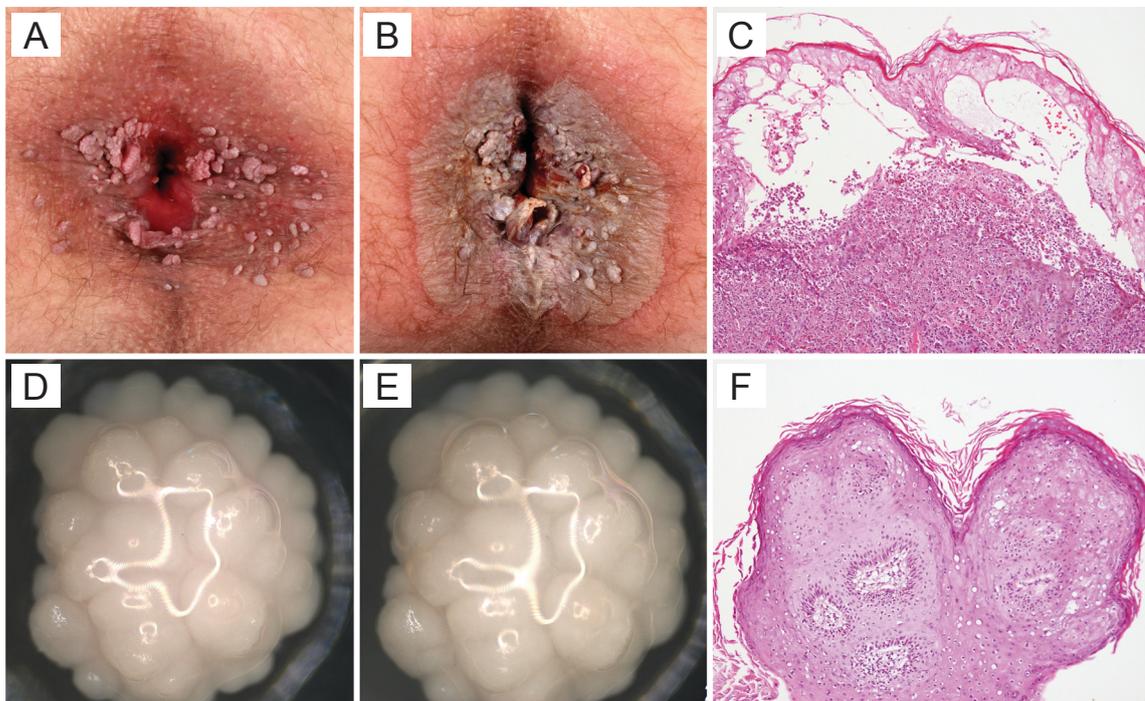


Abb. 15: *In-vivo*- und *ex-vivo*-Effekte von Ingenolmebutat auf Condylomata acuminata. Perianal lokalisierte CA eines 53-jährigen Patienten *in vivo* (A) sowie *time-lapse*-Aufnahmen (40-fache Vergrößerung) eines CA *ex vivo* vor (D) und 21 h nach der Behandlung mit 0,05%-igen IM (B und E). Histologie der entsprechenden CA nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) (116).

Bei der *ex-vivo*-Stimulation der CA mit IM wurden *time-lapse*-Aufnahmen durchgeführt, um die Veränderungen der Tumoren in zeitlicher Auflösung zu dokumentieren. Hierbei konnte demonstriert werden, dass IM *ex-vivo* „klinisch“ keinen Effekt auf CA zeigte (Abb. 15 E). Die histologische Aufarbeitung der Läsionen zeigten lediglich im oberen Drittel der Epidermis nekrotische Zellen. Es konnte keine Epitheliolyse beobachtet werden (Abb. 15 F). Als

Positivkontrolle erfolgte eine *ex-vivo*-Stimulation mit der Säure TCA, die sowohl in den *time-lapse*-Aufnahmen als auch in der Histologie eine vollständige Nekrose der Läsionen bewirkte (Daten nicht aufgeführt).

4 Diskussion

Der Wirkstoff IM ist als Gel-Formulierung (Picato®) in der Europäischen Union seit 2012 zur Behandlung von AK zugelassen (1). IM ist ein aus dem Wolfsmilchgewächs *E. peplus* extrahierter Wirkstoff, der schon seit Jahrhunderten als Volksheilmittel gegen Warzen und UV-induzierte Tumoren Anwendung findet (8, 117). Der Wirkmechanismus von IM auf zellulärer und molekularer Ebene ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Propagiert wird eine duale Wirkungsweise: bei höheren Konzentrationen (>100 µM) wirkt IM toxisch und führt so zu einer schnell auftretende Zellnekrose, während niedrige Konzentrationen (10-1.000 nM) eine komplexe Immunantwort mit Ausbildung eines Neutrophilen-dominierten Entzündungsinfiltrates induzieren sollen (52, 53).

Bei der Behandlung von AK mit IM kommt es klinisch zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion, die mit Rötungen, Krusten, Erosionen, sowie Pustelbildung einhergeht und meist innerhalb von wenigen Tagen abheilt (Abb. 2) (40, 42). Interessanterweise stellt sich die Entzündungsreaktion am deutlichsten im Bereich sichtbarer und palpabler AK dar, während sie im übrigen behandelten Areal deutlich milder ausgeprägt ist. Bei der Feldkanzerisierung finden sich klinisch manifeste AK auf einem Feld lichtgeschädigter Haut, in dem sich aber auch subklinisch AK befinden (25). Das klinische Reaktionsmuster bei der Behandlung der Feldkanzerisierung mittels IM scheint also mit dem Grad der Neoplasie zu korrelieren, nämlich starke Reaktionen bei bereits klinisch manifesten AK und schwächere Reaktionen bei der Demaskierung milderer, subklinischer AK.

Über die Wirkung bei AK hinaus konnte gezeigt werden, dass IM außerhalb des Zulassungsbereichs (*off-label*) auch bei der Behandlung von CA sehr effektiv ist und auch hier Entzündungsreaktionen hervorruft, welche zum Teil stärker ausgeprägt sind als bei AK (Abb. 3) (50, 51, 118). Es kommt zu einer großflächigen Ablederung der CA, aber auch zu Erosionen im Bereich klinisch unbefallener Haut, was vermuten lässt, dass, analog zur Reaktion subklinischer AK bei der Feldkanzerisierung, auch bei der Behandlung von CA mit IM HPV-befallene Keratinozyten, subklinischen Läsionen entsprechend, miterfasst werden. Außerdem kann beobachtet werden, dass die entstehenden

Erosionen ohne ersichtliche oder mikrobiologisch nachweisbare bakterielle Superinfektion innerhalb weniger Tage narbenfrei mit einem guten kosmetischen Ergebnis abheilen (40, 54, 71).

Histologische Untersuchungen von mit IM behandelten AK und CA zeigen ein dichtes Zellinfiltrat, das vorwiegend aus neutrophilen Granulozyten besteht, aber auch T-Zellen und Makrophagen enthält (Abb. 4) (43). Die genaue Betrachtung dieser Histologien zeigt, dass Entzündungszellen direkt aus den Gefäßen zu den IM-behandelten Zellen rekrutiert werden. Dies geschieht sehr früh und lässt vermuten, dass die Entzündungsreaktion für die rasche Ablederung der CA von essentieller Bedeutung ist (43).

Auf Grundlage dieser Beobachtungen stellten wir die folgenden Hypothesen auf:

1. IM induziert eine spezifische, läsionsgerichtete Entzündungsreaktion
2. IM induziert antimikrobielle Mechanismen, die selbst bei großflächigen Erosionen Superinfektionen verhindern und eine rasche Wundheilung unterstützen
3. Die rasche klinische Wirkung von IM ist primär immunvermittelt. Insbesondere ist die Induktion einer komplexen Immunantwort für die Wirkung von IM bedeutender als die Induktion unspezifisch toxischer Effekte.

Zur Überprüfung der aufgestellten Hypothesen wurden zunächst verschiedene differenzierte Zellen und Tumorzelllinien *in vitro* mit IM behandelt und anschließend die Regulation von Entzündungsmediatoren, im Detail von zehn Chemokinen, sowie fünf Genen, welche für AMP kodieren, mittels qPCR-Analysen untersucht. Nachfolgend wurden konditionierte Zellkulturüberstände IM-behandelter Zellen mittels ELISA auf die Konzentration ausgewählter Chemokine untersucht, um eine Validierung auf Proteinebene zu erreichen. Um zu eruieren, ob die unter IM-Therapie beobachtete verstärkte Rekrutierung von Entzündungszellen in Bereiche sichtbarer und palpabler AK mit einer läsionsgerichteten Induktion proinflammatorischer Chemokine in Tumorzellen einhergeht, wurden bei der Auswertung die Genexpression gesunder, differenzierter Keratinozyten mit fünf verschiedenen Tumorzelllinien verglichen.

Des Weiteren wurde der Einfluss von IM auf die Wundheilung untersucht, wobei verschiedene Gene des HA-Metabolismus getestet sowie Wundheilungs-Assays (Scratch-Assays) durchgeführt wurden.

Um schließlich die vermutete zentrale Bedeutung des Immunsystems für die rasche klinische Wirkung von IM zu untersuchen, wurden CA *ex vivo* mit IM behandelt und die Reaktion mit dem Verlauf klinisch *in vivo* mit IM behandelte CA verglichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *in-vitro*-Stimulation sowohl primärer differenzierter humaner Keratinozyten als auch verschiedener Tumorzelllinien mit IM eine erhöhte Genexpression des Chemokins *CXCL8* induziert. Beim Vergleich der differenzierten Zellen mit den Tumorzellen zeigte sich bei letzteren eine signifikant erhöhte Expressionsrate von *CXCL8*. Bei allen untersuchten Zellen zeigte sich ein glockenförmiges Verteilungsmuster innerhalb der verwendeten Konzentrationen von IM (1 nM - 10 µM) mit höchsten Expressionsraten bei 10 nM und 100 nM. Für das Chemokin *CCL2* zeigte sich lediglich in Tumorzellen, nicht aber in differenzierten Keratinozyten eine Induktion durch IM. Es zeigte sich ferner, dass Tumorzellen im Vergleich zu differenzierten Keratinozyten signifikant mehr *CCL2* exprimierten. Für *CCL5* zeigte sich unter IM zwar weder für differenzierte noch für Tumorzellen eine signifikante Induktion durch IM, jedoch konnte für beide eine tendenzielle Erhöhung der Genexpression durch IM beobachtet werden.

Mittels ELISA-Untersuchung konditionierter Zellkulturüberstände IM-behandelter Zellen konnte für die Tumorzelllinien UD-SCC-8 und HeLa eine signifikant erhöhte Konzentration von *CXCL8*-Protein im Vergleich zu primären humanen Keratinozyten nachgewiesen werden. Dies korrelierte mit den Ergebnissen der qPCR-Analysen.

Die qPCR-Analysen bezüglich der Genregulation verschiedener AMP durch IM zeigten eine Induktion von *RNase7* und *HBD3* sowohl in primären humanen Keratinozyten als auch in der Tumorzelllinie UD-SCC-8.

Für Gene des HA-Metabolismus konnte keine Regulation durch IM nachgewiesen werden.

In den durchgeführten Wundheilungs- bzw. Zellmigrationsassays konnte gezeigt werden, dass primäre humane Keratinozyten durch Stimulation mit IM

lediglich bei einer Konzentration von 10^{-7} M in ihrer Zellmigration gehemmt wurden.

Die *ex-vivo*-Stimulation von oberflächlich exzidierten CA mit IM zeigte im Verlauf keine klinischen Veränderungen. Insbesondere zeigte sich nicht die charakteristische weißlich-gräuliche Verfärbung von *in vivo* mit IM behandelten CA als klinisches Korrelat zu einer raschen Nekroseinduktion und Proteindenaturierung. Sehr wohl zeigten sich aber diese Veränderungen bei CA, die als Positivkontrolle *ex vivo* mit dem toxischen Agens TCA behandelt wurden. Die Histologien der *ex vivo* mit IM behandelten CA wiesen lediglich im oberen Anteil der Epidermis degenerierte und nekrotische Keratinozyten auf. Da in diesen oberflächlichen Bereichen die höchsten Konzentrationen von IM erreicht werden, lässt sich vermuten, dass dieser Effekt durch die zytotoxischen Eigenschaften von IM bedingt ist. Eine der *in-vivo*-Situation vergleichbare Degeneration oder Lyse von Zellen sowie eine intraepitheliale Blasenbildung in tiefer gelegenen Schichten der Epidermis konnte in der *ex-vivo*-Situation hingegen nicht beobachtet werden.

In Zusammenschau zeigen also die in dieser Arbeit beschriebenen klinischen und histopathologischen Beobachtungen, dass IM sowohl bei der Behandlung von AK, als auch bei der Behandlung von CA eine läsionsgerichtete inflammatorische Reaktion mit der Rekrutierung eines gemischtzelligen Entzündungszellinfiltrats und in der Folge eine Zerstörung und Denaturierung der Zielläsion induziert. Die Hypothese, dass die Induktion einer läsionsgerichteten Entzündungsreaktion für die gute klinische Wirksamkeit von IM entscheidend ist, wird durch weitere Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt. So wird die für die klassische Situation typische, vorbeschriebene Denaturierung von IM-behandelten Tumoren, in dieser Arbeit CA, bei Trennung vom Immunsystem weitestgehend unterbunden. Anhalte für unspezifische toxische Effekte von IM, vergleichbar der Inkubation mit der Säure TCA, finden sich hier nicht. In diesem Sinne kann IM als sogenannter *immune response modifier* (IRM) gewertet werden, welcher eine Immunantwort gegen pathologisch veränderte Zellen und Gewebe induziert. Die läsionsgerichtete Wirkungsweise hat hierbei den Vorteil, dass gesunde Zellen im Behandlungsareal weniger in Mitleidenschaft gezogen werden. Nebenwirkungen und Begleiterscheinungen sind also im Vergleich zu

Wirkstoffen mit ungerichteten toxischen Effekten vermeintlich geringer. Als klassischer IRM gilt Imiquimod (Aldara[®], Zyklara[®]), ein Agonist der Toll-like-Rezeptoren (TLR) 7 und 8 (119). Die Aktivierung von TLR7 und TLR8 auf dendritischen Zellen aktiviert den zentralen Transkriptionsfaktor NF- κ B (nukleärer Faktor κ B) und folglich die Induktion verschiedener proinflammatorischer Mediatoren wie INF- α , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-12 sowie der Chemokine CCL2, CCL4 und CXCL8 (120-125). Somit werden verschiedene Immunzellen, insbesondere plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) und zytotoxische T-Zellen, zu den Zielzellen rekrutiert. Interessanterweise ist Imiquimod sowohl für die Behandlung der aktinischen Feldkanzerisierung, als auch für die Behandlung von CA zugelassen (126). Das Indikationsspektrum deckt sich also mit dem von IM, auch wenn die Anwendung von IM bei der Therapie von CA ohne entsprechende Zulassung, also *off-label* erfolgt. In diesem Zusammenhang muss auch darauf hingewiesen werden, dass für die Anwendung von Imiquimod die Induktion systemischer Immuneffekte gezeigt werden konnte. Eine Anwendung von Imiquimod bei organtransplantierten Patienten ist folglich dringend kontraindiziert, da durch den IRM eine Aktivierung des Immunsystems und im schlimmsten Falle eine Organabstoßung oder die Induktion einer Graft-versus-host-Reaktion (engl.: *graft-versus-host-disease*, GvHD) befürchtet wird (126). Da IM basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls als IRM bewertet werden kann, sollte bei Organtransplantierten auch von der Anwendung von IM abgesehen werden. Auf der anderen Seite könnte die immunstimulierende Wirkung von IRM, etwa über eine anhaltende Modulation des Tumormikromilieus auch nachhaltig zur Effektivität entsprechender Wirkstoffe bei der Kontrolle von Tumorerkrankungen beitragen.

Das Tumormikromilieu wird aus der die Tumorzellen umgebenden extrazellulären Matrix gebildet und umfasst auch Zellen wie Fibroblasten, Adipozyten, Immunzellen sowie Blut- und Lymphgefäße (127). Die engen Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und dem Tumormikromilieu bilden die Grundlage für Tumorwachstum und Metastasierung (127).

Tumorzellen entwickeln eine Vielzahl von Mechanismen, um sich der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen (*tumor immune escape*). Verschiedene

Immunzellen, wie T- und B-Zellen, NK-Zellen und dendritische Zellen, spielen im Rahmen der natürlichen Anti-Tumor-Immunantwort eine Rolle. Ein Grundpfeiler ist die Antigenaufnahme und -präsentation durch dendritische Zellen mit anschließender T-Zell-Aktivierung, wodurch eine spezifische Immunität induziert wird (128-130). Durch die Fähigkeit von Tumorzellen, sich der Überwachung des Immunsystems zu entziehen (*tumor immune surveillance*) oder die Anti-Tumor-Immunantwort zu unterdrücken, kann eine Tumorentstehung ermöglicht werden (131). Tumorzellen können sich dabei verschiedene Mechanismen zu Nutze machen: so können zum einem MHC-Moleküle herunterreguliert werden, Tumorantigene unterdrückt werden oder eine Apoptoseresistenz durch übermäßige Expression antiapoptotischer Substanzen induziert werden (132, 133). Des Weiteren kann eine suppressive Tumormikroumgebung gebildet werden, welche neben Zellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr aus Tumor-assoziierten Endothelzellen, Fibroblasten sowie Makrophagen besteht (134). Durch immunsuppressive Mediatoren wie IL-10, TGF- β oder Fas-Ligand wird das immunsuppressive Milieu verstärkt (134). Auch Chemokine nehmen eine zentrale Rolle im Tumormikromilieu ein. So wirken proinflammatorische Chemokine wie CCL2 und CCL5 durch Rekrutierung von Immunzellen wie T-Helfer-Zellen oder dendritischen Zellen an der Anti-Tumor-Antwort mit (135-138). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund von Interesse, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass IM in Tumorzellen insbesondere CXCL8, nicht zuletzt aber auch die Expression von CCL2 und CCL5 induziert. Tatsächlich wurde von Lee *et al.* in einem murinen Modell die Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort durch IM beschrieben. Die einmalige intratumorale Injektion von IM in subkutane Tumoren von Mäusen führte zu einer Abheilung der Läsionen sowie zu einem Rückgang unbehandelter, entfernt liegender Tumoren infolge einer gesteigerten Aktivität von CD8⁺ T-Zellen (139). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene IM-vermittelte Induktion von CCL5 und insbesondere CCL2 als potentes T-Zell-Chemoattraktans für diesen Prozess von Bedeutung sein.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten die zentrale Rolle von CXCL8 für den Wirkmechanismus von IM zeigen. Challacombe *et al.* wiesen in

Zellkulturüberständen humaner Keratinozyten, Fibroblasten, neutrophiler Granulozyten sowie der humanen Melanomzelllinie Me10538 nach Stimulation mit IM erhöhte Konzentrationen von CXCL8 nach (56). Des Weiteren stellten Hampson *et al.* nach Stimulation mit IM erhöhte Proteinkonzentrationen von CXCL8 in Endothelzellen fest (67). CXCL8 (syn. IL-8) ist ein Chemokin der CXC-Gruppe, das vorwiegend die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bewirkt (66). Es sind hierbei zwei Rezeptoren beschrieben: der CXCR1-Rezeptor, der lediglich durch CXCL8 zu besetzen ist, sowie der CXCR2-Rezeptor, der auch eine Affinität für andere Neutrophilen-stimulierende Chemokine besitzt (140, 141). Durch Bindung von CXCL8 an neutrophile Granulozyten kommt zu einer Aktivierung des heterotrimeren G-Proteingekoppelten-Rezeptors. Die anschließende Signalkaskade umfasst die Aktivierung verschiedener Enzyme, wie der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) und Phospholipase C (PLC), die wiederum zu einer Bildung sekundärer Botenstoffe führen (80, 142). Es resultiert eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase B (PKB) sowie von MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein*) (143, 144). In den neutrophilen Granulozyten kommt es durch die Aktivierung dieser Signalkaskaden zu einer Formveränderung mit Ausbildung von kleinen Lamellipodien, die zusammen mit der ausgelösten Aktinpolymerisation eine Adhäsion mit nachfolgender Diapedese ermöglicht. Des Weiteren erfolgt eine Calcium-Mobilisierung und die Bildung und Freisetzung bioaktiver Lipide, granulärer Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch die neutrophilen Granulozyten ihre biologische Wirkung entfalten (80, 143, 144).

Neutrophile Granulozyten machen mit 40-60% den Hauptanteil der Leukozyten aus und stellen neben Makrophagen, Monozyten und NK-Zellen wichtige Effektoren des angeborenen Immunsystems dar. Sie bilden eine erste Verteidigungslinie bei der Bekämpfung von Mikroorganismen und haben als Hauptaufgabe die Phagozytose sowie Exozytose verschiedener Granula. Neben der zentralen Rolle im Entzündungsprozess, nehmen neutrophile Granulozyten eine wichtige Funktion in der Tumorabwehr wahr (64, 145-147). Bezüglich der IM-vermittelten Elimination neoplastischer Zellen durch rekrutierte neutrophile Granulozyten wird auch vermutet, dass diese im Rahmen einer antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody*

dependent cellular cytotoxicity, ADCC) stattfinden könnte (56). Dieser Prozess beginnt mit einer B-Zell-vermittelten Bildung von Antikörpern, die sich gegen zelluläre Antigene richten und an transformierte Zellen binden. Über diese Antikörper kann eine Erkennung durch neutrophile Granulozyten erfolgen, die die neoplastischen Zellen dann eliminieren. Challacombe *et al.* konnten außerdem zeigen, dass IM in neutrophilen Granulozyten zu einer Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt (56). Diese senkte die Viabilität der getesteten Melanomzelllinie MM96L. Möglicherweise spielt die Ausschüttung von ROS auch bei der Anti-Tumor-Immunantwort gegen dysplastische Keratinozyten eine Rolle.

Durch die gezielte Rekrutierung von Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten und T-Zellen, könnte IM also bewirken, dass ein *Tumor-Immune-Escape* durchbrochen und die Einleitung einer Anti-Tumor-Immunantwort induziert wird. In dieser Arbeit konnte außerdem beobachtet werden, dass IM gezielt in Tumorzellen und weniger in gesunden Zellen eine erhöhte Chemokinbildung induziert. Da im Bereich klinisch ausgeprägter AK vermehrt neoplastische Zellen erwartet werden, korreliert diese Beobachtung mit der massiven Entzündungsreaktion im Bereich klinisch ausgeprägter AK.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Emmert *et al.*, die systematisch die Effekte von IM auf AK und gesunde Haut untersuchten (148). Hierfür wurde bei 26 Patienten je ein 25 cm² großes Areal aktinischer Feldkanzerisierung sowie eine entsprechende Fläche gesunder, nicht sonnenexponierter Haut für 2 Tage mit IM-Gel behandelt. Die nachfolgenden histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass IM in AK eine signifikant stärkere und länger andauernde Entzündungsreaktion auslöst als in gesunder Haut. In den AK-Proben konnten vermehrt CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich in Gefäßendothelzellen eine Induktion von ICAM1, welches für die Transmigration von Leukozyten eine entscheidende Rolle spielt. Auch von Hampson *et al.* konnte in einem *in-vitro*-Ansatz eine Aktivierung von Endothelzellen nachgewiesen werden (67), was darauf hindeutet, dass auch eine Modulation von Zelladhäsionsmolekülen durch IM die Rekrutierung von Entzündungszellen unterstützt.

Ein weiteres Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit ist, dass sich die IM-induzierte Expression der verschiedenen Chemokinliganden in den verschiedenen Zelltypen stark konzentrationsabhängig zeigte. Interessant in diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Freiburger *et al.*, die ebenfalls *in-vitro*-Effekte von IM auf unterschiedliche Zelltypen wie Keratinozyten, Fibroblasten, Melanomzellen und PEK-Zellen untersuchte (149). Hierbei zeigte sich bezüglich der Viabilität und der Proliferation der untersuchten Zellen nach Stimulation mit IM (1 nmol/L - 10^5 nmol/L), dass Keratinozyten und SCC-Zellen ein biphasisches Reaktionsmuster aufwiesen. So war ein Abfall der Parameter Viabilität und Proliferation bei einer Konzentration von 100 nmol/L IM zu verzeichnen, wohingegen die Zellen bei höheren und niedrigeren Konzentrationen von IM weniger beeinträchtigt wurden. Auch Mikroarray-Analysen zeigten, dass bei 100 nmol/L IM die deutlichsten Unterschiede im Genexpressionsmuster zu verzeichnen waren. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, die zeigen, dass bei der entsprechenden Konzentration die höchste Expression von CXCL8 zu beobachten war.

Eine Limitation der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Genregulation durch IM stellt die Wahl der Zelllinien dar. Da bisher keine etablierte Linie mit AK-Zellen zur Verfügung steht, könnten SCC-Zellen der freien Haut die Morphologie von AK-Zellen gegebenenfalls besser repräsentieren als die von uns verwendeten SCC-Zellen des Kopf-Halsbereiches und der Zervix. Es ist jedoch auch bekannt, dass SCC-Tumoren unterschiedlichster Lokalisationen bezüglich der meisten und relevanten molekularer Marker übereinstimmen, sodass diese Einschränkung als relativ zu werten ist (150). Eine weitere Limitation stellt die Stimulationsdauer der Zellen dar. Während diese in der hier vorliegenden Arbeit 24 Stunden betrug, nutzten andere Autoren zum Teil mit deutlich kürzeren Stimulationszeiten (vier oder sechs Stunden) (56, 67). Da wir in den konditionierten Überständen mit IM inkubierter Zellen bei der Proteinmessung deutlich höhere Konzentrationen von CXCL8 feststellen konnten als Ergebnisse der qPCR-Analysen vermuten lassen, könnte die stärkste Genregulation bereits zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt als nach 24 Stunden Stimulation erfolgen. In diesem Falle wäre also

die mRNA der untersuchten Chemokine nach 24 Stunden bei der Messung bereits vielfach umgesetzt und somit schwächer detektierbar, wohingegen das umgesetzte Protein in den Zellkulturüberständen weiter nachweisbar bleibt. Weiterführende Experimente mit kürzeren Stimulationszeitpunkten könnten diese Fragestellung näher untersuchen.

Als weitere Fragestellung wurde in dieser Arbeit der Effekt von IM auf die Wundheilung untersucht. Hierzu wurden zum einen qPCR-Analysen der Expression von Genen des HA-Stoffwechsels (*HYAL1*, *HYAL2* und *HAS1-3*) und von Genen, die für AMP (*HBD1-3*, *LL37* und *RNase7*) kodieren durchgeführt, sowie zum anderen Wundheilungs-Assays (Scratch-Assays) ausgewertet. Während in der hier vorliegenden Arbeit kein Effekt von IM auf die Regulation von *HYAL1*, *HYAL2* und *HAS1-3* festgestellt wurde, konnten Kane-Maguire *et al.* sehr wohl demonstrieren, dass IM in Fibroblasten durch eine Hochregulation von *HAS2* die HA-Synthese induziert (73). Da HA maßgeblich an der Wundheilung beteiligt und der Verlust an HA ein Kardinalsymptom der Hautalterung ist (104, 151), könnte diese Beobachtung miterklären, wieso IM eine schnelle und narbenfreie Abheilung der behandelten Läsionen begünstigt. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass eine HA-reiche Matrix das während der Wundheilung entstehende Granulationsgewebe stabilisiert sowie die Neoangiogenese und Zellmigration fördert (104-106). Durch Anreicherung von HA kommt es außerdem zu geringeren Kollageneinlagerungen, die mit einer verringerten Narbenbildung einhergehen (107-109). Des Weiteren stellt sich die Frage, ob diese Veränderungen des HA-Metabolismus durch IM auch bei neoplastischen Zellen eine Rolle spielen. HA beeinflusst neben der Tumorentstehung auch die Tumordinvasion und Metastasierung (103, 110, 111). Twarock *et al.* konnten an Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zeigen, dass die systemische Inhibition der HA-Synthese und das Ausschalten der *HAS3* in Tumorzellen zu einem verringerten Tumorwachstum führte (152). Effekte von IM auf den HA-Metabolismus in Tumoren *in vivo* wurden in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Zukünftige Studien könnten aber entsprechende Effekte von IM auf SCC-Zellen der Haut oder Biopsien IM-behandelter AK und anderer Neoplasien erforschen.

Neben dem HA-Metabolismus spielt auch die Zellmigration eine zentrale Rolle für die Wundheilung. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Scratch-Assays mit primären humanen Keratinozyten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Wundheilung und Zellmigration durch IM in den meisten verwendeten Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-9} M IM) nicht negativ beeinflusst wird. Lediglich bei 10^{-7} M IM konnte auch nach 40 Stunden kaum eine Zellmigration beobachtet werden; die Wundheilung wurde also nachhaltig gestört. Dieses Ergebnis unterstreicht erneut die Beobachtung, dass diese Konzentration, in Übereinstimmung mit Freiberger *et al.* und unseren Ergebnissen der qPCR-Analysen, stärkere zelluläre und molekulare Effekte induziert als niedrigere oder höhere Konzentrationen. Ein solches konzentrationsabhängiges „On-Off“-Phänomen erscheint pharmakologisch und biologisch sehr interessant und sollte in zukünftigen Studien näher analysiert werden. Vielversprechend erscheint in diesem Zusammenhang zum Beispiel auch ein Vergleich von konzentrationsabhängigen Effekten auf physiologische versus neoplastische Zellen. Bezüglich des molekularen Wirkmechanismus von IM wird postuliert, dass der Wirkstoff ein potenter Aktivator der Proteinkinase C Delta (PKC δ) ist (56). Interessant wären also auch Scratch-Assays unter Inkubation mit 10^{-7} M IM in An- und Abwesenheit eines PKC-Inhibitors, wie zum Beispiel Bisindolylmalimid 1.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Analysen einer Regulation von AMP durch IM schließlich zeigen, dass *RNase7* und *HBD3* sowohl in primären humanen Keratinozyten als auch in der Tumorzelllinie UD-SCC-8 im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant hochreguliert werden. Auch hier zeigte sich erneut der stärkste Effekt bei einer Zellstimulation mit einer Konzentration von 10^{-7} M IM. *RNase7* und *HBD3* weisen starke antimikrobielle Eigenschaften gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen, Pilzen und Viren auf (82). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion von *RNase 7* und *HBD3* könnte also die klinische Beobachtung erklären, dass selbst großflächige Erosionen, die durch die Behandlung kutaner Tumoren mit IM entstehen können, praktisch immer ohne Superinfektion abheilen.

Neben den antimikrobiellen Eigenschaften ist mittlerweile bekannt, dass AMP darüberhinaus auch immunologische Funktionen ausüben. In der Pathogenese der Psoriasis und der atopischen Dermatitis bewirken AMP sowohl pro- also

auch anti-inflammatorische Effekte (153). *HBD3* führt bei Patienten mit Psoriasis zu einer Aktivierung von pDCs, die nachfolgend IFN- α produzieren und somit die Entzündungsreaktion verstärken (154). Eine IM-induzierte, läsionsgerichtete Entzündungsreaktion könnte also neben proinflammatorischen Chemokinen zum Teil auch durch AMP vermittelt werden. Ein Zusammenhang zwischen IM und AMP wurde bis dato lediglich durch Challacombe *et al.* untersucht, die eine mäßige Freisetzung von Defensinen aus den Granula neutrophiler Granulozyten bei Stimulation mit 100 ng/ml IM beschrieben (56).

Schließlich könnte die rasche und narbenlose Abheilung IM-induzierter entzündlicher und destrukturierender Reaktionen auch durch die limitierte Wirttiefe von IM bedingt sein. Während Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass IM auch bis in die tiefe Dermis und somit über die Basalmembran der Haut hinaus eindringt und hier zu einer Beeinträchtigung der Blutgefäße führt (155), beschreiben Emmert *et al.* für die von ihnen untersuchten Hautbiopsien humaner AK, dass sich der Effekt von IM auf die Epidermis beschränkt und die Basalmembran nicht verletzt wird (148). Auch Stahlhut *et al.* konnten an rekonstruierten humanen Vollhautäquivalenten demonstrieren, dass IM in der Epidermis, aber nicht der Dermis die Zellviabilität stört (55). Der Vergleich der unterschiedlichen Resultate für das murine und humane System veranschaulicht also auch für die Effekte von IM, dass sich Erkenntnisse aus Untersuchungen an Mauhaut, nicht ohne Weiteres auf die menschliche Haut übertragen lassen (156).

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und Daten aus der einschlägigen Literatur kann also postuliert werden, dass IM als IRM zielgerichtet gegen nicht-physiologische Zellen und Gewebe, explizit gegen neoplastischen Keratinozyten, AK und CA, eine von T-Zellen und neutrophilen Granulozyten dominierte Entzündungsreaktion induziert. Vergleichbar dem IRM Imiquimod ist es somit denkbar, dass auch IM systemische immunologische Effekte vermittelt (122, 157). Ferner kann analog zu Imiquimod postuliert werden, dass die Behandlung von AK und CA mit IM das Immunmikromilieu so nachhaltig beeinflusst, dass durch eine andauernde *immune surveillance*, etwa durch Bildung spezieller HPV-sensibler Memory-T-Zellen, die Frequenz von

Rezidiven reduziert werden könnte (158). Analog zu anderen IRM sollte IM bei organtransplantierten Patienten nicht angewendet werden, um die Möglichkeit einer Aktivierung des Immunsystems und im schlimmsten Falle eine Organabstoßung oder die Induktion einer GvHD zu vermeiden (126). Die durch IM induzierte Zytokin- und Chemokin-vermittelte Immunreaktion ist für die klinische Effektivität von IM entscheidend und wesentlich bedeutsamer als unspezifische, dosisabhängig toxische Effekte. IM zeigt in den meisten Dosierungen *in vitro* keine negativen Effekte auf die Wundheilung und induziert AMP, was in der Klinik eine rasche, komplikationslose Heilung unterstützt. *In vitro* zeigen sich für IM schließlich stark dosisabhängige Effekte im Sinne einer „on-off“-Reaktion – eine Beobachtung die in zukünftigen Studien näher untersucht werden könnte.

5 Literaturverzeichnis

1. European Medicines Agency, *Assessment Report Picato*. Procedure No. EMEA/H/C/002275, 2012.
2. Adolf, W., S. Chanai, und E. Hecker, *3-O-angeloylingenol, the toxic and skin irritant factor from latex of euphorbia anitiquorum l.(euphorbiaceae) and from a derived thai purgative and anthelmintic (vermifuge) drug*. ScienceAsia, 1983. 9: p. 081-088.
3. Appendino, G., et al., *An expeditious procedure for the isolation of ingenol from the seeds of euphorbia lathyris*. J Nat Prod, 1999. 62(1): p. 76-9.
4. Liang, X., et al., *Semisynthesis of ingenol 3-angelate (PEP005): Efficient stereoconservative angeloylation of alcohols*. Synlett, 2012. 23(18): p. 2647-2652.
5. Jorgensen, L., et al., *14-step synthesis of (+)-ingenol from (+)-3-carene*. Science, 2013. 341(6148): p. 878-82.
6. Dierbach, J.H., *Die Arzneimittel des Hippokrates, oder Versuch einer systematischen Aufzählung der in allen hippokratischen Schriften vorkommenden Medikamenten*. Neue Akademische Buchhandlung von Karl Groos, 1824: p. 143
7. Pedanius, D. und J. Berendes, *Arzneimittellehre in fünf Büchern*. Enke, 1902. 4:p. 458-462.
8. Green, A.C. und G.L. Beardmore, *Home treatment of skin cancer and solar keratoses*. Australas J Dermatol, 1988. 29(3): p. 127-30.
9. Tzogani, K., et al., *The European Medicines Agency approval of ingenol mebutate (Picato) for the cutaneous treatment of non-hyperkeratotic, non-hypertrophic actinic keratosis in adults: Summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)*. European Journal of Dermatology, 2014. 24(4): p. 457-463.
10. Rowert-Huber, J., et al., *Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification*. Br J Dermatol, 2007. 156 Suppl 3: p. 8-12.
11. Ackerman, A.B. und J.M. Mones, *Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma*. Br J Dermatol, 2006. 155(1): p. 9-22.
12. Flohil, S.C., et al., *Prevalence of actinic keratosis and its risk factors in the general population: the Rotterdam Study*. J Invest Dermatol, 2013. 133(8): p. 1971-8.
13. Traianou, A., et al., *Risk factors for actinic keratosis in eight European centres: a case-control study*. Br J Dermatol, 2012. 167 Suppl 2: p. 36-42.
14. Memon, A.A., et al., *Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population*. Br J Dermatol, 2000. 142(6): p. 1154-9.
15. Nomura, T., et al., *Induction of cancer, actinic keratosis, and specific p53 mutations by UVB light in human skin maintained in severe combined immunodeficient mice*. Cancer Res, 1997. 57(11): p. 2081-4.
16. Hutchinson, F., *Induction of tandem-base change mutations*. Mutat Res, 1994. 309(1): p. 11-5.
17. Brash, D.E., et al., *Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion*. J Investig Dermatol Symp Proc, 1996. 1(2): p. 136-42.

18. Einspahr, J.G., et al., *Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis*. Neoplasia, 1999. 1(5): p. 468-75.
19. Spencer, J.M., et al., *Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas*. Arch Dermatol, 1995. 131(7): p. 796-800.
20. Harwood, C.A. und C.M. Proby, *Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer*. Curr Opin Infect Dis, 2002. 15(2): p. 101-14.
21. Lebwohl, M.G., T. Rosen, und E. Stockfleth, *The role of human papillomavirus in common skin conditions: current viewpoints and therapeutic options*. Cutis, 2010. 86(5): p. suppl 1-11; quiz suppl 12.
22. Moy, R.L., *Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma*. J Am Acad Dermatol, 2000. 42(1 Pt 2): p. 8-10.
23. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, und W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. Cancer, 1953. 6(5): p. 963-8.
24. Dodds, A., A. Chia, und S. Shumack, *Actinic keratosis: rationale and management*. Dermatol Ther (Heidelb), 2014. 4(1): p. 11-31.
25. Braakhuis, B.J., et al., *A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications*. Cancer Res, 2003. 63(8): p. 1727-30.
26. Marks, R., et al., *Spontaneous remission of solar keratoses: the case for conservative management*. Br J Dermatol, 1986. 115(6): p. 649-55.
27. Dodson, J.M., et al., *Malignant potential of actinic keratoses and the controversy over treatment. A patient-oriented perspective*. Arch Dermatol, 1991. 127(7): p. 1029-31.
28. Kasiske, B.L., et al., *Cancer after kidney transplantation in the United States*. Am J Transplant, 2004. 4(6): p. 905-13.
29. Fernandez-Figueras, M.T., et al., *Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2015. 29(5): p. 991-7.
30. Rivers, J.K., et al., *Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel*. Br J Dermatol, 2002. 146(1): p. 94-100.
31. Wolf, J.E., Jr., et al., *Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses*. Int J Dermatol, 2001. 40(11): p. 709-13.
32. Lebwohl, M., et al., *Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from two phase III, randomized, double-blind, parallel group, vehicle-controlled trials*. J Am Acad Dermatol, 2004. 50(5): p. 714-21.
33. Swanson, N., et al., *Imiquimod 2.5% and 3.75% for the treatment of actinic keratoses: results of two placebo-controlled studies of daily application to the face and balding scalp for two 2-week cycles*. J Am Acad Dermatol, 2010. 62(4): p. 582-90.
34. Braathen, L.R., et al., *Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005*. J Am Acad Dermatol, 2007. 56(1): p. 125-43.
35. Freeman, M., et al., *A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinic acid (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study*. J Dermatolog Treat, 2003. 14(2): p. 99-106.

36. Pariser, D.M., et al., *Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial*. J Am Acad Dermatol, 2003. 48(2): p. 227-32.
37. Tarstedt, M., et al., *A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp*. Acta Derm Venereol, 2005. 85(5): p. 424-8.
38. Piacquadio, D.J., et al., *Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials*. Arch Dermatol, 2004. 140(1): p. 41-6.
39. Gupta, A.K., V. Davey, und H. McPhail, *Evaluation of the effectiveness of imiquimod and 5-fluorouracil for the treatment of actinic keratosis: Critical review and meta-analysis of efficacy studies*. J Cutan Med Surg, 2005. 9(5): p. 209-14.
40. Lebwohl, M., et al., *Ingenol mebutate gel for actinic keratosis*. N Engl J Med, 2012. 366(11): p. 1010-9.
41. Lebwohl, M., et al., *Long-term follow-up study of ingenol mebutate gel for the treatment of actinic keratoses*. JAMA Dermatol, 2013. 149(6): p. 666-70.
42. Anderson, L., et al., *Randomized, double-blind, double-dummy, vehicle-controlled study of ingenol mebutate gel 0.025% and 0.05% for actinic keratosis*. J Am Acad Dermatol, 2009. 60(6): p. 934-43.
43. Braun, S.A., et al., *Ingenol mebutate induces a tumor cell-directed inflammatory response and antimicrobial peptides thereby promoting rapid tumor destruction and wound healing*. Eur J Med Res, 2018. 23(1): p. 45.
44. Gross, G., et al., *Papillomavirus infection of the anogenital region: correlation between histology, clinical picture, and virus type. Proposal of a new nomenclature*. J Invest Dermatol, 1985. 85(2): p. 147-52.
45. Phelps, W.C. und K.A. Alexander, *Antiviral therapy for human papillomaviruses: rational and prospects*. Ann Intern Med, 1995. 123(5): p. 368-82.
46. Lacey, C.J., et al., *2012 European guideline for the management of anogenital warts*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013. 27(3): p. 263-70.
47. Koutsky, L.A., D.A. Galloway, und K.K. Holmes, *Epidemiology of genital human papillomavirus infection*. Epidemiol Rev, 1988. 10: p. 122-63.
48. von Krogh, G., et al., *European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts*. Sex Transm Infect, 2000. 76(3): p. 162-8.
49. Gross, G., H. Korting, und H. Schöfer, *Condylomata acuminata und andere HPV-assoziierte Erkrankungen des Genitale und der Harnröhre*. AWMF online-Leitlinien der deutschen STD-Gesellschaft, 2000: p. 059-001.
50. Braun, S., et al., *Erfolgreiche Therapie von Condylomata acuminata mit Ingenolmebutat* Successful therapy of condylomata acuminata with ingenol mebutate. Der Hautarzt, 2015. 66(4): p. 223-225.
51. Braun, S.A. und P.A. Gerber, *Erfolgreiche Behandlung von perianalen Condylomata acuminata mit Ingenolmebutat*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2016. 14(6): p. 616-617.

52. Rosen, R.H., A.K. Gupta, und S.K. Tyring, *Dual mechanism of action of ingenol mebutate gel for topical treatment of actinic keratoses: rapid lesion necrosis followed by lesion-specific immune response*. J Am Acad Dermatol, 2012. 66(3): p. 486-93.
53. Berman, B., *New developments in the treatment of actinic keratosis: focus on ingenol mebutate gel*. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2012. 5: p. 111-22.
54. Ogbourne, S.M., et al., *Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death*. Cancer Res, 2004. 64(8): p. 2833-9.
55. Stahlhut, M., et al., *Ingenol mebutate: induced cell death patterns in normal and cancer epithelial cells*. J Drugs Dermatol, 2012. 11(10): p. 1181-92.
56. Challacombe, J.M., et al., *Neutrophils are a key component of the antitumor efficacy of topical chemotherapy with ingenol-3-angelate*. J Immunol, 2006. 177(11): p. 8123-32.
57. Hampson, P., et al., *PEP005, a selective small-molecule activator of protein kinase C, has potent antileukemic activity mediated via the delta isoform of PKC*. Blood, 2005. 106(4): p. 1362-8.
58. Kedei, N., et al., *Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C*. Cancer Res, 2004. 64(9): p. 3243-55.
59. Ghayur, T., et al., *Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis*. J Exp Med, 1996. 184(6): p. 2399-404.
60. Emoto, Y., et al., *Activation of protein kinase Cdelta in human myeloid leukemia cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine*. Blood, 1996. 87(5): p. 1990-6.
61. Perletti, G.P., et al., *PKCdelta acts as a growth and tumor suppressor in rat colonic epithelial cells*. Oncogene, 1999. 18(5): p. 1251-6.
62. Gillespie, S.K., X.D. Zhang, und P. Hersey, *Ingenol 3-angelate induces dual modes of cell death and differentially regulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in melanoma cells*. Mol Cancer Ther, 2004. 3(12): p. 1651-8.
63. Serova, M., et al., *Effects of protein kinase C modulation by PEP005, a novel ingenol angelate, on mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2008. 7(4): p. 915-22.
64. Di Carlo, E., G. Forni, und P. Musiani, *Neutrophils in the antitumoral immune response*. Chem Immunol Allergy, 2003. 83: p. 182-203.
65. Ferrante, A., *Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors*. Immunol Ser, 1992. 57: p. 417-36.
66. Baggiolini, M., A. Walz, und S.L. Kunkel, *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils*. J Clin Invest, 1989. 84(4): p. 1045-9.
67. Hampson, P., et al., *The anti-tumor agent, ingenol-3-angelate (PEP005), promotes the recruitment of cytotoxic neutrophils by activation of vascular endothelial cells in a PKC-delta dependent manner*. Cancer Immunol Immunother, 2008. 57(8): p. 1241-51.
68. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response*. Lab Invest, 2002. 82(5): p. 521-33.
69. Panes, J., M. Perry, und D.N. Granger, *Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention*. Br J Pharmacol, 1999. 126(3): p. 537-50.

70. Cozzi, S.J., et al., *Ingenol mebutate field-directed treatment of UVB-damaged skin reduces lesion formation and removes mutant p53 patches*. J Invest Dermatol, 2012. 132(4): p. 1263-71.
71. Braun, S.A. und P.A. Gerber, *Cosmetic Effects of Ingenol Mebutate Gel in the Treatment of Field-Cancerized Photodamaged Skin*. Dermatol Surg, 2015. 41(11): p. 1328-9.
72. Werner, S. und R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol Rev, 2003. 83(3): p. 835-70.
73. Kane-Maguire, N., et al., *Modulation of fibroblast phenotype and extracellular matrix composition by ingenol mebutate may be associated with scar resolution and improved dermal cosmesis*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2012. 66(4): p. AB218.
74. Zlotnik, A. und O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. 12(2): p. 121-7.
75. Zlotnik, A., O. Yoshie, und H. Nomiya, *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*. Genome Biol, 2006. 7(12): p. 243.
76. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. 410(6824): p. 50-6.
77. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. 52(1): p. 145-76.
78. Rossi, D. und A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 217-42.
79. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. 25(2): p. 75-84.
80. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. 392(6676): p. 565-8.
81. Homey, B., et al., *Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC)*. J Immunol, 2000. 164(7): p. 3465-70.
82. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. 415(6870): p. 389-95.
83. Yang, D., et al., *Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 181-215.
84. Tang, Y.Q., et al., *A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins*. Science, 1999. 286(5439): p. 498-502.
85. Dann, S.M. und L. Eckmann, *Innate immune defenses in the intestinal tract*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. 23(2): p. 115-20.
86. Harder, J., R. Glaser, und J.M. Schroder, *Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity*. J Endotoxin Res, 2007. 13(6): p. 317-38.
87. Harder, J., et al., *Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic*. J Biol Chem, 2001. 276(8): p. 5707-13.
88. Harder, J., et al., *A peptide antibiotic from human skin*. Nature, 1997. 387(6636): p. 861.

89. Zanetti, M., *Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity*. J Leukoc Biol, 2004. 75(1): p. 39-48.
90. Agerberth, B., et al., *FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(1): p. 195-9.
91. Cowland, J.B., A.H. Johnsen, and N. Borregaard, *hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules*. FEBS Lett, 1995. 368(1): p. 173-6.
92. Sorensen, O.E., et al., *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3*. Blood, 2001. 97(12): p. 3951-9.
93. Zanetti, M., *The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals*. Curr Issues Mol Biol, 2005. 7(2): p. 179-96.
94. Harder, J. und J.M. Schroder, *RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin*. J Biol Chem, 2002. 277(48): p. 46779-84.
95. Prehm, P., *Hyaluronate is synthesized at plasma membranes*. Biochem J, 1984. 220(2): p. 597-600.
96. Itano, N. und K. Kimata, *Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase*. J Biol Chem, 1996. 271(17): p. 9875-8.
97. Shyjan, A.M., et al., *Functional cloning of the cDNA for a human hyaluronan synthase*. J Biol Chem, 1996. 271(38): p. 23395-9.
98. Spicer, A.P., M.L. Augustine, and J.A. McDonald, *Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase*. J Biol Chem, 1996. 271(38): p. 23400-6.
99. Watanabe, K. und Y. Yamaguchi, *Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase*. J Biol Chem, 1996. 271(38): p. 22945-8.
100. Spicer, A.P., J.S. Olson, and J.A. McDonald, *Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase*. J Biol Chem, 1997. 272(14): p. 8957-61.
101. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. 274(35): p. 25085-92.
102. Csoka, A.B., G.I. Frost, und R. Stern, *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*. Matrix Biol, 2001. 20(8): p. 499-508.
103. Stern, R., A.A. Asari, und K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. Eur J Cell Biol, 2006. 85(8): p. 699-715.
104. Chen, W.Y. und G. Abatangelo, *Functions of hyaluronan in wound repair*. Wound Repair Regen, 1999. 7(2): p. 79-89.
105. Toole, B., *Hyaluronan in morphogenesis*. Journal of internal medicine, 1997. 242(1): p. 35-40.
106. Toole, B.P., *Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation*, in *Cell biology of extracellular matrix*. 1991, Springer. p. 305-341.
107. Laurent, C., S. Hellstöm, und L.-E. Stenforde, *Hyaluronic acid reduces connective tissue formation in middle ears filled with absorbable gelatin sponge: an experimental study*. American journal of otolaryngology, 1986. 7(3): p. 181-186.

108. Longaker, M.T., et al., *Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid.* Ann Surg, 1991. 213(4): p. 292-6.
109. West, D.C., et al., *Fibrotic healing of adult and late gestation fetal wounds correlates with increased hyaluronidase activity and removal of hyaluronan.* Int J Biochem Cell Biol, 1997. 29(1): p. 201-10.
110. Kumar, S., et al., *Sera of children with renal tumours contain low-molecular-mass hyaluronic acid.* Int J Cancer, 1989. 44(3): p. 445-8.
111. Lokeshwar, V.B., et al., *Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer.* Cancer Res, 1997. 57(4): p. 773-7.
112. Karvinen, S., et al., *Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumours.* Br J Dermatol, 2003. 148(1): p. 86-94.
113. Franzmann, E.J., et al., *Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors.* Int J Cancer, 2003. 106(3): p. 438-45.
114. Toole, B.P., *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue.* Nat Rev Cancer, 2004. 4(7): p. 528-39.
115. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
116. Braun, S.A., et al., *Time-lapse imaging points towards a non-toxic, mainly immune-driven mode of action of ingenol mebutate in the treatment of anogenital warts.* Experimental dermatology, 2018. 27(6): p. 675-677.
117. Weedon, D. und J. Chick, *Home treatment of basal cell carcinoma.* Med J Aust, 1976. 1(24): p. 928.
118. Braun, S.A. und P.A. Gerber, *Ingenol mebutate for the management of genital warts in sensitive anatomic locations.* J Am Acad Dermatol, 2017. 77(1): p. e9-e10.
119. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.* Nat Immunol, 2002. 3(2): p. 196-200.
120. Gibson, S.J., et al., *Cellular requirements for cytokine production in response to the immunomodulators imiquimod and S-27609.* J Interferon Cytokine Res, 1995. 15(6): p. 537-45.
121. Megyeri, K., et al., *Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by Sendai virus utilize similar signal transduction pathways.* Mol Cell Biol, 1995. 15(4): p. 2207-18.
122. Schon, M.P. und M. Schon, *Imiquimod: mode of action.* Br J Dermatol, 2007. 157 Suppl 2: p. 8-13.
123. Testerman, T.L., et al., *Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609.* J Leukoc Biol, 1995. 58(3): p. 365-72.
124. Tomai, M.A., et al., *Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463.* Antiviral Res, 1995. 28(3): p. 253-64.
125. Wagner, T.L., et al., *Induction of cytokines in cynomolgus monkeys by the immune response modifiers, imiquimod, S-27609 and S-28463.* Cytokine, 1997. 9(11): p. 837-45.

126. MEDA Pharma GmbH & Co. KG. *Fachinformation Aldara 5 % Creme*. Stand: Februar 2015 [cited 2018 30.12.2018]; Available from: https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/prod-cerebro-ifap/media_all/63216.pdf.
127. Wang, M., et al., *Role of tumor microenvironment in tumorigenesis*. J Cancer, 2017. 8(5): p. 761-773.
128. Banchereau, J. und R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. 392(6673): p. 245-52.
129. Steinman, R.M., D. Hawiger, und M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annual review of immunology, 2003. 21: p. 685-711.
130. Hawiger, D., et al., *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. The Journal of experimental medicine, 2001. 194(6): p. 769-79.
131. Apetoh, L., et al., *Harnessing dendritic cells in cancer*. Seminars in immunology, 2011. 23(1): p. 42-9.
132. Hurwitz, A.A. und S.K. Watkins, *Immune suppression in the tumor microenvironment: a role for dendritic cell-mediated tolerization of T cells*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2012. 61(2): p. 289-93.
133. Khong, H.T. und N.P. Restifo, *Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes*. Nature immunology, 2002. 3(11): p. 999-1005.
134. Wu, T. und Y. Dai, *Tumor microenvironment and therapeutic response*. Cancer Lett, 2017. 387: p. 61-68.
135. González-Martín, A., et al., *Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4+ and CD8+ T cells*. Cancer research, 2011. 71(16): p. 5455-66.
136. Molon, B., et al., *Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells*. J Exp Med, 2011. 208(10): p. 1949-62.
137. Nesbeth, Y.C., et al., *CD4+ T cells elicit host immune responses to MHC class II-negative ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells*. J Immunol, 2010. 184(10): p. 5654-62.
138. Viola, A., et al., *The pros and cons of chemokines in tumor immunology*. Trends Immunol, 2012. 33(10): p. 496-504.
139. Le, T.T., et al., *Immunostimulatory cancer chemotherapy using local ingenol-3-angelate and synergy with immunotherapies*. Vaccine, 2009. 27(23): p. 3053-62.
140. Baggiolini, M., B. Dewald, und B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 675-705.
141. Baggiolini, M., B. Moser, und I. Clark-Lewis, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines*. The Giles Filley Lecture. Chest, 1994. 105(3 Suppl): p. 95S-98S.
142. Thelen, M., M. Ugucconi, und J. Bosiger, *PI 3-kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. 217(3): p. 1255-62.
143. Baggiolini, M. und I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. 307(1): p. 97-101.
144. Waugh, D.J. und C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2008. 14(21): p. 6735-41.

145. Alvarez, M.J., et al., *Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity*. *Cancer Res*, 2005. 65(12): p. 5123-32.
146. Chen, Y.L., et al., *Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils*. *J Immunol*, 2003. 171(3): p. 1183-91.
147. Di Carlo, E., et al., *The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions*. *Blood*, 2001. 97(2): p. 339-45.
148. Emmert, S., et al., *Tumor-Preferential Induction of Immune Responses and Epidermal Cell Death in Actinic Keratoses by Ingenol Mebutate*. *PLoS One*, 2016. 11(9): p. e0160096.
149. Freiburger, S.N., et al., *Ingenol Mebutate Signals via PKC/MEK/ERK in Keratinocytes and Induces Interleukin Decoy Receptors IL1R2 and IL13RA2*. *Mol Cancer Ther*, 2015. 14(9): p. 2132-42.
150. Yan, W., et al., *Squamous Cell Carcinoma - Similarities and Differences among Anatomical Sites*. *Am J Cancer Res*, 2011. 1(3): p. 275-300.
151. Ghersetich, I., et al., *Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging*. *Int J Dermatol*, 1994. 33(2): p. 119-22.
152. Twarock, S., et al., *Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis*. *Mol Cancer*, 2011. 10: p. 30.
153. Niyonsaba, F., et al., *Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases*. *Exp Dermatol*, 2017. 26(11): p. 989-998.
154. Tewary, P., et al., *beta-Defensin 2 and 3 promote the uptake of self or CpG DNA, enhance IFN-alpha production by human plasmacytoid dendritic cells, and promote inflammation*. *J Immunol*, 2013. 191(2): p. 865-74.
155. Lee, W.Y., et al., *Novel antileukemic compound ingenol 3-angelate inhibits T cell apoptosis by activating protein kinase Ctheta*. *J Biol Chem*, 2010. 285(31): p. 23889-98.
156. Gerber, P.A., et al., *The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes*. *Biol Chem*, 2014. 395(6): p. 577-91.
157. Nerurkar, L., et al., *The Systemic Response to Topical Aldara Treatment is Mediated Through Direct TLR7 Stimulation as Imiquimod Enters the Circulation*. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 16570.
158. Harrison, C.J., R.L. Miller, und D.I. Bernstein, *Posttherapy suppression of genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and enhancement of HSV-specific T-cell memory by imiquimod in guinea pigs*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. 38(9): p. 2059-64.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Peter Arne Gerber bedanken, der mir durch die Aufnahme in sein Forschungsteam diese Promotion ermöglicht hat und mir der beste Doktorvater war, den ich mir vorstellen kann. Ich bedanke mich für die durchgehende und uneingeschränkte Unterstützung, die herausragende Betreuung sowie sein stets offenes Ohr für meine Fragen und Probleme.

Ich bedanke mich bei Dr. Stephan Braun für seine sehr gute Betreuung, konstruktive Kritik und Hilfestellung bei der Erstellung dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Holger Schrupf für die Einarbeitung in die Experimente, die freundliche Betreuung, wertvolle Ratschläge und tägliche Problemlösungen in den verschiedensten Bereichen. Ich bedanke mich für die Hilfe bei der Auswertung der Daten sowie seine unendliche Geduld.

Besonderer Dank an Ulrich Wehry, der mich durch diese Zeit begleitet hat.

Großer Dank gilt auch dem gesamten Labor-Team der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Ich bedanke mich für die Einarbeitung in die Methodik, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Moritz für seine geduldige Unterstützung und den Glauben an meine Person.

Größter Dank gilt meiner Schwester Ania, die immer hinter mir steht und mir die schönste Form der Freundschaft schenkt. Danke für alles.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, die mir im Leben alles ermöglicht haben, was ich mir wünschen könnte. Ich bin dankbar für bedingungslose Unterstützung, das liebevollste Zuhause, das man haben kann sowie das unendliche Vertrauen in mich.

