

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkmechanismen von Diclofenac in Zelllinien des kutanen  
Plattenepithelkarzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Paul Milan Rodust

aus Berlin

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. E. Stockfleth  
                             2. Prof. Dr. med. Th. Dirschka  
                             3. Priv.-Doz. Dr. rer nat. A. Kaufmann

Datum der Promotion: 22. März 2013

*Meinen Eltern & Großeltern  
in tiefer Dankbarkeit gewidmet*



|   |    |
|---|----|
| 1. EINLEITUNG .....   | 1  |
| 1.1. AKTINISCHE KERATOSE, KUTANES PLATTENPITHELKARZINOM .....   | 1  |
| 1.1.1. <i>Klinische Einteilung &amp; Epidemiologie</i> .....  | 1  |
| 1.1.2. <i>Photokarzinogenese</i> .....  | 1  |
| 1.1.3. <i>Prognose</i> .....  | 3  |
| 1.1.4. <i>Therapie</i> .....  | 4  |
| 1.3. APOPTOSEREGULATION .....   | 12 |
| 1.3.1. <i>Bedeutung der Apoptose</i> .....  | 12 |
| 1.3.2. <i>Proapoptotische Signalwege</i> .....  | 13 |
| 1.4. ZIELSETZUNG .....  | 18 |
| 2. MATERIAL & METHODEN.....   | 19 |
| 2.1. ZELLKULTUR & STIMULATIONEN.....  | 19 |
| 2.1.1. <i>Zelllinien</i> .....  | 19 |
| 2.1.2. <i>Keratinocytenisolierung aus Vorhaut</i> .....   | 19 |
| 2.1.3. <i>Nährmedien</i> .....  | 20 |
| 2.1.4. <i>Behandlung und Aussaat</i> .....  | 20 |
| 2.1.5 <i>Mykoplasmentest</i> .....  | 22 |
| 2.2. METHODEN .....   | 22 |
| 2.2.1. <i>Western-Blot-Analysen</i> .....   | 22 |
| 2.2.2. <i>Apoptose-Nachweis durch Cell Death Detection ELISA (CDDE)</i> .....                             | 27 |
| 2.2.3. <i>Herstellung von Zellfraktionierungs-Lysaten</i> .....   | 28 |
| 2.2.4. <i>Kompetitiver Enzym-Immunoassay (EIA) zur quantitativen Bestimmung von PGE<sub>2</sub></i> ..... | 28 |
| 2.2.5. <i>Durchflusszytometrie</i> .....  | 30 |
| 2.2.6. <i>Immunfluoreszenzmikroskopie zum Nachweis von Clustering</i> .....                               | 30 |
| 2.2.7. <i>Saure Sphingomyelinase Aktivitätsbestimmung</i> .....   | 31 |

|   |    |
|---|----|
| 3. ERGEBNISSE.....  | 33 |
| 3.1. APOPTOSEINDUKTION IN KUTANEN PLATTENEPIHELKARZINOMZELLINIEN .....  | 33 |
| 3.1.1. Apoptose in drei von vier SCC-Zelllinien nach Diclofenac-Behandlung .....                                      | 33 |
| 3.1.2. Morphologische Veränderungen .....   | 34 |
| 3.1.3. Konzentrationsabhängigkeit von Diclofenac.....   | 34 |
| 3.2. BEDEUTUNG VON PROSTAGLANDIN E2 .....   | 35 |
| 3.2.1. Wirkung von Diclofenac und Diclofenac/HA auf die PGE <sub>2</sub> -Spiegel.....                                | 35 |
| 3.2.2. PGE <sub>2</sub> -Spiegel in den Plattenepithelkarzinomzelllinien vor und nach Behandlung mit Diclofenac ..... | 36 |
| 3.2.3. PGE <sub>2</sub> -Konzentrationen in Abhängigkeit von Diclofenac .....   | 38 |
| 3.2.4. Blockierung Diclofenac-induzierter Apoptose durch PGE <sub>2</sub> -Substitution.....                          | 38 |
| 3.3. DER EXTRINSISCHE SIGNALWEG - TODESREZEPTOREN .....   | 39 |
| 3.3.1. Vermehrte Caspasen-Aktivierung nach kombinierter Behandlung.....   | 39 |
| 3.3.2. Kostimulationsversuche mit Keratinozyten .....   | 41 |
| 3.3.3. Der Einfluss von Diclofenac und TRAIL auf die Proliferationsrate.....  | 43 |
| 3.4. URSACHEN DES SYNERGISMUS VON TODESLIGANDEN UND DICLOFENAC .....  | 45 |
| 3.4.1. Todesrezeptorexpression nach Diclofenac-Behandlung.....  | 45 |
| 3.4.2. Saure Sphingomyelinase-Aktivität.....  | 45 |
| 3.4.3. c-FLIP Expression.....   | 48 |
| 3.5. DER INTRINSISCHE SIGNALWEG - BCL-2-PROTEINE .....  | 48 |
| 3.5.1. Pro- und antiapoptische Veränderungen auf der Ebene der Bcl-2-Proteine .....                                   | 48 |
| 3.5.2. Aktivierung des mitochondrialen Signalweges .....  | 52 |
| 3.6. GEGENREGULATIONEN .....  | 53 |
| 3.6.1. Hochregulation der MAPK-Signalkaskade und der COX-2-Expression.....  | 53 |
| 3.6.2. Verstärkung der antiproliferativen Wirkung von Diclofenac durch Kombination mit einem MEK-Inhibitor.....       | 53 |

|  |     |
|--|-----|
| 4. DISKUSSION .....  | 56  |
| 4.1. DER STELLENWERT DER APOPTOSE .....  | 56  |
| 4.1.1. Apoptose in kutanem Plattenepithelkarzinom.....                               | 56  |
| 4.1.2. Konzentrationsreihe von Diclofenac .....                                      | 58  |
| 4.1.3. Limitationen in der Messung der Apoptose im in vitro Modell .....             | 59  |
| 4.2. DAS TUMORIGENE POTENTIAL VON PGE <sub>2</sub> UND COX-2 IN SCC.....             | 60  |
| 4.3. GEGENREGULATIONEN: ERK & COX-2.....   | 62  |
| 4.4. DIE BEDEUTUNG DES EXTRINSISCHEN SIGNALWEGES .....                               | 63  |
| 4.4.1. Clustering .....  | 64  |
| 4.4.2. Todesrezeptoren .....   | 66  |
| 4.4.3. cFLIP.....  | 67  |
| 4.5. DIE BEDEUTUNG DES INTRINSISCHEN SIGNALWEGES.....                                | 68  |
| 4.5.1. Die Regulation antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie.....              | 69  |
| 4.5.2. Die Regulation proapoptotischer Multi-Domänen-Proteine der Bcl-2-Familie..... | 71  |
| 4.5.3. Die Regulation proapoptotischer BH3-only Proteine der Bcl-2-Familie.....      | 73  |
| 4.5.4. Gegenregulationen auf der Ebene der Bcl-2-Proteine .....                      | 74  |
| 4.6. AUSBLICK .....  | 75  |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG.....  | 77  |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....  | 81  |
| LITERATURVERZEICHNIS .....   | 85  |
| LEBENS LAUF .....  | 100 |
| PUBLIKATIONEN & TAGUNGSBEITRÄGE.....   | 101 |
| DANKSAGUNG.....  | 103 |
| ERKLÄRUNG .....  | 104 |

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. AKTINISCHE KERATOSE, KUTANES PLATTENPITHELKARZINOM

### 1.1.1. KLINISCHE EINTEILUNG & EPIDEMIOLOGIE

Die aktinische Keratose (AK) stellt bei einer Punktprävalenz von 15% in Mitteleuropa und 45% in Australien in Patienten  $\geq 40$  Jahren das häufigste Carcinoma in situ des Menschen dar (Stockfleth and Kerl, 2006). Circa 10% (6-16%) der immunkompetenten und 40% der immunsupprimierten Betroffenen zeigen eine Progression der AK in ein invasives kutanes Plattenepithelkarzinom (SCC), sodass eine frühzeitige Behandlung der AK erforderlich ist. Die Behandlung der AK bedingt in den USA jährlich etwa 5,2 Millionen Arztbesuche mit geschätzten Kosten von 920 Millionen Dollar (Schwartz *et al.*, 2008).

Das SCC bildet mit dem Basalzellkarzinom (BCC) und weiteren seltenen primär kutanen Neoplasien wie die kutanen Lymphome, Adnextumoren und das Merkelzell-Karzinom die Gruppe der Non-melanoma skin cancer (NMSC). Die NMSC bedingen 96% der Hauttumore, dem gegenüber kommt dem Melanom unter den Hauttumoren ein Anteil von 4% zu. NMSC weisen einen jährlichen Inzidenzanstieg von 3-8% auf und bedingen mittlerweile 40% aller Tumore in der kaukasischen Bevölkerung (Trakatelli *et al.*, 2007). Bei gleichbleibender Entwicklung könnte sich die Inzidenz der NMSC bis 2030 verdoppeln. Das klinische Bild der aktinischen Keratose (AK) kann recht unterschiedlich ausfallen; dabei werden sechs verschiedene Typen unterschieden: keratotischer Typ (i), atrophischer Typ (ii), Cornu cutaneum-Typ (iii), verruköser Typ (iv), Lichen planus-Typ (v) und die pigmentierte aktinische Keratose (vi) (Stockfleth and Kerl, 2006).

### 1.1.2. PHOTOKARZINOGENESE

Eine hohe kumulative UV-Exposition stellt den ätiologisch bedeutendsten Faktor in der Hauttumorigenese dar. Dementsprechend treten 84% der BCCs und 74% der SCCs an chronisch sonnenexponierten Arealen des Körpers auf. Es wird geschätzt, dass ca. 90% der jährlich 1 Millionen Neumanifestationen von NMSC in den USA auf erhöhte UV-Exposition zurückzuführen sind (Buckman *et al.*, 1998). Der Zusammenhang zwischen UV-Exposition und der Entstehung von Basalzellkarzinomen scheint vor dem Hintergrund, dass das BCC häufiger

retroaurikulär und an der Nasenbasis als den stärker UV-exponierten Arealen der Ohrhelix und dem Nasenrücken auftritt, bis dato umstritten (Heckmann *et al.*, 2002).

UVB (280-320 nm) besitzt aufgrund des Absorptionsmaximums der aromatischen Ringstrukturen der DNA-Basen (235–280 nm) eine 5.000 bis 10.000-fach höhere direkte Mutagenität als UVA (320-400 nm). UVA besitzt jedoch einen indirekt mutagenen Effekt, indem die Photonen von zellulären Strukturen (Chromophoren) absorbiert werden. In der Folge entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) mit mutagenem Potential in Form des oxidativen Zwischenproduktes 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) (Kulms *et al.*, 2002). Durch UVB entstehen typischerweise Pyrimidin-Dimere, die zu C→T-Transitionen führen. Im Gegensatz hierzu kommt es durch UVA über ROS-Bildung insbesondere zu T→G-Transversionen, sodass jeweils unterschiedliche kennzeichnende Mutationen (signature mutations) entstehen.

Viele verschiedene Onko- und Tumorsuppressor-Gene können zur SCC-Karzinogenese beitragen. Punktmutationen in den Ras-Onkogenen (H-Ras, K-Ras und N-Ras) werden in etwa der Hälfte der SCCs gefunden (Pierceall *et al.*, 1991), lösen jedoch in transgenen Mäusen oder nach Transfektion in der Zellkultur noch keine tumorigene Transformation der Zellen aus. Bei Zellen mit einer bereits vorhandenen homozygoten Mutation der Tumorsuppressor-Gene (entweder p53 oder p16INK4a) führt die zusätzliche Einbringung einer H-Ras-Mutation jedoch zur Tumorentstehung (de Gruijl, 2000). In der Tumorigenese des SCC können neben p53- und Ras-Mutationen eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der NF-κB- und AP-1-Familien (Cooper and Bowden, 2007), die Herabregulation der intrazellulären Transkriptionsfaktoren PPARβ/δ (peroxisome proliferator-activated receptor) (Kim *et al.*, 2005), Hochregulation von Cyclinen und Herabregulation von Zell-Zyklus-Inhibitoren (Rodriguez-Puebla *et al.*, 1998; Robles *et al.*, 1998) von Bedeutung sein. Unter den multiplen Zell-Zyklus-Inhibitoren in der Hauttumorigenese ist die Überexpression von Cyclin D1, dessen Ursache häufig eine aktivierender Ras-Mutation ist, gut beschrieben. In transgenen Mäusen resultiert eine Cyclin D1-Defizienz entsprechend in einer Abnahme der epithelialen Hauttumoren um 80%. Weitere molekulare Veränderungen wie die Dysregulation von epidermal growth factor receptor (EGFR), Cyclooxygenase-2 (COX-2), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), B-cell leukaemia/lymphoma protein 2 (Bcl-2) Proteine und Todesliganden können zur Hauttumorigenese beitragen (Rodust *et al.*, 2009).

Dem Tumorsuppressor-Gen p53 kommt eine zentrale Bedeutung in der Tumorentstehung des kutanen SCC und der AK zu. Mutationen im p53-Gen werden in verschiedenen Tumoren mit einer hohen Prävalenz gefunden und das Auftreten von p53-Mutationen ist typisch für das kutane SCC (>90%) sowie für die AK (75–80%) (Ortonne, 2002; Nindl *et al.*, 2007). Apoptose-Induktoren und Zellzyklus-Inhibitoren werden durch p53 aktiviert, sodass seine Mutation entscheidend zu unkontrollierter Zellproliferation und Apoptose-Defizienz beiträgt (Hofseth *et al.*, 2004). In p53-Knockout-Mäusen wurde nach UV-Bestrahlung eine Abnahme von apoptotischen Keratinozyten und ein früheres Auftreten von Hauttumoren beobachtet im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Ziegler *et al.*, 1994). Jedoch konnte der Typ von p53-Mutationen nicht mit der Aggressivität von kutanen Plattenepithelkarzinomen korreliert werden, sodass die Notwendigkeit weiterer molekularer Ereignisse in der Tumorprogression vermutet werden (El-Deiry, 2007). In Mausmodellen wurde ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von p53-Mutationen und UV-Exposition belegt. So konnte die Applikation von Sonnencreme im Mausmodell das Auftreten der p53-Mutationen nahezu vollständig verhindern. Die p53-Mutation stellt einen frühen Schritt in der Hauttumorigenese dar, sodass das Auftragen von Sonnencreme als Präventionsmaßnahme von zentraler Bedeutung erscheint (Ulrich *et al.*, 2009).

### 1.1.3. PROGNOSE

Als 'Carcinoma in situ' der Epidermis stellt die AK eine Präkanzerose dar, welche in Abhängigkeit von der Immunitätslage des Patienten in etwa 10% der Fälle in ein invasives Plattenepithelkarzinom sekundär entarten kann (Stockfleth and Kerl, 2006). Somit stellt das Vorhandensein von aktinischen Keratosen den wichtigsten Risikofaktor für das Auftreten des kutanen Plattenepithelkarzinoms dar (Mittelbronn *et al.*, 1998). Tumoren mit einer Tumordicke von < 2 mm metastasieren praktisch nie („No-risk“-Tumoren), bei einer Dicke von 2 bis 6 mm kommt es in ca. 6% zur Progression („Low-risk“-Tumoren) und eine Tumordicke von > 6 mm ist mit einer Metastasierungsrate von 20% assoziiert („High-risk“-Tumoren). Wenn Metastasen auftreten, sind in etwa 85% regionale Lymphknoten befallen und in 15% liegt eine Fernmetastasierung mit Befall von Lunge, Leber, Gehirn, Haut oder Knochen vor (Alam and Ratner, 2001).

In der 7. Herausgabe der AJCC-Klassifikation (2011) ist das kutane Plattenepithelkarzinom erstmalig entsprechend den Ergebnissen der Evidenz-basierten Medizin neu klassifiziert worden. Die Einbeziehung von Hoch-Risiko Faktoren (primäre Lokalisation an Ohr und Lippe, Tumordicke > 2 mm, Clark-Level  $\geq$  IV oder perineurale Invasion) als zusätzliche Variablen, die in das T-Stadium miteingehen, sowie die Stratifikation des Lymphknoten-Status stellen

Änderungen gegenüber der Einteilung der sechsten Edition der AJCC dar. Die fortgeschrittenen T-Stadien (T3, T4) sind für Tumore mit Invasion spezifischer anatomischer Lokalisationen reserviert (Tab. 1.1.). Alle anderen Non-melanoma-Skin Cancer, außer das Merkelzell-Karzinom, werden nun entsprechend der Klassifikation des SCC eingeteilt. Das kutane SCC des Augelides wird den ophthalmologischen Karzinomen des Augelides zugeordnet. Entsprechend der TNM-Klassifikation ist eine Einteilung in Stadien möglich (Tab. 1.2.). Zusammenfassend sind T1- und T2-Tumore dem Stadium I bzw. II zugeordnet. Stadium III beinhaltet alle T3- oder N1-Tumore, die nicht die Kriterien für Stadium IV erfüllen und Stadium IV umfasst alle T4-, N2-,N3- oder M1-Tumore.

Die Prognose ist abhängig von der Tumordicke und der Lokalisation. Sie ist bei adäquatem operativem Vorgehen günstig, sodass das SCC eine Heilungsrate von über 90% aufweist bei einer Krankheits-spezifischen Moratlitätsrate von 1% pro Jahr (Weinstock, 1994). Eine frühe Metastasierung der Penis- und Vulvakarzinome sowie der Ohrmuschelkarzinome ist möglich. Das Stadium der Metastasierung ist mit einer schlechten Prognose behaftet. Die 10-Jahresüberlebensrate liegt bei regionaler Lymphknotenmetastasierung unter 20 Prozent und bei Vorliegen von Fernmetastasen unter 10 Prozent (Alam and Ratner, 2001). Eine Verschlechterung der Prognose wird ferner beobachtet bei einem makroskopischen Durchmesser von >2cm, Immunsuppression und Ulzeration (Rowe *et al.*, 1992). In immunsuppremierten Patienten nach Transplantation ist das Risiko ein SCC zu entwickeln 65–250-fach und für die Entstehung eines BCC zehn- bis 16-fach erhöht (Stockfleth *et al.*, 2002b).

#### *1.1.4. THERAPIE*

##### *(i) Feldkanzerisierung*

Angesichts der hohen Prävalenz kutaner Tumore wird die Suche nach topischen Therapieformen als schonendere Alternative zu operativen Maßnahmen, wie Kürettage, Kryochirurgie oder Laserbehandlung, immer wichtiger. Bei Vorhandensein multipler Läsionen sollten neben manifesten Läsionen auch die benachbarten, klinisch unauffälligen Areale mitbehandelt werden.

**Tabelle 1.1:** TNM-Klassifikation des kutanen Plattenepithelkarzinoms\* (nach AJCC 2011).

| TNM | Tumormerkmale   |
|-----|---|
| TX  | Primärtumor kann nicht beurteilt werden   |
| T0  | Kein Anhalt für einen Primärtumor   |
| Tis | Carcinoma in situ   |
| T1  | Ausdehnung < 2 cm mit <2 Hochrisiko-Parameter**   |
| T2  | Ausdehnung > 2 cm; oder: Ausdehnung jeglicher Dimension mit $\geq 2$ Hochrisiko-Parametern**    |
| T3  | Tumor mit Invasion der Maxilla, Mandibula, Orbita oder Temporalknochen.                         |
| T4  | Tumor mit Invasion des Skeletts oder perineurale Invasion in die Schädelbasis                   |
| NX  | Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden   |
| N0  | Kein Befall regionärer Lymphknoten  |
| N1  | Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten mit weniger als 3 cm Durchmesser                   |
| N2a | Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten mit mehr als 3 cm und weniger als 6 cm Durchmesser |
| N2b | Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten mit weniger als 6 cm im größten Durchmesser   |
| N2c | Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten mit weniger als 6 cm im Durchmesser  |
| N3  | Metastase in Lymphknoten mit mehr als 6 cm im Durchmesser                                       |
| MX  | Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden                                    |
| M0  | Keine Fernmetastasen  |
| M1  | Fernmetastasierung  |

\* **Ausgeschlossen sind die kutanen Plattenepithelkarzinome der Augenlider**

\*\* **Hochrisiko-Parameter des Primärtumors (T) Staging:**

**Tiefe/Invasion** > 2 mm Tumordicke

**Clark-Level  $\geq$  IV**

**Perineurale Invasion**

Differenzierungsgrad ab Grad 3 nach Broders

Anatomische Lokalisation Ohr, Lippe

**Tabelle 1.2:** Stadieneinteilung des kutanen Plattenepithelkarzinoms (nach AJCC 2011).

|             | Primärtumor | Lymphknoten | Fernmetastasen |
|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Stadium 0   | Tis         | N0          | M0             |
| Stadium I   | T1          | N0          | M0             |
| Stadium II  | T2          | N0          | M0             |
| Stadium III | T3          | N0          | M0             |
|             | T1-T3       | N1          | M0             |
| Stadium IV  | T1-T3       | N2          | M0             |
|             | Jedes T     | N3          | M0             |
|             | T4          | Jedes N     | M0             |
|             | Jedes T     | Jedes N     | M1             |

Es wird davon ausgegangen, dass in den benachbarten Arealen zur klinisch veränderten Haut subklinische durch UV-Licht induzierte Präkanzerosen vorliegen. Die Existenz von veränderten Keratinozyten mit unterschiedlichen Graduierungen in einem Areal wird hierbei auch als Feldkanzerisierung bezeichnet. In einer Studie, in der mehr als 1000 Plattenepithelkarzinome aus sonnenexponierter Haut histologisch untersucht worden, zeigten sich in der Peripherie in fast 100% der Fälle histopathologische Veränderungen im Sinne von aktinischen Keratosen (Altmeyer *et al.*, 2011.).

Das tatsächliche Ausmaß der dysplastischen Zellen innerhalb der Field Cancerisation kann klinisch nicht komplett abgeschätzt werden. Die Detektion des gesamten Areals einschließlich der subklinischen Läsionen kann mittels zweier in vivo Methoden der „Fluoreszenz-Detektion“ (FD) sowie der konfokalen Reflexionsmikroskopie vorgenommen werden. In der FD werden dysplastische Zellen sichtbar, indem diese 5-Aminolävulinsäure (ALA) nach Applikation selektiv aufnehmen und zu Protoporphyrin IX umsetzen, welches unter Bestrahlung mit einer photodynamischen Lichtquelle fluoresziert (Szeimies and Landthaler, 2002). Die konfokale Reflexionsmikroskopie ist eine in vivo Methode zur Visualisierung zellulärer und subzellulärer Strukturen mit nahezu histologischer Auflösung. Dysplastische Zellen weisen bei dieser Methode ein Honigwabemuster im Stratum granulosum sowie diskrete zelluläre und nukleäre Atypien im Stratum spinosum mit einer fokalen Unterbrechung der epidermalen Architektur auf (Ulrich *et al.*, 2010b).

#### *(ii) Topische Therapien*

Die verschiedenen Behandlungen der aktinischen Keratose können in zwei Gruppen, die „lesion-directed“ sowie die „field-directed“ Behandlung, unterteilt werden. Bei der „lesion-directed“ Therapie, zu welcher die chirurgische Exzision, die Kurretage und die Kryotherapie zählen, kann aus den benachbarten nicht-mitbehandelten Arealen aufgrund der punktuellen Therapie einzelner Läsionen leicht ein Rezidiv entstehen. Zur Erzielung einer adäquaten Therapie, im Besonderen bei Vorliegen einer flächenhaften Ausdehnung mehrerer AKs, sind „field-directed“ Behandlungen durch Einsatz von Topica wie 5-Fluorouracil, Imiquimod und Diclofenac in Hyaluronsäure von besonderer klinischer Relevanz (Stockfleth *et al.*, 2008).

Imiquimod bewirkt als Immunmodulator durch Aktivierung des Immunsystems der Haut eine Apoptoseinduktion in Krebszellen. Damit kämpft das Immunsystem entsprechend dem Konzept der Immunosurveillance selbst gegen den Tumor an. Bei der Aktivierung des Immunsystems wird eine Entzündungsreaktion provoziert, indem Imiquimod an die Toll-like Rezeptoren 7 und

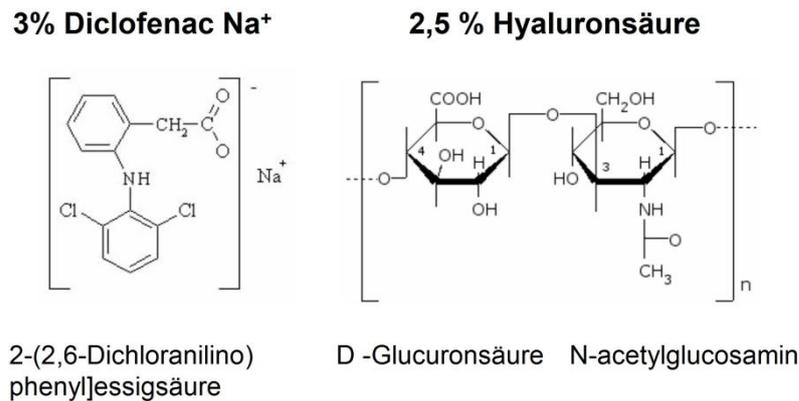
8 (TLR) bindet. Die Remissionsrate liegt bei dreimal wöchentlicher Anwendung über einen Zeitraum von 4 bis 12 Wochen bei 45,1-84%. Bei Auftreten einer schweren Erythembildung, die in 17,7% auftrat, ist die Ansprechrate erhöht (Stockfleth *et al.*, 2002a; Lebowohl *et al.*, 2004).

Weiterhin ist 5-FU in fünf-prozentiger Salbengrundlage für die Therapie der AK bei einer max. Fläche von bis 500 cm<sup>2</sup> (23 x 23 cm) zugelassen. Unter einer 1-2 x täglichen Anwendung über 2-4 Wochen treten häufig massive Entzündungsreaktionen auf. Es wurde jedoch auch hier bei Patienten mit einer stärkeren Entzündungsreaktion eine höhere Abheilungsrate beobachtet, sodass die Entzündungsreaktion wohlmöglich erwünscht ist im Sinne eines prognostisch hohen therapeutischen Effektes (Jury *et al.*, 2005). Hiervon zu unterscheiden sind unerwünschte Entzündungsreaktionen im Rahmen einer Kontaktdermatitis auf den in der Efudix-Creme enthaltenden Inhaltsstoff Propylen-Glykol (Farrar *et al.*, 2003). 5-FU zerstört die Tumorzellen über eine Interferenz mit DNA und RNA sowie durch Blockierung der Methylierung. Die Methylierung von dUMP (Desoxyuridin-Monophosphat) zu dTMP (Thymidilat) stellt den limitierenden Schritt in der DNA-Synthese dar und kann durch 5-FU blockiert werden (Ulrich *et al.*, 2010a).

In einer vergleichenden Studie verschiedener topischer Therapie-Regime zur Behandlung der AK zeigte sich unter Imiquimod (5%)-Creme eine histologische Heilungsrate von 73%, nach Anwendung von 5-Fluorouracil (5%)-Salbe lag diese bei 67% und nach Kryochirurgie betrug die histologische Abheilung 32% (Krawtchenko *et al.*, 2007). Niedrig dosiertes 5-FU (0,5%) in Kombination mit 10% Salizylsäure (Actikerall<sup>®</sup>) ist als lackbildende Lösung für die zielgerichtete Therapie der aktinischen Keratose für eine maximale Fläche von 5 cm<sup>2</sup> seit Sommer 2011 zugelassen. Unter Low-Dose-5-FU/Salizylsäure konnte die Zahl der Zielläsionen pro Patient um 76% vermindert werden im Vergleich zu 57% nach Solaraze-Behandlung und 36% unter Placebo (Stockfleth *et al.*, 2011).

### (iii) Diclofenac

Bei Vorliegen multipler AKs/Field-Cancerisation ist das Topikum Diclofenac 3% in Hyaluronsäure 2,5% (Abb.1.1) als First-Line-Therapeutikum vorgeschlagen worden (Stockfleth and Kerl, 2006), (Iraji *et al.*, 2008). Diclofenac gehört als Derivat der Phenyllessigsäure zur Gruppe der NSAIDs mit einem Selektivitätsverhältnis zugunsten von COX-2 gegenüber COX-1 im Verhältnis von 3:1 (Riendeau *et al.*, 2001). Die von Diclofenac unbeeinflusste COX-3 wird lediglich in den Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert.



**Abb.1.1: Strukturformeln der Bestandteile von Solaraze-Gel.** Das für die Indikation der AK eingesetzte Solaraze™ besitzt 3% Diclofenac sowie als weiteren Hauptbestandteil 2,5% Hyaluronsäure (D/HA).

Es konnte in mehreren klinischen Studien eine gute Verträglichkeit von D/HA gezeigt werden: In einer randomisierten Studie wiesen nur 7% der mit Solaraze behandelten Patienten Nebenwirkungen wie Pruritus, Parästhesien, Ödeme, Kontaktdermatitis gegenüber vergleichbaren 6% in der Placebogruppe auf (Rivers *et al.*, 2002). Die Ansprechrate gegenüber Solaraze lag bei 80% bei einer Abheilungsrate von 50% (Stockfleth and Kerl, 2006).

Neben der Abheilung ist eine histopathologische Regression der AK unter Behandlung mit D/HA nachgewiesen worden. Die AK wird histopathologisch in 3 Grade eingeteilt: bei den AKs Grad I finden sich dysplastische Zellen basal und suprabasal, in AK II reichen diese bis in das mittlere Drittel der Epidermis vor und in AK III wird die gesamte Epidermis erfasst (SCC in situ) (Rowert-Huber *et al.*, 2007). Während vor der 3-monatigen Therapie mit D/HA in den Biopsaten eine hohe Prävalenz an AK III vorlag (42/65), sank der Anteil nach Behandlung deutlich (3/46). Weiterhin konnte eine Reduktion der Mitoserate, der p53-Expression sowie des Proliferationsmarkers Anti-MiB-1 nachgewiesen werden (Dirschka *et al.*, 2010). In einer weiteren Arbeit wurde in AK-Herde nach D/HA-Behandlung immunhistochemisch eine Abnahme der Inflammationsmarker COX-2, CD3 und CD8 und eine Reduktion des Angiogenese-Markers CD 31 nachgewiesen (Maltusch *et al.*, 2011). Der Therapieerfolg einer Behandlung mit D/HA über einen 3 bzw. 6 monatigen Zeitraum scheint vergleichbar zu sein. Die klinisch komplette Abheilungsrate lag bei 40% v. 45% bei einer histologisch nachweisbaren Abheilung von 30 v. 40% nach 3- bzw. 6-monatiger Behandlung. Eine Verlängerung des Behandlungszeitraumes hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die Ansprechrate (Pflugfelder *et al.*, 2012).

*(iv) NSAIDs in der Prävention und Therapie der Aktinischen Keratose*

Die Hypothese, dass Prostaglandine zur Karzinogenese beitragen können, wurde zunächst durch epidemiologische Ergebnisse gestützt. So wurde bei Patienten mit regelmäßiger bzw. entsprechend dem Studienprotokoll mindestens zweimaliger wöchentlicher Einnahme eines NSAIDs über einen Zeitraum von fünf Jahren eine fünffach niedrigere Inzidenz an kutanen SCCs beobachtet (Butler *et al.*, 2005; Grau *et al.*, 2006). Für das kolorektale Karzinom konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt von NSAIDs auf die Krebsentstehung nur bei regelmäßiger Einnahme bestehen bleibt und bei unregelmäßiger Einnahme verloren geht. Der antitumorigene Effekt war vollständig reversibel und das Auftreten von Kolon-Karzinomen stieg kurz nach Sistieren der NSAID-Einnahme wieder an (Elwood *et al.*, 2009). Im Maus-Modell konnte eine Reduktion der UV-induzierten Hauttumore um 2/3 unter regelmäßiger Gabe von COX-Inhibitoren gezeigt werden (Pentland *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 1999).

*(v) Entwicklung neuer Chemotherapien – Cetuximab, Ausblick*

Im Rahmen einer Phase-II-Studie wurden 36 Patienten, die ein nicht resezierbares oder metastasiertes kutanes Plattenepithelkarzinom aufwiesen, mit Cetuximab als First-line Therapie behandelt. Es konnte eine Verlängerung des Gesamtüberlebens (...) und des Progressionsfreien-Überlebens (4,5 v. 1,7 Monate) v.a. in Patienten mit dem Auftreten eines akneiformen Hautexanthems (acne-like skin rash) beobachtet werden. Es wiesen 78% der Patienten ein Akneartiges Hautexanthem auf, welches nach 1-2 Monaten selbstlimiert ist (Maubec *et al.*, 2011). Cetuximab wirkt, indem es an die extrazelluläre Domäne von EGFR bindet und die Dimerisierung des Rezeptors verhindert. Voraussetzung für den Einsatz von Cetuximab ist eine EGFR-Überexpression. Die Angaben zur Prävalenz einer EGFR-Überexpression in metastasierten cSCC variieren zwischen 45-100%. (13/13 immunhistochemisch, 9/21 Western-Blot). In einer vergleichenden Studie konnte die pathophysiologische Bedeutung der EGFR-Überexpression unterstrichen werden. Eine EGFR-Überexpression war im Primarius vom metastasierten cSCC in 79% v. 36% in cSCC ohne Metastasierung nachweisbar.

Als weiterer pathogenetisch denkbarer Ansatz im Stadium der Fernmetastasierung erscheinen genterapeutische Strategien mit adenoviralen Vektoren zur Reintegration des p53-Wildtyp-Allels vielversprechend. Ein rekombinanter humaner p53-Adenovirus (Gendicine™) wurde in China 2003 für die Behandlung des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms zugelassen und stellt somit weltweit das erste zugelassene Genterapie-Produkt für die Behandlung von Krebs dar (Peng *et al.*, 2008).

## 1.2. COX-2 & NSAIDs

### *PGE<sub>2</sub>-medierte Signalwege*

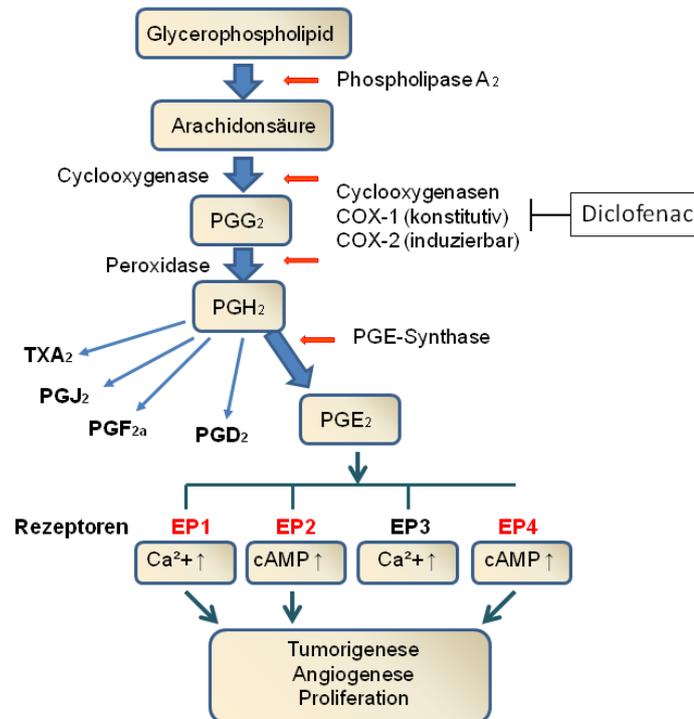
Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) wird in der Haut bei erhöhter COX-2-Aktivität am meisten produziert und stellt somit das Haupt-Prostaglandin dar (Tripp *et al.*, 2003). Zu den unterschiedlichen biologischen Aktivitäten von PGE<sub>2</sub> gehören die Induktion einer verstärkten Zellproliferation und Apoptosesuppression (Fecker *et al.*, 2007). PGE<sub>2</sub> entfaltet seine Wirkung über die Bindung an insgesamt vier G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren (EP1-EP4). EP2 und EP4 erhöhen über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) cAMP-Spiegel. EP1 erhöht hingegen den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel via Proteinkinase B/Akt, während EP3 den intrazellulären cAMP-Spiegel erniedrigt (Watabe *et al.*, 1993;Kiryama *et al.*, 1997;Fujino *et al.*, 2002) (Abb.1.2). Für die Rezeptoren EP1, EP2 und EP4 wurde eine verstärkte Expression in der Maushaut nach UV-Bestrahlung berichtet, und es konnte eine positive Korrelation ihrer Expressionsstärke mit der Hauttumorigenese hergestellt werden (Chun *et al.*, 2007;Tober *et al.*, 2006).

### *UV-induzierte COX-2-Expression & Tumorigenese*

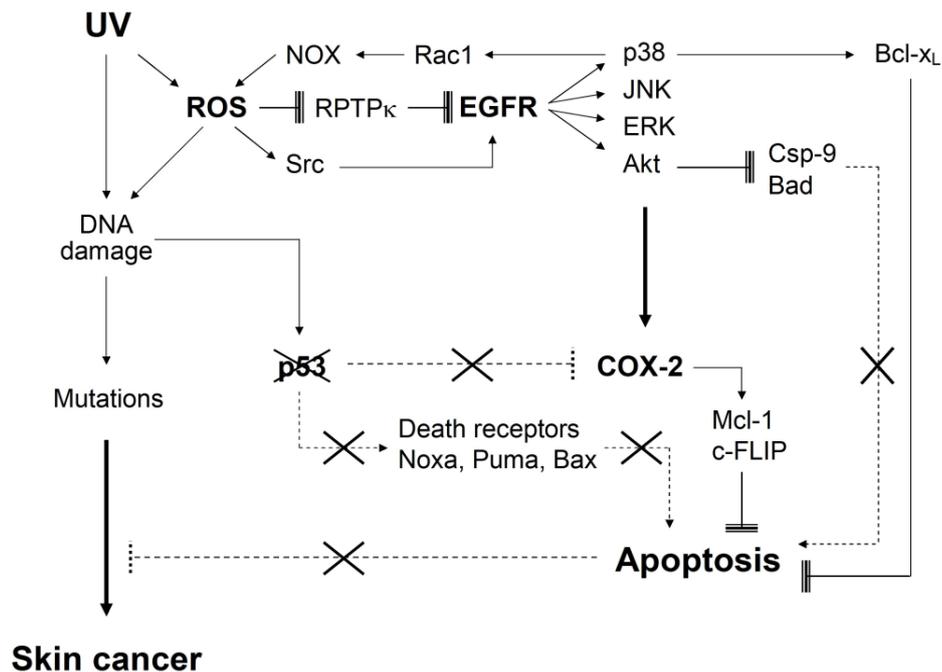
Als Erklärung für die erhöhten COX-2-Spiegel in NMSC wird UV-Bestrahlung diskutiert, wobei für den Mechanismus der UV-induzierten COX-2-Expression bislang verschiedene Signalkaskaden beschrieben worden. Zum einen kann die durch UV-Strahlen induzierte ROS-Bildung über die EGF-Rezeptor-Aktivierung eine COX-2-Induktion bedingen. Im Detail überführt die RPTPκ (receptor-type protein tyrosine phosphatase κ) den EGF-Rezeptor unter physiologischen Bedingungen in den dephosphorylierten und somit inaktiven Zustand. Im Rahmen einer UV-induzierten oxidativen Inhibition von RPTPκ kann EGFR nicht mehr deaktiviert werden und führt zu einer konstitutiven Aktivierung der MAPK-Signalwege MEK/ERK, JNK und p38 sowie dem Phosphoinositol 3-Kinase/Akt-Signalweg. MAPK-Signalwege können über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB und dessen Bindung an den COX-2-Promoter die Induktion der COX-2 bewirken (Abb.1.3) (Xu *et al.*, 2006;Black *et al.*, 2008). Der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Genistein supprimierte erfolgreich die UVB-medierte Induktion von COX-2 (Isoherranen *et al.*, 1999).

Ebenso bedeutsam für die COX-2-Induktion erscheint die Inaktivierung von p53 (Abb.1.3). Das Tumorsuppressorprotein p53 stellt einen effizienten Suppressor der COX-2-Transkription dar, was durch kompetitive Bindung an die TATA-Box des COX-2-Gens erklärt wird. Überexpression des p53-Wildtyps reduzierte die Expression von COX-2 in embryonalen

Mausfibroblasten (Subbaramaiah *et al.*, 1999). Ferner lagen COX-2-Überexpression und p53-Mutationen in histologischen Schnitten von AKs und SCCs in unmittelbarer Proximität zueinander, was die Bedeutung von p53 in der COX-2-Regulation unterstreicht (An *et al.*, 2002).



**Abb.1.2 Prostaglandin-Synthese und COX-abhängige Wirkmechanismen von Diclofenac.** Im initialen Schritt der Prostaglandin-Synthese kommt es durch hydrolytische Spaltung der C2-Esterbindung aus Glycerolphospholipid zur Abspaltung von Arachidonsäure. Die Cyclooxygenase (COX, auch als Prostaglandin H-Synthase oder PGHS bezeichnet) stellt ein bifunktionales, membranständiges Enzym mit Cyclooxygenase- und Peroxidase-Aktivität dar. Die COX-Aktivität wandelt Arachidonsäure in PGG<sub>2</sub> um, die Peroxidase-Komponente reduziert das Endoperoxid, sodass PGH<sub>2</sub> entsteht. Die PGE-Synthase bildet aus PGH<sub>2</sub> schließlich PGE<sub>2</sub>. Die Wirkung des PGE<sub>2</sub> wird über vier G-Protein-gekoppelte Prostaglandin E-Rezeptoren (EP1-4) auf unterschiedliche Weise vermittelt. Für die rot hinterlegten Rezeptoren EP1, EP2 und EP4 wurde eine tumorigene Wirkung auf die Haut berichtet. PGE<sub>2</sub> kann durch das Enzym 15-Prostaglandin-Dehydrogenase (PGDH) zu 15-keto PGE<sub>2</sub> inaktiviert werden.



**Abb.1.3.: Mögliche Signalkaskaden in der UV-induzierten Karzinogenese (Rodust *et al.*, 2009).** COX-2 kann einerseits durch verstärkte EGFR- und MAPK-Aktivität sowie durch Inaktivierung von p53 induziert werden.

### 1.3. APOPTOSEREGULATION

#### 1.3.1. BEDEUTUNG DER APOPTOSE

1972 wurde von Kerr, Wyllie und Currie der Begriff Apoptose zur Beschreibung der bei dem Zelltod zu beobachtenden morphologischen Veränderungen eingeführt (Kerr *et al.*, 1972). Zu den Charakteristika des programmierten Zelltodes auf Zellebene zählen zytoplasmatische Schrumpfung, Membran-Bläschenbildung („membrane blebbing“), nukleäre Fragmentierung, internukleosomale DNA-Fragmentierung in Abschnitte von ca. 200 bp sowie die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran (Elmore, 2007).

Der Grundstein für die Erforschung der Regulationsproteine der Apoptose konnte anhand der genetischen Charakterisierung des Nematoden *C. elegans* durch Horvitz und Sulston gelegt werden. In dem Spezies konnte festgestellt werden, dass exakt 131 der 1090 somatischen Zellen in der Entwicklung des Wurmes unvermeidlich dem programmierten Zelltod anheimfallen (Hengartner and Horvitz, 1994).

### 1.3.2. PROAPOPTOTISCHE SIGNALWEGE

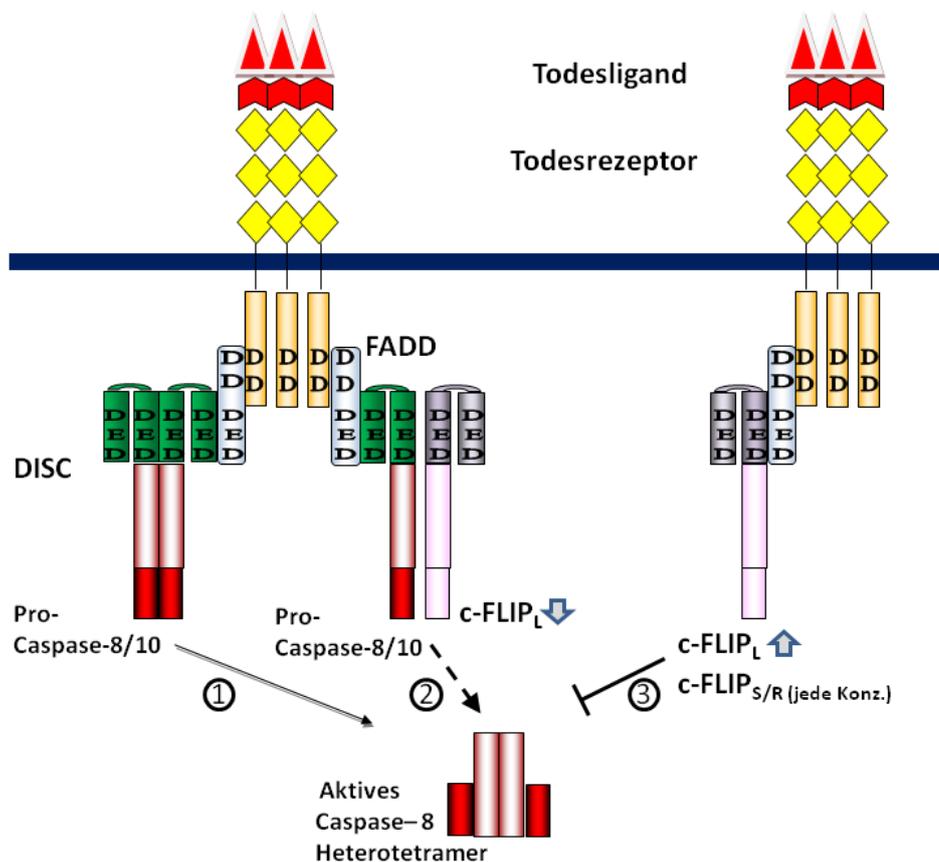
Für die Initiierung der Apoptose stellt die proteolytische Aktivierung der Caspasen einen entscheidenden Schritt dar. Die Caspasen-Aktivierung kann über zwei voneinander zu unterscheidende Apoptose-induzierende Signalwege ablaufen: Der durch Todesrezeptoren vermittelte Apoptose-Signalweg (extrinsischer Signalweg) wird durch die Bindung von Todesliganden (TNF- $\alpha$ , CD95L, TRAIL) an die jeweiligen Todesrezeptoren (TNF-R1, CD95, TRAIL-R1/-R2) induziert, während der mitochondriale/intrinsische Apoptose-Signalweg häufig durch zytotoxischen Stress und p53 aktiviert wird. Apoptose kann auch Caspasen-unabhängig durch Cathepsine, lysosomale Enzyme oder AIF (apoptosis inducing factor) reguliert sein. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können über eine Inhibition von Caspasen und einen Wechsel von Apoptose zu Nekrose einen Caspasen-unabhängigen Zelltod unterhalten (Lockshin and Zakeri, 2004; Franke *et al.*, 2010). Apoptose-Defizienz von Tumorzellen kann durch eine anormale Regulation vielfacher antiapoptotischer und proapoptotischer Faktoren entstehen, die auf eine Aktivierung von „Survival-Pathways“ wie NF- $\kappa$ B, MAPKs und PI3K/Akt zurückgeht.

#### *Extrinsischer Apoptose-Signalweg*

Die Todesliganden-mediierte Induktion der Apoptose, der extrinsische Signalweg, ist essentiell für die Elimination von Tumorzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen (Russell and Ley, 2002; Eberle *et al.*, 2007). Neben dem proapoptotischen Wirkmechanismus können die Todesrezeptoren auch NF- $\kappa$ B und die MAPK-Kaskade aktivieren (Guicciardi and Gores, 2009).

Nach der Bindung von Todesliganden oligomerisieren die Todesrezeptoren und es kommt zur Bildung eines Komplexes aus Todesrezeptor, korrespondierendem Todesliganden, Adapterprotein (TRADD und FADD) und Initiator-Caspase, welcher als death inducing signaling complex (DISC) bezeichnet wird. An die intrazelluläre Todesdomäne der Todesrezeptoren (death domain DD) binden durch homotypische Interaktionen Adaptermoleküle mit eigener Todesdomäne. Die Adaptermoleküle TRADD (TNF-Rezeptor assoziiertes Protein) bzw. FADD (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne) können über die Todeseffektordomäne (DED) die Pro-Caspasen-8 und -10 rekrutieren. Der Komplex aus Todesrezeptor, korrespondierendem Todesliganden, Adapterprotein (TRADD und FADD) und Initiator-Caspase wird als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet. Zelluläres FLIP (FLICE inhibitory protein), welches homolog zur Caspase-8 jedoch inaktiv ist, konkurriert mit Procaspase-8 um die freie Bindung an das DED des Adaptermoleküls FADD bzw. TRADD und

kann somit auf der Ebene der Caspasen-Ankoppelung den extrinsischen Apoptose-Signalweg inhibieren (Abb.1.4) (Debatin and Kramer, 2004).



**Abb.1.4: Blockierung des extrinsischen Signalweges durch c-FLIP.** Die Oligomerisierung, eventuell auch Trimerisierung, der Todesrezeptoren (CD95, TRAIL-R1 und TRAIL-R2) resultiert nach Bindung des Todesliganden (CD95L, TRAIL) in der Rekrutierung eines Adapter-Moleküls FADD mittels Interaktion der entsprechenden Todes-Domänen (DD). Im nächsten Schritt rekrutiert FADD die DED-enthaltene Initiator-Pro-Caspase-8 durch DED/DED- (death effector domain) Interaktion, so dass es zur Bildung eines DISC (Death-Inducing Signaling Complex) kommt (1). Auch niedrige Konzentrationen von c-FLIP<sub>L</sub> können am DISC durch Bildung von c-FLIP<sub>L</sub>-Pro-caspase-8 Heterodimeren den extrinsischen Caspase-Signalweg initiieren (2). Klassischerweise führen moderate und hohe Konzentrationen von c-FLIP<sub>L</sub> sowie beliebige Konzentrationen von c-FLIP<sub>S</sub> und c-FLIP<sub>R</sub> zur Blockierung der Pro-Caspase-8 Rekrutierung an den DISC und zur Apoptose-Inhibition (3).

Es sind bislang drei c-FLIP-Isoformen auf der Protein-Ebene beschrieben: c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub> und c-FLIP<sub>R</sub>. Bei Überexpression inhibieren alle Isoformen die Aktivierung von Procaspase-8, indem

sie die Prozessierung am DISC blockieren. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass niedrige c-FLIP<sub>L</sub>-Konzentrationen die Prozessierung der Procaspase-8 am DISC durch c-FLIP<sub>L</sub>-Procaspase-8 Heterodimer-Bildung und somit die Initiierung der Caspasen-Kaskade des extrinsischen Signalweges bewirken könnten (Chang *et al.*, 2002).

### *Intrinsischer Apoptose-Signalweg*

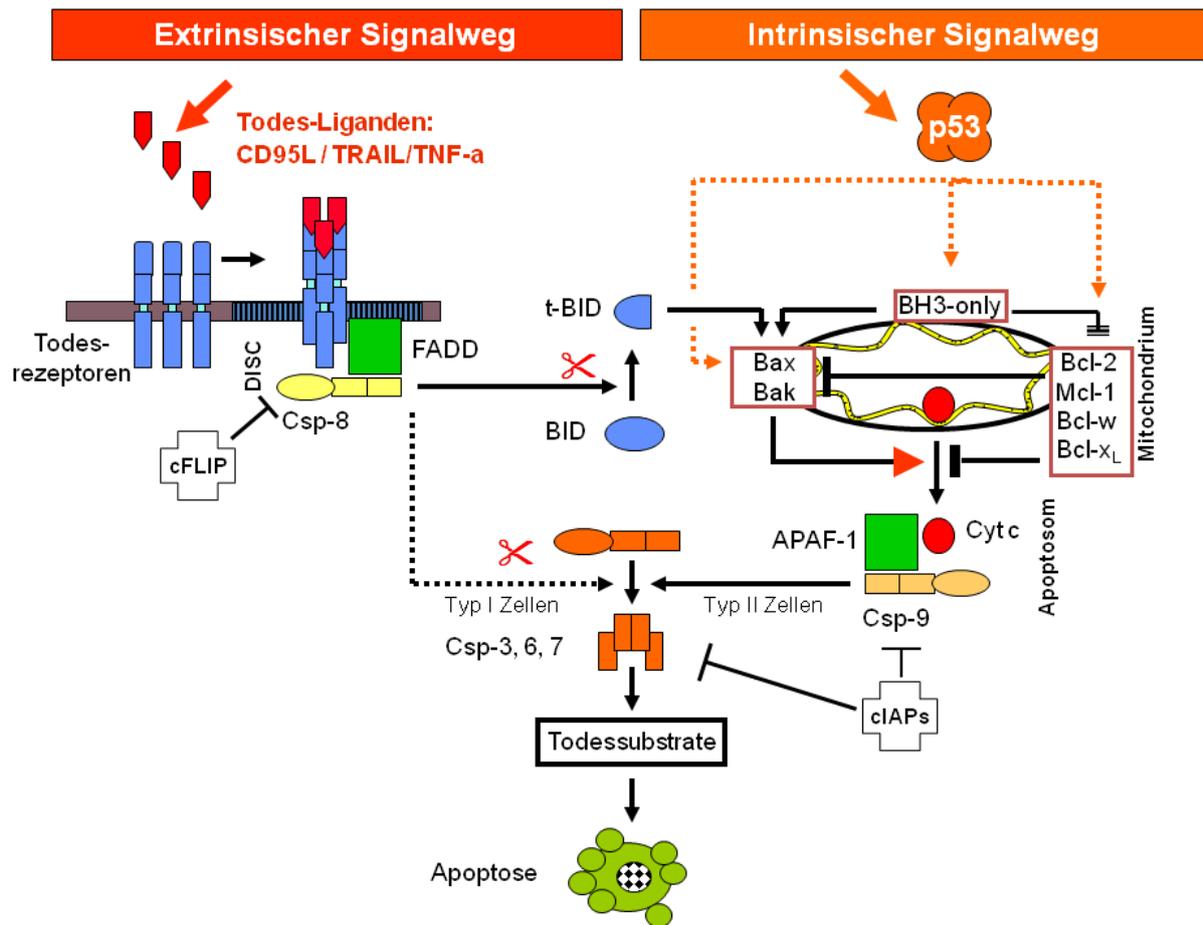
Die Mehrzahl der Chemotherapeutika induziert Apoptose über den intrinsischen Signalweg. So ist eine Blockade des mitochondrialen Signalweges häufig mit Chemotherapie-Resistenz assoziiert (Fulda and Debatin, 2006). Der intrinsische Signalweg ist charakterisiert durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilisation - MOMP) und der Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_M$ ). Es folgt die Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren – wie etwa Cytochrom c – aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Adams and Cory, 2007).

Die Regulation der äußeren mitochondrialen Membrandurchlässigkeit und die konsekutive Freisetzung mitochondrialer Faktoren wird von der Familie der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine entscheidend kontrolliert. Abhängig von der Präsenz von bis zu vier Bcl-2 Homologie-Domänen (BH 1-4) werden drei Hauptuntergruppen der Bcl-2-Proteine unterschieden: pro-apoptotische Multidomänen-Proteine (i), anti-apoptotische Multidomänen-Proteine (ii) und BH3-only Proteine (iii) (Chipuk *et al.*, 2010). Als Sensoren in der Apoptose-Kontrolle fungieren die BH3-only Proteine. Im Rahmen von zellulärem Stress tritt die Aktivierung der BH3-only Proteine ein, die zu einer Inaktivierung der anti-apoptotischen Multidomänen-Proteine führen (indirektes Aktivierungs-Modell). Von den Mitgliedern der BH3-only Proteine binden Bim und Puma an alle anti-apoptotischen Multidomänen-Proteine, wohingegen andere Vertreter der Gruppe wie, Noxa und Bad, nur eine komplementäre Bindung mit bestimmten Vertretern der anti-apoptotischen Multidomänen-Proteine eingehen. Somit müssen multiple anti-apoptotische Multidomänen-Proteine inaktiviert werden, um Bax und Bak zu befreien und die Apoptose in Gang zu setzen. Jedoch sind auch Bax-/Bak-Mutanten bekannt, die nicht konstitutiv aktiv sind, trotz fehlender Bindungskapazität der Bcl-2-ähnlichen Proteine an Bax und Bak (Kim *et al.*, 2006a). Wie die Homo-Oligomerisierung von Bax und Bak und die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran vonstattengeht ist bislang nicht abschließend geklärt. Ob ferner bestimmte BH3-only Proteine auch direkt Bax/Bak aktivieren können bleibt kontrovers (Chipuk *et al.*, 2010).

Im nachfolgenden Teil des Signalweges nach Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und Freisetzung der mitochondrialen Faktoren kommt es zur Bildung eines Komplexes (Apoptosom) bestehend aus Cytochrom c, dATP und Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1), der in einer Konformationsänderung von Apaf-1 resultiert, sodass es zur Freilegung der Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) kommt. An die CARD-Domäne kann Procaspase-9 binden (Jiang and Wang, 2000). Nach dem Modell der induzierten Proximität fungieren der DISC und das Apoptosom als Rekrutierungs-Plattformen, mit dem Ziel die Dimerisierung der apikalen Caspasen (Csp-8/-10/-9) zu ermöglichen. Durch eine Dimer-induzierte Aktivierung der apikalen Caspasen ohne Beteiligung von Proteolyse oder allosterischen Mechanismen wird die Caspasen-Kaskade initiiert (Pop *et al.*, 2006). In einem nächsten Schritt werden durch proteolytische Spaltung die Effektor-Caspasen, wie Caspase-3, -6 und -7 aktiviert (Abb.1. 5). Alle bisher bekannten Caspasen verfügen über einen Cysteinrest im aktiven Zentrum und zerlegen ihr Substrat nach einem Aspartatrest. Am Ende der Caspasen-Kaskade kommt es zur Prozessierung der Todessubstrate, die über 280 Proteine umfassen und u.a. Enzyme für die DNA-Reparatur sowie Signal- und Strukturproteine beinhalten und somit die Zelle in die Apoptose treiben (Fischer *et al.*, 2003).

Der intrinsische Apoptose-Signalweg ist ferner eng mit der Funktion von p53 verknüpft. Die zentrale Bedeutung des Verlustes von funktionellem p53 als 'guardian-of-the-tissue' wird in der erhöhten NMSC-Sequenz in Mäusen mit p53-Inaktivierung in der Haut deutlich (Ziegler *et al.*, 1994). Der Aktivierung von funktionellem p53 folgt die verstärkte Expression von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie wie Bax, Noxa, Puma, Bik/Nbk und Bid (Zuckerman *et al.*, 2009). Zu den Zielstrukturen des Transkriptionsfaktors p53 zählen ferner die Komplexbildung mit Bcl-x<sub>L</sub> sowie Bcl-2 und somit eine direkte Apoptose-Induktion unter Umgehung der Transkriptionsebene (Mihara *et al.*, 2003).

Die IAPs (Inhibitor of apoptosis protein) sind eine Familie von Proteinen, die die Caspasen-Kaskade regulieren können. Der anfangs postulierte Standpunkt des point-of-no-return nach der einmal aktivierten Caspasen-Kaskade relativiert sich oder wird durch die IAPs zunehmend widerlegt. Verschiedene Arbeiten mit Transfektions-Modellen und transgenen Mäusen zeigen, dass eine Intervention mittels der IAPs unterhalb der mitochondrialen Permeabilisation und Caspasen-Aktivierung die funktionelle Erholung der Zelle ermöglichen (Liston *et al.*, 2003).



**Abb.1. 5: Proapoptische Signalkaskaden** (Rodust *et al.*, 2009). In der Initiationsphase werden zwei Signaltransduktionswege unterschieden: der extrinsische und intrinsische Weg. Man unterscheidet hiernach auch in Apoptose Typ I (extrinsisch) und Typ II (intrinsisch). Der extrinsische Signalweg beinhaltet: Todesliganden-Bindung an die Todesrezeptoren, Rezeptor-Oligomerisierung, Bildung des death-inducing signaling complex (DISC), Aktivierung der Initiator-Caspase-8 oder Caspase-10, Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und konsekutive Freisetzung von Todes-Substraten, die die Apoptose ausführen. Der intrinsische Signalweg ist auf der rechten Seite dargestellt und beinhaltet: Aktivierung von p53, Transkription proapoptotischer Bcl-2-Proteine, Inhibition antiapoptotischer Bcl-2-Proteine, mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c, Formation des Apoptosoms, Aktivierung der Initiator-Caspase-9, Freisetzung und Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und erneute Spaltung von Todes-Substraten. Das Caspase-8/-10 Homologon c-FLIP inhibiert die Aktivierung der Initiator-Caspasen am DISC, wohingegen c-IAPs sowohl die Initiator- (Caspase-9) und die Effektor-Caspasen (Caspase-3 und -7) blockieren. Das Protein Bid wird durch Caspase-8 zum proapoptotisch aktiven tBid gespalten und fungiert als Brückenschlag zwischen Caspase-8 und dem mitochondrialen Signalweg. Scherensymbole in der Abb. weisen auf Protease-Aktivität hin.

## 1.4. ZIELSETZUNG

Zentrales Anliegen dieser Arbeit war die Untersuchung der proapoptotischen Mechanismen von Diclofenac, welches als Salbenform in Solaraze für die Behandlung der aktinischen Keratose als First-Line Therapeutikum indiziert ist. Der Wirkmechanismus von Diclofenac in der Apoptoseregulation in Bezug auf Zellen des kutanen Plattenepithelkarzinoms war bislang weitgehend unbeschrieben.

Um Ansatzpunkte für den Wirkmechanismus von Diclofenac in Non-Melanoma Skin Cancer (NMSC) zu finden, wurden vier verschiedene Plattenepithelkarzinomzelllinien verwendet und hinsichtlich der folgenden Fragestellungen und Aufgabenfelder untersucht:

1. Wie stark ist die Apoptoseinduktion durch Diclofenac?
2. Welche Bedeutung spielt PGE<sub>2</sub> in der Apoptoseinduktion?
3. Herausarbeitung von durch Diclofenac mediierten Regulationen auf der Ebene des extrinsischen Signalweges.
4. Die Bedeutung der Bcl-2-Proteine für die Regulation der Diclofenac induzierten Apoptose.
5. Kostimulation von Diclofenac mit Todesliganden und Erarbeitung der ursächlichen Regulationen für die synergistischen Effekte von Diclofenac mit Todesliganden.
6. Finden Gegenregulationen statt als Ansatzpunkt für zukünftige Kombinationstherapien?

## 2. MATERIAL & METHODEN

### 2.1. ZELLKULTUR & STIMULATIONEN

#### 2.1.1. ZELLINIEN

Es wurden fünf humane epitheliale Zelllinien der Haut verwendet. Die kutanen Plattenepithelkarzinomzelllinien SCL-I, SCL-II, SCC-12 und SCC-13 sowie als Kontrolle die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT.

*HaCaT* (Boukamp *et al.*, 1988) stellt eine spontan immortalisierte, humane, epitheliale, nicht neoplastisch-transformierte Zelllinie der Haut dar. Die Zelllinie besitzt epidermale Differenzierungskapazität und breitet sich auf Nacktmäusen als geordnetes epitheliales Gewebe aus. Die Plattenepithelkarzinom-Zelllinien *SCL-I* und *SCL-II* (Tilgen *et al.*, 1983; Rheinwald and Beckett, 1981) wurden aus wenig differenzierten Plattenepithelkarzinomen der Haut isoliert. Nach Injektion in Nacktmäuse kommt es zur Ausbildung von SCC-artigen Tumoren. Die Zelllinien *SCC-12* und *SCC-13* (Rheinwald & Beckett 1981) wurden aus Plattenepithelkarzinomen der Gesichtshaut isoliert. Die eingesetzten Zelllinien sind zur Bildung von Keratinfilamenten befähigt und benötigen für ihr Wachstum kein EGF.

#### 2.1.2. KERATINOZYTENISOLIERUNG AUS VORHAUT

Zur Isolierung der Keratinozyten aus Präputien zur Herstellung einer primären Keratinozytenkultur wurden die Vorhäute zunächst in sterilen 100 mm-Gewebekulturschalen (Falcon/Becton Dickinson, # 1029) längs aufgeschnitten und mit 10 ml PBS w/o  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  (Seromed/Biochrom, # L1825) supplementiert mit 500 U/ml Penicillin und 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin (Seromed/Biochrom, A 2212) gewaschen. Das subkutane Fettgewebe der Vorhaut wurde mittels Schere abpräpariert, anschließend das über bleibende Gewebe zweimal in PBS gewaschen. Zur Vergrößerung der Angriffsfläche für den darauf folgenden Trypsinisierungsschritt wurden die Vorhäute in Stücke von ca. 3-5 mm Kantenlänge geschnitten. Anschließend erfolgte die Inkubation der Vorhaut-Stücke in 10 ml 0,25%-igem Trypsin (Seromed/Biochrom#L2123) in PBS über Nacht bei 4°C sowie 60-120 minütige Inkubation in Trypsin bei 37°C am folgenden Tag.

Zur Gewinnung einer Keratinozyten-Kultur wurde die Epidermis nach erfolgter Trypsin-Inkubation abgezogen und die Dermis verworfen. Zur Neutralisierung des Trypsin erfolgte ein Waschschrift der Epidermis mit 10 ml RPMI 1640 (Seromed/Biochrom, # F 1215)

supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS/Seromed/Biochrom, # S 0115), 600  $\mu$ M L-Glutamin (Seromed/Biochrom, # K 0282), 500 U/ml Penicillin und 500  $\mu$ g/ml Streptomycin.

Die abgelöste Epidermis wurde auf der Petrischale ausgeklopft. Hierzu wurde die Epidermis mit der Pinzette gegriffen und ca. 30-40mal auf dem Boden der Petrischale ausgeklopft. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml-Röhrchen (Falcon/Becton Dickinson, # 2070) überführt, die Petrischale mit supplementiertem RPMI ausgepült und ebenfalls ins Röhrchen gegeben. Im nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation der Zell-Suspension, der Überstand verworfen und des Zellpellet in 20 ml Keratinozytenmedium resuspendiert (Keratinocyte-SFM, Gibco, # 17005-035), supplementiert mit: 50  $\mu$ g/ml bovinem Hypophysenextrakt (BPE, Gibco, # 13028), 5 ng/ml rekombinanten epidermalen Wachstumsfaktor (rEGF, Gibco, # 10450), 500 U/ml Penicillin und 500  $\mu$ g/ml Streptomycin. Nach Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer, Aussaat von  $2 \times 10^6$  Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup>-Flasche (Nunc, # 147589) in 10 ml supplementiertem Keratinozytenmedium und Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel und anschließend in zwei-tägigen Abständen bis die Kultur konfluent wurde.

### 2.1.3. NÄHRMEDIEN

Alle Zelllinien wurden bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Für SCL-I, SCL-II, SCC-12 und SCC-13 wurde RPMI 1640 verwendet (Roswell Park Memorial Institute) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin, nicht-essentielle Aminosäuren und L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Germany). HaCaT-Zellen wurden in DMEM-Medium (Gibco/Invitrogen) kultiviert (4,5 g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvat) supplementiert mit 10% FKS, Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin. Von Präputien isolierte Keratinozyten wurden in Keratinozytenmedium (Keratinocyte-SFM, Gibco, # 17005-035) kultiviert. Das Keratinozytenmedium wurde supplementiert mit 50  $\mu$ g/ml bovinen Hypophysen-Extrakt (BPE, Gibco, # 13028), 5 ng/ml rekombinanten Wachstumsfaktor (rEGF, Gibco, # 10450), sowie Penicillin und Streptomycin.

### 2.1.4. BEHANDLUNG UND AUSSAAT

Bei der Behandlung der Zellen ist zur Wahrung konstanter Bedingungen und der Möglichkeit der Reproduktion die Aussaat einer konstanten Zellzahl als wichtig zu erachten. Für die Apoptoseassays wurden 250.000 Zellen und im PGE<sub>2</sub>-ELISA Assay 500.000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Schale ausgesät. Hierfür wurde zuerst das in der Kulturflasche befindliche verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 Min mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02 %) inkubiert und mit 10

ml frischem Medium resuspendiert – hierbei fungiert das FCS als Inaktivator des Trypsin-EDTAs. Diese Zellsuspension wurde für 5 Min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Medium resuspendiert.

### *Stimulation*

Für die Aktivierung des extrinsischen Signalweges wurden die Zellen mit dem agonistischen Anti-CD95 Antikörper (CH-11, IgM mouse; Beckman Coulter, Krefeld, Germany), mit TRAIL (*Killer*TRAIL, soluble, human, recombinant; Alexis, Gruenberg, Germany ALX-201-073-C020) oder mit TNF- $\alpha$  (Sigma, Taufkirchen, Germany) behandelt. Inkubationszeiten betragen 16h bei Einsatz von CH-11 und TRAIL bzw. 24h für TNF- $\alpha$ . Die Konzentrationen für SCL-I, SCL-II and SCC-13 betragen 100 ng/ml (CH-11) und 20 ng/ml (TRAIL). SCC-12 und HaCaT-Zellen zeigten, wie in Konzentrationsreihen bestimmt, eine sehr viel höhere Sensitivität gegenüber Todesliganden, so dass die Effekte von Diclofenac partiell maskiert wurden. Es wurde für diese beiden Zelllinien die folgendenden reduzierten Konzentrationen gewählt: CH-11 in einer Konzentration von 1 ng/ml (SCC-12), TRAIL 10 ng/ml (SCC-12) bzw. 5 ng/ml (HaCaT) eingesetzt. TNF- $\alpha$  wurde bei allen Stimulation konstant in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet.

Diclofenac/HA (Solaraze®; Almirall, Barcelona, Spain) wurde zu den Zellkulturen in einer Endkonzentration von 0.2% oder 0.3% eingesetzt. In Experimenten, in denen Diclofenac/HA durch Diclofenac (Sigma) ersetzt wurde, entsprach dies einer äquimolaren Konzentration von 60 bzw. 90  $\mu$ g/ml Diclofenac. Für kombinierte Behandlungen wurden die Zellen für 4h mit Diclofenac vorbehandelt, gefolgt von weiteren 16h mit Diclofenac und Todesliganden.

24 h nach der Aussaat von 250.000 Zellen pro Well in 2 ml Medium in einer 6-Well-Schale geschieht der erste Mediumwechsel, 4 h darauf der nächste Mediumwechsel mit der behandelnden Substanz. Am zweiten Tag – 24 Stunden nach dem ersten Mediumwechsel – wird mit dem Cell Death Detection Kit (Roche) die Apoptoserate gemessen.

**Tabelle 2.1.:** Zur Behandlung mit Todesliganden wurden folgende End-Konzentrationen eingesetzt.

|                   | TNF- $\alpha$ | CD95L/CH-11 | TRAIL    |
|-------------------|---------------|-------------|----------|
| SCL-I,-II, SCC-13 | 10 ng/ml      | 100 ng/ml   | 20 ng/ml |
| <i>SCC-12</i>     | 10 ng/ml      | 1 ng/ml     | 10 ng/ml |

### 2.1.5 MYKOPLASMENTEST

#### *Polymerasekettenreaktion (PCR)*

Für die Verwendung des Venor®*GeM*-Mykoplasmen-Detektionskit wurde 100 µl Zellkulturüberstand bei 90-100% Konfluenz eingesetzt, das Probenmaterial 5 Min im Heizblock gekocht und die PCR-Probe anschließend durch kurzzeitiges Erhitzen für den Test vorbereitet. Eventuell im Probenmaterial enthaltene Mykoplasmen wurden lysiert und DNAsen inaktiviert. Durch Zentrifugation wurden störende Zelltrümmer abgetrennt. 2 µl des Überstandes der Proben bzw. 2 µl deionisiertes Wasser und 2 µl der Positivkontrolle wurden mit je 23 µl des Mastermixes versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden in den Block des PCR-Cyclers gestellt und das Cycler-Programm gestartet.

23 µl Mastermix enthalten: PCR-Wasser: 15,3 µl, 10x Reaktions-Puffer: 2,5 µl, Primer/Nucleotid Mix: 2,5 µl, Interne Kontrolle DNA: 2,5 µl, Polymerase (5 U/µl): 0,2 µl

Das *PCR-Programm* besteht aus: 39 Zyklen Denaturierung über 30 sek bei 94 °C, sowie 39 Zyklen Annealing über 30 sek bei 55 °C.

#### *Agarosegel-Elektrophorese*

Zur Herstellung eines 1,5-%igen Standard-Agarosegels wurden 1,5% (w/v) -Agarose in 1x TAE gelöst. Der TAE-Puffer wurde zum Sichtbarmachen von mindestens 10 ng DNA pro Bande mit 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml versetzt. Die Proben (7,5 µl) wurden zum Absinken in die Taschen und zur besseren Kontrolle der Elektrophorese mit 1/5 des Probenvolumens mit Ladepuffer gemischt. Die Elektrophorese wurde mit 100 V durchgeführt.

## 2.2. METHODEN

### 2.2.1. WESTERN-BLOT-ANALYSEN

#### *Herstellung von Proteinextrakten mit Standard-Lysispuffer*

Für die Herstellung von Protein-Extrakten wurden  $2.5 \times 10^6$  Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden 16 oder 24 Stunden nach Behandlung bei einer Konfluenz von 60% - 80% geerntet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor Lysis Puffer hinzugefügt wurde.

Durchgeführtes Protokoll: Für die Herstellung von Gesamt-Proteinextrakten wurden die Zellpellets in kaltem Standard Lysispuffer resuspendiert und die freigesetzte DNS ca. 10-mal mittels einer 1 ml Tuberkulin-Spritze geschert. Anschließend wurden die Proteinextrakte für 10 Min bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Lysate wurden bei - 80°C gelagert.

#### *Verwendete Puffer und Reagenzien – Proteinlysate*

Standard-Lysispuffer 10 ml: Tris-HCl 100 µl (1M, pH 7,5, T-1503, Sigma); NaCl 480 µl (3 M, 1.06404, Merck); SDS 500µl (10%, L-4390, Sigma); Nonidet P-40 50 µl (N-3516, Sigma); Protease-Inhibitoren: Aprotinin 36 µl (10%, 10236624, Roche); Leupeptin 100 µl (11017101, Roche); Pepstatin 100 µl (0,5 mg/ml, 253286, Roche); PMSF 100 µl (100 mM, P-7626, Sigma); EDTA 20 µl (0,5 M, pH 8,0, 8418, Merck); Aqua bidest. 8,5 ml und PhosSTP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten (04906845, Roche).

#### *Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Methode*

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt werden (BCA Protein Assay, 23225, Thermo Scientific). Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der die Amino-Gruppen von Proteinen in alkalischem Medium  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduzieren.  $\text{Cu}^+$ -Kationen reagieren dann mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Chelat-Komplex, dessen Absorption im ELISA-Reader gemessen werden kann.

Durchgeführtes Protokoll: Die zu bestimmenden Proteinextrakte sowie die Eichlösung wurden in Triplikaten in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Bestimmung wurden die Proteinextrakte (10 µl, 1:10 verdünnt in PBS) mit 200 µl Reaktionspuffer, bestehend aus Lösung A (4 µl) und Lösung B (196 µl) inkubiert. Als Eichlösung dient eine BSA-Lösung in verschiedenen Konzentrationen. Die Mikrotiterplatte wurde 30 Min bei 37°C inkubiert und bei 550 nm im ELISA-Plate-Reader vermessen. Mit Hilfe der bekannten BSA-Konzentrationen kann die Proteinmenge der Lysate bestimmt werden.

#### *Herstellung von Proteinextrakten mit CHAPS-Lysispuffer*

Für den Nachweis von Caspase-Spaltprodukten mittels Westernblot-Analyse wurden Proteinextrakte mit CHAPS-Puffer hergestellt. Hierfür wurden Zellen geerntet, mit kaltem PBS gewaschen und in CHAPS-Puffer (9283, Cell Signaling) resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen der Proteinextrakte wurden die Plasmamembranen weiter aufgebrochen

und die Proteinausbeute erhöht. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand von Zelltrümmern getrennt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Coomassie-Färbung bestimmt.

#### *Konzentrationsbestimmung von CHAPS-Proteinextrakten*

Die Proteinkonzentration von CHAPS-Extrakten wurde mit Hilfe einer Coomassie-Brilliantblau-Färbung bestimmt. Dazu wurden je 10  $\mu\text{l}$  einer Probe mit 3  $\mu\text{l}$  Protein-Probenpuffer versetzt, 5 Min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert und in einem 12%igen Polyacrylamidgel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung (Roti-Blue<sup>TM</sup>, A-152.1, Roth) über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Zur Entfernung unspezifischer Färbungen wurde das Gel in 25%-iger Methanol-Lösung 30 Min gewaschen. Zur Auswertung wurden die gefärbten Banden eingescannt und mit TINA-Software quantifiziert. Für die Evaluierung wurde eine Kontrollprobe mit bekannter Konzentration eingesetzt.

#### *Diskontinuierliche SDS-PAGE*

Durch die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Durch Molekulargewichtsstandards (Bio-Rad) kann die Größe der Proteinbanden bestimmt werden. Die Polyacrylamidgelle wurden mit dem Elektrophoresesystem für Minigele der Firma BioRad hergestellt. Zunächst wird das gegossene Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Der vorher in das Sammelgel gesteckte Kamm mit insgesamt 10 Taschen wird entfernt und die mit SDS-Probenpuffer (4x) versetzten und für 5 Min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturierten Zelllysate in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V (Biometra, Göttingen) durchgeführt, bis die Proteinfront das Gel-Ende erreicht hatte.

#### *Verwendete Puffer und Reagenzien – Elektrophorese*

Sammelgel (5%ig) 5 ml: Acryl-/Bisacrylamid 0,84 ml (30%, 37,5:1, 161-0158, Bio-Rad); Sammelgelpuffer 2,5 ml; Aqua bidest. 1,6 ml; APS 100  $\mu\text{l}$  (10%, 161-0700, Biorad); TEMED 10  $\mu\text{l}$  (161-0800, Bio-Rad). Sammelgelpuffer (pH 6,8) 500 ml: Tris-Base 19,7 g (T1503, Sigma); SDS 1,0 g; Aqua bidest. ad 500 ml. Trenngel (12%ig) 10 ml: Acryl-/Bisacrylamid 4,0 ml (30%, 37,5:1); Trenngelpuffer 5,0 ml; Aqua bidest. 1,0 ml; APS 100  $\mu\text{l}$  (10%); TEMED 10  $\mu\text{l}$ . Trenngelpuffer (pH 8,8) 500 ml: Tris-Base 38,5 g; Tris-HCl 9,3 g; SDS 1,0 g; Aqua bidest. ad 500 ml. Protein-Probenpuffer (4x) 10ml: Tris-HCl 2,5 ml (1M, pH 6,8; T3253, Sigma); SDS 0,2

g (L-4390, Sigma); Glycerin 4 ml (1.04093, Merck);  $\beta$ -Mercaptoethanol 2 ml (M-7154, Sigma); Bromphenolblau 4 mg (Biorad); Aqua bidest. 1,5 ml. Laufpuffer nach Laemmli (5x) 2 l: Tris-Base 30,4 g; Glycin 144 g (23390, Serva); SDS 10 g; Aqua bidest. ad 2 l.

#### *Transfer von Proteinen mittels Westernblot auf Nitrocellulosemembranen*

Bei der Westernblot-Methode werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA 83, Schleicher & Schuell) durch Anlegen eines elektrischen Feldes transferiert. Auf dieser werden die Proteine durch spezifische primäre und Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper indirekt detektiert. Die Meerrettich-Peroxidase setzt ein Chemilumineszenzreagenz (ECL-Detection-Reagent, Amersham Biosciences) um, wobei Lumineszenzlicht emittiert wird, das durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham Biosciences) sichtbar gemacht werden kann. Für den Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran (NC-Membran) wurden zunächst das Gel, eine NC-Membran in Gelgröße, zwei Schwämme und zwei Whatmanpapiere 10 Min in Transferpuffer (1x) geschüttelt. Dann wurde, von der Anode aus, folgende luftblasenfreie Schichtung vorgenommen: Schwamm, Whatmanpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel, Whatmanpapier und Schwamm. Dieser sogenannte „Sandwich“ wurde anschließend in eine Blotkammer eingebaut. Die Apparatur (BioRad) wurde schließlich mit dem Transferpuffer(1x) gefüllt und ein konstantes elektrisches Feld von 100 mA für 90 Min angelegt (Biometra, Göttingen).

#### *Verwendete Puffer und Reagenzien*

Transferpuffer (1x) 2 l: Tris-Base 11,64 g; Glycin 4,36 g; SDS 3,7 g; Methanol 400 ml; Aqua bidest. ad 2 l. Phosphat-buffered Saline (PBS)-Tween (0,05%): PBS Dulbecco 9,55 g (L182-50, Biochrom); Tween20 0,5 ml (P-9416, Sigma); Aqua bidest. ad 1 l. Milchpulver (5%): Blotting Grade Non-Fat Dry Milk Fat free 5 g (170-6404, Bio-Rad); Phosphate-buffered Saline 0,05% Tween ad 100 ml.

#### *Immunologischer Nachweis von Proteinen auf NC-Membranen*

Zum Nachweis des Proteintransfers wurden die Proteine auf der NC-Membran zunächst mit Ponceau S unspezifisch angefärbt. Die Färbung ist reversibel und wurde durch Waschen der Membran mit TBS-0,5 % Tween vollständig entfärbt. Vor der Behandlung mit dem primären Antikörper erfolgte ein 1-stündiger Blockierungsschritt der NC-Membran in der Blockierungslösung (TBS-0,05 % Tween + 5 % fettfreie Trockenmilch). Vor und nach der

Behandlung mit dem primären Antikörper wurden je drei Waschschritte mit TBS-0,05 % Tween durchgeführt.

#### *Elektrochemilumineszenz (ECL)*

Die ECL-Lösung für eine Membran, bestehend aus 2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B und 0,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H-1009, Sigma) wurde kurz vor Gebrauch gemischt und auf die Nitrozellulose-Membran gegeben. Nach 1 min Inkubation wurde die Membran zwischen zwei Folien in eine Filmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurden Röntgenfilme mit Expositionszeiten von 1 Sekunde bis zu 2 Stunden aufgelegt. Zur Auswertung wurden die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm anhand des Proteinmarkers bzw. entsprechenden Positivkontrollen identifiziert.

#### *Verwendete Puffer und Reagenzien – ECL*

Lösung A: Natriumsalz von Luminol (50 mg, A-4685, Sigma) gelöst in 200 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6; Lösung B: p-Hydroxycoumarinsäure (11 mg, C-9008, Sigma) gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, 20385, Serva).

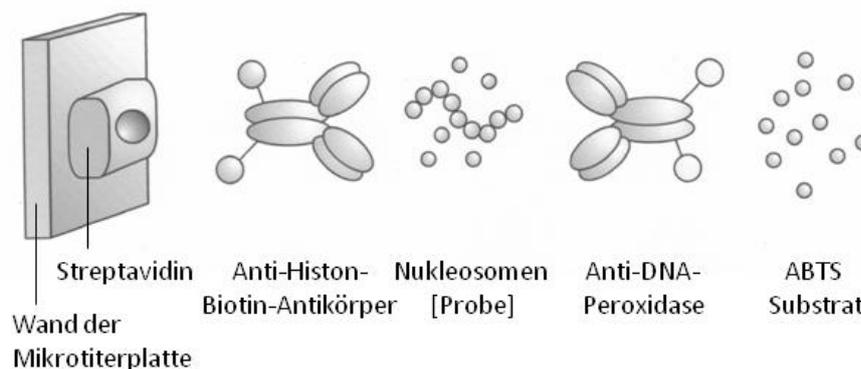
#### *Verwendete Antikörper: Westernblot Analyse*

*Verwendete primäre Antikörper*: c-FLIP<sub>LS</sub> (G-11, sc-5276, Santa Cruz, 1:200); Caspase-8 (9746; 1C12; Cell Signaling, 1:1000); Caspase-10 (4C1; MBL Inter., Watertown, MA, USA, 1:1000); Caspase-9 (9502; Cell Signaling, 1:1000); Caspase-3 cleavage products (9661; Asp175; Cell Signaling, 1:1000); Procaspase-3 (9662; Cell Signaling, 1:1000); Bid (2002; Cell Signaling, 1:1000); Bax (N-20, sc-493; Santa Cruz, 1:200); Bcl-2 (sc-509; Santa Cruz, 1:200); COX-2 (mouse polyclonal; Cayman Chemical, 1:100), Mcl-1 (sc-12756, Santa Cruz, 1:200); Bcl-x<sub>L</sub> (S-18, sc-634; Santa Cruz, 1:200); Bcl-w (rabbit monoclonal IgG, 31H4; Cell Signaling, 1:1,000); Bak (Y164; Epitomics Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200); Puma (1652-1, Epitomics, 1:200); Noxa (2437, ProSci Inc., Poway; CA, USA, 1:200); Cytochrom c (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, 1:1,000); Voltage-dependent anion channel (VDAC; mouse monoclonal, anti-Porin 31 HL, Calbiochem, EMD Chemicals Inc., 1:5,000), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (9101; Cell Signaling, 1:1000), p44/42 MAPK (Erk1/2) (4695; Cell Signaling, 1:1000), β-Actin (A5541; Sigma-Aldrich, Seelze, 1:5000); GAPDH (6C5, sc-32233, Santa Cruz, 1:1000).

*Verwendete sekundäre Antikörper*: Horseradish peroxidase (Hrp)-markierte Ziege anti-Maus Ig, Ziege anti-Kaninchen Ig, Kaninchen anti-Ziege Ig (Dako Cytomation, Hamburg, 1:5000).

### 2.2.2. APOPTOSE-NACHWEIS DURCH CELL DEATH DETECTION ELISA (CDDE)

*Versuchsprinzip:* Bei der Apoptose wird der DNA-Strang durch eine spezifische Endonuclease gespalten. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonuclease spaltet den DNA-Doppelstrang in den leicht zugänglichen Linker-Regionen zwischen den Nucleosomen in Mono- und Oligonucleosome. Die DNA in den Nucleosomen hingegen ist mit den Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 eng assoziiert und dadurch vor der Spaltung durch die Endonuclease geschützt. Aus diesem Grund ist nach Extraktion und Separation der DNA die für die Apoptose typische „DNA-Leiter“ im Agarose-Gel zu erkennen. Es spalten sich hierbei Stücke in diese spezifischen DNA-Fragmente und können nachgewiesen werden. Das quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip unter Verwendung von zwei monoklonalen Maus-Antikörpern gegen DNA und Histon (H2A, H2B, H3 und H4) dient als Basis für den CDDE. Es ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonucleosomen in Zelllysaten.

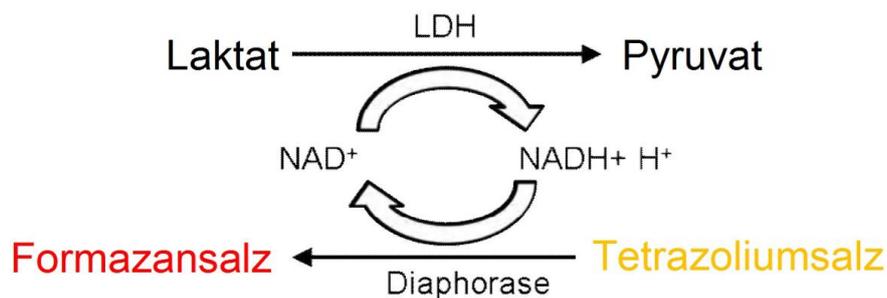


**Abb.2.1: Cell Death Detection ELISA Kit – Prinzip.** Zunächst werden die in der Probe enthaltenen Nucleosome über ihren Histon-Anteil von dem an der Wand immobilisierten Anti-Histon gebunden. Darauf folgend bindet Anti-DNA-Peroxidase an den DNA-Anteil der Nucleosomen. Das nichtgebundene Peroxidase-Konjugat wird ausgewaschen und der Anteil der im Immunkomplex fixierten Peroxidase mit 2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)] (=ABTS) als Substrat photometrisch bestimmt (entsprechend dem Datenblatt).

### Zytotoxizitätsnachweis durch LDH-Release-Assay

Der LDH-Test ist ein sehr häufig angewendeter In-vitro-Zytotoxizitätstest, dessen Prinzip auf der Bestimmung der Enzymaktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) im Zytoplasma basiert, das aus zerstörten oder beschädigten Zellen freigesetzt wird und somit im Überstand (in vitro im Zellkulturmedium) nachweisbar ist. Die Laktatdehydrogenase ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das sehr schnell in das Zellkulturmedium abgegeben wird, wenn die Zellmembran zerstört ist. Die LDH-Aktivität wird mittels eines enzymatischen Tests bestimmt. Es finden zwei Redoxreaktionen statt: Im ersten Schritt wird Laktat durch die Oxidoreduktase LDH zu Pyruvat

oxidiert, während das Coenzym  $\text{NAD}^+$  durch die Übertragung von Wasserstoff (vom Substrat Laktat) zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der im Testreagenz enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff vom entstandenen  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf das schwach gelbfarbene Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), welches dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert wird, während das  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird. Diese Farbstoffbildung kann kolorimetrisch mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen werden.



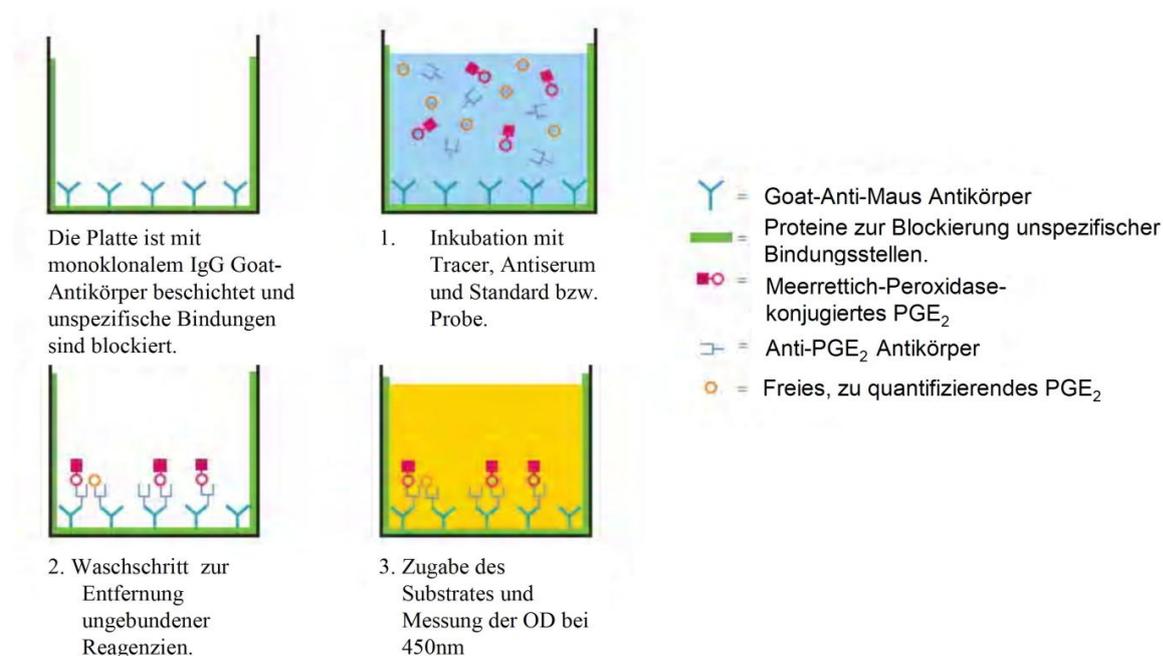
**Abb.2.2 : Zytotoxizitäts-Detektions Kit.** In einer gekoppelt enzymatischen Reaktion entsteht Formazansalz, das bei einer Wellenlänge von 490 nm kalorimetrisch detektiert wird. Der Umsatz von Tetrazoliumsalz (gelb) zu Formazansalz (rot) ist proportional zur LDH-Aktivität (entsprechend dem Datenblatt).

### 2.2.3. HERSTELLUNG VON ZELLFRAKTIONIERUNGS-LYSATEN

Zur Bestimmung der Cytochrom c-Freisetzung sowie der mitochondrialen Translokation von Bax wurden die Mitochondrien und das Zytosol von zu untersuchenden Zellen mit Hilfe eines Mitochondrien Fraktionierung Kits (ALX-850-276, Alexis, Grünberg) isoliert. Hierfür wurden  $1 \times 10^7$  Zellen geerntet, mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und bei 800 g bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zytosol-Extraktionspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in einem 1 ml Glas-Homogenisator mit 40-60 Stößen auf Eis homogenisiert bis circa 75% der Zellen aufgebrochen waren. Das Homogenisat wurde mit 800 g für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde zur Sedimentation der Mitochondrien mit 10.000 g für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der neue Überstand enthält die zytosolische Fraktion und wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  Mitochondrien-Extraktionspuffer resuspendiert und ebenfalls bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.4. KOMPETITIVER ENZYM-IMMUNOASSAY (EIA) ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON $\text{PGE}_2$

Der Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA Kit (Monoclonal, Cayman Chemical) basiert auf einem kompetitiven Prinzip zwischen freiem PGE<sub>2</sub> im Zellkulturüberstand und supplementiertem Meerrettich-Peroxidase-kojugiertem-PGE<sub>2</sub> (Tracer) um eine limitierte Menge an monoklonalem Antikörper. Dieser Antikörper-PGE<sub>2</sub>-Komplex bindet an den polyklonalen Anti-Maus IgG, mit welchem der Boden der ELISA-Platte beschichtet ist. Die Platte wurde gewaschen, damit ungebundene Reagenzien entfernt wurden. Nach Zugabe des Peroxidase-Reagens kam es zum Farbumschlag, der nach 20 min mittels eines Stop-Reagenses blockiert wurde. Als Eichlösung dient eine PGE<sub>2</sub>-Lösung in verschiedenen Konzentrationen. Der ELISA wurde 18 Stunden bei 4°C inkubiert und bei 450 nm im ELISA-Plate-Reader vermessen. Mit Hilfe der bekannten PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen kann die Proteinmenge der Lysate bestimmt werden. Je stärker der Farbumschlag ausfällt, desto mehr vom supplementiertem PGE<sub>2</sub>-Konjugat (Tracer) wurde gebunden und desto weniger PGE<sub>2</sub> ist im Zellkulturüberstand vorhanden. Für den Farbumschlag gilt folgender Zusammenhang: Absorption (bei 450 nm) ~ [gebundenen Tracers] ~ 1/[PGE<sub>2</sub>].



**Abb.2.3: Schema des PGE<sub>2</sub>-ELISA.** Freies, zu quantifizierendes PGE<sub>2</sub> und Meerrettich-Peroxidase-kojugiertes PGE<sub>2</sub> (Tracer) konkurrieren um die Bindung an den monoklonalen Ant-PGE<sub>2</sub> Antikörper. Der Komplex aus Tracer und Anti-PGE<sub>2</sub> bzw. zu quantifizierendem- PGE<sub>2</sub> und Anti-PGE<sub>2</sub> kann an den polyklonalen Anti-Maus-Antikörper binden. Nach einem Waschschrift wird das Acetylthiocholin-Reagens durch die an den Tracer kovalent gekoppelte Acetylcholinesterase hydrolysiert, so dass es zum Farbumschlag kommt. Die entstandene 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure verhält sich antiproportional zum freien PGE<sub>2</sub> (entsprechend dem Datenblatt).

### 2.2.5. DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Das Prinzip der Durchflusszytometrie/Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS) erlaubt es in kurzer Zeit, eine große Anzahl einzelner Zellen in Suspension mit Hilfe eines Durchflusszytometers zu untersuchen. Mit diesem Verfahren können Strukturen auf der Zelloberfläche oder nach Permeabilisieren der Zellen auch im Zellinneren nachgewiesen werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen wurden mit dem FACSCalibur Durchflußzytometer (BD Bioscience) durchgeführt.

#### *Oberflächenexpression – Rezeptoren*

Zur Bestimmung von Oberflächenexpression von Todesrezeptoren wurden die Zellen aus den 6-Well Platten geerntet mit 0.02% EDTA in PBS. Nach Waschen mit PBS wurden Aliquots von  $5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS mit 1% BSA mit mAb gegen TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5 für 30 min inkubiert (Alexis, HS101/HS201, 1:100). Die monoklonalen Maus IgG1 Antikörper (Alexis, clone MOPC31C, 278-010, 1:100) wurden als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 min mit sekundärem Phycoerythrin-markiertem goat anti-mouse IgG1 Antiserum inkubiert (Alexis, 211-201-C050; 1:100). Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurde die Oberflächen-Expression mit dem FACS-Calibur™ Durchflusszytometer bestimmt (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Der mittlere Fluoreszenz Index wurde berechnet mittels CellQuest™ Software (Becton Dickinson). CD95-Oberflächenexpression wurde mittels FACS-Analyse von Zellen, die mit einem Phycoerythrin-markiertem monoklonalem CD95-Antikörper inkubiert wurden, bestimmt (clone DX2; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) und als Kontrolle verglichen mit einem isotypischen monoklonalem IgG<sub>1</sub> Antikörper (clone MOPC-21, Becton Dickinson).

### 2.2.6. IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE ZUM NACHWEIS VON CLUSTERING

Zur Beschichtung von Glasplättchen mit dem Ziel der indirekten Immunfärbung wurden, die in eine 24-well Platte gelegten Glasplättchen mit ca. 500  $\mu$ l Poly-L-Lysin 1:100 (in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur bedeckt. Das Poly-L-Lysin wurde abgehoben und anschließend 3 Waschschriffe mit PBS und  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium pro Probe auf das nun beschichtete im Well befindliche Glasplättchen gegeben. Über Nacht adhärirten die Zellen an den Glasplättchen, und die Behandlung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Zu den entsprechenden Zeitwerten (30 sek - 2 h) nach Behandlungsbeginn wurden die Zellen durch Fixierung möglichst gut in dem Zustand der Stimulation erhalten. Als Fixans dienten jeweils 3ml 2% Paraformaldehyd (2x PBS, 60µl CaCl<sub>2</sub> 100mM, pH 7,2-7,4 mit 0,5 M HCl den pH adaptieren). Nach Fixierung sind die Zellproteine miteinander vernetzt und dadurch stabilisiert. Ferner wird die Zelle abgetötet und kann sich während der Färbeprozedur nicht mehr verändern. Nach der Fixierung mit Paraformaldehyd wurden zwei Waschschrirte mit PBS durchgeführt.

Als nächster Schritt folgte die Antikörperinkubation. Hierzu wurden die Plättchen herausgenommen, auf Parafilm gelegt und dreimal mit H/S für jeweils 2-7 min gewaschen. Primärer Antikörper in PBS/FCS wurde in 100 µl Tropfen auf die mit Zellen beschichteten Glasplättchen gegeben und für 45 min inkubiert. Das im fötalen Kälberserum enthaltene Serumalbumin dient der Blockierung, damit bspw. Pectine und andere zelluläre Strukturen mit Protein abgesättigt werden und der primäre Antikörper nicht unspezifisch an diese Stellen bindet. Anschließend Inkubation mit sekundärem AK für 45 min, davor und danach jeweils 2-mal waschen mit PBS für 2-7 min. Zuletzt erfolgt die Einbettung mittels des wasserlöslichen Einbettmittels Mowiol 4-88. Dieses wird auf einen Objektträger gegeben, das Deckgläschen mit den Zellen aufgelegt und abschließend mit Nagellack versiegelt.

#### 2.2.7. SAURE SPHINGOMYELINASE AKTIVITÄTSBESTIMMUNG

Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase wird durch den Abbau von radioaktiven Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin gemessen. Die Cholin-Gruppe ist wasserlöslich und trägt die radioaktive Markierung, so dass das abgespaltene Phosphorylcholin-Produkt leicht von dem lipophilen Sphingomyelin-Substrat separiert werden kann, welches während des Extraktionsschrittes in der organischen Phase verbleibt. Die saure Sphingomyelinase kann von der basischen und neutralen Isoform differenziert werden, indem der Test bei einem pH von 5,0 durchgeführt wird. Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase wird in totalen Zell-Lysaten bestimmt.

Zur Bestimmung der sauren Sphingomyelinase wurden in eine 6-well Platte ~ 250.000/well ausgesät, die Zellen 24h nach Aussaat behandelt und nach weiteren 24 h Inkubation geerntet. Hierzu wurde nach 1x Waschschrirte mit H/S 300 µL Lysispuffer (250 mM Na-Acetat + 1% NP-40 + 1,3 mM EDTA + Aprotinin und Leupeptin je 10µg/ml, pH 5,5) hinzugegeben, anschließend wurde das Lysat 10 min auf Eis stehen gelassen, die Zellen mittels eines Rubberpoliceman von

der Platte abgelöst und in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt. Das Lysat wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen wurden 30 µL Probenmaterial mit 270 µL Verdünnungspuffer (250 mM Na-Acetat pH 5,5 + 1,3 mM EDTA) gemischt.

Das für den nächsten Schritt zu verwendende radioaktiv markierte Substrat [<sup>14</sup>C]-Sphingomyelin ist unlöslich in Wasser und wurde daher bevor die Zelllysate hinzugegeben wurden in einer SpeedVac-Zentrifuge getrocknet, anschließend in 30 µL AMS-Lysis-Puffer (250 mM Na-Acetat + 0,1% NP-40 + 1,3 mM EDTA) gelöst und im Bad-Sonicator für 10 min beschallt, so dass eine Micellenbildung eintrat. In dem nächsten Schritt wurden die Zelllysate für 30 min mit 0.05 µCi [<sup>14</sup>C]-Sphingomyelin (2 GBq/mmol) pro Probe bei 37°C auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Lipide extrahiert durch Zugabe von jeweils 1 ml Chloroform : Methanol (2:1, v/v) pro Probe, gefolgt von starkem vortexen für 30 sek und Zentrifugation bei 800 x g über 10 min. Dies hat die Separation von Phosphorylcholin in der oberen (wässrigen/aquösen) Phase und Ceramid sowie Sphingomyelin in der unteren (organischen) Phase zur Folge. Ein Aliquot (350 µl) von der oberen Phase wurde vorsichtig abgenommen und in 20 ml Polyethylen-Fläschchen mit 3,5 ml Szintillations-Gemisch gefüllt. Die Szintillations-Messung der liquiden Phase spiegelt den Abbau von [14C]-Sphingomyelin wider und somit die Aktivität der sauren Sphingomyelinase.

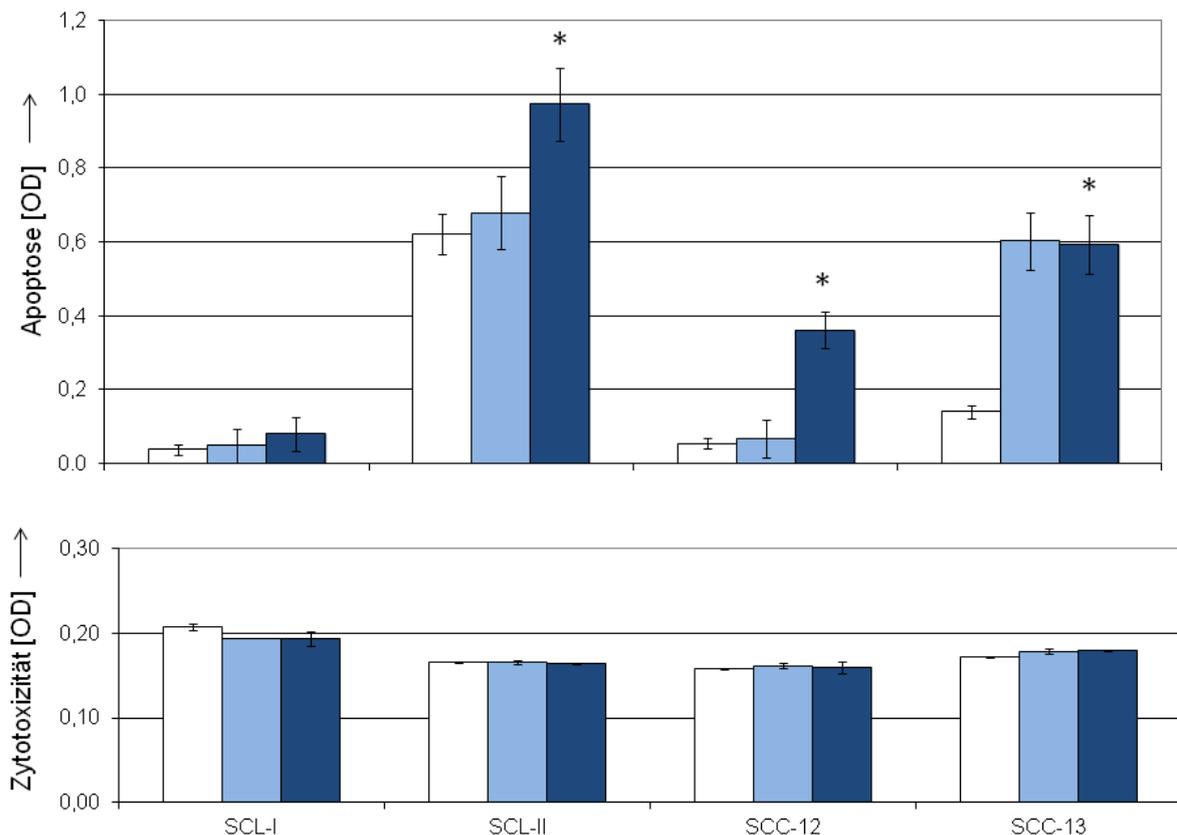
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. APOPTOSEINDUKTION IN KUTANEN PLATTENEPITHELKARZINOMZELLINIEN

##### 3.1.1. APOPTOSE IN DREI VON VIER SCC-ZELLINIEN NACH DICLOFENAC-BEHANDLUNG

In drei der vier kutanen SCC-Zelllinien induzierte Diclofenac/HA (Solaraze) Apoptose. Als Nachweismethode: DNA-Fragmentierung gemessen. Bei einer Konzentration von 0,3% Diclofenac/HA war in zwei der vier Zelllinien (SCL-II, SCC-12) eine signifikant höhere Apoptoseinduktion zu verzeichnen im Vergleich zu 0,2% Diclofenac/HA (Abb. 3.1.).

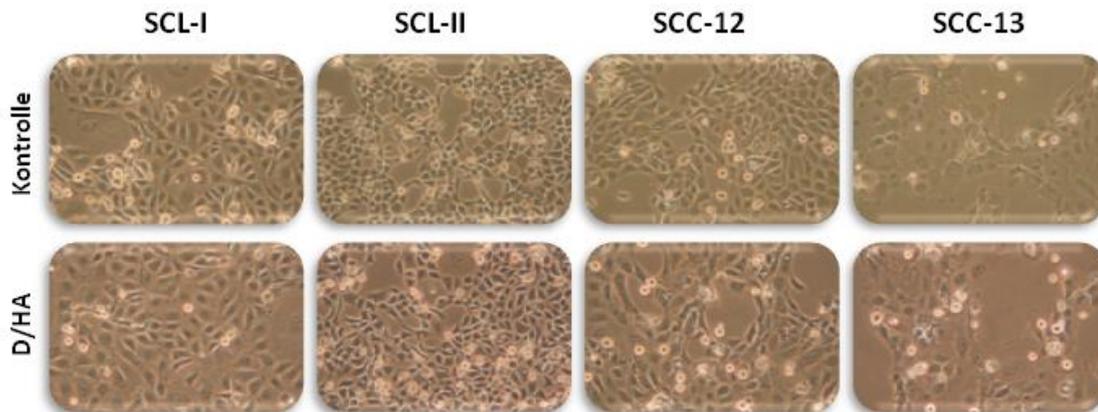
Die Zelllinie SCL-I erwies sich als Apoptose-resistent gegenüber der Diclofenac-Behandlung. Die Zytotoxizität LDH-Freisetzung Assay unbeeinflusst.



**Abb. 3.1: Apoptoseinduktion in drei von vier SCC-Zelllinien durch Diclofenac/HA (Solaraze).** Die SCC-Zelllinien wurden für 24 h behandelt und die DNA-Fragmentierung als Maß für die Apoptose gemessen. Die Zelllinien SCL-II, SCC-12 und SCC-13 waren sensitiv gegenüber der Diclofenac/HA-Behandlung, wohingegen SCL-I eine Resistenz aufwies. Die Wirkstoffkonzentration von 0,3% Solaraze bewirkte in den Zelllinien SCL-II und SCC-12 eine Steigerung der Apoptose gegenüber 0,2%. Das Experiment wurde 3-mal durchgeführt und zeigte vergleichbare Ergebnisse. Sternchen weisen auf eine nach dem Students t-Test signifikante Apoptoseinduktion gegenüber der Kontrolle hin.

### 3.1.2. MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN

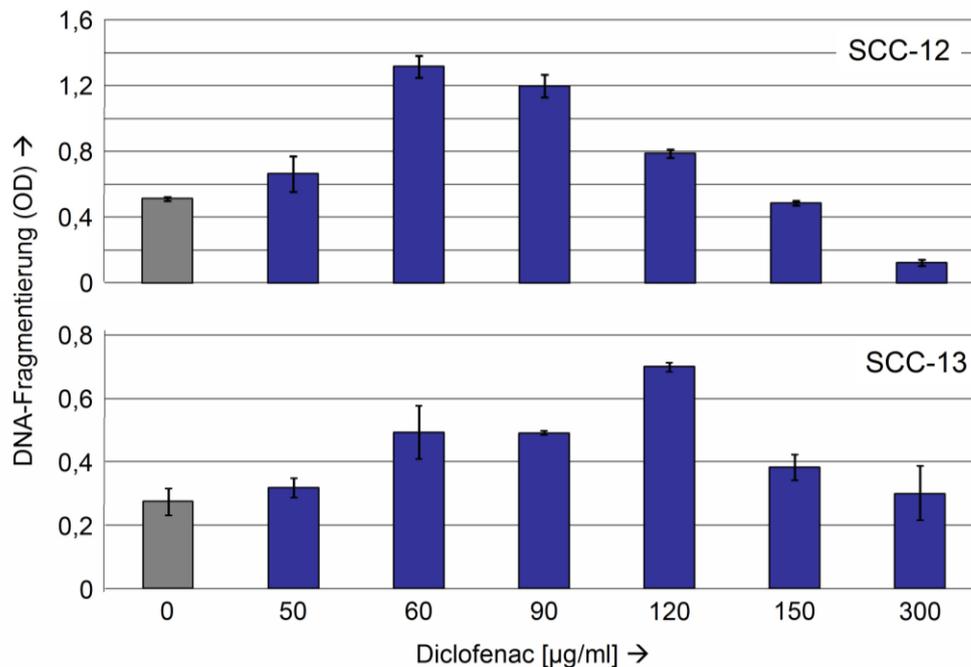
Unter Diclofenac-Behandlung wiesen die Zellen morphologische Veränderungen im Sinne eines apoptotischen Prozesses auf, die sich lichtmikroskopisch durch Volumenverlust sowie Ablösung und Abrundung der Zellen darstellten. Die gegenüber der Diclofenac-Behandlung resistente Zelllinie SCL-I blieb morphologisch unverändert (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Morphologische Zeichen des induzierten Zelltodes nach Diclofenac-Behandlung.** Dargestellt sind die SCC-Zelllinien SCL-I, SCL-II, SCC-12 und SCC-13 in der unteren Reihe nach 24-stündiger Behandlung mit 0,3% Diclofenac/HA (entspricht 90 µg/ml Diclofenac) verglichen mit der jeweils unbehandelten Probe in der darüberliegenden Reihe. In den mit Diclofenac behandelten sensitiven Zelllinien zeigten sich morphologische Veränderungen wie Volumenverlust, Ablösung und Abrundung von Zellen. Die resistente Zelllinie SCL-I wies keine dieser Veränderungen auf.

### 3.1.3. KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT VON DICLOFENAC

Die Zelllinien SCC-12 und SCC-13 wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Diclofenac (50 - 300 µg/ml) behandelt. Das Optimum der Apoptose lag in beiden Zelllinien im mittleren Konzentrationsbereich von 60-120 µg/ml. Niedrigere wie auch höhere Diclofenac-Konzentrationen resultierten in einer Abnahme der Apoptose (Abb. 3.3). Das Phänomen der abnehmenden Apoptoserate bei höheren Diclofenac-Konzentrationen war reproduzierbar in mehreren Experimentserien.

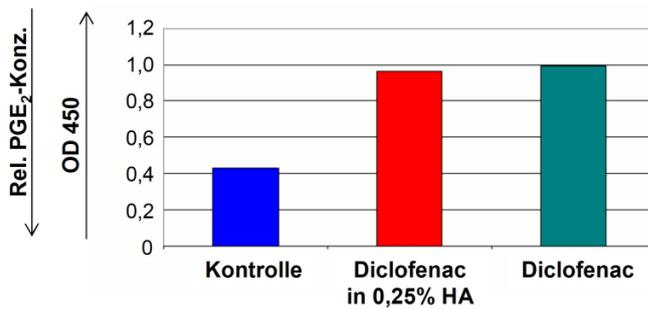


**Abb. 3.3: Induzierte Apoptose in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration.** Die Zelllinien SCC-12 (A) und SCC-13 (B) wurden mit Diclofenac in abgestuften Konzentrationen von 50 µg/ml bis 300 µg/ml für 24 h inkubiert. Das Optimum an induzierter Apoptose lag in allen Experimenten in einem Konzentrationsbereich von 60 bis 120 µg/ml Diclofenac. Diclofenac-Behandlungen mit Konzentrationen >120 µg/ml oder < 60 µg/ml wiesen entsprechend verminderte Apoptosewerte auf. Das Experiment wurde 3-mal durchgeführt und zeigte vergleichbare Ergebnisse. Doppelwerte.

## 3.2. BEDEUTUNG VON PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub>

### 3.2.1. WIRKUNG VON DICLOFENAC UND DICLOFENAC/HA AUF DIE PGE<sub>2</sub>-SPIEGEL

Als zentrale Zielstruktur von NSAIDs wird die Cyclooxygenase-2 (COX-2) betrachtet. Analog zur Apoptoseinduktion sollte in diesem experimentellen Ansatz verglichen werden, ob bzgl. der PGE<sub>2</sub>-Absenkung Unterschiede zwischen Diclofenac und Diclofenac/HA bestehen. Nach Behandlung mit Diclofenac/HA bzw. Diclofenac alleine zeigte sich eine Verdopplung der photometrischen Dichte von untersuchten Zellkulturüberständen. Entsprechend dem Prinzip des kompetitiven PGE<sub>2</sub>-EIA-Assays verhält sich die optische Dichte (OD) antiproportional zur tatsächlichen PGE<sub>2</sub>-Konzentration, so dass die gemessene Verdopplung der OD-450 einer signifikanten Abnahme der Prostaglandin-Produktion nach Diclofenac/HA- und Diclofenac-Behandlung entspricht. Diclofenac wurde in diesem Experiment als alleinige Substanz für den PGE<sub>2</sub>-senkenden Effekt bestätigt.



**Abb. 3.4: Relative PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen nach Diclofenac/HA- im Vergleich zu alleiniger Diclofenac-Behandlung.**

Gemessen wurde aus dem Überstand der Zelllinie SCC-13 die PGE<sub>2</sub>-Konzentration mittels EIA nach 4-stündiger Diclofenac- bzw. Diclofenac/HA-Behandlung. Die gemessene OD-450 verhält sich antiproportional zur PGE<sub>2</sub>-Konzentration. Diclofenac und Diclofenac/ HA rufen eine

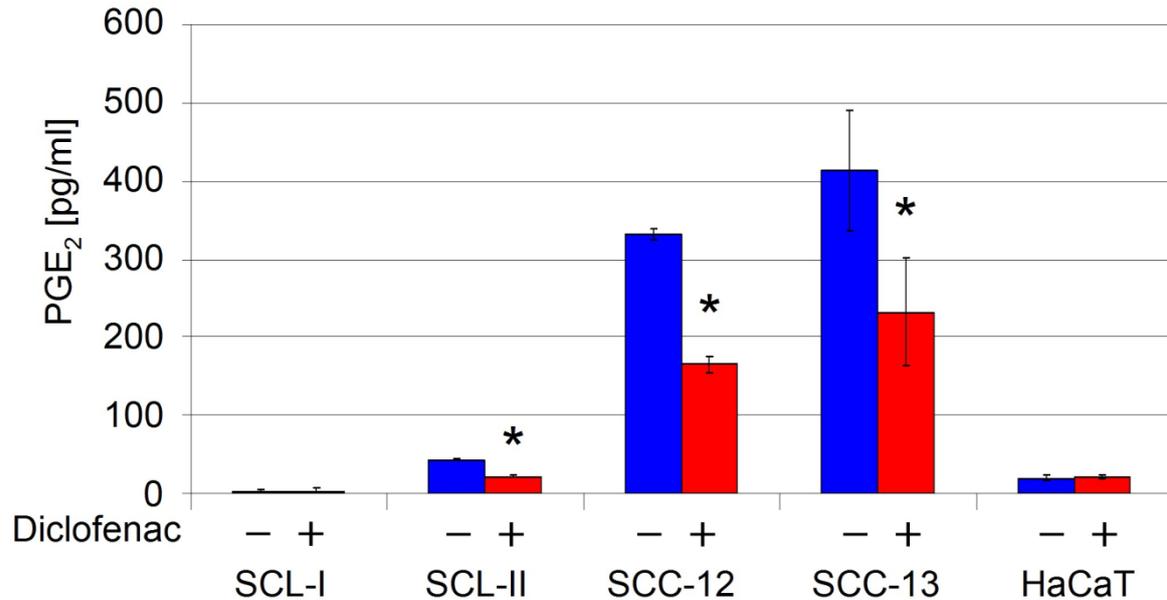
gleich starke Zunahme in der OD bzw. Abnahme der PGE<sub>2</sub>-Syntheserate hervor. Die Senkung des PGE<sub>2</sub>-Spiegels ist somit auf Diclofenac zurückzuführen. Einfachwerte, zwei Versuche.

### 3.2.2. PGE<sub>2</sub>-SPIEGEL IN DEN PLATTENEPITHELKARZINOMZELLINIEN VOR UND NACH BEHANDLUNG MIT DICLOFENAC

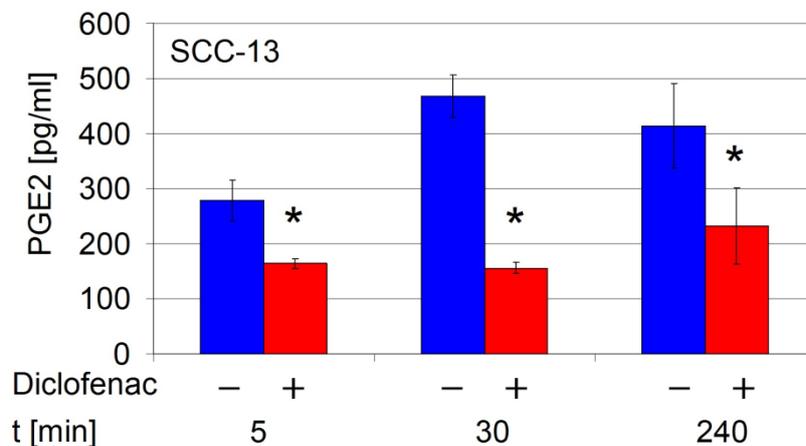
Anstelle von Diclofenac/HA wurde in den folgenden Experimente Diclofenac alleine eingesetzt, da eine Interferenz der Diclofenac in 0,25% HA-Salbe mit dem EIA-Assay zu nicht verwertbaren Ergebnissen geführt hatte. Es wurde eine Konzentration von 90 µg/ml Diclofenac, welche äquimolar mit 0.3% Diclofenac/HA-Salbe ist, eingesetzt.

Um ein besseres Verständnis für die funktionelle Bedeutung von PGE<sub>2</sub> in der Apoptose-Regulation zu erhalten, wurden im folgenden Experiment die PGE<sub>2</sub>-Spiegel in den vier SCC-Zelllinien bestimmt. Hierfür wurden die basalen PGE<sub>2</sub>-Spiegel sowie nach Behandlung mit Diclofenac aus dem Zellkultur-Überstand zu 4 und zu 24 Stunden nach Zugabe von frischem Wachstums-Medium ohne bzw. mit Diclofenac (90 µg/ml) mittels eines Enzym-Immunoassays (EIA) bestimmt. Es zeigten sich große Unterschiede der basalen PGE<sub>2</sub>-Niveaus in den verschiedenen SCC-Zelllinien. Während SCL-II, SCC-12 und SCC-13 zuvor als Apoptose-sensitiv charakterisiert wurden und hohe basale PGE<sub>2</sub>-Spiegel aufwiesen, zeigten sich im klaren Kontrast hierzu in der unter Diclofenac-Behandlung resistenten Zelllinie (SCL-I) erniedrigte basale PGE<sub>2</sub>-Level, die unterhalb dem Level der nicht-malignen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, die hier als Kontrolle verwendet wurde, datierten. Die Behandlung mit Diclofenac reduzierte signifikant PGE<sub>2</sub> in den drei sensitiven Zelllinien um 50% (SCL-II, SCC-12) bzw 44% (SCC-13) gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abb. 3.5).

Die Reduktion von PGE<sub>2</sub> wurde in einer limitierten Zeitkinetik anhand der Zelllinie SCC-13 untersucht (5 min, 30 min, 4 h). Hier zeigte sich bereits zu 5 min nach der Behandlung ein schnelles Ansprechen mit Verminderung der PGE<sub>2</sub>-Level (Abb. 3.6).



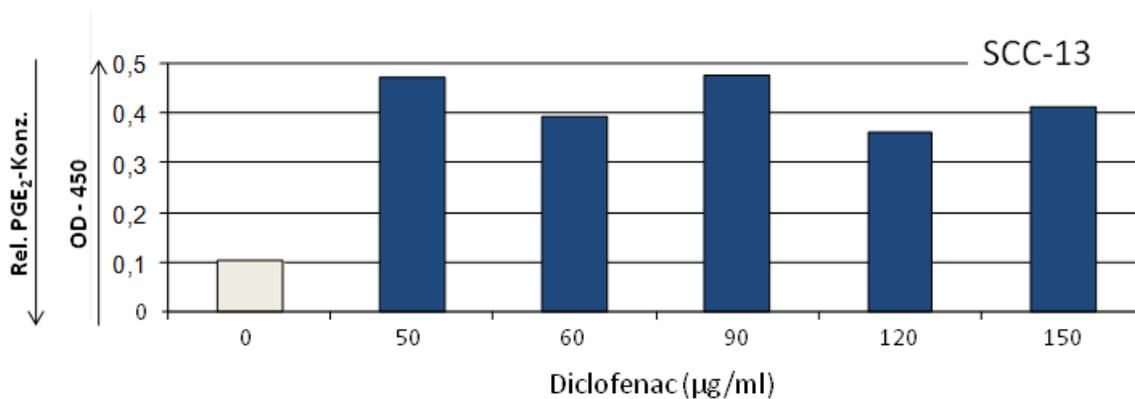
**Abb. 3.5: Herabregulation von PGE<sub>2</sub> in sensitiven Zelllinien durch Diclofenac.** Die PGE<sub>2</sub>-Spiegel wurden mit einem EIA aus dem Überstand der SCC-Zelllinien SCL-I, SCL-II, SCC-12 und SCC-13 sowie der nicht-transformierten HaCaT-Zelllinie bestimmt. Blaue Balken repräsentieren PGE<sub>2</sub>-Werte von unbehandelten Zellen (pg/ml) 4 h nach Mediumwechsel. Rote Balken korrespondieren zu Diclofenac behandelten Zellen (90 µg/ml, 4 h). 3 unabhängige Experimente zeigten ähnliche Ergebnisse. Sternchen weisen auf eine nach dem Students t-Test signifikante Reduktion des PGE<sub>2</sub> hin.



**Abb. 3.6: Frühe Senkung von PGE<sub>2</sub>.** PGE<sub>2</sub>-Spiegel in SCC-13 Zellen sind zu 5 min, 30 min und 4 h nach der Behandlung mit Diclofenac (90 µg/ml) abgebildet (rote Balken) im Vergleich mit nicht-behandelten Kontrollen (blaue Balken). Sternchen weisen auf eine nach dem Students t-Test signifikante Reduktion des PGE<sub>2</sub> hin.

### 3.2.3. PGE<sub>2</sub>-KONZENTRATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DICLOFENAC

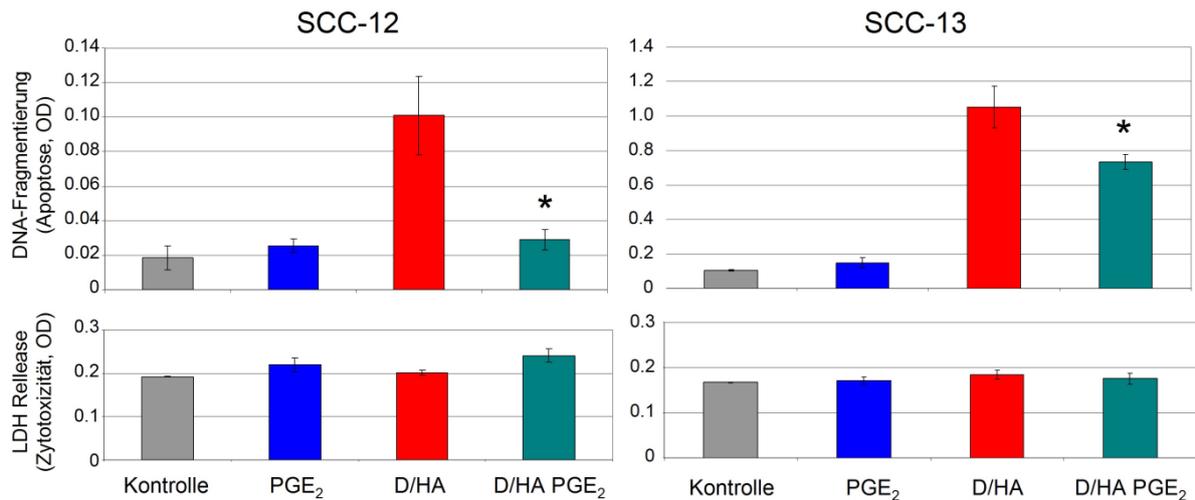
Ziel dieses Versuches war die Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen gemessener PGE<sub>2</sub>-Konzentration in den Überständen der Zelllinie SCC-13 nach Behandlung mit verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen (50-150 µg/ml). Alle eingesetzten Konzentrationen von 50-150 µg/ml Diclofenac senkten gleich wirksam die PGE<sub>2</sub>-Spiegel im Sinne einer Korrelation nullter Ordnung (Abb. 3.7). Es konnte kein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzten Diclofenac-Konzentrationen und gemessenem PGE<sub>2</sub>-Werten hergestellt werden, ebenso korrelierten die PGE<sub>2</sub>-Werte nicht mit den Apoptosewerten (vgl. Abb. 3.3.).



**Abb. 3.7: Konstante Senkung der PGE<sub>2</sub>-Level unter Einsatz verschiedener Diclofenac-Konzentrationen.** Gemessen wurde die OD-450/relative PGE<sub>2</sub>-Konzentration aus dem Überstand der Zelllinie SCC-13 mittels eines PGE<sub>2</sub>-EIA nach 4-stündiger Diclofenac-Behandlung. Die OD-450 verhält sich antiproportional zur relativen PGE<sub>2</sub>-Konzentration. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Senkung von PGE<sub>2</sub> nach Einsatz verschiedener Diclofenac-Konzentrationen (50-150 µg/ml). Die Senkung von PGE<sub>2</sub> bleibt konstant (Korrelation 0. Ordnung). Einfachwerte. Zwei durchgeführte Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.2.4. BLOCKIERUNG DICLOFENAC-INDUZierter APOPTOSE DURCH PGE<sub>2</sub>-SUBSTITUTION

Die Bedeutung des produzierten PGE<sub>2</sub> in Diclofenac/HA-induzierter Apoptose wurde in Diclofenac/HA-behandelten SCC-12 und SCC-13 Zellen durch Substitution von synthetischem PGE<sub>2</sub> überprüft. Diclofenac/HA Behandlung (0.3 %) induzierte Apoptose in SCC-12 und SCC-13 Zellen ohne einen Effekt auf die Zytotoxizität zu haben. Wichtig ist, dass die alleinige Gabe von PGE<sub>2</sub> (1.000 ng/ml) keinen Effekt auf den Zelltod hatte aber in beiden Zelllinien Diclofenac/HA-induzierte Apoptose signifikant reduzierte. Der blockierende Effekt durch PGE<sub>2</sub>-Supplementierung zu den behandelten Zellen unterstreicht die Bedeutung der Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Spiegel in Diclofenac/HA-induzierter Apoptose (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: PGE<sub>2</sub> blockiert durch Diclofenac induzierte Apoptose partiell.** Apoptose-Werte (DNA-Fragmentierung) und Zytotoxizität (LDH-Freisetzung) sind für SCC-12 und SCC-13 behandelte Zellen mit Diclofenac/HA (90 µg/ml), PGE<sub>2</sub> (1000 ng/ml) oder einer Kombination von beidem abgebildet. Die Untersuchungen wurden 24 h nach Behandlung durchgeführt. 3 unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Sternchen weisen auf nach dem Students t-Test signifikante Reduktion des PGE<sub>2</sub> hin.

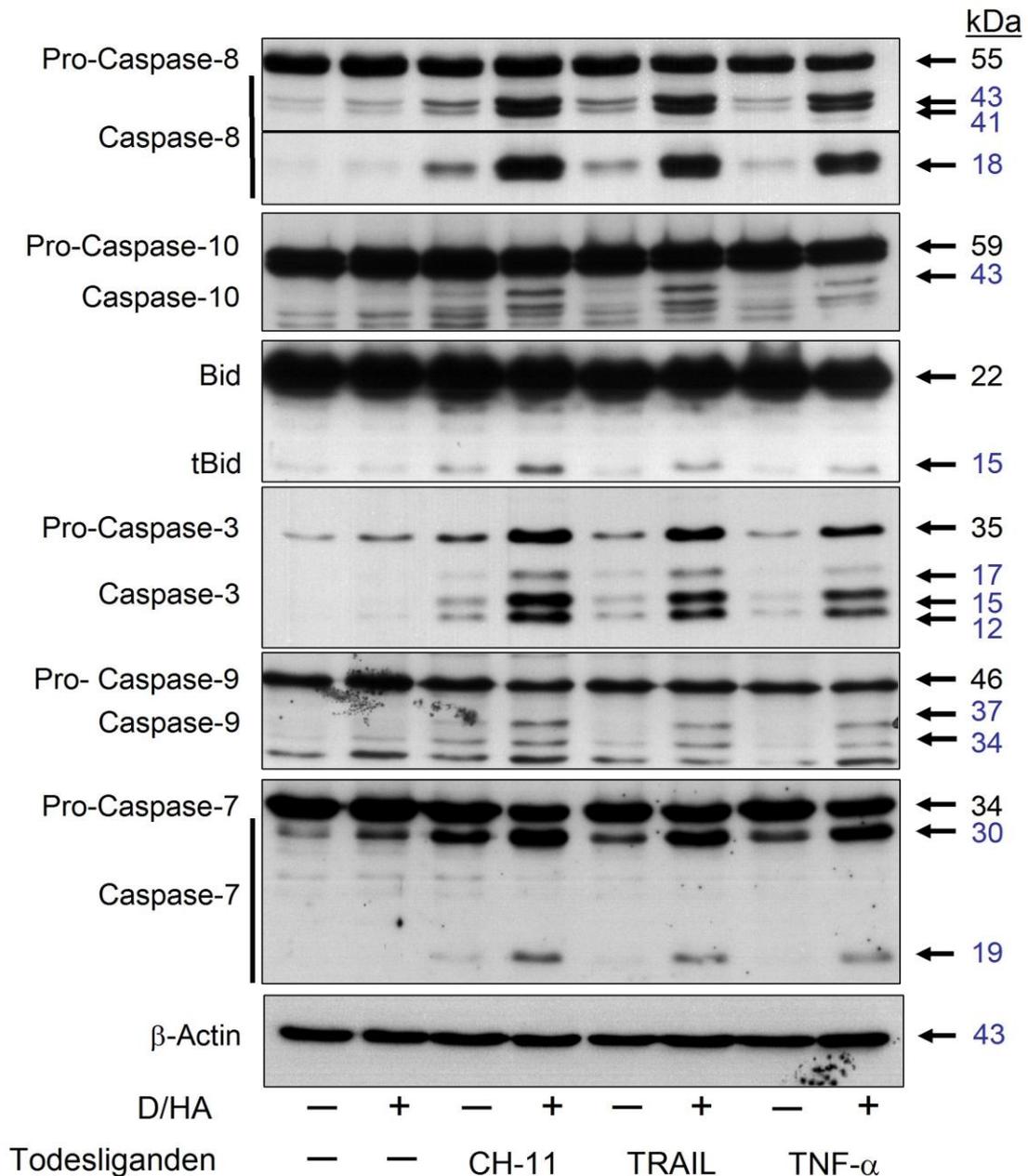
### 3.3. DER EXTRINSISCHE SIGNALWEG - TODESREZEPTOREN

#### 3.3.1. VERMEHRTE CASPASEN-AKTIVIERUNG NACH KOMBINierter BEHANDLUNG

Es wurde von uns ein Synergismus in der kombinierten Behandlung mit Todesliganden und Diclofenac nachgewiesen. Bereits durch die alleinige Behandlung mit Todesliganden (FasL/CD95L/CH-11, TNF- $\alpha$  und TRAIL) konnte in den sensitiven Zelllinien (SCL-II, SCC-12 und SCC-13) ein starkes Ansprechen erreicht werden. Das Ansprechen auf alleinige Todesliganden-Gabe wies auf eine Aktivität des extrinsischen proapoptotischen Signalweges in den SCC-Zellen hin. Nach kombinierter Behandlung konnte ein synergistischer Effekt in den sensitiven Zelllinien beobachtet werden, wohingegen in der Zelllinie SCL-I weder die Einzel-Behandlung mit Diclofenac/HA und Todesliganden noch die kombinierte Behandlung ein Ansprechen bewirkte, so dass für diese Zelllinie eine Resistenz gegenüber Diclofenac/HA und Todesliganden festzustellen ist (Fecker [... ] Rodust et al., *J. Invest Dermatol.*, 2010).

Als eine weitere Nachweismethode für die Apoptoseinduktion wurde in einem nächsten Schritt die Aktivierung der proapoptotischen Signalkaskade überprüft. Hierzu sind die Spaltprodukte für die Initiator-Caspasen des extrinsischen (Caspase-8,-10) und des intrinsischen Signalweges (Caspase-9) sowie die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -7) im Western-Blot nachgewiesen wurden. Ferner wurde das proapoptotische Protein tBid, als Brückenschlag zwischen Caspase-8

und dem mitochondrialen Signalweg, überprüft. Eine mäßige Bandenstärke der Caspasen-Spaltprodukte hinweisend für eine Caspasen-Aktivierung ist nach alleiniger Diclofenac- und Todesliganden-Behandlung zu verzeichnen. Analog zum beobachteten Synergismus bei der Apoptose-Messung zeigten sich verstärkte Spaltprodukte für tBid- und alle untersuchten Initiator- und Effektor-Caspasen- nach kombinierter Behandlung mit Todesliganden und Diclofenac (Abb. 3.9).



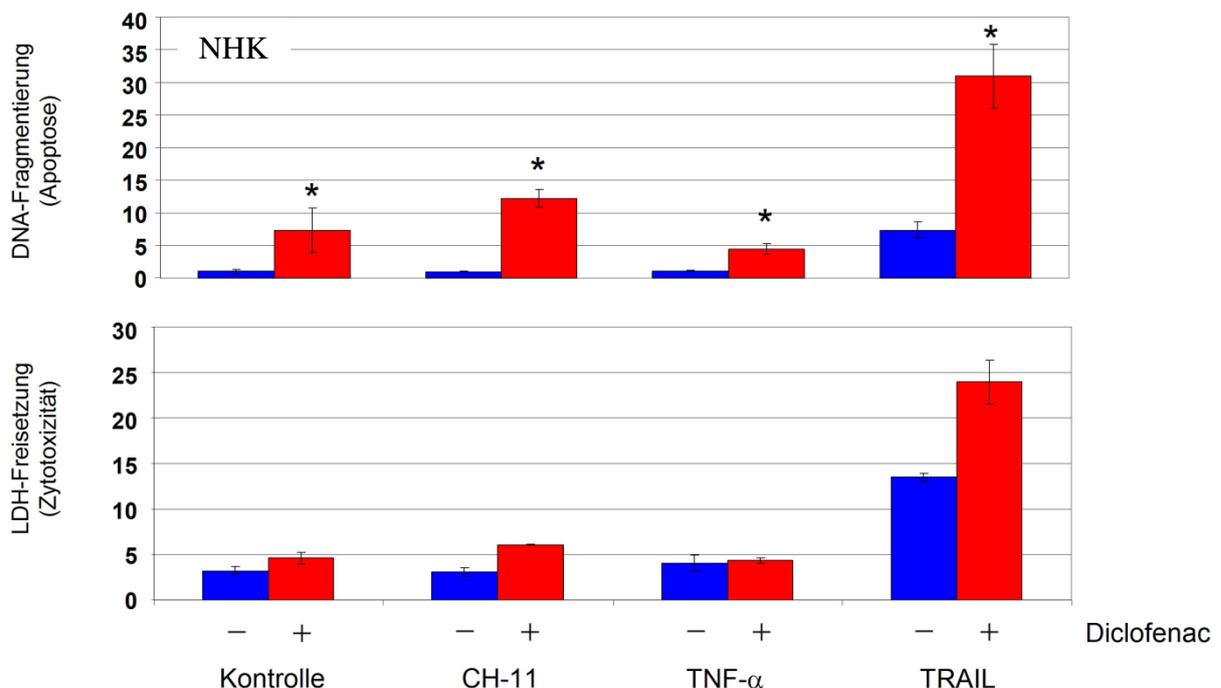
**Abb. 3.9: Verstärkte Caspasen-Aktivierung durch kombinierte Behandlung von Diclofenac/HA mit Todesliganden.** SCC-12 Zellen wurden mit Diclofenac/HA, CH-11, TRAIL oder TNF- $\alpha$  alleine oder in Kombination von D/HA und Todesliganden behandelt. Spezifische Spaltprodukte für Caspasen und Bid wurden im Western-Immunoblot nach Behandlung detektiert wie angegeben für Caspase-8 (18, 41, 43

kD), Caspase-10 (43 kD), tBid (15 kD), Caspase-9 (34, 37 kD), Caspase-3 (15, 17, 19 kD), und für Caspase-7 (19, 30 kD). Weiterhin Nachweis der Pro-Caspasen: Pro-Caspase 8 (55 kD), Pro-Caspase 10 (59 kD), Pro-Caspase 3 (35 kD), Pro-Caspase 9 (46 kD), Pro-Caspase 7 (34kD) sowie von nicht prozessiertem Bid (22 kD). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin Antikörper verwendet. Die Western-Blot Experimente wurden zweimal anhand unabhängiger Lysate mit ähnlichen Resultaten durchgeführt (Abb. aus Fecker et al., *Br J. Dermatol*, 2007).

### 3.3.2. KOSTIMULATIONSVERSUCHE MIT KERATINOZYTEN

Zur weiteren Untersuchung des kostimulatorischen Effektes von epithelialen Zellen wurden primäre Keratinozyten als Modell eingesetzt. Bei der Kostimulation von Keratinozyten mit Todesliganden und Diclofenac ergab sich ein starker synergistischer Effekt. Keratinozytenkulturen, die nach der zweiten Passage auf ihr Apoptoseverhalten untersucht wurden, sprachen auf alleinige CH-11 und TNF- $\alpha$  -Behandlung kaum an. TRAIL hingegen konnte die Apoptose gegenüber der unbehandelten Kontrolle 7-fach steigern.

Durch Diclofenac konnte die primäre Resistenz gegenüber CH-11 und TNF- $\alpha$  durchbrochen werden und für alle drei Todesliganden ein synergistischer Effekt in der Kombination mit Diclofenac gezeigt werden. In der Kostimulation mit Diclofenac erreichte CH-11 eine 12-fache, TNF- $\alpha$  eine 4-fache und TRAIL eine 30-fache Steigerung der Apoptose gegenüber der Basalapoptose (Abb. 3.10).

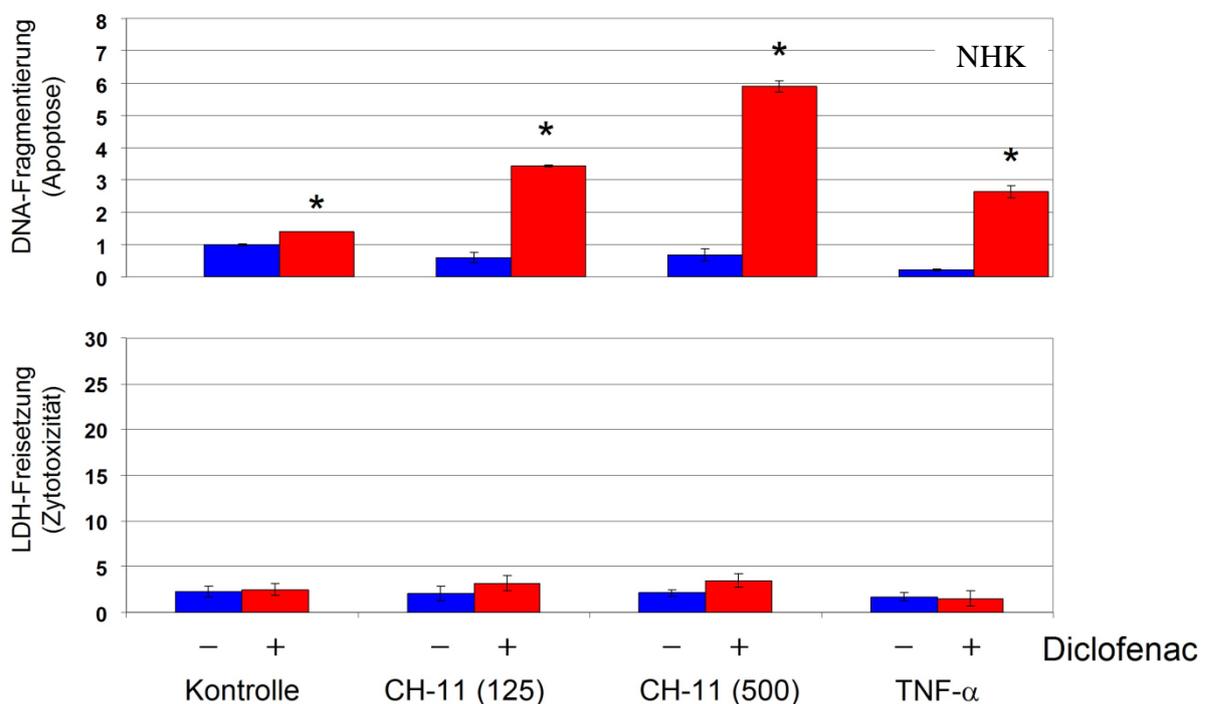


**Abb. 3.10: Synergismus von Diclofenac und Todesliganden in Keratinozyten-Primärkulturen (NHK).** Alleinige Behandlung mit Todesliganden löst mit Ausnahme von TRAIL keine Apoptose in

Keratinocyten aus (blaue Balken). Diclofenac verstärkt das Ansprechen der Keratinocyten gegenüber Todesligandengabe (rote Balken). Es wurden zwei Experimente mit jeweils Doppelwerten und vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Aussaat von 250.000 Zellen pro well.

### Einsatz von CH-11 in zwei Konzentrationen

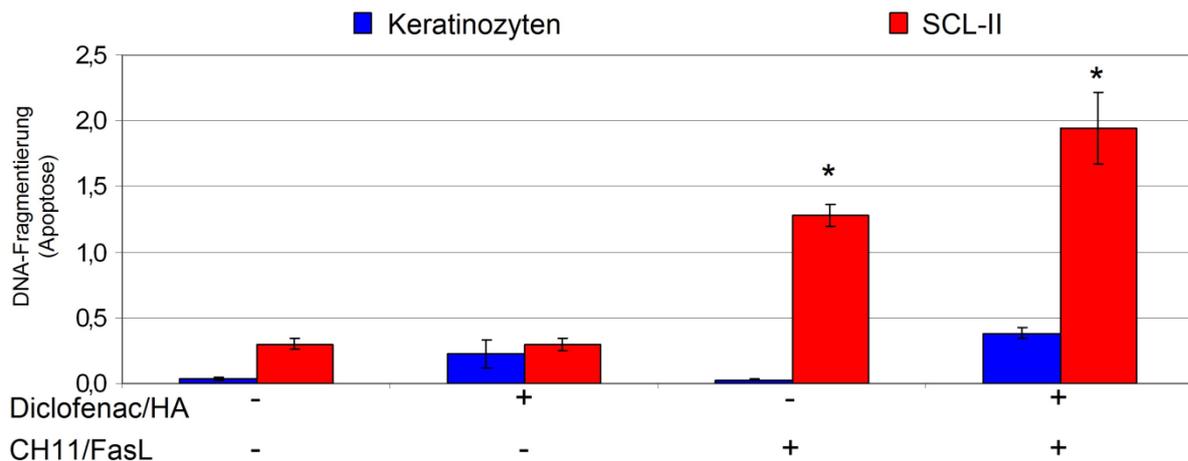
In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Keratinocyten in einer höheren Konfluenz ausgesät mit der Folge, dass weniger Keratinocyten abgelöst waren und eine Konfluenz von etwa 95% erreicht wurde. Die hiermit ermittelten Ergebnisse zeigen sogar eine Abnahme in der Apoptose bei alleiniger Zugabe der Todesliganden (CH-11 und TNF- $\alpha$ ). Nach TNF- $\alpha$ -Behandlung nahm die Apoptose um 80% und nach CH-11-Gabe um etwa 40% ab. Unter vierfacher Erhöhung der CH-11-Konzentration zeigte sich die Apoptose gegenüber der Kontrolle unbeeinflusst. Durch die gleichzeitige Behandlung mit Diclofenac und gesteigerter Todesliganden-Konzentration (500 ng/ml) konnte die Apoptose-auslösende Wirkung hingegen signifikant gesteigert werden gegenüber der Kostimulation mit normaler CH-11 Konzentration (125 ng/ml).



**Abb. 3.11: Dosiserhöhung von CH-11 erst nach Kombination mit Diclofenac Apoptose-steigernd (NHK).** Eine 4-fache Erhöhung der CH-11-Konzentration löst keine Apoptose nach alleiniger Behandlung in Keratinocyten aus. Wird Diclofenac zusätzlich gegeben, zeigt die höhere CH-11-Konzentration (500 ng/ml) eine um 70% gesteigerte Apoptose gegenüber der Kostimulation mit der niedrigeren CH-11-Dosis (125 ng/ml) auf. Die Zytotoxizität (LDH-Freisetzung) ist unbeeinflusst. Es

wurden zwei Experimente mit jeweils Doppelwerten und vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Aussaat von 400.000 Zellen pro well.

In einem weiteren Experiment wurde die Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL-II mit primären Keratinozyten auf das Ansprechen gegenüber der Behandlung mit CD95L, Diclofenac sowie der Kombination beider Stimulantien hin verglichen. Die Zelllinie SCL-II sprach im Vergleich zu Keratinozyten deutlich stärker gegenüber CH-11/FasL an (Abb. 3.12).

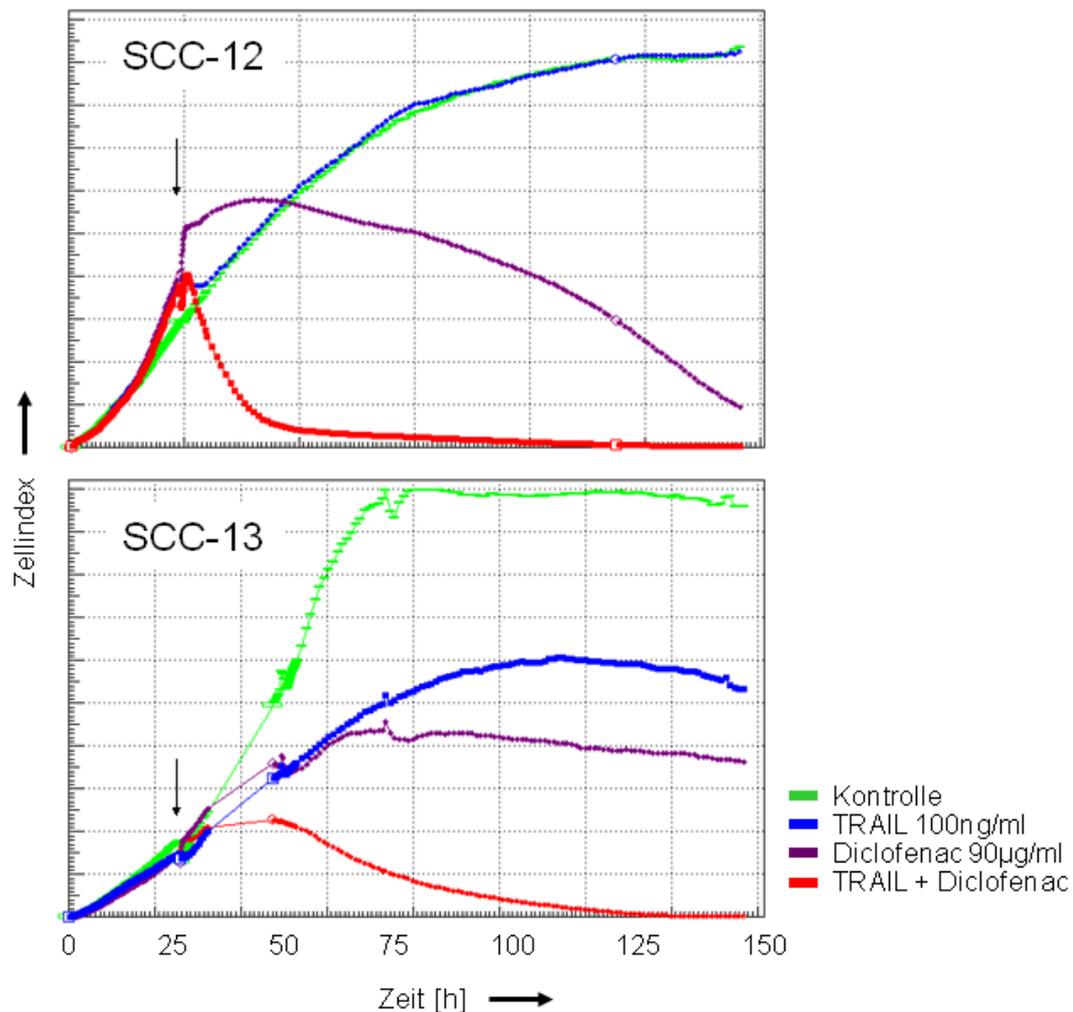


**Abb. 3.12: Verstärkte Apoptose in SCL-II gegenüber Keratinozyten-Primärkulturen.** Der Vergleich der Apoptoseraten zeigt, dass die entartete SCL-Zelllinie (rote Balken) insgesamt 5-fach stärker auf die Kostimulation von CH-11 und Diclofenac/HA anspricht als primäre Keratinozyten (blaue Balken). Es wurden zwei Experimente mit jeweils Doppelwerten und vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

### 3.3.3. DER EINFLUSS VON DICLOFENAC UND TRAIL AUF DIE PROLIFERATIONSRATE

Mit der Echt-Zeit-Zell-Analyse (real time cell analysis - RTCA) wurde in diesem Experiment eine kontinuierliche Aufzeichnung der Proliferation nach alleiniger sowie kombinierter Diclofenac- und TRAIL-Behandlung durchgeführt. Dabei wurden die Widerstände der Zelldichten in den Mikrotiter-Wells kontinuierlich gemessen. Der Widerstand korreliert positiv mit der Zelldichte, so dass bei Zunahme der Zellkonfluenz ein Anstieg des Widerstandes resultiert. Die Zelldichten von SCC-12 und SCC-13 Zellen wurden kontinuierlich über 150 h in einer Mikrotiter-Platte gemessen. 20 h nach Aussaat wurden die entsprechenden Stimulationen durchgeführt. Unbehandelte Kontroll-Zellen wuchsen kontinuierlich weiter bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens, was graphisch dem Verlauf einer Sättigungskurve entspricht. Mit TRAIL behandelte Zellen reagierten unterschiedlich: Die Zelllinie SCC-12 blieb gegenüber der TRAIL-Stimulation gegenüber der unbehandelten Kontrolle weitestgehend unbeeinflusst, wohingegen der Zellindex in der Zelllinie SCC-13 unter TRAIL-Behandlung deutlich abnahm.

Nach Behandlung mit Diclofenac in der Konzentration von 90 µg/ml stagnierte (SCC-12) bzw. wurde der Zellindex negativ (SCC-13). In der Kombination beider Substanzen ist eine deutliche Verstärkung des Effektes auf den Zellindex zu beobachten. Der Nullpunkt wird in der kombinierten Behandlung nach ein (SCC-12) bzw. zwei Tagen (SCC-13) erreicht (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: Synergistischer Effekt auf die Zellkonfluenz durch Diclofenac und TRAIL.** Echt-Zeit Zellanalyse zur Überprüfung der Zellkonfluenz (Zellindex) der Zelllinien SCC-12 und SCC-13 über einen Zeitraum von 150 h. Gezeigt werden die unbehandelte Kontrolle (grüne Kurve) sowie die Behandlungen mit den folgenden Substanzen: TRAIL (blaue Kurve), Diclofenac 90 µg/ml (violette Kurve) und die Kombination von TRAIL + Diclofenac in den o.g. Konzentrationen (rote Kurve). Die Pfeilspitzen markieren den Beginn der Behandlung. Das Experiment wurde jeweils zweimal mit zwei verschiedenen Aussaat-Dichten von 10.000 und 20.000 Zellen durchgeführt. Hier sind die Ergebnisse mit 10.000 Zellen dargestellt. Die unterschiedlichen Aussaaten sowie das zweite Experiment zeigten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.4. URSACHEN DES SYNERGISMUS VON TODESLIGANDEN UND DICLOFENAC

Verschiedene Regulationen können Auslöser der Sensitivierung von Keratinozyten und Plattenepithelkarzinomzelllinien gegenüber Todesliganden durch Solaraze/Diclofenac-Behandlung sein. Es wurden daher die folgenden Schnittstellen des extrinsischen Signalweges überprüft:

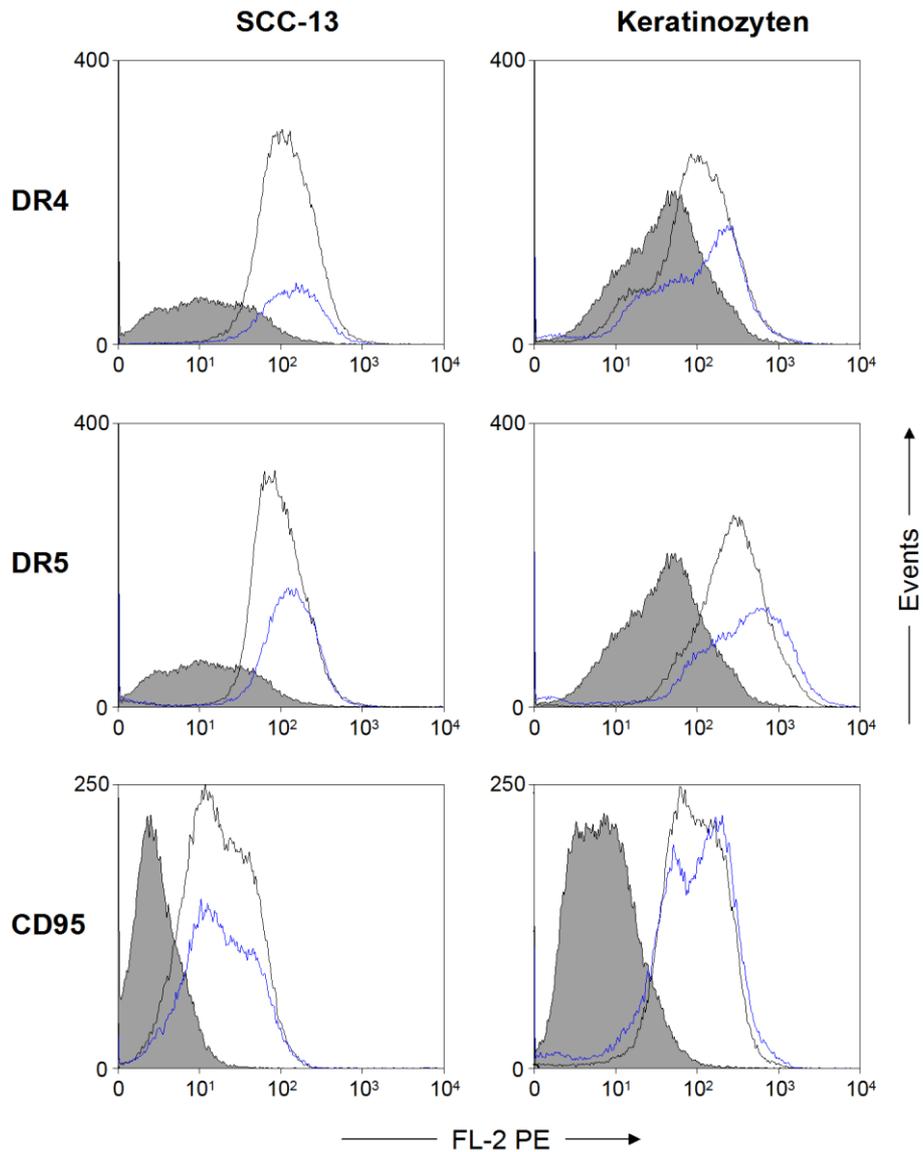
- a. Todesrezeptorexpression im FACS
- b. Raft-Bildung überprüft mittels:
  - Fluoreszenz-Mikroskopie
  - Saure-Sphingomyelinase-Aktivität
- c. FLIP-Expression

#### 3.4.1. TODESREZEPTOREXPRESSION NACH DICLOFENAC-BEHANDLUNG

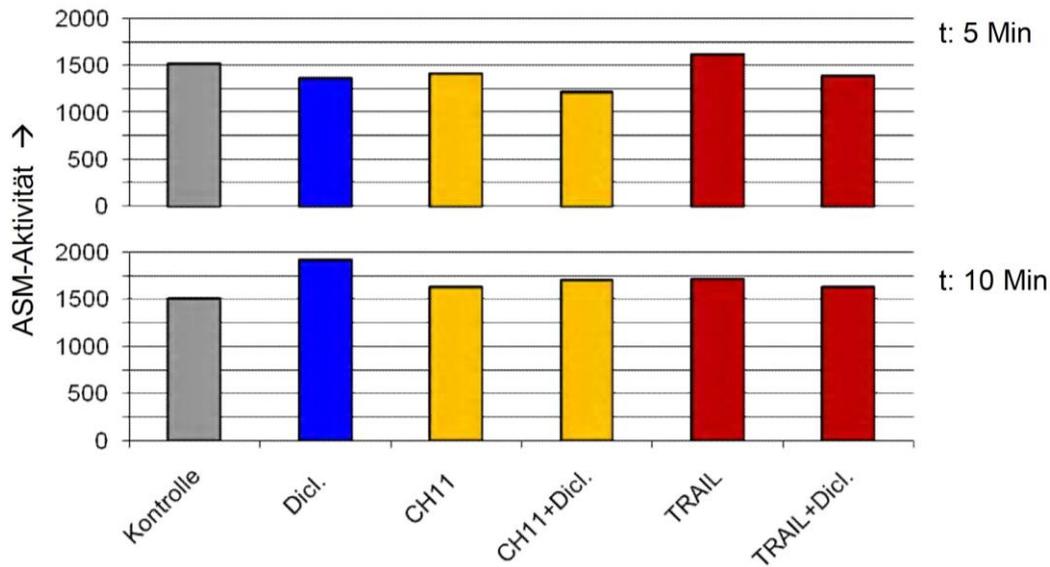
Primäre Keratinozyten wiesen in oben gezeigten Experimenten gegenüber alleiniger CD95L- und TRAIL-Behandlung eine absolute bzw. relative Resistenz auf. Erst nach Kostimulation von Diclofenac und Todesliganden wurden synergistische Effekte auf die Apoptose erzielt (Abb. 3.10, Abb. 3.12). Zur Überprüfung der Hypothese, ob eine Zunahme der Todesrezeptorexpression unter Diclofenac-Behandlung vorliegt, die ursächlich für die Sensitivierung gegenüber Todesliganden sein könnte, wurden die entsprechenden Rezeptoren einer Plattenepithelkarzinomzelllinie (SCC-13) sowie von primären Keratinozyten vor und nach Diclofenac-Behandlung im FACS überprüft (Abb. 3.14).

#### 3.4.2. SAURE SPHINGOMYELINASE-AKTIVITÄT

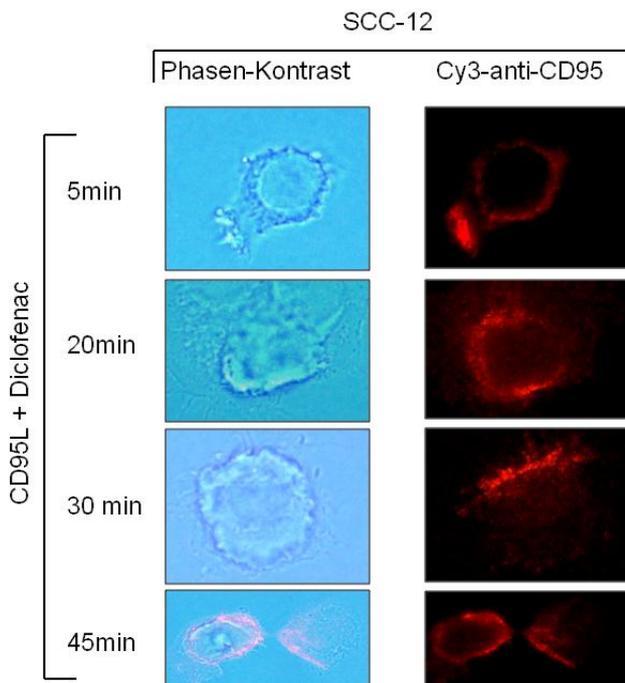
Die aktivierte saure Sphingomyelinase (ASM) spaltet aus Sphingomyelin Ceramid ab. Ceramid-Moleküle lagern sich in die Membran ein und stabilisieren Rafts. Diese membranständigen Veränderungen können zur Aktivierung des extrinsischen Signalweges führen. Ziel dieses Experimentes war es zu überprüfen, ob der Sensitivierung gegenüber Todesliganden eine Aktivierung der sauren Sphingomyelinase durch Diclofenac zugrunde liegt. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Aktivität der ASM nach Behandlung mit Diclofenac, Todesliganden sowie der Kombination beider Substanzen (Abb. 3.15). Ebenso wurde überprüft, ob die o.g. Behandlungsregimes nach Färbung gegenüber DR4, DR5 und CD95 ein Clustering der entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche von SCC-12 bewirken. Im Fluoreszenz-Mikroskop zeigten sich keine Hinweise auf Clustering nach Behandlung mit Diclofenac und Todesliganden sowie der Kombination beider Substanzen (Abb. 3.16).



**Abb. 3.14: Oberflächenexpression von TRAIL-R1/DR4, -R2/DR5 und CD95 in SCC-13 und Keratinozyten.** Die Darstellung der FACS-Daten erfolgte in Form von Overlay-Histogrammen. Die Kontrolle ist grau hinterlegt. Die schwarze Kurve entspricht der unbehandelten Probe und die blaue Kurve der entsprechenden Expression der Todesrezeptoren 24 h nach Behandlung mit Diclofenac (90 µg/ml). Es wurden drei Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.



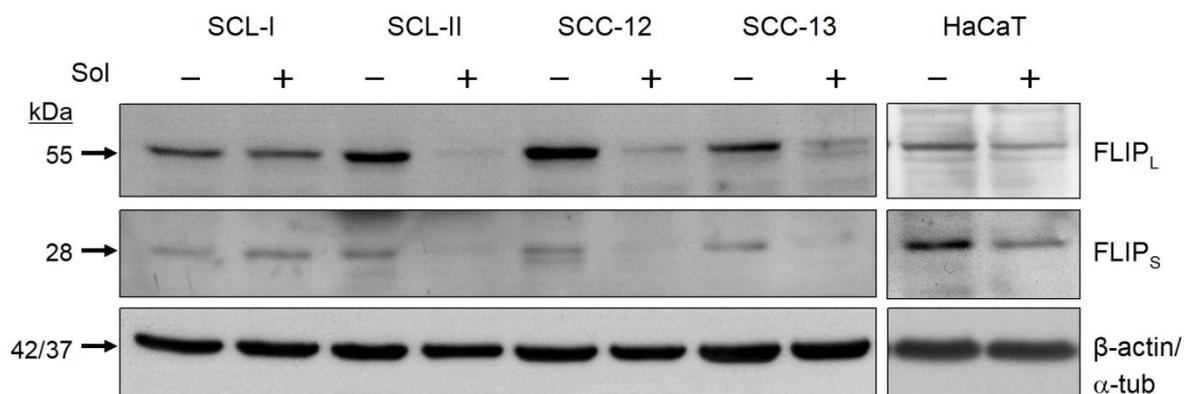
**Abb. 3.15: Unveränderte Aktivität der sauren Sphingomyelinase (ASM) nach verschiedenen Behandlungsregimes.** Die Aktivität der ASM wurde durch Degradation von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Sphingomyelin zu  $^{14}\text{C}$ -markiertem Phosphorylcholin ermittelt. Zu den Zeitwerten 5 Min (A) und 10 Min (B) nach Stimulation mit Diclofenac, CH11, TRAIL sowie der Kombination von Diclofenac mit Todesliganden wurden Zelllysate hergestellt und mit der Kontrolle verglichen. Die Aktivität von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Phosphorylcholin in der wässrigen Phase wurde gemessen, was der Aktivität der ASM entspricht. Es wurden zwei Versuche mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.



**Abb. 3.16: Kostimulation mit CD95L und Diclofenac.** Die Zelllinie SCC-12 wurde mit CD95L und Diclofenac stimuliert und anschließend eine Färbung mit FITC-gekoppeltem anti-CD95 Antikörper auf der Zellmembranoberfläche durchgeführt. Es waren keine Unterschiede zur Kontrolle feststellbar. Mehranreicherung von anti-CD95 Antikörpern können in der Phasen-Kontrast Untersuchung als Versetzung bzw. Überlagerung von Membranen gedeutet werden, so dass kein Clustering nachweisbar ist. Das Experiment wurde zweifach durchgeführt.

### 3.4.3. C-FLIP EXPRESSION

Die proapoptotische Aktivität von Todesrezeptoren wird entscheidend über den kompetitiven Caspase-8/-10 Inhibitor c-FLIP reguliert. Die beiden Isoformen FLIP<sub>S</sub> und FLIP<sub>L</sub> können die Bindung der Initiator-Caspase an den DISC und deren Aktivierung verhindern. Alle vier SCC-Zelllinien zeigen eine signifikante basale Expression von FLIP<sub>L</sub> und FLIP<sub>S</sub>. Nach 24 h Behandlung mit Diclofenac zeigen beide Isoformen eine deutliche Herabregulation in den Apoptose-sensitiven Zelllinien SCL-II, SCC-12, SCC-13 und in HaCaT. Keine Veränderungen in der Expression von c-FLIP wurden in der resistenten Zelllinie SCL-I beobachtet.



**Abb. 3.17: Expression von FLIP<sub>L</sub> (55 kD) und FLIP<sub>S</sub> (28 kD) in den vier SCC Zelllinien ist gezeigt.** Die Zellen wurden für 24 h mit 0.3% Solaraze (+) behandelt und mit unbehandelten Zellen (-) verglichen. Als Ladekontrolle wurde β-Actin Antikörper eingesetzt. Das Experiment wurde 3-mal mit unabhängigen Zelllysaten durchgeführt und zeigte ähnlichen Ergebnisse (Abb. aus Fecker [... ] Rodust et al., *J. Invest Dermatol.*, 2010).

## 3.5. DER INTRINSISCHE SIGNALWEG - BCL-2-PROTEINE

### 3.5.1. PRO- UND ANTIAPOPTOTISCHE VERÄNDERUNGEN AUF DER EBENE DER BCL-2-PROTEINE

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus von proapoptotischen Chemotherapeutika ist die Familie der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine von besonderer Bedeutung. Hierzu wurde die Expression der pro-apoptotischen Multidomäne Proteine (i), der anti-apoptotischen Multidomäne Proteine (ii) und die BH3-only Proteine (iii) in den vier SCC-Zelllinien nach Diclofenac/HA Behandlung untersucht.

Bcl-2 sowie die Vertreter aus der pro-apoptotischen Multidomäne Proteine, Bax und Bak, wiesen keine Veränderungen in der Expression auf (Abb. 3.18), jedoch konnten viele andere Regulation identifiziert und somit gezeigt werden, dass die Bcl-2 Protein-Superfamilie eine wichtige Plattform für die Apoptoseregulation durch Diclofenac/HA darstellt.

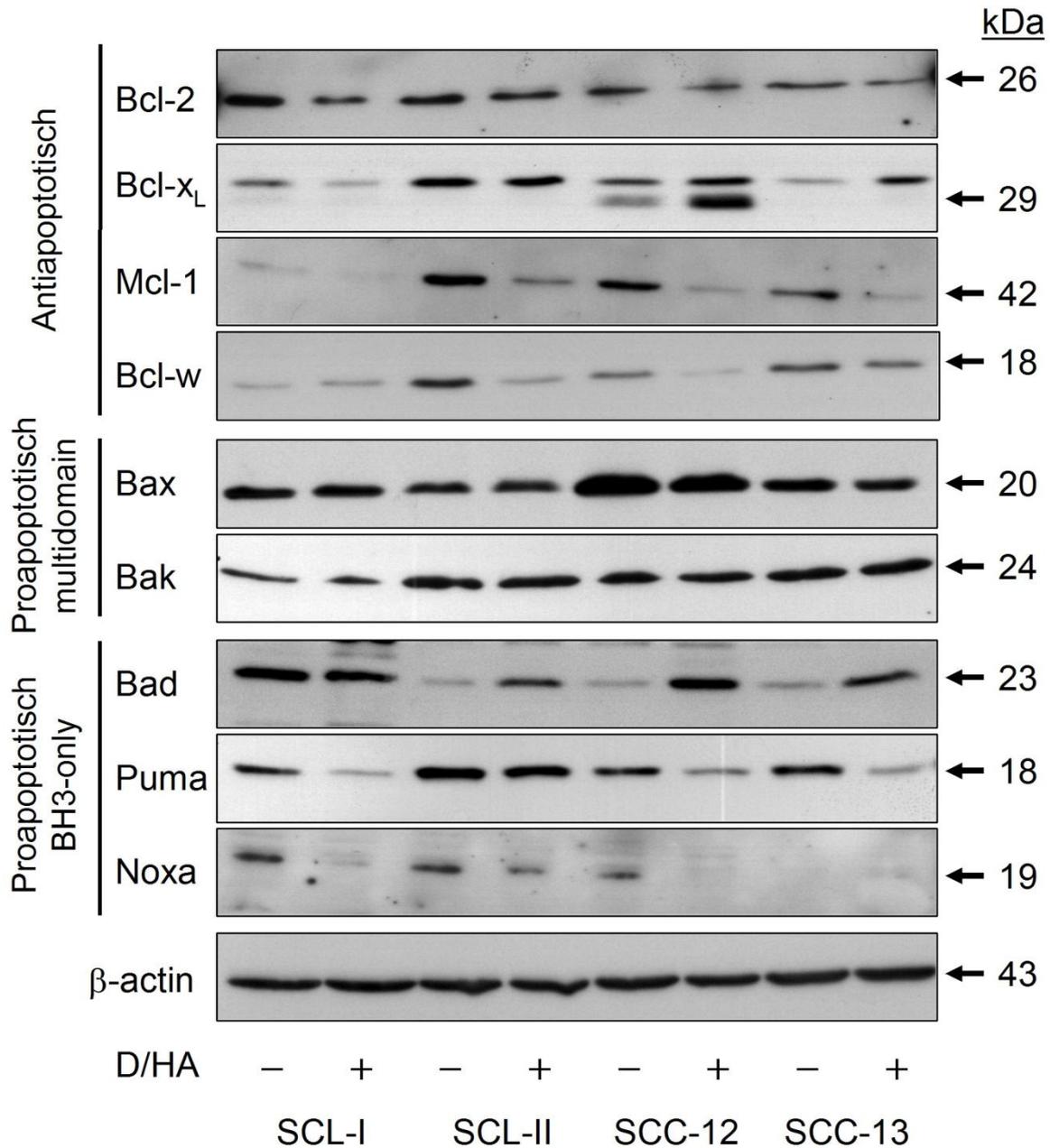
Als proapoptotische Effekte innerhalb der Gruppe der Bcl-2-Proteine konnte für die sensitiven Zelllinien (SCL-II, SCC-12 und SCC-13) eine Herabregulation von Mcl-1 und Bcl-w sowie eine Hochregulation des proapoptotischen BH3-only-Proteins Bad nachgewiesen werden. Im Besonderen zeigten sich diese Veränderungen nicht in der resistenten Zelllinie SCL-I. Weiterhin wies die resistente Zelllinie (SCL-I) bereits vor Diclofenac/HA-Behandlung eine niedrige Mcl-1 und Bcl-w Expression und eine hohe basale Expression des proapoptotischen BH3-only Proteins Bad auf (Abb. 3.18).

#### *Antiapoptotische Regulationen:*

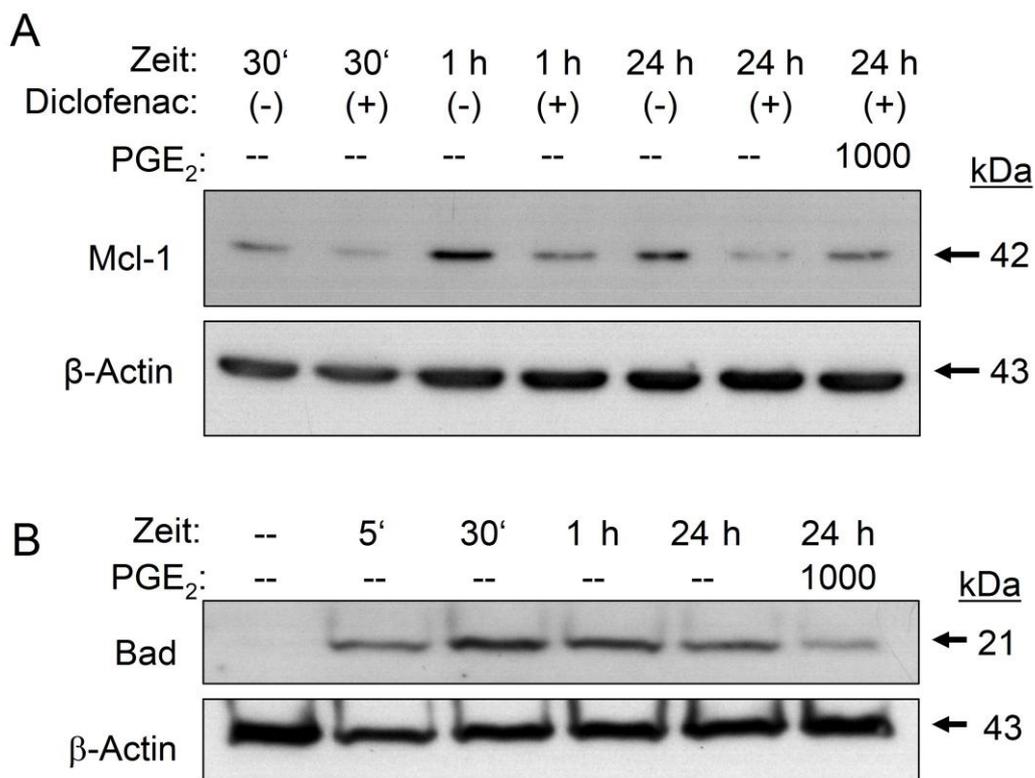
Andere Veränderungen waren offensichtlich antiapoptotischer Natur, wie die Herabregulation der proapoptotischen BH3-only Proteine Puma und Noxa durch Diclofenac/HA in den meisten Zelllinien. Zusätzlich findet eine Hochregulation des antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub> in SCC-12 statt. Diese Effekte könnten negative Feedback-Regulationen darstellen und somit die Apoptose möglicherweise abschwächen. Im Besonderen zeigten sich Puma und Noxa auch in der resistenten Zelllinie SCL-I herab reguliert, was hinweisend auf das allgemeine Ansprechen dieser Zelllinie sein könnte, jedoch keine Apoptose zur Folge hatte (Abb. 3.18).

#### *Zeitkinetik:*

Die Hochregulation von Bad und Herabregulation von Mcl-1 in SCC-12 Zellen erfolgte zu einem recht frühen Zeitpunkt von 30min nach Beginn der Behandlung. Der Zusammenhang zwischen der Regulation von Bcl-2-Proteinen mit PGE<sub>2</sub>-medierten Signalen konnte durch PGE<sub>2</sub>-Substitutionsexperimente hergestellt werden. Die Hochregulation von Bad und Herabregulation von Mcl-1 konnten durch PGE<sub>2</sub>-Substitution mit einer Endkonzentration von 1000 ng/ml PGE<sub>2</sub> reduziert werden (Abb. 3.19).



**Abb. 3.18: Veränderungen auf der Ebene der Bcl-2-Proteine nach Diclofenac/HA-Behandlung.** Die Expression der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-w), der proapoptotischen Multidomäne Bcl-2-Proteine (Bax, Bak) und der proapoptotischen BH3-only Proteine (Bad, Puma, Noxa) wurde mittels Western-Immunoblot Analyse für die vier SCC-Zelllinien mit und ohne Diclofenac (90 µg/ml, 24 h) bestimmt. Als Ladekontrolle wurden die Blots mit β-Actin inkubiert. Die Western-Blot Experimente wurden dreimal durchgeführt mit jeweils unabhängigen Zelllysatreihen und ähnlichen Ergebnissen.



**Abb. 3.19: Frühe Regulation der Bcl-2-Proteine.** Zeitkinetik der Mcl-1 Herab- und Bad Hochregulation in SCC-12 Zellen nach Behandlung mit Diclofenac/HA (90µg/ml) (Sol.) mittels Western Immunoblot. Die behandelten Kulturen wurden zusätzlich mit PGE<sub>2</sub> (500 oder 1000 ng/ml) supplementiert. Zwei unabhängige Experimente mit ähnlichen Ergebnissen wurden durchgeführt.

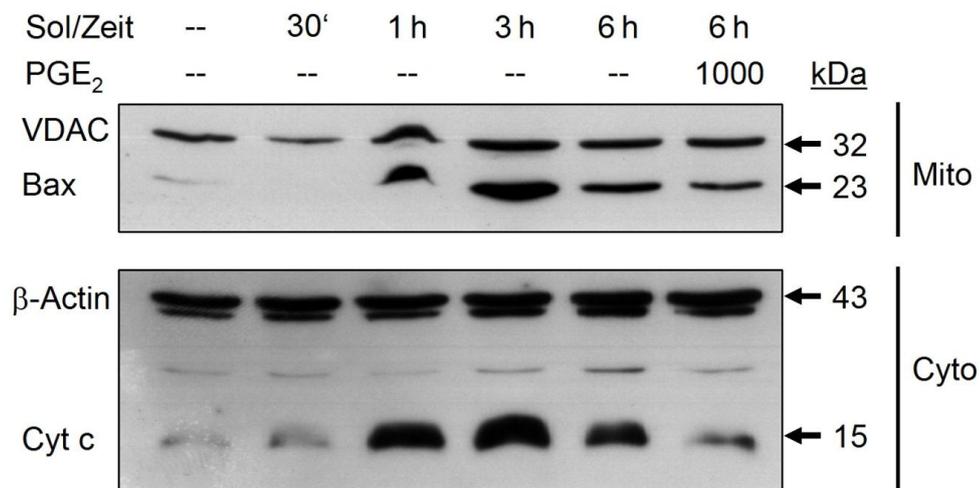
**Tabelle 3.1.: Zusammenfassung der Regulationen der Bcl-2-Proteine und ihre Auswirkungen auf die Apoptose.** Die dargestellten Regulationen der Bcl-2-Proteine aus Abb. 3.18 sind in dieser Abbildung zusammengefasst und der entsprechenden funktionellen Bedeutung: proapoptotisch, antiapoptotisch, unverändert und keine Expression zugeordnet.

|                                   | Anti-apoptotisch/<br>Multidomäne | Pro-apoptotisch/<br>Multidomäne | Pro-apoptotische/<br>BH3-only |
|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Pro-apoptotische<br>Regulationen  | Mcl-1 ↓<br>Bcl-w ↓               | Bax (mitoch.) ↑                 | Bad ↑                         |
| Anti-apoptotische<br>Regulationen | Bcl-x(L) ↑                       |                                 | Puma ↓<br>Noxa ↓              |
| Keine Regulationen                | Bcl-2                            | Bax (Gesamtprotein)             |                               |

### 3.5.2. AKTIVIERUNG DES MITOCHONDRIALEN SIGNALWEGES

Proapoptotische Veränderungen der Bcl-2-Proteine auf der Expressions-Ebene sollen verantwortlich für die Kontrolle des mitochondrialen Signalweges sein – häufig assoziiert mit einer Translokation von Bax und einer Freisetzung von mitochondrialen Faktoren in das Zytosol. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden mitochondriale und zytosolische Fraktionen separiert und mittels Western-Immunoblot analysiert. Diclofenac behandelte Zellen der Zelllinie SCC-12 wurden auf Bax-Translokation und Cytochrom c-Freisetzung untersucht. Es zeigte sich eine Bax-Translokation sowie Cytochrom c Freisetzung 1h nach Behandlung. Auch hier konnte eine Abschwächung der Effekte durch gleichzeitige PGE<sub>2</sub> -Gabe von 1000 ng/ml erreicht werden (Abb. 3.20).

Es wird eine zeitliche Sequenz der Diclofenac-induzierten Apoptose deutlich. Diese führt über eine Inhibition der COX-2, zu einem verminderten PGE<sub>2</sub>-Spiegel und konsekutiv zu multiplen Regulationen der Bcl-2-Proteine mit einer Induktion der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade.



**Abb. 3.20: Aktivierung der mitochondrialen Signalkaskade.** Mitochondriale Protein-Fractionen (Mito) und cytosolische Protein-Fractionen (Cyto) wurden von der Zelllinie SCC-12 isoliert. Für die Bestimmung der Zeitabhängigkeit wurden die Proteine nach 30 min, 1 h, 3 h und 6 h nach Diclofenac-Behandlung (90 µg/ml) geerntet. Extrakte mit zusätzlich 1000 ng/ml supplementiertem PGE<sub>2</sub> parallel zur sechs-stündigen Diclofenac-Behandlung wurden untersucht. Zeitabhängige Aktivierung von Bax (Translokation an die Mitochondrien) wird in der Western-Blot Analyse der mitochondrialen Extrakte gezeigt sowie zeitabhängige Freisetzung von Cytochrom c (Translokation von den Mitochondrien in das Zytosol) wird mittels zytosolischer Proteinextrakte im Western-Immunoblot nachgewiesen. Mitochondriale Fraktionen werden normalisiert mit dem voltage-dependent anion channel protein (VDAC) und zytosolische Fraktionen wurden mit β-Actin normalisiert. Drei unabhängige Experimente mit unabhängigen Zelllysatreihen ergaben vergleichbare Ergebnisse.

### 3.6. GEGENREGULATIONEN

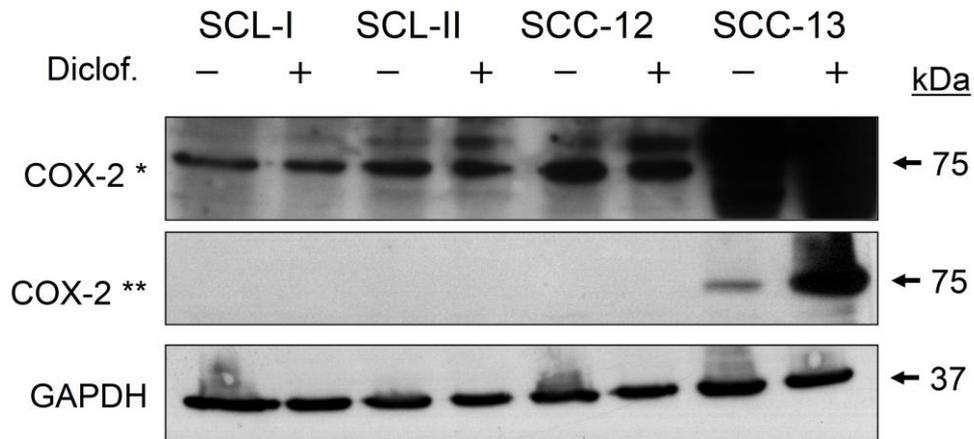
#### *3.6.1. HOCHREGULATION DER MAPK-SIGNALKASKADE UND DER COX-2-EXPRESSION*

In den Zelllinien, die sensitiv gegenüber Diclofenac-Behandlung sind, zeigte sich eine Hochregulation der COX-2 Expression nach 24-stündiger Diclofenac-Behandlung. Die basale Expression von COX-2 war in den SCC-Zelllinien nur schwach detektierbar. Eine Induktion von COX-2 wurde in SCC-13 beobachtet (Abb. 3.21).

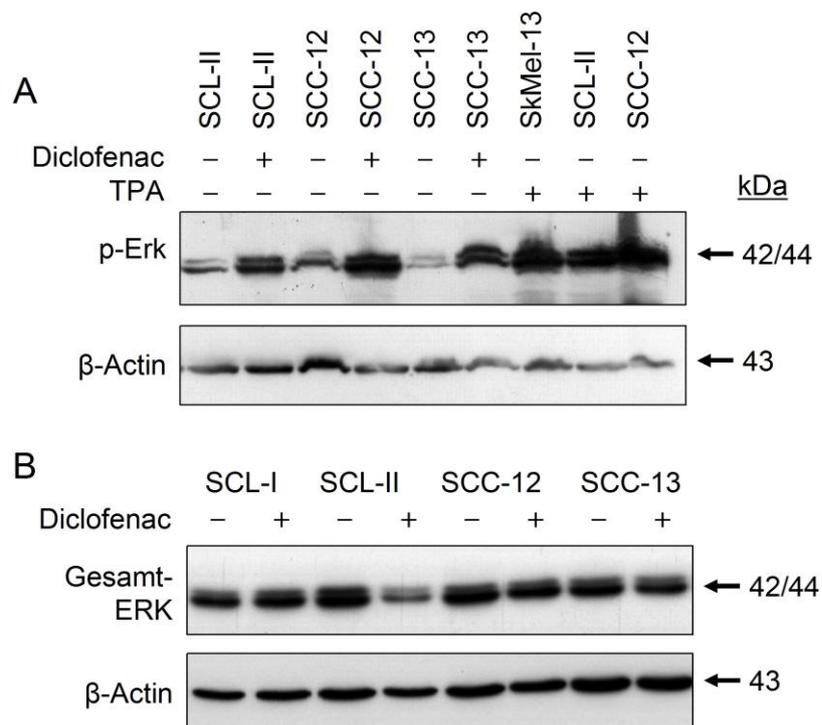
Die Expression von Phospho-p44/42 MAPK bzw. Phospho-Erk wurde in den sensitiven Zelllinien (SCL-II, SCC-12 und SCC-13) vor und nach Diclofenac-Gabe untersucht. Gegenüber der basalen Expression zeigte sich in allen drei Zelllinien nach Behandlung eine starke Induktion von p-Erk. Die Total-Erk-Expression (Phospho-Erk und De-Phospho-Erk) blieb unter Behandlung in allen Zelllinien unverändert, so dass wahrscheinlich die Zunahme der Phospho-Erk-Expression durch eine Interkonversion von De-Phospho-Erk zu Phospho-Erk bei konstanter Total-Erk-Expression hervorgerufen wurde (Abb. 3.22).

#### *3.6.2. VERSTÄRKUNG DER ANTIPROLIFERATIVEN WIRKUNG VON DICLOFENAC DURCH KOMBINATION MIT EINEM MEK-INHIBITOR*

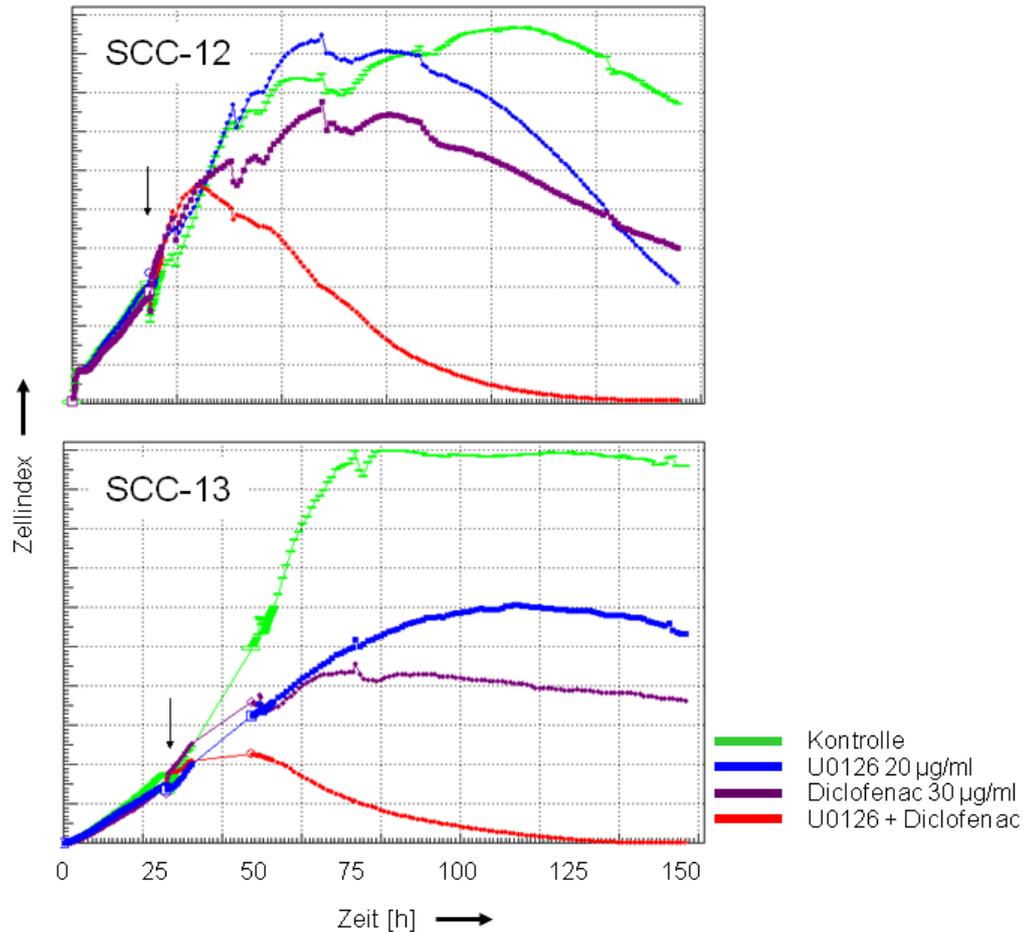
Die Real-Time-Zell-Analyse (real time cell analysis - RTCA) wurde für die Untersuchung der Effekte von Diclofenac und dem MEK1-/MEK2-Inhibitor (U0126) alleine sowie nach Kombination beider Substanzen eingesetzt. Hierbei ergab sich ein ähnlicher synergistischer Effekt in der Kombinationsbehandlung von Diclofenac und dem MEK-Inhibitor wie nach kombinierter TRAIL-Diclofenac-Behandlung (Abb. 3.13). Es wurde in dem folgenden Experiment eine niedrigere Diclofenac-Konzentration von 30 µg/ml gewählt, so dass sich der Kurvenverlauf nach Kombinationsbehandlung deutlicher von den Einzelbehandlungsregimes absetzen konnte.



**Abb. 3.21: COX-2 Hochregulation in den sensitiven Zelllinien.** Nach 24 stündiger Behandlung mit Diclofenac tritt eine Hochregulation der COX-2 Expression in SCL-II, SCC-12 und SCC-13 ein. Das Experiment wurde dreimal mit unabhängigen Zelllysatreihen durchgeführt und zeigte vergleichbare Ergebnisse. \* maximale Exposition, \*\* Expositionszeit von 2 min.



**Abb. 3.22: Hochregulation von Phospho-Erk durch Diclofenac.** Die Zellen (SCL-II, SCC-12, SCC-13) wurden für 24 h mit Diclofenac (90µg/ml) behandelt. Als Kontrollen wurden TPA-behandelte Proben eingesetzt. P-Erk (A) zeigt sich deutlich hoch-reguliert bei konstantem total-Erk-Spiegel (B).



**Abb. 3.23: Synergistischer Effekt auf die Zellkonfluenz durch Diclofenac und dem MEK-Inhibitor U0126.** Real-time Zell Analyse zur Überprüfung der Zellkonfluenz (Zellindex) über einen Zeitraum von 168 h für die Zelllinie SCC-12 und SCC-13. Gezeigt sind die unbehandelte Kontrolle (grüne Kurve) sowie die Behandlungen mit den folgenden Substanzen: dem MEK1-/MEK2-Inhibitor U0126, 20µg/ml (blaue Kurve), Diclofenac 30 µg/ml (violette Kurve) und die Kombination von U0126 + Diclofenac in den o.g. Konzentrationen (rote Kurve). Die Pfeilspitzen markieren den Beginn der Behandlung. Das Experiment wurde jeweils zweimal mit zwei verschiedenen Aussaat-Dichten von 10.000 und 20.000 Zellen durchgeführt. Hier sind die Ergebnisse mit 10.000 Zellen dargestellt. Die unterschiedlichen Aussaaten sowie das zweite Experiment zeigten vergleichbare Ergebnisse.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. DER STELLENWERT DER APOPTOSE

#### 4.1.1. APOPTOSE IN KUTANEM PLATTENEPIHELKARZINOM

Der programmierte Zelltod ermöglicht als physiologisches Gegengewicht zur Zellproliferation die Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase. Durch selektive Apoptose von genetisch veränderten Zellen werden potentiell onkogene Zellen eliminiert und einer malignen Transformation vorgebeugt. Immunhistochemische Färbungen weisen für das kutane SCC auf ein Ungleichgewicht zugunsten einer Apoptose-Defizienz und weniger auf einen Proliferationsüberschuss hin (Wrone-Smith *et al.*, 1999). Für die Tumorentität des kutanen Plattenepithelkarzinoms ist demnach die Überwindung der Apoptose von zentralem Interesse.

Diclofenac/HA ist zugelassen für die Therapie der aktinischen Keratose und induziert in drei von vier kutanen SCC-Zelllinien Apoptose. Hier konnte gezeigt werden, dass Diclofenac wirksam Apoptose in kutanen Plattenepithelkarzinomzelllinien induzieren kann: In drei der vier kutanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien wurde nach Diclofenac-Behandlung signifikant Zelltod bei unveränderter Zytotoxizität ausgelöst. Der Nachweis signifikanter Apoptoseinduktion in SCC-Zelllinien kann bedeutsam für ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus von Diclofenac sein. Ferner können sich hieraus etwa weitere klinische Erwägungen bei Vorliegen einer Apoptoseresistenz eines behandelten AK-Herdes ergeben und neue Ansätze sowie Kostimulationen zur Überwindung der Apoptose-Defizienz entwickelt werden. Diese in vitro-Befunde weisen gewisse Parallelen zu den Ergebnissen klinischer Studien auf: Hier lag die Ansprechrate gegenüber Diclofenac/HA in einem ähnlichen Bereich von etwa 79% bei einer kompletten Heilungsrate der Läsionen von 50% (Stockfleth and Kerl, 2006).

Als weiteres Zeichen der Apoptoseinduktion durch Diclofenac wurden in dieser Arbeit neben der quantitativen Bestimmung von DNA-Fragmentierung mittels ELISA weiterhin Caspasen-Spaltprodukte nachgewiesen. Nach alleiniger Diclofenac-Behandlung waren Caspasen-Spaltprodukte der Initiator-Caspasen-9 und -10 zu verzeichnen. Unter Kostimulation von Diclofenac mit Todesliganden trat eine deutliche Zunahme der Bandenintensität der Caspasen-Spaltprodukte auf. Ein ähnliches in dieser Arbeit nicht abgebildetes Ergebnis zeigte die Zell-Zyklus-Analyse unter Propidium-Iodid Färbung. In der durchflusszytometrischen Bestimmung der Sub-G1 Fraktion offenbarte sich eine vierfache Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen

nach Diclofenac/HA-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Fecker *et al.*, 2010).

NSAIDs unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Apoptose auszulösen. Innerhalb der Gruppe der NSAIDs wurde für Diclofenac eine besonders effektive Apoptose-Induktion beschrieben. So zeigten *in vitro* Experimente an transformierten embryonalen Fibroblasten vom Huhn für Diclofenac ein hohes proapoptotisches Potential im Vergleich zu sieben anderen NSAIDs (Lu *et al.*, 1995). In Plattenepithelkarzinomzellen des Mundraumes induzierte unter verschiedenen COX-Inhibitoren Diclofenac am stärksten den proapoptotischen/antitumorigenen Mediator „nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene“ (NAG-1) (Kim *et al.*, 2004). Es wurden jedoch auch antiapoptotische Effekte für Diclofenac beschrieben, auf die im Abschnitt 4.5.4. „Gegenregulationen auf der Ebene der Bcl-2-Proteine“ näher eingegangen wird.

#### *Hyaluronsäure (HA)*

Bislang wurde die Wirkung der in Solaraze-Gel (Diclofenac/HA) enthaltenen Hyaluronsäure nicht ergiebig untersucht. Im Zellkulturmodell zeigte HA keine signifikante Modulation der Apoptose gegenüber alleiniger Diclofenac-Behandlung (Fecker *et al.*, 2007). Weiterhin war kein Einfluss von HA auf die PGE<sub>2</sub>-Spiegel zu verzeichnen. In der Literatur sind die beschriebenen Effekte von HA auf die Apoptose vielseitig: Im Falle des Kolon-Karzinoms zeigte HA *in vivo* eine antitumorigene Wirkung durch Inhibition von Tumorwachstum und Angiogenese. Diese Effekte könnten sich daraus ergeben, dass Hyaluronsäure an Rezeptoren wie CD44 und intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) bindet. CD44 wird von normalen Keratinozyten exprimiert, und es wird vermutet, dass CD44 eine Verlängerung der Halbwertszeit von Diclofenac in der Epidermis medieren kann (Merk, 2007). In Melanom-Zellen löste HA wiederum eine verstärkte Zellmotilität über eine CD44-EGFR-Interaktion aus (Kim *et al.*, 2008).

Verschiedene aktuelle Arbeiten unterstreichen die auch mögliche antiapoptotische Wirkkomponente von HA. So wurde in Kultursystemen humaner Hautexplantate durch simultane Behandlung mit den beiden Glykosaminoglykanen Hyaluronsäure und Dermatansulfat eine Apoptosereduktion beobachtet (Peramo *et al.*, 2010). Weitere Arbeiten zeigten *in vitro* an artikulären Chondrozyten eine Inhibition der IL-1beta- und NO-induzierten Apoptose durch HA (Peng *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2008), und in Prostata-Karzinom-Zelllinien wurde eine antitumoröse Aktivität des Hyaluronsäuresynthese-Inhibitors 4-Methylumbelliferon nachgewiesen (Lokeshwar *et al.*, 2010).

Bei Experimenten mit dem Hyaluronsäuresynthese-Inhibitor 4-MU wurde in Melanom-Zelllinien ein HA-Synthese unabhängiger Wirkmechanismus favorisiert. Im humanen Genom sind drei HA-Synthase (HAS) Gene, HAS1, HAS2 und HAS3, beschrieben. In Melanom- und Fibrostaten-Zelllinien wurde unter Einsatz von siRNA-Knockdown für HAS2 eine effektive Senkung der HA-Spiegel vergleichbar mit 4-MU-Behandlung erreicht, jedoch eine unveränderte Proliferation hierunter beobachtet, sodass von den Autoren ein Hyaluronsäure-unabhängiger Wirkmechanismus von 4-MU angenommen wurde (Edward *et al.*, 2010). Andere Arbeiten konnten jedoch nach Suppression der HAS-Gene eine Hemmung der Zellproliferation, Invasion und Motilität nachweisen (Itano *et al.*, 2004).

Hyaluronsäure einen kanzuregonen oder eher antiproliferativen Einfluss hat, bleibt zu klären, und ist aufgrund der divergierenden Resultate verschiedener Arbeiten zur Zeit nicht zu beantworten. In der Zellkultur von SCC-Zelllinien hatte HA mit und ohne Diclofenac im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle keinen Einfluss auf die Apoptose (Fecker *et al.*, 2007).

#### 4.1.2. KONZENTRATIONSREIHE VON DICLOFENAC

Das Optimum der Diclofenac-induzierten Apoptose wurde mittels einer Konzentrationsreihe für die Zelllinien SCC-12 und SCC-13 untersucht. Die höchste Zelltod-Rate lag konstant im Konzentrationsbereich von 60 bis 120 µg/ml Diclofenac. Niedrigere wie auch höhere Konzentrationen hatten eine Abnahme der Apoptose zur Folge. Die beobachtete Abnahme der Apoptose in SCC-Zelllinien bei höheren Diclofenac-Konzentrationen könnte darin begründet liegen, dass Diclofenac als antiproliferative Substanz eine Reduktion des Zellindex bedingt und bei höheren Konzentrationen von Diclofenac eine Überlagerung des antiproliferativen und proapoptotischen Effektes eintritt, so dass die absolut gemessene DNA-Fragmentierung als Maß für die Apoptose zugunsten des zunehmenden antiproliferativen Effektes abnimmt.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte in der Zunahme der NF-κB-Aktivität unter höheren NSAID-Konzentrationen begründet liegen. So wurde in Mesangiumzellen der Ratte die NF-κB-Aktivität bei verschiedenen Celecoxib-Konzentrationen ermittelt. Bei niedrigen Celecoxib-Konzentrationen kam es zur erwarteten Abnahme der nukleären NF-κB-Aktivität im Sinne einer proapoptotischen Regulation, jedoch zeigte sich bei Hochdosis-Celecoxib-Behandlung eine Zunahme der NF-κB-Aktivität berichtet (Niederberger *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde die NF-κB-Aktivität nach Diclofenac-Behandlung nicht abgebildet, da in den Experimenten die

Abnahme der nukleären Aktivität von NF- $\kappa$ B (p65, p50 und c-Rel) unter Diclofenac-Behandlung nicht konsistent nachweisbar war.

#### 4.1.3. LIMITATIONEN IN DER MESSUNG DER APOPTOSE IM IN VITRO MODELL

##### *Vergleich der Wirkstoffkonzentrationen von Diclofenac in vivo und in vitro*

Diclofenac wurde in der vorliegenden Arbeit entsprechend des in der Konzentrations-Reihe ermittelten Apoptose-Maximums in einer Dosis von 60  $\mu$ g/ml (= 200  $\mu$ M) bis 90  $\mu$ g/ml (= 300  $\mu$ M) eingesetzt. In anderen experimentellen Arbeiten zur Apoptose-Untersuchung von Diclofenac werden Konzentrationen von 100  $\mu$ M gewählt. Diclofenac inhibiert die humane COX-1 und -2 mit IC<sub>50</sub>-Werte von 0,9-2,7 bzw. 1,5-20  $\mu$ M (Barnett *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1995).

Bei Patienten, die mindestens zweimal wöchentlich ein NSAID über fünf Jahre einnahmen, wurde eine insgesamt 5x niedrigere Inzidenz an kutanen SCCs beobachtet (Butler *et al.*, 2005; Grau *et al.*, 2006). Die erreichte Wirkstoff-Konzentration ist in diesem Fall jedoch sehr viel niedriger als im Zellkultursystem. Entsprechend den Angaben der Federal Drug Administration (FDA) liegt die systemische Diclofenac-Konzentration nach peroraler Einnahme von 3 x 50 mg Diclofenac (Voltaren)-Tabletten pro Tag (150 mg/Tag) jedoch nur bei 2270 ng/ml [Federal Drug Administration/FDA: Voltaren (diclofenac sodium) gel for topical use. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=6727> (01/2008)]. Nach peroraler Einnahme von Diclofenac wird eine Konzentration erreicht, die im unteren Bereich der IC<sub>50</sub> für die humane COX-2 liegt und etwa 1/10 bis 1/30 von der gewählten Konzentration in der Zellkultur beträgt.

##### *Apoptoseinduktion durch Diclofenac in Abhängigkeit von externen Einflüssen in der Zellkultur*

Die induzierte Apoptose nach Diclofenac-Behandlung in SCC-Zelllinien unterlag einer gewissen Variabilität. So schien die Apoptose-Sensitivität mit steigender Passage-Zahl und Kultivierungszeit zuzunehmen. Die Zellkultur versteht sich als ein Modell, um die in vivo Situation besser zu verstehen, und unterliegt verschiedenen externen Einflüssen u.a. der Passagezahl: In zahlreichen Arbeiten wie beispielsweise in humanen Fibroblasten (Mammone *et al.*, 2006), Stammzellen (Crisostomo *et al.*, 2006) und der oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie

SCC-9 (Haghiac and Walle, 2005) konnte der Zusammenhang zwischen der Passagezahl und einer Zunahme der Apoptoseparameter hergestellt werden.

#### 4.2. DAS TUMORIGENE POTENTIAL VON PGE<sub>2</sub> UND COX-2 IN SCC

Immer mehr Daten sprechen dafür, dass die erworbene Eigenschaft von Zellen, eine Apoptoseresistenz aufzuweisen, ein Hauptmerkmal von Krebszellen ist und die proapoptotischen Eigenschaften von NSAIDs in verschiedenen Tumorentitäten auf die Inhibition von COX-2 zurückzuführen sind (Elwood *et al.*, 2009). Hohe Proteinspiegel von COX-2 wurden für die AK berichtet und können in der Progression von der AK zum SCC weiter zunehmen (An *et al.*, 2002; Rodust *et al.*, 2009). Für das penile SCC wurde im Vergleich zu normaler Haut eine erhöhte Expression der Prostaglandin E-Synthase-1 festgestellt (Golijanin *et al.*, 2004). Aufgrund der verstärkten Expression der entscheidenden Enzyme in der PGE<sub>2</sub>-Synthese sind für die Gruppe der NMSC erhöhte PGE<sub>2</sub>-Werte zu erwarten. So wurden 1,9-fach erhöhte PGE<sub>2</sub>-Spiegel 7 SCCs im Vergleich zu normaler Haut gefunden (Vanderveen *et al.*, 1986). COX-2 und PGE<sub>2</sub>-Spiegel waren weiterhin in entzündeter sowie UV-exponierter Haut erhöht (Wiswedel *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2008), was einen ersten Schritt in der UV-induzierten Karzinogenese darstellen mag.

Die basale COX-2-Expression war in den vier SCC-Zelllinien nur schwach detektierbar. Eine Expression von COX-2 wurde in AK, SCC und BCC beschrieben (Higashi *et al.*, 2000). In einer histologischen Arbeit war eine COX-2 Expression in 11 der 15 kutanen Plattenepithelkarzinome nachweisbar (Stratton and Alberts, 2002).

Übereinstimmend mit den vorangenannten Arbeiten zeigten einige SCC-Zelllinien erhöhte PGE<sub>2</sub>-Werte auf, wobei die sensitiveren Zelllinien (SCC-12, SCC-13) weitaus höhere basale PGE<sub>2</sub>-Werte im Vergleich zur nicht-malignen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT aufwiesen. Intermediäre Werte zeigte die Zelllinie SCL-II. Die niedrigsten PGE<sub>2</sub>-Werte wurden für die Apoptose-resistente Zelllinie SCL-I festgestellt, was hinweisend sein könnte, für eine Korrelation zwischen basalen PGE<sub>2</sub>-Spiegeln und dem Ansprechen der SCC-Zelllinien auf Diclofenac.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit erstmalig für eine kutane Tumorzelllinie eine Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Werte nach NSAID-Behandlung nachgewiesen. Verschiedene weitere Arbeiten konnten unter Diclofenac-Behandlung eine reduzierte Prostaglandin-Synthese zeigen, jedoch wurde dies

ausschließlich für nicht-transformierte, normale Keratinozyten und UV-bestrahlte Haut jedoch bislang nicht für eine kutane Tumorentität gezeigt (Lee *et al.*, 2003b; Kim *et al.*, 2006; Wiswedel *et al.*, 2007). Exogene Supplementierung von PGE<sub>2</sub> reduzierte die Diclofenac-induzierte Apoptose deutlich, was die Bedeutung von PGE<sub>2</sub> in der Apoptoseinduktion unterstreicht. Beispiele für die Apoptose-blockierende Wirkung von PGE<sub>2</sub> wurden in Experimenten mit Zelllinien des hepatozellulären und Kolon-Karzinoms beschrieben, in denen vergleichbar mit unseren Ergebnissen externe PGE<sub>2</sub>-Substitution die NSAID-induzierte Apoptose aufhob (Kern *et al.*, 2006). Demgegenüber konnte in anderen Zellkulturmodellen, wie anhand embryonaler Fibroblasten vom Huhn und Melanom-Zelllinien, PGE<sub>2</sub>-Supplementierung nicht den NSAID-medierten antineoplastischen Effekt blockieren (Lu *et al.*, 1995; Vogt *et al.*, 2001).

Die Tatsache, dass trotz COX-2-Induktion in SCC-13 Zellen nach Diclofenac-Behandlung die PGE<sub>2</sub>-Spiegel signifikant gesenkt werden, könnte darin begründet sein, dass es sich bei dem induzierten COX-2 Protein um eine funktionell inaktive Isoform handelt. In Hühner-Embryo-Fibroblasten wurde unter NSAID-Behandlung die Induktion einer inaktiven Isoform des COX-2-Proteins beschrieben (Lu *et al.*, 1995). Als weitere Ursache für die gesenkten PGE<sub>2</sub>-Werte unter COX-Induktion ist eine konstitutiv wirksame, effektive Inhibition der COX, einschließlich der induzierten COX-2, denkbar. Somit würde das neu synthetisierte COX-2-Protein einer Inhibition durch Diclofenac unterliegen und funktionell inaktiv bleiben, sodass die PGE<sub>2</sub> – Syntheserate nicht gesteigert werden kann. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass trotz der Zunahme der COX-2-Expression eine Reduktion der COX-2-Aktivität unter Diclofenac-Behandlung vorliegt; besonders unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die PGE<sub>2</sub>-Spiegel in den SCC-Zelllinien deutlich abnehmen, und die Synthese von PGE<sub>2</sub> von der Enzym-Aktivität der COX-2 abhängt.

Auch in anderen Arbeiten konnte mit verschiedenen NSAIDs eine Hochregulation der COX-2-Expression nachgewiesen werden bei insgesamt verminderter COX-2-Aktivität (Elder *et al.*, 2000; Meade *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 2000). In einer älteren Arbeit an embryonalen Hühner-Fibroblasten präsentierte sich eine Induktion von COX-2 nach Behandlung mit elf verschiedenen NSAIDs. Die induzierte COX-2 mRNA wurde als eine nur partiell gesplicete Variante identifiziert und entsprach somit nicht-funktioneller mRNA (Lu *et al.*, 1995). In einer aktuellen Arbeit wurde in vivo ein gegenteiliger Effekt der Diclofenac/HA-Behandlung auf die COX-2-Expression in AK-Herden beobachtet. Die verstärkte Expression von COX-2 im Vergleich zu gesunden Gewebe nahm in AK-Herden nach 3-monatiger Diclofenac/HA-Behandlung in Gewebeproben von 19 untersuchten Patienten ab (Maltusch *et al.*, 2011).

Die beobachtete Korrelation zwischen basalen PGE<sub>2</sub>-Wert und Apoptose-Sensitivität der jeweiligen SCC-Zelllinie, sowie die Reduktion der Diclofenac-induzierten Apoptose durch exogene Supplementierung von PGE<sub>2</sub>, impliziert einen COX-2 abhängigen Mechanismus von Diclofenac. Andererseits weist die bei unterschiedlich hohen Diclofenac-Konzentrationen gleich effektive Senkung der PGE<sub>2</sub>-Spiegel bei wiederum verschieden starker Apoptose-Induktion auf wahrscheinlich zusätzlich bestehende andere COX-2/PGE<sub>2</sub>-unabhängige Wirkmechanismen hin.

#### 4.3. GEGENREGULATIONEN: ERK & COX-2

In den SCC-Zelllinien SCL-II, SCC-12 und SCC-13 zeigte sich eine deutliche Hochregulation von p-ERK bei unverändertem Gesamt-ERK (phospho- und de-phospho-ERK). Die Aktivierung von ERK kann eine partielle Blockierung des proapoptotischen Effektes von Diclofenac zur Folge haben. Die Behandlung der SCC-Zelllinien (SCC-12, SCC-13) in der Kombination von Diclofenac und dem MEK1-/MEK2-Inhibitor (U0126) resultierte in einen synergistischen Effekt auf die Proliferation. Diese Ergebnisse unterstreichen die funktionelle Bedeutung der ERK-Hochregulation im Sinne einer proliferationsfördernden und somit tumorigenen Gegenregulation in der Diclofenac-Behandlung. Weiterhin wurde eine COX-2-Hochregulation nachgewiesen.

Den am häufigsten beschriebenen Induktor der COX-2-Proteinexpression stellt die Mitogen-activated protein kinase (MAPK) bzw. als Teil der Signalkaskade ERK dar (Lewis *et al.*, 1998; Sun and Sinicropo, 2005). Es ist somit denkbar, dass auch im Zellkulturmodell des kutanen SCC die verstärkte COX-2-Expression in SCC-13 Zellen unter Diclofenac-Behandlung auf einer pERK-Hochregulation beruht. Es wurden jedoch auch verschiedene ERK-unabhängige COX-2 Induktionen nach NSAID-Behandlung beschrieben. Im Tiermodell wurde die induzierte COX-2-Genexpression im Darm auf eine Steigerung der iNOS-Aktivität im Rahmen der COX-I-Inhibition unter NSAID-Behandlung zurückgeführt. Unter physiologischen Bedingungen soll nach Meinung der Autoren die iNOS-Aktivität durch PGE<sub>2</sub> inhibiert sein (Takeuchi *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2002). Weitere Möglichkeiten der ERK-unabhängigen COX-2-Regulation sind transkriptionelle und post- transkriptionelle Modulationen der COX-Expression durch NSAIDs und Prostaglandine (Wu *et al.*, 1991) sowie die Assoziation von NSAIDs mit PPARs, welche als Mitglieder der Steroid-Hormon-Rezeptor-Superfamilie, an die Promoter-Region von COX-2 binden, und konsekutiv die COX-2-Expression induzieren können (Meade *et al.* 1999).

Erhöhte COX-2-Aktivität und PGE<sub>2</sub>-Spiegel stellen positive Regulatoren der Tumorzellproliferation dar, was hauptsächlich über den MAPK-Signalweg vermittelt wird (Wang and DuBois, 2006), sodass es klassischerweise unter COX-2-Inhibition zu einer Herabregulation von PGE<sub>2</sub> und p-ERK kommt (Rice *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2008). Beschrieben wurde jedoch auch übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit eine Aktivierung von ERK<sup>p44/42</sup> unter NSAID-Behandlung (Elder *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Yip-Schneider and Schmidt, 2003; Elder *et al.*, 2002). Die MAPK-Signalkaskade mediiert meist als Survival-Pathway antiapoptotische Regulationen, wie auch in dieser Arbeit durch Einsatz von MAPK-Inhibitoren eine Hemmung der Zellproliferation gezeigt wurde, und somit von einem proliferations-stimulierenden Effekt von pERK auf die SCC-Zellen auszugehen ist. In Chondrozyten und Kolon-Karzinom-Zellen führte die unter NSAID-Behandlung aufgetretene ERK-Aktivierung zur Verringerung der Apoptose und gegen MAPKs gerichtete Antisense Ansätze konnten die Apoptose potenzieren. (Yoon *et al.*, 2003), (Sun and Sinicrope, 2005). Die Bedeutung einer ERK-Hochregulation kann sich jedoch abhängig davon, welche Transkriptionsfaktoren (NF-κB, CREB, Ets-1, AP-1 und c-Myc) in dem Zellsystem aktiviert werden, sowohl pro- als auch antiapoptotisch auswirken (Chang *et al.*, 2003). In HT29 Kolon-Karzinom-Zellen wurde die NSAID-induzierte Apoptose durch ERK-Hochregulation vermittelt, und die Blockierung der ERK-Aktivierung schützte die Zellen vor den antineoplastischen Effekten des hier selektiven NSAIDs NS-398. Dieser proapoptotische Effekt von p-ERK wurde trotz einer auch hier vorhandenen p-ERK mediierten COX-2-Induktion beobachtet (Elder *et al.*, 2002).

Es ist somit denkbar, dass auch im Zellkulturmodell des kutanen SCC die pERK-Hochregulation den zentralen Induktor einer erhöhten COX-2-Expression unter Diclofenac-Behandlung darstellt. Eine gegen ERK gerichtete Inhibition sowie antisense Technologien könnten die COX-2 Induktion abschwächen und somit eine Sensitivierung gegenüber Diclofenac erreichen.

#### 4.4. DIE BEDEUTUNG DES EXTRINSISCHEN SIGNALWEGES

Der Todesliganden-medierte/extrinsische Apoptose-Signalweg ist von allgemeiner Bedeutung für eine gegen transformierte Zellen gerichtete Antwort des Immunsystems durch zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen (Russell and Ley, 2002; Dauer *et al.*, 2005). Die entscheidende tumorpräventive Bedeutung der „Immunosurveillance“ wird deutlich anhand der 65-250-fach höheren Erkrankungswahrscheinlichkeit an AK und invasivem SCC bei immunkomprimierten

Patienten im Vergleich zur normalen Bevölkerung (Ulrich *et al.*, 2006). Vor diesem Hintergrund erscheint eine Sensitivierung gegenüber dem extrinsischen Signalweg in Hauttumorzellen und eine effektivere Apoptoseinduktion durch infiltrierende Lymphozyten von besonderem Interesse.

Todesliganden erfüllen weiterhin eine entscheidende Aufgabe in der Kontrolle der Gewebshomöostase von normalen Keratinozyten. So wurde das CD95-Kontroll-System wird durch UV-Bestrahlung aktiviert. Sowohl CD95 als auch CD95L werden nach UV-Exposition in der Haut induziert (Filipowicz *et al.*, 2002; Leverkus *et al.*, 1997). Gld-Mäuse, denen funktionelles CD95L fehlt, wiesen eine erhöhte Inzidenz an SCCs sowie höhere p53-Mutationsraten auf (Hill *et al.*, 1999). Eine verminderte Todesliganden-Sensitivität ist wiederum typisch für das SCC und die AK.

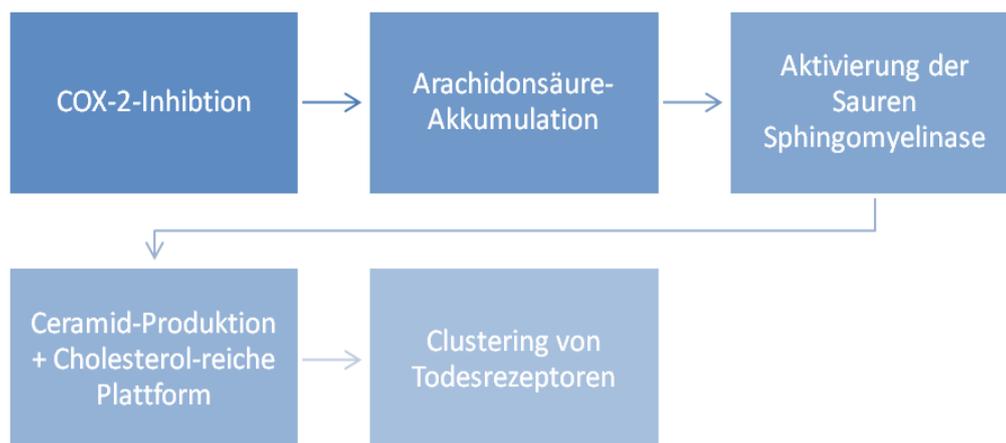
In dieser Arbeit wiesen primäre Keratinozyten (PK) gegenüber der Behandlung mit Vertretern der TNF-Superfamilie (TRAIL, CH-11 und TNF- $\alpha$ ) eine weitgehende Resistenz auf. Nach CH-11 und TNF- $\alpha$ -Behandlung wiesen die Keratinozyten auch bei höheren Konzentrationen eine vollständige Resistenz auf, während nach TRAIL-Gabe eine moderate Apoptose induziert werden konnte. Durch Diclofenac-Behandlung wurde die Resistenz gegenüber Todesliganden durchbrochen. Die beobachtete Sensitivierung zeigte sich insbesondere auch in entarteten Keratinozyten/SCC-Zelllinien. Die Zelllinie SCL-II wies im Vergleich zu primären Keratinozyten ein ca. fünffach stärkeres Ansprechen gegenüber der Kostimulation mit CH-11 und Diclofenac/HA auf. Eine vierfach höhere Sensitivität wurde für entartete Keratinozyten im Vergleich zu normalen Keratinozyten gegenüber TRAIL bereits beschrieben (Leverkus *et al.*, 2000). Die beobachteten synergistischen Effekte auf die Apoptose nach Kostimulation mit Todesliganden und Diclofenac korrelierten mit der verstärkten Caspasen-Aktivierung des extrinsischen Signalweges (Caspase-8,-10), des intrinsischen Signalweges (Caspase-9), der Effektor-Caspasen (Caspase-3, -7) und des proapoptotischen Proteins. Als mögliche Ursache für die Sensitivierung gegenüber Todesliganden durch Diclofenac wurden drei mögliche Regulationspunkte in näheren Betracht gezogen und auf ihre Relevanz überprüft:

- (1) Bildung von Lipid-Rafts/Cluster aus Todesrezeptoren (Clusterin)
- (2) Veränderung der Todesrezeptor-Expression
- (3) Veränderung der cFLIP-Expression

#### 4.4.1. CLUSTERING

Es wurden für die Gruppe der NSAIDs COX-2-unabhängige Wirkmechanismen wie die Verstärkung des Clustering bzw. der Raft-Bildung beschrieben. Es wurden daher in dieser Arbeit

fluoreszenzmikroskopische Färbungen der Todesrezeptoren (DR4, DR5 und CD95) nach Stimulation mit den entsprechenden Todesliganden und Diclofenac durchgeführt. In einem weiteren Experiment wurde mit dem gleichen Stimulations-Regime die saure Sphingomyelinase-Aktivität bestimmt. Im Falle eines Vorliegens von Clustering wird der Anstieg des Ceramid-Gehaltes durch die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase bewirkt. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Sphingomyelin zu Phosphocholin und Ceramid. In den Ceramid-reichen Domänen kann erleichtert Rafting/Clustering stattfinden. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung sowie die Aktivitätsmessung der sauren Sphingomyelinase als Indiz für eine mögliche Ceramid-Freisetzung ergaben keine Hinweise für das Vorliegen von Raft-Bildungen. Verschiedene Arbeiten haben das Vorliegen von Clustering in kutanen Zelllinien gezeigt. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Existenz von Clustering nach wie vor kontrovers beurteilt wird (Munro, 2003).



**Abb.4 1:** Postulierter Wirkmechanismus von COX-Inhibitoren auf die Formierung von Clustern [nach: (Martin *et al.*, 2005)].

In einer Melanomzelllinie induzierte UV-Licht über einen Fas-Liganden-unabhängigen Signalweg die Aggregation von Fas-Rezeptoren. Jedoch ist der Mechanismus der UV-induzierten Fas-Rezeptor Aggregation nicht bekannt (Elyassaki and Wu, 2006). Im Zusammenhang mit UVA-Bestrahlung und ROS-Bildung konnte Todesrezeptor-Clustering in HaCaT-Zellen identifiziert werden. Die Ergebnisse ließen sich nur in subkonfluenten Kulturen zeigen, singuläre, nicht adhärenzte Zellen ließen hingegen keine Raft-Bildung erkennen (Grether-Beck *et al.*, 2008). Es besteht die Möglichkeit, dass die SCC-Zellen analog zu den Ergebnissen von Grether-Beck *et al.* in subkonfluenten Kulturen ebenfalls unter Diclofenac-Behandlung

Clustering gezeigt hätten. Wir haben jedoch in unseren Experimenten entsprechend dem Protokoll singuläre Zellen eingesetzt und hierbei gegenüber den Kontrollen keine Zunahme an Rafts auf der Zelloberfläche finden können.

In einer weiteren Arbeit konnte durch den Einsatz von NSAIDs durch Akkumulation der Prostaglandin-Vorstufe Arachidonsäure eine Stimulation der Ceramid-Produktion nachgewiesen werden. Ceramid hat die Eigenschaft, sich in Membranen einzulagern und über eine Raft-Bildung die Initiierung des extrinsischen Signalweges zu bewirken (Chan *et al.*, 1998). In Kolon-Karzinom Zelllinien wurde durch COX-2-Inhibition ein DR5-Rezeptor-Clustering in Cholesterol- und Ceramid-reichen Domänen/Caveolae beobachtet. Dieser Prozess wurde von den Autoren auf eine Akkumulation der Arachidonsäure und konsekutiver Aktivierung der sauren Sphingomyelinase mit Freisetzung und Einlagerung von Ceramid in die Zellmembran zurückgeführt (Martin *et al.*, 2005).

#### 4.4.2. TODESREZEPTOREN

Als weitere Hypothese für die Todesliganden-Sensitivierung unter Diclofenac-Behandlung wurde überprüft, ob eine Zunahme der Todesrezeptor-Expression vorliegen könne. Es wurden FACS-Analysen für CD95, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 durchgeführt. Es lag eine signifikante basale Expression der Todesrezeptoren in den vier unbehandelten SCC-Zelllinien sowie in den Keratinozyten vor. Die vorhandene CD95/Fas-Expression in Keratinozyten-Kulturen ist als überraschend zu werten, da in einer Arbeit eine fehlende Fas/CD95-Expression in der Epidermis von UV-geschützter Haut berichtet wurde (Bachmann *et al.*, 2001). Die Ursache für die Diskrepanz könnte darin liegen, dass die primären Keratinozyten (PK) in der Kultivierung ihre Eigenschaften und Expressions-Muster ändern, wohingegen in der zitierten Arbeit ohne Kultivierung aus den Präparaten direkt Färbungen und Western-Blots durchgeführt wurden.

Die FACS-Analysen wurden unter der Annahme der Induktion der Todesrezeptor-Expression durchgeführt. Es konnten jedoch keine signifikanten Verschiebungen der Todesrezeptor-Expression auf der Zelloberfläche von PKs und SCC-Zellen festgestellt werden. Induzierte Expression von TRAIL-R2/DR5 wurde nach NSAID-Behandlung berichtet, insbesondere nach Celecoxib-Behandlung (Liu *et al.*, 2006; Nakamoto *et al.*, 2006; Yamanaka *et al.*, 2006; He *et al.*, 2008). Ferner wurde eine geringe Hochregulation der Oberflächenexpression von CD95, TNF-R1, DR4 und DR5 in hepatozellulären Karzinomzelllinien nach COX-2-Inhibition durch Celecoxib berichtet (Kern *et al.*, 2006). DR5-Hochregulation scheint ein häufiger Mechanismus in NSAID-medierter Apoptose darzustellen, wohingegen die anderen Todesrezeptoren in einem

Zell- und Tumorentitätsspezifischen Kontext reguliert sein können. In den SCC-Zelllinien erschien die Regulation der Todesrezeptor-Expression als nicht signifikant und nicht ursächlich für die Sensitivierung gegenüber Todesliganden.

#### 4.4.3. cFLIP

Die proapoptotische Aktivität der Todes-Rezeptoren wird von dem kompetitiven Caspase-8/-10 Inhibitor c-FLIP entscheidend negativ reguliert. Die beiden Isoformen FLIP<sub>S</sub> und FLIP<sub>L</sub> können die Initiator-Caspasen des extrinsischen Signalweges von der Bindung an den DISC und deren Aktivierung verhindern. Alle vier SCC-Zelllinien sowie die nicht-transformierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wiesen signifikante basale Expressionsspiegel von FLIP<sub>L</sub> und FLIP<sub>S</sub> auf. Nach 24-stündiger Behandlung mit Diclofenac/HA zeigten die c-FLIP-Isoformen eine starke Herabregulation in den Apoptose-sensitiven Zelllinien SCL-II, SCC-12, SCC-13 und in HaCaT. In deutlichem Unterschied dazu konnte keine Veränderungen der c-FLIP-Expression in der resistenten Zelllinie SCL-I festgestellt werden.

Die funktionelle Bedeutung von c-FLIP für die Verstärkung der Todesliganden-induzierten Apoptose durch Diclofenac/HA wurde durch Überexpression und Einsatz von siRNA weitergehend in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Hierbei konnte die Überexpression von c-FLIP die Todesliganden-mediierte Apoptose unterdrücken und siRNA ähnlich wie Diclofenac/HA die Apoptose verstärken (Fecker *et al.*, 2010).

In einer weiteren Arbeit, die die Bedeutung der c-FLIP Expression in der Haut unterstreicht, wird der erhöhte basale cFLIP-Spiegel als Ursache für eine reduzierte TRAIL-Sensitivität in normalen Keratinozyten betrachtet (Leverkus *et al.*, 2000). Eine starke Expression von cFLIP ist für SCCs humaner Haut berichtet worden und eine etwas schwächere Expression für die AK. Die ausgeprägte basale Expression von cFLIP wurde als potentieller Auslöser für eine verhinderte Elimination atypischer Keratinozyten und eine maligne Transformation angeführt (Bachmann *et al.*, 2001).

Die Herabregulation von c-FLIP wurde in Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms und Lungen-Krebs nach Celecoxib-Behandlung beschrieben (Chen *et al.*, 2007; Kern *et al.*, 2006). Durch FLIP<sub>L</sub>-Überexpression konnte ähnlich wie in unseren Ergebnissen der synergistische Effekt nach kombinierter NSAID- und Todesliganden-Gabe unterbunden werden (Sheng *et al.*, 1998). Die schnelle und effiziente Herabregulation von antiapoptotischen Faktoren wie Survivin

und c-FLIP könnte durch verstärkten Abbau über die Proteasomen erklärt werden (Liu *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2006; Gaiser *et al.*, 2008).

#### 4.5. DIE BEDEUTUNG DES INTRINSISCHEN SIGNALWEGES

Die Bcl-2-Familie, welche 17 or mehr Proteine bei Säugern umfasst (Adams and Cory, 2007), und integriert diverse zelluläre Signale einschließlich p53, um als als Schalter zwischen dem Überleben einer Zelle und dem Zelltod zu fungieren. Die Mehrzahl der Chemotherapeutika induzieren Apoptose über den intrinsischen Apoptose-Signalweg, sodass Blockierungen bzw. Mutationen im mitochondrialen Signalweg häufig mit Chemotherapie-Resistenz und Tumorigenese assoziiert sind und deren Kenntnis und Überwindung wichtige Grundpfeiler einer zielgerichteten Therapie darstellen (Fulda and Debatin, 2006).

In NSAID-induzierter Apoptose wurde die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien als ein frühes Ereignis identifiziert (Kern *et al.*, 2006). Eine Freisetzung von Cytochrom c innerhalb der ersten 60 min nach Behandlungsbeginn ließ sich auch in dieser Arbeit verifizieren. Zytosolisches Cytochrom c bindet im Rahmen der Apoptosom-Bildung u.a. an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Die Konformationsänderung von Apaf-1 ermöglicht durch Freilegung der Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) die Rekrutierung der Procaspase-9 und somit die Initiierung des intrinsischen Signalweges. Die Bedeutung des mitochondrialen Signalweges wird durch Apaf-1-defiziente Zellen unterstrichen, die eine Resistenz gegenüber ASS-induzierter Apoptose aufweisen (Jana, 2008).

Eine Induktion des mitochondrialen Apoptose-Signalweges ist für Diclofenac in tubulären Nierenzellen berichtet worden (Ng *et al.*, 2008). In anderen Tumorentitäten lösten NSAIDs ebenfalls Apoptose über den mitochondrialen-Signalweg aus, wie beispielsweise in Promyelozyten-Leukämie- (Inoue *et al.*, 2004) und hepatozellulären Karzinom-Zelllinien (Gomez-Lechon *et al.*, 2003; Fakurazi *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Cytochrom c-Freisetzung in sensitiven SCC-Zellen nach Diclofenac-Behandlung beobachtet. Weiterhin wurde eine Translokation von Bax sowie Caspase 9- und tBid-Spaltprodukte nachgewiesen<sup>5</sup>

Nach dem gegenwärtigen Modell der gegenseitigen Regulation der Bcl-2-Proteine wird das proapoptische Multidomäne-Bcl-2-Protein Bax als entscheidend für die Formierung der mitochondrialen Poren angesehen (Chipuk *et al.*, 2010). Cytochrom c-Freisetzung und Bax-

Translokation konnten durch PGE<sub>2</sub>-Substitution reduziert werden. Von besonderem Interesse erscheint die Zeitkinetik, wonach der mitochondriale Signalweg bereits nach 1 h komplett aktiviert ist. Dieser wird entscheidend kontrolliert durch pro- und antiapoptotische Bcl-2 Proteine. Die Expression der Bcl-2-Proteine ist mit verschiedenen „Survival“-Signalwegen verknüpft und mag eventuell auch von der COX-2 Aktivität abhängen. Daher beobachteten wir eine dramatische Herabregulation des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 nach Behandlung mit Diclofenac/HA in Apoptose-sensitiven Zellen, wohingegen die Expression des proapoptotischen Proteins Bad zunahm.

#### 4.5.1. DIE REGULATION ANTIAPOPTOTISCHER PROTEINE DER BCL-2-FAMILIE

Eine Herabregulation von *Mcl-1* konnte in den drei sensitiven SCC-Zelllinien festgestellt werden. Mechanistisch entfaltet *Mcl-1* seine antiapoptotische Wirkung durch Komplexbildung mit Bak und verhindert eine Bak-Oligomerisierung und Cytochrom c-Freisetzung (Gillissen *et al.*, 2010). Der Angriffspunkt von *Mcl-1* ist somit das Multidomäne proapoptotische Bcl-2 Protein Bak, welches in allen untersuchten SCC-Zelllinien nachweisbar war. Die Funktion von *Mcl-1* kann durch selektive Interaktion mit den BH3-only Proteinen Bim, tBid, Bik, Puma und Noxa aufgehoben werden (Akgul, 2009). Puma und Noxa wiesen unter Diclofenac-Behandlung eine Herabregulation auf und können somit *Mcl-1* nicht mehr antagonisieren. Das Spaltprodukt tBid konnte in den behandelten SCC-Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch ist in einigen Zellsystemen eine Spaltung von tBid erst unterhalb der Mitochondrien durch Effektor-Caspasen gezeigt worden (Shelton *et al.*, 2009). Da Puma und Noxa herabreguliert sind und tBid unter Umständen erst als Todessubstrat aktiviert werden könnte, scheint eine *Mcl-1* Herabregulation ein wichtiger Baustein in der Initiierung des intrinsischen Signalweges und der Bak-Aktivierung darstellen zu können.

Es wurde für die Zelllinie SCC-12 in einer Zeitkinetik eine schnelle Herabregulation von *Mcl-1* durch Diclofenac/HA (innerhalb von 30 Min) nachgewiesen. Diese schnelle Regulation korreliert mit der kurzen Halbwertszeit des Proteins, die zwischen 30 – 40 Min variiert (Akgul, 2009; Cuconati *et al.*, 2003) und von der De-Novo Syntheserate und dem proteosomalem Abbau abhängt. Zwei PEST-Motive, die im N-terminalen Teil des Proteins *Mcl-1* lokalisiert sind, sollen für die rasche Regulation verantwortlich sein. Die *Mcl-1*-Expression wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine auf der Transkriptionsebene über die Signalwege ERK/SRF, PI3K/AKT und JAK/STAT reguliert (Iglesias-Serret *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2005). Ein

posttranslationaler Mechanismus, der zur Mcl-1 Regulation beiträgt, beinhaltet Akt und die Kinase GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3). In der Abwesenheit von aktivem Akt, bspw. bedingt durch erniedrigte PGE<sub>2</sub>-Spiegel, wird das Akt-Zielprotein GSK-3 dephosphoryliert, in der weiteren Kaskade kommt es zur Phosphorylierung von Mcl-1 und dessen Ubiquitinierung und proteosomalem Abbau (Maurer *et al.*, 2006). Aktives ERK kann Mcl-1 wiederum an einer anderen Lokalisation, im PEST-Motif, Mcl-1 phosphorylieren und konnte hierdurch zu einer Verlängerung der Halbwertszeit in Burkitt Lymphom Zellen beitragen (Domina *et al.*, 2004). In der Haut ist die Herabregulation von Mcl-1 insbesondere zur Apoptose-Induktion und Cytochrom c-Freisetzung in Keratinozyten nach UV-Bestrahlung essentiell (Nijhawan *et al.*, 2003; Sitailo *et al.*, 2006). Die Hepatozyten von COX-2-überexprimierenden transgenen Mäusen wiesen infolge der fehlenden Mcl-1 und Fas-Regulation unter COX-2 Überexpression eine Blockade gegenüber der UV-induzierten Apoptose-Induktion auf (Casado *et al.*, 2007).

*Bcl-2* wies in den SCC-Zelllinien eine schwache basale Expression auf. Die schwache Expression von *Bcl-2* in Plattenepithelkarzinomen ist in immunhistochemischen Färbungen aus Haut-Biopsaten bereits beschrieben worden (Cerroni and Kerl, 1994; Delehedde *et al.*, 1999) und könnte hinweisend sein auf den Ursprung der Zellen aus suprabasalen Keratinozyten, die typischerweise eine geringere *Bcl-2*-Expression aufweisen (Puizina-Ivic *et al.*, 2008). Eine Regulation der *Bcl-2*-Expression konnte in unseren Experimenten nicht beobachtet werden. In anderen Arbeiten ist nach NS-398- Behandlung, einem selektivem COX-2 Inhibitor, in humanen Prostata-Karzinom-Zelllinien eine Herabregulation von *Bcl-2* beobachtet worden (Liu *et al.*, 1998). In der humanen kolorektalen Krebszelllinie HCA-7 konnte PGE<sub>2</sub> die NSAID-induzierte Apoptose inhibieren und gleichzeitig die *Bcl-2*-Expression erhöhen (Kern *et al.*, 2006). Zur tatsächlichen Bedeutung einer erhöhten *Bcl-2*-Expression sind in der Literatur divergierende Ergebnisse berichtet worden: Transgene Mäuse mit einer *Bcl-2*-Überexpression entwickelten doppelt so viele Papillome nach TPA-Behandlung wie der Wildtyp (Rodriguez-Villanueva *et al.*, 1998). In Jurkat- und BJAB-Zellen konnte eine *Bcl-2*-Überexpression zwar eine durch Bestrahlung induzierte Apoptose vermindern jedoch nicht die durch Celecoxib induzierte Apoptose negativ beeinflussen (Jendrossek *et al.*, 2003; Rudner *et al.*, 2011).

Ein zusätzlicher neuer Effekt von NSAIDs auf die *Bcl-2*-Protein-Familie wird hier in Form der Herunterregulation des antiapoptotischen Proteins *Bcl-w* in allen vier untersuchten Zelllinien beschrieben. *Bcl-w* ist Teil der Pro-Survival Subfamilie und unterdrückt die Bax- und Bak-Oligomerisierung (Yan *et al.*, 2000). *Bcl-w* hat seit der Erstbeschreibung 1996 im Vergleich zu anderen *Bcl-2*-Proteinen wenig Aufmerksamkeit erhalten (Gibson *et al.*, 1996).

Am besten ist der Einfluss von Bcl-w bislang in gastrointestinalen Tumoren beschrieben. Eine verstärkte Bcl-w-Expression konnte für das gastrale Adenokarzinom und das Kolon-Karzinom gefunden werden (Wilson *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003a). Bcl-w kann neben der Apoptose auch auf die Angiogenese und das Metastasierungsverhalten Einfluss nehmen. In einer Untersuchungsreihe von 50 Adenokarzinomen des Magens konnte in etwa der Hälfte der Fälle eine Bcl-w-Expression nachgewiesen werden. Bcl-w exprimierende Tumore wiesen eine erhöhte Invasivität und schlechtere Prognose auf. Eine protektive Eigenschaft gegenüber Todesstimuli konnte für Bcl-w in gastralen Tumorzelllinien nach Überexpression des Proteins gezeigt werden. Diesen Effekt führten die Autoren auf eine Blockierung des MAPK-JNK-Signalweges zurück. JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinase) ist ein proapoptotisch wirkendes Protein der MAPK-Signalkaskade, sodass dessen Blockierung zu einer Abschwächung der Apoptose führt (Lee *et al.*, 2003a). In Zellkulturen des Adenokarzinoms des Magens aktivierte Bcl-w den PI3K/Akt-Signalweg, was mit einer erhöhten Invasivität von Bcl-w exprimierenden Tumoren korreliert wurde. Das verstärkte Infiltrationspotential von Bcl-w positiven Tumoren wurde auf eine Sp1-Aktivierung via PI3K/Akt zurückgeführt. Sp1 aktivierte die Matrix Metalloproteinase-2, der eine zentrale Rolle in der Tumor-Invasion und Angiogenese zukommt (Bae *et al.*, 2006). Auf molekularer Ebene ist Bcl-w im aktiven Zustand schwach an die mitochondriale Membran assoziiert. In apoptotischen Zellen neutralisieren BH3-only Proteine die Survival-Aktivität von Bcl-w, indem diese an die hydrophobe Tasche von Bcl-w binden. Hierdurch wird die C-terminale Domäne von Bcl-w ähnlich wie bei Bax „ausgeklappt“ und es folgt darauf die Insertion in das Mitochondrium. Bcl-w ist jedoch im Gegensatz zu Bax nach der Insertion in die mitochondriale Membran funktionell inaktiv (Wilson-Annan *et al.*, 2003).

Welche funktionelle Bedeutung Bcl-w in Hauttumoren zukommt ist bislang nicht untersucht worden. Der Einfluss von Bcl-w auf das Invasions-Verhalten in Hauttumoren, der Wirkmechanismus von Bcl-w und eine eventuell verstärkte Expression von Bcl-w in neoplastischen Zellen der Haut gegenüber dem gesunden Gewebe sind einige der zur Zeit noch ungeklärten Fragen.

#### 4.5.2. DIE REGULATION PROAPOPTOTISCHER MULTI-DOMÄNEN-PROTEINE DER BCL-2-FAMILIE

Die Bax-Expression der Gesamt-Proteinlysate wies nach Diclofenac-Behandlung keine Veränderung auf. Jedoch konnte eine Zunahme von Bax in der mitochondrialen Fraktion festgestellt werden. In einzelnen Arbeiten ist eine Hochregulation der Bax-Expression unter NSAID-Behandlung gezeigt worden. In Zellen des Oesophagus-Karzinoms wurde nach Einsatz

des selektiven COX-2-Inhibitors, NS398, eine Reduktion der Phospho-Akt-Spiegel und eine konsekutive Hochregulation von Bax beobachtet (Che *et al.*, 2010). In kutanen Plattenepithelkarzinomen wurde im Vergleich zu nicht-neoplastischer Epidermis eine leichte aber signifikant verstärkte basale Bax- und zweifach erhöhte Bak-Expression immunhistochemisch festgestellt (Cerroni and Kerl, 1994; Delehedde *et al.*, 1999).

Das proapoptotische Multi-Domänen-Protein Bax ist in gesunden Zellen primär im Zytosol lokalisiert, kann jedoch ebenso locker an intrazelluläre Membranen gebunden sein wie den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum. Während der Apoptose translozieren Bax und Bak an die Mitochondrien und beeinflussen somit die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran. Sie ermöglichen den Proteinen aus dem intermitochondrialen Raum, wie etwa Cytochrom c, die Freisetzung in das Zytosol, sodass die Caspasen-Aktivierung und der Zelltod induziert werden können. Als Ergebnis der Translokation ist wie in dieser Arbeit gezeigt, Bax in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar. Ob Bax und Bak in Folge einer Konformationsänderung oligomerisieren und es hierdurch zu einer Porenbildung kommt, wird kontrovers diskutiert (Antignani and Youle, 2006).

Die funktionelle Bedeutung von Bax als Tumorsuppressor wird in Bax-defizienten Mäusen deutlich, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Resistenz gegenüber UV-induzierter Apoptose mit signifikant erhöhter Zunahme der Hauttumor-Inzidenz unter UV-Bestrahlung aufweisen (Cho *et al.*, 2001b). Auf Zellkulturebene wiesen Bax-defiziente, humane kolorektale Karzinomzellen eine partielle Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil und eine komplette Blockierung der NSAID-induzierten Apoptose auf (Zhang *et al.*, 2000). Es wurden inaktivierende Mutationen im Bax-Gen in verschiedenen Tumoren beschrieben. Über die Hälfte der humanen Adenokarzinome des Kolons weisen eine Frameshift-Mutation im Bax-Gen auf (Rampino *et al.*, 1997). In 2/33 koreanischen Patienten konnte für das Basalzellkarzinom eine Frame-Shift Mutation im Bax-Gen detektiert werden (Cho *et al.*, 2001a).

Bak/Bax-negative Jurkat-/T-Zell Lymphom-Zellen wiesen eine Apoptose-Resistenz gegenüber Celecoxib auf. Nach Wiedereinführung des Bak-Proteins löste Celecoxib wieder Zelltod aus (Muller *et al.*, 2008). Bax und Bak besitzen größtenteils überlappende Aufgaben in der Apoptoseregulation, sodass in einem in einem weiteren Mausmodell ohne Einsatz von UV-Bestrahlung unter Berücksichtigung aller Tumore in einem Beobachtungszeitraum von 1,5 Jahren die Bax -/- Mäuse kaum eine höhere Inzidenz an spontanen Tumoren aufwiesen (Knudson *et al.*, 2001).

Bak gehört wie auch Bax zu der Gruppe der Pro-apoptotisch/Multi Domäne Proteine und zeigte sich gegenüber Diclofenac-Behandlung unverändert. Bak kann nur den Zelltod einleiten, wenn Mcl-1 oder Bcl-x<sub>L</sub> durch die BH3-only Proteine inaktiviert sind (Adams and Cory, 2007). Bak kommt in der HPV-induzierten Hauttumorigenese eine eventuell imminente Rolle zu. Das von Hoch-Risiko HP-Viren gebildete Protein E6 kann das proapoptotische Bcl-2 Protein Bak degradieren, was den Zellen die Fähigkeit verleiht, trotz UV-Schäden zu überleben. Es konnte gezeigt werden, dass die von Hoch-Risiko HPVs abstammenden Proteine E6 und E7 notwendig sind für die effiziente Immortalisierung von Keratinozyten (Munger *et al.*, 1989).

#### 4.5.3. DIE REGULATION PROAPOPTOTISCHER BH3-ONLY PROTEINE DER BCL-2-FAMILIE

Die BH3-only Proteine nehmen in der Initiierungsphase des Zelltodes als Stress-Sensoren eine zentrale Rolle ein. Durch Antagonisierung der Multidomäne Bcl-2-Proteine ermöglichen sie schlussendlich die Porenbildung von Bax/Bak (MOMP). Die meisten Chemotherapeutika führen zur Aktivierung von einem oder mehreren BH3-only Proteine wie Glukokortikoide bei der ALL via Bim und Puma, Imiantinib bei der CML über Bim und Bad, Etoposid über Puma und Paclitaxel in neoplastischen Lymphozyten und epithelialen Zellen Bim induziert (Adams and Cory, 2007). Die BH3-only Proteine unterscheiden sich in ihrem Profil an potentiellen Bindungspartnern. Während Bim, Puma und tBid starke Bindungspartner von allen Pro-Survival Proteinen darstellen, assoziieren die übrigen BH3-only Proteine nur an mit einem Teil der Bcl-2-Multidomäne Proteine (Chen *et al.*, 2005). Beispielsweis bindet Noxa nur an Mcl-1 und A1, Bad ausschließlich an Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w. Die BH3-only Proteine wie Bim and Puma, die eine Bindung mit allen Bcl-2 Multidomäne Proteinen eingehen, sind sehr viel potentere Zelltod-Induktoren als BH3-only Proteine, die nur mit einzelnen Proteinen interagieren (Chen *et al.*, 2005). Von den untersuchten BH3-only Proteinen zeigten Bad und Bid eine propapoptotische Regulation, wohingegen Puma und Noxa überraschenderweise eine antiapoptotische Gegenregulation aufwiesen und daher im folgenden Abschnitt abgehandelt werden.

Als proapoptotische Effekte innerhalb der Gruppe der Bcl-2-Proteine konnte für die sensitiven Zelllinien (SCL-II, SCC-12 und SCC-13) eine Hochregulation des proapoptotischen BH3-only-Proteins *Bad* nachgewiesen werden. Im Besonderen zeigten sich diese Veränderungen nicht in der resistenten Zelllinie SCL-I. Interessanterweise ist *Bad* durch Diclofenac/HA ähnlich wie Mcl-1 innerhalb sehr kurzer Zeit reguliert. Die spezifische Regulation der Bcl-2 Proteine in der Zelllinie SCC-12 tritt kurz vor der Cytochrom c-Freisetzung und Bax-Translokation auf. Wieder

waren die Effekte partiell reversibel durch PGE<sub>2</sub>-Substitution. Ursächlich für die Regulation von Bad könnte der PKB/Akt-Signalweg sein. Es ist bekannt, dass die COX-2-Inhibition zu einer Abschwächung des PKB/Akt-Signalweges führen kann. PKB/AKT entfaltet seine antiapoptotischen Effekte durch Inaktivierung von Bad mittels Aktivierung des Proteins 14-3-3 (Grosch *et al.*, 2006). Ebenso wurde die Apoptose-Induktion in kolorektalen Karzinom-Zelllinien durch die COX-Inhibitoren Sulindac-Sulfonat, Indomethacin und SC-236 mit der Bad-Aktivierung in Zusammenhang gebracht (Liou *et al.*, 2007).

Als ein anderes BH3-only Protein, welches hier nicht überprüft wurde, könnte Bim involviert sein. Dieses proapoptotische Protein zieht sich in humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen durch PGE<sub>2</sub>-Substitution supprimiert (Greenhough *et al.*, 2010).

#### 4.5.4. GEGENREGULATIONEN AUF DER EBENE DER BCL-2-PROTEINE

Es sind in der Literatur für NSAIDs des Weiteren antiapoptotische Effekte beschrieben wie durch Diclofenac in Neuroblastomzellen (Yamazaki *et al.*, 2006), NS-398 in Osteosarkomzellen (Moalic *et al.*, 2001) und Nimesulid in Kopf-Hals-Karzinomzellen (Czembirek *et al.*, 2009).

Obwohl Diclofenac zu einer Aktivierung des intrinsischen Signalweges mit Cytochrom c Freisetzung und Bax-Translokation führte, wiesen von den Bcl-2-Proteinen Puma, Noxa und Bcl-x<sub>L</sub> antiapoptotische Regulationen auf, die die Apoptose insgesamt abschwächen könnten.

In den untersuchten SCC-Zelllinien fanden wir nach Diclofenac/HA-Behandlung eine Herabregulation der proapoptotischen BH3-only Proteine Puma und Noxa. Das BH3-only Bcl-2-Protein PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) stellt einen wichtigen Regulator der UV-induzierten Apoptose dar. PUMA ist ein direktes transkriptionelles Ziel von p53 (Han *et al.*, 2001; Nakano and Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001; Chipuk *et al.*, 2005). In einer aktuellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass PUMA die Bax-Translokation durch direkte Interaktion mit Bax und kompetitives Binden von Bcl-x<sub>L</sub> ermöglicht (Zhang *et al.*, 2009).

Ein weiteres Protein, welches antiapoptotisch in einer der vier Zelllinien hochreguliert wird, ist Bcl-x<sub>L</sub>. Transgene Mäuse mit einer Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> in epidermalen Keratinozyten zeigen eine stärkere Entwicklung von Hauttumoren (Pena *et al.*, 1998). In vitro verhinderte die Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression in HaCaT-Keratinozyten den Übergang in die Apoptose nach UV-Exposition (Jost *et al.*, 1999), und die Inhibition der Bcl-x<sub>L</sub>-Expression durch siRNA in normalen Keratinozyten sensitivierte die Zellen für proapoptotische Stimuli (Taylor *et al.*, 1999). Ferner zeigen verschiedene histologische Arbeiten, dass Bcl-x<sub>L</sub> das einzige Bcl-2-Protein ist,

welches im kutanen SCC eine Überexpression aufweist (Cerroni and Kerl, 1994; Delehedde *et al.*, 1999). In den Western-Immunoblots wiesen die vier SCC-Zelllinien hingegen keine basale Bcl-x<sub>L</sub> Expression auf und es war überraschenderweise eine Induktion von Bcl-x<sub>L</sub> in der Zelllinie SCC-12 nach Diclofenac-Behandlung zu verzeichnen. In anderen Arbeiten wie mit Gliom- und Prostatakarzinomzellen wurde durch NSAID-Behandlung im Allgemeinen eine Bcl-x<sub>L</sub>-Herabregulation beobachtet (Huang *et al.*, 2001; Nam *et al.*, 2004).

Survival-Pathways sind stark miteinander verknüpft, so dass Gegenregulationen dazu beitragen können, die Homöostase aufrecht zu erhalten. Als ein Nachteil der Gegenregulationen mag jedoch effektive Krebstherapie hierdurch verhindert werden. Bedeutend ist, dass die antiapoptotischen Regulationen nach Diclofenac/HA-Behandlung auch in der resistenten Zelllinie SCL-I auftreten, was für ein prinzipielles Ansprechen dieser Zelllinie sprechen mag, obgleich die Zelllinie Apoptose-resistent ist.

#### 4.6. AUSBLICK

Innerhalb der Gruppe der NSAIDs ist Diclofenac sehr wirksam und löst Apoptose aus. Es stellt sich dennoch die Frage, ob durch Kombination mit anderen Chemotherapeutika oder einer womöglich neuen Generation der NSAIDs, der Stickstoffoxid-spendenden NSAIDs, eine noch effizientere Apoptose zu erzielen sein wird.

Wie wir in dieser Arbeit gezeigt haben, tritt eine Sensitivierung des extrinsischen Signalweges ein, woraus sich eine vereinfachte Immunosurveillance durch zytotoxische T-Lymphozyten ergeben könnte. Imiquimod induziert als immunmodulierende Substanz die Synthese verschiedener Zytokine (IFN, TNF, IL-1, IL-6 und IL-8), die eine Verstärkung des Todesliganden-medierten Signalweges bewirken (Berman *et al.*, 2003). Der extrinsische Signalweg könnte durch gleichzeitige Behandlung mit Diclofenac und einer konsekutiven cFLIP-Herabregulation erleichtert werden. Es ist anzumerken, dass wir in hier nicht dargestellten Experimenten keinen Synergismus zwischen Diclofenac und Imiquimod feststellen konnten. Jedoch schließt dies nicht einen synergistischen Effekt zwischen Imiquimod und Diclofenac *in vivo* aus, da die Tumor-Immunosurveillance nur unter Anwesenheit der im Zellkulturmodell nicht vorhandenen Zellen des Immunsystems überprüft werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine p-ERK- und COX-2-Induktion beobachtet. Die am häufigsten beschriebene Ursache für eine COX-2-Induktion durch NSAIDs stellt der

Ras/Raf/MEK/ERK- Signalweg dar (Wang and DuBois, 2006). Im Falle einer ERK-abhängigen COX-2 Induktion könnten spezifische MEK/ERK-Inhibitoren eingesetzt werden, und somit der PGE<sub>2</sub>-senkende Effekt von Diclofenac wohlmöglich weiter potenziert werden. Ferner wurde über eine im Rahmen einer COX-1-Inhibition stattfindende COX-2 Induktion via iNOS-Aktivierung berichtet (Takeuchi *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2002). Selektive COX-2-Inhibitoren könnten bei Vorliegen dieses Mechanismus durch Umgehung der COX-1-Inhibition somit eine COX-2 Induktion verhindern. Mit der Entwicklung von Stickstoffoxid-spendenden NSAIDs wird zurzeit eine neue potentielle Klasse in der Tumorprävention und Tumorbehandlung erforscht. Im Vergleich zu den konventionellen NSAIDs gibt es Hinweise, dass Stickstoffoxid-spendende NSAIDs eine mehr als hundertfach potentere Inhibition im Wachstum von Colon-Krebszelllinien und eine wirkungsvollere Prävention für das Auftreten von Kolon-Ca im Tiermodell haben. Ein möglicher Wirkmechanismus dieser neueren Substanzgruppe könnte darin liegen, dass sich die ROS-Bildung auf das endoplasmatische Retikulum durch Akkumulation von ungefalteten Proteinen in diesem Zellorganell auswirkt. Der ER-Stress führt zur Aktivierung der ASK1, die via cJun Apoptose auslösen kann (Rigas, 2007; Jana, 2008).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

*Hintergrund:* Von der aktinischen Keratose (AK) geht als häufigste Präkanzerose des Menschen ein signifikantes Gesundheitsrisiko aus: Das Risiko der Progression von einer AK in ein invasives SCC beträgt ca. 5-10% und die Prognose des metastasierten SCC ist meist infaust. Die frühzeitige Therapie der aktinischen Keratose als 'Carcinoma in situ' ist zur Verhinderung einer Entartung in ein invasives Plattenepithelkarzinom indiziert. Erhöhte Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Expression und Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>)-Spiegel wurden für alle Tumorentitäten des Non Melanoma Skin Cancer (NMSC) berichtet. Topisches Diclofenac, welches zusammen mit der Trägersubstanz Hyaluronsäure für die Therapie der aktinischen Keratose zugelassen ist, erreicht eine Heilungsrate von 50% bei leichtem Nebenwirkungsprofil und ist insbesondere bei multiplen AKs/Field-Cancerisation als First-Line-Therapeutikum vorgeschlagen worden (Stockfleth and Kerl, 2006), (Iraji *et al.*, 2008).

*Zielsetzung:* Der Apoptose-Mechanismus von Diclofenac in Non-Melanoma Skin Cancer (NMSC) ist bislang nicht geklärt (Rivers *et al.*, 2002;Merk, 2007). In dieser Arbeit wurden die proapoptotischen Effekte von Diclofenac, der Stellenwert von PGE<sub>2</sub> sowie der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalweg in kutanen Plattenepithelkarzinomzelllinien untersucht.

*Methoden:* Vier humane, kutane SCC-Zelllinien wurden auf die PGE<sub>2</sub>-Spiegel, Expression der Bcl-2-Proteine, den mitochondrialen sowie den extrinsischen Apoptose-Signalweg hin überprüft. Hierzu kamen u.a. die folgenden Methoden zum Einsatz: Western-Immunoblots, Cell Death Detection ELISA, PGE<sub>2</sub>-ELISA, FACS-Analysen, immunhistochemische Färbungen, radioaktive Enzymaktivitätsbestimmungen und ein Proliferationsassay (Real Time Cell Analyser).

*Ergebnisse:* In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Diclofenac wirksam Apoptose in kutanen Plattenepithelkarzinomzelllinien induziert. Weiterhin wurde der Wirkmechanismus auf Ebene des extrinsischen und intrinsischen Signalweges aufgedeckt und verschiedene Gegenregulationen identifiziert. Diclofenac induzierte in drei von vier SCC-

Zelllinien Apoptose. Als wichtiges Charakteristikum von Diclofenac konnte eine Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Spiegel unter Behandlung nachgewiesen werden. Die Supplementierung mit PGE<sub>2</sub> hob die proapoptotischen Effekte von Diclofenac zum Teil auf, was einen partiell COX-2-abhängigen Mechanismus unterstützt.

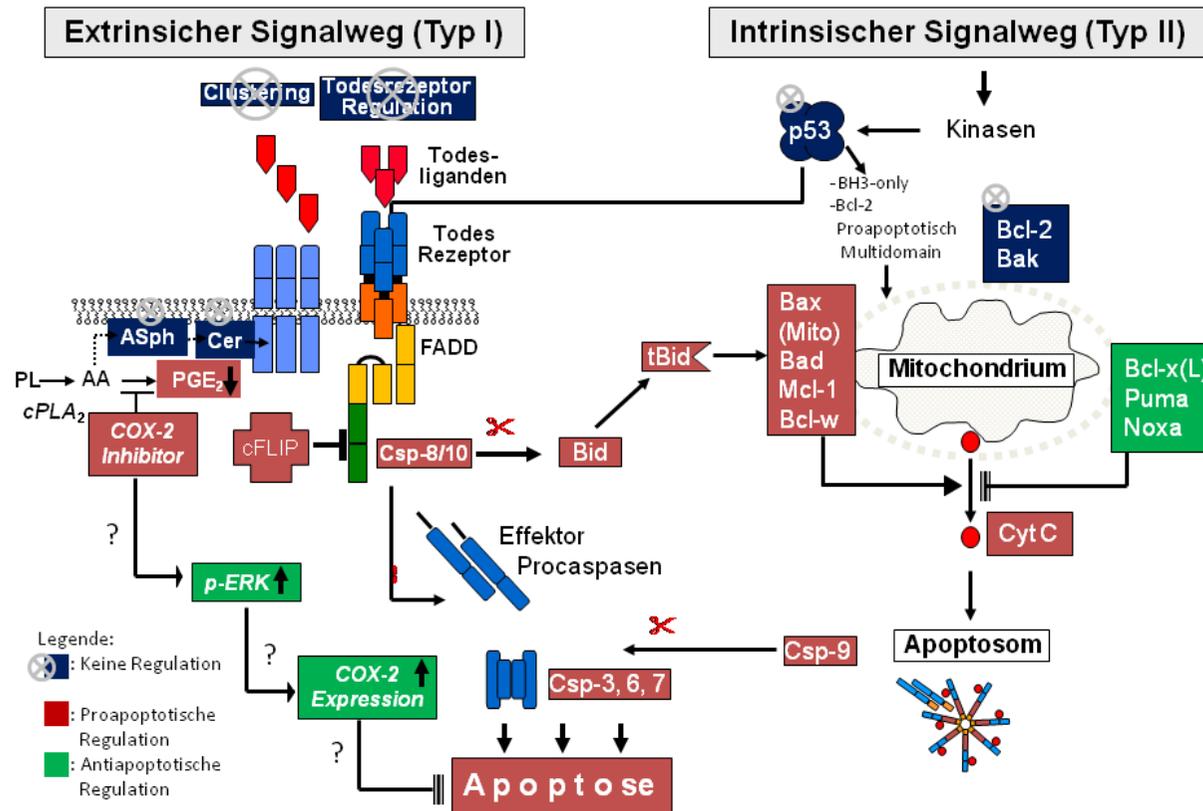
Der Todesliganden-medierte Apoptose-Signalweg (TNF- $\alpha$  -, TRAIL- und CD95-Aktivierung) konnte durch Diclofenac deutlich in sensitiven SCC-Zelllinien verstärkt werden. Der synergistische Effekt von Diclofenac und Todesliganden zeigte sich in der gemessenen Apoptose und einer verstärkten Spaltung der Initiator-Caspasen des extrinsischen Signalweges (Caspase-8/Caspase-10). Eine Herabregulation der cFLIP-Isoformen erschien ursächlich für die Sensitivierung zu sein. Für eine signifikante Todesrezeptor-Induktion oder das Vorliegen eines Todesrezeptor-Clustering nach Diclofenac-Behandlung ließen sich keine Indizien sammeln.

Einen weiteren Teil dieser Arbeit stellte die Überprüfung der Expression der Bcl-2-Proteine dar. Es konnten charakteristische Veränderungen pro- und antiapoptotischer Bcl-2-Proteine festgestellt werden. Im Besonderen wurde proapoptotisches Bad hochreguliert sowie antiapoptotisches Mcl-1 in den Apoptose-sensitiven Zelllinien herabreguliert, wohingegen diese proapoptotischen Regulationen in der Apoptose-resistenten Zelllinie nicht auftraten. Als einen Hinweis auf eine bislang noch nicht beschriebene Regulation nach NSAID-Behandlung zeigte sich das antiapoptotische Multidomäne-Protein Bcl-w unter Diclofenac-Behandlung herabreguliert. Die Veränderungen in der Expression der Bcl-2-Proteine resultierten in einer Translokation von Bax an die mitochondriale Membran und in einer Freisetzung von Cytochrom c als Hauptmerkmale der Aktivierung des intrinsischen (mitochondrialen) Apoptose-Signalweges.

Es ließen sich verschiedene Gegenregulationen identifizieren, die als Ansatzpunkt für zukünftige Weiterentwicklungen hilfreich sein mögen: Zu den antiapoptotischen Veränderungen zählten die Herabregulation von Noxa und Puma in Apoptose-sensitiven wie auch resistenten Zellen. Weiterhin wurden eine p-ERK-Hochregulation und COX-2 Induktion festgestellt, die eine potentielle Abschwächung des Zelltodes medieren könnten. Durch die kombinierte Behandlung von Diclofenac mit einem MEK1-/MEK2-Inhibitor konnte eine signifikante Verstärkung des antiproliferativen Effektes in der Real-Zeit-Zell-Analyse gezeigt und die Bedeutung der p-ERK-Hochregulation gestützt werden.

*Schlussfolgerung:* Die Ergebnisse zeigen einen Teil der Wirkmechanismen von Diclofenac in SCC-Zellen auf und könnten weitere Anpassungen und Verbesserungen für eine neue Therapie erlauben. Auf der Ebene der Bcl-2-Proteine konnten als proapoptotische Regulationen eine Hochregulation von Bad und eine Herabregulation von Mcl-1 und Bcl-w in sensitiven Zellen beobachtet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auf der extrinsischen Signaltransduktionsebene der Einsatz von Diclofenac mit Todesliganden zur Potenzierung der Apoptose führt. Es besteht Grund zur Annahme, dass durch den zusätzlichen Einsatz von Substanzen wie Imiquimod, die eine Verstärkung des Todesliganden-medierten Signalweges bewirken, synergistische Effekte in der klinischen Anwendung erzielt werden könnten. Als weitere Möglichkeit der ‘molecular targeted’ Therapie könnte durch gezielte Blockierung von Gegenregulationen wie durch den Einsatz von ERK-Inhibitoren einer Phospho-ERK-Hochregulation sowie evnetuell einer COX-2 Induktion entgegengewirkt werden und das Ziel einer weiteren Sensitivierung gegenüber Diclofenac positiv beeinflusst werden.



**Abb.4.2: Multiple Effekte von Diclofenac auf der Ebene von Apoptoseregulatoren.** Der intrinsische und extrinsische Signalweg wiesen verschiedene Regulationen auf. Auf Ebene des extrinsischen Signalweges sind keine signifikanten Regulationen der Todesrezeptor-Expression im FACS, kein Nachweis von Clustering in der Immunfluoreszenz sowie keine Veränderung der ASph (Saure Sphingomyelinase)-Aktivität nachweisbar. Ursächlich für die Sensitivierung des extrinsischen Signalweges ist cFLIP-Herabregulation. Auf Ebene des intrinsischen Signalweges wiesen Bax (Mito), Bad, Mcl-1 und Bcl-w proapoptische Regulationen auf mit konsekutiver Caspase-9-Spaltung. Als Brückenschlag zwischen beiden Signalwegen waren tBid Spaltprodukte nachweisbar. *Legende:* Rot hinterlegte Felder: nachweislich proapoptische Regulationen, grüne Felder: antiapoptische Regulationen, blaue Felder: keine Regulation nachweisbar, ASph: saure Sphingomyelinase, Cer: Ceramid, Cyt C: Cytochrom c. Fragezeichen: Kausalzusammenhang in der Literatur beschrieben, jedoch nicht in dieser Arbeit nachgewiesen. Scherensymbole weisen auf Proteaseaktivität hin.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                    |  |
|--------------------|--|
| AIF                | apoptosis inducing factor                      |
| AJCC               | American joint committee on cancer             |
| AK                 | Aktinische Keratose                            |
| Apaf-1             | apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1    |
| ASM                | Acid Sphingomyelinase                          |
| Bax                | Bcl-2-associated protein x                     |
| BAD                | Bcl-2 Antagonist of cell Death                 |
| Bak                | Bcl-2 Antagonist/Killer                        |
| Bax                | Bcl-2-Associated X protein                     |
| BCC                | Basal Cell Carcinoma                           |
| Bcl-2              | B-cell leukaemia/ lymphoma protein 2           |
| Bcl-X <sub>L</sub> | Bcl-2 like protein                             |
| BH3                | Bcl-2 Homology domain 3                        |
| Bid                | BH3-interacting domain death agonist           |
| CARD               | Caspase-Rekrutierungs-Domäne                   |
| Caspase            | cysteineaspartate protease                     |
| COX-2              | Cyclooxygenase-2                               |
| CREB               | cAMP response element-binding protein          |
| D/HA               | 3% Diclofenac in 2,5% Hyaluronsäure (Solaraze) |
| DED                | death effector domain/Todeseffektordomäne      |
| DD                 | death domain/Todesdomäne                       |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| DIABLO                            | Direct IAP Binding protein with Low pI   |
| DISC                              | Death-Inducing Signaling Complex         |
| DMSO                              | Dimethylsulfoxid                         |
| DNA                               | Desoxyribonukleinsäure                   |
| DR4                               | Death Receptor 4                         |
| DR5                               | Death Receptor 5                         |
| dsDNA                             | Doppelstrang-DNA                         |
| ECL                               | enhanced chemiluminescence               |
| EDTA                              | Ethylendiamintetraessigsäure             |
| EGFR                              | epidermal growth factor receptor         |
| EIA                               | Enzym-Immunoassay                        |
| EP <sub>1</sub> - EP <sub>4</sub> | PGE <sub>2</sub> -Rezeptor-Subtypen      |
| ERK                               | extracellular signal-regulated kinase    |
| FACS                              | Fluorescence-activated cell sorting      |
| FADD                              | Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne |
| FasL                              | Fas-Ligand (Synonym: CD95-Ligand/CH-11)  |
| FCS                               | fetal calf serum                         |
| FLICE                             | FADD-Like IL-1 Converting Enzyme         |
| FLIP                              | FLICE Inhibitory Protein                 |
| HA                                | Hyaluronsäure                            |
| H/S                               | HEPES/Saline                             |
| IAPs                              | Inhibitor of apoptosis protein           |
| LDH                               | Laktatdehydrogenase                      |

|                  |   |
|------------------|---|
| MAPK             | mitogen-activated protein kinase              |
| MEK              | MAP/ERK-kinase                                |
| NAD <sup>+</sup> | Nicotinsäureamidadenindinukleotid             |
| NADH             | Reduziertes Nicotinsäureamidadenindinukleotid |
| NF-κB            | nuclear factor-κB                             |
| nm               | Nanometer                                     |
| NMSC             | Non-melanoma skin cancer                      |
| NSAID            | non-steroidal anti-inflammatory drug          |
| PFA              | Paraformaldehyd                               |
| PGE <sub>2</sub> | Prostaglandin E <sub>2</sub>                  |
| PI               | Propidiumjodid                                |
| PI3K/Akt         | phosphatidylinositol 3-kinase                 |
| PK               | primäre/nicht entartete Keratinozyten         |
| PKA              | cAMP-dependent protein kinase                 |
| PUMA             | p53 Upregulated Modulator of Apoptosis        |
| ROS              | reactive oxygen species                       |
| RPTPκ            | receptor-type protein tyrosine phosphatase κ  |
| RTCA             | Real-Time Cell Analysis                       |
| SCC              | squamous cell carcinoma                       |
| SDS              | Natriumdodecylsulfat                          |
| Smac             | Second Mitochondrial Activator of Caspase     |
| tBid             | Truncated Bid                                 |

|          |  |
|----------|--|
| TNF      | Tumour Necrosis Factor                           |
| TRADD    | TNF-Rezeptor assoziierte Protein                 |
| TRAIL    | TNF-related apoptosis-inducing ligand            |
| XIAP     | X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein          |
| zVAD-fmk | benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp fluoromethylketone |
| 8-OHdG   | 8-hydroxydeoxyguanosine                          |

## LITERATURVERZEICHNIS

Adams,J.M., and Cory,S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**: 1324-1337.

Akgul,C. (2009) Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1326-1336.

Alam,M., and Ratner,D. (2001) Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* **344**: 975-983.

Altmeyer P, Paech V (2011) Springer-Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Barcelona Hongkong London Mailand Paris Tokyo, 1852

An,K.P., Athar,M., Tang,X., Katiyar,S.K., Russo,J., Beech,J. *et al.* (2002) Cyclooxygenase-2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches. *Photochem Photobiol* **76**: 73-80.

Antignani,A., and Youle,R.J. (2006) How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* **18**: 685-689.

Bachmann,F., Buechner,S.A., Wernli,M., Strebel,S., and Erb,P. (2001) Ultraviolet light downregulates CD95 ligand and trail receptor expression facilitating actinic keratosis and squamous cell carcinoma formation. *Journal of Investigative Dermatology* **117**: 59-66.

Bae,I.H., Park,M.J., Yoon,S.H., Kang,S.W., Lee,S.S., Choi,K.M., and Um,H.D. (2006) Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res* **66**: 4991-4995.

Barnett,J., Chow,J., Ives,D., Chiou,M., Mackenzie,R., Osen,E. *et al.* (1994) Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* **1209**: 130-139.

Berman,B., Sullivan,T., De Araujo,T., and Nadji,M. (2003) Expression of Fas-receptor on basal cell carcinomas after treatment with imiquimod 5% cream or vehicle. *British Journal of Dermatology* **149**: 59-61.

Black,A.T., Gray,J.P., Shakarjian,M.R., Mishin,V., Laskin,D.L., Heck,D.E., and Laskin,J.D. (2008) UVB light upregulates prostaglandin synthases and prostaglandin receptors in mouse keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **232**: 14-24.

Boukamp,P., Petrussevska,R.T., Breitkreutz,D., Hornung,J., Markham,A., and Fusenig,N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell-line. *Journal of Cell Biology* **106**: 761-771.

- Buckman,S.Y., Gresham,A., Hale,P., Hruza,G., Anast,J., Masferrer,J., and Pentland,A.P. (1998) COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* **19**: 723-729.
- Butler,G.J., Neale,R., Green,A.C., Pandeya,N., and Whiteman,D.C. (2005) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of actinic keratoses and squamous cell cancers of the skin. *Journal of the American Academy of Dermatology* **53**: 966-972.
- Casado,M., Molla,B., Roy,R., Fernandez-Martinez,A., Cucarella,C., Mayoral,R. *et al.* (2007) Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes. *Hepatology* **45**: 631-638.
- Cerroni,L., and Kerl,H. (1994) Aberrant Bcl-2 Protein Expression Provides A Possible Mechanism of Neoplastic Cell-Growth in Cutaneous Basal-Cell Carcinoma. *Journal of Cutaneous Pathology* **21**: 398-403.
- Chan,T.A., Morin,P.J., Vogelstein,B., and Kinzler,K.W. (1998) Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 681-686.
- Chang,D.W., Xing,Z., Pan,Y., Algeciras-Schimmich,A., Barnhart,B.C., Yaish-Ohad,S. *et al.* (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* **21**: 3704-3714.
- Chang,F., Steelman,L.S., Lee,J.T., Shelton,J.G., Navolanic,P.M., Blalock,W.L. *et al.* (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**: 1263-1293.
- Che,S.M., Zhang,X.Z., Hou,L., and Song,T.B. (2010) Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances radiosensitivity of radioresistant esophageal cancer cells by inhibiting AKT activation and inducing apoptosis. *Cancer Invest* **28**: 679-688.
- Chen,L., Willis,S.N., Wei,A., Smith,B.J., Fletcher,J.I., Hinds,M.G. *et al.* (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**: 393-403.
- Chen,S.Z., Liu,X.G., Yue,P., Schonthal,A.H., Khuri,F.R., and Sun,S.Y. (2007) CCAAT/enhancer binding protein homologous protein-dependent death receptor 5 induction and Ubiquitin/Proteasome-mediated cellular FLICE-inhibitory protein down-regulation contribute to enhancement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by dimethyl-celecoxib in human non-small-cell lung cancer cells. *Molecular Pharmacology* **72**: 1269-1279.
- Chipuk,J.E., Moldoveanu,T., Llambi,F., Parsons,M.J., and Green,D.R. (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**: 299-310.
- Cho,S., Hahm,J.H., and Hong,Y.S. (2001a) Analysis of p53 and BAX mutations, loss of heterozygosity, p53 and BCL2 expression and apoptosis in basal cell carcinoma in Korean patients. *Br J Dermatol* **144**: 841-848.

- Cho,S.H., Delehedde,M., Rodriguez-Villanueva,J., Brisbay,S., and McDonnell,T.J. (2001b) Bax gene disruption alters the epidermal response to ultraviolet irradiation and in vivo induced skin carcinogenesis. *International Journal of Molecular Medicine* **7**: 235-241.
- Chun,K.S., Akunda,J.K., and Langenbach,R. (2007) Cyclooxygenase-2 inhibits UVB-induced apoptosis in mouse skin by activating the prostaglandin E-2 receptors, EP2 and EP4. *Cancer Research* **67**: 2015-2021.
- Cooper,S.J., and Bowden,G.T. (2007) Ultraviolet B regulation of transcription factor families: Roles-of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. *Current Cancer Drug Targets* **7**: 325-334.
- Crisostomo,P.R., Wang,M.J., Wairiuko,G.M., Morrell,E.D., Terrell,A.M., Seshadri,P. *et al.* (2006) High passage number of stem cells adversely affects stem cell activation and myocardial protection. *Shock* **26**: 575-580.
- Cuconati,A., Mukherjee,C., Perez,D., and White,E. (2003) DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev* **17**: 2922-2932.
- Czembirek,C., Eder-Czembirek,C., Erovic,B.M., Turhani,D., Spittler,A., Selzer,E. *et al.* (2009) The Cyclooxygenase-2 Inhibitor Nimesulide, a Nonsteroidal Analgesic, Decreases the Effect of Radiation Therapy in Head-and-Neck Cancer Cells. *Strahlentherapie und Onkologie* **185**: 310-317.
- Dauer,M., Hertel,J., Bauer,C., Renner,F., Schad,K., Schnurr,M. *et al.* (2005) Chemosensitization of pancreatic carcinoma cells to enhance T cell-mediated cytotoxicity induced by tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Journal of Immunotherapy* **28**: 332-342.
- de Gruijl,F.R. (2000) Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Singlet Oxygen, Uv-A, and Ozone* **319**: 359-366.
- Debatin,K.M., and Krammer,P.H. (2004) Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* **23**: 2950-2966.
- Delehedde,M., Cho,S.H., Sarkiss,M., Brisbay,S., Davies,M., El-Naggar,A.K., and McDonnell,T.J. (1999) Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer* **85**: 1514-1522.
- Dirschka,T., Bierhoff,E., Pflugfelder,A., and Garbe,C. (2010) Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel induces regression of cancerous transformation in actinic keratoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **24**: 258-263.
- Domina,A.M., Vrana,J.A., Gregory,M.A., Hann,S.R., and Craig,R.W. (2004) MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* **23**: 5301-5315.
- Eberle,J., Kurbanov,B.M., Hossini,A.M., Trefzer,U., and Fecker,L.F. (2007) Overcoming apoptosis deficiency of melanoma - Hope for new therapeutic approaches. *Drug Resistance Updates* **10**: 218-234.

- Edward, M., Quinn, J.A., Pasonen-Seppanen, S.M., McCann, B.A., and Tammi, R.H. (2010) 4-Methylumbelliferone inhibits tumour cell growth and the activation of stromal hyaluronan synthesis by melanoma cell-derived factors. *Br J Dermatol* **162**: 1224-1232.
- El-Deiry, W.S. (2007) Targeting mutant p53 shows promise for sunscreens and skin cancer. *Journal of Clinical Investigation* **117**: 3658-3660.
- Elder, D.J., Halton, D.E., Crew, T.E., and Paraskeva, C. (2000) Apoptosis induction and cyclooxygenase-2 regulation in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines by the cyclooxygenase-2-selective non-steroidal anti-inflammatory drug NS-398. *Int J Cancer* **86**: 553-560.
- Elder, D.J.E., Halton, D.E., Playle, L.C., and Paraskeva, C. (2002) The MEK/ERK pathway mediates COX-2-selective NSAID-induced apoptosis and induced COX-2 protein expression in colorectal carcinoma cells. *International Journal of Cancer* **99**: 323-327.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**: 495-516.
- Elwood, P.C., Gallagher, A.M., Duthie, G.G., Mur, L.A.J., and Morgan, G. (2009) Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet* **373**: 1301-1309.
- Elyassaki, W., and Wu, S.Y. (2006) Lipid rafts mediate ultraviolet light-induced fas aggregation in M624 melanoma cells. *Photochemistry and Photobiology* **82**: 787-792.
- Fakurazi, S., Ithnin, H., Amom, Z., Baharuldin, T.H., Moorthy, M.M., and Win, M.L. (2006) Low doses of diclofenac induces hepatocellular changes in rat treated in vivo. *Acta Pharmacologica Sinica* **27**: 357.
- Farrar, C.W., Bell, H.K., and King, C.M. (2003) Allergic contact dermatitis from propylene glycol in Efudix cream. *Contact Dermatitis* **48**: 345.
- Fecker, L.F., Stockfleth, E., Braun, F.K., Rodust, P.M., Schwarz, C., Kohler, A. *et al.* (2010) Enhanced Death Ligand-Induced Apoptosis in Cutaneous SCC Cells by Treatment with Diclofenac/Hyaluronic Acid Correlates with Downregulation of c-FLIP. *J Invest Dermatol*.
- Fecker, L.F., Stockfleth, E., Nindl, I., Ulrich, C., Forschner, T., and Eberle, J. (2007) The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *British Journal of Dermatology* **156**: 25-33.
- Filipowicz, E., Adegboyega, P., Sanchez, R.L., and Gatalica, Z. (2002) Expression of CD95 (Fas) in sun-exposed human skin and cutaneous carcinomas. *Cancer* **94**: 814-819.
- Fischer, S.M., Lo, H.H., Gordon, G.B., Seibert, K., Kelloff, G., Lubet, R.A., and Conti, C.J. (1999) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis* **25**: 231-240.
- Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**: 76-100.
- Franke, J.C., Plotz, M., Prokop, A., Geilen, C.C., Schmalz, H.G., and Eberle, J. (2010) New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. *Biochem Pharmacol* **79**: 575-586.

- Fujino,H., West,K.A., and Regan,J.W. (2002) Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E-2. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 2614-2619.
- Fulda,S., and Debatin,K.M. (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-4811.
- Gaiser,T., Becker,M.R., Habel,A., Reuss,D.E., Ehemann,V., Rami,A., and Siegelin,M.D. (2008) TRAIL-mediated apoptosis in malignant glioma cells is augmented by celecoxib through proteasomal degradation of survivin. *Neuroscience Letters* **442**: 109-113.
- Gibson,L., Holmgreen,S.P., Huang,D.C., Bernard,O., Copeland,N.G., Jenkins,N.A. *et al.* (1996) bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* **13**: 665-675.
- Gillissen,B., Wendt,J., Richter,A., Richter,A., Muer,A., Overkamp,T. *et al.* (2010) Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol* **188**: 851-862.
- Golijanin,D., Tan,J.Y., Kazior,A., Cohen,E.G., Russo,P., Dalbagni,G. *et al.* (2004) Cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of the penis. *Clin Cancer Res* **10**: 1024-1031.
- Gomez-Lechon,M.J., Ponsoda,X., O'Connor,E., Donato,T., Castell,J.V., and Jover,R. (2003) Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochemical Pharmacology* **66**: 2155-2167.
- Grau,M.V., Baron,J.A., Langholz,B., Karagas,M., Greenberg,E.R., Stukel,T.A., and Mandel,J.S. (2006) Effect of MAIDS on the recurrence of nonmelanoma skin cancer. *International Journal of Cancer* **119**: 682-686.
- Greenhough,A., Wallam,C.A., Hicks,D.J., Moorghen,M., Williams,A.C., and Paraskeva,C. (2010) The proapoptotic BH3-only protein Bim is downregulated in a subset of colorectal cancers and is repressed by antiapoptotic COX-2/PGE(2) signalling in colorectal adenoma cells. *Oncogene*.
- Grether-Beck,S., Salahshour-Fard,M., Timmer,A., Brenden,H., Felsner,I., Walli,R. *et al.* (2008) Ceramide and raft signaling are linked with each other in UVA radiation-induced gene expression. *Oncogene* **27**: 4768-4778.
- Grosch,S., Maier,T.J., Schiffmann,S., and Geisslinger,G. (2006) Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute* **98**: 736-747.
- Guicciardi,M.E., and Gores,G.J. (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J* **23**: 1625-1637.
- Haghiac,M., and Walle,T. (2005) Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutrition and Cancer-An International Journal* **53**: 220-231.
- He,Q., Luo,X., Jin,W., Huang,Y., Reddy,M.V.R., Reddy,E.P., and Sheikh,M.S. (2008) Celecoxib and a novel COX-2 inhibitor ON09310 upregulate death receptor 5 expression via GADD153/CHOP. *Oncogene* **27**: 2656-2660.

- Heckmann,M., Zogelmeier,F., and Konz,B. (2002) Frequency of facial basal cell carcinoma does not correlate with site-specific UV exposure. *Arch Dermatol* **138**: 1494-1497.
- Hengartner,M.O., and Horvitz,H.R. (1994) Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 581-586.
- Higashi,Y., Kanekura,T., and Kanzaki,T. (2000) Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: Evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *International Journal of Cancer* **86**: 667-671.
- Hill,L.L., Ouhtit,A., Loughlin,S.M., Kripke,M.L., Ananthaswamy,H.N., and Owen-Schaub,L.B. (1999) Fas ligand: A sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science* **285**: 898-900.
- Hofseth,L.J., Hussain,S.P., and Harris,C.C. (2004) p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**: 177-181.
- Huang,Y., He,Q., Hillman,M.J., Rong,R., and Sheikh,M.S. (2001) Sulindac sulfide-induced apoptosis involves death receptor 5 and the caspase 8-dependent pathway in human colon and prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001 Sep 15 ;61 (18 ):6918 -24 **61**: 6918-6924.
- Inoue,A., Muranaka,S., Fujita,H., Kanno,T., Tamai,H., and Utsumi,K. (2004) Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: Dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome c, and caspase pathway. *Free Radical Biology and Medicine* **37**: 1290-1299.
- Iraji,F., Siadat,A.H., Asilian,A., Enshaieh,S., and Shahmoradi,Z. (2008) The safety of diclofenac for the management and treatment of actinic keratoses. *Expert Opinion on Drug Safety* **7**: 167-172.
- Isoherranen,K., Punnonen,K., Jansen,C., and Uotila,P. (1999) Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *British Journal of Dermatology* **140**: 1017-1022.
- Itano,N., Sawai,T., Atsumi,F., Miyaishi,O., Taniguchi,S., Kannagi,R. *et al.* (2004) Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J Biol Chem* **279**: 18679-18687.
- Jana,N.R. (2008) NSAIDs and apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**: 1295-1301.
- Jendrossek,V., Handrick,R., and Belka,C. (2003) Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* **17**: 1547-1549.
- Jiang,X., and Wang,X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* **275**: 31199-31203.
- Johnson,J.L., Wimsatt,J., Buckel,S.D., Dyer,R.D., and Maddipati,K.R. (1995) Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Arch Biochem Biophys* **324**: 26-34.
- Jost,M., Class,R., Kari,C., Jensen,P.J., and Rodeck,U. (1999) A central role of Bcl-X-L in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands. *Journal of Investigative Dermatology* **112**: 443-449.

- Jury,C.S., Ramraka-Jones,V.S., Gudi,V., and Herd,R.M. (2005) A randomized trial of topical 5% 5-fluorouracil (Efudix cream) in the treatment of actinic keratoses comparing daily with weekly treatment. *Br J Dermatol* **153**: 808-810.
- Kern,M.A., Haugg,A.M., Koch,A.F., Schilling,T., Breuhahn,K., Walczak,H. *et al.* (2006) Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* **66**: 7059-7066.
- Kerr,J.F., Wyllie,A.H., and Currie,A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.
- Kim,D.J., Murray,I.A., Burns,A.M., Gonzalez,F.J., Perdew,G.H., and Peters,J.M. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits epidermal cell proliferation by down-regulation of kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 9519-9527.
- Kim,D.J., Prabhu,K.S., Gonzalez,F.J., and Peters,J.M. (2006) Inhibition of chemically induced skin carcinogenesis by sulindac is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta). *Carcinogenesis* **27**: 1105-1112.
- Kim,K.S., Yoon,J.H., Kim,J.K., Baek,S.J., Eling,T.E., Lee,W.J. *et al.* (2004) Cyclooxygenase inhibitors induce apoptosis in oral cavity cancer cells by increased expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**: 1298-1303.
- Kim,T.I., Jin,S.H., Kim,W.H., Kang,E.H., Choi,K.Y., Kim,H.J. *et al.* (2001) Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis* **16**: 167-173.
- Kim,Y., Lee,Y.S., Choe,J., Lee,H., Kim,Y.M., and Jeoung,D. (2008) CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2. *J Biol Chem* **283**: 22513-22528.
- Kiriyama,M., Ushikubi,F., Kobayashi,T., Hirata,M., Sugimoto,Y., and Narumiya,S. (1997) Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *British Journal of Pharmacology* **122**: 217-224.
- Knudson,C.M., Johnson,G.M., Lin,Y., and Korsmeyer,S.J. (2001) Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Res* **61**: 659-665.
- Krawtchenko,N., Roewert-Huber,J., Ulrich,M., Mann,I., Sterry,W., and Stockfleth,E. (2007) A randomised study of topical 5% imiquimod vs. topical 5-fluorouracil vs. cryosurgery in immunocompetent patients with actinic keratoses: a comparison of clinical and histological outcomes including 1-year follow-up. *British Journal of Dermatology* **157**: 34-40.
- Kulms,D., Zeise,E., Poppelmann,B., and Schwarz,T. (2002) DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* **21**: 5844-5851.
- Lebwohl,M., Dinehart,S., Whiting,D., Lee,P.K., Tawfik,N., Jorizzo,J. *et al.* (2004) 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* **50**: 714-721.

- Lee,H.W., Lee,S.S., Lee,S.J., and Um,H.D. (2003a) Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Cancer Res* **63**: 1093-1100.
- Lee,J.L., Mukhtar,H., Bickers,D.R., Kopelovich,L., and Athar,M. (2003b) Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**: 294-306.
- Leverkus,M., Neumann,M., Mengling,T., Rauch,C.T., Brocker,E.B., Krammer,P.H., and Walczak,H. (2000) Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res* **60**: 553-559.
- Leverkus,M., Yaar,M., and Gilchrist,B.A. (1997) Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp Cell Res* **232**: 255-262.
- Lewis,T.S., Shapiro,P.S., and Ahn,N.G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- Liou,J.Y., Ghelani,D., Yeh,S., and Wu,K.K. (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3epsilon. *Cancer Res* **67**: 3185-3191.
- Liston,P., Fong,W.G., and Korneluk,R.G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* **22**: 8568-8580.
- Liu,X., Yue,P., Schonthal,A.H., Khuri,F.R., and Sun,S.Y. (2006) Cellular FLICE-inhibitory protein down-regulation contributes to celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Cancer Research* **66**: 11115-11119.
- Liu,X.H., Yao,S., Kirschenbaum,A., and Levine,A.C. (1998) NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* **58**: 4245-4249.
- Lockshin,R.A., and Zakeri,Z. (2004) Caspase-independent cell death? *Oncogene* **23**: 2766-2773.
- Lokeshwar,V.B., Lopez,L.E., Munoz,D., Chi,A., Shirodkar,S.P., Lokeshwar,S.D. *et al.* (2010) Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer Res* **70**: 2613-2623.
- Lu,X., Xie,W., Reed,D., Bradshaw,W.S., and Simmons,D.L. (1995) Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7961-7965.
- Maltusch,A., Rowert-Huber,J., Matthies,C., Lange-Asschenfeldt,S., and Stockfleth,E. (2011) Modes of action of diclofenac 3%/hyaluronic acid 2.5% in the treatment of actinic keratosis. *J Dtsch Dermatol Ges* **9**: 1011-1017.
- Mammone,T., Gan,D., and Foyouzi-Youssefi,R. (2006) Apoptotic cell death increases with senescence in normal human dermal fibroblast cultures. *Cell Biology International* **30**: 903-909.
- Martin,S., Phillips,D.C., Szekely-Szucs,K., Elghazi,L., Desmots,F., and Houghton,J.A. (2005) Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex

- components into ceramide-enriched caveolae. *Cancer Res* 2005 Dec 15 ;65 (24 ):11447 -58 **65**: 11447-11458.
- Maubec,E., Petrow,P., Scheer-Senyarich,I., Duvillard,P., Lacroix,L., Gelly,J. *et al.* (2011) Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin. *J Clin Oncol* **29**: 3419-3426.
- Maurer,U., Charvet,C., Wagman,A.S., Dejardin,E., and Green,D.R. (2006) Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* **21**: 749-760.
- Meade,E.A., McIntyre,T.M., Zimmerman,G.A., and Prescott,S.M. (1999) Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* **274**: 8328-8334.
- Merk,H.F. (2007) Topical diclofenac in the treatment of actinic keratoses. *International Journal of Dermatology* **46**: 12-18.
- Mihara,M., Erster,S., Zaika,A., Petrenko,O., Chittenden,T., Pancoska,P., and Moll,U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**: 577-590.
- Mittelbronn,M.A., Mullins,D.L., Ramos-Caro,F.A., and Flowers,F.P. (1998) Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol* **37**: 677-681.
- Moalic,S., Liagre,B., Le Bail,J.C., and Beneytout,J.L. (2001) Dose-dependent modulation of apoptosis and cyclooxygenase-2 expression in human 1547 osteosarcoma cells by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *International Journal of Oncology* **18**: 533-540.
- Muller,A.C., Handrick,R., Elsaesser,S.J., Rudner,J., Henke,G., Ganswindt,U. *et al.* (2008) Importance of Bak for celecoxib-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* **76**: 1082-1096.
- Munger,K., Phelps,W.C., Bubb,V., Howley,P.M., and Schlegel,R. (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**: 4417-4421.
- Munro,S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**: 377-388.
- Nakamoto,N., Higuchi,H., Kanamori,H., Kurita,S., Tada,S., Takaishi,H. *et al.* (2006) Cyclooxygenase-2 inhibitor and interferon-beta synergistically induce apoptosis in human hepatoma cells in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology* **29**: 625-635.
- Nam,D.H., Park,K., Park,C., Im,Y.H., Kim,M.H., Lee,S. *et al.* (2004) Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Oncol Rep* **11**: 263-268.
- Ng,L.E., Halliwell,B., and Wong,K.P. (2008) Nephrotoxic cell death by diclofenac and meloxicam. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **369**: 873-877.
- Niederberger,E., Tegeder,I., Vetter,G., Schmidtko,A., Schmidt,H., Euchenhofer,C. *et al.* (2001) Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J* **15**: 1622-1624.

- Nijhawan,D., Fang,M., Traer,E., Zhong,Q., Gao,W.H., Du,F.H., and Wang,X.D. (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes & Development* **17**: 1475-1486.
- Nindl,I., Gottschling,M., Krawtchenko,N., Lehmann,M.D., Roewert-Huber,J., Eberle,J. *et al.* (2007) Low prevalence of p53, p16(INK4a) and Ha-ras tumour-specific mutations in low-graded actinic keratosis. *British Journal of Dermatology* **156**: 34-39.
- Ortonne,J.P. (2002) From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology* **146**: 20-23.
- Paik,J.H., Ju,J.H., Lee,J.Y., Boudreau,M.D., and Hwang,D.H. (2000) Two opposing effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the expression of the inducible cyclooxygenase. Mediation through different signaling pathways. *J Biol Chem* **275**: 28173-28179.
- Pan,M.R., Chang,H.C., and Hung,W.C. (2008) Non-steroidal anti-inflammatory drugs suppress the ERK signaling pathway via block of Ras/c-Raf interaction and activation of MAP kinase phosphatases. *Cell Signal* **20**: 1134-1141.
- Paz,M.L., Ferrari,A., Weill,F.S., Leoni,J., and Maglio,D.H. (2008) Time-course evaluation and treatment of skin inflammatory immune response after ultraviolet B irradiation. *Cytokine* **44**: 70-77.
- Pena,J.C., Rudin,C.M., and Thompson,C.B. (1998) A Bcl-x(L) transgene promotes malignant conversion of chemically initiated skin papillomas. *Cancer Research* **58**: 2111-2116.
- Peng,H., Zhou,J.L., Liu,S.Q., Hu,Q.J., Ming,J.H., and Qiu,B. (2010) Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes in vitro. *Inflamm Res* **59**: 519-530.
- Peng,Z., Yu,Q., and Bao,L. (2008) The application of gene therapy in China. *IDrugs* **11**: 346-350.
- Pentland,A.P., Schoggins,J.W., Scott,G.A., Khan,K.N.M., and Han,R.J. (1999) Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis* **20**: 1939-1944.
- Peramo,A., Marcelo,C.L., Goldstein,S.A., and Martin,D.C. (2010) Improved preservation of the tissue surrounding percutaneous devices by hyaluronic acid and dermatan sulfate in a human skin explant model. *Ann Biomed Eng* **38**: 1098-1110.
- Pflugfelder,A., Welter,A.K., Leiter,U., Weide,B., Held,L., Eigentler,T.K. *et al.* (2012) Open label randomized study comparing 3 months vs. 6 months treatment of actinic keratoses with 3% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel: a trial of the German Dermatologic Cooperative Oncology Group. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **26**: 48-53.
- Pierceall,W.E., Goldberg,L.H., Tainsky,M.A., Mukhopadhyay,T., and Ananthaswamy,H.N. (1991) Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol Carcinog* **4**: 196-202.
- Pop,C., Timmer,J., Sperandio,S., and Salvesen,G.S. (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* **22**: 269-275.

- Puizina-Ivic,N., Sapunar,D., Marasovic,D., and Miric,L. (2008) An Overview of Bcl-2 Expression in Histopathological Variants of Basal Cell Carcinoma, Squamous Cell Carcinoma, Actinic Keratosis and Seborrheic Keratosis. *Collegium Antropologicum* **32**: 61-65.
- Rampino,N., Yamamoto,H., Ionov,Y., Li,Y., Sawai,H., Reed,J.C., and Perucho,M. (1997) Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**: 967-969.
- Rheinwald,J.G., and Beckett,M.A. (1981) Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res* **41**: 1657-1663.
- Rice,P.L., Goldberg,R.J., Ray,E.C., Driggers,L.J., and Ahnen,D.J. (2001) Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and induction of apoptosis by sulindac metabolites. *Cancer Res* **61**: 1541-1547.
- Riendeau,D., Percival,M.D., Brideau,C., Charleson,S., Dube,D., Ethier,D. *et al.* (2001) Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* **296**: 558-566.
- Rigas,B. (2007) The use of nitric oxide-donating nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of colorectal neoplasia. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 55-59.
- Rivers,J.K., Arlette,J., Shear,N., Guenther,L., Carey,W., and Poulin,Y. (2002) Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Br J Dermatol* **146**: 94-100.
- Robles,A.I., Rodriguez-Puebla,M.L., Glick,A.B., Trempus,C., Hansen,L., Sicinski,P. *et al.* (1998) Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo. *Genes & Development* **12**: 2469-2474.
- Rodriguez-Puebla,M.L., Robles,A.I., Johnson,D.G., LaCava,M., and Conti,C.J. (1998) Synchronized proliferation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of mouse skin: An in vivo model for cell cycle regulation. *Cell Growth & Differentiation* **9**: 31-39.
- Rodriguez-Villanueva,J., Greenhalgh,D., Wang,X.J., Bundman,D., Cho,S., Delehedde,M. *et al.* (1998) Human keratin-1,bcl-2 transgenic mice aberrantly express keratin 6, exhibit reduced sensitivity to keratinocyte cell death induction, and are susceptible to skin tumor formation. *Oncogene* **16**: 853-863.
- Rodust,P.M., Stockfleth,E., Ulrich,C., Leverkus,M., and Eberle,J. (2009) UV-induced squamous cell carcinoma--a role for antiapoptotic signalling pathways. *Br J Dermatol* **161 Suppl 3**: 107-115.
- Rowe,D.E., Carroll,R.J., and Day,C.L., Jr. (1992) Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol* **26**: 976-990.
- Rowert-Huber,J., Patel,M.J., Forschner,T., Ulrich,C., Eberle,J., Kerl,H. *et al.* (2007) Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol* **156 Suppl 3**: 8-12.

- Rudner,J., Elsaesser,S.J., Jendrossek,V., and Huber,S.M. (2011) Anti-apoptotic Bcl-2 fails to form efficient complexes with pro-apoptotic Bak to protect from Celecoxib-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* **81**: 32-42.
- Russell,J.H., and Ley,T.J. (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**: 323-370.
- Schwartz,R.A., Bridges,T.M., Butani,A.K., and Ehrlich,A. (2008) Actinic keratosis: an occupational and environmental disorder. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **22**: 606-615.
- Shelton,S.N., Shawgo,M.E., and Robertson,J.D. (2009) Cleavage of Bid by executioner caspases mediates feed forward amplification of mitochondrial outer membrane permeabilization during genotoxic stress-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem* **284**: 11247-11255.
- Sheng,H., Shao,J., Morrow,J.D., Beauchamp,R.D., and DuBois,R.N. (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* **58**: 362-366.
- Sitailo,L.A., Tibudan,S.S., and Denning,M.F. (2006) The protein kinase C delta catalytic fragment targets Mcl-1 for degradation to trigger apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 29703-29710.
- Stockfleth,E., Kerl,H., Zwingers,T., and Willers,C. (2011) Low-dose 5-fluorouracil in combination with salicylic acid as a new lesion-directed option to treat topically actinic keratoses - histological and clinical study results. *Br J Dermatol* **29**: 1181-1186.
- Stockfleth,E., Ferrandiz,C., Grob,J.J., Leigh,I., Pehamberger,H., and Kerl,H. (2008) Development of a treatment algorithm for actinic keratoses: a European Consensus. *European Journal of Dermatology* **18**: 651-659.
- Stockfleth,E., and Kerl,H. (2006) Guidelines for the management of actinic keratoses - Developed by the Guideline Subcommittee of the European Dermatology Forum. *European Journal of Dermatology* **16**: 599-606.
- Stockfleth,E., Meyer,T., Benninghoff,B., Salasche,S., Papadopoulos,L., Ulrich,C., and Christophers,E. (2002a) A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5% imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch Dermatol* **138**: 1498-1502.
- Stockfleth,E., Ulrich,C., Meyer,T., and Christophers,E. (2002b) Epithelial malignancies in organ transplant patients: clinical presentation and new methods of treatment. *Recent Results Cancer Res* **160**: 251-258.
- Stratton,M.S., and Alberts,D.S. (2002) Current application of selective COX-2 inhibitors in cancer prevention and treatment. *Oncology (Williston Park)* **16**: 37-51.
- Subbaramaiah,K., Altorki,N., Chung,W.J., Mestre,J.R., Sampat,A., and Dannenberg,A.J. (1999) Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 10911-10915.

- Sun, Y., and Sinicrope, F.A. (2005) Selective inhibitors of MEK1/ERK44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases potentiate apoptosis induction by sulindac sulfide in human colon carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* **4**: 51-59.
- Szeimies, R., and Landthaler, M. (2002) Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis of skin cancers. *Recent Results Cancer Res* **1755**: 90-106.
- Takeuchi, K., Tanaka, A., Kato, S., Amagase, K., and Satoh, H. (2010) Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. *Clinica Chimica Acta* **411**: 459-466.
- Tanaka, A., Araki, H., Hase, S., Komoike, Y., and Takeuchi, K. (2002) Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **16**: 90-101.
- Taylor, J.K., Zhang, Q.Q., Monia, B.P., Marcusson, E.G., and Dean, N.M. (1999) Inhibition of Bcl-x(L) expression sensitizes normal human keratinocytes and epithelial cells to apoptotic stimuli. *Oncogene* **18**: 4495-4504.
- Tilgen, W., Boukamp, P., Breitkreutz, D., Dzarlieva, R.T., Engstner, M., Haag, D., and Fusenig, N.E. (1983) Preservation of morphological, functional, and karyotypic traits during long-term culture and in vivo passage of two human skin squamous cell carcinomas. *Cancer Res* **43**: 5995-6011.
- Tober, K.L., Wilgus, T.A., Kusewitt, D.F., Thomas-Ahner, J.M., Maruyama, T., and Oberszyn, T.M. (2006) Importance of the EP1 receptor in cutaneous UVB-induced inflammation and tumor development. *Journal of Investigative Dermatology* **126**: 205-211.
- Trakatelli, M., Ulrich, C., del Marmol, V., Euvard, S., Stockfleth, E., and Abeni, D. (2007) Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions. *British Journal of Dermatology* **156**: 1-7.
- Tripp, C.S., Blomme, E.A.G., Chinn, K.S., Hardy, M.M., LaCelle, P., and Pentland, A.P. (2003) Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: Suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. *Journal of Investigative Dermatology* **121**: 853-861.
- Ulrich, C., Busch, J.O., Meyer, T., Nindl, I., Schmook, T., Sterry, W., and Stockfleth, E. (2006) Successful treatment of multiple actinic keratoses in organ transplant patients with topical 5% imiquimod: a report of six cases. *British Journal of Dermatology* **155**: 451-454.
- Ulrich, M., Drecoll, U., and Stockfleth, E. (2010a) Emerging drugs for actinic keratosis. *Expert Opin Emerg Drugs* **15**: 545-555.
- Ulrich, M., Krueger-Corcoran, D., Roewert-Huber, J., Sterry, W., Stockfleth, E., and Astner, S. (2010b) Reflectance confocal microscopy for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses. *Dermatology* **220**: 15-24.
- Ulrich, M., Ruter, C., Astner, S., Sterry, W., Lange-Asschenfeldt, B., Stockfleth, E., and Rowert-Huber, J. (2009) Comparison of UV-induced skin changes in sun-exposed vs. sun-protected skin-preliminary evaluation by reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol* **161 Suppl 3**: 46-53.
- Vanderveen, E.E., Grekin, R.C., Swanson, N.A., and Kragballe, K. (1986) Arachidonic acid metabolites in cutaneous carcinomas. Evidence suggesting that elevated levels of prostaglandins

in basal cell carcinomas are associated with an aggressive growth pattern. *Arch Dermatol* **122**: 407-412.

Vogt,T., McClelland,M., Jung,B., Popova,S., Bogenrieder,T., Becker,B. *et al.* (2001) Progression and NSAID-induced apoptosis in malignant melanomas are independent of cyclooxygenase II. *Melanoma Res* **11**: 587-599.

Wang,D., and DuBois,R.N. (2006) Prostaglandins and cancer. *Gut* 2006 Jan ;55 (1):115 -22  
*Epub* 2005 Aug 23 **55**: 115-122.

Watabe,A., Sugimoto,Y., Honda,A., Irie,A., Namba,T., Negishi,M. *et al.* (1993) Cloning and Expression of Cdna for A Mouse Ep(1) Subtype of Prostaglandin-e Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 20175-20178.

Weinstock,M.A. (1994) Epidemiologic investigation of nonmelanoma skin cancer mortality: the Rhode Island Follow-Back Study. *J Invest Dermatol* **102**: 6S-9S.

Wilson,J.W., Nostro,M.C., Balzi,M., Faraoni,P., Cianchi,F., Becciolini,A., and Potten,C.S. (2000) Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* **82**: 178-185.

Wilson-Annan,J., O'Reilly,L.A., Crawford,S.A., Hausmann,G., Beaumont,J.G., Parma,L.P. *et al.* (2003) Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol* **162**: 877-887.

Wiswedel,I., Grundmann,J.U., Boschmann,M., Krautheim,A., Bockelmann,R., Peter,D.S. *et al.* (2007) Effects of UVB irradiation and diclofenac on F2-isoprostane/prostaglandin concentrations in keratinocytes and microdialysates of human skin. *J Invest Dermatol* **127**: 1794-1797.

Wrone-Smith,T., Bergstrom,J., Quevedo,M.E., Reddy,V., Gutierrez-Steil,C., and Nickoloff,B.J. (1999) Differential expression of cell survival and cell cycle regulatory proteins in cutaneous squamoproliferative lesions. *J Dermatol Sci* **19**: 53-67.

Wu,K.K., Sanduja,R., Tsai,A.L., Ferhanoglu,B., and Loosemitchell,D.S. (1991) Aspirin Inhibits Interleukin-1-Induced Prostaglandin-H Synthase Expression in Cultured Endothelial-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 2384-2387.

Xu,Y.R., Shao,Y., Voorhees,J.J., and Fisher,G.J. (2006) Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 27389-27397.

Yamanaka,Y., Shiraki,K., Inoue,T., Miyashita,K., Fuke,H., Yamaguchi,Y. *et al.* (2006) COX-2 inhibitors sensitize human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine* **18**: 41-47.

Yamazaki,T., Muramoto,M., Oe,T., Morikawa,N., Okitsu,O., Nagashima,T. *et al.* (2006) Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, suppresses apoptosis induced by endoplasmic reticulum stresses by inhibiting caspase signaling. *Neuropharmacology* 2006 Apr;50 (5):558 -67 *Epub* 2006 Jan 4 **50**: 558-567.

- Yan,W., Samson,M., Jegou,B., and Toppari,J. (2000) Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. *Mol Endocrinol* **14**: 682-699.
- Yip-Schneider,M.T., and Schmidt,C.M. (2003) MEK inhibition of pancreatic carcinoma cells by U0126 and its effect in combination with sulindac. *Pancreas* **27**: 337-344.
- Yoon,J.B., Kim,S.J., Hwang,S.G., Chang,S., Kang,S.S., and Chun,J.S. (2003) Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes independent of cyclooxygenase activity. *J Biol Chem* **278**: 15319-15325.
- Yu,J., and Zhang,L. (2008) PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S71-S83.
- Zhang,L., Yu,J., Park,B.H., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (2000) Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* **290**: 989-992.
- Zhang,Y., Xing,D., and Liu,L. (2009) PUMA promotes Bax translocation by both directly interacting with Bax and by competitive binding to Bcl-X L during UV-induced apoptosis. *Mol Biol Cell* **20**: 3077-3087.
- Zhou,P.H., Liu,S.Q., and Peng,H. (2008) The effect of hyaluronic acid on IL-1beta-induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis. *J Orthop Res* **26**: 1643-1648.
- Ziegler,A., Jonason,A.S., Leffell,D.J., Simon,J.A., Sharma,H.W., Kimmelman,J. *et al.* (1994) Sunburn and P53 in the Onset of Skin-Cancer. *Nature* **372**: 773-776.
- Zuckerman,V., Wolynec,K., Sionov,R.V., Haupt,S., and Haupt,Y. (2009) Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* **219**: 3-15.

## LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## PUBLIKATIONEN & TAGUNGSBEITRÄGE

Diese Arbeit wurde in Teilen veröffentlicht:

### **UV-induced squamous cell carcinoma - a role for antiapoptotic signalling pathways.**

Rodust,P.M., Stockfleth,E., Ulrich,C., Leverkus,M., & Eberle,J. (2009)

*British Journal of Dermatology*, 161, 107-115.

Impact Factor: 4.353.

### **Enhanced Death Ligand-Induced Apoptosis in Cutaneous SCC Cells by Treatment with Diclofenac/Hyaluronic Acid Correlates with Downregulation of c-FLIP.**

Fecker,L.F., Stockfleth,E., Braun,F.K., Rodust,P.M., Schwarz,C., Kohler,A., Leverkus,M. & Eberle,J. (2010).

*Journal of Investigative Dermatology* **130**, 2098-2109.

Impact Factor: 6.270

### **Activation of mitochondrial apoptosis pathways in cutaneous squamous cell carcinoma cells by diclofenac/hyaluronic acid is related to upregulation of Bad as well as downregulation of Mcl-1 and Bcl-w.**

Rodust,P.M., Fecker,L.F., Stockfleth,E., and Eberle,J. (2012)

*Exp Dermatol* **21**: 520-525.

Impact Factor: 4.159

**Abstracts/Poster**

Abstracts und Poster mit dem Thema “Synergistic effects on induction of apoptosis by diclofenac/hyaluronic acid and death ligands in cutaneous squamous cell carcinoma cells”:

- |      |                      |
|------|----------------------|
| 2009 | EADO                 |
| 2008 | Apoptosis Luxembourg |
| 2008 | EADV Istanbul        |
| 2007 | ADO Regensburg       |

Abstracts und Poster mit dem Thema “Upregulation of proapoptotic - and downregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins by diclofenac/hyaluronic acid gel in cutaneous SCC cells trigger the mitochondrial apoptosis pathway”:

- |      |      |
|------|------|
| 2009 | EADO |
|------|------|

**Posterpreis**

“Activities of diclofenac/hyluronic acid on induction of apoptosis in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines”.

- |      |                |
|------|----------------|
| 2007 | ADO Regensburg |
|------|----------------|

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. E. Stockfleth für die freundliche Überlassung des Themas und die gute und engagierte Betreuung.

Besonders gilt mein Dank Herrn Priv-Doz. Dr. J. Eberle für die intensive Betreuung, die Wegweiser im Verlauf der praktischen Arbeit, die vielen Diskussionen und hilfreichen Gespräche. Unter seiner Anleitung habe ich gelernt, als Wissenschaftler zu denken.

Bei allen Gutachtern bedanke ich mich herzlich für das Lesen und Beurteilen dieser Arbeit.

Bei Dr. L. Fecker möchte ich mich für die hervorragende Einarbeitung in verschiedene zellbiologische Techniken bedanken und ohne dessen Kompetenz ein großer Teil dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Bei Constanze Schwarz bedanke ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei den „alltäglichen“ kleinen Problemen im Labor und den regen Austausch, sowie bei Dr. Frank Braun, Dr. Amma Yeboah, Dr. Amir Hossini, Dr. Bahtier Kurbanov, Dr. Jeannine Franke und Georgios Kokolakis für das gute Arbeitsklima und für die vielen persönlichen Gespräche.

Auch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich für die aufmunternden aber auch mahnenden Worte, ohne die diese Arbeit wohl niemals fertig geworden wäre.

## ERKLÄRUNG

„Ich, Paul Rodust, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Wirkmechanismen von Diclofenac in Zelllinien des kutanen Plattenepithelkarzinoms selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift