

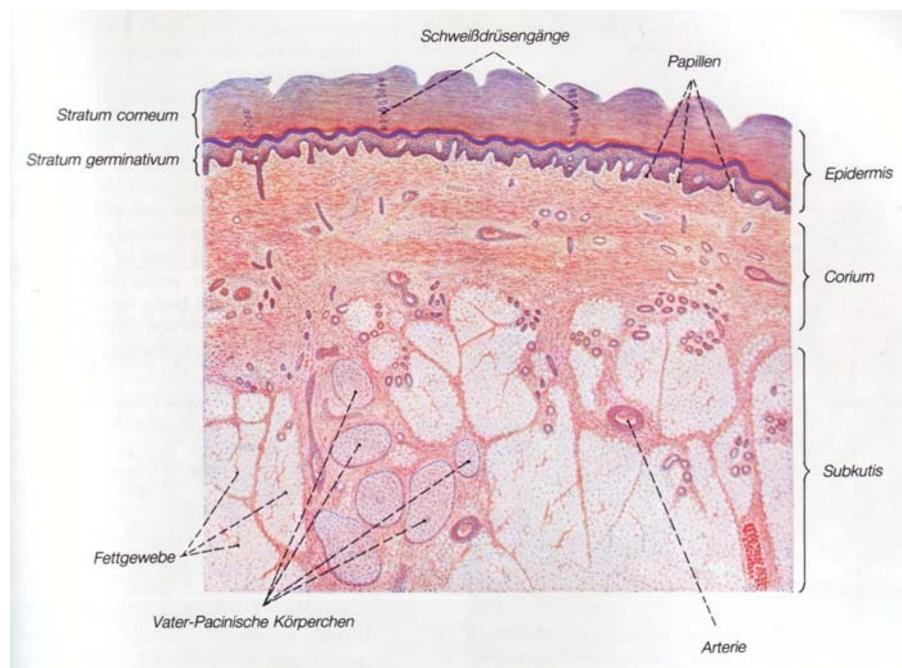
**Einleitung**

---

## 1. Einleitung

### 1.1. Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Körpers. Sie hat eine Barrierefunktion und schützt den Körper vor äußeren Einflüssen wie z.B. UV-Strahlung. Weiterhin reguliert sie die Körpertemperatur, schützt vor Flüssigkeitsverlust, ist an der Immunabwehr beteiligt und bildet Vitamin D unter dem Einfluss von Sonnenlicht. Makroskopisch lässt sich die Haut in drei Schichten, die Epidermis, die Dermis und die Subkutis unterteilen (Abb. 1.1.1).

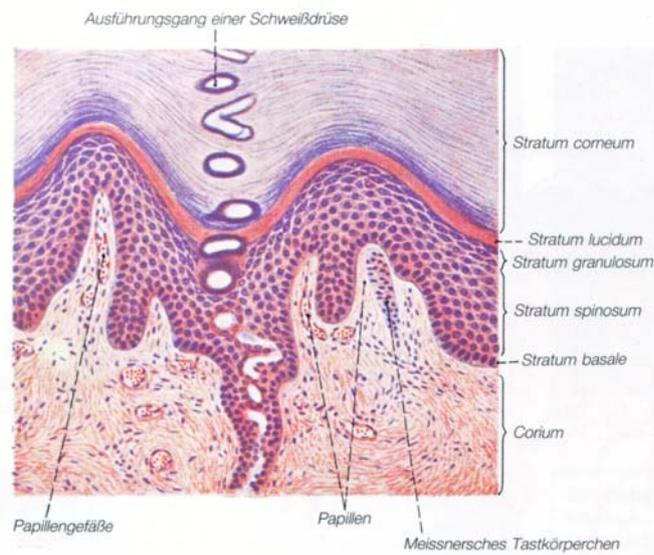


**Abb. 1.1.1** Darstellung des Aufbaus der Haut. Unterteilung in Epidermis, Corium und Subkutis H.E. Färbung, 18fache Vergrößerung (Sobotta, 2005)

**Epidermis.** Die Epidermis (Oberhaut) ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, das je nach Körperregion eine Dicke von 0,04 – 0,4 mm besitzt. Die Epidermis besteht zu 90 % aus Keratinozyten. Neben Keratinozyten findet man in den tieferen Schichten Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen. Die Epidermis kann in vier Schichten gegliedert werden. Von innen nach außen findet man das Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum (Abb. 1.1.2). In der Leistenhaut gibt es weiterhin das Stratum

## 1. Einleitung

lucidum. Die inneren drei Schichten bestehen aus lebenden Zellen. Das Stratum basale und das Stratum spinosum können zum Stratum germinativum zusammengefasst werden, in dem die Zellneubildung aus Stammzellen stattfindet. Die Keratinozyten der basalen Epithelschicht bilden Hemidesmosomen aus, die zur Verankerung des Epithels an der Basallamina dienen. Die Zellen des mehrschichtigen Stratum spinosum sind über Desmosomen miteinander verbunden. Das Stratum granulosum ist 1 - 3 Zellschichten dick und enthält Keratohyalin granula und Lamellenkörper. Letztere geben Lipide ab, die in den Interzellulärspalten des Stratum corneum eine lamellenförmige, wasserabweisende Barriere bilden, die den Körper vor Austrocknung schützt. Das Stratum corneum besteht aus mehreren Lagen toter, kernloser Keratinozyten (Korneozyten) und bildet die äußere Barriere des Körpers gegen die Umwelt. Die Zellen dieser Schicht verlieren 50 – 80 % ihres Wassergehaltes. Ihre ursprüngliche Zellmembran wird in eine Zellhülle umgewandelt, die aus dem Filaggrin-Keratin-Komplex, spezifischen Proteinen und den Lipiden der Lamellenkörper, die mit Involucrin verbunden sind, besteht. Die Zellen sind weiterhin über Desmosomen verbunden. (Fritsch, 1998; Rassner, 2002; Sobotta, 2005)



**Abb. 1.1.2** Stärkere Vergrößerung der Epidermis lässt vier Schichten erkennen, H.E. Färbung, 170fache Vergrößerung (Sobotta, 2005); Das Stratum lucidum kommt nur in der Leistenhaut vor.

**Dermis.** Die Dermis (Lederhaut, Corium) ist ein Bindegewebe, bestehend aus Kollagen- und Elastinfasern, die der Haut Festigkeit und Elastizität verleihen. Eingebettet in diese Matrix sind hauptsächlich Fibroblasten, daneben findet man

## 1. Einleitung

---

Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen. In der Dermis befinden sich auch Hautanhangsgebilde, Nerven und kapillare Blutgefäße. Wichtige Aufgaben der Dermis sind die Versorgung der Epidermis, Schutz vor Verletzung und Wasserspeicherung.

**Subkutis.** Die Subkutis (Unterhaut) ist das subkutane Fettgewebe, in dem größere Blutgefäße, Lymphgefäße, Nerven, sowie Schweißdrüsen liegen. Sie dient als Wärmeisolator, Fettdpot und mechanisches Polster.

### 1.2. Aktinische Keratose, Plattenepithelkarzinom und Basaliom

Die Inzidenz von Hautkrebs hat in den letzten Jahrzehnten, auch aufgrund des veränderten Freizeit- und Sonnenverhaltens der Bevölkerung, besonders in westlichen Staaten, stark zugenommen (Fritsch, 1998). Dabei liegt die Häufigkeit des Auftretens des sogenannten weißen Hautkrebses über der des Malignen Melanoms (ca. 3 % Neubildung), führt aber deutlich seltener zu Todesfällen (GEKID, 2006). Leider gibt es für Basaliome (Basal cell carcinoma, BCC) und Plattenepithelkarzinome (Squamous cell carcinoma, SCC) in Deutschland keine genaue staatliche Registrierung, wie für das Maligne Melanom.

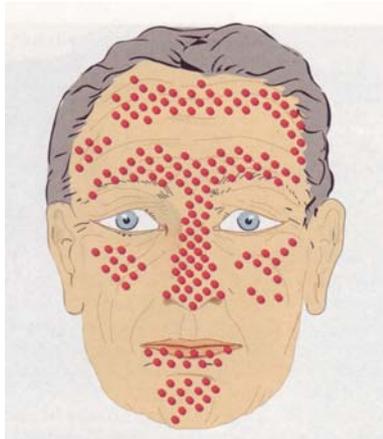
**UV-Strahlung.** Nur UV-Licht mit einer Wellenlänge von 290 - 400 nm ist biologisch aktiv. Es wird in UV-B (290 - 320 nm) und UV-A Strahlung (320 - 400 nm) unterschieden. Die langwelligere UV-A Strahlung dringt tiefer in die Haut ein – ca. 30 - 50 % erreichen das obere Korium. Akute UV-Schäden, wie z.B. Sonnenbrand werden besonders durch das energiereiche UV-B Licht hervorgerufen. Chronische UV-Schäden, die Lichtalterung und Karzinogenese umfassen, treten mit einer Latenzzeit von 20 - 30 Jahren auf werden sowohl durch UV-B als auch – aufgrund des hohen Anteils an der Strahlung – durch UV-A Strahlung hervorgerufen.

**Aktinische Keratose.** Die Aktinische Keratose (AK) gilt mittlerweile nicht mehr als Präkanzerose, sondern als benigne, also nicht metastasierende Krebsform (Jorizzo, 2004b). Sie ist v. a. behandlungsbedürftig, da sich in ca. 5 - 20 % der Erkrankungsfälle aus ihr ein SCC entwickeln kann (Cerbukovas et al., 2001; Fritsch, 1998; Garbe, 2005; Stockfleth, 2004; Stockfleth et al., 2002). Das Auftreten der AK

## 1. Einleitung

---

korreliert mit dem Grad und der Häufigkeit der UV-Einstrahlung. Prädilektionsstellen sind die sogenannten Lichtterrassen im Gesicht (Abb. 1.2.1), auf den Handrücken oder im Nacken. Mehrere Läsionen gleichzeitig, besonders an Kopf und Hals, sind typisch für diese Erkrankung und werden als Feldkanzerisierung bezeichnet (Stockfleth, 2004).



**Abb. 1.2.1** Hauptvorkommen der Aktinischen Keratose und des Plattenepithelkarzinoms, auf den sogenannten Lichtterrassen des Gesichts (Fritsch, 1998)

Im Frühstadium handelt es sich um scharf begrenzte Erytheme mit leichter Schuppung, die dann in erhabene, fest haftende Keratosen übergehen. In der Histologie ist eine unregelmäßige Epithelproliferation und eine gestörte Verhornung zu erkennen (Rassner, 2002). Behandelt wird eine solare Keratose mittels Kryotherapie, Kürettage oder operativer Abtragung. Seltener wird auch eine Lasertherapie oder ein Chemisches Peeling angewendet. Die photodynamische Therapie ist ein neu zugelassenes Behandlungsverfahren. Auch eine lokale Pharmakotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU), Diclofenac-Hyaluronsäure, Imiquimod oder Retinoiden ist möglich (Stockfleth, 2004).

**Plattenepithelkarzinom.** Trotz der oben erwähnten Schwierigkeiten aufgrund fehlender spezieller Krebsregister geht man heute von einer Neubildungsrate von 3 - 7 % für das SCC aus. Hellhäutige Menschen sind besonders betroffen. Ein SCC ist ein maligner (metastasierender) Tumor, der selten de-novo, sondern meist aus einer Aktinischen Keratose entsteht. Die Häufigkeit korreliert mit der kumulativen UV-Dosis, die während eines Lebens auf die Haut auftrifft (Fritsch, 1998; Garbe, 2005).

## 1. Einleitung

---

Das SCC wächst lokal infiltrierend und destruierend und besitzt eine unterschiedliche Metastasierungspotenz. Das klinische Erscheinungsbild ist nicht so variabel wie beim Basaliom, die WHO unterscheidet 5 Typen (Garbe, 2005). Die Stadieneinteilung nach dem TNM-System zur Klassifizierung von Hauttumoren ist zu vereinfachend und wird durch ein Grading des Entdifferenzierungsgrades ergänzt. Letztere Einteilung ist allerdings im klinischen Alltag wenig nützlich, da Grenzen schwer zu ziehen sind und die Verhornung nicht immer mit dem Grad der Entdifferenzierung korreliert. Entsprechend dem Ausbreitungsstadium und dem histologischen Typ wird das Plattenepithelkarzinom primär operativ mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm entfernt. Damit ist mit 88 - 96 % Sicherheit eine Heilung zu erreichen (Garbe, 2005). Als Therapiealternativen bzw. bei inoperablen Karzinomen stehen Kürettage, Kryotherapie, photodynamische Therapie, Lasertherapie und Strahlentherapie zur Verfügung (Fritsch, 1998; Rassner, 2002). Bei inoperablen oder metastasierenden Plattenepithelkarzinomen kann eine palliative Chemotherapie angewendet werden. Methotrexat (MTX) als Monotherapie ist hierfür ebenso wie eine Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin oder 5-FU ggf. zusätzlich Bleomycin geeignet. Bei metastasierenden Plattenepithelkarzinomen wird auch eine Therapie mit Interferon-alpha, ggf. auch in Kombination mit Retinoiden versucht (Garbe, 2005).

**Basaliom.** Das Basaliom ist der häufigste nicht-benigne Tumor der Haut. Er tritt vorwiegend im hohen Alter und nur an Haarfollikel-tragenden Körperregionen (Felderhaut) auf (Kruger et al., 1999). Das Basaliom wächst stark invasiv auch in Nachbargewebe ein. Es ist außerdem ein destruktiver Tumor, der durch Zerstörung lebenswichtiger Strukturen zum Tode führen kann. Das BCC wird als semi-maligne bezeichnet, d.h. es wächst lokal unbeschränkt, metastasiert aber nur selten (Fritsch, 1998). Auch für die Entstehung eines Basalioms ist UV-Licht der wichtigste Faktor. Allerdings korreliert das Verteilungsmuster nicht wie beim SCC streng mit der UV-Exposition. Mit Ausnahme von nicht Haarfollikel-tragenden Regionen kann ein BCC grundsätzlich überall auftreten, wobei der Kopfbereich mit 90 % bevorzugt ist (Fritsch, 1998). Das klinische Erscheinungsbild ist sehr vielseitig, von der WHO werden 10 Typen unterschieden.

Für das Basaliom gibt es keine präkanzeröse Phase. Die Tumorzellen sind nicht vollautonom, sondern stromaabhängig. Dadurch erklären sich auch die seltene Metastasierung und das kontinuierliche Wachstum im Zellverband. Die derzeit gültige

## 1. Einleitung

---

Stadieneinteilung von Hauttumoren nach der TNM-Klassifizierung ist auch für das Basaliom nicht anwendbar. Totalexzision mit relativ knappem Sicherheitsabstand gilt als Standardtherapie. Als Alternativen stehen die Kryotherapie und die Röntgenstrahlentherapie zur Verfügung. Weiterhin sind Kürettage, Kryotherapie, Lasertherapie oder photodynamische Therapie möglich. Topisches 5-FU und Imiquimod dürfen nur bei oberflächlichen Basaliomen eingesetzt werden, zeigen sich allerdings nicht so wirksam wie bei der Aktinischen Keratose. (Breuninger, 2005; Fritsch, 1998; Garbe, 2005; Rassner, 2002).

### 1.3. Aktuelle Therapieformen

Wie oben kurz dargelegt stehen zur Therapie sowohl physikalische Methoden als auch pharmakotherapeutische Ansätze zur Verfügung. Unter den physikalischen Methoden dominiert die Kryotherapie. Weitere Anwendung finden Kürettage, Exzision, Lasertherapie, Röntgen-Weichstrahltherapie und das Chemische Peeling. Die Ansprechraten der Verfahren variieren stark, sind aber auch von der Erfahrung des Arztes abhängig. Teilweise eignen sie sich bevorzugt zur Therapie einzelner Läsionen, nicht aber für die Therapie bei Feldkanzerisierung. Ein neu zugelassenes Verfahren stellt die Photodynamische Therapie dar. Bei flachen Aktinischen Keratosen ist eine komplette Abheilung in 88 % der Fälle möglich (Stockfleth, 2004; Touma et al., 2004) und sogar bei knotigen Basaliomen konnte eine Ansprechrate von 90 % erzielt werden (Rhodes et al., 2004).

In der Pharmakotherapie der Aktinischen Keratose werden v. a. Diclofenac-Hyaluronsäure, 5-FU und neu zugelassen auch Imiquimod angewendet.

**Diclofenac-Hyaluronsäure.** In Plattenepithelkarzinomen ist die COX-2 überexprimiert und COX-2 abhängiges PGE<sub>2</sub> fördert die Neoangiogenese und verhindert die Apoptose (Blomme et al., 2003; Hardy et al., 2003; Rivers et al., 2002). Auch durch UV-B Strahlung steigt die COX-2 Aktivität, so dass Diclofenac, welches die COX-2 hemmt, in die Therapie der AK Eingang gefunden hat. Es wird als 3 %ige Zubereitung in einem 2,5 %igen Hyaluronsäure Gel (Solaraze<sup>®</sup>) angewendet. Die Hyaluronsäure erhöht wahrscheinlich die Konzentration von Diclofenac in der Haut. Das Gel muss zweimal täglich über 90 Tage angewendet werden. Die Ansprechrate

## 1. Einleitung

---

übersteigt 75 % (45 % Kontrollgruppe), eine vollständige Abheilung war bei 50 % der Patienten zu beobachten (20 % Kontrolle). Die Therapie wird von lokalen Irritationen begleitet (Stockfleth, 2004). Ferner gibt es Untersuchungen, die keine Beteiligung der COX-2 an dieser Wirkung der Nicht Steroidalen Antirheumatika (NSARs) nahelegen. In Fibroblasten aus COX-1 und COX-2 null Mäusen wirkten NSARs zwar antiproliferativ, die Gabe von hohen Dosen PGE<sub>2</sub> hob die Induktion der Apoptose aber nicht auf (Vogt et al., 2001). Eine mögliche Erklärung ist ein PGE<sub>2</sub> abhängiger und ein unabhängiger Weg. Die Peroxidase-Aktivität von COX-2 kann auch den Redoxstatus der Zelle beeinflussen und zu Störungen des Zellwachstums beitragen (Higashi et al., 2000).

**5-Fluorouracil (5-FU).** 5-FU ist ein Inhibitor der Thymidilatsynthase. Es hemmt die Umwandlung von dUMP in dTMP und in der Konsequenz die DNA Replikation. 5-FU ist als 5 %ige Salbe zur Therapie der AK und nicht operabler oberflächlicher Basaliome zugelassen (Efudix<sup>®</sup>) und eignet sich besonders zur Therapie multipler Läsionen. Die Creme wird zweimal täglich über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen angewendet. Die Therapie ist mit heftigen Entzündungsreaktionen, Schmerzen, Erosion und manchmal auch Ulzeration verbunden. Vollständige Remissionen sind in 43 % der Fälle möglich (Jorizzo, 2004a), allerdings treten bei bis zu 55 % der Patienten Rezidive auf (Stockfleth, 2004). Beim SCC ist auch eine palliative Chemotherapie mit 5-FU in Kombination mit Cisplatin oder als kontinuierliche Infusion über 5 Tage möglich (Garbe, 2005). Mittlerweile gibt es in den USA auch eine 0,5 %ige Zubereitung in einer Microsponge Darreichungsform (Carac<sup>™</sup>), deren Wirksamkeit der 5 %igen Zubereitung nicht unterlegen ist (Loven et al., 2002), aber weniger Nebenwirkungen zeigt (Jorizzo, 2004a).

**Imiquimod.** Imiquimod gehört zur neuen Klasse der Immune Response Modifier. Es ist ein Agonist des toll-like Rezeptor (TLR) 7 und bewirkt eine Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, die v. a. die zelluläre Immunität steigern (Gupta et al., 2005; Hurwitz et al., 2003). Zur Therapie der AK wird Imiquimod als 5 %ige Creme (Aldara<sup>®</sup>) zweimal wöchentlich über 16 Wochen angewendet. Bei 45 % der behandelten Patienten konnte ein vollständiges Abheilen beobachtet werden; acht Wochen nach der Therapie wurde bei der Hälfte der Patienten eine Reduktion um mindestens 83 % beobachtet (Lebwohl et al., 2004). Aus der erwünschten

## 1. Einleitung

---

Immunreaktion ergeben sich auch die Nebenwirkungen, d.h. entzündliche Reaktionen. Imiquimod ist durch die europäische Zulassungsbehörde EMEA auch zur Therapie kleiner superfizieller Basaliome zugelassen.

**Retinoide.** Retinoide werden „off label“ zur Therapie der Aktinischen Keratose eingesetzt. Es gibt Versuche mit Etretinat (systemisch), Isotretinoin in Kombination mit 5-FU, topisch angewendetem Retinaldehyd und Adapalen (Stockfleth, 2004). Auch beim metastasierenden SCC gibt es Therapieversuche mit synthetischen Retinoiden und Interferon-alpha (Garbe, 2005).

### 1.4. DNA Polymerase alpha in Abgrenzung zu anderen Polymerasen

Seit der Entdeckung der DNA Polymerase alpha (Pol  $\alpha$ ) im Jahr 1957 sind bis heute zahlreiche weitere Polymerasen in eukaryotischen Zellen identifiziert worden (Hubscher et al., 2002). Besonders gut untersucht sind die fünf Polymerasen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ . Die Polymerasen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  kommen im Kern vor, wohingegen Pol  $\gamma$  in den Mitochondrien zu finden ist, so dass ihr die mitochondriale Replikation zugeschrieben wird. Die Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  sind replikative Enzyme, während Pol  $\beta$  ein reines Reparaturenzym ist. Pol  $\alpha$  ist das einzige Enzym mit einer assoziierten Primase Aktivität und damit zur de-novo DNA Synthese befähigt.

Anhand ihrer Ähnlichkeit mit den drei Polymerasen von Escherichia coli (DNA pol I, II und III) werden die eukaryotischen DNA-abhängigen DNA Polymerasen in drei Familien A, B und X eingeteilt (Tab 1.4.1). Die alpha-ähnlichen Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  gehören zur Familie B (Ito and Braithwaite, 1991).

---

<b>Familie</b>	<b>prokaryotisch</b>	<b>eukaryotisch</b>	<b>viral</b>
A	Pol I	Pol $\gamma$	T3, T5, T7 Pol
B	Pol II	Pol $\alpha$ , $\delta$ , $\epsilon$	Adenovirus, HSV, RB69, T4, T6 Pol
C	Pol III		
X		Pol $\beta$	
RT		Telomerase	Reverse Transkriptase

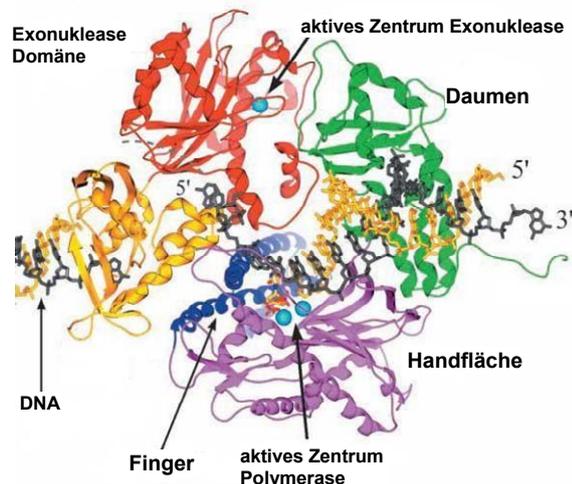
---

**Tab 1.4.1** Übersicht der Einteilung prokaryotischer, eukaryotischer und viraler DNA Polymerasen in Familien (nach (Patel and Loeb, 2001))

### 1.4.1. Sequenzkonservierung und aktives Zentrum

Zu den alpha-ähnlichen Polymerasen gehören u.a. die Hefe Pol 1, E. coli Pol II, Polymerasen der Herpesfamilie, des Vaccinia Virus, des Adenovirus und Phagen Polymerasen wie z.B. E. coli Phagen PRD1 und T4 und Bacillus Phage  $\Phi$ 29. Sequenz, Struktur und katalytische Eigenschaften der alpha-ähnlichen Polymerasen sind hoch konserviert. Besonders drei Regionen II, III und I (auch als Motiv A, B und C bezeichnet), sind innerhalb einer Familie hoch konserviert und auch in anderen Familien zu finden. Man geht davon aus, dass sie das aktive Zentrum der Pol  $\alpha$  bilden.

Die Struktur der Polymerasen wird häufig mit der Finger-, Daumen- und Handflächenregion einer rechten menschlichen Hand verglichen (Abb. 1.4.1) (Patel and Loeb, 2001). Region I befindet sich in der Handfläche und enthält Aspartat-Reste. Die Daumen und Fingerregionen unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Familien (Hubscher et al., 2002). Dennoch gibt es ein gemeinsames Merkmal der Polymerasen: die konzertierte Bewegung der Finger Subdomainen, die in Richtung der Handfläche rotieren. Dadurch wechselt das Enzym von einer offenen in eine geschlossene Konformation und bildet eine Bindungstasche für das einzubauende dNTP (Patel and Loeb, 2001).

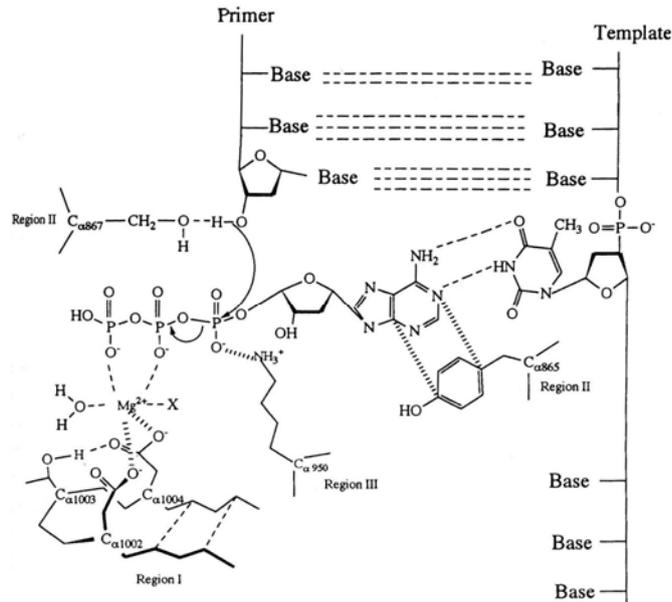


**Abb. 1.4.1** Finger-, Handflächen- und Daumenregion der RB69 Polymerase als Vertreter einer Familie B Polymerase (Franklin et al., 2001). Darstellung des trimeren Komplexes der Polymerase mit einem Primer/Template und dTTP

Anhand von Mutationsanalysen wurde ein Modell entwickelt, wie diese Regionen zusammenarbeiten (Abb. 1.4.2). Zwei Aspartat-Reste (Asp 1002 und Asp 1004,

## 1. Einleitung

Region I) komplexieren das Magnesium-Ion (Copeland and Wang, 1993), welches wiederum den Sauerstoff der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ständigen Phosphatgruppen des einzubauenden dNTPs komplexiert. Tyrosin 865 (Region II) bildet eine hydrophobe Wechselwirkung mit der Base des dNTPs, der Sauerstoff von Serin 867 (Region II) eine Wasserstoffbrücke mit der 3'-OH Gruppe des Primerendes. Lysin 950 (Region III) interagiert mit dem Sauerstoff der  $\alpha$ -Phosphatgruppe des dNTPs (Wang, 1996).

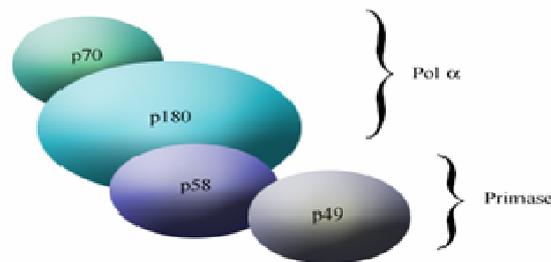


**Abb. 1.4.2** Modell der hoch konservierten Regionen des aktiven Zentrums einer alpha-ähnlichen DNA Polymerase, die beim Nukleotidtransfer zusammenwirken (Wang, 1996)

Bei Pol  $\alpha$  wurden nur sehr wenige Mutationen des Gens gefunden. Ein möglicher Grund könnte sein, dass die 180 kDa Einheit auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, und so die Expression dieses Gens monoallel ist. Eine Mutation, die eine Funktionseinschränkung bedeutet, könnte nicht ausgeglichen werden, da das 2. Allel bei Männern nicht vorhanden und bei Frauen nicht exprimiert ist. Bei den Pol  $\delta$  und  $\epsilon$  dagegen ist die Expression biallel und Mutationen kommen viel häufiger vor. Künstlich erzeugte Mutanten waren in Untersuchungen noch zu einer Replikation in der Lage, zeigten aber eine deutliche Einschränkung der katalytischen Aktivität oder der Genauigkeit (fidelity). Ob diese Enzyme in lebenden Zellen funktionstüchtig wären, ist fraglich. Da keine Mutationen nachgewiesen werden konnten, sollten Mutationen, die keine Funktionseinschränkung verursachen, selten sein. Beim Tumorwachstum würden solche Zellen mit eingeschränkter Funktion ausselektiert werden (Popanda et al., 2000).

### 1.4.2. Aufbau des Proteins

Der Pol  $\alpha$ :Primase Komplex ist ein Protein, das aus vier Untereinheiten aufgebaut ist (Abb. 1.4.3). Die größte Untereinheit hat eine Größe von 165-180 kDa und trägt die enzymatische Aktivität der Pol  $\alpha$ . Die Untereinheit wird posttranslational glycosyliert und Zellzyklus-abhängig phosphoryliert (Nasheuer et al., 1991), so dass ein Protein von 180 kDa entsteht. Die nächst größere Untereinheit hat 70 kDa, aber keine bekannte enzymatische Aktivität. Da sie aber ebenfalls Zellzyklus-abhängig phosphoryliert wird, ist eine regulierende Funktion anzunehmen. Die beiden Untereinheiten, die die Primase-Aktivität tragen, sind 58 bzw. 49 kDa groß (Kornberg, 1992; Wang, 1996).



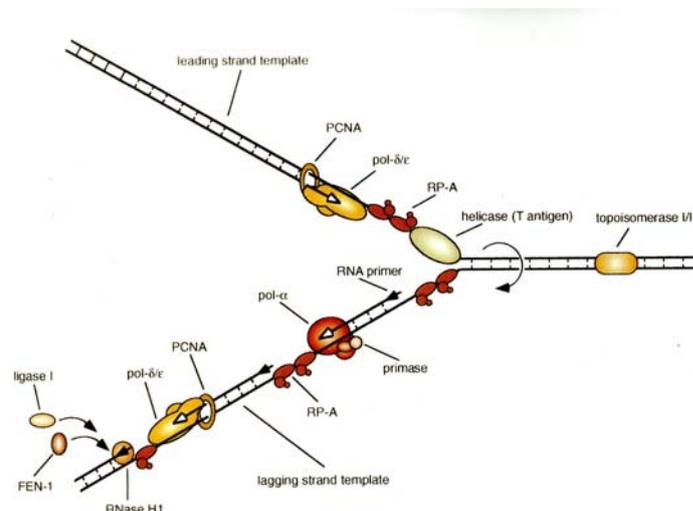
**Abb. 1.4.3** Aufbau der vier Untereinheiten des Pol  $\alpha$ :Primase Komplexes

Inhibitoren können dazu genutzt werden, zwischen verschiedenen Polymerasen zu unterscheiden. Dabei können  $K_i$  - Werte verschiedener Labore, abhängig von der Reinheit und der Integrität des Enzyms deutlich differieren. Pol  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  werden durch Aphidicolin gehemmt, Pol  $\beta$  und  $\gamma$  nicht. Pol  $\alpha$  ist besonders empfindlich gegenüber ButylphenyldGTP ( $IC_{50}$  1  $\mu$ M), nicht aber gegenüber ddNTPs. Letztere hemmen besonders Pol  $\beta$  und  $\gamma$  (Kornberg, 1992; Wang, 1996).

Der Mechanismus des Nukleotideinbaus in den wachsenden DNA-Strang läuft in definierten, aufeinanderfolgenden Schritten ab. Pol  $\alpha$  interagiert zunächst mit dem Template, dann mit dem Primer und zum Schluss mit dem dNTP. Die minimal erforderliche Primerlänge beträgt acht Nukleotide. Das Enzym arbeitet nicht prozessiv, was hinsichtlich der geringen zu synthetisierenden Primerlänge kein Nachteil ist. DNA Pol  $\delta$  dagegen arbeitet hoch prozessiv. Die Pol  $\alpha$  besitzt keine Exonuklease Aktivität (Kornberg, 1992; Wang, 1996). Ihre Genauigkeit ist hoch und kann durch replication protein A (RP-A) noch erhöht werden (Hubscher et al., 2002).

## 1.4.3. DNA Replikation durch die DNA Polymerase $\alpha$

Pol  $\alpha$  ist die hauptverantwortliche Polymerase für die Initiation der DNA Replikation. Mit Hilfe der SV40 (Simian Virus) in-vitro DNA Replikation konnte der Mechanismus aufgeklärt werden (Abb. 1.4.4). Dieses Modell eignet sich besonders gut, da T-Antigen das einzige virale Protein ist, dass zur Replikation benötigt wird (So and Downey, 1992). Es wirkt als Initiatorprotein und als Helikase. RP-A, ein DNA Einzelstrang bindendes Protein, stabilisiert die Einzelstrang-DNA für den Replikationsprozeß. Die Primase Aktivität des Enzymkomplexes synthetisiert zunächst einen kurzen RNA-DNA Primer am Führungsstrang und Primer für die Okazaki-Fragmente am Folgestrang. Diese Primer werden von der Pol  $\alpha$  auf eine Länge von ca. 35 - 40 bp verlängert, es entsteht die sogenannte Initiator DNA (iDNA) (Wang, 1996). Ist diese gebildet, bindet replication factor C (RF-C), ein ATP-abhängiges DNA Bindungsprotein, die iDNA und lädt proliferating cell nuclear antigen (PCNA) und Pol  $\delta$  in die Replikationsgabel, in dessen Folge der Pol  $\alpha$ :Primase Komplex abgespalten wird. Auch RP-A ist an diesem sogenannten Polymerasen switch beteiligt (Hübscher et al., 1996). Die vollständige Synthese wird dann an beiden Strängen durch die Pol  $\delta$  realisiert (Hubscher et al., 2002). Als Reifung bezeichnet man die anschließende Entfernung der RNA Primer durch die RNase H und FEN-1, Lücken werden wahrscheinlich durch die Pol  $\delta$  gefüllt, DNA Ligase I verbindet die Enden der Okazaki Fragmente (Brush and Kelly, 1996; Waga and Stillman, 1998).



**Abb. 1.4.4** Halbkontinuierliche DNA Synthese. Organisation an einer eukaryotischen Replikationsgabel (Brush and Kelly, 1996)

### **1.4.4. Regulation der DNA Replikation in Abhängigkeit vom Zellzyklus.**

Bevor sich eine Zelle teilt (Mitose, M-Phase) durchläuft sie verschiedene Stadien der Interphase, die als G1- (Gap-), S- (Synthese-) und G2- (Gap-) Phase bezeichnet werden. Ruhende Zellen befinden sich in der Phase G<sub>0</sub>. Die Regulation des Zellzyklus unterliegt einer strikten Kontrolle und dem zeitlichen Zusammenspiel verschiedener Proteine, v.a. den Cyclinen, den Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) und kleinen inhibitorischen Proteinen dieser Kinasen (CKIs).

Ruhende Zellen benötigen ein extrazelluläres Wachstumssignal, worauf die Expression von Cyclin D steigt. Cyclin D bindet und aktiviert Cdk4 und Cdk6. Diese Komplexe phosphorylieren im Kern u.a. das Retinoblastoma Protein (pRb), wodurch Transkriptionsfaktoren der E2F Familie aktiviert werden. Es folgt eine erhöhte Expression von Cyclin E, welches ebenfalls pRb phosphoryliert. Der aktivierte Cyclin E-Cdk2 Komplex führt zur Transkription verschiedener Enzyme und Proteine, wie z.B. der Dihydrofolatreduktase, Pol  $\alpha$ , Cdk1 und Cyclin A. Der Übergang zur S-Phase und die Initiation der DNA Replikation werden dadurch ermöglicht. Nach Überwinden des Restriktionspunktes des Zellzyklus ist die Zelle nicht mehr von äußeren Signalen abhängig, kann aber sehr wohl durch diese beeinflusst werden. Der Cyclin B-Cdk1 Komplex ist schließlich für die Regulation der G<sub>2</sub>/M-Phase verantwortlich (McGowan, 2003).

Pol  $\alpha$ : Primase und RP-A werden Zellzyklus-abhängig phosphoryliert (Nasheuer et al., 1991; Waga and Stillman, 1998) und könnten auch eine regulatorische Aufgabe haben - auch wenn bisher noch nicht gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung die replikative Aufgabe beeinflusst.

### **1.5. Hemmstoffe der DNA Polymerase alpha**

Nukleosid-Analoga und Nukleobasen sind eine sehr bedeutende Wirkstoffklasse, die pharmakologisch sehr breit gefächert ist. Solche Arzneistoffe finden sowohl in der antiviralen Therapie als auch als Immunsuppressiva oder Tumortheraeutika Anwendung. Der Tumortheraeutika dienen u.a. die Purinderivate Cladribin (2-ClidA) und Fludarabin (F-Ara-dA) und die Pyrimidinderivate Cytarabin (Ara-C) und Gemcitabin (dFdC) sowie die Nukleobase 5-FU und ihr Prodrug Capecitabin. Sie wirken hauptsächlich durch Hemmung der DNA Synthese, wobei sich ihre speziellen

## 1. Einleitung

---

Angriffspunkte unterscheiden können. Auch Nebenwirkungen von Nukleotid-Analoga, die in der antiviralen Therapie eingesetzt werden, wie z.B. Zidovudin (AZT), werden der Inhibition von humanen DNA Polymerasen, u.a. der Pol  $\alpha$ , zugeschrieben (Copeland et al., 1992; Nickel et al., 1992).

Bisher ohne therapeutische Anwendung sind Nukleosid-Analoga mit einem N<sup>2</sup>-Arylsubstituenten an der Base, wie z.B. Butylphenyldeoxyguanosin (BuPdG) oder Butylanilindesoxyadenosin (BuAdA). Diese in-vitro sehr potenten Pol  $\alpha$  Inhibitoren zeigten keine Antitumor Aktivität in Tierversuchen (Wright et al., 1987).

Um die mehrschrittige intrazelluläre Aktivierung der Nukleosid-Analoga zu verkürzen, wurden Phosphonate entwickelt. Diese besitzen bereits eine metabolisch stabile „Phosphatgruppe“. Bisher finden Vertreter dieser Gruppe nur in der antiviralen Therapie Anwendung. Der Einsatz von neuen, optimierten Derivaten in der Tumorthherapie erscheint vielversprechend zu sein, hemmen doch teilweise schon bisherige Vertreter die Pol  $\alpha$  effektiv.

Ein nicht-nukleosidischer Inhibitor replikativer Polymerasen (Pol  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ) ist das Aphidicolin (APH). Es findet aufgrund mangelnder systemischer Wirksamkeit und toxischer Nebenwirkungen keine Anwendung in der Therapie, dient aber als Standardsubstanz in der Forschung. Weiterhin werden auch zahlreiche Naturstoffe hinsichtlich ihrer Pol  $\alpha$  Hemmung untersucht.

### 1.5.1. Nukleotid-Analoga

Die Substanzen werden in Form ihrer Nukleoside gegeben, die mittels membranständiger Transporter in die Zelle transportiert und dort von intrazellulären Kinasen zu den entsprechenden Triphosphaten aktiviert werden. Dabei soll durch eine unterschiedliche Enzymausstattung von Tumorgewebe und gesundem Gewebe ein gewisses Targeting erreicht werden. Sowohl bei der Aktivierung als auch beim Einbau in die DNA konkurrieren die Substanzen mit den entsprechenden natürlichen Nukleosiden und Nukleotiden.

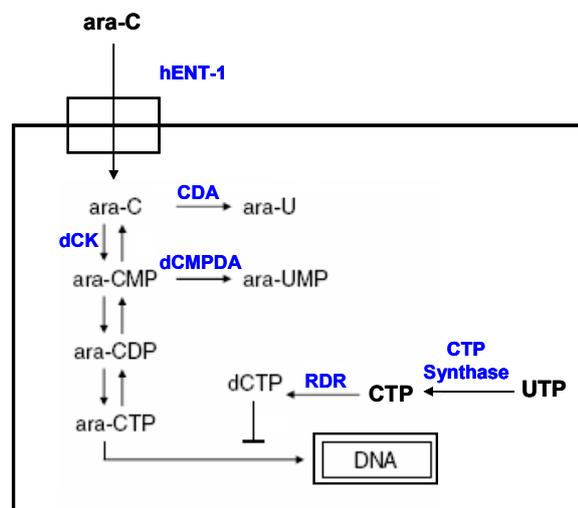
#### **Klassische Nukleotid-Analoga**

Nukleotid-Triphosphate, wie z.B. die Purinderivate Fludarabin-TP (F-Ara-dATP) und Cytarabin-TP (Ara-CTP) hemmen Pol  $\alpha$  nicht (Gandhi et al., 1997), sondern führen nach Einbau in die DNA zum Kettenabbruch. Diese Triphosphate sind den natürlichen Nukleosiden sehr ähnlich, so dass sie eine den natürlichen Substraten

## 1. Einleitung

ähnliche Affinität zur Pol  $\alpha$  besitzen. Einbau in den wachsenden DNA-Strang führt zu Konformationsänderungen der DNA, so dass es zum Strangbruch kommt. Das Pyrimidinderivat Ara-C bewirkt auch den Strangabbruch kann allerdings auch durch Exonukleasen entfernt werden, im Gegensatz zu Gemcitabin (dFdC), nach dessen Einbau der DNA-Strang noch um eine Base verlängert werden kann, so dass es dem Zugriff des Reparaturenzyms entzogen ist. dFdC wird nicht nur in den DNA Strang eingebaut, sondern hemmt auch Pol  $\alpha$  direkt. Zusätzlich interferiert es mit der Ribonukleotid Reduktase (RDR), so dass der intrazelluläre dCTP Pool (und auch der anderer Nukleotide) abnimmt (Azuma et al., 2001; Matsuda and Sasaki, 2004). Es kann auch in die RNA eingebaut werden (Matsuda and Sasaki, 2004).

Ara-C und dFdC werden mittels dem human equilibrative nucleoside Transporter (hENT-1) in die Zelle transportiert, wobei der Transport des lipophileren dFdCs effektiver verläuft. Ara-C hat aufgrund der Desaminierung durch die Cytidindesaminase (CDA) eine sehr kurze Halbwertszeit (Townsend and Cheng, 1987). Auch ara-CMP kann mittels der Desoxycytidylat-Deaminase (dCMPDA) deaminiert werden (Abb. 1.5.1). dFdC ist gegenüber beiden Abbaureaktionen deutlich stabiler (Jiang et al., 2000). Sogar hemmende Effekte auf die dCMPDA wurden beschrieben.



**Abb. 1.5.1** Aufnahme von Ara-C in die Zielzelle und intrazellulärer Metabolismus (nach (Hubeek et al., 2005))

### **Arylsubstituierte Nukleosid-Analoga**

Im Gegensatz zu klassischen Nukleosid-Analoga, die zu Strangabbruch führen, wirken N<sup>2</sup>-Arylsubstituierte Purinanaloga als sehr potente kompetitive Inhibitoren der Pol  $\alpha$ . Schon das Guaninderivat BuPG inhibiert Pol  $\alpha$  sehr stark. Eine Wirkungssteigerung kann durch Einführung eines Zuckerrestes und durch Phosphorylierung erzielt werden. Das Di- und Triphosphat unterscheiden sich nicht in ihrer Wirkstärke (Khan et al., 1984).

BuPG hemmt spezifisch die Pol  $\alpha$  und hat im Gegensatz zu Aphidicolin keinen Einfluss auf die Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$ . Allerdings hemmt BuPG nicht nur die DNA sondern auch die RNA Synthese. Arylsubstituierte Nukleotid-Triphosphate können von der humanen Pol  $\alpha$  nicht eingebaut werden. Ein synthetischer Primer mit BuPdG 3' Ende hemmte die Polymerase genauso stark wie BuPdGTP selbst (Khan et al., 1991).

BuAdA hemmt nicht nur die Pol  $\alpha$ , sondern auch die Polymerasen  $\beta$  und  $\gamma$ , wenn auch in deutlich geringerer Potenz (nanomolar vs. micromolar). Besonders die Hemmung von Pol  $\gamma$  ist ungewöhnlich, da sie nicht kompetitiv zu dATP ist.

Im Gegensatz zu Aphidicolin, das Pol  $\alpha$  und Zellwachstum gleichermaßen inhibiert, korreliert die Hemmung der Polymerase durch Basen, Nukleoside und Nukleotide nicht mit deren zytotoxischen Wirkungen (Wright et al., 1987). N<sup>2</sup>-(3,4-Trimethylphenyl)guanin (TMPG) hemmte die Pol  $\alpha$  weniger effektiv als BuPG ( $K_i$  44  $\mu$ M vs. 12  $\mu$ M), wirkte in der Zellkultur aber toxischer ( $IC_{50}$  52  $\mu$ M vs. 69  $\mu$ M). Möglicherweise gibt es einen Unterschied zwischen dem isolierten Enzym und dem intrazellulären Replikationskomplex, der viele weitere Proteine umfasst. Diese besitzen im Gegensatz zur Pol  $\alpha$  zum Teil auch Reparatoreigenschaften.

### **Phosphonate**

Eine weitere Untergruppe von Nukleotid-Analoga wurde in Form der Phosphonate geschaffen (Übersicht bei (Holy, 2003)). Diese Substanzen besitzen bereits eine dem Phosphat analoge Gruppe, die über ein Kohlenstoffatom mit dem Zucker verbunden ist und nicht wie bei Phosphaten über einen Sauerstoff. Phosphonate sind stabil gegenüber enzymatischem Abbau und bedürfen nicht der gesamten intrazellulären Aktivierungskaskade. Gerade die Einführung der ersten Phosphatgruppe ist schwierig und limitiert die Wirksamkeit einiger Substanzen. Die Phosphonate können in den wachsenden DNA Strang eingebaut werden und wirken als Strangabbrecher.

## 1. Einleitung

---

Es kommt zu einem Anhalten des Zellzyklus in der S-Phase und in der Konsequenz, abhängig von der Tumorzellart, zu terminaler Differenzierung oder Apoptose. Drei Phosphonate sind bereits wichtige Arzneistoffe der antiviralen Therapie: HPMP (Cidofovir, Vistide®) gegen Cytomegalie-Virus bei AIDS-Patienten, PMEA (Adefovir Dipivoxil, Hepsera®) gegen chronische Hepatitis B und PMPA (Tenofovir, Viread®) gegen HIV-Infektionen. Weitere Derivate werden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen Tumore (z.B. PMEDAP) und Protozoen (HPMPA) untersucht.

Phosphonomethoxyethyladenin (PMEA) ist der Prototyp dieser Substanzklasse. Es kann als azyklisches Analogon von AMP betrachtet werden. Die Substanz wird durch einen Endozytose-ähnlichen Prozess in die Zelle aufgenommen. An der intrazellulären Aktivierung zum entsprechenden Mono- und Diphosphat (PMEAp und PMEApp), der eigentlichen Wirkform, ist die Adenylatkinase beteiligt (Hatse et al., 1999a). PMEApp inhibiert kompetitiv virale Polymerasen und die Reverse Transkriptase. In höheren Konzentrationen hemmt PMEApp auch die humanen Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ . Dadurch hat die Substanz zusätzlich zur antiviralen auch eine Antitumor-Wirkung. Phosphonomethoxyethyl-2,6-diaminopurin (PMEDAP) gleicht PMEA in seiner Wirkung. Resistenzen gegen PMEA und PMEDAP in L1210 Zellen sind mit einer stark erhöhten Expression eines membranständigen Auswärtstransporters, MRP4 verbunden. PMEA aktiviert die Thymidinkinase-1 (TK-1). Die Transkription und Translation werden von PMEA nicht inhibiert (Holy, 2003).

Phosphonomethoxyethylguanin (PMEG) zeigt eine deutlich stärkere zytotoxische Wirkung als PMEA, wohingegen die antiviralen Eigenschaften geringer sind. Die zytotoxische Wirkung korreliert gut mit der inhibierenden Wirkung auf die DNA Polymerasen, zu denen PMEGpp die höchste Affinität unter den azyklischen Nukleosid-Analoga zeigt (Hatse et al., 1999c). PMEG wird mit einer Effizienz von 51 % in die DNA eingebaut (Holy, 2003). Phosphonomethoxypropyl- (PMP-) Derivate werden schlechter als PME-Derivate in die DNA eingebaut, was in Übereinstimmung mit ihrer geringeren Zytotoxizität steht.

Ein weiteres Phosphonat ist BCH-1868. Es wird nicht über den Nukleosidtransporter hENT-1 in die Zielzelle aufgenommen, intrazellulär vermutlich durch die GMP Kinase aktiviert. Die Substanz selbst ist kein Inhibitor der Pol  $\alpha$ , wohl aber das Mono- und Diphosphat ( $K_i$  2.2 bzw. 0.1  $\mu$ M). In der Zellzyklus-Analyse ist keine DNA Fragmentierung (prä-G1) nachzuweisen und die Substanz ist ohne Einfluss auf die

## 1. Einleitung

---

RNA- oder Proteinsynthese. Das Wachstum verschiedener Zelllinien wird in-vitro inhibiert. In-vivo konnte allerdings nur eine tumorstatische Wirkung, nicht aber ein Rückgang des Tumors, nachgewiesen werden (Leblond et al., 2002).

### 1.5.2. nicht-nukleosidische Hemmstoffe

Auch Naturstoffe ohne Ähnlichkeit mit den DNA Basen sind hinsichtlich ihrer Pol  $\alpha$  inhibierenden Wirkung untersucht worden. Besondere Aufmerksamkeit kommt hier Aphidicolin zu, die Substanz mit deren Hilfe die Pol  $\alpha$  als wichtige replikative Polymerase identifiziert wurde.

#### Aphidicolin

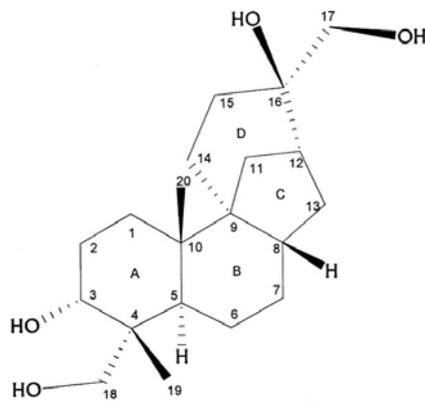
Aphidicolin ist ein tetrazyklisches Diterpen, das aus einem Pilz, *Cephalosporium aphidicola* und anderen Arten, isoliert wird. Mittlerweile gelingt auch die Synthese dieses ungewöhnlichen Moleküls mit verschiedenen Strategien (Belanger and Deslongchamps, 2000a; Belanger and Deslongchamps, 2000b; Toyota et al., 2003). APH hemmt die humanen DNA Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  und einige weitere alpha-ähnlichen Polymerasen. Uneinigkeit herrscht über die Art der Hemmung. APH bindet das Enzym alleine nur schwach und hemmt nicht-kompetitiv zur DNA. Die Hemmung zu dCTP ist kompetitiv, während kompetitive, nicht-kompetitive und gemischte Hemmungen bezüglich der anderen dNTPs beschrieben wurden. Dies scheint auch vom verwendeten Template, d.h. aktivierte DNA oder definierte Oligonukleotide (Sheaff et al., 1991), abhängig zu sein. APH bildet möglicherweise einen ternären Komplex mit dem Enzym und der DNA. Hierfür wurde das Modell der sogenannten „interfacial inhibition“ entworfen, einer extremen Form der nicht-kompetitiven Hemmung (Pommier and Cherfils, 2005; Pommier and Marchand, 2005). Danach gehen die Inhibitoren mit ihren Partnern einen Sackgassenkomplex ein, der sie unfähig macht, ihre biologische Funktion auszuüben. Sie binden nicht an den Grundzustand eines Proteins, sondern an eine Konformation, die nur nach Bindung an die DNA eingenommen wird. Traditionellere Modelle gehen von einer dNTP Bindungsstelle am Enzym aus, in deren Nähe APH bindet. Danach inhibiert APH die Übertragung des Pyrophosphats. Sollte es eine Bindungsstelle am Enzym geben, müsste laut Huberman (Huberman, 1981) in Analogie zu den Opioid-Rezeptoren allerdings auch ein natürliches Substrat vorhanden sein, das möglicherweise in die Regulation der Replikation involviert ist. Weiterhin induziert Aphidicolin sogenannte

## 1. Einleitung

---

„common fragile sites“, d.h. ortsspezifische Lücken oder Brüche, die in Metaphasen-Chromosomen nach partieller Inhibierung der DNA-Synthese deutlich werden (Arlt et al., 2003). Common fragile sites sind mit Genominstabilität und Tumorgenese verbunden.

Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehung der Pol  $\alpha$  Hemmung durch Aphidicolin (Prasad et al., 1989) zeigen, dass die 3-OH und 18-OH Gruppe essentiell sind (Michaelis et al., 2000). Auch eine Umkehr der Konfiguration an C-3 hebt die Wirkung vollständig auf (Arabshahi et al., 1988).



**Abb. 1.5.2** Strukturformel von Aphidicolin (Michaelis et al., 2000)

Aphidicolin und verschiedene Derivate wurden hinsichtlich ihrer Antitumor-, antiviralen (Michaelis et al., 2002) und anti-leishmaniellen (Kayser et al., 2001) Aktivitäten untersucht. Die Substanz selbst ist zu lipophil, so dass für Studien Aphidicolinglycinat und ein Gamma-Cyclodextrin Einschluss Komplex verwendet wurden. Zur Verbesserung der Pharmakokinetik wurden liposomale Zubereitungen an Neuroblastom-tragenden Mäusen untersucht (Michaelis et al., 2005). Mit Hilfe von Nanosuspensionen konnte ein Targeting in Leishmania-infizierte Makrophagen erreicht werden (Kayser, 2000).

In klinischen Studien (Phase I) hat sich Aphidicolin als systemisches Monotherapeutikum nicht bewährt. Es wurden zwar hauptsächlich reversible, lokale Nebenwirkungen am Applikationsort beobachtet, jedoch keine Antitumor-Wirkung (Sessa et al., 1991). Systemisch verabreicht kann Aphidicolin nur ein Tumorwachstum verhindern, führt aber nicht zur Remission. Bei Applikation direkt in den Tumor, bildet sich dagegen der Tumor vollständig zurück (Cinatl et al., 1999). Die mangelnde systemische Wirksamkeit von Aphidicolin wird auf eine rasche

## 1. Einleitung

---

Biotransformation zurückgeführt. Mit Hilfe eines Rattenleber in-vitro Modells wurde 3-Ketoaphidicolin als Hauptmetabolit (>90 %) identifiziert. In Übereinstimmung mit den Struktur-Wirkungsbeziehungen, hat der Metabolit weniger als 10 % der Wirkung der Muttersubstanz. Als verantwortliches Enzym für die Metabolisierung wurde CYP2C11 identifiziert (Edelson et al., 1990).

Erfolgsversprechender als die Monotherapie ist der Einsatz von APH in Kombination mit anderen Zytostatika. In Kombination mit Platinverbindungen oder Doxorubicin wirkt es synergistisch und ermöglicht die Umgehung von Resistenzen (Michaelis et al., 2001; Michaelis et al., 2000). Resistenzen gegen Ara-C kann Aphidicolin aufheben, wie Untersuchungen an Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zeigen (Hubeek et al., 2005a; Sargent et al., 1999). Diese Wirkungssteigerung wird durch eine Erhöhung der dCK Aktivität erreicht, die möglicherweise durch die gestörte DNA Synthese getriggert wird.

Die Zytotoxizität von Topotecan antagonisiert Aphidicolin dagegen (Cheng et al., 1994).

Derzeit wird Aphidicolin hauptsächlich experimentell zur Synchronisierung von Zellen in der S-Phase verwendet.

### **Vitamine und Naturstoffe**

Trotz vieler Fortschritte ist die Chemotherapie insbesondere solider Tumor nicht zufriedenstellend. Grund hierfür sind das Fehlen selektiver Zytostatika und Rezidive durch Resistenzen der Tumore gegenüber den verfügbaren Zytostatika. Um neue Quellen für effektive Tumorthapeutika zu entdecken, werden viele Naturstoffe gescreent, wobei der Fokus häufig auf eine Pol  $\alpha$  Hemmung als wirksame Zielstruktur für eine Krebstherapie gerichtet ist. Vitamin D<sub>2</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> nicht aber Calcitriol wirken als selektive Inhibitoren des Enzyms (IC<sub>50</sub> 123  $\mu$ M bzw. 96  $\mu$ M) (Mizushina et al., 2003b). Auch für Derivate der Vitamine A und B<sub>6</sub> konnte eine Wirksamkeit belegt werden (Mizushina et al., 2003a; Mizushina et al., 2003b). Unter den Naturstoffen fanden sich Taxol-Derivate, besonders Taxinin, als Inhibitor der Polymerasen  $\alpha$  und  $\beta$  (Oshige et al., 2004). Sehr vielversprechend und bereits erfolgreich in einem Anti-Tumor Screening in Mäusen getestet ist Dehydroaltenusin, ein sehr selektiver Pol  $\alpha$  Hemmer aus einem Pilz (*Alternaria tenuis*) (Maeda et al., 2007a). Der IC<sub>50</sub>-Wert für die Enzymhemmung liegt bei 0,5  $\mu$ M, die LD<sub>50</sub> zwischen 38

$\mu\text{M}$  (HeLa Zellen) und  $44,4 \mu\text{M}$  (A549 Zellen). Glykolipide, insbesondere Diacylglycerole aus Spinat inhibieren ebenfalls die Pol  $\alpha$  und die Proliferation humaner Zellen (NUGC-3, HL-60: (Kuriyama et al., 2005; Maeda et al., 2007b). Auch Polyphenolen aus grünem Tee, wie z.B. Epigallocatechin-3-gallat, wird eine solche Wirkung zugesprochen. Durch Konjugation mit Fettsäuren, insbesondere Palmitinsäure kann neben einer Wirkungssteigerung zusätzlich eine anti-angiogenetische Wirkung erzielt werden (Matsubara et al., 2007). Ein weiteres Polyphenol, gewonnen aus rotem Wein, ist Resveratrol, für das ein nicht kompetitiver Hemmmechanismus der Pol  $\alpha$  beschrieben ist (Locatelli et al., 2005).

### **1.6. Ein- und Auswärtstransport von Nukleosiden und deren Analoga**

#### **1.6.1. Nukleosidtransporter**

Nukleoside sind hydrophile Moleküle, die nur langsam über Zellmembranen diffundieren. Nukleosid Transporter ermöglichen die zelluläre Aufnahme von natürlichen Nukleosiden aber auch von Nukleosid-Analoga, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden. In Säugetierzellen kommen zwei strukturell unterschiedliche Klassen von Transportern vor: ‚equilibrative nucleoside transporters‘ (ENTs) und ‚concentrative nucleoside transporters‘ (CNTs) (Kong et al., 2004). CNTs sind Kationensymporter und ENTs sind unterstützende Diffusionssysteme. CNTs transportieren natriumabhängig einwärts, während ENTs natriumunabhängig, bidirektional transportieren (Mackey et al., 1998). Im Menschen transportieren die beiden Transporter hENT-1 und hENT-2 Purin- und Pyrimidinnukleoside. hENT-3 transportiert auch einige Nukleobasen. hENT-1 kann sehr spezifisch durch Nitrobenzylthioinosin (NBMPR) gehemmt werden. Dipyridamol, Dilazep und Draflazin hemmen sowohl hENT-1 als auch – deutlich schwächer – hENT-2 (King et al., 2006). hENTs kommen ubiquitär vor, während CNTs auf bestimmte Zellen, wie z.B. Darm- und Nierenepithel, Leber und Leukämiezellen beschränkt zu sein scheinen (Mackey et al., 1998).

Gemcitabin, Ara-C, Cladribin, Fludarabin und Ribavirin werden über hENT-1 in die Zelle transportiert (Kong et al., 2004). AZT und ddC werden nicht transportiert. In Hefezellen, die hENT-1 produzierten, konnte gezeigt werden, dass die 3'-OH Gruppe der Riboseeinheit für die Substratinteraktion mit dem Transporter wichtig ist (Kong et al., 2004). hENT-2 dagegen kann auch AZT und Didesoxynukleoside (Kong et al.,

## 1. Einleitung

---

2004), ferner einige Nucleobasen wie 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin, nicht aber 5-FU transportieren (Nagai et al., 2007). 5'-DFUR, ein direkter Vorläufer von 5-FU und Metabolit des oral verabreichbaren Capecitabin, wird von hENT-1 in MCF-7 Zellen transportiert (Molina-Arcas et al., 2006).

Bisher fokussierten sich klinische und ex-vivo Studien auf Interaktionen der Nucleotid-Analoga mit hENT-1, da dieser Transporter am weitesten verbreitet ist. Am besten ist hier die Interaktion mit Ara-C untersucht. Auch im Fall von Gemcitabin konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen dieses Transporters zu Resistenzen führt, z.B. in Pankreaskarzinomzellen. Dafür erhöhte eine Präinkubation mit 5-FU die Expression des hENT-1 Transporters und in der Folge die Wirksamkeit einer Gemcitabin Therapie (Tsuji et al., 2006).

Da eine Hemmung von hENTs mit Dipyridamol in Zellen, in denen auch hCNTs vorhanden sind, die Toxizität von Gemcitabin nicht erhöht, scheint der Auswärtstransport für den Netto-Gemcitabin-Transport keine große Rolle zu spielen (Mackey et al., 1998).

Eine Studie mit Ara-C resistenten Zelllinien zeigte, dass während der Resistenzentwicklung initial die mRNA Menge des hENT-1 Transporters steigt, später aber auch die Aktivität der dCK abnimmt und die der CDA zunimmt. Hemmung des Transporters verbesserte die zytotoxische Wirkung von Ara-C nur in den ursprünglichen Zellen, nicht aber in den resistenten Zellen (Kanno et al., 2007).

Dipyridamol kann in-vitro die zytotoxische Wirkung von Antimetaboliten wie z.B. MTX durch eine Hemmung des Nucleosidtransports und daraus resultierender Hemmung des Salvage Pathways erhöhen. Klinische Studien dazu waren allerdings aufgrund der niedrigen Plasmakonzentrationen nicht erfolgreich (Kong et al., 2004).

Untersuchungen zur Expression von hENT-1 in der Haut sucht man bisher in der Literatur vergeblich. Die meisten Untersuchungen beschränken sich aufgrund der am häufigsten untersuchten Substrate Ara-C und Gemcitabin auf Pankreaskarzinomzellen oder Leukämiezellen.

### **1.6.2. Auswärtstransporter organischer Anionen**

Multidrug resistance proteins (MRP, ABCC) gehören zur Unterfamilie C der Klasse der ATP-binding cassette transporters (ABC Transporter). Es sind Membranglykoproteine, die ATP-abhängig den auswärtsgerichteten Transport

## 1. Einleitung

---

organischer Anionen vermitteln. Der Subfamilie C gehören 12 Mitglieder an. Mit am besten charakterisiert sind die Transporter MRP 1-6. MRP 1-3 transportieren hauptsächlich Phase II Metabolite. Substrate für MRP4 und MRP5 sind cAMP, cGMP und Nukleotid-Analoga (Übersicht bei (Borst and Elferink, 2002).

MRP4 mRNA wurde in zahlreichen Geweben, v.a. in Niere und Prostata, aber auch in Leber, Testis, Ovar, Gehirn, Nebenniere, Blutplättchen und in zahlreichen Zelllinien gefunden. MRP5 mRNA wurde in großen Mengen im Gehirn, in Skelettmuskulatur, Lunge und Herz nachgewiesen. MRP5 auch auf Proteinebene zu detektieren, hat sich bisher als sehr schwierig erwiesen (Ritter et al., 2005).

Aufgrund ihrer Gewebeverteilung und der Fähigkeit, wichtige second messenger wie cGMP zu transportieren, wird vermutet, dass die beiden Transporter in physiologischen Signalprozessen beteiligt sind. Da sie bei hohen intrazellulären Konzentrationen der zyklischen Nukleotide besonders effektiv sind, wird vermutet, dass sie zum zellulären Schutzsystem gehören, indem sie einer Überstimulation entgegen wirken. MRP5 Knock-out Mäuse entwickeln keinen spezifischen Phänotyp. Allerdings könnte ein Überlappen der Substratspezifität mit MRP4 das Fehlen der Transporter maskieren (Borst and Elferink, 2002).

MRP4 hat ein breiteres Substratspektrum und transportiert neben zyklischen Nukleotiden, vorzugsweise cAMP, auch konjugierte Steroide (Chen et al., 2001), Prostaglandine (Reid et al., 2003), Gallensalze (Rius et al., 2003) und Glutathion (GSH). MRP5 transportiert neben zyklischen Nukleotiden, insbesondere cGMP, auch GSH.

Die Transporter sind auch für eine Reihe von Resistenzen verantwortlich. So werden PMEA, 6-Mercaptopurin und Thioguanin von MRP4 und MRP5 transportiert. Ganciclovir, Cisplatin, Topotecan und MTX werden nur durch MRP 4 auswärts geschleust; Gemcitabin, Cytarabin und Cladribin nur von MRP5 (Ritter et al., 2005). 5-FU wird von MRP5 und MRP8 transportiert. Polyglutamatierte Derivate von MTX werden nicht transportiert.

Spezifische Inhibitoren für diese Anionen-Transporter gibt es nicht. Verwendet werden unspezifische Inhibitoren wie z. B. Probenecid oder Sulfinpyrazon. Strukturell mit cGMP verwandt sind die Inhibitoren Sildenafil und Trequinsin. MRP4 kann weiterhin durch NSARs wie Indometacin, Indoprofen oder Ketoprofen gehemmt werden. Dagegen sind Diclofenac und verschiedene Coxibe schlechte Inhibitoren (Reid et al., 2003). Auch Dipyridamol wird als Inhibitor dieser Transporter eingesetzt.

## 1. Einleitung

---

MRP4 und MRP5 sind in vielen Zelllinien, auch Krebszelllinien vorhanden (Kool et al., 1997). Allerdings gibt es keine Untersuchungen zum Vorkommen dieser Transporter in epidermalen Zellen.

### 1.7. Desoxynukleosidkinasen und Thymidinphosphorylase

#### 1.7.1. Aktivierung von Nukleosiden

Wie beschrieben müssen Nukleoside zur Therapie von Virus- und Tumorerkrankungen intrazellulär aktiviert, d.h. zu den entsprechenden Triphosphaten phosphoryliert werden. Dafür sind eine Reihe substratspezifischer Enzyme erforderlich. Zunächst erfolgt die Phosphorylierung mit nukleosidspezifischen Enzymen zum Monophosphat, diese werden mit nukleotidspezifischen Enzymen zum Diphosphat phosphoryliert und letztere mit einer unspezifischen Nukleotiddiphosphat-Kinase zum Zielmolekül aktiviert. Eine gewisse Selektivität ist durch unterschiedliche Enzymausstattung des gesunden und des entarteten Gewebes möglich.

Desoxynukleosidkinasen katalysieren die 5'-Phosphorylierung von 2'-Desoxynukleosiden zu den entsprechenden Monophosphaten, wobei NTPs als Phosphatdonor dienen (Wang et al., 1999). Zytosolisch liegt die TK-1 vor, die nur Thymidin und seine Analoga phosphoryliert. Die dCK hat ein deutlich breiteres Substratspektrum. Dieses Enzym phosphoryliert neben Desoxycytidin (dC) auch Desoxyadenosin (dA) und Desoxyguanosin (dG) sowie entsprechende Analoga (Sabini et al., 2003). Nur in den Mitochondrien findet sich die Desoxyguanosinkinase (dGK), die ausschließlich Purin-Nukleoside phosphoryliert (Mansson et al., 2002). Weiterhin findet sich hier die Thymidinkinase-2 (TK-2), die Thymidin und dC phosphoryliert (Wang et al., 1999).

Die TK-1 wird konstitutiv exprimiert, wobei der mRNA Gehalt in der späten G1 Phase sehr stark ansteigt (Lipson and Baserga, 1989). Die Phosphorylierung mittels der TK ist die einzige Möglichkeit, Thymidin in den DNA Metabolismus einzuführen (Wang et al., 2001).

Der erste Schritt der Aktivierung wird als geschwindigkeitslimitierender Faktor angesehen. So wurde ein Mangel an dCK mehrfach mit einem Therapieversagen einer Ara-C-Behandlung bei AML in Zusammenhang gebracht (Hubeek et al., 2004; Kanno et al., 2007). Die meisten Untersuchungen zum Expressionsmuster dieser

## 1. Einleitung

---

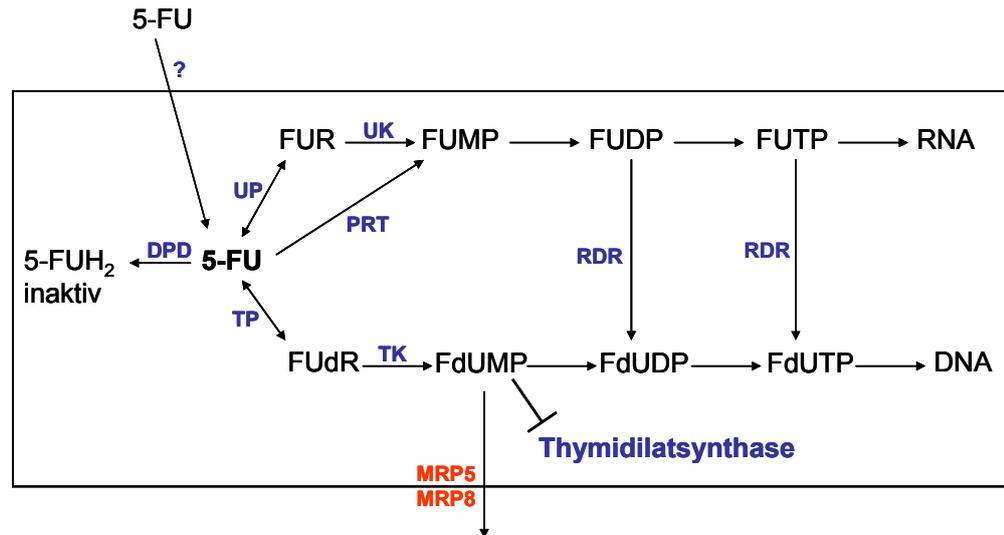
Enzyme wurden mit Lymphozyten durchgeführt, Informationen zur Expression der Kinasen in dermalen Zellen fehlen.

### 1.7.2. Aktivierung von Basen

Die Thymidinphosphorylase (TP) ist ein Enzym, das erstmals im Jahr 1953 beschrieben wurde. Erst im Jahr 1992 konnte gezeigt werden, dass es gleich dem 1987 erstmals beschriebenen Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) ist. Auch Gliostatin ist identisch mit TP. TP katalysiert die Phosphorolyse der Nukleosidbrücke von Pyrimidin 2'-Desoxynukleosiden, es entsteht das Pyrimidinderivat und 2-Desoxy- $\alpha$ -D-ribofuranose-1-phosphat (Focher and Spadari, 2001). Die TP-Aktivität wird durch Thymin inhibiert und durch Thymidin erhöht. TP kann aber auch anabolisch den Aufbau von Thymidin aus Thymin katalysieren. Neben der Kontrolle des Thymidinplasmaspiegels stimuliert TP auch die Angiogenese, vermutlich über zwei Mechanismen: Zunächst indirekt durch Erzeugung zellulären oxidativen Stresses und darauffolgender Sekretion von IL-8, VEGF und MMP-1 und weiterhin durch chemotaktische Wirkung der freigesetzten 2'-Deoxy-D-ribose. TP wirkt auch antiapoptotisch, und könnte dadurch die Tumorentwicklung durch eine Resistenz gegen Hypoxie-vermittelte Apoptose bei Krebszellen verstärken. Es wurde gezeigt, dass TP-überexprimierende Zellen unempfindlicher gegenüber Apoptose-Stimuli wie Fas oder Cisplatin waren. Diese Wirkung wird wahrscheinlich über den Phosphoinositol-3-kinase (PI3K)/Akt Weg vermittelt und kann im Gegensatz zur enzymatischen Wirkung nicht durch TP-Inhibitoren gehemmt werden (Jeung et al., 2006).

Basenanalogue, wie z.B. 5-FU und seine Prodrugs werden dagegen von TP aktiviert (Abb. 1.7.1, Abb. 3.1.10). Die stärkere Expression des Enzyms in sehr vielen Tumorgeweben ermöglicht eine gewisse Tumorselektivität. Die Wirksamkeit einer solchen Therapie kann durch Induktion des Enzyms durch verschiedene Zytokine wie z.B. TNF  $\alpha$ , INF  $\gamma$  oder IL-1 $\alpha$  (Focher and Spadari, 2001) aber auch durch Arzneistoffe wie z.B. AZT (Tsuneyoshi et al., 2006) erhöht werden.

Ein Vorkommen der TP in Fibroblasten aus humaner Vorhaut ist beschrieben (Focher and Spadari, 2001).



**Abb. 1.7.1** Aktivierungs- und Desaktivierungswege von 5-FU. DPD = Dihydropyrimidin-Dehydrogenase; UP = Uridinphosphorylase; PRT = Phosphoribosyltransferase; UK = Uridinkinase

### 1.8. Antiproliferative Wirkung von Calcitriol auch in Kombination mit Dexamethason

Tumore ab einer Größe von 1 - 3 mm<sup>3</sup> bedürfen der eigenen Versorgung mit Blutgefäßen. Die Angiogenese trägt zum weiteren Tumorwachstum bei und ermöglicht die Metastasierung durch Transport von Tumorzellen über die Blutbahn.

1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol, 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>) ist sowohl in vitro aktiv als auch bei Leukämie, Plattenepithelkarzinom, Prostata-, Brust und Dickdarmkrebs wirksam (Chung et al., 2007). Zusätzlich zur direkten Antitumor-Wirkung auf die Krebszellen hemmt Calcitriol die Proliferation von Endothelzellen und bewirkt damit eine Angiogenesehemmung. Die direkte Wirkung auf die Tumorzellen wird durch verschiedene Mechanismen, die zu Differenzierung, Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase und zur Apoptose führen, induziert. Calcitriol reduziert die Bildung von Phospho-Erk 1/2 (Extrazellulär regulierte Kinase) und Phospho-Akt. Die durch Abnahme von Phospho-Akt induzierte p27-Bildung könnte ein entscheidender Schritt für den Zellzyklusarrest sein (Bernardi et al., 2001). Weiterhin verstärkt Calcitriol die Wirkung anderer Tumorthapeutika (Beer and Myrthue, 2006). Aufgrund der dosislimitierenden Nebenwirkungen, Hypercalciämie und Hypercalciurie, ist Calcitriol allerdings nicht als Monotherapeutikum geeignet. Die Kombination mit Dexamethason (DEX) kann die Hypercalciämie aufheben. DEX

## 1. Einleitung

---

alleine hat eine geringe antiproliferative Wirkung im murinen SCCVII/SF Plattenepithelkarzinom-Modell (O'Malley et al., 1997) kann aber in-vitro und in-vivo die Antitumor-Wirkung von Calcitriol stark erhöhen (Bernardi et al., 2001; Trump et al., 2004). Möglicherweise wird dies durch eine erhöhte Expression des Vitamin D<sub>3</sub> Rezeptors (VDR) und durch eine synergistische Senkung von Phospho-Erk 1/2 und Phospho-Akt erreicht (Bernardi et al., 2001). Phase II Studien zur Behandlung des nicht-androgenabhängigen Prostatakarzinoms mit einer Calcitriol-DEX-Kombination wurden erfolgreich abgeschlossen (Trump et al., 2004). DEX verstärkt zudem die proliferationshemmende Wirkung auf Endothelzellen, es kann sogar die embryonale Angiogenese in Hühner Chorioallantoiden Membranen (CAM) hemmen (Nakamura et al., 1992).

Im Gegensatz zur zytotoxischen Wirkung von Calcitriol auf Plattenepithelkarzinome schützt Calcitriol primäre Keratinozyten und Fibroblasten vor Apoptose. Auch DEX, das die toxischen Effekte von Calcitriol verstärkt, wirkt auf primäre Fibroblasten durch Aktivierung der Sphingosinkinase 1 (Sphk1) und Erhöhung der intrazellulären Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Konzentration antiapoptotisch (Hammer et al., 2004; Manggau et al., 2001). S1P selbst hat pro-angiogenetische Eigenschaften (LaMontagne et al., 2006) und fördert die Proliferation von Endothelzellen (Kimura et al., 2000). Auf primäre Keratinozyten wirkt S1P proliferationshemmend, auf primäre Fibroblasten proliferationsfördernd.

### **1.9. Fragestellung und Zielsetzung**

Die Inzidenz von Hautkrebs hat in den letzten Jahrzehnten aufgrund der erhöhten Sonnenexposition erheblich zugenommen und wird voraussichtlich in den nächsten 20 Jahren weiter steigen. Die Therapieoptionen für die Aktinische Keratose, das Plattenepithelkarzinom sowie für das Basaliom sind derzeit nicht zufriedenstellend und auch neuere Entwicklungen in der Pharmakotherapie zeigen bei deutlichen Nebenwirkungen eine nicht hinreichende Heilungsrate.

Pol  $\alpha$  ist ein Schlüsselenzym, das die ersten Schritte der DNA Replikation katalysiert. Dieses Enzym als Zielstruktur einer rationalen Pharmakotherapie zu nutzen, erscheint sehr vielversprechend zu sein (Maeda et al., 2007a). Entwickelt werden

## 1. Einleitung

---

sollten Nukleotid-Analoga, wie sie bereits zur Therapie der Leukämie bzw. des Pankreaskarzinoms eingesetzt werden.

Als Referenzsubstanzen für Molecular Modelling Berechnungen und das in-vitro Screening wurden neben dem bekannten Pol  $\alpha$  Hemmer Aphidicolin, Pharmaka mit Zulassung für die Aktinische Keratose (5-FU, Diclofenac) und antivirale Phosphonate (PMEA, PMEG, PMEDAP) ausgewählt. Weiterhin sollte getestet werden, in wieweit andere Zytostatika (MTX, Dacarbazin, Doxorubicin, Capecitabin) als Referenzsubstanzen geeignet sein könnten. Auch Zalcitabin als Vertreter der nukleosidischen Virusstatika sollte auf eine mögliche Beeinflussung humaner Zellen untersucht werden.

Mit Hilfe des von Herrn Prof. Höltje, HHU Düsseldorf, entwickelten 3D-Modells des aktiven Zentrums der Pol  $\alpha$  konnten erste Pol  $\alpha$  Hemmer (BuP-OH, HM-1) rational entwickelt und an der FU Berlin, AK Herr Prof. Reißig, synthetisiert werden. Diese Substanzen standen im Zentrum des Promotionsvorhabens. Ergebnisse des Molecular Modelling waren zu überprüfen und wichtige Hinweise für die Strukturoptimierung sollten gewonnen werden.

Zur Messung der Zytotoxizität stehen verschiedene Testmethoden zur Verfügung, die unterschiedliche Aussagen ermöglichen, aber für die Zielzellen und die Testsubstanzen nur bedingt geeignet sein können. Neben der Testung der Proliferation mittels Thymidin-Einbau sollten der MTT-Test, der NRU-Assay und die Zellzyklus-Analyse hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und Aussagekraft evaluiert werden. Darüber hinaus sollte eine mögliche Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität bei den angewendeten Testmethoden untersucht werden. Diese vorbereitenden Untersuchungen mussten selbstverständlich der Testung der neu entwickelten Pol  $\alpha$  Hemmer voran gehen.

Als Zielzellen wurden drei Typen von Keratinozyten ausgewählt, die den Übergang von gesundem über immortalisiertes, nicht-tumorigenes bis hin zu Tumorgewebe darstellen, d.h. primäre Keratinozyten, die spontan transformierte HaCaT-Zelllinie und eine Zelllinie, die aus einem Plattenepithelkarzinom der Zunge (SCC-25) gewonnen wurde. Diese Zellen sollten zunächst hinsichtlich ihrer Expression von relevanten Stoffwechsellenzymen (dCK, TK-1, dGK, TP) und Transportern (hENT-1, MRP4, MRP 5) untersucht werden.

Schließlich wurde ein weiterer Angriffspunkt, die Hemmung der Angiogenese durch Vitamin D<sub>3</sub> auch in Kombination mit Dexamethason, untersucht. Der duale Angriff an

## 1. Einleitung

---

verschiedenen Schaltstellen des Tumorwachstums kann nämlich einen Therapieerfolg, d.h. prinzipiell auch einen der Pol  $\alpha$  Hemmer, vergrößern. Auch eine Ausweitung der Zielindikation über das primäre Ziel der Arbeit (Entwicklung von Pol  $\alpha$  Hemmer für hellen Hautkrebs) hinaus reicht damit in den Bereich des Möglichen. Vitamin D<sub>3</sub> ist hierfür ein sehr interessanter Kandidat, da es sowohl direkt auf SCC-Zellen wirkt (McGuire et al., 2001) als auch durch Proliferationshemmung von Endothelzellen indirekt das Tumorwachstum hemmt (Bernardi et al., 2002). DEX konnte die Wirkung auf SCC-25 Zellen verstärken, beide wirken aber bevorzugt auf Endothelzellen antiproliferativ. Da ihre Wirkung sehr stark vom verwendeten Zelltyp abhängig ist, sollten sich diese Untersuchungen zum anti-angiogenetischen Effekt auf die im Arbeitskreis etablierte humane mikrovaskuläre Hirnendothelzellen (HBMEC) beschränken.

Ogleich diese Untersuchungen in vielfacher Weise miteinander verbunden sind, kann doch die Abfolge definiert werden.

1. Methodenentwicklung

- Auswahl der Referenzsubstanzen

- Evaluierung der Testmethoden

- Expression von Enzymen und Transportern in Keratinozyten

2. Screening der mittels Molecular Modelling identifizierten Pol  $\alpha$  Hemmer

3. Kombinationsmöglichkeiten mit Vitamin D<sub>3</sub> und DEX