

**Diskussion**

---

### 4. Diskussion

Pol  $\alpha$  ist ein vielversprechendes Target zur Therapie der Aktinischen Keratose, einer frühen Form des hellen Hautkrebses. Derzeit stellt Aphidicolin den einzigen relativ spezifischen Inhibitor der Pol  $\alpha$  dar, der kommerziell erhältlich ist. Die Substanz wurde in Form eines Glycinat Derivats als Therapeutikum evaluiert (Sessa et al., 1991), zeigte aber keine ausreichende in-vivo Wirksamkeit. Dies ist vermutlich auf eine starke Metabolisierung der Substanz zurückzuführen (Edelson et al., 1990). In neueren Untersuchungen in einem Neuroblastoma in-vivo Modell hemmte Aphidicolin deutlich das Tumorstadium, ohne toxische Nebenwirkungen zu zeigen (Cinatl et al., 1999; Michaelis et al., 2001). Weiterhin werden verschiedene Nucleosid-Analoga hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Pol  $\alpha$  untersucht (Cihlar and Chen, 1997). Allein aufgrund der chemischen Struktur sind allerdings keine Aussagen über deren Wirksamkeit möglich. Hinweise auf eine Enzymhemmung durch z.B. Nucleosid-Analoga sind aber mit dem Molecular Modelling am aktiven Zentrum der Pol  $\alpha$  zu erhalten (Richartz et al., in Druck), die experimentell bestätigt werden müssen. Eine effektive intrazelluläre Hemmung erfordert zunächst mehrere Aktivierungsschritte in der Zelle. So waren Inhibitoren des isolierten Enzyms in einem Antitumor Screening unwirksam (Wright et al., 1987). Durch Molecular Modelling Berechnungen wurden zwei vielversprechende Nucleosid-Analoga (BuP-OH und HM-1) ermittelt. Diese sollten nun synthetisiert und zur Überprüfung bzw. Bestätigung der mit Modelling Berechnungen gefundenen Aktivität experimentell untersucht werden. Sofern sich die Wirkung von HM-1 und BuP-OH prinzipiell bestätigt, für eine Weiterentwicklung aber nicht hinreichend stark erscheint, sollten die Modelling Berechnungen fortgesetzt werden, um stärker bindende Inhibitoren zu finden. Dafür galt es, geeignete Referenzsubstanzen auszuwählen, Testmethoden für die Prüfung der zytotoxischen Wirkung auf gesunde und transformierte Keratinozyten zu evaluieren sowie die Zielzellen zu charakterisieren.

### 4.1. Auswahl der Referenzsubstanzen

Als Referenzsubstanzen boten sich bekannte Inhibitoren der Pol  $\alpha$  (Aphidicolin), Inhibitoren viraler Polymerasen (Zalcitabin, Phosphonate), aber auch Zytostatika mit anderen Angriffspunkten (MTX, Doxorubicin, Dacarbazin, Capecitabin) an, vor allem jedoch Substanzen, die derzeit zur Therapie der Aktinischen Keratose eingesetzt werden (Diclofenac, 5-FU).

#### 4.1.1. Eignung der Referenzsubstanzen

Nebenwirkungen von Inhibitoren viraler Enzyme, z.B. der Reversen Transkriptase, werden häufig einer zusätzlichen Hemmung humaner Polymerasen zugeschrieben. Zudem sind geringe Einbauraten, z.B. von PMEApp und 3TC-TP mit geringen Nebenwirkungspotentialen verbunden (Cihlar and Chen, 1997). Vorversuche mit Zalcitabin, einem weiteren Hemmer der Reversen Transkriptase, zeigten keine Proliferationshemmung humaner Zellen. PMEa dagegen, das zur Therapie der Hepatitis B (DNA Virus) eingesetzt wird, hemmte deren Proliferation (Abb. 3.1.12 und Tab. 3.1.2). Dabei ist die Wirkung auf SCC-25 Zellen (71 %) stärker als auf primäre Zellen (57 %). Eine zytotoxische Wirkung auf SCC-25 Zellen wurde dagegen im MTT-Test nicht festgestellt (Abb. 3.1.12 B).

MTX, Dacarbazin und Capecitabin erwiesen sich für die hier untersuchte Fragestellung und für die angestrebten Zytotoxizitätstests als ungeeignet. Die antiproliferative Wirkung von DOX differenziert nicht zwischen den untersuchten Zellarten (Abb. 3.1.11), daher wurde auch DOX nicht weiter untersucht. Diclofenac wird zwar in der Therapie der AK eingesetzt, durch den völlig anderen Wirkmechanismus gestaltet sich allerdings ein Vergleich der Wirkung mit der von Pol  $\alpha$  Hemmern schwierig. Das gleiche gilt für Imiquimod, das von Anfang an von einer Testung ausgeschlossen wurde.

Als Referenzsubstanzen geeignet waren schließlich der spezifische Inhibitor Aphidicolin und das Standardtherapeutikum der Aktinischen Keratose, 5-FU.

### 4.1.2. Wirkung von Aphidicolin

Aphidicolin ist ein tetrazyklisches Diterpen, das die Pol  $\alpha$  hemmt. Allerdings wird der Mechanismus der Hemmung noch immer kontrovers diskutiert. Es ist unwahrscheinlich, dass dieses nicht-nukleosidische, hydrophobe Molekül direkt mit der DNA interagiert (Fry and Loeb, 1986). Meist wurde eine kompetitive Hemmung bezüglich dCTP und eine nicht kompetitive Hemmung bezüglich der anderen dNTPs und der DNA berichtet (Huberman, 1981; Oguro et al., 1979), aber auch eine Konkurrenz mit allen vier dNTPs um die Bindungsstelle wurde beobachtet. Die Art der Hemmung wird stark durch die Zusammensetzung des Templates und durch das Verhältnis der dNTPs beeinflusst (Sheaff et al., 1991). Es wird ferner angenommen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse auch stark von der Konformation des Enzyms, bedingt durch den Extraktionsprozess, abhängen (Fry and Loeb, 1986). Da die zur Hemmung des Enzyms notwendigen Aphidicolin Konzentrationen bis zu 1000fach über der notwendigen Konzentration in zellulären Testsystemen liegen, könnte die Empfindlichkeit von Pol  $\alpha$  in der Zelle durch Interaktion mit anderen Proteinen, z.B. des Replikationskomplexes erhöht sein. Durch Entfernen der nukleären Proteine änderte sich auch die Art der Hemmung durch Aphidicolin (Fry and Loeb, 1986).

Daher sollte im Rahmen des Dissertationsvorhabens auch untersucht werden, ob der kompetitive Hemmmechanismus von Aphidicolin gegenüber dCTP in einem zellulären Testsystem nachvollzogen werden kann. Dies war wie in Abb. 3.1.3 und Abb. 3.1.4 dargestellt nicht der Fall. Die scheinbare Aufhebung bei  $10^{-7}$  M sollte vielmehr proliferative Effekte des dCTPs reflektieren. Möglicherweise stört die exogene Zugabe des dC das intrazelluläre Nukleosid Verhältnis, so dass ein vorhandener kompetitiver Mechanismus nicht mehr nachgewiesen werden kann. Auch könnte der Hemmmechanismus bezüglich der Nukleotide in Zellsystemen ohne Bedeutung sein, da die Zellen durch Auswärtstransporter in der Lage sind, die intrazellulären Nukleotidkonzentrationen ihren spezifischen Bedürfnissen anzupassen. Die Auswärtstransporter sind besonders bei zu hohen intrazellulären Konzentrationen aktiv, d.h. man vermutet, dass sie sozusagen eine Überlauffunktion erfüllen (Wielinga et al., 2003) und so im Kern künstlich erhöhte dCTP Konzentration verhindern. Dies schließt die Aufklärung unter den gegebenen experimentellen Bedingungen aus.

### **4.2. Evaluierung der Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Zytotoxizität**

#### **4.2.1. Thymidin-Einbau/ Proliferation**

Die Verwendung einer einzigen universellen Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität für alle Substanzen ist nicht möglich. Prinzipiell erscheint es sinnvoll, Substanzen, die in die DNA-Synthese von Zellen eingreifen, hinsichtlich der Proliferationshemmung zu untersuchen. Allerdings ist dies in vielen Fällen nicht möglich. 5-FU z.B. entleert durch Hemmung der Thymidilatsynthese den intrazellulären dTTP Pool. Dadurch wird vermehrt von außen angebotenes Thymidin eingebaut und man erhält falsch hohe Einbauraten, also keine Abnahme, die die tatsächlich stattfindende Proliferationshemmung widerspiegeln würde. Dies sollte auch auf die Wirkung von Thymidin-Analoga, wie z.B. das mittels Molecular Modelling entwickelte HM-1 zutreffen. Thymidin hebt ebenso die Differenzierungswirkung von MTX auf primäre Keratinozyten auf (Schwartz et al., 1992). Auch die proliferationshemmende Wirkung von Substanzen, die den Zellzyklus in die S-Phase verschieben ist problematisch (Hatse et al., 1999a). So ist für PMEA, Aphidicolin und Ara-C eine starke Aktivierung des Salvage-Pathways bzw. eine Erhöhung des daraus stammenden dTTPs beschrieben. Dies ist nicht auf eine direkte Aktivierung der TK-1, sondern vielmehr auf eine Akkumulation von Zellen in der S-Phase zurückzuführen. Erschwerend kommt hinzu, dass transformierte Zellen mehr TK-1 bilden als normale (Hatse et al., 1999b). Eine mögliche Lösung könnte die Verwendung von dUrd anstelle von Thymidin sein. Bei PMEA-behandelten Zellen stimmte dann auch die anhand des dUrd-Einbaus ermittelte Proliferationsrate mit der Zunahme des dTTP Pools überein. Der Pool der DNA Vorläufer nimmt zu, weil nur die DNA-Synthese, nicht aber die Synthese der Nukleotide gehemmt ist. Die Verwendung von dThd dagegen führte zu einer Überschätzung der DNA Einbaurate um das 4-fache (Hatse et al., 1999a). Allerdings wird dUrd nur markiert mit <sup>125</sup>Iod angeboten, somit deutlich mehr Vorkehrungen als bei <sup>3</sup>H-Thymidin erfordert und deshalb in dieser Arbeit nicht zur Anwendung kam. Die reduzierte Fähigkeit, den Salvage Pathway zu nutzen, ist auch Grund für die höhere Empfindlichkeit von SCC-25 Zellen gegenüber MTX im Vergleich zu primären Keratinozyten (Firestone et al., 1990; Lee et al., 1991). Die Aktivität der Thymidilatsynthese war für beide Zellarten gleich. Im Gegensatz zur SCC-Linie waren normale Keratinozyten aber

## 4. Diskussion

---

durch Verwertung von exogenem Thymidin in der Lage, eine Blockade der de-novo Synthese von dTMP zu umgehen. Dies wurde auch dadurch bestätigt, dass die Zellen in einem Basalmedium zwar langsamer wuchsen, die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte aber denen aus Versuchen in Wachstumsmedium entsprachen.

Die hier ermittelten Ergebnisse zum Einfluss von Aphidicolin auf epidermale Zellen können mit den beschriebenen Zusammenhängen erklärt werden. Bei primären Keratinozyten liegt der  $IC_{50}$ -Wert für die Proliferation eine 10er Potenz höher als bei Messung der Viabilität im MTT-Test, d.h. die Einbaurrate wurde überschätzt. Die maximale Hemmung ist im MTT-Test geringer. Bei SCC-25 Zellen liegen dagegen  $IC_{50}$  und maximale Hemmung in MTT-Test und Thymidin-Einbau sehr eng beieinander. Die Zellen können demnach exogenes Thymidin nicht in dem Maße nutzen wie primäre Keratinozyten. Die schnell proliferierende HaCaT-Zelllinie wird deutlich stärker in der Proliferation als in der Viabilität gehemmt (Abb. 3.1.1).

Auch die Tatsache, dass SCC-25 Zellen deutlich stärker als primäre Keratinozyten auf PMEA reagierten, könnte ein Hinweis auf die mangelnde Nutzung des Salvage Pathways sein (Abb. 3.1.12 A).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Versuche zur Proliferationshemmung mittels Thymidin-Einbau ihre Berechtigung haben und erste Hinweise auf zytotoxische Wirkungen liefern. Für Substanzen wie BuP-OH, die den Zellzyklus wenig beeinflussen, ist die Methode aussagefähig. Bei anderen Substanzen, wie z.B. Aphidicolin und PMEA, müssen die Ergebnisse durch weitere Tests verifiziert werden. Für Thymidin-Analoga und schnell proliferierende Zellen dagegen ist die Methode ungeeignet.

### **4.2.2. MTT-Test/ Viabilität**

Aussagen zur Zytotoxizität, die über eine Proliferationshemmung hinaus gehen, können mit dem MTT-Test gewonnen werden. Bei Substanzen, die die DNA Synthese hemmen, sind die  $IC_{50}$  Werte des Thymidin-Einbaus niedriger als die aus dem MTT-Test (Leblond et al., 2002). Wenn es nicht wie oben beschrieben zu einer Überschätzung des Thymidin-Einbaus kommt, ist dies sicher zu erwarten. Eine proliferationshemmende Wirkung tritt schneller ein als eine Abnahme der Viabilität, wie dies auch bei PMEG (Tab. 3.1.2) und BuP-OH (48 h, Tab 3.2.1) bei den drei Keratinozytenarten der Fall war.

### **4.2.3. NRU/ Membranintegrität**

Wie erwartet war der Einfluss auf die Membranintegrität primärer Keratinozyten bei allen untersuchten Substanzen gering (Tab 3.2.2). Bei den anderen Zellarten glichen die Kurvenverläufe dem MTT-Test, zeigten meist aber geringere Effekte. Dieser Test ist bei in die DNA-Synthese eingreifenden Zytostatika weniger sensitiv als der MTT-Test, wie es auch bereits für andere Substanzen gezeigt wurde (Weyermann et al., 2005).

### **4.2.4. Zellzyklus-Analyse**

Krebs wird immer mehr als eine Zellzyklusstörung gesehen. Im mehrstufigen Prozess der Tumorentstehung ist die Dysregulation des Zellzyklus ein fundamentales Ereignis (Malumbres and Carnero, 2003). Auch bei den hier untersuchten Zellen gibt es deutliche Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusphasen. Der Anteil umstimulierter primärer Keratinozyten in der S-Phase betrug ca. 14 % (Abb. 3.2.3). Die sich schnell teilende, transformierte Keratinozyten Zelllinie HaCaT weist mit ca. 27 % einen fast doppelt so hohen Anteil auf (Abb. 3.2.3). Bei den aus einem langsam wachsenden epithelialen Zungenkarzinom isolierten SCC-25 Zellen liegt der Anteil an der S-Phase bei ca. 17 % (Abb. 3.2.4), also ähnlich den primären Keratinozyten. Die Dysregulation wird durch eine veränderte Expression von Zellzyklusregulatoren, z.B. den zellzyklusabhängigen Kinasen (CDKs) und deren Aktivatoren und Inhibitoren (Cip/Kip), ausgelöst. Ein Eingriff in den Zellzyklus kann zu Proliferationshemmung, Apoptose oder Differenzierung der Zellen führen. Manche Krebszellen behalten ihre Fähigkeit zur Differenzierung (Hatse et al., 1999b), wodurch sie nachhaltig ihr tumorigenes Potential verlieren. Für PMEA konnte gezeigt werden, dass die Substanz abhängig von der Tumorart Differenzierung auslösen kann (Hatse et al., 1999d).

Es ist wichtig zwischen reversibler und nicht-reversibler Wachstumshemmung bzw. Zellzyklus-Arrest zu unterscheiden. Nicht-reversible Wachstumshemmung ist eine Voraussetzung für die Differenzierung (Schwartz et al., 1995). Bei einem reversiblen Zellzyklus-Arrest kann es nach Absetzen der Therapie zu Rezidiven kommen.

Veränderungen im Zellzyklus erleichtern auch die Interpretation von Daten aus anderen Zytotoxizitätstest. So können z.B. sehr hohe Einbauraten von Thymidin im Proliferationsassay häufig mit einer Akkumulation in der S-Phase oder im Fall von 5-

## 4. Diskussion

---

FU mit einem Arrest in G1 erklärt werden. Durch anschließende Zugabe von Thymidin können die Zellen in die S-Phase eintreten und in Folge dessen sehr hohe Thymidin-Einbauraten produzieren (Abb. 3.2.5).

Weiterhin ergibt sich aus der Zellzyklusverteilung die hohe Ansprechrate der HaCaT-Zellen auf proliferationshemmende Substanzen.

Nur mit Einschränkungen eignet sich die Zellzyklus-Analyse für primäre Keratinozyten. In der Zellzyklus-Analyse werden tote Zellen anhand der für die Apoptose charakteristischen DNA Fragmente (DNA-Leiter) als Sub-G1 Fraktion detektiert. Bei primären Keratinozyten findet während der Apoptose keine DNA Fragmentierung statt (Gandarillas et al., 1999; Haberland et al., 2006), so dass hier keine apoptotische Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.2.3). Primäre Keratinozyten exprimieren die dafür notwendige DNase (CAD) nur gering oder sie liegt nicht aktiviert vor. Takahashi et al. fanden mittels Real time PCR nur sehr geringe Mengen CAD in normaler und psoriatischer Epidermis. Das Protein war mittels Western Blot nur in psoriatischer Epidermis schwach, in gesunder Epidermis gar nicht detektierbar (Takahashi et al., 2002).

In durchflußzytometrischen Untersuchungen, die eine Translokation des Phosphatidylserins an die Membranaußenseite detektieren, konnten apoptotische Vorgänge in primären Keratinozyten, z.B. nach Stimulation mit Aphidicolin, dagegen sehr gut gezeigt werden (Abb. 3.1.2). Die starke Zunahme des G0/G1 Peaks nach Stimulation mit hohen Konzentrationen ( $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M) Aphidicolin und 5-FU (Abb. 3.2.3) weist wahrscheinlich auf einen Anteil apoptotischer Zellen hin. Der bei Stimulation mit BuP-OH oder HM-1 ( $10^{-5}$  M und  $10^{-4}$  M) fast unverändert hohe G1 Peak wird wahrscheinlich auch apoptotische Zellen enthalten, wie Ergebnisse zur Viabilität nahelegen (Abb. 3.4.1 und Tab 3.4.1).

### **4.2.5. Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität**

Es wurde untersucht, ob die bisher praktizierten Stimulationszeiten von 72 h für das Proliferationsassay und 48 h für den MTT-Test auch für die hier untersuchten Substanzen sinnvoll bzw. notwendig sind. Für Aphidicolin wurde in keinem Test ein Unterschied zwischen Stimulationszeiten von 24, 48 oder 72 h gefunden (Abb. 3.2.2). 5-FU scheint nach 48 h etwas wirksamer zu sein. Die Beeinträchtigung der Membranintegrität nach 24 oder 48 h unterschied sich bei keiner Substanz deutlich

(Tab 3.2.2). Im Proliferationsassay konnten einige Unterschiede für Doxorubicin und Diclofenac festgestellt werden (Abb. 3.2.1).

### **4.3. Auswahl und Charakterisierung der Zellarten**

Die Zellarten sollten die Entwicklung eines Tumors von gesundem über transformiertes hin zu malignem Gewebe darstellen. Zudem sollte diese Abstufung auch Aussagen über eine mögliche Beeinträchtigung von gesundem Gewebe bei topischer Therapie ermöglichen. Die Zytotoxizitätstests wurden mit drei Zellarten, primären Keratinozyten, HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen durchgeführt. Da speziell zu Anfang die HaCaT-Zelle als den primären Keratinozyten sehr ähnliche, leicht zu kultivierende und unbegrenzt verfügbare Zelllinie angesehen wurde, wurden einige Experimente nur mit diesen Zellen durchgeführt. Allerdings zeigte sich mit dem Projektfortschritt, dass HaCaT-Zellen als schnell proliferierende Zelllinie deutlich andere Eigenschaften als die primären Zellen aufweisen. Durch den hohen Anteil an Zellen in der S-Phase (Abb. 3.2.3) war ihre Sensitivität gegenüber proliferationshemmenden Substanzen erhöht. Da Aktinische Keratose, Plattenepithelkarzinom und Basaliom langsam wachsende Tumorarten sind, sind HaCaT-Zellen weniger für die Testung geeignet als primäre bzw. transformierte Keratinozyten (SCC-25). In jedem Fall ist die andere Reaktivität bei der Bewertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

#### **4.3.1. Expression von Transportern**

Um die Empfindlichkeit der Zielzellen, primäre Keratinozyten, HaCaT- und SCC-25 Zellen, auf Nukleosid-Analoga abschätzen zu können, wurde deren Expression von Nukleosidtransportern getestet.

Die natürlichen Nukleoside sind hydrophile Moleküle, die mittels spezifischer Transporter in die Zelle gelangen. Ubiquitär kommt der hENT-1 Transporter vor, der auch eine Reihe von Nukleosid-Analoga transportiert. Eine effektive Aufnahme der Polymerase-Inhibitoren in die Zielzelle ist Voraussetzung für ihre Wirksamkeit. Der Transporter konnte in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. In SCC-25 Zellen ist die Expression sehr schwach (Abb. 3.3.1). Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression der Transporter für jeden Zelltyp bzw. jede

#### 4. Diskussion

---

Zelllinie untersucht werden muss. Ob allerdings das Fehlen des Transporters in SCC-25 Zellen die Wirksamkeit der Nukleotid-Analoga negativ beeinflusst ist nicht sicher, da der Transport in die Zelle auch über einen anderen Transporter laufen könnte. AZT wird z.B. von hENT-2, nicht aber von hENT-1 transportiert (Kong et al., 2004). Weiterhin könnte die Aufnahme in die Zelle Transporter unabhängig verlaufen wie bei BCH-1868 (Leblond et al., 2002) oder auch bei PMEAs, das endozytotisch aufgenommen wird (Olsanska et al., 1997). Auch das lipophile Gemcitabin scheint weniger von einem Nukleosidtransportprozess abzuhängen als z.B. Ara-C, es konnte keine Korrelation zwischen hENT-1 Expression und Sensitivität der Zellen gegenüber Gemcitabin gezeigt werden (Tsuje et al., 2006).

Für den Auswärtstransport von natürlichen Nukleotiden und Nukleotid-Analoga sind vor allem MRP4 und MRP5 verantwortlich. PMEAs und PMEDAP sind Substrate dieser Transporter und auch das ähnlich wirkende PMEG wird wohl über diese Transporter aus der Zelle geschleust (Hatse et al., 1999c). In PMEAs-resistenten Zellen wird MRP4 überexprimiert (Lee et al., 2000; Schuetz et al., 1999).

Die Existenz der Transporter wurde in verschiedenen Zelllinien und Geweben nicht aber in der Haut nachgewiesen. Wegen der möglichen Konsequenzen für die Therapie wurde die Expression in primären Keratinozyten, HaCaT- und SCC-25 Zellen untersucht. Wie in Abb. 3.3.1 gezeigt, kommen sowohl MRP4 als auch MRP5 in Keratinozyten vor. Allerdings sind die Mengen geringer als bei dem Bezugsgen GAPDH. Besonders MRP5 ist weniger stark exprimiert. Anhand von Modellsubstanzen wurde geprüft, ob der nur unspezifische Inhibitor des MRP4-vermittelten Auswärtstransports Indometacin die Toxizität von PMEAs und PMEDAP auf primäre und transformierte Keratinozyten erhöht. Dies war nicht der Fall. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zu MRP4/MRP5-vermittelten Resistenzen [Hemmung des PEG<sub>2</sub>-Ausstroms: (Reid et al., 2003); Ausstrom von PMEAs aus Microglia-Zellen: (Dallas et al., 2004)] erfolgten ausschließlich an überexprimierenden Zellen oder Membranvesikeln. Weiterhin wurde keine Steigerung einer Toxizität durch Hemmung der Transporter gezeigt, sondern nur ein erhöhter Ausstrom durch die Transporter (Kruh et al., 2001; Pratt et al., 2005; Rius et al., 2003) bzw. ein verringerter Ausstrom nach Hemmung der Transporter. Der Einfluss auf die Zytotoxizität durch Hemmung der Transporter bei Zellen, die diese nicht überexprimieren, ist allerdings unbekannt.

Weiterhin wurden die Transporter als „low affinity cyclic nucleotide transporter“ beschrieben, die am besten bei sehr hohen Nukleotid - Konzentrationen arbeiten und wahrscheinlich eine Funktion als Überlaufpumpe innehaben (Wielinga et al., 2003). Gründe für die fehlende Wirkungssteigerung von PMEA und PMEDAP in den untersuchten Zellen könnten z.B. eine geringe Aufnahme der Substanzen in die Zellen sein. Dadurch erreicht die intrazelluläre Konzentration nicht so hohe Werte, dass eine Hemmung der Transporter sichtbar werden würde, da sie noch gar nicht auswärts transportieren. Weiterhin wäre es möglich, dass die Hemmung mit einem unspezifischen Inhibitor wie Indometacin unzureichend ist oder dass zu geringe Konzentrationen am Transportprotein erreicht werden.

Die geringe Expression der Transporter in diesen dermalen Zellen könnte ein Hinweis auf einen geringen Einfluss derselben auf die Therapie sein. Zurzeit gibt es noch keine Daten zur klinischen Relevanz der Transporter bei der Entstehung von Resistenzen. Das Substratspektrum legt aber eine solche Rolle nahe. Spezifische Inhibitoren sind notwendig, um den Einfluss der Transportproteine auf die Therapie mit Nukleosid-Analoga zu untersuchen (Ritter, 2005).

### **4.3.2. Expression von Enzymen des Nukleotidmetabolismus**

Die primären und transformierten Keratinozyten wurden ferner auf ihr Expressionsmuster bezüglich der für den Nukleotidmetabolismus, insbesondere für die intrazelluläre Aktivierung der Nukleotid-Analoga so wichtigen Enzymen dCK, dGK, TK-1 und TP untersucht.

Die zytosolische TK-1 phosphoryliert Thymidin zu TMP. Das Enzym konnte ebenso wie das primär katabole Enzym TP in allen drei Keratinozytenarten nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Einführung des Monophosphats in HM-1 möglich sein sollte. Die TP baut zwar Thymidin-Nukleoside ab, aktiviert andererseits aber auch Capecitabin und ermöglicht 5-FU die Aktivierung über den sogenannten DNA Weg. Das Enzym ist allerdings auch ein wichtiger Faktor der Angiogenese und eine hohe Expression in Tumoren soll mit einem hohen Metastasierungsrisiko verbunden sein (Focher and Spadari, 2001). Die nicht erhöhte Expression von TP in SCC-25 Zellen im Vergleich zu primären Keratinozyten könnte die geringe Metastasierungsneigung des Plattenepithelkarzinoms widerspiegeln. Auch wenn es Untersuchungen zur Wirkungssteigerung von Capecitabin-Metaboliten

durch Erhöhung der TP Expression gibt (Tsuneyoshi et al., 2006), wird doch vorrangig an der Entwicklung von Inhibitoren des Enzyms zur Angiogenesehemmung geforscht (Focher and Spadari, 2001).

Die dCK ist die Kinase mit dem breitesten Substrat-Spektrum, die neben dC auch dG und dA phosphorylieren kann. Sie ist nur schwach in SCC-25 Zellen exprimiert. Die nur in den Mitochondrien vorkommende dGK, welche dG phosphoryliert konnte in allen untersuchten Zellarten nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3). In-vitro sind Guanodin-Analoga Substrate beider Enzyme (Rodriguez et al., 2002), wobei in Zellkultur eine Präferenz für das mitochondriale Enzym gezeigt wurde (Zhu et al., 2000). Dies scheint allerdings auch konzentrationsabhängig zu sein, d.h. niedrige Konzentrationen (10  $\mu$ M) wurden bevorzugt von dGK-überexprimierenden Zellen, hohe (100  $\mu$ M) dagegen von dCK-überexprimierenden Zellen phosphoryliert (Rodriguez et al., 2002). BuP-OH ist wahrscheinlich ebenfalls Substrat für beide Enzyme. Da dies Auswirkungen auf den Ort der Aktivierung von BuP-OH haben kann, kommt der Expression der Enzyme des Nukleosid-Stoffwechsels in normalen und transformierten Keratinozyten große Bedeutung zu.

### **4.4. Testung mittels Molecular Modelling identifizierter Pol $\alpha$ Hemmer**

Mit Hilfe des von Herrn Prof. Höltje, HHU Düsseldorf entwickelten Modells des aktiven Zentrums der Pol  $\alpha$ , wurden erste Inhibitoren (BuP-OH, HM-1) des Enzyms rational entwickelt und von der FU Berlin, AK Herr Prof. Reißig synthetisiert. Sie wurden in der Zellkultur mit verschiedenen Untersuchungsmethoden charakterisiert, um die Ergebnisse des Molecular Modelling zu prüfen und Hinweise für Strukturoptimierungen zu geben.

#### **4.4.1. Zytotoxizität**

BuP-OH wirkte im MTT-Test (Abb. 3.4.1) und im Proliferationstest (Abb. 3.4.2) stark zytotoxisch. HM-1 war tendenziell schwächer wirksam, überraschte aber mit einer stark zytotoxischen Wirkung auf nicht-kontaktgehemmte SCC-25 Zellen in der Zellzyklus-Analyse (Abb. 3.4.3), was auch in einem MTT-Test mit verringerter Zelldichte bestätigt werden konnte (Abb. 3.4.4).

## 4. Diskussion

---

Auffällig war der geringe Einfluss von BuP-OH auf den Zellzyklus bei allen drei Zellarten trotz seiner deutlichen Hemmung der Proliferation, Viabilität und Membranintegrität. Obwohl BuP-OH selektiv im aktiven Zentrum der Pol  $\alpha$  angreift, könnte es anders als HM-1 nicht zytosolisch aktiviert werden. Solche Unterschiede sind auch von anderen Zytostatika bekannt. So wirkt Ara-G selektiv zytotoxisch auf T-Lymphoblasten, Ara-C aber genauso stark gegen B-Lymphoblasten. Beide Substanzen müssen intrazellulär zu den entsprechenden Triphosphaten aktiviert werden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Einführung der ersten Phosphatgruppe. Ara-C wird durch dCK phosphoryliert. In der Zellkultur wird Ara-G in hohen Konzentrationen bevorzugt durch die zytosolische dCK, in niedrigen dagegen bevorzugt durch die mitochondriale dGK phosphoryliert (Rodriguez et al., 2002). In CHO Zellen wird Ara-G fast ausschließlich in die mitochondriale DNA und nicht in nukleäre DNA eingebaut. Es wird intrazellulär durch das mitochondriale Enzym dGK aktiviert und die phosphorylierte Form ist praktisch innerhalb der Mitochondrien eingeschlossen (Zhu et al., 2000). Dennoch können die Autoren einen Einbau in die nukleäre DNA nicht ausschließen (Zhu et al., 2000). Hierfür könnte ein Nukleotid-Transportsystem der Mitochondrien verantwortlich sein (Rodriguez et al., 2002) und die Toxizität der Substanz erklären. Allerdings führten auch hohe Konzentrationen von dGTP in Mitochondrien zu starker und selektiver Apoptose von T-Lymphozyten (Herrstrom Sjoberg et al., 2001).

Die schwache Beeinflussung des Zellzyklus durch BuP-OH erst in den höchsten Konzentrationen ( $10^{-4}$  M; Abb. 3.2.3, Abb. 3.2.4) und die vergleichsweise stark ausgeprägte Wirkung im MTT-Test (Tab 3.2.1), weisen auf eine mitochondriale Aktivierung und auch Wirkung dieser Substanz hin. Besonders in SCC-25 Zellen, in denen die zytosolische dCK kaum nachgewiesen werden konnte, ist ein solcher Weg denkbar. Damit ließe sich möglicherweise auch die beobachtete stärkere Hemmung im MTT-Test verglichen mit der Proliferationshemmung nach 24 h erklären.

### 4.4.2. Zeitabhängigkeit

Interessanterweise schädigten BuP-OH und HM-1 die Viabilität bei Inkubationszeiten über 24 h stärker als bei Einwirkung über 48 h (Tab 3.2.1). Ob Keratinozyten Kompensationsmöglichkeiten haben, um eine Zytotoxizität bei längerer Gabe zu umgehen, ist unbekannt. Ähnliches konnte für die Membranintegrität beobachtet

werden, wobei hier die Unterschiede in den Effekten nicht ganz so stark waren. Einzig HM-1 schädigte die Membranintegrität bei HaCaT-Zellen nach 24 Stunden deutlich stärker als nach 48 Stunden (Tab 3.2.2).

### **4.4.3. Erhöhung der Zytotoxizität durch Costimulation**

Die Kombination von zwei Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten kann die Wirksamkeit einer Tumorthherapie deutlich steigern. Hier bieten sich z.B. Kombinationen an, die eine Aktivierung bzw. Aufnahme der Wirksubstanz sichern, einen Abbau bzw. das Ausschleusen verhindern oder über einen zweiten Angriffspunkt die Gesamtwirkung steigern.

BuP-OH ist ein Inhibitor der Pol  $\alpha$  und hemmt dadurch die DNA Replikation. 5-FU hemmt die DNA Synthese durch Blockade der Thymidilatsynthase induzierten Entleerung des intrazellulären dTTP Pools. Weiterhin verschiebt 5-FU den Zellzyklus in die S-Phase (Abb. 3.2.3 und Abb. 3.2.4) und erhöht die Expression von hENT-1 (Tsuji et al., 2006). Die Verschiebung der Zellen in die S-Phase könnte die Toxizität steigern, da dadurch mehr Zellen sensibel für die Hemmung durch BuP-OH sind. Eine solche Wirkungssteigerung durch Präinkubation oder Costimulation mit 5-FU konnte bei SCC-25 Zellen allerdings nicht gezeigt werden (Abb. 3.4.8 und Abb. 3.4.9). Die Viabilität war nicht stärker gestört als bei Einzelstimulation. Dafür können verschiedene Ursachen verantwortlich sein. Eine Wirkungssteigerung von BuP-OH durch vorheriges Verschieben der Zellen die S-Phase, setzt voraus, dass BuP-OH primär in der S-Phase des Zellzyklus wirkt. Als DNA Synthesehemmer ist dies auch zu erwarten. Es wäre aber trotz im Molecular Modelling gezeigter, effektiver Pol  $\alpha$  Hemmung möglich, dass die Substanz ähnlich wie Ara-G in der Zelle bevorzugt in den Mitochondrien aktiviert wird. Dadurch hätte die Substanz wenig Möglichkeit direkt auf die nukleäre DNA Synthese zu wirken, und es könnte durch Erhöhung der S-Phasen-Fraktion keine Wirkungssteigerung erzielt werden.

Trotzdem ist der Gedanke des dualen Angriffs sehr interessant. Z.B. kann die Zytotoxizität von Ara-C durch Co-Stimulation mit Aphidicolin gesteigert werden (Sargent et al., 2001). Durch Induktion der TP-Expression durch AZT konnte die Toxizität von 5'-DFUR erhöht werden (Tsuneyoshi et al., 2006). Auch die Hemmung des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) entweder durch siRNA

oder Inhibitoren erhöhte die Sensitivität gegenüber u.a. 5-FU bzw. führte zu einer Hemmung der Telomerase Aktivität (Budiyanto et al., 2003; Nozawa et al., 2006).

### **4.5. Hemmung des Tumorwachstums durch Angiogenesehemmung**

Calcitriol wird immer stärker als Substanz wahrgenommen, die zur Tumorthherapie beitragen kann, es erwies sich in Phase I und II Studien v.a. in Kombination mit anderen Substanzen als erfolgreich (Beer and Myrthue, 2004; Trump et al., 2004). Calcitriol wirkte auf SCC-Zellen (McGuire et al., 2001) als auch auf aus Tumoren stammenden Endothelzellen (TDEC) antiproliferativ (Bernardi et al., 2002; Chung et al., 2007). DEX besitzt eine wenn auch schwächere antiproliferative Wirkung auf diese Zellen und kann die Effekte von Calcitriol in-vitro und in-vivo verstärken (Bernardi et al., 2002; Bernardi et al., 2001). Dies ist überraschend, da DEX und Calcitriol andere Zellen wie z.B. primäre Fibroblasten (Hammer et al., 2004) bzw. primäre Keratinozyten (Manggau et al., 2001) vor Apoptose schützen. Diese protektiven Wirkungen werden in diesen Zellen über S1P vermittelt, das ein starker pro-angiogentischer Faktor ist (Kimura et al., 2000; LaMontagne et al., 2006) und in HUVECs antiapoptotisch wirkt.

Im Gegensatz zu den murinen Zellen, die McGuire et al. (McGuire et al., 2001) verwendet haben, wurde in der vorliegenden Arbeit eine humane Zelllinie, SCC-25, eingesetzt. Calcitriol wirkte erst in sehr hohen Konzentrationen toxisch und der Effekt wurde durch DEX wenig verstärkt (Abb. 3.5.1).

Auch auf HBMECs wirkten DEX und Calcitriol nicht antiproliferativ (Abb. 3.5.2) oder apoptotisch (Abb. 3.5.3 A). Diese Ergebnisse stimmen mit den Arbeiten um Trump überein. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass sich reife, normale Endothelzellen deutlich von neovaskulären Endothelzellen, die in Tumorgewebe einwandern unterscheiden (Chung et al., 2007). Zellen aus Tumorgewebe waren im Vergleich zu normalen Endothelzellen viel sensibler gegenüber einer Stimulation mit DEX und Calcitriol (Bernardi et al., 2002). Die Autoren beschreiben für Calcitriol (10 nM) einen apoptotischer Effekt in TDECs. Primäre Keratinozyten werden allerdings bei gleicher Konzentration vor Apoptose geschützt (Manggau et al., 2001). Der antiapoptotische Effekt von DEX und Calcitriol ist sehr stark vom Zelltyp abhängig und wird in primären Fibroblasten und Keratinozyten über S1P vermittelt. In HBMECs konnte

kein apoptoseschützender Effekt durch DEX oder Calcitriol nachgewiesen werden (Abb. 3.5.3) und auch die Beteiligung von S1P wurde ausgeschlossen, da die intrazellulären Konzentrationen sehr gering sind (Abb. 3.5.4) und die SphK1 kaum exprimiert wird (Abb. 3.5.5). Dies zeigt, dass nicht nur apoptotische Effekte von Calcitriol stark abhängig vom Zelltyp sind (TDECs reagieren empfindlich während normale Endothelzellen relativ resistent sind), sondern dass auch antiapoptotische Effekte stark vom Zelltyp abhängig sind. Die antiapoptotische Wirkung bzw. die pro-angiogenetische Wirkung, d.h. Induktion von Wachstum und Migration, wurde meist in HUVECs demonstriert. Für HBMECs scheinen diese Erkenntnisse nicht zu gelten, ein Unterschied, der bereits in Bezug auf S1P beobachtet wurde. S1P wirkt auf Endothelzellen aus den unterschiedlichsten Geweben pro-angiogenetisch, bei Gehirndothelzellen hemmte es allerdings die Migration (Pilorget et al., 2005). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheinen normale Endothelzellen nicht als Modell für tumorinduzierte Angiogenese geeignet zu sein und die Ergebnisse können wohl nicht auf TDECs übertragen werden.

Trotz der enttäuschenden in-vitro Ergebnisse könnten Calcitriol und DEX in-vivo eine wirksame Begleittherapie für die Aktinische Keratose darstellen. Bei einem Tumor, der aus einer in-vitro relativ resistenten Prostatakrebszelllinie generiert wurde, konnte in-vivo eine Wirksamkeit von Calcitriol gezeigt werden. Das Tumorstadium wurde durch Hemmung der Angiogenese inhibiert (Bernardi et al., 2002). Für SCC-Zellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass nach Stimulation mit Calcitriol Angiopoetin-2 auf Proteinebene verringert wurde. Dieser Faktor ist in Tumorzellen häufig überexprimiert und stimuliert einerseits das Tumorstadium, andererseits schützt er Endothelzellen über den Akt-Weg (Bernardi et al., 2002).

### **4.6. Ausblick**

Die Resultate der experimentellen Prüfung der ersten mittels Molecular Modelling gefundenen Inhibitoren der Pol  $\alpha$  bestätigen, dass das gewählte Target für die Tumorthherapie sehr interessant ist. Allerdings ist ihre Wirkstärke noch nicht ausreichend. Auf den hier beschriebenen Ergebnissen aufbauend konnten inzwischen stärker wirksame Derivate identifiziert werden. Um diese und auch folgende Kandidaten weiter charakterisieren zu können, sind noch weitere

#### 4. Diskussion

---

Untersuchungen notwendig. Bisher ist nicht bekannt, ob die Nukleotid-Analoga Substrate für den ubiquitär vorkommenden Transporter hENT-1 sind. Da dieser Transporter in den Plattenepithelkarzinomzellen nicht nachgewiesen wurde, ist interessant, ob sie auf diesen Transport wirklich angewiesen sind. Für solche Versuche müssten die Substanzen allerdings radioaktivmarkiert vorliegen. Dann könnte auch der Ort der Aktivierung, d.h. Zytosol oder Mitochondrien bestimmt werden. In primären Keratinozyten, in denen der Transporter nachgewiesen wurde, wäre auch dessen spezifische Hemmung durch NBMPR möglich, um den Einfluss für die Aufnahme in die Zellen zu untersuchen (Abb. 4.6.1).

Die Zytotoxizitätstestung lieferte sehr eindrucksvolle Ergebnisse, die gut mit den Ergebnissen des Molecular Modelling korrelieren und viele Informationen über die reine Enzymhemmung hinaus liefern. Mit Docking Simulationen konnte gezeigt werden, dass die Substanzen die Pol  $\alpha$  hemmen, dennoch sind ergänzende Versuche am isolierten Enzym wünschenswert. Hierfür sind allerdings die Triphosphate der Substanzen erforderlich.

Weiterhin wäre es interessant, weitere biologischen Marker und ihre Beeinflussung durch die Polymerasehemmer zu untersuchen. Für Plattenepithelkarzinome der Speiseröhre konnte z.B. eine Überexpression von Cdc25A gezeigt werden (Malumbres and Carnero, 2003). Diese Phosphatase aktiviert CDK2 und CDK4/6 und damit die Initiierung der DNA Synthese (Lukas et al., 2004). Das am häufigsten mutierte Gen in Tumorerkrankungen ist p53, das sowohl den G1/S als auch den G2/M Übergang reguliert (Golias et al., 2004). Für dieses Gen konnten die gleichen Mutationen in AK und SCC (Jorizzo, 2004b) gezeigt werden. Ein weiterer Marker, der z.B. in BCC erhöht ist, ist Bcl2 (Urosevic et al., 2003). Wird es ebenfalls von den Polymerasehemmern beeinflusst? Weiterhin wurde für SCC-Zellen ein weiterer Marker beschrieben, Ang-2, der durch Calcitriol verringert wird, wodurch in-vivo die Angiogenese und damit indirekt das Tumorstadium gehemmt werden kann (Bernardi et al., 2002). Möglicherweise wird dieser Faktor auch von den Pol  $\alpha$  Hemmern beeinflusst.

Der Einfluss der anionischen Auswärtstransporter in intakten Zellen ist mit Inhibitoren zurzeit nicht erfassbar. Denkbar wäre ein siRNA Knock-Down Experiment (Reid et al., 2003). Es ist allerdings nicht sicher, ob ein solches Experiment auch auf Viabilitätsuntersuchungen anzuwenden wäre, da die physiologischen Funktionen der Transporter nicht bekannt sind. Ausschalten der Transporter könnte aber auch eine

