

**Zusammenfassung**

---

### 5. Zusammenfassung

Die Inzidenz der Aktinischen Keratose, des Plattenepithelkarzinoms sowie des Basalioms ist in den letzten Jahren v.a. aufgrund eines veränderten Sonnenverhaltens der Bevölkerung stark angestiegen. Pol  $\alpha$ , das Schlüsselenzym der DNA Replikation, ist ein interessantes und vielversprechendes Target zur Therapie dieser Krebsformen. Erstmals wurden mit Hilfe eines 3D-Modells des aktiven Zentrums der Pol  $\alpha$  Inhibitoren für dieses Enzym rational entwickelt. Zwei vielversprechende Kandidaten, BuP-OH und HM-1, wurden in vielfältigen Untersuchungen hinsichtlich ihrer Toxizität auf primäre Keratinozyten, HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen im Vergleich zu Referenzsubstanzen (Aphidicolin, 5-FU) untersucht.

Unter den Zytotoxizitätstest war v.a. der MTT-Test universell anwendbar. Das Proliferationsassay, basierend auf dem Thymidin-Einbau, ergänzte die Ergebnisse, stieß aber bei den hier untersuchten Nukleosid-Analoga auf die Grenzen der Anwendbarkeit. Durch Zunahme des Anteils der Zellen in der S-Phase nach Stimulation mit den Testsubstanzen können falsch hohe Einbauraten ermittelt werden. Auch die Wirkungen von Thymidin Analoga oder von Substanzen, die in den Thymidin-Stoffwechsel eingreifen, können hiermit nicht quantifiziert werden. Die Zellzyklus-Analyse ermöglichte, zwischen ruhenden und tatsächlich toten Zellen zu differenzieren. Allerdings war bei primären Keratinozyten zu beachten, dass diese während der Apoptose keine charakteristischen DNA Strangbrüche aufwiesen und so in der Zellzyklus-Analyse nicht als tot identifiziert wurden. Hier waren weitere Untersuchungen, z.B. eine Annexin-V/PI Doppelfärbung erforderlich. Die Neutralrot Aufnahme ist ein weiteres häufig verwendetes Verfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität, das allerdings keine weiteren Erkenntnisse brachte und hinsichtlich der Sensitivität dem MTT-Test unterlegen war.

Die schnell proliferierenden HaCaT-Zellen erwiesen sich für diese Untersuchungen als wenig geeignet, da sie durch den vergleichsweise hohen Anteil an Zellen in der S-Phase empfindlicher reagierten und somit nicht repräsentativ für primäre Keratinozyten sind.

Für die Wirkung der Testsubstanzen ist eine Aufnahme in die Zelle und anschließende Aktivierung der Nukleosid-Analoga zu den entsprechenden Triphosphaten erforderlich. In dieser Arbeit wurden erstmals bei primären sowie

## 5. Zusammenfassung

---

transformierten Keratinozyten und SCC-25 Zellen die Expression der Transporter hENT-1, MRP4 und MRP5 sowie der Enzyme dCK, dGK, TK-1 und TP nachgewiesen.

Primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen exprimieren den ubiquitär vorkommenden Nukleosidtransporter hENT-1, SCC-25 Zellen aber kaum. Ob oder in welchem Ausmaß dieser Transporter für die Aufnahme der hier entwickelten Polymerase Inhibitoren notwendig ist, bleibt zu klären. Die anionischen Auswärtstransporter MRP4 und MRP5 können bei Überexpression Resistenzen verursachen, wie dies für PMEPA beschrieben wurde. In den hier untersuchten Zellen waren die Transporter nicht überexprimiert, kamen sogar eher in geringen Mengen vor. Ihr Einfluss konnte nicht endgültig geklärt werden, er scheint aber erst bei hohen Konzentrationen der Nukleotide zum Tragen zu kommen.

Die für die Aktivierung der Zellen notwendigen Kinasen TK-1 und dGK konnten in allen Zellen nachgewiesen werden. dCK war in SCC-25 Zellen kaum zu detektieren, aber in primären und transformierten Keratinozyten nachweisbar. Möglicherweise bedeutet dies, dass das entwickelte Guanosin Analogon BuP-OH in den Mitochondrien aktiviert wird. Ob es dann auch in den Mitochondrien wirkt oder in den Kern transportiert wird, wurde nicht geklärt. Die primär katabol wirkende TP konnte ebenfalls in allen Zellen nachgewiesen werden.

BuP-OH zeigte besonders im MTT-Test aber auch im Proliferationsassay eine gute Wirksamkeit. Dagegen beeinflusste es den Zellzyklus nur in der höchsten untersuchten Konzentration. HM-1 dagegen zeigte im MTT-Test eine vergleichsweise geringe Wirkung, wirkte jedoch auf nicht-kontaktgehemmten SCC-25 Zellen stark zytotoxisch.

Als zusätzlicher Angriffspunkt wurde die Angiogenesehemmung durch Calcitriol untersucht. Calcitriol auch in Kombination mit DEX hemmt das Tumorwachstum direkt und indirekt durch Hemmung der Angiogenese. In den hier untersuchten Zellen (SCC-25, HBMEC) konnte diese zytotoxische Wirkung nicht gezeigt werden.

Die Summe der Ergebnisse, sowohl zum Expressionsmuster der untersuchten Zellen als auch zum Zytotoxizitätsprofil der synthetisierten Substanzen, liefert wichtige Erkenntnisse für die Strukturoptimierung für weitere Wirkstoffkandidaten. Zudem erlaubt die breite Evaluierung von Toxizitätstests in Zukunft die gezielte Auswahl eines Tests entsprechend der Fragestellung und der Molekülstruktur.

### Summary

The incidence of actinic keratosis, squamous cell carcinoma as well as basal cell carcinoma has risen during the last decades primarily because of an increased exposure to UV radiation of the population. Pol  $\alpha$ , the key enzyme in DNA replication, is an interesting and promising target for the therapy of skin cancer. For the first time inhibitors of the pol  $\alpha$  were developed rationally by means of a 3D model of the active center of the enzyme. Two promising candidates, BuP-OH and HM-1, were tested diversely regarding their toxicity in primary keratinocytes, HaCaT cells and SCC-25 cells in comparison to reference substances (aphidicolin, 5-FU).

Among the cytotoxicity test the MTT-test proved most ubiquitously applicable. The proliferation assay, based on incorporation of [ $^3$ H]methyl-thymidine, complemented the results. However, there were limits to the applicability of the proliferation assay for the nucleoside analogues. By increasing the S-phase fraction incorporation rates may be overestimated and the effect of thymidine analogues or substances which interfere with thymidine metabolism cannot be quantified, either.

Cell cycle analysis enriched the outcomes and enabled to differentiate between dead and resting cells. However, it must be taken into account that primary keratinocytes do not undergo DNA fragmentation during apoptosis and can therefore not be detected as dead cells by cell cycle analysis. Therefore, further experiments were necessary, e.g. annexin V / PI double staining. Neutral red uptake assay is another frequently used method to determine cytotoxicity. It did not provide further information and was not as sensitive as the MTT-test.

HaCaT cells dividing more rapidly than primary keratinocytes or squamous cell carcinoma cells have a comparatively high percentage of S-phase cells rendering them super-sensitive to treatment with the reference substances. They cannot be used unrestricted as model cells for normal keratinocytes.

To become active, the substances have to be taken up into the cell and consequently activated to their respective triphosphates. In the course of this work the expression of the transporters hENT-1, MRP4 and MRP5 as well as the enzymes dCK, dGK, TK-1 and TP was first described for primary and transformed keratinocytes and SCC-25 cells.

It could be shown that primary keratinocytes and HaCaT-cells express the ubiquitously occurring nucleoside transporter hENT-1, however SCC-25 cells do not. Yet, if the transporter is necessary for the uptake of the polymerase inhibitors at all or

## 5. Zusammenfassung

---

to which extend has still to be elucidated. The anionic outward transporters MRP4 and MRP5 can cause resistance in cells overexpressing these transporters as it is described for PMEA. In the cells analyzed the two transporters were poorly expressed. Their influence could not finally be determined but it seems that they become more important with higher concentrations of the nucleotides.

Kinases required for the activation of the nucleoside analogues, i.e. TK-1 and dGK, could be detected in all cell types. dCK, however, was hardly detectable in SCC-25 cells. In primary keratinocytes and HaCaT cells the enzyme was expressed. It might be possible, that the guanosine analogue BuP-OH is activated by dGK in the mitochondria. If it exerts its effect in the mitochondria or if it is further transported into the nucleus has not yet been investigated. The primarily catabolically acting TP could be determined in all cell types.

BuP-OH showed especially in the MTT-test but also in the proliferation assay an appropriate efficacy. However the cell cycle was influenced only in the highest concentrations tested. In contrast, HM-1 showed a comparatively poor effect in the MTT-test, but proved to be highly toxic in not contact inhibited SCC-25 cells.

Moreover, the possibility of a dual attack targeting angiogenesis was evaluated. Calcitriol also in combination with DEX is a known and widely tested agent which inhibits tumor growth directly and indirectly via inhibition of angiogenesis. However, with the cells investigated here, i.e. SCC-25 cells and HBMEC, no such toxic effect could be detected.

The sum of the results, regarding the expression of the different transporters and activating enzymes in the cells as well as the cytotoxicity profiles of the synthesized substances, gives important information for the structural improvement of further analogues. Moreover, the broad spectrum of cytotoxicity tests which was evaluated allows to distinctly choosing a test protocol fitting to the structure of new substances and the aspect of interest.