

**Ein neues Target zur Therapie von Basaliom
und spinozellulärem Karzinom**

–

Inhibition der humanen DNA Polymerase α

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anja Richartz
aus Mainz

Juli 2007

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Burkhard Kleuser

Datum der Disputation: 12. Oktober 2007

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von
Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie
des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas. Ich danke ihr sehr herzlich für die stete, konstruktive Gesprächsbereitschaft und die wissenschaftlichen Anregungen sowie für ihre mitreißende Motivationsfähigkeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Hans-Dieter Höltje und Frau Dr. Monika Höltje, beide Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Polymerase Inhibitoren und für ihre Hilfe bei der Erstellung der Publikation.

Ebenfalls danke ich Herrn Professor Dr. Hans-Ulrich Reißig, FU Berlin, Institut für Chemie und Biochemie – Organische Chemie und seinem Arbeitskreis für die Synthese der Polymerase Inhibitoren.

Der Firma Riemser Arzneimittel AG, Greifswald – Insel Riems, möchte ich ganz herzlich für die Anschubfinanzierung des Projektes danken. Ich möchte mich weiterhin beim BMBF (Förderkennzeichen 13N9062) für die Kofinanzierung dieser Arbeit bedanken.

Ich danke Herrn Professor Dr. Antonín Holý und Herrn Professor Dr. Ivan Votruba, Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Prag für die freundliche Einladung und Aufnahme in ihre Arbeitskreise. Ich danke ihnen für die wissenschaftliche Anleitung und die freundliche Überlassung der Phosphonate.

Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser danke ich sehr herzlich für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Für das zur Verfügung Stellen der SCC-25 Zellen danke ich Frau PD Dr. Kerstin Danker, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Campus Benjamin Franklin, für die Bereitstellung der HBMECs Herrn Professor Dr. Oliver Liesenfeld, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Campus Benjamin Franklin.

Danksagungen

Ich danke Herrn Dr. Eule, Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Knoblauch, Herrn Dr. Schildknecht sowie dem Ärzteteam des St. Josephs Krankenhaus für das Gewebematerial zur Zellgewinnung.

Ich danke folgenden Firmen für die freundliche Überlassung der Referenzsubstanzen: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Zalcitabin, Capecitabin); medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Wedel (Methotrexat, Dacarbazin, Doxorubicin); Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz (Diclofenac); Leo Pharmaceutical Products, Ballerup, Dänemark (Calcitriol).

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting und Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser danke ich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, das freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen gemeinsamen Unternehmungen.

Darüber hinaus gilt Hannelore Gonska mein Dank für die Hilfe bei der Isolierung und Kultivierung der Zellen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Melanie Schüppel und Herrn Karsten Zimmermann für die Gespräche, die täglichen Highlights und die zahlreichen schönen Unternehmungen.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei meiner Familie und Herrn Christian Braem für die wertvolle Unterstützung und den liebevollen Rückhalt während der gesamten Zeit bedanken.

Originalarbeiten

A. Richartz, M. Höltje, B. Brandt, M. Schäfer-Korting, H.-D. Höltje: Targeting human DNA polymerase α for the inhibition of keratinocyte proliferation. Part 1. Homology model, active site architecture and ligand binding. J Enzym Inhib Med Chem [im Druck]

Poster

A. Richartz, C. Schraut, S. Hammer, B. Kleuser, O. Liesenfeld, M. Schäfer-Korting: Anti-apoptotic effects of glucocorticoids are cell-type specific. DPhG-Jahrestagung Mainz, 2005

A. Richartz, A. Schwanke, M. Höltje, B. Dugovic, C. Murruzzu, H.-C. Korting, H.-U. Reißig, H.-D. Höltje, M. Schäfer-Korting: Development of DNA Polymerase alpha inhibitors for the topical treatment of actinic keratosis. Symposium „Drugs, Targets and Carriers“ Berlin, 2007

Vortrag

A. Richartz, M. Höltje, H.-D. Höltje, M. Schäfer-Korting: Vergleich verschiedener Methoden zur Testung der in-vitro Toxizität von Polymerase-Hemmern. DPhG Landesgruppe Berlin-Brandenburg - Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Berlin, 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 2 -
1.1. Aufbau der Haut	- 2 -
1.2. Aktinische Keratose, Plattenepithelkarzinom und Basaliom	- 4 -
1.3. Aktuelle Therapieformen	- 7 -
1.4. DNA Polymerase alpha in Abgrenzung zu anderen Polymerasen	- 9 -
1.4.1. Sequenzkonservierung und aktives Zentrum	- 10 -
1.4.2. Aufbau des Proteins	- 12 -
1.4.3. DNA Replikation durch die DNA Polymerase α	- 13 -
1.4.4. Regulation der DNA Replikation in Abhängigkeit vom Zellzyklus.	- 14 -
1.5. Hemmstoffe der DNA Polymerase alpha	- 14 -
1.5.1. Nukleotid-Analoga	- 15 -
1.5.2. nicht-nukleosidische Hemmstoffe	- 19 -
1.6. Ein- und Auswärtstransport von Nucleosiden und deren Analoga	- 22 -
1.6.1. Nucleosidtransporter	- 22 -
1.6.2. Auswärtstransporter organischer Anionen	- 23 -
1.7. Desoxynucleosidkinasen und Thymidinphosphorylase	- 25 -
1.7.1. Aktivierung von Nucleosiden	- 25 -
1.7.2. Aktivierung von Basen	- 26 -
1.8. Antiproliferative Wirkung von Calcitriol auch in Kombination mit Dexamethason	- 27 -
1.9. Fragestellung und Zielsetzung	- 28 -
2. Materialien und Methoden	- 32 -
2.1. Materialien	- 32 -
2.1.1. Geräte	- 32 -
2.1.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	- 33 -
2.1.3. Nährmedien und Lösungen	- 37 -
2.1.4. Lösungen für Experimente	- 39 -
2.1.5. Oligonucleotide	- 41 -
2.2. Methoden	- 42 -
2.2.1. Lösungen der Testsubstanzen	- 42 -
2.2.2. Gewinnung und Kultivierung von primären Hautzellen und Zelllinien	- 43 -
2.2.3. Viabilitätsuntersuchungen	- 45 -

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.	Untersuchungen zur Zellproliferation	- 46 -
2.2.5.	Untersuchungen zur Apoptose und Nekrose	- 47 -
2.2.6.	Zellzyklus-Untersuchungen	- 48 -
2.2.7.	Mikroskopische Untersuchung der Zellen	- 51 -
2.2.8.	Untersuchung der mRNA-Transkription	- 51 -
2.2.9.	HPLC Analytik des S1P Gehaltes in HBMEC	- 53 -
2.3.	Statistik	- 54 -
3.	Ergebnisse	- 56 -
3.1.	Auswahl der Referenzsubstanzen	- 56 -
3.1.1.	Aphidicolin	- 56 -
3.1.2.	Pharmaka mit Zulassung für die Aktinische Keratose	- 60 -
3.1.3.	Weitere Zytostatika	- 62 -
3.1.4.	Virusstatika	- 67 -
3.2.	Evaluierung der Testmethoden für die Zielzellen und der Zeitabhängigkeit der Stimulation	- 70 -
3.2.1.	Thymidin-Einbau	- 70 -
3.2.2.	MTT-Test	- 72 -
3.2.3.	Neutralrot-Aufnahme	- 72 -
3.2.4.	Zellzyklus-Analyse	- 75 -
3.3.	Charakterisierung der Keratinozyten: Prüfung der Expression relevanter Stoffwechsellzyme und Transporter	- 77 -
3.3.1.	Membranständige Nukleosid- und Nukleotidtransporter	- 77 -
3.3.2.	Nukleosid-Kinasen und Thymidinphosphorylase	- 79 -
3.4.	Testung mittels Molecular Modelling identifizierter Pol α Hemmer	- 81 -
3.4.1.	Wirkung auf Viabilität, Membranintegrität, Proliferation und Zellzyklus	- 81 -
3.4.2.	Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität	- 85 -
3.4.3.	Wirkungssteigerung durch Costimulation	- 86 -
3.5.	Alternative Angriffspunkte: Angiogenese-Hemmung	- 87 -
4.	Diskussion	- 92 -
4.1.	Auswahl der Referenzsubstanzen	- 93 -
4.1.1.	Eignung der Referenzsubstanzen	- 93 -
4.1.2.	Wirkung von Aphidicolin	- 94 -
4.2.	Evaluierung der Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Zytotoxizität	- 95 -
4.2.1.	Thymidin-Einbau/ Proliferation	- 95 -
4.2.2.	MTT-Test/ Viabilität	- 96 -
4.2.3.	NRU/ Membranintegrität	- 97 -

Inhaltsverzeichnis

4.2.4.	Zellzyklus-Analyse	- 97 -
4.2.5.	Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität	- 98 -
4.3.	Auswahl und Charakterisierung der Zellarten	- 99 -
4.3.1.	Expression von Transportern	- 99 -
4.3.2.	Expression von Enzymen des Nukleotidmetabolismus	- 101 -
4.4.	Testung mittels Molecular Modelling identifizierter Pol α Hemmer	- 102 -
4.4.1.	Zytotoxizität	- 102 -
4.4.2.	Zeitabhängigkeit	- 103 -
4.4.3.	Erhöhung der Zytotoxizität durch Costimulation	- 104 -
4.5.	Hemmung des Tumorwachstums durch Angiogenesehemmung	- 105 -
4.6.	Ausblick	- 106 -
5.	Zusammenfassung	- 110 -
6.	Literaturverzeichnis	- 115 -
7.	Anhang	- 124 -
7.1.	Konzentrations-Wirkungskurven	- 124 -
7.2.	Aktivierungswege und zelluläre Transporter der Testsubstanzen	- 126 -

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
5-PRP	5-Phosphoribosylphosphat
A549	Humane Lungenkarzinom Zelllinie
ABC	ATP-binding cassette transporter
AK	Aktinische Keratose
AML	Akute myeloische Leukämie
APH	Aphidicolin
Ara-C	Cytarabin
Asp	Aspartat
AZT	Azidothymidin (Zidovudin)
BCC	Basal cell carcinoma (Basaliom, Basalzellkarzinom)
bp	Basenpaare
BPE	Bovine Pituitary Extract (Rinderhypophysenextrakt)
BSA	Bovines Serum Albumin
BuPdA	Butylphenyldesoxyadenin
BuPdG	Butylphenyldesoxyguanosin
CAD	Caspase-3 aktivierte DNase
CdK	cyclin-dependent kinase (zyklinabhängige Kinase)
cDNA	copy DNA
CKI	CdK Inhibitor
CNT	Concentrative nucleoside transporter (konzentrationsabhängiger Nukleosidtransporter)
COX	Cyclooxygenase
cpm	Counts per minute / Zählrate
dC	Desoxycytidin
dCK	Desoxycytidinkinase
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEX	Dexamethason
dFdC	Gemcitabin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMS	N,N-Dimethyl-Sphingosin

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflußzytometrie)
F-Ara-dA	Fludarabin
FEN-1	flap endonuclease 1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FPGS	Folylpolylglutaminsynthetase
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GSH	Glutathion
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HaCaT	Human adult keratinocytes kept under low Calcium and elevated temperature (humane, spontan transformierte Keratinozyten Zelllinie)
HBMEC	Human brain microvascular endothelial cell (humane mikrovaskuläre Gehirnendothelzelllinie)
hEGF	Human epidermal growth factor (humaner epithelialer Wachstumsfaktor)
HeLa	Humane Zervixkarzinom Zelllinie (von Henrietta Lacks)
hENT	human equilibrative nucleoside transporter (humaner Gleichgewichtsnukleosidtransporter)
HL-60	Humane akute myeloische Leukämie Zelllinie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (humane Nabelschnurvenen Endothelzelllinie)

Abkürzungsverzeichnis

I.U.	International Unit (internationale Einheit)
ICAD	Inhibitor der Caspase-3 aktivierten DNase
iDNA	initiator DNA
IL	Interleukin
KBM	Keratinocytenbasalmedium
Kc	Keratinocyten
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KGM	Keratinocyte growth medium (Keratinocytenwachstumsmedium)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knock-out
L1210	Maus Leukämie Zelllinie
MCF-7	Mammary carcinoma F-7 cell line (Humane Brustkrebszelllinie)
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug resistance protein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBMPR	Nitrobenzylthioinosin (Nitrobenzylmercaptopurine riboside)
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
NUGC-3	Humane Magenkarzinom Zelllinie
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMEA	Phosphonomethoxyethyladenin
PMEDAP	Phosphonomethoxy-2,6-diaminopurin

Abkürzungsverzeichnis

PMEG	Phosphonomethoxyethylguanin
Pol	Polymerase
pRB	Retinoblastoma Protein
RDR	Ribonukleotid Reduktase
Rfc-1	Reduced folate carrier (Transporter reduzierter Folsäure)
RF-C	replication factor C (Replikationsfaktor C)
RNA	Ribonukleinsäure
RP-A	replication protein A (Replikationsprotein A)
rpm	rotation per minute
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
S1P	D-erythro-Sphingosin-1-phosphat
SCC	Squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom, alte Bez.: Stachelzellkarzinom)
SCC VII / SF	Murine orale Plattenepithelkarzinom Zelllinie aus C3H Mäusen
siRNA	small interfering RNA
SphK	Sphingosinkinase
SSC	Sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
SV40	Simian virus
TBE	Tris, Borat, EDTA
TDEC	Tumor derived endothelial cell (Tumorentstammende Endothelzellen)
TK	Thymidinkinase
TLR	toll-like Rezeptor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNM	Tumor Nodal (Lymphknoten) Metastasen
TP	Thymidinphosphorylase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultra violett
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer Endothelwachstumsfaktor)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)