

Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Auswahl der Referenzsubstanzen

Pol α ist ein vielversprechendes Target zur Therapie der Aktinischen Keratose. Das Enzym katalysiert die ersten Schritte der de-novo DNA Synthese, so dass eine Inhibition effektiv das Tumorwachstum hemmen sollte. Mit Hilfe des Molecular Modellings wurden Pol α Inhibitoren entwickelt. Um diese in ihrer zytotoxischen Wirkung einschätzen zu können, galt es zunächst Referenzsubstanzen zu definieren. Die Vorauswahl der Referenzsubstanzen umschloss eine breite Palette von Substanzen, die entweder zur Krebstherapie eingesetzt werden, Standardtherapeutika der Aktinischen Keratose oder Inhibitoren der Pol α sind. Einige dieser Substanzen, insbesondere Phosphonsäureester wurden zudem vor oder parallel zu in-vitro Versuchen in Moleküldynamik-Simulationen am aktiven Zentrum der Pol α hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität und Bindungsenergien charakterisiert. Die Ergebnisse des Molecular Modellings sollten experimentell überprüft werden. Durch Vorversuche an Zellkulturen wurde die Auswahl der Referenzsubstanzen eingeschränkt. Alle untersuchten Substanzen werden im Folgenden vorgestellt.

3.1.1. Aphidicolin

Aphidicolin ist ein Inhibitor der replikativen DNA Polymerasen α , δ und ϵ . Die Substanz dient vielfach, wie auch in dieser Arbeit, als wichtiger Standard zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung auf die Pol α .

Aphidicolin hemmte nach 72 Stunden Stimulation die Proliferation primärer Keratinozyten und HaCaT-Zellen vollständig (Abb. 3.1.1 A) mit IC_{50} -Werten von 10^{-7} M. SCC-25 Zellen reagierten weniger sensitiv (IC_{50} : 4×10^{-7} M; Max. Hemmung: 50 %). Weiterhin wurde die Wirkung auf die Viabilität (Abb. 3.1.1 B) und Membranintegrität (Abb. 3.1.1 C) der drei Zellarten nach 48 Stunden Stimulation mit Aphidicolin untersucht. Keratinozyten reagierten in beiden Versuchen wenig, insbesondere war keine membranschädigende Wirkung nachzuweisen. HaCaT-

3. Ergebnisse

Zellen reagierten am stärksten mit IC_{50} -Werten von 5×10^{-7} M (MTT) bzw. 2×10^{-7} M (NR). Die maximale Hemmwirkung war besonders im MTT-Test höher als in SCC-25 Zellen (86 % vs. 62 %).

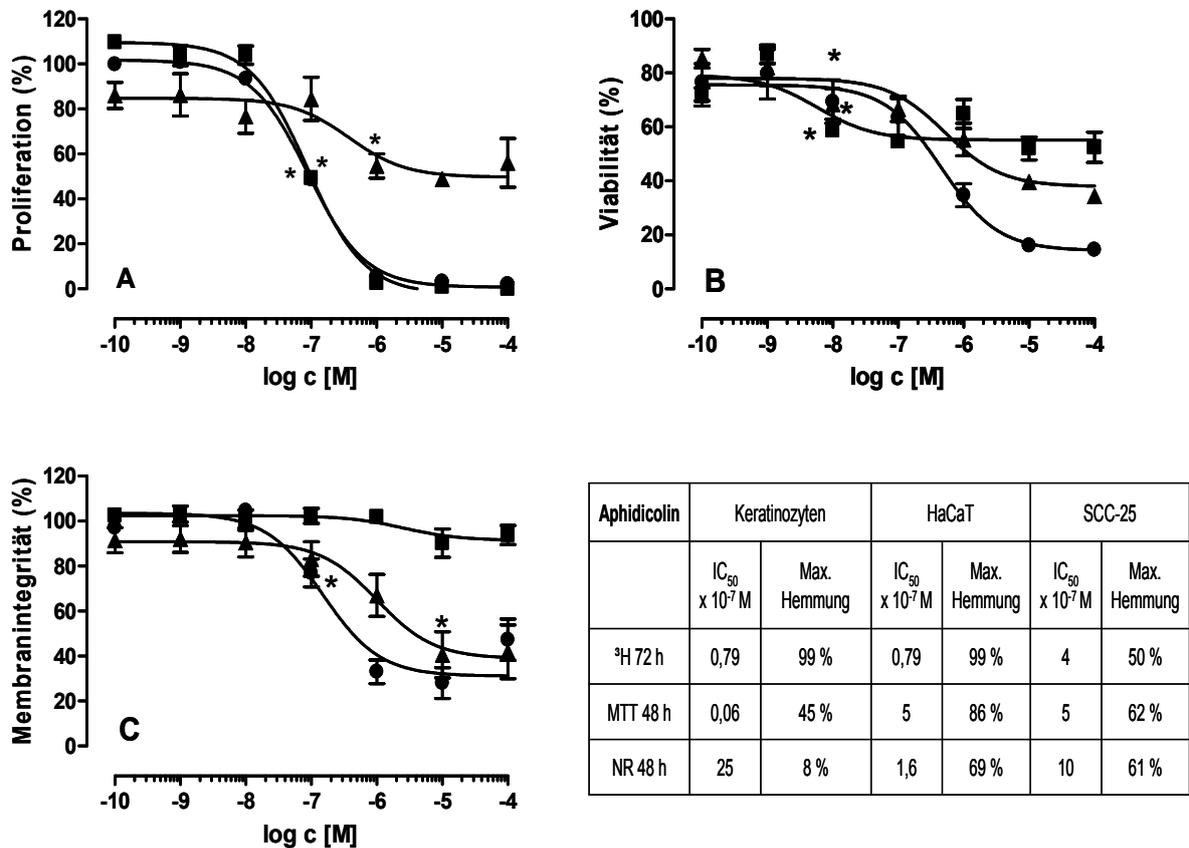


Abb. 3.1.1 Thymidin-Einbau (A, 72 h), MTT-Test (B, 48 h) und Neutralrot-Aufnahme (C, 48 h) nach Stimulation mit Aphidicolin bei primären Keratinozyten (■), HaCaT-Zellen (●) und SCC-25 Zellen (▲), * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle; tabellarische Darstellung der IC_{50} -Werte und der maximalen Hemmung

HaCaT-Zellen reagierten in allen drei Testsystemen am stärksten, wobei die proliferationshemmende Wirkung auf die sich schnell teilende Zelllinie besonders stark ausgeprägt war, dagegen waren die Wirkungen auf Viabilität und Membranintegrität etwas schwächer. Primäre Keratinozyten wurden ebenso stark wie die spontan transformierte Zelllinie in ihrer Proliferation gehemmt, allerdings waren keine Membranschäden nachzuweisen. Die Hemmung der Viabilität betrug maximal 45 %. SCC-25 Zellen teilen sich sehr langsam. Im Gegensatz zu HaCaT-Zellen war hier der proliferationshemmende Effekt nicht am stärksten ausgeprägt,

3. Ergebnisse

sondern ähnelte vielmehr der Wirkstärke in den anderen Testsystemen. Bei SCC-25 Zellen wurde maximal eine 50 %ige Hemmung der Proliferation erreicht (IC_{50} : 4×10^{-7} M). Viabilität und Membranintegrität nahmen maximal auf 60 % ab (IC_{50} : 5×10^{-7} M bzw. 10^{-6} M).

In weiteren Untersuchungen bei allen drei Zellarten wurde die Apoptose- und Nekroserate nach 24 Stunden Stimulation mit Aphidicolin gemessen (Abb. 3.1.2). Erst eine Konzentration die eine maximale Hemmung der Proliferation auslöste, d.h. 10^{-6} M bei primären Keratinozyten, 10^{-5} M bei HaCaT-Zellen und 10^{-4} M bei SCC-25 Zellen, erhöhte bei normalen und transformierten Keratinozyten signifikant die Apoptose- und Nekroserate. Bei SCC-25 Zellen gab es keine signifikante Zunahme gegenüber der Kontrolle.

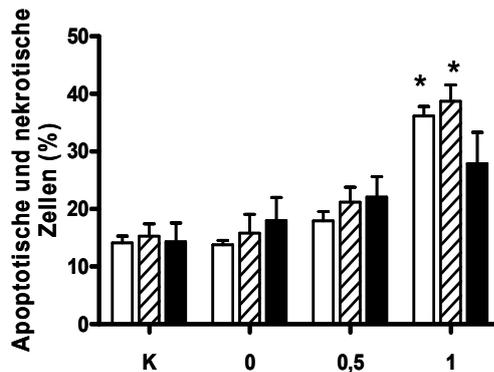


Abb. 3.1.2 Durchflußzytometrische Untersuchung der Apoptose- und Nekroserate nach 24 h Stimulation mit Aphidicolin bei primären Keratinozyten (offene Säulen), HaCaT-Zellen (gestreifte Säulen) und SCC-25 Zellen (geschlossene Säulen) bei Konzentrationen, die jeweils keine (0), halbmaximale (0,5) oder maximale (1) Hemmung der Proliferation bewirkten; (* $p \leq 0,05$ gegenüber K = Kontrolle)

Mechanismus der Aphidicolin-induzierten Pol α Hemmung

Bis heute herrscht in der Literatur Uneinigkeit über den Mechanismus der Pol α Hemmung durch Aphidicolin. Eine kompetitive Hemmung direkt am Bindungszentrum der Nukleotide sowie eine nicht-kompetitive Hemmung an einer benachbarten Bindungsstelle werden gleichermaßen diskutiert. Eine kompetitive Hemmung konnte in Bezug auf dCTP gezeigt werden.

An HaCaT-Zellen sollte nun untersucht werden, ob diese Hemmung nicht nur am isolierten Enzym, sondern auch in der Zellkultur nachgewiesen werden kann. Dazu

3. Ergebnisse

wurde Aphidicolin in einer Konzentration eingesetzt, die 50 % Hemmung der Proliferation bewirkte (10^{-7} M). Die Zellen wurden mit Deoxycytidin (dC) in steigender Konzentration 24 Stunden vorinkubiert, damit es intrazellulär in dCTP umgewandelt werden konnte. Die Stimulation mit Aphidicolin erfolgte über 24 oder 48 Stunden.

Aphidicolin (10^{-7} M) hemmte die Proliferation zu ca. 40 %, der Effekt wurde durch Präinkubation mit dC 10^{-5} M bzw. $10^{-5,5}$ M aufgehoben (Abb. 3.1.3 A). Allerdings wirkte dC alleine bei diesen Konzentrationen schwach proliferationsfördernd (Abb. 3.1.3 B). dC 10^{-4} M wirkte stark hyperproliferativ. Dieser Effekt wurde durch Aphidicolin 10^{-7} M nicht aufgehoben.

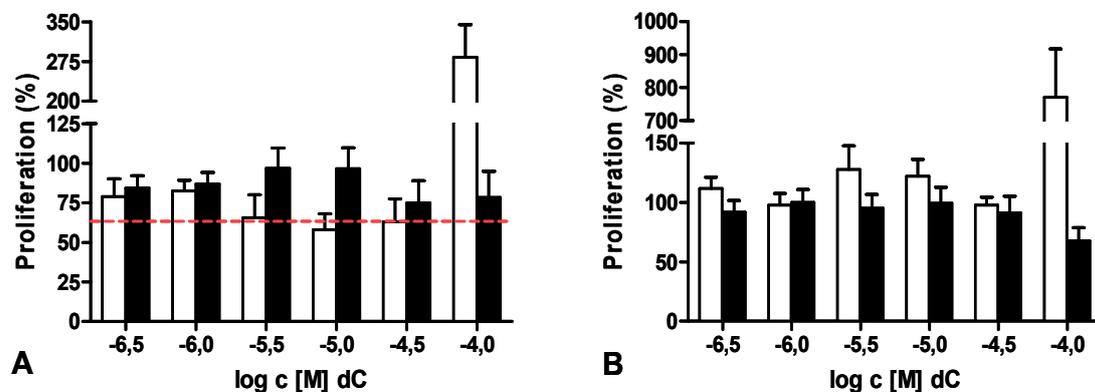


Abb. 3.1.3 **A:** Proliferation nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit Aphidicolin 10^{-7} M für 24 h (offene Säulen) oder 48 h (geschlossene Säulen) nach jeweils 24 h Präinkubation mit dC in den angegebenen Konzentrationen. Die rote Linie zeigt die Wirkung von Aphidicolin 10^{-7} M. **B:** Proliferation von HaCaT-Zellen nach Stimulation mit dC in entsprechenden Konzentrationen nach 48 h (offene Säulen) oder 72 h (geschlossene Säulen).

Als nächstes sollte der Effekt von dC 10^{-5} M bzw. $10^{-5,5}$ M anhand einer höheren Konzentration verifiziert werden. Bei der geringen Hemmung durch Aphidicolin 10^{-7} M könnte der hyperproliferative Effekt von dC eine Aufhebung der Aphidicolin-Wirkung vortäuschen. Dazu wurde der Versuch mit Aphidicolin 10^{-6} M wiederholt (Abb. 3.1.4).

3. Ergebnisse

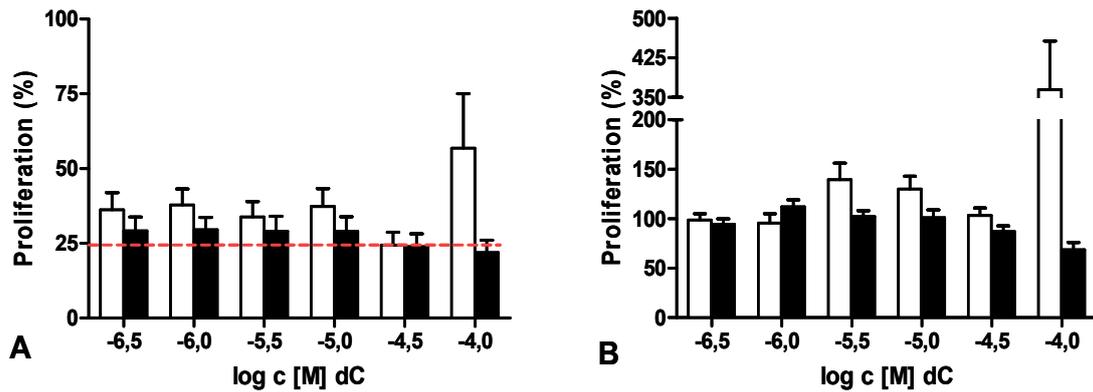


Abb. 3.1.4 **A:** Proliferation von HaCaT-Zellen nach Stimulation mit Aphidicolin 10^{-6} M für 24 h (offene Säulen) oder 48 h (geschlossene Säulen) nach Präinkubation mit dC in den angegebenen Konzentrationen für 24 h. Die rote Linie stellt die Wirkung von Aphidicolin dar. **B:** Proliferation von HaCaT-Zellen nach Stimulation mit dC nach 48 h (offene Säulen) bzw. 72 h (geschlossene Säulen).

Aphidicolin 10^{-6} M bewirkt eine ca. 75 %ige Hemmung der Proliferation. Der Effekt kann durch dC nicht aufgehoben werden. Der starke Anstieg der Proliferation in Gegenwart von dC 10^{-4} M war auf eine dC-eigene proliferationsfördernde Wirkung, nicht auf eine Aufhebung der Aphidicolin Wirkung zurückzuführen. Auch weitere Versuche mit Stimulationszeiten von 72 Stunden für Aphidicolin und 48 Stunden für dC lieferten keine aussagekräftigen Ergebnisse. Insgesamt ließen sich mit dCTP-Konzentrationen, die die von Aphidicolin um das 100fache überstiegen, die zytotoxische Wirkung von Aphidicolin in HaCaT-Zellen nicht aufheben.

3.1.2. Pharmaka mit Zulassung für die Aktinische Keratose

5-Fluorouracil (5-FU). 5-FU ist Standardtherapeutikum zur Therapie ausgedehnter Aktinischer Keratosen. Angewendet wird es in Form einer 5 %igen Creme. 5-FU hemmt die Thymidilatsynthase und verhindert so die de-novo Pyrimidinsynthese. Durch eine Entleerung des intrazellulären Thymidinpools nimmt die Proliferation ab. Darüber hinaus kann 5-FU auch als falscher Baustein in die DNA und v.a. die RNA eingebaut werden, sowie in der S-Phase des Zellzykluses eingreifen.

3. Ergebnisse

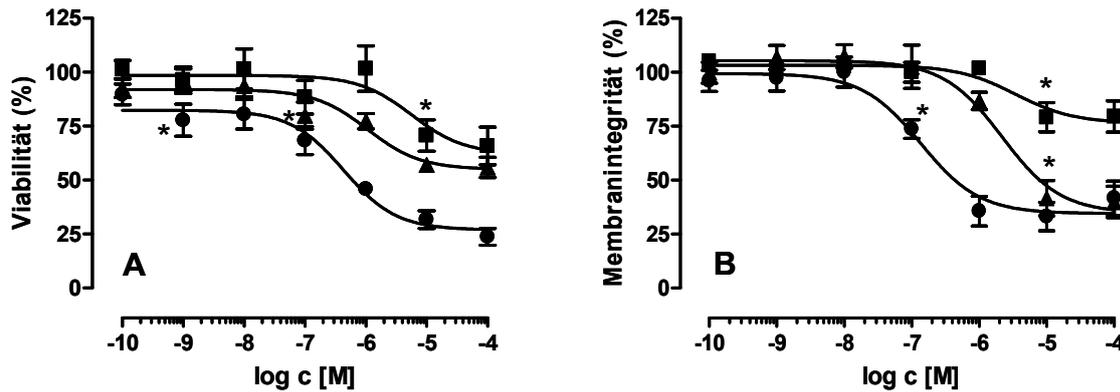


Abb. 3.1.5 MTT-Test (A) und Neutralrot-Aufnahme (B) nach 48 h Stimulation mit 5-FU in primären Keratinozyten (■), HaCaT-Zellen (●) und SCC-25 Zellen (▲); * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle

| 5-FU | Keratinozyten | | HaCaT | | SCC-25 | |
|----------|--|-----------------|--|-----------------|--|-----------------|
| | IC ₅₀ x 10 ⁻⁷ M | Max. Hemmung | IC ₅₀ x 10 ⁻⁷ M | Max. Hemmung | IC ₅₀ x 10 ⁻⁷ M | Max. Hemmung |
| MTT 48 h | 56,3 | 36 % | 4,3 | 73 % | 10,7 | 45 % |
| NR 48 h | 34,6 | 23 % | 1,4 | 65 % | 21,9 | 64 % |

Tab 3.1.1 IC₅₀-Werte x 10⁻⁷ M und maximale Hemmung (bei 10⁻⁴ M) in MTT-Test und NR-Aufnahme nach 48 h Stimulation mit 5-FU bei primären Keratinozyten, HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen

Die zytotoxische Wirkung von 5-FU auf primäre Keratinozyten, HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen wurde im MTT-Test und mittels Neutralrot (NR)-Aufnahme gemessen (Abb. 3.1.5, Tab 3.1.1). HaCaT-Zellen erwiesen sich in beiden Tests als besonders empfindlich, die IC₅₀-Werten lagen bei ca. 10⁻⁷ M. Primäre Keratinozyten reagierten wenig (IC₅₀-Werte 5 x 10⁻⁶ M, maximale Hemmung 35 % (MTT) bzw. 20 % (NR)). SCC-25 Zellen sprachen etwas stärker auf die Stimulation an als primäre Keratinozyten. Bei der Neutralrot-Aufnahme betrug die maximale Hemmung von SCC-25 und HaCaT-Zellen 65 %, allerdings war dafür bei SCC-25 Zellen eine 10fach höhere Konzentration erforderlich als bei HaCaT-Zellen (10⁻⁵ M vs. 10⁻⁶ M).

Diclofenac. Diclofenac ist ein Hemmer der Cyclooxygenase (COX) und wird in Form einer 3 %igen Zubereitung in einem 2,5 %igen Hyaluronsäuregel bei Aktinischer Keratose eingesetzt. Durch UVB-Strahlung steigt der COX-2-Gehalt von

3. Ergebnisse

Keratinozyten. Im Gegensatz zu Basalzellkarzinomzellen wurde in Zellen des Plattenepithelkarzinoms eine Erhöhung der COX-2 nachgewiesen (Vogt et al., 2001). Neben der COX-2 hemmenden Wirkung von Diclofenac tragen COX-unabhängige Signalwege zur Induktion der Apoptose, Hemmung der Angiogenese und zur Immunmodulation bei.

Die Hyaluronsäure dient der Penetrationsverbesserung, ist also in Zellexperimenten nicht notwendig, so dass die Versuche nur mit Diclofenac durchgeführt wurden.

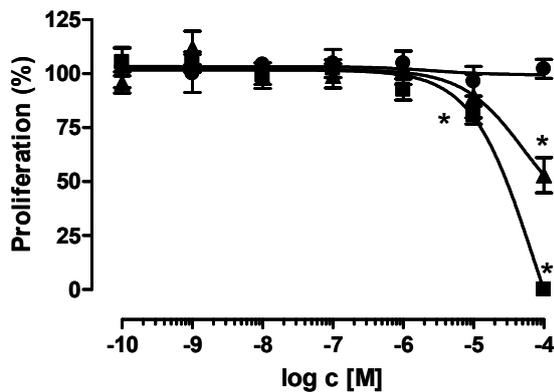


Abb. 3.1.6 Thymidin-Einbau nach 72 h Stimulation mit Diclofenac bei primären Keratinozyten (■), HaCaT-Zellen (●) und SCC-25 Zellen (▲), * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle

Die proliferationshemmende Wirkung von Diclofenac auf primäre Zellen (max. Hemmung 100 %, IC_{50} : $6,3 \times 10^{-5}$ M) übertraf die Wirkung auf SCC-25 Zellen (max. Hemmung 47 %, IC_{50} : 5×10^{-5} M). HaCaT-Zellen reagierten selbst in der höchsten untersuchten Konzentration nicht (Abb. 3.1.6).

3.1.3. Weitere Zytostatika

Methotrexat (MTX). MTX ist ein Analogon der Folsäure und inhibiert die Dihydrofolsäure-Reduktase (DHFR). Dadurch kommt es zu einem Mangel an Tetrahydrofolsäure (THF) und in der Folge zu einer Hemmung der de-novo Thymidin-Synthese. THF liefert den C1-Baustein zur Umwandlung von dUMP in dTMP durch die Thymidilatsynthase. In niedriger Dosierung wirkt der Antimetabolit anti-inflammatorisch, in höheren Dosierungen hemmt es auch die Zellteilung. MTX wird zur Tumorthherapie, selten beim Plattenepithelkarzinom, und bei schweren Formen der Psoriasis eingesetzt. Weiterhin wird es selten und nur in Kombination mit

3. Ergebnisse

anderen Chemotherapeutika und Strahlentherapie zur Therapie des Basalzellkarzinoms angewendet (Taguchi et al., 2006). Eine lokale Therapie ist mit MTX nicht möglich.

MTX übt seinen proliferationshemmenden Effekt durch die Entleerung des intrazellulären dTMP Pools aus. Die gleichzeitige Gabe von Thymidin hebt diesen Effekt auf (Schwartz et al., 1992; Schwartz et al., 1995), dagegen ist bei einer 24 Stunden verzögerten Gabe die Proliferationshemmung nicht mehr aufzuheben. Es kommt zu einem irreversiblen Zellarrest, der zur Differenzierung der Zellen führt. Die Zellen sind nach wie vor viabel, was durch Neutralrot-Aufnahme Tests bestätigt wurde. Als Ausmaß der proliferationshemmenden Wirkung von MTX auf primäre Keratinozyten wird einerseits eine Hemmung von > 75 % bei 10^{-6} M (Schwartz et al., 1995), andererseits eine IC_{50} bei $> 10^{-3}$ M (Firestone et al., 1990) beschrieben.

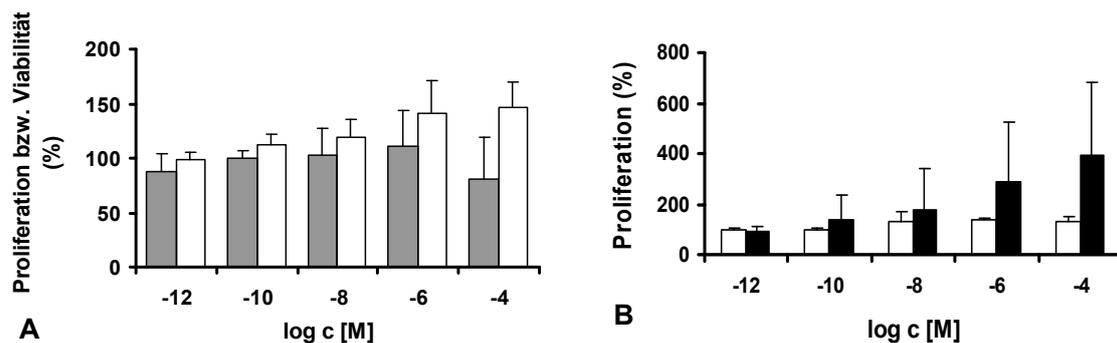


Abb. 3.1.7 **A:** Thymidin-Einbau (offene Säulen) und MTT-Test (graue Säulen) bei primären Keratinozyten nach Stimulation mit MTX (48 h oder 72 h, Vorversuche) **B:** Thymidin-Zugabe zum Zeitpunkt 0 (offene Säulen) oder 24 (geschlossene Säulen) der Stimulation

In den Vorversuchen dieser Arbeit konnte im MTT-Test nur eine schwache zytotoxische Wirkung von MTX auf primäre Keratinozyten bei 10^{-4} M festgestellt werden. Im Gegensatz dazu nahm der Einbau von radioaktivmarkiertem Thymidin zu (Abb. 3.1.7 A). Dies kann mit einer zunehmenden Hemmung der de-novo Thymidin Synthese erklärt werden, wodurch die Zellen vermehrt das extrazellulär angebotene Thymidin einbauen. Entsprechend war der Effekt noch größer, wenn Thymidin nicht zeitgleich mit MTX zugesetzt wurde, sondern 24 Stunden verzögert (Abb. 3.1.7 B).

3. Ergebnisse

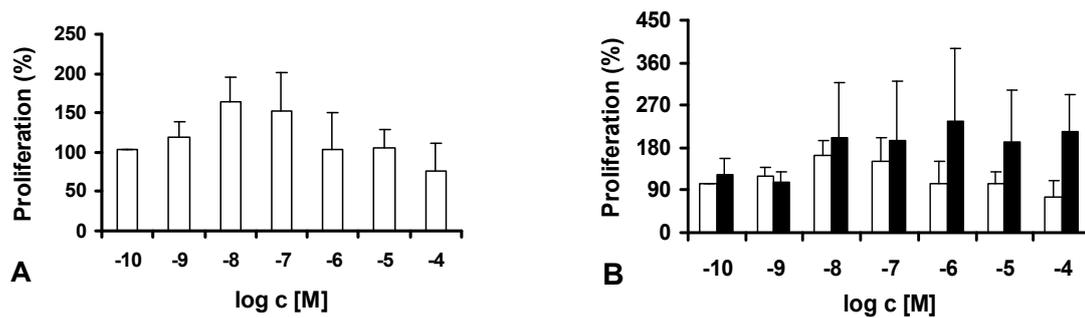


Abb. 3.1.8 **A:** Thymidin-Einbau bei SCC-25 Zellen (offene Säulen) und **B:** im Vergleich zu primären Keratinozyten (geschlossene Säulen) nach 72 h Stimulation mit MTX (Vorversuche)

Im Vergleich zu primären Keratinozyten ($IC_{50} > 10^{-3}$ M) sprechen SCC-25 Zellen ($IC_{50} 2 \times 10^{-8}$ M) deutlich stärker auf MTX-Stimulation an (Firestone et al., 1990; Jeffes et al., 1995) und diese Wirkung konnte auch durch Thymidin-Zusatz nicht aufgehoben werden (Lee et al., 1991). Daraus leiteten die Autoren ab, dass SCC-25 Zellen die Fähigkeit, den Salvage Pathway zu nutzen, verloren haben könnten. Andere wirkungsverringende Eigenschaften der Zellen, wie z.B. verminderte Wirkstoffaufnahme oder erhöhte DHFR Aktivität wurden zuvor experimentell ausgeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten SCC-25 Zellen die höchste Thymidin-Einbaurrate bei 10^{-8} M (Abb. 3.1.8 A). Unter der Voraussetzung, dass die Hemmung der DHFR mit der Einbaurrate von $[^3H]$ -Thymidin korreliert werden kann, entsprechen die Ergebnisse den oben zitierten Daten. Allerdings war die Einbaurrate in primären Keratinozyten, die ebenfalls für die letzten 24 Stunden einer 72 stündigen Stimulation Thymidin zugesetzt bekamen, höher (Abb. 3.1.8 B). Der Maximalwert lag bei 10^{-6} M. Untersuchungen von Jeffes (Jeffes et al., 1995) zeigten, dass auch Lymphozyten empfindlicher auf eine MTX Stimulation reagieren als gesunde epidermale Zellen. Möglicherweise wird die Wirkung von MTX auf hyperproliferative Hauterkrankungen nicht durch eine direkte Wirkung auf die epidermalen Zellen, sondern indirekt über aktivierte Immunzellen ausgeübt. Für diese These spricht auch, dass nur eine systemische Gabe, nicht aber eine lokale Anwendung wirksam ist.

Die Vorversuche zeigten, dass MTX als Referenzsubstanz nicht geeignet ist, so dass es nicht weiter untersucht wurde.

3. Ergebnisse

Dacarbazin (DTIC). DTIC gilt als Goldstandard zur Therapie des metastasierenden Melanoms mit einer Ansprechrate von 15 - 20% (Lev et al., 2003). DTIC ist ein nichtklassisches Alkylanz, das in-vivo nach hepatischer Aktivierung zu MTIC Nukleinsäuren alkyliert oder direkt DNA Schäden verursacht.

In-vitro kann die hepatische Aktivierung durch Aktivierung mit weißem Licht nachgeahmt werden (Metelmann and Von Hoff, 1983). Auch ohne Lichtaktivierung konnte die Induktion von Apoptose in Melanomzellen gezeigt werden (Shibuya et al., 2003). In den vorliegenden Versuchen wurde die Substanz nicht vorbehandelt.

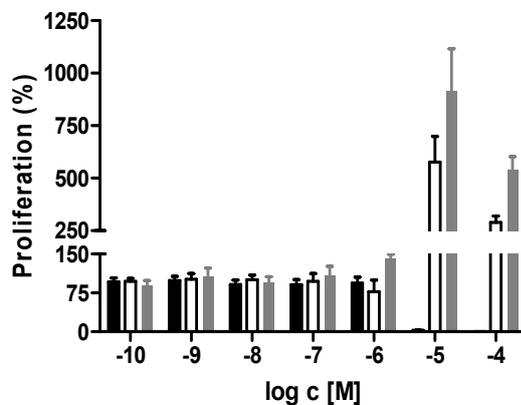


Abb. 3.1.9 Thymidin-Einbau nach 72 h Stimulation mit Dacarbazin bei primäre Keratinozyten (geschlossene Säulen), HaCaT-Zellen (offene Säulen) und SCC-25 Zellen (graue Säulen)

Dacarbazin 10^{-5} M wirkt auf primäre Keratinozyten stark proliferationshemmend. Dagegen kommt es bei HaCaT-Zellen bei 10^{-6} M zunächst zu einer schwachen Reduktion des Thymidin-Einbaus, bei 10^{-5} M jedoch zu einem sehr starken Anstieg. Bei SCC-25 Zellen ist dieser Anstieg noch stärker ausgeprägt. Das Maximum liegt ebenfalls bei 10^{-5} M, jedoch ohne vorherige Reduktion (Abb. 3.1.9).

Diese Ergebnisse entsprechen Untersuchungen in denen Melanozyten durch wiederholte Behandlung mit hohen Konzentrationen Dacarbazin (2,75 μ M bis 5,5 μ M) resistent gemacht wurden. Nach Einpflanzung in Mäuse zeigten diese Zellen ein aggressiveres Tumorwachstum und ein höheres Metastasierungspotential (Lev et al., 2004). Eine Resistenz von Krebszellen gegen Dacarbazin kann auch durch eine erhöhte Expression von O⁶-Alkylguanin-DNA-Transferase (AGT) verursacht werden, die das toxische Hauptprodukt der Akylierung O⁶-Alkylguanin abbaut (Gerson, 2002).

3. Ergebnisse

Die Ursache für die fehlende Hemmung von HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen durch Dacarbazin wurde nicht geklärt, führte aber zum Ausschluss der Substanz von weiteren Untersuchungen.

Capecitabin (CAP, Xeloda®). Capecitabin ist ein Prodrug von 5-FU, das oral verabreicht werden kann und v.a. zur Therapie des metastasierenden Kolorektalkarzinoms eingesetzt wird. Die dreischrittige Aktivierung erfolgt in der Leber bzw. der letzte Schritt bevorzugt in Dickdarmzellen, die eine hohe Thymidinphosphorylase (TP) Aktivität aufweisen (Abb. 3.1.10). Da auch Keratinozyten eine hohe TP-Aktivität aufweisen, sollte die Aktivierung auch in der Epidermis möglich sein.

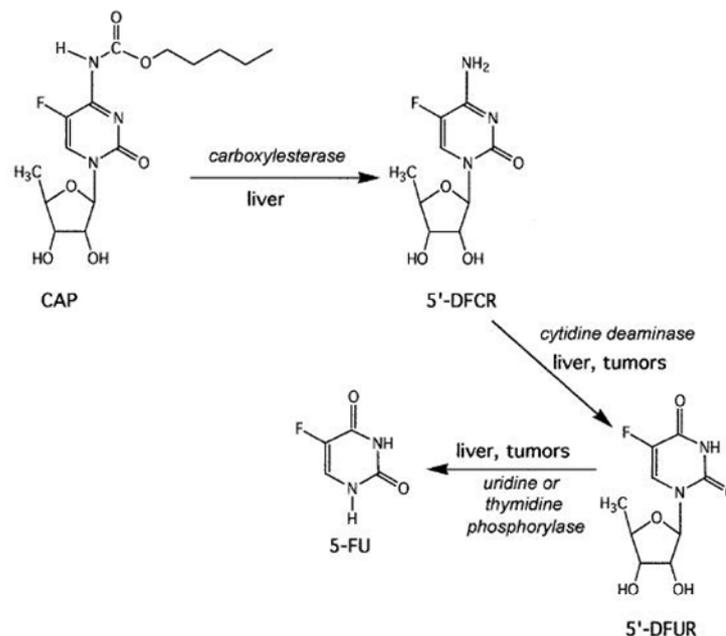


Abb. 3.1.10 Zelltypspezifische metabolische Aktivierung von Capecitabin zu 5-FU (nach (Desmoulin et al., 2002))

Im MTT-Test war die hemmende Wirkung nur gering ausgeprägt (nicht dargestellt). Da Capecitabin bei Testung an Monolayerkulturen keinen erkennbaren Vorteil gegenüber 5-FU aufwies, wurde die Substanz in weiteren Versuchen nicht berücksichtigt.

3. Ergebnisse

Doxorubicin (DOX, Adriamycin, Hydroxydaunorubicin). Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthracycline. Es interkaliert in die DNA, führt zum Strangbruch und stabilisiert gleichzeitig den Komplex mit der Topoisomerase II, so dass auch die Entspiralisierung des DNA-Stranges für die Transkription verhindert wird. DOX wird zur Therapie von Sarkomen und vielen Tumoren, z.B. dem Mammakarzinom, eingesetzt.

Doxorubicin wirkt auf primäre Keratinozyten, HaCaT- und SCC-25 Zellen gleichermaßen zytotoxisch mit IC_{50} Werten bei ca. 10^{-7} M (Abb. 3.1.11). Es ist als Referenz für eine toxische Wirkung geeignet. Der Nachteil besteht in der fehlenden Differenzierung der Wirkung zwischen primären und transformierten Keratinozyten.

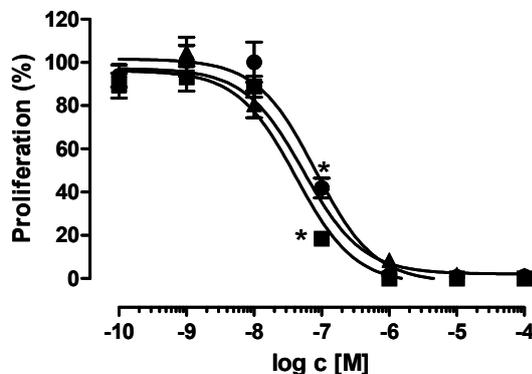


Abb. 3.1.11 Thymidin-Einbau nach 72 h Stimulation mit Doxorubicin bei primären Keratinozyten (■), HaCaT-Zellen (●) und SCC-25 Zellen (▲); die Proliferation bei 10^{-7} M in SCC-25 Zellen ist grafisch nicht dargestellt, * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle

3.1.4. Virusstatika

Zalcitabin (ddC, Hivid®). Zalcitabin ist ein Inhibitor der viralen Reversen Transkriptase. Nach Einbau in den wachsenden DNA-Strang führt es aufgrund der fehlenden 3'-OH Gruppe zum Kettenabbruch. Auch humane Polymerasen wie die DNA Polymerasen α , β und γ erkennen antivirale Nukleosidtriphosphat-Analoga und bauen diese in den wachsenden DNA-Strang ein (Cihlar and Chen, 1997). Allerdings ist die humane Pol α gegenüber Zalcitabin wenig empfindlich. Die Einbaurrate liegt im Vergleich zu dCTP bei 0,1 %. Die schwache Hemmwirkung der 2',3'-Didesoxynukleotide auf die Pol α wird mit einer fehlenden Wasserstoffbrückenbindung ausgehend von der 3'-OH Gruppe erklärt. In

3. Ergebnisse

Moleküldynamik-Simulationen konnte stellvertretend für die ddNTPs eine höhere Torsionsenergie von ddTTP als von dTTP gezeigt werden [Richartz et al., im Druck]. Auch in der höchsten getesteten Konzentration (10^{-4} M) zeigte Zalcitabin im MTT-Test bei primären Keratinozyten nur eine sehr geringe zytotoxische Wirkung (nicht dargestellt). In Gegenwart von Thymidin wurde, wie auch von Balzarini et al., (2002) beschrieben, kein wachstumshemmender Effekt auf Keratinozyten festgestellt. Die Substanz wurde in folgenden Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

Phosphonomethoxyethyl-Derivate (PMEA, PMEDAP, PMEG)

Phosphonomethoxyethyl-Derivate sind Nukleotid-Analoga, die eine metabolisch stabile Phosphor-Kohlenstoff Bindung besitzen. Die Diphosphate dieser Substanzen führen zum DNA Kettenabbruch, nachdem sie durch eine Polymerase in den wachsenden DNA-Strang eingebaut wurden. Die Substanzen wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Holý, Akademie der Wissenschaften, Prag synthetisiert und für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

In Moleküldynamik-Simulationen wurde PMEA (Adefovir) exemplarisch für diese Substanzklasse untersucht. PMEA kann gut molekulare Interaktionen mit dem Enzym eingehen. Aufgrund der azyklischen Seitenkette sind zwar keine Wasserstoffbrücken wie bei den natürlichen Nukleotiden möglich, allerdings ermöglicht die hohe Flexibilität dieser Seitenkette die Bildung einer Konformation, die für die Interaktion mit dem aktiven Zentrum des Enzyms erforderlich ist [Richartz et al., im Druck].

Während die Diphosphate für die Testung am isolierten Enzym erforderlich sind, werden für Untersuchungen an der Zellkultur die nicht phosphorylierten Phosphonate benötigt. Neben PMEA wurden auch PMEDAP und PMEG hinsichtlich ihrer Wirkung auf Proliferation und Viabilität von primären und transformierten Keratinozyten untersucht (Abb. 3.1.12).

3. Ergebnisse

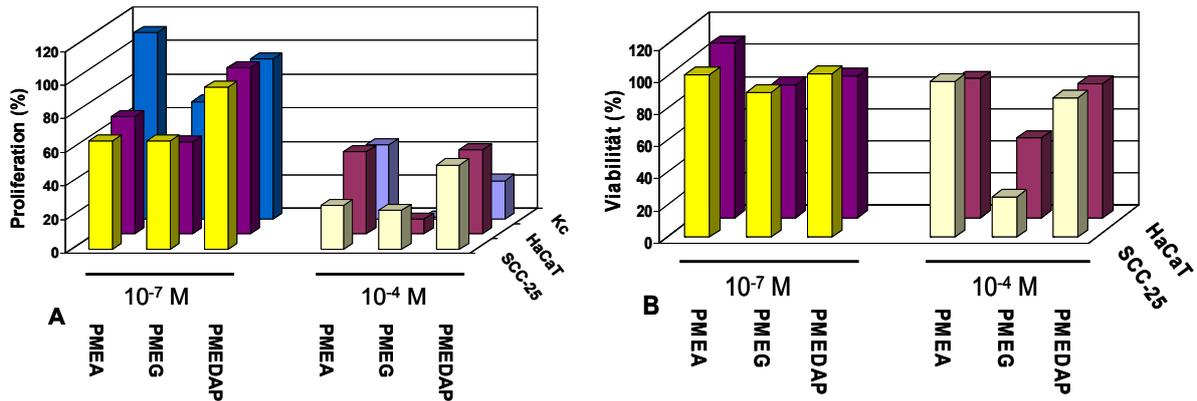


Abb. 3.1.12 Thymidin-Einbau (A) und MTT-Test (B) nach 48 h Stimulation mit PMEA, PMEG und PMEDAP. Proliferationsrate und Viabilität sind exemplarisch für die Konzentrationen 10⁻⁷ M und 10⁻⁴ M dargestellt, im Anhang (Abb. 7.1.1) finden sich die vollständigen Konzentrations-Wirkungskurven.

| | Keratinocyten | | HaCaT | | SCC-25 | |
|--------|----------------|-----|----------------|------------|----------------|------------|
| | ³ H | MTT | ³ H | MTT | ³ H | MTT |
| PMEA | 250 / 57 % | --- | 79 / 50 % | 25 / 17 % | 16 / 71 % | 13 / 4 % |
| PMEDAP | 100 / 77% | --- | 790 / 48 % | 0,6 / 10 % | 100 / 50 % | 20 / 13 % |
| PMEG | 2,5 / 96 % | --- | 1,3 / 84 % | 39 / 76 % | 7,9 / 73 % | 100 / 47 % |

Tab. 3.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse (IC₅₀ Werte (x 10⁻⁷M) / Maximale Hemmung) von Thymidin-Einbau (³H) und MTT-Test nach Stimulation mit PMEA, PMEDAP und PMEG bei primären Keratinocyten, HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen.

PMEG hemmte von diesen drei Substanzen die Proliferation am stärksten, eine Zelltypselektivität war nicht zu erkennen (IC₅₀: ca. 10⁻⁷ M, Abb. 3.2.1 A). Einzig die maximale Hemmung von PMEA auf SCC-25 Zellen (IC₅₀: 2 x 10⁻⁶ M, Max. Hemmung: 70 % Abb. 3.2.1 A) und die Wirkung von PMEDAP auf primäre Keratinocyten (IC₅₀: 10⁻⁵ M, Max. Hemmung: 77 % Abb. 3.2.1 B) entsprachen den Effekten von PMEG (Tab. 3.1.2). Im MTT-Test bewirkten PMEA und PMEDAP keine signifikante Hemmung der Viabilität von HaCaT- und SCC-25 Zellen. In diesem Test zeigt nur PMEG einen Effekt, der aber deutlich schwächer als die Proliferationshemmung war.

3.2. Evaluierung der Testmethoden für die Zielzellen und der Zeitabhängigkeit der Stimulation

Die untersuchten Zytostatika zeigen in den angewendeten Testverfahren teilweise deutliche Unterschiede in der Wirkung, was die Notwendigkeit eines Vergleichs der Methoden unterstreicht, um Testsysteme für die Polymerasehemmer zu identifizieren. Nicht alle Methoden sind für jede Fragestellung gleich gut geeignet (Weyermann et al., 2005).

Weiterhin sollten die Stimulationszeiten näher untersucht werden, ob eine Zeitabhängigkeit für die Wirkungen festzustellen ist. In früheren Arbeiten wurden Proliferation und Viabilität stets nach einer Einwirkdauer von Zytostatika über 72 Stunden festgestellt. Eine Beeinflussung der Proliferation sollte allerdings deutlich früher nachzuweisen sein, speziell bei sich schnell teilenden Zellen. Etwas verzögert sollte die Wirkung auf die Viabilität und die Membranintegrität eintreten. Ob bei den hier verwendeten Substanzen und Testmethoden eine kürzere Stimulationszeit ausreichend ist, wurde an ausgewählten Substanzen erprobt. Dabei sollten auch Unterschiede zwischen den Testmethoden (MTT-, NRU-Test, Thymidin-Einbau) offenbar werden.

3.2.1. Thymidin-Einbau

Der Thymidin-Einbau ist nicht generell für alle Substanzen anwendbar, z.B. ist er nicht für Substanzen, die in den Thymidin-Stoffwechsel eingreifen (MTX, Capecitabin, 5-FU), geeignet. An ausgewählten Substanzen sollte aber untersucht werden, ob für diese eine Zeitabhängigkeit nachzuweisen ist.

An SCC-25 Zellen erfolgte eine 24stündige und 72stündige Inkubation mit Doxorubicin und Diclofenac (Abb. 3.2.1). Die Proliferation nach 72 Stunden Inkubation mit Doxorubicin 10^{-7} M stieg stark an (335 %) und fügte sich nicht in den Kurvenverlauf ein, war aber reproduzierbar. Bei einer Stimulationszeit von 24 h gab es diesen Extremwert nicht, der weitere Kurvenverlauf der beiden Inkubationszeiten war sehr ähnlich.

Bei Diclofenac war die Hemmwirkung bei kleinen Konzentrationen nach 72 Stunden schwächer als nach 24 Stunden, allerdings betrug die mittlere maximale Hemmung (10^{-4} M) für beide Inkubationszeiten gleichermaßen ca. 60 %.

3. Ergebnisse

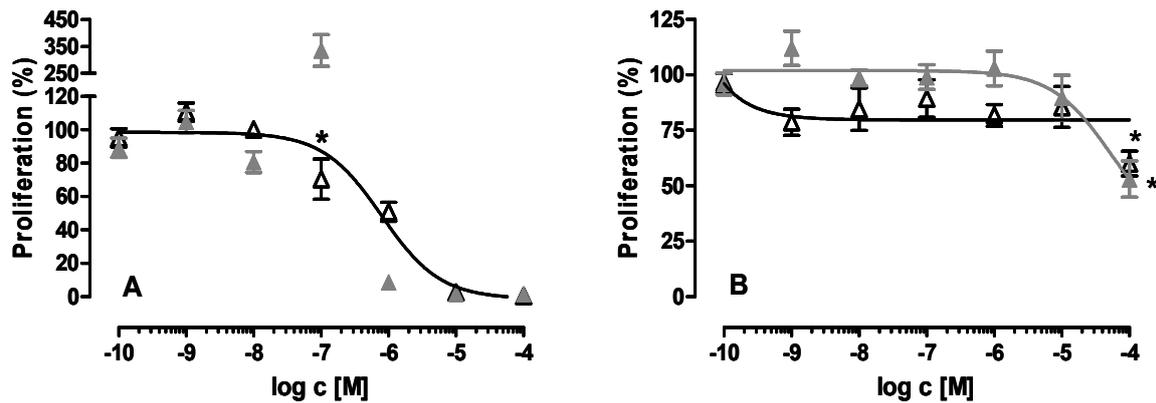


Abb. 3.2.1 Thymidin-Einbau in SCC-25 Zellen nach 24 Stunden (Δ) oder 72 Stunden (\blacktriangle) Stimulation mit Doxorubicin (A) oder Diclofenac (B), * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle

Mit Aphidicolin wurden HaCaT- und SCC-25 Zellen über 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert (Abb. 3.2.2). Es konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden. Mit SCC-25 Zellen wurde der Test mit 48 Stunden Inkubation nicht mehr wiederholt, mit HaCaT-Zellen nur einmal. Alle anderen Experimente wurden mindestens dreimal dreifach durchgeführt.

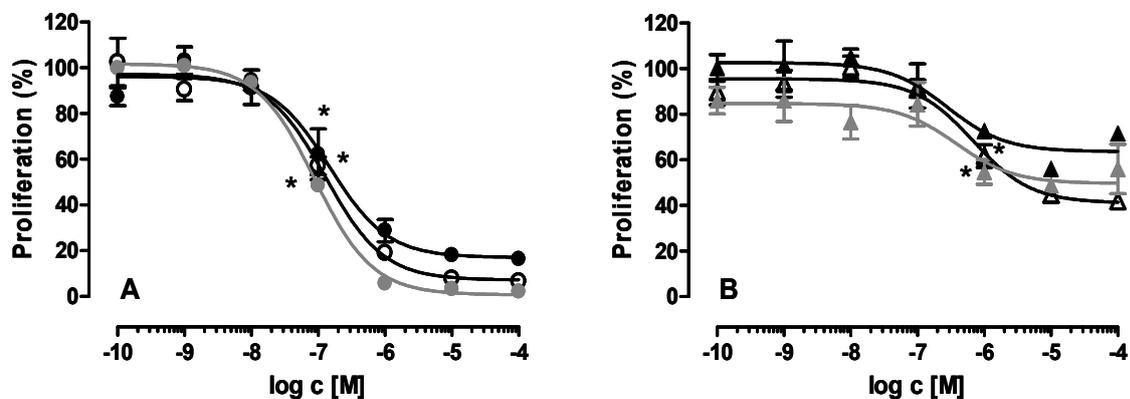


Abb. 3.2.2 Thymidin-Einbau nach Stimulation mit Aphidicolin in HaCaT-Zellen (o, A) und SCC-25 Zellen (Δ , B) nach 24 h (offene Symbole), 48 h (geschlossene Symbole) oder 72 h (graue Symbole), * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle

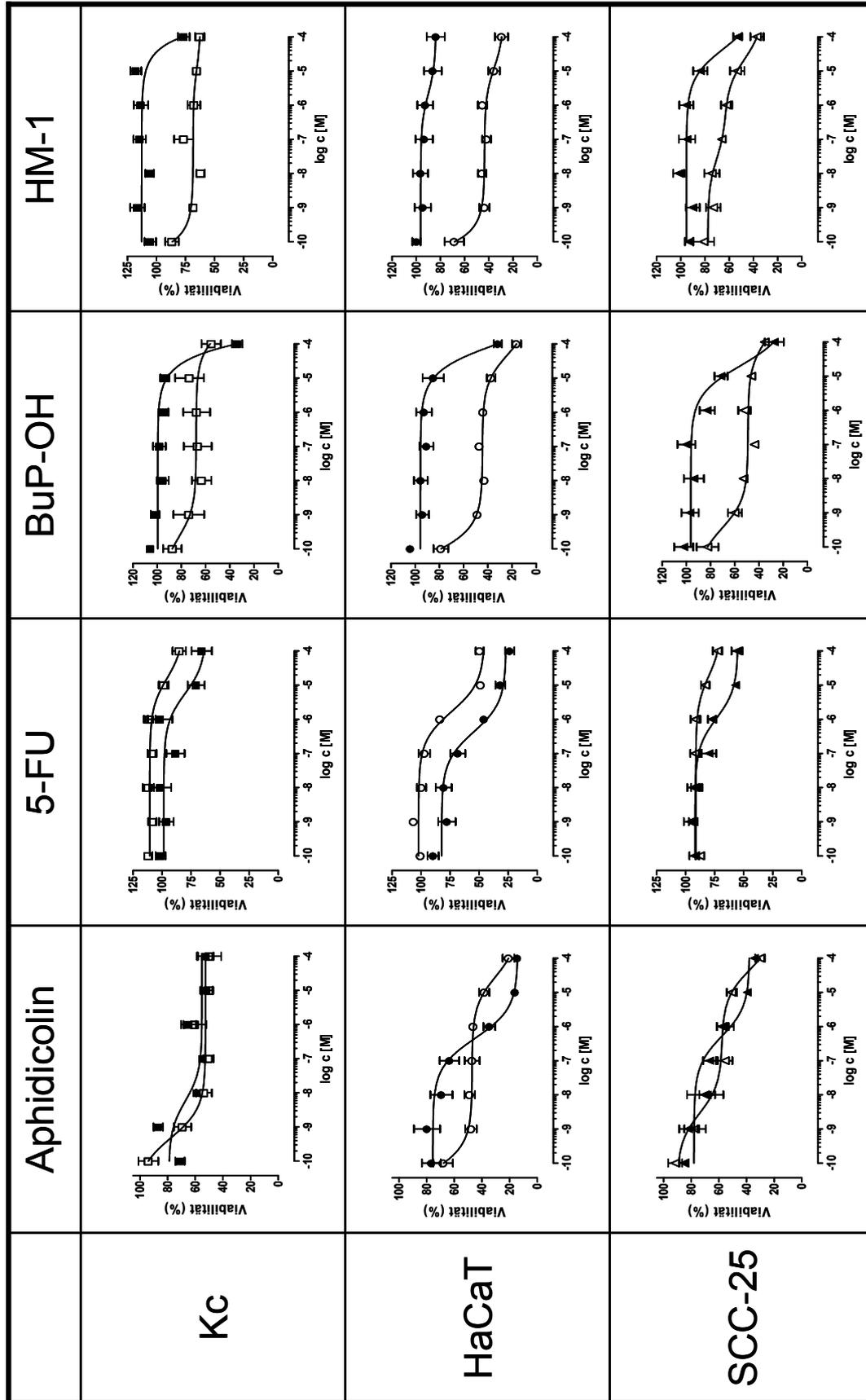
3.2.2. MTT-Test

Der MTT-Test erlaubt auch die Testung von Substanzen, die nicht im Proliferations-Assay untersucht werden könnten. Mit 5-FU und Aphidicolin wurden die Stimulationszeiten 24 und 48 Stunden bei den Zielzellarten verglichen (Tab 1.4.1). Für 5-FU war für alle drei Zellarten eine Stimulationszeit von 48 Stunden erforderlich. Effekte waren erst dann (SCC-25) oder doch zumindest deutlicher (Kc, HaCaT) zu sehen. Aphidicolin wirkte auf primäre Zellen bei beiden Stimulationszeiten gleich. Bei HaCaT- und SCC-25 Zellen kreuzen sich die Kurven und treffen sich bei einer gleichen maximalen Hemmung. Die Unterschiede sind aber nicht signifikant. Im Fall von Aphidicolin erlaubt eine 48 stündige Stimulation den Vergleich primärer und transformierter Keratinozyten, da dann ein einheitlicher Kurvenverlauf gegeben ist.

3.2.3. Neutralrot-Aufnahme

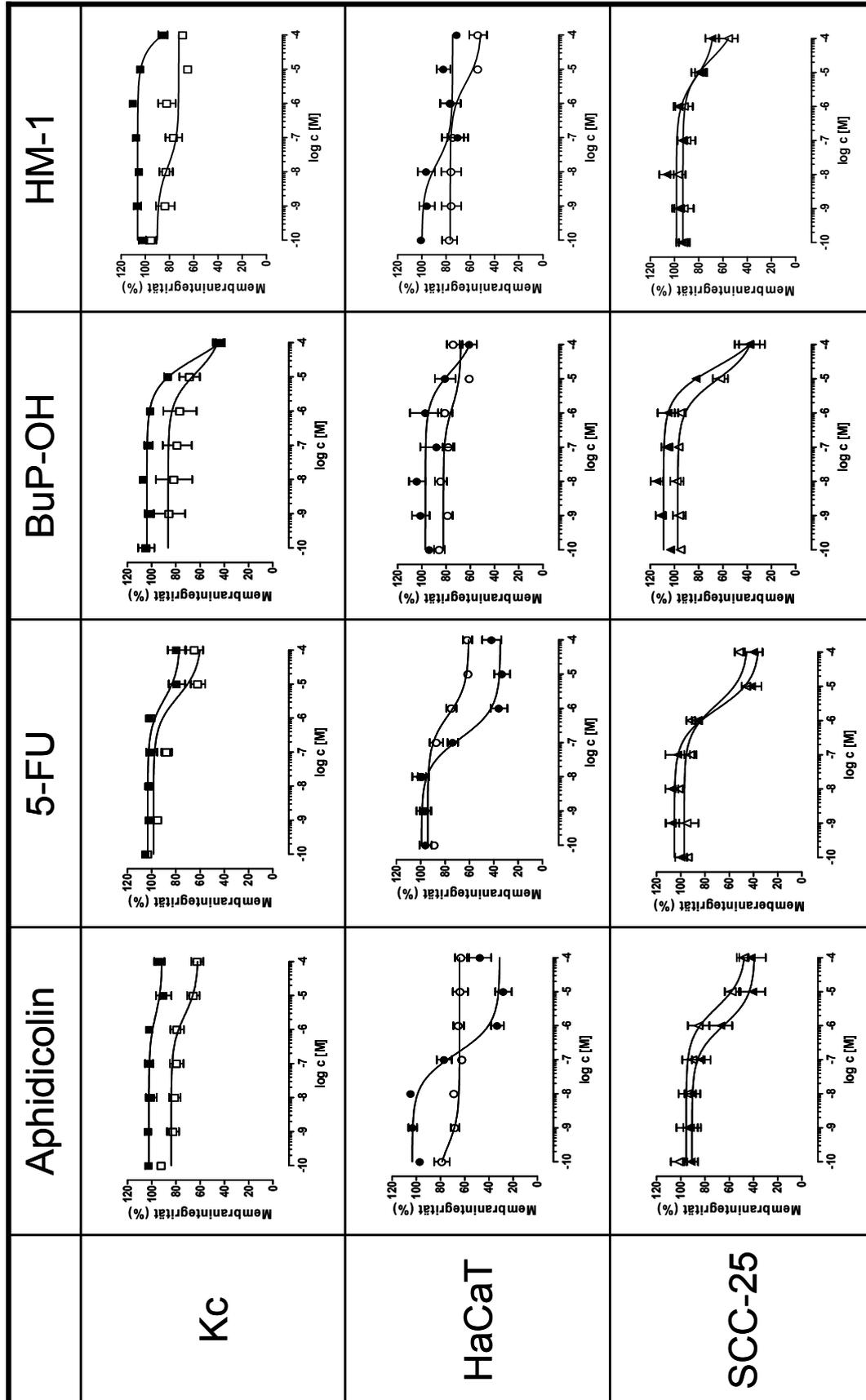
Zwei Stimulationszeiten – 24 und 48 Stunden – wurden auch im NRU-Test vergleichend untersucht (Tab 3.2.2).

SCC-25 Zellen zeigten bei keiner Substanz einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Stimulationszeiten. Aphidicolin und 5-FU wirkten nach 24 Stunden Stimulation auf primäre Zellen, bei HaCaT-Zellen dagegen nach 48 Stunden Stimulation stärker. 48 Stunden Stimulation mit 5-FU erhöhte den Effekt deutlich gegenüber der kürzeren Inkubationszeit. Insgesamt waren die beobachteten Unterschiede zwischen den Stimulationszeiten recht gering. Die maximale Hemmung war meist gleich.



Tab 3.2.1 Gegenüberstellung der Kurven des MTT-Tests nach 24 h (offene Symbole) oder 48 h (geschlossene Symbole) Stimulation mit Aphidicolin, 5-FU, BuP-OH oder HM-1 bei primären Keratinozyten (Kc, □), HaCaT-Zellen (o) und SCC-25 Zellen (Δ).

3. Ergebnisse



Tab 3.2.2 Neutralrot-Aufnahme nach 24 h (offene Symbole) oder 48 h (geschlossene Symbole) Stimulation. Vergleich der Wirkung von Aphidicolin, BuP-OH, 5-FU und HM-1 auf primäre Keratinozyten (Kc, □), HaCaT-Zellen (o) und SCC-25 Zellen (Δ).

3. Ergebnisse

3.2.4. Zellzyklus-Analyse

Substanzen, die in die Proliferation eingreifen, beeinflussen meist auch den Zellzyklus. Zunächst wurde der Einfluss von 5-FU und Aphidicolin untersucht, von denen eine Beeinflussung des Zellzykluses bekannt ist.

Bei primären Keratinozyten sind nach Stimulation mit beiden Substanzen keine toten Zellen (sub-G1) nachweisbar (Abb. 3.2.3 A, B). Aphidicolin 10^{-6} M führt zu einer deutlichen Verschiebung in die S-Phase (43 %), während dieser Effekt bei 5-FU in gleicher Konzentration deutlich schwächer ausgeprägt ist. Bei HaCaT-Zellen nahm unter Aphidicolin konzentrationsabhängig der Anteil toter Zellen deutlich zu (Abb. 3.2.3 C). Auch 5-FU bewirkte einen deutlichen Zuwachs der sub-G1 Phase bis auf 47 % bei 10^{-6} M, allerdings stieg dieser Anteil bei höheren Konzentrationen nicht an.

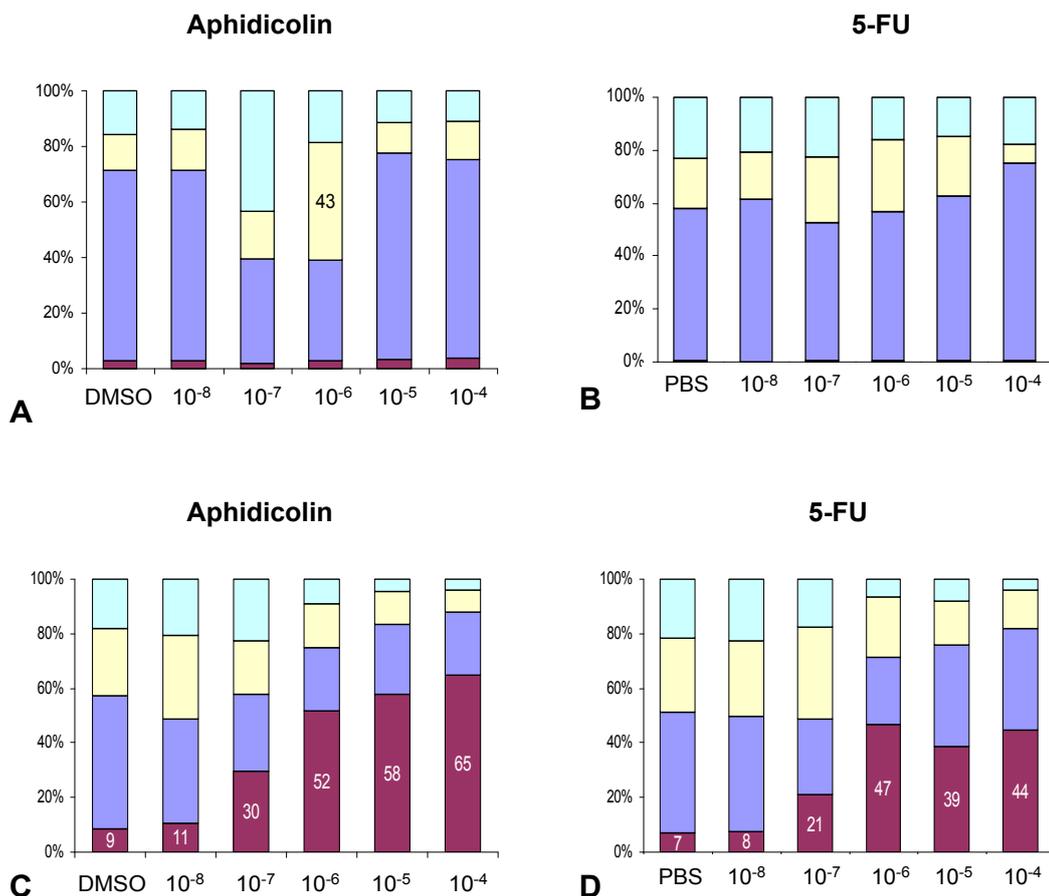


Abb. 3.2.3: Prozentuale Auswertung der Zellzyklus-Analyse bei primären Keratinozyten (A, B) und HaCaT-Zellen (C, D) nach 48 h Stimulation. Zyklusphasen: sub-G1 (rot), G1 (blau), S (gelb), G2 (türkis)

3. Ergebnisse

SCC-25 Zellen reagierten deutlich auf Aphidicolin. Sowohl eine Verschiebung in die S-Phase bei 10^{-6} M als auch ein Anstieg der sub-G1 Fraktion bei weiterer Konzentrationserhöhung konnten beobachtet werden (Abb. 3.2.4). 5-FU 10^{-6} M bewirkte ebenfalls eine Verschiebung in die S-Phase, nicht aber eine Erhöhung des Anteils der toten Zellen. Dafür nahm der Anteil der Zellen in der G1-Phase stark zu.

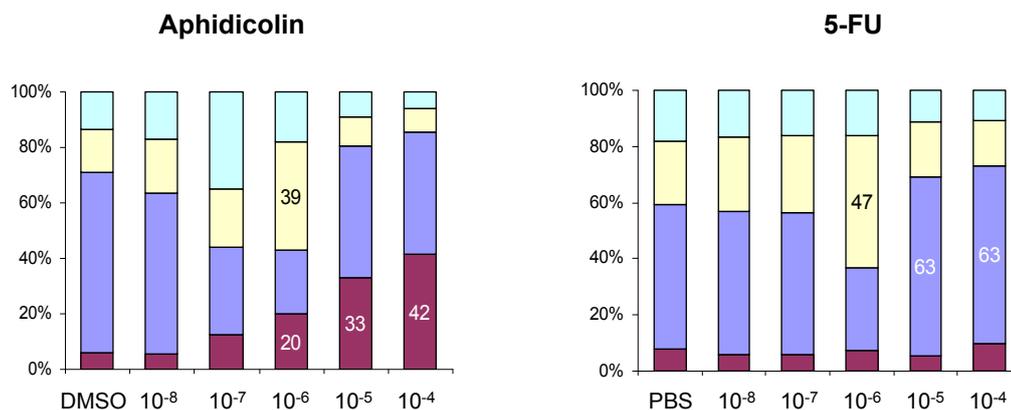


Abb. 3.2.4 Prozentuale Auswertung der Zellzyklus-Analyse nach 48 h Stimulation von SCC-25 Zellen; Zyklusphasen: sub-G1 (rot), G1 (blau), S (gelb), G2 (türkis)

Die Ergebnisse der Zellzyklus-Untersuchungen wurden durch die Daten des Thymidin-Einbaus ergänzt (Abb. 3.2.5). Stimulation mit 5-FU 10^{-7} M erhöhte bei HaCaT-Zellen den Anteil der Zellen in der S-Phase leicht, bei weiterer Konzentrationssteigerung stieg der Anteil toter Zellen deutlich. Dies spiegelte sich auch in der leichten Zunahme im Thymidin-Einbau bei 5-FU 10^{-7} M und einer Abnahme des Thymidin-Einbaus bei hohen Konzentrationen wider (Abb. 3.2.5 A). Auch bei primären Keratinozyten steigt der Thymidin-Einbau bei 5-FU 10^{-6} M analog zur Zunahme des Zellanteils in der S-Phase.

Bei SCC-25 Zellen bewirkte eine Stimulation mit 5-FU (10^{-6} M) eine Zunahme der Zellen in der S-Phase und bei weiterer Konzentrationserhöhung einen starken Anstieg des Anteils der G1-Phase. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Substanzen stieg der Anteil der toten Zellen nicht über Kontrollniveau. Durch Zugabe von Thymidin nach 48 Stunden Inkubation mit 5-FU konnten die wahrscheinlich ruhenden Zellen wieder in die S-Phase gelangen und das angebotene Thymidin einbauen. Dies spiegelt sich in den hohen Einbauraten bei 10^{-5} M und 10^{-4} M wider (Abb. 3.2.5 B). Wird Thymidin dagegen gleichzeitig mit 5-FU für 24 Stunden

3. Ergebnisse

angeboten, trifft dieser Effekt nicht ein, denn die Wirkung von 5-FU wird praktisch aufgehoben.

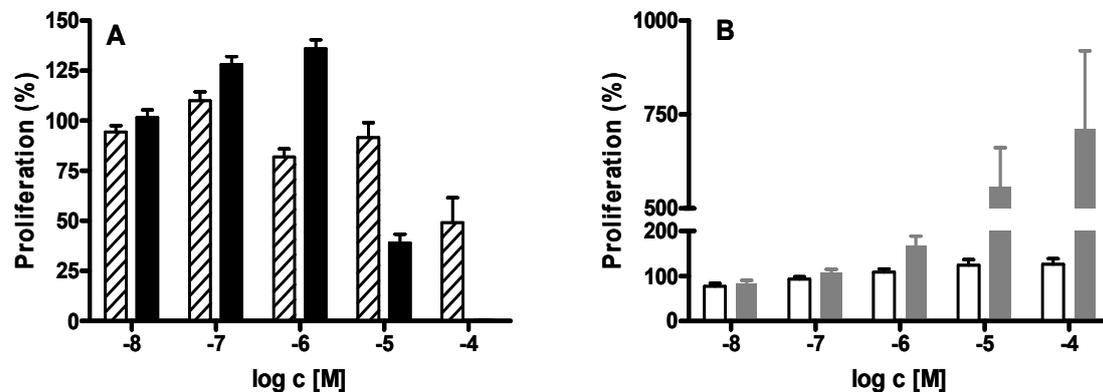


Abb. 3.2.5 Thymidin-Einbau nach Stimulation mit 5-FU **A** primäre Keratinozyten (geschlossene Säulen) und HaCaT-Zellen (gestreifte Säulen) nach 72 h **B** SCC-25 Zellen nach 24 h (offene Säulen) und 72 h (graue Säulen); Thymidinzugabe für die letzten 24 h.

3.3. Charakterisierung der Keratinozyten: Prüfung der Expression relevanter Stoffwechsellenzyme und Transporter

3.3.1. Membranständige Nukleosid- und Nukleotidtransporter

Die mittels Molecular Modelling identifizierten Substanzen sind Analoge der natürlichen Nukleoside. Sie sollten von der Zelle aufgenommen werden und intrazellulär einem Aktivierungsprozess durch Phosphorylierung unterliegen. Möglicherweise ist für die Aufnahme in die Zellen ein spezifischer Nukleosidtransporter (hENT-1) erforderlich. Für phosphorylierte Produkte gibt es membranständige Transporter (MRP4 und MRP5), die diese wieder aus der Zelle heraustransportieren können. Es galt daher zu prüfen, ob diese Transporter in primären und transformierten Keratinozyten vorkommen und ob die Aktivität bekannter Substrate der Auswärtstransporter, wie z.B. PMEPA und PMEDAP durch Hemmung der Transporter zunimmt. Damit kann der Einfluss des Auswärtstransportes auf die Wirksamkeit abgeschätzt werden.

Mittels Reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) wurden die drei Transporter in allen drei Zellarten auf mRNA Ebene nachgewiesen (Abb. 3.3.1), quantitative Unterschiede von MRP5 und MRP4 konnten nicht festgestellt werden. Allerdings war

3. Ergebnisse

die Menge im Vergleich zu GAPDH eher gering. hENT-1 ist in SCC-25 Zellen schwächer exprimiert als in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen.

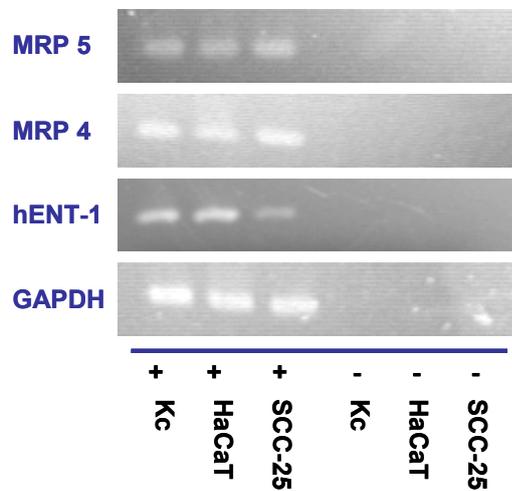


Abb. 3.3.1 Nachweis der membranständigen Transporter MRP5, MRP4 und hENT-1 auf mRNA Ebene mittels RT-PCR im Vergleich zur Expression von GAPDH bei primären Keratinozyten (Kc), HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen

Bis heute gibt es keine spezifischen Inhibitoren für die Transporter MRP4 und MRP5, doch existieren unspezifischen Inhibitoren wie z.B. Dipyridamol, Sulfasalazin, Sildenafil und Indometacin. Untersuchungen v.a. an Vesikeln zufolge sollte Indometacin mit einer IC_{50} von ca. 5×10^{-5} M der wirksamste Inhibitor sein (Reid et al., 2003). Da eine Inhibition der Transporter in den Krebszellen interessant wäre, wurden diese hinsichtlich eines solchen Effektes untersucht. Die Zellen wurden mit Indometacin und PME A bzw. PMEDAP 48 h costimuliert, allerdings konnte keine Erhöhung der Proliferationshemmung durch die gleichzeitige Gabe von Indometacin erreicht werden (Abb. 3.3.2). In einigen Fällen kam es sogar zu einer Wirkungsabschwächung.

Zwar scheint Indometacin die Wirkung von PME A bei HaCaT-Zellen in niedriger Konzentration zu erhöhen (Abb. 3.3.2 A), doch könnte dieser Effekt auch der Indometacin-eigenen Zytotoxizität zuzuschreiben sein. PME A hemmt die Proliferation von HaCaT-Zellen erst in hohen Konzentrationen, die maximale Hemmung von 50 % wurde bei 10^{-4} M erreicht (Abb. 3.1.12). Costimulation steigerte die Wirkung von PMEDAP bei HaCaT-Zellen nicht (Abb. 3.3.2 B). Anders als bei HaCaT-Zellen wirkt Indometacin (50 μ M) auf SCC-25 Zellen nicht toxisch. Die Costimulation bei PME A führte nicht nur zur Wirkungsabschwächung, viel mehr sogar zu einer

3. Ergebnisse

erhöhten Proliferation (Abb. 3.3.2 C). Indometacin bewirkte hingegen bei SCC-25 Zellen eine signifikante Steigerung der Wirkung von PMEDAP (Abb. 3.3.2 D).

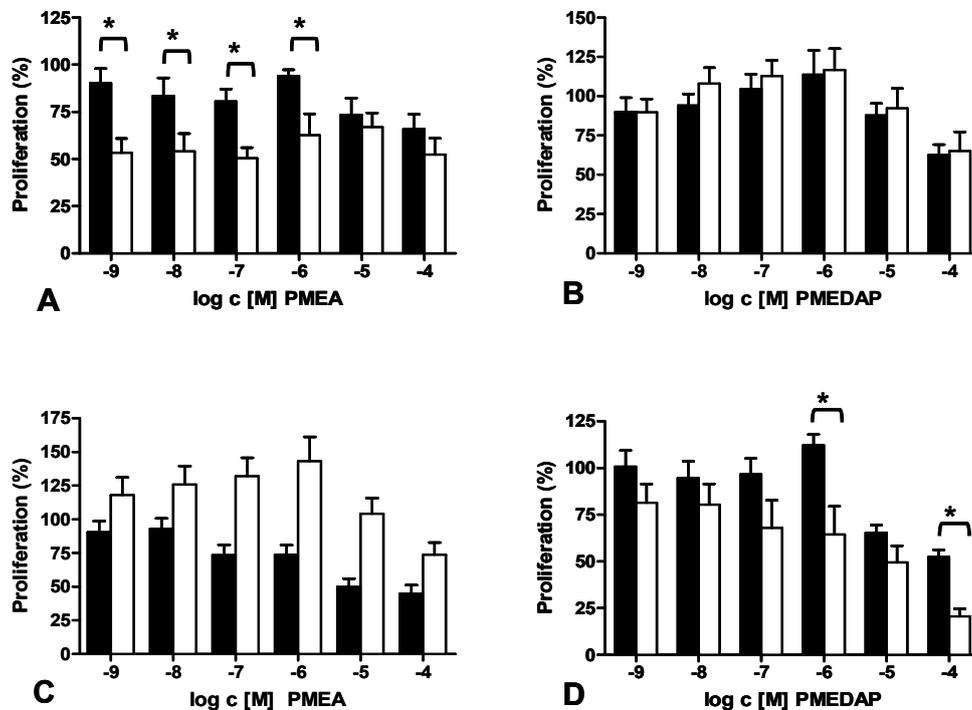


Abb. 3.3.2 Stimulation von HaCaT-Zellen (A, B) und SCC-25 Zellen (C, D) mit PME A (A, C) und PMEDAP (B, D) für 48 h alleine (geschlossene Säulen) und in Gegenwart von Indometacin (50 μ M; offene Säulen); * $p \leq 0,05$

Weiterhin wurde an HaCaT-Zellen untersucht, ob eine Stimulation mit PME A (10^{-4} M), PMEG (10^{-6} M) und PMEDAP (10^{-4} M) die Expression der Transporter auf mRNA Ebene erhöht. Die Transporter waren in allen drei Zellarten nach Stimulation vorhanden, allerdings weiterhin in sehr geringen Mengen (nicht dargestellt). Eine Steigerung der Expression konnte durch Stimulation mit den drei Phosphonaten nicht gezeigt werden.

3.3.2. Nukleosid-Kinasen und Thymidinphosphorylase

Zur Aktivierung müssen Nukleosid-Analoga intrazellulär zunächst von einer Basenspezifischen Kinase zum Monophosphat phosphoryliert werden. Die Einführung des Monophosphats ist meist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aktivierung.

3. Ergebnisse

Die Thymidinkinase-1 (TK-1) ist ein zytosolisches Enzym, das Thymidin und dessen Analoga phosphoryliert. Die Thymidinphosphorylase (TP) spaltet von einem Nucleosid den Zuckerrest ab und phosphoryliert diesen, so dass die freie Base und 5-PRP entstehen. Dies ist für die mittels Molecular Modelling generierten Testsubstanzen ein Abbau-Mechanismus, für Capecitabin dagegen ein unumgänglicher Schritt zur Aktivierung. Auch 5-FU kann über diese Aktivierung den sogenannten DNA-Weg einschlagen und so die Zelle schädigen.

Die Desoxycytidinkinase (dCK) ist die zytosolische Kinase mit dem breitesten Substratspektrum. Sie phosphoryliert neben dC auch dG und dA. Die Desoxyguanosinkinase (dGK) ist ein mitochondriales Enzym, das spezifisch Guanosen und dessen Analoga phosphoryliert.

Durch RT-PCR konnte auf mRNA Ebene die Expression der Enzyme gezeigt werden. dCK war in SCC-25 Zellen kaum vorhanden, in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen dagegen in deutlichen Mengen. Die anderen Enzyme konnten in allen drei Zellarten gleichermaßen nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3).

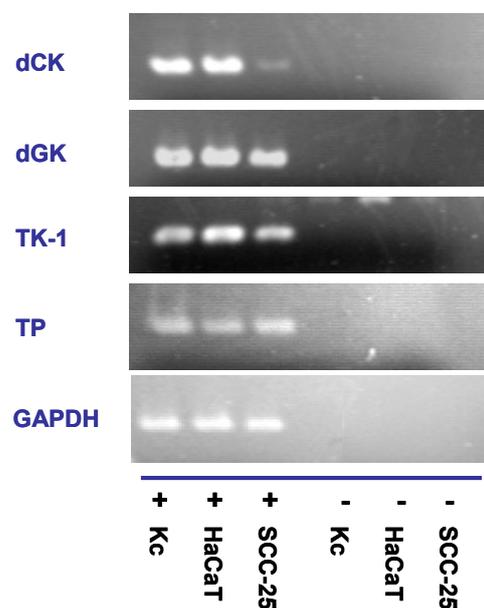


Abb. 3.3.3 Nachweis der dCK, dGK, TK-1 und TP auf mRNA Ebene mittels RT-PCR im Vergleich zu GAPDH bei primären Keratinozyten (Kc), HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen.

3. Ergebnisse

3.4. Testung mittels Molecular Modelling identifizierter Pol α Hemmer

Mit Hilfe des von Herrn Prof. Höltje, HHU Düsseldorf entwickelten Modells des aktiven Zentrums der humanen Pol α wurden Strukturvorschläge für Inhibitoren entwickelt und erste Vertreter dieser Inhibitoren synthetisiert. Dabei handelt es sich um ein Thymidin-Analoges (HM-1) und ein Guanin-Analoges (BuP-OH), die zunächst hinsichtlich ihres zytotoxischen Potentials in der Zellkultur an primären Keratinozyten, HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen getestet wurden.

3.4.1. Wirkung auf Viabilität, Membranintegrität, Proliferation und Zellzyklus

Die Wirkung von HM-1 und BuP-OH auf die Viabilität und Membranintegrität der Zielzellen wurde nach 48 Stunden Stimulation untersucht. HM-1 beeinflusst dabei die Viabilität von SCC-25 Zellen stärker als bei den anderen untersuchten Zellarten (50 %, Abb. 3.4.1 A). Im NRU Test sprachen jedoch HaCaT-Zellen bereits bei geringeren Konzentrationen an (Abb. 7.1.2 D), während der Maximaleffekt in HaCaT-Zellen dem in SCC-25 Zellen ähnlich war (25 % bzw. 30 %, Abb. 3.4.1 B).

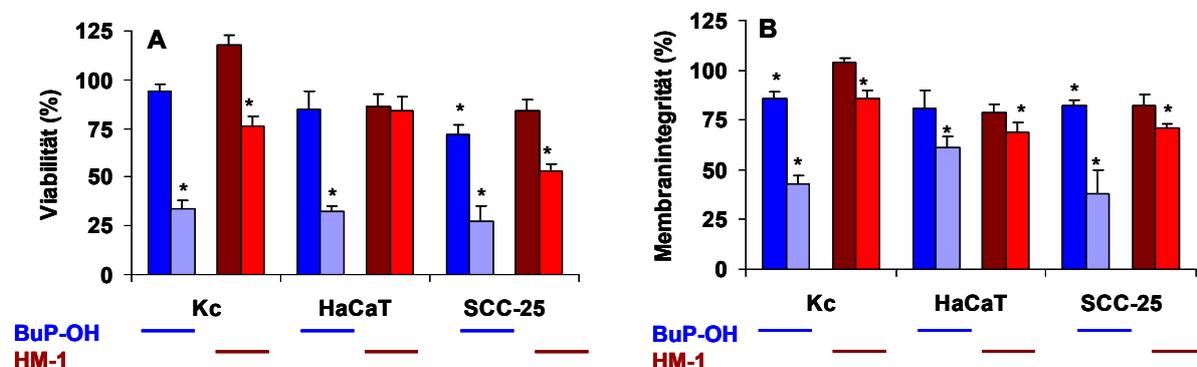


Abb. 3.4.1 MTT-Test (A) und Neutralrot-Aufnahme (B) nach 48 h Stimulation mit BuP-OH (blau) oder HM-1 (rot) bei primären Keratinozyten (Kc), HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen. Viabilität und Membranintegrität sind exemplarisch für die Konzentrationen 10⁻⁵ M (dunkle blau bzw. dunkel rot) und 10⁻⁴ M (hell blau bzw. hell rot) dargestellt. Die gesamte Konzentrations-Wirkungskurve ist im Anhang (Abb. 7.1.2) dargestellt. * p ≤ 0,05 gegenüber Kontrolle

3. Ergebnisse

| MTT | Kc | HaCaT | SCC | NRU | Kc | HaCaT | SCC |
|--------|-----------|------------|------------|--------|------------|--------------|------------|
| BuP-OH | 51 / 66 % | 12 / 68 % | 2,1 / 72 % | BuP-OH | 3,7 / 57 % | 1,7 / 39 % | 2,2 / 62 % |
| HM-1 | 5 / 23 % | 0,2 / 16 % | 4,5 / 47 % | HM-1 | 40 / 14 % | 0,002 / 25 % | 0,7 / 31 % |

Tab 3.4.1 IC₅₀-Werte ($\times 10^{-5}$ M) und maximale Hemmung (in %) bei 10^{-4} M im MTT- und NRU-Test nach 48 h Stimulation mit BuP-OH oder HM-1 bei primären Keratinozyten (Kc), HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen.

BuP-OH erwies sich, wie aufgrund der Ergebnisse des Molecular Modellings zu erwarten, als dem HM-1 hinsichtlich der Wirkstärke überlegen. BuP-OH 10^{-4} M hemmte nach 48 Stunden Stimulation die Viabilität in allen drei Zellarten ähnlich stark (70 %, Abb. 3.4.1). Die Neutralrot-Aufnahme wurde bei SCC-25 Zellen und primären Keratinozyten zu 60 % gehemmt, bei HaCaT-Zellen nur zu 40 % (Abb. 3.4.1 B). Bezieht man die Referenzsubstanzen Aphidicolin und 5-FU ein, ergibt sich die Abstufung der Wirksamkeit Aphidicolin > 5-FU > BuP-OH > HM-1. Allerdings übertraf BuP-OH 10^{-4} M bei primären Keratinozyten und SCC-25 Zellen im MTT-Test die Effekte der in gleicher Konzentration eingesetzten Referenzsubstanzen.

Nur für BuP-OH, nicht aber für HM-1, konnte weiterhin die Wirkung auf die Proliferation der Zielzellen bestimmt werden. BuP-OH 10^{-4} M hemmte die Proliferation von primären Keratinozyten und SCC-25 vollständig, HaCaT-Zellen reagierten weniger empfindlich (Abb. 3.4.2).

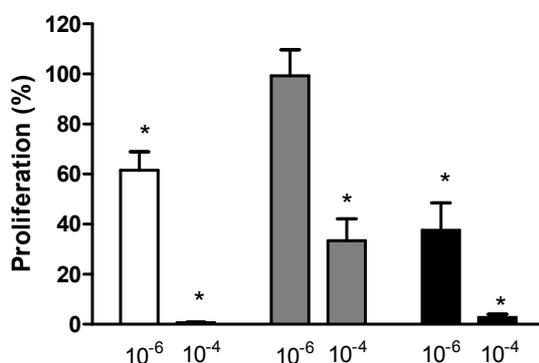


Abb. 3.4.2 Proliferation von primären Keratinozyten (offene Säulen), HaCaT-Zellen (graue Säulen) und SCC-25 Zellen (geschlossene Säulen) nach 24 h Stimulation mit BuP-OH in Konzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-4} M, * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle. Der gesamte Kurvenverlauf ist in Abb. 7.1.3 dargestellt.

3. Ergebnisse

BuP-OH hat auf den Zellzyklus der Zielzellen nur einen geringen Einfluss. Erst bei der höchsten getesteten Konzentrationen (10^{-4} M) steigt bei HaCaT- und SCC-25 Zellen der Anteil der toten Zellen auf 26 % bzw. 22 % (beide Kontrollen 7 %). Primäre Keratinozyten werden praktisch gar nicht beeinflusst. HM-1 beeinflusst auch erst bei 10^{-4} M den Zellzyklus. Bei primären Keratinozyten steigt der Anteil der Zellen in der G2 Phase auf 36 % (Kontrolle 16 %). In HaCaT-Zellen steigt dagegen die sub-G1 Fraktion auf 19 %, bei SCC-25 Zellen sogar auf 65 %.

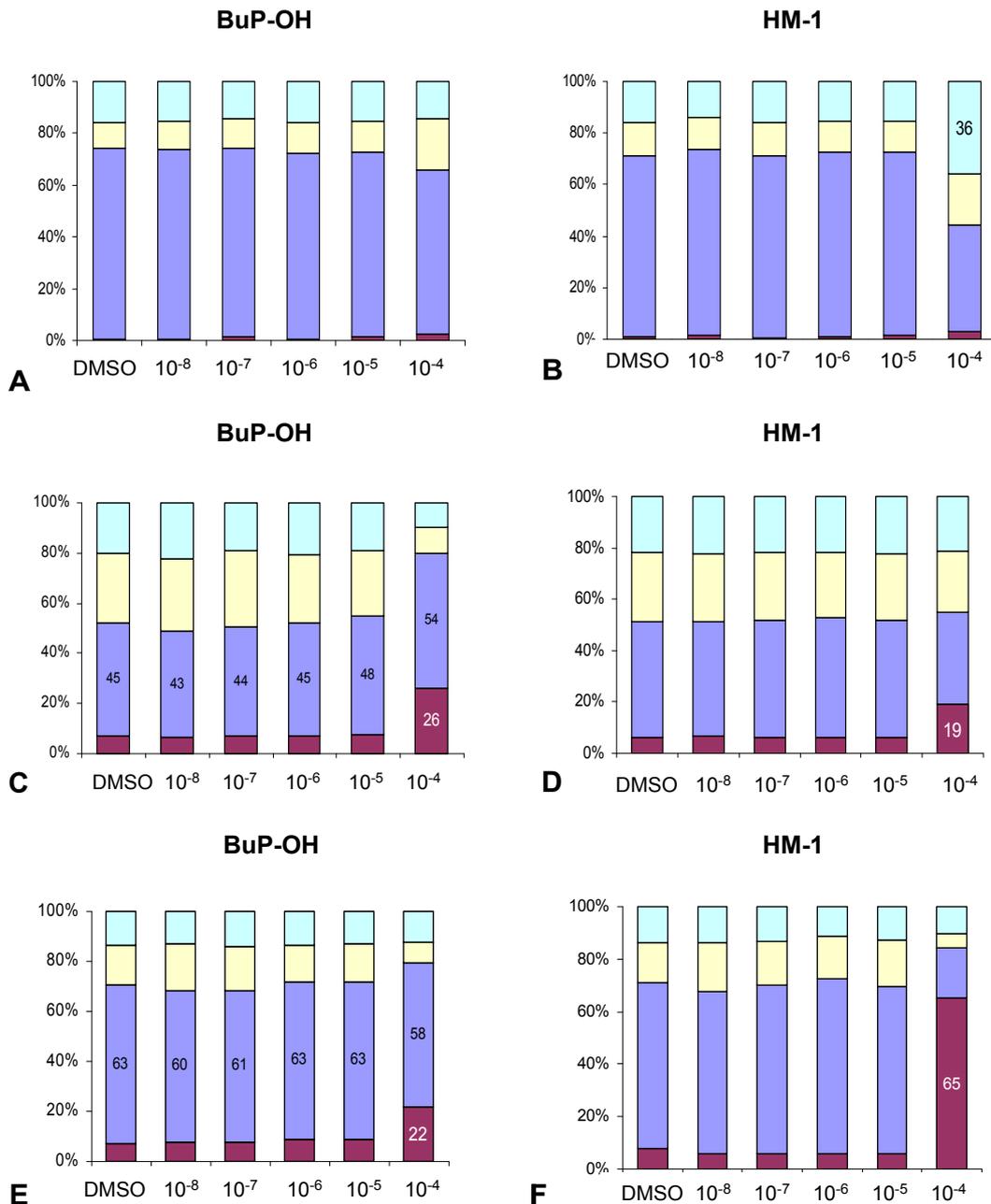


Abb. 3.4.3 Prozentuale Auswertung der Zellzyklus-Analyse bei primären Keratinozyten (A, B), HaCaT-Zellen (C, D) und SCC-25 Zellen (E,F) nach 48 h Stimulation mit BuP-OH bzw. HM-1. Zyklusphasen: sub-G1 (rot), G1 (blau), S (gelb), G2 (türkis)

3. Ergebnisse

Die überraschend starke zytotoxische Wirkung von HM-1 10^{-4} M wurde in den vorangegangenen Untersuchungen, d.h. im MTT- und NRU-Test nicht beobachtet. Daher wurde die Viabilitätsuntersuchung (MTT-Test) wiederholt, wobei die Zellen ähnlich dünn, wie für die Zellzyklus-Untersuchung ausgesät wurden (10^4 Zellen/Loch einer 24 Loch-Platte). So konnten die Ergebnisse der Zellzyklus Untersuchung bestätigt werden (Abb. 3.4.4). Die dünn ausgesäten Zellen zeigten eine Reduktion der Viabilität um 77 % im Vergleich zu 43 % bei dichterem Aussaat.

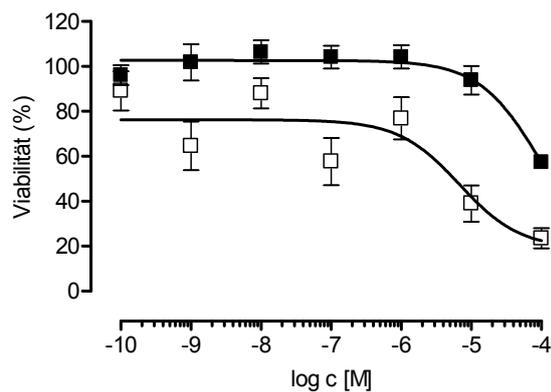


Abb. 3.4.4 Viabilität (MTT-Test) nach 48 h Stimulation von SCC-25 Zellen mit HM-1. Die Zellen wurden in einer Dichte von 10^4 Zellen/Loch (□) oder 4×10^4 Zellen/Loch (■) in 24 Loch-Platten ausgesät.

Auch mikroskopisch konnte die stark zytotoxische Wirkung von HM-1 10^{-4} M auf nicht-kontaktgehemmte SCC-25 Zellen eindeutig belegt werden (Abb. 3.4.5).

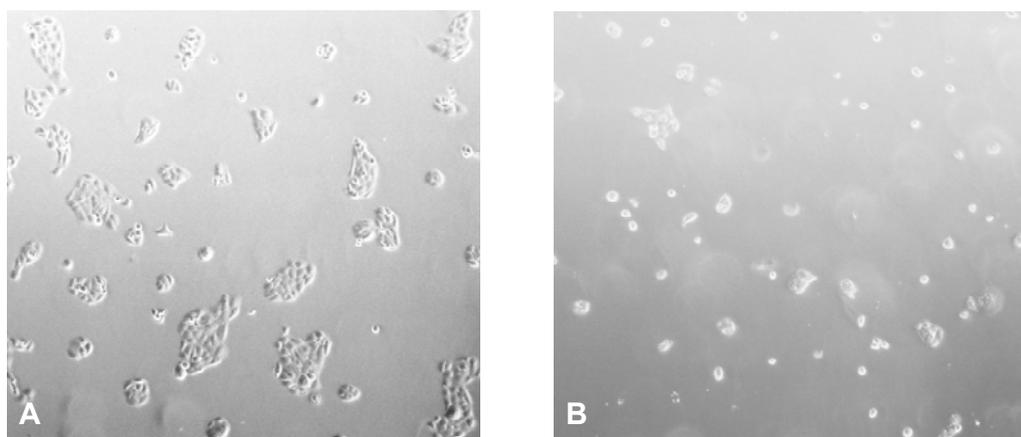


Abb. 3.4.5 Mikroskopische Untersuchung der SCC-25 Zellen nach 48 h Stimulation mit HM-1 10^{-4} M (B). Als Kontrolle (A) dienten Zellen, die nur mit DMSO stimuliert wurden.

3. Ergebnisse

3.4.2. Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität

Obgleich vorausgegangene Untersuchungen mit den Referenzsubstanzen keine Hinweise auf zeitliche Effekte gezeigt hatten, wurde die Wirkung von BuP-OH auf den Thymidin-Einbau nach einer Stimulation über 24 und 48 Stunden an allen drei Zellarten untersucht (Abb. 3.4.6). Bei primären Keratinozyten ergaben sich keine deutlichen Unterschiede. Bei HaCaT-Zellen ist der Kurvenverlauf bei 48 Stunden ungewöhnlich. Unter BuP-OH 10^{-9} M bis 10^{-6} M steigt der Thymidin-Einbau auf knapp 200 %, um bei 10^{-5} M auf den bei 24 Stunden Stimulation gefundenen Wert abzufallen.

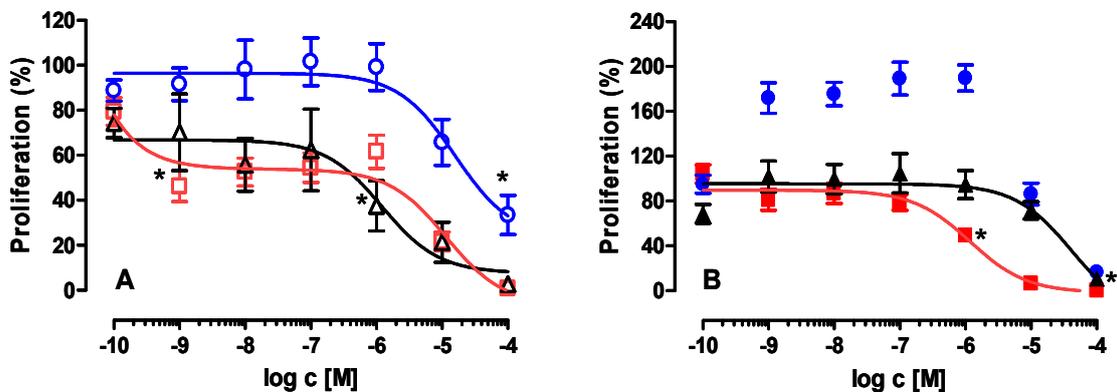


Abb. 3.4.6 Thymidin-Einbau nach 24 (A) oder 48 h (B) Stimulation mit BuP-OH bei primären Keratinozyten (\square , rot), HaCaT-Zellen (\circ , blau) und SCC-25 Zellen (Δ , schwarz), * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle

Bei SCC-25 Zellen war die Proliferationshemmung nach 24 Stunden viel stärker ausgeprägt und übertraf sogar die Wirkung von Aphidicolin in diesen Zellen deutlich (Abb. 3.4.7).

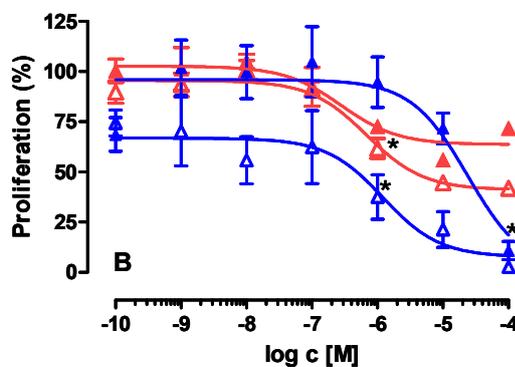


Abb. 3.4.7 Proliferation (Thymidin-Einbau) nach 24 h (offenes Symbol) oder 48 h (geschlossenes Symbol) Stimulation von SCC-25 Zellen mit BuP-OH (blau) im Vergleich zu Aphidicolin (rot), * $p \leq 0,05$ gegenüber Kontrolle

3. Ergebnisse

BuP-OH und HM-1 beeinflussten nach 24 Stunden Stimulation die Viabilität aller Zielzellen stärker als nach 48 Stunden Einwirkzeit (Tab 3.2.1). Erst in einer Konzentration von 10^{-4} M erreichte oder übertraf BuP-OH (48 h) die Wirkung einer Exposition über 24 Stunden. Bei HM-1 zeigte sich diese Zeitabhängigkeit besonders bei HaCaT-Zellen, hier näherten sich die Kurven auch bei der höchsten untersuchten Konzentration nicht an.

Die zeitlichen Unterschiede waren im NRU-Assay nach Stimulation mit BuP-OH und HM-1 gering ausgeprägt (Tab 3.2.2). Die beiden Substanzen wirkten etwas stärker nach 24 Stunden Stimulation.

3.4.3. Wirkungssteigerung durch Costimulation

Den Ergebnissen der Zellzyklus-Analyse zufolge könnte durch Kombination zweier Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten eine Wirkungssteigerung zu erzielen sein. Diese Hypothese wurde im Folgenden experimentell geprüft. BuP-OH, die tendenziell wirksamere Substanz der beiden neu synthetisierten Pol α Hemmer, und 5-FU (Thymidilatsynthasehemmung und Verschiebung des Zellzyklus in die S-Phase) wurden kombiniert. Dadurch sollte ein größerer Anteil von Zellen dem Angriff durch BuP-OH zur Verfügung stehen.

Zwei Stimulationsschemata wurden bei primären Keratinozyten und SCC-25 Zellen getestet:

1. Präinkubation mit 5-FU in einer Konzentration, bei der die Substanz selbst noch keine Viabilitätsabnahme bewirkt. 24 Stunden später Zugabe von BuP-OH in einer Konzentrationsreihe.
2. Costimulation einer Konzentration von BuP-OH, die noch nicht zytotoxisch ist, in Gegenwart einer Konzentrationsreihe 5-FU.

Beide Stimulationsschemata bewirkten keine Wirkungssteigerung. Die Kurven für die Versuche mit einer Präinkubation der Zellen mit 5-FU zeigten einen ähnlichen Wirkungsverlauf wie BuP-OH alleine ohne signifikante Steigerung der zytotoxischen Wirkung (Abb. 3.4.8). Da in diesen Versuchen die Zellen dünner ausgesät wurden, analog den Zelldichten, die für die Zellzyklus-Analyse gewählt wurden, sind auch frühere Versuchsdaten zum Vergleich mit dargestellt. Bei Costimulation nahm sogar im Vergleich zu früheren Versuchen mit 5-FU die Wirkung auf die dünn ausgesäten

3. Ergebnisse

Zellen ab (Abb. 3.4.9). Zugabe von BuP-OH (3×10^{-5} M) hob diese hyperviable Wirkung auf, allerdings nicht unter Werte früherer Versuche mit 5-FU alleine.

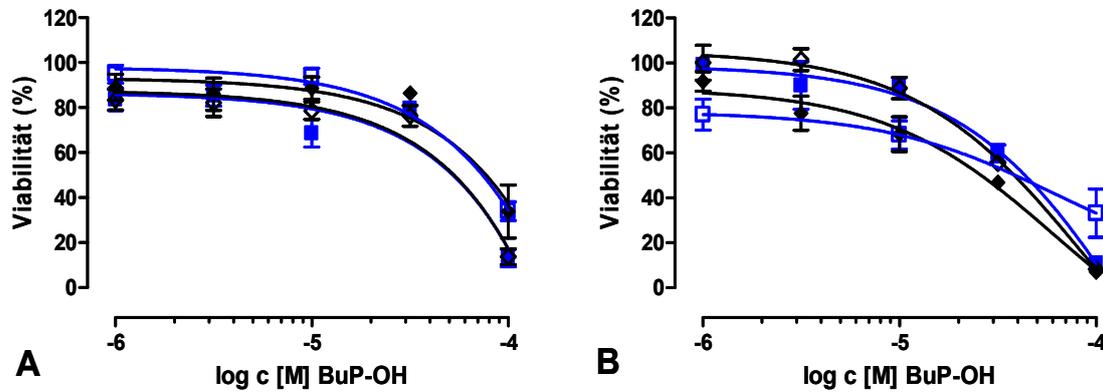


Abb. 3.4.8 Präinkubation von Keratinozyten (A) bzw. SCC-25 Zellen (B) mit 5-FU 10^{-6} M (\diamond) und 3×10^{-6} M (\blacklozenge) für 24 h und anschließender Stimulation mit BuP-OH für weitere 48 h im Vergleich zur Wirkung von BuP-OH (\blacksquare) und Ergebnissen aus früheren Versuchen (\square).

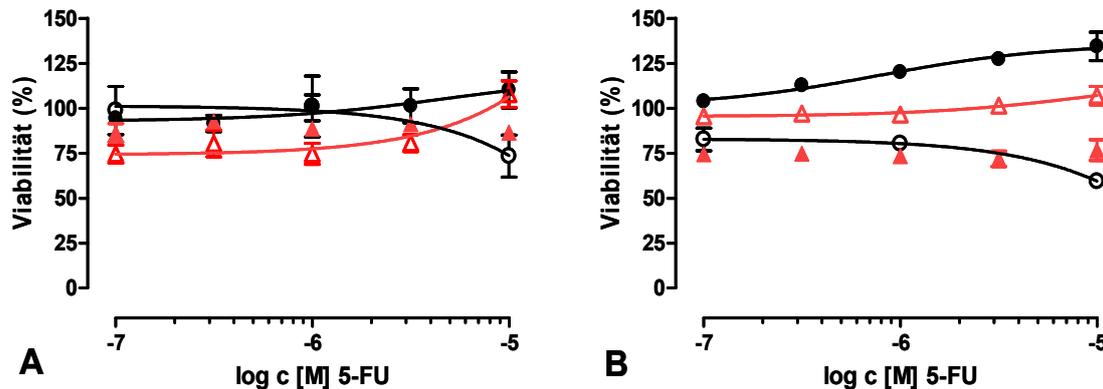


Abb. 3.4.9 Costimulation von Keratinozyten (A) bzw. SCC-25 Zellen (B) mit BuP-OH 10^{-5} M (Δ) und 3×10^{-5} M (\blacktriangle) und 5-FU für 48 h im Vergleich zu einer Konzentrationsreihe nur mit 5-FU (\bullet). Entsprechende Ergebnisse aus früheren Viabilitätstest (\circ).

3.5. Alternative Angriffspunkte: Angiogenese-Hemmung

1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ wirkt sowohl in-vitro als auch in-vivo gegen verschiedene Tumorarten und wird in klinischen Studien bereits erfolgreich gegen Prostatakarzinome eingesetzt. Neben der direkten Wirkung auf die Krebszellen trägt eine zusätzliche antiproliferative Wirkung auf Endothelzellen, die durch Angiogenese zum Tumorwachstum beitragen, zu der Antitumor-Wirkung bei. DEX kann die

3. Ergebnisse

Wirkungen von Calcitriol verstärken und die Nebenwirkungen mindern. Mittels dieser Effekte dürfte eventuell die Wirkung auch anderer Tumortherapeutika d.h. auch von Pol α Hemmern verstärkt werden.

Zunächst sollte untersucht werden, ob Calcitriol und DEX die Viabilität von SCC-25 Zellen beeinflussen können. Aufgrund einer Arbeit der Arbeitsgruppe um Trumpf (Bernardi et al., 2002) wurde weiterhin eine Kombination der beiden Substanzen (1:500) auf einen wirkungssteigernden Effekt hin untersucht. Vitamin D₃ (10⁻⁴ M) hemmte im Gegensatz zu DEX die Viabilität von SCC-25 Zellen deutlich. Kombination mit DEX erhöhte die Vitamin D₃ Wirkung nur geringfügig (Abb. 3.5.1).

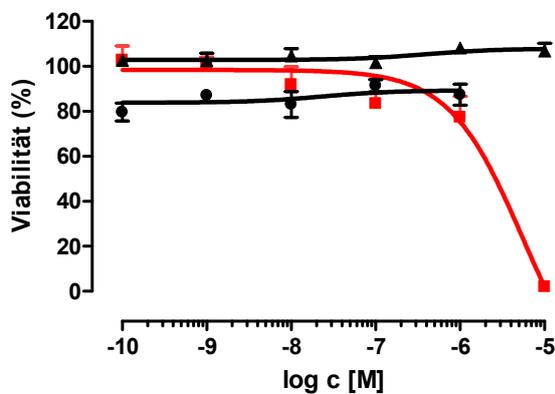


Abb. 3.5.1 MTT-Test bei SCC-25 Zellen nach 48 h Stimulation mit Dexamethason (▲), Vitamin D₃ (■) oder einer Kombination aus Vitamin D₃ und DEX (1:500) (●).

Weiterhin wurde untersucht, ob die im Arbeitskreis etablierten Endothelzellen (HBMEC) durch DEX bzw. Aphidicolin in ihrer Proliferation gehemmt werden können (Abb. 3.5.2).

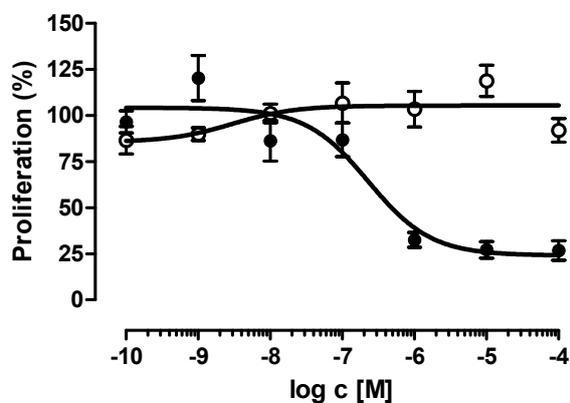


Abb. 3.5.2 Thymidin-Einbau bei HBMEC nach 24 h Stimulation mit Dexamethason (o) bzw. Aphidicolin (●).

3. Ergebnisse

Bei HBMECs konnte kein antiproliferativer Effekt von DEX gezeigt werden, wohingegen Aphidicolin stark proliferationshemmend wirkt (Abb. 3.5.2).

DEX kann bei Endothelzellen Apoptose auslösen, wobei die Wirkung auf Endothelzellen, die aus Tumorgewebe stammen (TDEC), deutlich stärker ist als auf normale Endothelzellen (39 % vs. 4 %; (Chung et al., 2007). Primäre Fibroblasten dagegen werden durch DEX vor Apoptose geschützt. Calcitriol (10 nM) kann in einigen Zellarten, wie z.B. SCC-Zellen aber auch TDECs, Apoptose auslösen. Dagegen wirkt die gleiche Konzentration in primäre Keratinozyten antiapoptotisch. Die protektiven Wirkungen werden über S1P vermittelt (Hammer et al., 2004).

Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob DEX und Calcitriol in HBMECs Apoptose auslösen oder diese vor Apoptose schützen und ob die Wirkung über S1P vermittelt wird.

Mit TNF α / Actinomycin D (Act) (20 ng/ml und 100 ng/ml) wurde Apoptose ausgelöst. Durch Präinkubation mit DEX 100 nM sollte ein möglicher antiapoptotischer Effekt gezeigt werden, der in primären Fibroblasten durch Dimethylsphingosin (DMS), einem Inhibitor der Sphingosinkinase-1, aufgehoben werden kann. DEX und Calcitriol lösten in HBMECs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Apoptose aus, konnten allerdings auch nicht vor Apoptose schützen (Abb. 3.5.3).

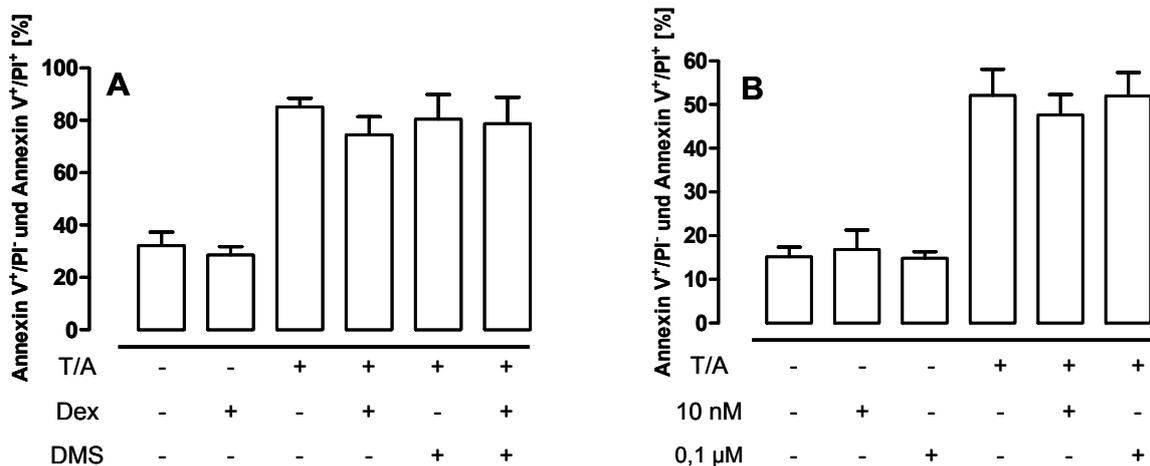


Abb. 3.5.3 Durchflußzytometrische Apoptose Untersuchung bei HBMECs mittels Annexin V / PI Doppelfärbung. **A:** Die Zellen wurden 24 h mit DEX (100 nM) und DMS (1 μ M) oder **B** Calcitriol (10 nM und 100 nm) vorbehandelt. Die Apoptose wurde durch TNF α / Act (T/A) ausgelöst.

3. Ergebnisse

DEX schützt Fibroblasten, indem es die SphK1 induziert und so die S1P Produktion erhöht. In primären Fibroblasten liegt der S1P Gehalt von unstimulierten Zellen bei ca. 450 pmol/ 10⁸ Zellen und kann bis auf über 550 pmol/ 10⁸ Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit DEX (1 µM) gesteigert werden (Hammer et al., 2004). Im Vergleich dazu ist der S1P Gehalt in HBMECs sehr gering und wird durch Stimulation mit DEX auch nicht erhöht (Abb. 3.5.4).

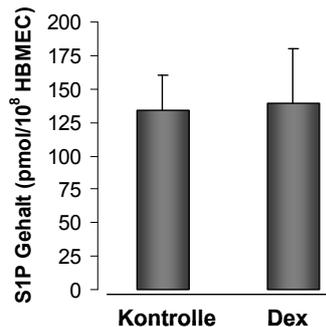


Abb. 3.5.4 HPLC Analytik zur Bestimmung des intrazellulären S1P Gehaltes von HBMECs nach Stimulation mit 100 nM DEX für 24 h

Abschließend wurde mittels RT-PCR untersucht, ob auf mRNA Ebene die SphK1 nachweisbar ist (Abb. 3.5.5). Als Positivkontrolle dienten primäre Fibroblasten. In HBMECs ist die Expression der Kinase nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 3.5.5).

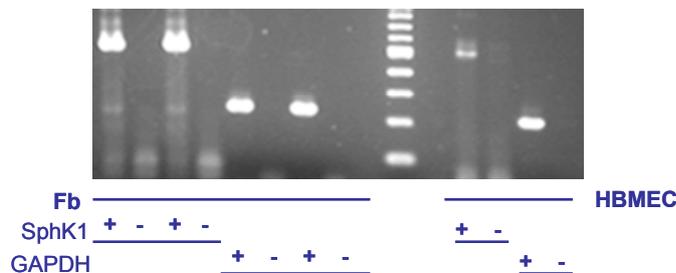


Abb. 3.5.5 Nachweis der SphK1 auf mRNA Ebene mittels RT-PCR bei HBMECs und im Vergleich zu primären Fibroblasten. Diese wurden einmal unstimuliert und einmal nach 24 h Stimulation mit DEX 100 nM untersucht.

DEX und Calcitriol wirken in HBMECs nicht antiapoptotisch, eine Beteiligung von S1P kann ausgeschlossen werden. Allerdings lösen beide Substanzen in diesen Zellen auch keine Apoptose aus. Auch die Wirkung auf die Viabilität von SCC-25 Zellen ist gering. Aufgrund dieser in-vitro Untersuchungen stellen diese Substanzen vermutlich keine Option für eine Wirkungsverstärkung bei hellem Hautkrebs bzw. für eine Erweiterung der Indikationsspektren auf Hirntumore dar.