

**In-vitro-Testung und Analytik innovativer DNA-
Polymerase- α -Hemmer, entwickelt für die topische
Behandlung von Plattenepithelkarzinomen und
Basaliomen**

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 Schwanke

aus Cottbus

Mai 2009

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

2. Gutachter: Herr Professor Dr. Burkhard Kleuser

Disputation am 11. September 2009

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

Am Institut für Pharmazie (Pharmakologie und Toxikologie)
der Freien Universität Berlin angefertigt.

Für

Meine Familie

DANKSAGUNG

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 stets interessanten Diskussionen innerhalb und außerhalb der NanoDerm-Treffen, Herrn Professor Höltje und Frau Dr. Barbara Zdrzil danke ich besonders für die gute Zusammenarbeit bei der Erstellung der Publikation zum Molecular Modelling der Polymerase-Hemmer.

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.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Ralf Zuhse und Herrn Dr. Peter Krause von der Firma Chiracon GmbH, Luckenwalde für die Synthese der Substanzen OxBu und OxHex sowie für die vielen anregenden Diskussionen im Rahmen der Entwicklung der Analytik der Polymerase-Hemmer.

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.

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

Herrn Professor Dr. Klaus Kramer und Herrn Dr. Tobias Blaschke danke ich für die Untersuchungen mit der Raman-Spektroskopie und die stets gewinnbringenden Gespräche.

Ich danke Herrn Dr. Eule, Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Knoblauch, Herrn Dr. Schildknecht sowie dem Ärzteteam des St. Joseph Krankenhauses für das Gewebematerial zur Gewinnung normaler humaner Keratinozyten und Fibroblasten.

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.

Dabei möchte ich Peggy Schlupp und Henrik Potteck für die vielen maßgeblichen Hilfestellungen bei der HPLC-Analytik danken. Darüber hinaus gilt Hannelore Gonska mein Dank für die Hilfe bei der Isolierung und Kultivierung der Zellen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Nadine Wolf, Dr. Vivian Kral und Dr. Sarah Kuchler dafür, dass ich in ihnen neben tollen Kollegen auch Freunde für das Leben gefunden habe.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern Evelyn und Rainer Schwanke, meiner Schwester Sylvia Schwanke, bei meiner Oma Antonie Hartmann und Thierry Bisso für die wertvolle Unterstützung und den liebevollen Rückhalt während der gesamten Zeit bedanken.

ORIGINALARBEITEN

Höltje, M.; Richartz, A.; Zdrzil, B.; Schwanke, A.; Dugovic, B.; Murruzzu, C.; Reißig, H.-U.; Korting, H. C.; Kleuser, B.; Höltje, H.-D.; Schäfer-Korting, M., Human polymerase α inhibitors for skin tumors: Modelling, synthesis and influence on normal and transformed keratinocytes. – Journal of Enzyme Inhibition & Medicinal Chemistry JEIMC; in press.

Blaschke, T.; Schwanke, A.; Emmendorffer, A.; Schäfer-Korting, M.; Korting, H. C.; Kramer, K.D., Tracking Tumor Growth in a 3-D Skin-Model Using Parelectric Spectroscopy. – to be submitted

Zdrzil, B.; Höltje, M.; Schwanke, A.; Schmitz, B.; Schäfer-Korting, M.; Höltje H.-D., Molecular Modeling Studies of New Potential Human DNA Polymerase alpha Inhibitors. – submitted.

Schwanke, A.; Reißig, H.-U.; Höltje, H.-D.; Zuhse, R.; Natek, M.; Höltje, M.; Richartz, A.; Zdrzil, B.; Korting, H. C.; Schäfer-Korting, M., Human polymerase α inhibitors for skin tumors. Antitumor Effects of Guanosine Phosphonate Analogs Identified by Molecular Modelling. – in progress.

POSTER

A. Richartz, A. Schwanke, M. Höltje, 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. „Targets, Drugs and Carriers“, Berlin 2007.

A. Schwanke, A. Richartz, M. Höltje, H. C. Korting, H.-U. Reißig, H.-D. Höltje, M. Schäfer-Korting: Cytotoxic Evaluation of DNA Polymerase alpha Inhibitors for the Topical Treatment of Actinic Keratosis. DPhG-Jahrestagung der deutschen pharmazeutischen Gesellschaft, Erlangen 2007.

A. Schwanke, A. Richartz, M. Höltje, H. C. Korting, H.-U. Reißig, H.-D. Höltje, M. Schäfer-Korting: Cytotoxicity of new innovative DNA Polymerase alpha inhibitors for the topical treatment of Actinic Keratosis. „nanomedicine and drug delivery symposium – Boston“ NanoDDS 07, Boston 2007.

VORTRAG

A. Schwanke, M. Höltje, H.-D. Höltje, H. C. Korting, R. Zuhse, A. Richartz, H.-U. Reißig, M. Schäfer-Korting: Innovative topische Zytostatika zur Behandlung der aktinischen Keratose. DPhG-Jahrestagung der deutschen pharmazeutischen Gesellschaft, Bonn, 2008.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>EINLEITUNG</i>	2
1.1	Aufbau der Haut	2
1.2	Formen des hellen Hautkrebses	4
1.3	Aktuelle Therapieoptionen bei hellem Hautkrebs	7
1.3.1	Physikalische Therapiemethoden	8
1.3.2	Pharmakotherapie	8
1.3.3	Kombinationstherapien	11
1.4	Kolorektal-, Mamma-, Zervix- und Blasenkarzinom	11
1.5	DNA Polymerase alpha	13
1.5.1	DNA Polymerasen	13
1.5.2	DNA Polymerase alpha und Pol- α -Primase-Komplex	14
1.5.3	Zellzyklus und Apoptose	15
1.5.4	DNA Replikation durch die Pol α	17
1.6	Hemmstoffe der DNA Polymerase alpha	17
1.6.1	Nicht-nukleosidische Hemmstoffe	17
1.6.2	Nukleosid- und Nukleotid-Analoga	19
1.7	Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	22
2	<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	25
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Zelllinien	28
2.1.4	Nährmedien und Lösungen	29
2.1.5	Säulen für die HPLC und SPE	36
2.2	Methoden	38
2.2.1	Gewinnung und Kultivierung von primären Hautzellen und Zelllinien	38
2.2.2	Viabilitätsuntersuchungen	39
2.2.3	Untersuchungen zur Zellproliferation	41
2.2.4	Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS)	42
2.2.5	HPLC Analytik	44
2.2.6	Festphasenextraktion	47
2.2.7	Statistik	48

3	<i>ERGEBNISSE</i>	50
3.1	Zellspezifische Untersuchungen	50
3.1.1	Thymidin-Analoga	51
3.1.2	Guanosin-Analoga	56
3.1.3	Guanosin-Analoga mit Phosphonatgruppe (Phosphonate)	57
3.1.4	Diethylester-Vorstufen der Phosphonate	63
3.1.5	Korrelation Molecular Modelling – Zytotoxizität	65
3.2	Analytik	66
3.2.1	Entwicklung der HPLC-Methode für die Thymin- und Guanin-Reihe	67
3.2.2	Entwicklung der HPLC-Methode für OxBu und OxHex	71
3.2.3	Entwicklung einer Festphasenextraktion	76
4	<i>DISKUSSION</i>	80
4.1	Zellspezifische Untersuchungen	80
4.1.1	Auswahl der Referenzsubstanzen und Zielzellen	81
4.1.2	Nicht-Phosphonate	85
4.1.3	Phosphonate	87
4.1.4	Ausblick – Weiterentwicklung der Phosphonate	92
4.2	Analytische Untersuchungen	95
4.2.1	Analytik der Nicht-Phosphonate	95
4.2.2	Analytik der Phosphonate	96
4.2.3	Analytik des Metabolismus	98
4.2.4	Ausblick – Weiterentwicklung der Analytik	100
5	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	103
6	<i>LITERATUR</i>	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5-Fluorouracil
ABC	ATP-binding cassette transporter
ACN	Acetonitril
AK	Aktinische Keratose
APH	Aphidicolin
Ara-C	Cytarabin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	Basal cell carcinoma (Basaliom, Basalzellkarzinom)
bp	Basenpaare
BPE	Bovine Pituitary Extract (Rinderhypophysenextrakt)
BSA	Bovines Serum Albumin
COX	Cyclooxygenase
Cpm	Counts per minute / Zählrate
dCK	Desoxycytidinkinase
DE	Diethylester
dFdC	Gemcitabin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DSMZ	Deutsches Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
dTMP	Deoxythymidin-Monophosphat
dTDP	Deoxythymidin-Diphosphat
dTTP	Deoxythymidin-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflußzytometrie)
Fb	Fibroblasten
FKS	Fetales Kälberserum

FL2	Filter für die PI-Fluoreszenz (FL2 = 564 – 606 nm)
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
G0	gap0-Phase
G1	gap1-Phase
G2	gab2-Phase
Gn	Guanin
Gs	Guanosin
GMP	Guanosin-Monophosphat
GDP	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
[³ H]-Td	mit Tritium radioaktiv markiertes Thymidin
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HaCaT	Human adult keratinocytes kept under low Calcium and elevated temperature (humane, spontan transformierte Keratinozyten Zelllinie)
hEGF	Human epidermal growth factor (humaner epithelialer Wachstumsfaktor)
hENT	human equilibrative nucleoside transporter
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HPV	humane Papilloma Viren
HT29	humane Kolorektalkarzinomzelllinie
I.U.	International Unit (internationale Einheit)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KBM	Keratinozytenbasalmedium
KCl	Kaliumchlorid
KGM	Keratinocyte growth medium (Keratinozytenwachstumsmedium)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

M	Mitose
MCF7	Mammary carcinoma F 7 cell line (Humane Brustkrebszelllinie)
MetOH	Methanol
MEME	Minimum Essential Medium Earle
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug resistance protein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na ₂ HPO ₄	Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer (Lichtwellenlänge)
Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4)
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	photomultiplier
Pol	Polymerase(n)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
Rt	Raumtemperatur
RT	Retention Time
S	Synthese
SCC4, SCC25	humane orale Plattenepithelkarzinomzelllinien (Squamous cell carcinoma)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	short interfering RNA
SISO	Adenozervikalkarzinomzelllinie
SPE	solid phase extraction
SPEC	solid phase extraction column

SSC	Sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
T24	humane Blasenkrebszelllinie
TBA-Cl	Tetrabutylammoniumchlorid (C ₄ H ₉) ₄ N ⁺ Cl ⁻
TCA	Trichloressigsäure
Td	Thymidin
TEA	Triethylamin
TK	Thymidinkinase
Tn	Thymin
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TP	Thymidinphosphorylase
UTP	Uridin-Triphosphat
UV	Ultra violett
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer Endothelwachstumsfaktor)

1 EINLEITUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von ca. 2 m² und einem Gewicht von ca. 10 % des Körpergewichts das größte Organ des menschlichen Körpers (*Walters, 2002*). Sie bildet die äußere Barriere des Organismus und schützt vor schädlichen Umwelteinflüssen – z.B. vor UV-Strahlung. Die Haut ist außerdem wesentlich an der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes, der Körpertemperatur und der Immunabwehr beteiligt. Anatomisch lassen sich drei Schichten der Haut unterteilen: die Epidermis, die Dermis (Korium) und die Subkutis, die sich unter der Kutis (Zusammenfassung von Epidermis und Dermis) befindet (Abb. 1-1). Die anatomischen und physiologischen Eigenschaften der Haut sind regional verschieden. Dabei spielen u. a. die Dicke der Epidermis, die Intensität der Pigmentierung, die Schichtdicke der Dermis und des subkutanen Fettgewebes, die Verteilung der Haarfollikel und Drüsen, die Blutgefäßversorgung, das Vorkommen von Abwehrzellen und hämodynamische Strukturen eine Rolle und beeinflussen die kutane Resorption von Substanzen und damit deren topische Anwendbarkeit (*Hornstein & Nürnberg, 1985*).

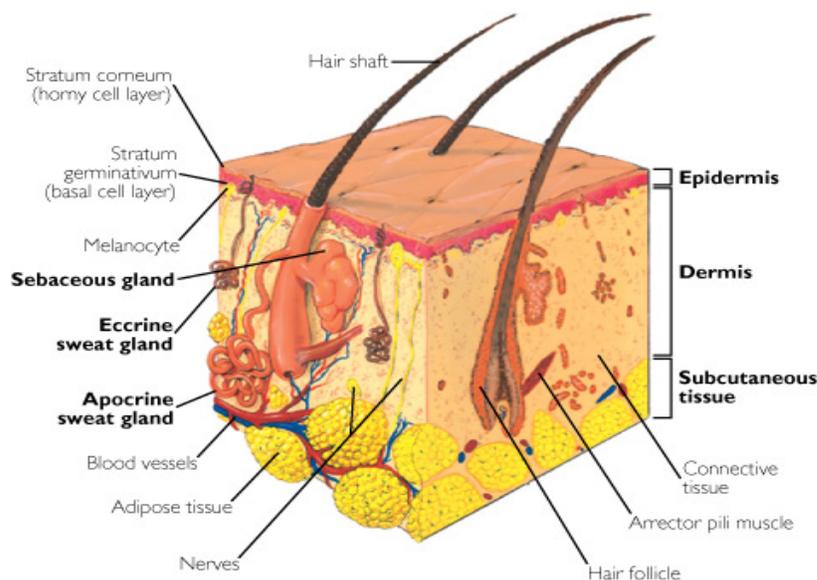


Abb. 1-1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Haut als senkrechter Schnitt. Von außen nach innen sind dargestellt die Epidermis, Dermis und Subkutis. (Bild: aus *Jarvis, 2000*)

Epidermis. Die Epidermis (Oberhaut) besteht aus einem avaskulären, mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel, das in Abhängigkeit von der Körperregion 0,04 – 1,6 mm dick ist. Durch kegelförmige Papillen ist die Epidermis mit dem vaskularisierten Korium verbunden, durch das die Epidermis ernährt wird. Circa 90 % der Epidermis bestehen aus Keratinozyten, die in der Basalzellschicht gebildet werden (Abb. 1-1) und in ihrem Differenzierungsprozess zur Oberfläche hin zunehmend abflachen und verhornen. Daneben findet man Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen. Im Querschnitt der Haut unterscheidet man von außen nach innen vier Schichten der Epidermis: das Stratum corneum (Hornschicht), das Stratum granulosum (Körnerschicht) sowie das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalzellschicht); letztere werden als Stratum germinativum (Keimschicht) zusammengefasst (Abb. 1-2). Das Stratum lucidum (Glanzschicht) kommt nur an der Leistenhaut der Hände und Füße vor und bildet dort den Übergang vom Stratum corneum zum Stratum granulosum.

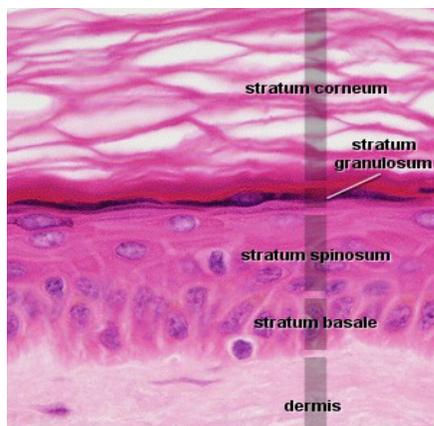


Abb. 1-2: Querschnitt durch die Epidermis mit den vier Epidermisschichten Stratum corneum, granulosum, spinosum und basale (von außen nach innen). Hautschnitt mit H.E.-Färbung, 200-fach vergrößert (Bild: J. Jackson, 1999, Mississippi College, Clinton).

Das Stratum corneum besteht aus ca. 10 – 15 Schichten von verhornten und im Gegensatz zu den anderen Epidermisschichten kernlosen („toten“) Zellen (Korneozyten) und stellt als ein sehr dichtes und wenig hydriertes Gewebe (Wassergehalt 15 – 20 %) das Barriere- und Speichersystem der Haut dar (Walters, 2002). Diese Barrierefunktion wird der Lipidmatrix zugeschrieben, die aus Ceramiden (40 %), Cholesterol (27 %), Cholesterylestern (10 %) und Fettsäuren (9 %) zusammengesetzt ist (Wertz et al., 1989). Die Korneozyten selbst bestehen aus einem Keratingerüst, das aus Keratinfilamenten gebildet wird, die unter dem Einfluß von Filaggrin vernetzt sind, und das zusätzlich durch Involucrin stabilisiert wird. Involucrin ist ein Protein, das sich im Stratum granulosum an der Innenseite der Zellmembran anlagert und durch Quervernetzung eine sehr rigide Hülle um die Keratinmatrix bildet (cornified envelope; Eckert et al., 1993). Das Stratum granulosum ist 2 – 5 Lagen dick und enthält

Keratohyalingranula und Lamellenkörper. Das darunterliegende Stratum spinosum enthält polygonale, leicht abgeflachte Zellen, die miteinander durch Desmosomen verbunden sind (Cozzani *et al.*, 2000). Keratin-Tonofibrillen formieren ein zytoplasmatisches Stützskelett. Die Regeneration der Epidermis erfolgt im Stratum basale. Hier finden sich zwei Typen von Keratinozyten, wobei ein Zelltyp Stammzellfunktion aufweist und durch Teilung neue Keratinozyten bildet und der andere durch Hemidesmosomen für die Verankerung in der Basalmembran sorgt (Walters, 2002). Das epidermale Kompartiment weist eine hohe metabolische Aktivität auf, insbesondere durch Esterasen (Gysler *et al.*, 1997; Ngawhirunpat *et al.*, 2003).

Dermis. Die wichtigste Aufgabe der Dermis (Korium, Lederhaut) besteht in der Versorgung der Epidermis. Die Dermis gliedert sich in das Stratum papillare und reticulare. Dabei sorgen Kollagen- und Elastinfasern für die Festigkeit und Elastizität der Haut. Neben Mastzellen, Lymphozyten und Makrophagen finden sich in der Koriummatrix hauptsächlich Fibroblasten, die ebenfalls metabolische Enzyme (Sulfotransferasen, Cytochrom-P450-Isoformen) bilden (Oesch *et al.*, 2007). Darüber hinaus befinden sich in der Dermis Blut- und Lymphgefäße, Sinnesrezeptoren sowie Hautdrüsen und Haarwurzeln.

Subkutis. Die Subkutis (Unterhaut) ist ein lamellar gebautes Bindegewebe, in das vor allem Fett eingelagert ist (Panniculus adiposus), welches dem Kälteschutz dient und einen Energiespeicher darstellt. Eingelagert in die Subkutis findet man größere Blut- und Lymphgefäße, Nerven und Schweißdrüsen.

1.2 Formen des hellen Hautkrebses

Die Inzidenz von Hautkrebs hat in den letzten Jahrzehnten, auch aufgrund des veränderten Freizeit- und Sonnenverhaltens der Bevölkerung stark zugenommen. Nahezu 90 % von circa 100.000 jährlich in Deutschland neu diagnostizierten Fällen des Basal- und Plattenepithelkarzinoms und von circa einer Million Fälle in den USA sind eine Folge von zu hoher UV-Licht-Exposition. Basal- und Plattenepithelkarzinom sowie dessen Frühform – die Aktinische Keratose – werden häufig unter dem Begriff „heller Hautkrebs“ zusammengefasst und damit von dem „dunklen (schwarzen) Hautkrebs“, dem malignen Melanom abgegrenzt, das die deutlich aggressivere Krebsform darstellt und unbehandelt zum Tod führt. Die Mehrheit der hellen Hauttumoren sind semimaligne Basalzellkarzinome (Basaliome, 80 %),

die selten Metastasen (0,03 %) bilden (*Anwar et al., 2004*). Das Plattenepithelkarzinom (Spinaliom, Spinalzellkarzinom, SCC) gilt als zweithäufigster bösartiger Hauttumor. Nachdem die Aktinische Keratose lange als Krebsvorstufe für das Plattenepithelkarzinom galt, betrachtet man sie heute als Carcinoma in situ. In circa 5 – 10 % der Fälle gehen Aktinische Keratosen innerhalb von 10 Jahren in ein Plattenepithelkarzinom über (*Anwar et al., 2004; Stockfleth & Kerl, 2006; Stockfleth, 2008*), bzw. 97 % der kutanen Spinaliome entwickeln sich nachweislich aus einer zuvor diagnostizierten Aktinischen Keratose (*Hurwitz & Monger, 1995*).

UV-Strahlung und Mutationen. Der Wellenlängenbereich des elektromagnetischen Spektrums von 1 – 400 nm wird als ultraviolette Strahlung bezeichnet. Diese ist kurzwelliger und daher energiereicher als das sichtbare Licht (400 – 800 nm). Man unterscheidet UV-C- (100 – 280 nm), UV-B- (280 – 320 nm) und UV-A-Strahlung (320 – 400 nm). Für die Schäden an der Haut sind die UV-B- und UV-A-Strahlung von Bedeutung, wobei die UV-B-Strahlung nur in die Epidermis eindringt, während UV-A-Strahlung bis in das Korium gelangt. Durch Zerstörung des Kollagenfasernetzes führt UV-A-Strahlung langfristig zu Strukturveränderungen im Bindegewebe und somit zur Hautalterung. UV-B-Strahlung bewirkt eine Verdickung des Stratum corneum (sogenannte Lichtschwiele) und durch Aktivierung von Melanozyten die Pigmentierung. Hohe Dosen UV-B induzieren akute Hautschäden in Form von Erythemen (Sonnenbrand) – häufige, starke UV-B-Exposition führt zu DNA-Schäden in den teilungsaktiven Keratinozyten des Stratum basale (*Matsumura & Ananthaswamy, 2004*). Es kommt zur Bildung von Purin- und Pyrimidin-Dimeren oder zum (Doppel-)Basenaustausch (*Brash et al., 1991; Ziegler et al., 1993*) – Genmutationen, die u.a. das Tumorsuppressorprotein p53 und die Telomerase betreffen, sind die Folgen. p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose sowie an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Sowohl bei Aktinischer Keratose als auch bei Plattenepithelkarzinomen können p53-Mutationen detektiert werden. Mutationen der Telomerase erhöhen die Aktivität dieser reversen Transkriptase, wodurch es nicht zu einer Verkürzung der Telomeren bei der Zellteilung kommt, was zu einem unkontrollierten Wachstum entarteter Zellen führt (*Burren et al., 1998; Balasubramanian et al., 1999; Lin & Lowe, 2001; D’Errico et al., 2007*).

Aktinische Keratose. Die Aktinische Keratose (AK, Abb. 1-3) gilt als benignes, nicht metastasierendes Plattenepithelkarzinom in situ, entsteht vorzugsweise bei dauerhaft lichtgeschädigter Haut und zeichnet sich durch eine Proliferation atypischer Keratinozyten in den tieferen Epidermisschichten aus; die Basalmembran ist noch nicht durchbrochen. Diese Läsionen können sich zurückbilden, entwickeln sich aber in circa 5 – 10 % der Fälle zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom (*Glogau, 2000; Anwar et al., 2004; Stockfleth & Kerl, 2006; Stockfleth, 2008*). Aktinische Keratosen entstehen vor allem in den lichtexponierten Regionen. Zu diesen Lichtterrassen zählen Gesicht, Stirn, Kopf (Glatze), Hände und Unterarme. Im Frühstadium zeigen sich scharf begrenzte Erytheme mit leichter Schuppung und hervortretenden, erweiterten Blutgefäßen (Teleangiektasien). Später entwickeln sich 0,2 – 1 cm große, scharf begrenzte, rötliche Knötchen (Papeln), die graubraun verhornt sind. Meist treten mehrere Läsionen gleichzeitig auf, dies wird als Feldkanzerisierung bezeichnet. Biopsie und konfokale Mikroskopie können die Diagnose der AK unterstützen und bestimmte Formen des Melanoms oder des Basalioms abgrenzen (*Anwar et al., 2004; Stockfleth & Kerl, 2006*).



Abb. 1-3: Beispiele für Aktinische Keratosen. Vorkommen hauptsächlich auf den sogenannten Lichtterrassen wie Kopf (1) und Hände (2). (Bilder: Klinik für Dermatologie u. dermatol. Allergologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Plattenepithelkarzinom (SCC). Das Plattenepithelkarzinom ist ein maligner (metastasierender) Tumor, der ebenfalls vor allem auf den Lichtterrassen des Körpers auftritt. Plattenepithelkarzinome entwickeln sich meist aus einer Aktinischen Keratose. Die Häufigkeit korreliert mit der kumulativen UV-Dosis, die während eines Lebens auf die Haut trifft (*Riede & Schaefer, 1999*). Dabei sind hellhäutige Menschen oder immunsupprimierte Personen höheren Alters besonders häufig betroffen (*Anwar et al., 2004*). Patienten mit Xeroderma pigmentosum, die genetisch bedingt eine verminderte Fähigkeit zur DNA-Reparatur aufweisen und daher besonders UV-empfindlich sind, besitzen ein 1000-fach erhöhtes Risiko, eine Hautkrebsform zu entwickeln (*Cleaver, 2000*). Der Nachweis humaner Papilloma Viren (HPV) Typ 16 lässt die Beteiligung einer HPV-Infektion an der

Tumorgenese vermuten (*Bulk et al., 2006; Näsman et al., 2009*). Beim invasiven SCC invadieren die neoplastisch entarteten Keratinozyten in die Dermis, später können sich vornehmlich in den lokalen Lymphknoten Metastasen bilden (*Anwar et al., 2004*). Im klinischen Erscheinungsbild imponieren Plattenepithelkarzinome als hautfarbene bis rötliche, verhornte Knötchen oder Knoten, die teilweise aufgebrochen und mit Krusten bedeckt sein können (Abb. 1-4).



Abb. 1-4: Beispiel für ein Plattenepithelkarzinom. Es ist ein rötlicher Tumor mit zentraler Hornkruste zu erkennen. (Bild: I. Nuhn, 2007, Philipps-Universität Marburg, Klinik für Dermatologie und Allergologie)

Basaliom. Der häufigste helle Hautkrebs tritt vor allem zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf und nimmt seinen Ausgang von den basalen Epidermisschichten und den Haarfollikeln (*Krüger et al., 1999*); Basaliome wachsen langsam, lokal infiltrierend und destruierend, metastasieren aber nur selten und werden daher als semimaligne bezeichnet. Die Tumorzellen sind nämlich nicht vollautonom, sondern stromaabhängig – daher die seltene Metastasierung und das kontinuierliche Wachstum im Zellverband (*Krüger et al., 1999*). Für das Basaliom gibt es keine Frühform; zu den Risikofaktoren zählen starke UV-A-Exposition bei sonnenempfindlicher Haut (Hauttyp 1 und 2). Anfangs zeigen sich kleine, harte Knoten ("Basaliomperlen"), später kommt es zu Ulzerationen und Destruktionen (*Domarus & Stevens, 1984*)

1.3 Aktuelle Therapieoptionen bei hellem Hautkrebs

Da eine Voraussage, ob eine Aktinische Keratose in ein invasives Plattenepithelkarzinom übergeht und ein Metastasierungsrisiko birgt, nicht sicher getroffen werden kann, ist es wichtig, die Läsionen effizient zu behandeln (*Glogau, 2000*). Bei der Wahl der Therapieoption spielen folgende Faktoren eine Rolle: Ausprägung, Lokalisation und Fortschreiten der Läsion; Einzel- oder Mehrfachläsionen (Feldkanzerisierung), Immunstatus (z.B. Transplantatempfänger) und Krankheitsgeschichte (Tumoranamnese) des Patienten. Für die Sicherung der Diagnose und zur Abschätzung der Tumorausprägung wird in der Regel mittels Biopsie eine Gewebeprobe entnommen und mikroskopisch untersucht. Therapeutisch

stehen sowohl physikalische Methoden als auch pharmakologische Ansätze zur Verfügung (*Stockfleth & Kerl, 2006*).

1.3.1 Physikalische Therapiemethoden

Kryotherapie. Die Kryotherapie ist die dominierende physikalische Behandlungsmethode und wird vor allem bei multiplen Läsionen von AK, SCC und Basaliom angewandt. Mit flüssigem Stickstoff werden die krankhaften Hautpartien vereist und so entfernt. Die Kryotherapie ist hinsichtlich Anwendungsdauer, -intensität und -frequenz nicht standardisiert, erzielt aber sehr zuverlässige Ergebnisse. Nachteilig ist die Gefahr, auch gesundes Gewebe neben und unter der Läsion (Dermis) zu schädigen sowie die Narbenbildung (*Lober & Fenske, 2004; Stockfleth & Kerl, 2006*).

Chirurgische Exzision und Küretage. Scharf begrenzte Läsionen werden mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm chirurgisch entfernt. Ist diese Standardtherapie nicht möglich, kann die Läsion ausgeschabt werden. Die Küretage wird hauptsächlich bei multiplen Läsionen angewandt. Beide Methoden erfordern eine örtliche Betäubung und hinterlassen Narben (*Lober & Fenske, 2004; Stockfleth & Kerl, 2006*).

Lasertherapie. Hierbei wird mit nahem Infrarotlicht, das besonders stark in den obersten Gewebeschichten absorbiert wird, eine Zerstörung der epidermalen Läsionen erreicht. Einzel- und Mehrfachläsionen können zuverlässig auf diese Weise behandelt werden. Nachteilig sind Nebenwirkungen wie Schmerz, Entzündungsreaktionen und Narbenbildung (*Lober & Fenske, 2004; Stockfleth & Kerl, 2006*).

1.3.2 Pharmakotherapie

5-Fluorouracil (5-FU). 5-FU wird zunächst durch die Thymidinphosphorylase (TP) zu FdUR umgesetzt und anschließend durch die Thymidinkinase 1 (TK1) zum Fluoro-Nukleosid-Monophosphat (FdUMP) aktiviert. FdUMP hemmt die Thymidylatsynthetase und verhindert so die Methylierung von Deoxyuridylat zu Thymidylat – die Bereitstellung von Thymidylat limitiert die DNA-Synthese. Als Antimetabolit mit Strukturähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin (DNA) beziehungsweise Uracil (RNA) wird 5-FU zudem anstatt der

physiologischen Nukleotide in die DNA und RNA eingebaut, diese DNA ist nicht funktionsfähig (Gupta et al., 2005).

5%ige 5-FU-Salbe (Efudix®) ist für die Behandlung Aktinischer Keratosen seit vielen Jahren zugelassen, das Arzneimittel wird zweimal täglich über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen auf die betroffenen Hautstellen aufgetragen. Eine vollständige Beseitigung von Aktinischen Keratosen gelingt in etwa 50 – 75 % der Fälle und die Rezidivrate beträgt bis zu 55 % (Levy et al., 2001; Lawrence et al., 1995; Stockfleth & Kerl, 2006). 5-FU führt häufig zu Hautentzündungen, Juckreiz, Schmerzen, sowie Erosionen bis hin zu Ulzerationen. Bei ca. 5 bis 10 % der Bevölkerung besteht ein Polymorphismus und damit ein Enzymdefizit der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase, wodurch es bei großflächiger topischer Anwendung von 5-FU in seltenen Fällen zu lebensgefährlichen Komplikationen wie z.B. toxischer Agranulozytose kommen kann (Johnson et al., 1999). Die intermittierende, einmal wöchentliche Applikation von 5%iger 5-FU-Creme besserte die Verträglichkeit (Pearlman, 1991) – geringere Ansprechraten schließen diese Therapie jedoch aus (Epstein, 1998). Weitere Studien erfolgten mit einer 0,5%igen 5-FU-Creme sowie einer mikropartikulären Zubereitung („microsponges“, Carac™). Die Microsponges fördern das Eindringen von 5-FU in die läsionale Haut, die entsprechende Zubereitung wird einmal täglich über 1 – 4 Wochen angewandt, wobei die Effizienz mit der Behandlungsdauer steigt. Die Wirksamkeit dieser mikropartikulären Zubereitung sowie der 0,5%igen 5-FU-Creme ist der 5%igen Zubereitung nicht unterlegen, induziert aber deutlich weniger Nebenwirkungen (Jorizzo et al., 2002; Loven et al., 2002; Weiss et al., 2002; Jorizzo, 2004b; Jorizzo et al., 2004c). Gegenwärtig ist in Deutschland jedoch nur die 5%ige Zubereitung zur topischen Anwendung verfügbar.

Die intraläsionale Anwendung von 5-FU ist lange bekannt und wird für einzelne Läsionen, die chirurgisch nicht entfernt werden können, als eine effektive, nebenwirkungsarme Variante mit guten kosmetischen Ergebnissen beschrieben (Odom & Goette, 1978; Goette & Odom, 1980; Eubanks et al., 1982). Diese Methode eignet sich nicht für multiple oder lang bestehende Läsionen oder für die Behandlung eines SCC (Morse et al., 2003).

Diclofenac-Hyaluronsäure. Das Arylsäurederivat Diclofenac hemmt sowohl Cyclooxygenase-1 (COX1) als auch COX2. Bei epithelialen Tumoren ist COX2 überexprimiert und vermehrt gebildetes PGE₂ fördert die Proliferation der entarteten Zellen, die Neoangiogenese des Tumors, hemmt die Apoptose und kann so das Tumorwachstum beschleunigen (Buckman et al., 1998; Lee et al., 2003). Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die keine Beteiligung der COX2 an der Tumorentwicklung nahelegen (Vogt

et al., 2001). Möglicherweise wirkt Diclofenac über einen PGE₂-unabhängigen Weg; z.B. kann durch Hemmung der COX2-Peroxidase-Aktivität der Redoxstatus der Zelle beeinflusst und ein gestörtes Zellwachstum verhindert werden (*Higashi et al., 2000*).

Zur topischen Anwendung bei AK steht Diclofenac als 3%iges Gel mit 2,5 % Hyaluronsäure zur Verfügung (Solaraze[®]). Die Bedeutung der Hyaluronsäure in diesem Präparat ist nicht endgültig geklärt, sie sichert vermutlich die adäquate Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes Diclofenac am Wirkort (*Moore & Willoughby, 1995*). Die Anwendung erfolgt zweimal täglich über 60 bis 90 Tage, wobei die Ansprechraten je nach Anwendungsdauer bei 60 bis 80 % liegen (*Rivers et al., 2002; Stockfleth & Kerl, 2006*). Als unerwünschte Wirkungen sind lokale Irritationen (Pruritus, Rötung, trockene Haut) und Sensibilisierungen bekannt (*Stockfleth & Kerl, 2006*).

Photodynamische Therapie. Bei der photodynamischen Therapie (PDT) zerstören Photosensitizer selektiv atypische Keratinozyten. Die PDT ist zur Behandlung der Aktinischen Keratose und oberflächlicher Basaliome zugelassen. Topisch appliziert werden 5-Aminolävulinsäure oder Methylaminolävulinat. Die Arzneistoffe penetrieren 3 – 4 mm tief in die Haut, der aktive Metabolit Protoporphyrin IX akkumuliert aufgrund eines erhöhten Metabolismus in Tumorzellen. Bei Bestrahlung mit hochenergetischem Licht im roten Spektralbereich (650 – 750 nm) entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die Kohlenstoff-Doppelbindungen zerstören und damit den Untergang von Tumorzellen einleiten. Die Ansprechraten liegen bei 70 – 90 % (*Pariser et al., 2008*). Für die palliative Therapie des Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereich wird Temoporfin verwandt. Die PDT ist der Kryotherapie kosmetisch überlegen; negative Effekte der PDT sind Schmerz und erhöhte Photosensitivität (*Jorizzo, 2004a; Rhodes et al., 2004; Stockfleth & Kerl, 2006*).

Imiquimod. Imiquimod ist ein spezifischer Toll-like-Rezeptor-7-Agonist, der zur Klasse der Immune Response Modifier (IRM) gehört. Es induziert die Synthese und Freisetzung von Zytokinen (IFN-alpha, IL-1, IL-6, IL-12 und TNF-alpha), die die zelluläre Immunantwort steigern (Makrophagen, zytotoxische T-Lymphozyten) und dadurch antivirale und antitumorale Eigenschaften besitzen (*Gupta et al., 2005*). Zweimal wöchentlich über 16 Wochen angewendet, reduzierte eine 5%ige Imiquimod-Creme bei 50% der Patienten AK-Läsionen zu 83% (*Lebwohl et al., 2004*). Unerwünschte Effekte der Imiquimod-Therapie („off-label-use“) sind u.a. Rötungen, Juckreiz, Schmerzen, sowie systemische

Nebenwirkungen wie Gelenk-, Muskel-, Kopfschmerzen und selten Fieber (*Stockfleth & Kerl, 2006*).

Retinoide. Retinoide sind natürliche Vitamin-A-Derivate und werden „off label“ zur Therapie der Aktinischen Keratose eingesetzt, Retinaldehyd wirkt antioxidativ. Nebenwirkungen der topischen Retinoidanwendung sind gesteigerte Sonnenempfindlichkeit, Erytheme, Juckreiz und Schmerz (*Stockfleth & Kerl, 2006*).

1.3.3 Kombinationstherapien

Die Prognose für Plattenepithelkarzinome ist nach wie vor schlecht. SCCs sind nicht immer operabel und besitzen – wie beschrieben – eine unterschiedliche Metastasierungspotenz. Strahlen- und Chemotherapie werden deshalb kombiniert und neoadjuvant oder adjuvant zu einer Tumoresektion eingesetzt. Die neoadjuvante Radiochemotherapie gilt als aggressiver, nebenwirkungsreicher und belastender für den Patienten, führt aber zu einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit als das konventionelle Vorgehen mit postoperativer Bestrahlung (*Garden et al., 2004; Keßler et al., 2007*). Radiotherapie in Kombination mit 5-FU und Mitomycin C oder 5-FU und Cisplatin ist der alleinigen Radiotherapie überlegen (*Fietkau et al., 1991; Budach et al., 2003; Ernst-Stecken et al., 2004*). Des Weiteren gibt es Therapieschemata, die initial eine Gabe von Cisplatin in Kombination mit Epirubicin und Paclitaxel (CEP) vorsehen, gefolgt von einer Strahlentherapie und wöchentlicher Paclitaxelgabe (*Fountzilias et al., 2005*). Bei metastasierenden Plattenepithelkarzinomen wird eine Interferon-alpha-Therapie, gegebenenfalls in Kombination mit Retinoiden versucht (*Garbe, 2005*).

1.4 Kolorektal-, Mamma-, Zervix- und Blasenkarzinom

Kolorektalkarzinom. Darmkrebs ist in Deutschland mit einer 6%igen Erkrankungsrate die zweithäufigste Krebserkrankung, wobei kolorektale Karzinome mehr als 95 % der Darmtumoren ausmachen und eine starke Metastasierungstendenz aufweisen (*Wiesinger, 1999*). Kolorektalkarzinome entstehen fast immer aus anfangs gutartigen Darmpolypen (Schleimhautgeschwülsten), die keine Symptome verursachen. Im späteren Verlauf kann es zu Blutungen, Einengungen des Darmlumens, Darmverschluss und Perforation der Darmwand

sowie zu Lymphknoten-, Leber- und Lungenmetastasierungen kommen. Neben der operativen Resektion als Mittel der Wahl werden im Stadium III (Dukes C) neoadjuvant verschiedene Kombinationen von Folinsäure, 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin und Capecitabin (5-FU-Prodrug) eingesetzt, des Weiteren werden die monoklonalen Antikörper Bevacizumab (gegen VEGF), Cetuximab und Panitumumab (beide gegen EGFR) in die Therapie eingebunden (*Wiesinger, 1999; Fietkau & Klautke, 2005*).

Mammakarzinom. Das Mammakarzinom zählt zu den Tumoren mit der stärksten Metastasierungstendenz (Knochen, Lunge, Leber) und ist für ca. 25 % aller Malignomneuerkrankungen bei Frauen verantwortlich, wobei etwa 5 % durch Mutationen in den Breast-Cancer-Genen BRCA1 und BRCA2 erblich bedingt sind (*Antonίου et al., 2003*). Mammakarzinome können hormonabhängig wachsen, wobei Estrogen als promoting-factor wirkt (*Bastert, 1990*). Neben der operativen Resektion als Mittel der Wahl werden verschiedene Zytostatikakombinationen aus Cyclophosphamid, Epirubicin, 5-Fluorouracil, Methotrexat und Taxanen angewandt. Bei hormonsensitiven Karzinomen kann zusätzlich die Estrogen bedingte Tumorprogression durch Estrogenrezeptorantagonisten wie Tamoxifen oder monoklonale Antikörper wie Trastuzumab (gegen den HER2/neu-Wachstumsfaktor gerichtet) gehemmt werden. Aromatasehemmer wie Anastrozol blockieren direkt die Estrogensynthese (*Bastert, 1990; Kreienberg et al., 2004*).

Zervixkarzinom. Das Zervixkarzinom ist der zweithäufigste bösartige Tumor bei Frauen. Die Mehrheit aller invasiven Zervixkarzinome sind Plattenepithelkarzinome (80 %), gefolgt von Adenokarzinomen (5 – 15 %). In 70 % der Zervixkarzinome können die humanen Papilloma Viren (HPV) Typ 16 und 18 nachgewiesen werden (*Kainz et al., 1995; Beckmann et al., 2007/2008*). Derzeit sind drei HPV-Impfstoffe zugelassen – Gardasil[®] und Silgard[®] gegen die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 (tetravalent) sowie Cervarix[®] gegen die HPV-Typen 16 und 18 (bivalent). Adjuvant zur Operation werden Cisplatin, Carboplatin, Ifosfamid und Topotecan, gegebenenfalls auch in Kombination mit Anthrazyklinen, Mitomycin, Bleomycin oder Taxanen eingesetzt (*Pfleiderer, 1998; Beckmann et al., 2007/2008*).

Blasenkarzinom. Das Blasenkarzinom ist die fünfthäufigste bösartige Tumorerkrankung, die meist von den Papillomen der Harnblasenschleimhaut ausgeht und auch durch chronische Harnblasenentzündungen und -infektionen ausgelöst werden kann, welche vornehmlich Plattenepithelkarzinome bedingen – die im Rahmen der Entzündungsreaktion entstehenden

Nitrosamine begünstigen die Pathogenese (*Huland & Friedrich, 2006; Manski, 2008*). Neben einer vollständigen Entfernung der Harnblase und der umliegenden Lymphknoten (Zystektomie), werden Strahlentherapie und hochdosierte Polychemotherapie mit Methotrexat, Vinblastin, Cisplatin und Adriamycin bzw. Epirubicin angewandt, allerdings weisen Blasenkarzinome eine hohe Rezidivrate auf (*Huland & Friedrich, 2006; Manski, 2008*).

1.5 DNA Polymerase alpha

1.5.1 DNA Polymerasen

Die zelluläre DNA-Synthese wird durch DNA-Polymerasen (Pol) katalysiert. Seit der Entdeckung der DNA-Polymerase durch A. Kornberg 1957 sind eine stetig wachsende Zahl an strukturell und funktional unterschiedlichen Isoformen beschrieben worden (*Kornberg, 1988; Patel & Loeb, 2001; Hübscher et al., 2002*). Diese sind in eukaryotischen Zellen für die DNA-Synthese, d.h. für die Replikation, die Reparatur und die Rekombination verantwortlich. DNA-Polymerasen haben zusätzlich regulatorische Funktionen wie die Überwachung und gegebenenfalls das Anhalten des Zellzyklus und der DNA-Synthese, so dass registrierte DNA-Schäden erst repariert werden können, bevor der Zellzyklus fortschreitet (*Wang, 1991*). In den letzten Jahren wurden insgesamt 19 Polymerasen identifiziert – unter anderem die Polymerasen alpha (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ), eta (η), theta (θ) und iota (ι) (*Hübscher et al., 2000; Hübscher et al., 2002*). Anhand von Sequenzhomologien wurden die bisher identifizierten, prokaryotischen, eukaryotischen und viralen DNA-Polymerasen in sieben Familien unterteilt: A, B, C, D, X, Y und Reverse Transkriptasen (Tab. 1-1), wobei den Polymerasen innerhalb dieser Hauptgruppen unterschiedliche Aufgabenbereiche zugeordnet werden können. DNA-Polymerasen der Familie B, C und D scheinen an der Replikation chromosomaler DNA beteiligt zu sein, während DNA-Polymerasen der Familie A die Replikation mitochondrialer DNA katalysieren. Mitglieder der Familie Y zeichnen sich dadurch aus, dass sie DNA-Schäden im Templatstrang umgehen können und so ein Abbruch der DNA-Synthese verhindern (*Filée et al., 2002*). Die eukaryotischen DNA-Polymerasen α , β , γ , δ und ϵ sind besonders gut untersucht, wobei Pol α , β , δ und ϵ im Kern vorkommen, Pol γ katalysiert in den Mitochondrien die Replikation mitochondrialer DNA. Pol α , δ und ϵ sind replikative Enzyme (Gruppe B), während Pol β (Gruppe X) ein reines Reparaturenzym ist (*Hübscher et al., 2002*). Die prokaryotische

Polymerase RB69 gehört zu den alpha-ähnlichen Polymerasen (*Patel & Loeb, 2001*) und war Grundlage der Entwicklung eines 3-D-Modells des aktiven Zentrums der Pol α (*Richartz et al., 2008*).

Tab 1-1: Einteilung der prokaryotischen, eukaryotischen und viralen DNA-Polymerasen (modifiziert nach *Patel & Loeb, 2001; Fillée et al., 2002; Hübscher et al., 2002*)

Familie	Prokaryota	Eukaryota	Viren
A	Pol I	Pol γ	T3, T5, T7 Pol
B	Pol II	Pol $\alpha, \delta, \epsilon, \zeta$	Adenovirus, HSV, RB69, T4, T6 Pol
C	Pol III		
D			
X		Pol β, θ	
Y	Pol IV, V	Pol η, ι	
Reverse Transkriptase		Telomerase	Reverse Transkriptase

1.5.2 DNA Polymerase alpha und Pol- α -Primase-Komplex

Der Pol- α -Primase-Komplex ist ein heterotetrameres Enzym. Die Untereinheiten p180 und p70 bilden die eigentliche Polymerase α , die Untereinheiten p58 und p49 tragen die Primase-Aktivität (*Copeland & Wang, 1991; Wang, 1991*). Nur die Primase-Untereinheit p49 ist zur DNA-Synthese de novo fähig, erlangt aber erst im Komplex mit der p58-Untereinheit ihre volle Aktivität. Die katalytische Untereinheit der Pol α (p180) wird posttranslational glycosyliert und in Abhängigkeit vom Zellzyklus phosphoryliert (s. 1.5.3; *Nasheuer et al., 1991*). p180 besitzt drei separate Domänen:

- eine N-terminale Domäne (Aminosäure 1–329)
- eine zentrale Domäne (Aminosäuren 330–1279), die alle hoch konservierten Regionen (s.u.), die für das Binden der DNA, der Nukleotide und die Phosphatabspaltung verantwortlich sind, enthält
- eine C-terminale Domäne (Aminosäuren 1235–1465), die offenbar für die Interaktionen mit den anderen Untereinheiten wichtig ist (*Hübscher et al., 2002*).

Die Struktur der Polymerasen wird häufig mit der Finger- (finger), Daumen- (thumb) und Handflächenregion (palm) einer rechten menschlichen Hand verglichen (Abb. 1-5; *Albà,*

2001; Patel & Loeb, 2001). Vergleicht man die alpha-ähnlichen Polymerasen, so kann die virale Pol RB69 ein geeignetes Strukturmodell für andere Polymerasen der B-Familie liefern (Abb. 1-5; Franklin et al., 2001). Für die katalytische Aktivität des Enzyms ist der Wechsel von der „offenen“ in die „geschlossene“ Form wichtig. In der „offenen“ Form ist die Fingerregion 60° von der Handflächenregion wegrotiert. In der „geschlossenen“ Form bilden ein Arginin- und zwei Lysinreste Wasserstoffbrückenbindungen mit den Phosphatgruppen des Substrats – einem Deoxynukleosidtriphosphat. Der Einbau des Substrats in die DNA unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes wird durch einen Mechanismus katalysiert, an dem zwei zweiwertige Metallionen (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) und zwei Aspartatreste (Asp 1002 und 1004) beteiligt sind (Copeland & Wang, 1993; Richartz et al., 2008). Es gibt zwar noch kein komplettes 3D-Modell der humanen Pol- α , doch wurde die 3-dimensionale Struktur für den aktiven Bereich des Enzyms (Aminosäuren 836 – 1102) inklusive der Finger-, Daumen- und Handflächenregion mittels Molecular Modelling konstruiert (Richartz et al., 2008).

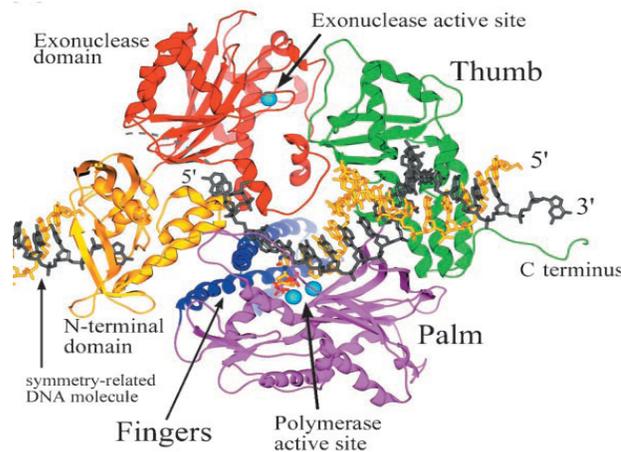


Abb. 1-5: Finger-, Handflächen- und Daumenregion (finger, palm, thumb) der RB69 Polymerase, einer alpha-ähnlichen Polymerase der B-Familie; dargestellt im trimeren Komplex mit dem Primer/Template und dTTP (Franklin et al., 2001).

1.5.3 Zellzyklus und Apoptose

Der Zellzyklus umfasst die grundlegenden Prozesse von Wachstum und Vermehrung einer Zelle, in denen die Verdopplung der DNA und die Weitergabe der genetischen Information an zwei identische Tochterzellen stattfinden. Die DNA-Synthese erfolgt in der S-Phase (Synthese), die Aufteilung der DNA in der M-Phase, welche aus Mitose (Aufteilung der Chromosomen) und Cytokinese (Teilung der Zelle) besteht. Zwischen M- und S-Phase liegt die G1-Phase (gap 1), in der Zellwachstum und Proteinsynthese stattfindet. Nach der S-Phase folgt die G2-Phase (gap 2), in welcher die erfolgreiche DNA-Replikation sichergestellt wird.

Die G1-, S- und G2-Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet. Ruhende Zellen gehen von der G1- in die G0-Phase über, können aber durch Wachstumsfaktoren in den Zellzyklus zurückkehren. Der Zellzyklus unterliegt einer komplexen Regulation, für welche vor allem Cycline, Cyclin-abhängige Proteinkinasen (CDK) und diese Kinasen inhibierende Proteine (INK) verantwortlich sind (Abb. 1-6). Wichtige Kontrollpunkte befinden sich vor Beginn der S-Phase (G1/S-Checkpoint) und unmittelbar vor bzw. nach der M-Phase (G2/M- bzw. M/G1-Checkpoint, *Johnson & Walker, 1999*). An diesen Restriktionspunkten kann der Zellzyklus angehalten werden, wenn es im vorangegangenen Ablauf zu Störungen gekommen ist sowie Reparaturvorgänge oder der „programmierte Zelltod“ – die Apoptose – eingeleitet werden (*Löffler & Montenarh, 2003*). Dysregulationen im Zellzyklus, Inaktivierung von p53 durch Genmutation oder Überexpression von Zellzyklus stimulierenden oder antiapoptotischen Faktoren sind für die Entstehung von malignen Tumoren von zentraler Bedeutung (*Evan et al., 1992; Adams & Kaelin, 1996; Cory et al., 1999; Scully et al., 2000; Raybaud et al., 2003*). Es wurde zudem gezeigt, dass die Telomerase – eine reverse Transkriptase, die die Telomeren (Chromosomenendstücke) synthetisiert – in neoplastisch veränderten Keratinozyten hochreguliert ist und so die SCC-Bildung vorantreibt (*Parkinson et al., 1997*).

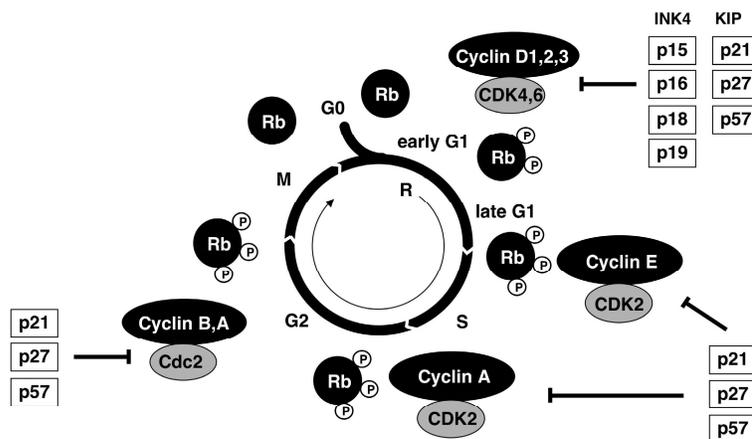


Abb. 1-6: Regulation des Zellzyklus durch Cycline und CDKs sowie ihre Inhibitoren (nach Daniel, 2003).
 (Cdc = CDK1; CDK = cyclin dependent kinase; G = growth; INK = inhibitor of cyclin dependent kinase; KIP = kinase inhibitor protein; M = mitosis; p = protein, P = phosphate group, Rb = retinoblastoma (protein), S = synthesis)

1.5.4 DNA Replikation durch die Pol α

Die Aktivität des Pol- α -Primase-Komplexes wird durch einen Zellzyklus-abhängigen Phosphorylierungsgrad reguliert. Eine Kinase hyperphosphoryliert die katalytische p180-Einheit in der G2/M-Phase, wodurch die Affinität zur Einzelstrang-DNA abnimmt (*Nasheuer et al., 1991*). Nach Entdrillen und Spaltung der DNA-Stränge durch eine Topoisomerase und die Helikase synthetisiert der Pol- α -Primase-Komplex in der Replikationsgabel einen kurzen RNA-DNA-Primer am Leitstrang und Primer für die Okazaki-Stücke am Folgestrang. Nach Verlängerung dieser Primer um 30 – 40 bp zur iDNA (initiator DNA) durch den Pol- α -Primase-Komplex wird dieser abgespalten. Anschließend synthetisiert die Pol δ 5' → 3'-gerichtet (dis-)kontinuierlich die DNA des Leitstrangs (der Okazaki-Stücke), die RNase H entfernt die Primer, Pol δ synthetisiert die fehlenden DNA-Stücke und eine Ligase verbindet die Okazaki-Fragmente (*Hübscher et al., 2000; Loeffler & Montenarh, 2003*).

1.6 Hemmstoffe der DNA Polymerase alpha

1.6.1 Nicht-nukleosidische Hemmstoffe

Aphidicolin. Aphidicolin (Abb. 1-7) ist ein tetrazyklisches Diterpen, das u.a. aus dem Pilz *Cephalosporium aphidicola* isoliert werden kann (*Bucknall et al., 1973*). Es hemmt reversibel die Replikation der DNA, indem es die DNA-Polymerase α blockiert. Ein kompetitiver Antagonismus zu dCTP (Deoxycytidin-Triphosphat) und ein nicht-kompetitiver Antagonismus zu den anderen drei Deoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP) – vor allem für dTTP (Deoxythymidin-Triphosphat) – werden postuliert (*Oguro et al., 1979*). Molecular Modelling Studien lassen vermuten, dass Aphidicolin direkt das aktive Zentrum der Pol α blockieren kann, favorisieren aber einen nicht-kompetitiven Mechanismus (*Richartz et al., 2008*). Strukturell sind dabei die 3-OH- und die 18-OH-Gruppe essentiell (*Michaelis et al., 2000*). Durch diese Replikationsblockade verbleiben die Zellen am G1/S-Phase-Übergang; dadurch kann eine Synchronisation der Zellen in der Zellkultur erfolgen (*Pedrali-Noy et al., 1980*). Aphidicolin hemmt zudem Pol δ und ϵ , wohingegen Pol β und γ auch von sehr hohen Aphidicolin-Dosen nicht gehemmt werden (*Oguro et al., 1979*).

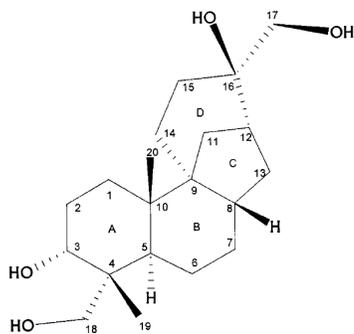


Abb. 1-7: Strukturformel von Aphidicolin (Michaelis et al., 2000)

Aphidicolin selbst hat keinen Eingang in die antitumorale Therapie gefunden. Wasserlösliche Glycinsäure-Derivat blockierten lediglich das Tumorstadium, führten jedoch nicht zur Remission (Sessa et al., 1991). Dies wird auf eine rasche Biotransformation zu einem unwirksamen Metaboliten – vor allem über CYP2C11 – zurückgeführt (Edelson et al., 1990). Kombinationen von Aphidicolin mit Cisplatin, Vincristin oder Doxorubicin wirken synergistisch und erscheinen vielversprechender als die systemische Gabe von Aphidicolinglycinat- γ -Cyclodextrin-Komplexen, wodurch die Dosis zwar gesenkt, jedoch keine Tumorremission erreicht wird (Sessa et al., 1991; Michaelis et al., 2000; Michaelis et al., 2005).

Weitere Polymerasehemmer. Weitere Möglichkeiten der nicht-nukleosidischen Pol- α -Hemmung ergeben sich aus dem Screening von Naturstoffen. Dehydroaltenusin, ein sehr selektiver Pol- α -Hemmer aus dem Pilz *Alternaria tenuis*, führte bei tumortragenden Nacktmäusen zu einer deutlichen Tumorsuppression. (Maeda et al., 2007b). Eine Pol- α -Hemmung konnte auch für verschiedene Vitamine wie A, B₆, D₂ und D₃ nachgewiesen werden (Murakami et al., 2002; Mizushima et al., 2003a; Mizushima et al., 2003b). Auch Glykolipide – v.a. Diacylglycerole – aus Spinat, sowie Fettsäure-konjugierte (Epi-)Catechin-Derivate aus grünem Tee können die Pol α hemmen und z.T. antiangiogenetisch wirken (Kuriyama et al., 2005; Maeda et al., 2007a; Matsubara et al., 2006; Matsubara et al., 2007). Auch für Taxol-Derivate liess sich eine Pol- α -Hemmung ermitteln (Mizushima et al., 1996; Mizushima et al., 2002; Oshige et al., 2004).

1.6.2 Nukleosid- und Nukleotid-Analoga

Nukleosid- und Nukleotid-Analoga unterscheiden sich von den natürlichen Nukleosiden bzw. Nukleotiden (Nukleosid-Monophosphaten) durch eine veränderte Pyrimidin- bzw. Purin-Base oder Zuckerkomponente (Ribose, Deoxyribose). Nukleosid- und Nukleotid-Analoga wirken als Antimetaboliten, da sie als falsches Nukleotid die Polymerase inaktivieren (sog. Suizid-Inhibitoren) und/oder als Triphosphat durch Einbau in die DNA zum Strangabbruch führen. Die Anheftung weiterer Nukleotide ist aufgrund einer fehlenden 3'-OH-Funktion nicht möglich (sog. chain terminators). Einige Analoga hemmen Schlüsselenzyme (z.B. die Thymidilatsynthase) für die Synthese von DNA- oder RNA-Basen (*van Rompay et al., 2003*).

Purin-Analoga. Aciclovir ist ein Guanosin-analoges Virustatikum, das vor allem durch virale Kinasen aktiviert und bei Herpes-simplex-Virusinfektionen eingesetzt wird. Ganciclovir, welches ausschließlich durch humane Nukleosidkinasen aktiviert wird, hemmt in seiner aktiven Triphosphatform besonders effizient virale Polymerasen und wird vor allem bei Cytomegalievirus-Infektionen eingesetzt. Das Phosphonat-Derivat Adefovir stellt ein Adenosin-Monophosphat-Analogon dar, wodurch der erste geschwindigkeitsbestimmende Aktivierungsschritt entfällt (*Spadari et al., 1998*). Intrazellulär wird Adefovir-Diphosphat gebildet, welches als Suizid-Inhibitor die Reverse Transkriptase des Hepatitis-B-Virus hemmt und als chain terminator wirkt (*Qaqish et al., 2003*). Tenofovir ist strukturell mit Adefovir verwandt und wird als reverser Transkriptase-Inhibitor bei HIV-Infektionen eingesetzt (*Azanza et al., 2008*).

Pyrimidin-Analoga. Capecitabin ist ein Prodrug des bereits beschriebenen 5-FU, es ist besser verträglich und wird als Zytostatikum (z.B. bei Dickdarmkrebs) eingesetzt. Zalcitabin ist ein Cytidin-Analogon und potenter und selektiver antiviraler Wirkstoff aus der Gruppe der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren zur Behandlung von HIV-Infektionen. Cidofovir ist wie Adefovir ein Phosphonat und stellt ein Cytosin-Monophosphat-Analogon dar. Es wird bei AIDS-Patienten mit Cytomegalievirus-Infektionen eingesetzt.

Aktivierung. Voraussetzung für die antivirale bzw. antitumorale Wirksamkeit nukleosidischer Pol- α -Hemmer ist die schrittweise Aktivierung zu Triphosphaten (Abb. 1-8). Die Synthese des Nukleosid-Monophosphats ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (*Spadari et al., 1998*), er wird von folgenden Deoxyribonukleosidkinasen (dNK) katalysiert: im Zytoplasma von der Thymidinkinase 1 (TK1) und Deoxycytidinkinase (dCK), in den

Mitochondrien von der Thymidinkinase 2 (TK2) und Deoxyguanosinkinase (dGK) (*Lee & Cheng, 1976a; Lee & Cheng, 1976b; Eriksson et al., 2002*). Eine unterschiedliche Enzymausstattung gesunder und viraler bzw. tumoraler Zellen ermöglicht ein gewisses Targeting. TK1 besitzt eingeschränkte Substratspezifität, da sie nur Deoxythymidin (dT) und Deoxyuridin (dU) phosphoryliert. Das Produkt dTTP fungiert als feedback Inhibitor. dCK phosphoryliert sowohl Pyrimidin- als auch Purin-Derivate, vor allem Deoxycytidin (dC), Deoxyadenin (dA) und Deoxyguanosin (dG) (*Eriksson et al., 2002*). TK2 katalysiert die Monophosphorylierung von Thymidin, kann aber auch andere Pyrimidinbasen (dU, dC) aktivieren (*Eriksson et al., 2002*). Ein genetisch bedingter Funktionsverlust der TK2 in Muskelzellen führt zu funktionsarmen Mitochondrien und damit zu Myopathie (*Saada et al., 2001*). dGK ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und phosphoryliert ausschließlich Purinnukleoside – dATP und dGTP sind feedback Inhibitoren. dGK gelangt in apoptotischen Zellen sehr effizient ins Zytoplasma, wahrscheinlich um verstärkt Apoptosefaktoren wie dATP zu bilden (*Jüllig & Eriksson, 2000; Jüllig & Eriksson, 2001*). dCK, TK2 und dGK werden im Gegensatz zur TK1 während des gesamten Zellzyklus exprimiert. TK1 wird vor allem in der S-Phase hochreguliert und ist in der G1- und M-Phase fast nicht aktiv. Es gibt Hinweise auf eine defekte TK1-Expression in Krebszellen (*Sherley & Kelly, 1988; Chang et al., 1995; Eriksson et al., 2002*).

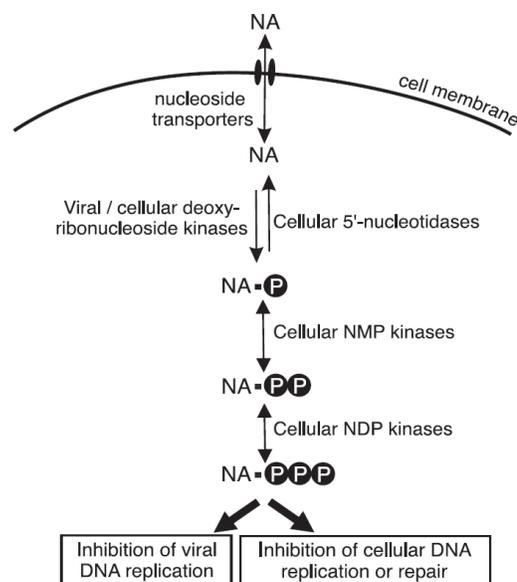


Abb. 1-8: Intrazelluläre Aktivierung von Nucleosid-Analoga (NA) und pharmakologischer Effekt. Die NAs werden durch die Zellmembran transportiert und von humanen zellulären oder viralen Kinasen zu ihrer aktiv wirksamen Triphosphatform umgesetzt (aus *van Rompay et al., 2003*).

Eine Kombinationstherapie mit zwei Nukleosid-Analoga ist sinnvoll, wenn diese von verschiedenen dNK aktiviert werden, z.B. TK1 und dCK, andernfalls konkurrieren zwei Substrate um die gleiche geschwindigkeitsbestimmende Reaktion.

Die Phosphorylierung zum Di- respektive Triphosphat erfolgt durch nukleotidspezifische Monophosphatkinasen (NMK) bzw. unspezifische Nukleotiddiphosphatkinasen (NDK).

Ein- und Auswärtstransporter, Resistenzbildung. Damit die meist hydrophilen Nukleosid-Analoga intrazellulär wirksam werden können, müssen sie mit Hilfe bestimmter Transporter die Zellmembran überwinden. Im Menschen sind die „human equilibrative nucleoside transporters“ 1 und 2 (hENT-1, hENT-2) für den Transport von Purin- und Pyrimidinnukleosiden verantwortlich (*Mackey et al., 1998; Kong et al., 2004; Jordheim & Dumontet, 2007*). In Cytarabin-resistenten Zellen wurde neben abgeschwächter dCK-Expression ein verringertes hENT-1-Proteinlevel festgestellt (*Sarkar et al., 2005*). Weitere Faktoren der Resistenzbildung (Abb. 1-9) gegen Nukleosid-Analoga sind Effluxpumpen, die „multi drug resistance proteins“ (MRPs). MRPs gehören zur Subfamilie C der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette), welche Energie-(ATP)-abhängig den Auswärtstransport organischer Anionen vermitteln. Es wird vermutet, dass sie die Zelle vor Überstimulation schützen, da sie bei hohen intrazellulären Konzentrationen von zyklischen Nukleotiden besonders effektiv arbeiten. MRP4 und MRP5 transportieren wichtige second messenger wie cGMP (*Borst & Elferink, 2002*) und Nukleosid- und Nukleotidanaloga sowie deren Monophosphate aus der Zelle (*Wijnholds et al., 2000; Wielinga et al., 2002; Reid et al., 2003; Wielinga et al., 2003*). Eine Resistenz gegen Adefovir wird mit einer Überexpression von MRP4 und MRP5 in Verbindung gebracht (*Jordheim & Dumontet, 2007*). Lungenkarzinomzellen konnten durch eine Verringerung der MRP5-Expression gegenüber Gemcitabin sensitiviert werden (*Oguri et al., 2006*).

Weitere Resistenzmechanismen sind zum Beispiel die ‚Downregulation‘ aktivierender Enzyme (dNKs), ‚Upregulation‘ abbauender Enzyme (z.B. 5'-Nukleotidase oder Deaminase) oder vermehrte Produktion natürlicher Nukleoside durch eine überexprimierte Ribonukleotid-Reduktase (RNR; *Galmarini et al., 2004; Jordheim et al., 2005; Jordheim & Dumontet, 2007*).

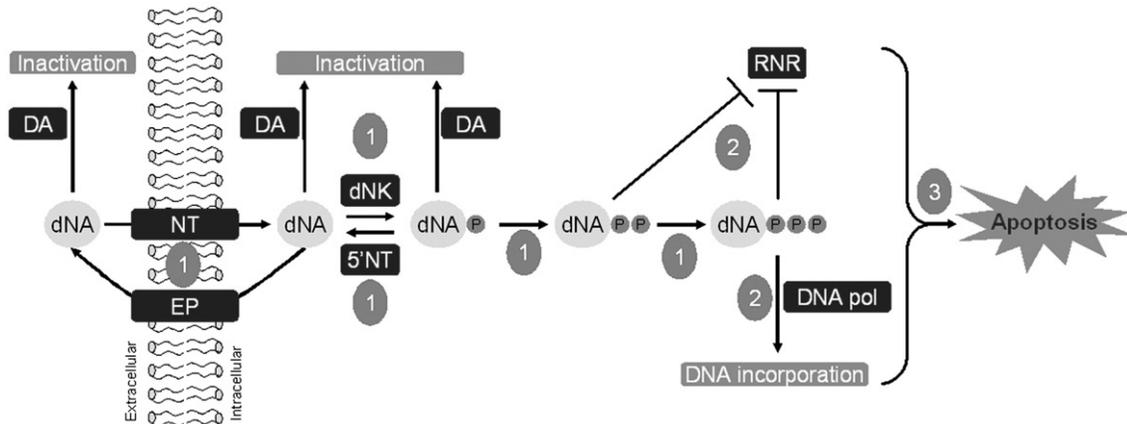


Abb. 1-9: Wirkmechanismus von Nucleosid-Analoga und drei große Resistenzgruppen: 1) verringerte Aufnahme, verstärkter Auswärtstransport, verstärkter Metabolismus; 2) Veränderung der intrazellulären Targets; 3) verminderte Apoptoseinduktion; dNA: Deoxyribonucleoside; NT: Nucleosidtransporter; EP: Effluxpumpe; DA: Deaminase; 5'-NT: 5'-Nucleotidase; dNK: Deoxynucleosidkinase; DNA pol: DNA Polymerase; P: Phosphatgruppe; RNR: Ribonucleotid-Reduktase (aus *Jordheim & Dumontet, 2007*).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Eine intensivierete UV-Exposition hat in den letzten Jahren zu einer erhöhten Inzidenz von Hautkrebs und Aktinischer Keratose geführt. Da die bisherigen Therapieoptionen für den hellen Hautkrebs bezüglich Heilungsrate und/oder Verträglichkeit nicht zufriedenstellend sind (*Jorizzo, 2004a; Jorizzo et al., 2004d; Stockfleth & Kerl, 2006*), sollte ein neuer therapeutischer Ansatz – die Interferenz mit der DNA-Synthese untersucht werden. Die 3-dimensionale Struktur des aktiven Bereichs der humanen Pol α konnte bereits mittels Molecular Modelling konstruiert und eine Reihe bekannter Pol- α -Inhibitoren in das aktive Zentrum gedockt werden (*Richartz et al., 2008*). Besonders interessant sind die therapeutisch noch nicht verwendeten N²-arylsubstituierten Purinanaloga. Diese sind potente Pol- α -Inhibitoren – die Einführung eines Zuckerrestes und Phosphorylierung steigerte die Wirksamkeit in vitro noch (*Wright et al., 1987; Khan et al., 1991*). Gemäß den Molecular-Modelling-Berechnungen der HHU wurden von der FU Chemie die nukleosidische bzw. nukleotidische Verbindungen BuP-OH, HM-1, HM-1-Oxim, isoHex-OH, OxBu, OxIsohex, OxHex sowie die Diethylester OxBu-DE und OxHex-DE synthetisiert. Letztere könnten aufgrund ihrer erhöhten Lipophilie attraktiv für die topische Therapie sein. Diese Substanzen sollten im Rahmen meiner Arbeit in vitro pharmakologisch gescreent und die als Arzneistoff am besten geeignete Substanz identifiziert werden. Dabei sollten auch die Voraussagen des Molecular Modelling überprüft und mit den pharmakologischen Daten korreliert werden. Die

beste Substanz sollte moderat lipophil ($\log P$ 1 – 3) sein, ein Molekulargewicht unter 500 g/mol aufweisen und idealerweise den derzeitigen Standard der topischen Therapie – 5-FU – in seiner Wirkung übertreffen. Tumorzellen sollten möglichst selektiv angegriffen werden, um die unerwünschten Wirkungen auf die gesunde Haut zu minimieren. Als Referenzsubstanzen wurden 5-FU sowie Aphidicolin als zytotoxischer Goldstandard gewählt. Da in vorangegangenen Untersuchungen bereits die ersten gemodelte Substanzen synthetisiert und pharmakologisch gescreent wurden, wurden auch HM-1 und die bisher wirksamste Substanz – BuP-OH – untersucht (*Richartz, 2007*). Foscarnet – ein Pyrophosphat-Analogon und Hemmstoff der viralen DNA-Polymerase – diente als Negativkontrolle.

Zielzellen waren zunächst drei Typen von Keratinozyten, die den Übergang von gesundem über immortalisiertes, nicht-tumorigenes bis hin zu Tumorgewebe darstellen, d.h. primäre Keratinozyten, die spontan transformierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und SCC25 Zellen, die aus einem Plattenepithelkarzinom der Zunge gewonnen wurden. Ferner wurden humane Fibroblasten untersucht, da eine Schädigung dieser Zellen auf Nebenwirkungen am Korium bei topischer Therapie hinweist. 5-FU ist bei einer Vielzahl solider Tumoren indiziert. Daher wurden weitere Krebszelllinien wie HT29 (Kolorektalkarzinomzellen), MCF7 (Mammakarzinomzellen), T24 (Blasenkarzinomzellen) und SISO (Adenozervixkarzinomzellen) einbezogen. Zur Messung der Zytotoxizität sollten die Viabilität untersucht und gegebenenfalls eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt werden.

Des Weiteren sollte eine analytische Detektionsmethode (HPLC) für die besten Substanzen und deren voraussichtliche Metaboliten entwickelt werden, mit der eine Quantifizierung und eine Untersuchung der chemischen Stabilität möglich ist. Auf Basis dieser Analytik sollen später pharmakokinetische Untersuchungen in Monolayer-Kulturen und an 3D-Hautmodellen sowie die Quantifizierung der applizierten Dosen in toxikologischen Untersuchungen möglich sein. Die Entwicklung dieser Methoden kann auf bereits veröffentlichte Verfahren zur Analytik von Pyrimidin- und Purin-Derivaten sowie von Purinnukleosid-Phosphonaten wie Adefovir oder Tenofovir aufbauen (*Decosterd et al., 1999; Rezk et al., 2005; Vávrová et al., 2007*).

Insgesamt lassen sich also zwei Schwerpunkte für die vorliegende Arbeit formulieren:

- 1) pharmakologisches Screening der Substanzen aus dem Molecular Modelling
 - an gesunden und krankhaften Hautzellen
 - an weiteren Tumorzelllinien
- 2) Entwicklung einer (validen) Analytik für die Detektion der Muttersubstanzen und deren Metaboliten

2 MATERIAL UND METHODEN

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Software CellQuest	
Software WinMDI	
Filtrationseinheit Millipore®	Millipore-Waters, Eschborn
Fluostar Optima	BMG Labtech, Offenburg
HPLC-Anlage Merck Hitachi	Merck Hitachi, Tokio, Japan
Autosampler AS-2000A	
Interface D-6000	
Pumpe L-6200 (3-Wege)	
UV-Detektor L-4000A	
HSM Software D-7000	
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Carl-Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Carl-Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 40	Carl-Zeiss, Jena
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Speed Vac Plus 110A	Savant Instruments Inc. Farmingdale NY, USA
Spektralphotometer Gene-Ray	Biometra, Göttingen
Sterilarbeitsbank LaminAir®	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler 1450 Microbeta™ Plus	Wallac, Freiburg
Vac Elut 20 System	Varian Inc., Lake Forest, CA, USA

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril, LiChrosolv®, gradient grade	VWR Merck, Darmstadt
Adefovir	Gilead Sciences, München
Aphidicolin	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Boviner Hypophysenextrakt (BPE)	Cell Systems, St. Katharinen

BuP-OH	Freie Universität Berlin
Capecitabin	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's modified Eagle's Medium/ Nutrition Mixture F12 Ham	Sigma, Taufkirchen
FACS Clean	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Fibroblasten-Wachstumsfaktor, human (hFGF-basic)	Biochrom, Berlin
5-Fluorouracil (5-FU)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Gentamicin (969 U/mg)	PanBiotech, Aidenbach
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
HAM's F-12 Medium	Biochrom, Berlin
HM-1	Freie Universität Berlin
HM-1-Oxim	Freie Universität Berlin
HPLC-Zubehör:	Merck, Darmstadt
Säulen:	LiChroCART [®] 125-4 LiChrospher [®] 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART [®] 250-4 Purospher [®] STAR RP-18 (5 µm) CC250/4 Nucleodur C18 Gravity (5 µm)
Vorsäulen:	LiChroCART 4-4 CC 8/4 Nucleodur C18 Gravity (5 µm)
Autosamplergefäße:	vial, 1,5 ml Gewindeflasche, Klarglas, 32 * 11,6 mm
Micro-Insert,	0,1 ml, transparent, 15 mm Spitze
Septum,	8 mm, Silikon weiß / PTFE blau
Schraubkappe,	8mm, mit Loch 5,5 mm, Gewinde 8-425
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Igepal	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Keratinocytenbasalmedium (KBM) plus	Cambrex BioScience, Landen,
Supplements zur Herstellung von KGM	Belgien
Membranfilter (Polyamid, 0,2 µm, D47 mm)	Schleicher & Schuell, MicroScience GmbH, Dassel

Methanol, LiChrosolv [®] , gradient grade	VWR Merck, Darmstadt
Minimum Essential Medium Earle (MEME) mit Bicarbonat (2,0 g/l)	Biochrom, Berlin
OxBu	Freie Universität Berlin bzw. Chiracon, Luckenwalde
OxBu-Diethylester	Chiracon, Luckenwalde
OxIsohex	Freie Universität Berlin
OxHex	Freie Universität Berlin bzw. Chiracon, Luckenwalde
OxHex-Diethylester	Chiracon, Luckenwalde
Panserin 801 Keratinozyten Medium plus Supplements	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Phosphatgepufferte Salzlösung, Calcium- und Magnesiumfrei	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
RNaseA	Qiagen, Hilden
RPMI 1640 Medium	Sigma, Taufkirchen
Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
SPE-Säulen	Varian Inc., Lake Forest, CA, USA
SPEC C18 (3 ml, 30 mg)	
Bond Elut C18 (3 ml, 500 mg)	
Bond Elut C8 (3 ml, 500 mg)	
Bond Elut C2 (3 ml, 500 mg)	
Bond Elut Certify II (3 ml, 200 mg)	
SPEC NH ₂ (3 ml, 30 mg)	
Sterilfilter Minisart [®] , 0,22 µm	Sartorius, Göttingen
Szintillationsflüssigkeit Optiphase [®] Supermix	Wallac, Freiburg
[³ H]-Thymidin (spezif. Aktivität 35,0 Ci/mmol)	Amersham, Buckinghamshire, UK
Tetrabutylammoniumchlorid (Bu ₄ N ⁺ Cl ⁻)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Triethylamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Biochrom, Berlin
Zalcitabin (ddC)	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.3 Zelllinien

Tab. 2-1: Übersicht über die verwendeten Zellarten, deren Herkunft oder Bezug.

Zellart	Beschreibung	Bezug
NHK	normale humane Keratinocyten	Isolierung aus menschlicher Vorhaut
HaCaT	Human adult keratinocytes kept under low Calcium and elevated temperature (humane, spontan transformierte Keratinozyten-Zelllinie)	DKFZ Heidelberg, Prof. Fusenig
Fb	normale humane Fibroblasten	Isolierung aus menschlicher Vorhaut
SCC4 und SCC25	squamous cell carcinoma-Zelllinien (ATCC CRL-1624 und ATCC CRL-1628) Herkunft: Plattenepithelkarzinom der Zunge	LGC Promochem
HT29	Kolorektalkarzinomzelllinie (ATCC HTB-38)	Prof. Gust, FU Berlin
MCF7	Mammakarzinomzelllinie (ATCC HTB-22)	Prof. Gust, FU Berlin
T24	Blasenkrebszelllinie (ATCC HTB-4)	LG Promochem
SISO	Adenozervixkarzinomzelllinie (ACC 327)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ)

2.1.4 Nährmedien und Lösungen

2.1.4.1 Zellmedien für die Kultivierung und die Zelluntersuchungen

Keratinocyten-Anzuchtmedium. Zur Unterdrückung des Fibroblastenwachstums während der Anzucht der Primärkultur der aus humaner Vorhaut isolierten Keratinocyten wurde das Panserin 801 Keratinocytenmedium verwendet. Das Medium wurde unter Zusatz folgender Supplements hergestellt:

5 ng/ml	hEGF
5 µg/ml	Insulin
0,5 µg/ml	Hydrocortison
0,1 mM	Ethanolamin
0,1 mM	Phosphoethanolamin
25 µg/ml	BPE

Fibroblasten-Anzuchtmedium. Für die Anzucht der Primärkultur der aus humaner Vorhaut isolierten Fibroblasten wurde das in Tab. 2-2 dargestellte Wachstumsmedium verwendet.

Für die Kultivierung und die experimentellen Untersuchungen der normalen humanen Keratinocyten und der Zelllinien HaCaT, SCC4, SCC25, HT29, MCF7, T24 und SISO wurden die in Tab. 2-2 dargestellten Wachstumsmedien eingesetzt. Für einige Experimente mit den Zelllinien HaCaT, SCC4, SCC25, HT29, MCF7, T24 und SISO (s. Angaben) wurde ein Basalmedium ohne Zusatz von FKS verwendet (Tab. 2-2).

Tab. 2-2: Übersicht über die für jede Zellart eingesetzten Basal- und Wachstumsmedien.

Zellart	Basalmedium	Wachstumsmedium
NHK	Keratinocytenbasalmedium (KBM)	Keratinocytenbasalmedium + Supplements 0,1 ng/ml hEGF 0,5 µg/ml Hydrocortison 5 µg/ml Insulin 30 µg/ml BPE 50 ng/ml Amphotericin B 50 µg/ml Gentamicinsulfat
HaCaT	RPMI 1640 + L-Glutamin 2 mM + Penicillin 100 I.U./ml + Streptomycin 100 µg/ml	HaCaT-Basalmedium + FKS 10 %
Fibroblasten (Fb)	DMEM + L-Glutamin 2 mM + Penicillin 100 I.U./ml + Streptomycin 100 µg/ml	Fb-Basalmedium + FKS 7,5 %
SCC25	1:1-Mischung aus DMEM/Nutrition Mixture F12 Ham und HAM's F-12 Medium + Penicillin 100 I.U./ml + Streptomycin 100 µg/ml + Hydrocortison 0,4 µg/ml	SCC25-Basalmedium + FKS 15 %
HT29	DMEM + Penicillin 100 I.U./ml + Streptomycin 100 µg/ml	HT29-Basalmedium + FKS 10 %
MCF7	MEME mit Bicarbonat (2,0 g/l) + L-Glutamin 2 mM + Gentamicin (969 U/mg) 50 mg/l + Natriumpyruvat 110 mg/l	MCF7-Basalmedium + FKS 10 %
T24	RPMI 1640 + L-Glutamin 2 mM + Penicillin 100 I.U./ml + Streptomycin 100 µg/ml	T24-Basalmedium + FKS 10 %
SISO	1:1 Mischung aus RPMI 1640 u. DMEM + L-Glutamin 2 mM + Penicillin 100 I.U./ml + Streptomycin 100 µg/ml	SISO-Basalmedium + FKS 10 % (hitzeinaktiviert, 20 min, 56 °C)

2.1.4.2 Lösungen zur Zellkultivierung

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

0,2 g/l	KCl
8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄

in Aqua bidest.

Stop-Medium

100 I.U./ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
10 %	FKS

in DMEM.

Trypsin-EDTA-Lösung

1,67 mg/ml	Trypsin
0,67 mg/ml	EDTA

in PBS.

Transportmedium

100 I.U./ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

in DMEM.

Einfriermedien

Keratinocyten, Fibroblasten: DMEM unter Zusatz von 10 % FKS und 10 % DMSO.

HaCaT, SCC4, SCC25, HT29, MCF7, T24, SISO: FKS unter Zusatz von 10 % DMSO.

Alle Lösungen für die Zellkultivierung wurden kühl (2 – 8 °C) gelagert.

2.1.4.3 Testsubstanzen und ihre Lösungen

Abbildung 2-1 zeigt die Struktur der Thymidin-Analoga, Tabelle 2-3 zeigt die ebenfalls auf Basis des Molecular Modelling entwickelten Guanosin-Analoga.

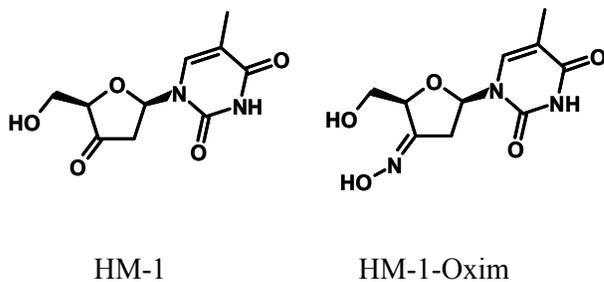
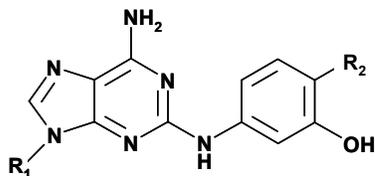


Abb. 2-1: Thymidin-Analoga. Strukturen für HM-1 und HM-1-Oxim, die auf Basis der Molecular Modelling Studien synthetisiert worden sind.

Tab. 2-3: Guanosin-Analoga. Übersicht über die Struktur der auf Basis der Molecular Modelling Studien synthetisierten Substanzen. Der logP-Wert wurde im Rahmen der Molecular Modelling Studien von der HHU mit dem ALOGPS 2.1 Programm berechnet. Der Standardfehler für den logP-Wert beträgt 0.26 (Tetko *et al.*, 2001; Tetko & Tanchuk, 2002).



Substanz	MG (g/mol)	logP	R ₁	R ₂
BuP-OH	414,47	2,63		
isoHex-OH	442,51	-		
OxBu	436,41	1,36		
OxIsohex	464,46	2,27		
OxHex	464,46	2,34		
OxBu-DE	492,54	-		
OxHex-DE	520,37	-		

Für die Zell-Untersuchungen wurden von den Substanzen jeweils 600 µl einer Stammlösung (2×10^{-2} M) im entsprechenden Lösungsmittel (Tab. 2-4) hergestellt und sterilfiltriert. Aus dieser Stammlösung wurden steril je 600 µl der Konzentrationen 2×10^{-3} M bis 2×10^{-12} M durch schrittweises Verdünnen 1:10 mit dem entsprechenden Lösungsmittel erhalten. Diese 10 verdünnten Lösungen wurden in 60-µl-Aliquots bei -20 °C eingefroren. Jedes Aliquot wurde für die pharmakologischen Experimente maximal viermal aufgetaut. Für die analytischen Experimente mittels HPLC und Festphasenextraktion (SPE) wurden ebenfalls Stammlösungen (2×10^{-2} M) im entsprechenden Lösungsmittel hergestellt, sterilfiltriert und unter Einsatz sterilfiltrierter Lösungsmittel weitere Verdünnungen erhalten, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die analytische Methode bestimmte die Zielkonzentrationen der Substanz und das Lösungsmittel (s. Angaben). Jedes Aliquot wurde maximal viermal aufgetaut.

Tab. 2-4: Übersicht über die verwendeten Substanzen, deren Molekulargewicht (MG), Lösungsmittel für die Stammlösung (2×10^{-2} M) sowie Lagerungsbedingungen für die Substanzen und Lösungen.

Substanz	MG (g/mol)	bezogen von	Lösungsmittel	Lagerung der Reinsubstanz / Lösung
Adefovir	273,20	Gilead Sciences GmbH	DMSO	2 – 8 °C / -20 °C
Aphidicolin	338,50	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	DMSO	2 – 8 °C / -20 °C
BuP-OH	414,45	Arbeitskreis	DMSO	2–8 °C / -20 °C
isoHex-OH	442,51	ReiBig, FU Berlin, Chemie		
Capecitabin	359,40	Roche Diagnostics, Mannheim	DMSO	2 – 8 °C (Lichtschutz) / -20 °C (Lichtschutz)
5-Fluorouracil (5-FU)	130,08	Sigma-Aldrich, Schnelldorf	PBS	2 – 8 °C (Lichtschutz) / -20 °C (Lichtschutz)
Guanin (Gn)	151,13	Sigma-Aldrich, Schnelldorf	Methanol-PBS (1 + 9)	2 – 8 °C / -20 °C
Guanosin (Gs)	283,24			2 – 8 °C / -20 °C
Guanosin-Monophosphat (GMP) Dinatriumsalz	407,18			-20 °C / -20 °C
Guanosin-Diphosphat (GDP) Dinatriumsalz	490,20			-20 °C / -20 °C
Guanosin-Triphosphat (GTP) Dinatriumsalz	573,22			-20 °C / -20 °C
HM-1	240,22			Arbeitskreis
HM-1-Oxim	255,23	ReiBig, FU Berlin, Chemie	DMSO	-20 °C (Lichtschutz) / -20 °C (Lichtschutz)
OxBu	436,41	AK ReiBig, FU Berlin bzw. Chiracon, Luckenwalde	DMSO	2 – 8 °C / -20 °C
OxIsohex	464,47	Arbeitskreis	DMSO	2 – 8 °C / -20 °C
OxHex	464,47	Chiracon, Luckenwalde		
OxBu-Diethylester	492,54			
OxHex-Diethylester	520,37			
Thymin (Tn)	126,12	Sigma-Aldrich, Schnelldorf	Methanol-PBS (1 + 9)	2 – 8 °C / -20 °C
Thymidin (Td)	242,23			2 – 8 °C / -20 °C
Thymidin-Monophosphat (dTMP) Dinatriumsalz	366,20			-20 °C / -20 °C
Thymidin-Diphosphat (dTDP) Dinatriumsalz	449,20			-20 °C / -20 °C
Thymidin-Triphosphat (dTTP) Dinatriumsalz	532,22			-20 °C / -20 °C
Zalcitabin	211,22			Roche Diagnostics, Mannheim

Die in DMSO hergestellten Stammlösungen wurden nicht länger als 3 Monate, die in PBS bzw. Methanol/PBS (1+9) hergestellten Lösungen maximal 1 Monat eingesetzt. Für die Aphidicolinstammlösungen betrug die Lagerfrist maximal 6 Wochen.

2.1.4.4 Lösungen für Viabilitätsuntersuchungen

MTT-Stammlösung

5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in PBS. MTT wurde unter Lichtausschluss zu 5 mg/ml in PBS gelöst, die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und lichtdicht bei -20 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Für Viabilitätsuntersuchungen wurden 40 µl dieser Stammlösung zu 460 µl Medium (der Zellart entsprechend) gegeben, so dass die Endkonzentration 0,4 mg/ml betrug.

2.1.4.5 Lösungen für Proliferationsuntersuchungen

[³H]-Thymidin-Lösung

[³H]-Thymidin (spezif. Aktivität 35,0 Ci/mmol) wurde als fertige Gebrauchslösung von Amersham bezogen und bei 2 – 8 °C in einem Kühlschrank für Radiochemikalien aufbewahrt. Die Entnahme der [³H]-Thymidin-Menge wurde in einem Entnahmeprotokoll mit Ausgangs-, Entnahme- und Endmenge dokumentiert.

Trichloressigsäure 5 % (V/V) (TCA)

50 ml/l TCA in PBS.

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 2 – 8 °C aufbewahrt.

Natronlauge (0,3 N) (NaOH)

12 g/l NaOH in Aqua bidest.

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 2 – 8 °C aufbewahrt.

2.1.4.6 Lösungen für Zellzyklusuntersuchungen

Propidiumiodid(PI)-Mastermix

4 µl/ml	PI-Stammlösung (40 µg/ml)
1 µl/ml	RNaseA-Stammlösung (100 µg/ml)
995 µl/ml	PBS (Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei), steril

Für die Propidiumiodid-Stammlösung wird PI-Reinsubstanz in Aqua bidest. Gelöst und sterilfiltriert. Die RNaseA-Stammlösung wird direkt von Qiagen bezogen. Der Mastermix, die Propidiumiodid- und die RNaseA-Stammlösung wurden bei 2 – 8 °C lichtgeschützt gelagert.

2.1.4.7 Lösungen für die High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Alle Lösungen für die HPLC wurden vor Verwenden 15 Minuten im Ultraschallbad entgast. Alle wässrigen Laufmittel wurden nach Herstellung vakuumfiltriert (Polyamid-Membranfilter, 0,2 µm, D47 mm), bei 2 – 8 °C gelagert und maximal 3 Tage verwendet.

Organische Laufmittel

Die organischen Laufmittelphasen wurden direkt als „gradient grade“ für die HPLC bezogen.

Wasser für die HPLC

Das Wasser für die HPLC wurde aus bidestilliertem Wasser durch Vakuum-Filtration mit einem Membranfilter (Polyamid, 0,2 µm, D47 mm) hergestellt. Für die Methode der basischen Phosphonattrennung wurde 0,1 % Triethylamin (TEA, 1 ml/l) zugesetzt.

Puffer für die Phosphattrennung mit TBA-Cl (Puffer A und B)

Für die Phosphattrennung mit TBA-Cl wurden 2 Laufmittel mit nachfolgender Zusammensetzung frisch hergestellt:

Puffer A:	0,01 M KH ₂ PO ₄
(pH 7)	0,01 M Bu ₄ N ⁺ Cl ⁻
	0,25 % Methanol
	550 µl 10 N NaOH / 1 in Aqua bidest.

Puffer B:	0,1 M KH_2PO_4	
(pH 7)	0,028 M $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$	
	30 % Methanol	
	1400 μl 10 N NaOH / 1	in Aqua bidest.

Organische Phase für die basische Phosphonattrennung

(nach: Chiracon, Luckenwalde)

Die organische Phase für die basische Phosphonattrennung wurde durch Mischen von 40 % Acetonitril und 60 % Methanol und Zusatz von 0,1 % TEA erhalten. Diese Mischung wurde nicht länger als 2 Monate verwendet.

Puffer für die Phosphonattrennung mit TBA-Cl (Puffer C)

Für die Phosphonattrennung mit TBA-Cl wurde folgendes Laufmittel frisch hergestellt:

Puffer C	10 mM KH_2PO_4	
(pH 6)	2 mM $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$	
	7% ACN	
	1000 μl 10 N NaOH / 1	in Aqua bidest.

2.1.4.8 Lösungen für die Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE)

Lyse-Puffer

Der Lysepuffer wurde frisch hergestellt:

1 % Igepal	0,5 % Natrium-Desoxycholat	
0,1 % SDS	1 mM EDTA	
50 mM NaF	1 mM PMSF	in PBS.

Außerdem wurden Trypsin-EDTA (siehe 2.1.4.2) eine Methanol-Wasser-Mischung (60 % in Aqua bidest.) und der Puffer B (siehe 2.1.4.7) verwandt. Alle Lösungen wurden kühl gelagert.

2.1.5 Säulen für die HPLC und SPE

Für die HPLC-Untersuchungen wurden die in Tabelle 2-5 beschriebenen Säulen, für die SPE-Untersuchungen die in Tabelle 2-6 verzeichneten Säulen verwendet.

Tab. 2-5: Übersicht über die verwendeten HPLC-Säulen sowie deren Füllmaterial und Eigenschaften.

Säule	Säulenmaterial	Eigenschaften
LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)	silica-basiert, Octadecylgruppen	stark unpolare Retention, saure, basische und neutrale Substanzen analysierbar
LiChroCART® 250-4 Purospher® STAR RP-18 (5 µm)	metallfrei, endcapped silica-basiert, Tetraalkoxysilane	stark unpolare Retention, aufgrund der Metallfreiheit können saure, basische und chelatisierende Substanzen analysiert werden, auch mit stark wässrigen Laufmitteln kompatibel
CC250/4 Nucleodur C18 Gravity (5µm)	Kieselgelphase, monomere Octadecylmodifikation, endcapped	Trennmechanismus beruht auf rein hydrophoben (van der Waals) Wechselwirkungen, pH-stabil bis pH 11

Tab. 2-6: Übersicht über die verwendeten SPE-Säulen sowie deren Füllmaterial und Eigenschaften.

Säule	Säulenmaterial	Eigenschaften
SPEC C18 Bond Elut C18	silica-basiert, trifunktionale Octadecylgruppen	stark unpolare Retention, häufige Verwendung um organisches Material aus wässrigen Phasen zurückzuhalten.
Bond Elut C8	silica-basiert, Octylgruppen	moderat unpolare Retention, häufige Verwendung bei biologischen Proben, aufgrund der kürzeren Kettenlänge zum Teil auch polare Interaktionen möglich
Bond Elut C2	silica-basiert, Ethylgruppen	schwach unpolare Retention häufige Verwendung um Metaboliten aus Serum und Plasma zurückzuhalten, wenn mit den anderen C-Säulen zu starke Rückhaltung stattfind
Bond Elut Certify II	gemischtes Säulenbett, Octyl- und quartäre Ammoniumgruppen	Starker Anionenaustauscher (SAX) und unpolare Retention, speziell für Moleküle mit sauren Strukturen und permanenten negativen Ladungen
SPEC NH ₂	silica-basiert, Aminopropylgruppen	Schwächerer Anionenaustauscher als SAX, polare Retentionsmechanismen, geeignet für sehr starke Anionen, die evtl. auf der SAX-Säule irreversibel zurückgehalten werden

2.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, galten folgenden Bedingungen für die Arbeit mit Zellkulturen:

Inkubation: im Brutschrank (37 °C, 95 % Luftfeuchte, 5 % CO₂-Gehalt)

Zentrifugation: Geschwindigkeit: 250 x g (5 min, 4 °C)

Einfrieren: in Kryoröhrchen, 10⁶ Zellen, in 1 ml Einfriermedium (2.1.4.2); langsames Einfrieren bei -80 °C, Lagerung in flüssigem Stickstoff

Auftauen: schnelles Auftauen im Wasserbad (37 °C), Aussäen in 75 cm²-Flasche mit 10 ml vorgewärmtem Medium, Mediumwechsel am nächsten Tag

2.2.1 Gewinnung und Kultivierung von primären Hautzellen und Zelllinien

Primäre Keratinozyten und Fibroblasten. Primäre Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus juveniler Vorhaut isoliert und kultiviert (*Vogler et al., 2003*). Vorhaut, die bei Zirkumzisionen in kinderchirurgischen Ambulanzen Berlins und dem St. Joseph-Krankenhaus anfiel, wurde sofort nach Operation in sterilem Transportmedium gekühlt in das Labor transportiert und anschließend 1 h bei 37 °C oder 24 h bei 4 °C mit Trypsin/EDTA (5 ml) inkubiert. Bei diesem Prozess lösten sich die Keratinozyten ab. Durch Schwenken der Häute erst in Stop-Medium, dann in PBS wurde die Enzymreaktion beendet. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, in Panserin 801-Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (25 cm²) eingesät (0. Passage) und kultiviert. Für die Isolierung der Fibroblasten wurden die Häute nochmals 1 h in Trypsin/EDTA (5 ml) inkubiert. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben abgestoppt, die Suspension zentrifugiert, in Fibroblasten-Wachstumsmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (25 cm²) eingesät (0. Passage) und kultiviert. Nach einigen Tagen waren die Keratinozyten bzw. Fibroblasten angewachsen. Weiter wurde das Medium abgesaugt, die Kultur mit PBS gewaschen und die Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (1,5 ml) abgelöst, die Reaktion durch 5 ml Stop-Medium beendet, die Zellsuspension zentrifugiert, die Zellen mit PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und in Keratinozyten- bzw. Fibroblasten-Wachstumsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (75 cm²) eingesät (1. Passage) und inkubiert. Bei einem Konfluenzgrad von 50 – 70 % wurden die Zellkulturen im Verhältnis 1:2 bis 1:3 verbreitert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 – 3 Tage. Die Zellen der 0. Passage wurden von mindestens drei Spendern vereint, um interindividuelle Unterschiede auszugleichen. Für die Versuche dienten Zellen der

2. – 4. Passage. Nicht benötigte Zellen der 2. Passage wurden eingefroren und gegebenenfalls durch Auftauen reaktiviert.

Zelllinien. Die Zelllinien HaCaT, SCC4, SCC25, HT29, MCF7, T24 und SISO wurden wie oben beschrieben kultiviert und zweimal pro Woche wie folgt gesplittet:

HaCaT, HT29, T24 1:6 bis 1:8

SCC25, MCF7, SISO 1:3 bis 1:5

SCC4 1:2

Die Zellen wurden dazu einmal mit 5 ml PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1,5 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Durch Zugabe von 3,5 ml Stop-Medium wurde die Enzymreaktion beendet. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellkulturflasche zweimal mit je 5 ml PBS nachgewaschen und die vereinigten Lösungen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen und pro Zellkulturflasche etwa 5×10^5 Zellen in 10 ml vorgelegten Medium ausgesät. Die Zellen wurden wie oben beschrieben eingefroren und reaktiviert.

2.2.2 Viabilitätsuntersuchungen

Grundlage des MTT-Tests. Mit dem MTT-Reduktionsassay (*Mosmann, 1983; Pagé et al., 1988; van de Loosdrecht et al., 1994; Gysler et al., 1997*) wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf die Viabilität von Keratinozyten, Fibroblasten, HaCaT Zellen und Tumorzellen untersucht. Das Testprinzip beruht auf der Umwandlung des gelben MTT zu blauem Formazan (Abb. 2-2) durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium Reduktase. Da diese Umwandlung ein aktives Reduktase-System erfordert, korreliert die Menge des gebildeten Farbstoffs mit der Zahl lebender Zellen.

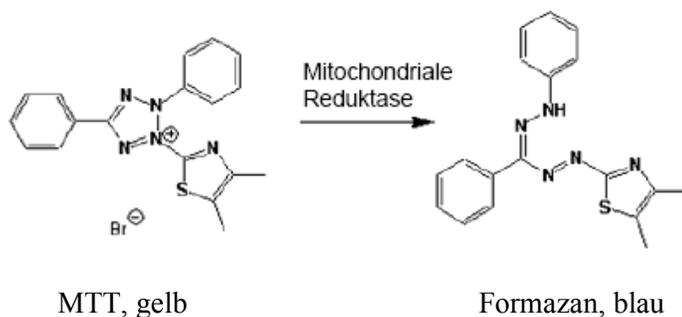


Abb. 2-2: Reduktive Umwandlung des gelben MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zum blauen Formazan.

Aussaat und Stimulation. Die Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend fand ein Mediumwechsel auf 500 μ l Basalmedium statt, lediglich für NHK wurde KGM verwendet. Anschließend wurden die Zellen entsprechend dem Stimulationsschema (Abb. 2-3) steril mit 2,5 μ l der Substanzlösung stimuliert und für 48 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 2,5 μ l des entsprechenden Lösungsmittels zugefügt.

Platte 1

Negativ-kontrolle	Negativ-kontrolle	Negativ-kontrolle	10^{-10} M	10^{-10} M	10^{-10} M
10^{-9} M	10^{-9} M	10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-8} M	10^{-8} M
10^{-7} M	10^{-7} M	10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-6} M	10^{-6} M
10^{-5} M	10^{-5} M	10^{-5} M	10^{-4} M	10^{-4} M	10^{-4} M

Platte 2

Negativ-kontrolle	Negativ-kontrolle	Negativ-kontrolle	Negativ-kontrolle	Negativ-kontrolle	Negativ-kontrolle
10^{-14} M	10^{-14} M	10^{-14} M	10^{-13} M	10^{-13} M	10^{-13} M
10^{-12} M	10^{-12} M	10^{-12} M	10^{-11} M	10^{-11} M	10^{-11} M

Abb. 2-3: Stimulationsschema für Platte 1 und 2 (10^{-4} – 10^{-14} M).

Quantifizierung des MTT-Reduktions-Assay. 48 h nach Zugabe der Testsubstanzen wurde steril und unter Lichtausschluss das Medium durch 500 μ l Medium mit einer MTT-Konzentration von 0,4 mg/ml ersetzt. Nach 4 h Inkubation wurden das Medium abgesaugt und die blauen Formazankristalle durch 5-minütiges Schütteln bei 300 rpm in 250 μ l DMSO pro Well gelöst und die Lichtabsorption bei $\lambda = 540$ nm photometrisch gemessen. DMSO diente als Blankwert (Platte + Lösungsmittel), bestimmt als Mittelwert der Absorptionen in 6 Wells.

Auswertung der Daten, Berechnung. Das Blankwertmittel wurde von allen Messwerten abgezogen. Von jeder Platte wurde zunächst der korrigierte Mittelwert für die Negativkontrollen gebildet und gleich 100 % gesetzt. Daraus wurden die prozentualen Viabilitätsraten der behandelten Proben jeder Platte wie folgt errechnet:

$$\text{Viabilitätsrate (\%)} = \frac{(\text{Messwert-Blankwertmittel}) \times 100 \%}{(\text{Mittelwert}_{\text{Negativkontrollen}} - \text{Blankwertmittel})}$$

2.2.3 Untersuchungen zur Zellproliferation

Grundlage des [³H]-Thymidin-Einbaus. Proliferierende Zellen synthetisieren für die Zellteilung u.a. DNA, wofür sie Nukleotidtriphosphate benötigen. Extrazellulär angebotenes, radioaktiv markiertes Thymidin wird in der Zelle zum Triphosphat aktiviert und in die DNA eingebaut. Die gemessene Radioaktivität kann über eine Eichgerade mit der Zahl der proliferierenden Zellen korreliert werden (*Manggau et al., 2001*).

Aussaat und Stimulation. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben ausgesät und stimuliert mit dem Unterschied, dass für alle Zellen ausschließlich Wachstumsmedium verwendet wurde.

Quantifizierung des [³H]-Thymidin-Einbaus. Bei den folgenden Schritten zur Bestimmung des [³H]-Thymidin-Einbaus waren die Regeln des radioaktiven Arbeitens zu beachten. Nach 24-stündiger Stimulation wurden zu jedem Well 10 µl einer 10%igen [³H]-Thymidin-Lösung (Verdünnung erfolgte mit Wachstumsmedium) pipettiert und die Zellen für weitere drei Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig einmal mit 250 µl eiskaltem PBS und weitere 2 Mal mit je 250 µl TCA gewaschen. Danach wurden die Zellen in 250 µl NaOH (0,3 N) durch Schütteln für eine Stunde bei 300 rpm aufgeschlossen und das Lysat (NaOH-Lösung) in Eppendorf-Caps (2 ml) überführt, die 1,0 ml Szintillations-Cocktail enthielten. Zur vollständigen Mischung der beiden Flüssigkeiten wurden die Caps geschüttelt und gevortext. Die Strahlen-induzierte Fluoreszenz des Szintillations-Cocktails wurde schließlich in einem Szintillationszähler quantifiziert. Die Mischung aus 1,0 ml Szintillations-Cocktail plus 250 µl NaOH diente als Blankwert. Das aus 6 unabhängigen Messungen ermittelte Blankwertmittel diente als konstanter Korrekturfaktor.

Auswertung der Daten, Berechnung. Die Auswertung der Daten und die Berechnung der Proliferationsrate (%) erfolgte wie für die Viabilitätsrate beschrieben (2.2.2).

Wischtest. Für den nach jedem Messtag durchzuführenden Wischtest wurden 6 Caps mit 1,0 ml Szintillations-Cocktail und kleinen Filterpapierstücken, die zuvor mit Ethanol getränkt und über 6 verschiedene Arbeitsgeräte gewischt wurden, bestückt und ebenfalls vermessen. Die Werte durften das Zehnfache des Blankwertes nicht überschreiten und wurden protokolliert.

2.2.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS)

Grundlage der Zellzyklusanalyse. Bevor sich eine Zelle teilt (Mitose, M-Phase), durchläuft sie verschiedene Stadien der Interphase, die als G1-, S- und G2-Phase bezeichnet werden. Ruhende Zellen befinden sich in der G0 Phase. Zellen, die sich in G1 oder G0 befinden, haben einen diploiden Chromosomensatz. Nach der DNA-Synthese in der S-Phase besitzen die Zellen einen tetraploiden Chromosomensatz (G2-Phase), der während der Mitose auf zwei Tochterzellen verteilt wird. Veränderungen der Zellzyklus-Verteilung nach Stimulation von Zellen mit den Testsubstanzen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Der DNA-Gehalt wurde durch Anfärben mit der interkalierenden Substanz PI bestimmt (*Davey & Kell, 1996; Ibrahim & van den Engh, 2003*). PI interkaliert stöchiometrisch in die DNA, so dass sich das Signal von Zellen in der G2-Phase aufgrund eines höheren DNA-Gehalts von dem der Zellen in der G0/G1-Phase unterscheidet. Zellen der S-Phase finden sich zwischen diesen beiden Bereichen. Bei DNA-Strangbrüchen nach apoptotischer und nekrotischer Zellschädigung werden diese DNA-Fragmente als breite Signale vor dem G1-Peak detektiert (tot).

Aussaat und Stimulation. Die Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation fand ein Mediumwechsel auf 1000 μ l Wachstumsmedium statt. Anschließend wurden die Zellen durch sterile Zugabe von 5 μ l der Substanzlösung stimuliert (Stimulationsschema, Abb. 2-4) und 48 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 5 μ l des entsprechenden Lösungsmittels zugefügt.

Negativ- kontrolle	10^{-8} M	10^{-7} M
10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M

Abb. 2-4: Stimulationsschema für eine 6-Loch-Platte (10^{-4} M bis 10^{-8} M).

Probenaufbereitung. Nach 48 h wurden das Medium aus jedem Well jeweils in ein FACS-Röhrchen (auf Eis) überführt und die in der Platte verbleibenden Zellen einmal mit 500 µl eiskaltem PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen. Die Waschlösung wurde in dasselbe FACS-Röhrchen überführt. Zugabe von 250 µl Trypsin/EDTA pro Well und kurze Inkubation löste die adhären Zellen ab. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 750 µl Stopmedium pro Well beendet und die Zellsuspensionen wurden in die zugehörigen FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Wells zweimal mit PBS gewaschen. Das durch Zentrifugieren der vereinigten Lösungen erhaltene Zellpellet wurde in 1000 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 3 x 750 µl Ethanol (96 %) mindestens 30 Minuten bei -20 °C gelagert. Nach Abzentrifugieren des Überstandes wurde das Pellet mit 1000 µl PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend mit 300 µl PI-Mastermix 30 Minuten inkubiert. Alle Arbeitsschritte ab der PI-Zugabe fanden unter Lichtausschluss statt. Direkt vor der Messung wurde jede einzelne Probe nochmals gevortext.

Einstellung des Durchflusszytometers vor der Messung. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit FACS Calibur unter Einsatz der Software Cell Quest. Zunächst wurde für jede Zellart das Zytometer nach Größe (Forwardscatter, FSC) und Granularität (Sidewardscatter, SSC) individuell eingestellt. Das geschah mit Hilfe von unbehandelten Kontrollzellen der entsprechenden Zellart. Durch Veränderung der Spannung bei FL2-H kann die Höhe im FL2-A Plot, durch Änderung der PMT Spannung von FL2-W die Lage des Signals in diesem Histogramm angepasst werden (Abb. 2-5). Durch diese Spannungsänderung wurde in einem Dot Plot mit FL2-A (x-Achse) gegen FL2-W (y-Achse) die Spannung so verändert, dass die Zellen jeweils ungefähr bei Kanal 200 lagen. Durch Legen eines Gates in dem Dot Plot sollten Zellcluster ausgeschlossen werden, da diese die relative Zellzyklus-Verteilung verfälschen würden. Dubletten von G0/G1 Zellen könnten z.B. als G2 Peak gesehen werden.

Auswertung der Daten. Die Auswertung der Zellzyklusanalysen der einzelnen Proben erfolgte mit Hilfe des dazugehörigen FL2-A/FL2-W Dot Plots (Abb. 2-5). Eine polygone Region wurde um die für die Auswertung relevanten Dots gelegt, das der Probe zugehörige FL2-A-Histogramm und zur Kontrolle das FL2-W-Histogramm geöffnet und die zuvor markierte Region auf diese Histogramme angewandt. Für die Ermittlung der prozentualen Anteile der Flächen für die subG1/tot-, G0/G1-, S- und G2-Phase wurden im FL2-A-Histogramm Marker gesetzt und anschließend über die Statistikfunktion deren prozentualer

Anteil berechnet. Jeweils 4 Werte (Zweifachbestimmung an 2 verschiedenen Zellpopulationen) wurden für die subG1/tot-, G0/G1-, S- und G2-Phase erhalten und gemittelt. Die Mittelwerte wurden als Teil vom 100 (100 = Summe der Mittelwerte für subG1/tot, G0/G1, S und G2) dargestellt.

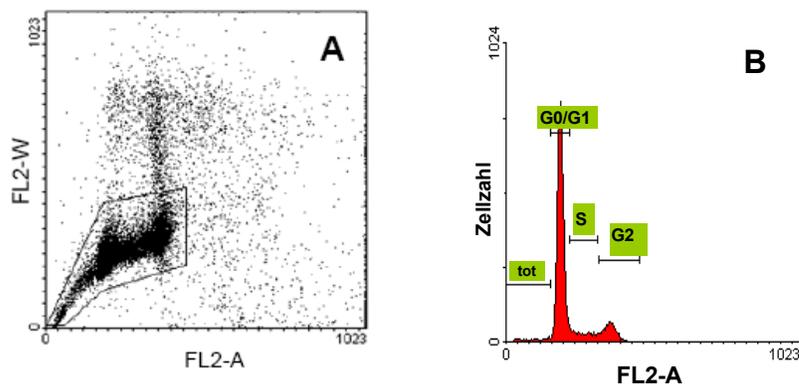


Abb. 2-5: Einstellung des Durchflußzytometers mit einer Kontrollpopulation für Zellzyklusuntersuchungen: **A** FL2-A/FL2-W Dot Plot; **B** FL2-A Histogramm mit den Markern für subG1/tot, G0/G1, S und G2 (aus *Richartz, 2007*).

2.2.5 HPLC Analytik

Zur Herstellung der Stammlösungen ($C = 2 \times 10^{-2}$ M) wurden von jeder Substanz jeweils 4 – 8 mg auf einer Analysenwaage abgewogen (cave: Personen- und Produktschutz, Arbeiten mit potentiell zytotoxischen Substanzen) und in dem entsprechenden Volumen zuvor sterilfiltrierten Lösungsmittels (siehe Tabelle 2-4) gelöst/suspendiert, für ca 5 min gevortext, anschließend ca. 10 min im Ultraschallbad belassen und sodann noch einmal 5 min gevortext. Soweit nicht anders angegeben wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt und die Vials mit einem Mikroinsert bestückt und mit 150 μ l befüllt. Die Laufmittel wurden an die Pumpenzugänge angeschlossen und von Luftblasen befreit, die Programmierung (s.u.) gewählt und die HPLC für 30 min eingelaufen. Vor dem Start jeder Serie erfolgte mindestens ein Blank-Lauf, nach Abschluss einer Serie wurde das System 180 min mit Wasser für die HPLC gewaschen (Flussrate: 0,3 ml/min). Für die Auswertung wurden die Flächenmittelwerte (aus mindestens 3 Versuchen) gegen die Konzentration aufgetragen.

Phosphattrennung mit TBA-Cl. Diese Methode diente dem Nachweis von Thymin, Thymidin, dTMP, dTDP und dTTP sowie Guanin, Guanosin, GMP, GDP und GTP. Diese Methode wurde zudem auf 5-FU, BuP-OH, HM-1-Oxim, Capecitabin und Zalcitabin angewendet. Ausgehend von den Stammlösungen wurden alle weiteren Verdünnungen mit Methanol hergestellt (10^{-9} M – 10^{-4} M). Die Methode basiert auf der von *Decosterd et al.* (1999) beschriebenen, es wurden folgende Konditionen gewählt:

Säule: LiChroCART® 125 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)

Vorsäule: LiChroCART 4-4

Laufmittel: Puffer A und B (siehe 2.1.4.7), Methanol

Flussrate 0,5 ml/min

UV-Absorption: 260 nm

Injektionsvolumen: 30 µl

Programmierung:	Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Methanol (%)
	0	100	0	0
	1	100	0	0
	5	36	64	0
	45	31	69	0
	50	50	0	50
	60	50	0	50
	65	100	0	0
	75	100	0	0

Basische Phosphonattrennung. Zur Analyse von OxBu und OxHex wurde die HPLC-Methode der basischen Phosphonattrennung verwendet. Alle Verdünnungen wurden mit basischem Methanol (Methanol + 0,1% TEA) hergestellt (10^{-7} M – 10^{-4} M). Die Methode orientierte sich an den Vorgaben von Chiracon (Luckenwalde).

Säule: CC250/4 Nucleodur C18 Gravity (5 µm)

Vorsäule: CC 8/4 Nucleodur C18 Gravity (5 µm)

Laufmittel: Wasser für die HPLC + 0,1 % TEA, organische Phase (Acetonitril/Methanol, 40:60 + 0,1 % TEA)

Flussrate: 0,8 ml/min

UV-Absorption: 270 nm

Injektionsvolumen: 50 µl

<u>Programmierung:</u>	<u>Zeit (min)</u>	<u>wässrige Phase (%)</u>	<u>organische Phase (%)</u>
	0	95	5
	20	0	100
	25	95	5
	30	95	5

Phosphonattrennung mit TBA-Cl. Alle Verdünnungen der Substanzen OxBu, OxHex und Adefovir wurden mit dem TBA-Cl-Puffer C (siehe 2.1.4.7) hergestellt (3×10^{-7} M – 3×10^{-5} M). Im Falle der Verwendung von Adefovir als internem Standard wurden die Verdünnungen mit 3 µl Adefovir-Stammlösung versehen, so dass sich eine interne Adefovir-Konzentration von 6×10^{-5} M ergab. Die Methode orientierte sich an den Vorgaben von *Vávrová et al. (2007)*.

Säule: LiChroCART® 250-4 Purospher® STAR RP-18 (5 µm)

Vorsäule: LiChroCART 4-4

Laufmittel: Puffer C (siehe 2.1.4.7), Methanol

Flussrate: 1,1 ml/min

UV-Absorption: 270 nm

Injektionsvolumen: 50 µl

<u>Programmierung:</u>	<u>Zeit (min)</u>	<u>Puffer C (%)</u>	<u>Methanol (%)</u>
	0	90	10
	45	25	75
	60	25	75
	70	90	10
	80	90	10

Im Anschluss an eine Serie wurde folgendes Waschprogramm mit Wasser für die HPLC und Methanol durchgeführt.

<u>Waschen:</u>	<u>Zeit (min)</u>	<u>Wasser (%)</u>	<u>Methanol (%)</u>	<u>Flussrate (ml/min)</u>
	0	100	0	1,0
	40	70	30	1,0
	60	25	75	1,0
	100	100	0	1,0
	180	100	0	0,4

Für die Untersuchungen ohne Standard wurden die Daten wie bereits angegeben ausgewertet. Für die Analysen mit Adefovir als internem Standard wurde das Mittel der Substanz/Adefovir-Verhältnisse (aus mindestens 3 Versuchen) gegen die Konzentration aufgetragen.

2.2.6 Festphasenextraktion

Bei der Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) werden die zu isolierenden Komponenten der flüssigen Phase an einer stationären festen Phase gebunden und später von dieser eluiert (*Solas et al., 1998; Hennion, 1999; Claire, 2000; Rezk et al., 2005*).

Zellkultur. Die Zellen (SCC25) wurden in einer Dichte von 10^5 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium durch 1000 μ l Wachstumsmedium ersetzt. Die Stimulation erfolgte mit 5 μ l der Thymidin- bzw. Guanosinstammlösung in jedes Well (Endkonzentration im Well 10^{-4} M), danach wurde weitere 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde je eine Platte mit den entsprechenden Lösungsmitteln (siehe Tab. 2-4) pipettiert.

Extraktion. Das Medium wurde in 2ml-Tubes überführt und bei -20 °C aufbewahrt. Die (adhärenten) Zellen in 2 Wells der Substanz- bzw. Kontrollplatte wurden jeweils einer Extraktionsmethode (I, II, III) unterworfen:

Extraktionsmethode I	Lyse der Zellen mit 500 μ l Lyse-Puffer (60 min bei 4 °C)
Extraktionsmethode II	Trypsinieren der Zellen mit 500 μ l Trypsin-EDTA (30 min bei 37 °C)
Extraktionsmethode III	Methanolische Extraktion mit 500 μ l MetOH 60%ig (24 h bei -80 °C)

Die erhaltenen Extraktlösungen wurden in ein 2ml-Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert und der Überstand für die Festphasenextraktion abgenommen.

Festphasenextraktion. An die mit den SPE-Säulen (Tab. 2-6) bestückte Extraktionsanlage (Vac Elut Extraction Manifold) wurde nach Schließen aller Auslasshähne ein Vakuum angelegt. Über die Auslasshähne sind die Säulen mit den Auffangröhrchen für den Lösungsmittelüberschuss bzw. die Elutionfraktionen verbunden. Durch Umstecken der SPE-Säulen wird das Auffangröhrchen gewählt. Die SPE-Methodik gliedert sich in folgende Schritte (Abb. 2-6):

- A Konditionieren („Aufschwämmen“ des Säulenmaterials, Porenbildung)
- B Probenaufgabe
- C Waschen
- D Elution

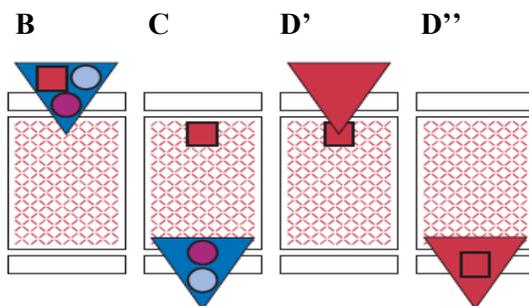


Abb. 2-6: Schematische Darstellung der SPE-Methodik: Konditionieren (nicht dargestellt), Probenaufgabe (B), Waschen (C), Elution (D' und D'').

Getestet wurden alle in Tabelle 2-6 beschriebenen Säulen. Die Säulen wurden mit 1 ml Methanol und 1 ml Puffer A (siehe 2.1.4.7; Phosphattrennung mit TBA-Cl) aufgeschwämmt und das überschüssige Lösungsmittel im Abfallauffangröhrchen aufgefangen. Nach Zugabe von je 500 μ l Puffer B (siehe 2.1.4.7; Phosphattrennung mit TBA-Cl) zu den Extrakten und Mischen wurden die Proben aufgetragen. Nach Waschen der Säulen mit 3 x 500 μ l (Sammeln der Waschlösung in separaten Abfallauffangröhrchen, um eventuell später die Waschlösung untersuchen zu können) erfolgte die Elution mit 3 x 200 μ l Puffer B (siehe 2.1.4.7; Phosphattrennung mit TBA-Cl), wobei eine fraktionierte Sammlung der Eluate erfolgte.

Im Anschluss wurde mittels Vakuum das Lösungsmittel abrotiert (Speed Vac Plus, 40 °C) und die in 100 μ l Methanol gelösten Rückstände wurden mit der HPLC-Methode zur Phosphattrennung mit TBA-Cl (siehe 2.2.5) analysiert.

2.2.7 Statistik

Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellversuche als Dreifachbestimmungen durchgeführt, jeder Versuch wurde mindestens zweimal wiederholt. Lediglich die FACS-Untersuchungen wurden als Zweifachbestimmungen durchgeführt, wobei jeder Versuch einmal wiederholt wurde. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte (MW) angegeben. Als Maß für die Genauigkeit wurde der Standardfehler des Mittelwerts (\pm SEM) berechnet. Der Prüfung auf Signifikanz von Konzentrationsreihen diente die einfaktorische Varianzanalyse (oneway ANOVA). Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt ($p \leq 0.05$). Wurden die Stichproben gegen die Kontrollgruppe getestet, kam der Dunnett's post-hoc Test zum Einsatz. Die grafische Auswertung erfolgte mittels nonlinearer Regression (Dosis-Wirkungskurve, Software: GraphPad Prism 4).

3 ERGEBNISSE

3 ERGEBNISSE

3.1 Zellspezifische Untersuchungen

Eine intensiviertere UV-Exposition hat in den letzten Jahren zu einer Zunahme der Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen und Aktinischen Keratosen geführt. Ein neuer therapeutischer Ansatz ist die Interferenz mit der DNA-Synthese. Dabei ist die Pol α ein Schlüsselenzym, das die ersten Schritte der DNA Replikation katalysiert und mit einer Primase-Funktion assoziiert ist (*Wang, 1991*). Die 3-dimensionale Struktur für den aktiven Bereich der humanen Polymerase α konnte mittels Molecular Modelling konstruiert und eine Reihe bekannter Pol- α -Inhibitoren in das aktive Zentrum gedockt werden (*Richartz et al., 2008*). Gemäß den Molecular-Modelling-Berechnungen der HHU wurden von der FU Chemie die nukleosidischen bzw. nukleotidischen Verbindungen BuP-OH, HM-1, HM-1-Oxim, isoHex-OH, OxBu, OxIsohex, OxHex sowie die Diethylester-Prodrugs OxBu-DE und OxHex-DE synthetisiert, die nun mittels in-vitro-Tests pharmakologisch gescreent wurden. Als Positivkontrolle dienten 5-FU, der derzeitige Standard für die topische Therapie, und Aphidicolin, ein bekannter Pol- α -Hemmer. Foscarnet, ein Hemmstoff der viralen DNA-Polymerase, diente als Negativkontrolle bei der Etablierung der Testsysteme. Die bereits untersuchten Substanzen HM-1 sowie die bislang wirksamste der gemodelten Substanzen – BuP-OH – wurden als weitere Referenzsubstanzen verwendet. Untersucht wurden die Viabilität mittels MTT-Test, die Proliferation mittels Thymidin-Einbau und gegebenenfalls der Zellzyklus (FACS-Analyse). Da die Aussagekraft dieser Testmethoden zeitabhängig ist, wurde auf die Ergebnisse der Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit zurückgegriffen (*Richartz, 2007*). Zunächst lag der Fokus auf primären Keratinozyten, der spontan transformierten HaCaT-Zelllinie und der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25. Anfangs wurde auch eine weitere Plattenepithelkarzinomzelllinie untersucht – die SCC4 Zelllinie; diese wurde schon bald aus den Untersuchungen ausgeschlossen, da sie sehr schlecht kultivierbar war und zudem sehr unregelmäßige Ergebnisse in den Tests lieferte. In die Untersuchungen wurden später Fibroblasten und weitere Krebszelllinien (Kolorektal-, Mamma-, Blasen- und Adenozervixkarzinom) einbezogen.

3.1.1 Thymidin-Analoga

HM-1-Oxim. In Analogie zu 5-FU wurde auf Basis des Molecular Modelling als erster Pol- α -Hemmer das Thymidin-Analogon HM-1 entwickelt, synthetisiert und hinsichtlich seines zytotoxischen Potentials an normalen humanen Keratinozyten (NHK), an der transformierten Keratinozytenzelllinie HaCaT und an der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25 charakterisiert (*Höltje et al., in press*). Da eine Abbaureaktion an der Ketogruppe des Zuckeranalogens Fünfringes während der 48-stündigen Inkubation (37 °C) vermutet worden ist, wurde das wahrscheinlich stabilere Oxim-Derivat hinsichtlich der Passgenauigkeit in die Bindungstasche des Enzyms getestet, synthetisiert und nun wie HM-1 auf Zytotoxizität getestet.

Für HM-1-Oxim konnte keine Steigerung der maximalen Inhibition im Vergleich zu HM-1 festgestellt werden (Abb. 3-1). Auch wenn HM-1-Oxim unter den drei Keratinozytenarten SCC25 Zellen am deutlichsten hemmte (maximale Hemmung: 30 %, Tab. 3-1), war diese Maximalwirkung schwächer als die von HM-1 und sehr viel schwächer als die der Positivkontrolle Aphidicolin (47 % bzw. 62 %). HM-1-Oxim konnte anders als HM-1 nicht den Maximaleffekt von 5-FU erzielen (42 %). Hervorzuheben ist die geringe aktive Konzentration für HM-1-Oxim an SCC25 Zellen, die sogar unter der von Aphidicolin lag (-lg IC₅₀ HM-1-Oxim 7,44 vs. Aphidicolin 6,29). An HaCaT Zellen unterschieden sich dagegen die maximale Inhibition und die -lg IC₅₀-Werte von HM-1 und dem -Oxim nicht, die Wirkung war aber erst bei einer Konzentration von 10⁻⁴ M statistisch signifikant ($p \leq 0,05$ gegenüber der Lösungsmittel-Kontrolle). Eine zu einem Wirkungsverlust von HM-1 führende Abbaureaktion während der 48-stündigen Inkubation bei 37 °C kann damit ausgeschlossen werden. Erwähnenswert ist die fehlende Wirkung von HM-1-Oxim auf NHK, was für eine gewisse Selektivität gegenüber den Tumorzellen spricht.

Die Beeinflussung der Proliferation von NHK, HaCaT und SCC25 Zellen durch die Thymidin-Analoga 5-FU, HM-1 und HM-1-Oxim wurde nicht mittels [³H]-Thymidin-Einbau untersucht, da exogen zugeführtes Thymidin sowohl die Wirkung von HM-1 und HM-1-Oxim als auch den durch 5-FU hervorgerufenen endogenen dTTP-Mangel und damit den antiproliferativen Effekt dieser Substanzen antagonisieren sollte (*Boucher et al., 2006*).

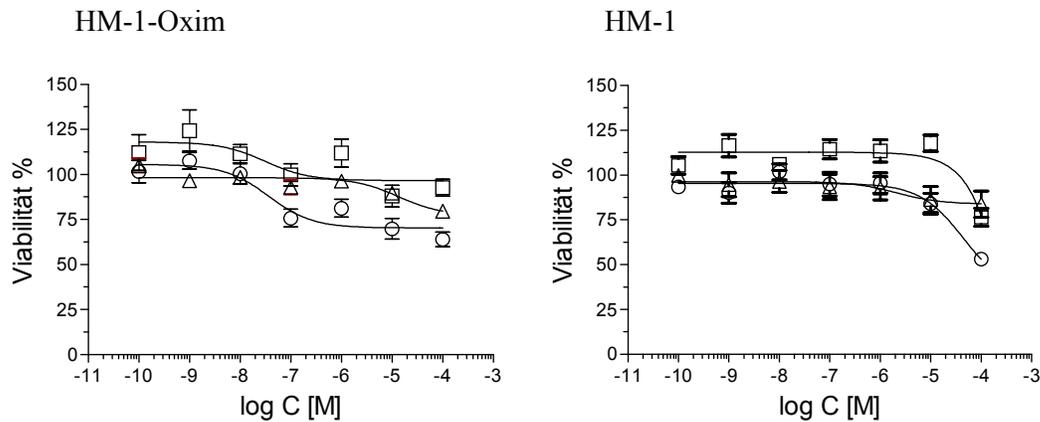


Abb. 3-1: Zytotoxizitäts-Assay des Thymidin-Analogons HM-1-Oxim im Vergleich zu HM-1 an normalen humanen Keratinozyten (NHK, □), an der transformierten Keratinozytenzelllinie HaCaT (Δ) und an der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25 (○). MTT-Viabilitäts-Test nach 48 h Stimulation. (Dosis-Wirkungskurven für HM-1 aus *Richartz, 2007*).

Für Aphidicolin und 5-FU ist die Beeinflussung des Zellzyklus – eine deutliche Verschiebung in die S-Phase – bekannt und konnte für normale humane Keratinozyten, HaCaT und SCC25 Zellen bereits gezeigt werden. Auch mit HM-1 wurde eine Beeinflussung des Zellzyklus festgestellt (*Richartz, 2007*). Bei Keratinozyten stieg der Anteil der Zellen in der G2-Phase von 16 % (Kontrolle, DMSO) auf 36 %, allerdings erst ab einer Konzentration von 10⁻⁴ M. Bei SCC25 Zellen war ebenfalls erst ab dieser Konzentration ein bemerkenswerter Effekt zu verzeichnen, der Anteil der subG1/tot-Fraktion stieg von 8 % der Kontrolle auf 65 %, was für eine starke zytotoxische Wirkung von HM-1 sprach. Da diese starke Wirkung im MTT-Test an kontaktinhibierten Zellen nicht erschien (Tab. 3-1), wurde der MTT-Test auch an nicht-kontaktinhibierten SCC25 Zellen wiederholt und tatsächlich eine Steigerung der Zytotoxizität festgestellt.

Daher sollte die Beeinflussung des Zellzyklus auch durch HM-1-Oxim untersucht werden, wobei HM-1 noch einmal getestet werden sollte, um die vorangegangenen Ergebnisse zu verifizieren. Für HM-1 konnten die Daten reproduziert werden. So stieg in Keratinozyten der G2-Anteil von 22 % der DMSO-Kontrolle auf 40 % und in SCC25 Zellen erhöhte sich der subG1/tot-Anteil von 9 auf 63 % (Abb. 3-2). Auch in der 2. Versuchsserie wurden Effekte erst ab einer Konzentration von 10⁻⁴ M verzeichnet. Für HM-1-Oxim wurde allerdings weder ein Einfluss auf die G2-Phase normaler humaner Keratinozyten noch die starke Zytotoxizität an SCC25 Zellen beobachtet. Insgesamt beeinflusste HM-1-Oxim den Zellzyklus kaum. Dieses Ergebnis entspricht der schwachen Wirkung im MTT-Test (Abb. 3-1). Daher wurde auf den MTT-Test an nicht-kontaktinhibierten SCC25 Zellen verzichtet.

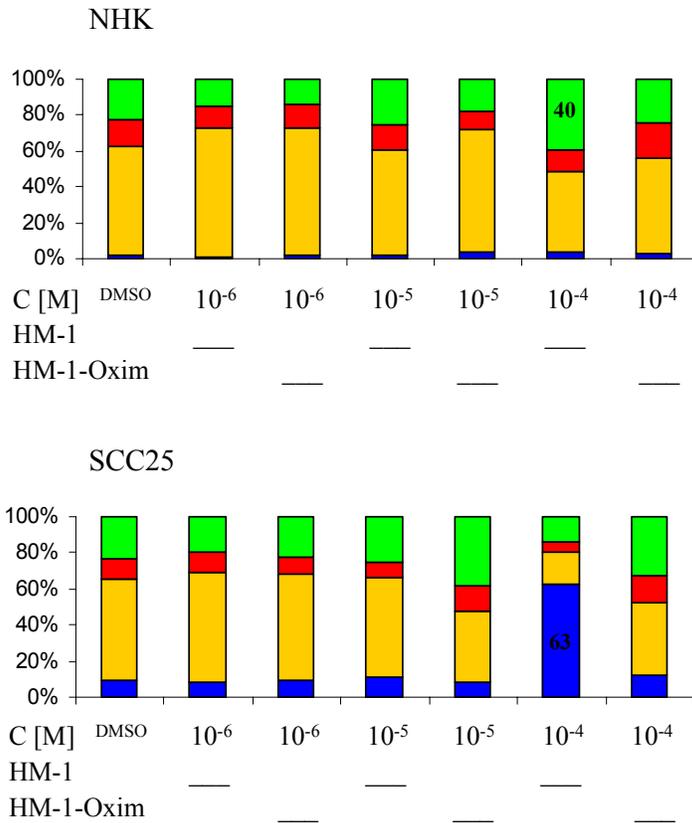


Abb. 3-2: Zellzyklusanalyse von NHK und SCC25 Zellen nach 48 h Stimulation mit HM-1-Oxim im Vergleich zu HM-1. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen: blau - subG1/tot; gelb - G1; rot - S; grün - G2

Costimulation mit HM-1-Oxim und 5-FU. Häufig wird durch Kombination zweier Pharmaka mit unterschiedlichen Angriffspunkten eine wirkungsvollere Therapie angestrebt, als Beispiel sei auf die Dreierkombination aus zwei nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren mit unterschiedlichen Aktivierungswegen und einem nicht nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor bzw. einem HIV-Proteasehemmer in der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) verwiesen. Mit dieser Behandlung kann die Zeit bis zum Erreichen des charakteristischen Endstadiums der AIDS-Erkrankung deutlich verlängert werden. Daher sollte durch Costimulation von NHK und SCC25 Zellen mit 5-FU und HM-1-Oxim mittels MTT-Test auf einen möglichen synergistischen Effekt getestet werden. Die Verschiebung des Zellzyklus in die S-Phase durch den Thymidilatsynthasehemmer 5-FU erhöht theoretisch den Anteil der Zellen, die der Wirkung des neuen, potentiellen Pol- α -Hemmer zugänglich sind.

Folgendes Stimulationsschema wurde gewählt:

Costimulation mit einer Konzentration HM-1-Oxims, die nicht zytotoxisch ist (Versuch 1: 10^{-7} M, Versuch 2: 5×10^{-6} M) in Gegenwart von 5-FU (10^{-7} M – 10^{-5} M) für 48 h.

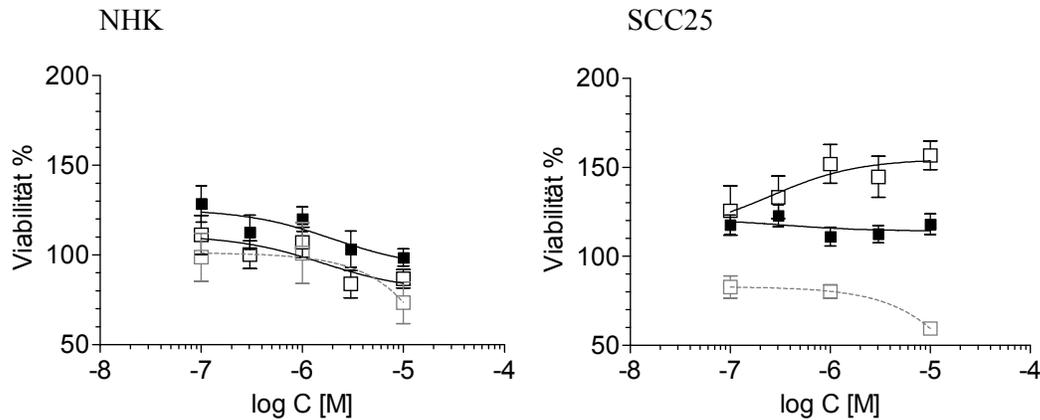


Abb. 3-3: Zytotoxizitäts-Assay der Costimulation (schwarz) mit 5-FU + HM-1-Oxim 10^{-7} M (\square) und 5-FU + HM-1-Oxim 5×10^{-6} M (\blacksquare), im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit 5-FU (\square , grau gestrichelt) an normalen humanen Keratinozyten (NHK) und an der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25. MTT-Viabilitäts-Test nach 48 h Stimulation.

Weder bei normalen humanen Keratinozyten noch bei SCC25 Zellen führte die Costimulation von 5-FU mit HM-1-Oxim zu einer synergistischen Wirkung (Abb. 3-3). Es ergaben sich sogar proliferative Effekte – bei SCC25 Zellen stärker als bei NHK. Bei NHK nahmen diese Effekte mit zunehmender 5-FU-Konzentration ab, bei SCC25 unterschieden sich die Kurven für die Costimulation deutlich von der 5-FU-Referenzkurve, die proliferativen Effekte nahmen sogar mit steigender Konzentration zu.

Präinkubation mit 5-FU. In Analogie zur Costimulation wurden NHK und SCC25 Zellen mit 5-FU nach folgendem Stimulationsschema präinkubiert:

Präinkubation mit 5-FU mit einer Konzentration, die nicht zytotoxisch ist (Versuch 1: 10^{-6} M, Versuch 2: 3×10^{-6} M), 24 h später Zugabe von HM-1-Oxim (10^{-7} M – 5×10^{-5} M) für 48 h.

Die Präinkubation führte bei NHK und SCC25 Zellen zu keiner synergistischen Wirkung (Abb. 3-4). Auch bei diesem Stimulationsschema wurden proliferative Effekte an SCC25 Zellen festgestellt, die stark von der HM-1-Oxim-Referenzkurve abwichen.

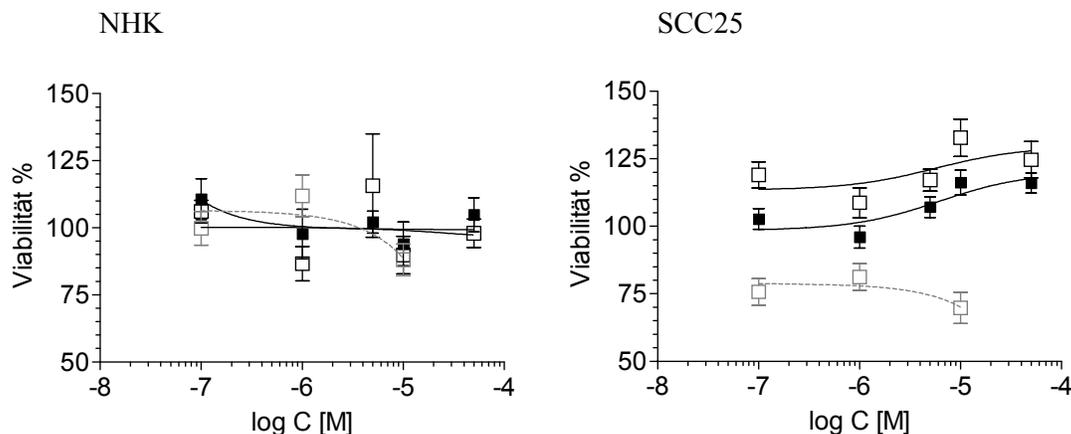


Abb. 3-4: Zytotoxizitäts-Assay nach Präinkubation (schwarz) mit 5-FU 10^{-6} M (\square) bzw. 3×10^{-6} M (\blacksquare), 24 h danach Stimulation (für 48 h) mit HM-1-Oxim, im Vergleich zu HM-1-Oxim ohne 5-FU-Präinkubation (\square , grau gestrichelt) an normalen humanen Keratinozyten (NHK) und an der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25.

Insgesamt konnte weder mit Costimulation noch durch Präinkubation eine stärkere Zytotoxizität erreicht werden. Die Werte streuten zudem in allen Versuchen stark. Möglicherweise konkurrieren die beiden Thymidin-Analoga 5-FU und HM-1-Oxim um dieselben aktivierenden Enzyme. Analoge Versuche mit 5-FU und BuP-OH führten in vorangegangenen Arbeiten zu keinem signifikant synergistischen Effekt, es kam ebenfalls zu einer erhöhten Proliferation (Richartz, 2007).

Viabilität (48 h)		NHK	HaCaT	SCC25
Aphidicolin	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	8,26 ± 0,41	6,34 ± 0,21	6,29 ± 0,29
	Max. Inhibition	44 %	86 %	62 %
5-FU	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	5,08 ± 0,48	6,22 ± 0,16	6,01 ± 0,28
	Max. Inhibition	41 %	80 %	42 %
HM-1	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	4,41 ± 0,72	5,69 ± 1,12	4,74 ± 0,34
	Max. Inhibition	23 %	16 %	47 %
HM-1-Oxim	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	n. d.	5,04 ± 0,40	7,44 ± 0,32
	Max. Inhibition		20 %	30 %
BuP-OH	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	4,58 ± 0,24	/	5,05 ± 0,37
	Max. Inhibition	66 %		65 %
isoHex-OH	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	4,50 ± 0,90	/	4,41 ± 0,92
	Max. Inhibition	46 %		54 %
Foscarnet	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	n. d.	n. d.	n. d.
	Max. Inhibition			

Tab. 3-1: Zytotoxizität der Thymidin-Analoga HM-1 und HM-1-Oxim sowie der Guanosin-Analoga BuP-OH und isoHex-OH im Vergleich zu Aphidicolin und 5-FU (Positivkontrolle), und Foscarnet (Negativkontrolle). -lg IC₅₀-Werte [M] ± SEM und maximale Inhibition (%) im MTT-Test nach 48 h Stimulation an NHK, HaCaT und SCC25 Zellen. n. d.: -lg IC₅₀ ist nicht bestimmbar, maximale Inhibition ist ≤ 15 %. (Werte für HM-1 und BuP-OH aus Richartz, 2007).

3.1.2 Guanosin-Analoga

IsoHex-OH. IsoHex-OH ist das iso-Hexyl-Analogon zu BuP-OH, das in vorangegangenen Untersuchungen deutlich stärker wirkte als HM-1 (Richartz, 2007), die 5'-OH-Gruppe am Zucker liegt unphosphoryliert vor. Bei BuP-OH und isoHex-OH könnte die intrazelluläre Aktivierung zum entsprechenden Triphosphat die Effektivität begrenzen, da die Einführung des ersten Phosphats wie unter 1.6.2 dargelegt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Spadari et al., 1998). Im Zytotoxizitäts-Assay (MTT-Test, 48 h) ergaben sich für isoHex-OH ähnlich gute Ergebnisse wie für BuP-OH (Abb. 3-5), maximal wurde eine 46%ige (NHK) bzw. 54%ige (SCC25) Viabilitätsabnahme erreicht. Die Hemmung durch BuP-OH betrug 66% (NHK) bzw. 65% (SCC25; Richartz, 2007). Damit übertreffen beide Substanzen die Maximaleffekte von 5-FU, die sehr ähnlichen aktiven Konzentrationen von isoHex-OH und BuP-OH übersteigen jedoch etwas die aktiven Konzentrationen von 5-FU (Tab. 3-1) wie die -lg IC₅₀-Werte zeigen.

Damit ergibt sich im Hinblick auf maximale Hemmung und aktive Konzentration (Tab. 3-1) folgende Abstufung der Wirksamkeit im MTT-Test: Aphidicolin > BuP-OH, isoHex-OH, 5-FU > HM-1, HM-1-Oxim > Foscarnet. Die Voraussagen der Molecular Modelling Studien treffen somit im Wesentlichen zu. Da isoHex-OH entgegen dieser Voraussagen nicht effektiver ist als BuP-OH, könnte der Eintritt des Moleküls in die molekulare Tasche der Polymerase α durch die iso-Hexyl-Gruppe behindert sein (Höltje et al., in press). Angesichts der Nicht-Überlegenheit von isoHex-OH gegenüber BuP-OH, wurde auf Untersuchungen zum Thymidin-Einbau verzichtet.

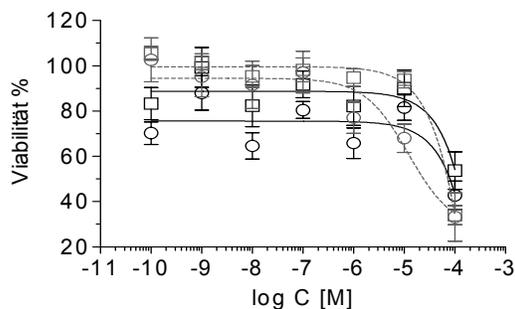


Abb. 3-5: Zytotoxizitäts-Assay des Guanosin-Analogons isoHex-OH (schwarz durchgezogen) im Vergleich zu BuP-OH (grau gestrichelt) an normalen humanen Keratinozyten (NHK, □) und Plattenepithelkarzinomzellen (SCC25; ○). MTT-Viabilitäts-Test nach 48 h Stimulation. (Dosis-Wirkungskurven für BuP-OH aus Richartz, 2007).

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen mit isoHex-OH ergaben allenfalls eine geringe Beeinflussung des Zellzyklus (Abb. 3-6). Das korreliert mit den für BuP-OH erhaltenen Werten, die nur einen geringen Einfluss auf den Zellzyklus der Zielzellen erkennen ließen (Richartz, 2007).

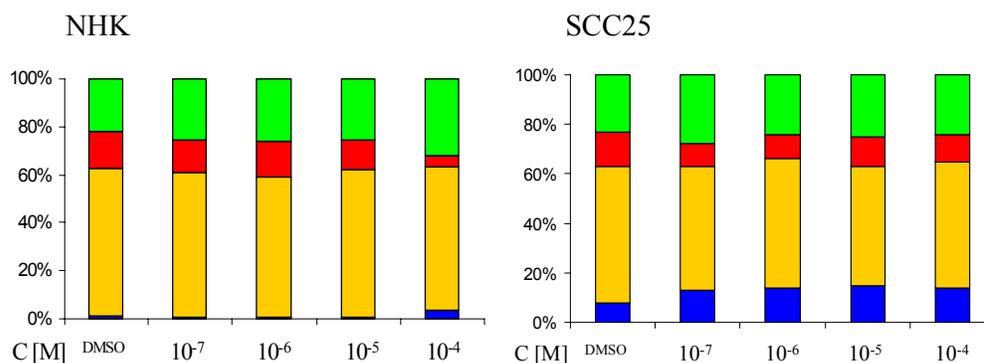


Abb. 3-6: Zellzyklusanalyse für normale humane Keratinozyten (NHK) und SCC25 Zellen nach 48 h Stimulation mit isoHex-OH. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen: blau - subG1/tot; gelb - G1; rot - S; grün - G2

3.1.3 Guanosin-Analoga mit Phosphonatgruppe (Phosphonate)

Wie erwähnt, müssen die nukleosidischen Pol- α -Inhibitoren durch Phosphorylierung in ihre Triphosphate überführt werden. Phosphonate sind als Monophosphat-Analoga mit einer metabolisch stabilen P-C-Bindung leichter aktivierbar als die Nicht-Phosphonate. Phosphonate sind zudem mäßig hydrophil und demzufolge für die Hautpenetration geeignet. Mittels Molecular Modelling Studien wurden OxBu, OxIsohex und OxHex (Tab. 2-3) identifiziert (Zdrasil et al., submitted), wobei es sich um Phosphonat-Analoga von BuP-OH, Isohex-OH (s. Kapitel 3.1.2) und das entsprechende n-Hexyl-Analagon handelt. Die in-vitro-Untersuchungen erfolgten wiederum mit diesen Substanzen und nicht mit deren Diphosphaten (Triphosphat-Analoga). Die intrazelluläre Aktivierung erfolgt durch zelluläre Kinasen, deren Expression bereits in NHK und SCC25 Zellen nachgewiesen ist (Richartz, 2007).

Zunächst wurden die Phosphonate an NHK, HaCaT Zellen und der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25 im Vergleich zu Aphidicolin, 5-FU und BuP-OH mittels MTT-Test und [³H]-Thymidin-Einbau getestet. Außerdem wurden normale humane Fibroblasten in die Untersuchungen einbezogen, um zytotoxische Effekte auf das Korium

abschätzen zu können, falls die Substanzen bei entsprechender pharmazeutischer Formulierung so tief in die Haut penetrieren sollten. Foscarnet diente erneut als Negativkontrolle, da es in keinem der untersuchten Zelltypen einen Effekt aufwies.

Mit OxBu und OxHex – beide mit n-Alkyl-Seitenkette – konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. OxBu wirkt im MTT-Test hochselektiv: NHK und HaCaT-Zellen wurden so gut wie nicht angegriffen, während die Viabilität von SCC25 Zellen maximal um 39 % sank (Abb. 3-3; Tab. 3-2). Die maximale Hemmung durch OxBu entspricht fast der von 5-FU, doch ist die aktive Konzentration von OxBu erheblich kleiner. So betragen die $-\lg IC_{50}$ -Werte für OxBu 9,43, für 5-FU 6,01. OxBu wirkt auf SCC25 Zellen in 1000-fach bzw. 10.000-fach geringeren Konzentrationen als Aphidicolin und BuP-OH (Tab. 3-2), allerdings ist die maximale Hemmung der Zellviabilität durch OxBu deutlich geringer als die der Referenzsubstanzen (max. Inhibitionen in SCC25 Zellen: OxBu 39 % vs 62 % bzw. 65 % für Aphidicolin bzw. BuP-OH). Die Tumorselektivität von OxBu konnte durch Untersuchungen an der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC4 untermauert werden, welche OxBu maximal zu ca. 47 % in der Viabilität hemmte.

OxHex hemmte die Viabilität von SCC25 Zellen mit maximal 74 % sogar deutlich stärker als OxBu und die aktive Konzentration war ähnlich gering wie die von OxBu (Abb. 3-7; Tab. 3-2). Zwar wurden NHK von OxHex stärker angegriffen als von OxBu, jedoch war die maximale Inhibition mit 43 % wesentlich geringer als bei SCC25 Zellen. Die Maximalwirkungen an NHK entsprechen denen von 5-FU, die aktive Konzentration von OxHex ist wieder sehr gering ($-\lg IC_{50}$ OxHex: 7,89 vs. 5-FU: 5,08). Ebenso wie NHK wurden HaCaT Zellen bei maximal 17%iger Hemmung nur moderat durch OxHex beeinflusst. Somit besteht auch für OxHex eine gewisse Tumorselektivität.

Beim Vergleich der beiden Phosphonate ergibt sich für OxHex der Vorteil einer stärkeren Zytotoxizität, während sich OxBu durch die Resistenz der NHK auszeichnet – bei mittelstarker Wirkung auf SCC25. Die aktiven Konzentrationen sind niedrig, wodurch eine topische Therapie erleichtert wird.

Normale humane Fibroblasten wurden von OxBu bzw. OxHex zu 62 % bzw 65 % geschädigt (Tab. 3-2), wobei OxHex bereits in niedrigen ($-\lg IC_{50}$ 8,25), OxBu dagegen erst in hohen Konzentrationen ($-\lg IC_{50}$ ca. 4,27) zytotoxisch wirkte. Insofern ist eine stärkere Schädigung des Korioms durch OxHex als durch OxBu zu erwarten. Allerdings wirken auch die Referenzsubstanzen Aphidicolin, 5-FU und BuP-OH auf Fibroblasten toxisch.

Entsprechend den Ergebnissen des Molecular Modelling müsste OxIsohex, welches eine Iso-Hexyl-Seitenkette besitzt, ein sehr starker Inhibitor der Pol α sein. Allerdings konnte das nicht nachgewiesen werden. Bezogen auf die maximale Hemmung war OxIsohex sogar weniger zytotoxisch als isoHex-OH. Doch zeigte OxIsohex eine Zellselektivität: es griff NHK nicht an, wirkte aber auf SCC25 Zellen zytotoxisch, wenn auch mit maximal 20 % Viabilitätshemmung nur sehr moderat (Abb. 3-7; Tab. 3-2). SCC4 Zellen wurden zu ca. 47 % gehemmt. Allerdings lieferte diese Zelllinie meist uneindeutige Ergebnisse, so dass eine genaue Analyse der Daten ausgeschlossen war. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher auf SCC4 Zellen verzichtet.

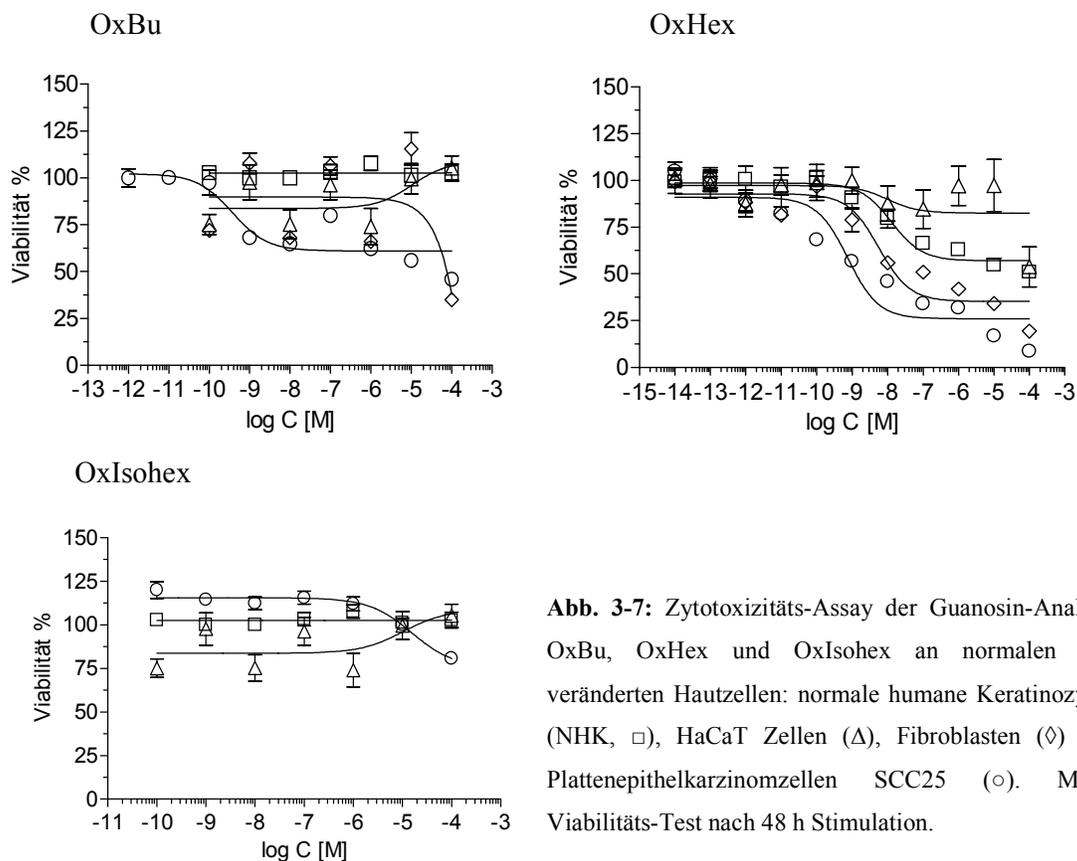


Abb. 3-7: Zytotoxizitäts-Assay der Guanosin-Analoga OxBu, OxHex und OxIsohex an normalen und veränderten Hautzellen: normale humane Keratinozyten (NHK, □), HaCaT Zellen (Δ), Fibroblasten (◇) und Plattenepithelkarzinomzellen SCC25 (○). MTT-Viabilitäts-Test nach 48 h Stimulation.

Ferner wurde der [³H]-Thymidin-Einbau gemessen, um den Einfluss von OxBu und OxHex auf die Proliferation der Zellen zu klären (Abb. 3-8). OxBu zeigte auch im Proliferationsassay keinen Effekt auf NHK und HaCaT Zellen, verringerte aber die Proliferation von SCC25 Zellen um bis zu 74 %, d.h. OxBu wirkte auf SCC25 Zellen stärker antiproliferativ als zytotoxisch (Tab. 3-2). Die Ergebnisse für OxHex stimmten mit den im MTT-Test erhaltenen überein: NHK wurden zu maximal 41 %, HaCaT mit 17 % moderat und SCC25 Zellen mit

69 % stark angegriffen. An der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25 traten die Effekte beider Phosphonate bereits in niedrigen Konzentrationen auf (-lg IC₅₀ OxBu 9,14; -lg IC₅₀ OxHex 7,39). Damit weisen beide Testsysteme auf eine starke Wirkung von OxHex und mittelstarke Wirkung von OxBu hin. Aphidicolin und BuP-OH inhibieren die DNA-Synthese von NHK komplett und greifen auch HaCaT Zellen stark an. An SCC25 Zellen bleibt Aphidicolin interessanterweise hinter den getesteten Phosphonaten zurück (Tab. 3-2). Wie bereits ausgeführt, kann 5-FU nicht in die Tests zum Thymidin-Einbau einbezogen werden. OxIsohex beeinflusste die Proliferation von HaCaT Zellen nicht. Die Proliferation von NHK wurde zunächst stark beschleunigt, verringerte sich aber ab einer Konzentration von ca. 10⁻⁷ M (ohne Abbildung). Die maximale Hemmung der Proliferation (bei 10⁻⁴ M) gegenüber der unbehandelten Kontrolle betrug an NHK 22 %, an SCC25 Zellen maximal 64 %.

Da OxBu und OxHex klar wirksamer waren als OxIsohex, wurde dieses in weiteren Untersuchungen nicht mehr mitgeführt. Das Fehlen der erwarteten Wirksamkeit dieser Substanz könnte mit einem erschwerten Zugang der nicht-linearen Seitenkette zum aktiven Zentrum des Enzyms (Pol α) zusammenhängen (*Zdrzil et al., submitted*) – dies hatte bereits der Vergleich der Wirkung von BuP-OH mit isoHex-OH gezeigt.

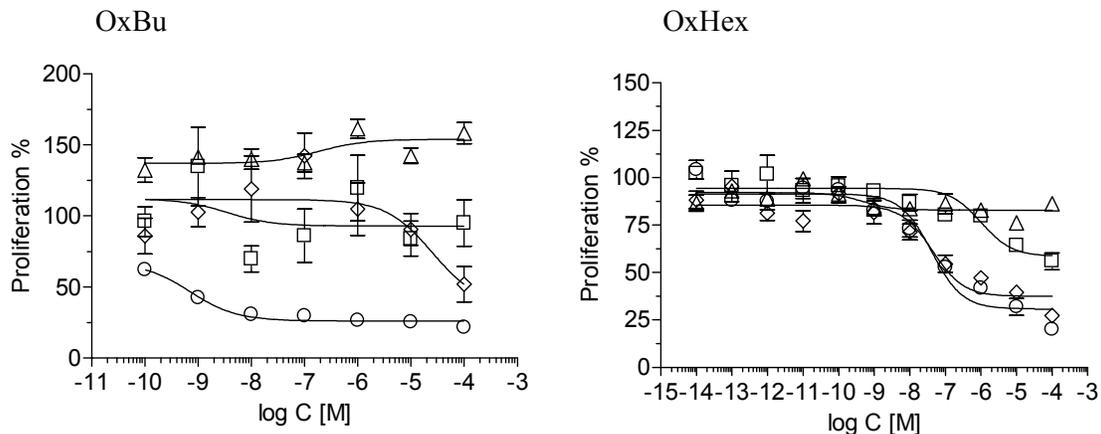


Abb. 3-8: Proliferations-Assay der Guanosin-Analoga OxBu und OxHex an normalen und veränderten Hautzellen: normale humane Keratinozyten (NHK, □), HaCaT Zellen (Δ), Fibroblasten (◇) und Plattenepithelkarzinomzellen SCC25 (○). [³H]-Thymidin-Einbau nach 24 h Stimulation.

Aufgrund der starken Wirksamkeit von OxBu und OxHex, sollten diese an weiteren Tumorzelllinien (HT29, MCF7, T24, SISO) untersucht werden. Die Referenzsubstanzen Aphidicolin, 5-FU und BuP-OH wurden ebenfalls getestet (Abb. 3-9). Größtenteils lagen die

-lg IC₅₀-Werte für die fünf Substanzen zwischen 7 und 9 (Tab. 3-2). Hervorzuheben ist die Toxizität von 5-FU auf T24 Zellen bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (-lg IC₅₀: 12,55). Gleiches gilt für die Wirkung von OxBu auf HT29 Zellen (-lg IC₅₀: 11,31) und von OxHex auf MCF7 Zellen (-lg IC₅₀: 9,25). Für die Zelllinien HT29, MCF7 und T24 lagen die maximalen Hemmungen hauptsächlich im Bereich 50 – 70 %. Besonders groß war die maximale Inhibition von BuP-OH an MCF7 Zellen (75 %), überraschend gering die von 5-FU an T24 Zellen (43 %), die sehr niedrige aktive Konzentration (s.o.) hätte eine stärkere Zytotoxizität erwarten lassen. Die maximale Viabilitätshemmung an SISO Zellen lag zwischen 38 % (BuP-OH) und 51 % (Aphidicolin). OxBu und OxHex wirkten somit auch an den vier zusätzlich untersuchten Tumorzelllinien zuverlässig – OxBu sogar mit größerem Maximaleffekt als bei SCC25 Zellen. Bei OxHex übertraf die zytotoxische Wirkung auf diese Tumorzelllinien die Schädigung von SCC25 Zellen nicht. Für Aphidicolin und BuP-OH wurde eine durchgängig starke, zellunspezifische Zytotoxizität gezeigt.

Ferner wurden OxBu und OxHex hinsichtlich ihrer antiproliferativen Wirkung an den genannten Tumorzelllinien untersucht (Abb. 3-10). Die -lg IC₅₀-Werte lagen im Bereich 7 bis 9, dies stimmte gut mit den Werten des Zytotoxizitätsassays überein. Die maximale Hemmung des Thymidin-Einbaus war im Allgemeinen etwas geringer als die im MTT-Test (Tab. 3-2). OxBu zeigte an MCF7 Zellen mit einem Maximaleffekt von 47 % und einem -lg IC₅₀-Wert von 8,96 die stärkste Wirkung, OxHex war weniger aktiv (-lg IC₅₀: 7,01), hemmte die Proliferation aber zu maximal 61 %. Auffällig sind die Ergebnisse an HT29 Zellen: OxHex zeigte einen Maximaleffekt von nur 24 %, OxBu förderte sogar die Proliferation.

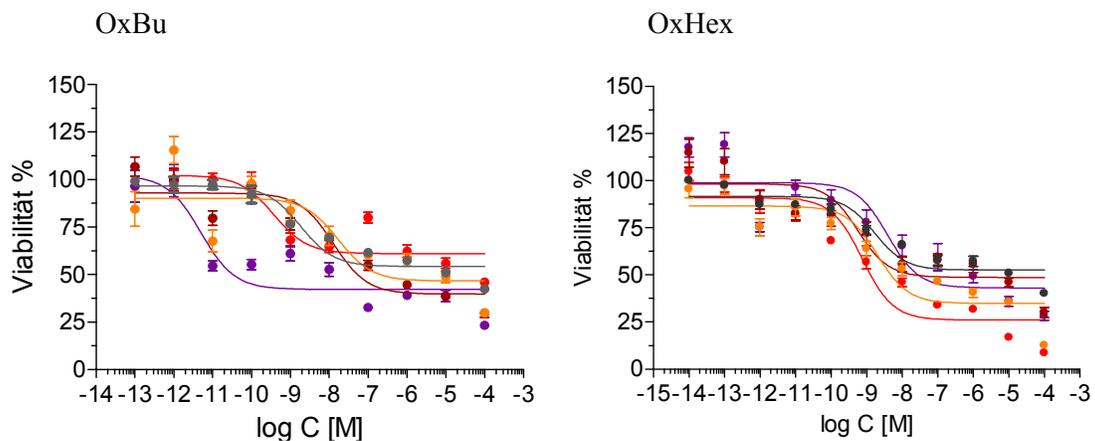


Abb. 3-9: Zytotoxizitäts-Assay der Guanin-Analoga OxBu und OxHex an den Tumorzelllinien SCC25 (rot), HT29 (lila), MCF7 (weinrot), T24 (orange), SISO (grau). MTT-Viabilitäts-Test nach 48 h Stimulation.

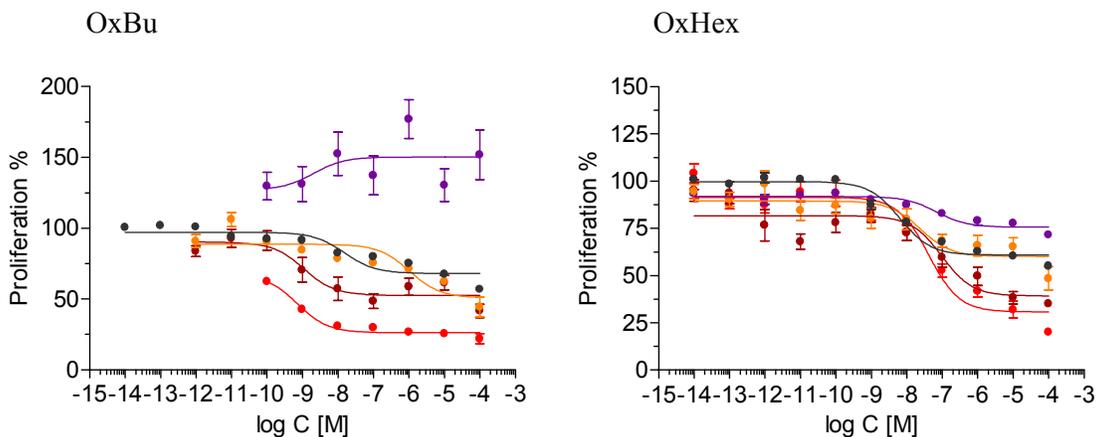


Abb. 3-10: Proliferations-Assay der Guanin-Analoga OxBu und OxHex an den Tumorzelllinien SCC25 (rot), HT29 (lila), MCF7 (weinrot), T24 (orange), SISO (grau). [³H]-Thymidin-Einbau nach 24 h Stimulation.

Tab. 3-2: Zytotoxizität und Proliferationshemmung der Guanin-Analoga OxBu, OxHex und OxIsohex mit den Referenzsubstanzen Aphidicolin, 5-FU und BuP-OH an den genannten Zelllinien: -lg IC₅₀-Werte [M] ± SEM und maximale Inhibition (%). MTT-Viabilitäts-Test nach 48 h Stimulation, [³H]-Thymidin-Einbau nach 24 h Stimulation. n.d.: -lg IC₅₀ ist nicht bestimmbar, maximale Inhibition ≤ 15 %.

MTT Test 48 h		NHK	HaCaT	Fb	SCC25	HT29	MCF7	T24	SISO
Aphidicolin	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	8,26 ± 0,41	6,34 ± 0,21	8,07 ± 0,25	6,29 ± 0,29	7,66 ± 0,23	8,61 ± 0,17	8,67 ± 0,21	8,57 ± 0,19
	Max. Inhibition	44 %	86 %	54 %	62 %	67 %	61 %	62 %	51 %
5-FU	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	5,08 ± 0,48	6,22 ± 0,16	4,94 ± 0,25	6,01 ± 0,28	7,80 ± 0,23	8,31 ± 0,16	12,55 ± 0,31	8,39 ± 0,15
	Max. Inhibition	41 %	80 %	88 %	42 %	66 %	70 %	43 %	43 %
BuP-OH	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	4,58 ± 0,24	4,64 ± 0,32	7,61 ± 0,25	5,05 ± 0,37	6,37 ± 0,21	7,32 ± 0,21	8,25 ± 0,21	7,34 ± 0,33
	Max. Inhibition	66 %	68 %	53 %	65 %	67 %	75 %	66 %	38 %
OxBu	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	n.d.	n.d.	4,27 ± 0,91	9,43 ± 0,22	11,31 ± 0,21	7,89 ± 0,15	7,77 ± 0,28	8,76 ± 0,14
	Max. Inhibition			62 %	39 %	58 %	60 %	53 %	46 %
OxHex	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	7,89 ± 0,22	8,01 ± 1,17	8,25 ± 0,16	9,12 ± 0,11	8,40 ± 0,23	9,25 ± 0,23	8,70 ± 0,17	8,77 ± 0,14
	Max. Inhibition	43 %	17 %	65 %	74 %	57 %	51 %	65 %	47 %
OxIsoHex	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	n.d.	n.d.	-	4,93 ± 0,26	-	-	-	-
	Max. Inhibition				20 %				
Proliferation 24 h		NHK	HaCaT	Fb	SCC25	HT29	MCF7	T24	SISO
Aphidicolin	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	7,08 ± 0,05	7,05 ± 0,04	-	6,07 ± 0,18	-	-	-	-
	Max. Inhibition	100 %	99 %		58 %				
BuP-OH	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	5,59 ± 0,27	5,01 ± 0,35	-	5,07 ± 0,38	-	-	-	-
	Max. Inhibition	100 %	67 %		87 %				
OxBu	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	n.d.	n.d.	4,84 ± 0,68	9,14 ± 0,16	8,68 ± 1,44	8,96 ± 0,33	5,98 ± 0,23	7,81 ± 0,16
	Max. Inhibition			48 %	74 %	n.d.	47 %	49 %	32 %
OxHex	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	5,99 ± 0,26	9,32 ± 0,75	7,31 ± 0,20	7,39 ± 0,15	7,16 ± 0,23	7,01 ± 0,24	7,62 ± 0,34	8,19 ± 0,09
	Max. Inhibition	41 %	17 %	63 %	69 %	24 %	61 %	40 %	39 %
OxIsoHex	-lg IC ₅₀ [M] ± SEM	4,95 ± 0,65	n.d.	-	9,16 ± 0,21	-	-	-	-
	Max. Inhibition	22 %			64 %				

Mit Hilfe der Zellzyklusanalyse (48 h) sollte geklärt werden, ob die Phosphonate den Zellzyklus von NHK, HaCaT und SCC25 Zellen in bestimmten Phasen arretieren, wodurch die erhöhten Einbauraten in den Versuchen zum Thymidin-Einbau erklärt werden könnten (Abb. 3-10). Allerdings ergab die Zellzyklusanalyse keine gravierende Beeinflussung des Zellzyklus durch OxBu (Abb. 3-11) bzw. OxIsohex (Daten nicht gezeigt). OxBu beeinflusste auch den Zellzyklus von Fibroblasten, HT29 und MCF7 Zellen nicht wesentlich (Daten nicht gezeigt). Da mit diesen Untersuchungen keine weiterführenden Aussagen möglich waren, wurde auf die Untersuchungen mit den anderen Tumorzelllinien und OxHex verzichtet.

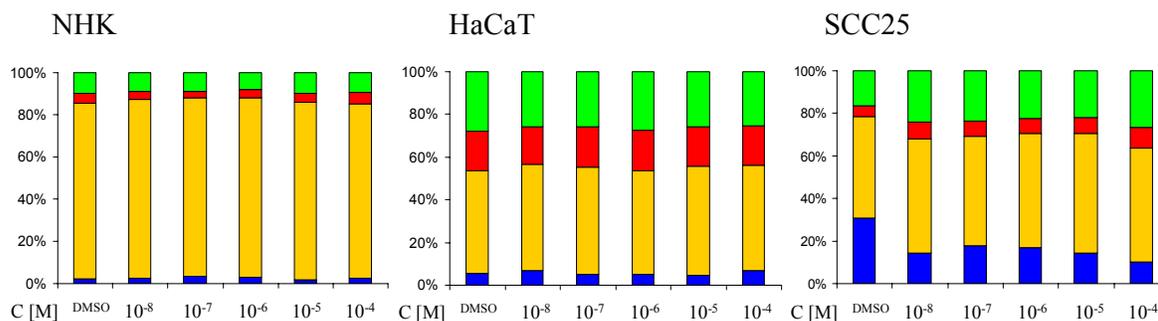


Abb. 3-11: Zellzyklusanalyse für NHK, HaCaT und SCC25 Zellen nach 48 h Stimulation mit OxBu. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen: blau - subG1/tot; gelb - G1; rot - S; grün - G2

3.1.4 Diethylester-Vorstufen der Phosphonate

Da Keratinozyten stark Esterasen exprimieren (*Gysler et al., 1997; Ngawhirunpat et al., 2003; Haberland et al., 2006*), sollte überprüft werden, ob auch die vorletzte Synthesestufe der Pol- α -Hemmer OxBu und OxHex – die entsprechenden Diethylester (DE, OxBu-DE; OxHex-DE) – als Arzneistoffe geeignet sein könnten. Deren höhere Lipophilie könnte zudem die Aufnahme in die Targetzellen erleichtern, in denen durch zytosolische Hydrolasen die beiden Ethylestergruppen abgespalten werden. Somit stünde eine größere Menge OxBu bzw. OxHex für die Hemmung der Pol α zur Verfügung. Da die Diethylester-Vorstufen zunächst hydrolysiert und anschließend in die Phosphonat-Diphosphate überführt werden müssen, stellen sie Prä-Prodrugs dar.

An NHK und SCC25 Zellen wurden daher die Zytotoxizität und Proliferationshemmung von OxBu-DE und OxHex-DE untersucht. Die pharmakologischen Kennzahlen für OxBu-DE und OxHex-DE sind in Tabelle 3-3 aufgeführt, die der Referenzsubstanzen sowie der Muttersubstanzen OxBu und OxHex in Tabelle 3-2.

Tab. 3-3: Zytotoxizität und Proliferationshemmung der Prä-Prodrugs OxBu-DE und OxHex-DE: $-\lg IC_{50}$ -Werte $[M] \pm SEM$ und maximale Inhibition (%).

		Viabilität (48 h)		Proliferation (24 h)	
		NHK	SCC25	NHK	SCC25
OxBu-DE	$-\lg IC_{50} [M] \pm SEM$	$8,88 \pm 0,20$	$7,81 \pm 0,19$	$8,11 \pm 0,25$	$7,36 \pm 0,20$
	Max. Inhibition	57 %	72 %	40 %	63 %
OxHex-DE	$-\lg IC_{50} [M] \pm SEM$	$7,99 \pm 0,15$	$8,93 \pm 0,14$	$7,01 \pm 0,24$	$7,38 \pm 0,15$
	Max. Inhibition	69 %	72 %	61 %	69 %

OxBu-DE griff sowohl NHK als auch SCC25-Zellen stärker an als OxBu (Abb. 3-12). Die maximale Zytotoxizität von OxBu-DE betrug für NHK 57 % und für SCC25 Zellen 72 %, die der Muttersubstanz OxBu 0 % bzw. 39 %. Allerdings änderte sich für das Prä-Prodrug OxBu-DE nicht der wirksame Konzentrationsbereich, wie die $-\lg IC_{50}$ -Werte erkennen lassen. OxHex-DE hemmte die Viabilität der SCC25 Zellen nicht stärker als OxHex. Dies trifft gleichermaßen auf die maximalen Hemmungen sowie die $-\lg IC_{50}$ -Werte zu. Allerdings erhöhte sich für OxHex-DE die Toxizität auf NHK. Die stärkere Schädigung normaler humaner Keratinozyten durch beide Prä-Prodrugs ist bei einer zukünftigen topischen Therapie nicht erwünscht.

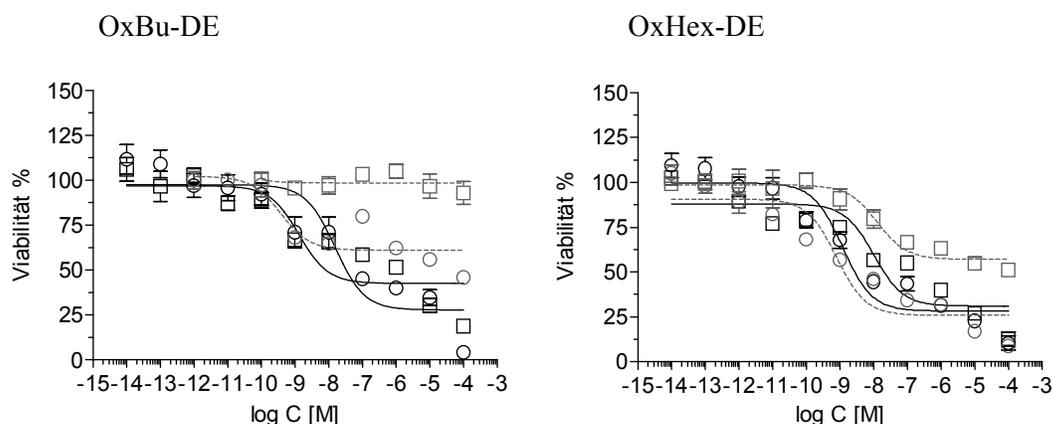


Abb. 3-12: Zytotoxizitäts-Assay der Prä-Prodrugs OxBu-DE und OxHex-DE (schwarz durchgezogen) im Vergleich zu den Muttersubstanzen (grau gestrichelt) an normalen humanen Keratinozyten (NHK, \square) und der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25 (\circ). MTT-Viabilitäts-Test nach 48 h Stimulation.

Die Resultate des [³H]-Thymidin-Einbaus stimmten gut mit denen des MTT-Tests überein. Auch im Proliferations-Assay zeigte sich für beide Diethylestervorstufen eine stärkere Schädigung von NHK im Vergleich zu den Muttersubstanzen (Abb. 3-13), wodurch die Selektivität für die Tumorzellen fast komplett verloren ging. Allerdings beeinflussten OxBu-DE und OxHex-DE die Proliferation der SCC25 Zellen nicht stärker als die freien Phosphonate.

Das Wirkprofil der Diethylester-Vorstufen ist somit ungünstiger als das von OxBu und OxHex – auf weitere Untersuchungen wurde deshalb verzichtet.

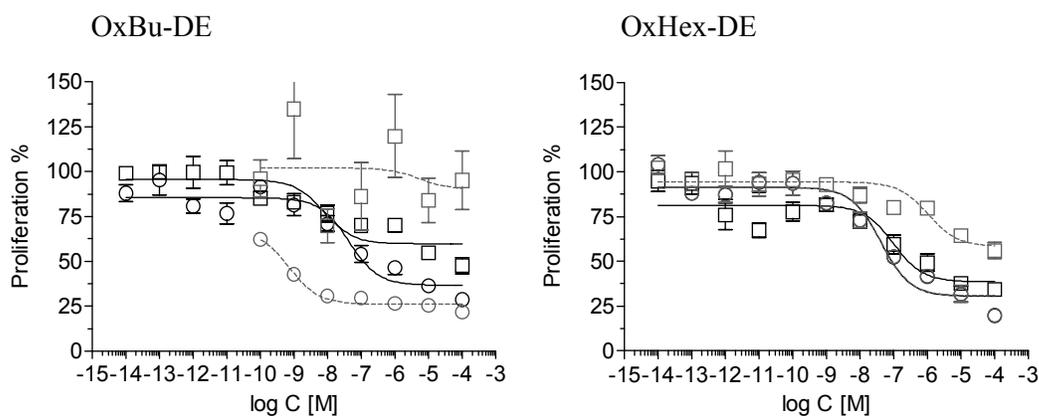


Abb. 3-13: Proliferations-Assay der Prä-Prodrugs OxBu-DE und OxHex-DE (schwarz durchgezogen) im Vergleich zu den Muttersubstanzen (grau gestrichelt) an normalen humanen Keratinozyten (NHK, □) und der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25 (○). [³H]-Thymidin-Einbau nach 24 h Stimulation.

3.1.5 Korrelation Molecular Modelling – Zytotoxizität

Als Resultate der Molecular Modelling Studien wurden Nukleosid-Analoga verschiedener Struktur vorgeschlagen. Substanzen mit einer azyklischen, „geöffneten“ Zuckerkomponente (OxBu, OxIsohex, OxHex) sollten in ihrer Bindungsaffinität zum aktiven Zentrum der Pol α und ihren Wechselwirkungsenergien mit dem Enzym den Nukleosid-Analoga mit intaktem Zuckerrest (BuP-OH, isoHex-OH) überlegen sein. Die größere Flexibilität der azyklischen Seitenketten ermöglicht eine bessere Anpassung der entsprechenden Triphosphat-Analoga an die Bindungstasche (Zdrzil *et al.*, submitted). Außerdem wurden die lipophileren Vertreter mit einer iso-Hexyl- bzw. n-Hexyl-Seitenkette als wirksamer eingestuft als die Butyl-Derivate, da eine bessere Ausnutzung der Seitentasche unter entsprechender Wechselwirkung möglich ist (Zdrzil *et al.*, submitted). Innerhalb einer Simulationsserie (ohne IsoHex-OH)

lagen die relativen Scores der azyklischen Substanzen für die Affinität zum aktiven Zentrum klar höher als für BuP-OH (*Zdrzil et al., submitted*). Für die schlussendlich synthetisierten Komponenten (relative Scores: BuP-OH 10,70; OxBu 14,30; OxIsohex 15,02; OxHex 15,80) war die Prädiktivität der Molecular Modelling Studien sehr gut, ausgenommen der iso-Hexyl-Derivate, die im MTT-Test eine relativ geringe Zytotoxizität zeigten (Abb. 3-14). Als Ursache der Abweichung von OxIsohex ist wie bei isoHex-OH an eine sterische Hinderung beim Eindringen in die Bindungstasche für die verzweigte Alkylseitenkette zu denken.

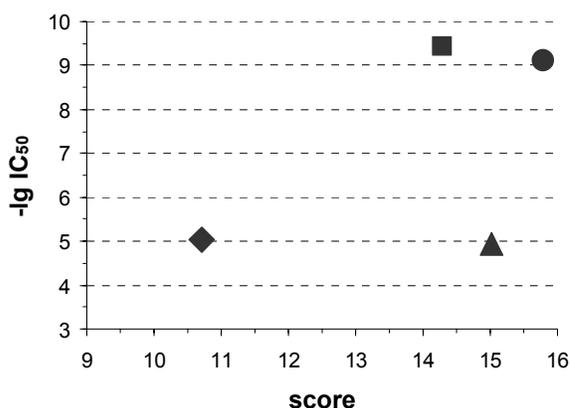


Abb. 3-14: Korrelation zwischen dem Docking Score von BuP-OH (◆), OxBu (■), OxIsohex (▲) and OxHex (●) aus den Molecular Modelling Studien und dem -lg IC₅₀-Wert, berechnet aus den Dosis-Wirkungskurven des Zytotoxizitätstests (MTT-Test) an SCC25 Zellen.

3.2 Analytik

Der zweite Teil des Dissertationsvorhabens beschäftigte sich mit der Entwicklung einer analytischen Detektions- und Quantifizierungsmethode (HPLC) für die pharmakologisch interessantesten Substanzen und deren voraussichtliche Metaboliten. Die Entwicklung dieser Methoden baute auf veröffentlichten Verfahren zur Analytik von Pyrimidin- und Purin-Derivaten sowie von Purinnukleosid-Phosphonaten wie Adefovir oder Tenofovir auf (*Decosterd et al., 1999; Rezk et al., 2005; Vávrová et al., 2007*).

3.2.1 Entwicklung der HPLC-Methode für die Thymin- und Guanin-Reihe

Zunächst sollte eine Methode für die Thymin-Reihe (Thymin, Tn; Thymidin, Td; Thymidin-Monophosphat, dTMP; Thymidin-Diphosphat, dTDP; Thymidin-Triphosphat, dTTP) und Guanin-Reihe (Guanin, Gn; Guanosin, Gs; Guanosin-Monophosphat, GMP; Guanosin-Diphosphat, GDP; Guanosin-Triphosphat, GTP) entwickelt werden, mit der sich jeweils die Pyrimidin- bzw. Purinbase, Nukleosid, Nukleotid sowie die entsprechenden Di- und Triphosphate nebeneinander bestimmen lassen. Die Methode sollte auf Nukleosid-Analoga übertragbar sein.

Voraussetzung für die HPLC-Analytik bei Raumtemperatur (Rt) ist eine ausreichende Stabilität der Untersuchungslösungen für einige Tage. Daher wurden zunächst Stabilitätsuntersuchungen für die Substanzlösungen der Thymin-Reihe und Guanin-Reihe über einen Zeitraum von 120 h (Messpunkte: 0, 24, 48, 72, 96, 120 h) bei Raumtemperatur durchgeführt. Ein signifikanter Abbau wurde nicht festgestellt, so dass in Zeitbereichen von 1 – 2 Tagen bei Rt gemessen werden kann. Allerdings unterliegen die Di- und Triphosphate offenbar schon beim Herstellen der Lösung einem gewissen Abbau (Tabelle 3-4).

Tab. 3-4: Stabilitätsuntersuchung der Thymin-Reihe und Guanin-Reihe, Darstellung der Differenz der Abbauproduktsummen (%), exemplarisch für die Messpunkte 0 h und 120 h; Daten für die Messpunkte 24, 48, 72 und 96 h nicht gezeigt.

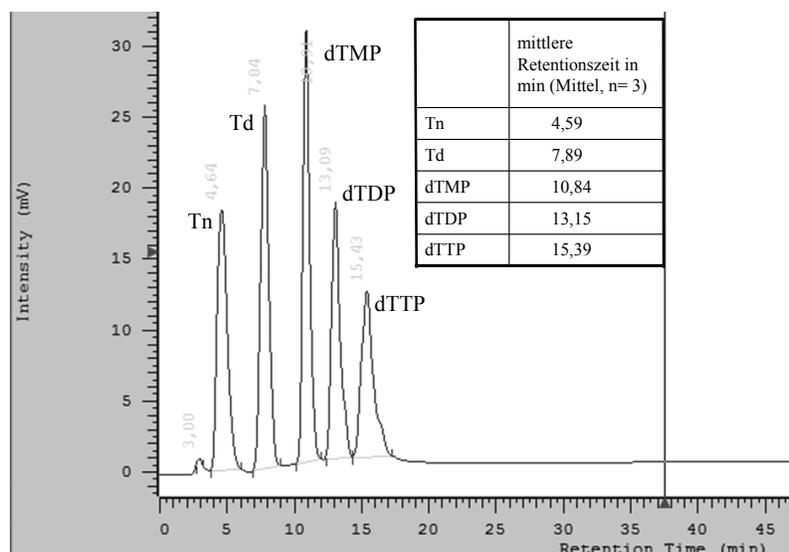
Thymin-Reihe				Guanin-Reihe			
Messpunkt	0 h	120 h		Messpunkt	0 h	120 h	
Substanz	Summe Abbauprodukte (%)	Summe Abbauprodukte (%)	Differenz (%)	Substanz	Summe Abbauprodukte (%)	Summe Abbauprodukte (%)	Differenz (%)
Tn	1,45	1,92	0,47	Gn	n. d.	n. d.	/
Td	2,59	3,22	0,63	Gs	0,82	1,16	0,34
dTMP	2,93	7,37	4,44	GMP	0,64	2,86	2,22
dTDP	12,34	13,34	1,00	GDP	5,30	5,64	0,34
dTTP	9,97	13,03	3,06	GTP	4,51	7,61	3,10

Die Trennung erfolgte auf der C18 – Reversed Phase Säule LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm). Zunächst wurde versucht, die Thymin-Reihe mit einer Gradientenelution mit Acetonitril und einem Acetat-Essigsäure-Puffer zu trennen. Dem lag

die Überlegung zugrunde, dass die 5 Substanzen unterschiedlich protoniert werden und so in ihrer Polarität differenzieren. Mit dieser Methode konnten lediglich Thymin und Thymidin, nicht aber die 3 Phosphate getrennt werden (Daten nicht gezeigt). Auch ein $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ -Puffer führte nicht zu einer ausreichenden Trennung. Schließlich wurde mit einem Tetrabutylammoniumchlorid-Puffer (TBA-Cl-Puffer) gearbeitet. *Decosterd et al. (1999)* haben bereits eine Methode zur Trennung von Desoxyribonukleosid- und Ribonukleosid-Triphosphaten mit TBA-Cl veröffentlicht. Es wurden die von *Decosterd et al. (1999)* vorgeschlagenen Laufmittel verwendet (Puffer A und B, siehe 2.1.4.7). TBA-Cl diene als Ionenpaarreagenz, wobei das Tetrabutylammonium-Ion (TBA^+) mit der negativen Ladung der Phosphatgruppe(n) (P^-) interagiert und mit dTMP, dTDP, dTTP Assoziate unterschiedlicher Stöchiometrie und Polarität bildet. dTMP assoziiert mit einem Molekül TBA^+ und ist demzufolge in der Reihe der Phosphate das am wenigsten lipophile, wohingegen dTTP mit 3 Molekülen TBA^+ assoziiert und damit die längste Retentionszeit aufweisen müsste. Thymin und Thymidin bilden kein Ionenpaar, da sie keine permanente Ladung tragen, müssten aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität getrennt werden (s.o.). Mit dieser Methode konnten alle 5 Substanzen der Thymin-Reihe erstmals getrennt werden. Allerdings erwies sich die Methode nach *Decosterd et al. (1999)* als zu lang (160 min) und die Trennqualität als noch nicht ausreichend – keine Basislinientrennung. Mittels Gradientenelution konnten die Trennleistung erhöht und die Elutionsdauer auf 75 min verkürzt werden (Methode, siehe 2.2.5 HPLC Analytik, Phosphattrennung mit TBA-Cl). Mit derselben Methode gelang auch die Trennung von Guanin, Guanosin, GMP, GDP und GTP. Abbildung 3-15 zeigt exemplarisch Originalregistrare der Trennung der Thymin- bzw. Guanin-Reihe. Die Konzentration der Einzelsubstanzen betrug 10^{-5} M für die Thymin-Reihe (10 nmol/ml, entsprechend in $\mu\text{g/ml}$: Tn 1,26; Td 2,42; dTMP 3,66; dTDP 4,49; dTTP 5,32) und 8×10^{-6} M für die Guanin-Reihe (8 nmol/ml, entsprechend in $\mu\text{g/ml}$: Gn 1,21; Gs 2,26; GMP 3,26; GDP 3,92; GTP 4,58). Die unterschiedlichen Peakflächen der Einzelsubstanzen ergeben sich aus den verschieden starken UV-Absorptionen bei 260 nm.

In weiteren Versuchen konnten mit dieser Methode auch 5-FU, Bup-OH, HM-1, HM-1-Oxim, Zalcitabin, Capecitabin und Aciclovir detektiert und deren Retentionszeiten (RT) bestimmt werden (Tab. 3-5).

Thymin-Reihe



Guanin-Reihe

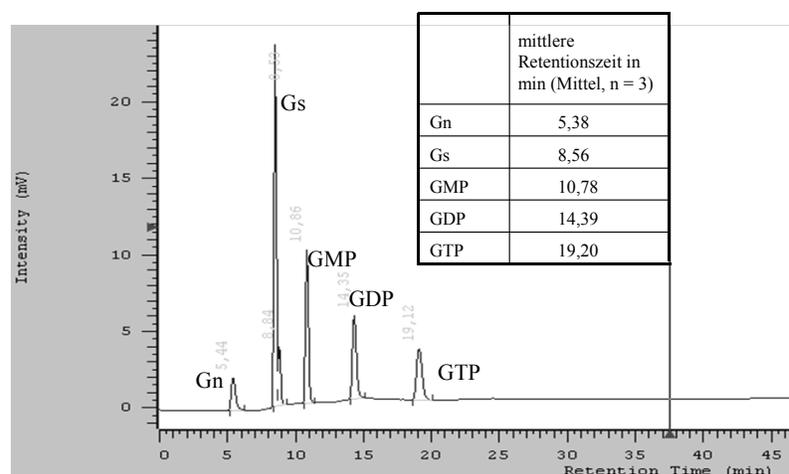


Abb. 3-15: Originalregistrate für die HPLC-Trennung der Thymin- und Guanin-Reihe mit der Methode der Phosphattrennung mit TBA-Cl. Die Konzentration betrug für die Thymin-Reihe 10^{-5} M, für die Guanin-Reihe 8×10^{-6} M. UV-Absorption 260 nm, Flussrate 0,5 ml/min, Injektionsvolumen 30 μ l, Raumtemperatur (Rt).

Substanz	mittlere RT (min)
5-FU	4,89
BuP-OH	63,36
HM-1	7,33
HM-1-Oxim	9,10
Zalcitabin	5,74
Capecitabin	58,87
Aciclovir	2,74

Tab. 3-5: Mittlere Retentionszeiten von 5-FU, Bup-OH, HM-1, HM-1-Oxim, Zalcitabin, Capecitabin und Aciclovir mit der HPLC-Methode der Phosphattrennung mit TBA-Cl. Die Retentionszeiten sind als Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelbestimmungen angegeben.

Im Folgenden wurde die Linearität der Peakflächen im Bereich 10^{-6} M bis 10^{-3} M (1 – 1000 nmol/ml) getestet, diese war für beide Substanz-Reihen nur bedingt gegeben und für die Guanin-Reihe insgesamt etwas besser (Abb. 3-16). Die Korrelationskoeffizienten betragen für die Thymin-Reihe 0,906 – 0,944 und waren für Gs, GMP, GDP und GTP größer 0,99. Da für Guanin die Peakflächen insgesamt kleiner waren, ist dessen lineare Regression zusätzlich mit kleinerer Skalierung dargestellt, r^2 betrug 0,734.

Anschließend wurde der Bereich $1 - 8 \times 10^{-6}$ M (1 – 8 nmol/ml) näher untersucht (Abb. 3-17), die Abhängigkeit der Peakflächen von der Konzentration war im Bereich $2 - 8 \times 10^{-6}$ M linear. Die resultierende Bestimmungsgrenze ist in Tabelle 3-6 dargestellt. Die Korrelation für die Guanin-Reihe war auch in dem Konzentrationsbereich $1 - 8 \times 10^{-6}$ M etwas besser als für die Thymin-Reihe. Die Korrelationskoeffizienten betragen für die Thymin-Reihe 0,948 – 0,998 und für Gs, GMP, GDP und GTP 0,928 – 0,987, für Guanin betrug r^2 0,813.

Tab. 3-6: Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode der Phosphattrennung mit TBA-Cl für die Einzelsubstanzen.

Substanz	Tn	Td	dTMP	dTDP	dTTP	Gn	Gs	GMP	GDP	GTP
Bestimmungsgrenze (µg/ml)	0,252	0,484	0,783	0,898	1,064	0,303	0,565	0,815	0,980	1,145

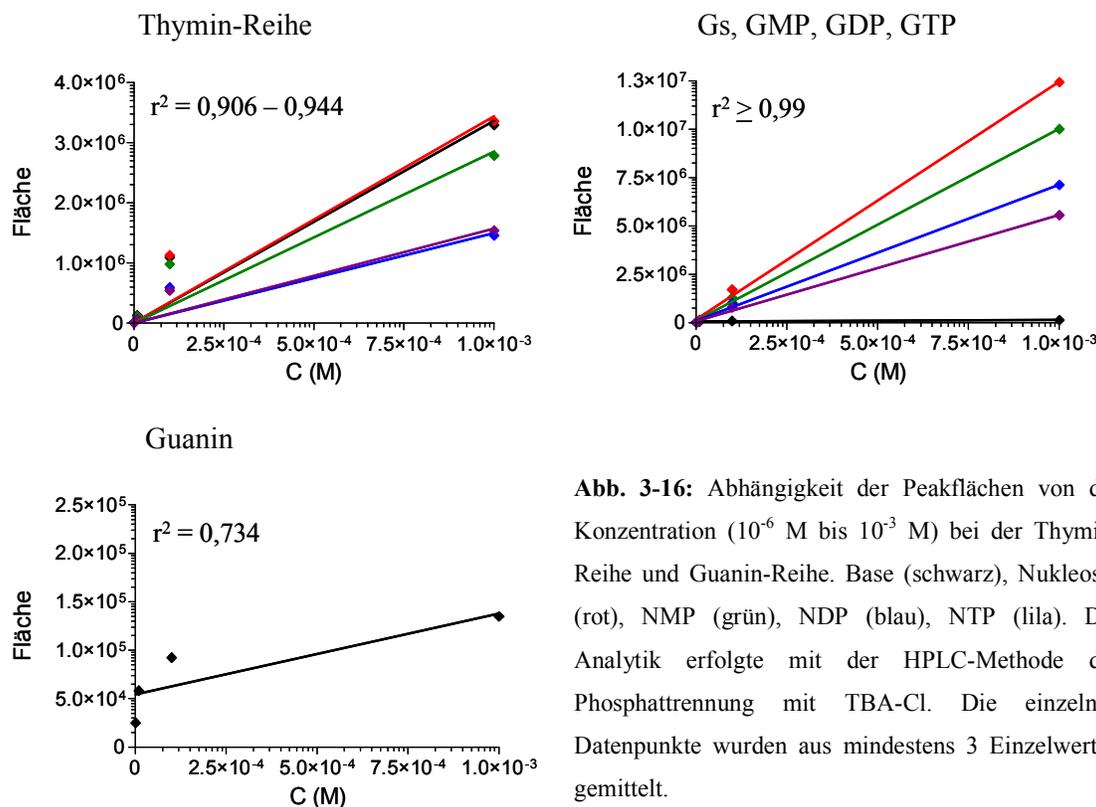


Abb. 3-16: Abhängigkeit der Peakflächen von der Konzentration (10^{-6} M bis 10^{-3} M) bei der Thymin-Reihe und Guanin-Reihe. Base (schwarz), Nucleosid (rot), NMP (grün), NDP (blau), NTP (lila). Die Analytik erfolgte mit der HPLC-Methode der Phosphattrennung mit TBA-Cl. Die einzelnen Datenpunkte wurden aus mindestens 3 Einzelwerten gemittelt.

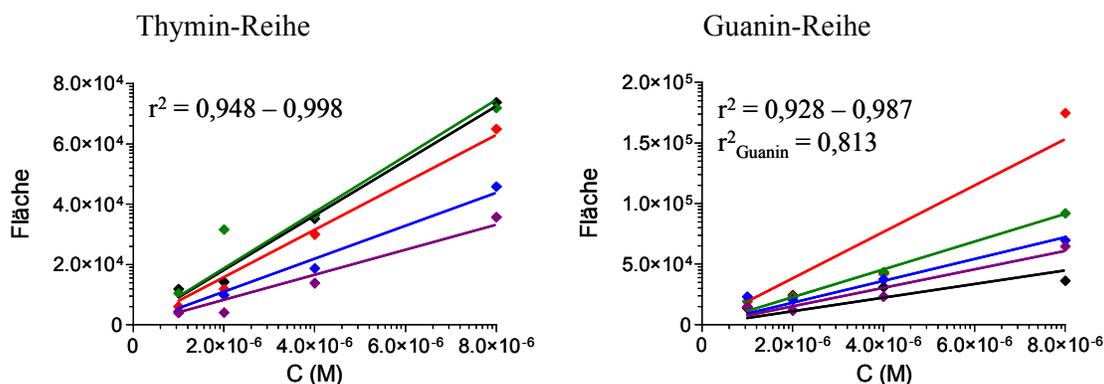


Abb. 3-17: Abhängigkeit der Peakflächen von der Konzentration ($1 - 8 \times 10^{-6}$ M) bei der Thymin-Reihe und Guanin-Reihe. Base (schwarz), Nucleosid (rot), NMP (grün), NDP (blau), NTP (lila). Die Analytik erfolgte mit der HPLC-Methode der Phosphattrennung mit TBA-Cl. Die einzelnen Datenpunkte wurden aus mindestens 3 Einzelwerten gemittelt.

3.2.2 Entwicklung der HPLC-Methode für OxBu und OxHex

Voraussetzung für die HPLC-Analytik bei Raumtemperatur ist eine ausreichende Stabilität der Untersuchungslösungen für einige Tage. Daher wurden zunächst orientierende Stabilitätsuntersuchungen auch für die Lösungen von OxBu und OxHex (10^{-4} M) durchgeführt. Diese waren mindestens 48 h sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37°C stabil. Lagerung bei -20°C gewährleistete eine mindestens 3-monatige Stabilität (Daten nicht gezeigt); länger wurden die Untersuchungslösungen nicht verwendet (siehe 2.1.4.3 Lösungen der Testsubstanzen). Ein von der Firma Chiracon GmbH durchgeführter orientierender Stresstest ergab eine deutliche Zersetzung von OxBu unter stark oxidativen Bedingungen ($2,5\text{ M H}_2\text{O}_2$) und großer Hitzeeinwirkung (trockene Hitze, 100°C). Im sauren Milieu kam es wahrscheinlich nur zu einer Verschiebung der Ladungen innerhalb des Moleküls oder der Bildung eines inneren Salzes, wodurch der Hauptpeak eine geringfügig längere Retentionszeit aufwies. Gegenüber basischen Stress-Einflüssen war OxBu relativ stabil (Zuhse *et al.*, 2008).

3.2.2.1 Basische Phosphonattrennung

Für die Analytik von OxBu wurde zunächst eine HPLC-Trennung mit der C18-RP-Säule LiChroCART[®] 125-4 LiChrospher[®] 100 (5 µm) auf Wasser-Acetonitril-Basis entworfen. Damit wurde die Substanz zwar als sauber definierter Peak, aber zu früh eluiert (RT ca. 1 min), so dass eventuelle Metaboliten oder Abbauprodukte voraussichtlich nicht abgetrennt werden können. Daher wurde nach Rücksprache mit der Chiracon GmbH, welche das Upscale der optimierten Synthese von OxBu und OxHex übernommen hatte, deren Methode übernommen und folgende Konditionen eingestellt: isokratischer Fluss der wässrigen (Wasser + 0,1 % TEA) und organischen Phase (Acetonitril/Methanol, 40:60 + 0,1 % TEA) im Verhältnis 80:20 über 25 min, UV-Detektion mit 270 nm. Die Flussrate wurde von 0,3 ml/min auf 0,8 ml/min erhöht. Mit dieser Methode wird OxBu nach ca. 4 Minuten als sauber definierter Peak isoliert (Abb. 3-18). Der Peak nach ca. 2 min ist ein Artefakt und vernachlässigbar.

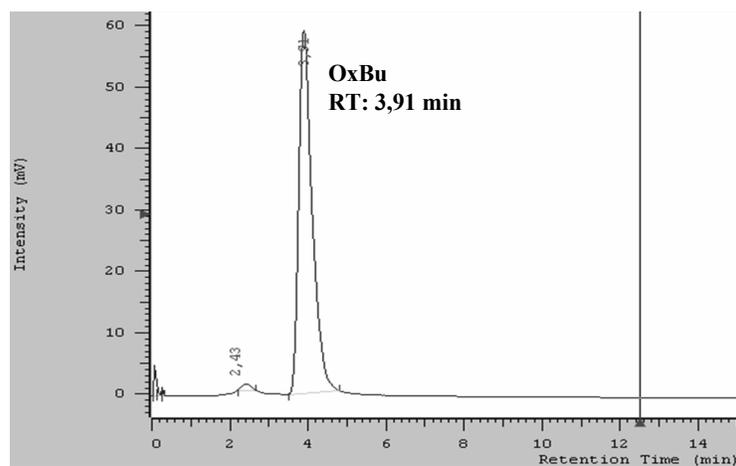


Abb. 3-18: Ausschnitt eines HPLC-Diagramms nach Injektion von 10 µl OxBu-Lösung (10^{-4} M) mit der von der Chiracon GmbH (Luckenwalde) übernommenen HPLC-Methode: isokratische Trennung (wässrige zu organischer Phase, 80:20, siehe Text), UV-Detektion bei 270 nm, Flussrate 0,8 ml/min, Rt.

Da die Basizität der Laufmittel (pH wässrige Phase: 10,6) auf Dauer zur Zersetzung der Säule führte, wurde für die weiteren Untersuchungen die bis pH 11 stabile Säule CC250/4 Nucleodur C18 Gravity (5 µm) eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Gradient in die Methode eingeführt (siehe 2.2.5 HPLC-Analytik, Methode: basische Phosphonattrennung), um einen größeren Polaritätsbereich zu erfassen und so eventuelle Abbauprodukte oder später Metaboliten erkennen zu können.

Im Chromatogramm zeigten sich allerdings stets je 2 Peaks unterschiedlicher Größe für OxBu und OxHex, die wahrscheinlich 2 verschiedene Salze dieser Phosphonate darstellen (Abb. 3-19). Die Retentionszeiten lagen für OxBu bei durchschnittlich 2,43 und 9,15 Minuten und für OxHex bei 2,44 und 11,21 Minuten, (die mittleren Retentionszeiten wurden aus mindestens 3 Einzelwerten berechnet). Die Flächen der einzelnen Peaks korrelierten linear mit den Konzentrationen ($r^2 > 0.99$, Abb. 3-20). Trennung einer Mischung von OxBu und OxHex ergab für den ersten Peak beider Substanzen eine nahezu identische Retentionszeit. Es wurde nicht geklärt, ob dieser Peak zu einem gemeinsamen Abbauprodukt gehört oder eine Salzform von OxBu und OxHex darstellt, die ähnliches Retentionsverhalten aufweist. Eine saubere Analytik erfordert allerdings Chromatogramme mit einem Peak pro Substanz. Die Methode ist daher zur Validierung ungeeignet.

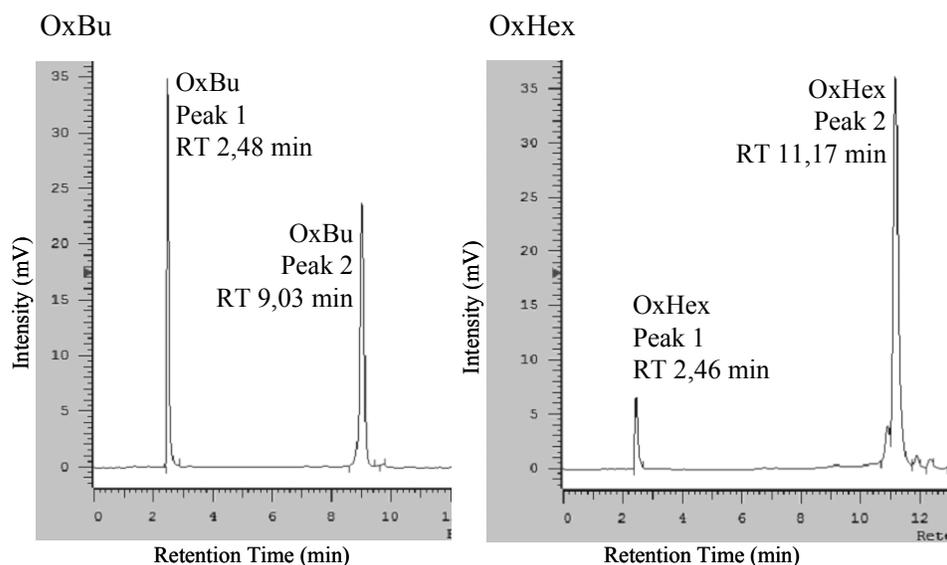


Abb. 3-19: Chromatogrammausschnitte für OxBu und OxHex ($C = 10^{-5}$ M). Gradientmethode der basischen Phosphonattrennung. Flussrate: 0,8 ml/min, UV-Detektion bei 270 nm, Injektionsvolumen 50 μ l, Rt.

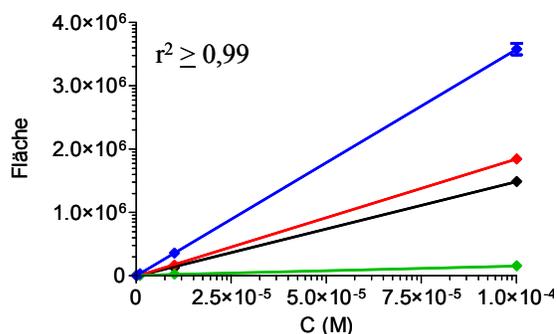


Abb. 3.-20: Lineare Korrelation der Peakflächen mit der Konzentration (10^{-7} M bis 10^{-4} M) von OxBu und OxHex nach Analytik mit der Gradientmethode für die basische Phosphonattrennung. OxBu Peak 1 (schwarz), OxBu Peak 2 (rot), OxHex Peak 1 (grün), OxHex Peak 2 (blau). Die einzelnen Datenpunkte wurden aus mindestens 3 Einzelwerten gemittelt.

3.2.2.2 Phosphonattrennung mit TBA-Cl

Aufgrund der guten HPLC-Trennung der Guanin-Reihe mit dem Ionenpaarreagenz TBA-Cl wurde für die Analytik von OxBu und OxHex eine an die Veröffentlichung von *Vávrová et al. (2007)* angelehnte Methode entwickelt, die zwar etwas weniger sensitiv war als die basische Phosphonattrennung, aber nur einen (konzentrationsabhängigen) Peak lieferte. Dieser Ansatz erschien auch im Hinblick auf die Analytik späterer Metabolisierungsprodukte (Mono- und Diphosphate der Phosphonate) vielversprechend. Adefovir wurde in die Untersuchungen einbezogen, da dieses strukturverwandte Phosphonat als interner Standard geeignet erscheint. Es wurde mit der RP-18-Säule LiChroCART® 250-4 Purospher® STAR (pH-stabil: 1,5 – 10,5) bei pH 6 gearbeitet und der unter 2.1.4.7 beschriebene Puffer C sowie Methanol als Laufmittel für die unter 2.2.5 beschriebene Gradientmethode verwendet (Phosphonattrennung mit TBA-Cl, 80 min, Flussrate 1,1 ml/min). In Vorversuchen wurde die optimale Detektionswellenlänge im Bereich 250 – 285 nm ermittelt, Detektion bei 270 nm ergab die größten Peakflächen, weshalb diese Wellenlänge für die Untersuchungen mit OxBu und OxHex verwendet wurde. *Vávrová et al. (2007)* detektierten bei 260 nm, dem UV-Absorptionsmaximum von Adefovir. Mit dieser Methode gelang es, Ein-Peak-Chromatogramme für Adefovir, OxBu und OxHex zu erhalten (Abb. 3-21), wobei die Peakflächen mit der Konzentration korrelierten (Abb. 3-22; $r^2 > 0.99$). Die mittlere Retentionszeit (gemittelt aus mindestens 3 Einzelwerten) betrug für OxBu 38,11 min, für OxHex 45,21 min und für Adefovir 5,95 min. Adefovir ist somit als interner Standard geeignet.

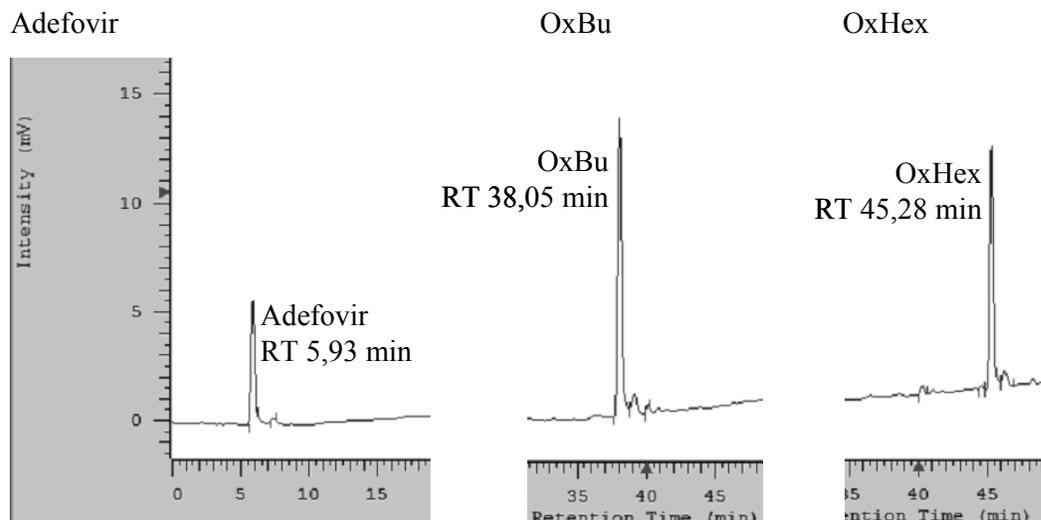


Abb. 3-21: Chromatogrammausschnitte für Adefovir, OxBu, und OxHex nach Analytik mit der Phosphonattrennung mit TBA-Cl. Flussrate: 1,1 ml/min. Detektionswellenlänge: 270 nm, Rt. Injiziert wurden 50 µl einer Substanzlösung mit einer Konzentration von 10^{-5} M.

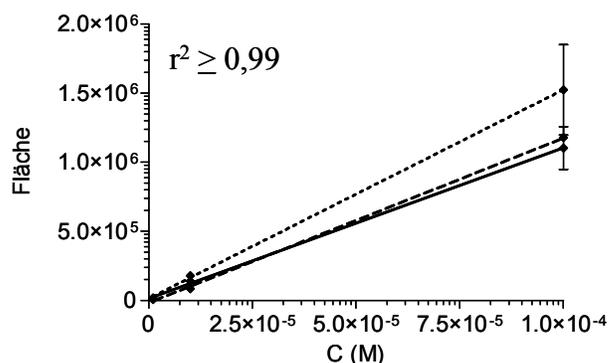


Abb. 3-22: Lineare Korrelation der Peakflächen mit der Konzentration (10^{-6} M – 10^{-4} M) von Adefovir (---), OxBu (••••) und OxHex (—) nach Analytik mit der Phosphonattrennung mit TBA-Cl. Die einzelnen Datenpunkte wurden aus mindestens 3 Einzelwerten gemittelt.

Im nächsten Schritt wurde Adefovir als interner Standard eingesetzt (6×10^{-5} M, entsprechend 16,39 µg/ml), wobei das Verhältnis der OxBu- bzw. OxHex-Fläche zur Adefovir-Fläche linear mit der Konzentration (6×10^{-7} M bis 10^{-4} M) korrelierte (Abb. 3-23, $r^2 > 0,99$). Bei diesen Versuchen wurde bei 275 nm detektiert, da gemäß der UV-Absorptionskurven eine maximale Antwort von OxBu und OxHex bei dieser Wellenlänge vorliegt und sich auf diesem Weg die Sensitivität der Methode erhöhen lässt. Tatsächlich konnte so die Bestimmungsgrenze von 10^{-6} M (1 nmol/ml; entsprechend OxBu 0,436 µg/ml; OxHex 0,464 µg/ml) auf 6×10^{-7} M (OxBu 0,262 µg/ml; OxHex 0,278 µg/ml) leicht verringert werden. Weitere Arbeiten ergaben, dass auch die Substanzen der Guanin-Reihe bei 275 nm detektiert werden können (Daten nicht gezeigt).

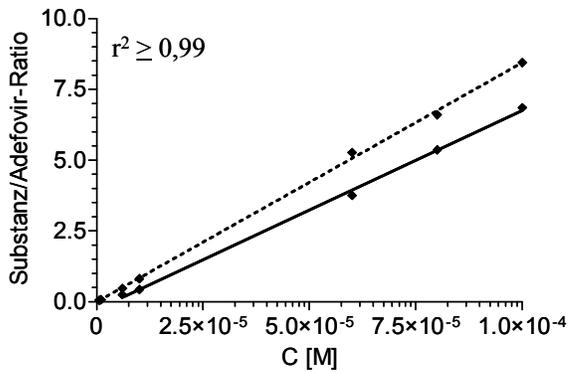


Abb. 3-23: Lineare Korrelation der Peakflächen mit der Konzentration (6×10^{-7} M bis 10^{-4} M) von OxBu (••••) und OxHex (—) mit Adefovir als internem Standard (6×10^{-5} M) nach Analytik mit der Phosphonattrennung mit TBA-Cl. Die einzelnen Datenpunkte wurden aus mindestens 4 Einzelwerten gemittelt.

3.2.3 Entwicklung einer Festphasenextraktion

Bei der Festphasenextraktion werden die zu isolierenden Komponenten der flüssigen Phase an einer stationären festen Phase gebunden und später von dieser eluiert (Solas *et al.*, 1998; Hennion, 1999; Claire, 2000; Rezk *et al.*, 2005). Eine Extraktion der Phosphorylierungsprodukte der Testsubstanzen ist für die geplanten zellkinetischen Untersuchungen erforderlich. Aufgrund ihrer höheren Stoffwechselaktivität wurden SCC25 Zellen für orientierende Versuche herangezogen. Untersucht wurde die Bildung phosphorylierter Metaboliten (dTMP, dTDP, dTTP, GMP, GDP, GTP) bei Inkubation mit Thymidin bzw. Guanosin als Modellsubstanzen; Detektion und Quantifizierung erfolgte mit der HPLC-Methode der Phosphatrennung mit TBA-Cl (s. 2.2.5). Modellsubstanzen waren nötig, da die Testsubstanzen lediglich in geringen Mengen verfügbar waren, aber für die Entwicklung der Analytik ein relativ hoher Substanzbedarf bestand. Nach 24-stündiger Inkubation der SCC25 Zellen mit Thymidin bzw. Guanosin (10^{-4} M) sowie der unbehandelten Kontrolle wurde das überstehende Medium abgenommen und ohne Extraktion mit der HPLC analysiert. Neben einigen Begleitpeaks zeigten sich im Chromatogramm hauptsächlich die Peaks für Thymidin (mittlere RT 7,89 min) und Guanosin (mittlere RT 8,56 min; Abb. 3-24 A). Anhand der Peakflächen sollten nach der Methode des externen Standards (s. Abb. 3-16, 3-17) die im Medium verbliebene Substanzmenge und darüber die in die Zelle aufgenommene Menge berechnet werden. Allerdings schwankten die Peakflächen von Probe zu Probe stark, so dass eine zuverlässige Aufnahme nicht berechnet werden konnte. Zentrifugieren der Mediumproben führte zu keiner Verbesserung. Zudem war in einigen Versuchen ein starker Abbau zu Thymin bzw. Guanin zu sehen (Abb. 3-24 B). Die Ursache dafür konnte nicht abschließend geklärt werden.

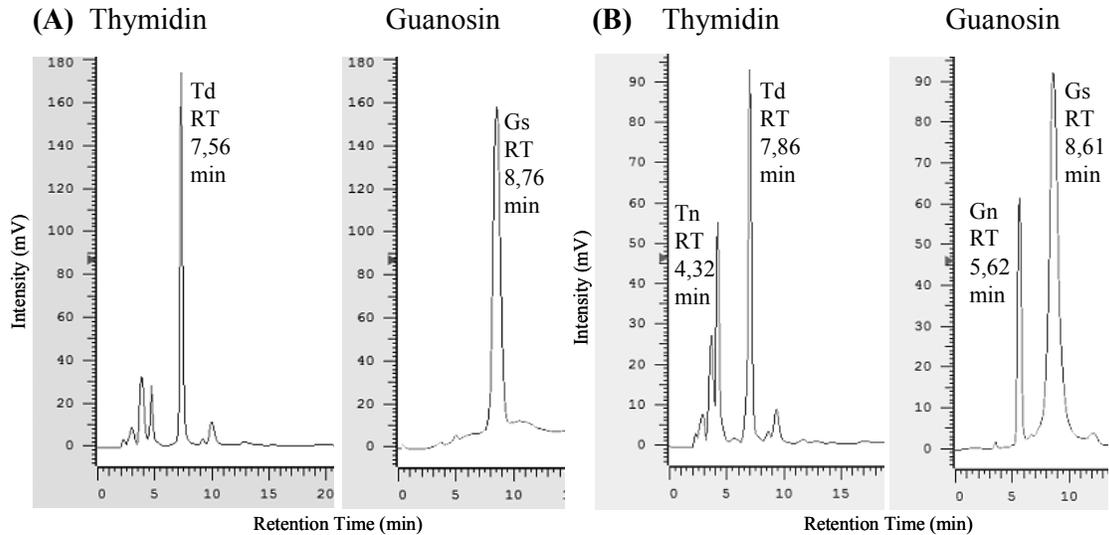


Abb. 3-24: Originalregistrare nach direkter Injektion des Mediums nach 24-stündiger Stimulation mit Thymidin bzw. Guanosin (10^{-4} M), HPLC-Methode der Phosphattrennung mit TBA-Cl, UV-Absorption 260 nm, Flussrate 0,5 ml/min, Injektionsvolumen 50 μ l, Rt.

Für den Zellaufschluss wurden 3 Extraktionsverfahren (siehe 2.2.6) erprobt:

- I Lyse-Puffer (60 min bei 4 °C)
- II Trypsinieren (30 min bei 37 °C)
- III Methanolische Extraktion (24 h bei -80 °C).

In der Literatur wird die methanolische Extraktion am häufigsten beschrieben, die Zellpellets werden meist über Nacht mit Methanol (60 %) bei -70 °C bis -80 °C extrahiert (*Slusher et al., 1992; Solas et al., 1998*). In den durchgeführten Versuchen schien allerdings die Aufschlussmethode mit Lyse-Puffer am effektivsten zu sein.

Mit allen nach den drei genannten Aufschlussmethoden erhaltenen Lysaten wurde unter Einsatz der in Tabelle 2-6 beschriebenen Säulen die in 2.2.6 dargestellte Festphasenextraktion durchgeführt. Es wurde stets eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Zuerst wurde mit unpolaren Säulen gearbeitet (C18, C8, C2), bei denen durch Ionenpaarbildung mit TBA-Cl die Lipophilie erhöht und so die Rückhaltung der 3 Phosphatester erreicht werden sollte, Thymidin selbst ist hinreichend unpolar. Polares Zellmaterial müsste im Waschschrift entfernt werden. Problematisch ist die Co-Elution von unpolarem Zellmaterial, das möglicherweise die Analyten überdeckt. In einem zweiten Ansatz wurde mit Anionenaustauschersäulen gearbeitet (Certify II, NH_2). Dabei sollten die permanent negativ geladenen Analyten durch Anionenaustausch im Säulenbett zurückgehalten werden, ungeladene Begleitstoffe aber

ausgewaschen werden. Kritisch ist dabei die Elution – es ist ein Eluens erforderlich, dass die negativ geladenen Analyten stärker bindet als die funktionellen Gruppen der Anionenaustauschersäule. Außerdem könnte Thymidin als ungeladenes Molekül schon im Waschschrift verloren gehen. Daher musste die Waschfraktion ebenfalls untersucht werden. Leider ist es nicht gelungen, eine geeignete und vor allem reproduzierbare Methode für die Festphasenextraktion zu etablieren. Zu den besten Ergebnissen führte die Zelllyse mit RIPA-Puffer und anschließende Extraktion mit der Anionenaustauschersäule Certify. Extraktion nach 24-stündiger Inkubation mit Thymidin und Guanosin ergab, dass vor allem dTMP und GMP gebildet wird (Abb. 3-25).

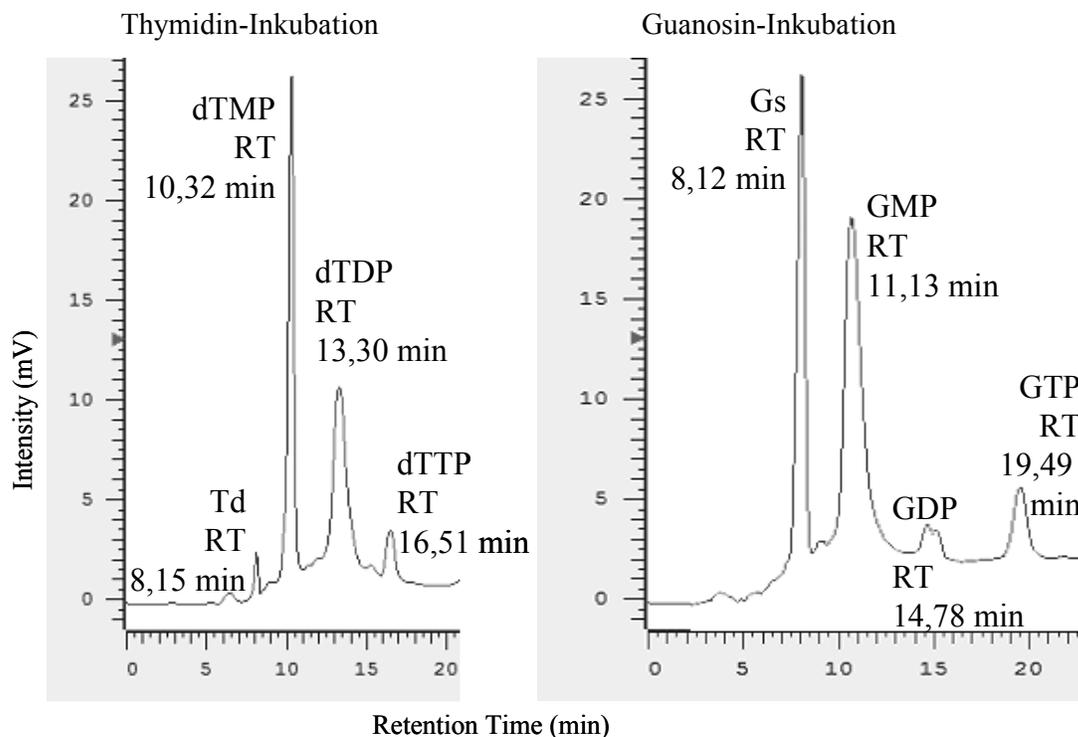


Abb. 3-25: Originalregistrare nach HPLC-Trennung des Eluats nach Festphasenextraktion mit der Phosphattrennung mit TBA-Cl. 24-stündige Stimulation von SCC25 Zellen mit Thymidin bzw. Guanosin und Zelllyse mit RIPA-Puffer, zur Festphasenextraktion diente die SPE Bond Elut Certify II Säule. UV-Absorption 260 nm, Flussrate 0,5 ml/min, Injektionsvolumen 50 µl, Rt.

4 DISKUSSION

4 DISKUSSION

Aufgrund einer erhöhten UV-Exposition in den letzten Jahren erkranken weltweit immer mehr Menschen an hellem Hautkrebs. Da die aktuellen Therapieoptionen entweder schmerzhaft sind – wie mit 5-FU (*Jorizzo, 2004a*) und bei der photodynamischen Therapie – (*Rhodes et al., 2004*) und/oder unzureichende Heilungsraten aufweisen – wie mit 5-FU, Diclofenac-Hyaluronsäure-Gel (*Rivers et al., 2002*), war es ein Ziel dieser Arbeit, einen neuen therapeutischen Ansatz – die Interferenz mit der DNA-Synthese – zu untersuchen. Die Pol α ist ein vielversprechendes Target, da sie die ersten Schritte der DNA Replikation katalysiert und mit einer Primase-Funktion assoziiert ist (*Wang, 1991*). Wie erwähnt wurden unlängst verschiedene selektive nicht-nukleosidische (siehe Kapitel 1.6.1) und nukleosidische (siehe Kapitel 1.6.2) Pol- α -Inhibitoren beschrieben. Diese Tatsache, aber auch der systemische Einsatz mehrerer Pol- α -Inhibitoren wie Cytarabin und Fludarabin (*Gandhi et al., 1997*) in der Leukämie-therapie oder Gemcitabin in der Behandlung des Pankreaskarzinoms unterstreichen die Relevanz der Pol α als Target für die Erzielung eines antineoplastischen Effekts. Zudem ist die Inhibition der DNA-Synthese mit der Inhibition der Pol- α -Aktivität durch die Gemcitabin- und Cytarabin-Triphosphate in der Brustkrebszelllinie MCF7 verbunden (*Gandhi et al., 1997; Jiang et al., 2000*). Ziel dieser Arbeit war es daher, eine neue Pol α inhibierende Substanz zu identifizieren, die idealerweise Zellen des hellen Hautkrebses, speziell der Aktinischen Keratose, stärker und selektiver angreift als die bereits zugelassenen Pharmaka und dabei Eigenschaften aufweist, die eine topische Applikation ermöglichen.

4.1 Zellspezifische Untersuchungen

Molecular Modelling. Voraussetzung für die Entwicklung neuer Pol- α -Inhibitoren war die Etablierung eines 3D-homologen Modells des aktiven Zentrums der humanen DNA Polymerase α , dieses wurde auf der Basis der DNA Polymerase des Bakteriophagen RB69 entwickelt. Bekannte Pol- α -Inhibitoren wie Adefovir-Diphosphat, Tenofovir-Diphosphat und Aphidicolin wurden in das aktive Zentrum gedockt und so deren Interaktionen mit dem aktiven Zentrum berechnet. Die Ergebnisse dieser Docking-Experimente zeigten eine deutliche Übereinstimmung der theoretischen mit den experimentellen Bindungsdaten (*Richartz et al., 2008*). Für Aphidicolin konnte zudem die kompetitive Hemmung bezüglich

dCTP und die nicht-kompetitive Hemmung bezüglich der anderen dNTPs gezeigt werden. Aphidicolin überführt dabei das aktive Zentrum der Pol α in eine inaktive „offene“ Form (Oguro *et al.*, 1979; Copeland and Wang, 1993). Des Weiteren wurde das bisher nur experimentell verwendete N²-arylsubstituierte Purin-Analogon BuAdATP (2-butylanilino-dATP) mittels Molecular Modelling untersucht, für das ebenfalls eine Pol- α -Inhibition nachgewiesen wurde, wobei die Einführung eines Zuckerrestes und Phosphorylierung die in-vitro-Wirksamkeit noch steigerte (Wright *et al.*, 1987; Khan *et al.*, 1991). Auf der Basis des von Richartz *et al.* (2008) beschriebenen Pol- α -Modells wurden die nukleosidischen bzw. nukleotidischen Verbindungen HM-1-Oxim, isoHex-OH, OxBu, OxIsohex, OxHex als potentielle Pol- α -Hemmer identifiziert und synthetisiert.

4.1.1 Auswahl der Referenzsubstanzen und Zielzellen

Referenzsubstanzen. Aphidicolin, 5-FU, BuP-OH und Foscarnet-Natrium wurden als Referenzsubstanzen gewählt. Aphidicolin ist, wie beschrieben, ein bekannter Pol- α - und Pol- δ -Hemmer (Oguro *et al.*, 1979; O'Dwyer *et al.*, 1994), der mit dem Nukleotideinbau in den neuen DNA-Strang während der S-Phase des Zellzyklus interferiert (Pedrali-Noy *et al.*, 1980). Cinatl *et al.* (1992) fanden, dass Aphidicolin in vitro selektiv zytotoxisch auf Neuroblastomzellen (vier Zelllinien) in Cokultur mit normalen embryonalen Zellen wirkte. Ferner wurden eine komplette Regression muriner Neuroblastome nach systemischer Gabe Aphidicolins ohne toxische Nebenwirkungen (Cinatl *et al.*, 1999), synergistische Effekte mit Cytarabin (in vivo und in vitro bei akuter myeloischer Leukämie; Sargent *et al.*, 2001; Hubeek *et al.*, 2005) sowie Wirksteigerung und Resistenzminderung durch Kombination von Aphidicolin bzw. Aphidicolin-Glycinaten mit Platinverbindungen beschrieben (Sargent *et al.*, 1996; O'Dwyer *et al.*, 1994). Allerdings gibt es auch Veröffentlichungen, die keinen signifikanten Benefit Aphidicolins in Kombination mit Cisplatin feststellten (Damia *et al.*, 1992). Wie erwähnt, konnte Aphidicolin-Glycinat als systemisches Antitumor-Therapeutikum nicht etabliert werden (Sessa *et al.*, 1991), wahrscheinlich aufgrund einer schnellen Metabolisierung (Edelson *et al.*, 1990). Den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zufolge ist Aphidicolin nicht für eine Hauttumorthherapie geeignet; Aphidicolin wirkte nicht selektiv auf SCC25 Zellen, insgesamt wurden die DNA-Synthese und die Mitochondrienfunktion von NHK und HaCaT Zellen sogar stärker beeinträchtigt (Richartz, 2007). Dies spiegelt sich sowohl in der maximalen Hemmung als auch in der aktiven Konzentration wider. Weiterhin zeigte Aphidicolin an Fibroblasten und vier weiteren

Krebszelllinien (HT29, MCF7, T24, SISO) eine vom Zelltyp unabhängige, ausgeprägte Zytotoxizität im MTT-Test. Die maximalen Hemmungen lagen im Bereich 51 – 67 %, die aktiven Konzentrationen (-lg IC₅₀-Werte) im Bereich 7,66 – 8,67 (Tab. 3-2).

Die zweite Referenzsubstanz, 5-FU, wurde als Goldstandard der topischen Therapie bei Aktinischer Keratose mitgeführt (*Lawrence et al., 1995; Levy et al., 2001; Jorizzo et al., 2002; Stockfleth & Kerl, 2006*). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen differenzierte 5-FU begrenzt zwischen NHK und SCC25 Zellen (-lg IC₅₀: NHK 5,08; SCC25 6,01, Tab. 3-2), wobei die maximalen Hemmungen sich nicht unterschieden (NHK 41 %; SCC25 42 %). Obwohl 5-FU Mittel der Wahl in der Therapie der Aktinischen Keratose ist, sprechen diese Ergebnisse für ein ungünstiges Risiko-Benefit-Verhältnis und erklären die schweren lokalen Nebenwirkungen (Kapitel 1.3.2). Wie Aphidicolin hemmte auch 5-FU die Viabilität der HaCaT Zellen am stärksten (-lg IC₅₀ 6,22; 80 % max. Hemmung). Das ist mit der starken Wachstumsrate dieser Zellart erklärbar, die sich mit zunehmender Passagezahl erhöht (*Boukamp et al., 1988; Boukamp et al., 1997*), zudem befinden sich bei HaCaT Zellen ein fast doppelt so hoher Anteil in der S-Phase als bei NHK oder SCC25 Zellen, woraus ein stärkeres Ansprechen auf proliferationshemmende Substanzen resultiert (*Richartz, 2007*). Wie erwähnt, wurde der Einfluss auf die Proliferation nicht mittels [³H]-Thymidin-Einbau untersucht, da exogen zugeführtes Thymidin den antiproliferativen Effekt von 5-FU antagonisiert (*Boucher et al., 2006*). Ohnehin wird die Verlässlichkeit des [³H]-Thymidin-Einbaus kontrovers diskutiert: einerseits wird der Test als zuverlässige Methode zur Bestimmung der Tumorzellproliferation beschrieben (*Toyohara et al., 2002*), andererseits werden zahlreiche Fehlerquellen und eine DNA-Synthese inhibierende Wirkung von [³H]-Thymidin selbst diskutiert (*Maurer, 1981; Hu et al., 2002*). Wie für Aphidicolin ist auch für 5-FU eine deutliche Verschiebung des Zellzyklus in die S-Phase bekannt und wurde auch für normale humane Keratinozyten, HaCaT und SCC25 Zellen gezeigt (*Richartz, 2007*).

Das Guanin-Analogon BuP-OH wurde bereits an den drei Keratinozytentypen untersucht und erscheint als die am besten geeignete Substanz innerhalb der Nicht-Phosphonat-Gruppe. Die maximale Hemmung der Viabilität von SCC25 Zellen unterschied sich kaum von der Aphidicolins und übertraf die von 5-FU bei Weitem, auch wenn die Wirkung von BuP-OH in etwas höheren Konzentrationen einsetzte als die von Aphidicolin und 5-FU. Ungünstigerweise greift BuP-OH aber auch NHK stark an, so dass eine topische Verwendung dieser Substanz nicht sinnvoll erscheint.

Foscarnet ist ein Pyrophosphat-Analogon und Hemmstoff viraler DNA-Polymerasen, welches zur systemischen Behandlung lebens- und augenlichtbedrohender Cytomegalieviren-

Infektionen sowie zur Behandlung akuter Schleimhautinfektionen durch aciclovirresistente Herpesviren bei AIDS-Patienten zugelassen ist. Foscarnet diente als Negativkontrolle, da es weder im Viabilitäts- noch im Proliferations-Tests an NHK, HaCaT und SCC25 eine nennenswerte Inhibition aufwies.

Zielzellen. Im Vordergrund dieser Arbeit standen zunächst 3 Typen von Keratinozyten, die den Übergang von gesundem über immortalisiertes, nicht-tumorignes bis hin zu Tumorgewebe darstellen: normale humane Keratinozyten (NHK), die transformierte Keratinozytenzelllinie HaCaT und die Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25. Die Untersuchungen an NHK sollten Hinweise auf eine Beeinträchtigung normaler Haut bei topischer Therapie mit den Testsubstanzen liefern. Die aus humanen, nicht malignen Keratinozyten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie HaCaT wurde als Zwischenstufe für den Übergang von gesundem zu tumorösem Gewebe gewählt (*Boukamp et al., 1988; Fusenig and Boukamp, 1998; Boukamp et al., 1999*). HaCaT Zellen weisen im Wesentlichen die Eigenschaften von basalen epidermalen Keratinozyten auf und verhalten sich auch phänotypisch wie diese was Wachstum und Differenzierung angeht (*Boukamp et al., 1988*). In Kultur mit humanen Fibroblasten bilden HaCaT Zellen eine nahezu normale Epidermis, deren Architektur der von adulten humanen Keratinozyten gleicht (*Schoop et al., 1999*). HaCaT Zellen tragen typischerweise durch UV-Licht induzierte Mutationen auf beiden Allelen von p53 (*Lehman et al., 1993*), wie sie auch bei Basalzellkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und der prämaligen Aktinischen Keratose gefunden werden (*Ziegler et al., 1993; Ziegler et al., 1994*). Allerdings weisen HaCaT Zellen bei sehr hohen Passagezahlen (> 300) zwar zahlreiche Translokationen und Deletionen auf (*Boukamp et al., 1997; Fusenig and Boukamp, 1998*), zeigen aber kein malignes Wachstum (in vitro und in vivo). Wie erwähnt befindet sich ein größerer Prozentsatz der HaCaT Zellen in der S-Phase und reagiert daher im Vergleich zu NHK oder SCC25 Zellen sensitiver auf die Behandlung mit Aphidicolin und 5-FU (*Richartz, 2007*). Diese Diskrepanz schloss es aus, HaCaT Zellen als verlässliches NHK-Modell zu verwenden, sondern erlaubte lediglich orientierende Untersuchungen neben Tests an NHK. UV-induzierte Mutationen von beispielsweise p53 oder p12^{doc-1} können zur Entstehung tumoröser Hautveränderungen wie einem SCC führen (*Ziegler et al., 1994; Matsuo et al., 2000*). *Matsuo et al. (2000)* zeigten, dass p12^{doc-1} – ein Wachstumssuppressor – aus NHK isoliert werden kann. Er ist mit dem DNA-Pol- α /Primase-Komplex assoziiert und reguliert so die DNA-Replikation, indem er u.a. die CDK2 vermittelte Phosphorylierung dieses Komplexes hemmt. Ein Verlust der Kontrollfunktion von p12^{doc-1}

kann zu unkontrolliertem Wachstum und schlussendlich einem SCC führen. Als Vertreter eines Plattenepithelkarzinoms diente die (orale) SCC25 Zelllinie. Neben dieser wurde anfänglich auch die SCC4 Zelllinie untersucht, welche aber sehr unregelmäßige Testergebnisse lieferte und daher aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

Da im Laufe der Untersuchungen ein starkes zytotoxisches Potential für die Phosphonate festzustellen war, wurden humane Fibroblasten als Indikatoren für eine potentielle Schädigung des Korioms durch eine topische Therapie sowie vier weitere Krebszelllinien untersucht: HT29 (Kolorektalkarzinomzellen), MCF7 (Mammakarzinomzellen), T24 (Blasenkarzinomzellen) und SISO (Adenozervixkarzinomzellen). Die humane Kolorektalkarzinom-Zelllinie HT29 dient häufig in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen von Therapieoptionen für das Kolorektalkarzinom (*Kleban et al., 2008; Mingxin et al., 2008*), so z.B. zur Testung von Capecitabin und Bevacizumab am Mausmodell (*Kolinsky et al., 2009*) sowie zur Prüfung von Lebermetastasierung bei Kolorektalkarzinom (*Robertson et al., 2008*). Die MCF7-Zelllinie ist eine Estrogen-Rezeptor positive (ER+) humane Brustkrebs-Zelllinie (*Srirangam et al., 2006*), welche auf eine antiestrogene Antitumor-Therapie mit Tamoxifen anspricht (*Rokavec et al., 2008*). An der MCF7-Zelllinie konnte z.B. eine Wachstumshemmung (G1-Zellzyklus-Arrest) unter Behandlung mit Ritonavir (*Srirangam et al., 2006*) sowie Resistenz gegen Tamoxifen infolge eines Estrogen-Rezeptor-Verlustes gezeigt werden (*Luqmani et al., 2009*). Ferner wurde mit MCF7 Zellen die Möglichkeit geprüft, durch „short interfering RNA“ (siRNA) die Expression von Mitose regulierenden Genen (z.B. Nek2) auszuschalten und so sowohl ER+ als auch ER- Mammakarzinomzellen in ihrem Wachstum zu hemmen (*Tsunoda et al., 2009*). Die T24-Zelllinie wird als eine der häufigsten Zelllinien in Harnblasen-Tumormodellen (*Hatina et al., 2008*), z.B. zur Testung der Wirksamkeit von Platin-Derivaten in vitro und in vivo (*Kovala-Demertzi et al., 2009*). In der Grundlagenforschung dient die T24-Zelllinie zum Verständnis von Migrations- und Metastasierungsprozessen des Harnblasenkarzinoms (*Mariotti et al., 2009*). Die T24-Zelllinie wird auch in Mausmodellen zur Untersuchung einer Wachstums- und Angiogenese-Hemmung mittels Co-Blockade des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und dessen Rezeptor (KDR) verwendet (*Chen et al., 2008*). Die SISO-Zelllinie dient sehr häufig der Untersuchung von Wachstums- und Angiogeneseprozessen zervikaler Karzinome (*Sonoda et al., 2007*) sowie der Aufklärung der Rolle des RCAS1 (receptor binding cancer antigen) im Metastasierungsprozess (*Liu et al., 2007b*). Die RCAS1-Expression ist in zervikalen Tumoren signifikant erhöht und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung, wobei einige RCAS1 positive Tumoren mit HPV Typ 16 infiziert sind (*Liu et al., 2007a*).

RCAS1 wird auch auf anderen Tumorzellen exprimiert, z.B. auf SCC Zellen (*Takahashi et al., 2001*).

4.1.2 Nicht-Phosphonate

In Analogie zu 5-FU wurden zunächst über einen relativ kurzen Syntheseweg die Thymidin-Analoga HM-1 und dessen Oxim-Derivat HM-1-Oxim synthetisiert, da eine Abbaureaktion an der Ketogruppe des Zucker-analogen Fünfringes während der 48-stündigen Inkubation (37 °C) vermutet wurde (*Höltje et al., in press*). Weiterhin wurden die Guanin-Analoga BuP-OH mit einer Butyl-Seitenkette und dessen iso-Hexyl-Analogon isoHex-OH in einer 11-Stufen-Synthese mit relativ geringen Ausbeuten dargestellt.

Die Zytotoxizität der Substanzen *in vitro* wurde zunächst mit dem MTT-Reduktions-Assay bestimmt, welcher sehr gut diskriminierte. HM-1 wurde bereits an NHK, HaCaT und SCC25 Zellen charakterisiert und zeigte eine geringe, leicht tumorselektive, zytotoxische Wirkung, die durch das Molecular Modelling nicht vorherzusehen war und eventuell durch eine unterschiedliche Enzym- und Transporterausstattung der Zellen begründet ist. HM-1-Oxim übertraf die durch HM-1 erzielte maximale Inhibition an SCC25 Zellen nicht, auch wenn die wirksame Konzentration von HM-1-Oxim an diesen Zellen geringer war als die von HM-1 (Abb. 3-1; Tab. 3-1). Ein abbaubedingter Wirkverlust kann daher ausgeschlossen werden (*Höltje et al., in press*). Erwähnenswert ist die fehlende Wirkung von HM-1-Oxim auf NHK gegenüber einer 30%igen Hemmung von SCC25 Zellen bei einem $-\lg IC_{50}$ -Wert von 7,44, was für eine gewisse Selektivität gegenüber den Tumorzellen spricht.

IsoHex-OH wurde relativ schnell aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da es entgegen den Molecular Modelling Berechnungen nicht aktiver war als BuP-OH, welches bis dahin überzeugt hatte (s.o.). IsoHex-OH blieb in seiner Wirkung knapp hinter BuP-OH zurück (Kapitel 3.1.2). Ein möglicher Grund ist, dass die iso-Hexyl-Gruppe nicht optimal in die entsprechende molekulare Tasche der Polymerase α passt (*Höltje et al., in press*).

Betrachtet man die maximale Hemmung und die aktive Konzentration der Nicht-Phosphonate, ergab sich folgende Abstufung der Zytotoxizität im Viabilitäts-Assay: Aphidicolin > BuP-OH, isoHex-OH, 5-FU > HM-1, HM-1-Oxim > Foscarnet. Demensprechend ergab sich folgende Reihenfolge der Proliferationshemmung: Aphidicolin >> BuP-OH >> Foscarnet (*Höltje et al., in press*).

Ergänzend zu den zytotoxischen Daten wurde der Zellzyklus analysiert, da dessen Dysregulationen – hervorgerufen durch Überexpression von Zellzyklus stimulierenden

Faktoren – zur Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms beitragen können (*Scully et al., 2000; Raybaud et al., 2003*). BuP-OH hatte trotz deutlich zytotoxischer Effekte praktisch keinen Einfluß auf den Zellzyklus. HM-1 zeigte hingegen einen ausgeprägten Effekt vor allem an nicht-kontaktinhibierten SCC25 Zellen (*Richartz, 2007*). Auch für 5-FU ist ein Einfluß auf den Zellzyklus bekannt (s.o.), daher wurde eine mögliche synergistische Wirkung von 5-FU und HM-1-Oxim vermutet. Eine Kombination der verschiedenen Wirkmechanismen von 5-FU (Thymidilatsynthase-Hemmung) und HM-1-Oxim (Pol- α -Inhibitor) könnte zu einer Wirksteigerung führen. Außerdem sollte der Zellpool durch eine Verschiebung des Zellzyklus in die S-Phase durch Präinkubation mit 5-FU sensibler auf eine Stimulation mit HM-1-Oxim reagieren. 5-FU wird zudem häufig in Kombinationstherapien verwandt, um synergistische Effekte zu erreichen. Gängig ist 5-FU kombiniert mit Cisplatin oder die Dreierkombination 5-FU/Cisplatin/Docetaxel, welche der Zweierkombination noch überlegen ist (*Kiyota et al., 2009; Pointreau et al., 2009*). Auch für die Kombination von 5-FU und COX-Hemmern wird ein synergistischer Effekt beschrieben (*Flis & Splwinski, 2009*). Im Gegensatz dazu verringert der DNA-Methyltransferase-Inhibitor Zebularin (Cytidin-Analogen) die 5-FU-induzierten Apoptose (*Suzuki et al., 2008*). Im Rahmen dieser Arbeit konnte für keinen Zelltyp (NHK, SCC25) – weder durch Costimulation noch durch Präinkubation mit 5-FU – eine Wirksteigerung von HM-1-Oxim festgestellt werden (Kapitel 3.1.1). Überraschenderweise wurde die Proliferation im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 5-FU bzw. HM-1-Oxim sogar verstärkt. Diese Ergebnisse deuten auf eine antagonistische Wirkung der beiden Substanzen hin. Analoge Versuche mit BuP-OH schlugen in vorangegangenen Arbeiten ebenso fehl (*Richartz, 2007*). Das Phänomen, dass vor allem Tumorzellen (wie SCC25) auf subtoxische Reize mit einer verstärkten Proliferation reagieren, wurde bereits beschrieben (*Richartz, 2007*) und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit mehrfach festgestellt (s.u.). Welche zellulären Mechanismen dafür verantwortlich sind, bleibt offen. Möglicherweise konkurrieren die zwei Thymidin-Analoga 5-FU und HM-1-Oxim bei dem ersten geschwindigkeitsbestimmenden Aktivierungsschritt zum Monophosphat um dasselbe Enzym – z.B. die zytosolische Thymidinkinase (TK1) oder die Thymidinphosphorylase (TP; Kapitel 1.6.2), welche beide Thymidin-Analoga aktivieren (*Eriksson et al., 2002*) und in NHK, HaCaT und SCC25 Zellen nachgewiesen wurden (*Höltje et al., in press*). Auch die mitochondriale TK2 und die zytosolische dCK können Pyrimidinbasen monophosphorylieren (*Eriksson et al., 2002*). dCK wurde ebenfalls in den genannten Zelltypen nachgewiesen, daher scheint eine Aktivierung von HM-1-Oxim gesichert, wodurch sich auch die zytotoxische Aktivität erklären ließe (*Höltje et al., in press*).

Auf Untersuchungen zur genauen Aktivierung und der unerwarteten Proliferation durch Costimulation wurde verzichtet, weil das HM-1-Oxim ohnehin aufgrund seiner geringen Wirkstärke nicht überzeugen konnte. *Ciccolini et al. (2000; 2001)* konnten aber bereits zeigen, dass eine verstärkte tumorale TP-Aktivität, hervorgerufen durch 2'-Deoxyinosin oder Gentransfer, zu einer vermehrten Bildung des 5-FU-Metaboliten FdUMP (Fluorodeoxyuridin-Monophosphat) führt, welcher die Thymidilatsynthase (TS) hemmt. TP ist aber auch identisch mit dem ‚platelet-derived endothelial cell growth factor‘ (PD-ECGF), einem Angiogenesefaktor der in Tumorzellen stark exprimiert wird, so dass eine künstliche Hochregulation der TP kontrovers diskutiert wird (*Focher & Spadari, 2001*). Im Gegensatz zu TP erhöhte Überexpression der TK nicht die antitumorale 5-FU-Aktivität, sondern senkte die Sensitivität der Tumorzellen (*Fanciullino et al., 2006*). Allerdings konnten humane endometriale Karzinomzellen, in welche das Gen für eine virale TK transfiziert wurde, in vitro für die Therapie mit Ganciclovir sensitiviert werden, indem die Monophosphorylierungsrate des Arzneistoffs erhöht wurde (*Ural et al., 2000*). Ob das ein Ansatz zur Wirksteigerung von HM-1 bzw. HM-1-Oxim sein könnte, wurde hier nicht überprüft. Letztlich bleibt gegenwärtig die Frage offen, ob die in-vitro-Situation auf die in-vivo-Verhältnisse übertragen werden kann.

Eine fehlende oder geringe Toxizität kann nicht nur auf einer unzureichenden enzymatischen Aktivierung beruhen, sondern auch durch einen induzierten Auswärtstransport der Substanzen bedingt sein. Die ABC-(ATP-binding cassette)-Membrantransporter MRP4 und MRP5 sind für den auswärts gerichteten Transport von Nukleosid- und Nukleotidanaloga und zum Teil deren monophosphorylierten Metaboliten verantwortlich (*Wijnholds et al., 2000; Wielinga et al., 2002; Reid et al., 2003; Wielinga et al., 2003*). Überexpression dieser Effluxpumpen führte zu Resistenzen, z.B. gegen Adefovir (*Wijnholds et al., 2000; Wielinga et al., 2002*) und wurden bereits in NHK, HaCaT und SCC25 Zellen nachgewiesen (*Baron et al., 2001; Richartz, 2007*). Insgesamt waren die Ergebnisse der Testsubstanzen ohne Phosphonatgruppe (Nicht-Phosphonate) nicht zufriedenstellend, entweder aufgrund einer zu geringen Wirksamkeit ($-lg IC_{50}$, maximale Inhibition) oder einer fehlenden Tumorselektivität.

4.1.3 Phosphonate

Wie erwähnt, müssen die potentiellen Pol- α -Inhibitoren durch Phosphorylierung in ihre Triphosphate überführt werden. Durch die Derivatisierung zum Phosphonat an der endständigen OH-Gruppe des Zucker-analogen Molekülteils gelingt es, die erste

Phosphatgruppe metabolisch stabil im Molekül zu verankern, da Phosphor-Kohlenstoff-Bindungen wesentlich stabiler als die hydrolyseempfindlichen Phosphatester-Bindungen sind. Dies führt zu besser aktivierbaren Monophosphat-Analoga. In der antiviralen Therapie werden Phosphonate bereits eingesetzt: z.B. Adefovir bei chronischer Hepatitis B oder Tenofovir gegen HIV-Infektionen. Mit dem Ziel einer verbesserten Therapie der Aktinischen Keratose und des SCC und die bis dahin beste Substanz – das Guanosin-Analogon BuP-OH – zu übertreffen, wurden mittels Molecular Modelling die Guanosin-analogen Phosphonate OxBu, OxIsohex und OxHex vorgeschlagen (Tab. 2-3; *Zdrazil et al., submitted*) und synthetisiert. Bei topischer Applikation muss eine ausreichende Bioverfügbarkeit der Substanzen in den Tumorkläsionen gesichert sein. Daher sollten die Wirkstoffe eine molekulare Masse unter 500 g/mol und ein ausgewogenes Hydrophilie-Lipophilie-Verhältnis aufweisen (logP 1-3; *Potts & Guy, 1992; Moss et al., 2002; Korting & Schäfer-Korting, in press*). Dies ist für OxBu, OxIsohex und OxHex realisiert (MG in g/mol und logP: OxBu 436 / 1,36; OxIsohex 464 / 2,27; OxHex 464 / 2,34). Nach der Penetration in die Haut müssen diese potentiellen Pol- α -Inhibitoren durch Nukleosidkinasen wie die zytosolische dCK und die mitochondriale dGK aktiviert werden (*Eriksson et al., 2002*), beide Kinasen werden von NHK und SCC25 Zellen gebildet (*Höltje et al., in press*). Voraussetzung für die intrazelluläre Aktivierung ist zunächst der Transport in die Zelle. Der ubiquitär vorkommende hENT-1 Transporter transportiert u.a. Nukleosid-Analoga (*Jordheim & Dumontet, 2007*) und wurde in den drei Keratinozyten-Zelltypen nachgewiesen – in SCC25 Zellen allerdings nur schwach (*Richartz, 2007*). Daher ist hENT-1 wahrscheinlich nicht entscheidend für die Aufnahme von OxBu, OxIsohex und OxHex, da diese auf SCC25 Zellen stark zytotoxisch wirkten. Die Aufnahme könnte durch andere Transportsysteme realisiert werden, z.B. wurde für NHK eine Aufnahme großer anionischer organischer Moleküle durch Anionentransporter der OATP-Familie beschrieben (*Schiffer et al., 2003*). Außerdem könnte die Aufnahme in die Zelle transporterunabhängig verlaufen – wie bei Adefovir, welches endozytotisch aufgenommen wird (*Olsanska et al., 1997*).

Die in-vitro-Untersuchungen an den drei Keratinozytenzelltypen ergaben für die Phosphonate eine deutliche Tumorselektivität (Tab. 3-2). OxBu und OxIsohex griffen weder NHK noch HaCaT Zellen an, wirkten jedoch auf SCC25 Zellen zytotoxisch – OxIsohex mit 20 % maximaler Hemmung allerdings nur moderat (daher eliminiert, s.u.), OxBu hemmte mit 39 % die Zellviabilität ähnlich stark wie 5-FU. OxHex reduzierte die Zahl viabler SCC25 Zellen um 74 % und damit deutlich stärker als NHK, deren Zahl um maximal 43 % abnahm, das sind

unwesentlich mehr als mit 5-FU (41%). Herausragend ist die starke Aktivität von OxBu und OxHex, beide wirkten bereits in nanomolaren Konzentrationen zytotoxisch auf SCC25 Zellen (-lg IC₅₀ 9,43 bzw. 9,12), damit sind sie 1000- bzw. 10000-fach aktiver als die Vergleichssubstanzen Aphidicolin und 5-FU (-lg IC₅₀ 6,29 und 6,01) bzw. BuP-OH (-lg IC₅₀ 5,05). Die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen stimmten im Wesentlichen mit denen aus dem Zytotoxizitäts-Assay überein. Damit wurde das Ziel, die Wirksamkeit von 5-FU und von BuP-OH zu übertreffen, erreicht, zudem wurden tumorselektive Substanzen generiert. Die Selektivität von OxBu wurde aufgrund der Bedeutung dieses Ergebnisses mehrfach und mit verschiedenen Chargen von OxBu nachgeprüft, und zwar sowohl im Vergleich von NHK mit SCC25 Zellen als auch im Vergleich von NHK mit SCC4 Zellen, einer weiteren Plattenepithelkarzinomzelllinie, die zu maximal 47 % gehemmt wurden. Die Tumorselektivität und ausgeprägte Zytotoxizität der Phosphonate könnte mit dem Wegfall des ersten langsamen Aktivierungsschritts zusammenhängen, wodurch sich die erhöhte Stoffwechselaktivität der Tumorzellen besser entfalten kann (*Spadari et al., 1998*).

OxBu und OxHex hemmten die Viabilität normaler humaner Fibroblasten zu etwa 60 % – OxHex bereits in kleinen Konzentrationen (-lg IC₅₀ ca. 8 für OxHex, ca. 4 für OxBu). Daher ist OxHex wahrscheinlich stärker hautschädigend, vorausgesetzt es penetriert in relevanten Mengen in die Dermis. Aus diesem Grund kommen Hautpenetrationsstudien sowie einer kontrollierten Penetration der Substanzen in die Epidermis mittels Nanopartikeln eine besondere Bedeutung zu (s.u.; *Jenning et al., 2000; Santos Maia et al., 2002*). Trotz allem könnten die beiden Phosphonate OxBu und OxHex aufgrund ihrer sehr hohen Wirkstärken einen neuen Ansatz in der Therapie des hellen Hautkrebses darstellen, wobei OxHex aufgrund seiner stärkeren Zytotoxizität der bessere Kandidat für eine kurze intensive Therapie zu sein scheint, OxBu dagegen bei längerfristiger Anwendung eventuell hautverträglicher sein könnte.

Die Resultate der pharmakologischen Untersuchungen stimmten gut mit den Voraussagen des Molecular Modelling überein, nach welchen OxHex am besten in die Bindungstasche der Polymerase α passt (Kapitel 3.1.5, *Zdrzil et al., submitted*). Höhere Scores, d.h. vermutete Bindungsaffinitäten, für die Substanzen mit einer azyklischen Zucker-analogen Komponente (Scores: OxBu 14,30; OxIsohex 15,02; OxHex 15,80) im Vergleich zu BuP-OH mit intakter Zuckerfunktion (Score: 10,70) legen nahe, dass die größere Flexibilität der offenen Seitenketten eine bessere Anpassung der entsprechenden Triphosphat-Analoga an die Bindungstasche ermöglicht. Betrachtet man die -lg IC₅₀-Werte, so war die Prädiktivität der berechneten Scores gegeben. Die lipophileren Vertreter mit einer iso-Hexyl- bzw. n-Hexyl-

Seitenkette wurden als wirksamer eingestuft als die Butyl-Derivate, da eine bessere Ausnutzung der Seitentasche unter entsprechender Wechselwirkung möglich sein sollte (*Zdrzil et al., submitted*). Dies war bei der pharmakologischen Testung der iso-Hexyl-Derivate isoHex-OH und OxIsohex jedoch nicht der Fall, was auf einen erschwerten Zugang der nicht-linearen Seitenkette zum aktiven Zentrum des Enzyms (Pol α) hinweist (*Zdrzil et al., submitted*).

Aufgrund ihrer großen Zytotoxizität gegenüber Plattenepithelkarzinomzellen wurden OxBu und OxHex sowie die Referenzen 5-FU, Aphidicolin und BuP-OH zusätzlich an den Tumorzelllinien HT29, MCF7, T24 und SISO untersucht. Die guten Ergebnisse an diesen Zelllinien eröffnen auch neue Möglichkeiten für die Therapie des Kolorektalkarzinoms, des Mammakarzinoms, des Blasenkarzinoms sowie des Adenozervixkarzinoms. Die Zytotoxizitäts-Assays ergaben aktive Konzentrationen im submikromolaren bis nanomolaren Bereich (-lg IC₅₀-Werte 7 – 9; Tab. 3-2). Herausragend ist die Wirksamkeit von OxBu an HT29 Zellen, dessen aktive Konzentration sogar unterhalb des nanomolaren Bereichs lag (-lg IC₅₀ 11,3) und eine Viabilitätshemmung von maximal 58 % ergab. Damit greift OxBu HT29 Zellen bei ähnlichem Maximaleffekt bereits in wesentlich geringeren Konzentrationen an als OxHex, so dass OxBu hier der geeignetere Kandidat ist. OxHex hingegen hemmte effektiver die Viabilität von MCF7 und T24 Zellen, berücksichtigt man die -lg IC₅₀-Werte (9,25 und 8,70) und Maximaleffekte (51 % und 65 %). BuP-OH hemmte die Viabilität von MCF7 Zellen sogar zu 75 %, wenn auch bei 100-fach größerem IC₅₀-Wert als OxHex. Für die SISO-Zelllinie sind OxBu und OxHex als gleichwertig zu betrachten, wobei sie kaum hinter der Zytotoxizität von Aphidicolin zurückbleiben. Ebenfalls hervorzuheben ist die starke zytotoxische Wirkung von 5-FU an T24 Zellen. Die sehr kleine aktive Konzentration (-lg IC₅₀: 12,55) hätte jedoch eine größere maximale Hemmung erwarten lassen (43 %). Die Diskrepanzen der Wirkungen der Test- und Referenzsubstanzen an den Zelllinien können mit einer differierenden Permeabilität zellulärer Strukturen oder unterschiedlichen Proteinausstattung der Zellen erklärt werden (*Wright et al., 1987*).

Die Ergebnisse des Proliferations-Assays stimmten im Großen und Ganzen gut mit den Werten des Zytotoxizitäts-Assays überein, wobei die Werte für die maximale Hemmung nach Thymidin-Einbau im Allgemeinen etwas geringer waren als die nach MTT-Test (Tab. 3-2). An HT29 Zellen waren die Ergebnisse für OxBu und OxHex uneindeutig: die Proliferation wurde kaum gehemmt, zum Teil sogar gefördert, obwohl die aktiven Konzentrationen im submikromolaren Bereich lagen und auch die Ergebnisse des MTT-Tests anders lauteten. Die

Ergebnisse des MTT-Tests sind jedoch verlässlicher (*Sieuwerts et al., 1995; Basha et al., 1996; Klein et al., 1996*) als die des Thymidin-Einbaus (*Maurer, 1981; Hu et al., 2002*). Eventuell kommt während der vergleichsweise kurzen Inkubationszeit von 24 h beim Thymidin-Einbau ein interessanter Effekt verstärkt zum Tragen, der mehrfach festgestellt werden konnte, nämlich dass eine Stimulation der Tumorzellen mit subtoxischen Substanzkonzentrationen zu einem Anstieg viabler bzw. proliferierender Zellen über 100 % führt. Eventuell erhöhen die Zellen ihre Wachstumsrate als Abwehrreaktion auf die potentiell toxischen Substanzen (*Richartz, 2007*).

Insgesamt wirkten OxBu und OxHex auch an den vier zusätzlich untersuchten Tumorzelllinien zuverlässig. Hier übertraf die Zytotoxizität von OxBu und auch BuP-OH oft sogar die an SCC25 Zellen. OxHex übertraf die Wirkung an SCC25 Zellen nicht, es stellt aber für eine neuartige Therapie der Aktinischen Keratose und des Plattenepithelkarzinoms die bis dato attraktivste Substanz dar. Für Aphidicolin und BuP-OH ergab sich eine durchgängig starke, zellunspezifische Zytotoxizität – das lässt vermuten, dass auch gesunde Zellen anderer Gewebe unspezifisch angegriffen werden, so wie für Hautzellen bereits gezeigt, so dass eine Therapie mit diesen Substanzen sorgfältig zu prüfen ist.

Obwohl die theoretischen Ergebnisse der Pol- α -Docking-Studien gut mit den in-vitro-Daten korrelierten (s.o.), fehlt der endgültige Beweis, dass tatsächlich die Polymerase α inhibiert wird. Es lässt sich leider nicht von dem Pol- α -Inhibitor Aphidicolin auf die neuen Substanzen rückschließen, da Aphidicolin im Gegensatz zu den Phosphonaten nicht intrazellulär aktiviert werden muss und eine etwas andere Bindungsstelle besitzt. Deshalb müssen die aktivierten Triphosphat-Analoga an der isolierten Polymerase α auf Enzymhemmung untersucht werden (s.u.).

Die vorletzte Synthesestufe von OxBu und OxHex – die entsprechenden Diethylester (DE, OxBu-DE; OxHex-DE) wurden ebenfalls auf Zytotoxizität geprüft. Die erhöhte Lipophilie der Diethylestervorstufen verstärkt die Aufnahme in die Targetzellen, in denen durch zahlreich exprimierte Esterasen die Muttersubstanzen freigesetzt werden (*Gysler et al., 1997; Ngawhirunpat et al., 2003; Haberland et al., 2006*), welche nun in größerer Menge für die Hemmung der Pol α zur Verfügung stehen. Dieser Umstand und eine erleichterte Beladung von Nanopartikeln machen diese Prä-Prodrugs zu attraktiven Wirkstoffen im Hinblick auf eine topische Applikation. Das Prinzip, durch Esterbildung die Arzneistoffapplikation zu verbessern, ist nicht neu. Mit Valaciclovir bzw. Valganciclovir, den Valinestern der

Ausgangssubstanzen, konnte die Resorptionsquote nach oraler Applikation entscheidend verbessert werden, da die Valinester Substrate intestinaler Aminosäuretransporter sind. Aus den Estern werden bereits in der Darmschleimhaut und später in der Leber die Muttersubstanzen freigesetzt, die nun in größerem Maß bioverfügbar sind (*Lai et al., 2008*). Die mit OxBu und OxHex strukturell verwandten Nukleotid-Analoga Adefovir und Tenofovir werden schlecht resorbiert. Bei Adefovir-dipivoxil und Tenofovir-disoproxil-fumarat ist aber nicht nur die Resorption, sondern auch die Penetration in die Targetzellen erheblich besser (*Qaqish et al., 2003; Azanza et al., 2008*). In der topischen Therapie wird ebenfalls mit z.B. Glucocorticoid-Ester-Prodrugs eine Steigerung der Lipophilie und damit verbesserte Penetration in die Haut und stärkere Wirkung erzielt (*Gysler et al., 1997; Gysler et al., 1999*). Die Zytotoxizität von OxBu-DE war im Vergleich zu OxBu erhöht, SCC25 Zellen wurden maximal zu 72 % gehemmt. Die Effekte von OxHex-DE an SCC25 Zellen unterschieden sich kaum von OxHex. Der wirksame Konzentrationsbereich änderte sich für beide Diethylester-Vorstufen im Vergleich zu den Muttersubstanzen kaum. Allerdings wirkten die Prä-Prodrugs verstärkt zytotoxisch auf NHK, damit ging der tumorselektive Effekt vor allem für OxBu verloren (Tab. 3-2; Tab. 3-3). Dies lässt sich mit der höheren Lipophilie und dem dadurch verbesserten Eindringen in die Hautzellen erklären. Somit zeigten OxBu-DE und OxHex-DE kein verbessertes Wirkprofil, zudem steht ihr hohes Molekulargewicht (492 bzw. 520 g/mol) einer optimalen Hautpenetration entgegen (*Potts & Guy, 1992; Moss et al., 2002*).

4.1.4 Ausblick – Weiterentwicklung der Phosphonate

Für die Weiterentwicklung der Phosphonate ist der endgültige Beweis der Polymerase-alpha-Hemmung durch die Triphosphat-Analoga (OxBu-Diphosphat, OxHex-DP) im Enzym-Assay mit der isolierten Pol α essentiell. OxBu- und OxHex-Diphosphat können von der Firma Chiracon synthetisiert werden, das Enzym kann kommerziell erworben werden. Für die Entwicklung des entsprechenden Enzym-Assays kann auf veröffentlichte Methoden zurückgegriffen werden (*Haraguchi et al., 1983; Tveit & Kristensen, 2001; Locatelli et al., 2005*).

Es wäre zudem interessant, die intrazelluläre Aktivierung der Phosphonate nachzuvollziehen. Untersuchungen zum Metabolismus in der 2D-Zellkultur an NHK und SCC25 Zellen wurden daher begonnen, welche auf analogen Studien zum Metabolismus des strukturverwandten Adefovir basieren (*Ray et al., 2004*).

In einem nächsten Schritt müssten Untersuchungen an der 3D-Kultur sowie an exzidierte Human- oder Schweinehaut erfolgen. Die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Höller Obrigkeit der Universität Aachen hat ein 3D-Modell humaner Plattenepithelkarzinomhaut entwickelt, wobei sie SCC12 Zellen in ein Konstrukt normaler humaner Keratinozyten inokulierten (Höller *et al.*, 2001; Höller Obrigkeit *et al.*, 2009). Auf dieser Basis wurden 3D-Haut-Tumor-Modelle mit SCC25 Zellen gezüchtet, die aktuell in Untersuchungen für den Wirknachweis der Testsubstanzen (OxBu und OxHex) in der 3D-Kultur eingesetzt werden. Für den Nachweis einer Reduktion der Tumorzellen werden die Modelle nach mehrtägiger Inkubation mit den Testsubstanzen immunhistochemisch charakterisiert (Höller Obrigkeit *et al.*, 2009). Des Weiteren sollen zukünftig Penetrations- und Permeationsstudien an exzidierte Human- oder Schweinehaut mittels Franz-Zell-Diffusion erfolgen, um Erkenntnisse bezüglich Eindringtiefe in die Haut, d.h. Ausmaß der Penetration sowie Akkumulation der Testsubstanzen in bestimmten Hautschichten zu erhalten, um eine potentielle Schädigung der Dermis, die aufgrund der Toxizität von OxHex an Fibroblasten möglich ist, vor der Erstanwendung am Menschen besser abschätzen zu können. Permeationsstudien und Analytik des Akzeptormediums im Anschluss können zudem Hinweise zum Metabolismus in der Humanhaut liefern (Gysler *et al.*, 1999). Eine starke Permeation der Substanzen würde das Risiko systemischer Nebenwirkungen erhöhen. Eine Untersuchung der systemischen Toxizität wird ohnehin im Rahmen der präklinischen Prüfung an Nagern durchgeführt – diese wurde bereits von der Firma tpi consult (toxikologie pharmakologie immunologie GmbH) unter der Leitung von Herrn Prof. Hockertz begonnen. Die ‚akute orale Toxizität‘ wird nach OECD-Richtlinie (423) nach einmaliger Injektion der Testsubstanzen in Mäuse und 14-tägiger Beobachtung festgestellt. Dosen von 100 mg/kg töteten 0 von 3 Mäusen. Die Untersuchungen dauern an.

Da Arzneistoffe nur zu einigen Prozent aus Salben, Cremes und Gelen in die Haut penetrieren (Korting & Schäfer-Korting, *in press*), soll eine kontrollierte Penetration in die oberen Hautschichten mit Wirkstoff beladenen Trägersystemen wie ‚solid lipid nanoparticles‘ (SLN) (Jenning *et al.*, 2000; Lombardi Borgia *et al.*, 2005; Santos Maia *et al.*, 2002) oder ‚dendritic core-multishell nanotransporters‘ (CMS) erreicht werden (Küchler *et al.*, 2009). Dabei steigt die Effizienz der Beladung mit der Lipophilie der Substanzen (Schäfer-Korting *et al.*, 2007). Untersuchungen zur Rezepturfindung von mit OxBu bzw. OxHex beladenen SLN wurden begonnen. Die endgültige nanopartikuläre Wirkstoffformulierung muss ebenfalls hinsichtlich des Penetrations- und Freisetzungsverhaltens sowie des Irritationspotentials getestet werden. Wolf *et al.* (2009) konnten keine akuten toxischen Effekte für SLN und CMS-Nanotransporter

nachweisen, so dass eine Hautverträglichkeit gewährleistet zu sein scheint. Falls OxBu und OxHex auch für die weiteren Krebsformen entwickelt werden sollen, könnten auch hier Nanopartikel für ein Drug Targeting eingesetzt werden. Nanopartikel, die den Antikörper Trastuzumab als Ligand trugen, banden das zelluläre HER2-Antigen auf Brustkrebszellen und führten so zur Anreicherung des inkorporierten Wirkstoffs in diesen Krebszellen (*Spänkuch et al., 2008; Steinhäuser et al., 2008*).

Andere Strategien für die Weiterentwicklung der Phosphonate ergeben sich aus verschiedenen Wirkstoffkombinationen, die zu einer Wirksteigerung führen könnten. Zunächst kann der Ansatz der Prästimulation mit 5-FU noch einmal aufgegriffen werden, um die Zellen durch Shift in die S-Phase für die Therapie mit OxBu und OxHex zu sensitivieren – die Phosphonate konkurrieren als Purin-Analoga nicht mit der Aktivierung von 5-FU. Möglicherweise wird aber ein zusätzlicher Effekt durch 5-FU-Stimulation von der ohnehin starken Toxizität der Phosphonate überdeckt. Deshalb sind Wirkstoffkombinationen mit unterschiedlichen zellulären Angriffspunkten sinnvoller. Da bei neoplastisch veränderten Keratinozyten die Telomerase hochreguliert ist, wodurch die Entstehung eines SCCs vorangetrieben wird (*Parkinson et al., 1997*), könnte eine Kombination mit Telomerase-Inhibitoren von Vorteil sein (*Budiyanto et al., 2003*). Des Weiteren erscheint eine Kombination mit EGFR-Inhibitoren (epidermal growth factor receptor) sinnvoll, da die EGFR-Inhibition auch die Telomerase-Aktivität senkt (*Budiyanto et al., 2003*). Überdies scheint auch die Pol η ein interessantes Target zu sein: in Xeroderma pigmentosum Patienten ist das DNA-Polymerase-H-Gen, welches für Pol η kodiert, mutiert – dadurch ist das Auftreten von Hautkrebskrankungen durch UV-Exposition erhöht (*Laposa et al., 2003; Cleaver, 2005*).

Wie dargestellt (Kapitel 1.2 Plattenepithelkarzinom) sind offenbar humane Papilloma Viren an der Tumorgenese des SCC beteiligt (*Bulk et al., 2006; Näsman et al., 2009*), wobei bei persistierenden HPV-Infektionen die Virus-DNA von Polymerasen des Wirts vervielfältigt wird (*Park et al., 1994*). Tatsächlich wurde in AK-Läsionen sogar mehr virale DNA nachgewiesen als in SCC-Läsionen (*Weissenborn et al., 2005; Dianzani et al., 2008*). Zudem zeigten SCC Patienten eine ausgeprägtere Serokonversion gegen HP-Viren als BCC Patienten (*Andersson et al., 2008*). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass der antivirale Toll-like-Rezeptor-7-Agonist Imiquimod nicht nur gegen durch HPV ausgelöste Genitalwarzen wirksam ist, sondern auch zur off-label-Therapie der AK eingesetzt wird (Kapitel 1.3.2; *Miller et al., 2008*). Eine Kombination dieser Pharmaka erscheint deshalb prüfenswert.

4.2 Analytische Untersuchungen

Für die vielversprechendsten Substanzen und deren voraussichtliche Metaboliten sollte eine HPLC-Analytik entwickelt werden, um diese Substanzen quantifizieren und hinsichtlich ihrer chemischen Stabilität untersuchen zu können. Mit dieser Methode sollen später die bereits erwähnten pharmakokinetischen Untersuchungen an 2D-Kulturen und 3D-Hautmodellen sowie die Quantifizierung der applizierten Dosen der angesprochenen toxikologischen Untersuchungen durchgeführt werden. Zudem galt es, eine Festphasenextraktionsmethode zur Isolierung der Phosphorylierungsprodukte der Testsubstanzen aus der Zellkultur zu etablieren.

4.2.1 Analytik der Nicht-Phosphonate

Im ersten Teil der Arbeit sollte eine Methode für die Molecular Modelling Substanzen BuP-OH, HM-1 und HM-1-Oxim entwickelt werden. Da diese Substanzen nur in begrenzter Menge verfügbar waren, wurde zunächst mit den natürlichen Nucleosiden Thymidin und Guanosin gearbeitet, deren Phosphorylierungsprodukte (dTMP, dTDP, dTTP, GMP, GDP, GTP) neben den Basen Thymin und Guanin als eventuelle Abbauprodukte detektierbar sein sollten.

Die ersten Versuche orientierten sich an Veröffentlichungen, die sowohl Purin- als auch Pyrimidinnucleoside trennten (*Alnouti et al., 2004; Ding et al., 2004; Verweij-van Wissen et al., 2005*). Es wurde mit einer Umkehrphase (RP-Säule), UV-Detektion (260 nm) und Gradientenelution mit Acetonitril und Acetat-Essigsäure-Puffer gearbeitet. Ein Laufmittel mit saurem pH und Acetonitril als organische Komponente zu verwenden, hatte sich als vorteilhaft erwiesen (*Alnouti et al., 2004*). Dem lag die Überlegung zugrunde, dass die 5 Substanzen unterschiedlich protoniert werden und so in ihrer Polarität differieren. Base und Nucleosid, nicht aber die 3 Phosphate konnten getrennt werden. Mit den Eluenten Acetonitril und Phosphatpuffer ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), die mehrfach zur Analyse von Purin- und Pyrimidinnucleosiden sowie deren Abbauprodukten dienten (*Fan et al., 2002; Kießling et al., 2004; Kano et al., 2005*), wurde jedoch keine ausreichende Trennung erzielt. Erfolg brachte eine Gradientenelution mit dem Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumchlorid (TBA-Cl-Puffer), die auf der Methode von *Decosterd et al. (1999)* basierte. TBA^+ -Ionen bilden Assoziate unterschiedlicher Stöchiometrie und Polarität mit der negativen Ladung der Phosphatgruppen (P^-) der Nucleotide. *Decosterd et al. (1999)* trennten nur die

phosphorylierten Metabolite, nicht die Nukleoside und Basen. Die Phosphattrennung mit TBA-Cl (Kapitel 2.2.5) erlaubte die Basislinientrennung der Basen, Nukleoside und Nukleotide der Thymin- und Guaninreihe (Abb. 3-15) sowie deren Detektion im nanomolaren Bereich (Bestimmungsgrenze: 2 nmol/ml; 0,252 – 1,145 µg/ml; Tab. 3-6). Die Peakflächen korrelierten meist gut mit der Konzentration ($r^2 > 0,9$).

Zudem wurden Stabilitätsuntersuchungen der Modellsubstanzen bei Raumtemperatur über 120 h durchgeführt. Diese ergaben keinen signifikanten Abbau, so dass eine durch Instabilität bedingte, fehlerhafte Detektion ausgeschlossen werden kann.

Mit der für Thymidin und Guanosin entwickelten Methode liessen sich auch die Testsubstanzen BuP-OH, HM-1, HM-1-Oxim sowie die Nukleosid-Analoga Zalcitabin, Capecitabin, 5-FU und Aciclovir analysieren. Die Retentionszeiten (Tab. 3-5) sind ein Maß für die Polarität der Substanzen, wobei die stärker hydrophilen Substanzen schneller eluiert werden, da sie mit der unpolaren, stationären (RP-)Phase geringere Wechselwirkungen ausbilden. Die Nukleosid-Analoga ohne größere Substituenten am Purin- bzw. Pyrimidinring mit Zucker(-analoger) Komponente (HM-1, HM-1-Oxim, Zalcitabin, Aciclovir) sind hydrophiler, werden also nach relativ kurzer Zeit detektiert. BuP-OH und Capecitabin, beide mit lipophilen Substituenten am Purin- bzw. Pyrimidinringsystem, weisen längere Retentionszeiten auf.

4.2.2 Analytik der Phosphonate

Ferner sollte eine HPLC-Methode für die Phosphonate OxBu und OxHex entwickelt werden, welche sich im Laufe der pharmakologischen Testung als aussichtsreichste Substanzen herausgestellt hatten. Dafür wurde zunächst die von der Firma Chiracon entwickelte isokratische Methode (basische Phosphonattrennung, Kapitel 2.2.5) adaptiert, OxBu wurde nach ca. 4 Minuten als sauber definierter Peak detektiert (Abb. 3-18), allerdings führte die starke Basizität der Laufmittel (pH 10,6) zur Zersetzung der RP-Säule (stabil bis pH 10). Für die weiteren Untersuchungen wurde eine stabilere Säule (bis pH 11) eingesetzt und ein Gradient eingeführt, um Abbauprodukte und Metabolite in einem größeren Polaritätsbereich zu eluieren. Überraschenderweise ergaben die Chromatogramme stets 2 Peaks für OxBu bzw. OxHex (Abb. 3-19; mittlere RT: 2,43 und 9,15, bzw. 2,44 und 11,21), deren Fläche sehr gut mit der Konzentration korrelierte ($r^2 > 0,99$, Abb. 3-20). Trennung einer 1:1-Mischung von OxBu und OxHex ergab, dass der erste Peak beider Substanzen nahezu dieselbe Retentionszeit aufwies. Möglicherweise stellt der erste Peak die deprotonierte Form, d.h. sehr hydrophile Salzform der Moleküle dar, wodurch der Unterschied zweier CH₂-Gruppen in der

Alkylkette keinen Einfluss auf die Retentionszeit hat und die beiden Substanzen praktisch zeitgleich eluiert werden. Der zweite Peak könnte die protonierte (Phosphonsäure-)Form darstellen – in der nicht-ionischen Form kann die unterschiedliche Länge der Alkylkette durchaus eine RT-Differenz von ca. 2 min ausmachen. Eine Zersetzung im basischen Milieu ist nicht anzunehmen, da OxBu im Stresstest gegenüber basischen Einflüssen relativ stabil war. Durch Säureeinwirkung kam es lediglich zu Ladungsverschiebungen im Molekül oder der Bildung eines inneren Salzes, wodurch der Hauptpeak eine geringfügig längere RT aufwies. Unter oxidativem Stress und bei trockener Hitze fand eine deutliche Zersetzung statt (Zuhse *et al.*, 2008). Eine saubere Analytik erfordert Chromatogramme mit einem Peak pro Substanz, die von Chiracon adaptierte Methode ist daher zur Validierung ungeeignet und wurde nicht weiterverfolgt.

In Analogie zu der erfolgreichen Phosphattrennung mit TBA-Cl wurde in einem zweiten Ansatz eine ähnliche Methode zur Trennung der Phosphonate entwickelt. OxBu und OxHex können aufgrund der Phosphonsäurestruktur leicht deprotonieren und ein Ionenpaar mit TBA-Cl bilden. Die Entwicklung orientierte sich an Verfahren zur Analytik von Adefovir bzw. Tenofovir (Shaw *et al.*, 1997; Sentenac *et al.*, 2003; Rezk *et al.*, 2005; Vávrová *et al.*, 2007). Alle Verfahren benutzen ein Tetrabutylammoniumsalz (meist TBA-hydrogensulfat) in einem wässrigen, phosphatgepufferten Laufmittel (pH 6) sowie eine organischen Phase (Acetonitril oder Methanol) an einer RP18-Säule. Häufig wird UV-detektiert (ca. 260 nm). Die Bestimmungsgrenzen liegen im Bereich 10^{-8} bis 10^{-7} M (0,01 – 0,1 µg/ml Substanz). Einige Methoden beschreiben eine Derivatisierung von Adefovir bzw. Tenofovir zum Chloroacetaldehyd-Derivat (Inkubation mit gepufferter, 0,34%iger Chloroacetaldehydlösung, pH 4,5, ca. 40 min, ca 90 °C) und anschließender Fluoreszenzdetektion (Extinktion 236 nm, Emission 420 nm; Shaw *et al.*, 1997; Jullien *et al.*, 2003; Sparidans *et al.*, 2003). Allerdings sind diese Methoden recht aufwendig und störanfällig, zudem konnte durch die Derivatisierung die Bestimmungsgrenze nicht verbessert werden.

Die endgültige Methode basierte auf der Veröffentlichung von Vávrová *et al.* (2007). Das lag vor allem an der geringen Salzkonzentration der verwendeten Laufmittel (10 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$), wodurch anders als bei den stärker konzentrierten Laufmitteln anderer Methoden (bis 20 mM Phosphatpuffer und bis 10 mM Bu_4N^+ -Salz; Shaw *et al.*, 1997; Sentenac *et al.*, 2003; Rezk *et al.*, 2005) säulen- und systemschonender gearbeitet wurde. Hohe Salzkonzentrationen führen schnell zu Ablagerungen – vor allem des relativ großen TBA-Moleküls – auf der Säule und Verstopfung feinsten Kapillaren, wodurch die

Trennleistung und Elutionstendenz der Analyten stark abnimmt. Anders als *Vávrová et al. (2007)* wurde nicht isokratisch, sondern mit Gradientelution gearbeitet, um Metabolite und Abbauprodukte unterschiedlicher Polarität in einer Analyse detektieren zu können. Die Phosphonattrennung mit TBA-Cl (Kapitel 2.2.5) war etwas weniger sensitiv als die basische Phosphonattrennung, lieferte aber nur einen Peak, dessen Fläche sehr gut mit der Konzentration korrelierte (Abb. 3-22; $r^2 > 0,99$). Das strukturverwandte Phosphonat Adefovir konnte als interner Standard eingesetzt werden, dabei korrelierte das Verhältnis der OxBu- bzw. OxHex-Fläche zur Adefovir-Fläche linear mit der Konzentration (Abb. 3-23, $r^2 > 0,99$). Die UV-Detektionswellenlänge orientierte sich anfänglich an Vorversuchen, die eine maximale Peakfläche bei 270 nm ergeben hatten, später wurde aber gemäß der UV-Absorptionskurven von OxBu und OxHex bei 275 nm detektiert und so die Sensitivität der Methode etwas erhöht. In aktuellen Arbeiten wurden Guanin, Guanosin sowie dessen 3 Phosphatformen mit dieser Methode detektiert, dies unterstreicht die Anwendbarkeit der Methode zur Detektion der Guanosin-analogen Phosphonate OxBu und OxHex sowie deren voraussichtlichen phosphorylierten Metaboliten. Die Bestimmungsgrenze ist mit 6×10^{-7} M (OxBu 0,262 µg/ml; OxHex 0,278 µg/ml) noch nicht zufriedenstellend und sollte – eventuell durch eine empfindlichere Detektionsmethode – verringert werden (s.u.), allerdings konnten auch *Vávrová et al. (2007)* nur bis $3,6 \times 10^{-7}$ M (0,100 µg/ml) Adefovir detektieren.

4.2.3 Analytik des Metabolismus

Wie erwähnt, sind genaue zellkinetische Untersuchungen, ob intrazellulär tatsächlich eine Aktivierung zu den phosphorylierten Metaboliten erfolgt, interessant. Daher sollte im dritten Teil der analytischen Arbeit eine Festphasenextraktion zur Isolierung dieser Metabolite etabliert werden. Dabei muss die stationäre Phase so beschaffen sein, dass die zu isolierenden Komponenten der flüssigen Phase zunächst gebunden werden, später aber von dieser eluierbar sind (*Hennion, 1999*). Erste Tests erfolgten an SCC25 Zellen, da diese eine höhere Stoffwechselaktivität aufweisen und demnach die Modellsubstanzen Thymidin und Guanosin stärker phosphorylieren als weniger teilungsaktive Zellen und so die Isolierung und Detektion einfacher als bei NHK gelingen könnte. Für den Aufschluss der Zellen wurden zunächst drei Verfahren gewählt (Kapitel 2.2.6). Die methanolische Extraktion (III) wird in der Literatur am häufigsten beschrieben (*Slusher et al., 1992; Solas et al., 1998; Claire, 2000; Rodriguez et al., 2000b; Gourdeau et al., 2001*) – die Zellpellets werden meist über Nacht mit Methanol (60 %) bei -70 °C bis -80 °C extrahiert. Der Zellaufschluss mit Lyse-Puffer (I) wurde in

Anlehnung an Verfahren zur Extraktion von DNA bzw. RNA zusammengestellt (*Richartz, 2007*) und erschien als nützliches Reagenz, die Zellsubstanz zu solubilisieren, die Proteine zu denaturieren (durch SDS) und durch anschließendes Zentrifugieren abzutrennen. Mit dieser Aufschlussmethode wurden die besten Ergebnisse erzielt. Als drittes Agens zum Zellaufschluss diente Trypsin-EDTA-Reagenz (II), welches Peptidbindungen spaltet. Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurde die Festphasenextraktion mit 2 Säulentypen durchgeführt – sowohl mit unpolaren Säulen (Bond Elut C18, C8, C2), als auch mit Anionenaustauschersäulen (Certify II, SPEC NH₂). Für die anschließende Detektion der Analyten konnte auf die HPLC-Methode der Phosphattrennung mit TBA-Cl zurückgegriffen werden. Die Extraktion an unpolaren Säulen durch Rückhaltung des lipophilen Phosphat-TBA-Assoziats (*Claire, 2000*) wird in der Literatur seltener beschrieben als die Extraktion an Anionenaustauschersäulen, bei denen das Phosphat-Anion selbst zurückgehalten wird (*Slusher et al., 1992; Solas et al., 1998; Rodriguez et al., 2000b*). Es zeigte sich, dass die Festphasenextraktion an unpolaren Säulen weniger geeignet war. Die C8- und C2-Säulen sind wahrscheinlich nicht lipophil genug, um die Phosphat-TBA-Assoziate zurückzuhalten, da mit diesen Säulen kaum verwertbare Ergebnisse erhalten wurden. Die C18-Säule erschien etwas geeigneter, lieferte jedoch auch keine reproduzierbaren Ergebnisse. Problematisch ist zudem die Elution von unpolarem Zellmaterial anderer Art, das möglicherweise die Analyten überdeckt. Bessere Resultate konnte mit den Anionenaustauschersäulen, speziell mit der stärkeren Säule Certify II, erreicht werden (Abb. 3-25). Offenbar werden hier die Analyten stark im Säulenbett zurückgehalten und ungeladene Begleitstoffe ausgewaschen. Thymidin könnte als ungeladenes Molekül bereits im Waschschrift verloren gehen, die Ergebnisse zeigten aber, dass auch Thymidin in der Elutionsfraktion nachweisbar war. Kritisch und eventuell der Grund für die bislang ungenügende Reproduzierbarkeit der Versuche ist die Elution – das Elutionsmittel muss die Analyten stärker binden als die Anionenaustauschersäule. Die Untersuchungen ergaben, dass in den mit Thymidin und Guanosin inkubierten Zellen vor allem dTMP und GMP gebildet wurden (Abb. 3-25).

Zur Berechnung der Wiederfindungsrate der Substanzen wurde das überstehende Medium vor der Extraktion direkt mittels HPLC analysiert. Dabei wurden hauptsächlich Thymidin (mittlere RT 7,89 min; Abb. 3-24 A) und Guanosin (mittlere RT 8,56 min) detektiert. Eine Aussage über die in die Zelle aufgenommene Menge der Modellsubstanzen war nicht möglich, da die Peakflächen von Probe zu Probe stark schwankten und zudem in einigen Versuchen ein starker Abbau zu Thymin bzw. Guanin eintrat (Abb. 3-24 B). Dieser Abbau trat nur sporadisch auf, daher muss die hohe Temperatur (37 °C) während der 24-stündigen

Inkubation als alleinige Ursache bezweifelt werden. Leider ist es im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens noch nicht gelungen, eine geeignete und vor allem reproduzierbare Methode für die Festphasenextraktion zu etablieren.

4.2.4 Ausblick – Weiterentwicklung der Analytik

HPLC. Die favorisierte TBA-Cl-Methode zur Phosphonat-Analytik wird mit einer neuen, reineren Charge von OxBu und OxHex und mit Adefovir als internem Standard verfeinert und validiert. Sobald die Diphosphatformen dieser Substanzen vorliegen, sollte die Anwendbarkeit der Methode auf deren Detektion geprüft und diese Triphosphat-Analoga in den Validierungsprozess einbezogen werden. Weiterhin sind umfangreiche Stabilitätstests mit den Muttersubstanzen sowie deren nanopartikulären Zubereitungen erforderlich. Die Charakterisierung der SLN hinsichtlich Stabilität und Wirkstoffbeladung kann auch mit Hilfe der Parelektrischen Spektroskopie (PS) erfolgen (s.u., *Blaschke et al., 2007*). Nach Filtration der Partikeldispersionen können der freie Wirkstoffanteil im Dispersionsmittel mittels HPLC sowie die Beladungskapazität der SLN mittels PS bestimmt werden. Mit der validierten HPLC-Methode sollen zukünftig die Proben aus den erwähnten pharmakokinetischen Untersuchungen an 2D-Kulturen und 3D-Hautmodellen analysiert und die Dosen der Testmaterialien der toxikologischen Prüfung verifiziert werden.

Da die Sensivität der HPLC-Methode eventuell nicht ausreichend ist, sollten Möglichkeiten einer verbesserten Detektion verfolgt werden. Zahlreiche Methoden favorisieren eine Anionenaustauschersäule zur Analytik von Nukleosiden und deren phosphorylierten Metaboliten und erzielen damit Bestimmungsgrenzen im subnanomolaren bis picomolaren Bereich, wobei mit UV- oder radioaktiver Detektion gearbeitet wird (*Darque et al., 1999; Rana & Dudley, 1999; Rodriguez et al., 2000a*). Ausserdem kann eine Massenspektrometrie die Detektion bis in den (sub)picomolaren Bereich erweitern (*Claire, 2000; Rodriguez et al., 2000b*).

Festphasenextraktion. Zur Verbesserung dieser analytischen Methode sollten vor allem weitere Möglichkeiten des Zellaufschlusses geprüft werden, um sicherzustellen, dass die in der Zelle gebildeten Metabolite quantitativ in Lösung gehen und so der Festphasenextraktion zugänglich sind. Möglich wäre die Zellyse mit hypotonischen Puffern, die Membranpermeabilisierung mit Ethanol, Lysolecithin oder nichtionischen Detergentien (Triton-X oder Tween 20) sowie die mechanische Zerstörung der Zellen mit flüssigem Stickstoff. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich eine an den Zellaufschluss

anschließende Proteinfällung (z.B. mit Chloroform und Methanol; mit Trichlor- oder Trifluoressigsäure; *Sentenac et al., 2003*) als förderlich erweist. *Gourdeau et al., (2001)* verzichten ganz auf eine Festphasenextraktion – nach methanolischer Extraktion werden die Zellsuspensionen zentrifugiert, zur Trockne einrotiert, der Rückstand in Wasser gelöst und direkt mittels HPLC analysiert. Möglicherweise ist diese Verfahrensweise robuster, problematisch ist eine potentielle Überlagerung der Analyten. Die Festphasenextraktion könnte nicht nur eine nützliche Methode für zellkinetischen Untersuchungen zum Metabolismus sein, sondern auch für spätere Untersuchungen von Blut, Plasma und Urin eingesetzt werden (*Solas et al., 1998; Claire, 2000; Rodriguez et al., 2000b; Sentenac et al., 2003; Rezk et al., 2005*).

Analytik zur Differenzierung von gesunder Haut und Hauttumor. Im Hinblick einer frühzeitigen Erkennung hyperproliferativer Hautveränderungen ist eine nicht-invasive Diagnostik wünschenswert. Einen vielversprechenden Ansatz stellt die Parelektrische Spektroskopie (PS) dar. Die PS ist zur Charakterisierung der Wirkstoff-Partikel-Interaktionen bereits etabliert (*Blaschke et al., 2007; Braem et al., 2007*). Eine Differenzierung von gesunder Haut und Tumorgewebe sollte möglich sein, da sich die Dipoldichten und -beweglichkeiten verschiedener Organe unterscheiden (*Mahlstedt et al., 2002; Blaschke et al., 2006*). Tumorhaut ist mittels PS statistisch signifikant von gesunder Haut abgrenzbar; auf diese Weise konnte das Tumorwachstum verfolgt werden (*Blaschke et al., to be submitted*).

5 ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Inzidenz von hellem Hautkrebs hat in den letzten Jahrzehnten, auch aufgrund zu hoher UV-Licht-Exposition, stark zugenommen. Die derzeitigen topischen Therapieoptionen sind entweder schmerzhaft – wie mit 5-FU und der photodynamischen Therapie und/oder weisen unzureichende Heilungsraten auf – wie mit 5-FU und Diclofenac-Hyaluronsäure-Gel. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, einen neuen therapeutischen Ansatz – die Interferenz mit der DNA-Synthese – für eine verbesserte topische Therapie der Aktinischen Keratose, des Plattenepithelkarzinoms und des Basalioms zu entwickeln.

Die Pol α ist ein vielversprechendes Target, da sie die ersten Schritte der DNA Replikation katalysiert und mit einer Primase-Funktion assoziiert ist. Die 3-dimensionale Struktur des aktiven Zentrums der humanen Pol α konnte mittels Molecular Modelling konstruiert und eine Reihe bekannter Pol- α -Inhibitoren in das aktive Zentrum gedockt werden. Gemäß diesen Molecular-Modelling-Berechnungen wurden die neuen nukleosidischen Verbindungen HM-1-Oxim und isoHex-OH sowie die neuartigen Nukleotid-Analoga OxBu, OxIsohex, OxHex und deren Diethylester OxBu-DE und OxHex-DE identifiziert, synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit mittels in-vitro-Zelltests pharmakologisch gescreent, wobei 5-FU, der Pol- α - und - δ -Hemmer Aphidicolin sowie die bereits gemodellten und getesteten Substanzen HM-1 und BuP-OH als Referenzen gewählt wurden.

Mit HM-1-Oxim und isoHex-OH gelang es weder, den derzeitigen Standard der topischen Therapie – 5-FU – in seiner Wirkung zu übertreffen, noch Tumorzellen selektiv anzugreifen. Auch eine Costimulation mit 5-FU erbrachte keine Verbesserung.

Die Derivatisierung zum Phosphonat an der endständigen 5'-OH-Gruppe des Zuckeranalogen Molekülteils führte zu den besser aktivierbaren Monophosphat-Analoga OxBu, OxIsohex und OxHex. Untersuchungen an normalen humanen Keratinozyten und an der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC25 ergaben eine deutliche Tumorselektivität, wobei OxBu und OxHex SCC25 Zellen schon im nanomolaren Bereich angriffen. Damit sind diese Phosphonate 1000- bzw. 10000-fach aktiver als die Vergleichssubstanzen Aphidicolin und 5-FU bzw. BuP-OH. Damit wurde das Ziel, die Wirksamkeit von 5-FU und BuP-OH zu übertreffen, erreicht und zudem tumorselektive Substanzen generiert. Nachteilig war die Hemmung normaler humaner Fibroblasten – durch OxHex bereits in nanomolaren Konzentrationen (-lg IC₅₀ ca. 8), vorausgesetzt die Phosphonate penetrieren in relevanten Mengen in die Dermis. Trotz allem scheint OxHex aufgrund seiner stärkeren Zytotoxizität der bessere Kandidat für eine Therapie des hellen Hautkrebses zu sein.

Die Resultate der pharmakologischen Untersuchungen stimmten gut mit den Voraussagen des Molecular Modelling überein, was allerdings nicht bei den iso-Hexyl-Derivaten der Fall war, deren nicht-lineare Seitenkette eventuell erschwert in das aktive Zentrum der Pol α eintritt. Aufgrund ihrer großen Zytotoxizität gegenüber Plattenepithelkarzinomzellen wurden die Testsubstanzen OxBu und OxHex zusätzlich an den Tumorzelllinien HT29, MCF7, T24 und SISO untersucht und wirkten auch an diesen zuverlässig. Die Zytotoxizität von OxBu übertraf sogar die an SCC25 Zellen. Ferner wurden die Diethylester (DE) von OxBu und OxHex an SCC25 Zellen und NHK auf Zytotoxizität geprüft, weil die erhöhte Lipophilie nicht nur die Beladung von Nanopartikeln vereinfachen, sondern auch zu einer verstärkten Aufnahme in die Targetzellen führen könnte, in welchen nach enzymatischer Esterspaltung die Muttersubstanzen freigesetzt werden. OxBu-DE und OxHex-DE zeigten allerdings ein schlechteres Wirkprofil als die Muttersubstanzen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten eine analytische Detektionsmethode (HPLC) für die Pol- α -Hemmer und deren voraussichtliche Metaboliten entwickelt sowie eine Festphasenextraktionsmethode zur Isolierung dieser Metaboliten etabliert werden. Eine HPLC-Trennung der Modell-Nukleoside Thymidin und Guanosin inklusive deren DNA Basen und Nukleotide gelang mit Basislinientrennung und Detektion im nanomolaren Bereich. Mit dieser Methode ließen sich auch die Testsubstanzen BuP-OH, HM-1, HM-1-Oxim sowie die Nukleosid-Analoga Zalcitabin, Capecitabin, 5-FU und Aciclovir detektieren. Für die Phosphonate OxBu und OxHex konnte eine HPLC-Methode mit Adefovir als internem Standard erarbeitet werden, mit welcher auch die Detektion der (bisher noch nicht synthetisierten) Diphosphate der Testsubstanzen möglich scheint.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit die Phosphonate OxBu und OxHex aufgrund ihrer starken Zytotoxizität und Selektivität gegenüber Plattenepithelkarzinomzellen als potentielle Wirkstoffe für die topische Therapie des hellen Hautkrebses identifiziert sowie eine HPLC-Analytik für diese Substanzen entwickelt.

SUMMARY

Due to an increased UV exposure, the number of patients with actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma has increased dramatically. Current therapy of actinic keratosis is either painful as with 5-fluorouracil (5-FU) and photodynamic therapy and/or cure rates are not totally satisfying as with 5-FU and diclofenac/hyaluronic acid. Therefore the aim of this study was an alternative approach like interference with DNA synthesis.

The human DNA polymerase α catalyzes the very first steps in DNA replication and is tightly associated with a primase. Therefore, it is an interesting target. Recently, the three-dimensional structure of the active site of human DNA polymerase α was proposed based on the application of molecular modelling methods and molecular dynamic simulations. The modelled structure of the enzyme was used for docking several known inhibitors in its active site. Based on molecular modelling novel nucleosides as HM-1-oxime and isoHex-OH as well as the nucleotide analogs OxBu and OxHex and their diethylester prodrugs were identified, synthesized and subjected to an in-vitro-screening comparing the results to the reference compounds 5-FU, aphidicolin – a well-known polymerase α and δ inhibitor – and to the already modelled and tested compounds HM-1 and BuP-OH.

Neither HM-1-oxime nor isoHex-OH surmounted the effects of 5-FU – the current standard for topical therapy of actinic keratosis. Moreover, no selectivity for tumor cells was observed. Costimulating the cells with 5-FU and the indicated agents did not improve the outcome either.

Next, the phosphonate derivatives OxBu, OxIsohex and OxHex, containing a metabolically stable P-C bond, were developed in order to circumvent the initial activation step. Cytotoxicity testing in normal human keratinocytes (NHK) and SCC25 cells showed a distinct selectivity of the phosphonates for tumor cells. OxBu and OxHex affected SCC25 cells even in the nanomolecular range. Referring to the IC_{50} values, OxBu and OxHex exceeded the activity of 5-FU and aphidicolin about 1000fold, BuP-OH was outranged about 10.000fold. Summing up, the aim of exceeding the effects of 5-FU and BuP-OH was achieved. Additionally, the lack of tumor selectivity has been overcome. OxHex, however, decreased the viability of normal human fibroblasts already at nanomolecular concentrations, too, whereas OxBu acts only at high concentration. Therefore, OxHex might be more toxic as compared to OxBu, if the substance penetrates into the dermis at a relevant amount. Nevertheless, OxHex appeared to be the most promising candidate for an improved skin cancer therapy.

These findings are well in accordance with the predictions made with the 3D-model except the iso-hexyl derivatives which were less active than predicted by molecular modelling, possibly due to a hindered access of the non-linear side chain to the active site of the enzyme. Due to their great potential as antitumor agents for actinic keratosis and squamous cell carcinoma OxBu and OxHex were tested in other tumor cell lines like HT29, MCF7, T24 and SISO cells, too. In fact, the phosphonates once more suppressed the viability of these tumor cell lines very efficiently. The cytotoxicity of OxBu often even surmounted the effects seen in SCC25 cells. Since normal human keratinocytes produce great amounts of esterases the ability to affect NHK and SCC25 cells was investigated with the respective diethylesters of OxBu and OxHex, too. The higher lipophilicity may favour penetration of the target cell as well as skin penetration when applied topically. Unexpectedly, the activity of the phosphonate diethylesters was less favourable as compared to the activity of OxBu and OxHex.

Secondly, an analytical method (HPLC) ought to be investigated to detect the pol α inhibitors and their expected metabolites. Additionally, a solid phase extraction method ought to be established to extract these metabolites from the cells.

An HPLC method was developed analysing the model compounds thymidine and guanosine including their respective DNA bases and nucleotides. Baseline separation and detection in the nanomolecular range was achieved. This method was applicable to the test compounds BuP-OH, HM-1, HM-1-oxime as well as to the nucleotide analogs zalcitabine, capecitabine, 5-FU and acyclovir. Aiming the detection of OxBu and OxHex likewise, an HPLC method using adefovir as internal standard was established. This method seems to be applicable for future detection of the potential phosphorylated metabolites of OxBu and OxHex.

In conclusion, within the present study the phosphonates OxBu and OxHex were identified as active agents concerning improved topical skin cancer therapy due to their great cytotoxicity and selectivity for squamous cell carcinoma cells. Moreover, the respective analytical method was investigated.

6 LITERATUR

6 LITERATUR

- Adams, P. D., and Kaelin, W. G., Jr. (1996). The cellular effects of E2F overexpression. *Curr Top Microbiol Immunol* **208**, 79-93.
- Alba, M. (2001). Replicative DNA polymerases. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3002.
- Alnouti, Y., White, C. A., and Bartlett, M. G. (2004). Simultaneous determination of zidovudine and lamivudine from rat plasma, amniotic fluid and tissues by HPLC. *Biomed Chromatogr* **18**, 641-647.
- Andersson, K., Waterboer, T., Kirnbauer, R., Slupetzky, K., Iftner, T., de Villiers, E. M., Forslund, O., Pawlita, M., and Dillner, J. (2008). Seroreactivity to cutaneous human papillomaviruses among patients with nonmelanoma skin cancer or benign skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 189-195.
- Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L. et al. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* **72**, 1117-1130.
- Anwar, J., Wrone, D. A., Kimyai-Asadi, A., and Alam, M. (2004). The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol* **22**, 189-196.
- Azanza, J. R., Garcia Quetglas, E., Sadaba, B., and Gomez-Giu, A. (2008). [Tenofovir: pharmacology and interactions]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26 Suppl 8**, 2-6.
- Balasubramanian, S., Kim, K. H., Ahmad, N., and Mukhtar, H. (1999). Activation of telomerase and its association with G1-phase of the cell cycle during UVB-induced skin tumorigenesis in SKH-1 hairless mouse. *Oncogene* **18**, 1297-1302.
- Baron, J. M., Holler, D., Schiffer, R., Frankenberg, S., Neis, M., Merk, H. F., and Jugert, F. K. (2001). Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**, 541-548.
- Basha, G., Yap, P., and Penninckx, F. (1996). Comparative study of classical, colorimetric and immunologic staining methods for the assessment of tumor cell viability. *Tumour Biol* **17**, 354-361.
- Bastert, G. (1990). Malignome der Mamma. In *Klinik des Frauenheilkunde und Geburtshilfe* (H. Schmidt-Matthiesen, Ed.). Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
- Beckmann, M. W., Mallmann, P., Prescher, A., und Kopp, I. (2007/2008). Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), S 2-Leitlinie. In *AWMF online*. <http://awmf.org>
- Blaschke, T., Kankate, L., and Kramer, K. D. (2007). Structure and dynamics of drug-carrier systems as studied by paelectric spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 403-410.
- Blaschke, T., Schwanke, A., Emmendorffer, A., Schäfer-Korting, M., Korting, H. C., and Kramer, K. D. (to be submitted). Tracking Tumor Growth in a 3-D Skin-Model Using Paelectric Spectroscopy.
- Blaschke, T., Sivaramakrishnan, R., Gross, M., and Kramer, K. D. (2006). Organ mapping using paelectric spectroscopy. *Phys Med Biol* **51**, 1623-1631.
- Borst, P., and Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**, 537-592.
- Boucher, P. D., Im, M. M., Freytag, S. O., and Shewach, D. S. (2006). A novel mechanism of synergistic cytotoxicity with 5-fluorocytosine and ganciclovir in double suicide gene therapy. *Cancer Res* **66**, 3230-3237.

- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**, 761-771.
- Boukamp, P., Popp, S., Altmeyer, S., Hulsen, A., Fasching, C., Cremer, T., and Fusenig, N. E. (1997). Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer* **19**, 201-214.
- Boukamp, P., Popp, S., Bleuel, K., Tomakidi, E., Burkle, A., and Fusenig, N. E. (1999). Tumorigenic conversion of immortal human skin keratinocytes (HaCaT) by elevated temperature. *Oncogene* **18**, 5638-5645.
- Braem, C., Blaschke, T., Panek-Minkin, G., Herrmann, W., Schlupp, P., Paepenmuller, T., Muller-Goyman, C., Mehnert, W., Bittl, R., Schafer-Korting, M., and Kramer, K. D. (2007). Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by piezoelectric spectroscopy and electron spin resonance. *J Control Release* **119**, 128-135.
- Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J., and Ponten, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10124-10128.
- Buckman, S. Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., and Pentland, A. P. (1998). COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* **19**, 723-729.
- Bucknall, R. A., Moores, H., Simms, R., and Hesp, B. (1973). Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*. *Antimicrob Agents Chemother* **4**, 294-298.
- Budach, V. G., Geismar, D., and Lammert, I. (2003). Accelerated hyperfractionated radiation therapy to 70.6 Gy plus 5-FU/MMC (C-HART) is more effective than HART to 77.6 Gy alone for locally advanced head and neck cancer. Four-year results of the German ARO 95-6 trial in 384 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**, Suppl, 153-154.
- Budiyanto, A., Bito, T., Kunisada, M., Ashida, M., Ichihashi, M., and Ueda, M. (2003). Inhibition of the epidermal growth factor receptor suppresses telomerase activity in HSC-1 human cutaneous squamous cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol* **121**, 1088-1094.
- Bulk, S., Berkhof, J., Bulkman, N. W., Zielinski, G. D., Rozendaal, L., van Kemenade, F. J., Snijders, P. J., and Meijer, C. J. (2006). Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. *Br J Cancer* **94**, 171-175.
- Burren, R., Scaletta, C., Frenk, E., Panizzon, R. G., and Applegate, L. A. (1998). Sunlight and carcinogenesis: expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations. *Int J Cancer* **76**, 201-206.
- Chang, Z. F., Huang, D. Y., and Lai, T. C. (1995). Different regulation of the human thymidine kinase promoter in normal human diploid IMR-90 fibroblasts and HeLa cells. *J Biol Chem* **270**, 27374-27379.
- Chen, X. L., Liu, L. C., Xu, Z. G., Li, Z., Li, R. W., Gao, R. J., Wang, S., Zhang, M., and Guo, H. (2008). [Inhibition of bladder cancer cell growth and angiogenesis by co-blockage of vascular endothelial growth factor and its receptor kdr]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **30**, 578-582.
- Ciccolini, J., Cuq, P., Evrard, A., Giacometti, S., Pelegrin, A., Aubert, C., Cano, J. P., and Iliadis, A. (2001). Combination of thymidine phosphorylase gene transfer and deoxyinosine treatment greatly enhances 5-fluorouracil antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **1**, 133-139.

- Ciccolini, J., Peillard, L., Evrard, A., Cuq, P., Aubert, C., Pelegrin, A., Formento, P., Milano, G., and Catalin, J. (2000). Enhanced antitumor activity of 5-fluorouracil in combination with 2'-deoxyinosine in human colorectal cell lines and human colon tumor xenografts. *Clin Cancer Res* **6**, 1529-1535.
- Cinatl, J., Jr., Cinatl, J., Kotchetkov, R., Driever, P. H., Bertels, S., Siems, K., Jas, G., Bindseil, K., Rabenau, H. F., Pouckova, P., Doerr, H. W., and Schwabe, D. (1999). Aphidicolin glycinate inhibits human neuroblastoma cell growth in vivo. *Oncol Rep* **6**, 563-568.
- Cinatl, J., Mainke, M., Weissflog, A., Steigmann, G., Rabenau, H., Doerr, H. W., and Kornhuber, B. (1992). Aphidicolin selectively kills neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett* **67**, 199-206.
- Claire, R. L., 3rd (2000). Positive ion electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled to ion-pairing high-performance liquid chromatography with a phosphate buffer for the quantitative analysis of intracellular nucleotides. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**, 1625-1634.
- Cleaver, J. E. (2000). Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of xeroderma pigmentosum. *J Dermatol Sci* **23**, 1-11.
- Cleaver, J. E. (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* **5**, 564-573.
- Copeland, W. C., and Wang, T. S. (1991). Catalytic subunit of human DNA polymerase alpha overproduced from baculovirus-infected insect cells. Structural and enzymological characterization. *J Biol Chem* **266**, 22739-22748.
- Copeland, W. C., and Wang, T. S. (1993). Mutational analysis of the human DNA polymerase alpha. The most conserved region in alpha-like DNA polymerases is involved in metal-specific catalysis. *J Biol Chem* **268**, 11028-11040.
- Cory, S., Vaux, D. L., Strasser, A., Harris, A. W., and Adams, J. M. (1999). Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* **59**, 1685s-1692s.
- Cozzani, E., Cacciapuoti, M., Parodi, A., Ghohestani, R., and Rebora, A. (2000). Desmosomes and their autoimmune pathologies. *Eur J Dermatol* **10**, 255-261.
- Damia, G., Tagliabue, G., Zucchetti, M., Davoli, E., Sessa, C., Cavalli, F., and D'Incalci, M. (1992). Activity of aphidicolin glycinate alone or in combination with cisplatin in a murine ovarian tumor resistant to cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* **30**, 459-464.
- Daniel, P. T. (2003). Zellzyklus und Apoptose. In *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien* (D. Ganten, and K. Ruckpaul, Eds.), pp. 130-174. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Darque, A., Valette, G., Rousseau, F., Wang, L. H., Sommadossi, J. P., and Zhou, X. J. (1999). Quantitation of intracellular triphosphate of emtricitabine in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2245-2250.
- Davey, H. M., and Kell, D. B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev* **60**, 641-696.
- Decosterd, L. A., Cottin, E., Chen, X., Lejeune, F., Mirimanoff, R. O., Biollaz, J., and Coucke, P. A. (1999). Simultaneous determination of deoxyribonucleoside in the presence of ribonucleoside triphosphates in human carcinoma cells by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **270**, 59-68.
- D'Errico, M., Lemma, T., Calcagnile, A., Proietti De Santis, L., and Dogliotti, E. (2007). Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutat Res* **614**, 37-47.

- Dianzani, C., Pierangeli, A., Chiricozzi, A., Avola, A., and Degener, A. M. (2008). Cutaneous human papillomaviruses as recurrence factor in actinic keratoses. *Int J Immunopathol Pharmacol* **21**, 145-152.
- Ding, Y., Williamson, L. N., White, C. A., and Bartlett, M. G. (2004). Determination of 2',3'-dideoxycytidine in maternal plasma, amniotic fluid, placental and fetal tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **811**, 183-189.
- Domarus, H., and Stevens, P. J. (1984). Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases and review of 170 cases in the literature. *J Am Acad Dermatol* **10(6)**, 1043-1060.
- Eckert, R. L., Yaffe, M. B., Crish, J. F., Murthy, S., Rorke, E. A., and Welter, J. F. (1993). Involucrin--structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol* **100**, 613-617.
- Edelson, R. E., Gorycki, P. D., and MacDonald, T. L. (1990). The mechanism of aphidicolin bioinactivation by rat liver in vitro systems. *Xenobiotica* **20**, 273-287.
- Epstein, E. (1998). Does intermittent "pulse" topical 5-fluorouracil therapy allow destruction of actinic keratoses without significant inflammation? *J Am Acad Dermatol* **38**, 77-80.
- Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K., and Eklund, H. (2002). Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1327-1346.
- Ernst-Stecken, A., Grabenbauer, G., Iro, H., Plasswilm, L., and Sauer, R. (2004). Phase II trial of hyperfractionated accelerated split-course radiochemotherapy with 5-FU and Cis-DDP in advanced head and neck cancer: results and toxicity. *Strahlenther Onkol* **180**, 805-810.
- Eubanks, S. W., Gentry, R. H., Patterson, J. W., and May, D. L. (1982). Treatment of multiple keratoacanthomas with intralesional fluorouracil. *J Am Acad Dermatol* **7**, 126-129.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119-128.
- Fan, B., and Stewart, J. T. (2002). Determination of lamivudine/didanosine/nevirapine in human serum using capillary zone electrophoresis. *J Capill Electrophor Microchip Technol* **7**, 103-106.
- Fanciullino, R., Evrard, A., Cuq, P., Giacometti, S., Peillard, L., Mercier, C., Aubert, C., Milano, G., and Ciccolini, J. (2006). Genetic and biochemical modulation of 5-fluorouracil through the overexpression of thymidine kinase: an in-vitro study. *Anticancer Drugs* **17**, 463-470.
- Fietkau, R., Iro, H., Grabenbauer, G. G., Altendorf-Hofmann, A., and Sauer, R. (1991). [Simultaneous radiotherapy and chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil in advanced head and neck tumors]. *Strahlenther Onkol* **167**, 693-700.
- Fietkau, R., und Klautke, G. (2005). Möglichkeiten und Entwicklungen der neoadjuvanten und adjuvanten Therapie des Rektumkarzinoms. *Chir Gastroenterol* **21**, 119-129.
- Filée, J., Forterre, P., Sen-Lin, T., and Laurent, J. (2002). Evolution of DNA polymerase families: evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *J Mol Evol* **54**, 763-773.
- Flis, S., and Splwinski, J. (2009). Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Res* **29**, 435-441.
- Focher, F., and Spadari, S. (2001). Thymidine phosphorylase: a two-face Janus in anticancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* **1**, 141-153.
- Fountzilas, G., Tolis, C., Kalogera-Fountzila, A., Karanikiotis, C., Bai, M., Misailidou, D., Samantas, E. et al. (2005). Induction chemotherapy with cisplatin, epirubicin, and paclitaxel (CEP), followed by concomitant radiotherapy and weekly paclitaxel for the management of locally advanced nasopharyngeal carcinoma. A Hellenic Cooperative Oncology Group phase II study. *Strahlenther Onkol* **181**, 223-230.

- Franklin, M. C., Wang, J., and Steitz, T. A. (2001). Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* **105**, 657-667.
- Fusenig, N. E., and Boukamp, P. (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* **23**, 144-158.
- Galmarini, C. M., Clarke, M. L., Jordheim, L., Santos, C. L., Cros, E., Mackey, J. R., and Dumontet, C. (2004). Resistance to gemcitabine in a human follicular lymphoma cell line is due to partial deletion of the deoxycytidine kinase gene. *BMC Pharmacol* **4**, 8.
- Gandhi, V., Huang, P., Chapman, A. J., Chen, F., and Plunkett, W. (1997). Incorporation of fludarabine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphates by DNA polymerase alpha: affinity, interaction, and consequences. *Clin Cancer Res* **3**, 1347-1355.
- Garbe, C. (2005). Plattenepithelkarzinom der Haut, der Lippen und der Augenlider, in Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. In *AWMF online*. <http://awmf.org>
- Garden, A. S., Harris, J., Vokes, E. E., Forastiere, A. A., Ridge, J. A., Jones, C., Horwitz, E. M., Glisson, B. S., Nabell, L., Cooper, J. S., Demas, W., and Gore, E. (2004). Preliminary results of Radiation Therapy Oncology Group 97-03: a randomized phase ii trial of concurrent radiation and chemotherapy for advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* **22**, 2856-2864.
- Glogau, R. G. (2000). The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol* **42**, 23-24.
- Goette, D. K., and Odom, R. B. (1980). Successful treatment of keratoacanthoma with intralesional fluorouracil. *J Am Acad Dermatol* **2**, 212-216.
- Gourdeau, H., Clarke, M. L., Ouellet, F., Mowles, D., Selner, M., Richard, A., Lee, N., Mackey, J. R., Young, J. D., Jolivet, J., Lafreniere, R. G., and Cass, C. E. (2001). Mechanisms of uptake and resistance to troxacitabine, a novel deoxycytidine nucleoside analogue, in human leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res* **61**, 7217-7224.
- Gupta, A. K., Davey, V., and McPhail, H. (2005). Evaluation of the effectiveness of imiquimod and 5-fluorouracil for the treatment of actinic keratosis: Critical review and meta-analysis of efficacy studies. *J Cutan Med Surg* **9**, 209-214.
- Gysler, A., Kleuser, B., Sippl, W., Lange, K., Korting, H. C., and Holtje, H. D. (1999). Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin. *Pharm Res* **16**, 1386-1391.
- Gysler, A., Lange, K., Korting, H. C., and Schafer-Korting, M. (1997). Prednicarbate biotransformation in human foreskin keratinocytes and fibroblasts. *Pharm Res* **14**, 793-797.
- Haberland, A., Schreiber, S., Maia, C. S., Rubbelke, M. K., Schaller, M., Korting, H. C., Kleuser, B., Schimke, I., and Schafer-Korting, M. (2006). The impact of skin viability on drug metabolism and permeation -- BSA toxicity on primary keratinocytes. *Toxicol In Vitro* **20**, 347-354.
- Haraguchi, T., Oguro, M., Nagano, H., Ichihara, A., and Sakamura, S. (1983). Specific inhibitors of eukaryotic DNA synthesis and DNA polymerase alpha, 3-deoxyaphidicolin and aphidicolin-17-monoacetate. *Nucleic Acids Res* **11**, 1197-1209.
- Hatina, J., Huckenbeck, W., Rieder, H., Seifert, H. H., and Schulz, W. A. (2008). [Bladder carcinoma cell lines as models of the pathobiology of bladder cancer. Review of the literature and establishment of a new progression series]. *Urologe A* **47**, 724-734.
- Hennion, M. C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A* **856**, 3-54.

- Higashi, Y., Kanekura, T., and Kanzaki, T. (2000). Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer* **86**, 667-671.
- Höller, D., Huppertz, B., Roos, T. C., Poblete Gutierrez, P., Merk, H. F., Frank, J., and Jugert, F. K. (2001). An improved and rapid method to construct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts. *Exp Dermatol* **10**, 264-271.
- Höller Obrigkeit, D., Jugert, F. K., Beermann, T., Baron, J. M., Frank, J., Merk, H. F., Bickers, D. R., and Abuzahra, F. (2009). Effects of photodynamic therapy evaluated in a novel three-dimensional squamous cell carcinoma organ construct of the skin. *Photochem Photobiol* **85**, 272-278.
- Höltje, M., Richartz, A., Zdrzil, B., Schwanke, A., Dugovic, B., Murruzzu, C., Reißig, H.-U., Korting, H. C., Kleuser, B., H.-D., H., and Schäfer-Korting, M. (submitted, under review). Human Polymerase alpha Inhibitors for Skin Tumors. Part 2. Modelling, Synthesis and Influence on Normal and Transformed Keratinocytes of New Thymidine and Purine Derivatives. *J Enzym Inhib Med Chem*.
- Hornstein, O. P., und Nürnberg, E. (1985). Die Haut als Aufnahme- und Wirkungsort der externen Therapie. In *Externe Therapie von Hautkrankheiten*. Thieme, Stuttgart.
- Hu, V. W., Black, G. E., Torres-Duarte, A., and Abramson, F. P. (2002). 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. *Faseb J* **16**, 1456-1457.
- Hubeek, I., Peters, G. J., Broekhuizen, A. J., Sargent, J., Gibson, B. E., Creutzig, U., and Kaspers, G. J. (2005). Potentiation of in vitro ara-C cytotoxicity by ribonucleotide reductase inhibitors, cyclin-dependent kinase modulators and the DNA repair inhibitor aphidicolin in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **131**, 219-222.
- Hübscher, U., Maga, G., and Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**, 133-163.
- Hübscher, U., Nasheuer, H. P., and Syvaaja, J. E. (2000). Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. *Trends Biochem Sci* **25**, 143-147.
- Huland, H., und Friedrich, M. (2006). Harnblasenkarzinom. In *Urologie* (H. Hautmann, and H. Huland, Eds.), pp. 202-212, Heidelberg.
- Hurwitz, R. M., and Monger, L. E. (1995). Solar keratosis: an evolving squamous cell carcinoma. Benign or malignant? *Dermatol Surg* **21**, 184.
- Ibrahim, S. F., and van den Engh, G. (2003). High-speed cell sorting: fundamentals and recent advances. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 5-12.
- Jarvis, C. (2000). Normal Skin Anatomy. In *Physical examination and health assessment, 3rd ed.* (W. B. Saunders), Philadelphia.
- Jenning, V., Gysler, A., Schafer-Korting, M., and Gohla, S. H. (2000). Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur J Pharm Biopharm* **49**, 211-218.
- Jiang, H. Y., Hickey, R. J., Abdel-Aziz, W., and Malkas, L. H. (2000). Effects of gemcitabine and araC on in vitro DNA synthesis mediated by the human breast cell DNA synthesome. *Cancer Chemother Pharmacol* **45**, 320-328.
- Johnson, D. G., and Walker, C. L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 295-312.
- Johnson, M. R., Hageboutros, A., Wang, K., High, L., Smith, J. B., and Diasio, R. B. (1999). Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* **5**, 2006-2011.
- Jordheim, L. P., and Dumontet, C. (2007). Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. *Biochim Biophys Acta* **1776**, 138-159.
- Jordheim, L. P., Guittet, O., Lepoivre, M., Galmarini, C. M., and Dumontet, C. (2005). Increased expression of the large subunit of ribonucleotide reductase is involved in

- resistance to gemcitabine in human mammary adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* **4**, 1268-1276.
- Jorizzo, J., Stewart, D., Bucko, A., Davis, S. A., Espy, P., Hino, P., Rodriguez, D., Savin, R., Stough, D., Furst, K., Connolly, M., and Levy, S. (2002). Randomized trial evaluating a new 0.5% fluorouracil formulation demonstrates efficacy after 1-, 2-, or 4-week treatment in patients with actinic keratosis. *Cutis* **70**, 335-339.
- Jorizzo, J. L. (2004a). Current and novel treatment options for actinic keratosis. *J Cutan Med Surg* **8 Suppl 3**, 13-21.
- Jorizzo, J. L. (2004b). Topical treatment of actinic keratosis with fluorouracil: is irritation associated with efficacy? *J Drugs Dermatol* **3**, 21-26.
- Jorizzo, J. L., Carney, P. S., Ko, W. T., Robins, P., Weinkle, S. H., and Werschler, W. P. (2004c). Fluorouracil 5% and 0.5% creams for the treatment of actinic keratosis: equivalent efficacy with a lower concentration and more convenient dosing schedule. *Cutis* **74**, 18-23.
- Jorizzo, J. L., Carney, P. S., Ko, W. T., Robins, P., Weinkle, S. H., and Werschler, W. P. (2004d). Treatment options in the management of actinic keratosis. *Cutis* **74**, 9-17.
- Jullien, V., Treluyer, J. M., Pons, G., and Rey, E. (2003). Determination of tenofovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **785**, 377-381.
- Jüllig, M., and Eriksson, S. (2000). Mitochondrial and submitochondrial localization of human deoxyguanosine kinase. *Eur J Biochem* **267**, 5466-5472.
- Jüllig, M., and Eriksson, S. (2001). Apoptosis induces efflux of the mitochondrial matrix enzyme deoxyguanosine kinase. *J Biol Chem* **276**, 24000-24004.
- Kainz, C., Tempfer, C., Gitsch, G., Heinzl, H., Reinhaller, A., and Breitenecker, G. (1995). Influence of age and human papillomavirus-infection on reliability of cervical cytopathology. *Arch Gynecol Obstet* **256**, 23-28.
- Kano, E. K., dos Reis Serra, C. H., Koono, E. E., Andrade, S. S., and Porta, V. (2005). Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. *Int J Pharm* **297**, 73-79.
- Keßler, P., Grabenbauer, G., Leher, A., Bloch-Birkholz, A., Vairaktaris, E., Neukam, F. W., and Sauer, R. (2007). [Five year survival of patients with primary oral squamous cell carcinoma. Comparison of two treatment protocols in a prospective study]. *Strahlenther Onkol* **183**, 184-189.
- Khan, N. N., Wright, G. E., and Brown, N. C. (1991). The molecular mechanism of inhibition of alpha-type DNA polymerases by N2-(butylphenyl)dGTP and 2-(butylanilino)dATP: variation in susceptibility to polymerization. *Nucleic Acids Res* **19**, 1627-1632.
- Kießling, P., Scriba, G. K., Suss, F., Werner, G., Knoth, H., and Hartmann, M. (2004). Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay and a capillary electrophoresis assay for the analysis of adenosine and the degradation product adenine in infusions. *J Pharm Biomed Anal* **36**, 535-539.
- Kiyota, N., Tahara, M., Kadowaki, S., Fuse, N., Doi, T., Minami, H., and Ohtsu, A. (2009). Systemic chemotherapy with cisplatin plus 5-FU (PF) for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN): efficacy and safety of a lower dose of PF (80/800) at a single institution in Japan. *Jpn J Clin Oncol* **39**, 225-230.
- Kleban, J., Mikes, J., Horvath, V., Sackova, V., Hofmanova, J., Kozubik, A., and Fedorocko, P. (2008). Mechanisms involved in the cell cycle and apoptosis of HT-29 cells pre-treated with MK-886 prior to photodynamic therapy with hypericin. *J Photochem Photobiol B* **93**, 108-118.

- Klein, M. B., Shaw, D., Barese, S., Chapo, G. A., and Cuono, C. B. (1996). A reliable and cost-effective in vitro assay of skin viability for skin banks and burn centers. *J Burn Care Rehabil* **17**, 565-570.
- Kolinsky, K., Shen, B. Q., Zhang, Y. E., Kohles, J., Dugan, U., Zioncheck, T. F., Heimbrook, D., Packman, K., and Higgins, B. (2009). In vivo activity of novel capecitabine regimens alone and with bevacizumab and oxaliplatin in colorectal cancer xenograft models. *Mol Cancer Ther* **8**, 75-82.
- Kong, W., Engel, K., and Wang, J. (2004). Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab* **5**, 63-84.
- Kornberg, A. (1988). DNA replication. *Biochim Biophys Acta* **951**, 235-239.
- Korting, H., and Schäfer-Korting, M. (in press). Carriers in the Topical Treatment of Skin Disease. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Schäfer-Korting, M; Ed.), Springer, Heidelberg.
- Kovala-Demertzi, D., Papageorgiou, A., Papathanasis, L., Alexandratos, A., Dalezis, P., Miller, J. R., and Demertzis, M. A. (2009). In vitro and in vivo antitumor activity of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones derived from 2-formyl and 2-acetyl pyridine and containing ring incorporated at N(4)-position: synthesis, spectroscopic study and crystal structure of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones, potential anticancer agents. *Eur J Med Chem* **44**, 1296-1302.
- Kreienberg, R., Kopp, I., Lorenz, W., Budach, W., Dunst, J., Lebeau, A., Lück, H.-J., v. Minckwitz, G., Possinger, K., Sauerbrei, W., Sauerland, S., Souchon, R., Thomssen, C., Untch, M., Volm, T., Weis, J., Schmitt-Reißer, B., Koller, M., und Heilmann, V. (2004). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau. *Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e.V.*
- Krüger, K., Blume-Peytavi, U., and Orfanos, C. E. (1999). Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle. *Arch Dermatol Res* **291**, 253-259.
- Küchler, S., Radowski, M. R., Blaschke, T., Dathe, M., Plendl, J., Haag, R., Schafer-Korting, M., and Kramer, K. D. (2009). Nanoparticles for skin penetration enhancement--a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* **71**, 243-250.
- Kuriyama, I., Musumi, K., Yonezawa, Y., Takemura, M., Maeda, N., Iijima, H., Hada, T., Yoshida, H., and Mizushima, Y. (2005). Inhibitory effects of glycolipids fraction from spinach on mammalian DNA polymerase activity and human cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem* **16**, 594-601.
- Lai, L., Xu, Z., Zhou, J., Lee, K. D., and Amidon, G. L. (2008). Molecular basis of prodrug activation by human valacyclovirase, an alpha-amino acid ester hydrolase. *J Biol Chem* **283**, 9318-9327.
- Laposa, R. R., Feeney, L., and Cleaver, J. E. (2003). Recapitulation of the cellular xeroderma pigmentosum-variant phenotypes using short interfering RNA for DNA polymerase H. *Cancer Res* **63**, 3909-3912.
- Lawrence, N., Cox, S. E., Cockerell, C. J., Freeman, R. G., and Cruz, P. D., Jr. (1995). A comparison of the efficacy and safety of Jessner's solution and 35% trichloroacetic acid vs 5% fluorouracil in the treatment of widespread facial actinic keratoses. *Arch Dermatol* **131**, 176-181.
- Lebwohl, M., Dinehart, S., Whiting, D., Lee, P. K., Tawfik, N., Jorizzo, J., Lee, J. H., and Fox, T. L. (2004). Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from two phase III, randomized, double-blind, parallel group, vehicle-controlled trials. *J Am Acad Dermatol* **50**, 714-721.

- Lee, J. L., Mukhtar, H., Bickers, D. R., Kopelovich, L., and Athar, M. (2003). Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**, 294-306.
- Lee, L. S., and Cheng, Y. (1976a). Human deoxythymidine kinase II: substrate specificity and kinetic behavior of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes derived from blast cells of acute myelocytic leukemia. *Biochemistry* **15**, 3686-3690.
- Lee, L. S., and Cheng, Y. C. (1976b). Human deoxythymidine kinase. I. Purification and general properties of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes derived from blast cells of acute myelocytic leukemia. *J Biol Chem* **251**, 2600-2604.
- Lehman, T. A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W. P., Welsh, J. A., Metcalf, R. A., Stampfer, M. R., Fusenig, N., Rogan, E. M., and et al. (1993). p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* **14**, 833-839.
- Levy, S., Furst, K., and Chern, W. (2001). A comparison of the skin permeation of three topical 0.5% fluorouracil formulations with that of a 5% formulation. *Clin Ther* **23**, 901-907.
- Lin, A. W., and Lowe, S. W. (2001). Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5025-5030.
- Liu, R., Pu, D. M., Cheng, Y. X., and Yin, L. (2007a). [Expressions of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in cervical carcinoma and correlation thereof with the invasion and metastasis of the cancerous tissues]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **87**, 1326-1329.
- Liu, R., Pu, D. M., Yin, L., Cheng, M., and Li, T. (2007b). [Correlation of RCAS1 expression to human papillomavirus 16 (HPV16) infection in cervical cancer]. *Ai Zheng* **26**, 633-637.
- Lober, B. A., and Fenske, N. A. (2004). Optimum treatment strategies for actinic keratosis (intraepidermal squamous cell carcinoma). *Am J Clin Dermatol* **5**, 395-401.
- Locatelli, G. A., Savio, M., Forti, L., Shevelev, I., Ramadan, K., Stivala, L. A., Vannini, V., Hubscher, U., Spadari, S., and Maga, G. (2005). Inhibition of mammalian DNA polymerases by resveratrol: mechanism and structural determinants. *Biochem J* **389**, 259-268.
- Löffler, G., und Montenarh, M. (2003). Replikation und Gentechnik. In *Biochemie und Pathobiochemie* (G. Löffler, und P. E. Petrides, Eds.), pp. 209-242. Springer-Verlag, 7. Auflage, Berlin.
- Lombardi Borgia, S., Regehly, M., Sivaramakrishnan, R., Mehnert, W., Korting, H. C., Danker, K., Roder, B., Kramer, K. D., and Schafer-Korting, M. (2005). Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parelectric spectroscopy. *J Control Release* **110**, 151-163.
- Loven, K., Stein, L., Furst, K., and Levy, S. (2002). Evaluation of the efficacy and tolerability of 0.5% fluorouracil cream and 5% fluorouracil cream applied to each side of the face in patients with actinic keratosis. *Clin Ther* **24**, 990-1000.
- Luqmani, Y. A., Al Azmi, A., Al Bader, M., Abraham, G., and El Zawahri, M. (2009). Modification of gene expression induced by siRNA targeting of estrogen receptor alpha in MCF7 human breast cancer cells. *Int J Oncol* **34**, 231-242.
- Mackey, J. R., Mani, R. S., Selner, M., Mowles, D., Young, J. D., Belt, J. A., Crawford, C. R., and Cass, C. E. (1998). Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* **58**, 4349-4357.
- Maeda, N., Kokai, Y., Ohtani, S., Sahara, H., Hada, T., Ishimaru, C., Kuriyama, I., Yonezawa, Y., Iijima, H., Yoshida, H., Sato, N., and Mizushima, Y. (2007a). Anti-

- tumor effects of the glycolipids fraction from spinach which inhibited DNA polymerase activity. *Nutr Cancer* **57**, 216-223.
- Maeda, N., Kokai, Y., Ohtani, S., Sahara, H., Kuriyama, I., Kamisuki, S., Takahashi, S., Sakaguchi, K., Sugawara, F., Yoshida, H., Sato, N., and Mizushima, Y. (2007b). Antitumor effects of dehydroaltenusin, a specific inhibitor of mammalian DNA polymerase alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 390-396.
- Mahlstedt, K., Blaschke, T., Kramer, K. D., and Gross, M. (2002). [Parelectric spectroscopy for noninvasive diagnosis of laryngeal tissue]. *Biomed Tech (Berl)* **47**, 70-75.
- Manggau, M., Kim, D. S., Ruwisch, L., Vogler, R., Korting, H. C., Schafer-Korting, M., and Kleuser, B. (2001). 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate. *J Invest Dermatol* **117**, 1241-1249.
- Manski, D. (2008). *Online Lehrbuch der Urologie*. <http://www.urologielehrbuch.de/harnblasenkarzinom.html>.
- Mariotti, M., Castiglioni, S., and Maier, J. A. (2009). Inhibition of T24 human bladder carcinoma cell migration by RNA interference suppressing the expression of HD-PTP. *Cancer Lett* **273**, 155-163.
- Matsubara, K., Saito, A., Tanaka, A., Nakajima, N., Akagi, R., Mori, M., and Mizushima, Y. (2006). Catechin conjugated with fatty acid inhibits DNA polymerase and angiogenesis. *DNA Cell Biol* **25**, 95-103.
- Matsubara, K., Saito, A., Tanaka, A., Nakajima, N., Akagi, R., Mori, M., and Mizushima, Y. (2007). Epicatechin conjugated with fatty acid is a potent inhibitor of DNA polymerase and angiogenesis. *Life Sci* **80**, 1578-1585.
- Matsumura, Y., and Ananthaswamy, H. N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 298-308.
- Matsuo, K., Shintani, S., Tsuji, T., Nagata, E., Lerman, M., McBride, J., Nakahara, Y., Ohyama, H., Todd, R., and Wong, D. T. (2000). p12(DOC-1), a growth suppressor, associates with DNA polymerase alpha/primase. *Faseb J* **14**, 1318-1324.
- Maurer, H. R. (1981). Potential pitfalls of [3H]thymidine techniques to measure cell proliferation. *Cell Tissue Kinet* **14**, 111-120.
- Michaelis, M., Vogel, J. U., Cinatl, J., Langer, K., Kreuter, J., Schwabe, D., and Driever, P. H. (2000). Cytotoxicity of aphidicolin and its derivatives against neuroblastoma cells in vitro: synergism with doxorubicin and vincristine. *Anticancer Drugs* **11**, 479-485.
- Michaelis, M., Zimmer, A., Handjou, N., Cinatl, J., and Cinatl, J., Jr. (2005). Increased systemic efficacy of aphidicolin encapsulated in liposomes. *Oncol Rep* **13**, 157-160.
- Miller, R. L., Meng, T. C., and Tomai, M. A. (2008). The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. *Drug News Perspect* **21**, 69-87.
- Mingxin, Z., Yan, L., Hongbo, W., Jianhua, Z., Hongyan, L., He, L., Hongqi, X., Sen, Z., and Xiaoguang, C. (2008). The antitumor activity of meisoindigo against human colorectal cancer HT-29 cells in vitro and in vivo. *J Chemother* **20**, 728-733.
- Mizushima, Y., Murakami, C., Ohta, K., Takikawa, H., Mori, K., Yoshida, H., Sugawara, F., and Sakaguchi, K. (2002). Selective inhibition of the activities of both eukaryotic DNA polymerases and DNA topoisomerases by elenic acid. *Biochem Pharmacol* **63**, 399-407.
- Mizushima, Y., Tanaka, N., Yagi, H., Kurosawa, T., Onoue, M., Seto, H., Horie, T., Aoyagi, N., Yamaoka, M., Matsukage, A., Yoshida, S., and Sakaguchi, K. (1996). Fatty acids selectively inhibit eukaryotic DNA polymerase activities in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1308**, 256-262.
- Mizushima, Y., Xu, X., Matsubara, K., Murakami, C., Kuriyama, I., Oshige, M., Takemura, M., Kato, N., Yoshida, H., and Sakaguchi, K. (2003a). Pyridoxal 5'-phosphate is a

- selective inhibitor in vivo of DNA polymerase alpha and epsilon. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1025-1032.
- Mizushina, Y., Xu, X., Murakami, C., Okano, T., Takemura, M., Yoshida, H., and Sakaguchi, K. (2003b). Selective inhibition of mammalian DNA polymerase alpha by vitamin D2 and D3. *J Pharmacol Sci* **92**, 283-290.
- Moore, A. R., and Willoughby, D. A. (1995). Hyaluronan as a drug delivery system for diclofenac: a hypothesis for mode of action. *Int J Tissue React* **17**, 153-156.
- Morse, L. G., Kendrick, C., Hooper, D., Ward, H., and Parry, E. (2003). Treatment of squamous cell carcinoma with intralesional 5-Fluorouracil. *Dermatol Surg* **29**, 1150-1153; discussion 1153.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Moss, G. P., and Cronin, M. T. (2002). Quantitative structure-permeability relationships for percutaneous absorption: re-analysis of steroid data. *Int J Pharm* **238**, 105-109.
- Murakami, C., Takemura, M., Sugiyama, Y., Kamisuki, S., Asahara, H., Kawasaki, M., Ishidoh, T., Linn, S., Yoshida, S., Sugawara, F., Yoshida, H., Sakaguchi, K., and Mizushina, Y. (2002). Vitamin A-related compounds, all-trans retinal and retinoic acids, selectively inhibit activities of mammalian replicative DNA polymerases. *Biochim Biophys Acta* **1574**, 85-92.
- Näsman, A., Attner, P., Hammarstedt, L., Du, J., Eriksson, M., Giraud, G., Ahrlund-Richter, S., Marklund, L., Romanitan, M., Lindquist, D., Ramqvist, T., Lindholm, J., Sparen, P., Ye, W., Dahlstrand, H., Munck-Wikland, E., and Dalianis, T. (2009). Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: An epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*.
- Nasheuer, H. P., Moore, A., Wahl, A. F., and Wang, T. S. (1991). Cell cycle-dependent phosphorylation of human DNA polymerase alpha. *J Biol Chem* **266**, 7893-7903.
- Ngawhirunpat, T., Kawakami, N., Hatanaka, T., Kawakami, J., and Adachi, I. (2003). Age dependency of esterase activity in rat and human keratinocytes. *Biol Pharm Bull* **26**, 1311-1314.
- Odom, R. B., and Goette, D. K. (1978). Treatment of keratoacanthomas with intralesional fluorouracil. *Arch Dermatol* **114**, 1779-1783.
- O'Dwyer, P. J., Moyer, J. D., Suffness, M., Harrison, S. D., Jr., Cysyk, R., Hamilton, T. C., and Plowman, J. (1994). Antitumor activity and biochemical effects of aphidicolin glycinate (NSC 303812) alone and in combination with cisplatin in vivo. *Cancer Res* **54**, 724-729.
- Oesch, F., Fabian, E., Oesch-Bartlomowicz, B., Werner, C., and Landsiedel, R. (2007). Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab Rev* **39**, 659-698.
- Oguri, T., Achiwa, H., Sato, S., Bessho, Y., Takano, Y., Miyazaki, M., Muramatsu, H., Maeda, H., Niimi, T., and Ueda, R. (2006). The determinants of sensitivity and acquired resistance to gemcitabine differ in non-small cell lung cancer: a role of ABCC5 in gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther* **5**, 1800-1806.
- Oguro, M., Suzuki-Hori, C., Nagano, H., Mano, Y., and Ikegami, S. (1979). The mode of inhibitory action by aphidicolin on eukaryotic DNA polymerase alpha. *Eur J Biochem* **97**, 603-607.
- Olsanska, L., Cihlar, T., Votruba, I., and Holy, A. (1997). Transport of Adefovir (PMEA) in human T-lymphoblastoid cells. *Collect Czech Chem Commun* **62**, 821-828.
- Oshige, M., Takenouchi, M., Kato, Y., Kamisuki, S., Takeuchi, T., Kuramochi, K., Shiina, I., Suenaga, Y., Kawakita, Y., Kuroda, K., Sato, N., Kobayashi, S., Sugawara, F., and Sakaguchi, K. (2004). Taxol derivatives are selective inhibitors of DNA polymerase alpha. *Bioorg Med Chem* **12**, 2597-2601.

- Pagé, M., Bejaoui, N., Cinq-Mars, B., and Lemieux, P. (1988). Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity. *Int J Immunopharmacol* **10**, 785-793.
- Pariser, D., Loss, R., Jarratt, M., Abramovits, W., Spencer, J., Geronemus, R., Bailin, P., and Bruce, S. (2008). Topical methyl-aminolevulinate photodynamic therapy using red light-emitting diode light for treatment of multiple actinic keratoses: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol* **59**, 569-576.
- Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M. R., and Mohr, I. J. (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8700-8704.
- Parkinson, E. K., Newbold, R. F., and Keith, W. N. (1997). The genetic basis of human keratinocyte immortalisation in squamous cell carcinoma development: the role of telomerase reactivation. *Eur J Cancer* **33**, 727-734.
- Patel, P. H., and Loeb, L. A. (2001). Getting a grip on how DNA polymerases function. *Nat Struct Biol* **8**, 656-659.
- Pearlman, D. L. (1991). Weekly pulse dosing: effective and comfortable topical 5-fluorouracil treatment of multiple facial actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* **25**, 665-667.
- Pedrali-Noy, G., Spadari, S., Miller-Faures, A., Miller, A. O., Kruppa, J., and Koch, G. (1980). Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin. *Nucleic Acids Res* **8**, 377-387.
- Pfleiderer, A. (1998). Diagnose und Therapie des Zervixkarzinoms. In *Der Gynäkologe*, pp. 964-973. Springer-Verlag, Freiburg.
- Pointreau, Y., Garaud, P., Chapet, S., Sire, C., Tuchais, C., Tortochaux, J., Faivre, S., Guerri, S., Alfonsi, M., and Calais, G. (2009). Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. *J Natl Cancer Inst* **101**, 498-506.
- Potts, R. O., and Guy, R. H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharm Res* **9**, 663-669.
- Qaqish, R. B., Mattes, K. A., and Ritchie, D. J. (2003). Adefovir dipivoxil: a new antiviral agent for the treatment of hepatitis B virus infection. *Clin Ther* **25**, 3084-3099.
- Rana, K. Z., and Dudley, M. N. (1999). Intracellular phosphorylation of zidovudine in an in vitro hollow fiber model. *Pharmacotherapy* **19**, 979-983.
- Ray, A. S., Vela, J. E., Olson, L., and Fridland, A. (2004). Effective metabolism and long intracellular half life of the anti-hepatitis B agent adefovir in hepatic cells. *Biochem Pharmacol* **68**, 1825-1831.
- Raybaud, H., Odin, G., Fafet, A., Santini, J., and Monteil, R. A. (2003). [Genic alterations in oral and head and neck squamous cell carcinomas: analysis of international literature]. *Pathol Biol (Paris)* **51**, 176-184.
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., De Haas, M., Van Deemter, L., Wijnholds, J., Balzarini, J., and Borst, P. (2003). Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol* **63**, 1094-1103.
- Rezk, N. L., Crutchley, R. D., and Kashuba, A. D. (2005). Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir in human plasma using high-performance liquid chromatography after solid phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **822**, 201-208.
- Rhodes, L. E., de Rie, M., Enstrom, Y., Groves, R., Morken, T., Goulden, V., Wong, G. A., Grob, J. J., Varma, S., and Wolf, P. (2004). Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol* **140**, 17-23.

- Richartz, A. (2007). *Ein neues Target zur Therapie von Basaliom und spinozellulärem Karzinom – Inhibition der humanen DNA Polymerase alpha*. Institut für Pharmazie, FU Berlin, Berlin.
- Richartz, A., Holtje, M., Brandt, B., Schafer-Korting, M., and Holtje, H. D. (2008). Targeting human DNA polymerase alpha for the inhibition of keratinocyte proliferation. Part 1. Homology model, active site architecture and ligand binding. *J Enzyme Inhib Med Chem* **23**, 94-100.
- Riede, U.-N., und Schaefer, H.-E. (1999). *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme, Stuttgart.
- Rivers, J. K., Arlette, J., Shear, N., Guenther, L., Carey, W., and Poulin, Y. (2002). Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Br J Dermatol* **146**, 94-100.
- Robertson, J. H., Yang, S. Y., Iga, A. M., Seifalian, A. M., and Winslet, M. C. (2008). An in vivo rat model for early development of colorectal cancer metastasis to liver. *Int J Exp Pathol* **89**, 447-457.
- Rodriguez, C. O., Jr., Plunkett, W., Paff, M. T., Du, M., Nowak, B., Ramakrishna, P., Keating, M. J., and Gandhi, V. (2000a). High-performance liquid chromatography method for the determination and quantitation of arabinosylguanine triphosphate and fludarabine triphosphate in human cells. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **745**, 421-430.
- Rodriguez, J. F., Rodriguez, J. L., Santana, J., Garcia, H., and Rosario, O. (2000b). Simultaneous quantitation of intracellular zidovudine and lamivudine triphosphates in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3097-3100.
- Rokavec, M., Schroth, W., Amaral, S. M., Fritz, P., Antoniadou, L., Glavac, D., Simon, W., Schwab, M., Eichelbaum, M., and Brauch, H. (2008). A polymorphism in the TC21 promoter associates with an unfavorable tamoxifen treatment outcome in breast cancer. *Cancer Res* **68**, 9799-9808.
- Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S., and Elpeleg, O. (2001). Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* **29**, 342-344.
- Santos Maia, C., Mehnert, W., Schaller, M., Korting, H. C., Gysler, A., Haberland, A., and Schafer-Korting, M. (2002). Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use. *J Drug Target* **10**, 489-495.
- Sargent, J. M., Elgie, A. W., Williamson, C. J., Lewandowicz, G. M., and Taylor, C. G. (2001). Circumvention of ara-C resistance by aphidicolin in blast cells from patients with AML. *Br J Cancer* **84**, 680-685.
- Sargent, J. M., Elgie, A. W., Williamson, C. J., and Taylor, C. G. (1996). Aphidicolin markedly increases the platinum sensitivity of cells from primary ovarian tumours. *Br J Cancer* **74**, 1730-1733.
- Sarkar, M., Han, T., Damaraju, V., Carpenter, P., Cass, C. E., and Agarwal, R. P. (2005). Cytosine arabinoside affects multiple cellular factors and induces drug resistance in human lymphoid cells. *Biochem Pharmacol* **70**, 426-432.
- Schäfer-Korting, M., Mehnert, W., and Korting, H. C. (2007). Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 427-443.
- Schiffer, R., Neis, M., Holler, D., Rodriguez, F., Geier, A., Gartung, C., Lammert, F., Dreuw, A., Zwadlo-Klarwasser, G., Merk, H., Jugert, F., and Baron, J. M. (2003). Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **120**, 285-291.

- Schoop, V. M., Mirancea, N., and Fusenig, N. E. (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **112**, 343-353.
- Scully, C., Field, J. K., and Tanzawa, H. (2000). Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol* **36**, 404-413.
- Sentenac, S., Fernandez, C., Thuillier, A., Lechat, P., and Aymard, G. (2003). Sensitive determination of tenofovir in human plasma samples using reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **793**, 317-324.
- Sessa, C., Zucchetti, M., Davoli, E., Califano, R., Cavalli, F., Frustaci, S., Gumbrell, L., Sulkes, A., Winograd, B., and D'Incalci, M. (1991). Phase I and clinical pharmacological evaluation of aphidicolin glycinate. *J Natl Cancer Inst* **83**, 1160-1164.
- Shaw, J. P., Sueoko, C. M., Oliyai, R., Lee, W. A., Arimilli, M. N., Kim, C. U., and Cundy, K. C. (1997). Metabolism and pharmacokinetics of novel oral prodrugs of 9-[(R)-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) in dogs. *Pharm Res* **14**, 1824-1829.
- Sherley, J. L., and Kelly, T. J. (1988). Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* **263**, 8350-8358.
- Sieuwerds, A. M., Klijn, J. G., Peters, H. A., and Foekens, J. A. (1995). The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **33**, 813-823.
- Slusher, J. T., Kuwahara, S. K., Hamzeh, F. M., Lewis, L. D., Kornhauser, D. M., and Lietman, P. S. (1992). Intracellular zidovudine (ZDV) and ZDV phosphates as measured by a validated combined high-pressure liquid chromatography-radioimmunoassay procedure. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 2473-2477.
- Solas, C., Li, Y. F., Xie, M. Y., Sommadossi, J. P., and Zhou, X. J. (1998). Intracellular nucleotides of (-)-2',3'-deoxy-3'-thiacytidine in peripheral blood mononuclear cells of a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2989-2995.
- Sonoda, K., Miyamoto, S., Yamazaki, A., Kobayashi, H., Nakashima, M., Mekada, E., and Wake, N. (2007). Biologic significance of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) as a pivotal regulator of tumor growth through angiogenesis in human uterine cancer. *Cancer* **110**, 1979-1990.
- Spadari, S., Maga, G., Verri, A., and Focher, F. (1998). Molecular basis for the antiviral and anticancer activities of unnatural L-beta-nucleosides. *Expert Opin Investig Drugs* **7**, 1285-1300.
- Spänkuch, B., Steinhäuser, I., Wartlick, H., Kurunci-Csacsko, E., Strebhardt, K. I., and Langer, K. (2008). Downregulation of Plk1 expression by receptor-mediated uptake of antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles. *Neoplasia* **10**, 223-234.
- Sparidans, R. W., Crommentuyn, K. M., Schellens, J. H., and Beijnen, J. H. (2003). Liquid chromatographic assay for the antiviral nucleotide analogue tenofovir in plasma using derivatization with chloroacetaldehyde. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **791**, 227-233.
- Srirangam, A., Mitra, R., Wang, M., Gorski, J. C., Badve, S., Baldrige, L., Hamilton, J., Kishimoto, H., Hawes, J., Li, L., Orschell, C. M., Srour, E. F., Blum, J. S., Donner, D., Sledge, G. W., Nakshatri, H., and Potter, D. A. (2006). Effects of HIV protease inhibitor ritonavir on Akt-regulated cell proliferation in breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 1883-1896.

- Steinhauser, I. M., Langer, K., Strebhardt, K. M., and Spankuch, B. (2008). Effect of trastuzumab-modified antisense oligonucleotide-loaded human serum albumin nanoparticles prepared by heat denaturation. *Biomaterials* **29**, 4022-4028.
- Stockfleth, E. (2008). Aktinische Keratose, Leitlinien. In *AWMF online*. <http://awmf.org>
- Stockfleth, E., and Kerl, H. (2006). Guidelines for the management of actinic keratoses. *Eur J Dermatol* **16**, 599-606.
- Suzuki, M., Shinohara, F., Endo, M., Sugazaki, M., Echigo, S., and Rikiishi, H. (2008). Zebularine suppresses the apoptotic potential of 5-fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Takahashi, H., Iizuka, H., Nakashima, M., Wada, T., Asano, K., Ishida-Yamamoto, A., and Watanabe, T. (2001). RCAS1 antigen is highly expressed in extramammary Paget's disease and in advanced stage squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol Sci* **26**, 140-144.
- Tetko, I. V., and Tanchuk, V. Y. (2002). Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J Chem Inf Comput Sci* **42**, 1136-1145.
- Tetko, I. V., Tanchuk, V. Y., and Villa, A. E. (2001). Prediction of n-octanol/water partition coefficients from PHYSPROP database using artificial neural networks and E-state indices. *J Chem Inf Comput Sci* **41**, 1407-1421.
- Toyohara, J., Waki, A., Takamatsu, S., Yonekura, Y., Magata, Y., and Fujibayashi, Y. (2002). Basis of FLT as a cell proliferation marker: comparative uptake studies with [³H]thymidine and [³H]arabinothymidine, and cell-analysis in 22 asynchronously growing tumor cell lines. *Nucl Med Biol* **29**, 281-287.
- Tsunoda, N., Kokuryo, T., Oda, K., Senga, T., Yokoyama, Y., Nagino, M., Nimura, Y., and Hamaguchi, M. (2009). Nek2 as a novel molecular target for the treatment of breast carcinoma. *Cancer Sci* **100**, 111-116.
- Tveit, H., and Kristensen, T. (2001). Fluorescence-based DNA polymerase assay. *Anal Biochem* **289**, 96-98.
- Ural, A. U., Takebe, N., Adhikari, D., Ercikan-Abali, E., Banerjee, D., Barakat, R., and Bertino, J. R. (2000). Gene therapy for endometrial carcinoma with the herpes simplex thymidine kinase gene. *Gynecol Oncol* **76**, 305-310.
- van de Loosdrecht, A. A., Beelen, R. H., Ossenkoppele, G. J., Broekhoven, M. G., and Langenhuijsen, M. M. (1994). A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods* **174**, 311-320.
- Van Rompay, A. R., Johansson, M., and Karlsson, A. (2003). Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* **100**, 119-139.
- Vávrová, K., Lorencova, K., Klimentova, J., Novotny, J., and Hrabalek, A. (2007). HPLC method for determination of in vitro delivery through and into porcine skin of adefovir (PMEA). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **853**, 198-203.
- Verweij-van Wissen, C. P., Aarnoutse, R. E., and Burger, D. M. (2005). Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **816**, 121-129.
- Vogler, R., Sauer, B., Kim, D. S., Schafer-Korting, M., and Kleuser, B. (2003). Sphingosine-1-phosphate and its potentially paradoxical effects on critical parameters of cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* **120**, 693-700.

- Vogt, T., McClelland, M., Jung, B., Popova, S., Bogenrieder, T., Becker, B., Rumpler, G., Landthaler, M., and Stolz, W. (2001). Progression and NSAID-induced apoptosis in malignant melanomas are independent of cyclooxygenase II. *Melanoma Res* **11**, 587-599.
- Walters, K. A. (2002). *Dermatological and Transdermal Formulations, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Wang, T. S. (1991). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **60**, 513-552.
- Weiss, J., Menter, A., Hevia, O., Jones, T., Ling, M., Rist, T., Roberts, J., Shavin, J. S., Sklar, J., Webster, G., Connolly, M., Furst, K., and Levy, S. (2002). Effective treatment of actinic keratosis with 0.5% fluorouracil cream for 1, 2, or 4 weeks. *Cutis* **70**, 22-29.
- Weissenborn, S. J., Nindl, I., Purdie, K., Harwood, C., Proby, C., Breuer, J., Majewski, S., Pfister, H., and Wieland, U. (2005). Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* **125**, 93-97.
- Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Kitko, D. J., Madison, K. C., and Downing, D. T. (1989). The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* **93**, 169-172.
- Wielinga, P. R., Reid, G., Challa, E. E., van der Heijden, I., van Deemter, L., de Haas, M., Mol, C., Kuil, A. J., Groeneveld, E., Schuetz, J. D., Brouwer, C., De Abreu, R. A., Wijnholds, J., Beijnen, J. H., and Borst, P. (2002). Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells. *Mol Pharmacol* **62**, 1321-1331.
- Wielinga, P. R., van der Heijden, I., Reid, G., Beijnen, J. H., Wijnholds, J., and Borst, P. (2003). Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem* **278**, 17664-17671.
- Wiesinger, H. (1999). Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft, Kolonkarzinom, Rektumkarzinom. In *AWMF online*. <http://awmf.org>
- Wijnholds, J., Mol, C. A., van Deemter, L., de Haas, M., Scheffer, G. L., Baas, F., Beijnen, J. H., Scheper, R. J., Hatse, S., De Clercq, E., Balzarini, J., and Borst, P. (2000). Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7476-7481.
- Wolf, N. B., Küchler, S., Radowski, M. R., Blaschke, T., Kramer, K. D., Weindl, G., Kleuser, B., Haag, R., and Schafer-Korting, M. (2009). Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models. *Eur J Pharm Biopharm.*
- Wright, G. E., Dudycz, L. W., Kazimierzczuk, Z., Brown, N. C., and Khan, N. N. (1987). Synthesis, cell growth inhibition, and antitumor screening of 2-(p-n-butylanilino)purines and their nucleoside analogues. *J Med Chem* **30**, 109-116.
- Zdrazil, B., Höltje, M., Schwanke, A., Schmitz, B., Schäfer-Korting, M., and Höltje, H.-D. (submitted). Molecular Modeling Studies of New Potential Human DNA Polymerase alpha Inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.*
- Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., and Brash, D. E. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773-776.
- Ziegler, A., Leffell, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E., Bale, A. E., and et al. (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4216-4220.
- Zuhse, R., Krause, P., und Fischer, C. (2008). Orientierungsbericht über den forcierten Abbau von OxBu unter Stressbedingungen, Chiracon GmbH, Luckenwalde.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ohne Angabe des Lebenslaufes.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt zu haben. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Berlin,

Anja Schwanke