

Hals-Nasen-Ohrenklinik

Universität Heidelberg

(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. P. K. Plinkert)

Institut für Pharmazie u. Biochemie

Universität Mainz

(Leiter der Pharmazeutischen Biologie: Prof. Dr. T. Efferth)

**Identifizierung und Charakterisierung neuartiger
zytotoxischer Phytochemikalien für die Therapie des
Kopf-Hals-Karzinoms und anderer Tumorentitäten**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der *venia legendi*

für das Fach Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

der Medizinischen Fakultät Heidelberg

der Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von

Dr. med. Serkan Sertel

aus

Ankara / Türkei

2011

Inhaltsverzeichnis

Glossar / Abkürzungsverzeichnis.....	2
1. Zusammenfassung.....	3
2. Einleitung.....	5
3. Ergebnisse.....	7
Phytochemikalien und ihre Derivate.....	8
3.1. <i>Vinca</i> -Alkaloide.....	8
3.2. Das Sesquiterpen Artesunate.....	12
3.3. Neue Derivate des Polyphenols Curcumin.....	16
3.4. Ätherische Öle.....	18
4. Liste der Originalien für die Habilitation.....	22
5. Literaturnachweis.....	23
6. Danksagung.....	29
Appendix: Originalien.....	30

Glossar / Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding Cassette
ART	Artesunate
CAT	Catalase
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
HNO	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
Max	Myc-assoziiertes Faktor x
MDR	Multidrug Resistance
MnSOD	Manganese-dependent superoxide dismutase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NCI	National Cancer Institute
OCSCC	Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TGFR	Transforming Growth Factor Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Zusammenfassung

Karzinome der Kopf- und Halsregion (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) sind die sechsthäufigste bösartige Krebserkrankung weltweit. Die Behandlung von Tumoren des Kopf- und Halsbereiches ist problematisch. Nach chirurgischen Eingriffen erfolgt meistens eine kombinierte Radio-Chemotherapie. Auf Grund von Resistenzbildungen der Tumore gegen die Chemotherapie lassen sich nur begrenzt verbesserte Überlebensraten erzielen. Sie liegen bei etwa 42% europaweit bei den 5-Jahresüberlebensraten. Die Mehrheit der Patienten mit lokalen oder regional fortgeschrittenen Kopf-Hals-Malignomen (Stadium III und IV) hat trotz chirurgischer und Strahlentherapeutischer Behandlung eine schlechte Prognose. Aus diesem Grund ist häufig eine zusätzliche Behandlung mit systemischen Chemotherapeutika notwendig. Eine entscheidende Rolle für das Ansprechen spielt dabei die erworbene Chemoresistenz der HNSCC. Ein weiteres Problem in der Onkologie ist die mangelnde Tumorspezifität der Chemotherapie. Die Folgen sind gravierende Nebenwirkungen, reduzierte Lebensqualität und hohe Morbidität. Daraus ergibt sich ein dringender Bedarf zur Erforschung und Entwicklung neuer, zielgerichteter Medikamente mit verbesserten Eigenschaften gegenüber Tumoren. Der erste Schritt hierfür wäre die Identifizierung und Charakterisierung neuer, zytotoxischer Substanzen.

Interessanterweise, sind etwa ein Drittel aller Medikamente auf dem Markt Naturstoffe, Naturstoffderivate oder beruhen auf biologischen Wirkprinzipien von Naturstoffen. In der Onkologie beträgt deren Anteil sogar mehr als zwei Drittel. Die Wirkstoffsuche unter den Naturstoffen aus traditionellen Heilpflanzen ist daher besonders vielversprechend und von hoher therapeutischer Relevanz. Unter den Naturstoffen werden Sekundärmetabolite, wie z.B. Antibiotika aus Mikroorganismen, Phytochemikalien aus Pflanzen oder marine Stoffe aus beispielsweise Schwämmen und Pilzen zusammengefasst. In der Natur dienen Phytochemikalien nicht nur als Lockstoffe der Pflanzen zur Bestäubung sondern auch als pflanzliche Waffen zur Abwehr von Fressfeinden und Nährstoffkonkurrenten. Die Natur hat diese Substanzen über die Jahrtausende anhaltende Evolution perfektioniert. Es ist daher besonders vielversprechend, Phytochemikalien aus Medizinalpflanzen als eine potentielle Quelle neuer Wirkstoffe und nachfolgender Derivatisierung von

Leitsubstanzen zur Medikamentenentwicklung zu nutzen.

Mit der vorliegenden Habilitationsarbeit wurden bekannte und neue zytotoxische Phytochemikalien und Naturstoffe auf ihre molekularen Wirkmechanismen bei Tumorzellen hin untersucht und deren antikanzerogene Aktivität gegenüber HNSCC und Tumoren anderer Entität eruiert. Diese Kandidatensubstanzen wurden in diesem Zusammenhang mit Methoden der Pharmakogenomik, der Bioinformatik und der molekularen Pharmakologie experimentell überprüft. Ausgewählte Phytochemikalien, die zytotoxisch auf Tumorzellen wirken, sollen den Ausgangspunkt für weitere Medikamentenentwicklungen darstellen. Langfristiges Ziel ist es, neue Wirkstoffe in die klinische Prüfung bei Patienten einfließen zu lassen.

2. Einleitung

Karzinome der Kopf- und Halsregion (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) sind die sechsthäufigste bösartige Erkrankung mit weltweit ca. 600.000 und bundesweit 10.000 Neuerkrankungen/Jahr. In Europa reichen die Mortalitätsraten für die Oropharynxkarzinome (OCSCC) von 29 bis 40 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die erzielbaren 5-Jahresüberlebensraten liegen bei etwa 42% europaweit. Trotz multimodaler Therapieoptionen bleibt die gesamte 5-Jahres-Überlebensrate für OCSCC bei 50% und hat sich nicht wesentlich in den letzten 30 Jahren verbessert. Die Behandlung von Tumoren des Kopf- und Halsbereiches ist problematisch. Nach chirurgischem Eingriff erfolgt meistens eine kombinierte Radio-Chemotherapie. Aufgrund von Resistenzbildungen der Tumore gegen die Chemotherapie ergeben sich kaum verbesserte Überlebensraten. Darüber hinaus ist das loko-regionale HNSCC-Rezidiv immer noch ein ungelöstes Problem in der Onkologie. Patienten, die zuvor radiochemotherapiert wurden, haben dabei einen Rückfall in entfernten Regionen des Kopf- und Halsbereiches. Die Rezidive sind in der Regel aggressiv und ihre Ansprechraten auf Chemotherapien sind niedriger als nicht-chemotherapierte Tumoren. Die Mehrzahl der Patienten mit lokal oder regional fortgeschrittenen Kopf-Hals Tumoren (Stadium III und IV) haben trotz chirurgischer und strahlentherapeutischer Behandlung eine schlechte Prognose. Aus diesem Grund ist häufig eine zusätzliche Behandlung mit systemischen Chemotherapeutika notwendig. Eine entscheidende Rolle für das Ansprechen spielt dabei die erworbene Chemoresistenz der HNSCC, die bereits durch einzelne Punktmutationen im Zielgewebe verursacht wird. Aufgrund dieser Resistenzbildungen ergeben sich nur begrenzt verbesserte Überlebensraten. Ein weiteres Problem in der Onkologie ist die mangelnde Tumorspezifität der Chemotherapie. Die Folgen sind gravierende Nebenwirkungen, reduzierte Lebensqualität und hohe Morbidität. Daraus ergibt sich ein dringender Bedarf zur Erforschung und Entwicklung neuer und zielgerichteter Medikamente mit verbesserten Eigenschaften gegenüber Tumoren. Zu diesem Zweck wäre der erste Schritt die Identifizierung und Charakterisierung von neuartigen zytotoxischen sekundären Pflanzenstoffen auf der Grundlage von Vorwissen über die Wirksamkeit von ausgewählten Heilpflanzen aus verschiedenen Kulturen, wie z.B. der traditionellen Chinesischen Medizin (TCM). Interessanterweise

sind etwa ein Drittel aller Medikamente auf dem Markt Naturstoffe, Naturstoffderivate oder beruhen auf biologischen Wirkprinzipien von Naturstoffen. In der Onkologie beträgt deren Anteil sogar mehr als zwei Drittel. Die Wirkstoffsuche unter den Naturstoffen aus traditionellen Heilpflanzen ist daher besonders vielversprechend und ist von hoher therapeutischer Relevanz. Unter den Naturstoffen werden Sekundärmetabolite, wie z.B. Antibiotika aus Mikroorganismen, Phytochemikalien aus Pflanzen oder marine Stoffe aus beispielsweise Schwämmen und Pilzen zusammengefasst. In der Natur dienen Phytochemikalien nicht nur als Lockstoffe der Pflanzen zur Bestäubung sondern auch als pflanzliche Waffen zur Abwehr von Fressfeinden und Nährstoffkonkurrenten. Die Natur hat diese Substanzen über die Jahrtausende anhaltende Evolution perfektioniert. Es ist daher besonders attraktiv, Phytochemikalien aus Medizinalpflanzen als eine potenzielle Quelle für die Identifizierung von neuen Wirkstoffen und nachfolgender Derivatisierung von Leitsubstanzen zur Medikamentenentwicklung zu nutzen. In den vergangenen Jahrzehnten hat sich die Forschung auf die gesundheitlichen Auswirkungen von sekundären Pflanzenstoffen und pflanzlichen Extrakten fokussiert.

3. Ergebnisse

Diese Habilitation befasst sich mit der Identifizierung und Charakterisierung neuartiger zytotoxischer Phytochemikalien, die sich für die Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms und anderer Tumorentitäten qualifizieren könnten. Phytochemikalien gehören wie die Leitsubstanzen und ihren Derivaten den Sekundärmetaboliten von Pflanzen an. Sekundärmetabolite sind Stoffwechselprodukte von Pflanzen, Mikroorganismen, Schwämmen oder Pilzen, die biologische Wirkstoffe, wie z.B. Antibiotika, Toxine, Insektizide oder Botenstoffe sind. Sekundärmetabolite repräsentieren die Waffen der Pflanzen zur chemischen Abwehr von Fressfeinden und Nährstoffkonkurrenten, die über die Jahrmillionen der Evolution perfektioniert wurden. Phytochemikalien sind in der klinischen Tätigkeit fest implementiert. Als eine bekannte Gruppe sind Antibiotika, Sekundärmetabolite von Mikroorganismen, wie z.B. *Penicillium notatum* zu nennen. In der Onkologie gibt es ebenso wichtige Beispiele, wie die Taxole aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) oder die *Vinca*-Alkaloide aus dem Madagaskar-Immergrün (*Catharanthus roseus*). Naturstoffe stellen eine wichtige Quelle für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika dar. Im Folgenden werden vier unterschiedliche Gruppen von Phytochemikalien bezüglich ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber HNSCC Zellen und Tumorzellen anderer Entität vorgestellt: *Vinca*-Alkaloide, Sesquiterpen (Artesunate), Polyphenole (Curcumin-Derivate) sowie ätherische Öle aus drei bekannten Heilpflanzen (Salbei, Thymian und Liebstöckel).

Phytochemikalien und ihre Derivate

3.1. *Vinca*-Alkaloide

Die pflanzliche Wirkstoffgruppe der *Vinca*-Alkaloide, bekannt als Mitosespindelgifte, gehören zu den klinisch etablierten Chemotherapeutika, deren Ursprung ein Naturstoff ist. Vinblastin und Vincristin sind Alkaloide aus der Pflanze *Catharanthus roseus* (früher: *Vinca rosea*). Ihre monomeren Vorläufer-Moleküle sind Vindolin und Catharanthin. Beide Vorläufer-Moleküle sind weniger toxisch als ihre dimeren Endprodukte, Vinblastin und Vincristin. Vinblastin wird bei der Behandlung des Hodgkin-Lymphoms eingesetzt, während Vincristin gegen das Non-Hodgkin-Lymphom, die akute lymphatische Leukämie und das Nephroblastom verwendet wird. Die semi-synthetischen Derivate Vindesin und Vinorelbin werden erfolgreich in der Behandlung der Leukämie, des Lymphoms, Melanoms, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des metastasierenden Mammakarzinoms angewendet. *Vinca*-Alkaloide arretieren Tumorzellen während der Mitose durch Bindung an Tubulin mit konsekutiver Hemmung der Polymerisation von Tubulinen zu Mikrotubuli. Neben der Interaktion der *Vinca*-Alkaloide mit Tubulinen, tragen weitere vorgeschaltete "Upstream-" (z.B. membran-gebundene Efflux-Transporter) und nachgeschaltete "Downstream-Mechanismen" (z.B. Signaltransduktionswege, Apoptose) zur Wirksamkeit der *Vinca*-Alkaloide gegen Krebszellen bei. Wir haben uns mit der Wirksamkeit und Wirkungsweise von *Vinca*-Alkaloiden auf HNSCC und andere Tumorentitäten in der Zellkultur beschäftigt.

Für den korrekten Ablauf einer Mitose sind die beiden Spindelpolkörperchen, die Zentrosomen verantwortlich. An diesen Zentrosomen setzen Zugfasern aus Proteinen an, die den im Verlauf der Mitose generierten doppelten Chromosomensatz homolog in die beiden neuen Tochterzellen transportieren. Krebszellen bilden häufig überzählige Zentrosomen aus, was im Normalfall zu völlig ungleichmäßigen Chromosomenverteilungen, und nichtlebensfähigen Tochterzellen führt. Tumorzellen entgehen diesem Zelltod nur dann, wenn ihnen trotz überzähliger Zentrosomen eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen gelingt. Dazu bündeln Sie mehrere Zentrosomen zu Aggregaten, sog. Clustern. Innerhalb der Tumorzelle entstehen zwei Cluster, zwischen denen sich eine funktionsfähige zweipolige Spindel ausbilden kann. Diese für Krebszellen höchst spezifische Charakteristik der zentrosomalen Clusterbildung macht sie allerdings selektiv angreifbar, da multiple

Zentrosomen in gesunden Zellen nicht vorkommen. Da die HNSCC114 Zelllinie prominenterweise überzählige Zentrosomen ausbildet und somit multipolare Mitosen aufweist, wurde sie für unsere Arbeiten verwendet.

Der bisher bekannte Wirkmechanismus von *Vinca*-Alkaloiden ist, dass sie die Polymerisation von Tubulinen zu Mikrotubuli hemmen. Dadurch ist die Mitose unterbrochen und die Tumorzelle geht zugrunde. Neurotoxische Nebenwirkungen durch die *Vinca*-Alkaloide ergeben sich durch die Rolle der Tubuline als wichtigste zytoskelettale Bahnen für den axonalen Transport in Nervenzellen.

In der pflanzlichen Biosynthese der *Vinca*-Alkaloide werden weniger toxische monomere Vorstufen auf einen Reiz hin zu hochtoxischen heterodimeren Endprodukten synthetisiert. Der Unterschied in der Zytotoxizität ist als ein Selbstschutzmechanismus der Madagaskar-Immergrün Pflanze (*Catharanthus roseus*) zu interpretieren. Wir stellten die Hypothese auf, dass die unterschiedlichen Zytotoxizitäten der monomeren Vorstufen (Vindolin und Catharanthin) und dimeren Endprodukte (Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin) die Bindung an die primäre Zielstrukturen der *Vinca*-Alkaloide, den Tubulinen, beeinflussen sollte. Eine vergleichende Analyse der funktionellen Auswirkungen der Verbindungen auf die Bildung von Mikrotubuli (Wirkung auf α -/ β -Tubulin-Polymerisation) wurde *in vitro* durchgeführt. Die relativen Bindungsaffinitäten von Vindolin und Catharanthin wurden mittels des Dixon Plots, einer graphische Methode zur Bestimmung der Art der Enzymhemmung und der Dissoziationskonstante (K_i) für ein Enzym-Inhibitor-Komplexe, ermittelt. Es zeigte sich, dass alle getesteten *Vinca*-Alkaloide entweder direkt oder indirekt (allosterische Modulation) an den Vinblastin Bindungsstellen von α -/ β -Tubulin interferieren. Die experimentellen Daten wurden mit molekularen Modellierungs-Studien verglichen. Die Bindung von *Vinca*-Alkaloiden an Tubulin kann nicht nur eine Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation, sondern auch Auswirkungen auf die Mitosespindel-Formation haben. Die Bildung von multipolaren Mitosespindeln durch Hemmung der zentrosomalen Koaleszenz wird als neuartige Behandlungsstrategie antizipiert. Deshalb haben wir die Kapazität der *Vinca*-Alkaloide, multipolare Mitosespindeln zu induzieren, analysiert. Schließlich haben wir die Rolle von Resistenzmechanismen für monomere und dimere *Vinca*-Alkaloide analysiert. Hierzu untersuchten wir die Kreuzresistenz von Vincristin-resistente CEM/VCR1000 Leukämiezellen gegenüber Vindolin und Catharanthin im Vergleich zu Vinblastin, Vindesin und Vinorelbin. Anschließend haben wir andere

Determinanten des Ansprechens gegenüber *Vinca*-Alkaloide in dem Zelllinien-Panel des National Cancer Institute (NCI) mittels COMPARE-Analysen der microarray-basierten Transkriptom-weiten mRNA-Expression analysiert.

Unsere Arbeiten zeigen, dass die monomeren Vorstufen Vindolin und Catharanthin schwache Zytotoxizität zeigten, während die dimeren Endprodukte Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin hohe Zytotoxizität gegenüber Krebszellen aufwiesen. Die molekularen *in silico* Docking- und biochemischen *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass Vinblastin, Vincristin und Vinorelbin mit hoher Affinität an α - β -Tubulin binden und die Tubulin-Polymerisation hemmen. Demgegenüber waren die Auswirkungen von Vindolin und Catharanthin schwach. Ebenso induzierte Vinblastin hohe Raten von multipolaren Mitosespindeln, während Vindolin und Catharanthin diese nur schwach beeinflussten. P-Glykoprotein-überexprimierende multiresistente CEM/VCR1000 Zellen waren resistent gegenüber Vincristin und kreuzresistent gegenüber Vinblastin, Vindesin und Vinorelbin, aber nicht bzw. nur schwach kreuzresistent gegenüber Vindolin und Catharanthin. Zusätzlich zu Tubulin als primäre Zielstruktur, wurden mittels COMPARE und Signalweg Profiling microarray-basierte mRNA Signaturen des Ansprechens dieser Verbindungen identifiziert.

Zusammenfassung

Zusammenfassend haben wir festgestellt, dass interessanterweise die Endprodukte (Vinblastin und Vincristin) auf HNSCC ebenfalls zytotoxischer sind als ihre Vorstufen (Vindolin und Catharantin). Durch biochemische Prüfung der Daten aus unseren bioinformatischen *molecular docking* Analysen bestätigten wir, dass *Vinca*-Alkaloide an α - β -Tubulin binden und die Tubulin-Polymerisation inhibieren. Die Induktion multipolarer Spindeln und Hemmung der zentrosomalen Clusterbildung mit konsekutiver Apoptose der multipolaren HNSCC-Zelllinie wurde als neuer Wirkmechanismus von *Vinca*-Alkaloiden (Vindolin, Catharantin, Vincristin und Vinblastin) aufgedeckt und erläutert. Dieser Wirkmechanismus ist eine neue potentielle tumorspezifische Behandlungsstrategie. Der Vorteil gegenüber den üblichen onkologisch genutzten Wirkmechanismen ist neben der Tumorspezifität, die zusätzliche Vermeidung neurotoxischer Nebenwirkungen. In der Zukunft sollen neue

zytotoxische Phytochemikalien identifiziert werden, welche die tumorspezifische zentrosomale Clusterbildung hemmen und somit die Apoptose der Tumorzelle verursachen, aber dennoch keine Tubulinhemmung in gesundem Gewebe hervorrufen und damit nebenwirkungsärmer sind.

3.2. Das Sesquiterpen Artesunate

Artemisinin, dessen Derivat Artesunate (ART) und einige andere aktive Naturstoffe wurden auf HNSCC und Tumorzelllinien anderer Entität hinsichtlich ihrer Wirkung und Wirkmechanismen untersucht. Darüber hinaus wurden Gene, die c-Myx/Max-reguliert sind und mit der Zytotoxizität von ART in menschlichen Colon-, Ovarial- und Bronchialkarzinom-Zelllinien assoziiert sind mittels Pharmakogenomik (Einfluss des Genoms auf die Wirkung von Arzneimittel) identifiziert [60]. Zusätzlich wurden Faktoren untersucht, die die Sensitivität oder Resistenz von Tumorzellen gegenüber ART bestimmen [61].

Artemisia annua L. wird in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) zur Behandlung von Fieber und Schüttelfrost verwendet. Artemisinin wurde als der aktive Bestandteil von *Artemisia annua* L. in der Wirkung gegen Malaria identifiziert. Es ist ein Sesquiterpenlacton mit einer internen Peroxid-Brücke, die essenziell für seine Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* ist. Tatsächlich werden Artemisinin und seine Derivate von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) offiziell für die Behandlung von Malaria, vor allem als ein Teil von Kombinationstherapien mit anderen Anti-Malaria-Medikamenten empfohlen.

Im Rahmen eines systematischen Screenings von Heilpflanzen, die in der TCM angewendet werden, zeigten Artemisinin und seine Derivate *in vitro* und *in vivo* zytotoxische Aktivität gegenüber Krebszellen. In der ersten Studie, haben wir mittels Microarray-Technologie (mRNA-Profilung und COMPARE-Analyse) beteiligte Gene auf der Transkriptionsebene aufgedeckt. Der COMPARE-Algorithmus wurde vom National Cancer Institute (NCI) für die Wirkstoffforschung entwickelt. Er korreliert das Zytotoxizitätsprofil der untersuchten Substanz oder des Extraktes mit einem bekannten Wirkstoffs gegen Krebs. Hierbei zeigen Substanzen oder Extrakte mit gleichen Wirkmechanismen ähnliche mittlere Kurven des Zytotoxizitätsprofils wie die unbekanntes Naturprodukt-Verbindungen und werden dadurch als "Treffer" in der COMPARE-Analyse gewertet. Wir unterzogen dieses Expressionsprofil einer Signalweg-Analyse mittels eines bioinformatischen Ansatzes (Ingenuity Pathway Analysis, IPA). Darüber hinaus führten wir eine Transkriptionsfaktor-Analyse, die auf eine mögliche Rolle von c-Myc und Max als Transkriptionsregulatoren für nachgeschaltete Gene hinwies, welche das Ansprechen der Krebszellen auf ART bestimmen. Das Microarray-basierte mRNA-Profilung und die COMPARE-Analyse

fürten zur Identifizierung einer Reihe von Genen deren Expression entweder mit hohen oder niedrigen IC_{50} -Werten für ART assoziiert waren. Diese Gene könnten als Resistenz- oder Sensitivitätsfaktoren für das Ansprechen von Tumorzellen gegenüber ART dienen. Dies ist denkbar für Gene, die Einfluss auf die ribosomale Aktivität, den Medikamenten-Transport, die zelluläre anti-oxidative Abwehr, Apoptose, Zellproliferation, den Zellzyklus etc. haben. Eine Untersuchung der zugrundeliegenden Signaltransduktionswege durch IPA deutete auf eine Rolle der Signalwege im Zusammenhang mit dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) und dem Tumorsuppressor p53. Andererseits gab es Gene ohne direkte funktionale Verbindung zur zellulären Antwort auf ART wie beispielsweise Gene die in dem Überleben der cochleären äußeren und inneren Haarzellen involviert sind. Wir stellten die Hypothese auf, dass ART die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren nachgeschaltete Gene, die in der Krebszellantwort gegenüber ART beteiligt sind. Dies würde die Identifizierung von Genen mit und ohne offensichtlichen Bezug auf die zytotoxische Aktivität von ART durch Microarray und COMPARE-Analysen erklären. Durch Analyse der Bindungsmotive für die Transkriptionsfaktoren c-Myc und Max stellten wir in der Tat fest, dass 53 von 56 Genen eine oder mehrere Bindungsstellen für c-Myc/Max in ihren Promotorsequenzen enthalten (s. Publikation im Appendix: Originalien). MYC codiert das Onkoprotein c-Myc, dass die Expression von ca. jedem sechsten humanem Gen reguliert und in der Zellproliferation, -differenzierung and Apoptose beteiligt ist. Max (myc-associated factor X) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor und gleichzeitig Kofaktor zu c-Myc. Viele Krebszellen beinhalten eine mutierte, permanent exprimierte Version von MYC. Dies führt zu unregulierter Umsetzung von vielen Genen, die in der Proliferation involviert sind. Wir schlussfolgerten, dass die c-Myc und Max-vermittelte transkriptionelle Kontrolle der Genexpression in der therapeutischen Wirkung von ART in Krebszellen beitragen könnte. Gleichwohl könnten auch unerwünschte Nebenwirkungen durch die Beeinflussung von therapiefremden Genen ausgelöst werden.

Wie bei herkömmlichen Chemotherapeutika, unterzogen wir auch ART einer Resistenztestung gegenüber Tumorzellen. Im zweiten Schritt war es unser Ziel die Mechanismen der Resistenz gegenüber ART zu verstehen. Dazu untersuchten wir in der zweiten Studie Determinanten der Sensitivität und Resistenz von Tumorzellen gegenüber ART. Zunächst haben wir die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50})

Werte für ART in 55 Zelllinien des Screening-Panels des Developmental Therapeutics Program des NCI bestimmt. Dieser Ansatz wurde angewendet, um neue Faktoren, die für das Ansprechen der Krebszellen auf ART verantwortlich sind zu bestimmen. Ein zweites Ziel war es, zu analysieren, ob klassische Determinanten der Resistenz gegen etablierte Chemotherapeutika ebenfalls eine Rolle in der ART-Resistenz spielen. Zu diesem Zweck haben wir Tumorsuppressor-Gene (p53, p^{16INK4a}), Onkogene (HPV-E6), anti-oxidative Stressantwort-Gene [Catalase (CAT); Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD)], sowie Multidrug Resistance-Transporter [P-glycoprotein (P-gp/ABCB1)] und das Brustkrebs Resistenzprotein (BCRP/ABCG2) in ihrem Einfluss gegenüber ART-Resistenz getestet.

Zusammenfassung

Zusammenfassend lieferte der Ansatz des "gene-hunting" mehrere neue Kandidatengene, die das Ansprechen der Krebszellen auf ART regulieren können. Die Ergebnisse müssen weiter untersucht werden, um den Beitrag dieser Gene für die Resistenz gegen ART zu beweisen. Im "candidate gene"-Ansatz untersuchten wir die Rolle von mehreren klassischen Resistenzmechanismen in Hinblick auf die Resistenz gegen. Der Tumorsuppressor p^{16INK4A} fungiert als Vermittler von Resistenz auch gegenüber ART. Der p53-Signalweg ist kein kritischer Faktor für die Entwicklung von Resistenzen gegen ART. Das Onkoprotein HPV-E6 wirkt sich auf das Ansprechen von Tumorzellen auf ART aus. Die Induktion der CAT-Expression nach ART Exposition auf Tumorzellen deutet auf eine Rolle dieses Proteins für die Entwicklung der ART-Resistenz. Die signifikante Korrelation zwischen ART und CAT wurde durch die dreidimensionale Modellierung der Bindung von ART an CAT mit der wahrscheinlichsten Position an vier Aminosäuren bestimmt.

In unserer Studie zeigte sich, dass ART kein Inhibitor der ATP-binding Cassette (ABC)-Transporter ABCB1 und ABCG2 ist. Obwohl ART spezifische inhibitorische Funktionen auf bestimmte ABC-Transporter aufweisen kann, trifft dies trotzdem nicht auf ein breites Spektrum der verschiedenen ABC-Transportern zu.

Unser Ansatz demonstrierte deutlich, dass das Ansprechen von Tumorzellen gegenüber ART multifaktoriell ist. Das Ansprechen wird einerseits durch die Genexpression, die mit der ART-Sensitivität und andererseits mit der ART-Resistenz

assoziiert ist, bestimmt. Zumindest sind ein Teil der funktionellen Gengruppen (z.B. Angiogenese-fördernde Faktoren, Zellwachstum- und Proliferation-assoziierte Gene, Signalgeber und Kinasen) auch im Ansprechen von Tumoren gegenüber Chemotherapie beteiligt. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob ART bei Rezidivtumoren wirkt und ob die identifizierten Gene in der vorliegenden Studie das klinische Ansprechen gegenüber ART bestimmen.

3.3. Neue Derivate des Polyphenols Curcumin

Curcumin (Diferuloylmethan) ist der aktive Bestandteil von *Curcuma longa* L. *Curcuma* gehört zur Familie der Ingwer (*Zingiberaceae*). *Curcuma longa* L. wird als Gewürz und Färbemittel in mehreren Lebensmitteln wie Curry, Senf, Kartoffelchips sowie in Kosmetika und Arzneimitteln verwendet. Curcumin wird seit Langem in der TCM gegen Bauchschmerzen und Gelbsucht verwendet. Es zeigt ein breites Spektrum an pharmakologischen Aktivitäten, wie z.B. anti-oxidative und entzündungshemmende Wirkungen. Curcumin weist insbesondere eine chemopräventive Wirkung gegen verschiedene humane Karzinome auf, da hohe Konzentrationen von Curcumin zytotoxisch wirken und Apoptose induzieren können. Dies könnte in der Onkologie therapeutische Anwendung finden. Klinische Phase I und II-Studien werden derzeit durchgeführt. Klassische Chemotherapien zeichnen sich durch Nebenwirkungen und die Entwicklung von Resistenzen aus. Die Entwicklung der Multidrug-Resistenz (MDR) ist ein großes Hindernis für viele bereits etablierter Zytostatika und wird durch mehrere ABC-Transporter vermittelt. Es hat sich gezeigt, dass *Curcuma longa* L. als Gewürz und sein isolierter Bestandteil Curcumin Modulatoren von Chemo- und Strahlentherapie von Tumoren sind. Es ist jedoch noch unbekannt, ob Tumorzellen in der Lage sind, Widerstand gegen Curcumin selbst zu entwickeln. Daher war das Ziel unserer Studie, Faktoren zu eruieren, die das Ansprechen von Tumoren auf Curcumin bestimmen. Zu diesem Zweck haben wir die Rolle der ABC-Transporter für die Resistenz gegen Curcumin und vier weiterer Curcumin-Derivate untersucht. Wir untersuchten die Kreuzresistenz von P-Glykoprotein und MRP1-überexprimierenden MDR-Tumorzellen gegenüber Curcumin. Im nächsten Schritt untersuchten wir die Kreuzresistenz von Curcumin auf vier Curcumin-Derivate und auf mehr als 1400 Standard-Medikamente des Developmental Therapeutics Program des NCI. Da die Reaktion von Tumorzellen auf zytotoxische Substanzen in der Regel multifaktoriell bestimmt wird, ist es nicht ausreichend ausschließlich ABC-Transporter zu analysieren. Durch die Verwendung von Microarray-basiertem mRNA Expression Profiling mittels COMPARE und hierarchische Clusteranalysen haben wir darüber hinaus untersucht, welche Gene mit der Sensitivität oder Resistenz der NCI-Zelllinien mit Curcumin korrelieren. Anschließend haben wir bioinformatisch die vermeintlich beteiligten Signaltransduktionswege identifiziert, die eine Rolle bei der Wirkung von Tumorzellen auf Curcumin spielen.

Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Untersuchung, dass Curcumin zuzüglich zur Fülle von Berichten über die chemopräventive Rolle eine zytotoxische Aktivität gegenüber Krebszellen aufweist. Die zytotoxische Aktivität verbesserte sich sogar mit den Curcumin-Derivaten. Ethoxycurcumin-trithiadiazolaminomethylcarbonat erwies sich als die wirksamste Verbindung in der vorliegenden Untersuchung. Es ist nicht nur die erhebliche zytotoxische Aktivität, es ist auch die fehlende Kreuzresistenz zu 1400 Standard-Medikamenten und Nichtbeteiligung in ABC-Transporter-vermittelter Multidrug-Resistenz, die diese Klasse von Verbindungen zu einem interessanten Kandidaten für die Onkologie macht. Die mRNA-basierten Microarray- und COMPARE-Analysen wiesen auf bestimmte Gene als Determinanten der Sensitivität und Resistenz gegenüber Curcumin hin. Diese könnten als Biomarker nützlich sein, um zukünftig individuell abgestimmte Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Aus ernährungsphysiologischer Sicht bietet *Curcuma longa* ein interessantes Forschungsgebiet, ob es, als Gewürz verwendet, das Tumor-Ansprechen auf Chemotherapie bei onkologischen Patienten verbessern kann.

3.4. Ätherische Öle

Salvia officinalis L. (Salbei) und *Thymus vulgaris* L. (Thymian) gehören zur Familie der Lippenblütler, *Lamiaceae*. Interessanterweise bedeutet das lateinische Wort *Salvia* "heilen". Verschiedene Extrakte aus *Salvia* Arten haben antihydrotische, antibakterielle, antimykotische, antivirale, krampflösende und blutzuckersenkende Eigenschaften.

In der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (HNO) wird der Salbei bei der Behandlung von Entzündungen und Infektionen der Hals- und Mundschleimhäute wie Stomatitis, Gingivitis und Pharyngitis geschätzt. Die Wirksamkeit von *Salvia* ist vor allem durch den hohen Gehalt an ätherischen Ölen und Gerbstoffen (Tanninen) erklärt. Die meisten biologischen Effekte des Salbeis rühren von den Inhaltsstoffen des ätherischen Öls, wie Cineol, Borneol und Thujon. Ätherisches Thymian-Öl und dessen Leitsubstanz Thymol haben antimikrobielle, antimykotische und antioxidative Eigenschaften. In der Allgemeinmedizin wird Thymian als schleimlösendes Mittel bei Infektionen der oberen Atemwege, wie z.B. der Bronchitis und dem Keuchhusten eingesetzt. In der Zahnheilkunde wird Thymol als antiseptischer Hauptwirkstoff in Mundspülungen gegen Gingivitis verwendet.

Krebshemmende Wirkung wurden den Pflanzen der Gattung *Salvia* aus der Familie der *Lamiaceae* ebenfalls zugeschrieben. Das wachstumshemmende Potenzial von ätherischen Ölen der Gattung *Salvia* wurde wiederholt bei Nieren-Ca, Glioblastom-, Darm- und Prostatakarzinom-Zelllinien bestätigt. Beim chemotherapie-resistentem Ovarialkarzinom konnte die zytotoxische Aktivität von ätherischem Thymian-Öl festgestellt werden.

Levisticum officinale W.D.J. Koch (Liebstöckel) gehört zur Familie der Doldenblütler, *Apiaceae*. Liebstöckel findet seit Jahrhunderten als Heilpflanze Anwendung gegen Blähungen, ist krampflösend und hat harntreibende Wirkung. Klinisch ist es ein potentes Diuretikum. Es wurde von der deutschen Kommission E für den Einsatz bei Infektionen der unteren Harnwege und Harngrieß genehmigt. *L. officinale* Ethanol-Extrakte haben in Leukämie-Zelllinien Apoptose-induzierende Aktivität gezeigt.

Das Ziel unserer Studien war eine mögliche Zytotoxizität der drei Heilpflanzen auf eine menschliche HNSCC-Zelllinie, UMSCC1 - ursprünglich von einem männlichen Patienten mit einem T2 N0 M0 Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle -

zu evaluieren. Die chemische Charakterisierung der ätherischen Öle wurde mittels Gaschromatographie durchgeführt. Um Einblick in die molekulare Wirkungsweise der jeweiligen ätherischen Öle auf Krebszellen zu bekommen, wurde ein microarray-basiertes mRNA Expressionsprofiling durchgeführt. Differenziell exprimierte Gene wurden einer Signalweg Analyse mittels eines bioinformatischen Ansatzes (Ingenuity Pathway Analysis, IPA) unterzogen. Dieses Verfahren dient dazu biologische Funktionen und Erkrankungen mit experimentellen Ergebnisse zu verbinden und molekulare Zusammenhänge zu visualisieren.

Die Details zu Material und Methoden der drei Studien sind im Appendix: Originalien zu finden.

Wir bestätigen unsere Hypothese, dass alle drei ätherischen Öle von Heilpflanzen zytotoxisches Potenzial auf die HNSCC-Zelllinie UMSCC1 haben. Ein überraschender, aber wiederholt beobachteter Effekt war, dass subtoxische Konzentrationen aller drei ätherischen Öle Zellproliferation stimulierten. Bei höheren Konzentrationen zeigten sich dosisabhängige zytotoxische Effekte. Vergleichbare Effekte sind bisher für Standard-Chemotherapeutika wie Doxorubicin berichtet worden. Die proliferationsstimulierende Wirkung einer sonst zytotoxischen Verbindung könnte als eine Abwehrmaßnahme der Karzinomzellen interpretiert werden. Bei niedrigen subtoxischen Konzentrationen, schützen sich Krebszellen vor schädlichen Stimuli durch die Induktion der Proliferation, während bei höheren Konzentrationen dieser Abwehrmechanismus durch die zytotoxischen Effekte überfordert wird. Anzumerken ist, dass der XTT-Assay zwar normalerweise stark mit der Zellzahl korreliert, *de facto* aber nicht die Zellzahl, sondern im Wesentlichen deren mitochondriale Dehydrogenaseaktivität erfasst. Aktive Transportprozesse beim Herausschleusen der Xenobiotika könnten daher bis zu einem Schwellenwert die metabolische Aktivität der Zellen und damit die Werte für die Zellvitalität (XTT-Assay) deutlich erhöht haben. Die Möglichkeit, dass zytotoxische Verbindungen wie Doxorubicin oder o.g. ätherische Öle proliferationsfördernde Aktivität bei niedrigen Konzentrationen ausüben können, sollte nicht unberücksichtigt bleiben.

Das zytotoxische Potenzial aller drei Pflanzenextrakte wirft unweigerlich die Frage, auf, welche wirksamen Bestandteile sie haben. Hierzu wurden die Hauptbestandteile der Pflanzenextrakte gaschromatographisch aufgetrennt und identifiziert.

Die Microarray-Technologie ermöglicht einen Blick auf die komplexe zelluläre Antwort auf den Reiz der getesteten ätherischen Öle auf der Ebene der Genaktivität, von denen in unseren Studien die jeweils am stärksten regulierten diskutiert werden.

Unsere Daten zeigen, dass die Wirkung des ätherischen Öls von *Levisticum officinale* auf die UMSCC1 Zellen durch mehrere Gene und ein komplexes regulatorisches Netzwerk reguliert wurde. Die runterregulierten Gene zeigten keine Assoziation mit einer krebshemmenden Aktivität. Bisher wurden noch keine Daten über mögliche Mechanismen der Zytotoxizität von *Levisticum officinale* berichtet. Im Rahmen der vorliegenden Signalweg Analysen waren die ERK5- und ILK Signalwege sowie das Eindringen von Viren *via* Endozytose und der p53-Signalweg die vier signifikant geregelten Wege durch *L. officinale*. ERK5, aus der MAPK-Familie, ist in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und wird durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und zellulärem Stress aktiviert. Der ERK5-Signalweg ist in Endothelzellen essenziell zur Verhinderung der Apoptose und reguliert die Tumor-Angiogenese und Zellmigration. Der Einfluss von *L. officinale* auf den ERK5 Signalweg und damit auf die Tumor-Angiogenese könnte einen neuartigen Angriffspunkt in der Krebs-Therapie bieten.

Interessanterweise regulierte in UMSCC1 Zellen das ätherische Öl von *L. officinale* signifikant einen der wichtigsten Tumor-Suppressor-Signalwege, den p53 Signalweg. Das Tumorsuppressor-Protein p53 wird, beispielsweise aufgrund eines DNA-Schadens, einer Nukleotid-Depletion oder Hypoxie aktiviert und initiiert die Transkription von pro-apoptischen und zellzyklusarretierenden Zielgenen. Liebstöckel könnte die Aktivität von p53 durch post-translationale Modifikationen regulieren.

Die Behandlung von UMSCC1-Zellen mit *Salvia officinalis* hat gleichzeitig mit dem p53-Signalweg einen der prominentesten Tumorsuppressor-Signalwege aktiviert. Dieser wird meist unter Bedingungen wie DNA-Schädigung, Nukleotidmangel oder Hypoxie ausgelöst. Die Zielgene von p53 sind proapoptisch und hemmen die Zellzyklusprogression.

Zusammenfassung

Abschließend präsentieren wir erstmals Daten über die molekulare Wirkungsweise von Salbei, Liebstöckel und Thymian in menschlichen Oropharynxkarzinom-Zellen. Ätherische Öle von Salbei, Thymian und Liebstöckel haben die Fähigkeit, das Zellwachstum von UMSCC1 Tumorzellen bei hohen Konzentrationen zu hemmen, während sie die Proliferation bei subtoxischen Dosen fördern. In der Microarray-Genexpressionsanalyse wurden vorrangig Gene identifiziert, die in Krebs, Zellwachstum und -proliferation, Zelltod, Zellmorphologie, Zellzyklus, Genexpression und DNA-Reparatur beteiligt sind. Die drei deutlich signifikant durch Salbei geregelten Signalwege waren die Arylhydrocarbon-Signaltransduktion, Zellzyklus (G1/S-Checkpoint) Regulierung und der p53-Signalweg. Gene, die im Interferon-Signalweg, in der N-Glycan Biosynthese und im extrazellulärem signalreguliertem kinase 5 (ERK5) Signalweg beteiligt sind, sind mit der Zytotoxizität von ätherischem *Thymus vulgaris* Öl assoziiert. Gene, die in dem ERK5-Signalweg, dem Integrin-linked-kinase (ILK)-Signalweg, dem Eindringen von Viren *via* Endozytose und dem p53-Signalweg beteiligt sind, sind mit der Zytotoxizität von ätherischem Öl aus dem Blatt von *L. officinale* assoziiert. Die ätherischen Öle von *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* und *Levisticum officinale* stellen somit einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dieser Naturprodukte auf das Plattenzellkarzinom im Bereich der Mundhöhle dar. Der Nachweis der Wirksamkeit und Verträglichkeit *in vivo* steht allerdings noch aus, so dass keine Anwendungsempfehlungen beim Krebs der Mundhöhle gegeben werden können.

4. Liste der Originalien für die Habilitation

1. [Factors determining sensitivity or resistance of tumor cell lines towards artesunate.](#)
Sertel S, Eichhorn T, Sieber S, Sauer A, Weiss J, Plinkert PK, Efferth T.
Chem Biol Interact. 2010 Apr 15;185(1):42-52. Epub 2010 Feb 6.
2. [Pharmacogenomic identification of c-Myc/Max-regulated genes associated with cytotoxicity of artesunate towards human colon, ovarian and lung cancer cell lines.](#)
Sertel S, Eichhorn T, Simon CH, Plinkert PK, Johnson SW, Efferth T.
Molecules. 2010 Apr 22;15(4):2886-910.
3. [Molecular docking and pharmacogenomics of vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine.](#)
Sertel S, Fu Y, Zu Y, Rebacz B, Konkimalla B, Plinkert PK, Krämer A, Gertsch J, Efferth T.
Biochem Pharmacol. 2011 Mar 15;81(6):723-35. Epub 2011 Jan 8.
4. [Cytotoxicity of Thymus vulgaris essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma.](#)
Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T.
Anticancer Res. 2011 Jan;31(1):81-7.
5. [Chemical Composition and antiproliferative activity of essential oil from the leaves of a medicinal herb, Levisticum officinale, against UMSCC1 head and neck squamous carcinoma cells.](#)
Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T.
Anticancer Res. 2011 Jan;31(1):185-91.
6. [Pharmacogenomic determination of genes associated with sensitivity or resistance of tumor cells to curcumin and curcumin derivatives.](#)
Sertel S, Eichhorn T, Bauer J, Hock K, Plinkert PK, Efferth T.
J Nutr Biochem. 2011 Aug 22. [Epub ahead of print]
7. [\[Anticancer activity of Salvia officinalis essential oil against HNSCC cell line \(UMSCC1\).\]](#)
Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T.
HNO. 2011 Sep 7. [Epub ahead of print] German.

5. Literaturnachweis

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen tiefsten Dank und Respekt meinem wissenschaftlichen Lehrer und Freund Prof. Dr. Thomas Efferth, Lehrstuhlinhaber für Pharmazeutische Biologie am Institut für Pharmazie und Biochemie an der Universität Mainz, für seine herausragende Unterstützung während meiner akademischen Laufbahn aussprechen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. h.c. Peter K. Plinkert, meinem akademischen und klinischen Lehrer. Er hat mir die einzigartige Möglichkeit gegeben, diese Arbeiten durchzuführen. Durch seine maßgebliche Unterstützung wurden diese Ideen realisierbar.

Ganz besonders möchte ich meinem Freund Dr. Hiroshi Nakagawa von der Abteilung für Angewandte Biologische Chemie am Institut für Biowissenschaften und Biotechnologie an der Chubu Universität aus Kasugai in Japan danken. Seine zahlreichen Ratschläge in praktischer Laborarbeit und seine exemplarische Geduld haben mich gelehrt zielgerichtet voranzugehen.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinem Freund Dr. Tolga Eichhorn von der Abteilung für Pharmazeutische Biologie am Institut für Pharmazie und Biochemie an der Universität Mainz. Seine Unterstützung und geduldige Beantwortung all meiner Fragen sind von unschätzbarem Wert.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Gerd Fricker vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie an der Universität Heidelberg für die freundliche Aufnahme in sein Labor.

Abschließend möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken, die mich sehr motiviert und unterstützt haben.

Appendix: Originalien