

Molekulare Forschungsansätze zur Vorbeugung von Krebserkrankungen (Chemoprävention)



► Prof. Dr. Helmut Bartsch



► Dr. C. Gerhäuser



► Dr. J. Nair

Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Heidelberg

Einleitung

Die Vorbeugung von Krebserkrankungen durch Pharmaka, Natur- und Nahrungs-inhaltsstoffe (Krebs-Chemoprävention) gewinnt als gering belastete Interventionsstrategie bei der Krebsbekämpfung zunehmend an Bedeutung (Sporn und Suh, 2002). Mehrere Gründe sprechen dafür: z. B.

1. bietet die Krebschemoprävention ein breiteres Zeitfenster zum prophylaktischen Eingreifen als die antineoplastische Therapie von Tumoren,
2. die zunehmende Erkenntnis molekularer Targets und das Verständnis, wo und wie präventive Substanzen und Vakzine in den Mehrstufenprozess der Krebsentstehung eingreifen und somit das Krebswachstum verlangsamen, hemmen oder gar rückgängig machen und
3. es stehen große Bevölkerungsgruppen für chemopräventive Interventionen zur Verfügung: Patienten über 60 Jahre mit hoher Inzidenzrate von kolorektalen Adenomen, ältere Männer mit latenter Prostatakrebs, ca. 12 % aller Frauen entwickeln Brustkrebs und über 25 % der Bevölkerung sind Zigarettenraucher (Vainio, 2002).

Fortschritte in der Krebsvorbeugung durch Pharmaka und Naturstoffe sind daher hauptsächlich von drei Forschungsgebieten zu erwarten:

1. Isolierung und Charakterisierung neuer protektiver Wirkstoffe mit niedriger Langzeittoxizität,
2. Validierung krebs-prädikativer Bio(Surrogat-)marker zur Voraussage der pharmakologischen Wirksamkeit der Substanzen und weit am dringendsten
3. die Durchführung mehr klinischer Interventionsstudien zur Erfassung der prophylaktischen Wirksamkeit, z. B. in Patienten mit Präneoplasien und später an größeren Populationen, die Krebsrisikofaktoren ausgesetzt sind. Zu diesen Themen sind wie folgt einige Beispiele angeführt.

Identifizierung neuer chemopräventiver Verbindungen in einer Batterie von Testsystemen Die Krebsentstehung, die grob in die Initiations-, Promotions-, und Progressionsphase unterteilt wird, kann als kontinuierliche Anhäufung von genetischen oder biochemischen Zellschäden angesehen werden. Zur Identifizierung und Beurteilung neuer krebs-chemopräventiver Naturstoffe und synthetischer Verbindungen wurden in den Schwerpunktbereichen Metabolismus, Antioxidantien, Hemmung der Tumorpromotion, der Zellproliferation und von Entzündungsprozessen verschiedene Testmodelle als Markersysteme für chemopräventive Aktivität im Labor etabliert (Gerhäuser et al, 2003). Diese Modelle, die meist mit Enzympräparationen oder in Zellkultur durchgeführt werden, ermöglichen die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben in 1–3 Tagen, ohne dass wie im High-Throughput-Screening die Kontrolle über substanzspezifische Charakteristika verloren geht. Vorteile sind ein geringer Substanzbedarf, einfache Durchführung, vergleichbar geringe Kosten, und die Generation von Daten in computerisierter Form, die eine schnelle, halbautomatische Auswertung der Ergebnisse ermöglichen. Als Brücke zwischen Kurzzeit-in-vitro- und Langzeit-in-vivo-Modellen wurde von uns ein Maus-Brustdrüsen-Organkulturmodell (Mouse Mammary Gland Organ Culture Model, MMOC) eingesetzt. Diese Kombination ermöglicht die Auswahl der erfolg-

versprechendsten Substanzen für in-vivo-Untersuchungen.

Krebs-chemopräventive Wirkung von Xanthohumol (XN), ein prenyliertes Chalcon aus Hopfen (*Humulus lupulus L.*)

Hopfen ist eine reiche Quelle an phenolischen Verbindungen im Bier. Der Anteil an Polyphenolen im Hopfenharz besteht aus Phenolkarbonsäuren, prenylierten Chalconen und Flavonoiden, Catechinen und Proanthocyanidinen. In früheren Untersuchungen wurden antioxidative, anti-proliferative und cytotoxische Effekte beschrieben. Daraufhin wurde ein Hopfenextrakt in den oben beschriebenen Testsystemen analysiert. Eine anschließende aktivitätsge-

Chemische Strukturen ausgewählter Hopfeninhaltsstoffe



Hopfen
(*Humulus lupulus*)

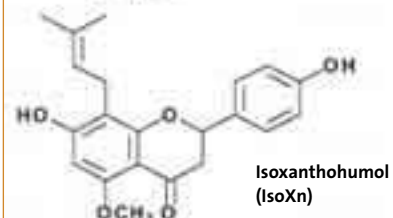
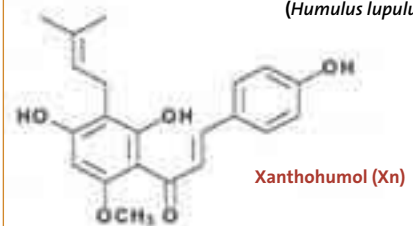


Abb. 1: Die potentielle chemopräventive Wirkung von polyphenolischen Bierinhaltsstoffen, wie das Xanthohumol (XN) und Isoxanthohumol aus Hopfen, wurde in Zusammenarbeit mit A. Alt und H. Becker, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, untersucht.

leitete Fraktionierung führte zur Identifizierung von Xanthohumol (XN) als aktivster Verbindung und einer Reihe von strukturverwandten Substanzen (Abb. 1). Wir konnten zeigen, dass XN in der Initiations-, Promotions- und Progressionsphase in die Krebsentstehung eingreifen kann (Gerhäuser et al, 2002) (Abb. 2). Zunächst wurde XN als Radikalfänger untersucht und konnte Hydroxyl-, Peroxyl- und Superoxidanion-Radikale besser als Trolox inaktivieren. Eine Hemmung der Tumor-Initiation durch Modulation der Aktivität von Enzymen des Phase-1- und -2-Fremdstoffmetabolismus konnte bestätigt werden. Erstmals konnte

eine entzündungshemmende Wirkung von XN nachgewiesen werden. XN hemmt die Aktivität der konstitutiv exprimierten Cox-1, aber auch der induzierbaren Cox-2, und verhinderte in LPS-stimulierten Raw Makrophagen die Induktion der iNOS und Produktion von NO. Zellwachstumshemmende Wirkung konnte anti-östrogenen Eigenschaften, der Hemmung der DNA-Polymerase α und einer Induktion von Apoptose und Zell-Differenzierung zugeschrieben werden. Als erster Nachweis einer chemopräventiven Wirksamkeit wurde XN im MMOC-Modell untersucht und verhinderte das Auftreten DMBA-induzierter Läsionen im nanomolaren Bereich. In-vivo-Untersuchungen an Ratten konnten zeigen, dass XN in Dosen bis 1 g/kg Körpergewicht p. o. gut verträglich ist. In Studien zur Bioverfügbarkeit wurde bei dieser Dosis vier Stunden nach Applikation im Plasma eine Maximalkonzentration von 0.34 μM gemessen. Als Hauptmetabolit wurde Xanthohumol-4'-O-Glucuronid identifiziert. Weitere Untersuchungen zum Nachweis chemopräventiver Mechanismen in-vivo zeigten, dass XN im Unterschied zu Tamoxifen ein reines Anti-Östrogen darstellt. Wir konnten zeigen, dass XN die Proliferation von Brust- und Darmkrebszellen in-vitro hemmt. Dies war mit der Induktion von Apoptose (programmierter Zelltod) verbunden. XN aktivierte sowohl den To-

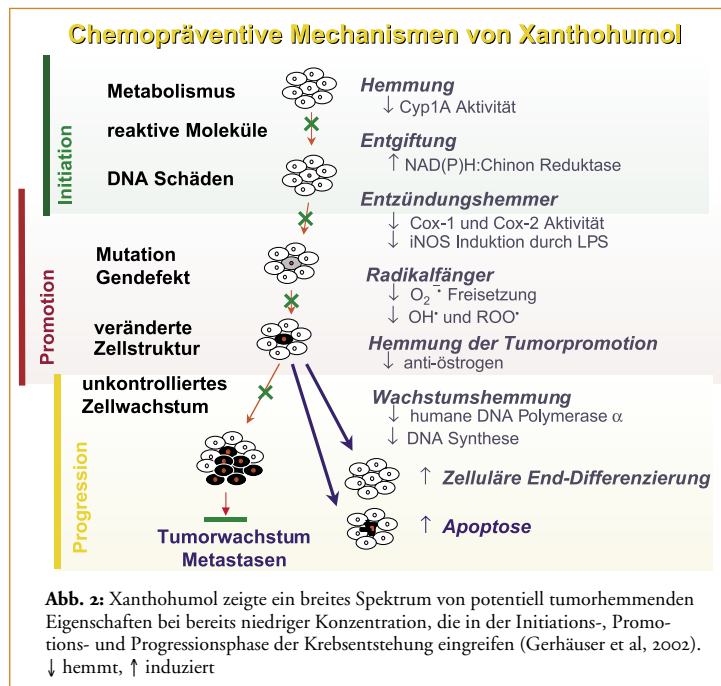


Abb. 2: Xanthohumol zeigte ein breites Spektrum von potentiell tumorhemmenden Eigenschaften bei bereits niedriger Konzentration, die in der Initiations-, Promotions- und Progressionsphase der Krebsentstehung eingreifen (Gerhäuser et al, 2002).
 ↓ hemmt, ↑ induziert

desrezeptor Weg und Caspase 8 als auch den mitochondrialen Weg über Caspase 9. Beide Wege führten zu einer Aktivierung der nachfolgenden Effektorcaspasen 3 und 7 und zu einer Spaltung der Poly (ADP-Ribose) Polymerase [PARP] (Pan et al, Manuskript in Vorbereitung). Die Hemmung der Angiogenese, d. h. der Bildung neuer Blutgefäße zur Tumorversorgung aus dem bestehenden Gefäßsystem, bietet neue Angriffsmöglichkeiten im Bereich der Krebstherapie und wahrscheinlich auch in der Chemoprävention. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass chemopräventive Agenzien wie Resveratrol oder Curcumin auch antiangiogene Wirkung zeigen und das Kapillarwachstum reduzieren. Diese „Angioprävention“ beruht auf dem Zusammenspiel einiger Faktoren, die auch Angriffspunkte in der klassischen Krebs-Chemoprävention darstellen, wie z. B. Stickstoffmonoxid als Produkt der induzierbaren NO-Synthase oder Prostaglandine, die durch Cyclooxygenasen gebildet werden. Unter Verwendung von Gefäßen aus humanen Plazenten haben wir ein in-vitro-Anti-Angiogenese-Testmodell etabliert und damit das angiopräventive Potential verschiedener potentieller chemopräventiver Substanzen untersucht (Bertl et al, 2004a). XN hemmte die Neubildung der Mikrokapillaren dosisabhängig, wobei ein IC₅₀ von 2.2 μM ermittelt wurde. Zur Aufklärung von Wirkungsmechanismen setzten

wir humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) ein und untersuchten die Wirkung von XN auf die Proliferation, Migration und Differenzierung der Endothelzellen. XN war im μM -Bereich aktiv (Bertl et al, 2004b, 2005).

Zusammenfassend zeigte XN ein überraschend breites Spektrum von potentiell tumorhemmenden Eigenschaften. Es wirkte bei bereits niedrigen Konzentrationen antioxidativ, antimutagen und konnte die Tumorpromotion hemmen. Daneben erwies es sich als antiproliferativ, antiangiogen und pro-apoptotisch, womit durch die letzte Eigenschaft geschädigte

Zellen z. B. in Krebsvorstufen effizienter eliminiert werden können (Übersicht in Gerhäuser, 2005). Nach diesen aussichtsreichen präklinischen Ergebnissen bedarf es jetzt der Durchführung von klinischen Interventionsstudien, die den praktischen Nutzen und die Effizienz der chemopräventiven Substanz(en) bei Risikogruppen in der Allgemeinbevölkerung und bei Patienten mit Krebsvorstufen (Brust, Kolorektum) belegen. Dafür besteht gegenwärtig in Europa großer Nachhol- und Handlungsbedarf (Gescher et al, 2003).

Neue Biomarker in der Krebspräventionsforschung

Ein weiteres Forschungsziel ist die Entwicklung und Validierung krebsprädiaktiver, für Interventionsstudien nutzbarer, Bio(Surrogat-)marker, insbesondere für schwer zugängliche Gewebspräneoplasien. Da solche prädiaktive Surrogatmarker bereits in frühen Stadien der Krebsentstehung, also bei bereits vorhandenen Gewebspräneoplasien eingesetzt werden können, gelingt es oft, die Wirksamkeit chemopräventiver Substanzen in ungleich kürzerer Zeit, kosteneffizienter und an kleinen Studienkollektiven nachzuweisen bzw. wahrscheinlich zu machen. Danach lassen sich oft größere Interventionsstudien mit der Hemmung des Krebswachstums als Endpunkt besser rechtfertigen und planen.

Erhöhtem oxidativen Stress und Lipidperoxidation (LPO) werden heute wichtige Rollen bei der Tumorpromotion und -progression zugeschrieben. Wir und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Bildung spezifischer oxidativer Schäden in der DNA eine der frühesten messbaren Veränderungen der Zelle darstellt. Werden diese nicht repariert, tragen sie zu genomischer Instabilität und Krebswachstum bei. Somit könnten diese oxidativen DNA-Marker wertvolle frühe Hinweise auf die Pathogenese z. B. von chronischen entzündlichen Erkrankungen geben, was durch unsere Vorarbeiten in humanem prämaligmen Gewebe, z. B. bei chronischer Pankreatitis, Leberzirrhose und entzündlichen Darmerkrankungen bereits gestützt wird (Bartsch und Nair, 2004). Die von uns untersuchten oxidativ veränderten DNA-Basen zeigten einen Anstieg bereits in frühen vorgeschädigten Stadien bis hin zur Gewebspräneoplasie. Diese mutationsauslösenden Veränderungen in der DNA, die durch persistierenden oxidativen Stress entstehen, lassen sich nach DNA-Reparatur auch im Harn als modifizierte Desoxynucleoside nachweisen und können somit nicht-invasiv gemessen werden. Als Biomarker untersuchen wir den „steady state level“ mehrerer endogen gebildeter DNA-Addukte, die aus Hydroxynonenal (HNE) und Malondialdehyd (MDA) entstehen,

also aus LPO-Endprodukten der Arachidon- und Linolsäure gebildet werden. MDA wird außer durch LPO auch enzymatisch über den COX-/LOX-vermittelten Stoffwechsel generiert (Abb. 3). Für drei exozyklische Addukte haben wir nachweisempfindliche Analysemethoden entwickelt und validiert (Bartsch und Nair, 2000; Sun et al, 2004). Analysen erfolgen durch Immunaффinitäts-³²P-Postmarkierung in Gewebeproben, über immunhistochemische Detektierung in Biopsien und im Harn ausgeschiedene Desoxynucleoside, z. B. von Ethenodesoxyadenosin (εdA), durch Immunanreicherung und HPLC-Fluoreszenzdetektierung. Zwei Beispiele für die Anwendbarkeit dieser Methoden zur Detektierung von exozyklischen DNA-Schäden bei Alkohol- und HBV-assoziierten Lebererkrankungen seien hier angeführt. Nadelbiopsien aus der Leber von Patienten mit alkoholbedingten Lebererkrankungen wurden auf diese oxidativen DNA-Schäden (εdA) immunhistochemisch untersucht (Frank et al, 2004). Die Prävalenz positiv gefärbter Zellkerne lag, verglichen mit asymptomatischen Lebern, signifikant höher in der alkoholbedingten Fettleber und war am höchsten im zirrhotischen und fibrotischen Gewebe. Die Leberwerte für Morbus Wilson und für Haemochromatose waren ähnlich hoch wie bei Alkohol-induzierter Zirrhose/Fibrose.

Harnproben von HBV-infizierten thailändischen Patienten mit chronischer Hepatitis, Zirrhose und hepatozellulärem Karzinom wurden mit asymptomatischen HBsAg-Trägern verglichen. Die Mittelwerte für εdA-Spiegel in diesen Patienten lagen im Vergleich zu Kontrollen um 20- bis 90-fach höher (Bartsch und Nair, 2004). Mit diesen Ergebnissen haben wir zum ersten Mal durch Alkoholmissbrauch oder HBV-Infektion ausgelöste stark miskonformierende DNA-Läsionen in der Leber nachgewiesen, die alle wahrscheinlich an der Entwicklung von Leberkrebs aus Zirrhose-/Fibrose-Vorstufen beteiligt sind. Derzeit verfolgen wir zwei Kernfragestellungen, die von klinischer Relevanz sein dürften:

1. Können die Adduktspiegel (z. B. von εdA im Urin gemessen) den Krankheitsverlauf ausgehend von Krebsvorstufen bis zur malignen Entartung voraussagen? Sollten die DNA-Adduktmarker mit anderen molekularpathologischen und klinischen Indikatoren korrelieren, so könnten damit möglicherweise Risikopatienten in frühen Stadien identifiziert werden.
2. Kann mit diesen Markern die Effizienz therapeutischer und chemopräventiver Interventionen während des Krankheitsverlaufes überprüft werden? Solche Forschungsprojekte mit klinischer Zusammenarbeit sind bereits bei uns angelaufen.

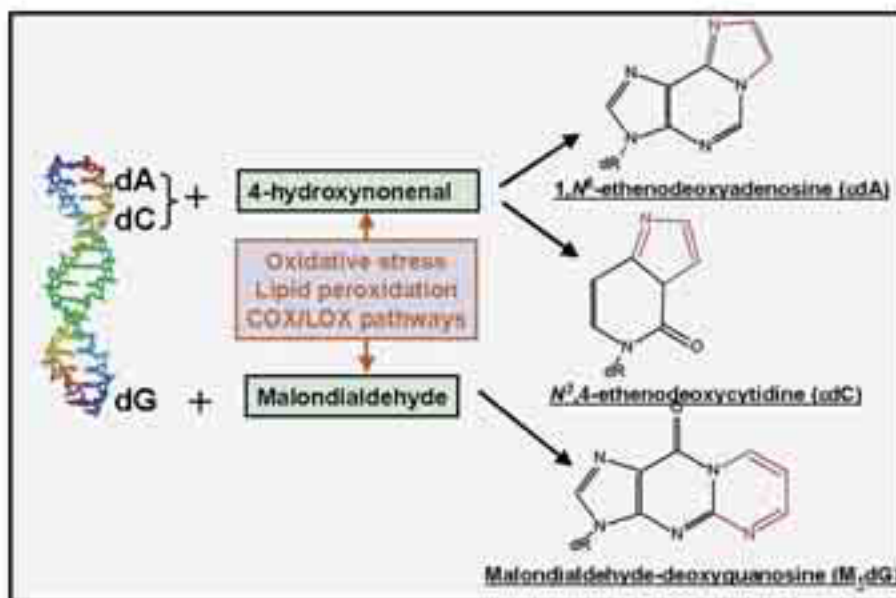


Abb. 3: Bildung von exozyklischen (Etheno)-DNA-Addukten aus 4-Hydroxynonenal (HNE) und M₁dG aus Malondialdehyd (MDA), die durch oxidativen Stress in der Säugetierzelle aus Linol- und Arachidonsäure gebildet werden und auch beim Menschen nachgewiesen wurden. Anhäufung solcher promutagener DNA-Läsionen trägt zu genetischer Instabilität bei, die den Übergang von gutartigen in bösartige Zellen vorantreibt (Bartsch und Nair, 2000).

Therapeutische Interventionen bei Patienten mit aggressiven oralen Leukoplakien

Das letzte Beispiel bezieht sich auf den Einsatz eines zytogenetischen Markers, des DNA-Aneuploidie-Status von Zellen aus aggressiven oralen Leukoplakien, der erstaunlicherweise hochsignifikante Voraussetzungen zur individuellen Krebsanfälligkeit zulässt und der bereits in einer angelaufenen Interventionsstudie eingesetzt wird (Übersicht in Sudbo and Reith, 2005). Die von Sudbo et al. (2001) verbesserte Messmethode für den Aneuploidie-Status besteht aus der Isolierung von Zellkernen aus dysplastischen Bereichen von Mundhöhlenbiopsien der Leukoplakie-Patienten. Die Analyse erfolgt durch automatisierte hochauflösende Zytometrie und erlaubt die Klassifizierung der Zellen nach DNA-Gehalt mit aneuploider, tetraploider und mit normal

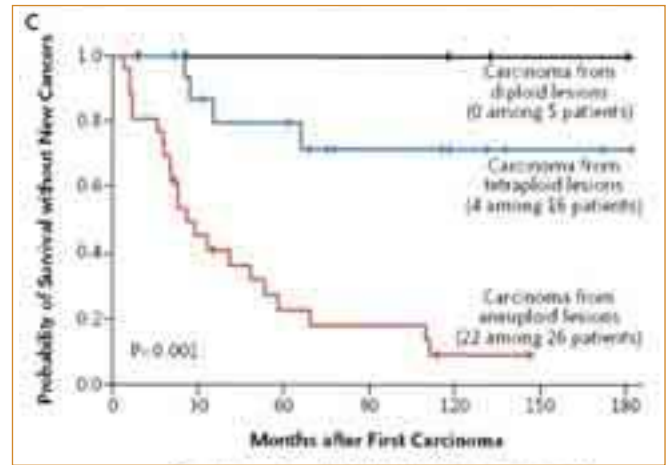
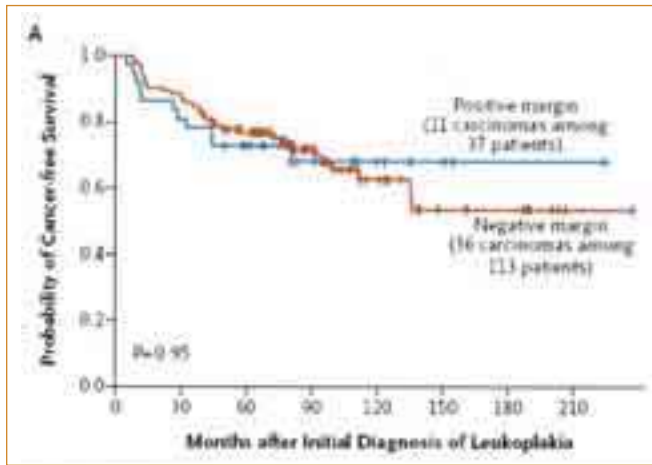


Abb. 4: Kaplan-Meier-Kurven zur Bildung von Karzinomen der Mundhöhle aus oralen Leukoplakien
 A) Tumorfreie Überlebenskurven nach Leukoplakien-Resektion aufgeteilt nach ‚Margin status‘.
 C) Überlebenskurven (ohne neue Tumore) von 47 oralen Primärtumorpatienten, unterteilt nach Ploidiestatus der vorausgegangenen Leukoplakien in diploid, tetraploid und aneuploid (entnommen aus Sudbo und Reith, 2005 mit Genehmigung von Wiley-Liss, Inc. A. Wiley Company).

diploider Verteilung. Während das klassische Histologie-„Grading“ von Leukoplakien keine prognostische Aussage erlaubte (Abb. 4a), entwickelten ca. 90% der aneuploiden Leukoplakiepatienten maligne Tumore und starben daran: die 5-Jahres-Sterberate betrug 72% (Übersicht Reith und Sudbo, 2002). Dies ist hier durch die Kaplan-Meier-Überlebenskurven ohne maligne Erkrankung illustriert (Abb. 4c). Leukoplakien mit normal diploiden Zellen unterscheiden sich signifikant von solchen mit aneuploiden Läsionen (Sudbo et al, 2004). Diese Autoren konnten also zeigen, dass selbst eine komplette Resektion von aggressiven, aneuploiden Leukoplakien nicht lebenserhaltend ist. Somit bedürfen diese Patienten einer neuartigen präventiven Intervention, welche in diesem Kontext einer Krebstherapie gleichkommt. Die Rekrutierung für eine solche Interventionsstudie ist angelaufen (Sudbo und Reith, 2005). Dabei wird der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib und ein EGF-Rezeptor-Thyrosinkinase-Inhibitor (EKB 569) allein oder in Kombination oder ein Placebo gegeben. Damit sollen mehrere fehlerhafte Signaltransduktionswege, die an der Entstehung maligner Zellfunktionen beteiligt sind, getroffen werden. In dieser randomisierten prospektiven Studie wird als Endpunkt die Inzidenzrate von neuen Mundhöhlenkarzinomen gemessen. Sollte diese prophylaktische/therapeutische Intervention Erfolge verzeichnen, wäre das ein erstes Beispiel für eine zunehmende Überlappung von präventiven Interventions- und Tumortherapieansätzen, nämlich durch die Behandlung einer zytogenetisch

definierten Hochrisikogruppe von Patienten mit Präkanzerosen mit Krebstherapeutika, wie z. B. Tyrosinkinase-Inhibitoren. Mehr solcher randomisierter Studien sind nun gefordert.

Literatur

Bartsch H, Nair J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detect. Prev.* (2004) 28, 385-391.

Bartsch H, Nair J. Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress. *Toxicology* (2000) 153, 105-114.

Bertl E. Inhibition of angiogenesis by potential cancer chemopreventive agents - establishment of a human in vitro anti-angiogenesis assay and mechanistic evaluation of potent inhibitors. Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2005).

Bertl E, Klimo K, Heiss E, Klenke F, Peschke P, Becker H, Eicher T, Herhaus C, Kapadia G, Bartsch H, Gerhäuser C. Identification of novel inhibitors of angiogenesis using a human in vitro anti-angiogenesis assay. *Intern. J. Cancer Prev.* (2004a) 1, 47-61.

Bertl E, Becker H, Eicher T, Herhaus C, Kapadia G, Bartsch H, Gerhäuser C. Inhibition of endothelial cell functions by novel potential cancer chemopreventive agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004b) 325, 287-295.

Frank A, Seitz HK, Bartsch H, Frank N, Nair J. Immunohistochemical detection of 1,N6-ethenodeoxyadenosine in nuclei of human liver affected by diseases predisposing to hepato-carcinogenesis. *Carcinogenesis* (2004) 25, 1027-1031.

Gerhäuser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer, Special Issue* (2005) in press.

Gerhäuser C, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauff J, Liu GY, Sithimonchai S, Frank N. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* (2003) 523-524, 163-172.

Gerhäuser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, Neumann I, Scherf HR, Frank N, Bartsch H, Becker H. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.* (2002) 1, 959-969.

Gescher AJ, Sharma RA, Steward WP. Cancer prevention and delay are as important as cure. *Lancet Oncol.* (2003) 4, 72-73.

Reith A, Sudbo J. Impact of genomic instability in risk assessment and chemoprevention of oral premalignancies. *Int. J. Cancer* (2002) 101, 205-209.

Sporn MB, Suh N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat. Rev. Cancer* (2002) 2, 537-543.

Sudbo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int. J. Cancer* (2005), 115, 339-345

Sudbo J, Lippman SM, Lee JJ, Mao L, Kildal W, Sudbo A, Sagen S, Bryne M, El-Naggar A, Risberg B, Evensen JF, Reith A. The influence of resection and aneuploidy on mortality in oral leukoplakia. *N. Engl. J. Med.* (2004) 350, 1405-1413.

Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A.. DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N. Engl. J. Med.* (2001) 344, 1270-1278.

Sun X, Nair J, Bartsch H. A modified immuno-enriched ³²P-postlabeling method for analyzing the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, 3-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)-pyrimido[1,2-alpha]purin-10(3H)one in human tissue samples. *Chem. Res. Toxicol.* (2004) 17, 268-272.

Vainio H. The need for preventive drugs and vaccines in global cancer control: a challenge for public health and for industry. *Toxicol. Ind. Health* (2002) 18, 84-90.

Kontakt:
 Prof. Dr. Helmut Bartsch
 Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
 Toxikologie und Krebsrisikofaktoren
 Im Neuenheimer Feld 280
 69120 Heidelberg
 Tel.: 06221 423300
 Fax: 06221 423359
 E-Mail: h.bartsch@dkfz.de