Artemisinin und dessen Derivate in der Krebstherapie: nur Ferroptose oder doch mehr?

Dr. med. Matthias Kraft
Prof. Dr. Dr. med. Ben Pfeifer

Die Beseitigung von funktionell überflüssigen, infizierten oder potenziell neoplastischen Zellen wird durch den programmierten Zelltod (PCD) gesteuert, der eine wichtige Rolle bei der Homöostase, der Wirtsabwehr gegen Krankheitserreger, bei Krebs und einer Reihe anderer Pathologien spielt.

Es sind mehrere Arten von PCD-Wegen beschrieben worden, darunter Apoptose, Nekroptose und Pyroptose. Dabei kommen unterschiedliche molekulare und zelluläre Mechanismen ins Spiel, die sich oft in ihrer Endstrecke unterscheiden, wie zum Beispiel die Fähigkeit, Entzündungsreaktionen auszulösen. Neuere genetische und biochemische Untersuchungen haben zudem eine bemerkenswerte Flexibilität bei der Nutzung verschiedener PCD-Stoffwechselwege nachweisen können. Apoptose galt bislang als der wichtigste Zelltodprozess, durch den Organismen die Entstehung von Krebs verhindern (Abb. 1) *[1]*.

In den letzten Jahren hat sich herauskristallisiert, dass weitere Mechanismen des Zelltodes an der Regulation der Homöostase des Organismus beteiligt sind. Neben dem Apoptose-induzierenden Faktor-1 (AIF-1) und der Poly-ADP Ribose (PARP), welche zum PARP-1 abhängigen Zelltod (Parthanatos) führt, konnte im Kontext der Onkologie die Eisen (Fe^{++})-abhängige Ferroptose als wesentlicher Faktor zur Eliminierung von Krebszellen definiert werden *[2]*. Ferroptose wurde von Dixon im Jahr 2012 entdeckt und als solche erstmalig beschrieben *[3]*. Sie ist gekennzeichnet durch eine sehr ausgeprägte, eisenabhängige intrazelluläre Anhäufung von tödlichen Lipiden und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) *[4]*. In ferroptotischen Zellen erscheinen die Mitochondrien kleiner und haben eine erhöhte mitochondriale Membrandichte bei gleichzeitig reduzierten oder verschwundenen mitochondrialen Cristae. Der Begriff „Ferroptose" geht auf die Tatsache zurück, dass die Eisen-Chelation, die zu einer Senkung des intrazellulären Eisenspiegels führt, die Bildung reaktiver Radikalspezies wie Hydroxylradikale verhindert und die Zellen vor dem Tod schützt *[3]*.

Allerdings wurden Ferroptose-Induktoren schon vor dem Konzept der Ferroptose identifiziert. Der erste bekannte Ferroptose-Induktor war Erastin, ein synthetisches letales Molekül, dass 2003 erstmalig beschrieben wurde *[3]*. Erastin bindet irreversibel an SLC7A11, einem Gen, welches für den Cystin-Glutamat Antiporter codiert und diesen inaktiviert. Weitere Ras-selektive letale kleine Moleküle, (RSL)-3 und (RSL)-5, die Zellen auf nicht-apoptotische Weise abtöteten, wurden später im Jahr 2008 im Rahmen einer Hochdurchsatzstudie zum Screening kleiner Moleküle identifiziert *[4]*. Erastin und RSL3 lösen keine morphologischen Veränderungen oder biochemischen Prozesse aus, die mit Apoptose übereinstimmen, wie z. B. Chromatinrandbildung oder PARP-Spaltung. Darüber hinaus wird der durch Erastin und RSL3 ausgelöste Zelltod nicht durch Apoptose-, Nekrose-, Nekroptose- oder Autophagie-Inhibitoren abgeschwächt. Allerdings können Antioxidantien (z. B. Vitamin E) und Eisen-Chelatoren (z. B. Deferoxaminmesylat) den RSL-induzierten Zelltod unterbinden. Folglich bezieht sich Ferroptose im Allgemeinen auf eine eisenabhängige, nicht-apoptotische Form des programmierten Zelltods *[5, 6]*. Die Ferroptose könnte eine bisher unerkannte wichtige Rolle bei der Zerstörung von Krebszellen spielen und somit in der Krebstherapie Bedeutung erlangen. Wie bereits zuvor erwähnt, hat sich gezeigt, dass übermäßiger, eisenabhängiger oxidativer Stress zur Krebsentstehung beitragen kann *[7]*. Auf Grund genetischer Veränderungen und abnormer Proliferation weisen Krebszellen ein anhaltend hohes Niveau an ROS-bezogenem oxidativen Stress auf *[8]*. Somit sollten Wirkstoffe, die den ROS-Stoffwechsel beeinflussen, auch das Wachstum von Tumorzellen modifizieren können. Erastin und RSL-3 scheinen diese Fähigkeit zu haben. Es hat sich nämlich gezeigt, dass diese Ratten-Sarkom-Zellen, die durch Virus-Onkogen (RAS)-Mutation entstanden sind, durch Ferroptose abtöten können *[9, 10]*. Daher scheint es sinnvoll, Ferroptose-Induktoren in der Krebsbehandlung zu testen und einzusetzen.

Manz et al. *[42]* klassifizierten die Ferroptose-Induktoren anhand ihrer spezifischen Ziele in drei Typen: Ferroptose-Induktoren der Klasse 1, Ferroptose-Induktoren der Klasse 2 und Medikamente wie Sorafenib und Artemisinin sowie seine Derivate. Außerdem werden die Ferroptose-Inhibitoren in fünf Kategorien eingeteilt: Antioxidantien, ROS-Inhibitoren, Eisen-Chelatoren, Proteinsynthese Inhibitoren und Transaminase-Hemmer (Tab. 1) *[11, 12]*. Darüber hinaus zeigte eine Untersuchung von 114 Krebszelllinien, dass diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCLs) und Nierenzellkarzinome (RCCs) sehr empfindlich auf Erastin reagieren *[13]*. Kim et al. konnten nachweisen, dass ultra-Nanopartikel die Ferroptose von Krebszellen unter Nährstoffentzug induzieren und das Tumor-

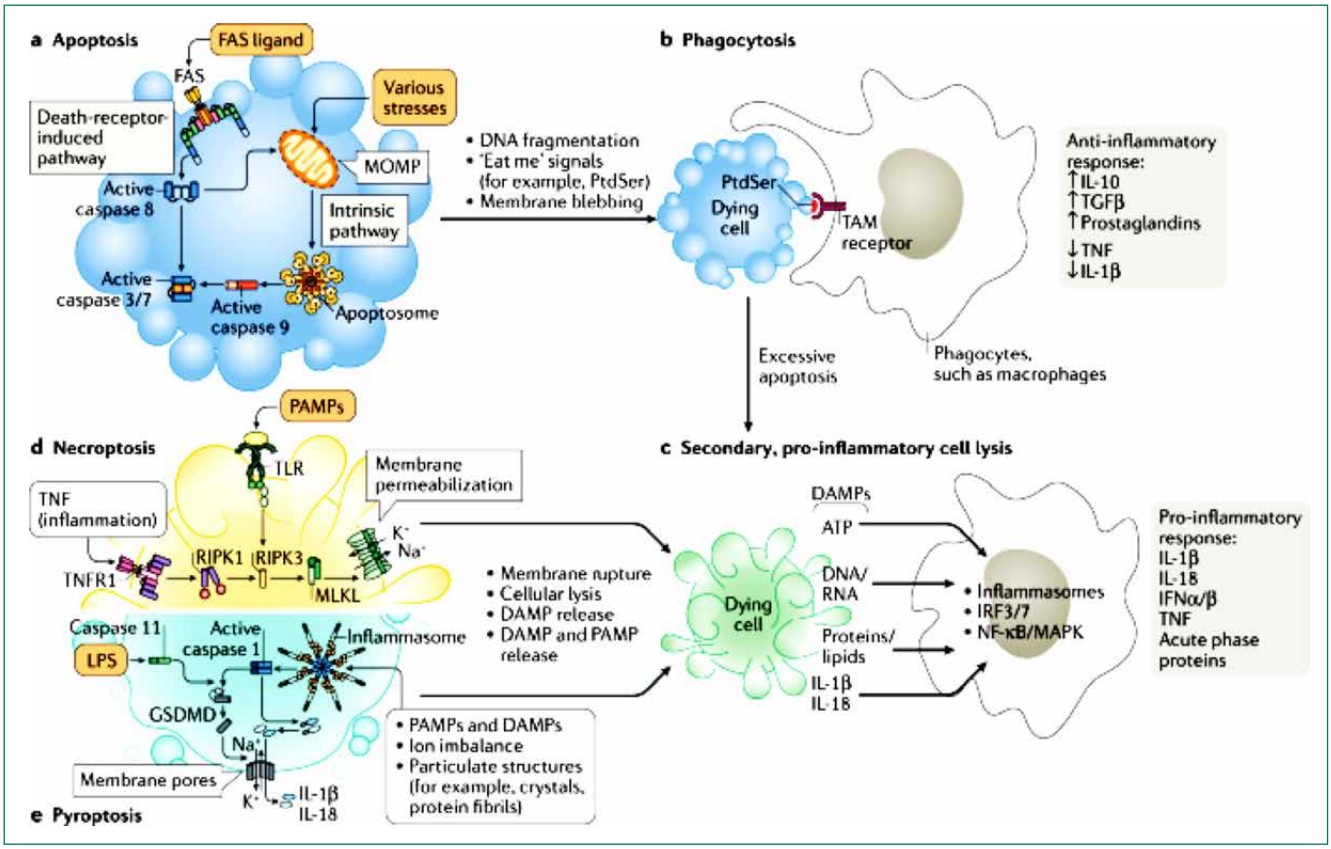


Abb. 1 *Die Beseitigung von funktionell überflüssigen, infizierten oder potenziell neoplastischen Zellen wird durch den programmierten Zelltod (PCD) gesteuert. Zellen können verschiedene Wege des PCD gehen; diese Wege sind durch unterschiedliche Mechanismen gekennzeichnet und unterscheiden sich in ihrer Aktivierung und ihren Ergebnissen (modifiziert nach [1]).*

wachstum unterdrücken können, was die Rolle von Ferroptose-Induktoren bei der Abtötung von Tumorzellen und der Hemmung des Tumorwachstums unterstreicht *[14]*.

Neben den zuvor genannten Induktoren der Ferroptose spielt Artesunat (ein vom Artemisinin abgeleiteter Arzneistoff) eine wichtige Rolle bei der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, welche in die Ferroptose münden. Extrakte aus Artemisia annua und verwandten Pflanzen werden seit Jahrhunderten zur Behandlung und Prävention von Malaria und anderen, durch Parasiten, Viren und Bakterien verursachte Infektionskrankheiten eingesetzt. Die Identifizierung des aktiven pharmazeutischen Wirkstoffs, Artemisinin, führte schließlich zur Herstellung des halbsynthetischen Derivats, Artesunat, das im Vergleich zu Artemisinin eine längere Halbwertszeit und eine bessere Bioverfügbarkeit aufweist. Nach der Beobachtung von Efferth et al. im Jahre 2001 und 2003, dass Artemisinin und seine Derivate gegen eine Vielzahl menschlicher Krebszelllinien wirksam sind, wurden präklinische und klinische Nachweise erbracht, die eine signifikante, krebshemmende Aktivität von Artemisinin-Derivaten unterstreichen *[15, 16]*.

Die Artemisinin-Derivate, Artesunat, Artemether, Arteether, Artenimol, Artemisitene, Arteanuin B, ein weiteres monomeres Artemisinin-Derivat, sowie drei Artemisinin-Dimer-Moleküle (Fig. 3.), wurden zusammen mit einer Gruppe von Genen, die Proteine für den Eisenstoffwechsel kodieren, wie z. B. das Transferrin, die Transferrin-Rezeptoren 1 und 2, das Ceruloplasmin sowie das Lactoferrin, in einem Panel von 60 Tumorzelllinien (NCI60) hinsichtlich der Induktion von Ferroptose untersucht und als Biomarker für die Tumorempfindlichkeit gegenüber Artemisinin-Medikamenten identifiziert *[17]*. Artesunat (ART) ist ein gut verträgliches Medikament. Eine Studie bestätigte, dass ART sowohl das Wachstum von Ovarialkarzinom-Zelllinien in vitro, als auch das Wachstum von Ovarialkarzinomen im Tiermodell hemmt *[18]*. Außerdem wurde in einer in vivo Studie an einem Mausmodell für das duktale Pankreaskarzinom ein verringertes Tumorwachstum nach Gabe von ART gezeigt *[19]*. In einer weiteren Studie induzierte ART spezifisch den ROS- und lysosomalen Eisen-abhängigen Zelltod in Pankreaskarzinom-Zelllinien. Dieser Prozess wurde durch Ferrostatin-1 gehemmt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Pankreaskarzinom-Zellen mit K-ras Mutation empfindlicher auf die Induktion einer Ferroptose reagieren *[20]*. Bezugnehmend auf die oben bereits erwähnte Induktion der Ferroptose durch Nahrungsentzug scheint ein Aspekt in diesem Zusammenhang sehr wichtig.

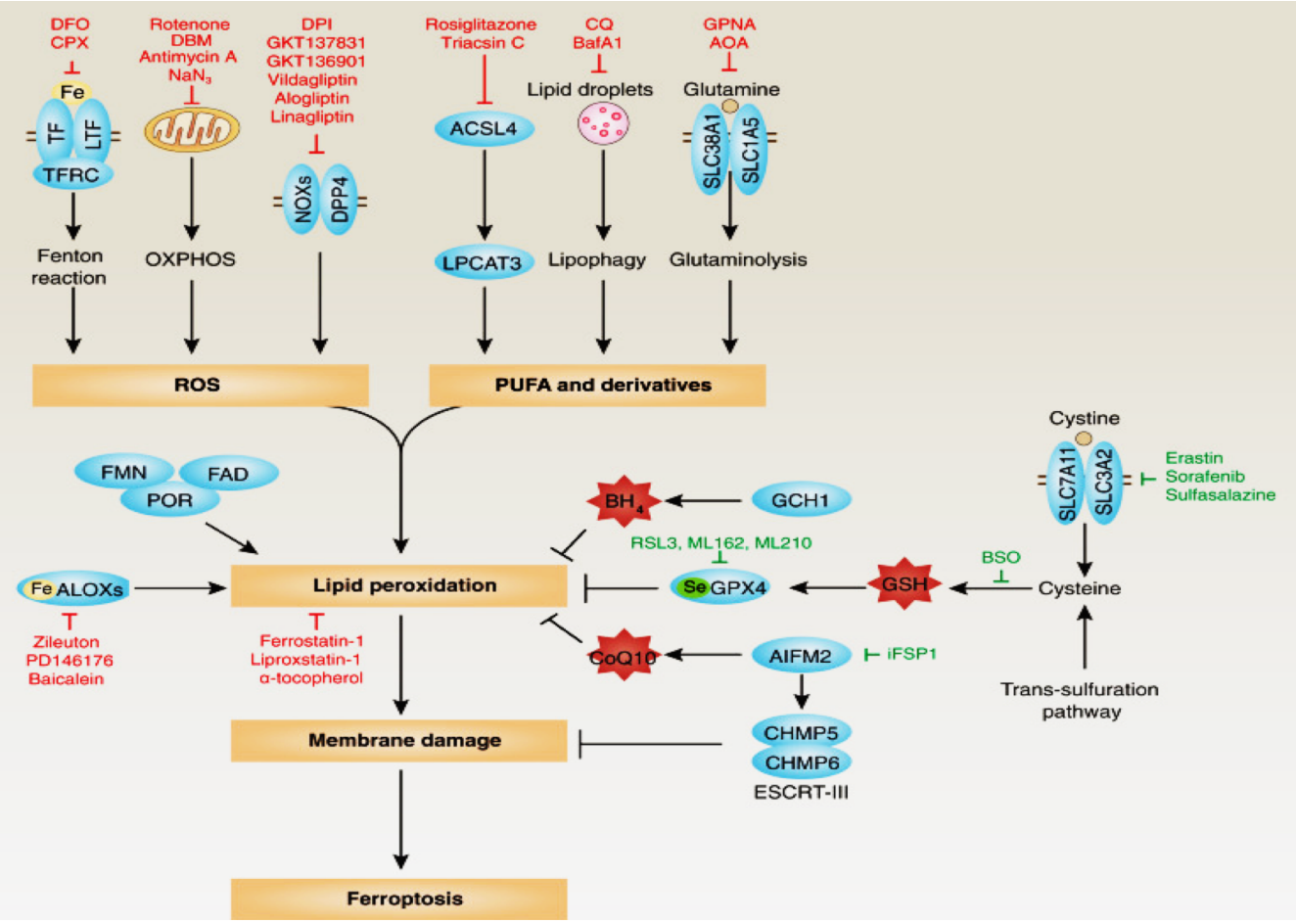


Abb. 2 *Aktivierungs- und Hemmungsmechanismen der Ferroptose: Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) ist das wichtigste biochemische Ereignis, das zur Ferroptose führt. Ferroptose Induktoren sind grün, Inhibitoren rot dargestellt (modifiziert nach [2])*

In vivo konnte nämlich gezeigt werden, dass Pankreaskarzinompatienten mit K-ras Mutation von einem kurzfristigen Fasten vor Chemotherapie profitieren und die Chemotherapie somit potenziert werden kann *[21]*. Erstaunlicherweise zeigt Artesunat auch Einfluss auf die Resistenzentwicklung von Pankreaskarzinom-Zellen gegenüber Gemcitabin. Hierbei kommt es zur Bildung des Metaboliten dFdCDP, welcher die Ribonukleosid-Reduktase hemmt und die DNA-Synthese blockiert. In einer neuen Studie aus der Arbeitsgruppe um Yao et al. *[22]* konnte indes gezeigt werden, dass die Expression von c-Myc und PD-L1 in Bauchspeicheldrüsentumoren im Vergleich zu benachbarten Geweben deutlich erhöht ist. Allerdings ist es nicht geklärt, ob dFdCDP-resistenter Bauchspeicheldrüsenkrebs mit c-Myc und PD-L1 assoziiert ist. In ähnlicher Weise war die Expression von c-Myc und PD-L1 auch in dFdCDP-resistenten Panc-1-Zellen im Vergleich zu den elterlichen Zellen deutlich erhöht. Darüber hinaus wurde die dFdCDP-Empfindlichkeit durch die Kombination von dFdCDP- und c-Myc-Inhibitoren in Panc-1-Zellen erhöht. Außerdem wurde die PD-L1-Proteinexpression bei der Behandlung mit c-Myc-Inhibitoren drastisch herunterreguliert. Artesunat (ART), welches aus 18 Verbindungen ausgewählt wurde, konnte die dFdCDP-Resistenz in vitro umkehren. Somit könnte der Mechanismus der dFdCDP-Resistenz darin bestehen, dass die Überexpression von c-Myc zu einer erhöhten PD-L1-Expression beiträgt und die Gabe von ART die dFdCDP-Resistenz durch Hemmung von c-Myc und somit der PD-L1 Expression überwinden kann. C-Myc und PD-L1 wären somit neue prognostische Biomarker bei dFdCDP-resistentem Bauchspeicheldrüsenkrebs und die Gabe von Artesunat ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für die Überwindung der dFdCDP-Resistenz.

Auch in Tumoren neuroendokriner Herkunft konnte ART sein Potential als Krebstherapeutikum bestätigen. Die zytotoxische Aktivität von ART gegenüber neuroendokrinen Tumoren (NET) konnte in einer Studie von Ya et al. *[23]* einschließlich der beteiligten Mechanismen in vitro eindrucksvoll bestätigt werden. ART induzierte mehrere zelluläre Reaktionen in verschiedenen NET-Zelllinien. Die letalen Modi waren, wie so häufig, in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich. Der autophagische Zelltod war in allen der drei untersuchten Zelllinien nachweisbar. Zusätzlich zur Autophagie wurden in Zelllinien aus pankreatischen neuroendokrinen

Karzinomen (BON-1) mindestens zwei weitere Zelltodarten beobachtet, nämlich Apoptose und erneut Ferroptose. Außerdem wurde ein eisenabhängiger, aber nicht klassischer ferroptotischer Zelltod in Zelllinien des Bronchialkarzinoides (NCI-H727) festgestellt. Offensichtlich löste ART den Zelltod in NETs durch ein umfassendes und komplexes Netzwerk aus, wobei die Interaktionen innerhalb der Netzwerke noch weiter aufgeklärt werden müssen.

ART zeigte sich auch effektiv in der Behandlung von Kopf-Hals Tumoren (HNC). In einer Studie von Rohn et al. *[24]* wurde die Wirkung von Artesunat und Trigonellin, einem Pyridinalkaloid des Bockshornklees, an verschiedenen HNC-Zelllinien getestet, darunter auch drei Cisplatin-resistenten HNC-Zelllinien. Cisplatin zählt zu den wesentlichen Chemotherapeutika bei Kopf-Hals-Tumoren. Häufig zeigt sich jedoch im Laufe der Zeit eine Resistenz gegenüber Cisplatin, die bislang nicht verstanden wurde. Die Ergebnisse der Studie belegten die Wirksamkeit und konnten den molekularen Mechanismus der Artesunat-Behandlung bei HNC aufzeigen. ART induzierte Ferroptose in HNC-Zellen durch Senkung des zellulären Glutathion Spiegels und Erhöhung der Lipid-ROS-Spiegel. Dieser Effekt wurde durch Ko-Inkubation mit Ferrostatin-1 und Vorbehandlung mit einem Derivat von Vitamin E namens Trolox blockiert. ART tötete, wie in vielen anderen Studien, selektiv Tumorzellen, nicht aber gesunde Zellen. Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) ist ein nuklearer Transkriptionsfaktor, der an das Antioxidantien-Reaktions-Element bindet und eine Reihe von Entgiftungs-/Abwehrgenen aktiviert. Eine abnorme Nrf2-Aktivierung in Krebszellen entsteht durch somatische Mutationen im Kelch-like-assoziierten Protein 1 (Keap1) oder dem Nrf2-Gen, sowie durch andere Mechanismen, die die Bindung von Keap1 an Nrf2 stören. Unreguliertes Nrf2 verleiht Krebszellen eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und lenkt Krebszellen in Richtung metabolische Re-Programmierung. Dies führt zum Schutz und Überleben der Zellen *[25]*. Bei Cisplatin-resistenten HNC´s kam es aufgrund der Aktivierung des Nrf2-Antioxidantien-Reaktionselements durch Artesunat nur zu einer suboptimalen Wirkung. Das Ausschalten von Keap1, einem negativen Regulator von Nrf2, verringerte ebenfalls die Artesunat-Empfindlichkeit von HNC-Zellen. Die genetische Ausschaltung von Nrf2 oder Trigonellin kehrte die Ferroptose-Resistenz von Keap1- und Cisplatin-resistenten HNC-Zellen gegenüber ART in vitro und auch in vivo wieder um.

Dies scheint auch der Fall beim Harnblasenkarzinom zu sein. In einer Studie von Zhao et al. *[26]* konnte die Effektivität von ART auch bei Cisplatin-resistenten Harnblasenkarzinom Zelllinien gezeigt werden. Die Exposition von Harnblasenkarzinom Zelllinien gegenüber ART führte zu einer signifikanten zeit- und dosisabhängigen Hemmung des Tumorzellwachstums und der Proliferation von naiven und Cisplatin-resistenten Harnblasenkarzinomzellen. Es zeigte sich begleitend ein G0/G1-Phasenarrest und eine Modulation von Zellzyklus regulierenden Proteinen. ART induzierte zudem Apoptose durch DNA-Schäden, insbesondere in den Cisplatin-resistenten Zellen, aber keine Ferroptose. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass ART zu einer Störung der mitochondrialen

Morphologische Eigenschaften	Biochemische Eigenschaften	Genetische Eigenschaften	Induktoren	Inhibitoren
Zellmembran: • Fehlen von Rissbildung und Blasenbildung (blebs) der Plasmamembran • Abrundung der Zelle **Zytoplasma:** • kleine Mitochondrien mit kondensierter Mitochondrienmembrandichte • Verringerung oder Verschwinden der Crista der Mitochondrien • Riss der äußeren Mitochondrienmembran **Zellkern:** • normale Kerngröße und • fehlende Chromatinkondensation	Keine Modulation durch Verbindungen, die als Inhibitoren des regulären Zelltods bekannt sind wie z. B.: • Caspase • Cathepsin- oder Calpain-Proteasen • RIPK1 (Nekrostatin-1) • Cyclophilin D • Cyclosporin A	Erforderlich für Erastin-induzierte Ferroptose: • RPL8 • IREB2, • ATP5G3, • CS • TTC35 • ACSF2	**Ferroptose-Induktoren der Klasse 1:** • Erastin und Erastin-Derivate • Buthioninsulfoximin • DPI2 • Glutamat • Lanperison • Sulfasalazin, • SRS13-45 und SRS13-60 **Klasse-2-Ferroptose-Induktoren:** • DPI7, DPI10, DPI12, DPI13,DPI17, DPI18, DPI19, ML162 und RSL3 **Medikamente:** • Sorafenib • Artemisinin und Derivate (Artesunat)	**Antioxidantien:** Vitamin E, Trolox, U0126 **Hemmer der ROS-Bildung:** Ferrostatin-1 SRS8-72, SRS11-92, SRS12-45, SRS13-35, SRS13-37, SRS16-86 **Eisenchelatoren**: Desferoxamin, 2,2-Bipyridyl Ciclopirox-Olamin **Proteinsynthese-Hemmer:** Cycloheximid **Transaminase Hemmstoff:** Aminooxyacetiensäure

Tab. 1 *Grundlegende Merkmale und Eigenschaften der Ferroptose (modifiziert nach [12]).*

Atmung und ATP-Bildung führt. Diese Beeinträchtigung korrelierte mit der Autophagie der Zellen. Die Autoren schlussfolgern aus diesem Grunde, dass ART signifikant proliferative und metabolische Aspekte von Cisplatin-empfindlichen und Cisplatin-resistenten Harnblasenkarzinom Zellen hemmt und so ein großes Potenzial für die Behandlung von fortgeschrittenem und therapieresistentem Harnblasenkrebs haben könnte.

Eine gestörte Eisenhomöostase ist ein typisches Merkmal des hepatozellulären Karzinoms (HCC). Die Störung des Eisenstoffwechsels ist eine wirksame Strategie für die Therapie des HCC. In der klinischen Praxis gibt es jedoch nur wenige sichere und wirksame zielgerichtete Wirkstoffe. Die Gruppe um Jiang et al. *[27]* zeigte, dass ART den labilen Eisenpool (LIP) beim HCC regulieren und den ROS-abhängigen Zelltod wirksam herbeiführen kann. Mechanistisch gesehen erhöht ART den LIP durch Förderung des lysosomalen Abbaus des Eisenspeicherproteins Ferritin über die Ansäuerung der Lysosomen. Die Anhäufung des

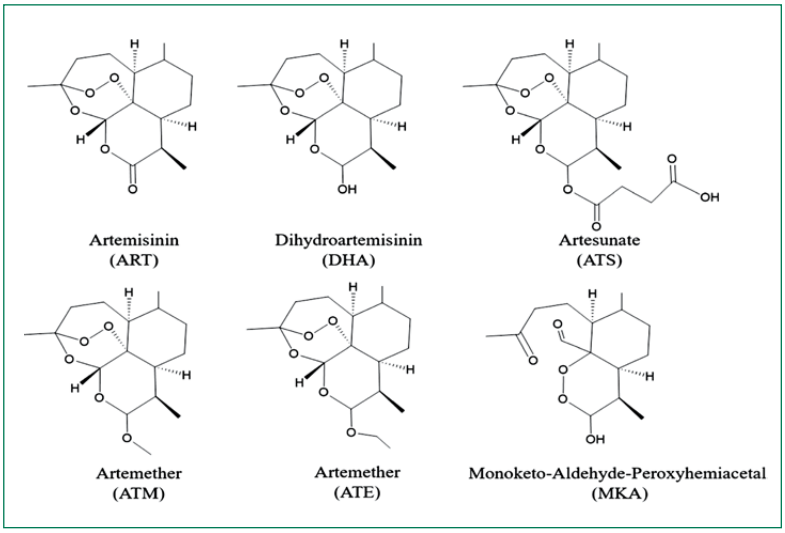


Abb. 3 *Chemische Struktur von Artemisinin-Verbindungen*

labilen Eisens im endoplasmatischen Retikulum (ER) fördert dann die übermäßige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und eine schwere Störung des ER, was zum Zelltod führt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ART ein sicheres und potenzielles Anti-HCC-Mittel sein könnte, welches über eine Störung der Eisenhomöostase in hepatozellulären Tumorzellen zu einer Wachstumshemmung führt.

ART scheint auch das in vitro Wachstum einer Reihe von Ovarialkarzinom-Zelllinien sowie das Wachstum von aus Patientinnen isolierten Eierstockkrebszellen zu hemmen. Darüber hinaus verringerte ART das Tumorwachstum in einem Mausmodell von Eierstockkrebs. Mit ART behandelte Ovarialkarzinom-Zellen zeigten eine starke Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und eine verringerte Proliferation. Ein ROS-abhängiger Zellzyklusstillstand trat hier in der G2/M-Phase auf, während ein ROS-unabhängiger Zellzyklusstillstand in der G1-Phase auftrat, und zwar abhängig von der Konzentration von ART, dem die Eierstockkrebszellen ausgesetzt waren. Die anti-proliferative Wirkung von ART stand in Zusammenhang mit einer veränderten Expression mehrerer wichtiger Zellzyklus regulierender Proteine (z. B. Cyclin D3, E2F-1 und p21), sowie einer Hemmung des „mammalian Target of Rapamycin" (mTOR) Weges. Die Exposition von Eierstockkrebszellen gegenüber höheren Konzentrationen von ART führte zu ROS-abhängigen DNA-Schäden und Zelltod. Die Vorbehandlung von Eierstockkrebszellen mit einem Pan-Caspase Inhibitor oder Ferroptose-Inhibitor verringerte die ART-vermittelte Zytotoxizität, beseitigte sie aber nicht vollständig. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass sowohl Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Wege an der Abtötung beteiligt sind und ein Hinweis darauf, dass ART eine starke antiproliferative und zytotoxische Wirkung auf Eierstockkrebszellen hat und daher für die Behandlung von Eierstockkrebs nützlich sein könnte *[28]*. Die Experimente wurden in einer anderen Studie mit anderen Zelllinien des serösen Ovarialkarzinoms (CaOV3 und SKOV3ip1) durchgeführt. Die Empfindlichkeit von CaOV3 Zellen auf ART war deutlich höher als die von SKOV3ip1 Zellen. Ferroptose Inhibitoren hemmten die ART-induzierte intrazelluläre Lipid-Peroxidation und den Zelltod. Im Gegensatz zum Klasse-1-Ferroptose-Induktor Erastin, hatte ART in diesen Experimenten jedoch keine Auswirkungen auf den intrazellulären Glutathion Spiegel. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die ART-induzierten Veränderungen des lysosomalen $Fe2^{+}$ parallel zur Induktion der Ferroptose verliefen. Daraus kann gefolgert werden, dass Ferritin das intrazelluläre $Fe2^{+}$ oxidiert und bindet, und so in dieser Zelllinie möglicherweise eine hemmende Wirkung auf die Ferroptose hat. Die Ausschaltung des nukleären Coaktivators 4, eines Schlüsselmoleküls der Ferritin-spezifischen Autophagie, unterdrückte den ART-induzierten Zelltod. Die Ausschaltung der schweren Ketten des Ferritins durch siRNA erhöhte die Empfindlichkeit gegenüber ART und die Überexpression der schweren Ferritin-Ketten verringerte die Empfindlichkeit der Ovarialkarzinom-Zelllinien gegenüber ART. Somit kann aus dieser Studie der Rückschluss gezogen werden, dass die Verstärkung der-Ferritin spezifischen Autophagie ein wichtiger Schritt im Mechanismus der ART-induzierten Ferroptose ist, und der Spiegel der schweren Ferritin-Ketten zur Regulierung der Empfindlichkeit bei der ART-induzierten Ferroptose in Zellen des serösen Ovarialkarzinoms sein könnte *[29]*.

Parallel zu diesen Daten hat sich gezeigt, dass der Einfluss von ART auf mTOR scheinbar auch bei anderen Tumorentitäten eine entscheidende Rolle auf die

Hemmung des Tumorwachstums haben könnte. Analog zu Metformin (Fig. 5) scheint ART bei Zelllinien von Rhabdomyosarkomen (RMS) über mTOR seine Wirkung zu entfalten. Unter Verwendung von RMS-Zelllinien hat die Arbeitsgruppe um Jun Luo *[30]* zeigen können, dass Dihydroartemisinin (DHA) die Zellproliferation und Lebensfähigkeit von RMS-Zellen, nicht aber von normalen Zellen hemmt. Dies war mit einer Inaktivierung von mTORC1 verbunden. Es konnte nachgewiesen werden, dass DHA weder an mTOR noch an das FK506-bindende Protein 12 (FKBP12) bindet. Auch hemmte DHA weder den Insulin-like Growth Factor-1 receptor (IGF-1R), die Phosphoinositiol-3-Kinase (PI3K) und die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 12 (Erk1/2), noch aktivierte es den Signaltransduktionsweg über Phosphatasen und Tensin Homolog (PTEN) in den Zellen, welche normalerweise im Rahmen der Aktivierung von mTOR typisch sind. Vielmehr stimulierte DHA die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK).
Eine Behandlung mit Artesunat, einer Vorstufe von DHA, hemmte ebenfalls dosisabhängig das Tumorwachstum von RMS-Xenografts durch gleichzeitige Aktivierung von AMPK und Unterdrückung von mTORC1 *[31]*. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass DHA das mTORC1 durch Aktivierung von AMPK in Tumorzellen hemmen kann und in dieser Hinsicht ein großes Potential in der Tumortherapie besitzen könnte. Somit scheint die Ferroptose nicht der einzige Weg zu sein, über den ART seine tumorhemmende Wirkung entfaltet.

Klinische Studien zu Artesunat

In einer klinischen Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom wurde die Chemotherapie-Kombination von Vinorelbin und Cisplatin (CTx) bei 120 Patienten mit und ohne ART 120 mg über 8 Tage prospektiv und randomisiert auf seine Toxizität hin untersucht *[32]*. Die Kombination aus ART plus CTx erzielte eine statistisch signifikante Verbesserung des Kurzzeitüberlebens (88 vs. 72 % primäres Ansprechen). Das progressionsfreie Überleben in der ART-Gruppe lag bei 24 Wochen und war signifikant länger als bei der Kontrollgruppe mit 20 Wochen. Die ART-Therapie wurde gut vertragen, eine erhöhte Toxizität wurde nicht beobachtet. In einer weiteren Studie mit 10 Patientinnen, welche an Gebärmutterhalskrebs litten (Stadium III oder IV), erfolgte über 28 Tage eine Infusions-Therapie mit DHA *[33]*. Es konnte klinisch eine Symptomfreiheit erzielt werden. Korrespondierend zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen eine Abnahme der Expression von p53, des Onkogens EGFR und des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie der Anzahl der CD31-positiven Blutgefäße während der DHA-Behandlung. Die Expression der Transferrin Rezeptoren nahm zu. Bei sechs Patienten traten die Tumore nach vier bis acht Monaten (durchschnittlich sechs Monate) erneut auf. Zwei Patienten verstarben nach einer sechs- bis siebenmonatigen Remission. Bei vier Patienten mit Tumorrezidiv wurde ein zweites Mal für 28 Tage mit DHA behandelt und eine klinische Remission erreicht. 12 bis 13 Monate nach der ersten DHA-Behandlung verstarben zwei dieser Patienten aufgrund von Niereninsuffizienz. Diese klinische Phase I/II-Pilotstudie mit DHA ist ermutigend in Bezug auf die Verringerung der klinischen Symptome des fortgeschrittenen Gebärmutterhalskrebses, sowie hinsichtlich der Verträglichkeit und der Auswirkungen auf die Überlebenszeit der Patienten. Eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Studie wurde an 23 Patienten mit kolorektalem Karzinom im St. Georg's Hospital (University of London, UK) durchgeführt *[34]*. Nach der Diagnose und vor der Operation wurde den Patienten entweder 14 Tage lang eine orale ART (200 mg; n = 12) oder ein Placebo (n = 11) verabreicht. Die Ergebnisparameter waren das klinische Überleben sowie die immunhistochemische Beurteilung der Apoptose Raten (gemessen mit dem TUNEL-Test) und der Expression verschiedener Tumormarker (VEGF, EGFR, c-MYC, CD31, Ki67 und p53). Zwanzig von 23 Patienten (ART = 9, Placebo = 11) schlossen das Studienprotokoll ab. Apoptotische Zellfraktionen von >7 % wurden bei 67 % der mit ART behandelten Gruppe und bei 55 % der mit Placebo behandelten Patienten beobachtet. Die Bayes'sche Analyse ergab, dass eine ART-Behandlung die Ki67-Rate reduzierte und die CD31-Expression erhöhte. Die mediane Nachbeobachtungszeit von 42 Monaten zeigte, dass 1 mit ART behandelter Patient und 6 mit Placebo behandelte Patienten refraktäre Tumore entwickelten. Die Pharmakokinetik von ART und DHA wurde bei 23 metastasierten Brustkrebspatientinnen während der täglichen oralen Einnahme von ART (100, 150 oder 200 mg) über einen Zeitraum von mehr als drei Wochen untersucht *[35]*. Das geschätzte DHA-Speichel/Plasma-Verhältnis stimmte mit den berichteten freien Plasmaspiegeln von DHA überein. Das Ansprechen des Tumors auf die ART-Therapie und die Überlebenszeit der Patienten wurden leider nicht berichtet. Die gleichen 23 metastasierten Brustkrebspatientinnen wurden in einer Phase-I-Studie auf die Verträglichkeit von ART untersucht *[36]*. Bei vier Patientinnen traten ART-bedingte Nebenwirkungen hinsichtlich des auditiven Systems auf; bei einer Patientin schwer, aber reversibel. In einer weiteren klinischen Phase-I Studie erfolgte eine Untersuchung der Toxizität einer intravenösen Behandlung mit ART. Die Patienten wurden in eine Titrationsdosis-Eskalationsstudie mit Dosisstufen von 8, 12, 18, 25, 34 und 45 mg/kg aufgenommen. Die i.v. Applikation erfolgte an den Tagen 1 und 8. Die Behandlung wurde alle 21 Tage wiederholt. Die Toxizität wurde anhand NCI CTCAE (Version 4.0) bewertet und das Ansprechen

nach den RECIST-Kriterien (Version 1.1) beurteilt. Insgesamt wurden 19 Patienten in die Studie eingeschlossen, von denen 18 hinsichtlich der Toxizität und 15 hinsichtlich der Wirksamkeit auswertbar waren. Dosis limitierende, toxische Nebenwirkungen traten bei Dosierungen von 12 (1 von 6 Patienten), 18 (1 von 6) und 25 mg/kg (2 von 2) auf und bestanden aus neutropenischem Fieber (Gr. 4), Überempfindlichkeitsreaktionen (Gr. 3), sowie Leberwerterhöhung (Gr. 3/4) zusammen mit neutropenischem Fieber und Übelkeit/Erbrechen (Gr. 3) trotz unterstützender Behandlung. Die maximal tolerierbare Dosis wurde auf 18 mg/kg festgelegt. Es wurde kein deutliches Ansprechen beobachtet. Vier Patienten wiesen eine stabile Erkrankung während der Behandlung mit ART auf, darunter drei über einen Zeitraum von 8, 10 und 11 Zyklen, was einer Krankheitskontrollrate von etwa 27 % entspricht. Die pharmakokinetischen Parameter von ART und seinem aktiven Metaboliten DHA korrelierten mit der Dosis. Die Behandlung war gut verträglich. In dieser vorbehandelten Population wurde eine mäßige klinische Aktivität beobachtet. Leider gibt es keine Hinweise auf die weitere Einnahme von Nahrungsergänzungsmittel oder pflanzlichen Heilmitteln, welche durchaus die Toxizität von Artesunat erhöhen können.

Zusammenfassung

Artemisinin und seine Derivate, DHA und ART, sind sowohl in vitro und in vivo gegen Krebszellen aktiv, wie viele andere natürliche Produkte oder deren Derivate *[35]*. Medikamente vom ART-Typ weisen multispezifische Wirkmechanismen mit mehreren Zielen auf *[38, 39, 40, 41]*. In den letzten zwei Jahrzehnten ist eine Fülle von Veröffentlichungen über die krebshemmende Wirkung von ART und seinen Derivaten erschienen, die darauf hindeuten, dass diese Klasse von Verbindungen attraktive Kandidaten für die Krebstherapie darstellen. Diese Sichtweise wird durch die verfügbaren, noch vorläufigen, klinischen Daten gestützt. Weitere groß angelegte klinische Studien sind erforderlich, um überzeugendere Beweise für die Eignung von ART und seinen Derivaten in der klinischen Onkologie zu liefern. Leider ist dies wegen der fehlenden finanziellen Unterstützung und des fehlenden ökonomischen Anreizes bei nicht patentierbaren Natursubstanzen sehr schwer umsetzbar.

Dr. med. Matthias Kraft
BioMed Klinik
Tischbergerstraße 5+8
76887 Bad Bergzabern | Deutschland

Prof. Dr. Dr. med. Ben Pfeifer
Aeskulap-International
Grendel 2
6004 Luzern | Schweiz

Literatur

[1] Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020 Nov; 21(11):678–695.

[2] Tang D, Kroemer G. Ferroptosis. Curr Biol. 2020 Nov 2; 30(21):R1292-R1297.

[3] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et. Al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012 May 25;149(5):1060–72.

[4] Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. Nat Chem Biol. 2014 Jan;10(1):9–17.

[5] Xie Y, Hou W, Song X et al.. Ferroptosis: process and function. Cell Death Differ. 2016 Mar;23(3):369–79.

[6] Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. Cell Mol Life Sci. 2016 Jun;73(11–12):2195–209.

[7] Toyokuni S, Ito F, Yamashita K et al.. Iron and thiol redox signaling in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis. Free Radic Biol Med. 2017 Jul;108:610–626.

[8] Cramer SL, Saha A, Liu J, et al.. Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. Nat Med. 2017 Jan;23(1):120–127.

[9] Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, et al.. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. Cancer Cell. 2003 Mar;3(3):285–96.

[10] Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. Chem Biol. 2008 Mar;15(3):234–45.

[11] Toyokuni S, Ito F, Yamashita K, et al.. Iron and thiol redox signaling in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis. Free Radic Biol Med. 2017 Jul;108:610–626.

[12] Xia X, Fan X, Zhao M, Zhu P. The Relationship between Ferroptosis and Tumors: A Novel Landscape for Therapeutic Approach. Curr Gene Ther. 2019;19(2):117–124.

[13] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch MEet al.. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. Cell. 2014 Jan 16;156(1–2):317–331.

[14] Kim SE, Zhang L, Ma K, Riegman M et al.. Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth. Nat Nanotechnol. 2016 Nov;11(11):977–985.

[15] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A et al.. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. Int J Oncol. 2001 Apr;18(4):767–73.

[16] Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A et al.. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. Mol Pharmacol. 2003 Aug;64(2):382–94.

[17] *Ooko E, Saeed ME, Kadioglu O et al.. Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells. Phytomedicine. 2015 Oct 15;22(11):1045–54.*

[18] *Greenshields AL, Shepherd TG, Hoskin DW. Contribution of reactive oxygen species to ovarian cancer cell growth arrest and killing by the anti-malarial drug artesunate. Mol Carcinog. 2017 Jan;56(1):75–93.*

[19] *Eling N, Reuter L, Hazin J et al.. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. Oncoscience. 2015 May 2;2(5):517–32.*

[20] *Ohman KA, Hashim YM, Vangveravong S et al.. Conjugation to the sigma-2 ligand SV119 overcomes uptake blockade and converts dm-Erastin into a potent pancreatic cancer therapeutic. Oncotarget. 2016 Jun 7;7(23):33529–41.*

[21] *Yang L, TeSlaa T, Ng S et al.. Ketogenic diet and chemotherapy combine to disrupt pancreatic cancer metabolism and growth. Med (N Y). 2022 Feb 11;3(2):119–136*

[22] *Yao J, Huang M, Shen Q et al.. c-Myc-PD-L1 Axis Sustained Gemcitabine-Resistance in Pancreatic Cancer. Front Pharmacol. 2022 May 2;13:851512*

[23] *Yan G, Dawood M, Böckers M et al.. Multiple modes of cell death in neuroendocrine tumors induced by artesunate. Phytomedicine. 2020 Dec;79:153332.*

[24] *Roh JL, Kim EH, Jang H et al.. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. Redox Biol. 2017 Apr;11:254–262*

[25] *Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System in Cancer. Front Oncol. 2017 May 4;7:85.*

[26] *Zhao F, Vakhrusheva O, Markowitsch SD et al.. Artesunate Impairs Growth in Cisplatin-Resistant Bladder Cancer Cells by Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy Induction. Cells. 2020 Dec 9;9(12):2643. doi: 10.3390/cells9122643*

[27] *Jiang Z, Wang Z, Chen L et al.. Artesunate induces ER-derived-ROS-mediated cell death by disrupting labile iron pool and iron redistribution in hepatocellular carcinoma cells. Am J Cancer Res. 2021 Mar 1;11(3):691–711.*

[28] *Greenshields AL, Shepherd TG, Hoskin DW. Contribution of reactive oxygen species to ovarian cancer cell growth arrest and killing by the anti-malarial drug artesunate. Mol Carcinog. 2017 Jan;56(1):75–93.*

[29] *Koike T, Takenaka M, Suzuki N et al.. Intracellular ferritin heavy chain plays the key role in artesunate-induced ferroptosis in ovarian serous carcinoma cells. J Clin Biochem Nutr. 2022 Jul;71(1):34–40*

[30] *Luo J, Odaka Y, Huang Z et al.. Dihydroartemisinin Inhibits mTORC1 Signaling by Activating the AMPK Pathway in Rhabdomyosarcoma Tumor Cells. Cells. 2021 Jun 1;10(6):1363.*

[31] *Deeken JF, Wang H, Hartley M et al.. A phase I study of intravenous artesunate in patients with advanced solid tumor malignancies. Cancer Chemother Pharmacol. 2018 Mar;81(3):587–596.*

[32] *29 Zhang ZY, Yu SQ, Miao LY et al.. Artesunate combined with vinorelbine plus cisplatin in treatment of advanced non-small cell lung cancer: a randomized controlled trial. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2008 Feb;6(2):134–8.*

[33] *Jansen FH, Adoubi I, De Chodder T et al.. First study of oral Artenimol-R in advanced cervical cancer: clinical benefit, tolerability and tumor markers. Anticancer Res. 2011 Dec;31(12):4417–22*

[34] *Krishna S, Ganapathi S, Ster IC et al.. A Randomised, Double Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Oral Artesunate Therapy for Colorectal Cancer. EBioMedicine. 2014 Nov 15;2(1):82–90.*

[35] *Ericsson T, Sundell J, Torkelsson A et al.. Effects of artemisinin antimalarials on Cytochrome P450 enzymes in vitro using recombinant enzymes and human liver microsomes: potential implications for combination therapies. Xenobiotica. 2014 Jul;44(7):615–26.*

[36] *König M, von Hagens C, Hoth S et al. Investigation of ototoxicity of artesunate as add-on therapy in patients with metastatic or locally advanced breast cancer: new audiological results from a prospective, open, uncontrolled, monocentric phase I study. Cancer Chemother Pharmacol. 2016 Feb;77(2):413–27.*

[37] *T. Efferth, E. Koch, Complex interactions between phytochemicals: the multi-target therapeutic concept of phytotherapy, Curr. Drug Targets 12(2011) 122–132.*

[38] *Li J, Casteels T, Frogne T, et al. Artemisinins Target GABAA Receptor Signaling and Impair α Cell Identity. Cell. 2017;168(1–2):86–100.e15.*

[39] *Efferth T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. Drug Resist Updat. 2005;8(1–2):85–97.*

[40] *Eichhorn T, Schloissnig S, Hahn B, et al. Bioinformatic and experimental fishing for artemisinin-interacting proteins from human nasopharyngeal cancer cells. Mol Biosyst. 2012;8(4):1311–1318*

[41] *Zhou Y, Li W, Xiao Y. Profiling of Multiple Targets of Artemisinin Activated by Hemin in Cancer Cell Proteome. ACS Chem Biol. 2016;11(4):882–888*

[42] *Manz DH, Blanchette NL, Paul BT et al.. Iron and cancer: recent insights. Ann N Y Acad Sci. 2016 Mar;1368(1):149–161.*