

Der Tumorsuppressor p53 im Zentrum einer Strategie zur Linderung von Nebenwirkungen bei der Krebstherapie

Lisa Wiesmüller*

Instabilitäten im genetischen Material der Körperzellen (Veränderung einzelner Nucleotide, Verlust, Austausch oder Verdopplung von Chromosomen-Segmenten, Fehlen oder Überzähligkeit einzelner Chromosomen) können zur Entwicklung hyperproliferativer Zellpopulationen bis hin zum Tumor und zur Metastasierung führen, wenn im Verlauf dieses Mehrstufenprozesses Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressoren inaktiviert werden.^[1] Besonders deutlich wird die Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität zur Vermeidung von Krebs am Beispiel des Tumorsuppressor-Proteins p53: In 50–60% aller Krebsarten ist das natürliche (Wildtyp-) p53-Gen durch Mutation oder Deletion der beiden Allele ausgeschaltet.^[2, 3] In einer weiteren Fraktion der Tumore führen epigenetische Mechanismen, wie Ausschluss aus dem Zellkern, beschleunigter Abbau oder Komplexierung des Proteins, indirekt zur funktionellen Inaktivierung von p53.^[4] In zellulären Stresssituationen kann p53 das Wachstum in der Zellzyklus-Phase G1 (vor der DNA-Synthese), seltener auch in S (während der DNA-Synthese) oder in G2/M (nach der DNA-Synthese) anhalten oder den aktiven Zelltod, die Apoptose, einleiten (Abbildung 1).^[5] Apoptose stellt einen Schutzmechanismus dar, der Zellen nach irreparablen Schädigung entfernt und kritisch für die Vermeidung maligner Tumore und für den Erfolg chemotherapeutischer Behandlungen ist. Die Apoptose beinhaltet ein zelluläres Selbstzerstörungsprogramm, in dessen Verlauf zelluläre Strukturen aufgelöst und Proteine und Chromosomen durch Proteasen bzw. DNAsen abgebaut werden. Auf molekularer Ebene wurden als Signale für die von p53 vermittelte Wachstumsregulation vor allem DNA-Strangbrüche ermittelt, z.B. nach Einwirkung ionisierender Strahlen. Kinasen wie Atm, die einen DNA-Strangbruch erkennen, übertragen Phosphatgruppen auf p53.^[6] Die damit verbundene Aktivierung des p53-Moleküls bewirkt, dass Gene mit p53-Erkennungsse-

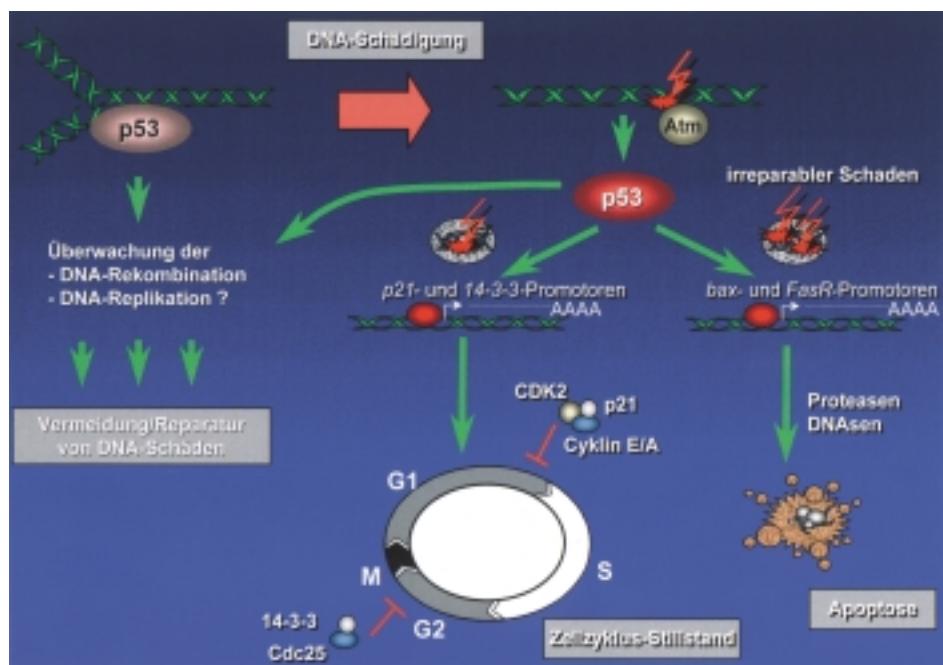


Abbildung 1. Die Rolle von p53 als „Wächter des Genoms“. p53 bewahrt die genetische Integrität in Zellen während natürlicher Proliferationsphasen durch Überwachung von Rekombinations- und möglicherweise auch von Replikationsprozessen. Die Abbildung zeigt weiterhin die intrazellulären Signalwege, die in Stresssituationen durch Vermittlung von p53 zum Wachstums-Stop oder zum aktiven Zelltod führen.

quenzen angeschaltet werden. Das Produkt des Zielgens *p21^{WAF}* ist ein Inhibitor der für G1/S-Zellzyklus-Stadien spezifischen Kinasen CyklinE:Cdk2 und CyklinA:Cdk2 und verhindert so die Verdopplung geschädigter DNA.^[5, 7] Das Produkt des 14-3-3-Gens blockiert die Phosphatase Cdc25, welche für die Aktivierung der Cdk1-Kinase am G2/M-Übergang benötigt wird. So verhindert das Protein 14-3-3, dass sich geschädigte Zellen mitotisch teilen. Die Zielgene, die für Todesrezeptoren wie CD95(APO-1/Fas-R) und für einen Antagonisten des antiapoptotischen Faktors Bcl2, Bax, codieren, vermitteln die Einleitung des aktiven Zelltodes. Während der letzten Jahre wurde aus mehreren Laboratorien berichtet, dass p53 über seine wachstumsregulatorischen Funktionen hinaus an DNA-Reparaturprozessen, insbesondere an der Rekombination, aktiv teilnimmt.^[8] Rekombinationsprozesse beinhalten den DNA-Austausch zwischen zwei Genom-Abschnitten und sind der letztmögliche Reparaturmechanismus, wenn aufgrund von DNA-Doppelstrangbrüchen die fehlende Information durch Replikation vom komplementären Strang nicht übertragen werden kann. Unter Verwendung spezieller Testsysteme konnte demonstriert werden, dass p53 die Genauigkeit von Rekombinationsprozessen kontrolliert, d.h., insbesondere die Häufigkeit fehlerhafter Austauschereignisse um ein bis zwei Größenordnungen herabsetzt.^[9] Somit erreicht p53 die Aufrechterhaltung der Genomstabilität während natürlicher

[*] Dr. L. Wiesmüller
Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie
an der Universität Hamburg
Martinistraße 52, 20251 Hamburg (Deutschland)
Fax: (+49) 40-48051-117
E-mail: wiesmuel@hpi.uni-hamburg.de

Proliferationsphasen und in zellulären Stresssituationen durch Aktivitäten sowohl bei der rekombinativen DNA-Reparatur als auch durch Anschaltung von Wachstumsregulatoren.^[10]

Gemäß dieser zentralen und gleichzeitig äußerst komplexen Rolle von p53 als Tumorsuppressor avancierte dieses Protein seit seiner Entdeckung vor 20 Jahren zum wichtigsten Studienobjekt innerhalb der Krebsforschung. Im Bereich der Diagnose wird heute mit gentechnischen, mikroskopischen und biochemischen Verfahren angestrebt, den funktionellen Status von p53 in Tumoren festzustellen, um den Heilungserfolg durch individuelle Krebstherapien zu steigern.^[4] So erwiesen sich beispielsweise p53-defiziente Kolonkarzinom-Zellen als resistent gegenüber 5-Fluorouracil, einem Hemmstoff der DNA-Synthese, jedoch als äußerst empfindlich gegenüber Bestrahlung. Insgesamt scheinen je nach p53-Mutation und Krebstherapeutikum die Beeinträchtigung der Reparatur oder der Verlust der Apoptose entgegengesetzte zelluläre Antworten hervorzurufen. Bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien wird in der Grundlagen- und in der klinischen Forschung versucht, in Tumorzellen die Apoptose-vermittelnden Eigenschaften von Wildtyp-p53 zu verstärken oder nach Verlust zu rekonstituieren, indem durch Applikation synthetischer Peptide der Angriff der zellulären Proteinabbau-Maschinerie auf p53 blockiert oder die Rückfaltung von p53-Mutanten zur Wildtyp-Konformation katalysiert wird oder dadurch, dass mit adenoviralen oder retroviralen Gen-Vektoren Wildtyp-p53 in defiziente Zielzellen eingeschleust wird.^[11–13] Die derzeit wohl vielversprechendste Strategie (klinische Erprobungs-Phasen I und II) wurde von der Firma ONYX Pharmaceuticals in Richmond (Kalifornien) entwickelt und beinhaltet die zielgerichtete Zerstörung von Tumorzellen, denen funktionelles Wildtyp-p53 fehlt, durch virale Lyse.^[14] Hierfür wurde das Genom eines Adenovirus so manipuliert, dass dieser ausschließlich in p53-defizienten Zellen vermehrungsfähig ist und somit nur die Krebszellen aktiv abtötet.

Theoretisch sollten die gleichen Funktionen, die Wildtyp-p53 die Eliminierung von Tumorzellen ermöglichen, auch supprimiert werden können, um normales Gewebe vor der zerstörerischen Wirkung von genotoxischem Stress zu bewahren. Mit dem Ziel, eine entsprechende Strategie zur Linderung der Nebenwirkungen von Radio- und Chemotherapien für Patienten mit Tumoren ohne funktionelles Wildtyp-p53 zu entwickeln, durchsuchten Komarov und Mitarbeiter in ihrer kürzlich in *Science* publizierten Arbeit^[15] eine Bibliothek von 10000 synthetischen Verbindungen nach Inhibitoren von Wildtyp-p53. Für das Auswahlverfahren verwendeten die Autoren die Mäuse-Fibroblasten-Zelllinie ConA, die Wildtyp-p53 enthält und in die das bakterielle Gen für β-Galactosidase (*lacZ*) in Kombination mit einer synthetischen DNA-Erkennungssequenz für p53 eingeschleust worden war.^[15] Diese DNA-Kombination ermöglichte es, 14 h nach Behandlung der Zellen mit dem Cytostatikum Doxorubicin die gesteigerte Aktivität des zellulären p53-Proteins als transkriptioneller Transaktivator nachzuweisen. Ein Farbumschlag des β-Galactosidase-Substrates X-Gal nach Blau in den Zellkulturen der 96-Loch-Platten zeigte die Anschaltung des *lacZ*-Genes durch p53 an, ein Ausbleiben dieser Färbung die

Inhibierung dieser Aktivität durch die jeweils zugesetzte Chemikalie. Eine wasserlösliche Verbindung mit einer relativen Molekulmasse von 367 bewirkte die deutlichste Beeinflussung und erhielt deswegen als „*p fifty three inhibitor*“ die Bezeichnung Pifitrin α (PFTα; Abbildung 2). In Konzentrationen von 10 μM unterdrückt PFTα zu mehr als 90 % die von p53 abhängige Genaktivierung nach Applikation von Doxorubicin ($\leq 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) oder nach UV-Bestrahlung ($\leq 25 \text{ J m}^{-2}$). Erwartungsgemäß wirkte PFTα auch inhibitorisch auf die transkriptionelle Transaktivierung chromosomaler Gene mit p53-Erkennungssequenzen und auf nachgeschaltete biologische Prozesse, nämlich je nach Zell- und DNA-Schadens-Typ auf die Einleitung des Stillstandes im Zellzyklus oder auf die Apoptose.

Der Vergleich von Zellen mit unterschiedlichem p53-Status belegte jeweils die p53-Abhängigkeit der PFTα-Effekte. Die antiapoptotische Wirkung von PFTα konnte mit einer Lebendzell-Färbetechnik und anschließender quantitativer Auswertung am Mikrotiterplatten-Lesegerät für geeignete tumorigene Zellen (C8) demonstriert werden. Nach UV-Bestrahlung oder Doxorubicin-Applikation wurden bis zu 90 % der Zellen durch PFTα-Behandlung vor dem Zelltod geschützt, für die Chemotherapeutika Etoposid, Taxol und Ara C ergab sich ein maximal zweifacher protektiver Effekt. Die PFTα-vermittelte Hemmung der Fähigkeit von p53, nach γ-Bestrahlung den Stillstand des Zellzyklus in der G1-Phase einzuleiten, wurde durch Fluorescence-activated-Cell-Sorting (FACS)-Analysen für ConA-Fibroblasten demonstriert. Nach Färbung der zellulären DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann mit dieser Methode durchflusszytometrisch der DNA-Gehalt in Einzelzellen gemessen und somit der Anteil der Zellen einer Population, die sich in Stadien vor oder nach der DNA-Verdopplung befinden, bestimmt werden.

Zur Klärung der Frage, auf welcher Stufe des Signalübertragungsweges, der von DNA-Schäden ausgelöst wird, die Wirkung von PFTα einzuordnen ist, wurde alternativ zur Schadensinduktion Wildtyp-p53 mit einem Gen-Vektor in p53-defizienten Zellen (Saos-2) produziert. Da PFTα unter diesen Bedingungen weiterhin die von p53 eingeleitete Apoptose unterdrückte, muss der Inhibitor p53 nachgeschaltet sein. Eine Beeinflussung des Aktivierungszustandes von p53 durch veränderte Modifikationsmuster, vor allem durch Phosphatgruppenübertragungen, konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung der p53-Proteine in zwei Dimensionen nach Ladung und Masse weitgehend ausgeschlossen werden.^[6] Die der transkriptionellen Transaktivierung von p53-Zielgenen zugrunde liegende Bindung an bestimmte Erkennungssequenzen wird ebenfalls nicht von PFTα beeinträchtigt, da die Bildung hochmolekularer Komplexe aus radioaktiv markierten DNA-Sonden und p53 gleichermaßen für Proteine aus unbehandelten wie aus PFTα-behandelten Zellen in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese nachgewiesen wurde. Als einzige Veränderung nach PFTα-Gabe beobachteten die Autoren die Abnahme der zellulären p53-Menge, insbesondere in den Zellkernen, wie aus Immunoblots

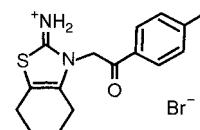


Abbildung 2. Chemische Struktur von Pifitrin α (2-(2-Imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-p-tolylethanone-hydrobromid).

(Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern nach Gelelektrophorese und Membrantransfer) abzulesen war. Unklar blieb bislang, ob dieses Phänomen auf eine verminderte Neusynthese von p53 zurückzuführen ist, auf eine erhöhte Instabilität des Proteins oder auf einen gestörten Import in den Zellkern.

Um die Anwendbarkeit von PFT α beim Schutz vor toxischen Nebenwirkungen von Krebstherapien zu prüfen, wurden im nächsten Schritt Experimente am lebenden Tier durchgeführt. Mäusen zweier Zuchttämme wurden intraperitoneal 2.2 mg PFT α pro kg Körpergewicht injiziert, anschließend mit 8 Gy ionisierender Strahlung behandelt und die Überlebensrate, das Körpergewicht und Gewebsveränderungen 100 Tage lang beobachtet. Innerhalb dieses Zeitraums wurde vollständiger Schutz vor dem Strahlungs-induzierten Tod durch PFT α festgestellt, bei gleichzeitig geringem Gewichtsverlust als ohne Vorbehandlung. Letzterer korrelierte mit verminderter Apoptose in den bestrahlten Geweben, was mit einer Färbetechnik zur mikroskopischen Darstellung von Chromosomenbrüchen gezeigt wurde („TUNEL-Assay“). Interessanterweise entdeckten die Autoren in den Mäusen keinerlei Tumoren bis zu sieben Monate nach Bestrahlung und Wirkstoff-vermittelter Inaktivierung von p53.

Es ist umstritten, dass p53 ein zentraler Faktor bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität und damit bei der Unterdrückung von Krebs ist.^[3] In diesem Licht erscheinen die vielversprechenden Daten von Komarov und Kollegen geradezu unglaublich: Wieso führt der Funktionsverlust in p53-Null-Mäusen innerhalb von sechs Monaten zur Entstehung bösartiger Tumore, während die p53-Inaktivierung durch PFT α trotz zusätzlicher DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlen keinerlei entartetes Zellwachstum nach sich zieht?^[15, 16] Wurden die Versuchstiere nicht lange genug beobachtet, oder war die Zahl der Tiere (30) zu gering? Langzeitstudien mit mehreren tausend Versuchstieren scheinen unumgänglich zu sein, ähnlich wie dies nach der lebhaften Diskussion um die umstrittenen Versuche bezüglich der Nebenwirkungen eines Schneeglöckchen-Gens in gentechnisch veränderten Kartoffeln angestrebt wird.^[17] Der scheinbare Widerspruch zwischen PFT α -vermittelter p53-Inaktivierung und fehlender Krebssuszeptibilität könnte jedoch mit der Multifunktionalität des Tumorsuppressors erklärt werden. Obwohl PFT α , wie von Komarov et al.^[15] gezeigt wurde, die Wachstums-regulatorischen Funktionen von p53 unterdrückt, besteht in Analogie zum Verhalten bestimmter p53-Mutanten die Möglichkeit, dass diese Verbindung keinen Einfluss auf

die Überwachung von DNA-Reparaturprozessen durch p53 hat.^[10, 18] In der Tat ließ bereits das Fehlen von Tumoren bei p21-Null-Mäusen wie auch bei einem Teil der Mäuse mit der transkriptionell inaktiven Mutante p53(135Val) vermuten, dass andere Mechanismen als die Wachstumsregulation zur Tumorsuppression durch p53 beitragen müssen.^[19, 20] Sollten DNA-Reparaturstudien und gründliche Analysen bezüglich möglicher Mutationen oder genomicscher Umordnungen in Geweben nach kombinierter PFT α - und Strahlenexposition belegen, dass PFT α gezielt die p53-abhängige Selbstzerstörung chemo- oder radiotherapiert Zellen verringert, gleichzeitig aber nicht zu einer Destabilisierung des Genoms führt, könnte diese Entdeckung die Lebensqualität von Krebspatienten in Zukunft tatsächlich verbessern helfen.

-
- [1] B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Trends Genet.* **1993**, *9*, 138–141.
 - [2] M. S. Greenblat, W. P. Bennett, M. Hollstein, C. C. Harris, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4855–4878.
 - [3] D. P. Lane, *Nature* **1992**, *358*, 15–16.
 - [4] G. McGilland, D. E. Fisher, *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 223–225.
 - [5] T. Jacks, R. A. Weinberg, *Nature* **1996**, *381*, 643–644.
 - [6] D. W. Meek, L. E. Campbell, L. J. Jardine, U. Knippschild, L. Kendrick, D. M. Milne, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 416–419.
 - [7] A. Levine, *Cell* **1997**, *88*, 323–331.
 - [8] F. Janus, N. Albrechtsen, I. Dornreiter, L. Wiesmüller, F. Grosse, W. Deppert, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 12–27.
 - [9] C. Dudenhöffer, G. Rohaly, K. Will, W. Deppert, L. Wiesmüller, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 5332–5342.
 - [10] C. Dudenhöffer, M. Kurth, F. Janus, W. Deppert, L. Wiesmüller, *Oncogene* **1999**, *18*, 5773–5784.
 - [11] A. Bottger, V. Bottger, A. Sparks, W. L. Liu, S. F. Howard, D. P. Lane, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 860–869.
 - [12] G. Selivanova, L. Ryabchenko, E. Jansson, V. Iotsova, K. G. Wiman, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 3395–3402.
 - [13] M. Favrot, J. L. Coll, N. Louis, A. Negoescu, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 728–739.
 - [14] J. R. Bischoff, D. H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey, F. McCormick, *Science* **1996**, *274*, 373–432.
 - [15] P. G. Komarov, E. A. Komarova, R. V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J. S. Coon, M. V. Chernov, A. V. Gudkov, *Science* **1999**, *285*, 1733–1737.
 - [16] L. A. Donehower, M. Harvey, B. L. Sladec, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, J. S. Butel, A. Bradley, *Nature* **1992**, *356*, 215–221.
 - [17] S. W. Ewen, A. Puszta, *Lancet* **1999**, *354*, 1353–1354.
 - [18] Y. Saintigny, D. Rouillard, B. Chaput, T. Soussi, B. S. Lopez, *Oncogene* **1999**, *18*, 3553–3565.
 - [19] C. Deng, P. Zhang, J. W. Harper, S. J. Elledge, P. Leder, *Cell* **1995**, *82*, 675–684.
 - [20] D. L. Schaffner, P. Chevez-Barrios, S. L. Huang, R. Barrios, B. F. Dickey, M. R. Shaker, S. Rajagopalan, G. M. Habib, R. M. Lebovitz, M. W. Lieberman, *Lab. Invest.* **1996**, *74*, 1005–1011.