

Annette Allmendinger

Dr. med.

Über die Eignung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins TPX2 als Ziel einer pharmakologischen Krebstherapie

Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. Martin R. Berger

TPX2 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das während der Mitose essentiell für die Ausbildung einer funktionstüchtigen Spindel ist. Dabei nimmt es über mehrere Mechanismen Einfluss auf die Ausbildung der Mitosespindel: TPX2 ist an einer Chromatininduzierten Knospung von Mikrotubuli beteiligt, rekrutiert das Motorprotein Hklp2/ Kif15 und die Kinase Aurora A an die Spindelmikrotubuli, aktiviert Aurora A und ist an der Organisation der Spindelpole beteiligt. TPX2 wird zudem in verschiedenen Tumoren vermehrt exprimiert und das Ausmaß der TPX2-Expression korreliert mit der Malignität mehrerer Tumorentitäten.

Seine essentielle Bedeutung für die Zellteilung ließ erwarten, dass TPX2 ein aussichtsreiches Target für die pharmakologische Behandlung maligner Neoplasien ist. Um die Eignung von TPX2 als Target experimentell zu validieren, wurden in dieser Arbeit die Methoden der Tetracyclin-abhängigen konditionalen Genexpression (Tet-On-System) und der RNA-Interferenz kombiniert. Die Zelllinien HeLa-EM2-11-TPX2 und -22-TPX2 erlauben einen zeitlich gesteuerten Knockdown von TPX2 (und eine simultane Expression des Fluoreszenzproteins eGFP) durch Gabe des Induktors Doxycyclin (Dox). Für in-vitro- Versuche wurde eine Dox-Konzentration von 0,2 µg/ml im Zellkulturmedium gewählt, da sich bei dieser Konzentration eine ausreichende Aktivierung des Tet-On-Systems und geringe unspezifische Effekte zeigten. Für in-vivo-Versuche wurde entsprechend eine Dox-Konzentration von 0,2 mg/ml im Trinkwasser der Tiere gewählt.

Das Ausmaß des TPX2-Knockdowns wurde in beiden Zelllinien anhand von quantitativer Real-Time-PCR und Western-Blot auf mRNA- bzw. Proteinebene quantifiziert. Innerhalb von 72 Stunden fiel die mRNA-Menge auf 12 % bzw. 14 % der Kontrolle ab. Die Proteinmenge von TPX2 erreichte nach 48 Stunden ca. 20 % des Wertes der Kontrollzellen. Ergänzend wurde durchflusszytometrisch ermittelt, dass nach 72 Stunden Inkubation mit Dox ca. 95 % der Zellen eine Expression von eGFP aufwiesen.

In den darauffolgenden Versuchen wurden die Auswirkungen einer reduzierten TPX2-Expression auf den Zellzyklus, die Zellproliferation in vitro und die Tumorphiliferation in vivo untersucht. In der Zellzyklusanalyse mittels FACS der Propidiumiodid-gefärbten Zellen zeigte sich eine deutliche Reduktion der G1/G0-Population von etwa 60 % auf 40 %. Die G2/M-Population blieb mit ca. 20 % annähernd stabil. Ein starker Anstieg wurde dafür in der sub-G1-Population beobachtet. In diesen Experimenten zeigte sich unter verminderter TPX2-Expression also vor allem eine Apoptose-Induktion, jedoch keine signifikante Anreicherung der Zellen in der Mitose.

Die Beeinflussung der Zellproliferation durch eine reduzierte TPX2-Expression wurde in vitro anhand von MTT-Tests untersucht. Hier wurde die Zellproliferation von HeLa EM2-11-TPX2 und -22-TPX2 innerhalb von 72 Stunden auf ca. 50 % der Kontrolle reduziert. In einem murinen Xenograft-Modell wurden die Effekte einer reduzierten TPX2-Expression in vivo ermittelt. Unter Gabe von Dox kam es zu einem deutlichen

Rückgang der Wachstumsrate von Tumoren der Zelllinien HeLa EM2-11-TPX2 und -22-TPX2 und vorübergehend auch zu einem geringen Rückgang des mittleren Tumolvolumens. Das Tumorwachstum wurde durch den TPX2-Knockdown jedoch nicht dauerhaft arretiert: Etwa 10 Tage nach Beginn der Dox-Gabe stieg die Wachstumsrate der Tumoren wieder an. Von Therapiestart bis Versuchsende (Therapiedauer 14 Tage) wurde das Tumorwachstum der Zelllinien HeLa EM2-11-TPX2 und -22-TPX2 durch Gabe von Dox im Vergleich zur Kontrolle um 71 % bzw. 88 % verringert.

Schließlich wurde untersucht, ob ein TPX2-Knockdown erfolgreich mit den klassischen Spindelgiften Vincristin und Docetaxel kombiniert werden kann. Die Effekte der Kombinationstherapien wurden in vitro mittels MTT-Test untersucht. Die alleinige Gabe der Zytostatika Vincristin oder Docetaxel führte im MTT-Test zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellproliferation in TPX2-Knockdown- und Kontrollzelllinien. Durch die Kombinationstherapien kam es zu einer weiteren Reduktion der Zellproliferation von HeLa EM2-11-TPX2 und -22-TPX2 im Vergleich zu den Einzeltherapien. Für die Kombination von TPX2-Knockdown und Vincristin zeigte sich in vitro ein synergistischer antiproliferativer Effekt. Unter Kombinationsbehandlung mit TPX2-Knockdown und Docetaxel konnte in vitro keine Abweichung von einem additiven antiproliferativen Effekt festgestellt werden.

Im murinen Xenograft-Modell zeigten sich folgende Ergebnisse: Die Einzelbehandlung mit Vincristin verringerte das Tumorwachstum von HeLa EM2-11-TPX2 und -22-TPX2 auf 41 % bzw. 18 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch die Behandlung mit Docetaxel wurde das Tumorwachstum auf 24 % bzw. 25 % reduziert. Die Kombination von Vincristin und TPX2-Knockdown führte zu einer Reduktion der Tumorproliferation auf 7 % bzw. 1 % der Kontrolle. Die Kombination von Docetaxel und TPX2-Knockdown bewirkte eine Verringerung des Tumorwachstums auf 3 % bzw. 2 % der Kontrolle. Beide Kombinationstherapien waren sowohl dem alleinigen TPX2-Knockdown als auch der jeweiligen Einzeltherapie mit Vincristin oder Docetaxel statistisch signifikant überlegen. Die hier erzielten Ergebnisse stehen in Einklang mit vergleichbaren in-vivo-Experimenten an Pankreaskarzinom- und hepatozellulären Karzinom-Zelllinien sowie in-vitro-Experimenten an mehreren humanen Tumorzelllinien.

Aufgrund dieser Beobachtungen erscheint TPX2 als pharmakologisches Target aussichtsreich und die Kombination einer TPX2-Inhibition mit klassischen Spindelgiften sinnvoll.