

Fiona Roswitha Kolbinger

Dr. med.

## **Development of selective histone deacetylase 8 and 10 inhibitors: analysis of biological function and antitumor activity in childhood cancer**

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Olaf Witt

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor des Kindesalters. Je nach Ausprägung phänotypischer und molekularer Faktoren werden Risikogruppen stratifiziert, deren Therapie und Prognose sich deutlich voneinander unterscheiden: Während Patienten mit Niedrigrisiko-Neuroblastomen eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90 % besitzen, liegt diese bei Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastom bei etwa 50 %, und häufig leiden Patienten sowohl während als auch nach aggressiver multimodaler Therapie unter Nebenwirkungen, die ihre Lebensqualität maßgeblich beeinträchtigen. Die Prognose eines Neuroblastom-Rezidivs ist nahezu infaust. Im Sinne einer gezielten Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms könnte es daher von Vorteil sein, molekulare Zielstrukturen pharmakologisch zu beeinflussen.

Hohe intratumorale Expression der Lysin-Deacetylasen HDAC8 und HDAC10 sind negative prognostische Parameter im Neuroblastom respektive Hochrisiko-Neuroblastom. HDAC8-Inhibition induziert in vitro eine Differenzierung unreifer Neuroblasten und hemmt im Neuroblastom-Xenograft-Modell das Tumorwachstum in vivo. HDAC10-Inhibition resultiert durch Wechselwirkungen mit lysosomalen Homöostasemechanismen in einer intrazellulären Akkumulation applizierter Chemotherapeutika und schließlich im Zelltod kultivierter Hochrisiko-Neuroblastomzellen. Bis dato wurde kein HDAC-Inhibitor beschrieben, der HDAC8 und HDAC10 in niedrigen mikromolaren Konzentrationen hemmt und die HDACs 1, 2 und 3 in seinem Selektivitätsprofil ausspart. Nebenwirkungen bereits klinisch zugelassener Breitband-HDAC-Inhibitoren (u.a. Panzytopenie, Elektrolytentgleisungen und das Fatigue-Syndrom) werden auf eine Inhibition dieser Klasse I-HDACs zurückgeführt und könnten durch eine Applikation Subtyp-spezifischer HDAC-Inhibitoren umgangen werden, die lediglich die für die Tumorbologie relevanten HDACs hemmen.

In der präsentierten Studie wurden zunächst zehn Hydroxamsäurederivate hinsichtlich ihrer HDAC-Subtyp-Spezifität analysiert. Die Enzym-Inhibition wurde dabei sowohl biochemisch als auch in Tumorzellen bestimmt. Anschließend wurde in acht pädiatrischen Tumorzelllinien die antitumorale Wirksamkeit der Kandidaten-Inhibitoren untersucht. Zusammenfassend ergaben sich bei diesen Analysen deutliche Unterschiede sowohl im HDAC-Inhibitionsspektrum als auch in der antiproliferativen Wirksamkeit der Inhibitoren.

Die Kandidatensubstanz TH34 konnte als Inhibitor der HDACs 6, 8 und 10 identifiziert werden und zeigte besonders vielversprechende antitumorale Effekte in Hochrisiko-Neuroblastomzellen, während eine Behandlung mit TH34 in Medulloblastom- und embryonalen Rhabdomyosarkom-Zelllinien wesentlich geringer wirksam war. Eine Behandlung mit TH34 beeinflusste die Viabilität nichttransformierter humaner Zellen nur äußerst geringfügig und wurde von Mäusen gut toleriert. In Neuroblastom-Zelllinien waren MYCN-amplifizierte Zelllinien (SK-N-BE(2)-C, IMR-32, Kelly) wesentlich empfindlicher gegenüber TH34-Behandlung als nicht-MYCN-amplifizierte Zelllinien (SH-SY5Y, SK-N-AS); andere genetische Aberrationen wie Mutationen von TP53 oder ALK korrelierten nicht mit der Sensitivität der Neuroblastomzellen gegenüber HDAC6/8/10-Inhibition.

Zur mechanistischen Analyse der Effekte einer pharmakologischen Hemmung der HDACs 6, 8 und 10 im Neuroblastom wurden auf Grundlage dieser Ergebnisse weitere Experimente mit TH34 durchgeführt. TH34-Behandlung führte in klassischen und primären Neuroblastom-Zellkulturen zu frühen Behandlungszeitpunkten (24 Stunden) zu DNA-Doppelstrangbrüchen sowie der Aktivierung entsprechender DNA-Reparaturmechanismen, angezeigt durch eine konzentrationsabhängige Zunahme an  $\gamma$ H2AX-Foci. Dieser Prozess ließ sich durch Zugabe des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK nicht aufheben, was belegt, dass die DNA-Schäden keine Folge einer Caspasen-Aktivierung sind, sondern ein früher, davon unabhängiger Vorgang. Zu späteren Zeitpunkten konnte eine Aktivierung zellulärer Caspasen nachgewiesen werden, und analog reduzierte die Zugabe eines Caspase-Inhibitors den beobachteten Zelltod von Hochrisiko-Neuroblastomzellen nach 72 Stunden Behandlung signifikant.

Darüber hinaus induzierte HDAC6/8/10-Inhibition eine Häufung aberranter Mitosefiguren und Zellzyklusarrest. Unter Behandlung mit TH34 exprimierten Neuroblastomzellen außerdem vermehrt molekulare Marker neuronaler Differenzierung (NTRK1, CDKN1A, NEFM), was sich phänotypisch im Wachstum neuritenähnlicher Zellausläufer widerspiegelte. Kombiniert mit Retinsäure zeigte sich im Bereich niedriger mikromolarer Konzentrationen zudem ein Synergismus hinsichtlich der Inhibition des Neuroblastomzell-Koloniewachstums.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein neuartiger, selektiver Inhibitor der HDACs 6, 8 und 10, TH34, identifiziert werden, der in Neuroblastomzellen über die Induktion von DNA-Schäden zu Caspase-vermitteltem programmiertem Zelltod und neuronaler Differenzierung führt und synergistisch mit Retinsäure das Wachstum von Neuroblastomzellen hemmt. Gegenüber nicht-transformierten humanen Zellen und in vivo zeigte TH34 dabei keine relevante Toxizität, was den Wirkstoff, auch in Kombination mit Retinsäure, für weiterführende therapeutische Studien im klassischen oder orthotopen Neuroblastom-Xenograft-Modell qualifiziert. Insgesamt stützen diese Ergebnisse die Anwendung selektiver HDAC-Inhibitoren als antineoplastische Wirkstoffe und unterstreichen das therapeutische Potenzial selektiver HDAC6/8/10-Inhibition im Hochrisiko-Neuroblastom.