

Michael Müller
Dr. med.

Combining oxidative stress and histone deacetylase inhibitors: novel targeted treatment options for pediatric malignancies.

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. Ina Oehme

Seit mehr als zwanzig Jahren stagnieren die durchschnittlichen Überlebensraten von pädiatrischen Krebspatienten, woraus sich ein dringender Bedarf an neuen therapeutischen Strategien ableitet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Strategie untersucht: die Kombination von APR-246 und Histondeacetylase Inhibition. APR-246 ist ein Medikament, dessen Wirkmechanismus zunächst als p53-Reaktivierung beschrieben wurde. Aufgrund verschiedener Veröffentlichungen konnte jedoch ein alternativer Wirkmechanismus als wahrscheinlicher identifiziert werden: Durch kovalente Bindung und daraus resultierende Hemmung von Glutathion kommt es zur Induktion reaktiver Sauerstoffspezies, die zum Zelltod führen. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass dies der Hauptwirkungsmechanismus ist.

Zu Beginn der Arbeit wurden Neuroblastom-Zelllinien und pädiatrische hochgradige Gliom-Zelllinien mit APR-246 behandelt. Eine Korrelation zwischen dem p53-Mutationsstatus und der Sensitivität konnte dabei nicht festgestellt werden, und auch die anknüpfenden p53-Signalweganalysen konnten keine Reaktivierung nachweisen. Im Vergleich zu hochgradigen Gliomzellen erwiesen sich die Neuroblastom-Zelllinien jedoch als besonders empfindlich.

Durch Kombination der Datensätze der Cancer Cell Line Encyclopedia und des Cancer Therapeutics Response Portals konnte gezeigt werden, dass einerseits keine Korrelation zwischen p53-Mutationsstatus und Empfindlichkeit besteht. Andererseits wurde festgestellt, dass vor allem Neuroblastom-Zelllinien zu den empfindlichsten Entitäten gehören. Neben dem p53-Mutationsstatus wurde auch *SLC7A11*, das für einen Teil eines Transporters kodiert, der die Menge an intrazellulärem Glutathion reguliert, bereits als potenzieller Biomarker beschrieben: Je weniger *SLC7A11* eine

Zelle exprimiert, desto weniger Cystein nimmt sie auf, desto weniger Glutathion kann sie produzieren und desto empfindlicher reagiert sie auf die Behandlung mit APR-246. Eine geringe Expression von *SLC7A11* wurde generell in Neuroblastom-Zelllinien festgestellt. Dieses Expressionsmuster wurde nicht nur in Zelllinien verschiedener Tumorentitäten festgestellt, sondern auch in Sequenzdaten, die direkt aus Biopsien von Tumorpatienten stammen. Somit liegt der Schluss nahe, dass die beschriebenen präklinischen Ergebnisse auch auf die klinische Praxis übertragbar sind.

SLC7A11 erwies sich zwar als nützlich bei der Identifizierung empfindlicher Entitäten, war aber nicht als prädiktiver Biomarker für die Stratifizierung empfindlicher Zelllinien geeignet. Übertragen auf die Klinik wäre es daher kein nützlicher Biomarker, um Patienten zu identifizieren, die auf eine solche Therapie ansprechen könnten. Ein solcher Marker ist allerdings für eine erfolgreiche klinische Anwendung unerlässlich. Aus diesem Grund wurden die oben genannten Datenbanken erneut verwendet, um eine genetische Signatur zu erstellen, die die Empfindlichkeit deutlich besser vorhersagt als bisherige Biomarker-Kandidaten. Mit dieser Signatur war es möglich, die Empfindlichkeiten von zufällig ausgewählten etablierten Tumormodellen und patientennahen Kurzzeitkulturen, die in dieser Arbeit getestet wurden, korrekt vorherzusagen.

In der Annahme eines durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelösten Wirkmechanismus wurde die Behandlung mit APR-246 mit der Inhibition von Histondeacetylasen kombiniert. Letztere sind eine Familie von Enzymen mit vielfältigen zellulären Wirkungen, von denen eine die intrazelluläre Erhöhung des Stresses durch reaktive Sauerstoffspezies ist. Ein Nutzen der Kombination von Histondeacetylase-Hemmung und APR-246-Behandlung wurde in mehreren Neuroblastom-Modellen mit verschiedenen Histondeacetylase-Inhibitoren nachgewiesen, und als Kombination zeigten APR-246 und der Histondeacetylase-Inhibitor Vorinostat synergistische Effekte. Neuroblastom-Modelle, die weniger empfindlich auf APR-246 reagieren, konnten durch die Kombination weiter sensibilisiert werden. Auf dieser Grundlage konnte die folgende vielversprechende therapeutische Strategie entwickelt werden: Nach einer verlängerten Vorbehandlung mit einem HDAC-Inhibitor wurden die Zellen anschließend mit APR-246 behandelt. Auf diese Weise wurden die Zellen zunächst durch eine Erhöhung der basalen Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies sensibilisiert und anschließend durch APR-246 der Zelltod

induziert. Die Wirksamkeit der Kombination aus einem HDAC-Inhibitor und APR-246 auch in einem Zebrafischembryo-Xenograft-Modell nachgewiesen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag dazu geleistet hat, den Wirkmechanismus von APR-246 besser zu verstehen, einen prädiktiven Biomarker zu etablieren und die Weichen für die klinische Umsetzung zu stellen. Im Hinblick auf die Behandlung des Neuroblastoms wurden in der vorliegenden Arbeit neue therapeutische Strategien vorgeschlagen, bei denen sowohl APR-246 als auch seine Kombination mit Histondeacetylase-Inhibition zum Einsatz kamen und die die derzeit stagnierende Therapielandschaft in Zukunft erweitern könnten.