

// Identifizierung von Biomarkern zur Vorhersage genotoxischer Wirkmechanismen //

E. KRÄMER
R. FRÖTSCHL
(BfArM)

Neue Arzneistoffe müssen unter anderem dahingehend geprüft werden, ob sie Mutationen auslösen und damit Krebserkrankungen verursachen können. Dieses mutagene Potenzial von Arzneistoffen wird aktuell mit In-vitro- und In-vivo-Tests geprüft. Bei positiven In-vitro-Befunden muss häufig mit Hilfe aufwendiger Tiermodelle der genotoxische Wirkmechanismus aufgeklärt werden.¹ Inzwischen sind unterschiedliche Mechanismen bekannt, mit denen genotoxische Substanzen den Zellzyklus sowie die Apoptose beeinflussen. Ein Ziel ist daher, mit Hilfe von neuen Methoden der Genomik sowie funktionellen Analysen Testsysteme zu entwickeln, mit denen es möglich wird, unbekannte Substanzen zuverlässig in vitro auf ihr mutagenes Potenzial hin zu überprüfen.^{2,3} Am BfArM wird ein solches Forschungsprojekt in Zusammenarbeit mit Prof. Jürgen Borlak, Fraunhofer ITEM, Hannover, durchgeführt. An der Lebertumorzelllinie HepG2 wird der Einfluss bekannter mutagener Substanzen auf die Schlüsselproteine p53 und p21 untersucht.

GEN- UND PROTEINAKTIVITÄT IM BLICK

Ziel des Forschungsprojektes ist es, durch Untersuchung des Expressionsprofils toxikologisch relevanter Gene und ihrer Genprodukte – der Proteine – in HepG2-Zellen potenzielle Biomarker für genotoxische Wirkungsmechanismen zu charakterisieren. Bei HepG2-Zellen handelt es sich um eine gut charakterisierte Lebertumorzelllinie. Das Expressionsprofil gibt Auskunft darüber, welche Gene in einer bestimmten Situation in mRNA übersetzt werden können. Die mRNA kann dann durch Prozesse der posttranskriptionalen Modifikation zu einem Protein übersetzt werden. Regulationsprozesse der Zelle können diese Modifikation jedoch erst einmal verhindern oder sogar die mRNA wieder abbauen, sodass die Übersetzung zum Protein verhindert werden kann.

Zellzyklusproteine und Apoptosekontrollproteine spielen eine zentrale Rolle für die Aktivität der Zelle und für den programmierten Zelltod, der häufig bei mutierten Zellen ausgeschaltet ist. P53 ist ein Schlüsselprotein bei der Antwort der Zelle auf genotoxischen Stress. P53 kann unabhängig von seiner Genexpression eine Änderung der zellulären Proteinkonzentration bewirken. Im stressfreien Zustand ist p53 in einem konstanten und weitgehend inaktiven Level in der Zelle vorhanden. Als Antwort auf äußere Stressfaktoren kann die Menge und Aktivität von p53 oder nur die Aktivität erhöht werden. Dabei ist einer der ersten Aktivierungsschritte die spezifische Phosphorylierung des Proteins.⁴ Diese Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung kann zur Expression des Proteins p21 führen. P21 beeinflusst den Zellzyklus und induziert im Falle von starken DNA-Schäden auch die Apoptose.⁵

Eine der ersten Untersuchungen im Forschungsprojekt „Identifizierung von Biomarkern“ war daher die Erstellung eines Expressionsprofils mit Fokus auf p53 und p21 sowie die Phosphorylierung von p53 und der Anstieg von p21-Proteinen in HepG2-Zellen. Dabei wurden die Zellen mit fünf bekannten genotoxischen Substanzen – Bleomycin (BM), Etoposid (EP), Benzo(a)pyren (BP), N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNH) oder Griseofulvin (GF) – behandelt, die verschiedene, bereits charakterisierte genotoxische Wirkmechanismen besitzen. Die genotoxischen Konzentrationen der Substanzen in den Zellen werden mittels Mikrokern-Test und Comet Assay ermittelt. Mit dem Mikrokern-Test lassen sich Chromosomenschäden und Schäden des Spindelapparates aufdecken. Comet Assay, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, ist eine Technik, die es ermöglicht, DNA-Schädigungen in einzelnen Zellen festzustellen.

REFERENZEN

1. Hu T et al.: Identification of a gene expression profile that discriminates indirect-acting genotoxins from direct-acting genotoxins. *Mutat Res.* 2004;549(1-2):5-27
2. Saito S et al.: Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37536-37544
3. Stewart ZA et al.: Increased p53 phosphorylation after microtubule disruption is mediated in a microtubule inhibitor- and cell-specific manner. *Oncogene.* 2001;20(1):113-124
4. Appella E et al.: Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.* 2001;268(10):2764-2772
5. Yang PM et al.: Loss of IKKbeta activity increases p53 stability and p21 expression leading to cell cycle arrest and apoptosis. *J Cell Mol Med.* 2010;14(3):687-698
6. Houser S et al.: Camptothecin and Zeocin can increase p53 levels during all cell cycle stages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(5):998-1009
7. Slamenová D et al.: Differences between survival, mutagenicity and DNA replication in MMS- and MNU-treated V79 hamster cells. *Mutat Res.* 1990;228(1):97-103

Die HepG2-Zellen wurden zu je drei Zeitpunkten (1 h, 4 h, 24 h) mit den Substanzen behandelt. Nach den Behandlungszeiten wurden die Proteine aus den Zellen extrahiert und der Nachweis von p21 und der Phosphorylierung des Proteins p53 an verschiedenen Aminosäuren – Serin 15, 46 und 392 – mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gemessen. Für das Expressionsprofil wurden die Zellen für eine Stunde mit den Substanzen behandelt. Nach einer Erholungsphase von je 3, 7, 15 oder 23 h wurde aus den Zellen die RNA extrahiert und darüber das Expressionsprofil von rund 1.150 Genen mittels Microarray ermittelt. Zur Kontrolle der Microarraymessungen wurden elf Gene mit Real-Time-PCR (RT-PCR) nachgemessen.

BISHERIGE BEFUNDE

Die getesteten Mutagene unterscheiden sich darin, zu welchem Zeitpunkt und in welchem Ausmaß sie die Phosphorylierung des Proteins p53 induzieren (siehe Tabelle). Bleomycin zeigt dabei den größten Effekt. Der p21-spezifische ELISA zeigt, dass Bleomycin nach 4 und 24 h auch hier die stärkste Induktion aufweist. Bei Etoposid wird ebenfalls ein Effekt auf p21 nach 4 und 24 h beobachtet. Bei N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff lässt sich eine Aktivität von p21 nur nach 4 h erkennen. Griseofulvin und Benzo(a)pyren induzieren messbare Zunahmen des p21-Levels erst nach 24 h.

Tabelle: Phosphorylierung der Aminosäure Serin an verschiedenen Positionen im Protein p53 sowie die Zunahme der Konzentration des Proteins p21 nach Inkubation von HepG2-Zellen mit verschiedenen mutagenen Substanzen

Substanzen/Zeit	Serin 15			Serin 46			Serin 392			p 21		
	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h
Bleomycin	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	
Etoposid	x	x	x			x			x			x
Benzo(a)pyren			x									x
N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff			x			x		x	x			x
Griseofulvin						x			x			x

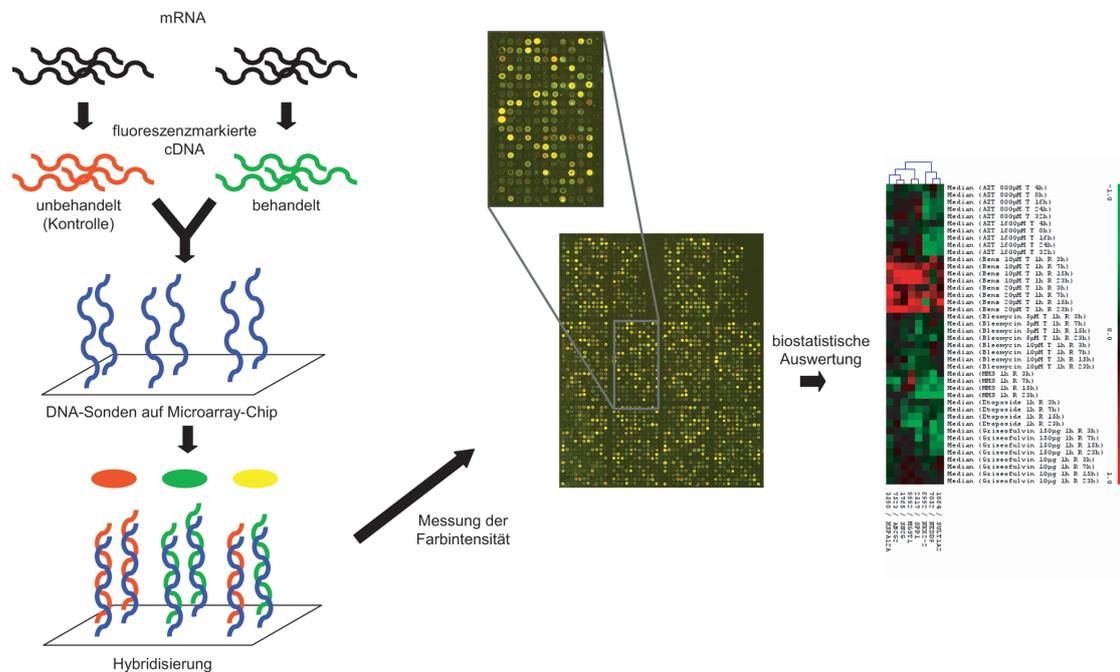
Die Expressionsprofil-Untersuchungen auf RNA-Ebene zeigen bei keinem der genotoxischen Behandlungen eine Änderung der Expression von p53 in HepG2-Zelllinien. Die p21-Expression hingegen ist bei Bleomycin, Etoposid, N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff und Benzo(a)pyren erhöht. Griseofulvin zeigt keinen Effekt. Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von p21 unabhängig von Expressionsänderungen des p53 zu sein scheint. Dagegen induziert offenbar die Phosphorylierung von p53 jedoch die Expression von p21.

Die beobachtete starke Aktivität von Bleomycin wird möglicherweise durch die komplexe genotoxische Wirksamkeit der Substanz vermittelt: Bleomycin ist ein Interkalator. Interkalatoren zeichnen sich durch aromatische Ringsysteme aus, mit denen sie sich zwischen die Basen der DNA einschieben können. Darüber hinaus bildet Bleomycin ein Chelat und produziert ein Pseudoenzym, welches die Produktion von freien Radikalen generiert. Diese verursachen den direkten Doppelstrangbruch der DNA.

Etoposid agiert indirekt, indem es die Topoisomerase II hemmt. Die Substanz erzeugt genauso wie Bleomycin Doppelstrangbrüche und somit ausgeprägten mutagenen Stress. Die Strangbrüche werden im Regulationsprozess der Zelle erkannt. Einer dieser Regulationsprozesse ist auch die Phosphorylierungsaktivität am Protein p53, welches so aktiviert wird und nun einerseits DNA-Reparaturmechanismen in Gang setzen kann, andererseits wird der Zellzyklus gestoppt.

Abbildung:
Microarray-Technik
(Schema)

DNA-Sonden werden auf dem Microarray (Objektträger) aufgebracht. Die zu untersuchende mRNA wird in cDNA umgeschrieben, wobei Nucleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen eingebaut werden. Parallel dazu wird die Kontroll-mRNA mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnet. Die beiden Proben werden zusammengegeben. Bei der anschließenden Hybridisierung binden die markierten cDNA-Stücke entsprechend ihren Mengenverhältnissen an die komplementären DNA-Sonden. Anschließend wird das Fluoreszenzsignal quantitativ ausgewertet.



Benzo(a)pyren selbst ist nicht toxisch, es benötigt erst eine metabolische Aktivierung durch Cytochrom P450-1A1. Dadurch wird das Mutagen Benzo(a)pyren-Diolepoxid generiert. Dieses Molekül bindet kovalent an die N²-Position der DNA-Base Guanin. Die Bildung des Benzo(a)pyren-Diolepoxid benötigt einige Zeit und ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass eine Phosphorylierung von Benzo(a)pyren erst nach 24 h nachzuweisen ist (siehe Tabelle Seite 16).⁶

N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff interagiert direkt mit der DNA durch einen nukleophilen Angriff und der Methylierung hauptsächlich am O⁶ vom Guanin.⁷ Die von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff gesetzten DNA-Schäden führen erst nach 24 h zu einer Aktivierung der p53-Phosphorylierung. Trotzdem steigt die p21-Konzentration in der Zelle bereits nach 4 h an. Dies deutet bei N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff-Behandlung auf einen p53-unabhängigen Anstieg der p21-Konzentration in der Zelle hin.

Griseofulvin bindet an einer bestimmten Region der Tubulin- α - und - β -Untereinheiten und verhindert deren Abbau. Dieser Prozess führt erst in der Zellteilung zu Veränderungen am Erbmateriale (aneugene Effekte) und zeigt erst nach 24 h nachweisbare Effekte auf p53 und p21. Dies passt zu den erst nach 24 h nachweisbaren Effekten auf p53 und p21 in HepG2-Zellen (siehe Tabelle Seite 16).

AUSBLICK

Alle getesteten Referenzsubstanzen unterscheiden sich in ihrem Profil der p53-Phosphorylierung und p21-Induktion. Inwieweit diese Profile wirkmechanismusspezifisch sind und Biomarkerqualitäten haben, muss im weiteren Verlauf des Projekts geprüft werden. Wenn sich dies bestätigt, könnte es möglich werden, ein Testsystem zu entwickeln, in dem allein durch Zeitverlauf und Ausmaß von Genexpression und Protein-Phosphorylierung bestimmte mutagene Wirkmechanismen erkannt werden können.