

**Deregulierte zelluläre Antwort auf die DNA Schädigung in *BRCA1* -kompetenten
BrustkrebspatientInnen als neues therapeutisches Target**

Projekt - Österr. Krebshilfe

Antragstellerin: Ao. Univ.-Prof. Dr. Jozefa Gadek-Wesierski

Institut für Krebsforschung; Univ. Klinik für Innere Medizin I, Medizinische Universität
Wien

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde ein neuer therapeutischer Ansatz, die sogenannte ‘synthetische Letalität’, entwickelt, in dem genetische Veränderungen in Krebszellen effektiv genutzt werden, um diese selektiv zu töten. Dieser neue Ansatz basiert auf der Tatsache, dass Brustkrebszellen, die kein funktionelles Brustkrebs-assoziiertes Protein 1 oder 2 (*BRCA1/BRCA2*) besitzen und infolge dessen Defizite in der homologen Rekombination (HR) aufweisen, hypersensitiv auf die Hemmung der Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP-1) reagieren. Pharmakologische Inhibitoren von PARP-1 in Kombination mit zytotoxischen Anti-Krebs Medikamenten oder Strahlungstherapie verursachen genetische Instabilität, vor allem in *BRCA1/2* mutierten Zellen, die zum Zelltod führen. Überraschenderweise, konnten wir zeigen, dass *BRCA1*-kompetente BT-20 Brustkrebszellen hypersensitiv gegenüber der Inhibition von PARP sind [1].

Das Ziel dieses wissenschaftlichen Projektes war es, die Komponenten der fehlregulierten Antwort von *BRCA1*-kompetenten Brustkrebszellen auf DNA-Schädigung zu identifizieren und die Rolle von *TP53* in der Reaktion auf die Hemmung von PARP-1 zu charakterisieren. Die Aufklärung der synthetisch letalen Interaktion in *BRCA1/2*-kompetenten Tumorzellen könnte dabei helfen neue potentielle therapeutische Targets zu identifizieren und den therapeutischen Nutzen von PARP-1-Inhibitoren sowohl in der Mono-, als auch in der Kombinationstherapie mit anderen Anti-Krebs-Medikamenten wie Topoisomerase-Inhibitoren, zu erweitern.

In unseren bisherigen Arbeiten wurde zur Hemmung der PARP-1-Aktivität NU1025 eingesetzt. Da diese Verbindung die Proliferation von *BRCA1*-defizienten SKBr-3 Zellen nur sehr schwach

beeinflusst hat und kaum einen Schaden in der DNA hervorrief, konnte man nicht ausschließen, dass die Sensitivität der Brustkrebszellen (u.a. der untersuchten SKBr-3 Zellen) gegenüber einzelnen PARP-1 Antagonisten divergieren kann. Wir haben daher in diesem Projekt neben NU1025 auch vier andere PARP-1 Inhibitoren wie AZD2461, Iniparib, Olaparib und Rucaparib, die in klinischen Studien getestet werden, eingesetzt. Es wurde zuvor in mehreren veröffentlichten Studien gezeigt, dass Iniparib PARP-1, das an der Reparatur der DNA-Einzelstrangbrüche beteiligte Enzym, irreversibel inhibiert. Iniparib wurde zur Behandlung verschiedener Karzinome, z.B. Lungenkarzinom und beim dreifach rezeptor-negativen Brustkrebs (*triple-negative breast cancer*, TN) eingesetzt. Die zunächst vielversprechenden Ergebnisse in Bezug auf progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben nach Behandlung mit Iniparib bei dreifach rezeptornegativem (TN) Brustkrebs konnten später in einer weiteren Phase-III-Studie nicht bestätigt werden.

Die Auswirkung der pharmakologischen Interferenz mit der PARP-1-Aktivität auf die Vitalität der Zellen und die Zellzyklusregulation wurde unter Einsatz von 5 verschiedenen Verbindungen (AZD2461, Iniparib, NU1025, Olaparib und Rucaparib) ausgewertet. Interessanterweise zeigten sich SKBr-3 Zellen sensitiv lediglich gegenüber der Wirkung von AZD2461; nach der Behandlung mit 50 μ M AZD2461 für 72 h wurde die Zahl der lebenden SKBr-3 Zellen signifikant (ca. 50%) reduziert.

Wir haben die Auswirkung der PARP-1 Hemmung auf den Spiegel von ca. 4500 zellulären Proteinen in 3 Brustkrebszelllinien bestimmt. Unsere Resultate zeigen, dass sich die Hemmung des PARP-1 Enzyms generell sehr stark (bis zu 50-fach) auf die Expression mehrerer Proteine, die unterschiedliche zelluläre Funktionen regulieren, in den untersuchten Brustkrebszellen auswirkt. Es erscheint besonders interessant, dass die PARP-1 Inaktivierung in den *BRCA1/2*-defizienten SKBr-3 Brustkrebszellen den zellulären Spiegel mancher Onkoproteine und Regulatoren der Zellteilung erhöht, während in *BRCA1/2*-kompeten BT-20 Zellen der gleiche Inhibitor zur deutlichen Konzentrationsreduktion mehrerer Proteine, die u.a. DNA-Reparatur, Transkription und rRNA Prozessierung kontrollieren, führt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Reduktion der DNA-Reparatur und rRNA-Prozessierung die *BRCA1/2*-kompetenten BT-20 Zellen zur Induktion der Apoptose sensibilisiert. Im Gegensatz dazu scheint der Anstieg mancher Onkoproteine, GTPasen und zellulärer Bestandteile, die sowohl die DNA-Synthese als auch den Zellzyklus positiv regulieren, die Vermehrung von *BRCA1/2*-defizienten Brustkrebszellen zu beschleunigen.

In der ersten Phase des Projektes haben wir die Folgen der pharmakologischen Interferenz mit der Aktivität von ATM Kinase in zwei Brustkrebszelllinien (MCF-7 und SKBr-3 Zellen) mit unterschiedlichen Defekten in DNA-Reparatur-Prozessen untersucht. Während humane SKBr-3 Zellen *BRCA1*-negativ sind, weisen MCF-7 Zellen eine Mutation in *RAD51C*, einem *RAD51* Paralog, auf.

Die Serin-Proteinkinase ATM (abgeleitet von **A**taxia **t**elangiectasia **m**utated) ist ein sehr sensibler Sensor von DNA-Läsionen, insbesondere von Doppelstrangbrüchen. Nach DNA-Schädigung kommt es zur Aktivierung der ATM-Kinase und in der Folge zur Mobilisierung einer abwärts gelegenen Signalkaskade, die wiederum die Rekrutierung von spezifischen DNA Reparaturproteinen direkt an den DNA-Läsionen induziert und damit die Reparaturprozesse einleitet. Zwei klinisch getestete Inhibitoren von ATM Kinase (**KU55933** und **CP466722**) wurden in unseren Experimenten eingesetzt. Es hat sich herausgestellt, dass KU55933 nach der Behandlung für 48 h keine anti-proliferative Wirkung in beiden Zelllinien zeigte und lediglich eine schwache Reduktion der Zahl von MCF-7 Zellen nach Exposition für 72h bewirkte (**Abb. 1A**). Im Gegensatz dazu kam es zur viel stärkeren Reduktion der Zahl der lebenden MCF-7 und SKBr-3 Zellen nach der Behandlung mit CP466722, einem zweiten ATM-Blocker, die bereits nach der Behandlung von 48 h einsetzte (**Abb. 1A & B**). Die Unterschiede in der Wirksamkeit von beiden Inhibitoren bei äquimolaren Konzentrationen ($C_E = 10 \mu\text{M}$) in den SKBr-3 Zellen waren statistisch signifikant (**Abb. 1A**). Generell waren humane SKBr-3 Brustkrebszellen stärker sensitiv zur Hemmung der ATM-Kinase als MCF-7 Zellen (siehe den Vergleich der IC_{50} Werte; Abb. 1B)

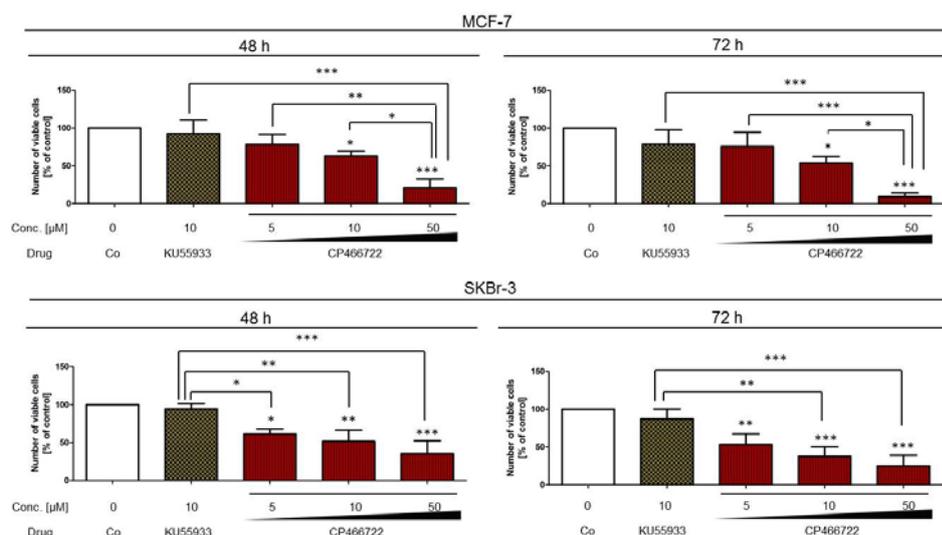


Abb. 1A. Behandlung der humanen MCF-7 und SKBr-3 Brustkrebszellen mit KU55933 für 48 h zeigt keine anti-proliferative Wirkung in beiden Zelllinien.

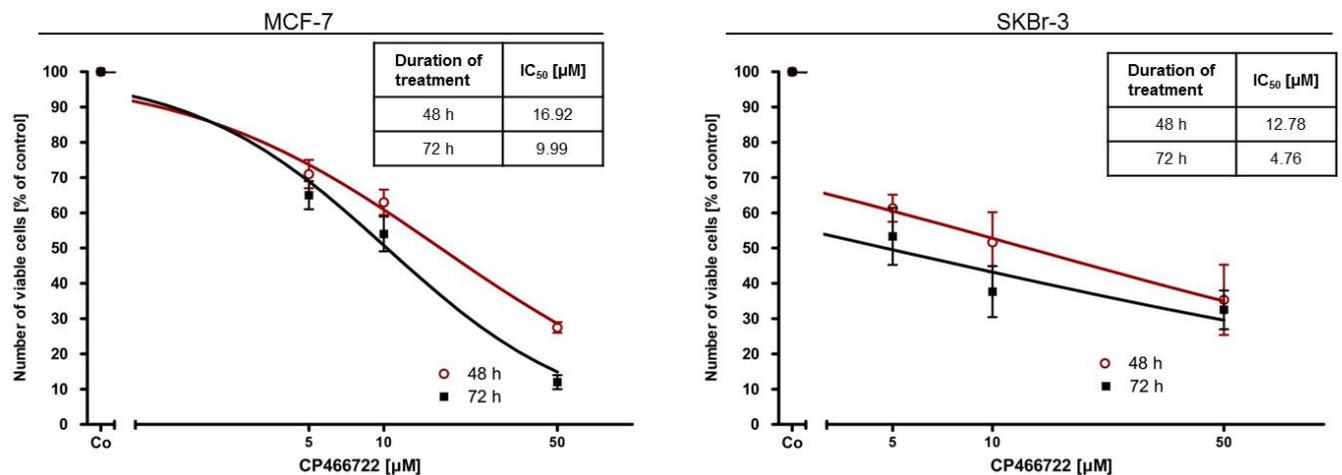


Abb. 1B. Signifikante Reduktion der Zahl der lebenden MCF-7 und SKBr-3 Zellen nach der Behandlung mit CP466722. Die Reduktion der Zahl der lebenden Krebszellen setzte bereits nach der Behandlung von 48 h ein.

In unseren bisherigen Arbeiten wurde NU1025 zur Hemmung der PARP-1-Aktivität eingesetzt. Da diese Verbindung nur sehr schwach die Proliferation von BRCA1-defizienten SKBr-3 Zellen beeinflusst hat und kaum einen Schaden in der DNA hervorrief, konnte man nicht ausschließen, dass die Sensitivität der Brustkrebszellen (u.a. der untersuchten SKBr-3 Zellen) gegenüber einzelnen PARP-1 Antagonisten divergieren kann. Wir haben daher in diesem Projekt neben NU1025 auch vier andere PARP-1 Inhibitoren wie AZD2461, Iniparib, Olaparib und Rucaparib eingesetzt.

Die Zulassung zur klinischen Studien war entscheidend für die Wahl der zu testenden Inhibitoren. Im Lauf dieses Projektes hat sich herausgestellt, dass Iniparib das an der DNA-Reparatur beteiligte Enzym PARP-1 irreversibel inhibiert und zur Behandlung verschiedener Karzinome, z.B. Lungenkarzinom und beim dreifach rezeptornegativen Brustkrebs (*triple-negative breast cancer*, TN) eingesetzt wurde. Die zunächst vielversprechenden Ergebnisse in Bezug auf progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben nach Behandlung mit Iniparib bei dreifach rezeptornegativen Brustkrebs konnten allerdings später in einer weiteren Phase-III-Studie nicht bestätigt werden.

Die Auswirkung der pharmakologischen Interferenz mit der PARP-1-Aktivität auf die Vitalität der Zellen und die Zellzyklusregulation wurde unter Einsatz von 5 verschiedenen

Verbindungen (AZD2461, Iniparib, NU1025, Olaparib und Rucaparib) ausgewertet (**Abb. 2 A & B**). Interessanterweise zeigten sich SKBr-3 Zellen sensitiv lediglich gegenüber der Wirkung von AZD2461. Nach der Behandlung mit AZD2461 ($C_E = 50 \mu\text{M}$) für 72 h wurde die Zahl der lebenden SKBr-3 Zellen signifikant (ca. 50%) reduziert.

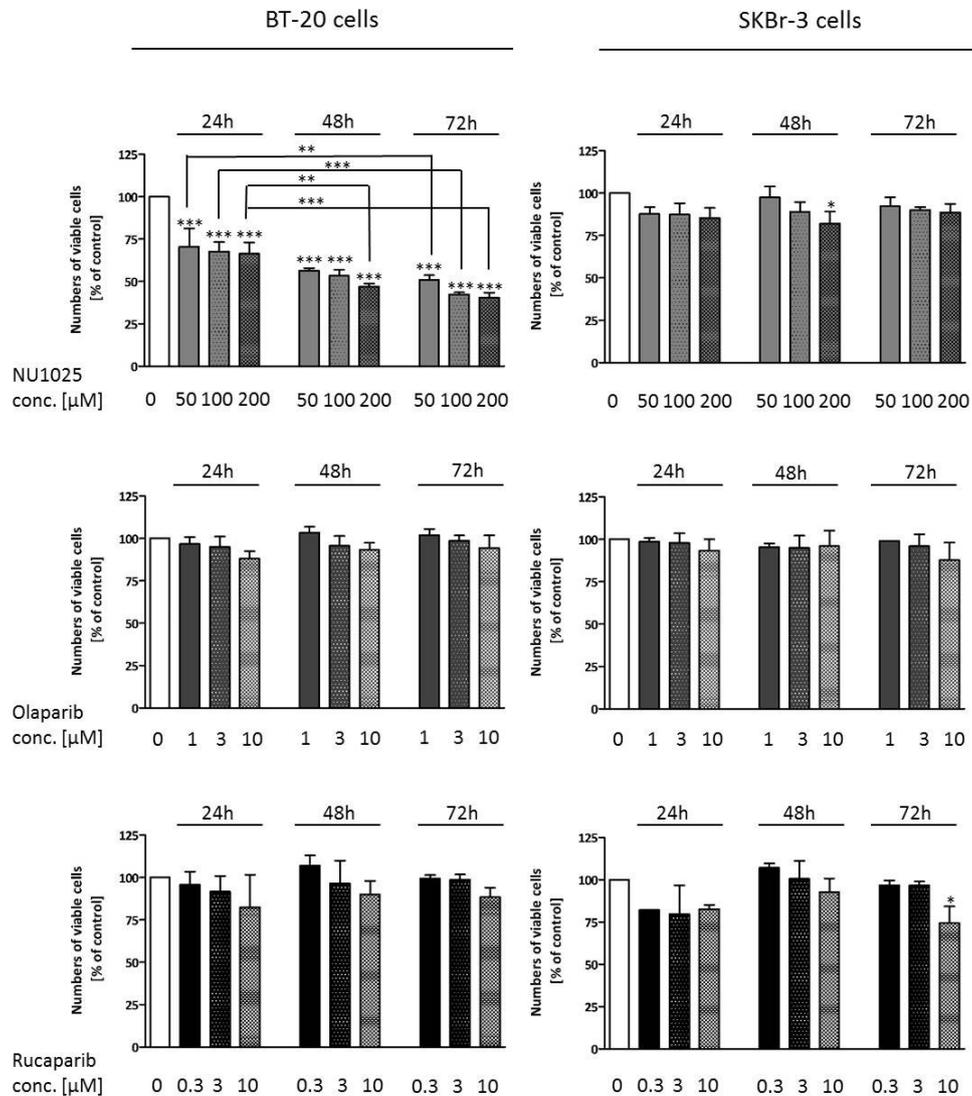


Abb. 2A. Signifikante Reduktion der Zahl der lebenden BT-20 Zellen nach der Behandlung mit NU1025. Die Reduktion der Zahl der lebenden Krebszellen setzte bereits nach der Behandlung von 24 h ein.

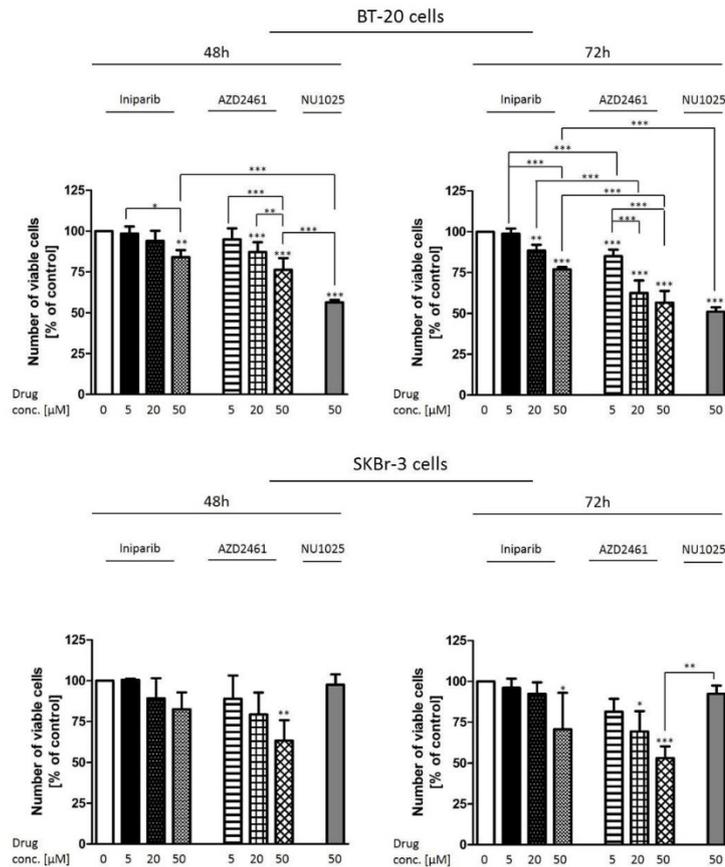


Abb. 2B. Verstärkte Sensitivität von humanen SKBr-3 Zellen zur AZD2461-vermittelten Hemmung der PARP-1 Aktivität

Die auffallend geringe Wirksamkeit von Olaparib und Rucaparib in BT-20 Zellen im Vergleich mit NU1025 veranlasste uns ihre zytotoxische Wirkung zu überprüfen. Als geeigneter Parameter wurde die spezifische Phosphorylierung von Histon H2AX gewählt. Die Phosphorylierung von Histon H2AX an Serin in der Position 139 stellt einen Indikator der durch DNA-Schädigung ausgelösten Aktivierung der zellulären ATM-Kinase.

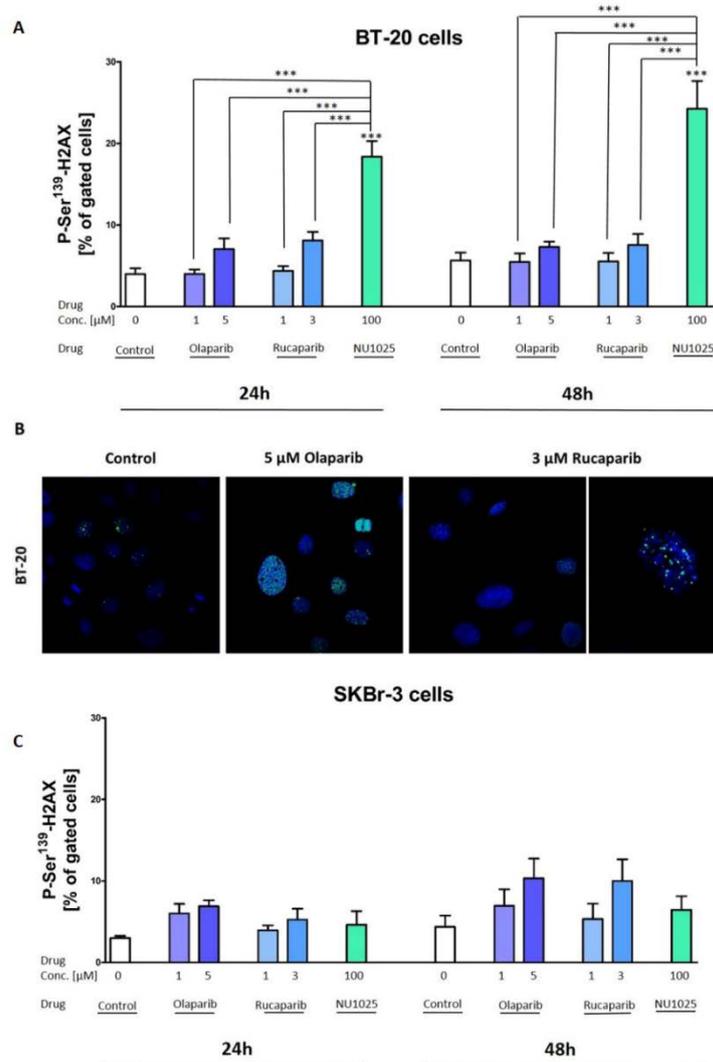


Abb. 3. Unterschiede in der Kinetik der Induktion der Doppelstrangbrüche im Erbgut nach der Inaktivierung von zellulärem PARP-1: Starker Anstieg von dsDNA Strangbrüchen in NU1025-behandelten BT-20 Zellen.

Unbehandelte Kontrollzellen und Zellen nach der Behandlung mit drei PARP-Inhibitoren (Olaparib, Rucaparib bzw. NU1025) wurden mit einem Antikörper gegen P^{Ser139}-H2AX inkubiert und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (**Fig. 3 A & C**) oder *in situ* gefärbt und im konfokalen Mikroskop analysiert (**Fig. 3B**). Die Interferenz mit der PARP-1 Aktivität hat nur zum geringen Anstieg der spezifischen H2AX-Phosphorylierung in SKBr-3 Zellen geführt. Im Gegensatz dazu kam es nach der Hemmung der PARP-1 Aktivität mittels NU1025 zur signifikanten Aktivierung der ATM-Kinase und H2AX-Phosphorylierung an Serin 139.

Im Weiteren wurde der Einfluss der drei PARP-1 Inhibitoren auf die Zellzyklusprogression in den getesteten Brustkrebszellen untersucht. Die drei eingesetzten Hemmstoffe (insbesondere Olaparib & Rucaparib) führten nach 24h zu einer transienten Akkumulation der BT-20 Zellen in der G₂-Phase assoziiert mit einer Reduktion der G₁-Zellen (**Fig. 4**). Im Gegensatz dazu wurde die Zellzyklusprogression von SKBr-3 Zellen kaum durch die Hemmung von PARP-1 (**Fig. 4**) beeinflusst.

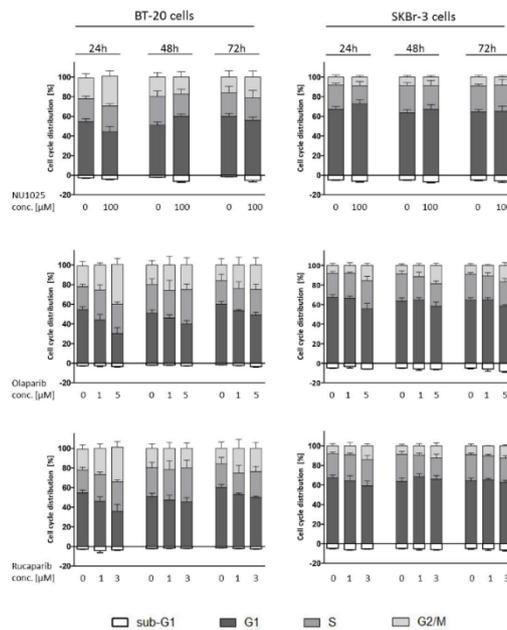


Abb. 4. Pharmakologische Interferenz mit der PARP-1 Aktivität führt nach 24h zur transienten Akkumulation der BT-20 Zellen in der G₂-Phase.

Da die drei getesteten PARP-1-Inhibitoren (Olaparib, Rucaparib bzw. NU1025) kaum einen Einfluss auf den Zellzyklus in den SKBr-3 Zellen zeigten, stellte sich die Frage, ob sie ihre biologische Wirkung auf die untersuchten Zellen *via* Induktion des Zelltodes (d.h. Apoptose) lenken können. Um die Zellen sowohl in frühen und als auch fortgeschrittenen Stadien des Zelltodes erfassen zu können, haben wir den *Live cell assay* (Schmid et al. 2007) zur Bestimmung der Apoptosenrate herangezogen. Die durchflusszytometrische Quantifizierung der Zellen, die ausschließlich Hoechst 33342 bzw. 7-AAD oder gleichzeitig beide Fluorochrome akkumulieren, ermöglicht die früh- und spät-apoptotische Zellen von jenen, die nekrotisch sind, abzugrenzen. Wie in **Abb. 5** gezeigt, induzierte NU1025 stark den Zelltod in den BT-20 Zellen aber nicht in den SKBr-3 Zellen. Interessanterweise, keinen nennenswerten Anstieg der Apoptosenrate konnte man nach der Behandlung mit Olaparib oder Rucaparib in beiden Zelllinien beobachten.

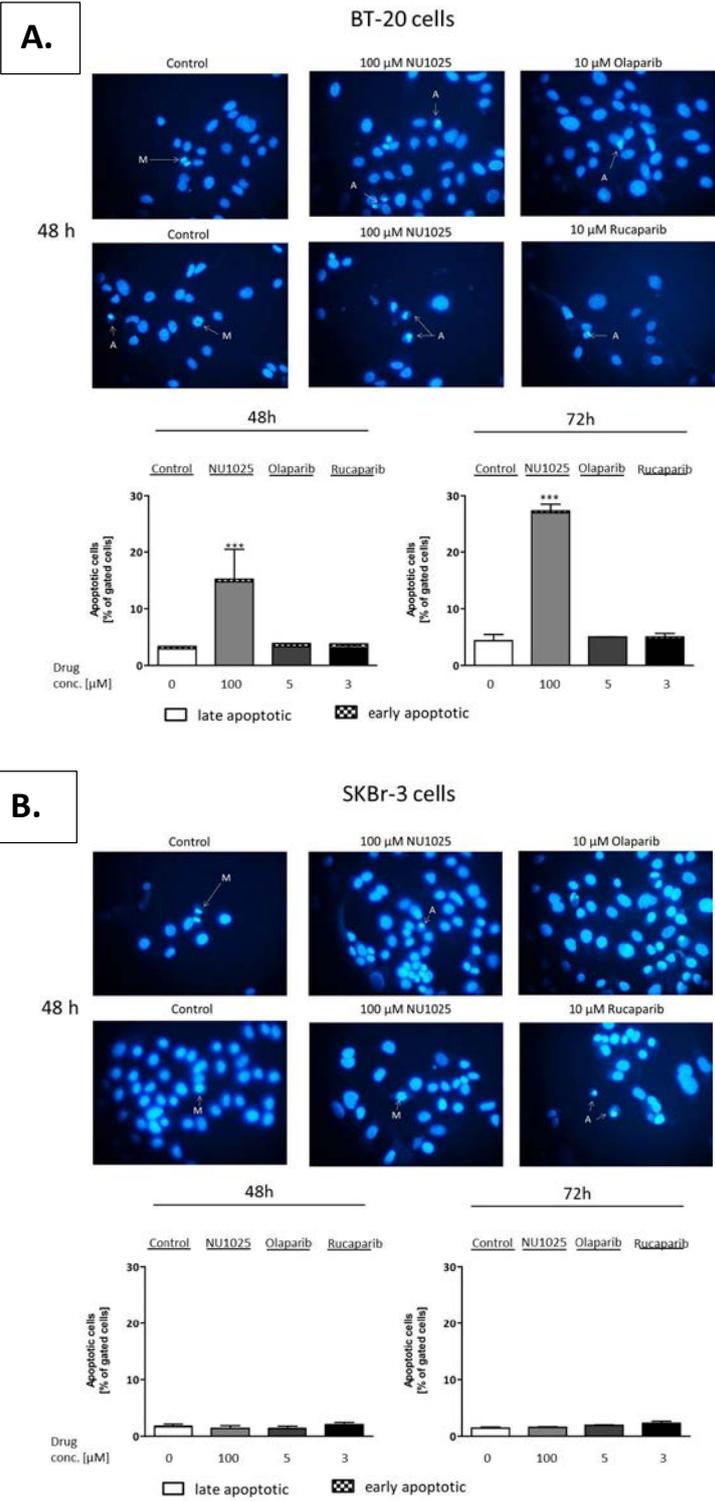


Abb. 5. Pharmakologische Interferenz mit der PARP-1 Aktivität mittels NU1025 induziert den Zelltod selektiv in BT-20 Zellen.

Interessanterweise zeigte AZD2461 eine stark anti-proliferative Wirkung auch gegenüber humanen ER-positiven MCF-7 Brustkrebszellen, die aufgrund der Inaktivierung der Caspase-3 bekanntlich Apoptose-resistent sind (**Abb. 6**).

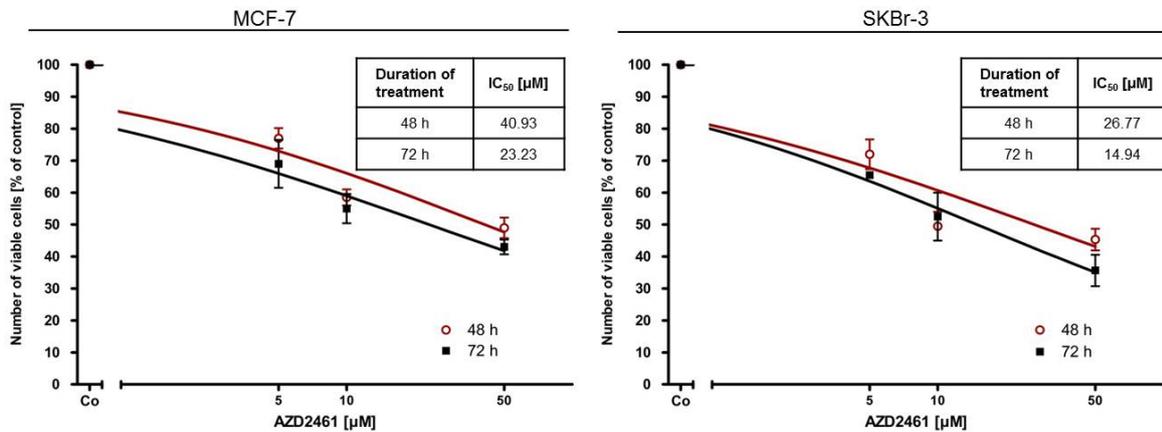


Abbildung 6. AZD2461 war synthetisch letal in beiden untersuchten Zelllinien.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Interferenz mit der PARP-1 Aktivität mittels AZD2461 unterschiedliche biologische Folgen in beiden Zellen auslöste. In Caspase-3 negativen MCF-7 Zellen induzierte AZD2461 primär die Arretierung des Zellzyklus in der G₂/M Phase (**Abb. 7**) während es in Caspase-3-positiven SKBr-3 Zellen für Apoptose charakteristische Veränderungen des Chromatins und in der Folge den programmierten Zelltod einleitete (**Abb. 8**).

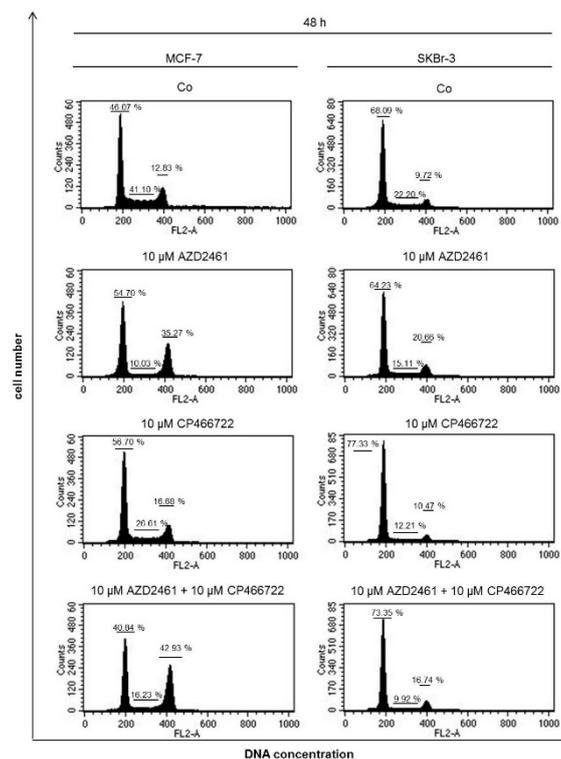


Abbildung 7. In MCF-7 Zellen induziert AZD2461 primär die Arretierung des Zellzyklus in der G₂/M Phase.

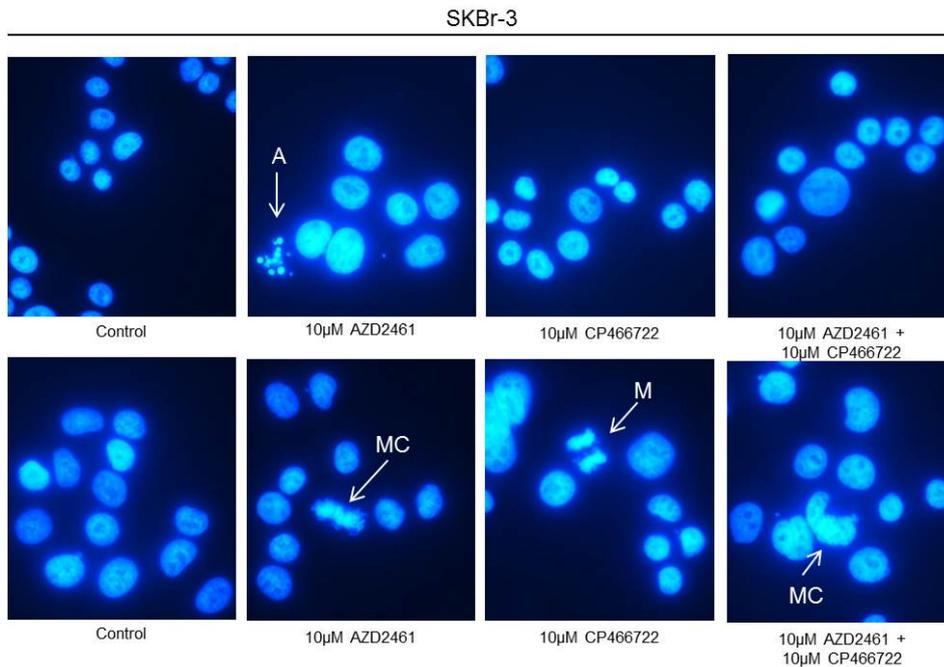


Abbildung 8. In SKBr-3 Zellen induziert AZD2461 primär den programmierten Zelltod mit charakteristischer Fragmentierung des Chromatins.

Proteom-Analysen (**Fig. 9; Tabelle 1**) ergaben, dass sich die PARP-1 Inaktivierung in BT-20 Zellen stark auf die Konzentration multipler Proteine auswirkte: der zelluläre Spiegel mehrerer Ribonukleoproteine, Chromatin-Remodeller (SWI/SNF), mitochondrialer Proteine und Prolyl-Isomerasen wurde stark (bis zu 30-fach) gesenkt. Auf der anderen Seite erhöhte die simultane Hemmung von PARP-1 und TOPOII alpha den Spiegel einiger ribosomaler Proteine (z.B. L46 und L49) bis zu 40-fach; die zelluläre Konzentration von Protein Phosphatase 23 wurde sogar 80-fach erhöht.

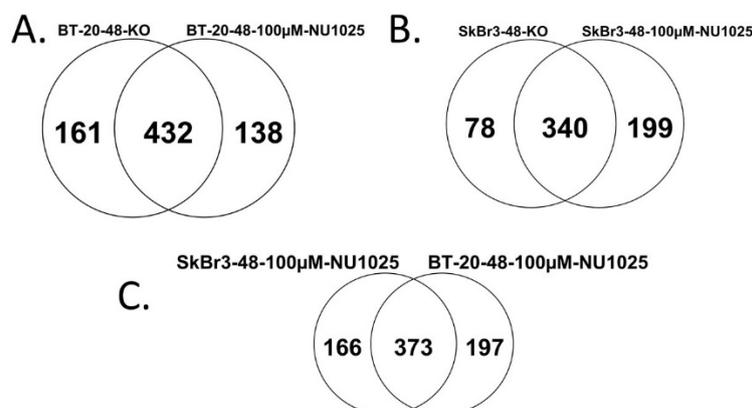


Abb. 9. Eine Proteomanalyse zeigte die Veränderungen in der Proteinexpression in den humanen BT-20 und SKBr-3 Zellen nach der Hemmung der PARP-1-Aktivität mit NU1025.

Unsere Resultate zeigen, dass in humanen Brustkrebszellen nicht nur Defekte in *BRCA1/2*, sondern auch in anderen Komponenten (e.g. *RAD51*) der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung, mit PARP Inhibitoren synthetisch letal sind. Die Reaktivierung von mutiertem p53 Protein verstärkt die Wirkung der pharmakologischen Interferenz mit PARP-1 in Brustkrebszellen, wobei die kooperative Wirkung von der Art der Mutation in *TP53* abhängt (Unterschiede in der *TP53* Mutation in Kodon 132 und 175).

Zusammenfassend stellen wir fest, dass ein wesentlicher Teil der in dem Projekt gestellten Ziele bisher erfolgreich realisiert werden konnte. Die im Rahmen des Projektes erzielten Ergebnisse wurden in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht (siehe **Publikationsliste**). Zurzeit werden noch die restlichen Resultate ausgewertet und zur Publikation vorbereitet.

Tabelle 1

Changes in the abundance of the selected proteins in NU1025-treated BT-20 cells				
No.	Protein name	Gene name	Change	Function
1.	Adenine phosphoribosyl-transferase	<i>APRT</i>	↑	Regulation of vesicular traffic and actin remodelling
2.	ADP-ribosylation factor 1	<i>ARF1</i>	↑	Regulation of vesicular traffic and actin remodelling
3.	DNA damage-binding protein 1	<i>DDB1</i>	↓	Role in nucleotide excision repair
4.	Nucleolar RNA helicase 2	<i>DDX21</i>	↓	rRNA processing
5.	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein	<i>NOLC1</i>	↓	rRNA transcription, nucleogenesis
6.	Cell division control protein 42 homolog	<i>CDC42</i>	↓	A small GTPase; diverse cellular functions
7.	Testin	<i>TES</i>	↓	Regulation of cell motility
8.	Fascin	<i>FSCN1</i>	↓	Organization of actin filament
9.	RNA binding protein 39	<i>RBM39</i>	↑	Regulation of transcription
10.	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	<i>TOMM70</i>	↑	Receptor accelerating the import of mitochondrial precursor proteins
Changes in the abundance of the selected proteins in NU1025-treated SKBr-3 cells				
No.	Protein name	Gene name	Change	Function
1.	ADP-ribosylation factor 4	<i>ARF4</i>	↑	Regulation of vesicular traffic and actin remodelling
2.	Breast carcinoma-amplified sequence 1	<i>BCAS1</i>	↑	A putative oncogene
3.	Proliferating cell nuclear antigen	<i>PCNA</i>	↑	Role in both DNA synthesis and DNA repair
4.	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kD helicase	<i>SNRNP200</i>	↑	Role in pre-mRNA splicing
5.	Ribonucleotide reductase large subunit	<i>RRM1</i>	↑	Catalysis of the biosynthesis of deoxyribonucleotides
6.	Cell division control protein 42 homolog	<i>CDC42</i>	↑	A small GTPase; diverse cellular functions
7.	Stathmin	<i>STMN1</i>	↑	Regulation of microtubule dynamics
8.	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	<i>HNRNPAB</i>	↑	Role in pre-mRNA processing
9.	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	<i>SYNCRIP</i>	↑	Role in pre-mRNA processing
10.	Mitochondrial import receptor subunit TOM40	<i>TOMM40</i>	↑	Regulation of protein transport into mitochondria

↑ - a weak effect; ↑ - a strong effect

Publikationen

1. J. Wesierska-Gadek & S. Heinzl. **2014**. Interactions between Ataxia telangiectasia mutated kinase inhibition, poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition and *BRCA1* status in breast cancer cells. *J. Cancer Prevention* 19(2): 125.
2. J. Wesierska-Gadek, M. Mauritz, G. Mitulovic & M. Cupo. **2015**. Differential potential of pharmacological PARP inhibitors for inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis in human breast cancer cells. *J.Cell. Biochem.* 116: 2824-39.
3. J. Wesierska-Gadek & M. Mauritz. **2016**. Why (multi)targeting of cyclin-dependent kinases is a promising therapeutic option for hormone-positive breast cancer and beyond. *Future Med. Chem.* 7(18) 55-72.

Artikel (in Vorbereitung)

4. J. Wesierska-Gadek & B. Morajda. 2016. Reactivation of p53 mutants to sensitize human breast cancer cells to DNA damage induced by inhibition of PARP-1 activity.
5. J. Wesierska-Gadek & M. Mauritz. 2016. Evaluation of the efficacy of pharmacological PARP-1 inhibitors in human breast cancer cells with varying potential to recognize and to repair DNA strand breaks.
6. J. Wesierska-Gadek, M. Serocki & A. Skladanowski. 2016. Pharmacological interference with the activity of nuclear PARP-1 potentiates the action of the RAD51 inhibitors in breast cancer cells.
7. J. Wesierska-Gadek, Ch. Gerner, M. Serocki & A. Skladanowski. 2016. Effect of the pharmacological interference with PARP-1 activity on cellular levels of chromatin remodelling proteins and chaperons.
8. J. Wesierska-Gadek & Ch. Gerner. 2016. Strong changes in the expression of cellular proteins in breast cancer cells after inhibition of PARP-1 activity