

DNA-Methyltransferase-Inhibitoren in der epigenetischen Krebstherapie

Bodo Brückner, Frank Lyko

Deutsches Krebsforschungszentrum
Heidelberg

Zusammenfassung

Die Reaktivierung epigenetisch stillgelegter Tumorsuppressorgene erlaubt neue Ansätze in der Krebstherapie. Dabei spielt die pharmakologische Inhibition von DNA-Methyltransferasen eine wichtige Rolle, da diese Enzyme für die epigenetische Genregulation von zentraler Bedeutung sind. In den vergangenen Jahren wurden bedeutende Fortschritte in der klinischen Anwendung derartiger Inhibitoren gemacht. Darüberhinaus konzentrieren sich derzeit wesentliche Forschungsaktivitäten auf die Entwicklung neuartiger Verbindungen mit erhöhter Spezifität. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei dem Einsatz von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren im Rahmen von Kombinationstherapien zur Chemosensibilisierung therapieresistenter Tumoren.

Schlüsselwörter

DNA-Methyltransferasen, Epimutationen, Azacytidin, Decitabin

Development of DNA methyltransferase inhibitors for epigenetic cancer therapies

Summary

The reactivation of epigenetically silenced tumor suppressor genes represents a novel approach in tumor therapy. Because of the central importance of DNA methyltransferases in epigenetic gene regulation, the pharmacological inhibition of these enzymes plays an important role. Over the past few years, important advances have been made in the clinical application of these inhibitors. In addition, major research activities are currently focused on the development of novel, more specific compounds. A particularly interesting aspect is the development of combination therapies that utilize DNA methyltransferase inhibitors for the chemosensitization of therapy-resistant tumors.

Keywords

DNA methyltransferases, epimutations, azacytidine, decitabine

Einleitung

Epigenetische Mutationen spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krebs. Vielfach findet man im Genom charakteristische Kombinationen von genetischen und epigenetischen Veränderungen, die eine eingeschränkte Kontrolle der Zellproliferation zur Folge haben. Genetische Mutationen sind durch irreversible Veränderungen in der DNA-Sequenz charakterisiert. Da derartige Veränderungen lange Zeit die Entwicklung von Krebstherapien maßgeblich beeinflusst haben, zielen klassische therapeutische Ansätze auf das Abtöten genetisch veränderter Zellen ab. Die dazu verwendeten Strategien gehen zum Teil mit beträchtlichen Nebenwirkungen einher. Die Erkenntnis, dass die Entstehung und das Wachstum von Tumoren wesentlich durch epigenetische Mechanismen beeinflusst wird, erlaubt aber seit einigen Jahren fundamental neue Ansätze in der Krebstherapie (Egger et al., 2004). Dies geht auf die Beobachtung zurück, dass im Tumorgewebe eine Vielzahl von Tumorsuppressorgenen hypermethyliert vorliegen kann. In diesem Fall werden die Gene, die für die Kontrolle des Zellwachstums von zentraler Bedeutung sind, abgeschaltet und stehen somit der betroffenen Zelle nicht mehr zur Verfügung. Im Gegensatz zu genetischen Mutationen sind derartige Epimutationen aber reversibel. Eine pharmakologische Hemmung epigenetischer Modifikationen könnte somit eine Umprogrammierung von Krebszellen in einen weniger aggressiven Zustand bewirken. Derartige Ansätze erlauben

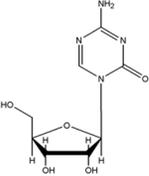
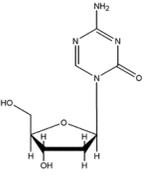
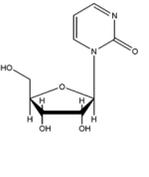
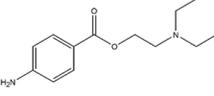
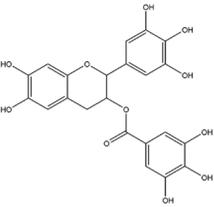
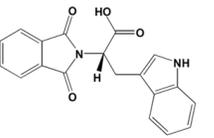
Substanz	Test-Stadium	Struktur
Azanukleosidderivate		
5-Azacytidin (Vidaza™)	zugelassen	
5-Aza-2'-deoxycytidin (Decitabin, Dacogen™)	Phase III	
Zebularin	Phase I	
Niedermolekulare Verbindungen		
Procain	präklinisch	
Epigallocatechingallat (EGCG)	Phase I	
RG108	präklinisch	

Abb 1 Entwicklungsstadien und Strukturen verschiedener DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

Die Machbarkeit derartiger Ansätze ist bereits vor einigen Jahren in Mausmodellen überzeugend nachgewiesen worden. Beispielsweise führt die Injektion des DNMT-Inhibitors Decitabin zu einer erheblichen Verringerung in der Zahl und Größe intestinaler Tumoren im APC^{Min}-Mausmodell (Laird et al., 1995). Decitabin gehört zur Klasse der Azanukleosid-Inhibitoren. Diese Verbindungen sind chemisch mit dem Cytosin verwandt und werden von den DNMT-Enzymen auch als Substrat erkannt. Sobald eine DNA-Methyltransferase auf ein Azanukleosid in der DNA trifft, wird die Methylierungsreaktion eingeleitet. Dabei bildet sich eine kovalente Bindung, die im Gegensatz zum normalen Verlauf der Reaktion nicht mehr aufgelöst werden kann. Anschließend werden die derart entstandenen Methyltransferase-DNA-Addukte abgebaut und folglich die Konzentration freier Methyltransferasen verringert. Demnach fungieren Azanukleoside in einem Mechanismus-abhängigen Prozess als Selbstmord-Substrate. Die oben geschilderten Prozesse führen schließlich zu einer Reduktion der DNA-Methylierung.

Die klinische Bedeutung von DNMT-Inhibitoren

Die DNMT-Inhibitoren Azacytidin und Decitabin (5-Aza-2'-Deoxycytidin, siehe Abbildung 1) werden bereits seit mehr als 20 Jahren in mehr als 100 klinischen Studien getestet. Wesentliche Durchbrüche gelangen aber erst vor wenigen Jahren und zwar in der Behandlung von Myelodysplastischem Syndrom (MDS), einem präleu-

neue Wege in der Krebstherapie und stellen vermutlich im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie eine geringere Belastung für die betroffenen Patienten dar.

Grundlagen der epigenetischen Krebstherapie

Die epigenetische Regulation der Genexpression wird durch zwei interagierende Mechanismen vermittelt. Zum einen können Histone, die Verpackungseinheiten der DNA, durch Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung kovalent modifiziert werden; die entsprechende Kombination von Modifikationen kann genaue Informationen über den Aktivitätszustand des entsprechenden Gens enthalten. Zum anderen kann aber auch die DNA direkt methyliert werden, was ein verbreitetes Signal für die Stilllegung von Genen darstellt. Die DNA-Methylierung gilt als die stabil-

ste unter den epigenetischen Modifikationen und ist in den vergangenen Jahren eingehend charakterisiert worden. Die Modifikation an den Cytosin-Basen der DNA wird von Enzymen vermittelt, die als DNA-Methyltransferasen bezeichnet werden (Bestor, 2000). Diese Enzyme stellen die primären Zielstrukturen für eine epigenetische Krebstherapie dar. Dabei wird versucht, durch sogenannte DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMT-Inhibitoren) die Aktivität der Enzyme zu hemmen oder zu unterbinden. Dies führt zu einem Verlust der DNA-Methylierung im Genom und kann in einer Reversion von epigenetischen Mutationen resultieren. Epigenetisch stillgelegte Tumorsuppressorgene können also demethyliert und somit reaktiviert werden. Die Kontrolle der Zellproliferation und die Funktionalität zellulärer Signalübertragungswege wäre damit wiederhergestellt.

kämischen Knochenmarkstumor (Silverman et al., 2002). So konnte in einer Studie mit 191 Patienten gezeigt werden, dass die mit Azacytidin behandelte Gruppe einen deutlich günstigeren Krankheitsverlauf hatte als die Kontrollgruppe, die mit Antibiotika und Bluttransfusionen behandelt wurde. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da das Myelodysplastische Syndrom überwiegend in Patienten mit hohem Alter diagnostiziert wird, die nicht mehr für eine aggressive Chemotherapie in Frage kommen. Mit einem ähnlichen Behandlungsprotokoll konnte unter Verwendung von Decitabin im vergangenen Jahr auch eine deutliche Verbesserung im Verlauf der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) beobachtet werden (Issa et al., 2004). Dies lässt darauf hoffen, dass Azanukleoside bei entsprechender Feineinstellung der klinischen Behandlungsprotokolle einen breiten Einsatz in der Krebsbekämpfung finden können. In diesem Zusammenhang bleibt noch darauf hinzuweisen, dass Azacytidin (Vidaza™, Pharmion) im Herbst 2004 in den USA zur Behandlung von MDS als Medikament zugelassen wurde. Für Decitabin (Dacogen™, MGI Pharma) wird im laufenden Jahr mit der Zulassung gerechnet. Eine weitere, strukturell verwandte Verbindung, das Zebularin (siehe Abbildung 1) befindet sich derzeit in Phase I der klinischen Prüfung.

Aufgrund ihrer Toxizität werden Azanukleoside heute in den meisten klinischen Studien in relativ geringer Konzentration eingesetzt. Die mit der Toxizität in Verbindung stehenden Nebenwirkungen (z.B. febrile Neutropenie) konnten durch eine Reduktion der Dosis deutlich verringert werden. Allerdings ist bei geringen pharmakologischen Dosen auch der Wirkmechanismus der Verbindungen nur schwer erklärbar. Diese Entwicklungen illustrieren das zentrale Problem beim Einsatz der Verbindungen: Azanukleoside inhibieren die DNA-Methylierung durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen DNA-Methyltransferasen und DNA. Dieser Inhibitionsmechanismus ist zwar äußerst effizient, aber auch von Natur aus toxisch. Insofern lässt sich die

demethylierende Wirkung nicht von der Toxizität trennen. Diese Problematik hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass verstärkt nach DNMT-Inhibitoren mit alternativen Inhibitionsmechanismen gesucht wird.

Die Entwicklung neuartiger DNMT-Inhibitoren

Die Suche nach alternativen Substanzen zur Methylierungsinhibition wurde hauptsächlich von zwei Strategien geleitet: Erstens die Verringerung der Expression der Methyltransferasen durch Antisense-Oligonukleotide oder RNA-Interferenz und zweitens die Inhibition der Methyltransferaseaktivität durch die direkte Interaktion der freien DNMTs mit niedermolekularen chemischen Verbindungen („small molecules“). Seit ihrer Entdeckung werden RNA-Oligonukleotide verwendet, um die Expression von Genen in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen zu reprimieren. Erste Experimente mit RNAs, die spezifisch für DNA-Methyltransferasen sind, deuten daraufhin, dass eine Demethylierung genomischer DNA in humanen Zellen erzielt werden kann. Insbesondere MG98, ein DNMT1-spezifisches Antisense-Oligonukleotid, verursachte eine Demethylierung genomischer DNA in Colonkarzinomzellen (Robert et al., 2003). Erste klinische Versuche schienen auf eine mögliche therapeutische Wirksamkeit hinzuweisen und das Oligonukleotid befindet sich inzwischen in Phase II der klinischen Prüfung. Es sei an dieser Stelle aber darauf hingewiesen, dass der klinische Einsatz von Oligonukleotiden mit einer Vielzahl von pharmakologischen Problemen verbunden ist.

Seit kurzem wird deshalb verstärkt nach niedermolekularen Substanzen gesucht, die in der Lage sind, Methyltransferasen in einem Mechanismus-unabhängigen Prozess zu inhibieren (Brueckner und Lyko, 2004). Im Gegensatz zu Azanukleosid-Derivaten werden diese Substanzen nicht in die DNA integriert, sondern interagieren direkt mit Methyltransferasen. Näher untersucht wurden bislang Procain, Epigallocatechingallat (EGCG) und RG108 (siehe Abbildung 1). Bei Procain handelt es sich um ein weit verbreitetes Lokalanästhetikum für das

eine demethylierende Wirkung in Tumorzellen beschrieben wurde. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die Verbindung in sehr hohen Konzentrationen zur Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen kann. Doch im Gegensatz zu den obengenannten niedermolekularen Verbindungen beruht die inhibitorische Aktivität von Procain nicht auf der direkten Wechselwirkung mit DNA-Methyltransferasen. Stattdessen wurde vorgeschlagen, dass die Substanz an DNA-Bereiche bindet, die, wie beispielsweise Promotorbereiche von Genen, eine besonders hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden aufweisen.

EGCG ist die phenolische Hauptkomponente von grünem Tee. Neben einer Vielzahl von anderen physiologischen Wirkungen, wurde für EGCG auch eine Demethylierung und Reexpression von Tumorsuppressorgenen beschrieben. Es wurde postuliert, dass EGCG direkt mit DNA-Methyltransferasen interagiert und deren Aktivität inhibiert. Aufgrund der polyfunktionellen Natur von EGCG, kann jedoch nach jetzigem Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden, dass andere Wirkmechanismen dabei eine maßgebliche Rolle spielen. Insbesondere scheint EGCG nichtselektive oxidative Prozesse auszulösen. Die Substanz ist deshalb besonders attraktiv, weil sie in Form eines weit verbreiteten Getränks kontinuierlich aufgenommen werden kann. Es bleibt allerdings hervorzuheben, dass die Wirksamkeit von EGCG bislang noch nicht in standardisierten pharmakologischen Tests oder bei Patienten nachgewiesen werden konnte.

Vor kurzem ist es auch erstmals gelungen, einen niedermolekularen DNMT-Inhibitor über einen rationalen Ansatz zu entwickeln: RG108 ist ein Tryptophanderivat, das mittels eines dreidimensionalen Modells der katalytischen Domäne von DNMT1 in einem *in silico* Screen identifiziert wurde (Brueckner et al., 2005). Im Gegensatz zu den bislang beschriebenen Substanzen vermochte RG108 die Methyltransferase-Aktivität sowohl in zellfreien Testsystemen als auch in Tumorzellen zu inhibieren.

Überdies zeigte sich, dass RG108 präferentiell die Methylierung euchromatischer Bereiche reduziert und die für die chromosomale Stabilität wichtigen Bereiche des perizentrischen Heterochromatins kaum beeinflusst. Darüberhinaus bietet die Verbindung von ihrer Struktur her vielfältige Möglichkeiten zur chemisch/pharmakologischen Optimierung. Procain, EGCG und RG108 befinden sich derzeit in einem fortgeschrittenen Stadium ihrer präklinischen Prüfung in Bezug auf ihre tumorhemmende Wirkung. Die nächsten Jahre werden zeigen, ob eine dieser Substanzen in der Lage ist, die Entstehung und das Wachstum von Tumoren in Patienten effizient zu hemmen.

Ausblick

Abschließend soll noch hervorgehoben werden, dass in der Kombination von DNMT-Inhibitoren mit etablierten Chemotherapeutika ebenfalls ein erhebliches Anwendungspotential stecken könnte. Aufgrund ihrer besonderen genetischen Konstitution und den damit einhergehenden physiologischen Charakteristika erweisen sich Tumorzellen als besonders resistent gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika. Dies geht unter anderem darauf zurück, dass zelluläre Signalwege, die für die Auslösung des programmierten Zelltods („Apoptose“) verantwortlich sind, epigenetisch stillgelegt werden. Jedoch ist es möglich, Tumorzellen durch Gabe von Methyltransferase-Inhibitoren gegenüber konventionellen Chemotherapeutika zu sensibilisieren (Plumb et al., 2000; Soengas et al., 2000). Dieser Effekt geht vermutlich auf die Demethylierung des Genoms und die damit verbundene Reaktivierung stillgelegter Signalwege zurück. Eine weitere Strategie zur nachhaltigen Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen in Krebszellen besteht in der Gabe von Methyltransferase-Inhibitoren in Kombination mit Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren. Diese Verbindungen verringern die Aktivität von Histondeacetylase, welche ebenfalls eine Rolle in der epigenetischen Regulation spielen. Gemeinhin wird angenommen, dass die Histonacetylierung und DNA-Methylierung auf synergistische

Art und Weise die Transkriptionsaktivität von Genen steuern. Eine Kombinationstherapie mit DNMT- und HDAC-Inhibitoren könnte somit eine besonders effiziente Reaktivierung von epigenetischen Mutationen bewirken. Darüberhinaus kann durch eine Reduktion in der Dosis der DNMT-Inhibitoren die Schwere der Nebenwirkungen deutlich reduziert werden. Die klinische Wirksamkeit derartiger Kombinationstherapien wird derzeit in mehreren Studien untersucht.

Literatur

- Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395-2402.
- Brueckner B, Lyko F (2004) DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 25:551-554.
- Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F (2005) Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res* 65:6305-6311.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457-463.
- Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM (2004) Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103:1635-1640.
- Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R (1995) Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81:197-205.
- Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R (2000) Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 60:6039-6044.
- Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR (2003) DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 33:61-65.
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, et al. (2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 20:2429-2440.
- Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, et al (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409:207-211.

Korrespondenzadresse

Dr. Frank Lyko
Abteilung Epigenetik
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer feld 580
69120 Heidelberg
Tel. 06221-423801
Fax 06221-423802
f.lyko@dkfz-heidelberg.de