

Molekulare Toxikologie der Valproinsäure: Von der Schädigung der Embryonalentwicklung zur Therapie von Krebs

M. Göttlicher, P. Zhu, U. Werling, J. Sleeman, ITG; O. Krämer, T. Heinzl, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

Einleitung

Valproinsäure (VPA) ist seit drei Jahrzehnten als Medikament zur Behandlung von Krampfleiden („Epilepsien“) im Einsatz. Das VPA-Molekül ist verglichen mit anderen Medikamenten sehr einfach aufgebaut: es ist eine verzweigte Carbonsäure mit 5 Kohlenstoffatomen in der Haupt- und drei Kohlenstoffatomen in der Seitenkette (Abb. 1). Trotz der einfachen Struktur hat das Molekül mehrere Wirkungen im Organismus. Zur Therapie von Krampfleiden genutzt wird die auf das zentrale Nervensystem wirkende antiepileptische und dämpfende Komponente. Zusätzlich hat das Medikament eine wesentliche Nebenwirkung: es induziert Missbildungen im Embryo wie zum Beispiel fehlerhafter Schluss des Rückenmarkskanals oder unproportionierte Ausbildung des Gesichtsschädels. Aufgrund dieser Nebenwirkung sollte VPA auch nicht während der Schwangerschaft eingesetzt werden. Da aber bisher keine guten Alternativen verfügbar sind, kommt es immer wieder vor, dass Epileptikerinnen unter Behandlung mit VPA schwanger werden, und dass bei wenigen Prozent dieser Schwangerschaften die genannten Fehlbildungen auftreten. Unsere Fragestellung war, warum Valproinsäure solche Fehlbildungen induzieren kann. Wir erwarteten, etwas Grundsätzliches über die Regulation des Schicksals von Zellen während der Embryonalentwicklung zu lernen, und herauszufinden, wie ein so einfaches Molekül wie die Valproinsäure die komplexen Vorgänge während der Embryonalentwicklung stören kann. Um das Wesentliche vorweg zu

nehmen: Wir konnten zeigen, dass Valproinsäure in einen ganz wesentlichen Prozess der Steuerung der Genaktivität eingreift, nämlich die Enzymsysteme, die den Acetylierungsgrad von Histonen und damit die Zugänglichkeit von Genen steuern. Valproinsäure ist ein Hemmstoff der Histondeacetylasen, also ein Enzym, das Acetylreste von Histonen entfernt. Histondeacetylierung ist ein physiologischer Mechanismus, über den Genexpression gehemmt wird, und deshalb führt die Hemmung dieser Enzyme zur Aktivierung bestimmter Gene. Offensichtlich ist die Embryonalentwicklung besonders anfällig gegen Störungen in diesem Prozess. Störungen in diesem Kontrollmechanismus spielen auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs, und viele aktuelle Arbeiten deuten darauf hin, dass die Hemmung von Histondeacetylasen auch in Tumorzellen besonders kritisch ist. Im Kontext solcher Arbeiten konnten wir zeigen, dass VPA in Leukämiezellen oder Tumorzellen aus dem Dickdarm oder der Brust eine Spezialisierung vermutlich zurück zur normalen Funktion oder Absterben induziert. Damit scheint dieselbe Wirkungskomponente der VPA, nämlich die Hemmung von Histondeacetylasen, die unerwünschte Induktion von Fehlbildungen des Embryos zu erklären und zugleich ein neuartiges Konzept der Krebstherapie zu begründen.

Konzept der Wirkung von Medikament und Giftstoff

Jede chemische Substanz, die im Organismus eine Wirkung erzielt, muss in irgendeiner Form An-

schluss an die bestehenden physiologischen Signalsysteme von Zelle und Organismus finden. Dies gilt gleichermaßen für Medikamente und fast alle Giftstoffe, es sei denn letztere führen unspezifisch zur Zerstörung von Zellen. Diese Signalsysteme und Netzwerke von Signalwegen kontrollieren, welche genetischen Programme zu einer bestimmten Zeit an einem bestimmten Platz im Organismus und unter den jeweils vorliegenden Bedingungen

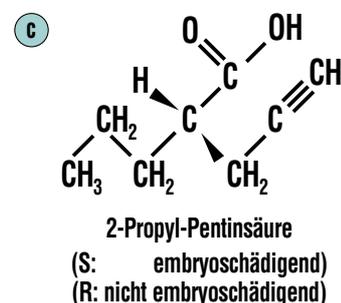
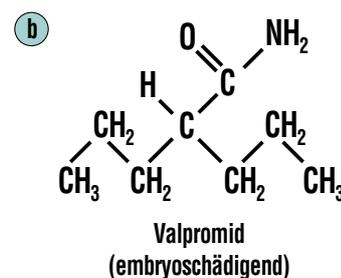
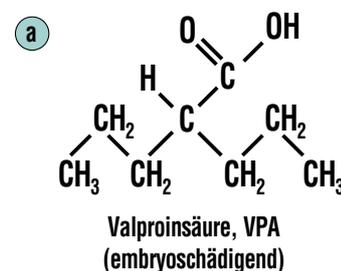


Abb. 1: Valproinsäure (a) und davon abgeleitete Verbindungen Valpromid (b) und 2-Propyl-4-Pentinsäure (c).

ausgeführt werden. Deshalb bestehen Signalnetzwerke und die durch sie kontrollierten genetischen Programme aus physiologischer Notwendigkeit, denn ohne sie gäbe es keine geordnete Entwicklung unseres Körpers oder kein Bestehen in der Umwelt. Genauso wie das Betriebssystem und die „Hardware“ eines Computers noch nicht darüber entscheiden, welche Programme ein Computer letztlich ausführt, genauso bestimmen die bestehenden Signalnetzwerke und genetischen Programme noch nicht welche Funktionen eine spezifische Zelle im Organismus zu einer gegebenen Zeit erfüllt. Es sind die kontextabhängige Aktivierung und Repression von genetischen Programmen durch Signale von zumeist außerhalb der Zelle, die die spezifische Funktion einer einzelnen Zelle steuern und dadurch erst die Integrität und Lebensfähigkeit des Gesamtorganismus ermöglichen. Gewisse Fehler im Signalnetzwerk kann der Organismus ausgleichen. Wenn diese Kapazität allerdings erschöpft ist, entstehen Krankheiten. Viele Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs, haben ihre Ursache in genetisch bedingten oder im Lauf des Lebens erworbenen Fehlern im zellulären Programm. Ziel der Therapie mit Pharmaka ist eine Kompensation dieser Defekte durch gezielte Eingriffe in die Regelsysteme. Umgekehrt interessiert den Toxikologen, dass Giftstoffe Komponenten der bestehenden Signalnetzwerke und genetischen Programme stören und dadurch erst Krankheiten auslösen können. Damit lassen sich aus der Sicht des Toxikologen oder Pharmako-

logen zwei komplementäre Ansichten desselben Grundprozesses zeichnen: Der Organismus mit seinen Zellen und deren Signalsystemen und genetischen Programmen steht gegenüber dem gewaltigen Raum denkbarer oder bestehender chemischer Verbindungen. Es ist die kontextabhängige Funktion von Signalsystemen und genetischen Programmen sowie deren Kontrolle durch die chemisch (und physikalisch) definierte Umwelt der Zelle, die über Gesundheit und Krankheit entscheiden.

Die Analyse der Interaktion zwischen Organismus und chemischem Raum hat sich zu einem komplexen wissenschaftlichen Ansatz entwickelt, der neben klassischer Toxikologie und Pharmakologie erheblich durch Zellbiologie, Genetik, Modellsystem für menschliche Krankheiten in Tieren, die Genomforschung und, zumindest aus dem medizinisch-therapeutischen Blickwinkel, durch eine moderne synthetische Chemie bestimmt wird.

Mechanismus der Wirkung von Valproinsäure

Aktivierung von Genaktivität durch VPA über einen intrazellulären Rezeptor

Unsere Suche nach dem Mechanismus der embryoschädigenden Wirkung von VPA konzentrierte sich zunächst auf die Suche nach einem Surrogat-Marker der Reaktion des zellulären Signalnetzwerks auf Valproinsäure. Unser Ausgangspunkt war der Vergleich

einer Serie von Substanzen, die von der Valproinsäure abgeleitet sind: Valpromid (Abb. 1) wirkt zum Beispiel antiepileptisch, schädigt aber den Embryo nicht. 2-Propyl-Pentinsäure (Abb. 1) ist eine chirale Verbindung, d.h. sie existiert in R und S Enantiomeren (links- bzw. rechts-drehend). Beide Enantiomeren sind schwach antiepileptisch. Den Embryo schädigt allerdings nur das S-Enantiomer, während durch das R-Enantiomer keine Schädigung nachgewiesen wurde. Diese Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigte uns, dass die therapeutisch genutzte Wirkung zur Unterdrückung von Krampfanfällen einem anderen Mechanismus folgt, als die Störung der Embryonalentwicklung. Unsere Frage nach einem Surrogatmarker wurde also dahingehend präzisiert, ob wir eine Komponente im zellulären Signalnetzwerk finden können, die durch VPA aktiviert wird, und die „richtig“ zwischen den Embryo-schädigenden und den nicht schädigenden Derivaten unterscheidet. Unsere Suche begann bei den intrazellulären Hormonrezeptoren, von denen Mitglieder eine ganze Familie auf jeweils unterschiedliche zelluläre Botenstoffe wie Hormone oder Vitamine reagieren. Diese Rezeptoren binden im „Vorspann“ (= Promoter) von bestimmten Genen an die DNA und schalten je nachdem, ob ein Botenstoff für den Rezeptor vorhanden ist, die Aktivität des folgenden kodierenden Bereichs von Genen an oder ab (Abb. 2a). Wir konnten zeigen, dass ein solcher Rezeptor, der PPAR δ , durch VPA geschaltet wird (Abb. 2b). Offen blieb zunächst die Frage, über welchen Mechanismus VPA den Rezeptor aktiviert.

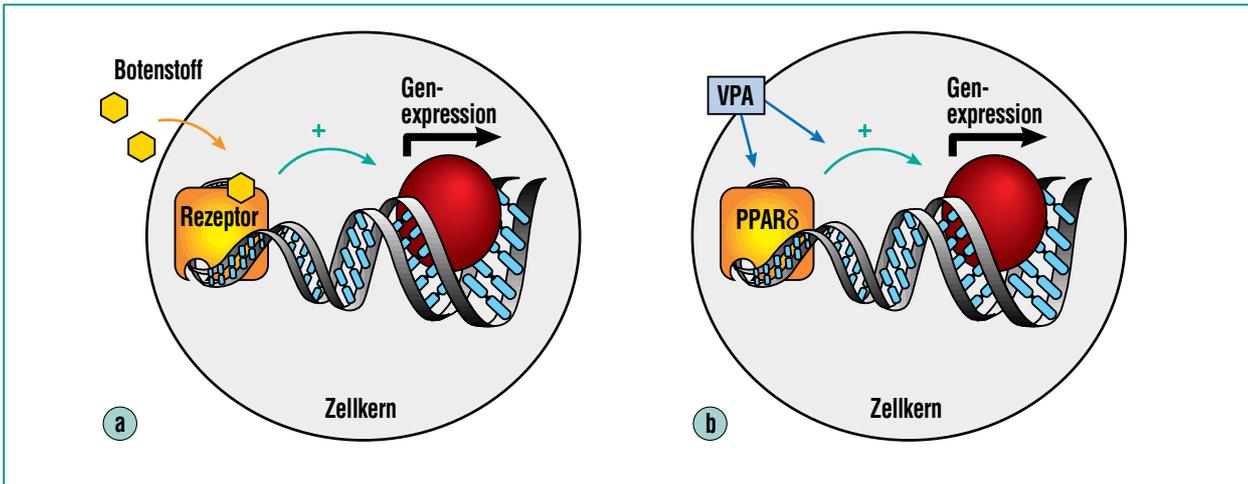


Abb. 2: Regulation von Genaktivität durch „Rezeptoren“ (a) und Steuerung des PPAR δ -Rezeptors durch VPA (b).

DNA ist im Chromatin gepackt und die Packungsdichte des Chromatins reguliert die Aktivität von Genen

Die Regulation von Genaktivität durch intrazelluläre Rezeptoren erfolgt im Grundkonzept über zwei Mechanismen: Ohne Ligand reprimiert (unterdrückt) der Rezeptor die Genaktivität, und mit Ligand stimuliert er die Genaktivität. Ein wesentlicher Aspekt dieser Regulation liegt darin, dass DNA in der Zelle nicht als wirrer langer Faden vorliegt, sondern zusammen mit Proteinen im Chromatin organisiert ist. Zunächst einmal ist DNA perlschnurartig in sogenannten Nucleosomen gepackt. Jeweils etwa 200 Basenpaare der DNA sind um einen Kern aus 8 Histonproteinen „gewickelt“. (Abb. 3). Die „Enden“ der Histonproteine ragen aus dem Nucleosom heraus und können modifiziert werden. Histonacetyltransferasen können die positiv geladenen Lysinreste der Histonen acetylieren und damit deren

Ladung neutralisieren. Histondeacetylasen können diese Acetylreste wieder entfernen, und damit die positive Ladung wieder freilegen. Da jeder Baustein der DNA eine negative Ladung trägt, geht

man davon aus, dass die Ladung der Histone einen erheblichen Einfluss auf die Packungsdichte von Chromatin hat und damit über die Zugänglichkeit für die aktive Genexpression oder deren Re-

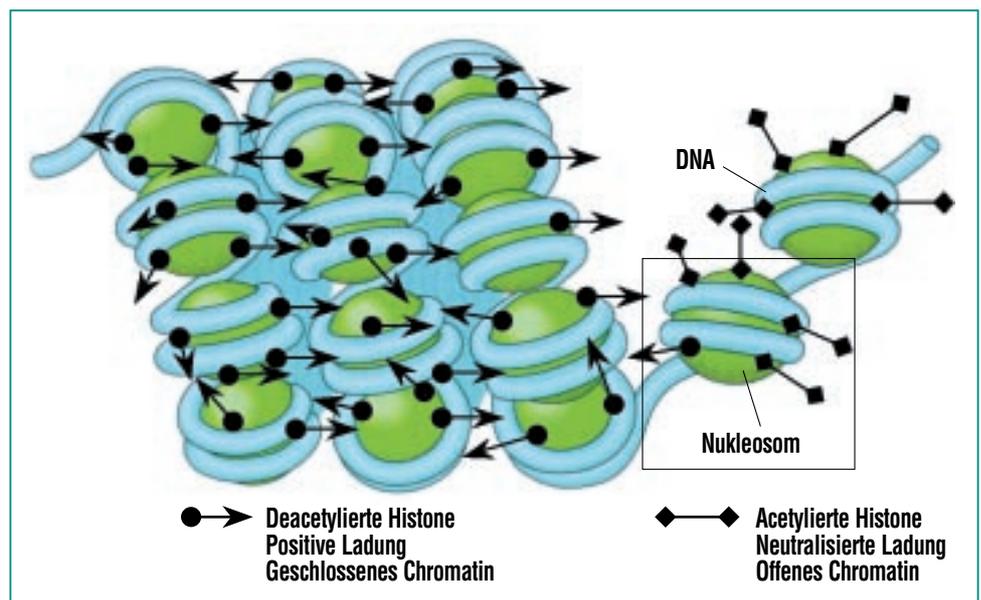


Abb. 3: DNA ist zusammen mit Proteinen im Chromatin organisiert. DNA ist um Histone (grüne „Kugeln“) gewickelt, und eine Einheit aus etwa 200 Basenpaaren DNA und 8 Histonen wird als Nucleosom bezeichnet. Acetylierte Histone führen zu einer offenen Form des Chromatins, die Genaktivität begünstigt (rechte Hälfte), und fehlende Acetylierung bedingt eine dichte Packung des Chromatins, die Genaktivität verhindert (linke Hälfte).

pression entscheidet: Acetylierte Histone begünstigen offensichtlich die Aktivität von Genen, d.h. Expression und Abschrift in Boten-RNA (Abb. 3). Fehlende Acetylierung hemmt die Aktivität von Genen.

Ein Rezeptor im Kern kann lokal an der Stelle des jeweils zu regulierenden Gens als „Schalter“ zwischen acetylierten und nicht

acetylierten Histonen und damit zwischen Aktivierung und Repression der Genaktivität wirken. Ohne Botenstoff bindet der Rezeptor weitere Proteine an das betreffende Gen. In diesen rekrutierten Proteinkomplexen finden sich Histondeacetylasen, die Chromatin in die reprimierte Form überführen können (Abb. 4a). In der Gegenwart von Botenstoff tauscht der Rezeptor die gebun-

denen Proteinkomplexe aus: die reprimierenden Proteinkomplexe werden durch aktivierende Komplexe ersetzt, die als wesentliche Komponenten Histonacetyltransferasen enthalten. Diese Acetyltransferasen können Chromatin in die aktive Form überführen und begünstigen deshalb die Aktivität des folgenden Gens (Abb. 4b). Eine dritte Art der Regulation kann dadurch erfolgen, dass Komponenten der Repressionsmaschinerie gehemmt werden. Die Enzymaktivität von Histondeacetylasen kann durch niedermolekulare Substanzen gehemmt werden (Kreuz in Abb. 4c). Dies führt auch zu einer (gegebenenfalls nur partiellen) Aktivierung der Genaktivität, könnte aber korrekter als „Derepression“ bezeichnet werden. Histondeacetylase-Hemmer sind zum Beispiel Buttersäure oder der bakterielle Giftstoff Trichostatin A.

VPA ist ein Histon-deacetylase-Hemmer und moduliert Genaktivität über den Acetylierungsgrad von Histonen

Ausgehend von unserem Leitbefund, dass VPA die PPAR δ -abhängige Aktivität von Genen steuert, haben wir überprüft, welcher Typ der Regulation von Genaktivität über intrazelluläre Rezeptoren durch VPA ausgelöst wird. Als zentralen Befund konnten wir zeigen, dass VPA über die Hemmung von Histondeacetylasen wirkt, d.h. dass VPA genommen die Aktivität von Genen dereprimiert. Es ist davon auszugehen, dass PPAR δ -abhängige Genexpression zwar ein gut geeigneter Leitbefund in unseren

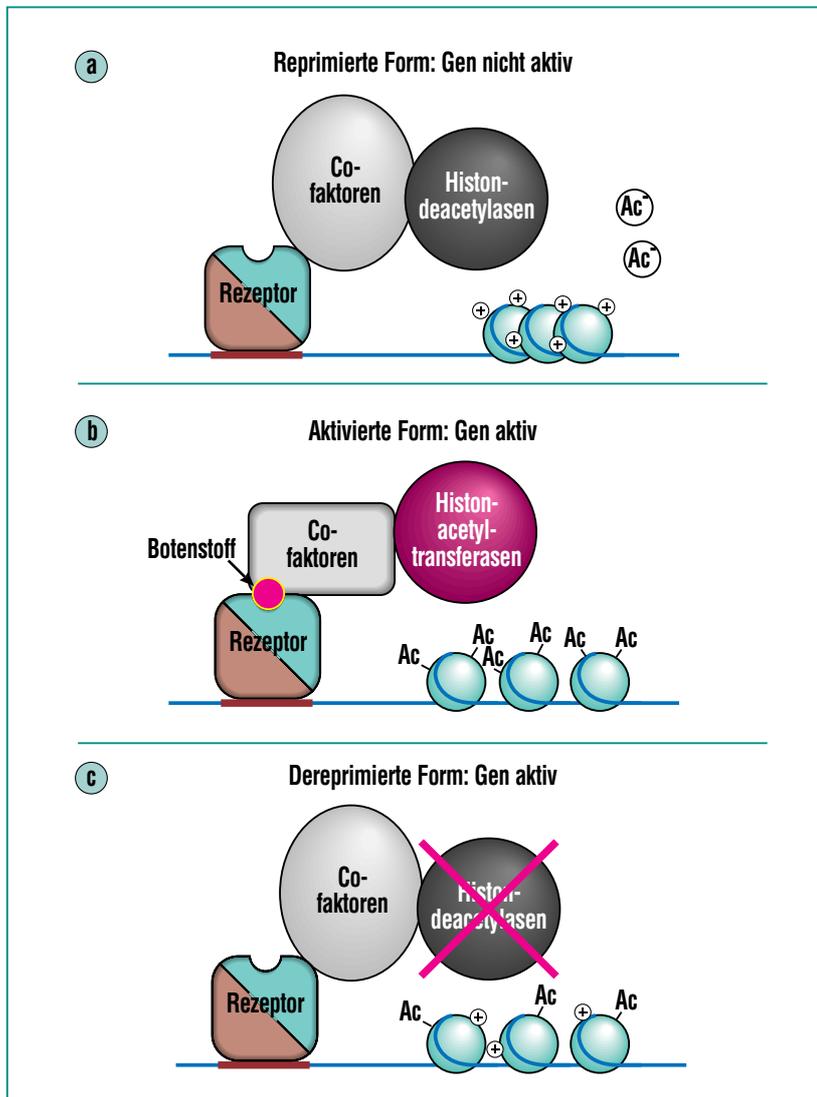


Abb. 4: Drei Arten der Regulation der Genexpression durch intrazelluläre Rezeptoren: a) Reprimiert, b) Aktiviert, c) „Dereprimiert“ = Aktiv.

Studien war, dass VPA aber über den gezeigten Mechanismus eine ganze Reihe von intrazellulären Rezeptoren dereprimieren und damit de facto aktivieren wird. Die zentralen Ergebnisse, die diese These stützen, sind im folgenden dargestellt.

Histonacetylierung und Histondeacetylierung sind offensichtlich an der Regulation vieler Gene beteiligt. Deshalb führt die Behandlung von Zellen mit einem Histondeacetylase-Hemmer dazu, dass sich ein ausreichender Anteil von Histonen in der acetylierten Form ansammelt und mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden kann. Dieser Nachweis ist uns nach VPA-Behandlung sowohl in kultivierten Zellen als auch in den Immunzellen der Maus gelungen.

Die Histondeacetylaseaktivität lässt sich auch im Reagenzglas messen. Histondeacetylase können mit spezifischen Antikörpern aus Zellextrakten isoliert werden. Im Reagenzglas werden solche Histondeacetylasepräparationen mit Histonen inkubiert, die Tritium-markiertes Acetat tragen. Die Freisetzung des Acetats und damit die Histondeacetylierung kann im Scintillationszähler gemessen werden (Abb. 5a). Ergebnisse eines typischen Experiments sind in Abb. 5b gezeigt. Ohne die Zugabe von Hemmstoffen lässt sich die Histondeacetylaseaktivität der Präparation messen (100%). Die Zugabe des etablierten Histondeacetylase-Hemmers TrichostatinA (TSA) hemmt diese Aktivität um mehr als 80%. Ähnlich wirkt VPA schon bei einer Konzentration von 0,5 mM. Im

Serum von Patienten, die VPA zur Vermeidung von Krampfanfällen einnehmen, werden Konzentrationen von bis zu 1 mM erreicht, was durchaus im zur Histondeacetylasehemmung erforderlichen Bereich liegt.

Bleibt die Frage, wie VPA Histondeacetylase hemmt. Mittels radioaktiver VPA konnten wir zeigen, dass VPA selbst an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet und dadurch offensichtlich den Zugang für das eigentliche Substrat, das acetylierte Histon blockiert.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass VPA ein Hemmer von Histondeacetylase ist. Struktur-Aktivitätsbeziehungen deuten darauf hin, dass dies der Grund für die Störung der Embryonalentwicklung ist. Erstaunlicherweise toleriert der erwachsene Organismus VPA sehr gut, obwohl davon auszugehen ist, dass auch hier Histondeacetylase gehemmt werden. Offensichtlich ist das zelluläre Signalsystem im Er-

wachsenen im Gegensatz zu einem kritischen Stadium der Embryonalentwicklung so flexibel, dass es diese Störung kompensieren kann. Mit dieser Schlussfolgerung wäre ein Abschluss des Projekts erreicht, wenn nicht Histondeacetylase als sehr vielversprechende Kandidaten der zukünftigen Krebstherapie weltweit diskutiert und entwickelt würden.

HDAC-Inhibitoren als Krebstherapeutika

Krebs hat wesentliche Ursachen in der fehlerhaften Expression genetischer Information. Erst in den letzten Jahren ist klar geworden, dass die fehlerhafte Repression von Genexpression durch Histondeacetylase die Ursache für Krebs sein kann. Bei bestimmten Formen von Leukämie sind Chromosomen so verändert, dass zwei Stücke von DNA zusammengeführt wurden, die normalerweise nicht zusammen gehören. Solche fehlerhafte

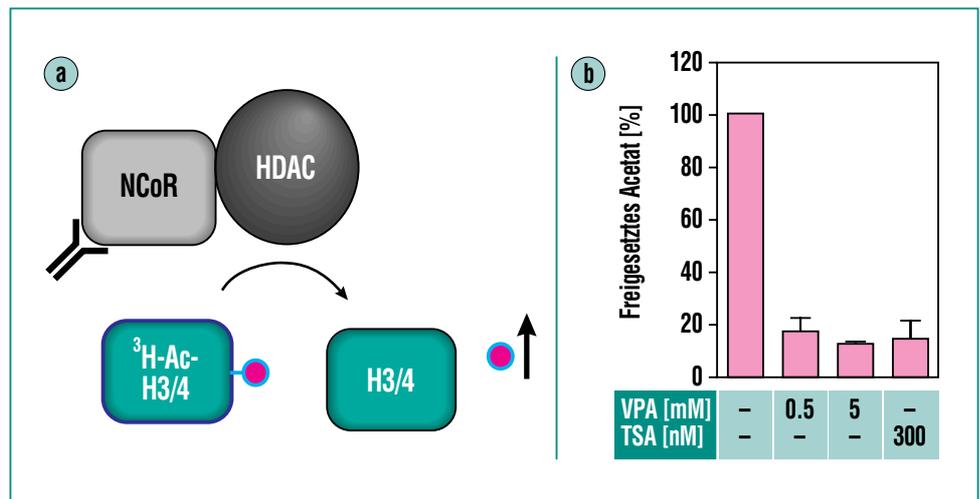


Abb. 5: Messung der HDAC-Aktivität mittels Immunkomplexenzymassay. Das Prinzip der Analyse ist im Text beschrieben und schematisch dargestellt (a). Ein typisches Experiment ist im Diagramm gezeigt (b).

Chromosomen kodieren für chimäre Proteine, die fehlerhaft Histondeacetylasen binden und Genaktivitäten hemmen, die für die normale Entwicklung von Blutzellen nötig wären. Bei solchen Formen der Leukämie können Histondeacetylase-Hemmer die fehlerhafte Funktion des chimären Proteins aufheben und einen zumindest partiellen Heilungserfolg bewirken. Interessanterweise können Histondeacetylase-Hemmer aber auch in Krebszellen Differenzierung zu normalen Zellen oder Zelltod auslösen, in denen kein Chromosomenbruch offensichtlich ist. Obwohl noch nicht klar ist, welche Gene in diesen Zellen dereprimiert werden müssen, wird große Hoffnung auf Histondeacetylase-Hemmer gesetzt, die für den Einsatz bei Krebspatienten geeignet sind und mit denen Studien an großen Patientengruppen durchgeführt werden können. Die bisher verfügbaren Substanzen sind nur unzureichend geeignet. VPA ist dagegen seit Jahrzehnten als Medikament im Einsatz und wird abgesehen von den Störungen in der Embryonalentwicklung sehr gut vertragen. Aufgrund unserer Daten zur Histondeacetylase-Hemmung muss man erwarten, dass VPA zur Krebstherapie geeignet ist. Diese Hypothese ha-

ben wir zunächst in Zellkulturen und in einem Tiermodell mit Brustkrebszellen bestätigt. Zusammen mit der Universität Rom konnte in Leukämiezellen aus Patienten entweder die Spezialisierung (Differenzierung) zu offensichtlich normalen Immunzelle oder der kontrollierte Zelltod induziert werden. Damit sind die Vorarbeiten geleistet, VPA in der Klinik an Patienten mit Leukämie, Brust- oder Dickdarntumoren zu testen. Solche Studien haben wir zusammen mit dem Europäischen Institut für Onkologie in Mailand begonnen.

Zusammenfassung und offene Fragen

Histondeacetylasen nehmen zentrale Rollen bei der Kontrolle der Genexpression in der Zelle ein. Mit VPA konnten wir eine Substanz identifizieren, die als Histondeacetylase-Hemmer diese für das Schicksal von bestimmten Zellen offensichtlich kritischen Komponenten im zellulären Signalsystem beeinflussen kann. Dabei kann VPA nicht zwischen verschiedenen Zellen im Erwachsenen oder im Embryo bzw. zwischen normaler oder Krebszelle unterscheiden. Es ist der spezifische Zustand der jeweiligen Zelle, der über die Konsequenzen

der VPA-Wirkung entscheidet. Bestimmte Zellen im Embryo und Krebszellen sind offensichtlich besonders empfindlich auf die Störung von Histondeacetylasen. Je nach Bedingung im Embryo bzw. in der Krebszelle zeigen sich unterschiedliche Konsequenzen der gleichen primären molekularen Wirkung: Fatale Störung der Entwicklung des Embryos oder erwünschte Abtötung von Tumorzellen. Aufgabe der Zukunft wird sein, diejenigen Gene zu finden, die kritisch durch VPA reguliert werden und die die Empfindlichkeit gegenüber VPA bestimmen. Damit könnten Krebsformen erkannt werden, die besonders für die Therapie mit VPA oder anderen Histondeacetylase-Hemmern geeignet sind. Bessere von VPA abgeleitete Substanzen müssen entwickelt werden, die entweder die Schädigung des Embryos während der Therapie von Krampfleiden vermeiden oder die gezielt für die Therapie von Krebs geeignet sind. Hierbei werden Genom- und Transkriptomforschung eine entscheidende Rolle an der Schnittstelle zwischen Genom und chemischem Raum spielen.

Literatur

M. Göttlicher, S. Minucci, P. Zhu, O.H. Kramer, A. Schimpf, S. Giavara, J.P. Sleeman, F. Lo Coco, C. Nervi, P.G. Pelicci, T. Heinzel, *Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. Embo J 2001; 20: 6969-6978.*

O.H. Krämer, M. Göttlicher, T. Heinzel, *Histone deacetylase as a therapeutic target. Trends Endocrinol Metab 2001, 12, 294-300.*

P.A. Marks, V.M. Richon, R. Breslow, R.A. Rifkind, *Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. Curr Opin Oncol 2001, 13, 477-483.*