*Lockdown*, ein Hemmstoff gegen die Metastasierung von Tumoren

**Ein großes Problem bei Krebserkrankungen ist die Metastasierung von Tumoren. Nun ist es einer Forschergruppe der Universität Konstanz gelungen, eine Substanz zu identifizieren, die Krebszellen unbeweglich macht. Bei der Verbindung handelt es sich um einen Hemmstoff der Protein-Phosphatase PPM1F, die eine Schlüsselrolle bei der Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Zellmatrix und bei der Zellmobilität spielt. Da die Inhibierung von PPM1F dazu führt, dass Krebszellen quasi in der Zellmatrix eingesperrt werden, wurde der Hemmstoff *Lockdown* genannt. Wenn eine Krebszelle sich nicht bewegen kann und an Ort und Stelle verharren muss, ist die Gefahr der Metastasierung der Krebszelle weitgehend gebannt.**

Die Fähigkeit von Tumoren, Tochtergeschwülste (Metastasen) zu bilden, ist immer noch eine große Sorge bei einer Krebserkrankung. Denn die Metastasierung eines Tumors verschlechtert die Prognose für den betroffenen Patienten erheblich. Könnte man die Metastasenbildung unterbinden, wäre dies ein wesentlicher Fortschritt in der Krebstherapie. Aber bislang gibt es keine wirksamen Mittel, die eine Absiedlung bösartiger Tumore verhindern können.

Die Wanderung von Krebszellen beruht auf eine Umgestaltung der Integrin-abhängigen Wechselwirkung zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix sowie auf einer Umstrukturierung des Aktin-Cytoskeletts. Integrine sind Adhäsionsproteine, die eine wichtige Rolle bei der Bindung von Zellen an anderen Zellen und der extrazellulären Matrix spielen. Aktin ist ein Strukturprotein, dessen Polymerisation und Depolymerisation zu einer gerichteten Zellbewegung führt. Der dynamische Umbau von Integrinen und des Aktin-Cytoskeletts ist die treibende Kraft der Zellmobilität und wird über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Dabei kommt der Metallionen-abhängige Protein-Phosphatase 1F (PPM1F) eine entscheidende Rolle zu. Zum einem fungiert die PPM1F als β1-Integrinphosphatase und dephosphoryliert das Adhäsionsprotein, wodurch die Anhaftung von Zellen an die extrazelluläre Matrix aufgehoben wird. Zum anderen hemmt PPM1F p21-aktivierte Kinasen (PAK) durch Dephosphorylierung, wodurch die Dynamik intrazellulärer Aktin-Stressfasern beeinflusst und die Mobilität der Zellen erhöht wird. Darüber hinaus kommt PPM1F in metastasierenden Krebsarten (z.B. Brustkrebs, Darmkrebs und Leberzellkarzinom) in größeren Mengen vor, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die Phosphatase eine Schlüsselrolle bei der Metastasierung spielt. Die vorhandenen Daten deuten darauf hin, dass PPM1F ein therapeutisches Zielmolekül für niedermolekulare Wirkstoffe sein könnte. Um dies zu überprüfen, hat nun ein deutsches Wissenschaftlerteam der Universität Konstanz in hauseigenen Substanzbibliotheken nach Hemmstoffen der PPM1F gesucht.

Zur Identifizierung potenzieller Hemmstoffe der PPM1F wurden 56289 Substanzen mittels Hochdurchsatz-Screening in einem Fluoreszenztest mit der rekombinanten Protein-Phosphatase untersucht. Mithilfe von weiteren Tests wurde schließlich eine Verbindung identifiziert, die effizient die Aktivität der PPM1F hemmte. Bei der Verbindung handelt es sich um ein Diphthalsäurederivat, welches auf dem Namen *Lockdown* getauft wurde (Abb.). Die Aktivität anderer Phosphatasen (Protein-Phosphatase 1 und 5, Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B und RJ, VHR Phosphatase, ILK-assoziierte Serin/Threonin Phosphatase 2C) wurde durch *Lockdown* nur geringfügig gehemmt (10-20% bei einer Konzentration von 10 μM), was auf eine hohe Spezifität des Inhibitors für die PPM1F hindeutet. Darüber hinaus zeigte *Lockdown* keine Zytotoxizität gegenüber menschlichen A172-Gliobastomzellen und embryonalen Mausfibroblasten. Kinetische Untersuchungen ergaben schließlich, dass *Lockdown* ein reversibler allosterischer Inhibitor der PPM1F ist. Die Bindung des Hemmstoffes außerhalb des aktiven Zentrums erklärt auch, warum *Lockdown* eine sehr hohe Spezifität für PPM1F hat und andere verwandte Protein-Phosphatasen nicht inhibiert.

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus von *Lockdown* wurde dessen Hemmaktivität zunächst in Gegenwart von Manganionen untersucht. Die logische Grundlage hierfür ist, dass Phthalsäure chelatbildende Eigenschaften hat und dass die Aktivität der PPM1F von Mn2+-Ionen abhängig ist. Allerdings konnte die Hemmwirkung von *Lockdown* in Gegenwart von 10 mM Mn2+ nicht überwunden werden, was darauf hindeutet, dass die inhibitorische Aktivität der Verbindung nicht auf eine Chelatierung der vom Enzym gebundenen Mn2+-Ionen beruht. Auch wenn die Carboxylgruppen nicht die Mn2+-Ionen der PPM1F binden können, so sind sie dennoch essenziell für die Hemmaktivität von *Lockdown*. Denn eine Veresterung der Carboxylgruppen mit Ethanol hob die inhibitorische Wirkung von *Lockdown* nahezu vollständig auf.

Zur Überprüfung, ob *Lockdown* die Aktivität von PPM1F in intakten Zellen inhibieren kann, wurde die Wirkung des Hemmstoffes auf A172-Glioblastomzellen untersucht. Idealerweise sollten *Lockdown*-behandelte Zellen einen ähnlichen Phänotyp zeigen wie PPM1F-Knockout-Zellen. So zeigen A172-Zellen, denen das *PPM1F*-Gen mittels CRISPR-Cas9-Verfahren inaktiviert wurde, eine erhöhte Integrin-vermittelte Zell-Matrixadhäsion und eine erhöhte Phosphorylierung von β1-Integrin und PAK. Inkubation mit 100 μM *Lockdown* induzierte bei Wildtyp A172-Zellen den gleichen Phänotyp mit gesteigerter Matrixhaftung und erhöht phosphorylierten Adhäsionsproteinen. Allerdings war die Durchdringung dieses Phänotyps in den PPM1F-Knockout-Zellen stärker ausgeprägt als in den *Lockdown*-behandelten Zellen (70-90% bzw. 30-40% der Zellen zeigten den entsprechenden Phänotyp). Als Grund für die geringere Wirksamkeit von *Lockdown* wurde eine geringe Membranpermeabilität des Hemmstoffes aufgrund der vier vorhandenen Carboxylgruppen angenommen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Effektivität des ethylierten Hemmstoffes als Prodrug (*LockdownPro*, Abb.) untersucht. *LockdownPro* sollte eine bessere Membranpermeabilität haben und durch intrazelluläre Esterasen wieder in funktionsfähigem Hemmstoff ungewandelt werden. Eine Behandlung von Wildtyp A172-Zellen mit 25 μM *LockdownPro* erzeugte den gleichen Phänotyp wie eine Inkubation mit 100 μM *Lockdown*. Die mit *LockdownPro* behandelten Zellen waren hyperadhäsiv und zeigten eine erhöhte Phosphorylierung der PPM1F-Substrate β1-Integrin und PAK. Dieser PPM1F-Knockout Phänotyp wurde bei 50% der *LockdownPro*-behandelten Zellen beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt, dass der veresterte Hemmstoff eine höhere *In-Vivo*-Wirkstärke hat als die unveresterte Verbindung.

Um zu zeigen, dass eine *LockdownPro*-vermittelte Hemmung der PPM1F die Mobilität von Tumorzellen reduziert, wurden 3D-Matrigel-Invasionsstudien durchgeführt. A172-Zellen zeigen unter normalen Umständen eine ausgeprägte Wanderung durch eine 3D-Matrigel-Barriere. Diese invasive Wanderung der A172-Zellen wurde durch *LockdownPro* in einer konzentrationsabhängigen Weise inhibiert. Desgleichen konnte mit 25 μM *LockdownPro* die Mobilität von invasiven MDA-MB-231-Brustkrebszellen und HepG2-Leberkarzinomzellen drastisch eingeschränkt werden. Die Fähigkeit von *LockdownPro* das invasive Wanderverhalten von Krebszellen zu unterdrücken, wurde in *In-Vivo*-Versuchen mit Chorioallantoismembranen von Hühnerembryonen bestätigt. Die Chorioallantoismembran besteht aus drei Lagen: zwei Epithelschichten, zwischen denen sich eine gut vaskularisierte Mesenchymalschicht befindet. Wenn unbehandelte A172-Zellen auf die Chorioallantoismembran aufgebracht wurden, drangen sie innerhalb von drei Tagen tief in die Mesenchymalschicht ein. Im Gegensatz dazu waren *LockdownPro*-behandelten A172-Zellen nicht in der Lage, in die Mesenchymalschicht vorzudringen und verweilten auf der Oberfläche der Chorioallantoismembran.

Mit *LockdownPro* wurde ein zellpermeabler PPM1F-Hemmstoff gefunden, der die Absiedlung von Krebszellen aus Tumoren unterdrücken kann. Die Ergebnisse der Studie bestätigen zudem, dass PPM1F eine Schlüsselrolle bei der Mobilität von Krebszellen zukommt. Die relativ hohe Effektivdosis von 25 μM macht es aber eher unwahrscheinlich, dass *LockdownPro* zur Anwendung bei Patientinnen und Patienten kommen wird. Allerdings ist *LockdownPro* ein vielsprechender Wirkstoffkandidat, der die Basis für die Entwicklung von Derivaten mit verbesserter Wirkstärke bietet. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, weitere wirksamerer PPM1F-Hemmstoffe zu identifizieren, denn mit rund 56000 Substanzen wurde bislang nur ein Bruchteil des Raums chemischer Verbindungen gescreent.

[1] T. M. Grimm et al., Cell Chem. Biol., https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.03.011 (2022)]

*PD Dr. Dietmar Steverding, Norwich, England*



**Abb.** Chemische Strukturen von *Lockdown* und *LockdownPro*. Die Synthese von *LockdownPro* erfolgte durch Veresterung von *Lockdown* mit Ethanol, wobei ein Gemisch aus dreifach und vierfach ethyliertem *Lockdown* entstand.