

Cancer multi-omics

Stress macht Zellen resistent gegen Folsäure-basierte Chemotherapeutika

ROBERT AHRENDTS, JAN MEDENBACH
INSTITUT FÜR ANALYTISCHE CHEMIE, UNIVERSITÄT WIEN, ÖSTERREICH UND
BIOCHEMIE-ZENTRUM REGENSBURG, UNIVERSITÄT REGENSBURG

The unfolded protein response (UPR), a cellular stress response pathway, is broadly implicated in disease and resistance to therapy. The molecular mechanisms that drive stress-mediated chemoresistance are, however, only poorly understood. We have employed a multi-omics approach to determine UPR-induced gene regulation, revealing the UPR regulon. We further observe metabolic rewiring upon stress and resistance to Methotrexate, a widely-employed therapeutic reagent. The precise molecular characterization of the pathway driving resistance might lead to novel concepts in cancer therapy.

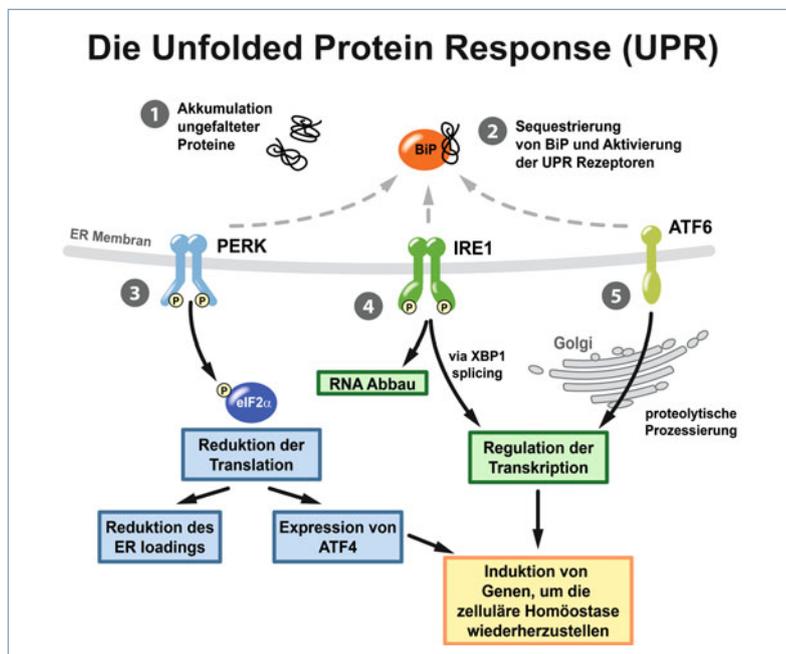
DOI: 10.1007/s12268-020-1457-4
© Die Autoren 2020

■ Unsere Körperzellen sind täglich Stress ausgesetzt – beispielsweise ist nicht immer eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen oder Sauerstoff gewährleistet, ionisierende Strahlung oder chemische Substanzen können Biomoleküle schädigen oder zelluläre Prozesse können ins Stocken geraten. Um diese Herausforderungen zu meistern, aktiviert die Zelle *stress response pathways*,

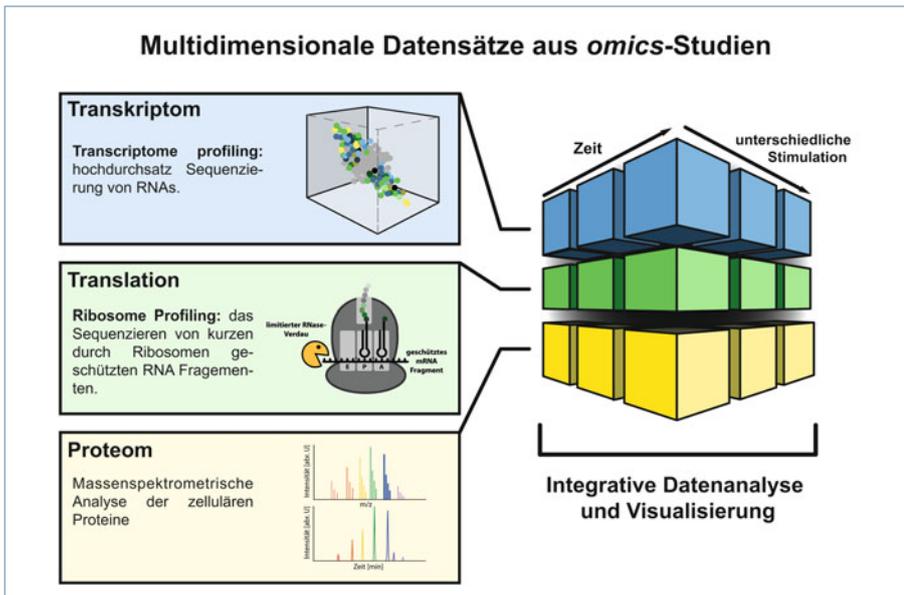
die dazu dienen, die zelluläre Homöostase wiederherzustellen und so das Überleben der Zelle zu sichern, oder, falls dies nicht möglich ist, den programmierten Zelltod einzuleiten.

Die *unfolded protein response* (UPR) des endoplasmatischen Retikulums (ER) ist einer dieser stress response pathways [1, 2]. Die UPR wird ausgelöst durch die Ansammlung von ungefalteten Proteinen im ER. Die drei

Transmembranproteine PERK (*PKR-like ER kinase*), IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), und ATF6 (*activating transcription factor 6*) dienen als Rezeptoren, die mit ihren luminalen Domänen den Status des ERs sondieren (Abb. 1). Unter normalen Bedingungen werden sie vom ER-Chaperon BiP gebunden und so inaktiviert. Kommt es jedoch zu einer Anhäufung von ungefalteten Proteinen im ER, bindet BiP an diese neuen Klienten und die so freigesetzten UPR-Rezeptoren werden aktiv. IRE1 und ATF6 steuern dann eine transkriptionelle Anpassung der Zelle, was unter anderem zu einer vermehrten Produktion von Chaperonen führt, die die Proteinfaltung im ER unterstützen. Die Kinase PERK hingegen reguliert die zelluläre Translation durch Phosphorylierung einer Untereinheit des Translationsfaktors eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*). Dadurch wird die Proteinsynthese in der Zelle insgesamt reduziert und das ER in seiner Funktion entlastet. Eine kleine Gruppe an mRNAs aber zeigt ein gegensätzliches Verhalten: durch ausgefeilte Mechanismen erhöht sich ihre Translation nach Phosphorylierung von eIF2. Prominentestes Beispiel ist hier die mRNA, welche den



◀ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der *unfolded protein response* (UPR). Ungefaltete Proteine akkumulieren im endoplasmatischen Retikulum (1) und werden vom ER-Chaperon BiP gebunden (2). Dadurch wird BiP von den UPR-Rezeptoren PERK, IRE1 und ATF6 freigesetzt, was zu deren Aktivierung führt. Die Proteinkinase PERK (3) kann nun die alpha-Untereinheit des Initiationsfaktors 2 (eIF2) phosphorylieren, was zu einer generellen Reduktion der zellulären Translation führt und das ER entlastet. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Produktion des Transkriptionsfaktors ATF4. (4) Nach Freisetzung von BiP wird die endonukleolytische Aktivität von IRE1 aktiviert, was zum Abbau ER-assoziiierter Transkripte führt. Weiterhin ermöglicht die IRE1-abhängige mRNA-Prozessierung die Produktion des Transkriptionsfaktors XBP1. (5) ATF6 kann nach Freisetzung von BiP in den Golgi-Apparat translozieren, wo es proteolytisch prozessiert wird. Die dadurch freigesetzte cytoplasmatische Domäne (ATF6p50) kann nun in den Zellkern transportiert werden, wo sie als Transkriptionsfaktor aktiv ist. Insgesamt kommt es durch die Aktivität von ATF4, XBP1 und ATF6p50 zu Transkriptionsveränderungen, die dazu dienen, die Faltungskapazität im ER zu erhöhen und so die zelluläre Homöostase wiederherzustellen, oder, falls dies nicht gelingt, den programmierten Zelltod auszulösen.



▲ **Abb. 2:** Kombination analytischer Verfahren zu einem *multi-omics*-Ansatz. Um Genexpressionsveränderungen nach einem Stimulus umfassend und auf unterschiedlichen Ebenen zu bestimmen, können Messungen zu zellulärer RNA-Abundanz, Translationsstatus und Proteom (links dargestellt) miteinander verknüpft werden. Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten und nach unterschiedlicher Behandlung der Zellen erzeugen multidimensionale Datensätze (rechts), deren integrative Auswertung tiefe Einblicke in die zelluläre Antwort auf den Stimulus erlauben.

Transkriptionsfaktor ATF4 codiert. Dieser stimuliert die Expression einer Reihe an Proteinen, die eine Anpassung an den Stress ermöglichen sollen.

Eine funktionierende UPR ist besonders wichtig für Zellen, die eine große Menge an Peptiden sekretieren, z. B. insulinproduzierende Betazellen des Pankreas. Es ist daher wenig überraschend, dass Störungen der UPR mit Diabetes mellitus in Zusammenhang gebracht werden. Darüber hinaus trägt die UPR auch zur Progression von Krebsleiden bei, zu Chemoresistenzen und zu einer Reihe an weiteren Erkrankungen (darunter neurodegenerative Prozesse, wie sie beispielsweise bei Alzheimer auftreten) [2, 3]. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind allerdings nur unzureichend verstanden. Eine präzise und umfassende Analyse der stressinduzierten Veränderungen der Genexpression wird daher dringend benötigt, um die Rolle der UPR in der Krankheitsentstehung besser zu definieren und neue Konzepte für gezielte Therapien entwickeln zu können.

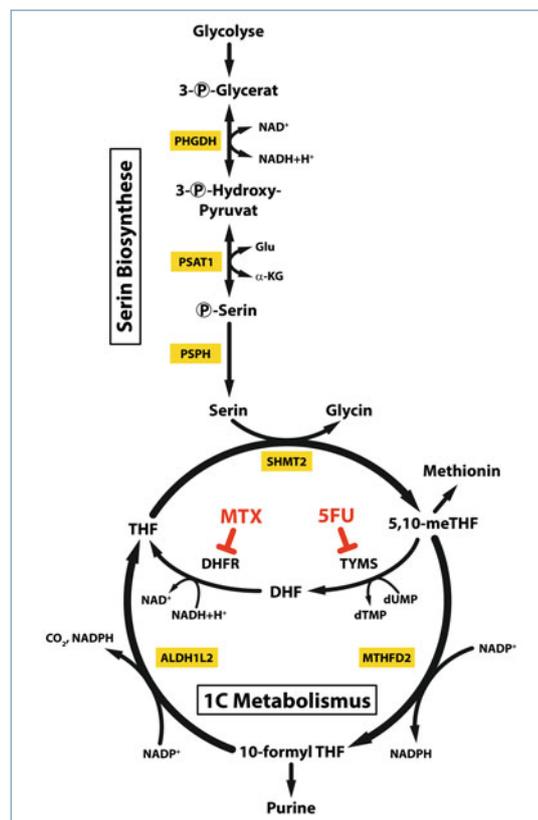
Das UPR-Regulon

Multi-omics-Ansätze sind eine probate Herangehensweise, um selbst komplizierte Prozesse, wie sie in der zellulären Stressantwort auftreten, als Ganzes messen zu können. Der Einsatz unterschiedlicher quantitativer ana-

lytischer Methodik, welche die Gesamtheit einer bestimmten Molekülklasse abbilden kann (*omics*-Methoden), erlaubt es große Datensätze zu generieren, deren bioinformatische Integration dann eine hochauflösende

Analyse des zellulären Status ermöglicht (**Abb. 2**). Beispielsweise erlauben *RNA expression profiling* und Protein-Massenspektrometrie Veränderungen auf Ebene des Transkriptoms und des Proteoms zu messen, während *ribosome profiling* Einblicke in Translationsraten liefert. Kombiniert lassen sich so Veränderungen in der Genexpression auf unterschiedlichen Ebenen messen. Dies erlaubt es z. B., einen Signaltransduktionsweg aus verschiedenen Winkeln zu betrachten und erste Hinweise auf regulatorische Prozesse abzuleiten.

Angewendet auf die UPR sind damit tiefe und grundlegend neue Einblicke möglich. So konnten wir z. B. zum ersten Mal das UPR-Regulon in kultivierten Krebszellen definieren – eine Gruppe an Proteinen, die induziert wird, um die zelluläre Homöostase wiederherzustellen und das Überleben der Zellen zu sichern [4]. Die adaptiven Genexpressionsveränderungen betreffen nicht nur bekannte Zielgene der UPR (wie z. B. Chaperone), sondern auch eine Vielzahl weiterer Gene, deren Regulation zuvor noch nicht mit der zellulären Antwort auf Stress in Verbindung gebracht wurde. Viele dieser neuen UPR-*targets* spielen prominente Rollen bei der Entstehung und Progression von Krankheiten oder erfüllen wichtige Funktionen im zellulären Stoffwechsel.



◀ **Abb. 3:** Die UPR induziert Enzyme der Serinbiosynthese und des mitochondrialen 1C-Metabolismus (gelb hervorgehoben) – Stoffwechselwege hier vereinfacht dargestellt. Der 1C-Metabolismus hat eine zentrale, anabole Funktion (Synthese von Nucleobasen und Aminosäuren) und trägt zum Aufrechterhalten des zellulären Redoxstatus und der epigenetischen Homöostase bei. Die Chemotherapeutika Methotrexat (MTX) und 5-Fluorouracil (5-FU) (rot hervorgehoben) greifen in den Folsäurebasierten Stoffwechsel ein, indem sie die Enzyme Thymidylatsynthase (TYMS) und Dihydrofolatreduktase (DHFR) hemmen. DHF: Dihydrofolsäure; THF: Tetrahydrofolsäure; 5,10-meTHF: 5,10-methylen-THF; PHGDH: Phosphoglycerat-Dehydrogenase; PSAT: Phosphoserin-Aminotransferase; PSPH: Phosphoserin-Phosphatase; SHMT2: Serin-Hydroxymethyltransferase 2; MTHFD2: bifunktionelle Methylenetetrahydrofolat-Dehydrogenase/Cyclohydrolase; ALDH1L2: Aldehyd-Dehydrogenase 1 family member L2.

Stress verändert den zellulären Metabolismus

Veränderungen des Stoffwechsels sind charakteristisch für neoplastische Zellen und dienen dazu, ihre hohe Proliferationsrate aufrecht zu erhalten. Diese Besonderheiten macht man sich in der Klinik zunutze. Eine Reihe an Chemotherapeutika zielt darauf ab, zentrale Stoffwechselwege zu blockieren, die wichtig sind für die Proliferation der Krebszellen [5]. Beispielsweise unterdrücken einige Antimetabolite die Biosynthese von Nukleobasen, welche für die DNA-Replikation während des Zellzyklus benötigt werden und wirken so als Zytostatika. Ein prominenter Vertreter dieser Gruppe ist das Basenanalogon 5-Fluorouracil (5-FU), das in der Krebstherapie breite Anwendung findet. Es unterdrückt die Proliferation von Krebszellen, indem es das Enzym Thymidylatsynthase (TYMS) hemmt, welches im Menschen essenziell für die Produktion von Deoxythymidinphosphat ist (**Abb. 3**).

Auch das Auslösen der UPR wirkt sich auf den zellulären Metabolismus aus. Unter Stress zeigt sich eine erhöhte Synthese von Enzymen der Serinbiosynthese und des Folsäure-basierten 1C-Stoffwechsels (**Abb. 3**). So kommt es zu einem verstärktem Flux an Metaboliten aus der Glykolyse in den 1C-Metabolismus [4]. Dieser zentrale Stoffwechselweg ist wichtig für die Synthese von Aminosäuren, trägt zum Aufrechterhalten des zellulären Redoxstatus und der epigenetischen Homöostase bei und liefert Bausteine für die Synthese von Nukleobasen [6]. Auch das oben beschriebene Enzym Thymidylatsynthase bezieht die Kohlenstoffgruppe zur Methylierung von dUMP zu dTMP aus dem Folsäure-basierten Stoffwechsel.

Chemoresistenz als Folge von Zellstress

Aufgrund seiner zentralen Funktion, ist es nicht verwunderlich, dass der 1C-Metabolismus bereits früh als Ziel möglicher chemotherapeutischer Behandlung identifiziert wurde. Schon 1947 konnten erste Erfolge in der Behandlung von Leukämien mit dem Folsäure-Antagonisten Aminopterin erzielt werden. Heute sind verwandte Substanzen, z. B. Methotrexat (MTX), zur Therapie von Neoplasien und Autoimmunerkrankungen weit verbreitet. Das Auftreten von Chemoresistenzen schränkt ihre Nutzung jedoch ein.

Überraschenderweise führt das Auslösen der UPR in kultivierten, menschlichen Zellen zu einer fast vollständigen Resistenz gegen-

über dem Folsäure-Analogon Methotrexat. Diese Chemoresistenz ist abhängig von der Aktivierung der Kinase PERK und der Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2. Letzteres kann durch die Expression einer phosphomimetischen Proteinvariante belegt werden, bei der eine Phosphorylierung durch Mutation der entsprechenden Aminosäure (eIF2 α , Ser51Asp) imitiert wird [4].

Neben PERK können drei weitere Kinasen eIF2 α an der gleichen Position (Ser51) phosphorylieren: GCN2 (*general control non-repressible 2*), PKR (*protein kinase RNA-activated*) und HRI (*heme-regulated inhibitor*). Auch sie werden durch unterschiedliche Arten von Stress oder virale Infektion aktiviert und bilden zusammen mit PERK die *integrated stress response* [7]. Auch die pharmakologische Aktivierung von HRI erlaubte es kultivierten Zellen in Gegenwart hoher Dosen von Methotrexat zu proliferieren [4]. Dies legt nahe, dass unterschiedliche Arten von Zellstress die Chemoresistenz hervorrufen können. Da wir bekannte Wege der Resistenzbildung gegen Methotrexat ausschließen können, scheint es sich um einen neuartigen Mechanismus zu handeln, dessen genaue molekulare Aufklärung in Zukunft verbesserte Konzepte und Ansätze zur Überwindung von Resistenzen in der Krebstherapie erhoffen lässt.

Fazit

Multi-omics-Ansätze können grundlegend zum Verständnis komplizierter zellulärer Prozesse beitragen. Die gewonnenen Einblicke beflügeln gezielte genetische und biochemische Grundlagenforschung und können so zur Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte beitragen.

Danksagung

Wir bedanken uns für die finanzielle Förderung des Juniorverbands SUPR-G (Systems Biology of the Unfolded Protein Response in Glioma) durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen der e:Med Initiative (01ZX1401A-E).

Literatur

- [1] Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ (2020) Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:421–438
- [2] Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334:1081–1086
- [3] Clarke HJ, Chambers JE, Liniker E, Marciniak SJ (2014) Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell* 25:563–573
- [4] Reich S, Nguyen CDL, Has C et al. (2020) A multi-omics analysis reveals the unfolded protein response regulon and stress-induced resistance to folate-based antimetabolites. *Nat Comm* 11:2936
- [5] Mader MM, Henry JR (2007) Antimetabolites. In: Taylor BJ, Triggler DJ (Hrsg.) *Comprehensive medicinal chemistry II*. Elsevier, Amsterdam, 55–79
- [6] Ducker GS, Rabinowitz JD (2017) One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metab* 25:27–42
- [7] Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K et al. (2016) The integrated stress response. *EMBO Reports* 17:1374–1395

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadressen:

Asst. Prof. Dr. Robert Ahrends
Institut für Analytische Chemie
Universität Wien
Währingerstraße 38
A-1090 Wien
Robert.Ahrends@univie.ac.at

PD Dr. Jan Medenbach
Biochemie-Zentrum Regensburg
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31
D-93053 Regensburg
Jan.Medenbach@ur.de

AUTOREN



Robert Ahrends

1999–2005 Biologiestudium an der Universität Gießen. 2005–2009 Promotion in der Analytischen Chemie bei Prof. Dr. M. Linscheid, HU Berlin. 2010–2013 Postdoc im Labor von Prof. Dr. M. Teruel an der Stanford Medical School. 2013–2019 Gruppenleiter am Institut für analytische Wissenschaften ISAS e.V., Dortmund. Seit 2020 Professor am Institut für Analytik der Universität Wien, Österreich.



Jan Medenbach

1997–2002 Biologiestudium an der Universität Gießen. 2002–2006 Promotion in der Biochemie bei Prof. Dr. A. Bindereif, Gießen. 2006–2012 Postdoc im Labor von Prof. Dr. M. Hentze am Europäischen Molekularbiologie Labor (EMBL) in Heidelberg. Seit 2012 unabhängiger Gruppenleiter an der Universität Regensburg.