
Der Bowman-Birk Protease Inhibitor wirkt als selektiver Radioprotektor für Normalzellen

K.H. Dittmann, N. Güven, C. Mayer, Tübingen

Bei einer radioonkologischen Behandlung ist die Reaktion des Normalgewebes dosislimitierend. Vor allem Spätreaktionen des Normalgewebes, wie z.B. die Entwicklung einer Fibrose, können das Behandlungsergebnis maßgeblich beeinträchtigen. Durch den Einsatz von Radioprotektoren können solche unerwünschten Reaktionen des Normalgewebes verhindert bzw. das Ausmaß reduziert werden.

Aktuell verfügbare Radioprotektoren besitzen jedoch meist eine hohe Toxizität oder ihr Effekt ist im klinisch relevanten Dosisbereich nicht eindeutig nachweisbar, so daß ein Einsatz genau abgewogen werden muß. Eine Ausnahme stellt der Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI) dar. Er wurde ursprünglich als antikarzinogene Substanz im Tierversuch identifiziert [7]. Schon bei diesen Experimenten zeigte sich, daß die Substanz auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch wirkt und aufgrund ihrer außerordentlichen Stabilität oral appliziert werden kann.

Im Rahmen unserer Arbeiten konnten wir zeigen, daß BBI neben der bereits beschriebenen antikarzinogenen Wirkung auch eine radioprotektive Aktivität besitzt [1]. Dieser radioprotektive Effekt zeigt sich *in vitro* in einem deutlich verbesserten klonogenen Überleben normaler Fibroblasten nach Behandlung mit ionisierender Strahlung.

Für den Einsatz im Rahmen einer radioonkologischen Behandlung muß ein Radioprotektor Normalgewebe-Selektivität aufweisen. Eine Radioprotektion von Tumorzellen würde die lokale Tumorkontrolle in Frage stellen. Wir überprüften deshalb eine Vielzahl von Tumorzelllinien auf eine BBI-vermittelte Radioprotektion. In keiner der Tumorzelllinien konnten wir eine Radioprotektion nachweisen [2]. Die genotypische Charakterisierung der Tumorzelllinien zeigte, daß der Tumorsuppressor p53 entweder mutiert oder inaktiviert war. Eine experimentell induzierte Inaktivierung des p53 in normalen Fibroblasten war mit dem Verlust der Radioprotektion durch BBI verknüpft. So gehen wir davon aus, daß der radioprotektive Effekt von BBI nur von Zellen nutzbar ist, die über ein funktionsfähiges p53 verfügen. Der Einsatz von BBI im Rahmen einer radioonkologischen Behandlung wäre damit mit einem therapeutischen Benefit verbunden, da der Großteil humaner Tumoren ein mutiertes p53 aufweist [6] bzw. die Funktion der p53-assoziierten Signaltransduktionskaskade beeinträchtigt ist. In diesem Fall würde nur das Normalgewebe eine Radioprotektion erfahren.

Neben dem Einsatz in der Radioonkologie ist ein Einsatz von BBI natürlich auch bei allen beruflich strahlenexponierten Personen denkbar. In diesem Fall wäre – auf Grund der fehlenden Toxizität – ein präventiver Einsatz möglich. Voraussetzung für einen Einsatz ist jedoch ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus und die intensive Testung *in vivo*.

Molekularbiologisch ist der radioprotektive Effekt von BBI mit der Modulation der strahleninduzierten Signaltransduktionskaskade gekoppelt. BBI erhöht nicht nur die Proteinmenge und die transkriptionelle Aktivität von p53 [2], sondern interagiert auch mit der strahleninduzierten Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) [5], der initialen Reaktion der strahleninduzierten Signaltransduktion. Aufgabe dieser Signaltransduktionskaskade ist es, die Zelle auf eine schnelle und effiziente Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden vorzubereiten. Für das mechanistische Verständnis des radioprotektiven Effekts von BBI ist essentiell, daß es bereits während der Präinkubation der Zellen mit BBI zur Aktivierung des EGFR kommt. Nachfolgend steigt die p53-Proteinmenge [3] und induziert die Transkription der Reparatur-relevanten Gene für ERCC3 und Gadd45. Als Konsequenz dieser molekularen Reaktionen läßt sich eine schnellere Reparatur von DNA-Schäden in BBI-vorbehandelten Zellen nachweisen.

Die Kenntnis des molekularen Mechanismus und der molekularen Struktur von BBI ermöglicht eine Abschätzung der Vor- und auch der Nachteile eines in vivo-Einsatzes. So wäre es denkbar, daß der systemische Einsatz eines Proteaseninhibitors, der mit einer Vielzahl von proteasen-assoziierten physiologischen Vorgängen in vivo interagieren kann, sicher auch mit Gefahren oder Komplikationen verknüpft sein kann. Um dieses Problem zu vermeiden, wurde versucht den radioprotektiven Effekt von BBI vom antiproteolytischen Effekt abzukoppeln. Es konnte eine Teilsequenz des BBI-Moleküls – bestehend aus neun Aminosäuren – identifiziert werden, die den radioprotektivem Effekt aufweist, ohne die antiproteolytischen Eigenschaften des Gesamtmoleküls zu besitzen [4]. Darüber hinaus konnten wir zeigen, daß durch die Deletion der Aminosäure Serin aus dem Nonapeptid auch dessen radioprotektive Wirkung verloren geht. Das synthetische Nonapeptid hat den Vorteil, daß es keine antiproteolytischen Eigenschaften mehr besitzt und deshalb besonders für den klinischen Einsatz geeignet ist (Patent Nr. 19735587.0).

Erste tierexperimentelle Studien, die in Kooperation mit Prof. Dr. Milas (M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, USA) durchgeführt werden, legen den Schluß nahe, daß durch BBI das Auftreten von strahleninduzierten fibrotischen Veränderungen in der Beinhaut von Mäusen reduziert werden kann (leg-contracture-assay, Dosis 45 Gy). Darüber hinaus konnte in diesen in vivo Versuchen gezeigt werden, daß BBI keinen radioprotektiven Effekt auf experimentell induzierte Mausfibrosarkome aufweist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit BBI bzw. dem daraus abgeleiteten Peptid ein Radioprotektor zur Verfügung steht, der nicht toxisch ist, der leicht applizierbar werden kann und vor allem spezifisch für Normalzellen wirkt.

Literatur

- [1] Dittmann, K.H.; Löffler, H.; Bamberg, M.; Rodemann, H.P.: Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. *Radioth. & Oncol.* 34 (1995) 137–143

- [2] Dittmann, K.H.; Güven, N.; Mayer, C.; Ohneseit, P.; Zell, R.; Begg, A.C.; Rodemann, H.P.: The presence of wild-type p53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in vitro. *Radiat. Res.* 150 (1998) 648–655
- [3] Dittmann, K.H.; Güven, N.; Mayer, C.; Rodemann, H.P.: The radioprotective effect of BBI is associated with the activation of DNA-repair relevant genes. *Int. J. Radiat. Biol.* 74 (1998) 225–230
- [4] Güven, N.; Dittmann, K.H.; Mayer, C.; Rodemann, H.P.: The radioprotective potential of the Bowman-Birk protease inhibitor is independent of its secondary structure. *Cancer Letters* 125 (1998) 77–82
- [5] Güven, N.; Dittmann, K.H.; Rodemann, H.P.: Bowman-Birk proteinase inhibitor reduces the radiation-induced activation of the EGF-receptor and induces tyrosine phosphatase activity. *Int. J. Radiat. Biol.* 73 (1998) 157–162
- [6] Hollstein, M.; Sidransky, B.; Vogelstein, B.; Harris, C.C.: p53 mutations in human cancer. *Science* 253 (1991) 49–53
- [7] Kennedy, A.R.: Prevention of carcinogenesis by proteinase inhibitors. *Cancer Res.* 54 (1994) 1999–2005

Diese Arbeiten wurden und werden von der DFG gefördert (Di/402/6-1 und Di/402/6-2).