

MATTHIAS U. KASSACK, ALEXANDRA HAMACHER und NIELS ECKSTEIN

Resistenzmechanismen von Tumoren gegen Platinkomplexe: Neue Drug Targets und diagnostische Marker

Platinkomplexe in der Therapie maligner Tumore

Barnett Rosenberg untersuchte vor über 40 Jahren die Wirkung elektromagnetischer Strahlung auf die Zellteilung. Bei Verwendung von als inert angesehenen Platinelektroden beobachtete Rosenberg eine bis zu 300-fache Zunahme der Länge von *Escherichia-Coli*-Bakterien.¹ Dieser Effekt wurde nicht durch das elektrische Feld hervorgerufen, sondern konnte den durch Elektrolyse entstandenen Produkten Cis-Diammin-dichloro-platin (II), heute bekannt als Arzneistoff Cisplatin (Abb. 1), sowie dem Platin (IV) Analogen Cis-Diammin-tetrachloro-platin (IV) zugeordnet werden. Rosenberg hatte unbeabsichtigt einen Platinkomplex untersucht, der bereits 1844 von Michel Peyrone synthetisiert worden war. Schnell wurde die zytotoxische Wirkung von Cisplatin entdeckt, die ersten Patienten 1971 behandelt und die Zulassung als Zytostatikum durch die US Food and Drug Administration (FDA) im Jahr 1978 gewährt. Cisplatin ist mittlerweile ein weit verbreitetes und effektives Chemotherapeutikum zur Behandlung epithelialer Tumore wie Bronchial-, Kopf-Hals-, Ovarial- oder Blasenkarzinome.² Meist erfolgt eine Kombination von Cisplatin mit anderen Zytostatika. Der große medizinische Fortschritt durch die Einführung von Cisplatin kann am Beispiel von Hodentumoren demonstriert werden: Vor Einführung der cisplatinhaltigen Chemotherapie war die Diagnose beinahe immer ein Todesurteil, heute ist selbst bei metastasierenden Tumoren eine Heilung bei 80 Prozent der Patienten erreichbar.³ Limitiert wird die Anwendung von Cisplatin durch die hohe Toxizität. Durch Synthese abgewandelter Platinkomplexe, aber auch Verwendung anderer Metallkomplexe (Palladium, Gold) wurde versucht, die hohe Nephro- und Ototoxizität zu mindern und damit die Anwendung von Platinkomplexen sicherer zu gestalten. Die Toxizität von Cisplatin konnte durch eine intensive Hydratation vor Cisplatinapplikation reduziert und durch Einführung des Derivates Carboplatin (Cis-Diammin-[1,1-cyclobutandicarboxylato]-platin (II)) umgangen werden (Abb. 1). Die bei Cisplatin gefürchtete Nephro- und Ototoxizität tritt bei Carboplatin praktisch nicht auf, dafür ist bei Carboplatin eine Knochenmarksuppression und Thrombozytopenie dosislimitierend. Die Überlebensraten beim Ovarialkarzinom sind für Cis- und Carboplatin in vielen klinischen Studien als praktisch identisch anzusehen.

¹ Vgl. Rosenberg *et al.* (1965).

² Vgl. Kelland (2007).

³ Vgl. Einhorn (2002).

Aufgrund der geringeren Toxizität wird daher beim Ovarialkarzinom weitgehend Carboplatin dem toxischeren Cisplatin vorgezogen.⁴

Ein großes Problem der Cis- beziehungsweise Carboplatintherapie ist die intrinsische und die erworbene (sekundäre) Resistenz von Tumoren gegen Platinkomplexe. Eine Vielzahl von Platinkomplexen wurde mit dem Ziel synthetisiert, das Wirkungsspektrum von Cisplatin zu erweitern. Dies führte zur Entwicklung von Oxaliplatin (1R,2R-Diaminocyclohexan-oxalato-platin (II)) mit dem so genannten DACH-Liganden (1,2-Diaminocyclohexan) (Abb. 1). Auffällig war Oxaliplatin im Screening der NCI-60-Tumorzellen: Oxaliplatin ergab ein anderes, erweitertes Sensitivitätsmuster verglichen mit Cisplatin. Insbesondere in der Kombination mit 5-Fluoruracil zeigt Oxaliplatin sehr gute Wirksamkeit beim Kolonkarzinom, das intrinsisch resistent gegen Cisplatin ist.⁵ Weitere Entwicklungen sind die auch oral bioverfügbaren Platinkomplexe Satraplatin (Bisacetato-ammin-dichloro-cyclohexylamin-platin (IV)) sowie Picoplatin (Cis-Ammin-dichloro-2-methylpyridin-platin (II)) (Abb. 1).⁶ Beide befinden sich in Phase I, II oder III von klinischen Studien. Obwohl nicht alle Studien zu positiven Resultaten kamen, sind beide Platinkomplexe die aussichtsreichsten Kandidaten für die Zulassung eines weiteren Platinkomplexes in der Tumorthherapie. Satraplatin und Picoplatin zeigen auch Aktivitäten bei intrinsisch cisplatinresistenten Tumoren und könnten ebenfalls Wirksamkeit gegenüber sekundär resistent gewordenen Tumoren aufweisen.

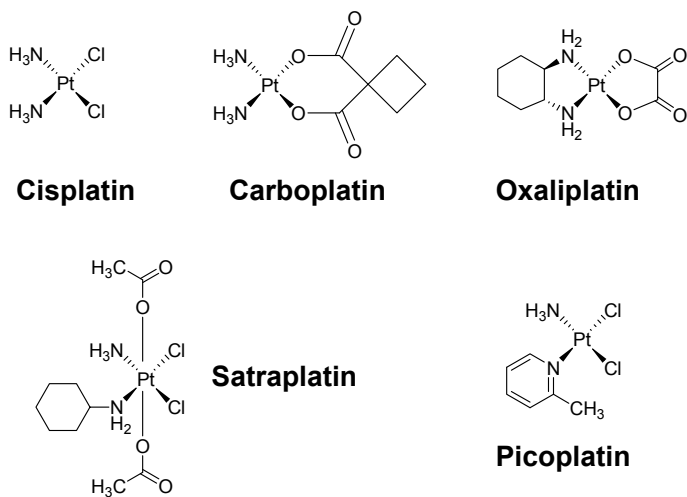


Abb. 1: In die Therapie maligner Tumore eingeführte oder in klinischen Studien befindliche Platinkomplexe

⁴ Vgl. Aabo *et al.* (1998).

⁵ Vgl. Goldberg *et al.* (2004).

⁶ Vgl. Kelland (2007).

Warum sind einige Tumore gegen Cisplatin resistent?

Resistenzen gegen Cisplatin können intrinsisch vorliegen wie beim Kolonkarzinom oder im Verlauf der Therapie erworben werden wie beispielsweise beim Ovarialkarzinom. Hodenkarzinome sind außerordentlich sensitiv gegenüber Cisplatin. Dies begründet die hohe Heilungsrate einer Cisplatin-Kombinationstherapie bei diesem Tumor. Was macht nun Hodenkarzinome so sensitiv oder umgekehrt andere Tumorzellen klinisch resistent gegen Cisplatin? Abbildung 2 zeigt das zelluläre Schicksal von Cisplatin und mögliche Resistenzmechanismen. Cisplatin wird durch Diffusion oder über den Kupfertransporter CTR1 in die Zelle aufgenommen.⁷ Im Zytosol wird Cisplatin in den Aquokomplex umgewandelt und führt als solcher zur Ausbildung von Cisplatin-DNA-Addukten, die vorwiegend Intrastrang-Crosslinks darstellen. Ein intaktes Mismatch-Repair-System (MMR) führt zu einem fortwährenden, aber erfolglosen Reparaturversuch der Zelle, der schließlich in der Apoptose, dem programmierten Zelltod, mündet.⁸ So geschieht es bei sensitiven Zellen wie Hodentumoren. An mehreren Stellen können aber Resistenzmechanismen zu einer Abschwächung bis hin zur Aufhebung des zytostatischen Effektes von Cisplatin führen.⁹ Die zelluläre Aufnahme von Cisplatin kann durch verringerte Expression des Kupferaufnahme-transporters CTR1 reduziert sein. Umgekehrt kann eine erhöhte Expression der P-Typ-ATPasen ATP7A und ATP7B zu einer verstärkten Sequestrierung und Ausschleusung von Cisplatin führen. Cisplatin kann weiterhin durch thiolgruppenhaltige Peptide oder Proteine (Glutathion, Metallothioneine) entgiftet und dann über ABC-Transporter wie MRP2 ausgeschleust werden. Auch wenn Cisplatin sein hauptsächliches Target DNA erreicht und sich erfolgreich Platin-DNA-Addukte gebildet haben, so kann eine verstärkte DNA-Reparatur vorwiegend durch Enzyme des *Nucleotide Excision Repair* (NER), aber auch des *Base Excision Repair* (BER) die zytotoxische Wirkung aufheben. Schließlich ist aber auch die Ausbildung von Platin-DNA-Addukten kein Garant für eine zytotoxische Wirkung. Die Enzyme des Mismatch-Repair-Systems und der Apoptose müssen ebenfalls intakt sein, damit Apoptose ausgelöst wird. Mutationen oder die Expression antiapoptotischer Gene können die zytotoxische Wirkung auch in diesem Stadium verhindern.¹⁰ All diese Ansätze zur Erklärung der Resistenz von Cisplatin sind aber nicht ausreichend, um eine verlässliche klinische Vorhersage zur Sensitivität von Tumorpatienten für eine Platintherapie zu machen. Es muss weitere individuelle Faktoren geben, die für eine Cisplatinresistenz mitverantwortlich sind.

Wie können weitere Cisplatinresistenzgene gefunden werden?

Systematische Untersuchungen von sensitiven und resistenten Tumorzellen zur Entdeckung weiterer Cisplatinresistenzmechanismen können vergleichsweise einfach an (selbst) etablierten Tumorzelllinien erfolgen, die unter Behandlung mit klinisch relevanten Konzentrationen an Cisplatin resistent gemacht und dann auf transkriptioneller und translationeller Ebene untersucht werden. Zwei Ziele sind dabei angestrebt: Erstens sollen weitere Kandidatengene zur Vorhersage der Sensitivität beziehungsweise Resistenz von Tumor-

⁷ Vgl. Ishida *et al.* (2002).

⁸ Vgl. Siddik (2003).

⁹ Vgl. Stewart (2007).

¹⁰ Vgl. Siddik (2003).

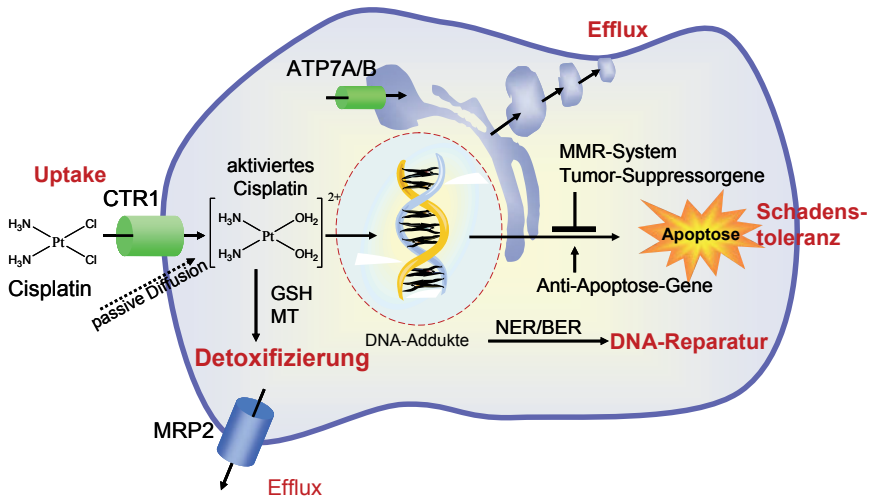


Abb. 2: Zelluläre Aufnahme und intrazelluläres Schicksal von Cisplatin mit möglichen Resistenzmechanismen gegen Cisplatin

zellen gegen Platinkomplexe gefunden werden. Solche möglichen diagnostischen Marker zur Chemosensitivität müssen dann an klinischen Proben validiert werden. Das zweite Ziel ist, neue Arzneistofftargets zur Überwindung der Resistenz gegen Platinkomplexe zu entdecken. Dies würde es ermöglichen, primär (intrinsisch) resistente Tumore mit Cisplatin behandelbar zu machen und eine sekundäre Resistenzentwicklung zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Der Ansatz, Resistenzgene selektiv auszunutzen, wird mit dem Prodrug und Alkylans Canfosamid verfolgt.¹¹ Das Cisplatin inaktivierende Enzym Glutathion-S-Transferase pi-1 (GSTP1) aktiviert Canfosamid zu einem Alkylans. Ein Resistenzmechanismus gegen Cis- und Carboplatin wird also gezielt ausgenutzt, um ein zytotoxisches Agens zu aktivieren.

In unserer Arbeitsgruppe wurden bisher ein kommerziell erhältliches Ovarialkarzinomzellpärchen (A2780 und die resistente Variante A2780cis), das Zungenkarzinom Cal27 sowie die Mammakarzinomzelllinie MCF7 mit den selbst erzeugten resistenten Varianten Cal27cis und MCF7cis untersucht.¹² Zur chemotherapeutischen First-Line-Behandlung von Ovarialkarzinomen und Kopf-Hals-Tumoren wie dem Zungenkarzinom gehören Platinkomplexe wie Cisplatin beziehungsweise das toxikologisch günstigere Carboplatin. Ein Einsatz von Platinkomplexen beim Mammakarzinom ist derzeit Gegenstand verschiedener klinischer Studien.¹³ Alle drei Zellpärchen (A2780/A2780cis, Cal27/Cal27cis, MCF7/MCF7cis) wurden zunächst auf transkriptioneller Ebene verglichen. Interessante Kandidatengene wurden dann proteinbiochemisch untersucht. Weitere Tumorzelllinien, bei denen Platinkomplexe in der First-Line-Therapie eingesetzt werden, sind derzeit mit

¹¹ Vgl. Townsend *et al.* (2002).

¹² Vgl. Weykam (2007), Gosepath *et al.* (2008) sowie Eckstein *et al.* (2008).

¹³ Vgl. United States National Institutes of Health (2008).

dem Schwerpunkt auf veränderter Signaltransduktion von platinresistenten gegenüber -sensitiven Tumorzellen Gegenstand intensiver Bearbeitung in unserer Arbeitsgruppe.

Erworbene Cisplatinresistenz der Zungenkarzinomzelllinie Cal27 ist assoziiert mit verringerter DKK1-Expression¹⁴

Die im Vergleich zur sensitiven Zelllinie circa zehnfach resistendere Subzelllinie Cal27cis wurde durch zyklische Anwendung klinischer Konzentrationen von Cisplatin erzeugt. Abbildung 3 zeigt Konzentrations-Effekt-Kurven des zytotoxischen Effektes von Cisplatin auf sensitive Cal27- und resistente Cal27cis-Zellen. Cal27- und Cal27cis-Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Kupfertransportern und ebenfalls keine Unterschiede in der zellulären Aufnahme von Cisplatin. Dies legt den Schluss nahe, dass andere Resistenzmechanismen als veränderte Aufnahme oder Efflux eine Rolle spielen.

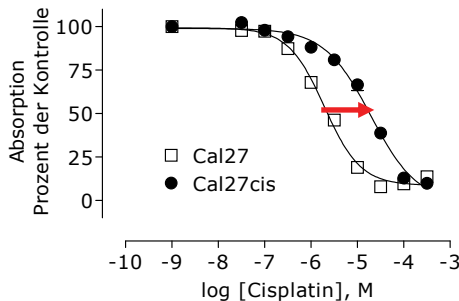


Abb. 3: Zytotoxischer Effekt von Cisplatin auf sensitive Cal27- und resistente Cal27cis-Zellen, bestimmt mit Hilfe des MTT-Zytotoxizitätsassays. Die Abnahme der Cisplatinsensitivität der resistenten Cal27cis-Zellen im Vergleich zur sensitiven Zelllinie ist durch den Pfeil verdeutlicht.

Mit Hilfe der Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung (SSH), einer Methode der differentiellen Genexpression, sowie bestätigender quantitativer PCR wurden einige neue Cisplatinresistenz-Kandidatengene identifiziert. Darunter befand sich Dickkopf-1 (DKK1), ein sezerniertes Glykoprotein, das als funktioneller Antagonist des WNT- β -Catenin-Signaltransduktionsweges fungiert. Sensitive Cal27-Zellen sezernieren etwa doppelt so viel DKK1 wie die resistenten Cal27cis, was sowohl durch quantitative PCR als auch mittels ELISA über eine Sekretionsdauer von vier Tagen bestimmt wurde (Abb. 4). Auf akute Cisplatinbehandlung reagieren beide Zelllinien mit einer verstärkten Sekretion von DKK1. Abbildung 5 zeigt allerdings, dass die sensitiven Cal27 sowohl mehr DKK1 sezernieren als die resistenten Cal27cis als auch zu einem früheren Zeitpunkt. Das Zungenkarzinom Cal27 zeigt also eine duale Antwort auf eine Cisplatinbehandlung, die von der Dauer der Behandlung abhängig ist. Erfolgt eine kurzfristige, akute Behandlung mit Cisplatin, so ist die DKK1-Sekretion verstärkt (Abb. 5). Erfolgt jedoch über viele Zellzyklen eine intermittierende Behandlung mit Cisplatin, so nimmt die Chemosensitivität gegen Cisplatin um

¹⁴ Vgl. Gosepath *et al.* (2008).

den Faktor 10 ab (Abb. 3). Diese Resistenzzunahme ist mit einer verringerten Sekretion von DKK1 assoziiert (Abb. 4).

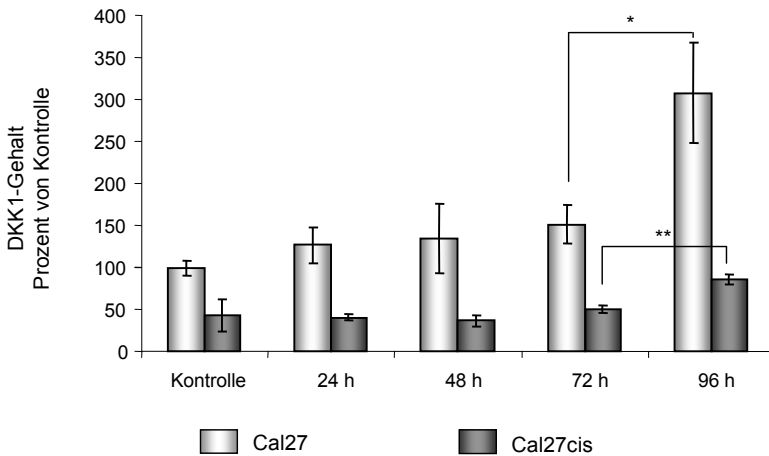


Abb. 4: DKK1-Sekretionskinetik von Cal27- und Cal27cis-Zellen über vier Tage. Der DKK1-Gehalt zum Zeitpunkt 0 h der Zelllinie Cal27 wurde auf 100 Prozent gesetzt. *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$ (t-Test).

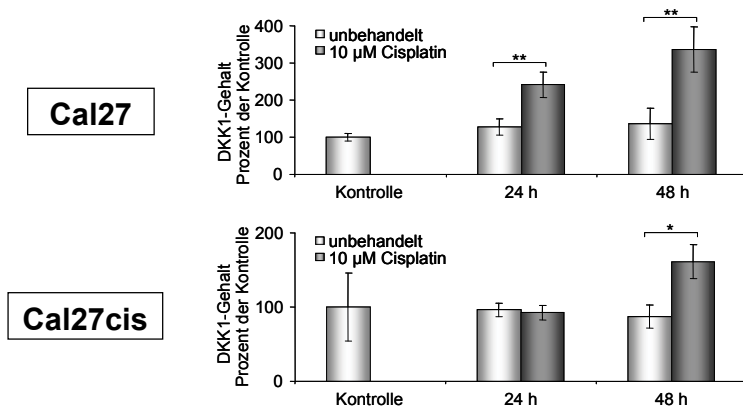


Abb. 5: Induktion der DKK1-Sekretion durch Cisplatinbehandlung bei Cal27- und Cal27cis-Zellen. Als 100-Prozent-Kontrolle wurde der DKK1-Gehalt im Nährmedienüberstand der unbehandelten Proben jeder Zelle verwendet. *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$ (t-Test).

DKK1 greift in den Signaltransduktionsweg von WNT, einem Liganden für membranständige Rezeptoren, ein und führt zu einem funktionellen Antagonismus der WNT-Wirkung (Abb. 6).¹⁵ WNT bindet an den *Frizzled Receptor*, benötigt aber als Korezeptor LRP6, um dann über das Protein Dishevelled (Dsh) zu einer Hemmung des β -Catenin-

¹⁵ Vgl. Wang *et al.* (2000).

Destruktionskomplexes und der Glykogensynthasekinase-3 β (GSK3 β) zu führen (Abb. 6A). Die WNT-vermittelte Aktivierung dieses Signalweges bewirkt damit, dass β -Catenin nicht abgebaut, sondern angereichert wird, in den Zellkern transloziert und Transkription, Zellproliferation und Überleben der Zelle fördert. Bei Anwesenheit von DKK1 (Abb. 6B) kommt es zur Ausbildung eines Rezeptorkomplexes zwischen LRP6 und Kremen1/2 (Krm), der internalisiert und abgebaut wird. Der β -Catenin-Destruktionskomplex mit aktiver GSK3 β kann β -Catenin phosphorylieren und so für die ubiquitinvermittelte Proteolyse zugänglich machen. Eine Aktivierung der Transkription von WNT-Zielgenen unterbleibt.

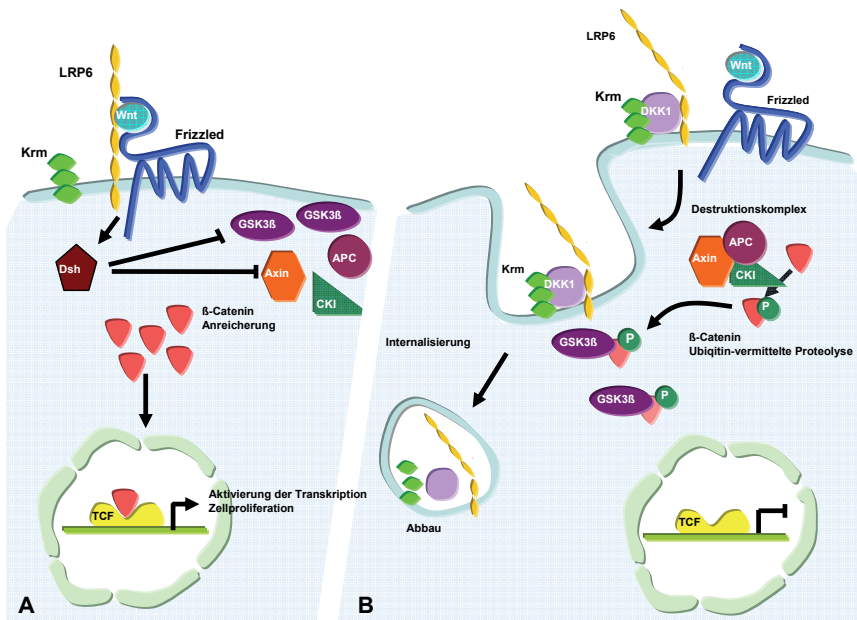


Abb. 6: WNT-Signalweg in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von DKK1

Wenn die unterschiedliche Sekretion von DKK1 bei Cal27- und Cal27cis-Zellen in der Tat physiologische Bedeutung besitzen sollte, dann müssten sich bei intaktem WNT-Signaltransduktionsweg unterschiedliche β -Catenin-Konzentrationen in Cal27 und Cal27cis finden lassen. Der in Abbildung 7 dargestellte Western-Blot bestätigt dies. Da eine erhöhte DKK1-Sekretion bei der sensitiven Zelllinie auftrat, wurde nun untersucht, ob eine Erhöhung der DKK1-Sekretion zu einer Resensitivierung der resistenten Cal27cis-Zellen führen würde. Rekombinante Überexpression von DKK1 zeigte in der Tat eine Linksverschiebung der Cisplatinkonzentrations-Effektkurven im zytotoxischen MTT-Assay und im Proliferations-(BrdU)-Assay. Die Resensitivierung gelang um einen Faktor zwischen 2,2 und 3 (Abb. 8). Unter Berücksichtigung des ermittelten Resistenzunterschiedes um den Faktor 10 zwischen Cal27 und Cal27cis zeigte die Überexpression von DKK1, also eine partielle Resensitivierung von Cal27cis gegen Cisplatin. Die sensitiven Cal27-Zellen wurden zudem ebenfalls um den gleichen Faktor „hyper“sensitiviert. Dies deutet auf einen

Beitrag des Gens DKK1 zur Chemosensitivität gegen Cisplatin sowie auf weitere, basale Resistenzmechanismen, die oben diskutiert wurden, hin.

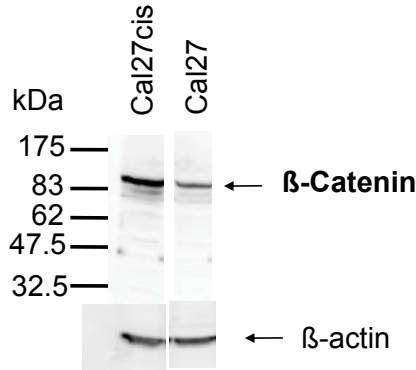


Abb. 7: Western-Blot von β -Catenin in sensiblen Cal27- und resistenten Cal27cis-Zellen. β -Aktin diente als Kontrolle zur Standardisierung der Proteinmenge.

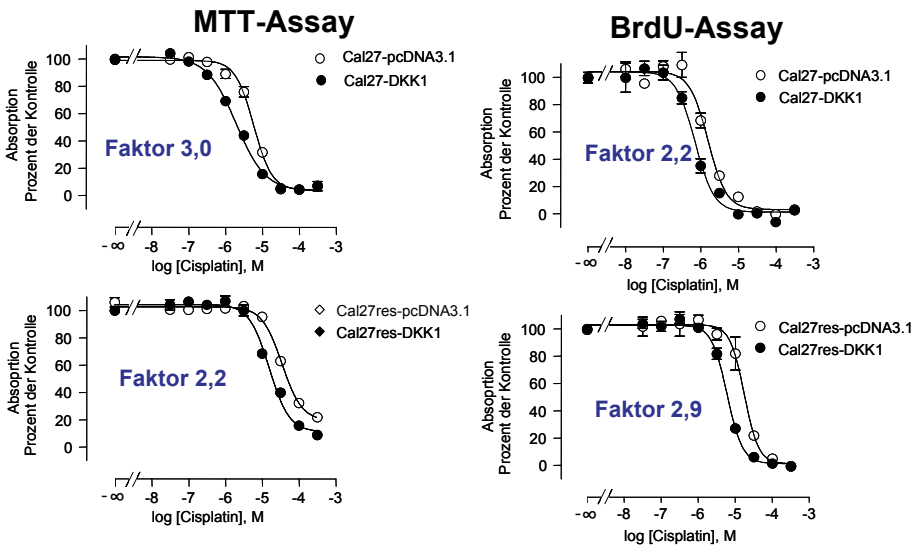


Abb. 8: Sensitivierung von Cal27- und Cal27cis-Zellen gegen Cisplatin im MTT-Zytotoxizitäts- und BrdU-Proliferationsassay durch rekombinante Überexpression von DKK1. DKK1-Überexpressionsklone wurden mit Vektorkontrollen (pcDNA3.1) verglichen.

Das epitheliale Membranprotein 1 (EMP1) ist ein Cisplatin sensitivierendes Gen in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780cis

Mit der gleichen Vorgehensweise wie beim Zellpärchen Cal27/Cal27cis wurde beim Ovarialkarzinom A2780 ein neues, bisher nicht in Zusammenhang mit Cisplatin gebrachtes Gen identifiziert. Bei diesem Gen handelt es sich um das epitheliale Membranprotein EMP1. A2780- und A2780cis-Zellen weisen einen Sensitivitätsunterschied von circa 5 auf (MTT- beziehungsweise BrdU-Assay). Die sensitiven A2780-Zellen zeigen transkriptionell und translationell (Western-Blot) eine circa doppelt so hohe Expression von EMP1 wie die resistenten A2780cis. Überexpression des Gens EMP1 führte zu einer geringen, aber signifikanten Erhöhung der Chemosensitivität gegen Cisplatin (Faktor 1,8 bei den sensitiven A2780; Faktor 3,5 bei den resistenten A2780cis). Diese Ergebnisse (Immunzytochemie, Western-Blot, MTT-Zytotoxizitätsassays) sind in Abbildung 9 dargestellt.

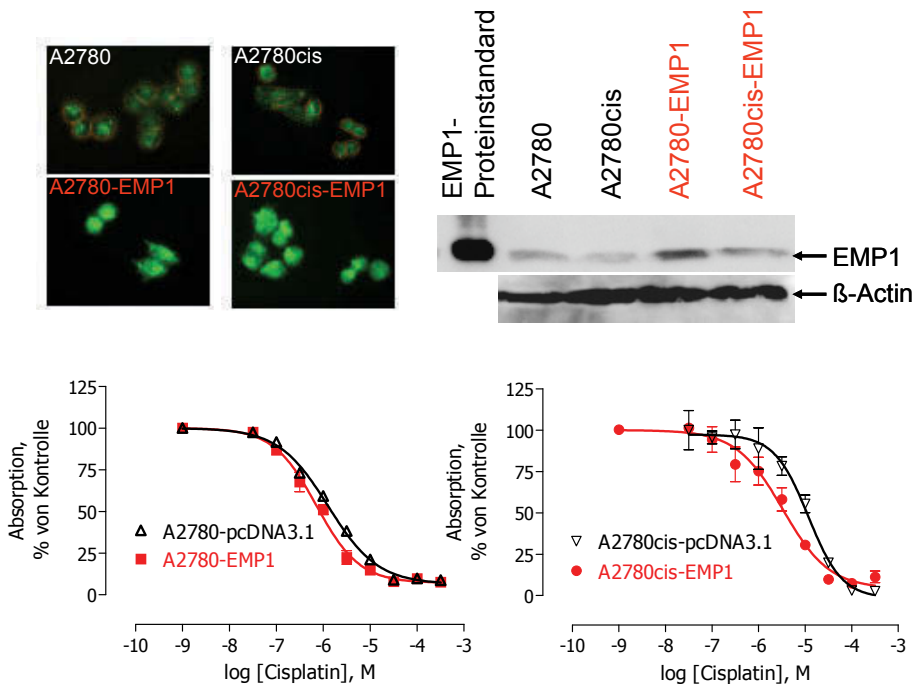


Abb. 9: Immunzytochemie und Western-Blot von EMP1 in A2780, A2780cis und Überexpressionsklonen A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 sowie Sensitivierung von A2780- und A2780cis-Zellen gegen Cisplatin im MTT-Zytotoxizitätsassay durch rekombinante Überexpression von EMP1. EMP1-Überexpressionsklone wurden mit Vektorkontrollen 120(pcDNA3.1) verglichen.

Wiederum gelang also die Identifizierung eines bisher nicht in Zusammenhang mit Cisplatin stehenden Resistenzgens. Allerdings zeigte sich wie bei Cal27cis nur eine partielle Resensitivierung der resistenten Ovarialkarzinomzellen gegen Cisplatin. Im Fall der A2780- und A2780cis-Zellen kann dies durch eine verringerte Cisplatin Aufnahme bei den

resistenten A2780cis-Zellen erklärt werden, die auf einer veränderten Expression des Cisplatinenaufnahmetransporters CTR1 beruht.¹⁶

Der EGF-Rezeptorligand Amphiregulin spielt eine Schlüsselrolle bei der Cisplatinresistenz von Mammakarzinomen¹⁷

Das dritte Beispiel beinhaltet die Brustkrebszelllinie MCF7. Platinkomplexe gehören bisher nicht zur First-Line-Therapie von Mammakarzinomen. Es läuft aber eine Reihe klinischer Studien, die eine Verwendung von Platinkomplexen beim Mammakarzinom untersuchen.¹⁸ Aus der MCF7-Zelllinie wurde durch intermittierende Behandlung mit Cisplatin die 3,3-fach resistendere MCF7cis-Zelllinie generiert. Die Cisplatinbehandlung orientierte sich hinsichtlich der Behandlungsintervalle und Konzentrationen in Analogie zur Cal27-Zelllinie an der klinischen Anwendung von Cisplatin. MCF7 und MCF7cis wurden mit DNA-Microarrays und Phospho-Proteomarrays untersucht. In der resistenten Zelllinie MCF7cis ist der Signaltransduktionsweg des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGF-R) aktiviert (= phosphoryliert). Abbildung 10 zeigt eine verstärkte Phosphorylierung des EGF-R sowie der nachgeschalteten Kinasen ERK1 und AKT1 in MCF7cis. In weiteren Experimenten wurde geklärt, wie es zur Aktivierung des EGF-R in MCF7cis kommt. Amphiregulin konnte als der verantwortliche Ligand identifiziert werden, der zur Aktivierung des EGF-R führt. Eine siRNA-Ausschaltung von Amphiregulin und die Verwendung neutralisierender Antikörper gegen Amphiregulin führte zu einer vollständigen Resensitivierung der resistenten MCF7cis-Zellen. Eine Generalisierung und Selektivität dieses Befundes für Mammakarzinome wurde durch Korrelationsanalysen der Amphiregulinexpression mit der Chemosensitivität gegen Cisplatin von zwölf Brustkrebs- sowie 43 Lungenkarzinomzelllinien gezeigt. Bei den zwölf Brustkrebszelllinien besteht eine signifikante Korrelation (Abb. 11), während bei den 43 Lungenkarzinomzelllinien keine Korrelation besteht. Eine autokrine Regulation durch Amphiregulinsekretion und Aktivierung des EGF-R-Signaltransduktionsweges in Mammakarzinomzellen wurde in dieser Studie als neues Prinzip der erworbenen Chemosensitivität gegen Cisplatin identifiziert.

Zusammenfassung

Seit der Entdeckung der zytotoxischen Wirksamkeit von Cisplatin durch Barnett Rosenberg haben Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin einen festen Platz in der Chemotherapie maligner Tumore erhalten. Die Zulassung weiterer Platinkomplexe ist zu erwarten. Die Toxizität ist durch begleitende therapeutische Maßnahmen und Beachtung von Kontraindikationen relativ beherrschbar. Problematischer sind intrinsische und erworbene Resistenzen, die multifaktoriell und therapielimitierend sein können. Andere Metall- oder neuere Platinkomplexe (Satra-, Picoplatin) sowie gezielte Ausnutzung von Resistenzmechanismen können Strategien zur Überwindung von Resistenzen sein. Klinisch dominiert aber das Problem, dass bisherige diagnostische Marker zur *verlässlichen* Vorhersage der Chemosensitivität gegen Platinkomplexe nicht ausreichen. In unserer Arbeitsgruppe wird

¹⁶ Vgl. Zisowsky *et al.* (2007).

¹⁷ Vgl. Eckstein *et al.* (2008).

¹⁸ Vgl. United States National Institutes of Health (2008).

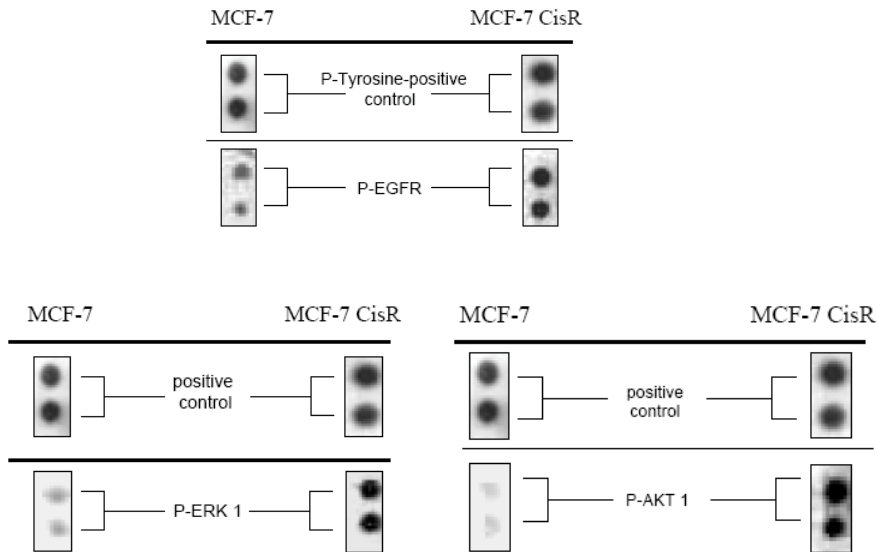


Abb. 10: Ausschnitt von Phospho-Proteomarrays von Rezeptortyrosinkinasen und nachgeschalteten intrazellulären Kinasen. Antikörper sind gegen phosphorylierte Proteine gerichtet.

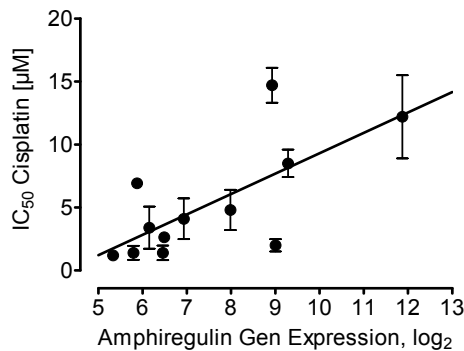


Abb. 11: Korrelation der Expression von Amphiregulin mit der Chemosensitivität gegen Cisplatin (Korrelationskoeffizient: 0,674)

daher nach Mechanismen der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen Platinkomplexe und Strategien zur Überwindung derselben gesucht. Platinkomplexresistente Subzelllinien werden durch an klinische Bedingungen angelehnte Behandlungsstrategien von Tumorzellen mit Platinkomplexen selektiert und anschließend biochemisch und funktionell analysiert. Auf diese Weise konnten beim Zungenkarzinom Cal27 und Ovarialkarzinom A2780 – Karzinome, bei denen Platinkomplexe als First-Line-Therapie eingesetzt werden – neue Mechanismen der erworbenen Resistenz identifiziert werden. Eine Pla-

tinresistenz von Cal27-Zellen geht einher mit einer verringerten Expression von DKK1, einem funktionellen WNT-Antagonisten. DKK1-Überexpression führt zu einer partiellen Resensitivierung. Die erworbene Resistenz von A2780cis-Zellen ist zum Teil auf eine Verringerung der EMP1-Expression zurückzuführen, ebenfalls ein neuer Resistenzmechanismus. In Mammakarzinomen wurde festgestellt, dass erworbene Resistenz gegen Cisplatin mit der Entwicklung eines autokrinen Wachstumssignals (Aktivierung des EGF-R durch Amphiregulin) einhergeht. Aus den hier vorgestellten Mechanismen könnten sich diagnostische Marker entwickeln und darüber hinaus therapeutische Targets ergeben. Kombinationen von Platinkomplexen mit Modulatoren/Inhibitoren des WNT-Signaltransduktionsweges oder von Wachstumsfaktorrezeptoren sind eine Erfolg versprechende Strategie zur Verhinderung und Bekämpfung der Resistenzentwicklung gegen Platinkomplexe und zur möglichen Anwendung bei intrinsisch resistenten Tumoren.

Danksagung

Die hier vorgestellten Arbeiten wären ohne eine Anschubfinanzierung der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zur Bildung von Forscherverbünden und die finanzielle Unterstützung der Stiftung CAESAR nicht möglich gewesen. Dank gilt den ehemaligen Mitarbeiterinnen Dr. Eva Gosepath und Dr. Silke Weykam, die mit großem Einsatz die Studien an den Cal27- beziehungsweise A2780-Zellen durchgeführt haben.

Literatur

- AABO, K. *et al.* (1998). „Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group“, *British Journal of Cancer* 78, 1479–1487.
- ECKSTEIN, N., K. SERVAN, L. GIRARD, D. CAI, G. VONJONQUIERES, U. JAEHDE, M. U. KASSACK, A. F. GAZDAR, J. D. MINNA und H. D. ROYER (2008). „Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells“, *Journal of Biological Chemistry* 283, 739–750.
- EINHORN, L. H. (2002). „Curing metastatic testicular cancer“, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 4592–4595.
- GOLDBERG, R. M., D. J. SARGENT, R. F. MORTON, C. S. FUCHS, R. K. RAMANATHAN, S. K. WILLIAMSON, B. P. FINDLAY, H. C. PITOT und S. R. ALBERTS (2004). „A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer“, *Journal of Clinical Oncology* 22, 23–29.
- GOSEPATH, E. M., N. ECKSTEIN, A. HAMACHER, K. SERVAN, G. VONJONQUIERES, H. LAGE, B. GYÖRFFY, H. D. ROYER und M. U. KASSACK (2008). „Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1“, *International Journal of Cancer* 132, 2013–2019.
- ISHIDA, S., J. LEE, D. J. THIELE und I. HERSKOWITZ (2002). „Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr 1 in yeast and mammals“, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 14298–14302.
- KELLAND, L. (2007). „The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy“, *Nature Reviews Cancer* 7, 573–584.
- ROSENBERG, B., L. VANCAMP und T. KRIGAS (1965). „Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode“, *Nature* 205, 698–699.

- SIDDIK, Z. H. (2003). „Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance“, *Oncogene* 22, 7265–7279.
- STEWART, D. J. (2007). „Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin“, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 63, 12–31.
- TOWNSEND, D. M., H. SHEN, A. L. STAROS, L. GATE und K. D. TEW (2002). „Efficacy of a glutathione S-transferase π -activated prodrug in platinum-resistant ovarian cancer cells“, *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 1089–1095.
- UNITED STATES NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (2008). Informationen über Staatliche und privat durchgeführte klinische Studien in den USA und weltweit. <http://www.clinicaltrials.gov/> (15.Juli 2008).
- WANG, J., J. SHOU und X. CHEN (2000). „Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53“, *Oncogene* 19, 1843–1848.
- WEYKAM, S. (2007). *Differentielle Genexpression in Cisplatin-resistenten und -sensitiven Ovarialkarzinom-Zelllinien und Untersuchung der Funktion von EMP1*. Dissertation. Bonn.
- ZISOWSKY, J., S. KOEGEL, S. LEYERS, K. DEVARAKONDA, M. U. KASSACK, M. OSMAN und U. JAEHDE (2007). „Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells“, *Biochemical Pharmacology* 73, 298–307.

