

// Sensibilisierung von Glioblastomzellen gegenüber Temozolomid //

B. HAAS

D. VON MALLEK

N. ECKSTEIN

(BfArM)

Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme, GBM, WHO Grad IV) ist eine der häufigsten primären bösartigen Neubildungen des zentralen Nervensystems. In der Gruppe der malignen Gliome neuroepithelialen Ursprungs hat es die schlechteste Prognose. 2014 verstarben allein in den USA etwa 14.320 Personen an GBM.¹ Das mediane Überleben neu diagnostizierter Patienten mit GBM betrug vor der Einführung von Temozolomid im Jahre 2005 bei optimaler Therapie zwischen neun und zwölf Monaten.² Zur Standardtherapie nach weitgehend radikaler operativer Resektion gehört heute die postoperative Radiochemotherapie mit Temozolomid. Eine Ursache der schlechten Therapieergebnisse ist die intrinsische Resistenz, die GBM gegenüber Radiotherapie und Temozolomid aufweist. Da der Tumor klinisch nicht als verkapselte Geschwulst imponiert, sondern durch diffus infiltratives Wachstum charakterisiert ist, ist eine vollständige Resektion nur in Ausnahmefällen möglich. Wenn es möglich wäre, die Chemoresistenz des GBM zu revertieren, könnte die Chemotherapie des GBM möglicherweise optimiert werden. Hierzu müssen die intrazellulären Signalwege der Chemoresistenz des GBM aufgeklärt werden. Am BfArM werden Projekte mit dem Hintergrund durchgeführt, Signalwege in GBM-Zelllinien aufzuklären, die Chemoresistenz gegenüber dem Arzneistoff Temozolomid verursachen.

GLIOBLASTOMA MULTIFORME – DEFINITION UND THERAPIE

Gliome sind die häufigsten Primärtumore im zentralen Nervensystem des Menschen.³ Etwa 95 Prozent der Fälle sind primäre Glioblastome (GBM), die de novo ohne vorhergehende Tumorerkrankung entstehen. Sekundär entstehen GBM beispielsweise aus einem vorangegangenen wenig malignen Astrozytomrezidiv im Rahmen schrittweiser Tumorprogression.⁴ Sie sind mit etwa fünf Prozent der Fälle deutlich seltener als primäre GBM.³ Bei den Gliomen handelt es sich um eine heterogene Gruppe bösartiger Neubildungen. Nach WHO-Definition umfasst das histologische Grading bei Gliomen vier Schweregrade:⁵ Grad I und II umfassen langsam wachsende, wenig aggressive Astrozytome. Grad-III-Gliome sind schnell wachsende Tumore, während hochmaligne Grad-IV-Gliome darüber hinaus ausgedehnte nekrotische Anteile aufweisen und/oder angiogenetisch aktiv sind. Die hochmaligne Form, das GBM (Grad IV), ist eine der aggressivsten und tödlichsten Tumorerkrankungen überhaupt. Diese außergewöhnlich hohe Malignität zeigt sich in einer mittleren Überlebenszeit von nur 14,6 Monaten unter Therapie und einer Fünfjahres-Überlebensrate von unter drei Prozent trotz Therapie.² Im Verlauf der Erkrankung kommt es durch Bildung von Gehirnödemen und stetiger Größenzunahme des Tumors, auch bei geeigneter supportiver Therapie, letztlich zu progredienter neurologischer Symptomatik und schließlich zum Tod. Drei Hauptprobleme erschweren die Therapie des GBM:

- (1) GBM-Zellen bilden keinen makroskopisch und bildgebend klar abgrenzbaren Tumor, sondern verteilen sich diffus in Form von undefinierten Zellaggregaten ohne klare Grenzen zum sie umgebenden Hirnparenchym. Dies führt dazu, dass eine R0-Resektion in der Regel nicht möglich ist.
- (2) GBM-Zellen liegen jenseits der Blut-Hirn-Schranke, die das zentrale Nervensystem unter anderem durch die Expression von Carrierproteinen vor einer Intoxikation mit Xenobiotika schützt. Der prominenteste Vertreter dieser Carrierproteine ist das plasmalemmale Glykoprotein (P-gp oder auch Multidrug

Resistance Protein 1, MDR1). Dieser Arzneistoffcarrier transportiert mit hoher Effizienz eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Moleküle und ist für eine große Zahl an erworbenen Chemoresistenzen verantwortlich. Zytostatika mit Affinität zu P-gp scheiden somit für eine Therapie des GBM aus; beispielsweise Anthrazycline, Taxole, Vinca-Alkaloide.⁶

(3) GBM-Zellen zeigen durchweg eine intrinsische Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie. Diese intrinsische Resistenz beruht vorwiegend auf der am häufigsten in GBM gefundenen genetischen Instabilität mit Mutationen in Genen wie zum Beispiel p53, Retinoblastom (RB) und Phosphatase and Tensin homolog (PTEN).⁷

Während der letzten drei Jahrzehnte konnte kein substanzieller Fortschritt in der Therapie des Glioblastoms verzeichnet werden, trotz teils sehr aufwendiger experimenteller Therapieansätze wie der Neutroneneinfangtherapie.⁸ Indikationen zur Radiochemotherapie bei Glioblastomen bestehen am häufigsten postoperativ oder auch bei neurochirurgischer Inoperabilität. Bei einem Rezidiv kann die hochkonformale Re-Bestrahlung erwogen werden. Das Zielvolumen der konformalen Bestrahlung umfasst den in der präoperativen Bildgebung sichtbaren Tumor mit einem Sicherheitssaum von 1–2 cm.

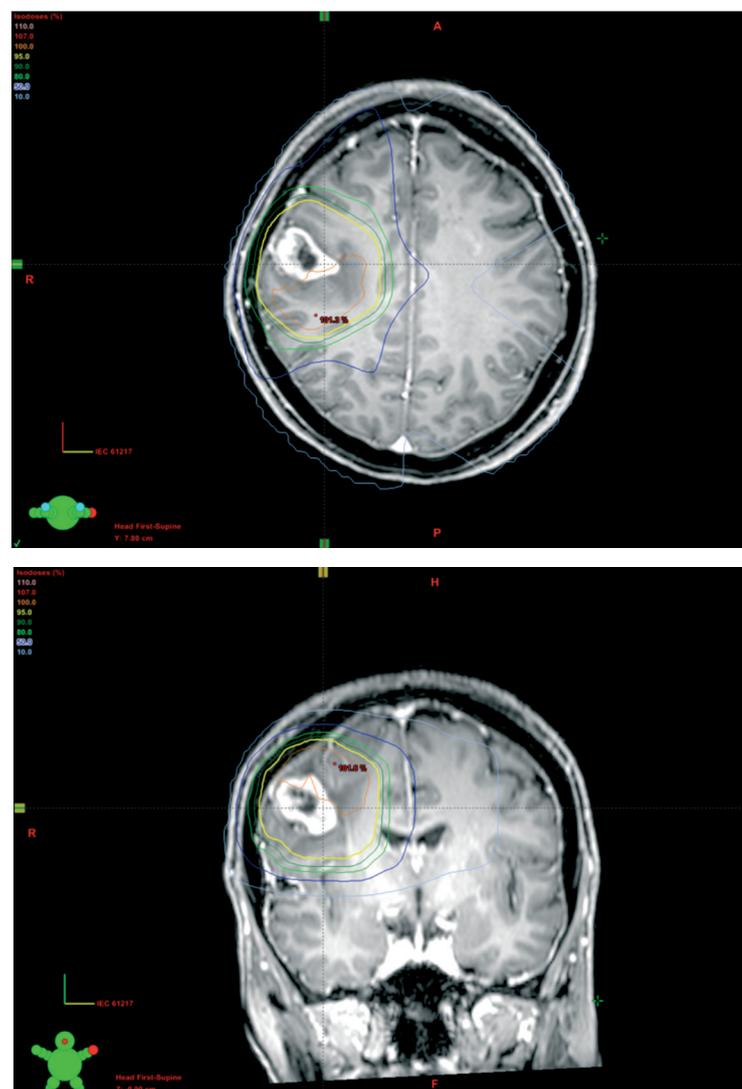


Abbildung 1:
3-D-Bestrahlungsplan mit
Isodosenverteilung bei
rechtsseitigem GBM

Das individuell definierte zu bestrahlende Zielvolumen schließt den sichtbaren Tumor, das perifokale Ödem und einen Sicherheitssaum mit ein.

Quelle: Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. M. Kocher, Universitätsklinikum Köln

Es wird eine Gesamtdosis von 60 Gy mit täglicher Fraktionierung von 2 Gy appliziert. Dosisescalationen darüber hinaus ergeben keine Verbesserung der Prognose.⁴

Die Chemotherapie spielte lange Zeit eine untergeordnete Rolle in klinischen Behandlungsschemata. Bis heute gibt es mit zusätzlichem Einsatz von Temozolomid nur ein einziges Therapieregime, das einen Vorteil in der Gesamtüberlebensrate (OS) zeigt.²

GBM-ZELLINIEN ZUR CHARAKTERISIERUNG RELEVANTER SIGNALWEGE

Zur ursächlichen Untersuchung von Resistenzmechanismen eignen sich GBM-Zelllinien, die sich durch eine genetische Gemeinsamkeit auszeichnen, nämlich eine Loss-of-Function-Mutation im PTEN-Gen. Der Tumorsuppressor PTEN ist ein wichtiger funktioneller Antagonist des PI3K/AKT-Survival-Signalweges. Dieser Signalweg ist ein komplexes mehrarmiges Netzwerk, welches das Überleben der Zelle, ihre Proliferation, den Glukosemetabolismus sowie die Angiogenese steuert.⁹ Die Vermeidung der Apoptose durch eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges wurde bereits in vielen intrinsisch arzneimittelresistenten Tumoren beobachtet.¹⁰ In humanen GBM-Zellen ist in wenigstens 60 Prozent das PTEN-Gen als funktioneller Antagonist einer PI3K-Phosphorylierung mutiert, was zur Aktivierung des Signalweges führt.¹¹ Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des PI3K-Signalweges mit einer ungünstigen klinischen Prognose einhergeht.¹² Ergebnisse einer Reihe von Publikationen aus den letzten zehn Jahren lassen vermuten, dass die Hemmung des PI3K/AKT-Signalweges die erworbene Multimedikamentenresistenz in vielen humanen Tumoren überwinden kann (zusammengefasst in Jia et al.)¹³.

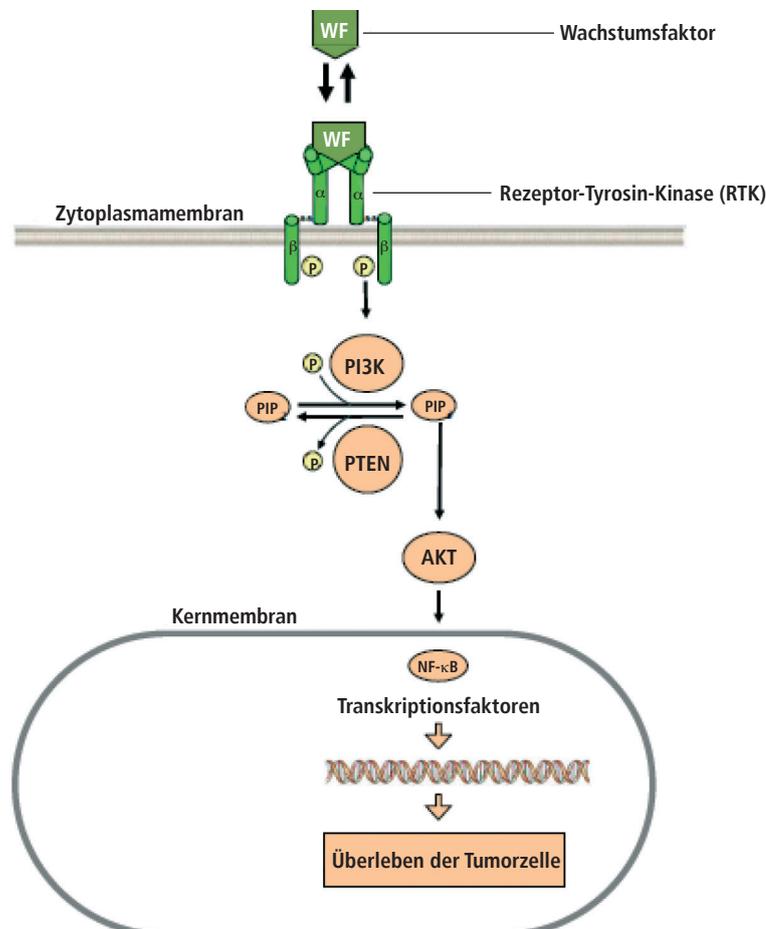


Abbildung 2:
Schematische Darstellung
des PI3K/AKT-Signalwegs in
Glioblastomzellen

Quelle: N. Eckstein (BfArM)

2008 untersuchte ein internationales, multizentrisches Forscherkonsortium das komplette Genom von 206 Glioblastom-Biopsaten hinsichtlich Amplifikationen, Genexpression und DNA-Methylierung, um die zentralen Signalwege in GBM-Zellen zu identifizieren. Die Forscher fanden drei entscheidende Signalwege, die zur Onkogenese von Glioblastomen beitragen: (1) die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), (2) die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 und (3) die Inaktivierung des Tumorsuppressors Retinoblastom (RB).¹⁴ Jede Probe, die untersucht wurde, hatte zumindest eine Mutation in einem der drei Signalwege; 74 Prozent wiesen sogar in allen drei Signalwegen Alterationen auf. Hieraus kann geschlossen werden, dass die genannten Signalwege entscheidend an der Tumorgenese des Glioblastoms beteiligt sind. Die Befunde erklären zudem, warum GBM-Zellen intrinsisch chemoresistent sind: Sowohl eine Aktivierung von RTK als auch eine Inaktivierung von p53 und/oder RB führen zu einer Hemmung der Apoptose. Theoretisch könnte man annehmen, dass eine Hemmung von RTK (wie beispielsweise beim HER-2-positiven Mammakarzinom) die Chemoresistenz im Glioblastom überwinden sollte. Allerdings sind GBM-Zellen typischerweise dadurch charakterisiert, dass multiple RTK an ihrer Oberfläche aktiviert/überexprimiert sind. Der Flaschenhals, durch den alle diese Signale müssen, ist jedoch der PI3K/AKT-Signalweg. Dementsprechend ist der PI3K/AKT-Signalweg ein vielversprechendes Ziel für innovative medikamentöse Therapien mit dem Potenzial, synergistisch mit einer begleitenden Chemotherapie zu wirken.¹⁵ Eine schematische Übersicht gibt die Abbildung 2.

Im Laufe der letzten Jahre wurden viele Transkriptionsfaktoren, Onkogene und Tumorsuppressorgene in Glioblastomzelllinien untersucht. Dabei ist vor allem Zeit die DNA-Hypermethylierung in den Mittelpunkt der Untersuchungen gerückt. Beispielsweise wurde als ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung eines Glioblastoms der Verlust des Transkriptionsfaktors GATA4 durch die Hypermethylierung seines Promotors identifiziert.¹⁶ Diese Prozesse sind allerdings upstream und interagieren nicht direkt mit einer pharmakologischen Hemmung des PI3K/AKT-Signalweges downstream.

VORLÄUFIGE ERGEBNISSE AUS LAUFENDEN PROJEKTEN AM BFARM

In laufenden Projekten am BfArM wurden Daten mit dem Fokus auf der Resistenz der zwei GBM-Zelllinien U87 und U251 gegenüber Cisplatin erhoben.

Beide Zelllinien sind durch eine PTEN-Loss-of-Function-Mutation gekennzeichnet. Dies legt den Schluss nahe, dass der funktionelle Gegenspieler, der PI3K/AKT-Signalweg, intrinsisch aktiviert vorliegt und für die Resistenz verantwortlich ist. Dies sollte überprüft werden.

Die bisherigen Ergebnisse wurden im Rahmen einer Reihenuntersuchung mit dem Hauptaugenmerk auf der Cisplatinresistenz erhoben. Cisplatin gehört wie Temozolomid zur Gruppe der Alkylanzien, hat aber in der klinischen Behandlung von Glioblastomen keine Bedeutung, sodass diese Daten zwar eine geeignete Grundlage für laufende Projekte bilden, für sich allein jedoch von begrenztem Wert sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Mechanismen einer Resistenz von Cisplatin und Temozolomid auf molekularer Ebene ähnlich sind.

Im Rahmen der Cisplatinexperimente wurde eine grundlegende Charakterisierung der Zellen hinsichtlich des Proteoms, Phosphoproteoms und Sekretoms vorgenommen. Zudem wurden zellfunktionelle Experimente durchgeführt. In MTT-Assays wurde der EC50-Wert von Cisplatin (LD50 in vitro) bestimmt. Dann wurden mit pharmakologischen Experimentalsubstanzen spezielle Proteine von onkogenetisch wichtigen Signalwegen der Zelle ausgeschaltet und ihr Einfluss auf den EC50 der Cisplatin-Dosis-Wirkungskurve bestimmt. Die Ergebnisse des MTT-Assays sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

REFERENZEN

1. Siegel R et al.: Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin. 2014;64:9-29
2. Stupp R et al.: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):987-996
3. Furnari FB et al.: Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev. 2007;21(21):2683-2710
4. Engenhardt-Cabillic R et al.: Zentrales Nervensystem und Sinnesorgane. In: Wannenmacher M et al. (Hrsg): Strahlentherapie. 2. Aufl. 373-430. Springer Verlag GmbH, Berlin/Heidelberg 2013
5. Zhu Y et al.: The molecular and genetic basis of neurological tumours. Nat Rev Cancer. 2002;2(8):616-626
6. Gottesman MM et al.: Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer. 2002;2(1):48-58
7. Ishii N et al.: Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. Brain Pathol. 1999;9(3):469-479
8. van Rij CM et al.: Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme. Pharm World Sci. 2005;27(2):92-95
9. Tokunaga E et al.: Deregulation of the Akt pathway in human cancer. Curr Cancer Drug Targets. 2008;8(1):27-36
10. Vivanco I et al.: The phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002;2(7):489-501
11. Dhandapani KM et al.: Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. J Neurochem. 2007;102(2):522-538
12. Chakravarti A et al.: The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. J Clin Oncol. 2004;22(10):1926-1933
13. Jia J et al.: Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(2):111-128
14. Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive genomic

		Cisplatin IC50 [µM]	
Inhibitor	Funktion	U87	U251
unbehandelt	Kontrolle	9,5	9,8
Erlotinib	EGFR-Inhibitor	10,2	12,1
AG1024	IGF 1R-Inhibitor	9,3	7,6
AG1296	PDGF Rβ-Inhibitor	7,4	9,4
LY294002	PI3K-Inhibitor	4,0*	3,2*
Wortmannin	PI3K-Inhibitor	3,7*	3,0*

Tabelle:

Einfluss von Proteinen, die auf onkogenetisch wichtige Signalwege wirken, auf die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) von Cisplatin bei den Zelllinien U87 und U251. Die Konzentrationen der Inhibitoren waren: 3 µM Erlotinib, 1 µM AG1024, 10 ng/ml AG1296, 5 µM LY294002 und 30 nM Wortmannin. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) von Cisplatin wurde vorher in MTT-Assays bestimmt (n=3, Student's t test, *p<0,05).

Intrinsisch medikamentenresistente GBM-Zellen zeichnen sich durch die Phosphorylierung und Aktivierung von multiplen RTK aus. Diese aktivierten RTK vermitteln die Resistenz durch eine nachgeschaltete Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. Die systematische Hemmung der Signalwege zeigt, dass die AKT-Kinase der entscheidende Faktor der Resistenzlösung ist. Die Hemmung der AKT-Kinase sensibilisiert die Tumorzellen gegenüber Cisplatin, während die Hemmung der RTK keinen Einfluss auf den Resistenzgrad hat.

Die laufenden Projekte haben den Schwerpunkt, das Proteom, Phosphoproteom und Transkriptom der beiden PTEN-mutierten GBM Zelllinien im unbehandelten und im Temozolomid-behandelten Zustand vergleichend zu untersuchen. Diese Omics-basierten Vergleiche bilden eine breite Basis zur Identifikation von dysregulierten Signalwegen, die in weiteren Experimenten aufgeklärt werden sollen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die postoperative Standardtherapie des GBM ist eine Kombination aus Radiochemotherapie mit oraler Einnahme des Alkylanz Temozolomid gefolgt von sechs Zyklen adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid. Sie bewirkt eine Verlängerung des Gesamtüberlebens um etwa drei Monate. Die Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen die eingesetzten Wirkstoffe stellt ein wesentliches Problem dar. Ziel der Projekte ist es, Wege zu einer Chemosensibilisierung des GBM in vitro und ex vivo aufzuzeigen.

characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature. 2008;455(7216):1061-1068

15. Hennessy BT et al.: Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(12):988-1004

16. Agnihotri S et al.: (2011) A GATA4-regulated tumor suppressor network represses formation of malignant human astrocytomas. J Exp Med. 2011;208(4): 689-702