Beeinflussung des EGF-Rezeptors durch eine zytostatische Behandlung

C.		Marth
T.		Lang
G.		Daxenbichler

Univers.-Klinik f. Frauenheilk. Innsbruck (Vorst.: Prof. Dr. O Dapunt)

Dr. C. Marth, Univ.-Klinik für Frauenheilkunde, Anichstraße 35, A-6020 Innsbruck

Eine wesentliche Eigenschaft von malignen Tumoren ist das autonome Wachstum, das vor allem durch die Aktivierung von Onkogenen ermöglicht wird. Beim Ovarialkarzinom stellt die verstärkte Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren HER-1 (EGF-Rezeptor) und HER-2 (erbB-2/neu) einen bedeutsamen prognostischen Parameter dar und könnte die Grundlage für das akzelerierte Wachstum bilden. Wir konnten kürzlich nachweisen, daß das Onkogen HER-2 unter direkter Regulation von Interferon-gamma steht. Der EGF-R wird von manchen Autoren jedoch als das bedeutsamere System in der Wachstumssteuerung von malignen Ovarialtumoren erachtet. Neben dem EGF selbst binden aber auch andere Substanzen wie z. B. der Transformierende Wachstumsfaktor-alpha (TGF-alpha) am EGF-R und stimulieren über die Aktivierung der Tyrosinkinase die Proliferation. Ein hoher Prozentsatz von Ovarialkarzinomen produzieren TGF-alpha und exprimieren auch den hierzu assoziierten EGF-R. Damit bildet die Tumorzelle eine sogenannte autokrine Schleife womit sie sich selbst einen wirksamen Wachstumsstimulus setzt. Eine Beeinflussung dieses Regelkreises könnte, wie am Beispiel des Mammakarzinoms und der Antiöstrogentherapie gezeigt werden könnte, Grundlage einer effizienten Therapie bilden. Wir stellten uns daher die Frage, welche Faktoren in die Regulation dieses Wachstumsfaktorrezeptors eingreifen und haben uns dabei vor allem mit relevanten Zytostatika beschäftigt.

Als Modell dient die Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3, gezüchtet als Monolayer in Minimum Essential Medium zu 10% Zusatz an fötalem Kälberserum. Die Tumorzellen wurden entweder für 2 Stunden oder kontinuierlich dem Zytostatikum ausgesetzt. Dabei wurden die folgenden Substanzen eingesetzt: Cisplatin (CDDP, 10 µM), 4-Epidoxorubicin (EPI, 0,5 µM), Etoposid (VP-16, 5 µg/ml), Actinomycin D (ACT-D, 0,5 µg), Hydroxy-Harnstoff (OH-urea, 20 mM), Cycloheximide (CHX, 5 µg/ml), 4-Hydroxy-Tamoxifen (OHT, 1 µM) und Interferon-gamma (IFN-gamma, 10 ng/ml). Nach 3 Tagen bestimmten wir die Anzahl der Zellen und EGF-R Moleküle pro Zelle mittels einem Bindungsassay. Dabei wurde eine Konzentration von ¹²⁵I-EGF mit steigenden Konzentrationen an kaltem EGF inkubiert. Die Affinität des EGF-R (KD) und Anzahl Bindungsstellen wurden mittels des Programmes „Ligand“ errechnet. Für Verlaufskontrollen wurden Einzelpunktbestimmungen durchgeführt.

An den OVCAR-3 Ovarialkarzinomzellen konnten wir 98000 ± 15000 EGF-R Moleküle pro Zelle nachweisen. Die Analyse nach Scatchard wies auf eine Bindungsstelle mit hoher Affinität (KD 0,2 nM) hin wobei die von manchen Autoren beschriebenen EGF-R mit niedriger Affinität und hoher Kapazität nicht beobachtet werden konnten.

Eine Behandlung der Tumorzellen mit CCDP führte dosisabhängig sowohl bei Kurz-(2 Stunden) als auch Dauerinkubation mit dem Zytostatikum zu einer Hemmung der

Freie Vorträge (Grundlagenorientierte klinische Forschung) 374

Proliferation. Im Gegensatz zu den Effekten auf das Wachstum induzierte CDDP an OVCAR-3 Zellen lediglich nach Kurzinkubation die EGF-R Moleküle an der Zelloberfläche um $178\% \pm 25\%$. An den Dauerbehandelten OVCAR-3 war keine signifikante Beeinflussung der EGF-R-Konzentration zu bemerken. Auch die VP-16 und EPI wurde nach einer Inkubation von 2 Stunden sowohl eine signifikante Induktion des EGF-R ($131\% \pm 9\%$ bzw. $179\% \pm 15\%$) als auch Hemmung der Proliferation beobachtet. Das hochpotente Antiöstrogen OHT beeinflusste weder das Wachstum noch die Anzahl der EGF-Bindungsstellen. Interferone und insbesondere das IFN-gamma supprimieren die Expression des Onkogens HER-2, das eine weitgehende Homologie mit dem FIER-1, dem EGF-R, aufweist. Bei Ovarialkarzinomzellen wird vermutet, daß die Beeinflussung dieses Wachstumsfaktorrezeptors die Hemmung der Proliferation vermitteln könnte. Im Gegensatz zum HER-2 beeinflusste jedoch das IFN-gamma den EGF-R nicht. Dies ist umso mehr interessant als diese beiden Gene sowohl in ihrer Struktur als auch Promotersequenz große Ähnlichkeit aufweisen. Eine bessere Aufklärung dieser divergenten Ergebnisse wird derzeit an unserer Klinik mit molekularbiologischen Methoden betrieben. Um den Mechanismus der Zytostatika-induzierten Modulation des EGF-R zu verstehen haben wir die Zellen mit spezifischen Hemmsubstanzen für die DNA- (OH-urea), RNA- (ACT-D) und Proteinbiosynthese (CHX) inkubiert. Während wir bei Behandlung mit OH-urea ebenfalls eine Vermehrung der EGF Bindungsstellen bemerken konnten (157%), führte die Hemmung der RNA- und Proteinbiosynthese zu deren Abnahme (41% bzw. 73%).

Diese Ergebnisse erlauben die Hypothese

daß die Ovarialkarzinomzelle auf einen Angriff auf zentrale Prozesse der Wachstumsregulation nämlich der DNA-Synthese und Replikation mit einer gesteigerten EGF-R-Präsentation beantworten. Diese Reaktion könnte einen Versuch darstellen der Wachstumshemmung entgegenzuwirken und zu entkommen. Eine Blockierung der RNA- und Proteinbiosynthese verhindert diese potentielle Gegenreaktion der Tumorzelle. Weitere Untersuchungen sollen nun die funktionelle Bedeutung und somit klinische Relevanz unserer Ergebnisse beleuchten. Die verstärkte EGF-R Expression könnte als Reaktion auf eine Zytostatikatherapie auftreten und auf eine Resistenzentwicklung hinweisen. Somit wäre diese Steigerung in der Wachstumsfaktorrezeptor Biosynthese auch eine mögliche Erklärung für die schlechte Prognose dieser Patientinnen.