

Chuli Fu
Dr. med

Preclinical Evaluation of the HDACi Romidepsin in combination with Cisplatin as a novel therapy for osteosarcoma

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Andreas Kulozik, PhD

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit lokalisiertem Osteosarkom hat sich nach der Einführung der Polychemotherapie in Kombination mit einer suffizienten lokalen chirurgischen Behandlung deutlich verbessert. Über die letzten 40 Jahre hat sich jedoch kein signifikanter Fortschritt in den Überlebensraten beim Osteosarkom erreichen lassen. Insbesondere zeigen die derzeitigen Behandlungsstrategien insbesondere eine begrenzte Wirksamkeit bei der Behandlung von metastasiertem und rezidiviertem Osteosarkom mit einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 20%. Daher ist die Entwicklung neuer systemischer Therapeutika dringend erforderlich.

Romidepsin wurde für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen. Es bindet an Histondeacetylasen (HDAC) und hemmt diese, was zu globalen Veränderungen der Genexpression und zur Induktion von Zellzyklusarrest, Apoptose und Proliferationshemmung führt. Daher wurde in dieser Studie der HDACi Romidepsin verwendet um in Kombination mit dem DNA-schädigenden und in der Standardtherapie verwendeten Zytostatikum Cisplatin den Effekt auf das klonogene Zellüberleben, die Apoptose, die DNA-Schädigung und das Fortschreiten des Zellzyklus in Osteosarkomzellen zu untersuchen.

Die antiproliferative und zytotoxische Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Romidepsin und Cisplatin wurde zunächst mittels des "clonogenic survival assays" bestimmt. Die Vorbehandlung von Osteosarkomzellen mit Romidepsin für 4 Stunden vor der parallelen Behandlung mit Cisplatin verringerte das klonogene Überleben in

dosisabhängiger Weise signifikant verglichen mit der Behandlung von Zellen mit Cisplatin 6 Stunden vor Romidepsin. Um neben dem antiproliferativen und zytotoxischen Effekt nach weiteren schädigenden Mechanismen zu suchen führte ich Western-Blot-Tests zum Nachweis von cleaved Caspase 3 und PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) als Apoptosemarker durch. Die Ergebnisse zeigten, dass die Spaltung von Caspase 3 und PARP nach einer Romidepsin -Behandlung verglichen mit DMSO behandelten Negativkontrollen leicht zunahm. Allerdings zeigte sich nach der Kombination von Romidepsin und Cisplatin im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen eine erhebliche Hochregulation gespaltener Caspase 3 und PARP . Um festzustellen, ob das Ausmaß der Apoptose auf DNA-Schäden zurückzuführen war, untersuchte ich mittels Western blots die Phosphorylierung von H2AX, einem etablierten Marker für DNA-Doppelstrang-Schäden. Nach einer Vorbehandlung mit Romidepsin für 4 Stunden vor der Behandlung mit Cisplatin zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation eine höhere pH2AX-Expression als in mit DMSO behandelten Negativkontrollen oder nach der Behandlung mit einer Substanz allein.

Um einen Zusammenhang zwischen dem verminderten klonogenen Überleben, Romidepsin und Cisplatin verursachten DNA-Schäden und einem Stillstand des Zellzyklus zu beurteilen wurde die Zellzahl prozentual mittels einer FACS-Analyse in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus bestimmt. Cisplatin induzierte die Akkumulation von Zellen in der S-Phase und der Prozentsatz der Zellen in der G2/M-Phase stieg nach einer Romidepsin-Behandlung drastisch. Zusätzlich zeigte die Kombinationsbehandlung einen signifikanten Anstieg der Zellen in G2/M-Zellen im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die sequentielle Behandlung von Osteosarkomzellen mit Romidepsin vor Cisplatin eine signifikante Wirkungssteigerung gegenüber einer alleinigen Cisplatintherapie darstellt. Dieses

Therapieschema könnte einen potenziellen klinischen Fortschritt in der Behandlung des Osteosarkoms darstellen.