



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des Urokinase-Rezeptors (u-PAR) in kolorektalen Karzinomen und deren Eingliederung in ein molekulares Stagingkonzept

Autor: Gabriele Maurer
Institut / Klinik: Chirurgische Klinik
Doktormutter: Prof. Dr. H. Allgayer, PhD

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Malignome in den westlichen Ländern. Dennoch existieren bisher kaum präzise, biologisch-funktionelle Prognoseparameter, die schon zu einem sehr frühen Follow-up-Zeitpunkt die individuelle Prognose des einzelnen Patienten vorherzusagen vermögen. Der Urokinase-Rezeptor (u-PAR, CD87), ein stark glykosyliertes Protein von 55-60 kDa, das über einen Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker an der Zellmembran befestigt ist, ist ein mit Invasion und Metastasierung assoziiertes Molekül mit negativer prognostischer Relevanz in einer Vielzahl menschlicher Tumoren.

Durch Bindung des Liganden u-PA an u-PAR kommt es zur Degradierung verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix und – unabhängig von der proteolytischen Aktivität des u-PA – zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Eine erhöhte u-PAR-Expression in Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom lässt sich in erster Linie auf eine verstärkte Transkription zurückführen. Zwei für die Induktion der *u-PAR*-Expression sehr wichtige Promotorregionen befinden sich bei -190/-171 und bei -152/-135 (Basenpaare relativ zum Transkriptionsstartpunkt) und werden durch Mitglieder der AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie bzw. durch Sp1, Sp3 und einen AP-2 α -ähnlichen Faktor gebunden. *In vitro*-Vorarbeiten wiesen eine u-PAR-Hochregulation durch die zytoplasmatische Tyrosinkinase Src, vermittelt über das -152/-135-Motiv, sowie durch K-Ras, hier über die Region -190/-171, nach.

In dieser ersten umfangreicheren prognostischen Studie wurden diese u-PAR-regulierenden Transkriptionsfaktoren und Signalwege auf ihre *in vivo*-Relevanz hin untersucht. Es wurde überprüft, ob Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgeweben bzgl. der Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an spezifische *u-PAR*-Promotorelemente und bzgl. dazu führender Signalwege als frühe Risikoprädiktoren dienen könnten; ferner, ob sie sich zur Definition neuer prognostischer Sub- und Risikogruppen eignen. Bei 92 Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden Gewebe des Primärtumors und eine Probe aus zugehöriger Normalmukosa hinsichtlich Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3 und des AP-2 α -ähnlichen Faktors an die Region -152/-135 sowie von AP-1 an die Region -190/-171 des *u-PAR*-Promotors, zusätzlich hinsichtlich der Existenz von *K-ras*-Mutationen, Src-Aktivität und u-PAR-Proteinmenge analysiert. Dafür wurden u.a. EMSA-Analysen, Kinase-Assays, Western Blot-, ELISA- sowie PCR-Untersuchungen durchgeführt und die entsprechenden Protokolle zum Teil für die Gewebesituation optimiert.

Tumorgewebe wiesen signifikant mehr u-PAR auf als die entsprechenden Normalmukosae, zudem eine höhere Src-Aktivität und -Proteinmenge ($p < 0,001$, $p = 0,013$ und $p < 0,001$). Die Bindung von AP-1 an das Element -190/-171 und des AP-2 α -ähnlichen Faktors an -152/-135 war in den Tumoren signifikant stärker als in den Normalgeweben ($p < 0,001$ und $p = 0,007$). Anhand der Transkriptionsfaktorbindung an die untersuchten spezifischen *u-PAR*-Promotorelemente ließen sich bereits nach relativ kurzer Nachbeobachtungszeit (Median 26,3 Monate) prognostische Risikogruppen abgrenzen. Kaplan-Meier-Analysen zeigten ein signifikant kürzeres tumorspezifisches Überleben bei erhöhter Bindung von Sp1 und Sp3 wie auch von Sp1/AP-2 α und Sp1/AP-1 ($p = 0,002$, $p = 0,006$, $p = 0,010$ und $p = 0,005$). Insbesondere die Kombination aus einer erhöhten Sp1-Bindung an das Element -152/-135 und erhöhtem Src-Protein war in uni- und multivariaten Analysen mit schlechterem Überleben und kürzerem rezidivfreien Intervall verbunden (univariat $p < 0,001$ und $p = 0,016$; multivariat $p = 0,025$, Hazard Ratio 4,229 und $p = 0,021$, Hazard Ratio 6,507). Das prognostische Risiko nahm ferner mit steigender Anzahl an *u-PAR* gebundener Transkriptionsfaktoren zu. In CART-Analysen wurden, basierend auf diesen Ergebnissen, erste molekular erweiterte Staging-Modelle berechnet. Gerade innerhalb der klinisch vermeintlich günstigen Prognosegruppe der kurativ

resezierten Patienten ließen sich mit dem Nachweis der tumorspezifischen Bindung von Sp1 an den *u-PAR*-Promotor neue Risikopatienten definieren, deren Überlebenswahrscheinlichkeit fast so ungünstig war wie die nicht kurativ resezierter Patienten – zu einem Zeitpunkt, zu dem u-PAR selbst noch keine prognostische Aussage lieferte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch die *in vivo*-Bestimmung transkriptionell aktivierender Faktoren des invasionsassoziierten Gens *u-PAR* möglich ist, bereits zu einem frühen Nachbeobachtungszeitpunkt Risikopatienten zu identifizieren. Inwiefern therapeutische Konzepte bei solchen Patientengruppen neu überdacht werden und Studien mit hier angreifenden Behandlungsstrategien im Sinne einer „targeted therapy“ initiiert werden sollten, könnte nach weiterführenden Untersuchungen diskutiert werden.