

Eva Paul, geborene Gingerich

Dr. med.

Die Bedeutung von Gewebsinhibitoren von Metalloproteinasen kolorektaler Lebermetastasen

Geboren am 03.03.1981 in Bretten

Staatsexamen am 18.11.2009 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Karsten Brand

Maligne Tumorerkrankungen sind nach Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache bei beiden Geschlechtern in Deutschland. Die Mortalität von Tumorpatienten wird derzeit immer noch maßgeblich von der Metastasierung des Primärtumors bestimmt. Das Kolorektale Karzinom stellt die zweithäufigste Krebserkrankung und Krebstodesursache dar. Die meisten Patienten versterben nicht am Primärtumor selbst, sondern an den Komplikationen der Metastasierung. Der Prozess der Metastasierung beinhaltet das Loslösen der Tumorzellen aus dem Tumorverband, deren Migration durch die Extrazelluläre Matrix, die Invasion von Blut- und Lymphgefäßen, die Extravasation und anschließende Proliferation der Tumorzellen. Bereits in den achtziger Jahren wurde ein wichtiger Zusammenhang zwischen den proteolytischen Umbauprozessen der Extrazellulären Matrix und der Metastasierungsfähigkeit eines Tumors gesehen, da die Tumoren mit der höchsten Metastasierungsrate die stärkste Degradation der Extrazellulären Matrix aufzeigten. Bald darauf wurden bestimmte Proteasen für diesen Prozess verantwortlich gemacht, die so genannten Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Ab- und Umbauvorgänge der Extrazellulären Matrix sind sowohl für physiologische als auch pathologische Prozesse von größter Bedeutung. Den MMPs kommt daher eine zentrale Rolle bei der embryonalen Entwicklung, Wundheilung, Angiogenese, malignen Neubildungen, Arthritiden, Fibrose, Arteriosklerose und vielen weiteren biologischen Mechanismen zu. Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass MMPs im Hinblick auf tumoröse Prozesse weitaus größere Bedeutung haben, als die ausschließliche Matrixdegeneration. Sie werden dafür verantwortlich gemacht, über ihren Einfluss auf Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Zytokine und andere biologisch aktive Substanzen die Gewebemöostase wesentlich zu beeinflussen.

Die Inhibition der MMPs erfolgt durch deren natürlich vorkommenden Gegenregulatoren, die Gewebsinhibitoren von Metalloproteinasen, auch Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen (TIMPs) genannt. Sie verfügen aber auch über MMP-unabhängige Aufgaben. Es wurde festgestellt, dass bei tumorösen Prozessen oftmals

eine Störung des MMP/TIMP-Gleichgewichts zugunsten der Proteasen vorliegt. Dabei korrelierte eine erhöhte MMP-Expression mit der Aggressivität der Tumoren und einer schlechten Prognose der Krebspatienten. Daher sah man die Chance, durch den Einsatz von synthetischen MMP-Inhibitoren, neue Anti-Tumor-Therapeutika gewinnen zu können. Die Anwendung von synthetischen MMPs sowie die Überexpression von TIMPs mittels Gentransfer, zeigte in einigen Tierexperimenten eine viel versprechende anti-tumoröse Wirkung. In klinischen Studien, blieb der erhoffte Erfolg der MMP-Inhibitoren jedoch bisher aus. Interessanterweise zeigte sich, dass TIMPs bei tumorösen Prozessen oftmals ebenfalls wie MMPs hochreguliert sind und beim Kolorektalen Karzinom sowie weiteren Karzinomen ebenfalls negativ mit der Prognose der Patienten assoziiert sind. Für TIMP-1 und TIMP-2 ist belegt, dass beide anti-apoptotisch, angiogenesefördernd und angiogenesehemmend sowie proliferationsfördernd und proliferationshemmend wirken können. Dies zeigt, dass TIMPs sowohl tumorfördernd als auch tumorinhibierend agieren können.

Ziel dieser Dissertation war es daher, neue Erkenntnisse über die komplexe Rolle der Gewebsinhibitoren von Metalloproteinasen im Hinblick auf die Metastasierung kolorektaler Lebermetastasen zu erhalten. Im ersten Teil der Arbeit erfolgte nach der Mikrodissektion und RNA-Isolierung der Gewebeschnitte der CT 26 und LS174 Mausmodelle die Genexpressionsanalyse der jeweiligen Kompartimente im Bezug auf TIMP-1 und TIMP-2 mittels qPCR. Bei den verwendeten Mausmodellen handelt es sich um Gewebeproben der Leber von Mäusen, die nach Applikation von murinen CT 26 bzw. humanen LS174 Kolonadenokarzinomzellen Lebermetastasen entwickelten. Die Mikrodissektion wurde differenziert in die vier verschiedenen Gewebeareale Tumor, Tumorinvasionsfront, Leber und Leberinvasionsfront durchgeführt, wodurch eine isolierte Genexpressionsanalyse der einzelnen Kompartimente ermöglicht wurde. Im zweiten Teil der Arbeit wurde tierexperimentell untersucht, welchen Einfluss der Knockdown gegenüber der Überexpression von TIMP-1 in kolorektalen CT 26 Tumorzellen auf deren metastatisches Verhalten hat. Mittels Transfektion erfolgte zuvor die Herstellung eines Knockdowns, dessen TIMP-1 Genexpression wurde wie die zweier weiterer Knockdowns, der Überexpression, einer Vergleichsgruppe Scramble und unveränderter CT 26 Zellen mittels qPCR und auf Proteinebene mittels ELISA bestimmt.

Es wurde eine erhöhte TIMP-1 und TIMP-2 Genexpression in den Tumorinvasionsfronten nachgewiesen. Tierexperimentell zeigte eine erhöhte TIMP-1 Expression hingegen eine drastische Reduktion der Lebermetastasen in der Überexpressionsgruppe. Die verminderte TIMP-1 Konzentration im Knockdown resultierte im Gegensatz dazu in einer starken Zunahme des Tumorumfanges. Eine erhöhte TIMP-Konzentration in der Tumorinvasionsfront könnte somit der Aufrechterhaltung einer Balance zwischen MMPs und TIMPs dienen, um dadurch ein möglichst physiologisches Wachstum des Tumors zu gewährleisten. Im Tierexperiment wurde diese Balance in zwei Extreme verschoben. Der in der Überexpressionsgruppe gesehene Anti-Tumoreffekt einer vermehrten TIMP-1 Konzentration, könnte auf die

anti-tumorösen Eigenschaften von TIMP-1 zurückzuführen sein. Das starke Wachstum des Knockdowns, könnte an einer uneingeschränkten MMP-Aktivität aufgrund der verminderten TIMP-1 Konzentration liegen. Eine gestörte Balance würde somit das metastatische Tumorwachstum zwar nicht verhindern, aber evtl. langfristig gesehen aufgrund eines unphysiologischen Wachstums Einfluss auf dessen Mikroarchitektur und Blutversorgung nehmen. Um die Aufgabe der TIMPs hinsichtlich der tumorösen Gewebeeinfiltration ausreichend klären zu können, bedarf es weiterer Studien, die unter anderem diesen histologischen Aspekt berücksichtigen. Der Einsatz von TIMPs als potentielle Anti-Tumor-Therapeutika scheint weiterhin viel versprechend, muss allerdings die tumorfördernden Eigenschaften der TIMPs berücksichtigen.

