

DKFZ

Maria Zhivkova-Galunska
Dr. sc. hum.

Identifizierung von Genen, die beim Pankreaskarzinom eine Rolle spielen, ihre Modulation und therapeutische Anwendung

Geboren am 11.03.1979 in Sofia, Bulgarien
Staatsexamen in Pharmazie am 17.12.2003 an der Medizinischen Universität, Sofia, Bulgarien

Promotionsfach: Toxikologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. M. R. Berger

Die Expression der extrazellulären Matrixproteine OPN und ON, die in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms diskutiert werden, ihres Transkriptionsfaktors HOXC8, der Metalloproteinasen MMP2, 3 und 9, sowie der Signaltransduktionsproteine ERK und P38 wurde in Pankreaskarzinom Zelllinien des Menschen und der Ratte untersucht. Es zeigte sich, dass OPN bei 8 und ON bei 7 von 14 humanen Zelllinien exprimiert war. Mit der Expression von OPN war die des Transkriptionsfaktors HOXC8 negativ korreliert ($p=0,005$), während die Expressionen von ON und HOXC8 eine direkte Korrelation aufwiesen ($p=0,03$). Eine deutliche Expression von OPN war mit dem Wachstum der jeweiligen Zelllinien in der Leber von Nacktratten korreliert ($p=0,001$), während die von ON und HOXC8 mit diesem Parameter negativ assoziiert war ($p=0,10$ und $p=0,002$). ERK und P38 ließen sich in allen Zelllinien nachweisen, aber mit unterschiedlichem Expressionsniveau. Das Verhältnis von P38 zu ERK (jeweils phosphorylierte zu nicht phosphorylierten Formen) war ebenfalls assoziiert mit dem Anwachsen von Pankreaskarzinom Zelllinien in der Leber von Nacktratten. Ein hohes Verhältnis von pP38 zu P38 und ein niedriges Verhältnis von pERK zu ERK waren negativ korreliert mit diesem Parameter. Umgekehrt waren niedrige Relationen von pP38 zu p38 verbunden mit hohen Relationen von pERK zu ERK korreliert mit Wachstum der betreffenden Pankreaskarzinom Zellen in der Leber von Nacktratten ($p=0,02$ für die 12 untersuchten humanen Pankreaskarzinom Zelllinien).

Im Folgeschritt wurde untersucht, welche Konsequenzen die verminderte Expression von OPN, ON und HOXC8 hatte bzw. die erhöhte Konzentration von OPN und ON. Knockdown von OPN mit spezifischen ASOs in AsML und Suit2-007 Zellen verminderte deren Wachstum. Die ON-Downregulation durch ein Antisenseoligonukleotid war dagegen mit erhöhter Proliferation im Vergleich zur Nonsense-Kontrolle in Suit2-007 Zellen assoziiert.

Darüber hinaus zeigte die Behandlung mit rekombinantem ON eine starke antiproliferative Wirkung *in vitro*. Eine verminderte HOXC8 Expression mittels RNA Interferenz verursachte erhöhte Proliferation, Koloniebildung und Migration von Suit2-007 Zellen. Dazu wurde der Einfluss dieser Downregulation auf die OPN und ON Expression der Suit2-007 Zellen untersucht. Während die hohe OPN Expression nicht weiter stimuliert werden konnte, war der Knockdown von HOXC8 auch mit einer Verminderung der ON mRNA Expression assoziiert. Ein weiterer Hinweis auf die Regulation von ON durch HOXC8 kam von der Stimulation der HOXC8 mRNA Expression nach Downregulation von ON mRNA (mit ASO-ON) in Suit2-007 Zellen. Die direkte Relation zwischen HOXC8 und ON mRNA Expression in den humanen Pankreaskarzinom Zelllinien, sowie ihre gegenseitige Regulation unterstützt die Hypothese, dass HOXC8 mit der antitumorigenen Rolle von ON assoziiert ist bzw. ON ein Teil des Wirkungsmechanismus von HOXC8 ist.

Darüber hinaus wurden OPN und ON an einem für diesen Zweck etablierten *in vitro* Modell von kokultivierten Tumorzellen und Hepatozyten untersucht. Das Ziel dieses Kokulturmodells war es, die spezifischen Bedingungen der Leber für die metastasierten Tumorzellen *in vitro* nachzuahmen. Dadurch konnten Veränderungen der Genexpression, die als Folge der Wechselwirkungen zwischen Pankreaskarzinom- und Leberzellen stattfinden, beobachtet werden. Dabei wurde eine deutlich stimulierte OPN Expression in AsML und Suit2-007 Zellen unter dem Einfluss von kokultivierten Hepatozyten nachgewiesen. Eine signifikante Veränderung der ON mRNA wurde nicht festgestellt.

Schließlich wurde die Zelllinienbank verwendet, um ein stabiles Lebermetastasen-modell des Pankreaskarzinoms in der Ratte zu entwickeln und Therapieansätze *in vivo* zu untersuchen. Dabei wurden drei *in vivo* Modelle mit verschiedenen Eigenschaften etabliert. In zwei von ihnen wurde die *in vivo* ASO-OPN Wirkung allein oder in Kombination mit Cilengitide untersucht. Jedoch konnte kein signifikanter Effekt festgestellt werden, was sowohl auf aggressivem Wachstum der Tumorzellen und den malignen Eigenschaften des Pankreaskarzinoms, als auch auf pharmakokinetischen Eigenschaften der Therapeutika basieren kann.

Eine Überexpression von HOXC8 mRNA wurde in menschlichen Pankreaskarzinomproben im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe gefunden. Das HOXC8 Protein wurde in der umgebenden EZM, einschließlich Fibroblasten und Endothelzellen, sowie in den die Metastasen umgebenden Geweben detektiert, während die Tumore selbst negativ waren. Diese Befunde zusammen mit der negativen Korrelation von HOXC8 mit dem Wachstum der Zelllinien *in vivo*, der Steigerung der Proliferation, Koloniebildung und Migration der

Tumorzellen nach Verminderung der HOXC8 Expression *in vitro*, sowie die Regulation der ON Expression lassen eine präventive Rolle von HOXC8 beim Pankreaskarzinom vermuten.