

Miriam Elisabeth Uhlmann
Dr. med.

Untersuchungen zur Wertigkeit von Osteopontin beim kolorektalen Karzinom, als therapeutischer Angriffspunkt im Rattenmodell und als Prognosefaktor bei Patienten

Institut: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Prof. Dr. med. Martin R. Berger

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung von Osteopontin beim kolorektalen Karzinom, einem wichtigen Faktor der Tumorprogression und Metastasierung. In einem Ratten-Lebermetastasenmodell sollte die Translation von Osteopontin mittels Antisense-Oligonukleotiden gehemmt werden, um eine Reduktion der intrahepatischen Metastasenbildung zu bewirken. In einem zweiten Teil wurde die Expression von Osteopontin und drei weiteren prometastatischen Genen, sowie deren prognostische Bedeutung bei Patienten mit kolorektalem Karzinom evaluiert.

Die Wirksamkeit des Antisense-Oligonukleotids gegen Osteopontin wurde zunächst an CC531^{lacZ} Zellen in vitro getestet und bewirkte in der höchsten eingesetzten Dosis (10µg/ml) eine mäßige Reduktion detektierter Osteopontin mRNA und Proteinmengen, sowie eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation um 53% (p<0,001). Beim anschließenden in vivo Versuch wurden 4×10^6 CC531^{lacZ} Zellen über den Pfortaderkreislauf in die Leber von Ratten eingeschwemmt und damit die Bildung von hepatischen Metastasen ausgelöst. Den Tieren wurde direkt im Anschluss an die Tumorzell-Inokulation eine osmotische Minipumpe implantiert, über die Antisense-, Sense-, oder Nonsense-Oligonukleotide in verschiedenen Konzentrationen appliziert wurden. Die Antisense-Therapie zeigte zwei Wochen nach CC531^{lacZ} -Inokulation einen signifikanten antiproliferativen Effekt (>80% Reduktion) und eine Translationshemmung von Osteopontin auf Proteinebene. Eine Woche nach Therapieende zeigte sich hingegen kein bzw. ein „Rebound“- Effekt der ASO^{opn} Therapie, mit einer maximal auf 177% der Kontrolle gesteigerten Proliferation.

Sowohl in vitro, als auch in vivo wurde die Wirkung des ASO^{opn} von dem ursprünglich als Kontroll-Oligomer eingesetzten Sense-Oligonukleotid (SO) übertroffen. Die Therapie von CC531^{lacZ} Zellen mit dem SO (10µg/ml) resultierte in einer um 56% reduzierten Proliferation (p<0,001) und in vivo konnte noch eine Woche nach Ende der Therapie mit dem SO (4mg/kg) eine signifikante Reduktion auf 25% T/C beobachtet werden (p=0,026). Wurde die SO Therapie über 21 Tage verabreicht zeigte sich eine um 96% reduzierte Tumorzellmenge. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit der SO Therapie mindestens eine Verdopplung der Überlebenszeit der Tiere möglich war.

Im zweiten Teil wurde die mRNA Expression von Osteopontin und drei weiteren Genen in Adenokarzinomproben von 118 Patienten untersucht. Bei den Genen handelt es sich um Matrix-metalloproteinase-2 (MMP-2), Transforming growth factor-β (TGF-β) und

Cyclooxygenase-2 (COX-2), die direkte oder indirekte Verbindungen zu Osteopontin aufweisen und eine wichtige Rolle bei kolorektalen Karzinomen spielen. OPN war in 43,2% der Tumorproben stärker exprimiert als in gesunder Mukosa, MMP-2 in 70%, TGF- β in 24,5% und COX-2 in 89% der Tumorproben. Die Höhe der Expressionen wurde mit den klinischen Stadien der Patienten korreliert und zeigte für keines der Gene einen signifikanten Expressionsanstieg im Zusammenhang mit einem schlechteren klinischen Stadium. Anschließend wurden die relativen Expressionswerte von 103 Patienten, deren Überlebenszeit ermittelt werden konnte, über das 75% Quantil in zwei Gruppen eingeteilt. Diese beiden Kategorien wurden in einer Überlebenszeitanalyse gegeneinander getestet und zeigten bei keinem der Gene einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher Genexpression und kürzerer Überlebenswahrscheinlichkeit. Zuletzt wurde mit den relativen Expressionswerten eine rangtransformierte hierarchische Clusteranalyse durchgeführt, bei der eine Gruppe von 33 Patienten zu 100% in eine „Clustergruppe“ fiel. Die Proben der 33 Patienten zeigten eine signifikant höhere Expression aller vier Gene als der Rest der untersuchten Proben ($p < 0,001$). Zwischen der Clustergruppe und dem Rest der Patienten gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der klinischen Stadien, aber die Patienten der Clustergruppe lebten im Median 5 Monate kürzer und verzeichneten 9% mehr Todesfälle innerhalb des Untersuchungszeitraumes.

Die Ergebnisse des Rattenlebermetastasen-Modells zeigen, dass Osteopontin ein potentes therapeutisches Zielmolekül der Tumorprogression ist und durch ein Antisense-Oligomer unterdrückt werden kann, solange eine kontinuierliche Applikation stattfindet. Außerdem wurde eine signifikante antiproliferative Wirkung des Sense-Oligonukleotids entdeckt, deren Ursache noch nicht aufgeklärt werden konnte.

Die Höhe der Expression von Osteopontin und seinen Interaktionspartnern korreliert nicht mit dem klinischen Stadium der Patienten und hat keinen signifikanten Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit. Es konnte allerdings eine Gruppe von Patienten identifiziert werden, deren Tumoren eine hohe Expression aller vier Gene aufweisen und die im Median eine um fünf Monate verkürzte Überlebenszeit zeigten.