

Maren Bretsch
Dr.sc.hum.

Pathogenetische Rolle der Integrine $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ und deren Interaktionspartner bei Knochenmetastasen des Mammakarzinoms

Promotionsfach: Medizinische Physik
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfhard Semmler

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau in Industrienationen. Wenn bei Brustkrebs Fernmetastasen in Erscheinung treten, ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden Mitteln eine dauerhafte Heilung nicht erreichbar. Mehr als die Hälfte der Patienten mit Mammakarzinomen entwickeln im Laufe der Erkrankung Knochenmetastasen, die zu schweren Komplikationen wie Hyperkalzämie und pathologischen Frakturen führen können. Daher ist es notwendig, die Pathogenese der Knochenmetastasen zu untersuchen, um neue therapeutische Ansätze aus den Kenntnissen der pathogenetischen Vorgänge zu entwickeln, die die Interaktionen beteiligter Faktoren der Knochenmetastasierung spezifisch hemmen.

Die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ gehören zu den wichtigsten Faktoren der Tumorprogression und der Neubildung von Blutgefäßen. In der Metastasierung unterschiedlicher Primärtumoren wurde die Expression und Komplexbildung von BSP mit deren Interaktionspartnern - den Integrinen $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ und den Matrix Metalloproteinasen MMP-2/-9 - beschrieben. Jedoch ist die therapeutische Wirkung der $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Inhibitoren auf die durch Brustkrebs induzierten Knochenmetastasen sowie die pathophysiologische Bedeutung der Interaktionen bzw. Komplexbildungen aus Integrinen, BSP und MMP-2/-9 bei der Knochenmetastasierung bisher unbekannt. Daher war das Ziel der Arbeit, die pathophysiologische Bedeutung von Integrinen $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ und deren Interaktionspartnern BSP und MMP-2/-9 bei der Knochenmetastasierung von Mammakarzinomzellen zu untersuchen.

Im Rahmen einer In-vitro-Studie wurden die Effekte eines $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Integrin Inhibitors, eines anti-BSP Antikörpers und eines MMP-2/-9 Inhibitors, alleine und in Kombination, mit Hilfe von vier In-vitro-Testmethoden auf die Migration, Invasion und Proliferation an humanen MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen sowie die Osteoklastenaktivität untersucht. Mittels eines Proliferationstests wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen in Anwesenheit einer Therapie gemessen. Der Einfluss der zu testenden Substanzen auf die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen wurde mit Hilfe eines Migrationstests untersucht. Ein Invasionstest analysierte den Einfluss der zu testenden Substanzen auf die Fähigkeit von Tumorzellen, durch eine Kollagenmembran zu invadieren. Außerdem wurde ein Knochenresorptionstest eingesetzt, der die Aktivität der Osteoklasten unter Einfluss einer Therapie misst. MDA-MB-231 Zellen wurden Konzentrationen von 1-200 $\mu\text{g/ml}$ der jeweiligen Substanz für 1-5 Tage (Proliferationstest und Invasionstest) bzw. für eine Dauer von 1-4 Tagen (Migrationstest) und 5 Tagen (Knochenresorptionstest) ausgesetzt. Die Therapien erfolgten in Einzelbehandlungen sowie in simultanen Kombinationsbehandlungen. Die aus den Einzelwirkungen der Substanzen erwartete (errechnete) Kombinationswirkung wurde mit der tatsächlichen (beobachteten) Kombinationswirkung ins Verhältnis gesetzt (T/E).

In einer In-vivo-Studie wurde die Wirkung eines $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Inhibitors auf experimentelle Knochenmetastasen mittels nicht-invasiver Methoden untersucht. Hierfür wurden im Rahmen einer Frühtherapie (Therapie von entstehenden Knochenmetastasen) und einer Spättherapie

(Therapie von bereits entstandenen Knochenmetastasen) jeweils 10^5 humane MDA-MB 231 Mammakarzinomzellen in die A.epigstrica superficialis dextra von Nacktratten inokuliert, woraufhin sich Knochenmetastasen ausschließlich in Femur, Tibia und Fibula des entsprechenden Beines entwickelten. Zur Beobachtung des Therapieverlaufs wurde das Volumen des Weichteiltumors und der Osteolyse auf nativen MRT und CT Bildern bestimmt. Diese morphologischen Verfahren wurden durch funktionelle radiologische Methoden ergänzt. Unter Verwendung eines etablierten Zwei-Kompartimentmodells lieferte die dynamisch kontrastmittelverstärkte MRT (DCE-MRT) Informationen über das relative Blutvolumen (repräsentiert durch die Amplitude A) sowie über die Gefäßpermeabilität (repräsentiert durch die Austauschrate k_{ep}) innerhalb der Knochenmetastasen. Die diffusionsgewichtete Bildgebung (DWI) wurde durchgeführt, um eine Aussage bezüglich der Zellularität innerhalb der Tumore zu treffen. Im Anschluss an die Bildgebungsexperimente wurden die Knochenmetastasen immunhistologisch und mittels Expressionsanalyse untersucht.

Die In-vitro-Studie ergab, dass die Migration, Invasion und Proliferation sowie Osteoklastenaktivität von substanzexponierten Zellen in Einzelbehandlungen mit einem $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Inhibitor reduziert werden konnte. Einzelbehandlungen mit einem anti-BSP Antikörper und einem MMP-2/-9 Inhibitor reduzierten ebenfalls die Migration und Proliferationsfähigkeit der MDA-MB-231 Zellen. In den Kombinationsversuchen (anti BSP + anti- $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Integrin; anti-BSP + anti-MMP-2/-9; anti-MMP-2/-9 + anti- $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Integrin) zeigten sich im Migrations-, Invasions und Proliferationstest im Mittel additive Kombinationseffekte ($T/E\ 1,3 < 0,7$) und vereinzelt synergistische Effekte ($T/E < 0,7$). Somit wurden der $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Inhibitor, der anti-BSP Antikörper und der MMP-2/-9 Inhibitor erfolgreich in 3 In-vitro-Testmethoden kombiniert. Ebenfalls zeigte der $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Integrin Inhibitor vielversprechende Ergebnisse in den 4 *in vitro* Tests, das den Ansatz zu weiteren Untersuchungen in einem *in vivo*-Modell bekräftigte.

In der In-vivo-Studie zeigte sich auf morphologischen MRT und CT Aufnahmen, dass sowohl eine Früh- als auch eine Spättherapie mit einem Integrin Inhibitor zu einer Reduktion des Volumens der Osteolyse als auch Weichteilmetastase im Vergleich zu Kontrolltieren führte. Mit Hilfe der DCE-MRT ließen sich anti-angiogene Effekte des $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Integrin Inhibitor *in vivo* nachweisen und es zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Rückgang des relativen Blutvolumens sowie der Gefäßpermeabilität innerhalb der Knochenmetastasen. Diese Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit denen der histologischen Analyse. Somit bewirkte die Therapie mit einem Integrin Inhibitor eine Abnahme der Amplitude Blutvolumens (assoziiert mit Amplitude A) und eine erhöhte Permeabilität (assoziiert mit Austauschrate k_{ep}) der Tumorgefäße, bedingt durch die Zunahme von unreifen Gefäßen. Die Expressionsanalyse ergab eine verminderte Expression von osteolyse- und angiogenese assoziierten Faktoren nach Spättherapie mit einem $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Integrin Inhibitor. Die Berechnung des *apparent diffusion coefficients* (ADC) mittels diffusionsgewichteter Bildgebung in Knochenmetastasen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppe.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der Integrine $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ und deren Interaktionspartnern BSP und MMP-2/-9, jeweils alleine und in Kombination, wichtige Schritte bei der Knochenmetastasierung wie Zellmigration, Invasion und Proliferation humaner MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen *in vitro* reduzieren konnte. Ferner wurde *in vivo* gezeigt, dass die Inhibition der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ in Nacktratten in einer Reduktion des Volumens der Osteolyse und Weichteilmetastase sowie der

Vaskularisierung in experimentellen Knochenmetastasen resultierte. Die Hemmung der Integrine $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ führte jedoch nur zu einer Reduktion, nicht zu einer vollständigen Hemmung der Knochenmetastasierung. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Integrine $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ wichtige pathogenetische Faktoren der Knochenmetastasierung sind und damit ein potentielles therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Patienten mit Mammakarzinom darstellen.