

Hassan Adwan
Dr. sc. hum.

Untersuchungen zum Einfluss der durch Antisense Oligonukleotide verminderten Expression von Osteopontin, Bone Sialoprotein II und Osteonectin auf Parameter der Metastasierung In vitro und in vivo.

Geboren am 19.01.1972
Staatsexamen am Mai-1998 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pharmakologie und Toxikologie.
Im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg
Arbeitsgruppe für Toxikologie und Chemotherapie
Prof. Dr. med. Martin R. Berger

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer nicht viralen Gentherapie zur Expressionshemmung der drei Glykoproteine Osteopontin (OPN), Bone Sialoprotein II (BSP II) und Osteonectin (ON) auf die Metastasierungsfähigkeit der MDA-MB-231 Mammakarzinomzelllinien *in vitro* als auch *in vivo* untersucht.

Die Expression der drei Proteine wurde zunächst mittels Western Blot bei einer Reihe von Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs nachgewiesen. Zur Therapie wurde für jedes der drei Proteine mit dem HUSAR Programm „Mfold“ eine Serie von zehn Antisense Oligonukleotiden (ASOs) ausgewählt, deren Eignung daran gemessen wurde, wie intensiv im Western Blot die Expression des jeweiligen Proteins vermindert werden konnte. Die maximale Hemmung der Expression von Osteopontin lag bei 84% nach Behandlung mit ASO-OPN-4, die von Bone Sialoprotein II bei 75% nach Behandlung mit ASO-BSP-II-6 und die von Osteonectin bei 70% nach Behandlung mit ASO-ON-3.

Mit einer kleineren Serie von Peptid-Oligonukleotiden (PNAs), die gegen die m-RNA von BSP II bzw. OPN gerichtet waren, wurde eine Hemmung der entsprechenden Proteinexpression von über 80% (PNA-BSP-II-6a) bzw. 43 % (PNA-OPN) erreicht. Diese ASOs bzw. PNAs wurden für die weitergehenden Untersuchungen ausgewählt mit denen ihr Einfluss auf die Proliferation, Koloniebildung und Migration von MDA-MB-231 Zellen bestimmt werden konnte.

Die jeweilige Wirkung der ASOs bzw. PNAs wurde mit der einer Standardtherapie verglichen, für welche ein Antikörper gegen BSP-II, ein Bisphosphonat (Ibandronat) und ein Alkylphosphocholins (ErPC₃) ausgesucht worden waren.

Bezüglich der Proliferation wiesen die ASOs nur eine geringe Wirkung auf, mit einer Abstufung von ASO-OPN-4 (relativ beste Wirkung) zu ASO-ON-3 (keine Wirkung). Eine ausgeprägtere Wirkung war bei der Inhibition von Koloniewachstum und Migration der MDA-MB-231 Zellen zu sehen, bei gleicher Abstufung der Wirkung bezüglich der verwendeten ASOs. Verglichen mit den ASOs zeigten die PNAs in diesen Tests keinen Vorteil. Bei der Hemmung der Kolonienbildung und der Migration wurde die Wirkung der Positivkontrollen erreicht und teilweise übertroffen. Bei einer Kombinationstherapie der ASOs mit ErPC₃ war der Hemmeffekt auf die Koloniebildung additiv.

Im *in vivo* Versuch wurde die Fähigkeit der MDA-MB-231^{GFP} zur Bildung lytischer Metastasen in der Nacktratte untersucht. 10⁵ Zellen wurden in einen Nebenast der Arteria femoralis des rechten Beins einer männlichen Nacktratte injiziert. Vier Wochen danach bildeten die unbehandelten Tumorzellen lytische Läsionen im Bereich aller drei Knochen (Tibia, Fibula und Femur) dieses Beins.

Im ersten Teil wurden die MDA-MB-231^{GFP} Zellen vortherapiert, also vor der Implantation in das Tier gegen die Oligos ASO-OPN-4 bzw. ASO-BSPII-6 exponiert. Diese Vorbehandlung mit den ASOs verursachte sowohl eine Verhinderung als auch eine Verzögerung der Metastasierung, wobei die Vorbehandlung mit dem AS-OPN-4 etwas effizienter war als die Vorbehandlung mit dem ASO-BSPII-6.

Im zweiten Teil wurde die systemische Freisetzung der ASOs untersucht. Die durch eine subkutan implantierte osmotische Mini- Pumpe applizierten ASOs waren dabei wirksam hinsichtlich der Verhinderung einer Metastasenbildung und zeigten in ihrer therapeutischen Wirkung nur geringe Unterschiede zum ersten Tierversuch, die sich in einer gering besseren Wirkung von ASO-BSPII-6 verglichen mit AS-OPN-4 zeigten.

Beim dritten *in vivo* Experiment wurde die Wirkung einer lokoregionalen Applikation der entsprechenden ASOs im Tier untersucht. Den Tieren wurden nach Injektion der MDA-MB-231^{GFP} Zellen in Nanopartikel als Träger eingebettete ASOs lokal injiziert. In diesem Teil zeigte sich ebenfalls für beide ASOs eine hohe Effizienz, wobei die Therapie mit AS-OPN-4 geringfügig effizienter war als die Therapie mit ASO-BSPII-6.