

Tobias Bäuerle
Dr. med.

Entwicklung und Charakterisierung eines Tiermodells zur lokal begrenzten Bildung von Knochenmetastasen durch MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen und Therapie der osteolytischen Läsionen durch Hemmung von Bone Sialoprotein

Geboren am 18.05.1978 in Karlsruhe
Drittes Staatsexamen am 16.11.2005 an der Universität Heidelberg
Promotionsfach (Institut): DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. M. R. Berger

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines Nacktrattenmodells zur Bildung von lokalen Knochenmetastasen durch humane MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen. Dieses Tiermodell sollte geeignet sein, die Pathogenese osteolytischer Läsionen sowie Auswirkungen verschiedener Therapien auf die Entwicklung von Knochenmetastasen radiologisch und histologisch zu evaluieren. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen der Therapie mit einem Antikörper bzw. einem Antisense Oligonukleotid gegen Bone Sialoprotein (BSP) untersucht werden.

Zur lokalen Entwicklung von Knochenmetastasen in der Nacktratte wurden 1×10^5 MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen, die Green Fluorescent Protein exprimieren (MDA-MB-231^{GFP} Zellen), in die A. epigastrica superficialis dextra inokuliert. Dieses Gefäß stellt eine Anastomose zwischen der A. iliaca und A. femoralis dar, sodass die A. epigastrica superficialis nach der Inokulation der Tumorzellen ligiert werden konnte, ohne eine Ischämie des Versorgungsgebietes zu verursachen. Ab der dritten Woche nach Tumorimplantation entwickelten sich osteolytische Läsionen in Femur, Tibia und Fibula des rechten Hinterbeins der Nacktratte. Die Beobachtung des Läsionsverlaufs erfolgte durch konventionelle Röntgenaufnahmen, Computertomographie (CT) und flat-panel Volumetric Computed Tomography (fpVCT). Neben den Läsionen im Hinterbein wurden keine weiteren Metastasen in Skelett und Organen der Nacktratten entdeckt. Die Metastaseninzidenz betrug bei einer Serie von 96 Ratten 92,7%. Eine Zunahme der Läsionsgrößen konnte in einem Zeitraum von bis zu 110 Tagen nach Tumorimplantation beobachtet werden.

Im Anschluss an die Beobachtungszeit wurden die osteolytischen Läsionen der Hinterbeine histologisch untersucht. Auf den Knochenschnitten gelang immunhistologisch die Lokalisation der MDA-MB-231^{GFP} Zellen durch die grüne Fluoreszenz des GFP, und auch die Expression von BSP war fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar. Auf den untersuchten histologischen Schnitten exprimierten alle MDA-MB-231^{GFP} Zellen BSP. Durch die Immunfärbung war BSP darüber hinaus besonders an Gefäßendothelien aufgefallen. Auch bei pathogenetischen Vorgängen der Knochenmetastasierung, wie der Extravasation und der Invasion, konnte die Kolo-kalisation von BSP und GFP bei Mammakarzinomzellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen deuten auf eine wichtige Rolle des BSP in der Pathogenese osteolytischer Läsionen durch MDA-MB-231^{GFP} Mammakarzinomzellen hin.

Um die Auswirkungen eines BSP-Antikörpers auf MDA-MB-231^{GFP} Mammakarzinomzellen

und auf die Entwicklung von Knochenmetastasen zu beurteilen, wurde ein Antikörper gegen humanes BSP in dieser Studie *in vitro* und *in vivo* eingesetzt.

Die Exposition der MDA-MB-231^{GFP} Zellen *in vitro* gegenüber dem Antikörper (0 bis 400 µg/ml anti-BSP) bewirkte eine Reduktion der Proliferation, Koloniebildung und Migration dieser Zellen von jeweils bis zu 95, 83 und 89 T/C%.

In Nacktratten zeigten sich nach Inokulation von mit dem Antikörper vorinkubierten MDA-MB-231^{GFP} Zellen (25-100 µg/ml anti-BSP für 48 h bei n=11 Ratten und 600 µg/ml anti-BSP für 2 h bei n=7 Ratten) signifikant erniedrigte durchschnittliche Läsionsgrößen von 22,4 bzw. 18,7 T/C% am Ende des Beobachtungszeitraums von 60 bzw. 90 Tagen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (n=25 Ratten).

Das BSP-Antisense Oligonukleotid (BSP-ASO) adsorbiert an Nanopartikel, das den Ratten am Tag der Tumorzellinokulation intraarteriell verabreicht wurde (1,17 mg/kg, n=5 Ratten), führte nicht zu einer Verminderung der durchschnittlichen Läsionsgrößen im Vergleich zu Kontrolltieren (n=5 Ratten). Wurde das BSP-ASO jedoch über einen Zeitraum von 4 Wochen nach Tumorimplantation über osmotische Minipumpen appliziert (2,84 mg/kg täglich, n=4 Ratten), zeigte sich ein deutlicher Rückgang der durchschnittlichen Läsionsgröße auf 41,6 T/C% an Tag 60 nach Tumorimplantation gegenüber Tieren, die ein Nonsense Oligonukleotid erhielten (n=5 Ratten).

Durch dreimalige subkutane Verabreichung des BSP-Antikörpers innerhalb von 4 Tagen nach Tumorinokulation (Tag 0, 2, 4; jeweils 20 mg/kg anti-BSP) an 10 Nacktratten konnte eine signifikante Reduktion der durchschnittlichen Läsionsgröße auf 29,9 T/C% am Ende des Beobachtungszeitraums von 60 Tagen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden. Tiere, die niedrigere (n=8 Ratten) und höhere (n=8 Ratten) Dosen erhielten, wiesen keine Verminderung der durchschnittlichen Läsionsgrößen auf.

Die Behandlung von Nacktratten nach der Entwicklung von osteolytischen Läsionen mit 10 mg/kg anti-BSP wöchentlich für 8 Wochen (n=8 Ratten) resultierte in signifikant kleineren Läsionen von 57,3 T/C% am Ende des Beobachtungszeitraums. Durch eine Erhöhung der wöchentlichen anti-BSP-Dosis auf 20 mg/kg (n=10 Ratten) ließ sich keine Verminderung der Läsionsgrößen erzielen. Auch durch die intravenöse Verabreichung des Alkylphosphocholins ErPC₃ (2x40-60 µMol/kg wöchentlich für 8 Wochen, n=6 bzw. n=8 Ratten) war kein Rückgang der durchschnittlichen Läsionsgrößen zu beobachten. Die Kombinationstherapie aus ErPC₃ (2x60 µMol/kg wöchentlich) und anti-BSP (10 mg/kg wöchentlich) für 8 Wochen (n=10 Ratten) resultierte jedoch in signifikant kleineren durchschnittlichen Läsionen an Tag 80 nach Tumorimplantation im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Bei diesen Tieren, die wöchentlich 10 mg/kg anti-BSP mit oder ohne ErPC₃ erhielten, konnte zudem eine Neubildung von Knochen radiologisch und histologisch nachgewiesen werden.

Mit dem hier dargestellten Tiermodell ist es möglich, die lokale Entwicklung von Knochenmetastasen durch MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen im Hinterbein von Nacktratten bei hoher Inzidenz der osteolytischen Läsionen über einen langen Beobachtungszeitraum radiologisch und histologisch zu verfolgen. Im Rahmen dieses Tiermodells konnte außerdem die wichtige Rolle des Bone Sialoproteins in der Pathogenese

der Knochenmetastasierung durch MDA-MB-231 Zellen dargelegt werden. Ein Antikörper gegen BSP verminderte *in vitro* Proliferation, Koloniebildung und Migration von MDA-MB-231 Zellen; *in vivo* reduzierte der Antikörper und das Antisense Oligonukleotid gegen BSP bei Nacktratten die Entwicklung von osteolytischen Knochenmetastasen.