

Nelli Ziegler
Dr. sc. hum.

Einfluss von Bone Sialoprotein und Osteopontin auf Tumorprogression und ossäre Metastasierung beim Mammakarzinom.

Geboren am 16.07.1997 in Duschanbe/Tadschikistan.

Diplom der Fachrichtung Ernährungswissenschaften am 24 August 2004 an der Universität Hohenheim- Stuttgart.

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. P.P. Nawroth

Im ersten Teil dieser Studie sollte der Zusammenhang zwischen der Sialoproteinexpression in den Mammakarzinom-Zellen und die Primärtumorgröße untersucht werden. Dafür wurden humane Mammakarzinom MDA-231 Zellen mit hBSP-, hBSP-KAE oder hOPN-Genen stabil transfiziert. Die etablierten Zelllinien wurden dann für die intrakardiale (systemisch) und subkutane (orthotop) Injektion eingesetzt und metastasierten dann in die Weichteilorgane oder die Knochen von athymischen Nacktmäusen.

Ein weiteres Anliegen dieser Studie war es, herauszufinden inwiefern BSP/OPN Überexpression Tumorzellen in die Lage versetzt, den Knochen und viszerale Organe *in vivo* als das Zielort der Invasion anzuvisieren und letztendlich erfolgreich zu besiedeln. Zudem sollte demonstriert werden, dass die Blockierung der BSP/OPN-Expression durch die antisense-Sequenz der Fernmetastasierung durch die Krebszellen vorbeugt.

Weiterhin sollten die Auswirkungen der KAE-Sequenz auf die Metastasierung beobachtet werden.

Zielsetzung dieser Arbeit war außerdem nachzuweisen, ob sich Veränderungen im Knochen und in viszeralen Fernmetastasen bei Nacktmäusen im orthotopen oder kardialen Implantationsmodell immunhistologisch nachweisen lassen.

Dabei erwies sich in diesem Teil der Arbeit die Wahl des Mausmodells als problematisch, da für die statistische Berechnungen immunhistologischer Färbung nicht ausreichendes Gewebematerial zur Verfügung stand.

Auffallend hoch war die immunhistologisch nachweisbare OPN-Expression in Knochenmetastasen und in sekundären Viszeralmetastasen der OPN-behandelten Mäuse. Vereinzelt konnten auch BSP-positive Zellen in diesen Paraffinpräparaten nachgewiesen werden, was für eine gemeinsame Genregulierung der beiden Sialoproteine spricht.

Sowohl im Primärtumor (orthotopes Injektionsmodell) als auch in den viszeralen Metastasen (systemisches Injektionsmodell) konnten wir eine positive Faktor H-Expression nachweisen. Dies unterstützt die bisherigen Studien, dass Faktor H eine entscheidende Rolle bei der Prävention der Komplement-vermittelten Tumorlyse besitzt. Um erfolgreich zu metastasieren, müssen die Krebszellen überleben und die physiologischen Barrieren, wie das Immunsystem, überwinden.

In den BSP-sense und antisense-behandelten Versuchsmäusen konnten in diesem Zusammenhang nur moderate Faktor H-Expression ermittelt werden.

In weiteren Analysen mit größeren Tumorzahlen sollten diese immunhistologischen Ergebnisse überprüft werden.

Tumorzellen können den Knochen direkt abbauen. An dieser Tumor-medierten Osteolyse sind Matrixmetalloproteinasen und knochenabbauende Enzyme (z.B. Cathepsin K) wesentlich beteiligt. Aus der Familie der Matrixmetalloproteinasen können MMP-2 und MMP-9 bereits teilweise abgebautes Kollagen weiter abbauen. Entsprechend weisen auch MDA-231-Zellen diese Proteinase in hoher Konzentration auf. Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass in den Knochenmetastasen von OPN-sense-behandelten Tieren eine hohe MMP-2-Expression vorliegt, was für das Zusammenspiel der Matrixmetalloproteinasen und Sialoproteine mit ihren Integrinrezeptoren spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich der Einfluss der Bone Sialoproteinexpression auf die Primärtumorgröße im subkutanen Xenotransplantationsmodell nicht eindeutig nachweisen. Nach der Injektion von BSP-antisense-transfizierten Zellen in das Brustdrüsengewebe der Nacktmäuse konnte zwar das Auftreten von Primärtumoren und das Tumolvolumen im Mausmodell gesenkt werden, diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Es konnte nicht klar nachgewiesen werden, dass BSP im orthotopen Implantationsmodell ursächlich mit der Knochenmetastasierung verbunden ist. Denn das BSP-antisense Konstrukt konnte das Metastasierungspotential der Mammakarzinomzellen in den Knochen nicht definitiv senken. So wurde bei BSP-sense und -antisense-behandelten Mäusen im gleichen Ausmaß Knochenmetastasen ausgebildet. In beiden Versuchsgruppen konnten in diesem Injektionsmodell histologisch keine viszerale Metastasen nachgewiesen werden.

Auffallend ist die Bedeutung von BSP für Skelettmetastasen im systemischen Implantationsmodell, denn hier konnte durch BSP-antisense-Versuche der Metastasierungseffekt um 62,5% gedrosselt werden.

Dies könnte bedeuten, dass nach dem die Mammakarzinomzellen den Zellverband im Primärtumor erfolgreich überwunden haben und sich bereits im systemischen Kreislauf befinden, die Expression des Bone Sialoproteins bei der Invasion und Metastasierung einen selektiven Vorteil bietet. Eine nichtorthotope Transplantation kann demnach die metastatische Distribution von Karzinomzellen signifikant steigern und zugleich die Absiedelung in bestimmte Organe fördern.

In dieser Studie sollte weiterhin die Rolle der RGD-Sequenz, die für die Integrin-Bindung verantwortlich ist, untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Studie waren doch recht überraschend, da belegt wurde, dass nicht nur die Arg-Gly-Asp-Aminosäuresequenz für die Eigenschaften des Proteins verantwortlich ist, sondern es weitere Mechanismen bei der Interaktion zwischen dem Bone Sialoprotein und seinen Rezeptoren geben muss.

So konnte in dieser Studie durch die Injektion von BSP-KAE-Zellen weder eine Reduktion des Tumolvolumens noch der sekundären Metastasenbildung im Skelett oder in Weichteilorganen erreicht werden.

Katagiri Y.U. *et al.* konnten in einem *in vitro* Modell mit dem artverwandten OPN-Protein und der B16-BL6-Melanoma Zelllinie nachweisen, dass die Adhäsion dieser Zellen auch ohne OPN möglich und sogar die αv -Untereinheit dafür nicht erforderlich ist. Ähnliche Situation könnte es im Fall von BSP geben.

In den Versuchen mit OPN gab es klarere Forschungsergebnisse. Das Wachstum von xenotransplantierten OPN-sense-transfizierten Tumorzellen war schneller als in der OPN-antisense Kontrollgruppe, woraus ein signifikant höheres Tumolvolumen resultierte. In diesem Zusammenhang korrelierten die *in vitro* mit den *in vivo* Ergebnissen dieser Studie.

Insbesondere in den OPN-sense-Tieren wurde eine Erhöhung der Anzahl viszerale Metastasen in beiden Implantationsmodellen im Vergleich zu OPN-antisense ermittelt. Klinisch relevant ist diese Beobachtung, da OPN als prognostischer Faktor gegenwärtig nicht

nur für Brustkrebs, sondern auch für Prostatakarzinom, Schilddrüsen- und Hautkrebs eingesetzt wird. Weitere Krebsarten könnten also folgen.

Zwar konnte im systemischen Inokulationsmodell mit OPN-antisense-transfizierten Zellen eine Suppression der metastatischen Progression im Knochen wie auch in Weichteilorganen erreicht werden, diese Unterschiede waren dennoch nicht signifikant. Weiterhin wurde bei 66,67% den OPN-sense-behandelten Versuchstieren und bei 54,5% OPN-antisense-Mäusen mittels bildgebender Verfahren (Röntgenanalyse) Knochenmetastasen nachgewiesen. Nach der Ermittlung der osteolytischen Läsionen (mm²) in den Röntgenbildern konnten wir dennoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen OPN-sense- und antisense Versuchstieren ausmachen. Bei diesem computergestützten Verfahren konnten die Mikrometastasen bei der Erfassung der osteolytischen Läsionen einbezogen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von BSP und OPN bei der Osteoporoseentwicklung im Versuchstier zu untersuchen. Hierzu wurden morphometrische Analysen durchgeführt und Parameter ermittelt, die auf den Resorptionsstatus und den Osteolysegrad des Knochens Rückschlüsse zu lassen.

In unseren Experimenten konnten wir signifikante osteolytische Effekte auf den Knochen und die Bedeutung von BSP/OPN bei der Entstehung von sekundärer Osteoporose im Skelettsystem zeigen.

Nach der Evaluation der histomorphometrischen Parameter konnte ein signifikant positiver Einfluss von OPN und BSP-exprimierenden Zellen auf den Resorptionsstatus im Knochen aufgezeigt werden. In dieser Untersuchung konnte somit der Zusammenhang zwischen der BSP/OPN-Expression in Krebszellen und der Stimulierung von Osteoklasten, die für die tieferen Resorptionslakunen und die daraus folgende Trabekelperforationen verantwortlich gemacht werden.

Pathophysiologisch kann die Osteoporose als Störung des dynamischen Gleichgewichts zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau mit Überwiegen des Knochenabbaues definiert werden. Diese negative Bilanz kann sowohl durch exzessiven Knochenverlust als auch durch abnorm verminderte Knochenneubildung bedingt sein. Das Ungleichgewicht zwischen Resorption und Formation entwickelt sich durch eine reduzierte Apoptoserate der Osteoklasten bei gleichzeitig verkürzter Lebensdauer der Osteoblasten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig histomorphometrisch die Rolle der Osteoblasten bei der Entstehung sekundärer Osteoporose im Nacktmausmodell untersucht.

Sowohl Osteopontin, als auch Bone Sialoprotein induzieren eine Osteoporose im orthotopen Implantationsmodell. Hierbei haben wir eine signifikante Reduzierung der Gesamtosteoblastenzahl und der aktiven Osteoblasten festgestellt. Demnach setzen Primärtumorzellen verschiedene Mediatorsubstanzen frei (z.B. PTHrP), welche die Aktivität der Osteoklasten und der Osteoblasten pathologisch verstärken und eine Kaskade maligner osteodestruktiver Prozesse auslösen bevor pathophysiologisch Skelettmetastasen nachgewiesen werden. Die osteolytisch freigesetzten Wachstumsfaktoren und Chemokine induzieren ihrerseits die Stimulierung von Krebszellen wodurch weitere Osteoblastenhemmung und Osteoklastenaktivierung mit resorptiver Freisetzung von Wachstumsfaktoren erfolgt. So entsteht ein sich selbst erhaltender Teufelskreis.

Diese neuen tumorbiologischen Erkenntnisse, die bislang im Hinblick auf die BSP/OPN-vermittelte Osteoporoseentwicklung im Mausmodell erzielt wurden, stellen eine wichtige Grundlage für die klinischen Behandlungsverfahren von Osteoporose und Frakturen bei Mammakarzinom-Patientinnen dar. Momentan werden Bisphosphonate bei Brustkrebspatientinnen mit Knochenmetastasierung eingesetzt, da eine deutliche Verminderung des Auftretens von Skelettmetastasen erzielt wird. Auch für Patientinnen ohne skelettale Metastasen sind diese Ergebnisse klinisch relevant und bei der Risikostratifizierung

bei Mammakarzinompatientinnen zu berücksichtigen, damit eine prophylaktische Therapieführung ermöglicht wird.

Da ein unkontrolliertes Fortschreiten einer Brustkrebserkrankung für die Betroffenen Patientinnen in der Regel mit langzeitigen erheblichen Einschränkungen und Minderung der Lebensqualität verbunden ist, ist die sekundäre Osteoporose und die Knochenmetastasierung eine besondere ärztliche Herausforderung - mit individuell variablen Therapiezielen. Um die klinischen Behandlungsmethoden in Zukunft noch effektiver gestalten zu können, ist es nötig, die molekularen Mechanismen des Knochens noch präziser zu definieren. Aus diesem Grund wird die Forschung auf dem Gebiet des Mammakarzinoms weiterhin eine wesentliche Herausforderung bleiben.