

Proteinanalyse und Molekularforschung

T. Gemoll, S. Strohkamp, S. Limmer, J. K. Habermann

- 3.1 Molekularbiologie der Metastasierung – 12
- 3.2 Organspezifische Lungenmetastasierung – 13
- Literatur – 15

3.1 Molekularbiologie der Metastasierung

Die Tumorprogression zu Fernmetastasen beinhaltet eine Reihe von Ereignissen, die man unter dem Begriff der »metastatischen Kaskade« zusammenfasst. Nachdem eine maligne Transformation einer Zelle zur Bildung eines primären Tumors geführt hat, erfolgt in der Tumormasse eine Neovaskularisierung (Angiogenese). Einzelne Zellen oder ganze Zellgruppen wandern anschließend in die umgebende extrazelluläre Matrix (ECM) und das gesunde Stroma (Migration, Invasion) ein. Die molekulare Grundlage für die Dissoziation von Tumorzellen aus dem Primärverband ist die Reaktivierung von embryonalen Signalwegen. Ein dafür verantwortlicher Schlüsselmechanismus ist die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) (Scheel u. Weinberg 2012). Sie bewirkt die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte, Aufhebung der Zellpolarität und Reorganisation des Zytoskeletts durch eine Umwandlung der Zelle von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp. In der Embryonalentwicklung ist die EMT ein ganz normaler Prozess: Einzelne Zellen im Embryo lösen sich aus dem Verband und wandern durch den Embryo, um in einer anderen Region wichtige Strukturen anzulegen. Eine wesentliche Rolle hierbei spielen die sogenannten EMT-Transkriptionsfaktoren, die die Aktivität einer ganzen Reihe von Genen regulieren. Zu ihnen gehören Proteine wie twist-related protein 1 (TWIST), snail homolog 2 (SLUG) und forkhead box C2 (FOXC2) (Scheel u. Weinberg 2012; Grunert et al. 2003). Dieselben Proteine sind auch an der EMT beteiligt, die bei der Metastasierung von ausschlaggebender Bedeutung ist (Grunert et al. 2003). TWIST etwa wird in invasiven Brustkrebszellen von Mäusen in hohen Mengen exprimiert, jedoch nicht in Karzinomen, die nicht metastasieren. Wird TWIST herunterreguliert, können zwar noch Tumore entstehen, aber sie verlieren ihre Fähigkeit zur Metastasierung (Qin et al. 2012). Ähnliches wurde bei Experimenten mit dem Transkriptionsfaktor SLUG beobachtet. Wenn die Expression von SLUG unterdrückt wird, nimmt die Zahl der Melanom-Metastasen um 93 % ab (Shih u. Yang 2011).

Des Weiteren spielt der Wnt-Signalweg bei der EMT eine wichtige Rolle. Das intrazelluläre Schlüsselprotein dieses Signalwegs ist β -Catenin, das sowohl mit der Zell-Zell-Adhäsion assoziiert ist, als auch als latentes Genregulatorprotein arbeitet. Binden Wnt-Liganden an einem Rezeptorkomplex aus Frizzled- und einem low density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (Lrp5/6)-Rezeptor, wird β -Catenin vermindert phosphoryliert und daraufhin dessen Abbau verhindert. Das β -Catenin akkumuliert daraufhin im Zytoplasma und wandert in den Zellkern, wo es mit DNA-bindenden Proteinen der t-cell-factor-Familie (TCF-Familie) einen Komplex bildet. Dadurch verwandeln sich diese Repressoren in Transkriptionsfaktoren und bestimmte Zielgene, wie z. B. *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)* und *Cyclin-D1*, werden exprimiert und fördern so die Proliferation. Der Transkriptionsfaktor TCF kann außerdem zusammen mit β -Catenin wichtige Gene für den EMT-Prozess aktivieren oder inhibieren. Die Ablösung aus dem Primärtumor und das Durchwandern der extrazellulären Matrix werden zusätzlich durch eine Reihe von Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie von Serin-, Zystein- und Aspartatproteinasen katalysiert. Vor allem MMP sind hierbei intensiv untersucht worden und bilden die Grundlage für eine Reihe von klinischen Studien, die die Effektivität spezifischer MMP-Inhibitoren (tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases – TIMP) in der Krebsbehandlung evaluieren. Untersuchungen haben hier gezeigt, dass MMP in einer Vielzahl von malignen Tumoren vermehrt exprimiert werden und diese vermehrte Expression mit einer Tumoraggressivität und erhöhtem Metastasierungspotential assoziiert ist (Chambers u. Matrisian 1997; Kleiner u. Stetler-Stevenson 1999). Unter anderem haben Untersuchungen an Patienten mit kolorektalem Karzinom gezeigt, dass eine erhöhte mRNA-Expression von MMP-1 im Tumor mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf das Überleben verbunden ist (Hidalgo u. Eckhardt 2001).

Nach der Auflösung der extrazellulären Matrix müssen sich Tumorzellen zum Zielgewebe aktiv fortbewegen können. Die Migration der Tumorzellen wird dabei als eine amöboide Bewegung beschrieben. Besonders Änderungen von Aktinfilamenten, welche die intrazellulären Transport- und Bewegungsvorgänge inklusive

der Zellteilung organisieren, bestimmen in diesem Zusammenhang die Zytoskelett-assoziierten Formänderungen. Signalabhängig und in einer geordneten Weise erfolgt die Umorganisation des Aktinzytoskeletts durch Aktin-bindende Proteine, die mit dem Aktinnetzwerk interagieren, den Polymerisationszustand modulieren und so dessen Umbau kontrollieren. Zum Beispiel konnten Akunuru et al. zeigen, dass eine Inhibition der in verschiedenen Tumoren überexprimierten rho-like GTPase Rac1 tumorspezifische Aktivitäten supprimiert (Akunuru et al. 2011). Rac1 stellt somit einen potentiellen therapeutischen Ansatz dar, um die Invasion und Migration von Tumorzellen zu blockieren.

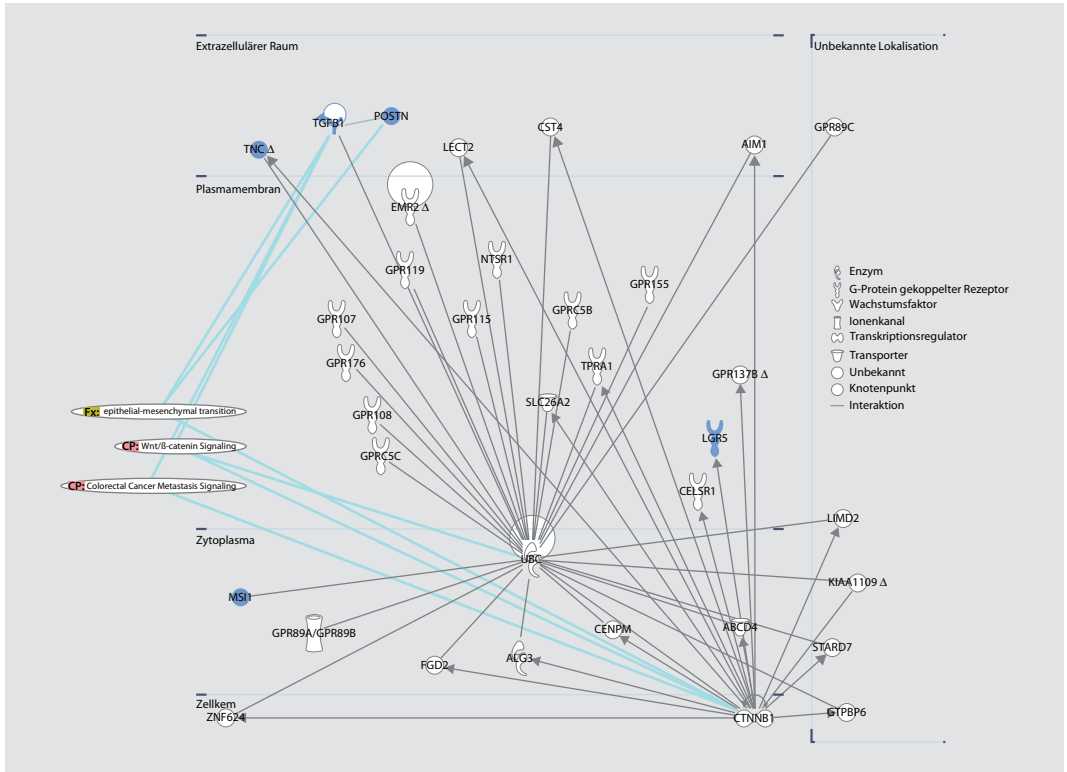
Zusätzlich zur aktiven Bewegung müssen sich die zirkulierenden Tumorzellen nach Ablösung vom Primärtumor vor allem der überlebensfeindlichen Umgebung anpassen. Neben Scherkräften, die durch Strömung entstehen, und anderen mechanischen Einwirkungen (Kollision mit der Gefäßwand und/oder anderen Zellen) spielen körpereigene Schutzfunktionen eine wichtige Rolle, um den Tumorzellen Schäden zuzufügen. Zytotoxische T-Zellen (CTL) und natürliche Killer-Zellen (NK) bedienen sich zum einen der Ausschüttung von Granzymen und dem Auslösen der Apoptose in den Tumorzellen. Letzteres wird durch die Expression und Bindung des CD96-Liganden auf der lymphozytären Oberfläche an das Transmembranprotein CD95 (Fas) induziert. Eine Überlebensstrategie der Tumorzellen bieten Zell-Zell-Interaktionen, z. B. von Tumorzellen untereinander und/oder mit Thrombozyten. Schon 1865 wurde von Trousseau erkannt, dass es einen Zusammenhang zwischen Blutgerinnung und Tumorerkrankungen gibt (Variki 2007). Mittlerweile assoziiert die Thrombozytenzahl in vielen Studien als prognostischer Parameter von Tumoren und gibt Anhaltspunkte für den Zusammenhang zwischen Thrombozyten und Metastasierung (Nash et al. 2002). So konnte beispielsweise eine verminderte Metastasenzahl nach Tumorzellinjektion in Mäusen mit medikamentös induzierter Thrombozytopenie (Gasic et al. 1968) und eine geringere Tumormetastasierung mit Hilfe antithrombotischer Medikamente beobachtet werden (Nash et al. 2002).

Nach der Intravasation in die lymphatischen Gefäße und/oder in das Blutkreislaufsystem und

dem Überleben im Kreislaufsystem haften sich einzelne Tumorzellen an das Kapillarnetz eines entfernt liegenden Organs (Arretierung) und eignen sich spezifische Eigenschaften der neuen Umgebung an. In einem zur EMT umgekehrten Vorgang, der sogenannten mesenchymalen-epithelialen Transition (MET), werden epitheliale Eigenschaften zurückerlangt, um das Homing im Zielgewebe durchführen zu können. Unter anderem konnten Wolf et al. (2012) zeigen, dass das tumoreigene Chemokin CCL2 spezifische Rezeptoren auf dem Endothel der Blutgefäße manipuliert, um die metastasierende Darmkrebszelle von den Blutgefäßen in die Organe einzuschleusen. In einem Prozess, der als »metastatische Kolonisierung« verstanden wird, etablieren sich durch Proliferation die Mikrometastasen. Alternativ initiieren disseminierte Zellen intravasculäres Wachstum und formen Mikrometastasen, die die Gefäßwände zerstören. Im finalen Schritt der »metastatischen Kaskade« proliferieren mikrometastatische Kolonien zu klinisch detektierbaren Makrometastasen. Kurzzeitige oder permanente Veränderungen von unterschiedlichen Genen und Proteinen kennzeichnen diesen Abschnitt und führen zu einem äußerst komplexen Phänotyp der Tumorzelle(n) mit Organspezifität.

3.2 Organspezifische Lungenmetastasierung

Bezogen auf die Organspezifität der Metastasierung wurden in den letzten Jahren bedeutende Erfolge auf molekularer Ebene erzielt. Zwar beobachtete Stephen Paget schon vor ca. 120 Jahren, dass die Verteilung von Metastasen im Körper nicht willkürlich verläuft (Langley u. Fidler 2011), doch konnten erst mit der Offenlegung von Prozessen der Metastasierung und der Einführung von verbesserten Untersuchungsmethoden bedeutende Fortschritte verzeichnet werden. Auch für die Kolonisation von disseminierten Tumorzellen in der Lunge scheinen spezielle Nischen zu existieren. Zwei kürzlich veröffentlichte Studien entdeckten Moleküle der ECM als Faktoren, die essenziell für das Wachstum von Tumorzellen aus der Brust in der Lunge sind (Malanchi et al. 2012; Oskarsson et al. 2011). Oskarsson et al. (2011) konnten zeigen,



■ **Abb. 3.1** Graphische Darstellung der IPA Netzwerkanalyse basierend auf blau hinterlegten Targets (TnC, POSTN, TGFβ, LGR5, und MSI1), die für organspezifische Metastasierung der Lunge eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Für miR-335 konnte keine signifikante Interaktion innerhalb des Netzwerks festgestellt werden. Hervorzuheben ist die Beteiligung der Moleküle in kanonischen Signalwegen (CP) der kolorektalen Metastasierung und der Wnt-β-Catenin-Signalübertragung. Die Epitheliale-Mesenchymale-Transition zeigt sich als assoziierte Netzwerkfunktionen (Fx).

dass tanscin C (TnC) als ECM-Protein an der invasiven Front von humanen Lungenmetastasen exprimiert wird und mit schlechtem Überleben des Patienten assoziiert ist. Dabei wird TnC von der Metastasen supprimierenden microRNA miR-335 negativ reguliert (Oskarsson et al. 2011; Tavazoie et al. 2008). Zwar konnte der Knockdown des Gens nicht das Tumorwachstum von Brustkarzinomen verhindern, doch zeigte sich eine reduzierte Formation von Lungenmetastasen in 90 % der behandelten Mäuse. Die Ausschaltung von TnC induziert weiter eine Herunterregulation von *leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5* (LGR5) und *musashi RNA-binding protein 1* (MSI1), zwei Gene, die für den Wnt- und den Notsch-Signalweg essenziell sind. Weitere Analysen ergaben, dass TnC nach Antwort des Wnt-Liganden für die Expression von LGR5 verantwortlich ist und den

Notch-Signalweg aktiviert (Oskarsson et al. 2011). Interessanterweise zeigt die zweite Studie, dass ein weiteres ECM-Molekül mit TnC interagiert und mit einer Reduktion von spontanen Lungenmetastasen einhergeht (Malanchi et al. 2012). Malanchi zeigte, dass *periostin* (POSTN) von Fibroblasten in infiltrierten aber nicht in metastasefreien Lungen exprimiert und von transforming growth factor beta (TGFβ) induziert wird. Basierend auf den sechs Targets (TnC, miR-335, POSTN, TGFβ, LGR5, und MSI1), die für organspezifische Metastasierung der Lunge eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, bestätigte eine unabhängige Signalweganalyse (Ingenuity Pathway Analysis (IPA), Ingenuity Systems) unserer Arbeitsgruppe eine enge Korrelation zum Wnt-Signalweg, kolorektaler Metastasierung und EMT (eigene Daten; ■ Abb. 3.1). IPA ist eine weitverbreitete Datenbank und Software, die auf

der Ingenuity Pathway Knowledge Base (IPKB) aufbaut. Sie ermöglicht zum einen die Zuordnung zu bekannten metabolischen Netzwerken und Signalkaskaden, zum anderen können auch indirekte Interaktionen zwischen den untersuchten Identitäten aufgedeckt werden. Die von der IPA Software generierten Netzwerke werden in einer Rangfolge bewertet und ergaben in dem o. a. Experiment eine signifikante Interaktion der Moleküle in einem mit »Bindegewebsstörung« assoziierten Netzwerk (Score 14). Bemerkenswert ist die zentrale Rolle von Ubiquitin C in diesem Netzwerk. Ubiquitin C ist ein proteinbindendes Enzym und spielt eine zentrale Rolle in der Progression des Zellzyklus sowie im Zellwachstum. Die Rolle im Prozess der Metastasierung, insbesondere der organspezifischen Metastasierung, ist bislang nicht bekannt.

- Qin Q, Xu Y, He T, Qin C, Xu J (2012) Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell research* 22:90–106
- Scheel C, Weinberg RA (2012) Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol* 22:396–403
- Shih JY, Yang PC (2011) The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 32(9):1299–1304
- Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q et al (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451:147–152
- Varki A (2007) Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 110:1723–1729
- Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M et al (2012) Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer cell* 22:91–105

Literatur

- Akunuru S, Palumbo J, Zhai QJ, Zheng Y (2011) Rac1 targeting suppresses human non-small cell lung adenocarcinoma cancer stem cell activity. *PLoS one* 6:e16951
- Chambers AF, Matrisian LM (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89:1260–1270
- Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC (1968) Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 61(1):46–52
- Grunert S, Jechlinger M, Beug H (2003) Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(8):657–665
- Hidalgo M, Eckhardt SG (2001) Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93:178–193
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 Suppl:S42–51
- Langley RR, Fidler IJ (2011) The seed and soil hypothesis revisited—the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer* 128:2527–2535
- Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA et al (2012) Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 481:85–89
- Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK (2002) Platelets and cancer. *Lancet Oncol* 3:425–430
- Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, Vanharanta S, Tavazoie SF et al (2011) Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 17(7):867–874



<http://www.springer.com/978-3-642-32981-4>

Lungenmetastasen

Diagnostik - Therapie - Tumorspezifisches Vorgehen

Limmer, S. (Hrsg.)

2015, XVIII, 194 S. 68 Abb., 32 Abb. in Farbe.,

Hardcover

ISBN: 978-3-642-32981-4