

Sara Badawi

Dr. med.

## **Charakterisierung grundlegender molekularer Alterationen in der Leberzellkarzinom-Zelllinie HepaRG**

Dissertationsfach: Pathologie

Doktorvater: Priv. Doz. Dr. med. Th. Longerich

Die humane Hepatokarzinogenese ist ein schrittweiser Prozess bei dem eine chronische Leberschädigung über eine Leberzirrhose zum HCC führt. Im Rahmen der chronischen Gewebsschädigung und der resultierenden Regeneration kommt es zu zahllosen genetischen Veränderungen. Sofern diese einen Überlebensvorteil für die betroffene Zelle darstellen, können solche Alterationen klonal selektiert werden und letztlich zur malignen Entartung der Leberzellen führen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulare Analyse der HCC-Zelllinie HepaRG, wobei insbesondere genomische Makroimbancen charakterisiert und hierdurch alterierte, potentiell protumorigene Kandidatengene *in vitro* analysiert werden sollten.

P53- und  $\beta$ -Catenin stellen die beiden am häufigsten im humanen HCC mutierten Gene dar. Beide wiesen in HepaRG-Zellen eine wildtypische Sequenz auf. Es konnte jedoch eine MDM4-Überexpression, die zu einer funktionellen p53-Inhibierung führen kann, nachgewiesen werden.

Die genomischen und funktionellen Analysen deuten darauf hin, dass der Aktivierung des EGFR-Signalwegs in HepaRG-Zellen eine besondere protumorigene Bedeutung zukommt. Bei Vorliegen einer Trisomie 7 konnte eine signifikante Überexpression von EGFR auf mRNA- und Proteinebene detektiert werden. Eine Inhibierung mittels des selektiven EGFR-Inhibitors Tyrphostin führte zudem zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität, wobei insbesondere HepaRG-Zellen in der Proliferationsphase eine hohe Vulnerabilität aufwiesen. Daneben konnte MET als zweites onkogenes Zielgen der Trisomie 7 identifiziert werden.

Ein zentrales, molekulares Merkmal der HepaRG-Zellen ist die Translokation der(22)t(12;22)(p11;q11). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Charakterisierung dieses Rearrangements ergab, dass es sich um eine zentromerische Fusion ohne Generierung eines protumorigenen Fusionsproteins handelt.

Als potentielle von der Monosomie 12p betroffene Tumorsuppressorgen-kandidaten konnten p27 (CDKN1B) und ETV6 identifiziert werden, die beide in HepaRG-Zellen vermindert exprimiert werden und vermutlich die Progression des Zellzyklus *in vitro* erleichtern.

Unter Langzeitkultivierung der HepaRG-Zellen kam es zur Entwicklung weiterer genomischer Instabilität. Hierbei fiel insbesondere eine biallelische Deletion des CDKN2A-Genlocus (p16) auf Chromosom 9p21 auf, was ebenfalls förderlich auf die Zellzyklusprogression wirkt. Zudem deuten die bei Langzeitkultivierung beobachteten umschriebenen 7q-Verluste auf weitere bei Langzeitkultivierung selektionierte Tumorsuppressorgenkandidaten (z.B. PTPN12) hin.

Es konnten somit in der vorliegenden Arbeit wesentliche protumorigene Faktoren und Pathomechanismen in HepaRG-Zellen identifiziert werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die allgemein als chromosomal stabil geltenden HepaRG-Zellen bei längerfristiger Kultivierung neue, häufig sehr umschriebene, genomische Veränderungen hinzugewinnen, denen sich dezidiert protumorigene Kandidatene zuweisen lassen.