

Magdalena Görtz

Dr. med.

Die De-novo-Synthese des Metastasierungs-assoziierten Proteins C4.4A im hepatozellulären Karzinom steigert die Migration und Invasion von Tumorzellen

Fach/Einrichtung: Chirurgie

Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Schemmer

Aufgrund der fehlenden Kenntnisse zu den Mechanismen der Karzinogenese und Tumorprogression des hepatozellulären Karzinoms bleibt seine Therapie eine Herausforderung. Derzeit fehlen sowohl Marker, die eine frühzeitige Diagnose des hepatozellulären Karzinoms erlauben, als auch therapeutische Targets, deren Inhibition die Ausbreitung des Tumors verhindern würden. Das Protein C4.4A erscheint aufgrund seines Expressionsprofils für diese Problematik vielversprechend. C4.4A wird im gesunden menschlichen Organismus nur sehr eingeschränkt auf einzelnen Epithelien exprimiert und kommt in der gesunden Leber nicht vor. Dagegen wurde eine Hochregulation von C4.4A in verschiedenen bösartigen Tumoren beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Rolle von C4.4A im primären Leberkarzinom untersucht.

Zunächst wurde die Expression von C4.4A in humanen Gewebeproben immunhistochemisch analysiert. Im gesunden bzw. zirrhotischen Lebergewebe (n = 12) trat keine C4.4A-Expression auf, dagegen konnte im hepatozellulären Karzinom (n = 17) in 59% der Präparate eine deutliche C4.4A-Expression detektiert werden. In pulmonalen Metastasen des hepatozellulären Karzinoms (n = 10) war die C4.4A-Expression verglichen mit dem Primärtumor verstärkt und trat in 80% der untersuchten Proben auf. Die C4.4A-Expression nahm in Richtung der invasiven Front der Metastase graduell zu. In Cholangiozyten und in Gewebe von Patienten mit einem cholangiozellulären Karzinom (n = 8) trat keine C4.4A-Expression auf.

Um die C4.4A-Expression während der Entwicklung der Leber zu untersuchen, wurden fetale Lebern aus einer trächtigen Ratte am 16. Embryonaltag entnommen und die Hepatozyten mittels „Magnetic Cell Sorting“ isoliert. Eine C4.4A-Expression wurde in der fetalen Hepatozytenpopulation, die den Stammzellmarker Thymocyte Antigen 1 exprimiert, festgestellt.

Weiterhin wurde C4.4A mit einer Proteinmasse von 65 kDa in den humanen Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms Huh7 und HepG2 mit Western Blot und Immunfluoreszenz detektiert. In der Durchflusszytometrie wurde nachgewiesen, dass Hypoxie-Bedingungen die C4.4A-Expression in den Huh7- und HepG2-Zellen verstärken.

Um die Funktion von C4.4A im hepatozellulären Karzinom zu untersuchen, wurde die C4.4A-Expression in den Huh7- und HepG2-Zellen mit einer spezifischen small interfering RNA blockiert. Nach der Herunterregulation von C4.4A wurde analysiert, welchen Einfluss C4.4A im hepatozellulären Karzinom auf die Proliferation, Apoptose, Migration, Invasion und Wundheilung hat. Mittels eines MTT-Proliferationstest und einer Annexin V-/Propidiumiodid-Färbung wurde festgestellt, dass C4.4A die Viabilität und Apoptoserate nicht beeinflusst.

In einem Migrations-Assay nach dem Boyden Chamber-Prinzip und in einem Invasion Assay, bei dem zusätzlich eine Schicht aus extrazellulärer Matrix überwunden werden musste, zeigten die Huh7- und HepG2-Zellen nach der Herunterregulation von C4.4A ein signifikant geringeres Migrations- und Invasionspotential. Dies deutet darauf hin, dass die C4.4A-Expression im hepatozellulären Karzinom zum Metastasierungsprozess beiträgt.

Auch die Wundheilung war im „Scratch Assay“ nach der Transfektion einer C4.4A-spezifischen small interfering RNA signifikant reduziert. Das Wundheilungsvermögen war durch die Herunterregulation von C4.4A unter Hypoxie-Bedingungen stärker beeinträchtigt als unter Normoxie-Bedingungen. C4.4A scheint somit unter Hypoxie eine größere Bedeutung für die Zellmigration zu spielen als unter Normoxie.

Um zu analysieren, wie C4.4A seine Rolle in der Tumorzellausbreitung ausübt, wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Kolokalisationsstudien von C4.4A mit dem Zelladhäsionsmolekül und Laminin-Rezeptor Integrin $\alpha 6$ durchgeführt. Unter Normoxie-Bedingungen zeigte sich in den Huh7- und HepG2-Zellen eine partielle Kolokalisation von C4.4A mit Integrin $\alpha 6$. Über das Zusammenlagern mit dem die Zellmotilität beeinflussenden Molekül Integrin $\alpha 6$ könnte C4.4A seinen Einfluss auf die Migration ausüben.

Nach Inkubation unter Hypoxie-Bedingungen verstärkte sich die Kolokalisation mit Integrin $\alpha 6$. Die unter Hypoxie-Bedingungen gesteigerte C4.4A-Expression und vermehrte Kolokalisation mit Integrin $\alpha 6$ bieten eine Erklärung, warum C4.4A unter Hypoxie stärker zur Zellmigration beiträgt als unter Normoxie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Abwesenheit von C4.4A im gesunden Lebergewebe und der de-novo-Synthese im Primärtumor und in Metastasen des hepatozellulären Karzinoms identifizieren C4.4A als potentiell diagnostisches

Markermolekül. Aufgrund der sehr eingeschränkten Expression im gesunden Organismus und dem Beitrag zur Migration und Invasion von Leberkarzinomzellen stellt C4.4A zudem ein vielversprechender Angriffspunkt für die Therapie des hepatozellulären Karzinoms dar, insbesondere im metastasierten Erkrankungsstadium.