

Moritz Anton Löffler
Dr. med.

Das miRNA Expressionsprofil der schrittweisen Cholangiokarzinogenese über Biliäre Intraepitheliale Neoplasien und funktionale Evaluation der miRNA-451a-ATF2-Achse.

Fach/Einrichtung: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Benjamin Goeppert

Distale Cholangiokarzinome entstehen im Bereich des Ductus choledochus und sind durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet. Eine chirurgische Resektion als einziger kurativer Therapieansatz wird durch eine oft späte Diagnosestellung limitiert. Ergänzend zu einer Platin-basierten Chemotherapie gibt es bis heute keine klinisch etablierten zielgerichteten Therapien. Als Grundlage neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze ist es daher unerlässlich, die der Karzinogenese zugrundeliegenden molekularbiologischen Veränderungen zu verstehen. Die Cholangiokarzinogenese ist aktuell als schrittweiser Prozess beschrieben worden: Aus dem nicht-neoplastischen Gallengangsepithel entwickelt sich eine dysplastische Vorläuferläsion und schließlich ein invasives Adenokarzinom. Biliäre intraepitheliale Neoplasien sind die häufigsten Vorläuferläsionen distaler Cholangiokarzinome und wengleich histomorphologisch klar definiert, stehen bis heute systematische molekulargenetische Untersuchungen aus. Das Ziel dieser Arbeit war es, die schrittweise Cholangiokarzinogenese über biliäre intraepitheliale Neoplasien erstmalig molekularbiologisch auf Ebene der miRNA Expression zu untersuchen. Dabei sollten biliäre intraepitheliale Neoplasien anhand eines miRNA-Profiles charakterisiert und deregulierte Kandidaten miRNAs als potentielle Ansatzpunkte für Diagnostik und Therapie identifiziert werden. Aus einer Patientenkohorte (n = 12) wurden Triplet-FFPE-Gewebeproben von nicht-neoplastischem Gallengang, biliärer intraepithelialer Neoplasie und invasivem distalen Cholangiokarzinom des jeweils selben Patienten selektiert. Die epithelialen Anteile der Proben wurden mittels Lasermikrodissektion isoliert und die Gesamt-RNA extrahiert. Anschließend wurde unter Verwendung der Nanostring Technologie ein 826 miRNAs umfassendes Expressionsprofil erstellt und die Proben in einer Heatmap geclustert. Signifikant deregulierte Kandidaten miRNAs wurden mittels quantitativer PCR und anhand einer unabhängigen Patientenkohorte validiert. Anschließend wurden Kandidaten miRNAs mittels miRNA Mimics und lentiviralen Vektoren in Cholangiokarzinom Zelllinien überexprimiert und in funktionalen Assays evaluiert. Dabei wurde ein Einfluss auf Zellproliferation (Resazurin Assay), Koloniebildung, Migration (Scratch Assay) und Invasion (Transwell Assay) untersucht. Potentielle miRNA Zielgene wurden anhand einer herunterregulierten Genexpression nach miRNA Überexpression in einem Microarray identifiziert und mit dem Online Tool TargetScan 7.2 auf komplementäre Sequenzen abgeglichen. Mittels quantitativer PCR, Luciferase Assay und Western Blot wurden Zielgene validiert. Unter Verwendung gepoolter siRNAs wurden Zielgene spezifisch inhibiert und funktionale Effekte in Zellkultur evaluiert. Die Expression der Zielgene wurde schließlich mittels immunhistochemischen Färbungen in den zuvor auf die miRNA Expression untersuchten Gewebeschnitten nachvollzogen. Im Nanostring Assay waren 49 miRNAs signifikant dereguliert. Das Clustering aller Patientenproben anhand dieser 49 deregulierten miRNAs resultierte in einer Unterscheidung von nicht-neoplastischem Gallengang, biliärer intraepithelialer Neoplasie und invasivem Cholangiokarzinom anhand der miRNA Expression. Biliäre intraepitheliale Neoplasien nahmen dabei eine Zwischenstellung ein und wurden anhand eines distinkten miRNA Profils als Vorstufe distaler Cholangiokarzinome charakterisiert. Unter

den signifikant deregulierten miRNAs wiesen 8 miRNAs eine kontinuierlich-graduell ansteigende Expression auf, was sie als potentielle Onkogene qualifizierte. Auf der anderen Seite zeigten 11 miRNAs eine kontinuierlich-graduell abnehmende Expression und wirkten somit potentiell tumorsuppressiv. Dabei stachen miRNA-451a (-10,9-fach herunterreguliert) und miRNA-144-3p (-6,34-fach herunterreguliert), die auf derselben primary miRNA transkribiert werden, als die am stärksten herunterregulierten Kandidaten hervor. Dies wurde in einer unabhängigen Patientenkohorte bestätigt. Eine Überexpression von miRNA-451a zeigte in Zellkultur keinen Einfluss auf Proliferation und Koloniebildung, jedoch wurde eine Hemmung von Zellmigration und Invasion nachgewiesen. Auch die Transfektion von miRNA-144-3p führte zu einer Migrationshemmung. Im Microarray zeigten sich 585 Gene infolge der miRNA-451a Überexpression herunterreguliert. Unter diesen potentiellen Zielgenen wiesen *ATF2*, *CAB39*, *PSMD11*, *MIF* und *SMAD4B* eine zu miRNA-451a komplementäre Sequenz in der 3' untranslatierten Region auf. *ATF2* wurde als direktes Zielgen von miRNA-451a validiert und eine direkte Bindung an miRNA-451a wurde im Luciferase Assay bestätigt. Funktional bewirkte eine spezifische *ATF2* Inhibition ebenfalls eine Migrationshemmung, was dem von miRNA-451a vermittelten Effekt entsprach. In der Patientenkohorte wurde korrespondierend mit der Herunterregulation von miRNA-451a eine Zunahme der *ATF2* Expression in einer Untergruppe immunhistochemisch nachgewiesen. Diese Daten legen eine tumorsuppressive migrationshemmende miRNA-451a-*ATF2* Achse nahe. Diese wird im Rahmen der schrittweisen Cholangiokarzinogenese durch Herunterregulation von miRNA-451a ausgeschaltet. Da die Herunterregulation von miRNA-451a bereits in biliären intraepithelialen Neoplasien nachweisbar ist, stellt diese frühe Veränderung einen potentiellen diagnostischen oder therapeutischen Ansatzpunkt dar. In einer zukünftigen Studie wäre zu klären, inwieweit eine Hochregulation von miRNA-451a beispielsweise in einem Mausmodell der Karzinogenese entgegenwirken kann. Diese Arbeit charakterisiert biliäre intraepitheliale Neoplasien erstmalig anhand eines eigenen miRNA Profils und präsentiert die miRNA-451a-*ATF2* Achse als neuen Mechanismus in der distalen Cholangiokarzinogenese.