

Johannes Schreck
Dr. med.

Analyse der Immunzellinfiltration und Regulation des Tumorsuppressors SH2D4A im hepatozellulären Karzinom

Fach/Einrichtung: Pathologie

Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Stephanie Rössler

Leberkrebs entsteht häufig auf der Grundlage chronischer Entzündungsvorgänge. Hierbei sind insbesondere Zytokine in der Tumorumgebung erhöht, welche mit Tumorigenese, Invasion und Metastasierung assoziiert sind. Eines dieser Zytokine ist das für die Homöostase der Hepatozyten wichtige und als starker Zellzyklusmodulator wirkende Interleukin 6 (IL-6). Die regulatorische Funktion von IL-6 wird durch Signal Transducer And Activator Of Transcription 3 (STAT3) nach Dimerisierung zweier STAT3-Moleküle und Translokation in den Zellkern vermittelt. Diese STAT3-Dimere werden durch SH2 Domain Containing 4A (SH2D4A) im Zytoplasma der Hepatozyten retiniert und somit die Funktion des IL-6-Signalwegs gehemmt. Durch diese und weitere andere Eigenschaften wirkt SH2D4A als Tumorsuppressoren in der Leberkrebsentstehung. Weiterhin weist das zur STAT-Proteinfamilie gehörende STAT1 in Bezug auf die Entstehung von Leberkrebs eine zu STAT3 unterschiedliche Wirkung und Funktion auf. Im Folgenden war Thema der Arbeit, eine mögliche Assoziation zwischen der Expression von STAT3 und STAT1 in Tumorzellen und den Immunzellen in der Tumorumgebung von Leberkrebspatienten darzustellen. Zudem wurde wegen der engen funktionellen Assoziation zwischen STAT3 und SH2D4A die transkriptionelle Regulation von *SH2D4A* in Leberkrebs ebenfalls mit Fokus auf unterschiedliche Zytokine hin untersucht.

Zunächst wurde ein Multigewebeblock von 127 Leberkrebspatienten mit Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und den Immunzellmarkern Cluster of Differentiation 3 (CD3), CD4, CD8, CD20, CD68, CD117, Forkhead-Box-Protein P3 und Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) immunhistologisch untersucht. Die Expression von STAT1 in den Tumorzellen und STAT1-positive Immunzellen zeigten eine starke Korrelation mit den infiltrierenden regulatorischen und zytotoxischen T-Zellen und schwächer für die infiltrierenden B-Zellen. Zudem zeigte sich eine starke Korrelation mit der PD-L1-Expression in den Tumorzellen. Expression von STAT3 in Tumorzellen war mäßig stark korreliert mit einem Infiltrat regulatorischer T-Zellen. In absoluten Zellzahlen wiesen Tumoren mit hoher PD-L1-Expression signifikant mehr T- und B-Zellen sowie Makrophagen in ihrer Tumorumgebung auf. Gleichartige Beobachtungen traten auch für STAT1-positive Immunzellen, jedoch nicht für STAT3-positive Immunzellen auf. In Tumoren mit einer hohen STAT3-Expression in den Tumorzellen zeigte sich eine signifikant vermehrte Infiltration regulatorischer und zytotoxischer T-Zellen. Ebenfalls wiesen Tumoren mit vermehrtem Infiltrat STAT3-exprimierender Immunzellen signifikant vermehrte infiltrierende T- und B-Zellen auf. Schließlich zeigt sich in Tumorzellen mit starker nukleärer Expression von STAT1 und STAT3 eine starke zytoplasmatische Expression dieser Proteine. Außerdem wiesen Tumorzellen mit starker nukleärer STAT3-Expression auch eine starke nukleäre STAT1-Expression auf.

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *SH2D4A* in Leberkrebs wurden Leberkrebszellen der Linien HepG2 und Hep3B mit verschiedenen Zytokinen, darunter Transforming growth factor β (TGF β) und Interferon- γ (IFN- γ) behandelt. Hierbei zeigte sich ein Anstieg der *SH2D4A*-Expression in beiden Zelllinien auf mRNA-Ebene. Um mehr über die nachgeschalteten Regulationsmechanismen zu erfahren, wurde der *SH2D4A*-Promotor in-silico auf potenzielle

Transkriptionsfaktorbindestellen hin untersucht. Die Vielzahl der generierten Kandidaten wurden nach theoretischer Bindungswahrscheinlichkeit geordnet. Nach eingehender Literaturrecherche sowie in Zusammenschau mit den bislang erhaltenen Ergebnissen wurden die Transkriptionsfaktoren Forkhead Box A1 (FOXA1), YIN-YANG-1 (YY1) und Krüppel-like factor 4 (KLF4) ausgewählt. Diese Transkriptionsfaktoren führen nach Expression in den Leberkrebszellen zu einer vermehrten Expression der endogenen *SH2D4A*-mRNA und auch zu einer erhöhten Aktivität des isolierten *SH2D4A*-Promotors in Experimenten mit Luciferase-Assay. In diesen Experimenten zeigte sich die stärkste Induktion für den Transkriptionsfaktor KLF4, weshalb in den Folgeexperimenten auf KLF4 fokussiert wurde. Zur Untersuchung der Funktion der einzelnen Transkriptionsfaktorbindestellen des *SH2D4A*-Promotors wurden mittels gerichteter Mutagenese verschiedene Varianten des *SH2D4A*-Promotors mit unterschiedlicher Konfiguration inaktivierter KLF4-Bindestellen erstellt. In Experimenten mit Luciferase-Assay zeigte sich nach Inhibition aller relevanter Bindestellen in HepG2 und Hep3B eine signifikant niedrigere Induktion der *SH2D4A*-Promotoraktivität nach KLF4-Expression. Bei Isolation jeweils einer Bindestelle ließ sich in HepG2 für eine spezifische, zentral gelegene Bindestelle eine signifikant erhöhte Induktion der Promotoraktivität nachweisen. In Versuchen mit Inaktivierung jeweils einer einzelnen Bindestelle war nicht, wie erwartet, für eben diese Bindestelle ein Abfall der Induktion der Promotoraktivität zu sehen. Stattdessen kam es bei Inaktivierung der direkt daneben liegenden Bindestelle wieder zu einer signifikant erhöhten Induktion der *SH2D4A*-Promotoraktivität. In den Experimenten mit Hep3B war unabhängig von der eigentlichen Bindestelle immer eine signifikant niedrigere Induktion der Promotoraktivität festzustellen. Diese Beobachtungen legen für die Zelllinie Hep3B eine kooperative Interaktion der individuellen Transkriptionsfaktorbindestellen mit einer sigmoidal verlaufenden Aktivierungskurve nahe. In der Zelllinie HepG2 weisen die Versuchsergebnisse auf eine dominante Bindestelle hin, welche die Promotoraktivität maßgeblich beeinflusst. Die anderen Bindestellen führen bei rein statistischer Betrachtung zu einer verminderten Bindungswahrscheinlichkeit der Transkriptionsfaktoren an genau dieser dominanten Bindestelle und somit führt eine Isolation der dominanten Bindestelle zu einer erhöhten Promotoraktivität. Zudem weisen die Ergebnisse in HepG2 auf eine inhibitorische Aktivität der angrenzenden Bindestelle hin, sodass bei Inaktivierung dieser inhibitorischen Bindestelle über Disinhibition der eigentlich relevanten Bindestelle somit der beobachtete Anstieg der Promotoraktivität erklärbar wird.

Zusammenfassend ließ sich mittels Immunhistochemie eine Untergruppe von Leberkrebspatienten mit aktiviertem STAT1- und STAT3-Signalweg abgrenzen, welche ein vermehrtes Infiltrat zytotoxischer und regulatorischer T-Zellen aufweisen, was häufig mit einer schlechten Prognose für die Patienten vergesellschaftet ist. Die starke Expression von PD-L1 in STAT3-positiven Tumorzellen weist auf eine Subpopulation der Leberkrebspatienten mit STAT3-assoziierte Ausbildung einer Immuntoleranz hin. Diese könnte zukünftig möglicherweise eine neue Möglichkeit zur Blockade der PD-L1-Achse aufzeigen. Weiterhin zeigen die Beobachtungen einen Einfluss von Zytokinen auf die endogene *SH2D4A*-mRNA-Expression und abhängig von der Zelllinie zwei verschiedene Modelle möglicher Regulationsmechanismen zwischen KLF4 und dem *SH2D4A*-Promotor. Beide Zelllinien unterscheiden sich in ihrer endogenen *SH2D4A*-Expression als auch in anderen Merkmalen wie dem p53-Mutationsstatus und dem HBV-Infektionsstatus, wobei aktuell unklar ist, ob diese verschiedenen Merkmale die beobachteten Unterschiede in den Zelllinien hinreichend erklären können. Weiter zu verstehen, welche Merkmale zu den beiden differenten Regulationsmechanismen der *SH2D4A*-Expression führen kann helfen, neue innovative therapeutische Therapieformen zur zielgerichteten Therapie der Leberkrebspatienten aufzudecken.