

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das humane cholangiozelluläre Karzinom (CCC)**

Das humane cholangiozelluläre Karzinom (CCC) repräsentiert etwa 10% der primären Lebermalignome und ist nach dem hepatozellulären Karzinom der zweithäufigste primäre Lebertumor. Ursprünglich wurden unter dem Begriff des CCCs nur die primären Malignome der intrahepatischen Gallengänge zusammengefasst. Aktuellere Klassifikationen hingegen beziehen die Malignome der extrahepatischen Gallenwege mit ein und unterteilen das CCC in Tumoren der intrahepatischen, perihilären und distal extrahepatischen Gallenwege<sup>1</sup>. Die operative Resektion stellt die einzige potentiell kurative Therapieoption dar<sup>2</sup>. Weder chemo- noch strahlentherapeutische Therapieansätze konnten bisher die Überlebensraten dieser Tumorpatienten signifikant verbessern<sup>3</sup>. Trotz erweiterter Indikationsstellung und Zunahme der Radikalität in der chirurgischen Therapie durch optimierte Leberresektionsverfahren ist die Prognose weiterhin sehr schlecht. Die mediane Überlebenszeit in der Gruppe der operierten Patienten beträgt 11 Monate, während Patienten mit einem nicht-resektablen Tumor nach durchschnittlich 4 Monaten versterben<sup>4</sup>.

Diese Daten verdeutlichen die zwingende Notwendigkeit, durch ein vertieftes Verständnis der Ätiopathogenese des humanen CCC neue Ansätze für innovative Therapiestrategien zu entwickeln. In diesem Zusammenhang deuten zahlreiche präklinische und erste klinische Studien der letzten Jahre daraufhin, dass eine Inhibition der Tumor assoziierten Neoangiogenese eine potentiell effektive und nebenwirkungsarme Therapiestrategie zur Behandlung solider epithelialer Tumoren darstellen könnte<sup>5;6</sup>.

## **1.2 Angiogenese und “angiogenic switch“**

Die Neubildung von Gefäßen (Neoangiogenese) ist eine essentielle Voraussetzung für das Wachstum und die Metastasierung solider Malignome (Übersichten<sup>6-11</sup>). Während in nichttransformierten Geweben Neoangiogenese durch eine balancierte Expression von proangiogenen (z.B. VEGF, FGF, EGF, TGF $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1b,-4,-8, HGF, PDGF, TGF $\alpha$ , Vitronectin) und antiangiogenen Faktoren (z.B. TSP-1, IFN- $\alpha$ , Angiostatin, Endostatin, IL-10,-12, PF-4) reguliert wird, kann diese Balance in transformierten Geweben zugunsten proangiogener Faktoren verschoben sein<sup>12</sup>. Dieses Phänomen wird als “angiogenic switch“ bezeichnet (Übersichten<sup>6;13</sup>).

### 1.3 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)

VEGF gilt als einer der zentralen Faktoren für die tumorassoziierte Neoangiogenese<sup>14-16</sup>. VEGF ist ein Heparin-bindendes, dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa. Durch alternatives Splicing des primären Transkriptes eines einzelnen, etwa 14 kB umfassenden VEGF-Gens entstehen mindestens fünf VEGF-Isoformen mit unterschiedlichen Aminosäurelängen (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>)<sup>17,18</sup>. Im Rahmen der malignen Transformation kommt es zu einer Überexpression von VEGF in einer Reihe von Tumoren. Die Regulation der VEGF-Expression unterliegt einer komplexen Kontrolle unterschiedlicher pathogenetischer Faktoren: (i) verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie z. B. EGF, PDGF, IL-6 und TGFβ-1 stimulieren VEGF *in vitro*<sup>19-21</sup>; (ii) tumorassoziierte genetische Alterationen, wie z. B. K-ras aktivierende Mutationen oder inaktivierende Mutationen von p53 führen zur Überexpression von VEGF<sup>22,23</sup> und (iii) Verminderung des lokalen Sauerstoffpartialdrucks (Hypoxie) führt zur einer Induktion der VEGF Genexpression<sup>24-27</sup>.

VEGF ist ein überwiegend parakrin wirkender, endothelzellspezifischer Wachstumsfaktor, der zahlreiche Endothelzellfunktionen, wie beispielsweise Proliferation, Migration und Gefäßpermeabilität reguliert<sup>23,28</sup>. Die fünf verschiedenen Isoformen propagieren in unterschiedlicher Weise, koordiniert die Neovaskularisation von Tumoren<sup>29</sup>. Die biologische Wirkung von VEGF wird über spezifische Oberflächenrezeptoren der Tyrosinkinase-Superfamilie VEGFR-1 (flt-1) und VEGFR-2 (KDR/flk-1) vermittelt<sup>14</sup>, die nahezu exklusiv auf Endothelzellen exprimiert werden<sup>15,30</sup>. Die Bindung von VEGF an VEGFR-1 und VEGFR-2 induziert eine Homodimerisierung, wodurch die Rezeptordimere intrazellulär durch Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomänen aktiviert werden. VEGFR-2 vermittelt überwiegend die VEGF-induzierten mitogenen und chemotaktischen Effekte sowie Veränderungen der Endothelzellmorphologie. Diese Prozesse spielen eine wesentliche Rolle im Rahmen der Neoangiogenese<sup>15,30</sup>. Im Gegensatz hierzu ist VEGFR-1 nicht in der Lage, Proliferation oder Chemotaxis in Endothelzellen zu induzieren. Interessanterweise induziert dieser Rezeptor aber die Migration von Monozyten und scheint darüber hinaus notwendig zu sein, um eine maximale VEGF-Antwort in Endothelzellen zu vermitteln<sup>15,30</sup>. Die biologische Bedeutung des VEGF/VEGF-Rezeptorsystems wird durch die Beobachtung belegt, dass VEGF in einer Reihe von humanen Malignomen und Metastasen überexprimiert wird, wobei das Ausmaß der Überexpression sowohl mit dem Vaskularisierungsgrad als auch mit der Tumorgröße und dem Metastasierungsverhalten korreliert<sup>23,28,30</sup>. Daher bietet sich das

VEGF/VEGF-Rezeptorsystem als potentieller Ansatz für eine antiangiogene Therapiestrategie an. Zahlreiche präklinische Studien konnten zeigen, dass das Tumorwachstum verschiedener Malignome sowie Metastasenbildung durch Injektion eines neutralisierenden anti-VEGF-Antikörpers oder Expression einer dominant-negativen Mutante des Typ 2 VEGF-Rezeptors (VEGFR-2) oder Inhibition der VEGF Rezeptorkinase deutlich inhibiert werden kann<sup>31-35</sup>.

Die ersten antiangiogenen therapeutischen Strategien finden sich derzeit in klinischer Erprobung<sup>36</sup>. Über die biologische Bedeutung sowie die Regulation von VEGF und seiner Rezeptoren speziell im humanen CCC liegen bisher wenige und zum Teil konträre experimentelle Daten vor<sup>37;38</sup>. Insbesondere bleibt derzeit unklar, welche Faktoren zu einer Induktion der VEGF Expression im humanen CCC beitragen und für den “angiogenic switch“ mitverantwortlich sind.

#### **1.4 Transforming growth factor $\beta$ -1 (TGF $\beta$ -1)**

TGF $\beta$ -1 ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin, das in drei Isoformen exprimiert wird, die sich hinsichtlich ihrer Rezeptor-Bindungsaffinität unterscheiden<sup>39;40</sup>. TGF $\beta$ -1 wird von den Zellen als inaktives Propeptid sezerniert (latentes TGF $\beta$ -1) und in der extrazellulären Matrix als Komplex, bestehend aus dem inaktiven Propeptid und einem TGF $\beta$ -Bindungsprotein gespeichert<sup>40</sup>. Die biologisch aktive Form besteht aus einem Homodimer von je 112 Aminosäuren. *In vivo* wird aktives TGF $\beta$ -1 entweder durch das Matrixglykoprotein Thrombospondin-1 von dem inaktiven Komplex gelöst<sup>41</sup> oder durch Proteasen wie Kathepsin und Plasmin abgespalten<sup>42</sup>. Die biologische Wirkung von TGF $\beta$ -1 wird durch zwei spezifische Zelloberflächenrezeptoren (T $\beta$ RI und T $\beta$ RII) vermittelt. Ligandenbindung initiiert die Dimerisierung dieser Rezeptoren, die dann als Serin/Threonin-Kinasen Effektor-Moleküle die Smad-Familie von Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so aktivieren. Mit dem TGF $\beta$ -Rezeptor sind Smad-2 und Smad-3 direkt assoziiert, die daher auch als Rezeptor-regulierte Smads (R-Smads) bezeichnet werden. Nach Aktivierung bilden sie mit zytosolischem Smad-4 heteromultimere Komplexe, die dann in den Zellkern translozieren und dort die Expression von TGF $\beta$ -1 Zielgenen steuern können (Übersichten<sup>39;43</sup>). Zu diesen zählen unter anderem weitere Mitglieder der Smad-Familie, Smad-6 und Smad-7, die im Sinne eines negativen Feedbacks durch kompetitive Bindung an den Typ I Rezeptor die TGF $\beta$ -Signalkette unterbrechen können (Übersichten<sup>44-46</sup>). Vereinfacht führt TGF $\beta$ -1 in Zellen epithelialen Ursprungs zu einer Wachstumsinhibition, während Zellen mesenchymalen Ursprungs in ihrem Wachstum

stimuliert werden. Diese Zuordnung trifft allerdings in transformierten Zellen häufig nicht mehr zu. So wird in Karzinomzellen häufig ein Verlust oder auch die Umkehrung der antiproliferativen Wirkung von TGF $\beta$ -1 beobachtet. Für verschiedene gastrointestinale Neoplasien konnte belegt werden, dass TGF $\beta$ -1 die Tumorprogression fördert. Hierzu zählen Pankreas-<sup>47</sup>, Kolon-<sup>48</sup> und, wie kürzlich berichtet auch cholangiozelluläre Karzinome<sup>49</sup>. Für den Verlust der mitoseinhibitorischen und proapoptotischen Effekte in Karzinomen scheinen inaktivierende Mutationen auf unterschiedlichen Ebenen der TGF $\beta$ -Signaltransduktionskaskade verantwortlich<sup>50;51</sup>. Häufig sind jedoch nur selektive Ausschnitte der TGF $\beta$ -1 vermittelten Signaltransduktion inaktiviert, wodurch Funktionen von TGF $\beta$ -1, die eine Tumorprogression fördern können, typischerweise erhalten sind. Hierbei erscheint die TGF $\beta$ -1 vermittelte Stimulation von VEGF und die resultierende Tumorneoangiogenese von zentraler Bedeutung<sup>52-56</sup>. Saadeh<sup>26</sup> und Frank<sup>56</sup> konnten in humanen Osteoblasten und humanen Keratinozyten eine Induktion des VEGF Proteins durch TGF $\beta$ -1 belegen. Zwei weitere Arbeiten, die eine TGF $\beta$ -1 vermittelte Induktion der VEGF-mRNA in murinen Osteoblasten<sup>54</sup> und in humanen Adenokarzinomzellen der Lunge<sup>21</sup> belegen konnten, lassen vermuten, dass die Mechanismen der TGF $\beta$ -1 vermittelte VEGF-Induktion auf prätranslationaler Ebene stattfinden. Es bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch unklar, durch welche molekularen Mechanismen TGF $\beta$ -1 zur Stimulation von VEGF führt. Chua et al<sup>54</sup> konnten eine transkriptionelle Aktivierung des VEGF Promotors in murinen Osteoblasten nachweisen. Ob dieser Mechanismus jedoch auch bei epithelialen Tumoren und im besonderen im humanen CCC bedeutsam ist, blieb bislang unklar.

## **1.5 Zielsetzung**

Die Expressionsmuster von VEGF, TGF $\beta$ -1 und den jeweiligen Rezeptoren im humanen cholangiozellulären Karzinom wurden bislang nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der Mechanismen der Expression von VEGF und TGF $\beta$ -1 *in vivo* sowie die Analyse möglicher funktioneller Interaktionen auf molekularbiologischer Ebene *in vitro*.