

## 5 Diskussion

Eine mögliche Ursache für den malignen Phänotypus des humanen CCCs kann durch die Beobachtung begründet sein, dass Tumorwachstum und Metastasierungsverhalten entscheidend von der Induktion der Tumorangiogenese abhängen<sup>63;64</sup>. Über die für den "angiogenic switch" verantwortlichen und an der malignen Transformation von humanen Cholangiozyten beteiligten Faktoren ist bisher wenig bekannt. Diese Arbeit sollte erstmalig Faktoren identifizieren, die an der Tumorangiogenese des CCCs beteiligt sind.

Die Bestimmung der mikrovaskulären Gefäßdichte (MVD) ist ein wertvoller prognostischer Parameter bei verschiedenen soliden Malignomen<sup>65</sup> war, in CCCs bisher aber noch nicht untersucht worden. Unter Verwendung eines endothelspezifischen Antikörpers wurden Gefäße in Arealen mit einer hohen Gefäßdichte, sogenannten "hot spots"<sup>60</sup>, gezählt und eine mittlere MVD von  $126 \pm 45$  Gefäßen/ $0,74 \text{mm}^2$  (n=19) ermittelt. Dieser Wert liegt ungefähr in dem Bereich der mit derselben Methode bestimmten MVD von Tumoren, die als gut vaskularisiert gelten, wie zum Beispiel Mammakarzinomen ( $101 \pm 49$ ) oder Prostatakarzinomen ( $77 \pm 32$ )<sup>60</sup> und weist auf einen hohen Anteil tumorassoziierter Angiogenese im humanen CCC hin.

In Anbetracht des hohen Vaskularisierungsgrades des CCCs schien die Charakterisierung des VEGF/VEGF-Rezeptorsystems interessant, da VEGF eine zentrale Rolle für die Regulation der Tumorneoangiogenese spielt und der VEGF Signaltransduktionsweg derzeit eines der vielversprechendsten Ziele für einen antiangiogenen Therapieansatz darstellt<sup>66</sup>. Zwei immunhistochemische Studien haben bisher die VEGF Expression im humanen CCC untersucht und kamen zu divergierenden Ergebnissen<sup>37;38</sup>. Die vorliegende Untersuchung konnte in allen 19 untersuchten CCCs eine VEGF Proteinexpression nachweisen. Diese Daten stimmen mit den Untersuchungen von Kawahara et al<sup>37</sup> überein, die eine VEGF Immunoreaktivität in 100 % der CCCs demonstrierten. Im Gegensatz hierzu wiesen Hida et al<sup>38</sup> VEGF in 31% der untersuchten CCCs nach.

Immunhistochemische Untersuchungen können nicht zwischen intrazellulärem und rezeptorgebundenem VEGF diskriminieren und somit auch nicht zum Nachweis des zellulären Ursprungs des Zytokins dienen. Aus diesem Grund wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt und nachgewiesen, dass exklusiv cholangiozelluläre Tumorzellen den zellulären Ursprung von VEGF *in vivo* darstellen. Es fiel eine besondere Akzentuierung der VEGF-mRNA Expression im Bereich perinekrotischer Tumorzellareale auf. Dies wurde bereits in

anderen soliden Tumoren, wie dem hepatozellulären Karzinom<sup>27</sup>, dem Kolonkarzinom<sup>67</sup> und humanen Gliomen<sup>68</sup> beobachtet. Eine vermehrte VEGF Expression in Tumorbereichen mit einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck könnte auf eine mögliche Rolle von lokaler Hypoxie als Stimulanz für die Induktion der VEGF Expression hinweisen<sup>24</sup>.

Die Wirkungen von VEGF werden in parakriner Weise über die beiden Thyrosinkinaserzeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 vermittelt. Die Expression dieser Rezeptoren im CCC ist bisher noch nicht untersucht worden. Mittels Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung wurde die Expression von VEGFR-1 in 15 von 19 und VEGFR-2 in 10 von 19 Tumorproben nachgewiesen. VEGF Rezeptor mRNA und Protein wurden nur über Endothelzellen exprimiert. Die VEGF Rezeptoren werden von Endothelien in nicht transformierten Geweben nicht exprimiert, während es im Rahmen der Tumorneoangiogenese zu einer Expression beider Rezeptoren kommt<sup>67-69</sup>. Diese Beobachtung legt die Vermutung, dass nicht nur VEGF, sondern auch seine Rezeptoren im Rahmen der malignen Transformation des CCC hochreguliert sind.

Es wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren, die das VEGF-Gen aktivieren, in unterschiedlichen Zellsystemen beschrieben, die möglicherweise auch im CCC zu einer VEGF Aktivierung führen: (i) Tumorphypoxie, wie durch die verstärkte VEGF-mRNA Expression im Bereich perinekrotischer Tumorzellareale in vorgelegter Studie belegt; (ii) genetische Veränderungen, wie zum Beispiel *K-ras* aktivierende Mutationen und Expression von mutiertem p53, beides Alterationen, die im CCC beschrieben sind<sup>70,71</sup> (iii) schließlich können sowohl verschiedene Zytokine wie EGF, PDGF, IL-6, TGF $\beta$ -1, als auch oxidativer Stress zu einer Induktion von VEGF führen<sup>19,21,58</sup>. Unter diesen Faktoren spielt TGF $\beta$ -1 eine hervorgehobene Rolle im Rahmen von Lebererkrankungen und wirkt in der Leber als Regulator von Zellproliferation<sup>72</sup>, Matrixsynthese<sup>73</sup> und Apoptose<sup>74</sup>. Kürzlich konnten Yokomuro et al<sup>49</sup> zeigen, dass es in CCC Zelllinien zu einem Verlust der TGF $\beta$ -1 vermittelten mitoinhibitorischen und proapoptischen Effekte kommt, was auf die Rolle von TGF $\beta$ -1 im Rahmen der malignen Transformation des CCCs hindeutet. Es ist bekannt, dass bei anderen gastrointestinalen Malignomen, wie zum Beispiel Pankreaskarzinomen<sup>47</sup> und Kolonkarzinomen<sup>48</sup> inaktivierende Mutationen im Bereich der TGF $\beta$ -1 Signaltransduktionskaskade zu malignen Transformation der genannten Gewebe beitragen. Die Stimulation von VEGF stellt einen weiteren möglichen Mechanismus der TGF $\beta$ -1 induzierten

Tumorgenese dar<sup>52;54;56</sup>. Daher wurden die Untersuchungen auf die möglich funktionelle Interaktion zwischen TGF $\beta$ -1 und VEGF im CCC beschränkt.

In einer vorherigen Studie wurden Mesenchymzellen als zellulärer Ursprung von TGF $\beta$ -1 in der Leber benannt<sup>75</sup>. Die vorliegende Arbeit zeigte TGF $\beta$ -1 Immunreaktivität über Mesenchymzellen in 15 von 19 und über Tumorzellen in 4 von 19 Tumorproben. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Arbeiten, wobei Vogelbruch et al<sup>76</sup> TGF $\beta$ -1 Immunreaktivität über Mesenchymzellen in 25 von 30 CCCs und Chen et al<sup>77</sup> Immunreaktivität überwiegend über Tumorzellen selbst, nachweisen konnten. Die Expressionsmuster der TGF $\beta$ -1 Rezeptoren sind bisher nicht untersucht worden. Die vorgelegte Arbeit zeigte eine starke Immunreaktivität beider TGF $\beta$ -1 Rezeptoren über Tumorzellen in allen untersuchten CCCs. Diese Beobachtung legt nahe, dass Tumorzellen als Ziel einer möglichen TGF $\beta$ -1 Wirkung dienen. Über vorausgegangene Arbeiten hinausgehend konnte somit erstmalig die Expression von VEGF, TGF $\beta$ -1 und der jeweiligen Rezeptoren im CCC nachgewiesen werden.

Um die Hypothese einer parakrinen und/oder autokrinen Interaktion der beiden Zytokine zu überprüfen wurde ein *in vitro* Zellsystem bestehend aus den beiden CCC Zelllinien TFK-1 und EGI-1 etabliert. Mittels RT-PCR, sowie VEGF und TGF $\beta$ -1 spezifischen ELISAs konnte in Übereinstimmung mit den *in vivo* Daten eine Koexpression der beiden Zytokine demonstriert werden. Beide Zelllinien exprimierten 3 von 5 bekannten VEGF Isoformen (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub>) und sezernierten sowohl VEGF als auch TGF $\beta$ -1 in die Zellkulturüberstände. Desweiteren führte Inkubation mit TGF $\beta$ -1 zu einem signifikanten, zeitabhängigen Anstieg der VEGF Proteinkonzentration. Diese Ergebnissen stimmen mit Arbeiten an humanen Osteoblasten<sup>55</sup> und humanen Keratinozyten<sup>56</sup> überein. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die Antagonisierung von TGF $\beta$ -1 mit einem neutralisierenden TGF $\beta$ -1 Antikörper zu einer Inhibition der VEGF Expression führt. Damit konnte erstmalig eine autokrine und parakrine Regulation der VEGF Expression durch TGF $\beta$ -1 nachgewiesen werden. Die biologische Bedeutung dieser Beobachtung wird durch eine Arbeit unterstützt, die eine Inhibition der Angiogenese durch neutralisierenden TGF $\beta$ -1 Antikörper, in einem "Angiogenesis disc system" beschreibt<sup>78</sup>.

Obwohl die stimulatorischen Effekte von TGF $\beta$ -1 auf die Expression von VEGF in einer Reihe von *in vitro* Systemen beschrieben worden sind<sup>21;52;55;79</sup>, bleiben die molekularen

Mechanismen, die zu einer Stimulation führen, weitgehend ungeklärt. Einzig Chua et al<sup>54</sup> beschreiben eine transkriptionelle Aktivierung des VEGF Gens durch TGFβ-1 in murinen MC3T3-E1 Osteoblasten. Um die molekularen Mechanismen der TGFβ-1 induzierten VEGF Stimulation in CCC Zellen zu untersuchen, wurde zunächst durch quantitative kompetitive RT-PCR gezeigt, dass TGFβ-1 die VEGF Expression vor der Translation der mRNA, also nicht zum Beispiel durch posttranslationale mRNA Prozessierung, zu regulieren scheint. Andere Arbeiten legen eine transiente Zunahme der VEGF-mRNA Konzentration in murinen Osteoblasten und Adenokarzinomzellen der Lunge<sup>21;54</sup> (über maximal 6 Stunden) nahe. Im Gegensatz dazu zeigt die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Kinetik der VEGF-mRNA Induktion durch TGFβ-1 in CCC Zellen eine kontinuierliche Zunahme der VEGF-mRNA Konzentration über 48 Stunden.

Durch Transaktivierungsexperimente mit einem humanen VEGF-Reportergenkonstrukt konnte eine dosisabhängige Aktivierung des VEGF-Promotors in CCC Zellen nachgewiesen werden. 5' Deletionsanalysen identifizierten die -85 bis -53 Sequenz des humanen VEGF Promotors als notwendig für die basale Promotoraktivität und die TGFβ-1 Sensivität. Interessanterweise wird diese GC-reiche Sequenz in mehreren Arbeiten als entscheidend für die basale und regulative VEGF Promotoraktivität beschrieben, wie zum Beispiel (i) die PDGF vermittelte Stimulation in NIH3T3 Zellen<sup>57</sup>, (ii) die p42/p44 MAP Kinase vermittelte Stimulation in Fibroblasten<sup>80</sup>, (iii) die p73 vermittelte Inhibition in Leukämiezellen<sup>81</sup> und (iv) die Hypoxie vermittelte Induktion in Magenkarzinomzellen<sup>58</sup>.

Der -85 bis -50 Abschnitt des VEGF-Promotors enthält keine Smad bindenden Sequenzen, jedoch drei potentielle Sp1/3, zwei potentielle Egr-1 und eine potentielle AP2 Transkriptionsfaktorbindungssequenzen, die sich teilweise überlappen (Abbildung 8A). Durch Mutationsanalysen dieser Sequenzen konnte gezeigt werden, dass nur die Sp1/3 bindenden Sequenzen erforderlich für die TGFβ-1 Wirkungen sind. Weiterhin konnte in den Supershiftexperimenten demonstriert werden, dass zwar Sp1 an AP2 Bindungssequenzen, der Transkriptionsfaktor AP2 aber nicht an die mögliche AP2-Bindungssequenz bindet. Diese Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die zeigen konnten, dass Sp1 mit AP2- Bindungssequenz interagieren kann<sup>58;82</sup>.

Die biologische Wirkung von TGFβ-1 wird vornehmlich durch die Familie der Smad-Transkriptionsfaktoren vermittelt. Smad-Proteine binden direkt an DNA-Regionen die TCGTAGAC-Sequenzen, sogenannte Smad bindende Elemente (SBE), enthalten<sup>83-85</sup>. Kürzlich

wurde erstmals beschrieben, dass auch Sp1 bindende DNA-Sequenzen TGF $\beta$ -1 sensibel reagieren können<sup>86</sup>. Entscheidend scheint hierbei die Interaktion von Smads mit Sp1, ohne dass die Smad Proteine direkt an DNA binden<sup>87-89</sup>. Dieser Wirkmechanismus ist für "klassische" TGF $\beta$ -1 Zielgene wie p21<sup>87</sup>, p15<sup>88</sup> und die Expression von  $\alpha$ 2(I) Kollagen<sup>89</sup> beschrieben worden. Der genaue molekulare Mechanismus, der zu der Interaktion zwischen Sp1 und Smads führt, ist bisher noch nicht bekannt. Es sind allerdings folgende Möglichkeiten denkbar: Smad's könnten (i) eine Oligodimerisierung von Sp1 induzieren, welche zu einer höheren Affinität an die Transkriptionsfaktorbindungssequenzen führt; (ii) zu einer Rekrutierung von weiteren Faktoren (p300 oder c-jun) führen, die Sp1 stabilisieren oder die transkriptionelle Aktivität von Sp1 erhöhen<sup>43</sup> oder (iii) über Phosphorylierung beziehungsweise Acetylierung die Aktivität von Sp1 steigern<sup>87</sup>. Derzeit ist nicht bekannt, welcher dieser Mechanismen entscheidend für die TGF $\beta$ -1 vermittelte Stimulation von VEGF ist. Die EMSA Analysen haben jedoch gezeigt, dass es nach TGF $\beta$ -1 Behandlung zu keiner Veränderung der Sp1-DNA und der Sp3-DNA Komplexe gekommen ist. Es scheint demnach unwahrscheinlich, dass eine Veränderung der Affinität der Sp-Transkriptionsfaktoren zu einer TGF $\beta$ -1 vermittelten Transaktivierung führt. Daraufhin wurde die transaktivierende Wirkung von TGF $\beta$ -1 auf Sp1- und Sp3-Gal4 Fusionsproteine untersucht. Es zeigte sich, dass Sp1/Gal4-, nicht aber Sp3/Gal4-Fusionsproteine eine TGF $\beta$ -1 vermittelte Gal4 Reportergenkonstrukt-Sensitivität induzierten. Demnach scheint Sp1 und nicht Sp3 durch TGF $\beta$ -1 aktiviert zu werden.

Es konnte so erstmalig gezeigt werden, dass TGF $\beta$ -1 einen proangiogenen Faktor (VEGF) transkriptionell, Sp1 vermittelt, reguliert. Es bleibt allerdings unklar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, welche der beschriebenen molekularen Modifikationen des Transkriptionsfaktors Sp1 verantwortlich für die TGF $\beta$ -1 vermittelte Transaktivierung des VEGF Promotors sind.