Onkologie

Das Angiopoietin-ähnliche Protein 4 hemmt die Metastasenbildung

**Die „begleitende Tumorresistenz“ bezeichnet ein Phänomen, bei dem ein Primärtumor das Wachstum von Metastasen unterdrückt. Die molekularen Mechanismen dieser Beeinflussung sind bisher kaum verstanden. Jetzt hat eine deutsche Forschergruppe das proteolytisch abgespaltene N-terminale Fragment des Angiopoietin-ähnlichen Proteins 4 als die Substanz identifiziert, die das Metastasenwachstum inhibiert. Das Fragment hemmt den Wnt-Signalweg mit der Folge, dass die Gefäßneubildung bei Metastasen unterdrückt wird. Tierexperimente bestätigten das therapeutische Potenzial des N-terminalen Fragments als antimetastatisch wirkendes Mittel.**

Der Heilungserfolg einer Krebsbehandlung hängt entscheidend davon ab, ob sich bereits Tochtergeschwülste (Metastasen) im Körper des Patienten gebildet haben. Denn Metastasen verschlechtern die Überlebenschancen eines Krebspatienten in vielen Fällen dramatisch. Bemerkenswerterweise bilden sich solche lebensbedrohliche Tochtergeschwülste häufig erst, nachdem der Primärtumor chirurgisch entfernt worden ist. Dieses Phänomen ist bekannt als „begleitende Tumorresistenz“ (engl. *concomittant tumour resistance*) und kommt besonders häufig bei Brustkrebs und schwarzem Hautkrebs (malignem Melanom) vor. Die Ursachen und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für die begleitende Tumorresistenz waren bisher unbekannt. Es gab aber Hinweise darauf, dass anscheinend der Primärtumor das Wachstum von Tochtergeschwülsten unterdrückt. Jetzt ist es Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg und vom European Center for Angioscience (ECAS) in Mannheim gelungen, das Phänomen der begleitenden Tumorresistenz zu entschlüsseln.

Frühere Studien deuteten darauf hin, dass proangiogene und antiangiogene Cytokine (Faktoren, die das Wachstum von Blutgefäßen fördern bzw. hemmen) eine entscheidende Rolle bei der begleitenden Tumorresistenz spielen. Dabei rückte der Wachstumsfaktor Angiopoietin-ähnliches Protein 4 (engl. *angiopoietin-like protein 4*, ANGPTL4; Abb.) in den Fokus des Interesses. Allerdings waren die Studienergebnisse widersprüchlich: Einige Arbeiten konnten zeigen, dass ANGPTL4 proangiogene und krebsfördernde Eigenschaften besitzt, weil andere Studien für das Protein antiangiogene Wirkungen feststellten. Darüber hinaus wurde gefunden, dass sezerniertes ANGPTL4 proteolytisch in zwei Fragmente gespalten wird - in ein N-terminales (nANGPTL4) und ein C-terminales (cANGPTL4) Fragment (Abb). Diese Befunde veranlassten die Forscher und Forscherinnen vom DKFZ und ECAS, die Hypothese aufzustellen, dass die proteolytische Spaltung von ANGPTL4 dessen krebsfördernde und -hemmende Aktivitäten reguliert.

Als primären Ursprungsort für ANGPTL4 wurden Krebszellen identifiziert, was im Einklang mit früheren Erkenntnissen steht, dass das Cytokin ein negativ prognostischer Marker für das Fortschreiten einer Tumorerkrankung ist. Um die Verteilung von ANGPTL4 und dessen N- und C-terminalen Fragmenten in Körper zu bestimmen, wurden Tumorbiopsien und Blut von Hautkrebspatienten mit spezifischen anti-nANGPTL4 und anti-cANGPTL4 Antikörpern untersucht. In allen untersuchten Tumorbiopsien wurden intaktes ANGPTL4 sowie die beiden Fragmente nachgewiesen. Hingegen wurden im Blut der Patienten nur ungespaltenes ANGPTL4 und das nANGPTL4-Fragment gefunden, aber kein cANGPTL4-Fragment. Darüber hinaus zeigten quantitative Analysen, dass nANGPTL4 in einer deutlich höheren Konzentration im Blut vorkommt als intaktes ANGPTL4. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für Patienten gefunden, die an Lungenkrebs erkrankt waren. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass ungespaltenes ANGPTL4 sich überwiegend im Primärtumor befindet, während das nANGPTL4-Fragment hauptsächlich im Blut vorkommt.

Um die Rolle des intakten ANGPTL4 zu bestimmen, wurde die Expression des Cytokingens in menschlichen A375-Melanomzellen mittels shRNAs (*short hairpin* RNAs) herunterreguliert. Anschließend wurden die A375-Zellen mit herunterreguliertem ANGPTL4-Gen und nicht-modifizierte A375-Zellen in die Haut von immundefizienten Mäusen implantiert. Es wurde jedoch kein Unterschied in der Vermehrung zwischen Kontrollzellen und A375-Zellen mit herunterreguliertem ANGPTL4-Gen festgestellt. Daraufhin wurde die Vaskularisierung (Gefäßversorgung) der in den Mäusen gewachsenen Tumore untersucht. Verglichen mit Kontrolltumoren hatte die Tumore, bestehend aus A375-Zellen mit herunterregulierten ANGPTL4-Gen, eine deutlich geringere Vaskularisierung. Die Angiogenese-induzierende Wirkung von ANGPTL4 konnte mittels eines Sphäroid-Angiogenese-Tests und rekombinantem Cytokin validiert werden. Um zu untersuchen, ob die proangiogene und krebsfördernde Funktionen von ANGPTL4 durch proteolytische Spaltung moduliert werden, wurden die cANGPTL4- und nANGPTL4-Fragmente in zwei verschiedene Mauskrebszelllinien (LLC-Lungen-Karzinom-Zellen und B16F10-Melanom-Zellen) mit niedriger endogener ANGPTL4-Konzentration exprimiert. Die Expression von cANGPTL4 in beiden Krebszelllinien erhöhte das Wachstum des Primärtumors, während eine Expression von nANGPTL4 keinen Einfluss darauf zeigte. Allerdings beeinflusste cANGPTL4 nicht die Zellproliferation, sondern förderte die Vaskularisierung der Tumore. Die Ergebnisse dieser Experimente offenbaren, dass die proangiogene und krebsfördernde Funktion von ANGPTL4 durch die C-terminale Domäne des Cytokins vermittelt werden.

Eine mögliche Funktion des nANGPTL4-Fragments zeigte sich im Rahmen einer prospektiven longitudinalen Studie mit 10 Hautkrebspatienten. Dabei stellte sich heraus, dass der nANGPTL4-Blutspiegel mit fortschreitendem Wachstum von Metastasen signifikant abnahm. Der ANGPLT4-Blutspiegel war dagegen vom Krebsstadium unbeeinflusst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nANGPTL4 für das verzögerte Wachstum von Metastasen bei Krebspatienten verantwortlich zu sein scheint.

Als Grund für die unterschiedlichen Wirkungen von cANGPTL4 und nANGPTL4 wurden deren unterschiedliche Beeinflussung der [Tumorgefäßbildung](https://www.linguee.com/german-english/translation/Gef%C3%A4%C3%9Fbildung.html) vermutet. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden *In-Vitro*-Sphäroid-Keimungstests unter Verwendung von humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVECs) in Gegenwart des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors A (VEGF-A) durchgeführt. Die Versuche zeigten, dass ANGPTL4 und cANGPTL4 eine starke proangiogene Antwort auslösten. Im Gegensatz dazu zeigte nANGPTL4 eine Hemmung der VEGF-A-erzeugten vaskulären Keimung. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem Hornhaut-Angiogenese-Assay erhalten, einem *In-Vivo*-Test, bei dem Cytokin-haltige Pellets in korneale Mikrotaschen in den Augen von Mäusen implantiert wurden. Wie beim *In-Vitro*-Test bewirkte cANGPTL4 in Gegenwart von VEGF-A eine starke Vaskularisierung der Hornhaut, während nANGPTL4 die VEGF-A-induzierte Gefäßbildung deutlich hemmte. Diese Versuchsergebnisse bestätigen die proangiogene bzw. antiangiogene Wirkung von cANGPTL4 bzw. nANGPTL4.

Um zu untersuchen, ob die antiangiogene Wirkung von nANGPTL4 durch Bindung an das Syndecan-4 Protein (SCD4), welches kürzlich als ein Rezeptor für nANGPTL4 identifiziert worden war, vermittelt wird, wurde die Expression von SDC4 in HUVECs mittels shRNA herunterreguliert. Im Vergleich zu HUVECs, die mit Kontroll-shRNAs transduziert wurden, verhinderte nANGPTL4 in HUVECs mit herunterreguliertem SCD4 die VEDF-A-induzierte Angiogenese nicht. Des Weiteren wurde gefunden, dass die Bindung von nANGPTL4 an SCD4 zu einer Herunterregulierung von Zielgene des Wnt-Signalwegs in HUVECs führt. Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Gefäßbildung und Gefäßreifung. Diese Experimente haben gezeigt, dass die antiangiogene Wirkung von nANGPTL4 durch Bindung an SCD4 vermittelt wird, was eine Herunterregulierung des Wnt-Signalwegs in Endothelzellen bewirkt.

Um die Rolle des vom Primärtumor produziertem ANGPTL4 sowie dessen proteolytische Fragmente beim Metastasenwachstum *in vivo* zu ermitteln, wurden ANGPTL4, cANGPTL4 oder nANGPTL4 exprimierende B16F10-Melanom-Zellen in Mäusen implantiert. Sieben Tage später wurden den Mäusen B16F10-Melanom-Wildtypzellen intravenös injiziert. Die Überexpression von ANGPLT4 oder nANGPLT4 bewirkte eine deutlich geringere Metastasierung der Lunge durch die injizierten B16F10-Melanom-Wildtypzellen. Außerdem wurde gefunden, dass die geringe Metastasenbildung in Mäusen mit ANGPLT4-exprimierendem Primärtumor auf das N-terminale Fragments des Cytokins zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu förderte die Überproduktion von cANGPTL4 die Bildung von B16F10-Wildtyp-Metastasen in den Lungen der Versuchstiere. Diese Daten deuten darauf hin, dass das im Blut freigesetzte nANGPTL4 für die Hemmung des Wachstums von Metastasen verantwortlich ist.

Zur Bestimmung des therapeutischen Potenzials von nANGPTL4 wurden Mäuse mit rekombinantem nANGPTL4 (7 μg) oder phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; Kontrolle) zwei Tage vor der Injektion von Krebszellen konditioniert. Anschließend wurde den Mäusen zweimal pro Woche für 14 Tage entweder nANGPTL4 oder PBS intravenös injiziert. Verglichen mit den PBS-behandelten Mäusen unterdrückte die Gabe von rekombinanten nANGPTL4 die Metastasenbildung in den Versuchstieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch adeno-assoziierte Viren (AAV) vermittelte Heraufregulierung von nANGPTL4 erhalten. Weitere Experimente zeigten zudem, dass die Angiogenese-regulierenden Signalwege und die Wnt-Signalweiterleitung durch die Behandlung mit nANGPLT4 im Primärtumor und in Metastasen herunterreguliert waren. Zusammengenommen zeigen diese Befunde, dass therapeutisch verabreichtes nANGPTL4 auch *in vivo* das Wachstum von Metastasen durch Herunterregulierung des Wnt-Signalwegs und Inhibierung der Vaskularisierung hemmen kann.

Diese Studie hat die molekularen Grundlagen des Phänomens der begleitenden Tumorresistenz weitgehend aufgeklärt. Das durch proteolytische Spaltung des Wachstumsfaktors Angiopoietin-ähnliche Protein 4 (ANGPTL4) gebildete N-terminal Fragment des Cytokins (nANGPTL4) wurde als Schlüsselmolekül der begleitenden Tumorresistenz identifiziert. Es wurde gezeigt, dass das im Blut vorkommende nANGPLT4 das Metastasenwachstum dadurch hemmt, indem es die Gefäßneubildung bei Tochtergeschwülsten unterdrückt. Wo das vom Primärtumor gebildete ANGPLT4 im Körper gespalten wird, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Als wahrscheinlicher Ort wurde entweder das Blut oder die Leber vermutet. Ob sich nANGPLT4 als Mittel zur Verhinderung von Metastasen bei Krebspatienten eignet, muss zunächst in weiteren vorklinischen Studien ermittelt werden.

[C. Hübers et al., J. Exp. Med. **220**, e20202595 (2023)].

*PD Dr. Dietmar Steverding, Norwich, England*



**Abb.** Schematische Darstellung der Struktur des Angiopoietin-ähnlichen Proteins 4. Der Wachstumsfaktor besteht aus 406 Aminosäuren und enthält vier funktionelle Domänen: ein Signalpeptid (SP, vermittelt die Translokation des Proteins ins endoplasmatische Retikulum für die Sekretion); ein Lipoproteinlipase-spezifisches Epitop (LPL, bewirkt eine Hemmung der Lipoproteinlipase); eine Coiled-Coil Domäne (CCD, vermittelt die Oligomerisierung des Proteins); und eine Fibrinogen-ähnliche Domäne (FÄD, vermittelt die Bindung an Integrine, wodurch die Angiogenese stimuliert wird). Die Stelle zur Spaltung des Wachstumsfaktors in sein N-terminales Fragment und sein C-terminales Fragment ist die Sequenz 161RRKR164. [Abb. D. Steverding]