



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Analyse der Bindung von Ap-1 Familienmitgliedern, Sp1 und einem AP-2 α -ähnlichen Faktor an verschiedene Regionen des Promotors des Urokinase-Rezeptor- (u-PAR-) Gens in einer großen Serie resezierter gastrointestinaler Karzinome – potenzielle Synergismen und klinische Relevanz *in vivo*

Autor: Tobias Biller
Institut / Klinik: Chirurgische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. H. Allgayer, PhD

Studien über die Transaktivierung von Genen über Promotorelemente sind bisher meist mit Tumorzelllinien und nicht mit reseziertem Tumorgewebe durchgeführt worden. Allerdings sind solche „*in vivo*-Experimente“ von großer Wichtigkeit, um die Erkenntnisse der Analysen transkriptioneller Vorgänge, die man aus Experimenten mit Tumorzelllinien gewonnen hat, auch *in vivo* nachweisen zu können. Nur auf der Basis solcher Experimente, die am ehesten die *in vivo*-Situation widerspiegeln, kann man mögliche neue molekulare Konzepte zur Diagnostik und Therapie entwickeln.

Der Urokinase Rezeptor (u-PAR) ist ein stark und heterogen N-glykosyliertes, cysteinreiches Protein mit einer relativen Masse von M_r 55,000-60,000 Da. Nach Bindung seines Liganden, des Urokinasetyp Plasminogenaktivators (u-PA), bewirkt er unter anderem den Plasmin-vermittelten Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibrin und Kollagen IV. Er wird in zahlreichen menschlichen Tumoren überexprimiert und ist signifikant mit der Invasion und Metastasierung wie auch mit einem negativen prognostischen Verlauf von Tumorerkrankungen assoziiert. Eine hohe u-PAR-Expression in Tumorzellen wird vor allem transkriptionell reguliert.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte eine tumorspezifische Bindung von Sp1 und eines AP-2-ähnlichen Faktors an die Promotorregion -152/-135 des mit Metastasierung assoziierten u-PAR-Gens in 60% von *in vivo*-reseziertem Tumorgewebe gezeigt werden. Versuche mit Tumor-Zelllinien legen eine zusätzliche, möglicherweise synergistische Rolle einer AP-1-Promotorregion (-190/-171) des u-PAR-Gens bei der Regulierung des u-PAR nahe. Diese Studie wurde durchgeführt, um zum einen die Bindung von Faktoren der AP-1-Familie an die Promotorregion (-190/-171) des u-PAR-Gens in reseziertem Tumor- und Normalgewebe für ein großes Patientenkollektiv zu analysieren und Untergruppen zu definieren, in denen die Bindung tumorspezifisch ist. Zum anderen sollen Transkriptionsfaktorbindungs-Muster an beide Promotorregionen des u-PAR *in vivo* untersucht und mögliche Synergismen nachgewiesen werden. Bei der ersten vorläufigen prognostischen Auswertung der Daten betrug die mediane Nachbeobachtungszeit der Patienten 30 Monate. Daraus werden erste Ergebnisse präsentiert und vorläufige prognostische Schlussfolgerungen gezogen.

Bei 121 Patienten wurden aus resezierten gastrointestinalen Tumoren und entsprechendem Normalgewebe nukleäre Extrakte hergestellt und mittels Electrophoretic Mobility Shift Assays die Transkriptionsfaktorbindung an die Region -190/-171 des u-PAR-Promotors untersucht. In Supershift-Experimenten wurden bei 26 Patienten mit kolorektalen Karzinomen mit spezifischen Antikörpern die einzelnen gebundenen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. Bei 89 Patienten konnte die Analyse der Region -190/-171 des u-PAR-Promotors mit der Analyse der Region -152/-135 kombiniert werden. Die Intensität der Bindung der Transkriptionsfaktoren wurde densitometrisch bestimmt. Durch ELISA wurden die u-PAR-Proteinmengen in den jeweiligen Geweben bestimmt. Die Patienten wurden für die prognostische Auswertung in Untergruppen (hohe u-PAR-Expression vs. niedrige u-PAR-Expression; Bindung aller dreier Transkriptionsfaktoren an beide u-PAR-Promotorelemente vs. den Rest) eingeteilt und deren Outcome bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 30 Monaten vorläufig miteinander verglichen (Kaplan-Meier-Analysen).

Eine tumorspezifische Bindung von AP-1 an die Region -190/-171 des u-PAR-Promotors wurde in 40 % der Patienten mit kolorektalen Karzinomen (n=103) und in 44 % der Patienten mit Magenkarzinomen (n=18) festgestellt. Bei der Supershift-Analyse der 26 kolorektalen Karzinome ergab sich folgendes Verteilungsmuster: c-Fos wurde in 58 %, c-Jun in 50 %, JunD in 39 % und Fra-1

in 4 % der Fälle tumorspezifisch gebunden. Die Bindung von AP-1 korrelierte signifikant mit den u-PAR-Proteinmengen im Normal- und Tumorgewebe ($p < 0,001$), wohingegen die Bindung von AP-2/Sp1 nur im Tumorgewebe mit den u-PAR-Proteinmengen signifikant korrelierte ($p < 0,001$). 62 % der kolorektalen Karzinome zeigten eine simultane Bindung von AP-1, AP-2 und Sp1, 11 % von AP-1 und AP-2, 16 % von AP-2 und Sp1, 4 % von AP-2 alleine, 3 % von AP-1 alleine und 0 % von Sp1 alleine. Die Bindung von AP-1-, AP-2- und Sp1 korreliert signifikant untereinander, die simultane Bindung von AP-1 und AP-2 zeigt die höchste Korrelation der Kombinationen mit u-PAR-Proteinmengen im Tumorgewebe. Für Patienten mit kolorektalen Karzinomen ergab sich ein Trend hin zu einer schlechteren Prognose sowohl bezüglich eines rezidivfreien Überlebens also auch bezüglich des insgesamten Überlebens, wenn in den Tumorgeweben die Bindung aller drei Transkriptionsfaktoren festgestellt werden konnte ($p > 0,05$).

Dies ist die erste Arbeit, die in einer großen Patientenserie an reseziertem Tumor- und Normalgewebe die tumorspezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an zwei wichtige Regionen des u-PAR-Promotors untersucht. Das AP-1-Bindungselement scheint ein weniger tumorspezifischer Regulator zu sein als das Sp1/AP-2-Motiv. Der hohe Prozentsatz an Fällen mit simultaner Bindung der Transkriptionsfaktoren an beide Promotorelemente und die Korrelation der kombinierten Bindung an diese Elemente mit hohen u-PAR-Proteinmengen in den Tumoren unterstützen die Hypothese eines Synergismus der Regionen -190/-171 und -152/-135 des u-PAR-Promotors *in vivo*. Für eine Subpopulation von ungefähr 25 % der Patienten mit kolorektalen Karzinomen, bei denen eine tumorspezifische u-PAR-Transaktivierung über beide Promotorelemente festgestellt werden konnte, wäre die Entwicklung spezifischer Medikamente gegen diese beiden Regionen bzw. gegen durch sie vermittelte Signalwege als ein neuer Therapieansatz denkbar.