

Markus Dechant  
Dr. med.

## **Untersuchungen zu Mutationen im Apoptosesignalweg in der kindlichen akuten lymphoblastischen Leukämie, dem autoimmun-lymphoproliferativen Syndrom und dem Osteosarkom**

Promotionsfach: Orthopädie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Volker Ewerbeck

Apoptose ist die häufigste Form des Zelltodes im Immunsystem. Sie reguliert das Wachstum der Lymphozyten und ist ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase. Zusätzlich ist es durch Apoptose möglich, potenziell für den Organismus gefährliche Zellen zu entfernen und somit der Entstehung von Krankheiten entgegen zu wirken. Andererseits kann eine Dysfunktion der Apoptose aber auch zur Entstehung von Krankheiten und zur Entwicklung von Therapieresistenzen beitragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Ermittlung von Mechanismen der Apoptoseresistenz durch genomische Analyse von zentralen Genen bzw. Genabschnitten der Apoptoserezeptoren und der Adaptermoleküle TRADD und FADD in den malignen Tumorerkrankungen ALL und Osteosarkom sowie in der nichtmalignen lymphoproliferativen Erkrankung ALPS.

Das Adapterprotein TRADD stellt bei den Signalkaskaden, welche über die Rezeptoren TNFR1 und DR3 verlaufen ein zentrales Protein dar. TNFR1 und DR3 spielen neben CD95 als Apoptoserezeptoren bei der Regulation der Lymphozytenhomöostase eine bedeutende Rolle. Ob diese Moleküle auch eine Rolle bei der Pathogenese von ALL oder ALPS spielen wurde in dieser Studie durch Sequenzanalysen der entsprechenden Gene an insgesamt 41 Kindern erkrankt an ALL und 10 Kindern erkrankt an ALPS untersucht. Im TRADD Gen eines B-ALL Patienten konnte eine missense Mutation und im TRADD Gen eines ALPS Typ Ia Patienten zwei missense Mutationen und eine silent Mutation identifiziert werden. Funktionelle Analysen ergaben eine gesteigerte Apoptoserate der Zellen, welche die identifizierten Mutationen im TRADD Gen tragen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können deshalb sowohl bezüglich der ALL als auch des ALPS keinen direkten Zusammenhang der identifizierten Mutationen mit der Pathogenese dieser Krankheiten herstellen. Allerdings konnte in Mausmodellen mit dereguliertem TRAF2 Signalweg ein Überlebensvorteil von B-Lymphozyten bzw. die Entstehung von B-Zell-Lymphoproliferativen Erkrankungen gezeigt werden. Da die Bindung von TRAF2 an TRADD von den identifizierten Mutationen aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb des TRADD Gens vermutlich negativ beeinflusst sind im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gezeigten pro-apoptotischen Wirkung auch anti-apoptotische Effekte der identifizierten Mutationen erklärbar. In einer weiteren Analyse wurden 15 Tumorproben von Osteosarkompatienten und 3 Osteosarkomzelllinien untersucht. Die Untersuchung beinhaltete alle Todesdomänen der Apoptoserezeptoren, die komplette codierende Sequenz des Apoptoserezeptor DR4 und die Adaptermoleküle TRADD und FADD. Es konnten insgesamt vier verschiedene Mutationen innerhalb der codierenden Sequenz des Apoptoserezeptors DR4 identifiziert werden. DR4 gehört zu den TRAIL-Rezeptoren. Eine Mutation betrifft die

Todesdomäne des Rezeptors und drei Mutationen den Bereich der Bindungsstelle des Rezeptorliganden. Diese Mutationen konnten bereits bei anderen Tumoren beschrieben werden. Innerhalb der Untersuchungsgruppen zeigte sich bei den Tumorpatienten und bei den Tumorzelllinien eine erhöhte Homozygotie im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Die Mutationen sind aufgrund ihrer Lokalisation sehr interessant und erlauben aufgrund von zusätzlich vorliegenden Erkenntnissen eventuell Rückschlüsse auf die Pathogenese der Erkrankung. Darüberhinaus wird das TRAIL-System bereits in vielen Studien als möglicher Effektorsignalweg zur Tumorthherapie erforscht wodurch sich zusätzliche Bedeutungen der identifizierten DR4 Mutationen für die Osteosarkomtherapie ergeben. Aufgrund der erhobenen Befunde und der bisherigen Studien kann es von Nutzen sein, zur Etablierung und Verbesserung der TRAIL-Therapie einen *in vitro* Sensitivitätstest zu etablieren, der es erlaubt, je nach Tumorart die optimale Kombination von TRAIL-Agonisten und Chemotherapeutikum zu finden, für eine maximale Tumorsensitivierung und eine minimale Beeinflussung normaler Zellen. Eine bestehende Fehlfunktion der TRAIL-Rezeptoren würde die Effektivität und den Nutzen dieser Therapieoptionen einschränken, so dass eine Mutationanalyse der TRAIL-Rezeptoren wie in dieser Arbeit gezeigt einen prognostischen Wert in Bezug auf den Erfolg einer Tumorthherapie mit TRAIL/APO2L, Rezeptorantikörpern und Chemotherapeutika haben kann. Zusätzlich könnte dadurch ein weiterer Schritt zum Verständnis der Pathogenese, der klinischen Ausprägung und möglicher Mechanismen einer Therapieresistenz erreicht werden. Eine Mutationsanalyse wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, könnte daher auch Anwendung bei weiteren Tumorarten finden, welche einer Therapie zugeführt werden, die das TRAIL-System als Effektormechanismus beinhaltet. Die Ergebnisse können dann zur Optimierung der Therapie und zur Optimierung der Risikostratifizierung beitragen.