

Marie-Charlotte von Brevern
Dr. sc. hum.

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bei der Entstehung von Speiseröhrenkrebs:
Neue Mechanismen, Genorte und klinische Anwendungsmöglichkeiten

Geboren am 24.04.1969 in Speyer
Reifeprüfung am 21.06.1988
Studiengang der Fachrichtung Biologie (Diplom) vom WS 1988/89 bis WS 1994/95
Vordiplom am 15.03.1991 an der Universität Würzburg
Diplom am 31.01.1995 an der Universität Würzburg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. H. Bartsch

Zusammenfassung:

Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wurde als ein wichtiger Schritt bei der Entstehung von Krebszellen erkannt. Die Aufklärung der daran beteiligten Prozesse sowie die Identifizierung von betroffenen Tumorsuppressorgenen stellt damit eine der Voraussetzungen für die Entwicklung von Krebspräventionsstrategien und gezielten Therapiemaßnahmen dar.

Eines der am häufigsten mutierten Gene in Humantumoren ist das p53 Tumorsuppressorgen. Seine Funktion als "Wächter des Genoms" hat es in den Mittelpunkt von klinischer und Grundlagenforschung gerückt, wobei als wichtiger Aspekt die Rolle von p53 als diagnostischer und prognostischer Marker zu klären ist.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden Speiseröhrenkrebspatienten (N=65) aus zwei Hochrisikoregionen in Frankreich und China daraufhin untersucht, ob sie Serumantikörper gegen mutiertes p53 aufweisen, und inwieweit sich deren Nachweis für die Früherkennung von Speiseröhrenkrebs eignet. Immunhistochemische, Mutations- und serologische Analysen hinsichtlich des p53 Status der Tumoren der Patienten wurden mit der anti-p53 Immunreaktion verglichen. In 25% der Patienten konnten anti-p53 Autoantikörper nachgewiesen und eine signifikante Korrelation zwischen der anti-p53 Seropositivität und tumorspezifischen p53 Genmutationen etabliert werden ($P < 0,01$). Dabei scheinen Mutationen, die zu einer strukturellen Veränderung von p53 führen, und weniger die Anreicherung des p53 Proteins per se für die Produktion von p53 Antikörpern in Speiseröhrenkrebspatienten verantwortlich zu sein. Insgesamt scheinen Wirtsfaktoren bei der Auslösung einer anti-p53 Immunreaktion zu überwiegen. P53 Mutationsanalysen in Tumoren der Patienten aus Guangzhou wurden im Rahmen einer epidemiologischen Pilotstudie ausgewertet, wobei Mutationsfrequenz und -muster mit Expositionsdaten verglichen wurden. Neben bekannten Risikofaktoren für Ösophaguskrebs wie Zigarettenkonsum wies die relativ hohe Mutationsfrequenz bei Nichtrauchern darauf hin, daß auch ernährungsbedingte Karzinogene wichtige Risikofaktoren für Speiseröhrenkrebs in der chinesischen Provinz Guangzhou darstellen. Eine früher in Patienten aus Guangzhou beschriebene Hotspotmutation im Kodon 176 konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Um aufzuklären, ob neben p53 auch andere Tumorsuppressorgene bei der Auslösung von sporadischem Speiseröhrenkrebs eine Rolle spielen, wurde in dem zweiten Teil der Arbeit das Tylose Ösophaguskrebsgen (TOCG) untersucht. Dieses Gen führt bei Trägern der seltenen Erbkrankheit Tylose zur Entwicklung von Speiseröhrenkrebs. Der häufig gefundene Allelverlust in der chromosomalen Region des TOC Gens in fast 70% der untersuchten sporadischen Speiseröhrenkarzinome (N=35) verstärkt den Verdacht, daß dieses Gen auch bei der Auslösung von nicht-familiären Speiseröhrentumoren eine Rolle spielt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die Retrotransposition normaler zellulärer Sequenzen in humanen Zellen in einem meßbaren Ausmaß stattfindet. Damit sollte die Hypothese getestet werden, ob dieser Prozeß in Form von insertioneller Mutagenese in der Karzinogenese von Relevanz sein könnte. Verschiedene in vitro Reportersysteme wurden durch stabile Transfektion humaner Zelllinien mit Reporterplasmiden etabliert, mit denen zum einen die Retrotranspositionsfrequenz normaler zellulärer Sequenzen, und zum

anderen die Aktivierbarkeit des Promotors eines aktiven LINE-1 Retrotransposons untersucht wurden. Erste Ergebnisse der in vitro Retrotranspositions-Reportersysteme bestätigten, daß solche Ereignisse tatsächlich in HeLa-Zellen und wie erstmals nachgewiesen auch in MCF-7 Zellen stattfinden. Die Häufigkeit, mit der solche Ereignisse stattfanden, war bei den einzelnen Zellklonen deutlich verschieden, obwohl in allen eine stabile Expression der Retrotranspositions-Reporter-kassette nachgewiesen werden konnte. Die Behandlung eines HeLa Zellklons (HJ #4-5) mit dem demethylierenden Agens Azacytidin oder durch längere stationäre Wachstumsbedingungen führten zu keiner meßbaren Steigerung der Retrotranspositionsereignisse. Um die Expression des stabil integrierten Reporterkonstruktes bzw. von endogenen LINE-Elementen, welche vermutlich die Retrotransposition beeinflussen, in den behandelten Zellen zu analysieren, wurde eine Multiplex RT-PCR entwickelt. Diese lieferte erste Hinweise auf einen Anstieg der Reporter-kassetten-mRNA nach Azacytidin-Behandlung und nach längerem stationären Wachstum. Mit dem zweiten etablierten Reportersystem für die Aktivierbarkeit des humanen LINE-1.2 Promotors in HeLa-Zellen wurde eine schnelle und einfache, zusätzliche Methode entwickelt, mit der sich der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Expression von LINE-Retrotransposons testen läßt. LINE-Promotor aktivierende Faktoren können dann in den etablierten Retrotranspositions-Reportersystemen auf ihre Bedeutung für die Retrotranspositionsfrequenz normaler zellulärer Gene untersucht werden.