

Christopher Janson

Dr. med.

## **Mutationsanalyse der aminoterminalen und coiled-coil Domäne von STAT3 bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie**

Geboren am 24.01.1974 in Freiburg i. Breisgau

Staatsexamen am 16.5.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktormutter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. Renate M. Weber

Die molekulare Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie ist in ihrer Gesamtheit noch nicht verstanden. Bekannt ist, daß Mutationen in den AML-Blasten zu Überfunktion und zu Funktionsverlust von bestimmten Genprodukten führen können, und dadurch eine klonale Expansion undifferenzierter Zellen verursachen können. Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie sind in der Mehrzahl von AML-Blasten hyperaktiviert. STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) sind latent exprimierte Transkriptionsfaktoren, die die zelluläre Signalweiterleitung von Zytokinen und Hormonen gewährleisten. STAT-Proteine vermitteln Signale bei unterschiedlichen zellphysiologischen Prozessen wie Differenzierung, Proliferation, Zellüberleben, Apoptose und Angiogenese. Damit spielen sie im Organismus eine wichtige Rolle in der fötalen Entwicklung, bei Entzündungsreaktion, Immunantwort und Transformation. Aktiviert werden STATs durch transiente und strikt regulierte Tyrosinphosphorylierung, die durch rezeptorassoziierte JAKs (Janus Kinasen) katalysiert wird. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass mehrere STATs in einer Vielzahl humaner Tumorzelllinien und primärer Tumoren einschließlich akuter und chronischer Leukämien konstitutiv aktiviert sind. In primären AML-Blasten wird von verschiedenen Arbeitsgruppen eine konstitutive Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 in 22%-100% der Patienten dokumentiert. STAT5 und vor allem STAT3 werden als Onkogene betrachtet, da sie die Transkription von Zyklin D1, D2, c-Myc und Bcl-xL induzieren und damit die Zellzyklusprogression, Transformation und Apoptoseunterdrückung direkt beeinflussen. Untersuchungen haben gezeigt, daß die hoch konservierte aminoternale Domäne der STATs wahrscheinlich durch die Assoziation mit Phosphatasen für die Deaktivierung der STATs kritisch ist. Die daran anschließende coiled-coil Domäne interagiert mit Proteinen

(PIAS), die ebenfalls die Aktivität der STATs hemmen. Mit dieser Arbeit sollte erstmals der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mutationen in der aminoterminalen und coiled-coil Domäne des STAT3-Transkriptionsfaktors und der Leukämogenese untersucht werden. Ein Mutationsscreening mittels RT-PCR-SSCP 45 AML-Patienten und drei gesunden Kontrollen wurde durchgeführt. Das Patienten-Kollektiv bestand aus 45 de novo AMLs. Die aus einer Knochenmarksbiopsie gewonnenen Zellen wurden mittels Dichtezentrifugation über Ficoll aufgearbeitet. Aus den gewonnenen mononukleären Zellen wurde RNA isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und die aminoterminalen 1128 bp mittels PCR in vier überlappenden Fragmenten amplifiziert. Die vier PCR-Fragmente wurden mit der SSCP-Methode analysiert. Stichproben wurden manuell (radioaktiv) oder maschinell mit dem Cycle-Sequencing-Verfahren sequenziert und mit der Wildtyp-Sequenz über eine Datenbank verglichen. Die SSCP-Bandenmuster zeigten keine Unterschiede zwischen AML-Proben untereinander und gegenüber den Proben der gesunden Probanden. Die Sequenzierung von Stichproben ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit der Wildtyp-Sequenz von STAT3. Es konnten keine Mutationen in der aminoterminalen und coiled-coil Domäne von STAT3 detektiert werden. Die bei AML sehr häufig auftretende konstitutive Aktivierung von STAT3 führt zu einer alterierten Genexpression zu Gunsten proliferativer und antiapoptotischer Signale. Im Rahmen der Leukämogenese wird STAT3 deswegen eine zentrale Rolle zugeschrieben. In dieser Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob Mutationen, die zu einer solchen Aktivierung führen könnten, in der aminoterminalen und coiled-coil Domäne von STAT3 bei AML vorhanden sind. Die Screening-Ergebnisse aus unserem Kollektiv zeigen keine Mutationen in diesen STAT3-Abschnitten und unterstützen diese Hypothese nicht. Verschiedene Mechanismen konstitutiver STAT3-Aktivierung in AML-Patienten sind mittlerweile identifiziert worden. In manchen AML-Blasten wurde eine autokrine und/oder parakrine Stimulation des JAK/STAT-Signalweges durch Zytokinüberproduktion nachgewiesen. Einige onkogene Tyrosinkinase (Bcr-Abl, TEL-JAK2) führen in seltenen AML-Fällen ebenfalls zur konstitutiven Aktivierung von STAT3. Die Hemmung von STAT3 in Tumoren mit konstitutiver STAT3-Aktivität blockiert Zellwachstum und induziert Apoptose. Das macht STAT3 zu einer attraktiven, vielversprechenden Zielstruktur neuer, mechanistischer Therapieansätze sowohl bei Leukämien als auch bei soliden Tumoren.