

Eva Pauly
Dr. med.

Mutationen im CD95-Signalweg als Mechanismus der Apoptoseresistenz bei der kindlichen akuten lymphatischen Leukämie und bei dem autoimmun-lymphoproliferativen Syndrom

Geboren am 03.01.1977 in Bensheim
Reifeprüfung am 20.06.1996 in Bensheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1997 bis WS 2003/2004
Physikum am 25.03.1999 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg, Boston, Genf und Lausanne
Praktisches Jahr in Heidelberg, Oxford und Edinburgh
Staatsexamen am 08.06.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. K.-M. Debatin

Die Apoptose ist die häufigste Form von Zelltod im Immunsystem und reguliert das Wachstum von Lymphozyten. Die Bindung des CD95-Liganden an den CD95-Rezeptor initiiert über eine Signalkaskade, an der das Protein FADD beteiligt ist, die so genannte CD95-vermittelte Apoptose. Eine Resistenz der T- und B-Lymphozyten der akuten lymphatische Leukämie (ALL) und des autoimmun-lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose trägt zur unkontrollierten Zellproliferation bei und ist Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Die Störung der CD95-vermittelten Apoptose durch Mutationen in zentralen Genen des CD95-Signalweges stellt einen hypothetischen Mechanismus der Apoptoseresistenz dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Ermittlung von Mechanismen der Apoptoseresistenz durch genomische Analyse von zentralen Genen (CD95-Rezeptor, CD95-Ligand, FADD) in der CD95-Signalkaskade und eine Charakterisierung gefundener Mutationen als Grundlage für weitere Studien zur Pathogenese in diesen pädiatrischen Tumorerkrankungen. Abhängig von Art und Lokalisation wurde durch Klonierung Aufschluss über Homo- oder Heterozygotität neuer Mutationen erhalten und durch weitere Analysen auf mRNA-Niveau eine Charakterisierung der gefundenen Mutationen im Kontext der Apoptoseresistenz ermöglicht.

Die vorliegende Mutationsanalyse ist die erste vollständige Analyse des kompletten FADD- und CD95-L-Genoms in einer größeren ALL-Patientengruppe (n=42), wobei auch bei den ALPS-Patienten eine umfangreichere Analyse (n=15) dieser Gene durchgeführt wurde. Insbesondere das ALPS ist ein interessantes Modell für den Zusammenhang zwischen Apoptoseresistenz und Mutation im CD95-Signalweg, weil eine Voraussetzung für die Diagnose die Resistenz gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose ist. Die Einzelschritte von der Blutprobe zur Gensequenz wurden daher in der vorliegenden Arbeit soweit optimiert, dass sie jetzt für die klinische Routine eingesetzt werden. Als Ergebnis der Analyse zeigte sich eine bemerkenswerte genetische Stabilität in beiden Genen mit keinem Polymorphismus bei der ALL und nur zwei „stummen“ Mutationen bei zwei ALPS-Patienten. Diese niedrige Mutationshäufigkeit in diesen Proteinen des CD95-Signalweges im Vergleich mit anderen Tumorerkrankungen legt eine Abhängigkeit des Mutationsrisikos von Faktoren wie der

Tumorentität und dem Lebensalter nahe. Außerdem scheint der ALPS-Typ Ib, der durch Mutation im CD95-L definiert ist, wesentlich seltener als angenommen.

In einer weiteren Analyse wurden jedoch sowohl im Exon als auch Intron wichtige Mutationen des CD95-Rezeptorgens bzw. CD95-Liganden gefunden, die zwar bei geringer Fallzahl keine statistische Aussagen zulassen, aber aufgrund ihrer Lokalisation in funktionell kritischen Bereichen besonders interessant sind. Alternative Mechanismen der Apoptoseresistenz, insbesondere eine wichtige Rolle der löslichen Proteinvarianten des CD95-Rezeptors und CD95-Liganden, sind denkbar. Eine Intron-Mutation führt bei einem ALPS-Patienten zu einem Basenaustausch (AG -> AC) im Intron 5 und konnte durch Klonierung im Rahmen dieser Arbeit auf eine heterozygote Mutation dieses Gens zurückgeführt werden. Dadurch wird die Spleißsignalsequenz AG verändert, was die mutagene Induktion eines alternativen Spleißproduktes wahrscheinlich macht. Ein Vergleich mit bekannten mutagenen Spleißvarianten legt eine vermehrte Sekretion des löslichen CD95-Rezeptors (sCD95) nahe. Diese Hypothese wird zusätzlich unterstützt durch den in dieser Arbeit mittels RT-PCR durchgeführten Nachweis von vermehrter sCD95-Expression in lymphoproliferativen Zelllinien im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Durch die bekannte apoptoseblockierende Wirkung des sCD95 ergäbe sich ein neuartiger Mechanismus der Apoptoseresistenz beim ALPS.

Ein Austausch des aromatischen Phenylalanins durch das aliphatische Leucin durch Transition im Exon 1 des CD95-Liganden-Gens bei einer von drei analysierten Osteosarkom-Zelllinien führt zu einer weiteren Hypothese. Die Mutation liegt in einem für die Synthese von löslichem CD95-Liganden kritischen transmembranen Bereich. Die Freisetzung des CD95-L wird durch eine Metalloprotease-vermittelte proteolytische Spaltung in dieser Region reguliert. Neben der Synthese eines vollständig defekten CD95-L ist eine vermehrte Produktion des löslichen CD95-Liganden wahrscheinlich. Eine solche vermehrte sCD95-L-Bildung ist von Ewing-Sarkomen bekannt und könnte im Sinne der „counterattack“ der Tumoren gegenüber attackierenden Zellen des Immunsystems interpretiert werden. In dieser Theorie eliminieren Tumore durch Sekretion von löslichem sCD95-L Immunzellen durch Auslösen der CD95-vermittelten Apoptose in den Immunzellen.

Weitere Analysen beider Paradigmen auf Proteinniveau könnten den Zusammenhang von Spleißmutation und Apoptoseresistenz bei ALPS einerseits und mutationsinduzierter CD95-L „tumor counterattack“ beim Osteosarkom unterstützen. Eine weiterführende Mutationsanalyse des CD95-Liganden bei Osteosarkomen scheint aufgrund der in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Mutation sehr viel versprechend.

Außerdem könnte der Vergleich der Mutationsfrequenz der Gene FADD und CD95-L bei den soliden Osteosarkomen mit der niedrigen Mutationsfrequenz bei den ALPS- und ALL-Patienten weiteren Aufschluss über die Verteilung solcher Mutationen solider versus hämatologischer pädiatrischer Tumoren geben. Damit liefert die Untersuchung des Genoms wichtige Hinweise für viel versprechende Studien zur Apoptoseresistenz im Proteom von pädiatrischen Tumoren und erlaubt in Korrelation zum klinischen Phänotyp neue, möglicherweise prognostisch relevante Klassifikationen zu treffen.