

Stephanie Alice Klappenecker
Dr. med.

Analyse der Ras - Aktivität in der Epidermis von Keratin – 5 – Promotor – Cyclooxygenase – 2 transgenen Mäusen

Geboren am 4.12.1982 in Schwäbisch Hall
Staatsexamen am 16.6.2009 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Boukamp

Krebserkrankungen sind häufig letal und werden wahrscheinlich in einigen Jahren die kardiovaskulär bedingten Todesfälle übertreffen und zur häufigsten Todesursache werden. In der Haut ist die Inzidenz von Tumoren am höchsten und in den letzten Jahren weiter angestiegen.

Eine konstitutive Überexpression des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2), das in vielen Situationen physiologisch transient induziert wird und dann neben der normalerweise konstitutiv exprimierten Isoform COX-1 eine Schlüsselrolle in der Prostaglandinbiosynthese einnimmt, ist charakteristisch für Hyperplasien, Dysplasien und epithelialen Tumoren bei Mensch und Maus. Dies gilt auch für Hauttumoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bereits etabliertes genetisch manipuliertes Mausmodell genutzt, in welchem COX-2 unter der Kontrolle des Keratin-5-Promotors in Keratin 5 positiven Geweben einschließlich den basalen Zellen der interfollikulären und follikulären Epidermis konstitutiv exprimiert wird. Die Epidermis dieser Tiere wurde im Vergleich zu Wildtypgewebe analysiert. Zu meinen Beobachtungen gehörte, dass die COX-2 überexprimierende, transgene Epidermis homozygoter Tiere der Linie 675^{+/+} bereits nach 7 Wochen den hyperplastischen Phänotyp aufweist.

Das Hauptziel meiner Arbeit war, festzustellen, ob die Überexpression des Enzyms im genannten Kompartiment transgener Epidermen mit einer erhöhten Aktivität des wachstumsfördernden Protoonkogens Ras und verschiedenen Ras abhängigen Effektorinasen korreliert.

Die Expressionsanalyse von präzipitiertem GTP-Ras Protein (Ras Activation Assay Kit) und ethanolisch präzipitiertem Ras-Protein aus Gewebehomogenaten mittels Immunblotanalysen lieferte keine Hinweise auf einen bedeutsamen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Genotypen. Dies gilt sowohl für Gesamt-Ras als auch für die aktivierte Form GTP-Ras. Die Ras-Effektor-Kinasen des MAP-Kinase-Signalwegs ERK 1 und 2, p38, JNK (SAPK) sowie des PI3K/AKT-Signalwegs lagen gemäß meiner Immunblotanalyse mittels spezifischen Antikörpern zur Erkennung spezifischer Phosphorylierungen ebenfalls nicht in aktivierter, phosphorylierter Form in transgenen Epidermen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen vor.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen an Pancreasproben dieser transgenen Mäuse. Meine Daten stützen allerdings die früher gezogenen Schlüsse, dass die epidermale Hyperplasie eher auf eine abnormale terminale Differenzierung als auf eine erhöhte Proliferationsrate zurückzuführen ist.

Im Hinblick auf die Expression des nukleären Transkriptionsfaktors NR4A2, einem publizierten COX-2-Zielgen in Kolonkarzinomzellen, wurde in der Epidermis K5 COX-2 transgener Mäuse auf RNA-Ebene (RT-PCR-Analyse) und auf Proteinebene (Immunblot- und

Immunfluoreszenzanalyse) keine erhöhte Expression des Proteins beobachtet, obgleich sich auf RNA-Ebene eine leichte Erhöhung bei 4 Wochen alten Tieren andeutete.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen somit den Schluss zu, dass die hyperplastische und dysplastische Transformation der Epidermis K5 COX-2 transgener Mäuse auf molekularer Ebene nicht mit einer Aktivierung des Ras-Proteins und/oder seiner Effektor-Kinasen einhergeht und auch keine Überexpression des Transkriptionsfaktors NR4A2 für die pathologische Veränderung verantwortlich zu sein scheint. Zukünftig durchzuführende Analysen der Genexpression in COX-2 transgener und normaler Epidermis mittels genomweiter Microarrays dürften geeignet sein, um COX-2 abhängige Zielgene zu definieren.