

Sebastian Korff

Dr. med

Untersuchung von Marker-Genen bei Mikrosatelliten-instabilen Tumoren und Entwicklung eines Computer-Verfahrens zur Hochdurchsatzanalyse von Fragmentanalysen aus humanen Mikrosatelliten-instabilen Tumoren.

Geboren am 23. November 1978 in Bonn-Duisdorf jetzt Bonn

3. Staatsexamen am 27. Oktober 2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie, Abteilung Angewandte Tumorbiologie

Doktorvater: Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. M. von Knebel Doeberitz

Das kolorektale Karzinom zählt in Deutschland zu einer der häufigsten Tumorentitäten. Bei Männern ist es die dritthäufigste Tumorentität, bei Frauen sogar der zweithäufigste Tumor. Insgesamt erkranken nach den Zahlen des Robert-Koch-Instituts jährlich rund 35.000 Menschen neu am kolorektalen Karzinom. In 3-5% aller kolorektalen Karzinome tritt ein autosomal-dominantes Syndrom auf, das HNPCC. Bei diesem handelt es sich nicht um die Entstehung der Tumoren nach der Adenom Karzinom Sequenz, sondern ist die Folge eines MMR-System Defektes, der zu Mikrosatelliteninstabilität führt. Ebenfalls kommt es bei ca. 15% der sporadischen Tumorerkrankungen zu einem Mikrosatelliteninstabilen Phenotyp. Diese mikrosatelliteninstabilen Tumore zeichnen sich durch bestimmte histopathologische und klinische Eigenschaften, wie einer erhöhten Überlebensrate oder einer erhöhten Lymphozyteninfiltration aus.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Überlebensrate oder Lymphozyteninfiltration stellt die Entstehung von Neopeptiden dar, die durch die Mikrosatelliteninstabilität auftreten. Bei Frameshiftmutationen entsteht das Neopeptid durch das verschobene Leseraster zusammen mit einer Proteintrunkierung und bietet für weitere Forschungen

auf dem Weg zu einer Vakzinierung oder in der Diagnostik als Tumormarker neue Möglichkeiten. Dafür werden die Neopeptide auf ihre Immunogenität, Spezifität und Sensitivität überprüft und letztlich in klinischen Studien die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten evaluiert.

In der Identifizierung von Genen mit einer hohen Mutationshäufigkeit und in der Identifizierung von Genen die an der Entwicklung der mikrosatelliteninstabilen Karzinogenese beteiligt sind, sowie der Unterscheidung von Genen die keine Relevanz für die Karzinogenese zeigen liegt der Schlüssel für ein weiterführendes Verständnis im Prozess der mikrosatelliteninstabilen Tumore.

Durch systematische Analyse von der Gengruppe der Phosphatasen (16 Gene) und der systematischen Analyse von Monorepeats der Länge 10 oder länger (92 Gene) konnten wir u.a. eine Protein Tyrosin Phosphatase (PTP N21) identifizieren, dessen Mutation bereits im Frühstadium der Entstehung des mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinoms nachgewiesen werden kann. Des Weiteren wurden 14 Gene identifiziert, die eine Mutationsfrequenz im Sinne einer Frameshiftmutation von 100% in kolorektalen Zelllinien aufweisen (*AF265236*, *AK055986*, *AK022329*, *AF119893*, *ENSG00000183683*, *AF161416*, *AK056768*, *BC012620*, *AF071111*, *M74720*, *AL157429*, *AF113539*, *AK021445*, *NT_010274*). Zudem konnten vier Gene identifiziert werden, die in humanen kolorektalen Tumorgeweben im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe eine Mutationsrate des jeweiligen Monorepeats von über 95% aufwiesen (*AF265236*, *BC016966*, *AF119907*, *AK055986*).

Davon abzugrenzen ist die Betrachtungsweise nach Woerner et al, durch die sich weitere der analysierten Gene ebenfalls als interessant darstellen, da sie Mutationsfrequenzen aufweisen die mehr als das Zweifache der normalen Standardabweichung von dem Mittelwert der Mutationsraten der entsprechenden Repeatlänge abweichen. Diese werden als Real Targets bezeichnet und unterliegen nach Woerner einem Mutations-Selektionsdruck in positiver oder negativer Richtung im Vergleich mit anderen bekannten Genen dieser Repeatlänge. Im Gegensatz zu den Genen mit hohen Mutationsraten, die nicht unweigerlich einem Real Target entsprechen müssen, konnten insgesamt 12 Real Target Gene gefunden werden (*AF161416*, *AF132956*, *AL512714*, *AF113539*, *L39061*, *M24350*, *AK022448*, *AK021445*, *AF395440*, *AK000022*, *BC018537*, *BC012192*). Mit negativem Selektionsdruck nach Woerner et al

wurden 11 Gene identifiziert (*AK055159*, *AK024445*, *NT_010498*, *AF152506*, *ENSG00000183914*, *AK021774*, *AF403384*, *AF006514*, *AL008635*, *L07541*, *L26953*), d.h. die Mutationsfrequenz der Mono Repeats liegen unterhalb der Prediktion der zu erwartenden Mutationsfrequenz aufgrund aller Mono Repeats der gleichen Länge.

Soweit die Funktion der Gene bekannt ist, zeigt sich in Datenbankanalysen eine Übereinstimmung zwischen Proteinfunktion und entsprechendem Selektionsdruck. Hier sei als Beispiele für negativen Selektionsdruck das Gen *AL008635*, welches für das Protein HMG2L1 kodiert, aufgeführt, einem als negativer Regulator des Wnt/beta-catenin Signaltransduktionsweg bekanntes Protein. Eine Mutation von *AL008635* und ein damit verbundenes Fehlen von HMG2L1 kann zu einer Überstimulation des wnt/b-Catenin Signaltransduktionsweges führen. Dies wiederum hat eine Überexpression von b-Catenin zur Folge. Die niedrige Mutationsfrequenz von *AL008635* mit 5,2% in Tumoren und 16,7% in Zelllinien lässt sich somit gut in den Gesamtzusammenhang einordnen und bestätigt den negativen Selektionsdruck auf eine Mutation in diesem Gen.

Ein Beispiel für ein Gen welches sich unter positivem Selektionsdruck befindet ist *AK022448* mit 70,2%. Dieses Gen kodiert für das Protein Advillin (p92), welches zur Gelsolin/Villin Familie gehört, im Kolon exprimiert wird und vor allem für die Morphologie von Mikrovilli eine Rolle spielt.

Ein weiteres Ziel, neben der Bestimmung von Kandidatengenen, die eine Rolle in der Entstehung von mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Tumoren spielen oder sich als therapeutisches bzw. diagnostisches Mittel eignen können, ist es, die bisherige Analysemethoden zu verbessern. Hierzu wurde ein Protokoll erarbeitet, mittels dessen Fragmentanalysen in großem Maßstab schnell und zuverlässig abgearbeitet werden können (High-Throughput-PCR). Des Weiteren wurde ein Computerverfahren entwickelt, welches dem Wissenschaftler objektiv und reproduzierbar empfiehlt, bestimmte Frameshiftmuster nach der Analyse als mutiert zu werten. Hiermit steht erstmals ein Standard für die Auswertung von Frameshiftmutationen bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren zur Verfügung. Der Auswertalgorithmus ist unter <http://corf.seltarbase.org> nutzbar.