

David Manuel Cordas dos Santos
Dr. med.

Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7 supports proliferation and viability of T-cell acute lymphoblastic leukaemia cells

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. Andreas Kulozik, PhD

Die akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) stellen die Mehrheit der Krebsfälle bei Kindern mit einem Alter unter 15 Jahren dar. Innerhalb dieser Leukämieart ist die T-Vorläufer-ALL (T-ALL) für bis zu 15% der Fälle verantwortlich. Sie ist durch eine maligne Transformation von T-Zell-Lymphoblasten definiert, die daraufhin in lymphatische Gewebe und das Knochenmark eindringen, wo sie ein Versagen der hämatopoetischen Funktionen verursachen. Auf einer zellulären Ebene sind bestimmte genetische Veränderungen wie das Vorkommen von Fusionsgenen unter Einbeziehung der Genloci für den T-Zell-Rezeptor, den Zellzyklus betreffende Deletionen von 9p21, oder ein mutierter NOTCH1-Signalweg besonders relevant. Darüber hinaus finden sich in ungefähr 10% der T-ALL Patienten Deletionen von 6q15-16.1. Diese Chromosomenregion kodiert für 16 bekannte Gene, darunter auch für die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase 7 (MAP3K7), die eine entscheidende Rolle in angeborenen Immunsignalwegen besitzt. Eine Stimulation zentraler Immunrezeptoren wie dem Toll-like-Rezeptor oder dem T-Zell-Rezeptor aktivieren MAP3K7, was zu einer weiteren Aktivierung der nachgeschalteten I κ B-NF- κ B Signalkaskade und weiterer MAP-Kinasen führt. Es wurde beobachtet, dass MAP3K7 in verschiedenen Krebsarten abhängig vom Zelltyp funktionell und prognostisch relevant ist. Die Grundhypothese dieser Doktorarbeit postuliert, dass MAP3K7 eine entscheidende Rolle im Kontext der Deletionen von 6q15-16.1 spielt und mit einer erhöhten Malignität der T-ALL-Zellen assoziiert ist. Um die biologische Relevanz von MAP3K7 in T-ALL-Zellen aufzuklären, werden die Funktionen in T-ALL-Zellen und deren Wirkmechanismen untersucht.

Vier T-ALL-Zelllinien wurden auf MAP3K7-Deletionen durch multiplexe, ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA; engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) und auf die Expression von MAP3K7-mRNA durch quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR; engl. *quantitative real time-PCR*) untersucht. Mittels adeno-assoziierten viralen (AAV) Vektoren, die entweder eine MAP3K7-kodierende cDNA oder eine anti-MAP3K7-shRNA mit einem GFP Reporterprotein exprimierten, wurde eine Überexpression und eine Depletion von MAP3K7 durchgeführt. Die Transduktionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie und die Depletionseffizienz durch qRT-PCR und Western Blots gemessen. Zellproliferation wurde mit Hilfe eines Hemozytometers analysiert. Die Apoptoseinduktion wurde mittels Durchflusszytometrie nach einer Färbung mit Phycoerythrin gebundenem Annexin V bestimmt. Um den Beitrag des NF- κ B-Signalswegs zu den Effekten der MAP3K7-Depletion zu bewerten, wurden die Zellen mit TNF- α behandelt und die Zelllysate anschließend mit Western Blots analysiert. Zudem wurden die mRNA-Expressionslevel der NF- κ B-Zielgene BCL2, CMYC, FAS, PTEN und TNF- α mittels qRT-PCR ermittelt.

MAP3K7 war in keiner der getesteten Zelllinien deletiert. Die AAV-vermittelte Transduktion für den Transfer der anti-MAP3K7-shRNA war erfolgreich und führte zu einer restlichen MAP3K7-mRNA-Expression von weniger als 25%. Die Transduktion der Überexpressionskonstrukte war nicht effektiv. Der MAP3K7-Depletion verminderte die Proliferation der T-ALL-Zellen und machte sie für Apoptose anfällig. Die Behandlung mit anti-MAP3K7-shRNA änderte weder die Expressionslevel der beteiligten Proteine des NF- κ B-Signalwegs, noch die Expression der NF- κ B-Zielgene nach der Behandlung mit TNF- α .

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass MAP3K7 für das Überleben der T-ALL-Zellen *in-vitro* essentiell ist. Es hält die Proliferation aufrecht und verhindert Apoptose, was darauf hinweist, dass eine verbleibende Expression von MAP3K7 für die T-Zell-Lymphoblasten unverzichtbar ist. Die beobachteten Effekte können nicht durch eine Inaktivierung des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors NF- κ B erklärt werden, was darauf hindeutet, dass MAP3K7 über alternative Mechanismen wirkt. Bezüglich der biologischen Relevanz von MAP3K7 lässt sich aus den beobachteten Effekten nach der Proteindepletion eine onkogene Eigenschaft ableiten. Vergleicht man den Effekt der MAP3K7-Depletion in dieser Arbeit mit den beschriebenen klinischen Eigenschaften von T-ALL-Patienten mit einer Deletion von 6q15-16.1, scheint es unwahrscheinlich, dass die Deletion von MAP3K7 ein Ereignis ist, das die Leukämogenese der T-ALL begünstigt.