

Konstantina Falida

Dr. sc. Hum.

**Identification of single-stranded DNAs from beef products, their replication in human cells and their relationship with breast cancer**

DKFZ

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Harald zur Hausen

Brustkrebs ist die zweithäufigste Ursache Krebs-assoziiierter Todesfälle bei Frauen weltweit. Viele verschiedene Faktoren sind mit diesem Krankheitsrisiko assoziiert. Epidemiologische Daten deuten auf eine potenzielle Verbindung zwischen dem Verzehr von Rindfleisch als auch Milchprodukten und der Brustkrebsinzidenz hin, wobei auch andere Arten von Krankheiten wie sowohl Dickdarm- und Prostatakrebs als auch neurodegenerative oder Autoimmundefekte damit in Verbindung gebracht werden. Aufgrund der epidemiologischen Daten wurde eine neue Hypothese aufgestellt, die Rinderarten, die sich aus der Gattung *Bos taurus* ableiten, einen spezies-spezifischen Faktor zuschreibt. Dieser Faktor sollte für die Ätiologie der genannten Krankheiten (mit)verantwortlich sein. Darauf aufbauend analysierte unsere Arbeitsgruppe sowohl Rinderseren und kommerzielle Milchproben wie auch humanes Blut und Gewebe von Patienten mit Multipler Sklerose. In dieser Studie wurden 18 zirkuläre DNA-Moleküle isoliert, genannt bovine milk and meat factor (BMMF), die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten DNA Molekülen in vier Untergruppen klassifiziert wurden. Diese Dissertation führt DNA-Isolationen fort, indem weitere Milchprodukte wie Joghurt, Creme Fraiche, Butter und Quark untersucht wurden. Hieraus konnten zwei neue DNA-Moleküle isoliert werden, die eine Ähnlichkeit zu einem bereits aus früheren Studien bekannten Molekül zeigen (MSBII.176).

Zusätzlich zur klassischen molekularbiologischen Isolation und Analyse von DNA wurden hier Brustkrebsgewebe mittels „Next-Generation-Sequenzierung“ (NGS) auf das Vorhandensein von BMMFs getestet. Dafür wurde ein reproduzierbares Protokoll zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Säugetierzellen etabliert. Die so gewonnene DNA aus sieben Brustkrebsgeweben und gesundem Tumor-benachbarten Kontrollgewebe wurde mittels NGS analysiert. Aus diesem Kontrollgewebe wurde ein zirkuläres DNA Molekül isoliert,

welches 85% Sequenzidentität auf Nukleinsäureebene zu einem bereits aus erster Studie bekanntem Isolat MSS11.162, zeigt und auch 95% Ähnlichkeit zu einem bakteriellen Plasmid eines Hämodialyse-behandelten Patienten aufweist. Dies zeigt neue und interessante Ansätze für weitere Untersuchungen auf.

Epidemiologische Daten legen auch eine potenzielle Verbindung zwischen dem Verzehr und der verstärkten Exposition mit rotem Fleisch und Hodgkin Lymphomen nahe. Darüber hinaus wurden in der Vergangenheit 24 Torque-Tenoviren (einzelsträngige DNA Viren) aus Milzbiopsien eines Hodgkin Lymphom-Patienten isoliert. Daher wurden für die Suche nach einem permissiven Zellkultursystem für die identifizierten BMMFs zwei Zelllinien, die ursprünglich aus Hodgkin-Lymphomen stammen, getestet (L-1236 und L-428). Nach transienter Transfektion dieser Zelllinien konnte eine Langzeit-Persistenz und Replikation der verschiedenen Plasmid-ähnlichen Agenzien in diesen beiden Zelllinien aufgezeigt werden. In Ko-Transfektionsexperimenten mit Kombinationen zweier unterschiedlicher BMMFs wurde jedoch keine Komplementation der Agenzien in Hodgkin Zelllinien beobachtet, obwohl solche Helfereffekte in der Nierenzelllinie HEK293TT in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurden.

Der Einbau des Zuckermoleküls N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) in humane Zellmembranen kann Immunreaktionen und dadurch chronische Entzündungen verursachen. Darüber hinaus dient es als Rezeptor für verschiedenen Viren, weshalb Neu5GC eine potenzielle Rolle im Zelleintritt der BMMFs spielen könnte. Die durchgeführten Experimente zeigten allerdings nur eine geringe Verstärkung der Replikation nach externer Zugabe von Neu5GC. Daher lassen sich keine eindeutigen Schlüsse bezüglich der Infektion von BMMFs ziehen und weitere Untersuchungen unter verschiedenen Bedingungen sind hierzu nötig.

Um eine potenzielle Immunreaktion von Patienten mit Brustkrebs und Hodgkin Lymphomen gegenüber dem MSB11.176-BMMF kodierten Rep-Protein zu untersuchen, wurden ELISA-Experimente durchgeführt. Es wurde eine erhöhte Immunantwort gegenüber MSB11.176 Rep in Serum von Brustkrebspatienten gegenüber Plasma von gesunden Probanden festgestellt, was eine messbare Exposition gegenüber BMMF zeigt. Allerdings konnte kein Unterschied der Seropositivität zwischen Serum von Patienten mit Hodgkin-Lymphom und Kontrollplasma beobachtet werden.

Diese Dissertation untersucht eine epidemiologisch basierte Assoziation von diätetischen Gewohnheit als Risikofaktor bei Brustkrebs. Es wurden wichtige Erkenntnisse auf diesem

bisher unbekanntes Gebiet gewonnen, wobei weitere Studien nötig sind, um BMMF eindeutig mit Brustkrebs in Verbindung zu bringen.