

Christin Schlegel

Dr. med.

Linking karyotype stability and p53 in AML cells

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum

Doktorvater: Prof. Dr. med. Alwin Krämer

AML mit einem komplexen Karyotyp und p53 Mutationen stehen in deutlicher Assoziation. Beide stellen unabhängige starke prognostische Marker eines schlechten klinischen Ergebnisses dar, welches sich bei gleichzeitigem Vorhandensein noch verschlechtert. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, die mechanistischen Verbindungen zwischen p53 Mutationen und komplexen Karyotypen, die bisher noch nicht gänzlich verstanden sind, näher zu beleuchten. Es ist kontrovers, ob p53 Inaktivierung allein für das Entstehen von Aneuploidie und chromosomaler Instabilität ausreicht und welche Eigenschaften der Chromosomenfehlverteilung für die Aktivierung von p53 verantwortlich sind. Folglich wurde in dieser Arbeit die Rolle von p53 in Bezug auf die Stabilität von Karyotypen und der Toleranz verschiedener Arten von Chromosomenaberrationen, entstehend aus Chromosomenfehlverteilung, untersucht. Daneben wurde eine mögliche Korrelation zwischen Chromosomengröße und numerischer Aneuploidie geprüft.

Zu diesem Zweck, wurden isogene p53-Knockout Zellen aus der euploiden AML Zelllinie EEB mittels CRISPR-Cas9 Gen-Modifizierung generiert. Daraufhin wurden die Knockout -und Wildtyp-Zellen als Einzelzellen mit und ohne vorherige Induktion von Chromosomenfehlverteilung mit CENP-E und MPS1 Inhibitoren ausgesät. Die so entstandenen Zellklone wurden dann mittels M-FISH auf Chromosomenaberrationen untersucht.

Die ermittelten Daten zeigen, dass ein p53-Knockout das spontane Auftreten von Chromosomenaberrationen, einschließlich numerischer und struktureller Abweichungen, und chromosomale Instabilität zur Folge hat. Dies deutet an, dass p53 Mutationen eine kausale Rolle bezüglich der Induktion komplexer Karyotypen bei der AML spielen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass p53 Inaktivierung zum Auftreten und klonaler Expansion von Aberrationen der Chromosomen 5, 7, 17 und 22 führt, welche scheinbar proliferative Vorteile bringen. Interessanterweise spiegelt diese in vitro Beobachtung sich in Daten von AML Patienten wider, bei denen p53 Mutationen häufig mit einem sogenannten typischen komplexen Karyotyp, der sich durch Aberrationen der Chromosomen 5, 7 und 17 definiert, einhergehen.

Im Hinblick auf die Suche nach den Eigenschaften der Chromosomenfehlverteilung, die eine p53 Aktivierung herbeiführen, wurde herausgefunden, dass Epiphänomene von Aneuploidie und nicht Aneuploidie an sich verantwortlich zu machen sind. Es zeigte sich, dass p53 verschiedene Arten von Chromosomenaberrationen in unterschiedlichem Ausmaß unterdrückt. Dementsprechend wurde ein Zugewinn ganzer Chromosomen in p53-Wildtyp Zellen nicht toleriert. Demgegenüber wurden Verluste von ganzen Chromosomen deutlich besser toleriert. Die schlechte Toleranz zusätzlicher Chromosomen ist möglicherweise auf damit einhergehenden

proteotoxischen Stress zurückzuführen. Strukturelle Chromosomenaberrationen - ungeachtet, ob diese balanciert oder nicht balanciert waren - wurden in p53-Wildtyp Zellen ebenfalls fast nicht beobachtet und waren lediglich in p53-Knockout Zellen zu finden. Da DNA-Schäden, ein bekannter Aktivator von p53, nur in p53-Knockout Zellen detektiert wurden und häufig mit strukturellen Chromosomenaberrationen assoziiert sind, liefern sie eine plausible Erklärung warum strukturelle Chromosomenaberrationen in p53-Wildtyp Zellen eliminiert werden.

Unter Berücksichtigung dessen, dass kritisch kurze Telomere ebenfalls als DNA-Schäden detektiert werden, überrascht es nicht, dass die Ergebnisse bestätigen, dass Telomer-Dysfunktionen mit p53 Inaktivierung assoziiert sind. Interessanterweise weisen die Daten darauf hin, dass Telomer-Dysfunktionen auch durch Chromosomenaberrationen gefördert werden, wahrscheinlich bedingt durch Aneuploidie-assoziierten zellulären Stress, übereinstimmend mit der bereits bekannten Assoziation von AML mit komplexem Karyotyp und zu kurzen Telomeren.

Überdies zeigte sich, dass eine p53-Aktivierung vom Ausmaß der chromosomalen Instabilität abhängt, da lediglich leicht veränderte Karyotypen in p53-Wildtyp Zellen beobachtet wurden, während auch komplexe Karyotypen in p53-Knockout Zellen präsent waren. Folglich ist vermutlich Aneuploidie-assoziiertes zelluläres Stress, der abhängig ist vom Ausmaß der chromosomalen Veränderungen, die zugrundeliegende Ursache für die p53-abhängige Eliminierung von Zellen, die eine gewisse Schwelle an zellulären Stress überschreiten.

Neben Erkenntnissen über die Rolle von p53 wurde demonstriert, dass auch Chromosomenaberrationen selbst Chromosomeninstabilität fördern. Weiter zeigte sich, dass AML-Zellen eher Chromosomen verlieren als zugewinnen, was sich auch in den meisten anderen menschlichen malignen Neoplasien beobachten lässt und impliziert, dass Chromosomengewinn im Gegensatz zu Chromosomenverlusten entweder weniger wahrscheinlich entsteht und/oder schlechter toleriert wird.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass numerische Aneuploidie besser toleriert wird, desto kleiner die betroffenen Chromosomen sind und für je weniger Gene sie kodieren. Vermutlich ist dies bedingt durch eine kleinere Wahrscheinlichkeit, dass vitale Funktionen beeinträchtigt werden und durch Aneuploidie-assoziierten Stress, der abhängig ist vom Ausmaß der betroffenen Gene.

Anknüpfend an die Ergebnisse dieser Studie verbleiben noch Fragen, für deren Beantwortung es weiteren Untersuchungen bedarf. Vorherige Studien mit anderen Zelllinien zeigten, dass die Inaktivierung von p53 nicht immer zu karyotypischer Instabilität führt. Daher ist es immer noch unklar welche zusätzlichen Veränderungen dafür notwendig sind. Außerdem wäre es interessant die Schwelle näher zu charakterisieren, ab welchem Ausmaß karyotypischer Veränderungen p53 aktiviert wird.