

Jochen Schmidt

Dr. sc. hum.

## **Untersuchungen zu wachstumsregulatorischen Genen bei der Entstehung von Ösophaguskrebs**

Geboren am 11.09.1966

Reifeprüfung am 14.06.1985

Vordiplom am 26.6.1990 an der Technischen Hochschule Darmstadt

Diplom am 24.02.1994 an der Technischen Hochschule Darmstadt

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. H. Bartsch

Eine Besonderheit bei der Entstehung von squamösen Karzinomen des Ösophagus stellt die offensichtliche Abwesenheit von Mutationen des *ras*-Onkogens in Primärtumoren und aus Tumoren etablierten Zelllinien dar. Als alternativer Angriffspunkt für mögliche Mutationen bietet sich das *raf*- Onkogen an, welches für die Raf-Kinase kodiert, die direkt mit Ras interagiert und bei der Vermittlung von mitogenen Signalen eine wichtige Rolle spielt. Hinweise auf die Beteiligung von *raf* an kanzerogenen Prozessen liefern eine Vielzahl an Untersuchungen aus tierexperimentellen Studien. Dazu gehört auch eine Studie, die in induzierten Lungentumoren der Maus Punktmutationen in der konservierten Region 3 des *raf*-Gens fanden (Storm et al., 1993). Das Vorkommen von Punktmutationen in humanen Tumoren konnte dagegen bis heute nicht gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 78 Biopsie-Proben von Ösophaguskrebs-Patienten und Patienten mit hepatozellulären Karzinomen (HCC) auf Veränderungen in einem Teil der konservierten Region 3 des *raf*-Gens mit Hilfe der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten analysiert. Bei beiden Krebsarten wurden bisher keine bzw. selten Veränderungen des *ras*-Onkogens gefunden. In keiner der untersuchten Proben konnten Veränderungen in dem untersuchten Bereich detektiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten vier etablierte Ösophaguskrebs-Zelllinien der TE-Serie auf Veränderungen in einer Reihe von Genen untersucht werden, die bei der Kontrolle des Zellwachstums eine Rolle spielen und die bei der Entstehung vieler Krebsarten beteiligt sind.

Hierzu wurden die Zellen zunächst auf Mutationen in Exon 1 (Kodons 12 und 13) und Exon 2 (Kodon 61) der beiden Proto-Onkogen-Isoformen Harvey (H)- und Kirsten (K)-*ras* untersucht. Hier wurden keine Mutationen gefunden. Die Zelllinie TE 1 wies in Kodon 27, Exon 1 des H-*ras*-Gens eine stille Mutation auf (CAT→CAC). Die gewonnenen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu älteren Untersuchungen, bei denen in drei tumorigenen Zelllinien der TE-Serie Mutationen in Exon 1 von K-*ras* (TE 1, TE 2) bzw. H-*ras* (TE 8) gefunden wurden (Galiana et al., 1993).

Die Sequenzierung der Exons 6-8 des Tumorsuppressorgens p53 lieferte in allen vier Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse. TE 1 und TE 11 zeigten „Missense“-Mutationen in den Exons 8 (TE 1, G→A) und 7 (TE 11, G→T), während TE 15 eine heterozygote Mutation in der „Splice acceptor site“ von Intron 5 (Austausch G→A) aufwies. Der daraus resultierende Phänotyp wies im Westernblot neben dem Wildtyp auch ein verkürztes P53-Protein (ca. 45 kDa) in unterschiedlichen Mengenverhältnissen auf. TE 13 zeigte in den untersuchten Bereichen keine Veränderungen auf der Ebene des Gens. Mit Hilfe des Westernblots wie auch durch die immunzytochemische Analyse ließ sich hier kein P53-Protein nachweisen. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Barnas et al. (1997) und widerlegen frühere Studien, in denen in den TE-Zellen keine Veränderungen des p53-Gens gefunden wurden (Yamada et al., 1991).

Weiterhin konnte eine erhöhte Expression des Zellzyklus-Regulators Cyclin D1 in TE 13 sowie des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) in TE 11 mittels Westernblot-Analyse gefunden werden. Durch die Behandlung der TE-Zellen mit TPA, Zigarettenrauchlösung und  $\gamma$ -Strahlung ließ sich die Phosphorylierung von MAPK (ERK2) induzieren. TE 1, TE 11 und TE 13 zeigte bei allen drei Behandlungen eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von MAPK (ERK2), während TE 15 nur auf die Behandlung mit TPA reagierte. Die mechanistischen Ursachen für das abweichende Verhalten von TE 15 sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen der TE-Zelllinien sein.