

Christian Kuntzen  
Dr. med.

## **Umgehung des transformierenden Potentials humanpathogener Papillomviren in Zervixkarzinomzellen durch Histondeacetylaseinhibitoren**

Institut: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Frank Rösl

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen von HDAC-Inhibition durch Natriumbutyrat (NaB) und TSA im Kontext der HPV-induzierten Karzinogenese untersucht. Als Modellsystem wurde die HPV 18-positive Zervixkarzinomzelllinie HeLa verwendet. Die viralen Onkogene von „*high risk*“ Typen humaner Papillomviren (HPV 16, - 18, u.a.) spielen in der Ätiologie des Zervixkarzinoms eine entscheidende Rolle und tragen durch vielfältige Mechanismen zur Deregulation des Zellzyklus bei. Durch FACS- und Westernblotanalyse wurde gezeigt, daß HDAC-Inhibition unter den gewählten Bedingungen in HeLa-Zellen nach 16 h zum Wachstumsarrest in der G1-Phase führt, obwohl die viralen Onkogene gleichzeitig transkribiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher mit NaB zum ersten Mal eine Substanz beschrieben, die die Effekte der viralen Onkoproteine auf den Zellzyklus umgeht.

Der Zellzyklus wird durch die Aktivitäten von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) gesteuert. Während des Übergangs von der G1- in die S-Phase werden nacheinander CDK4/6 durch Cyclin D1 und CDK2 durch Cyclin E und Cyclin A aktiviert. Diese Komplexe phosphorylieren sequentiell das Retinoblastomprotein pRb und führen dadurch zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, der bei der Induktion der S-Phase eine wichtige Rolle spielt.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, daß die Proteinmengen der genannten CDKs durch HDAC-Inhibition unverändert bleiben, während Proteine, die die CDK-Aktivitäten posttranslational regulieren, durch NaB stark beeinflußt werden. Sowohl Cyclin D1 als auch Cyclin A finden sich durch NaB im Sinne einer Zellzyklushemmung herunterreguliert, während Cyclin E selektiv induziert wird. Weiterhin werden die beiden CDK2-Inhibitoren p21<sup>CIP1</sup>/WAF1 und p27<sup>KIP1</sup> deutlich induziert, während der CDK4-Inhibitor p16<sup>INK4a</sup> unbeeinflußt bleibt. Durch Immunpräzipitation von CDK2-Komplexen wurde gezeigt, daß die CDK2-Aktivität nach 12- 16 h komplett gehemmt wird, was mit der Bindung von p21 und p27 einhergeht. Während beide CDK2-Inhibitoren direkt durch das virale Onkoprotein E7 gehemmt werden, wird E7 aus dem Komplex abgespalten.

Während gezeigt wird, daß die Regulation der Cycline und des CDK-Inhibitors p21 durch die

Veränderung der Transkriptionsrate verursacht wird, nimmt die Proteinmenge von p27KIP1 gegenläufig zur Menge der mRNA ab. Dies ließ erstmals auf eine Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems durch HDAC-Inhibitoren schließen und führte zu weiteren Experimenten in unserem Labor, die das F-Box Protein SKP2 des SCF-Komplexes als Ursache nahelegten. Die Herabregulation von Cyclin D1 und die CDK2-Hemmung ließen eine verminderte Phosphorylierung und daher Aktivierung des Retinoblastomproteins pRb erwarten. Es wird gezeigt, daß pRb stattdessen durch die Behandlung mit NaB komplett degradiert wird. Da die Expression von E2F nicht beeinträchtigt ist, entsteht „freies E2F“.

Durch die inadäquate Freisetzung von E2F kann Apoptose ausgelöst werden. Daß beide HDAC-Inhibitoren schon nach 16 h Apoptose auslösen, wurde durch einen sensitiven ELISA bestätigt, der die Freisetzung von Mono- und Oligonukleosomen ins Zytoplasma mißt. Eine Erklärung wird geliefert durch die Präsenz von E7, welches zur teilweisen Abspaltung von pRb von E2F und zur nachfolgenden pRb-Degradation führt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in unserem Labor die Abhängigkeit der pRb-Degradation und der Apoptoseinduktion von der Präsenz von E7 bestätigt.

Diese Studien beschreiben grundlegende Mechanismen, wie das transformierende Potential von „*high risk*“ Typen humaner Papillomviren therapeutisch umgangen werden kann und öffnen neue Perspektiven für die Therapie des Zervixkarzinoms. Sie liefern die molekularbiologische Grundlage für die klinische Anwendung von HDAC-Inhibitoren in der Behandlung des Zervixkarzinoms.