

Arbeitsgruppe: miRNAs in Hepatoblastomen
PD Dr. med. Irene Schmid und Dr. rer. nat. Julia von Frowein
Forschungsvorhaben: Kinderkrebshilfe Ebersberg

**Identifizierung von microRNAs in unterschiedlich fehlregulierten
Signalwegen beim Hepatoblastom**

Grundlagen:

Das Hepatoblastom ist ein bösartiger embryonaler Tumor der Leber, der meist bei Kindern im Alter zwischen 3 Monaten und 6 Jahren auftritt. Es ist die am häufigsten auftretende bösartige Leber-Tumorart im Kindesalter (79% aller Lebertumore in Kindern unter 15 Jahren). Etwa 25% der Kinder überleben diese Krankheit nicht. Mittels zytogenetischer Untersuchungen wurden bereits zahlreiche genetische Veränderungen nachgewiesen, wie z.B. Veränderungen an Chromosom 1q, 2q, 4q, 7, 8q, 11p15, 17, 20q, 22q. Die molekularen Mechanismen, die zum Auftreten eines Hepatoblastoms führen und die den Verlauf und die Prognose bestimmen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

Da diese Tumore durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen charakterisiert sind, stellt sich die Frage nach den wichtigsten Schlüsselgenen, die zum unkontrollierten Wachstum von Hepatoblastomzellen führen. Microarray-Untersuchungen lieferten bereits wichtige Erkenntnisse über die Veränderungen im Genexpressionsmuster beim Hepatoblastom im Vergleich zu gesundem Lebergewebe. Die Expression der Schlüsselgene Igf2 (Insulin-like growth factor 2), c-Met (Hepatocyte growth factor receptor), β -Catenin (Wingless-Int Signalweg) und Plag1 (Protoonkogen) ist beim Hepatoblastom drastisch erhöht und scheint eine wichtige Rolle für die erhöhte Proliferation (Zellteilungsrate) des Tumorgewebes zu spielen. Ob diese Gene allerdings die Schlüsselpunkte in der Entwicklung eines Tumors darstellen, oder ob andere Mechanismen einen wichtigeren Einfluss ausüben, ist weitgehend ungeklärt.

Nicht nur Gene, die für Proteine kodieren, können die Ausbildung von Tumoren beeinflussen, nach neueren Erkenntnissen haben auch kleine regulatorische RNAs (sog. microRNAs – miRNAs) einen großen Einfluss auf die Regulation von Genexpression und somit auf die Entstehung von Krebs.

Was ist microRNA (= miRNA)

Die Übersetzung von Genen in Protein erfolgt über die Zwischenstufe einer Matrize, der sogenannten Vorläufer - „messenger RNA“ (mRNA). Aus dieser Vorläufer-mRNA werden über einen Prozess der sich „Spleißen“ nennt, unnötige Zwischenbereiche (Introns) herausgeschnitten und die endgültige mRNA (Exonbereiche) anschließend wieder zusammengesetzt (siehe Abbildung 1). Die kleinen herausgeschnittenen Introns wurden lange Zeit für Abfall- bzw. Abbauprodukte gehalten. Inzwischen ist allerdings bekannt, dass aus einem Teil dieser Introns kleine sog. microRNAs (miRNAs) hervorgehen, die allerdings für kein Protein kodieren, aber dennoch sehr wichtige regulatorische Funktionen ausüben und in der Lage sind, die Übersetzung bestimmter Gene sehr effektiv zu blockieren. Hierzu binden sie an komplementäre mRNA-Bereiche und blockieren so deren Übersetzung in Protein oder veranlassen sogar deren Abbau. Bisher sind etwa 450 humane miRNA-Sequenzen bekannt. Die tatsächlich vorhandene Menge an humanen miRNAs wird auf etwa 1000 geschätzt, die wiederum ca. 30-50 % der Gene regulieren.

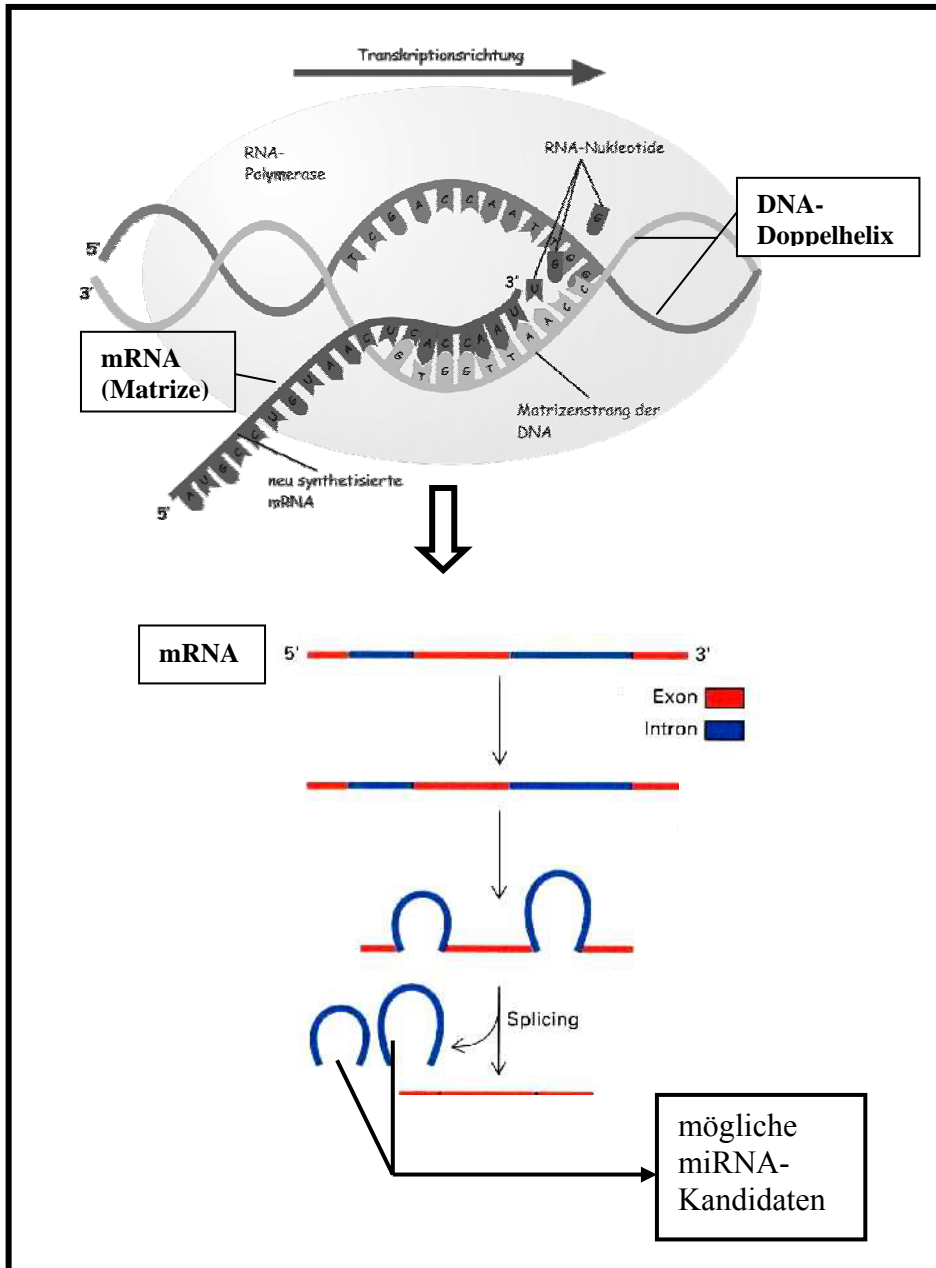


Abb. 1
Bei der Transkription wird ein Gen abgelesen und als mRNA vervielfältigt, d.h. ein spezifischer DNA Abschnitt dient als Vorlage zur Synthese eines neuen RNA Strangs (messenger RNA-mRNA). Ein weiterer wichtiger Schritt stellt der Prozess des Spleißens der Vorläufer-mRNA statt. Die Vorläufer mRNA, die aus Exons und Introns besteht wird durch das Spleißen von Introns befreit und die angrenzenden Exons werden zur reifen mRNA verknüpft.

Sowohl die fehlregulierte Expression von mRNAs wie auch von microRNAs üben einen großen Einfluss auf zellbiologische Prozesse, wie Zellteilung und Zelltod aus und spielen daher auch bei der Entwicklung von Krebs eine sehr wichtige Rolle. So wurde gezeigt, dass verschiedene Tumorarten ein sehr spezifisches microRNA-Expressionsmuster aufweisen, allerdings wurde dieses Muster beim Hepatoblastom noch nicht untersucht.

Hypothese:

Wir postulieren, dass Fehlregulationen in den oben genannten fehlregulierten Signalwegen (Igf2 = Insulin-like growth factor 2, c-Met = Hepatocyte growth factor receptor, β -Catenin = Wingless-Int Signalweg und Plag1 = Protoonkogen) zu einer Dysregulation im microRNA-

Expressionsmuster führen und dass Veränderung in diesem Kontrollmechanismus sowohl Prognose als auch Chemotherapieresistenz beeinflussen können.

Ziel:

Durch gezieltes Blockieren der einzelnen Signalwege mit Hilfe von siRNA (RNA-Interferenz) und einem anschließenden Vergleich der jeweiligen microRNA-Expressionsmuster sollen zuerst regulatorische microRNAs identifiziert werden, die gleichzeitig an unterschiedlichen Stellen in diesen fehlerhaft regulierten Signalwegen eine Rolle spielen. Sie könnten wichtige neue therapeutische Ansatzpunkte darstellen, was durch Überexpression bzw. Blockierung von spezifischen microRNAs bestätigt werden soll. Die Gewebe- und Tumor-Spezifität soll durch den Vergleich von Tumorzellen versus primäre Hepatozyten ermittelt werden.

Zwischenergebnisse:

Als erster Kandidat, der von Plag1 reguliert wird, konnte die miR-492 identifiziert werden. Die Sequenz von miRNA-492 ist im Krt19 Gen lokalisiert, deren Expression wiederum von Plag1 reguliert wird. Plag1 reguliert somit Krt19 aus dem dann die miR-492 prozessiert wird. Wir konnten nachweisen, dass miR-492 einige Tumor-relevante Gene reguliert, die durch Überexpression in Tumorzelllinien identifiziert wurden (Publikation in Arbeit).

Diese Gene wurden anschließend in Hepatoblastom Tumorproben untersucht. Allerdings ist die Regulation gegenläufig. Die Gene, die durch die miRNA in Zelllinien herabreguliert wurden, sind in der Korrelation von miRNA und Gen in der Tumorprobe positiv korreliert. Evtl. deutet dies auf einen positiven biologischen feedback Mechanismus hin. Je mehr fehlreguliertes Gen vorhanden ist, umso mehr miR-492 wird produziert um dieser Genexpression entgegenwirken zu können. Diese Hypothese soll in weiteren Schritten genauer untersucht werden.

Weiteres Forschungsvorhaben:

Es ist seit kurzem bekannt, dass Tumore miRNAs ins Blut abgeben und diese geschützt in sogenannte Vesikel vorliegen. So könnte die miRNA als diagnostischer Marker für die frühe Erkennung von Metastasen eingesetzt werden. Diese Hypothese soll genauer untersucht werden.

Mitarbeiter der Arbeitsgruppe

PD Dr. med. Irene Schmid

Dr. rer. nat. Julia von Frowein

Leiter der Arbeitsgruppe

Postdoc