

Charakterisierung der Rolle neuer potentieller Onkogene für Wachstum und Metastasierung von Ewing Sarkomen

In unserem neu gegründeten Labor für pädiatrische Sarkombiologie im Pathologischen Institut der LMU München beschäftigen wir uns intensiv mit der Erforschung der molekularen Ursachen der Entstehung und Progression sowie Arzneimittelresistenz von kindlichen Weichteil- und Knochentumoren – den sogenannten Sarkomen. Sarkome sind nach den Hirntumoren die häufigsten soliden Tumore im Kindesalter und im Vergleich zu Leukämien immer noch oft mit schlechten Heilungsaussichten verbunden. Als Modellsysteme arbeiten wir vorwiegend an Ewing Sarkomen.

Ewing Sarkome wurden 1921 erstmals vom US-amerikanischen Pathologen James Ewing als „Endotheliom des Knochens“ beschrieben und sind die zweithäufigsten Knochentumore bei Kindern und Jugendlichen und die dritthäufigsten bei Erwachsenen. Diese hochaggressiven Knochentumore treten mit einem Altersgipfel von ca. 15 Jahren auf und neigen zur frühen Metastasierung (v.a. in die Lungen und in andere Knochen) und zur starken Osteolyse (d.h. zu starkem metastatischem Knochenabbau). In der Tat weisen etwa 25% der Patienten zum Diagnosezeitpunkt bereits Mikrometastasen in den Lungen und/oder weitere Fernmetastasen auf.

Obwohl die Überlebensraten im lokalisierten Stadium ca. 70–80% erreichen, bleibt das metastasierte Stadium trotz einer sehr toxischen und zum Teil verstümmelnden Therapie fast immer mit einer infausten Prognose verbunden. Die Entwicklung von neuen und v.a. schonenderen Therapieansätzen ist deshalb unerlässlich.

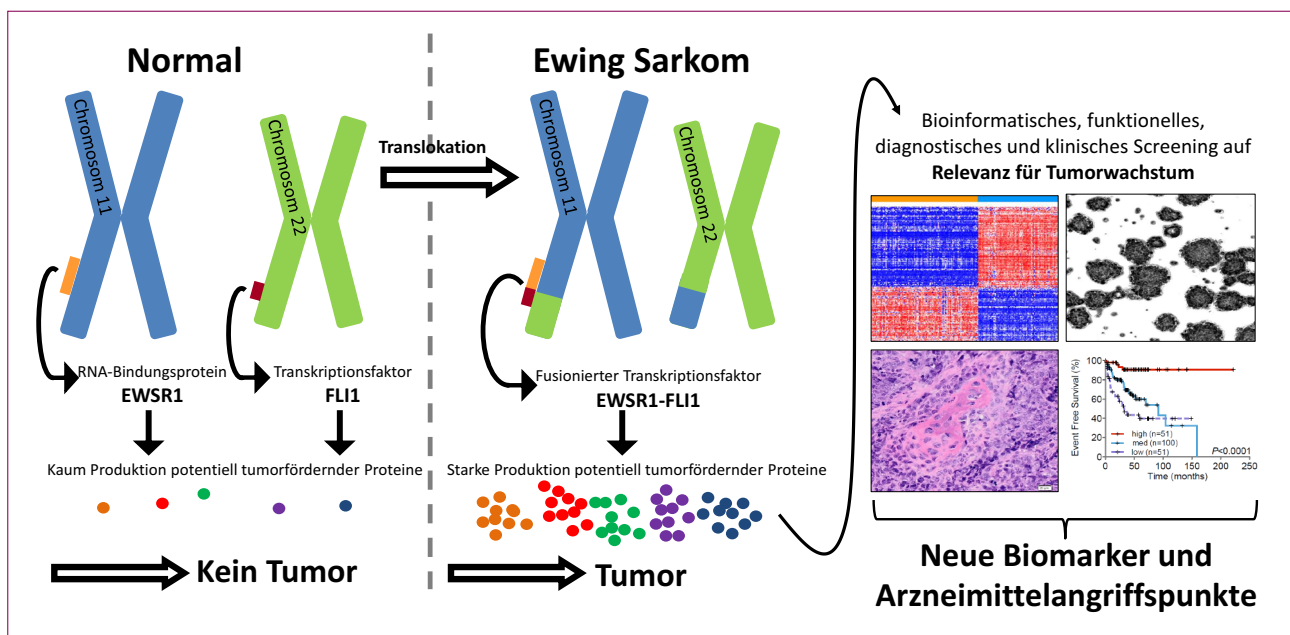
Ewing Sarkome sind genetisch dahingehend besonders, dass sie im Unterschied zur bekannten mehrstufigen und schrittweisen Entstehung und Entartung von Tu-

moren des Erwachsenenalters wahrscheinlich nur durch ein einziges genetisches Ereignis ausgelöst werden, nämlich durch die spezifische Bildung von EWSR1-ETS-Fusionsproteinen. Die mit ca. 85% häufigste chromosomale Translokation führt zu einer Fusion des EWSR1 (**E**wing **s**arcoma **b**reakpoint **r**egion **1**) Gens mit dem FLI1 (**f**riend **l**eukemia **v**irus **i**ntegration **1**) Gen und zur konstitutiven Bildung des EWSR1-FLI1-Fusionsproteins.

Durch die EWSR1-FLI1-Translokation entsteht ein aberrant und permanent aktiver Transkriptionsfaktor, der als ursächlich für die Entstehung des Ewing Sarkoms angesehen wird. Die Expression von EWSR1-FLI1 verursacht letztlich über die EWSR1-FLI1-Zielgene den komplexen und klinisch hochmalignen Phänotyp dieser Tumorentität.

Experimentelle Versuche das EWSR1-FLI1-Fusionsprotein direkt als selektiven Angriffspunkt für die Immun- und Biotherapie zu nutzen blieben bislang erfolglos. Dies mag an der ubiquitären Präsenz des physiologischen RNA-Bindungsproteins EWSR1, der geringen Immunogenität und der vorwiegend intranukleären Lokalisation von EWSR1-FLI1 liegen. Deshalb stellt die Identifikation und detaillierte funktionelle Charakterisierung der EWSR1-FLI1-Zielgene nicht nur den Schlüssel zum molekularen Verständnis der Erkrankung sondern auch zur Entwicklung selektiv wirkender Arzneimittel dar.

Aus tumorbiologischer und klinischer Sicht ist es nun wichtig herauszufinden, welche der EWSR1-FLI1-Zielgene einen wesentlichen Beitrag zur Aggressivität der Erkrankung leisten und sich eventuell als neue Biomarker für eine verbesserte Risikobeurteilung und/oder selektive Zielstrukturen für eine spezifische Arzneimitteltherapie eignen.



Zur Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen einer zielgerichteten Therapie ist es wünschenswert, dass die neuen potentiellen Arzneimittelangriffspunkte möglichst nur in den Tumorzellen, nicht aber im Normalgewebe gebildet werden. Darüber hinaus sollten diese möglichen Arzneimittelangriffspunkte bzw. Gene möglichst wichtig für das Wachstum und Überleben der Tumorzellen sein, um den Tumorzellen die Chance zu nehmen, sich durch bloße Herunterregulation dieser Gene einer gezielten Therapie entziehen zu können (Escape-Mechanismen).

Beim Ewing Sarkom konzentrieren wir uns deshalb auf direkte EWSR1-FLI1-Zielgene, da diese zumeist im Vergleich zum Normalgewebe stark überexprimiert werden und Escape-Mechanismen weitestgehend unwahrscheinlich sind.

Um nun neue EWSR1-FLI1-Zielgene zu finden, die im Ewing Sarkom im Vergleich zum Normalgewebe stark überexprimiert sind und möglichst wichtig für das maligne Verhalten dieser Tumore sind, wurden vier komplementäre Analysen kombiniert:

1. In einem in vitro Modellsystem, das eine induzierbare Unterdrückung von EWSR1-FLI1 in Ewing Sarkomzellen erlaubt, wurden zu mehreren Zeitpunkten nach Beginn der Herunterregulation von EWSR1-FLI1 Transkriptom-Analysen durchgeführt. Dadurch konnte die Expression aller EWSR1-FLI1-Zielgene im zeitlichen Verlauf erfasst werden.
2. In einem zweiten Schritt wurde anhand von epigenetischen Profilen und genomweiten EWSR1-FLI1 Bindungsanalysen geprüft, welche dieser Gene tatsächlich eine EWSR1-FLI1-Bindung an ihren regulatorischen Genelementen aufweisen (= direkte EWSR1-FLI1-Zielgene).
3. In einem dritten Schritt wurde die hierdurch generierte Liste der stark EWSR1-FLI1 getriebenen Zielgene mit dem Expressionsprofil von primären humanen Ewing Sarkomen verglichen, um diejenigen EWSR1-FLI1-Zielgene zu finden, die tatsächlich in primären Ewing Sarkomen im Vergleich zu Normalgeweben überexprimiert sind (= Ausschluss von in vitro Artefakten).

4. In einem letzten Schritt wurden alle Gene, die
 - a) in einem Modellsystem stark durch EWSR1-FLI1 hochreguliert werden,
 - b) stark im Ewing Sarkom überexprimiert sind und
 - c) einen tatsächlichen Bindungsnachweis von EWSR1-FLI1 in ihrem regulatorischen Genelementen aufweisen,

in einem unabhängigen Datensatz auf ihren Einfluss auf das Gesamtüberleben von Ewing Sarkom Patienten geprüft.

Diese Untersuchungen führten zur Identifizierung von fünf stark überexprimierten Genen, die wahrscheinlich direkte EWSR1-FLI1-Zielgene sind und deren Expressionshöhe signifikant mit dem Überleben von Ewing Sarkom Patienten korreliert.

Derzeit arbeiten wir intensiv an der funktionellen Charakterisierung dieser Gene, um ihre molekulare Wirkungsweise zu verstehen und ihr Potential für eine spezifischere Diagnostik und Therapie beurteilen zu können.

Durch die großzügige finanzielle Unterstützung durch die Mehr **LEBEN** für krebserkrankte Kinder – Bettina-Bräu-Stiftung konnten wir eine Halbtagsstelle für eine/n Medizinisch-Technische/n-Assistenten/in (MTA) schaffen. Die/der MTA wird bald ihren/seinen Dienst in unserer Arbeitsgruppe antreten und soll unsere Doktoranden bei den zeitintensiven Untersuchungen dieser neuen EWSR1-FLI1-Zielgene unterstützen und bei komplexen Experimenten mitwirken.

Wir versprechen uns durch die Schaffung dieser MTA-Stelle auch eine Verstärkung unserer Laborarbeit v.a. im technischen und methodischen Bereich und ein schnelleres Erreichen unseres ambitionierten, langfristigen Forschungsziels: einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Heilungsaussichten von krebserkrankten Kindern zu leisten.

Dr. med. Thomas Grünewald, Ph.D.

Leiter des Labors
für pädiatrische Sarkombiologie
im Pathologischen Institut der LMU

Liebe Spenderinnen und Spender,
die **Mehr LEBEN für krebserkrankte Kinder – Bettina-Bräu-Stiftung**
wird die Forschungsthemen des
Labors für pädiatrische Sarkombiologie im Pathologischen Institut
der LMU München unterstützen!

Wir wären sehr dankbar, wenn Sie sich gemeinsam mit uns engagieren würden,
um den an Krebs erkrankten Kindern zu helfen.

Spendenkonto
Stadtsparkasse München
IBAN: DE73 7015 0000 0907 2190 00
BIC: SSKMDEMXXX

Kontakt: Horst E. Wendling
E-Mail: horst.wendling@bettina-braeu-stiftung.de • Internet: www.bettina-braeu-stiftung.de