

Die Rolle von replikationsassoziierten DNA-Schäden bei der Tumorentstehung

2. Jahresbericht (2020)

Prof. Massimo Lopes

*Institut für molekulare Krebsforschung, Universität Zürich,
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich*

Prof. Achim Weber

*Institut für Pathologie und Molekularpathologie, Universitätsspital Zürich,
Schmelzbergstrasse 12, 8091 Zürich*

Stipendiatin: Dr. Laure-Alix Clerbaux

*Institut für molekulare Krebsforschung, Universität Zürich,
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich*

Einleitung

Leberkrebs ist weltweit die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache. Dieses Leiden entwickelt sich hauptsächlich aus chronischen Lebererkrankungen, wobei chronische Gewebeschäden sowohl Zelltod (Apoptose) als auch eine anhaltende Zellproliferation induzieren, um beschädigte Zellen zu beseitigen und zu ersetzen.

Hyperproliferation kann wiederum zu höheren DNA-Replikationsraten führen, was das Risiko für replikationsassoziierte DNA-Schäden erhöhen und genetische Instabilität und die Entstehung von Tumoren bewirken kann. Wir haben im Vorfeld Mäuse einer partiellen (zwei Drittel) Hepatektomie (PH) unterzogen. Dieser Eingriff simuliert die Leberresektion, der sich Patienten unterziehen müssen, und stellt ein gutes Modell für akute Leberhyperproliferation dar. Dabei haben wir DNA-Schäden in replizierenden Hepatozyten beobachtet (Boege *et al.*, 2017). Allerdings ist über den replikativen Stress in diesem Zusammenhang nichts bekannt. Des Weiteren haben wir gezeigt, dass die hepatische Deletion von Mcl-1, einem anti-apoptotischen Protein, das in vielen arzneimittelresistenten Tumoren vorkommt, nach einem Jahr Apoptose, chronische Leberhyperproliferation, DNA-Schäden und Tumoren in 50% aller Versuchstiere induziert (Boege *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2010) (Abb. A).

Derzeit gibt es für Leberkrebs keine Therapie, mit Ausnahme der Lebertransplantation, die eine hohe Rückfallrate (60% nach 5 Jahren) aufweist. Ein besseres Verständnis der regenerativen Vorgänge in beschädigten Lebern ist deshalb vonnöten. Ausserdem ist die Entschlüsselung der nukleären Rolle von Mcl-1, vor allem in Bezug auf replikativen Stress, von klinischer Bedeutung im Hinblick auf Therapien, die Mcl-1 anvisieren.

Wir beabsichtigen, entscheidende, an der frühen Leberkarzinogenese beteiligte Mechanismen des Replikationsstresses zu entschlüsseln. Dazu benutzen wir im Lopes Forschungslabor etablierte, spezialisierte molekulare Techniken zur Untersuchung des replikativen Stresses (Neelsen & Lopes, 2015) in den klinisch relevanten PH und Mcl-1 KO-Mausmodellen des Weber Labors.

Forschungsfortschritte und Ergebnisse

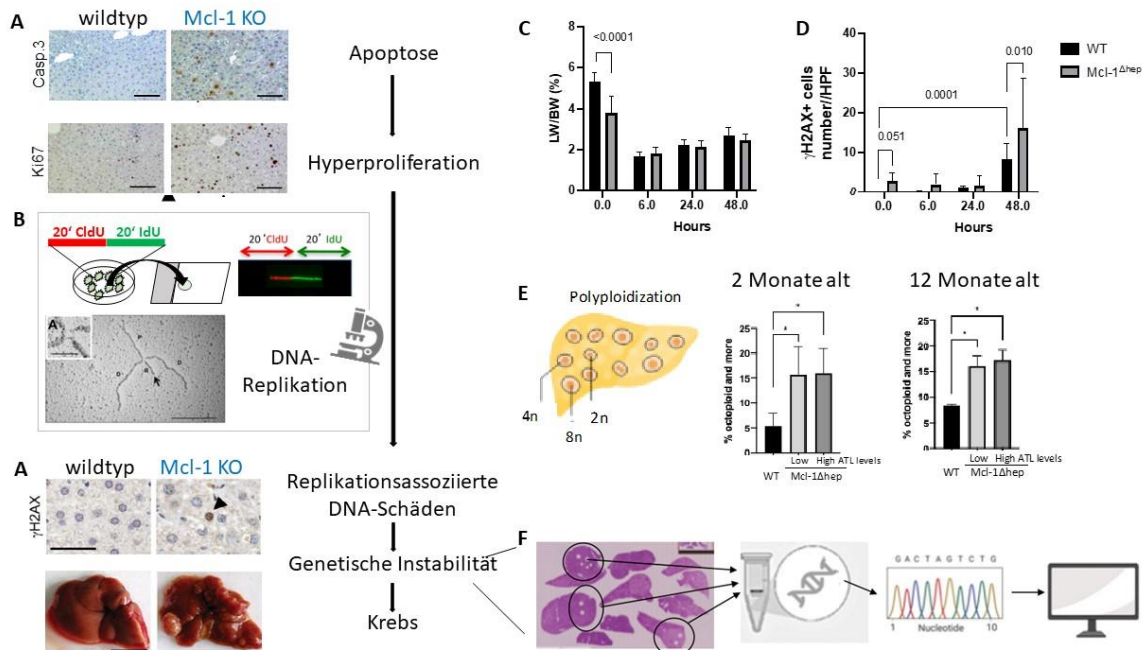
In einem ersten Schritt ist es uns gelungen, einige routinemässig *in vitro* verwendete Techniken an unsere *in vivo* Modelle anzupassen, indem wir Hepatozyten isoliert und die DNA-Schäden mittels Comet-Assay charakterisiert haben. Gegenwärtig entwickeln wir weitere Protokolle, um die individuelle Replikationsgabelprogression mit Hilfe von DNA-Faseranalysen zu verfolgen, und um die Umgestaltung der Gabel in isolierten Hepatozyten mithilfe eines Elektronenmikroskops zu visualisieren (Abb. B).

In einem zweiten Schritt haben wir Lebern von WT und Mcl-1 KO-Mäusen einer PH unterzogen. Wir konnten keinen Unterschied zwischen der regenerativen Fähigkeit von Mcl-1 KO-Lebern und WT-Lebern beobachten (Abb. C), untersuchen nun aber mithilfe von Markern (z.B. γ H2AX) die DNA-Schäden in diesen Organen (Abb. D). Um die Auswirkungen auf die genetische Stabilität abzuschätzen, haben wir genomische DNA extrahiert und mittels Whole-Exome-Sequenzierung die Mutationslandschaft charakterisiert, entweder verursacht durch Hyperproliferation induzierte DNA-Schäden nach PH oder in Mcl-1 KO-Tumoren (Abb. F). Gegenwärtig laufende, bioinformatische Analysen werden uns erlauben, die genetischen Veränderungen in diesem Kontext mit menschlichen Mutationssignaturen zu vergleichen. Gleichzeitig haben wir beobachtet, dass die Deletion von Mcl-1 in den Hepatozyten von Mäusen eine nukleäre Polyploidisierung (d.h. eine Vervielfachung des Chromosomensatzes) auslöst (Abb. E). In der Leber tritt eine Polyploidisierung im Laufe des Lebens physiologisch auf, kann aber auch pathologisch, als Antwort auf gewisse Stressarten, auftreten. Die Rolle der Polyploidie in der Entstehung von Leberkrebs ist nicht bekannt. Wir konnten zeigen, dass die Polyploidisierung in Mcl-1 KO-Lebern weder auf erhöhte Apoptose und Proliferation, noch auf das Alter zurückgeführt werden kann (Fig. D). Dies deutet auf eine direkte Rolle von Mcl-1 in der Polyploidisierung hin. Wir untersuchen nun, ob Replikationsstress, anhaltende DNA-Schäden oder Endoreplikation Mechanismen sind, die an diesem Prozess beteiligt sind. Um weitere Einblicke in Mechanismen, an denen Mcl-1 bei replikativem Stress beteiligt ist, zu gewinnen, haben wir Mcl-1 KO-Darm- und Leberzellen kultiviert. Wir induzieren *in vitro* replikativen Stress, indem wir mithilfe von genotoxischen Medikamenten die DNA-Replikation stören. So können wir die individuelle Replikationsgabelprogression verfolgen und eine potentielle Umgestaltung der Gabel, die im Vorfeld mit anderen klinisch relevanten Replikationsstress-Bedingungen verknüpft wurde (Berti, Cortez & Lopes, 2020), sichtbar machen (Abb. B).

Abbildungen

Schematische Darstellung der Arbeitshypothese und der Hauptergebnisse. **(A)** Lebern von Wildtyp (WT) und Mcl-1 KO-Mäusen mit repräsentativen Tumoren. Färbung für Caspase 3 (apoptotischer Marker), Ki67 (proliferativer Marker) und γ H2AX (DNA-Schadensmarker). **(B)** Darstellung der molekularen Methoden, die zur Überwachung der individuellen Replikationsgabelprogression (DNA-Faseranalysen) und zur Visualisierung der Umgestaltung der Gabel (Elektronenmikroskop) verwendet wurden. **(C)** Regenerative Fähigkeiten von WT und Mcl-1 KO-Mäusen nach partieller Hepatektomie, beurteilt gemäss dem Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht. **(D)** DNA-Schäden, beurteilt mittels γ H2AX-Färbung. **(E)** Darstellung der nukleären Polyploidisierung in der Leber und Prozentsatz der Hepatozyten, die eine hohe nukleäre Polyploidie (>8) in WT und Mcl-1 KO-Mäusen aufweisen. Alanin-Aminotransferase (ALT) Konzentrationen dienen als Apoptosemarker. **(F)** Analyse der genomischen Veränderungen durch histologische Beurteilung von Mcl-1 Tumoren, Extraktion

der genomischen DNA dieser Tumoren, Whole-Exome-Sequenzierung und bioinformatische Analyse.



Referenzen

- Berti, M., Cortez, D., & Lopes, M. (2020). The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10), 633–651. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0257-5>
- Boege, Y., Malehmir, M., Healy, M. E., Bettermann, K., Lorentzen, A., Vucur, M., ... Weber, A. (2017). A Dual Role of Caspase-8 in Triggering and Sensing Proliferation-Associated DNA Damage, a Key Determinant of Liver Cancer Development. *Cancer Cell*, 32(3), 342-359. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.010>
- Neelsen, K. J., & Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes: From dead end to dynamic response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(4), 207–220. <https://doi.org/10.1038/nrm3935>
- Weber, A., Bocher, R., Vick, B., Urbanik, T., Haybaeck, J., Zoller, S., ... Schulze-Bergkamen, H. (2010). Hepatocyte-specific deletion of the anti-apoptotic protein Mcl-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*, 51(4), 1226–1236. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.005.Re-Thinking>