

acoasso

Österreichische Gesellschaft für Chirurgische Onkologie
Austrian Society of Surgical Oncology

INTERDISZIPLINÄRE ONKOLOGIE

Offizielles Organ der Österreichischen Gesellschaft für Chirurgische Onkologie

**Abschlussbericht über das Projekt
"Analysis of 14-3-3 Sigma
Expression in Colorectal Carcinoma
and its Impact on Resistance to
Chemotherapeutic Agents"**

Perathoner A

*Journal für Gastroenterologische
und Hepatologische Erkrankungen*

2010; 8 (4), 52-53

Interdisziplinäre Onkologie 2010;

2 (4), 52-53

Homepage:

www.kup.at/acoasso

Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche

Abschlussbericht über das Projekt „Analysis of 14-3-3 Sigma Expression in Colorectal Carcinoma and its Impact on Resistance to Chemotherapeutic Agents“

(gefördert durch das Georg-Stumpf-Stipendium 2006 der ACO/ASSO)

A. Perathoner

■ Einleitung

14-3-3 sigma ist ein kleines intrazelluläres Protein von 28–33 kDa Größe, das in Epithelzellen beinahe ubiquitär gebildet wird und gemeinsam mit p53 an zahlreichen physiologischen Zellfunktionen wie Zellzyklusregulation, Apoptose und Signaltransduktion beteiligt ist. Zahlreiche Untersuchungen in den vergangenen Jahren haben gezeigt, dass 14-3-3 sigma auch bei der malignen Transformation von Zellen eine wichtige Rolle spielt: der Verlust der 14-3-3-sigma-Expression geht beispielsweise beim Mammakarzinom mit einer signifikanten Tumorprogression einher. Unsere eigenen immunhistochemischen Untersuchungen bei Patienten mit einem Kolonkarzinom ergaben hingegen eine deutliche Zunahme der 14-3-3-sigma-Expression mit steigender Dedifferenzierung des Karzinoms. Wir konnten darüber hinaus nachweisen, dass die Überexpression von 14-3-3 sigma einen unabhängigen negativen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben der Patienten darstellt [1]. Unsere bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass 14-3-3-sigma-überexprimierende Dickdarmkarzinome möglicherweise apoptose-resistent sind. Unterstützt wird diese These durch andere Publikationen, die zeigten, dass 14-3-3 sigma durch Bindung an Bad und Bax deren proapoptotische Wirkung aufheben kann. Für die Therapie maligner Tumoren ist dieser Effekt von größter Wichtigkeit, da ja jede Chemotherapie primär darauf abzielt, Krebszellen durch Induktion der Apoptose zu eliminieren. Beim Dickdarmkarzinom ist 5-Fluorouracil (5-FU) das am meisten verwendete Chemotherapeutikum. Resistenz gegen 5-FU, z. B. durch Überexpression von Thymidylatsynthase (TS), ist eine der Hauptursachen für das Scheitern einer entsprechenden Chemotherapie. Ein besseres Verständnis dafür, wie 14-3-3 sigma Apoptoseprozesse beeinflusst und verhindert, könnte wertvolle Hinweise dafür liefern, wie Tumorzellen im Dickdarm effektiver eliminiert werden können. Ziel des vom Georg-Stumpf-Stipendium der ACO-ASSO unterstützten Projekts war es daher, entsprechende experimentelle In-vitro-Untersuchungen durchzuführen, um Zusammenhänge zwischen der Expression von 14-3-3 sigma und der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika in Kolonkarzinom-Zelllinien zu analysieren (Erhöht ein „knock down“ von 14-3-3 sigma in vitro die Sensitivität gegenüber 5-FU? Wie reagieren Tumorzellen, die 14-3-3 sigma überexprimieren, in vitro auf Chemotherapeutika?). Darüber hinaus sollten allfällige Promotorelemente ausgeforscht werden, welche die Expression von 14-3-3 sigma regulieren.

■ Untersuchungen und Ergebnisse

Zunächst war es notwendig, in einem ersten Schritt diverse Kolonkarzinomzelllinien mit unterschiedlicher Expression von 14-3-3 sigma und unterschiedlichem Resistenzverhalten gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil zu generieren. Nach entsprechenden Vorarbeiten wurden hierfür einerseits die Zelllinien HT29 und SW480 ausgewählt, welche 14-3-3-sigma-negativ und 5-FU-sensitiv sind, und andererseits die Zelllinien HT29-12, HT29-21, DLD1 und Lovo selektioniert, welche 14-3-3-sigma-positiv und resistent gegen die Behandlung mit 5-FU sind. Für die Durchführung der geplanten Analysen musste die Expression von 14-3-3 sigma in den bestehenden Zelllinien künstlich so modifiziert werden, dass sowohl eine nachweisbare Überexpression als auch eine eindeutige Blockade der Expression von 14-3-3 sigma erzielt werden konnte, d. h. in 14-3-3-sigma-negativen Zellen wird 14-3-3 sigma überexprimiert und in 14-3-3-sigma-positiven Zellen wird die Expression von 14-3-3 sigma blockiert.

Für die Herstellung von Kolonkarzinomzellen mit einer stabilen Überexpression von 14-3-3 sigma („Phase I, Part A: Generation of 14-3-3 sigma overexpression in CRC cell lines“) wurde das 14-3-3-sigma-Gen in einen speziellen Vektor (pcDNA4/TO) eingebaut und jede 14-3-3-sigma-negative Zelllinie anschließend mit diesem Vektor transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels Western Blot überprüft und bestätigt. Im Gegenzug musste im nächsten Arbeitsschritt die 14-3-3-sigma-Expression in 14-3-3-sigma-positiven Zellen eliminiert werden („Phase I, Part B: Generation of stable siRNA-mediated 14-3-3 sigma knock down in CRC cell lines“). Erzielt werden konnte dies durch die Technik der so genannten RNA-Interferenz, bei der durch eigens konstruierte kleine RNA-Sequenzen (siRNA) eine gezielte Genblockade erreicht werden kann. Die kommerziell erhältlichen, entsprechenden 14-3-3-sigma-spezifischen RNA-Sequenzen wurden durch Transfektion in die 14-3-3-positiven Kolonkarzinomzellen eingebracht und das Ausmaß der 14-3-3-sigma-Genblockade mittels PCR und Western Blot überprüft.

Die bereits vorhandenen Zelllinien und die neu gezüchteten 14-3-3-sigma-überexprimierenden und 14-3-3-sigma-negativen Zelllinien wurden anschließend mit dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil nach einem exakt definierten Schema mit unterschiedlichen Zeitintervallen und Dosierungen behandelt. Der entsprechende Effekt des Chemotherapeutikums wurde durch Messung von Zellproliferation, Apoptose und Hemmkonzentration des Chemotherapeutikums beurteilt. Die Ergebnisse zeigten erwartungsgemäß eine geringe Resistenz der 14-3-3-negati-

ven Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (hohe Apoptoserate), während die 14-3-3-positiven Zellen einen dramatischen Anstieg der Chemotherapieresistenz zeigten (geringe Apoptoserate).

Im zweiten Teil des Projekts wurden Promotoranalysen durchgeführt, um Proteine zu identifizieren, die an der aberranten Expression von 14-3-3 sigma in Tumorzellen beteiligt sind. Solche Proteine könnten interessante Targets für eine unterstützende Therapie darstellen. Mithilfe von Reporter- und EMSA-Assays und anschließender Proteinsequenzierung mittels MALD-TOFF wurden mehrere verschiedene Transkriptionsfaktoren (z. B. AP-1, EGR-3, Pit-1, NFE2, GCMa, IRF8 und Oct1) als mögliche Regulatoren der 14-3-3-sigma-Transkription identifiziert, die in weiteren Analysen noch auf ihre Spezifität und genaue Wirkung untersucht werden sollen.

An dieser Stelle sei der Österreichischen Gesellschaft für Chirurgische Onkologie und ihrem Gönner, Herrn Mag. Georg Stumpf, noch einmal herzlichst für die großzügige finanzielle

Unterstützung dieses Projekts gedankt. Das Georg-Stumpf-Stipendium stellt ein überaus wichtiges Förderinstrument für junge, onkologisch interessierte, forschende Chirurgen dar und bestätigt die kontinuierlich zunehmende Bedeutung der chirurgischen Onkologie in der Medizin in Österreich.

Literatur:

1. Perathoner A, Pirkebner D, Brandacher G, Spizzo G, Stadlmann S, Obrist P, Margreiter R, Amberger A. 14-3-3sigma expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3274–9.

Korrespondenzadresse:

*Dr. Alexander Perathoner
Department Operative Medizin
Universitätsklinik für Viszeral-, Transplantations- und
Thoraxchirurgie
Medizinische Universität Innsbruck
A-6020 Innsbruck, Anichstraße 35
E-Mail: alexander.perathoner@i-med.ac.at*

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)