

Funktionelle Relevanz der N6-Methyladenosin (m6A)-RNA-Modifikation für die Progression des Urothelkarzinoms der Harnblase

Stipendiat: Dr. med. Manuel Neuberger, Mannheim

Das Urothelkarzinom der Harnblase ist durch eine hohe Rezidiv- und Progressionsrate charakterisiert, deren biologischer Hintergrund nicht vollständig geklärt ist. Über die letzten Jahre ist das Epitranskriptom zunehmend in den Fokus der Krebsforschung gerückt. RNA-Modifikationen beeinflussen durch posttranskriptionelle Änderungen maßgeblich die Zellentwicklung und -differenzierung. Die m6A-Modifikation ist die häufigste interne mRNA-Modifikation in Eukaryoten und wurde erstmalig 1974 beschrieben. Im Urothelkarzinom der Harnblase liegen erhöhte m6A-Level vor. Das Hauptmethylierungsprotein ist die Methyltransferase-like 3 (METTL3), welche mit 13 weiteren komplexassoziierten Proteinen eine funktionelle Methylierungseinheit bildet. Basierend auf einer publizierten *in silico* Datenanalyse können Urothelkarzinom-Patienten bezüglich ihrer Prognose anhand ihrer m6A-Komponenten risikostratifiziert werden, jedoch fehlt hier bislang eine klinische Validierung. Zudem führt der gezielte Knockdown bzw. Knockout des hochregulierten Methylierungsproteins METTL3 zur Reduktion des Zellwachstums und der Invasivität sowie zur Erhöhung der Apoptoserate.

Die m6A-Detektion bleibt trotz zunehmender Forschungserkenntnisse weiterhin eine Herausforderung. Transkriptomweite, antikörperabhängige Methoden wie MeRIP-Seq und miClip-Seq lassen zwar ein typisches m6A-Verteilungsmuster erkennen, eine exakte Lokalisation und Quantifizierung der Methylierungsorte war jedoch bislang nicht möglich. Hierdurch ist aktuell bekannt, dass die methylierten Adenosinbasen meist als DRACH-Sequenz vorliegen und insbesondere in langen kodierenden Exonen, in Stopcodonnähe oder in der 3'UTR-Region bestimmter Zielgene auftreten.

Ziel des Projektes ist es die funktionelle Relevanz der N6-Methyladenosin (m6A)-RNA-Modifikation für die Progression des Urothelkarzinoms der Harnblase besser zu verstehen. Das Projekt wird in der Abteilung Epigenetik des Deutschen Krebsforschungszentrums unter Leitung von Prof. Dr. Lyko in Kooperation mit der Klinik für Urologie und Urochirurgie der Universitätsmedizin Mannheim unter Leitung von Prof. Dr. Michel durchgeführt.

In einem ersten Schritt werden die bestehenden Erkenntnisse zur m6A-Modifikation im Urothelkarzinom validiert und präzisiert. Unter Nutzung einer kürzlich publizierten, antikörperunabhängigen m6A-Sequenzierungsmethodik (MAZTER-Seq) wird zum direkten Nachweis von m6A-Stellen auf Einzelnukleotid-Ebene ein qRT-PCR-basiertes-m6A-Assay entwickelt. Nach Etablierung wird das Assay zur exakten Identifizierung und Quantifizierung bereits bekannter m6A-Peaks von Zielgenen angewandt und mit klinisch-pathologischen Progressionsparametern assoziiert. Dies erfolgt an tumoralem und paratumoralem Frischgewebe sowie an einer bestehenden Kohorte von FFPE-Zystektomiepräparaten.

Anschließend soll die Methodik nach erfolgtem METTL3-Knockdown sowie -Knockout transkriptomweit durch eine vergleichende MAZTER-Sequenzierung angewandt werden, um weitere hypermethylierte Zielgene exakt zu charakterisieren. Dabei erfolgte die Bestimmung wichtiger Methylierungsmuster für die Progression durch den Vergleich von invasiven gegen nicht-invasive Zelllinien in 3 unterschiedlichen Bedingungen (unbehandelt vs. Knockdown vs. Knockout). Ergänzend wird der Effekt des Knockdowns bzw. Knockouts auf die Tumorzelllinien durch in-vitro Viabilitäts-, Invasions- und Apoptoseassays untersucht werden.

Zur Überführung des Projektes ins Heimatlabor soll zum Ende des Förderungszeitraum begonnen werden, die identifizierten Signalkaskaden intern rückzuvalidieren und ihre funktionelle Relevanz auf die Progression und Karzinogenese des Urothelkarzinoms weiter zu untersuchen. Erkenntnisse aus diesem Projekt sollen zukünftig die Integration epitranskriptomischer Ansätze in die bisherigen Verfahren der molekularen Diagnostik und Therapie des Urothelkarzinoms erlauben.