Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Fakultät für Klinische Medizin Mannheim

Dissertations-Kurzfassung

Mutation analysis of the DNA polymerase delta gene in human sporadic colorectal cancers

Autor: Jia-Chun Dai

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ)

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. E. Hagmüller

A high frequency of chromosomal abnormalities and mutations are found in various human cancers. Particularly, the development of colorectal cancer is characterized by marked chromosomal changes and the accumulation of a large number of mutations in oncogenes and tumor suppressor genes (Vogelstein *et al.,* 1988). These multiple mutations cannot be explained by the spontaneous mutation rate in normal cells. Rather, they must be caused by early mutations arising in genes which are responsible for genomic stability (mutator hypothesis proposed by L. Loeb 1991). Especially, DNA polymerases might acquire mutator properties during tumor development, which would result in reduced copying fidelity and would contribute to the increasing number of DNA sequence alterations in human colorectal cancer.

To test this hypothesis, the DNA polymerase δ mRNA was examined in 6 colon cancer cell lines and in 14 sporadic human colorectal cancers. The normal mucosae of these patients served as contrals. For analysis, amplification of cDNA by polymerase chain reaction, single-strand conformation polymorphism, cloning and sequencing techniques were used.

In 5 of the cell lines, 9 mutations leading to alterations of the amino acid sequence of DNA polymerase δ were detected. Most mutations were found in the cell lines DLD-1, HCT116 and SW48 for which defects in mismatch repair genes had been identified previously. In the majority of cases, wild-type and mutated sequences were present. In two cell lines (HCT116 and SW48), a single-nucleotide deletion occurred at the same position. This resulted in a shift of the reading frame and a premature termination codon by which the DNA interaction domain of the enzyme was eliminated. Furthermore, sequence deviations were found in the tumor tissues of 5 colon cancer patients. Wild-type and altered sequences were present simultaneously. The deviations included missense mutations (2 cases) and silent mutations (2 cases). The missense mutations and one of the silent mutations were found in normal mucosa as well.

In addition, the cDNA sequence of DNA polymerase δ obtained from four normal human colon mucosae revealed two sequence alterations when compared with the published genomic DNA sequence from human fetal liver. These alterations are supposed to be genomic DNA polymorphisms.

Most of the amino acid changes detected in the DNA polymerase δ mRNA were located near one of the highly conserved domains which are responsible for the catalytic protein functions. The mutations found are likely to alter the structure of the DNA polymerase δ protein and to impair the function of the protein. In particular, copying fidelity might be decreased, thus contributing to the high mutation

Die Entwicklung kolorektaler Tumoren ist durch eine zunehmende Zahl von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen charakterisiert (Vogelstein et al. 1988). Eine so hohe Zahl an Mutationen kann nicht durch die spontane Mutationshäufigkeit normaler Zellen erklärt werden. Daher wurde im Rahmen der Mutatorhypothese von L. A. Loeb (1991) gefordert, daß in der frühen Tumorentwicklung Mutationen in solchen Genen entstehen müssen, die für die genomische Stabilität und Integrität verantwortlich sind: z. B. in Genen der DNA-Replikation. Dadurch könnten vor allem DNA-Polymerasen Mutatoreigenschaften annehmen, die zu einer verringerten Kopiergenauigkeit und damit zu den DNA-Sequenzveränderungen in menschlichem Kolonkrebs führen könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit am Modell des sporadischen Kolonkarzinoms untersucht, ob das Gen der DNA-Polymerase δ mutiert sein kann.

Dazu wurde die m-RNA der DNA-Polymerase δ von 6 Kolonkarzinom-Zellinien und von 14 sporadischen kolorektalen Tumoren und dem normalen dazugehörigen Mukosagewebe nach DNA-

Sequenzunterschieden untersucht. Folgende Techniken wurden verwendet: Isolierung der Gesamt-RNA, Umschreibung der m-RNA in cDNA, Amplifizierung der cDNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion, Analyse des Einzelstrang-Konformationspolymorphismus, DNA-Sequenzierung und Klonierung.
In fünf der Zellinien wurden 9 Mutationen gefunden, die eine Änderung der Aminosäure-Sequenz der DNA-Polymerase δ zur Folge hatten. In der Überzahl der Fälle wurden mutierte Sequenz und Wildtyp-Sequenz gleichzeitig gefunden. Die meisten Mutationen traten in den Zellinien DLD-1, HCT116 und SW48 auf, für die Defekte in den Genen der Basenfehlpaarungsreparatur beschrieben worden sind. In zwei Zellinien (HCT116 und SW48) wurde, in der gleichen Position, eine Deletion eines einzigen Nukleotides entdeckt, was eine Verschiebung des Leserahmens verursachte und zu einem vorzeitigen Stoppkodon führte. Dadurch ging die Domäne, die für die Wechselwirkung von Enzym und DNA kodiert, verloren. Zusätzlich wurden im Tumorgewebe von 5 Patienten mit Kolonkrebs Sequenz-abweichungen gefunden. Es handelte sich um zwei stumme Mutationen und um zwei Mutationen, die die Aminosäuresequenz verändern. Auch hier wurden veränderte Sequenz und Wildtyp-Sequenz gleichzeitig entdeckt. Außerdem waren die Aminosäureveränderungen und eine der stummen Mutationen auch in der normalen Mukosa vorhanden.
Darüberhinaus unterschied sich die Sequenz der DNA-Polymerase δ–cDNA, die aus dem Gewebe von vier normalen Mukosen gewonnen wurde, in zwei Positionen von der genomischen DNA-Sequenz, die für menschliches, fötales Lebergewebe publiziert wurde. Bei beiden Abweichungen könnte es sich um DNA-Polymorphismen handeln.
Die meisten Veränderungen der Aminosäuresequenz der DNA-Polymerase δ aus sporadischen kolorektalen Tumoren liegen in der Nähe einer der hoch konservierten Domänen, von denen man weiß, daß sie für eine katalytische Proteinfunktion kodieren. Es ist anzunehmen, daß die gefundenen Mutationen Struktur und Funktion des DNA-Polymerase δ-Proteins verändern. Vor allem könnte die Kopiergenauigkeit der DNA-Polymerase beeinträchtigt sein, was die hohe Mutationsrate verursachen könnte, die bei kolorektalen Tumoren beobachtet wird.