Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Fakultät für Klinische Medizin Mannheim

Dissertations-Kurzfassung

Mutationsanalyse des DNA-Polymerase alpha-Gens und p53-Gens in sporadisch auftretenden Kolonkarzinomen

Autor: Chun Zheng

Institut / Klinik: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H. Thielmann

Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die Hypothese, daß DNA-Polymerasen durch Mutationen während früher Phasen der Tumorentstehung so verändert werden, daß sie Mutatoreigenschaften annehmen und so durch Anhäufung mutagener Ereignisse zur malignen Entartung der Zelle beitragen können. Das sporadische Kolonkarzinom diente als Modell, um zu überprüfen, ob das Gen der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase α mutiert sein kann.

Aus den Tumorpräparaten, dem Mukosagewebe und den Zellkulturen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase eine Erststrang-cDNA synthetisiert. Aus der Erststrang-cDNA wurden mittels die Polymerase-Kettenreaktion selektiv spezifische Abschnitte der DNA-Polymerase α-cDNA und *p53*-cDNA vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden mittels Analyse des Einzelstrang-Konformationspolymorphismus bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, was als Vorprüfung offenbar ausreichend empfindlich ist, um Mutationen aufzuspüren. Auf Sicherheitsgründen wurden alle PCR-Produkte sequenziert.

Die cDNA der DNA-Polymerase α wurde bei 11 Tumor- und Mukosapräparaten von Patienten geprüft, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt waren, aber keine familiäre Vorgeschichte dieser Erkrankung aufwiesen. Ergänzend dazu wurde die cDNA von sechs Kolonkarzinom-Zellinien analysiert. Drei dieser Zellinien (DLD1, HCT116 und SW48) wiesen Mutation in den Genen der Basenfehlpaarungsreparatur auf und unterlagen somit einer erhöhten Mutationsrate.

Die vollständige Sequenzierung von vier Tumorpräparaten mit samt normaler Mukosa zeigte Unterschiede gegenüber der in der Datenbank gespeicherten Referenzsequenz. Letztere war für DNA-Polymerase α von (malignen) KB-Zellen bestimmt worden. So stellt nicht diese, sondern die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Sequenz die normale Nukleotidfolge der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase α dar. Diese Sequenz diente für die weitere Mutationsanalyse als Kontrolle. In der cDNA der DNA-Polymerase α aus Tumoren wurden zwei Mutationen gefunden (Zellinie HCT116, GT**C** ® GT**A**, Val $\rightarrow$ **Val**; Patient CC9MA, AC**T** $\rightarrow$ AC**C,** Thr $\rightarrow$ **Thr**), die zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führten.

Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, wie oft Mutationen überhaupt in den untersuchten Zellinien und Tumoren vorkommen, wurde die cDNA des *p53*-Gens untersucht, da diese in mehr als der Hälfte aller menschlichen Kolonkarzinome verändert ist (Baker et al., 1989). Es wurden die gleichen Kolonkarzinome, Mukosapräparate und Zellinien untersucht wie bei der Analyse der DNA-Polymerase α. Sieben Mutationen wurden entdeckt, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge hatten.

In der Zellinie DLD1 führte eine Punktmutation TCC $\rightarrow$ T**T**C zum Austausch von Serin gegen Phenylalanin. Die Zellinien HT29, SW480 und SW620 zeigten ebenfalls eine Punktmutation (CGT $\rightarrow$ C**A**T, Arg $\rightarrow$ **His**). Weitere Mutationen wurden in drei von acht Tumoren gefunden. Im Tumor CC24HN trat eine Punktmutation

(CCC $\rightarrow$ C**A**C, Pro $\rightarrow$ **His**) auf. Tumor CC3MA zeigte die Abweichung

(CGG $\rightarrow$ **T**GG, Arg $\rightarrow$ **Trp**). In Tumor CC7MA führte ein Austausch der Base Cytosin gegen Adenin zu einem Stoppkodon. Bezügen auf das Spektrum bekannter Mutationen (IARC *p53* Database) ist diese Veränderung neu.

Zum immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins wurde der monoklonaler Antikörper des Klons PAb 122 eingesetzt. Von den 13 untersuchten Proben

(6 Zellinien und 7 Tumoren der Patienten) konnte in 5 Proben (vier Zellinien DLD1, HT29, SW480, SW620 und ein Karzinom CC24HN) das Protein p53 nachgewiesen werden. Die Nachweishäufigkeit

entspricht 38 % der untersuchten Fälle. Bei all diesen 5 positiven Proben fand sich je eine Mutation in der Sequenz.
Die im *p53*-Gen gefundenen Mutationen entsprechen den in der Literatur publizierten Veränderungen bei kolorektalem Karzinom. Sie sind ein Indiz dafür, daß in den untersuchten Zellinien und Tumoren Veränderungen im Genom vorhanden sind im Gegensatz zu der geringen Zahl von Mutationen, die im Gen der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase α gefunden werden. Die Annahme der Hypothese erscheint nicht unberechtigt, daß DNA-Polymerase α zwar während der Tumorentstehung mutiert wird, aber die Mehrheit dieser Mutationen führen zur Störung der Proteinfunktion und verzögern die Replikation. Zellen mit solchen Mutationen werden aber eliminiert, denn das Tumorwachstum begünstigt Zellen, die sich besonders schnell vermehren.