

Jens Büttner

Dr. med.

Mutationsanalyse des DNA-Polymerase α -Gens und des APC-Gens in sporadisch auftretenden Kolonkarzinomen des Menschen

Geboren am 05.07.1972 in Darmstadt

Reifeprüfung am 26.05.1992

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1993/1994 bis SS 1999

Physikum am 07.09.1995 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 25.11.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Rolf Heiner Schirmer

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, daß DNA-Polymerasen durch Mutationen während früher Phasen der Tumorentstehung so verändert werden, daß sie Mutatoreigenschaften annehmen und somit zur weiteren malignen Entartung der Zelle beitragen. Am Modell des sporadischen Kolonkarzinoms wurde geprüft, ob das Gen der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase α mutiert sein kann. Zusätzlich wurde das APC-Gen ("adenomatous polyposis coli"-Gen) untersucht, das ein bei Kolonkarzinomen häufig entartetes Tumorsuppressor-Gen ist. Aus ökonomischen Gründen - um eine größere Anzahl an Tumoren gleichzeitig untersuchen zu können - wurde die cDNA-Analyse der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase α auf zwei Doktorarbeiten aufgeteilt. Die Nukleotide 1 - 2020 des dem 5'-Ende zugewandten Bereichs der cDNA wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Dieser Teil der DNA-Polymerase α -cDNA und die "mutation cluster region" des APC-Gens wurden bei 15 Tumorpräparaten von Patienten geprüft, die an der sporadischen Form des Kolonkarzinoms erkrankt waren. Verglichen wurde mit der cDNA gesunder Darmschleimhaut derselben Patienten sowie der publizierten Datenbank-Sequenz. Ergänzend dazu wurde die cDNA von sechs Kolonkarzinom-Zelllinien analysiert (DLD1, HCT116, HT29, SW48, SW480 und SW620). Drei dieser Zelllinien (DLD1, HCT116 und SW48) waren

durch Defekte in den Genen der Basenfehlpaarungsreparatur charakterisiert und unterlagen somit einer erhöhten Mutationsrate.

Methodisch wurde folgendermaßen vorgegangen: Aus den Gewebeproben und den Zelllinien wurde die Gesamt-RNA isoliert. Nach Umschreibung der mRNA in cDNA wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) selektiv spezifische cDNA-Abschnitte vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden mittels Analyse des Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP) nach Mutationen durchsucht. Wann immer sich in der SSCP-Gelelektrophorese Veränderungen in der Mobilität einzelner DNA-Fragmente ergaben, wurde das entsprechende PCR-Produkt sequenziert. Die Nukleotidsequenz dieser PCR-Produkte wurde entweder mittels Festphasensequenzierung oder mittels zyklischer Sequenzierung ermittelt.

Im 5'-Bereich der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase α konnten weder in den Zelllinien noch in den Tumorpräparaten Veränderungen gegenüber der normalen Darmschleimhaut nachgewiesen werden. Allerdings wurden Unterschiede in der Nukleotidsequenz gegenüber der publizierten Referenzsequenz gefunden. Die in dieser Arbeit vorgestellte Sequenz wurde - im Gegensatz zur Referenzsequenz - mehrfach an voneinander unabhängigen Mukosapräparaten bestätigt. Mit größter Wahrscheinlichkeit repräsentiert sie daher die korrekte Nukleotidfolge der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase α .

Um einen Anhaltspunkt über das Auftreten von Mutationen in den untersuchten Tumoren und Zelllinien unabhängig von der DNA-Polymerase α zu erhalten, wurde die cDNA der "mutation cluster region" des APC-Gens untersucht. Es wurden fünf Mutationen entdeckt, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge hatten. In der Zelllinie DLD1 (bei der die Basenfehlpaarungsreparatur defekt ist) wurde als Folge einer Deletion eine Leserahmenverschiebung gefunden. Desweiteren wurde in dieser Zelllinie eine Punktmutation nachgewiesen, die zum Austausch einer Aminosäure führte. In der Zelllinie SW480 dagegen sowie in zwei Tumorpräparaten (ohne Reparaturdefekte) wurde je eine Punktmutation gefunden, die ein kodierendes Triplet direkt in ein Stoppkodon überführte. Aus der Literatur geht hervor, daß sich in Zellen mit defekter Basenfehlpaarungsreparatur vermehrt Mutationen finden, die den Leserahmen verschieben, während in Zellen mit intakter Basenfehlpaarungsreparatur vornehmlich Punktmutationen auftreten. Erstere sind Ausdruck von Replikationsfehlern, letztere spiegeln die Wirkung von Mutagenen bzw. Karzinogenen wider. Die APC-Mutationen der vorliegenden Arbeit entsprachen dieser Verteilung.

Zusätzlich wurde in vier Zelllinien und vier Tumoren eine Mutation gefunden, die keine Veränderungen der Aminosäuresequenz bewirkte. Diese Veränderung trat in allen Präparaten

an der gleichen Nukleotidposition auf und wurde als Polymorphismus interpretiert, da sie auch in zwei Präparaten normaler Darmschleimhaut nachzuweisen war.

Die in der "mutation cluster region" des *APC*-Gens gefundenen Mutationen entsprechen den in der Literatur publizierten Veränderungen bei Kolontumoren. Sie sind Indiz dafür, daß in den untersuchten Zelllinien und Tumoren Veränderungen im Genom vorhanden sind. Im Gegensatz dazu traten in der cDNA der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase α keine Mutationen auf (auch nicht in der carboxyterminalen Hälfte der cDNA, deren Untersuchung Gegenstand einer weiteren Doktorarbeit war). Somit ist es unwahrscheinlich, daß DNA-Polymerase α während der Tumorentstehung Mutator-Eigenschaften annimmt.