

**Aus dem Institut für Zellbiochemie  
und Klinische Neurobiologie  
des Universitätskrankenhauses Eppendorf  
Direktor: Prof. D. Richter**

**"Expressions- und Mutationsanalyse  
von KET/p63 in Basaliomen"**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von**

**Julia Bethge  
aus Hannover  
Hamburg, 2001**

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 27. November 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. H. Schmale

Korreferent: Prof. Dr. D. Richter

## ***Widmung***

*diese Arbeit möchte ich  
meinen Eltern Dorothee und Klaus-Peter Bethge  
sowie meinem Freund Stefan Maisch  
widmen*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>WIDMUNG</b>	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>IV</b>
<b>AMINOSÄUREN</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. KET/p63, ein Mitglied der neu entdeckten p53-Genfamilie	1
1.2. p53: Funktion als Tumorsuppressorgen, Bedeutung in der Cancerogenese und Mutationshäufigkeit in Tumoren	1
1.3. Der Aufbau der Haut	5
1.4. Das Basaliom	7
1.5. Charakterisierung von KET/p63	9
1.6. Ziel der Arbeit	12
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1. Material	14
2.1.1. Chemikalien	14
2.1.2. Lösungen	14
2.1.3. Enzyme	15
2.1.4. Kits	15
2.1.5. DNA-Vektor und Bakterienstamm	15
2.1.6. Oligonukleotide	16
2.1.7. Gewebe	17
2.1.8. DNA	18
2.1.9. Geräte	18
2.2. Methoden	18
2.2.1. Gewebepräparation	18
2.2.2. Gleichzeitige Isolation von RNA und DNA aus dem Basaliomgewebe	19
2.2.3. Quantifizierung der Menge an RNA und DNA durch vergleichende Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.4. cDNA-Synthese aus der Gesamt-RNA und RT-PCR	22

---

2.2.5. Aufreinigung von Oligonukleotiden nach der Synthese	25
2.2.6. Aufreinigung der PCR-Produkte	26
2.2.7. Sequenzierung der PCR-Produkte	26
2.2.8. Subklonierung eines PCR-Fragmentes	27
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
3.1. Darstellung des Tumormaterials	32
3.2. Darstellung des Patientenkollektivs	33
3.3. Gleichzeitige RNA- und DNA-Isolation	33
3.4. RT-PCR	34
3.4.1. Amplifikation von KET/p63	34
3.4.2. Amplifikation von p53	35
3.5. Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte	36
3.5.1. KET/p63	36
3.5.2. p53	37
3.6. Mutationsanalyse	37
3.6.1. KET/p63	37
3.6.2. p53	40
3.6.3. HaCaT-Zelllinie	44
3.7. Expressions-Analyse der Spleißvarianten	45
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>47</b>
4.1. Methodische Probleme	47
4.2. Vergleich mit der Literatur	50
4.3. Mögliche Funktionen von KET/p63	52
4.4. Fazit	60
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>62</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>63</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>70</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>71</b>
<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>72</b>

**ABKÜRZUNGEN**

Abb.	Abbildung
AER	apical ectodermal ridge
AS	Aminosäure
Aqua tridest.	dreifach destilliertes Wasser
BCC	Basal Cell Carcinoma (Basaliom)
β-Me	Beta-mercaptoethanol
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ca	Carcinom
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CUS	Chronisch ulcerative Stomatitis
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EEC Syndrom	ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and facial clefts Syndrome
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hu	human
kb	kilobase
KET	Abkürzung für das Rattenhomolog des humanen p63 mit hauptsächlicher Expression in <u>Kerati</u> nozyten
LMS	Limb Mammary Syndrome
M	Molar
m	murine = von der Maus
mm	Millimeter

---

ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl
NaAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunden
SES-ANA	squamous epithelium-specific antinuclear antibodies
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
Temp	Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

**AMINOSÄUREN**

<u>Buchstabe</u>	<u>Name</u>	<u>Kurzschreibweise</u>
G	Glycin	Gly
A	Alanin	Ala
V	Valin	Val
I	Isoleucin	Ile
F	Phenylalanin	Phe
P	Prolin	Pro
S	Serin	Ser
T	Threonin	Thr
C	Cystein	Cys
M	Methionin	Met
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosin	Tyr
N	Asparagin	Asn
Q	Glutamin	Gln
D	Asparaginsäure	Asp
E	Glutaminsäure	Glu
H	Histidin	His
K	Lysin	Lys
R	Arginin	Arg

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. KET/p63, ein Mitglied der neu entdeckten p53-Genfamilie

Bis 1997 wurde angenommen, daß das Tumorsuppressorgen p53 keine Genfamilie besäße, doch dann wurden kurz nacheinander gleich zwei verwandte Gene entdeckt: p73 [Oren et al. 1997] und ein weiteres Gen, das unter den Namen KET [Schmale und Bamberger 1997], p63 [Yang et al. 1998], p40 [Trink et al. 1998], p51 [Osada et al. 1998] und p73L [Senoo et al. 1998] veröffentlicht wurde. Hier wird die Nomenklatur **KET/p63** verwandt.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie beider Gene zu p53 sowie untereinander entstand sogleich die Frage, ob sie auch als Tumorsuppressorgene fungieren oder eine andere Funktion haben.

### 1.2. p53: Funktion als Tumorsuppressorgen, Bedeutung in der Cancerogenese und Mutationshäufigkeit in Tumoren

Wegen seiner zentralen Rolle in der Regulation des Zellzyklus wird das Tumorsuppressorgen p53 auch als Wächter des Genoms bezeichnet [Lane 1992]. Es bewirkt entweder Zellzyklusstop in der G1-Phase zum Zwecke der DNA-Reparatur nach Schädigung der DNA zum Beispiel durch chemische Karzinogene, ionisierende Strahlen oder UV-Licht, oder es induziert Apoptose, um die Akkumulation von DNA-Schäden in einer Zelle zu verhindern. Als Transkriptionsfaktor aktiviert das p53-Protein dabei die Expression weiterer in die Kontrolle des Zellzyklusses und des programmierten Zelltodes involvierter Gene wie zum Beispiel p21WAF1/CIP1, MDM2, 14-3-3, BAX, GADD45 [Kaelin Jr. 1999] und reguliert dadurch negativ die Zellteilung. Dadurch kann es die Progression einer mutierten Zelle zu einem malignen Zellklon und letztendlich zum invasiven Tumor verhindern. So wird die Integrität des Genoms bewahrt.

Darüberhinaus hat p53 Funktionen in der Zellalterung sowie in der Kontrolle der Angiogenese [Wallace-Brodeur et al. 1999]. Im Gegensatz dazu hat es weniger Bedeutung für den normalen Zellzyklus, also ohne genotoxischen Streß, sowie für die Zelldifferenzierung, wie man an der zunächst normalen Entwicklung von p53<sup>-/-</sup> Mäusen sehen kann [Donehower et al. 1992].

Das p53-Tumorsuppressorgen ist auf dem Chromosom 17p13.1. lokalisiert. Es ist 20 Kilobasen lang und besteht aus 11 Exons, von denen das erste nicht Protein-kodierend ist und nur untranslatierte Bereiche enthält. Es kodiert ein 53 Kilodalton schweres aus 393 Aminosäuren aufgebautes nukleäres Phosphoprotein. Dieses läßt sich strukturell und funktionell in drei wichtige Bereiche einteilen: die N-terminale Transaktivierungsdomäne, den

Kernbereich mit der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne, die an eine Pentamer-Konsensus-Sequenz im Promotorbereich der oben genannten Gene binden kann, und die C-terminale Oligomerisierungsdomäne, die für die Protein-Protein-Interaktionen u.a. die Tetramerisierung der p53-Proteine verantwortlich ist. Weiterhin fallen beim Interspeziesvergleich fünf in Aminosäure- und Nukleotidsequenz hochkonservierte Bereiche auf, von denen allein vier in der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne liegen. Diese Tatsache zusammen mit der Erkenntnis, daß auch die meisten von Mutationen betroffenen Aminosäuren in diesem Bereich liegen, veranschaulichen die wichtige Bedeutung dieser Region für die Funktion von p53 (s. Abbildung 1.1).

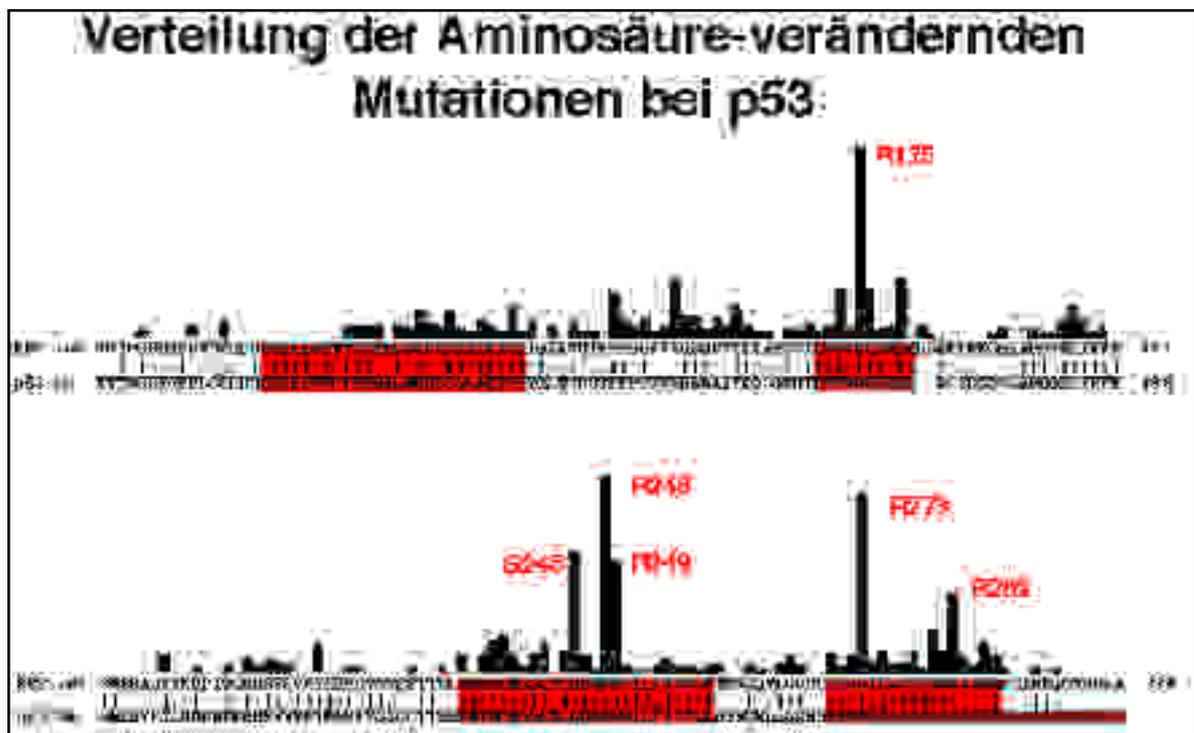
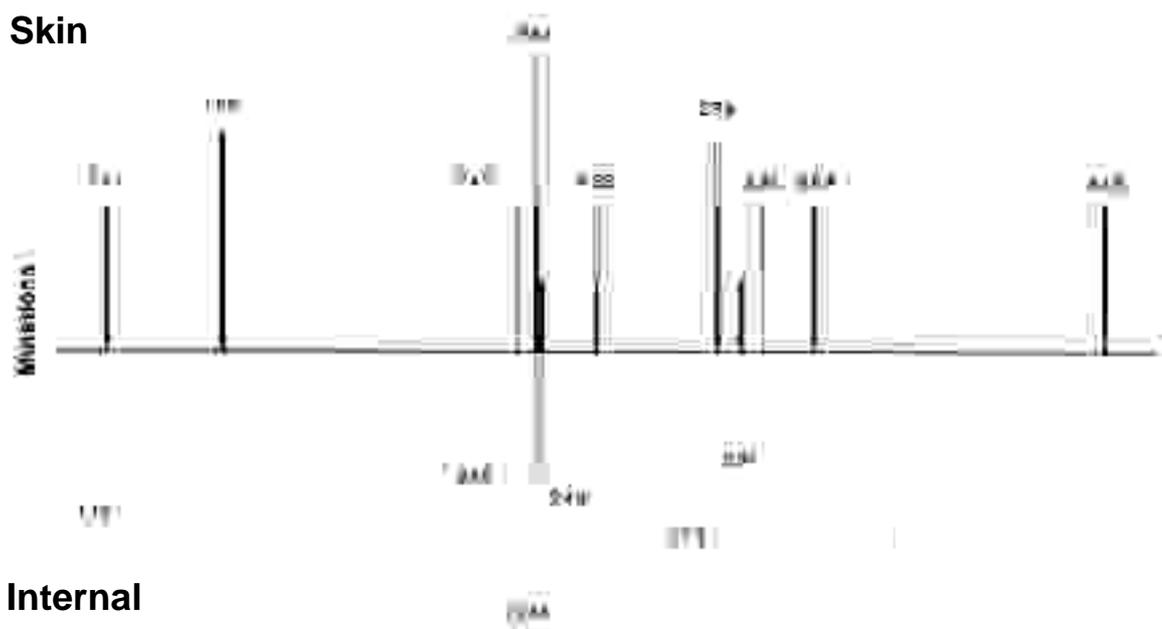


Abbildung 1.1: Lokalisation der am häufigsten von Mutationen betroffenen Aminosäuren in der DNA-Bindungsdomäne des p53 Tumorsuppressorgens und Darstellung der Sequenzhomologie zwischen p53 und KET/p63 in diesem Bereich. Hervorgehoben sind die sechs meistbetroffenen "Mutations-hotspots". Die rot-markierten Areale geben die in der Evolution hochkonservierten Bereiche der DNA-Bindungsdomäne an.

Nach heutigem Verständnis sind Tumoren genetische Erkrankungen, die schrittweise entstehen und nach Akkumulation mehrerer Mutationen in verschiedenen Genen klinisch manifest werden. Dabei können sowohl Onkogene aktiviert werden als auch Tumorsuppressorgene inaktiviert werden. Klassischerweise sind Tumorsuppressorgene infolge ihrer Inaktivierung oder infolge des Verlustes ihrer Expression an der Entstehung von Tumoren beteiligt. Die Knudson-Hypothese besagt, daß zum Ausbruch eines Tumors immer beide Allele im Tumorsuppressorgen inaktiviert sein müssen. Dabei können aber durchaus verschiedene Mutationen auf den beiden Allelen zu finden sein, oder es reicht nur eine

Mutation auf dem einen Allel aus, wenn das andere durch Allelverlust nicht kodiert [Knudson Jr. 1985]. Dies nennt man auch loss of heterozygosity (LOH) und macht es sich bei der Suche nach weiteren Tumorsuppressorgenen zunutze.

Das am häufigsten von Mutationen betroffene Gen ist das p53 Tumorsuppressorgen [Lübbe et al. 1994]. Inaktivierung des p53-Gens durch Deletion, Mutation oder Interaktion mit zellulären oder viralen Proteinen wie MDM2, HPV E6-Protein und Adenovirus E1B-Protein ist ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung von mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumoren [Arrowsmith 1999]. Dabei sind die p53-Mutationen in den allermeisten Fällen missense Punktmutationen und in sogenannten hotspots konzentriert, die vor allem in den oben genannten vier hochkonservierten Regionen in der DNA-bindenden Domäne des Gens zu finden sind (s. Abbildung 1.2). Diese Regionen entsprechen Exons 5-8 und die betreffenden für die DNA-Bindung essentiellen Aminosäuren sind sowohl zwischen p53 Genen verschiedener Spezies als auch unter den verschiedenen p53-verwandten Genen zu einem hohen Prozentsatz identisch .



[Weiß et al. 1997]. Zusätzlich aber können mutante Formen von p53 durch Bildung von dysfunktionalen Heterooligomeren mit der Wildtypform diese in dominant-negativer Art inaktivieren bzw. die Bindung an die DNA durch Konformationsänderung verhindern [Yang et al. 1998]. Zudem sind mutante Formen des p53-Proteins äußerst stabil und zeigen eine im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich verlängerte Halbwertszeit. Dadurch können sie die Transformation der Zelle noch beschleunigen. Dies steht in starkem Kontrast zu anderen Tumorsuppressorgenen, bei denen frameshift-Mutationen und große Deletionen dominieren und deren mutante Formen häufig instabil sind [Kaelin Jr. 1999].

Im Falle von UV-induzierten Karzinomen der Haut, also auch Basaliomen, sind die zu findenden p53- Punktmutationen typischerweise C->T-Transitionen an Dipyrimidin-Dimeren, wobei die CC->TT-Transition hochspezifisch für UV-Einwirkung ist und auch als "molecular fingerprint of UV-radiation" bezeichnet wird [Ananthaswamy et al. 1990, Grossman et al. 1997]. Im Gegensatz zu Tumoren innerer Organe, bei denen der Verlust der p53 Tumorsuppressor-Funktion ein spätes, mit zunehmender Invasivität des Tumors einhergehendes Ereignis ist, treten bei nicht melanozytären Hauttumoren p53 Mutationen frühzeitig und dem invasiven Stadium vorausgehend auf [Lübbe et al. 1994]. Auch unterscheiden sich die von Mutationen am häufigsten betroffenen Aminosäuren wie am oben gezeigten Schema ersichtlich zum Teil zwischen Tumoren innerer Organe und Tumoren der Haut [Ziegler et al. 1993]. Die Zahlen in der Literatur über die p53 Mutationshäufigkeit bei Basaliomen sind uneinheitlich. Sie reichen von 10% bis zu 56% [Brash et al. 1991, Rady et al. 1992, Campbell et al. 1993, Moles et al. 1993, Ziegler et al. 1993, Kubo et al. 1994, D'Ericco et al. 1997]. Das liegt wahrscheinlich am jeweils verwendeten Tumormaterial, bei dem eine Vermischung von normaler Haut ohne p53-Mutationen und Tumorgewebe vor allem im Falle von Frischgewebe nicht immer zu vermeiden ist und so zur Feststellung einer falsch niedrigen Mutationsrate führen kann [Ponten 1996].

Während bei Plattenepithelkarzinomen zumeist der Verlust des einen p53-Allels und p53 Mutationen auf dem anderen Allel zu finden sind, weisen Basaliome p53 Mutationen auf beiden Allelen auf [Grossman et al. 1997, Ziegler et al. 1993]. Außerdem weisen epitheliale Tumoren der Haut sehr häufig eine Überexpression von p53 auf. So wird in bis zu 65% der Basaliome eine p53-Überexpression gefunden, wobei zumeist eine Assoziation mit dem Grad der Entdifferenzierung der Zellen und somit der Aggressivität der Tumoren nachweisbar ist. Allerdings ist auch in frühen Stadien der Karzinogenese epithelialer Hauttumoren, d.h. in Präkanzerosen, schon abnorme p53-Expression zu finden. Nur in einem Teil dieser Tumoren beruht die Erhöhung der intrazellulären p53-Spiegel auf der Expression von mutanten Formen mit verlängerter Protein-Halbwertszeit, bei anderen Tumoren mit Überexpression von Wildtyp-p53 ist der Grund bisher nicht geklärt. Leider haben sich anfängliche Hoffnungen

nicht bestätigt, daß eine Überexpression von p53 als Hinweis auf eine p53 Mutation oder als Marker für eine maligne Transformation dieser Zelle gewertet werden kann [Weiß et al. 1997]. So zeigte sich, daß eine p53- Überexpression auch schon in normaler Haut nach UV-Exposition als normale Antwort auf UV-induzierte DNA-Schädigung auftritt.

### 1.3. Der Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und hat mit der äußeren Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt eine wichtige Funktion. Sie bildet immerhin 16% des Körpergewichtes und hat eine Gesamtfläche von 1,5-2 m<sup>2</sup>. Als Schutzbarriere gegen Verletzungen, physikalische und chemische Noxen sowie bakterielle und virale Infektionen ist sie einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt. Gerade deswegen ist ihre Fähigkeit zur ständigen Regeneration und Proliferation so wichtig.

Grob unterteilt man die Haut in die vom Ektoderm abstammende Epidermis (s. Abbildung 1.3) und die darunterliegende vom Mesoderm abstammende Dermis.

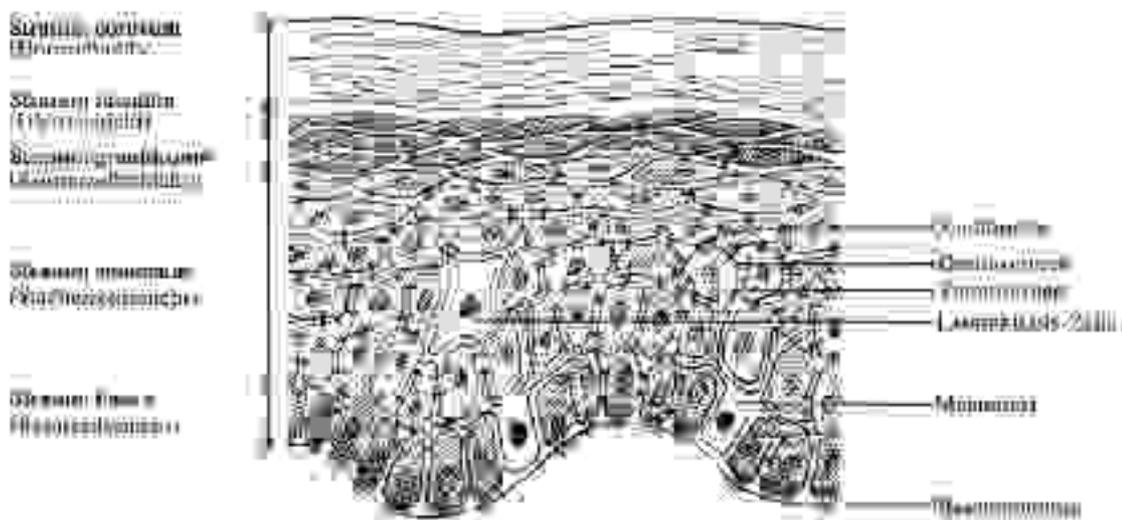


Abbildung 1.3: Schema des Aufbaus und der Schichtung der Epidermis [J Barth, G Richter, P Altmeyer, 1991]

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, dessen Hauptzellpopulation die Keratinozyten sind. Diese bilden durch Differenzierung auch die Hautanhangsgebilde wie Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikel. Weiterhin läßt sich die Epidermis in verschiedene Schichten unterteilen: Stratum basale mit einer Schicht Basalzellen, Stratum spinosum mit 4-10 Schichten von sogenannten Stachelzellen, Stratum granulosum mit 3-5 Schichten sogenannter Körnerzellen und Stratum corneum aus ganz flachen, festgepackten, kernlosen Hornzellen.

Im Gegensatz zu der Basalzellschicht, die als Proliferationskompartiment zu DNA-Synthese und Zellteilung befähigt ist, durchlaufen die suprabasalen Schichten als Differenzierungskompartiment den Prozeß der terminalen epidermalen Differenzierung, bei dem es außer morphologischen und biochemischen Veränderungen auch zum Zellteilungsstopp und schließlich zum kontrollierten Zelltod kommt. Das Durchlaufen all dieser Stadien von der Basalzelle bis zur abschilfernden Hornschuppe dauert etwa 3-4 Wochen.

Außerdem kann man den Aufbau der Haut auch als Mosaik von epidermalen proliferierenden Einheiten betrachten. Dabei entspringt jede Einheit einer Gruppe von ca. 10 Basalzellen, von denen wiederum eine die Stammzelle ist, und bildet eine darüberliegende Säule. Die Stammzelle teilt sich asymmetrisch zum einen in eine identische sich selbsterhaltende Tochterstammzelle und zum anderen in eine sich weiter teilende Transitzelle, die nach weiteren Teilungen ausdifferenziert und das Reifungskompartiment der Einheit bildet (s. Abbildung 1.4).

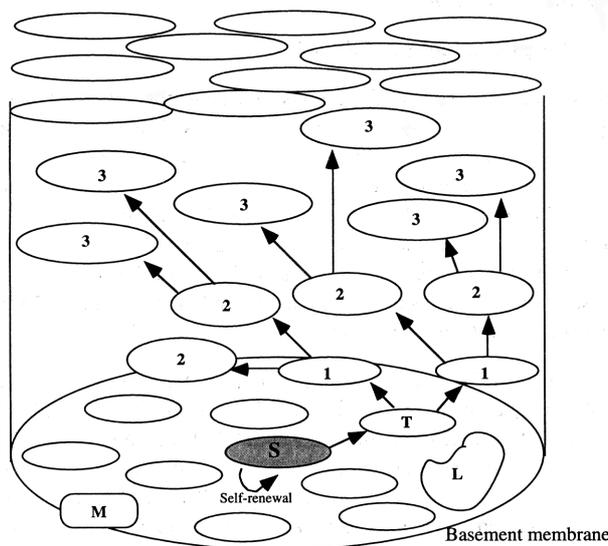


Abbildung 1.4: Schema des Aufbaus der Epidermis als Mosaik aus einzelnen wie hier abgebildeten epidermalen proliferierenden Einheiten (EPU: epidermal proliferating unit). S: Stammzelle, T: Transitzelle, 1-3: verschiedene Differenzierungsstadien, L: Langerhanszelle, M: Melanozyt. [Zhi-Ping Ren, 1996]

Man nimmt an, daß Stammzellen spezielle Mechanismen besitzen, um die Integrität ihrer DNA zu schützen und eine konstante Zahl von epidermalen proliferierenden Einheiten aufrecht zu erhalten. So ist zum Beispiel der Zellzyklus der Stammzelle langsamer als in den Transitzellen, so daß mehr Zeit für DNA-Reparatur besteht [Potten 1981].

Dieser verlangsamte Zellzyklus könnte auch das langsame Wachstum von Basaliomen erklären, die ja ihren Ursprung von eben dieser Stammzelle zu nehmen scheinen.

#### 1.4. Das Basaliom

Der Begriff *Basaliom* geht auf Nekam (1901) zurück und hat sich im deutschen Schrifttum allgemein durchgesetzt. Er hat den Vorteil gegenüber der in der angelsächsischen Literatur gebräuchlichen Bezeichnung *basal cell carcinoma*, daß er den biologischen Charakter der Geschwulst nicht vorwegnimmt [Köhler et al. 1997].

##### **Definition:**

Das Basaliom ist ein von den basalen Zellschichten der Epidermis und dem Haarfollikel ausgehender Tumor, der invasiv und destruierend wächst, jedoch nicht metastasiert und daher auch als semimaligner Tumor bezeichnet wird. Dadurch erfolgt eine Abgrenzung einerseits zu den benignen Geschwulsten und andererseits zu den malignen Tumoren [Herz 1995]. Auch gibt es keine Präkanzerosen, aus denen ein Basaliom entstehen kann, sondern es entsteht immer de novo. Insgesamt stellen Metastasierung und letaler Verlauf seltene Komplikationen bei Basaliompatienten dar.

##### **Inzidenz und Pathogenese:**

Das Basaliom ist der häufigste Tumor an der Haut, wobei die Morbidität je nach Intensität der Sonnenbestrahlung zwischen 20-50 pro 100000 Einwohner in Nord- und Mitteleuropa und 250 pro 100000 Einwohner in Australien schwankt und seine Inzidenz weltweit steigt. Demgegenüber ist die Mortalitätsrate sehr niedrig und beträgt 0,1 pro 100000 Einwohner und Jahr.

Es tritt gewöhnlich bei Patienten ab der 5. Lebensdekade auf und seine Häufigkeit steigt ohne Geschlechtsbevorzugung mit zunehmendem Alter. Basaliome treten oft multipel und mit großer morphologischer Vielfalt auf. Ihr Wachstum ist sehr langsam, kann jedoch expansiv und infiltrativ sein (s. Abbildung 1.5).

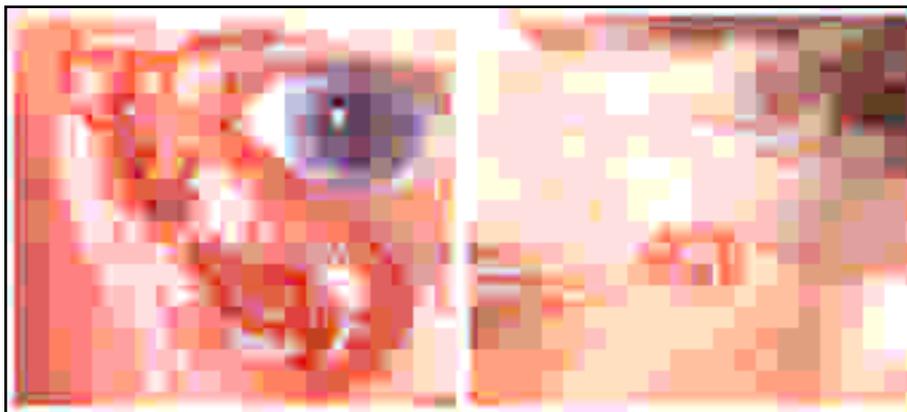


Abbildung 1.5: Makroskopische Bilder von Basaliomen mit typischem perlschnurartigem Randsaum und Teleangiektasien, links mit zentraler Nekrose, rechts zikatisierend mit vernarbendem Zentrum. [E. G. Jung, 1995]

Prädilektionstelle ist mit 85-90% die UV-Licht-exponierte Haut von Gesicht und Hals, weniger häufig sind Stamm und Extremitäten betroffen, wobei auch sehr ungewöhnliche

Lokalisationen wie Inguinalregion, Vulva, Penis, Scrotum Perianalregion, Brust, Handflächen, Fußsohlen, Kapillitium und Mund beschrieben sind. In diesen Arealen spielen andere Provokationsfaktoren als UV-Licht wie z.B. Strahlentherapie, Arsenexposition, Trauma, chronische Entzündung, Genodermatosen und Hamartome eine Rolle [Köhler et al.1997].

Neben der wichtigen Rolle des UV-Lichtes als Hauptrisikofaktor wird eine genetisch determinierte Verringerung der Reparaturkapazität UV-Licht-induzierter DNA-Schäden diskutiert [Wie et al. 1994]. Daneben spielen inaktivierende Mutationen des p53 Tumorsuppressorgens, des humanen Patched Gens [Fan et al. 1997] sowie eine Überexpression des Onkogens Bcl-2 als Hemmer der Apoptose eine wichtige Rolle. Zudem wird eine Änderung des Immunstatus mitverantwortlich gemacht.

Konventionelles histologisches Klassifikationssystem für Basaliome [Köhler 1997]:

1. Solides Basaliom (a:umschrieben, b:infiltrativ)  
Sonderformen: zystisches, keratotisches, adenoides, pigmentiertes Basaliom
2. Nodulo-ulzeriertes Basaliom
3. Pigmentiertes Basaliom
4. Sklerodermiformes Basaliom
5. Multifokal entstehendes superfizielles Basaliom
6. Fibroepitheliom
7. Basosquamöses Karzinom
8. Basaliomatosen

Ein in der Weltliteratur zunehmend zu findendes Klassifikationssystem für Basaliome, das einheitlich für klinische, histologische und therapeutische Bedürfnisse verwendbar ist, unterteilt in:

1. Noduläres Basaliom
2. Superfizielles Basaliom (auch Rumpfhautbasaliom)
3. Infiltratives sklerodermiformes Basaliom
4. Infiltratives nichtsklerodermiformes Basaliom
5. Sonderformen
6. Basaliomatosen und andere Genodermatosen

Mischbilder der genannten Typen sind möglich.

### **Histologie:**

Basaliome sind solide epitheliale Tumoren mit zellulärer Ähnlichkeit zum Stratum basale der

Epidermis. Als Ursprungszellen werden primordiale pluripotente Epidermiszellen mit verschiedenen Ausdifferenzierungsmöglichkeiten, am häufigsten in Richtung des Haarfollikelepithels, angesehen. Die darüberliegende Epidermis ist meist atroph, häufig erodiert oder ulzeriert. Die proliferierenden basaloiden Zellen wachsen von der interfollikulären Epidermis oder den Follikelepithelien zunächst endophytisch, später gelegentlich auch exophytisch, in dichten Zellsträngen in das Korium hinein und bilden Zellnester. Charakteristisch ist die palisadenartige Anordnung der Basaliomzellen am Rand der Tumorstränge im Gegensatz zu dem regellosen Bild im Zentrum (s. Abbildung 1.6). Zudem ist histologisch ein peritumorales bindegewebiges Stroma mit scheinbar enger Beziehung zum Tumorparenchym typisch, wobei unklar ist, ob der Tumor die Stromareaktion bedingt oder umgekehrt [Köhler et al.1997].

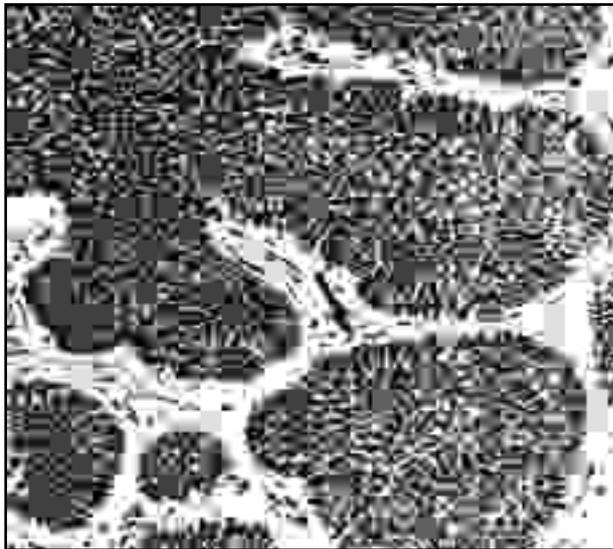


Abbildung 1.6: Histologisches Bild eines Basalioms in 1:250facher Vergrößerung. Typisch ist der solide Aufbau, die palisadenartige Anordnung der peripheren Zellen (Pfeil) und das desmoplastische Stroma. [U.-N. Riede, C. Wittekind und W. Stern, 1995]

Trotz des invasiven und destruktiven Wachstums und weiterer Charakteristika maligner Tumoren wie Aneuploidie, Zellatypien und Mitosenreichtum, zeigt das Basaliom keine atypischen Mitosen und auch keine Zeichen der Tumorprogression in aggressivere Stadien, so auch keine Metastasierung. Eine mögliche Erklärung für die Unfähigkeit zur Metastasenbildung ist die oben erwähnte scheinbare Abhängigkeit der Basaliomzellen vom umgebenden dermalen Stroma [Ponten 1996].

### 1.5. Charakterisierung von KET/p63

Nachdem zunächst KET als p53-Paralog in der Ratte entdeckt wurde [Schmale et al. 1997], folgten kurz danach Studien über das menschliche Ortholog p63, das eine beachtliche Identität in der Aminosäuresequenz von 98% zu der Rattensequenz aufweist. Diese starke Konservierung deutet möglicherweise darauf hin, daß KET/p63 ein evolutionär älteres und

Vorläufer-Gen von p53 ist [Augustin et al. 1998]. Dabei wurde schnell klar, daß es mindestens sechs verschiedene Spleißvarianten unterschiedlicher Länge gibt, die unter anderem zu der uneinheitlichen Nomenklatur p63, p40, p51, p73L [Yang et al. 1998, Trink et al. 1998, Osada et al. 1998, Senoo et al. 1998] führten (s. Abbildung 1.7).

Die strukturelle Ähnlichkeit zu p53 ist insbesondere im Bereich der DNA-bindenden Domäne sehr groß, in der die Identität 75% beträgt, wobei mit der Ausnahme einer Aminosäure alle für die DNA-Bindung verantwortlichen Aminosäuren übereinstimmen [Schmale et al. 1997]. Diese Region ist für die Funktion von p53 essentiell und sie beinhaltet auch die bei Tumoren zu findenden Mutations-hotspots.

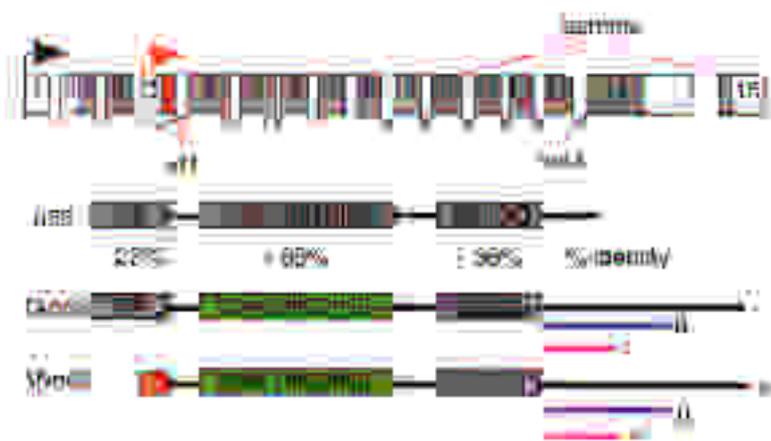


Abbildung 1.7: Schema des Aufbaus von KET/p63 und Darstellung der strukturellen Ähnlichkeit zu p53. TA: Transaktivierungsdomäne, DNA BINDING: sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne, OLIGO: Oligomerisierungsdomäne. Die Prozentzahlen geben die Identität zu p53 der einzelnen Domänen an. Dargestellt sind zudem die sechs Haupt-Isotypen von KET/p63. [A. Yang et al., 1999]

KET/p63 liegt auf Chromosom 3q27, einer Region, die in einigen Tumorarten wie Ösophaguskarzinomen und Plattenepithelkarzinomen deletiert sein kann [Augustin et al. 1998]. Es umfaßt 15 Exons, wobei insbesondere Exon 1-3 sowie Exon 11-14 in verschiedenen Spleißvarianten fehlen können. Das Molekulargewicht dieser unterschiedlichen Spleißvarianten liegt zwischen 44,000 und 72,000 Dalton [Yang et al. 1998].

Die bekanntesten sechs verschiedenen Spleißvarianten resultieren aus zwei verschiedenen Promotoren im 5'-Bereich, einem vor Exon 1 und einem in Intron 3, und drei verschiedenen Spleißmöglichkeiten im 3'-Bereich. Durch den zusätzlichen Promotor in Intron 3 entsteht ein alternatives Exon 3, auch Exon 3' bezeichnet, bei den N-Isoformen (s. Abbildung 1.8). Drei der sechs Spleißvarianten kodieren Proteine, die ebenso wie p53 Proteine eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale Oligomerisierungsdomäne besitzen (TAp63). Die restlichen drei Spleißvarianten besitzen keine Transaktivierungsdomäne (Np63). Je nach Art des C-terminus wird in  $\Delta$ ,  $\Delta$ , unterschieden [Yang et al. 1998]. Dabei hat die  $\Delta$ -Form den längsten, die  $\Delta$ -Form den kürzesten C-terminus.

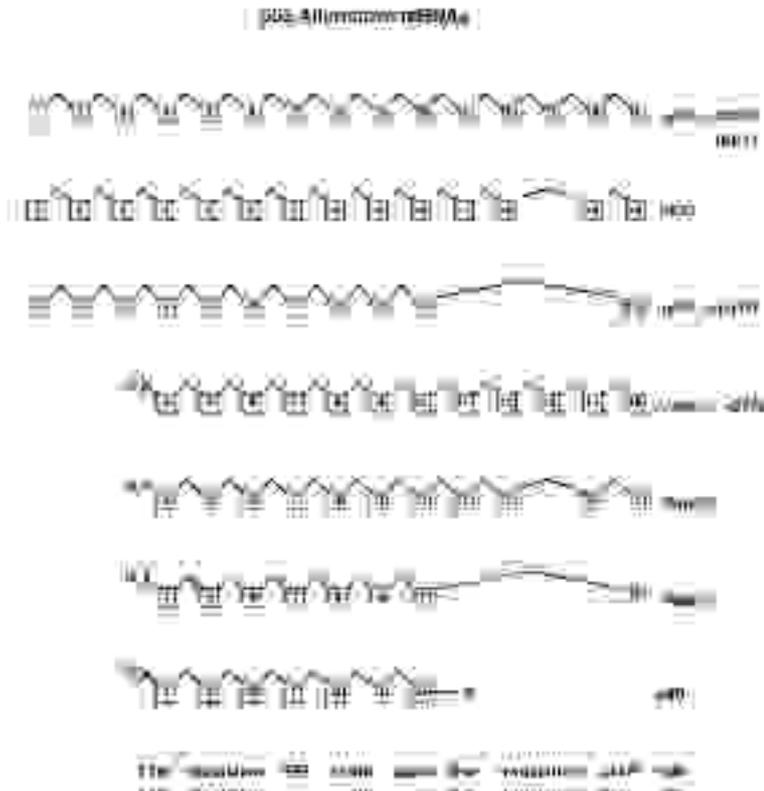


Abbildung 1.8: Schema des Aufbaus der verschiedenen mRNA-Spleißvarianten von KET/p63 und ihre unterschiedliche Nomenklatur in der Literatur. Die Zahlen in den Kästen stellen die Exons dar, wobei die Größe der Introns und Exons zur Vereinfachung nicht berücksichtigt wurde. [WG Kaelin, 1999]

Obwohl allen p63-Isoformen die DNA-Bindungsdomäne gemein ist, zeigen sowohl die Np63-Isoformen aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne als auch interessanterweise die TAp63-Isoform keine Transaktivierung von p53 Reportergenen. Im Gegensatz dazu weist die Ap63-Isoform starke Transaktivierungsaktivität und Induktion von Apoptose auf. Das deutet darauf hin, daß es zusätzliche regulative Elemente in der SAM-Domäne des -C-terminus geben muß, die mit der Transaktivierungsdomäne von p63 interferieren und somit für die Funktion entscheidend sind [Yang et al. 1998].

Auch konnte gezeigt werden, daß die Np63-Isoformen dominant-negative Eigenschaften besitzen dadurch, daß sie kompetitiv die Aktivität von p53 und von transaktivierenden p63-Isoformen hemmen können. Diese Interaktionen zwischen den verschiedenen Spleißvarianten sowie zwischen p63 und p53 zeigen neue Möglichkeiten für gegenseitige funktionelle Inaktivierung [Yang et al. 1998].

Immunhistochemische Expressionsanalysen sowie RT-PCR zeigten p63-Transkripte in einer großen Reihe von Gewebearten wie: Skelettmuskulatur, Herzmuskel, Plazenta, Mamma, Speicheldrüse, Trachea, Testes, Niere und Nebenniere, Milz, Thymus, Gehirn, und vor allem epitheliale Gewebearten wie Epidermis, Urothel, Prostataepithel und Ektocervix [Schmale et al. 1997, Osada et al. 1998, Yang et al. 1998]. Interessanterweise war die Expression in diesen epithelialen Geweben in der basalen Zellschicht am stärksten, wohingegen in den suprabasalen Zellschichten kaum Signal erschien (s. Abbildung 1.9). Das ist um so

bedeutsamer, da wie in 1.3. beschrieben die basale Zellschicht von Epithelien als Stammzellpopulation für die Proliferation und Regeneration des Epithels verantwortlich ist.

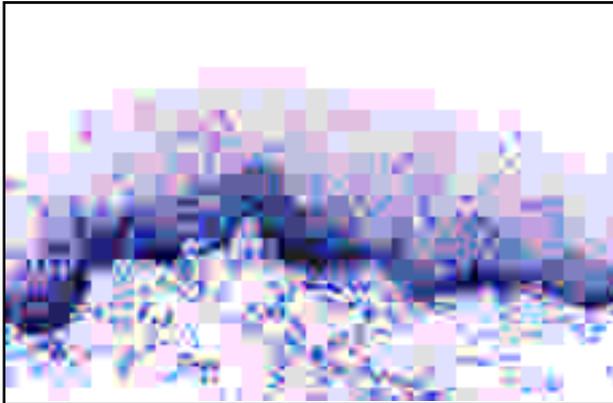


Abbildung 1.9: Darstellung der fast ausschließlich in den basalen Zellschichten vorhandenen Expression von KET/p63 durch in situ Hybridisierung der p63 mRNA in normaler humaner Epidermis. [R. Parsa et al., 1999]

Weiterhin wurde in epithelialen Zellen die  $\Delta$ p63-Isoform als vorherrschende Spleißvariante gefunden, was aufgrund der fehlenden Transaktivierungsaktivität und damit keiner Induktion von Apoptose nicht gegen die proliferative Funktion dieses Gewebes spricht.

Auffällig ist jedoch, daß KET/p63 im Gegensatz zu p53, das ubiquitär in allen Zellen vorhanden ist, gewebespezifisch mit Bevorzugung epithelialer Gewebe wie der Epidermis etc. exprimiert wird.

Während der Erstellung dieser Arbeit erschienen mehrere Studien über funktionelle Aspekte von KET/p63, die genauer in der Diskussion besprochen werden. Unter anderem wurde anhand von p63-knockout-Mäusen, denen das Gen völlig fehlt, die wichtige Funktion von KET/p63 in bezug auf die Entwicklung und Differenzierung von Epithelien und anderer Gewebe ektodermalen Ursprungs gezeigt. Zudem wurde eine Rolle als Autoantigen im Rahmen der Chronisch Ulcerativen Stomatitis beim Menschen [Lee et al. 1998] sowie eine Bedeutung für die Entstehung von genetischen Erkrankungen des Menschen wie das "Limb Mammary Syndrome" und das "Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia and Clefting Syndrome" gefunden.

### 1.6. Ziel der Arbeit

Aufgrund der oben erwähnten Gewebespezifität und der bis dahin ungeklärten Frage nach der Funktion von KET/p63 wurden von mir Tumoren, die ihren Ursprung von der basalen Zellschicht der Epidermis nehmen, nämlich Basaliome, auf die Expression und Mutationshäufigkeit von KET/p63 hin untersucht, um eine potentielle Rolle von KET/p63 als Tumorsuppressorgen zu beleuchten.

Dazu wurden sowohl die DNA als auch die RNA von insgesamt 30 Basaliomen aufgereinigt. Nach cDNA-Synthese wurden in jeweils einem oder zwei PCR-Ansätzen Exon 4-8 von KET/p63 amplifiziert und nach Aufreinigung des PCR-Produktes sequenziert. Dieser Bereich

beinhaltet die DNA-Bindungsdomäne von KET/p63 und entspricht dem Bereich der Mutations-hotspots von p53.

Zum Vergleich wurde jeweils auch die DNA-Bindungsdomäne von p53 in der PCR aus der Basaliom-cDNA amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert. Als Positivkontrolle für die cDNA wurde jeweils auch eine GAPDH-Sequenz amplifiziert.

Anschließend wurden die KET/p63- und p53-Sequenzen per Computer ausgewertet und auf Punktmutationen hin untersucht.

Zudem wurde anhand der Amplifikation der beiden KET/p63-Isoformen +TA und -TA aus der RNA der Basaliome in der PCR eine Analyse der Spleißvarianten-Expression durchgeführt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Agarose	BRL (Bethesda Research Laboratories)
Bromphenolblau	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Tris	GIBCO
dNTP-Mix	Pharmacia
0.5 mM Hexamer-Random-Primer	Boehringer Mannheim
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas
t-RNA	Boehringer Mannheim

#### 2.1.2. Lösungen

10 x TBE:	<u>Zusammensetzung</u>
	121g Tris
	61.8g Borsäure
	7.44g EDTA
	ad 1 l mit Aqua tridest.
Taq PCR Master Mix (QIAGEN)	Taq DNA Polymerase PCR Puffer, enthält 3mM MgCl <sub>2</sub> , TrisHCl, KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH8.7 (20°C) dNTP mix, jeweils 400 $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP
5 x First Strand Buffer (GIBCO BRL)	250 mM Tris-HCl (pH8.3 bei Raumtemp.) 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP-Mix (Pharmacia)	jeweils 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Agarosegel-Auftragspuffer	5% Glycerin, 10 mM Tris/HCl pH7.5 1mM EDTA pH 7.5, 0.02% Bromphenolblau

SOC-Medium	2% Bactotryptone 0.5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 20 mM MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
LB-Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 7.5 g NaCl ad 1L mit Aqua tridest., pH 7,2

### 2.1.3. Enzyme

Taq-Polymerase	QIAGEN
Superscript Reverse Transcriptase	GIBCO BRL
BseDI-Restriktionsenzym	MBI Fermentas

### 2.1.4. Kits

	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN-RNA/DNA Kit	Catalog No.14123
Taq PCR Master Mix Kit	Catalog No.201443
QIAquick PCR Purification Kit	Catalog No.28106
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Catalog No.20051
SureClone <sup>TM</sup> Ligation Kit	Pharmacia
JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit	GENOMED

### 2.1.5. DNA-Vektor und Bakterienstamm

pUC 18 SmaI/BAP	GIBCO BRL
Epicurian Coli XL1-Blue Subcloning-Grade Competent Cells	Stratagene

### 2.1.6. Oligonukleotide

Bei den PCR-Ansätzen zur Amplifikation von Exon 4-8, entsprechend der DNA-bindenden Domäne des KET/p63-Gens und für die Sequenzierung kamen folgende Primer zur Anwendung:

Bezeichnung	Sequenz
hu 53 L3	5'-d(CATAAGGTACCAGCACACTC)-3'
hu 53 L21	5'-d(TGGATGTCATCTGGATACCAT)-3'
hu 53 L33	5'-d(CCATCCAGATCAAGGTGATGAC)-3'
hu 53 L34	5'-d(CATGCCCAGTATGTAGAAGATC)-3'
hu 53 L35	5'-d(TCTGGTTTCCAGAGTAACAATG)-3'
hu 53 L36	5'-d(GTCCGAAACTTGCTGCTTTCTG)-3'
hu 53 L39	5'-d(CACCTCCGTGACGTGCTCAGCT)-3'
mKET E4s	5'-d(CCACAGTACACGAACCTGGGGCTC)-3'
huKET IN6as	5'-d(GGAATATGGACACAGAGCCATG)-3'

Zur Kontrolle der Qualität der cDNA wurden bei den PCR-Reaktionen folgende Primer mitverwendet:

Bezeichnung	Sequenz
GAPDH P2	5'-d(GTGAAGGTCGGATGTCAACG)-3'
GAPDH P3	5'-d(GGTGAAGACGCCAGTGGACTC)-3'

Bei den PCR-Ansätzen zur Amplifikation der beiden verschiedenen 5'-Spleißvarianten +TA und TA von KET/p63 kamen zusätzlich folgende Primer zum Einsatz:

Bezeichnung	Sequenz
hu 53 L27	5'-d(CGGGATCCGAAATGAATTTTGAAACTTCA)-3'
hu 53 L28	5'-d(CGGGATCCAACATGTTGTACCTGGAAAAC)-3'
hu 53 L32	5'-d(TTCTGAATCTGCTGGTCCATGC)-3'

Bei den PCR-Ansätzen zur Amplifizierung von Exon 5-10, entsprechend der DNA-bindenden Domäne des p53-Gens und für die Sequenzierung wurden folgende Primer verwendet:

Bezeichnung	Sequenz
hu p53 E5s	5'-d(GCCATCTACAAGCAGTCACAGC)-3'
hu p53 E10as	5'-d(CAGCCTGGGCATCCTTGAGTTC)-3'
hu p53 E7s	5'-d(GTGTAA/GTCTCCTAGGTTGGC)-3'
hu p53 E8as	5'-d(TCCTGCTTGCTTACCTCGCT)-3'

### 2.1.7. Gewebe

Für das Screening von Basalzellkarzinomen wurden mir freundlicherweise aus der Praxis von Priv. Doz. Dr. med. K. Meißner und Dr. med. C. Müller, Tangstedter Landstr.77, 22415 Hamburg-Langenhorn 25 Stanzbiopsien ( T1-T25) und aus dem AK St. Georg von Dr. med. A. Kirchoff 18 Stanzbiopsien ( G1-G18) aus dem Zentrum der frisch operativ entfernten Tumoren zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde bei -70°C gelagert und auf Trockeneis transportiert. Die einzelnen Tumorbiopsien wurden so verschlüsselt, daß ich nachträglich den jeweiligen histologischen Befund zuordnen konnte. Es wurde eine Einwilligungserklärung erstellt, die gleichzeitig als Information für die Patienten darüber diente, daß die Gewebeprobe nicht für kommerzielle Zwecke verwendet wird sowie die Bestimmungen des Datenschutzes eingehalten werden. Zudem wurde das Forschungsvorhaben von der Ethik-Kommission Hamburg (Aktenzeichen OB.98 vom 19.10.1998) genehmigt.

Die histologische Einstufung des operativ entfernten Gewebes wird für die Praxis Dr. Meißner / Dr. Müller durch das Histologische Labor: Dres. med. A. Angelkort, W. Krause, K. Meißner Herderstr. 17, 22085 Hamburg durchgeführt.

Für das AK St. Georg wird die Histologie durch Prof. Dr. med. W. Meigel, Prof. Dr. med. M. Vierbuchen und Dr. med. A. Stemm erhoben.

Von den 25 erhaltenen Stanzbiopsien aus der Praxis von Dr. Meißner konnten 8 Proben aufgrund falscher Lagerung oder zu geringer Menge nicht verwendet werden (T5-T10, T16, T18). Weiterhin konnten 4 Proben aufgrund der Histologie nicht in die Auswertung genommen werden (T1, T3, T4, T20), bei einer Probe konnte aufgrund fehlender Verschlüsselung keine Histologie zugeordnet werden (G15). So konnten letztendlich 13 Basaliome aus Langenhorn und 17 Basaliome aus dem AK St. Georg ausgewertet werden.

### 2.1.8. DNA

Für die Suche nach dem KET/p63-Polymorphismus in der Normalbevölkerung wurde mir freundlicherweise die DNA von 50 Blutspendern über Herrn PD Dr. W. Höppner aus dem Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung zur Verfügung gestellt. Der Transport erfolgte auch hier auf Trockeneis und die Lagerung bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung.

### 2.1.9. Geräte

Gelelektrophorese Kammer	BlueMarine 100	SERVA
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Porzellan-Mörser &-Pistill	55, rauh 250ml	Roth, Karlsruhe
Photometer	Novaspec	Pharmacia, Freiburg
PCR Gerät	Gene Amp 2000	Perkin Elmer, Weiterstadt
Sequenzier	373 DNA Sequenzier	ABI, Weiterstadt
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415c	Eppendorf, Hamburg

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Gewebepräparation

Das verwendete Basaliomgewebe wurde als Stanzzylinder jeweils aus dem Zentrum der operativ entfernten Basaliome entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C gelagert bis zur Weiterverarbeitung. Dabei unterschieden sich die Größe der Zylinder und damit auch die Menge an Gewebe erheblich und betragen im Mittel 2 mm Durchmesser aus der Praxis Dr. Meißner und 4 mm Durchmesser aus dem AK St.Georg. Der Transport erfolgte auf Trockeneis.

Vor der Aufarbeitung wurde zunächst das ungefähre Gewicht der einzelnen Gewebeproben abgeschätzt. Dazu wurde sowohl das Gewicht des Transportgefäßes mit dem Gewebe als auch später das Gewicht des leeren Transportgefäßes gemessen und die Differenz als Gewicht des Tumorgewebes gebildet. Das so ermittelte Gewicht lag bei den sehr kleinen Stanzbiopsien aus der Praxis Dr. Meißner zwischen 5mg und 65mg. Bei den größeren Stanzbiopsien aus dem AK St. Georg wurde das Gewicht nicht ermittelt.

Anschließend wurde das Gewebe in einen mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser überführt und sofort mit flüssigem Stickstoff übergossen. Mit einem ebenfalls vorgekühlten Pistill wurde das solide Gewebestück in feines Pulver zermörsert, wobei mehrmals flüssiger Stickstoff nachgegossen wurde. Das Gewebepulver wurde mit Hilfe eines feinen Spatels in ein vorgekühltes 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Homogenisation auf Trockeneis gelagert. Nach Zugabe von 0.5 ml QRL1-Puffer (QIAGEN RNA/DNA-Kit, enthält Guanidinium Isothiocyanat zur Inaktivierung von RNasen und damit zur Stabilisierung der RNA) und anschließendem vortexen, erfolgte die Homogenisation mit Hilfe einer 20-gauge Kanüle und einer 5ml-Spritze durch mehrmaliges Aufziehen in die Spritze.

Der auf diese Weise hergestellte Gewebeextrakt wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei  $-70^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert bis zur gemeinsamen Weiterverarbeitung mit anderen Gewebeproben. Dazu wurde er dann für 10-15 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut.

Zwischen den Extraktionen aus den einzelnen Basaliomen mußte der Mörser einschließlich Pistill und feinem Spatel jeweils gereinigt werden, um Kontaminationen der Gewebepräparationen untereinander und durch RNasen auszuschließen. Dafür wurden zunächst alle drei Geräte auf Raumtemperatur gebracht, anschließend kurz mit Wasser ausgespült und dann für mindestens eine Stunde mit 1M Natronlauge zur Entfernung von RNasen übergossen und inkubiert. Als weitere Absicherung gegen sowohl RNasen als auch DNasen und andere Verschmutzung wurden die betroffenen Flächen von Mörser und Pistill anschließend mit 70% Ethanol benetzt und über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Zur Vermeidung von Kontamination des Materials wurden die oben genannten Schritte alle mit Schutzkleidung und Handschuhen durchgeführt.

### **2.2.2. Gleichzeitige Isolation von RNA und DNA aus dem Basaliomgewebe**

Um RNase frei zu arbeiten und Kontamination mit DNA zu vermeiden, wurden auch die folgenden Schritte mit Schutzkleidung und einem eigenen Set an Handschuhen, Pipetten und Reagenzien räumlich getrennt von der Aufarbeitung von PCR-Produkten durchgeführt.

Die Isolation sowohl der Gesamt-RNA als auch der DNA wurde mit Hilfe des QIAGEN RNA/DNA-Kit durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits besteht in der gleichzeitigen Isolation und Aufreinigung von RNA und DNA durch Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule mit gezielter Eluation der einzelnen Komponenten. Durch Zugabe von Puffer-Lösungen der entsprechend notwendigen Salzkonzentrationen bei neutralem pH-Wert werden zunächst kontaminierende Metabolite (Proteine, Polysaccharide etc.) entfernt und anschließend nacheinander RNA und DNA gewaschen und eluiert.

- Lösungen: (genaue Zusammensetzung wird von QIAGEN nicht angegeben)
- QRL1 (enthält Guanidinium Isothiocyanat, Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml QRL1 erforderlich)
  - QRV1 (Präzipitation von Proteinen)
  - QRE (Equilibration der Säule)
  - QRV2 (Binden der RNA an die Säule)
  - QRW (Auswaschen von Proteinen, Polysacchariden, Kohlenhydraten und anderen zellulären Bestandteilen)
  - QRU (enthält Harnstoff, Elution der RNA)
  - QC (Waschen der DNA)
  - QF (Elution der DNA)
  - Isopropanol (eiskalt zur Fällung der RNA)
  - Isopropanol (Raumtemperatur zur Fällung der DNA)
  - Ethanol (70%, eiskalt zum Waschen von RNA und DNA)

Durchführung:

Das in 0.5 ml QRL1 aufgenommene homogenisierte Gewebelysat wurde mit 0.5 ml QRV1 versetzt, kurz geschüttelt und 20 Minuten bei 15000 g und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt.\* Nach Zugabe von 0.8 ml eiskaltem Isopropanol folgte eine 5 minütige Inkubation auf Eis und eine anschließende 30 minütige Zentrifugation bei 15000 g und 4°C. Währenddessen wurden die Säulen mit 1 ml QRE äquilibriert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0.15 ml QRL1 aufgenommen und zur besseren Lösung abwechselnd je 3 Minuten bei 56°C im Heizblock erhitzt und anschließend stark geschüttelt bis es sich vollständig gelöst hatte. Dann wurden 1.35 ml QRV2 zugefügt und erneut 5 Minuten bei 5000 g und 4°C zentrifugiert bevor der Überstand auf die Säule pipettiert wurde. Dabei wurde der Durchfluß in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt und für die spätere DNA-Aufreinigung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 1 ml QRW wurde die RNA mit 1 ml bei 45°C vorgewärmten Elutionspuffer QRU extrahiert. Es folgte die Fällung der RNA mit 1 ml eiskaltem Isopropanol und eine Inkubation auf Eis bis zur gemeinsamen Weiterverarbeitung mit der DNA.



Die Auftragsproben wurden zum Sichtbarmachen der zurückgelegten Laufstrecke mit 1  $\mu$ l Agarose-Gel-Auftragspuffer versetzt, ad 11  $\mu$ l mit Aqua tridest ergänzt und nach Mischen vorsichtig in die Geltaschen aufgetragen. Im Anschluß an die Elektrophorese bei 80 Volt konstant wurde das Gel unter UV-Beleuchtung auf einem Transilluminator betrachtet und dokumentiert.

#### **2.2.4. cDNA-Synthese aus der Gesamt-RNA und RT-PCR**

Für die Reverse Transkription wurden ungefähr 1  $\mu$ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe der SUPERSCRIPT-Reverse Transcriptase von GIBCO BRL.

Lösungen:

- 0.5 mM Hexamer-Random-Primer
- 5 x First Strand Buffer
- 0.1 M DTT
- 10 mM dNTP-Mix
- SUPERSCRIPT RT

#### Durchführung der cDNA-Synthese:

Zunächst wurde ein 12  $\mu$ l Ansatz aus :

- 1  $\mu$ l Random Primer
- x  $\mu$ l Gesamt-RNA (entsprechend ca. 1  $\mu$ g)
- y  $\mu$ l Aqua tridest. (ad 12  $\mu$ l)

gemischt, kurz zentrifugiert und 10 Minuten zur Denaturierung der RNA bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde er kurz auf Eis gekühlt, erneut kurz zentrifugiert und ergänzt mit:

- 4  $\mu$ l 5 x First Strand Buffer
- 2  $\mu$ l 0.1 M DTT
- 1  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mix

Dieser Ansatz wurde nach Mischen und kurzer Zentrifugation für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um ein Aneinanderlagern der Primer an die RNA zu ermöglichen. Anschließend folgte eine 2 minütige Inkubation bei 37 °C, der optimalen Temperatur für die Aktivität der Reversen Transkriptase, im Wasserbad, bevor 1 µl SUPERScript RT (entsprechend 200 Units) zugefügt und nochmals für 60 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Während dieser Zeit wurde die cDNA aus der RNA durch die Reverse Transkriptase synthetisiert. Die Reaktion wurde durch eine 15 minütige Inkubation bei 70°C terminiert und der Reaktionsansatz mit 180 µl Aqua tridest. auf 200 µl verdünnt.

### Durchführung der PCR:

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die PCR-Ansätze räumlich getrennt von der Aufarbeitung der PCR-Produkte durchgeführt. Auch wurde hierfür ein eigener Satz Pipetten und Pipettenspitzen, sowie gesondert gelagerte PCR-Gefäße, Lösungen und Handschuhe benutzt und mit Schutzkleidung gearbeitet.

Die PCR wurde mit Hilfe des Taq PCR Master Mix Kit von QIAGEN durchgeführt. Für die Amplifizierung der DNA-bindenden Domäne (entsprechend Exon 4-8) von KET/p63 wurden unterschiedliche Primer verwendet, da es in einigen Fällen nicht möglich war, das ganze Fragment zusammenhängend zu amplifizieren. Zumeist konnte aber das komplette 844 bp lange Fragment als Ganzes vervielfältigt werden mit den Primern mKET E4s und hu53 L21. Zur Kontrolle der Versuchsdurchführung und der Qualität der cDNA wurde zusätzlich eine humane GAPDH- / oder eine Actin-Sequenz amplifiziert.

Folgende Primerpaare kamen zum Einsatz (siehe auch Abb.3.5):

Amplifizierung der **DNA-bindenden Domäne von KET/p63** aus der jeweiligen cDNA:

	sense	antisense	Fragmentgröße
1 Fragment	mKET E4S	hu53 L21	844 bp
2 Fragmente	mKET E4S	hu53 L3 / hu53 L39	547 / 396 bp
	hu53 L33	hu53 L21	540 bp

Amplifizierung von **Exon und Teilen von Intron 6 von KET/p63** aus genomischer DNA:

	sense	antisense	Fragmentgröße
1 Fragment	hu53 L34	huKET IN6as	301 bp

Amplifizierung der **DNA-bindenden Domäne von p53** aus cDNA:

	sense	antisense	Fragmentgröße
1 Fragment	hup53 E5s	hup53E10as	586 bp

Amplifizierung von **Exon 7 und 8 von p53** aus genomischer DNA:

	sense	antisense	Fragmentgröße
1 Fragment	hup53 E7s	hup53 E8as	616 bp

Als reine Sequenzierprimer wurden zusätzlich folgende Primer für die Sequenzierung der DNA-bindenden Domäne von KET benutzt:

hu53 L34 , hu53 L35 , hu53 L36

Amplifizierung der verschiedenen **Spleißvarianten des 5'-Endes von KET/p63**:

	sense	antisense	Fragmentgröße
+TA	hu53L27	hu53L32	376 bp
-TA	hu53L28	hu53L39	441 bp

Es wurde folgender 50 µl-Reaktionsansatz verwendet:

25 µl Taq PCR-Mastermix (QIAGEN)

2 µl Primer 1 (10 µM)

2 µl Primer 2 (10 µM)

11 µl Aqua tridest.

10 µl cDNA

Zunächst wurde auf Eis ein Mix für sämtliche PCR-Ansätze aus allen Komponenten außer der cDNA hergestellt. Dann wurden je 40 µl dieses Mixes auf die verschiedenen PCR-Reaktionsgefäße verteilt, bevor 10 µl der Template-cDNA (bzw. der genomischen DNA) und in einem Ansatz als Negativ-Kontrolle Aqua tridest. dazu pipettiert wurde.

Nach gründlichem Mischen erfolgte ein *simplified Hot Start*. Dabei wurde das PCR-Gerät zunächst auf 94°C vorgeheizt, bevor die Reaktionsgefäße hineingesetzt wurden.

Temperatur-Programm:

1.Schritt	5 Minuten	94°C	erste Denaturierung
2.Schritt	1 Minute	94°C	Denaturierung
3.Schritt	1 Minute	55°C	Primer-Anlagerung
4.Schritt	1 Minute	72°C	Verlängerung
40-malige Wiederholung der Schritte 2-4			
5.Schritt	10 Minuten	72°C	Verlängerung aller nicht vollständigen Amplifikate
6.Schritt	unbegrenzt	4°C	Kühlung der Proben

Nach Durchführung der PCR wurden jeweils 5 µl der Ansätze in einer 1.2 prozentigen Agarose-Gel-Elektrophorese nach Größe der DNA-Fragmente aufgetrennt und diese unter UV-Beleuchtung betrachtet und dokumentiert. Dabei wurde wie oben beschrieben verfahren. Durch gleichzeitiges Auftragen eines Längenstandards (Marker I, II, III, X oder 100bp Leiter) konnte die Größe der DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Je nach Qualität des PCR-Produktes wurde es auf unterschiedliche Art und Weise aufgereinigt vor der Sequenzierung.

### 2.2.5. Aufreinigung von Oligonukleotiden nach der Synthese

Für einige der PCR-Ansätze mußten spezielle Primer neu hergestellt werden. Nach Synthese eines neuen Primers für die verschiedenen PCR-Ansätze durch das Servicelabor von Dr. F. Buck im Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde dieser Primer wie folgt aufgearbeitet: zunächst wurde das eingedampfte Oligonukleotid in 200µl Aqua tridest. gelöst und 5 Minuten bei 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorffgefäß überführt. Nach Zufügen von 20µl 3M Natriumacetat und 530µl absolutem Ethanol wurde der Ansatz gut gemischt und mindestens 2 Stunden bei -20°C gefällt. Durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 4°C wurde das Präzipitat gesammelt und anschließend mit 500µl 75% igem Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Daraufhin wurde es kurz trocknen gelassen und abschließend in 100µl 10mM Tris pH8 gelöst.

Die Konzentration des aufgereinigten Oligonukleotids wurde photometrisch bestimmt und daraufhin wurden aus dieser Stammlösung Ansätze mit einer Konzentration von jeweils 10 pmol pro ml für PCR- Ansätze erstellt.

Bei der photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde zunächst das Photometer gegen eine DNA-freie Lösung des Probenpuffers in der entsprechenden Verdünnung geeicht. Dann wurde die vorliegende Konzentration an Oligonukleotid mit Hilfe des jeweiligen Absorptions-Koeffizienten bei der Wellenlängen 260nm bestimmt. Dabei entspricht ein Extinktions-Koeffizient OD<sub>260</sub> von 1,0 näherungsweise einer Konzentration von 30 µg/ml einzelsträngiger DNA.

### **2.2.6. Aufreinigung der PCR-Produkte**

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte von den Primern und Puffern aus den PCR-Ansätzen wurde bei Vorhandensein nur einer deutlichen Bande zumeist das QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN benutzt, wobei der PCR-Ansatz direkt über eine Säule aufgereinigt werden konnte. Nach mehrmaligem Waschen wurde die DNA mit 30 µl 1 mM Tris eluiert.

Bei weniger reinen PCR-Produkten wurde die entsprechende Bande unter UV-Beleuchtung mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol aufgereinigt. Dabei wurde der Agaroseblock zunächst gewogen und dann in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit der dreifachen Menge an Puffer QX1 versetzt. Nach Zufügen von 10 µl der gut gemischten QIAEX II Glaskugel-Suspension, erfolgte eine 10 minütige Inkubation im Wasserbad bei 50°C , wobei alle 2 Minuten gut gemischt wurde, um die Agarose vollständig zu lösen. Die mit DNA beladenen Glaskügelchen wurden durch kurze Zentrifugation (30 s bei 14000 rpm) gesammelt und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde nun einmal mit 500 µl Puffer QX1 und zweimal mit 500 µl Puffer PE gewaschen, jeweils nach kurzer Zentrifugation der Überstand abgenommen und abschließend das Pellet 10-15 Minuten luftgetrocknet. Die Elution der DNA von den Glaskugeln erfolgte mit 20 µl 1mM Tris nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch starkes Schütteln und anschließende Zentrifugation (30 s bei 14000 rpm). Der die DNA enthaltende Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration in einer erneuten Gelelektrophorese abgeschätzt.

### **2.2.7. Sequenzierung der PCR-Produkte**

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit der *Cycle-Sequencing* -Methode unter Zuhilfenahme von Dye-Terminatoren (an Nukleotide gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe) sequenziert.

Dabei wurden vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die in den Sequenzierungsreaktionen jeweils einem bestimmten ddNTP zugeordnet wurden und in der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung abgelesen werden konnten.

Von den aufgereinigten PCR-Produkten wurden ungefähr 500ng mit 15 pmol des jeweilig erforderlichen Sequenzierprimers versetzt und mit Aqua tridest. ad 12 µl ergänzt. Die Sequenzierreaktion und die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung und Auswertung erfolgte mit Hilfe eines ABI-Sequencers im Servicelabor von Dr. F. Buck im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie.

### **2.2.8. Subklonierung eines PCR-Fragmentes**

Das 301 bp lange PCR-Fragment aus der Amplifikation von Exon und Intron 6 von KET/p63 aus genomischer DNA des Basalioms G8 wurde nach erfolgloser Mutationssuche in der Sequenzierung der PCR-Produkte subkloniert. Die Subklonierung erfolgte mit Hilfe des Sure Clone Ligation Kits von Pharmacia.

Lösungen: (genaue Zusammensetzung wird von Pharmacia nicht angegeben)

Klenow Fragment

T4 Polynucleotide Kinase

T4 DNA Ligase

10 x Blunting/Kinasing Puffer

2 x Ligations Puffer

200 mM DTT

pUC 18 Sma I/ BAP-Vektor

Micro Spin Säulen

Sephacryl S-200 HR (bei 4°C gelagert)

Phenol/Chloroform-Gemisch

Durchführung:

Zunächst wurde die Menge des PCR-Produktes in einer quantitativen Agarosegel-Elektrophorese ungefähr abgeschätzt, um die erforderliche einzusetzende Menge zu

bestimmen. Für ein wie hier verwendetes 300 bp langes DNA-Fragment sollten 60-100 ng DNA eingesetzt werden.

Blunting/Kinasing Reaktion: Hierbei werden die überstehenden 3'-Adenosinenden vom PCR-Produkt entfernt und die Enden des PCR-Fragmentes phosphoryliert.

Es wurde ein 20 µl Ansatz aus:

4 µl PCR-Fragment (Exon und Intron 6 aus G8)

1 µl Klenow Fragment

2 µl Blunting/Kinasing Puffer

1 µl T4 Polynucleotide Kinase

12 µl H<sub>2</sub>O

gemischt, kurz zentrifugiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden 20µl des Phenol/Chloroform-Gemisches hinzugefügt, gevortext und dann 1 Minute zentrifugiert. Dabei bilden sich zwei Phasen, von denen die obere wässrige Phase die DNA enthält. Diese wurde zur Aufreinigung der DNA auf eine MicroSpin Säule aufgetragen. Die untere Phase wurde verworfen.

MicroSpin Column Purification:

Zunächst wurde das Sephacryl resuspendiert und gut gemischt, 500µl auf eine in einem Eppendorfgefäß sitzende Säule aufgetragen und 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und anschließend die obere wässrige Phase langsam aufgetragen. Nach erneutem 30 sekündigem Zentrifugieren wurden 2 µl des Säulendurchflusses für die nachfolgende Ligation eingesetzt.

Ligation des PCR-Fragmentes in den Vektor:

Es wurde ein 20 µl-Ansatz aus

2 µl Säulendurchfluß

1 µl Vektor (entspricht 50ng dephosphoryliertem Vektor)

10 µl 2 x Ligations-Puffer

- 1  $\mu$ l DTT
- 1  $\mu$ l T4 DNA-Ligase
- 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

hergestellt, vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und 2 Stunden bei 16°C inkubiert.

Von diesem Ansatz werden 2-5  $\mu$ l für die Transformation eingesetzt, der Rest wird eingefroren. Vor der Transformation wurde der Ligationsansatz noch phenolisiert und mit Ethanol bei -20°C gefällt, anschließend abzentrifugiert und das Pellet nach dem Trocknen in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### Transformation:

20  $\mu$ l kompetenter Epicurian Coli XL1-Blue Subcloning-Grade Zellen wurden auf Eis aufgetaut und gemischt. Nach der Zugabe von 2  $\mu$ l Ligationsansatz wurde der Transformationsansatz für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert und die Bakterien bei dem anschließenden Hitzeschock (45 Sekunden bei 42°C in einem Wasserbad) transformiert. Der Hitzeschock ermöglicht die Aufnahme der DNA durch die Bakterien. Der Ansatz wurde für zwei Minuten auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 80  $\mu$ l auf 37°C erwärmten SOC-Mediums erneut für 1 Stunde bei 37°C leicht geschüttelt, um die Antibiotika-Resistenz herzustellen. Anschließend wurden diese insgesamt 100  $\mu$ l des Transformationsansatzes auf einer LB-Medium-Agarplatte mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den am nächsten Tag 30 gewachsenen Kolonien wurden 18 Kolonien mit Hilfe eines Zahnstochers auf eine neue LB-Ampicillin-Agarplatte systematisch übertragen und von jeder Kolonie jeweils auch eine 5 ml Flüssigkultur angeimpft. Beides wurde wieder bei 37°C über Nacht inkubiert. Die 18 Flüssigkulturen wurden in der nachfolgenden Plasmid-Minipräparation weiterverarbeitet.

#### Plasmid-Minipräparation:

Die Isolation der Plasmid-DNA mit dem enthaltenen PCR-Fragment als Insert aus den Zellen wurde mit Hilfe des JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kits von GENOMED durchgeführt.

#### Lösungen:

- G1 = 50 mM Tris/HCl (pH8.0); 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNaseA
- G2 = 200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)
- G3 = enthält Acetat und Guanidiniumhydrochlorid
- G4 = enthält Ethanol, NaCl, EDTA und Tris/HCl

### Durchführung:

Zunächst wurden jeweils getrennt die Zellen aus den 18 Flüssigkulturen durch Zentrifugation pelletiert und in 210 µl G1-Lösung resuspendiert bis die Lösung homogen war. Dann wurden 210 µl G2-Lösung zugefügt, vorsichtig gemischt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt dient zur Lysis der Zellen und Freisetzung der Plasmide. Es folgte ein Neutralisationsschritt durch Zugabe von 280 µl G3-Lösung mit sofortigem Mischen und anschließend 10 minütigem Zentrifugieren bei maximaler Umdrehungszahl. Der Überstand wurde vorsichtig auf die JETQUICK Spin-Säulen, die vorher in einem 2 ml Eppendorfgefäß plaziert wurden, gegeben und diese dann für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 700 µl G4-Lösung und erneuter 1 minütiger Zentrifugation. Zum Eluieren der Plasmid-DNA wurden abschließend 75 µl Aqua tridest. auf die Säule pipettiert und durch Zentrifugation der Durchfluß in einem frischen Gefäß gesammelt. Dieser enthielt nun die vermehrten Plasmide mit den einklonierten PCR-Fragmenten.

Um nun Klone, die in ihrer Plasmid-DNA die gesuchte Mutation enthalten, zu finden, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dafür wurde ein Restriktionsenzym gewählt, dessen Schnittstelle genau an der Stelle in der Sequenz des PCR-Fragmentes lag, an der auch die Mutation zu finden ist. Das Restriktionsenzym BseDI schneidet in der Basenabfolge 5'...C|CNNGG...3' jeweils zwischen den beiden Cytosinen. Da nun die Stelle in der KET/p63 Exon 6-Sequenz, an der die Mutation auftritt, die Abfolge CCCAGG in der Wildtypsequenz enthält, war BseDI ein geeignetes Restriktionsenzym, um Klone mit der Mutation zu TCCAGG zu identifizieren. Dabei wurde das DNA-Fragment von Klonen ohne die Mutation von dem Restriktionsenzym geschnitten, wohingegen das DNA-Fragment von Klonen mit der Mutation nicht geschnitten wurde, da bei ihnen das eine Cytosin durch ein Thymidin ersetzt war. Dadurch ergab sich für diese Klone ein anderes Bandenmuster in der anschließenden Agarosegel-Elektrophorese.

### Restriktionsansatz:

Es wurde das Restriktionsenzym BseDI (SecI) einschließlich des dazugehörigen Puffers von der Firma MBI Fermentas verwendet.

Dafür wurde für jeden Klon, also 18 x ein 10 µl-Ansatz aus je:

2 µl DNA aus den Minipräparationen

1 µl 10 X BseDI-Puffer

0.5 µl BseDI-Enzym

6.5 µl H<sub>2</sub>O

hergestellt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden die 10 µl des Restriktionsansatzes mit den geschnittenen DNA-Fragmenten zur Detektion von Klonen mit auffälligem Bandenmuster, die die Mutation enthalten könnten, in einer Agarosegel-Elektrophorese wie unter 2.2.3. beschrieben dargestellt und unter dem UV-Transilluminator betrachtet und dokumentiert. Dabei ergab sich, daß fünf der 18 Klone ein auffälliges Bandenmuster enthielten, sodaß von diesen Klonen jeweils 2 x 2µl des Miniprep-Ansatzes zum Sequenzieren gegeben wurde, um die gesuchte DNA-Sequenz jeweils sowohl mit einem pUC 18-forward und einem -reverse Primer in beide Richtungen darzustellen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Darstellung des Tumormaterials

Von 43 erhaltenen Proben konnten insgesamt 30 Basaliomstanzbiopsien erfolgreich aufgearbeitet werden. Davon stammen 17 Stanzbiopsien aus dem Allgemeinen Krankenhaus St. Georg und sind mit G1-G18 (G15 fehlt) benannt. Zum Teil stammen von einem Patienten verschiedene Tumorbiopsien von unterschiedlichen Lokalisationen. 13 Stanzbiopsien stammen von Priv.Doz. Dr. med. K. Meissner und sind mit T1-T25 benannt.

Anhand der histologischen Einstufung des restlichen Tumorgewebes konnten die Stanzbiopsien der jeweiligen Histologie zugeordnet werden:

Tabelle 3.1: Darstellung des untersuchten Tumormaterials

Stanzbiopsie-Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Diagnose
G1	Weiblich	96	Ohr links, retroaurikulär	Noduläres BCC
G2	s.o.	s.o.	Ohr links, Ohrmuschel	Kleinnoduläres BCC
G3	Männlich	74	Ohr rechts, Helix	Sklerodermiformes BCC
G4	s.o.	s.o.	Ohr rechts, retroaurikulär	Multizentrisches, sklerodermiformes BCC
G5	s.o.	s.o.	Brust rechts	Multinoduläres, z.T. zystisches BCC
G6	Männlich	89	Hinterkopf	Solides BCC
G7	Weiblich	77	Stirnhaargrenzerechts	Noduläres BCC
G8	Weiblich	64	Schulter rechts	Superfizielles BCC
G9	Männlich	66	Unterarmrechts	Multizentrisches, kleinnoduläres BCC
G10	Männlich	58	Schulterblatt links	Multizentrisches, kleinnoduläres BCC
G11	s.o.	s.o.	Brustwirbelsäule links	Noduläres BCC
G12	s.o.	s.o.	Ohr links, retroaurikulär	Multizentrisches, noduläres BCC
G13	*	*	Schulterblatt links	Multizentrisches, kleinnoduläres BCC
G14	Männlich	67	Oberschenkel links	Solides BCC
G16	Männlich	68	Unterlidrechts	Metatypisches, basosquamöses BCC
G17	Männlich	67	Scheitelregion	Solides BCC
G18	Männlich	71	Medialer Augenwinkel links	BCC-Rezidiv

\* Daten zu Alter und Geschlecht lagen nicht vor

Stanzbiopsie-Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation	Diagnose
T2	Weiblich	63	Hüfte links, ventral	Rumpfhautbasaliom
T11	Männlich	75	Auge rechts	Solides BCC, ulceriert
T12	Männlich	67	Rippenbogen links	Solides BCC
T13	s.o.	s.o.	Axilla links	Solides BCC
T14	Weiblich	78	Rücken	Multifokales, solides BCC
T15	Männlich	77	Nasenflügel links	Solides BCC, ulceriert
T17	Männlich	90	Augenbraue	Solides BCC
T19	Männlich	68	Axilla links	Partiell solides, partiell adenoides BCC
T21	Männlich	79	Wange links	Superfizielles, solides BCC
T22	Weiblich	86	Kinn rechts	Solides BCC
T23	s.o.	s.o.	Hals rechts	Solides BCC
T24	Männlich	78	Stirn rechts	Solides, fokal pseudozystisches BCC
T25	Weiblich	56	Ohr rechts, retroauriculär	Solides BCC

### 3.2. Darstellung des Patientenkollektivs

Insgesamt wurde Biopsiematerial von 21 Patienten verwendet, dabei von 7 Frauen und 14 Männern. Das Alter lag zwischen 56 und 96 Jahren mit einem Mittelwert von 74 Jahren.

### 3.3. Gleichzeitige RNA- und DNA-Isolation

Durch die Anwendung eines speziellen Kits von QIAGEN (s.oben) konnte für jeden der Tumoren gleichzeitig sowohl die RNA als auch die DNA isoliert und aufgereinigt werden, außer für Proben T5-T10, deren RNA und DNA durch falsche Lagerung vor Ort degradiert war, bevor sie aufgearbeitet werden konnten.

Durch die unterschiedliche Größe der Stanzzyylinder war die Ausbeute an RNA, die für die RT-PCR zur Verfügung stand, bei den Basaliomen aus Langenhorn generell geringer. In zwei Fällen, T16 und T18, reichte sie nicht aus, um genügend cDNA für eine RT-PCR zu synthetisieren. In allen anderen Fällen konnte ausreichend RNA für die RT-PCR isoliert werden. Sie wurde jeweils im Anschluß an die Aufreinigung zusammen mit der dazugehörigen DNA in einer RNase-freien Agarose-Gelelektrophorese dargestellt (s. typisches Beispiel auf Abbildung 3.1), um die Qualität der Präparation zu kontrollieren. Dabei

wurde auf Degradation der RNA geachtet und auf das Verhältnis der Menge an 28S- zu 18S-rRNA, das bei guter Gesamt-RNA-Isolation etwa 2:1 betragen soll. Zusätzlich wurde dabei die notwendige einzusetzende Menge für die cDNA-Synthese abgeschätzt.

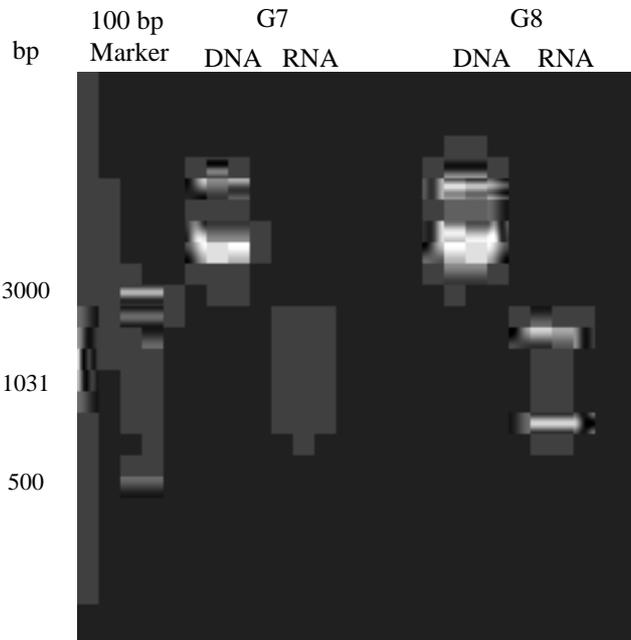


Abbildung 3.1: Darstellung der aufgereinigten DNA und Gesamt-RNA zweier Basaliome in der nicht denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese.

### 3.4. RT-PCR

#### 3.4.1. Amplifikation von KET/p63

In allen Fällen konnte die 573 Basenpaar lange DNA-bindende Domäne von KET/p63, beginnend am Ende von Exon 4 und terminierend am Ende von Exon 8 aus der cDNA amplifiziert werden. Dabei wurde zumeist ein 844 Basenpaar langes Fragment, beginnend in Exon 4 und terminierend in Exon 9 amplifiziert (s. Abbildung 3.2).

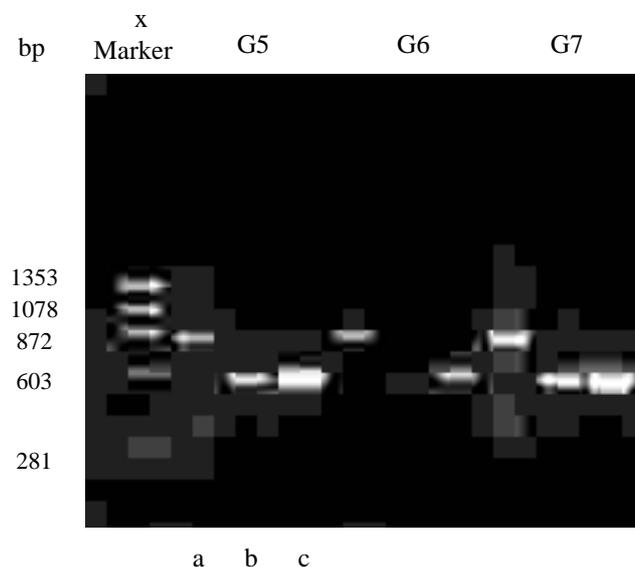


Abbildung 3.2: Darstellung des PCR-Produktes der DNA-Bindungsdomäne von KET/p63 als ein 844 bp langes Fragment (a) zusammen mit einer Actin-Kontrolle (b) und dem PCR-Produkt der DNA-Bindungsdomäne von p53 als 586 bp langes Fragment (c) von insgesamt drei verschiedenen Basaliomen (G5-G7).

Der Abstand der Primer zum Anfang bzw. zum Ende der Sequenz der DNA-bindenden Domäne wurde dabei groß genug gewählt, um bei der Sequenzierung den gesamten Bereich lesen zu können.

In einigen Fällen mußten zwei kleinere Fragmente von 396 und 540 Basenpaar Länge (T11) bzw. von 547 (Fragment 1) und 540 (Fragment 2) Basenpaar Länge (T22, G5, G7, G8, G9, G11, G14, G15, G16) amplifiziert werden (s. Abbildung 3.3), deren Sequenz sich aber überschneidet, so daß auch in diesen Fällen nach der Sequenzierung die gesamte DNA-bindende Domäne zu lesen war.

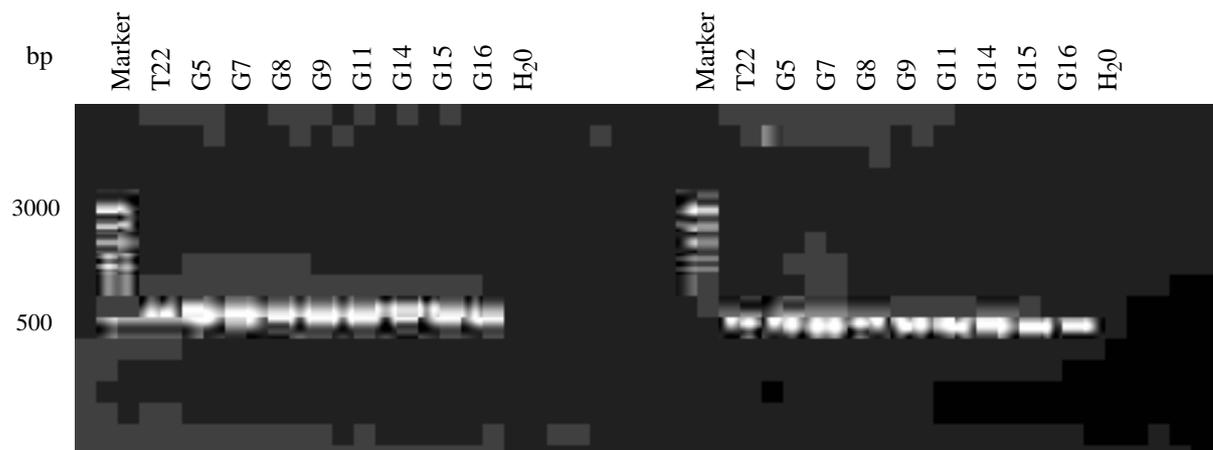


Abbildung 3.3: Darstellung der PCR-Produkte der DNA-Bindungsdomäne von KET/p63 in zwei Fragmenten von insgesamt neun Basaliomen. Links das 547 bp lange Fragment 1 und rechts das 540 bp lange Fragment 2.

### 3.4.2. Amplifikation von p53

Zusätzlich wurde erfolgreich für jedes Basaliom die DNA-bindende Domäne von p53 mit Hilfe eines 586 Basenpaar langen Fragmentes, dessen Beginn in Exon 5 und dessen Ende in Exon 10 lag, aus der cDNA amplifiziert (s. Abbildung 3.4).

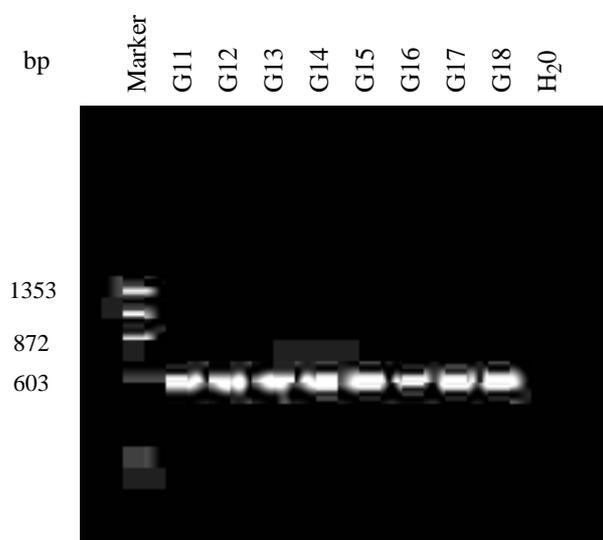


Abbildung 3.4: Darstellung des PCR-Produktes der DNA-Bindungsdomäne von p53 als 586 bp langes Fragment von den Basaliomen G11 bis G18.

### 3.5. Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wie in 2.2.5. beschrieben entweder direkt aus dem PCR-Ansatz über eine Säule oder nach Auftragen des restlichen PCR-Produktes in einer zusätzlichen Agarosegel-Elektrophorese und Ausschneiden der Bande, konnten in allen Fällen die DNA-bindenden Domänen von sowohl KET/p63 als auch p53 vollständig sequenziert werden. Zwar unterschied sich die Qualität der Sequenzen abhängig von der Menge und der Reinheit der PCR-Produkte, es konnte aber zumeist durch überschneidende Sequenzierungen oder Sequenzierung in beide Richtungen sowohl vom 5'-Ende als auch vom 3'-Ende her die vollständige Sequenz erfaßt werden.

#### 3.5.1. KET/p63

Für die Sequenz des 844 bp langen Fragmentes von KET/p63 wurde jeweils zweimal sequenziert, um auch den Randbereich gut lesen zu können. Dabei wurde nicht der PCR-antisense-Primer hu53L21 für die Sequenzierung verwendet, sondern der in der Sequenz liegende sense-Primer hu53L34 als reiner Sequenzierprimer. Das hat den Vorteil, daß zum einen die resultierende Sequenz reiner ist und nicht durch amplifizierte Nebenprodukte überlagert wird, zum anderen kann dadurch besser der gesamte Bereich der DNA-Bindungsdomäne gelesen werden, da sich die beiden Sequenzen überlappen und der Sequenzierprimer nicht im Randbereich liegt. In einigen Fällen wurde zusätzlich auch der PCR-sense-Primer mKETE4s ausgetauscht gegen den antisense-Primer hu53L35 als Sequenzierprimer.

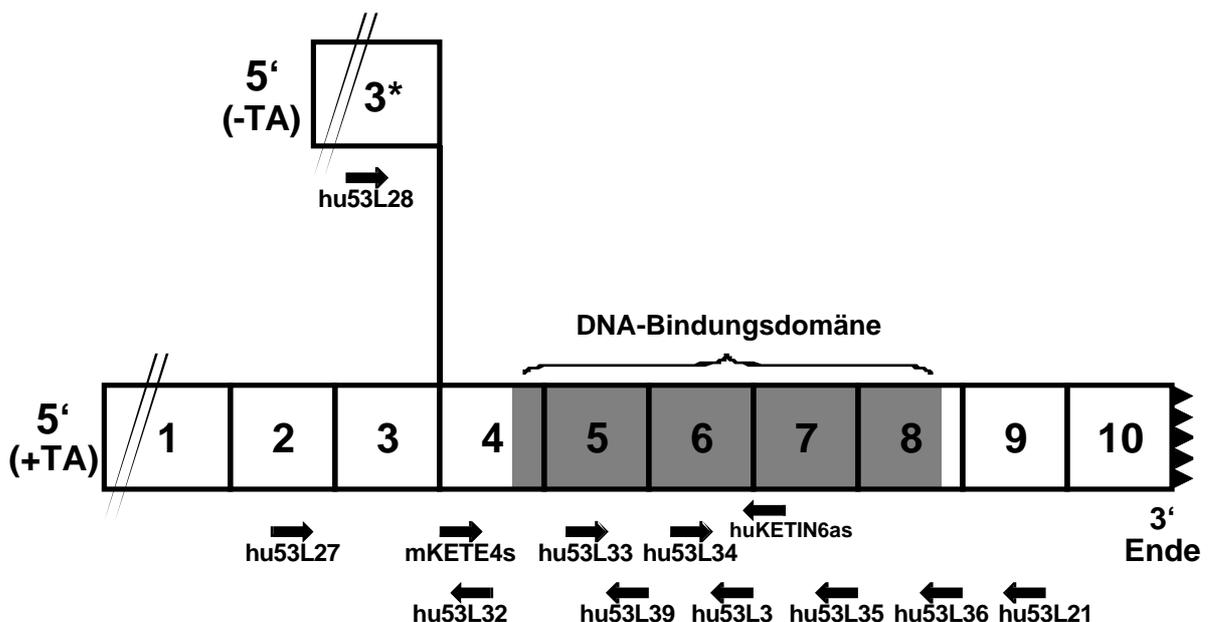


Abbildung 3.5: Schema der Position der PCR-Primer in der Sequenz von KET/p63 zur Amplifikation und Sequenzierung der DNA-Bindungsdomäne und der Spleißvarianten +TA und -TA. Die verschiedenen Spleißmöglichkeiten des 3'-Endes sind nicht dargestellt.

Für die Sequenzen der zwei kürzeren Fragmente von KET/p63 wurde pro Fragment jeweils nur in eine Richtung sequenziert. Dabei konnten die gleichen Primer, die schon für die PCR verwendet worden waren, auch für die Sequenzierung eingesetzt werden und ergaben klare Sequenzen. So wurde Fragment 1 mit dem PCR-antisense-Primer hu53L3 und Fragment 2 mit dem PCR-sense-Primer hu53L33 sequenziert (s. Abbildung 3.5).

### 3.5.2. p53

Für die Sequenzierung des 586 bp langen Fragmentes von p53 wurde nur in eine Richtung sequenziert mit dem PCR-sense-Primer hup53 E5s. Nur bei unklaren Sequenzen mit der Frage nach einer Mutation wurde zusätzlich mit dem PCR-antisense-Primer hup53E10as in die Gegenrichtung sequenziert.

## 3.6. Mutationsanalyse

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte zunächst mit dem Auge durch Suche nach Auffälligkeiten in der Sequenz. Danach wurden die Sequenzen per Computer ausgewertet, indem sie zunächst eingegeben und anschließend mit der Wildtypsequenz auf Abweichungen der Basenabfolge verglichen wurden. Das geschah mit Hilfe des Programmes GCG (Genetics Computer Group Wisconsin-Package 10.0, Madison/Wisconsin, USA), in dem alle Sequenzen der einzelnen Basaliome mit dem jeweiligen Sequenzierprimer-Namen als Basenabfolge in einem Sequenzprojekt untereinander eingegeben wurden. Durch Vergleich der Basenabfolge mit der Wildtypbasenabfolge wurden Abweichungen festgestellt, die zumeist mit N gekennzeichnet waren und anschließend in der jeweils dazugehörigen Sequenz aufgesucht wurden, um zu überprüfen, ob es sich nur um ein Artefakt handelt oder wirklich um zwei unterschiedliche Basen an derselben Position, die auf eine Mutation hindeuten.

### 3.6.1. KET/p63

Bei der Auswertung der Sequenzen wurde in den zwei Basaliomen G7 und G8 jeweils ein Basenaustausch entdeckt.

Basaliom G7: In der Sequenz des Fragmentes 2 der DNA-bindenden Domäne von KET/p63, sequenziert mit sense-Primer hu53L33, war in **Exon 6** im Codon 287 eine C->T Transition an Basen-Position 886 zusätzlich zur Wildtypsequenz sichtbar. Auch in der Sequenz des Gegenstranges, sequenziert mit dem antisense-Primer hu53L36, fand sich die entsprechende G->A Transition.

Daraufhin wurde auch auf Ebene der genomischen DNA nach einem Basenaustausch gesucht. Dazu wurde der Primer huKET-IN6as angefertigt, der in Intron 6 liegt, da der Basenaustausch relativ nahe an der Exon 6 - Intron 6 - Grenze liegt. Nach Amplifizierung und Sequenzierung eines 301 Basenpaar langen Fragmentes aus der genomischen DNA konnte auch in dieser Sequenz die G->A Transition gefunden werden (s. Abbildung 3.6). Dieser Basenaustausch führt zu dem Codon TTG statt CTG. Da beide Codons für die Aminosäure Leucin kodieren, findet auf Proteinebene kein Aminosäurewechsel statt.

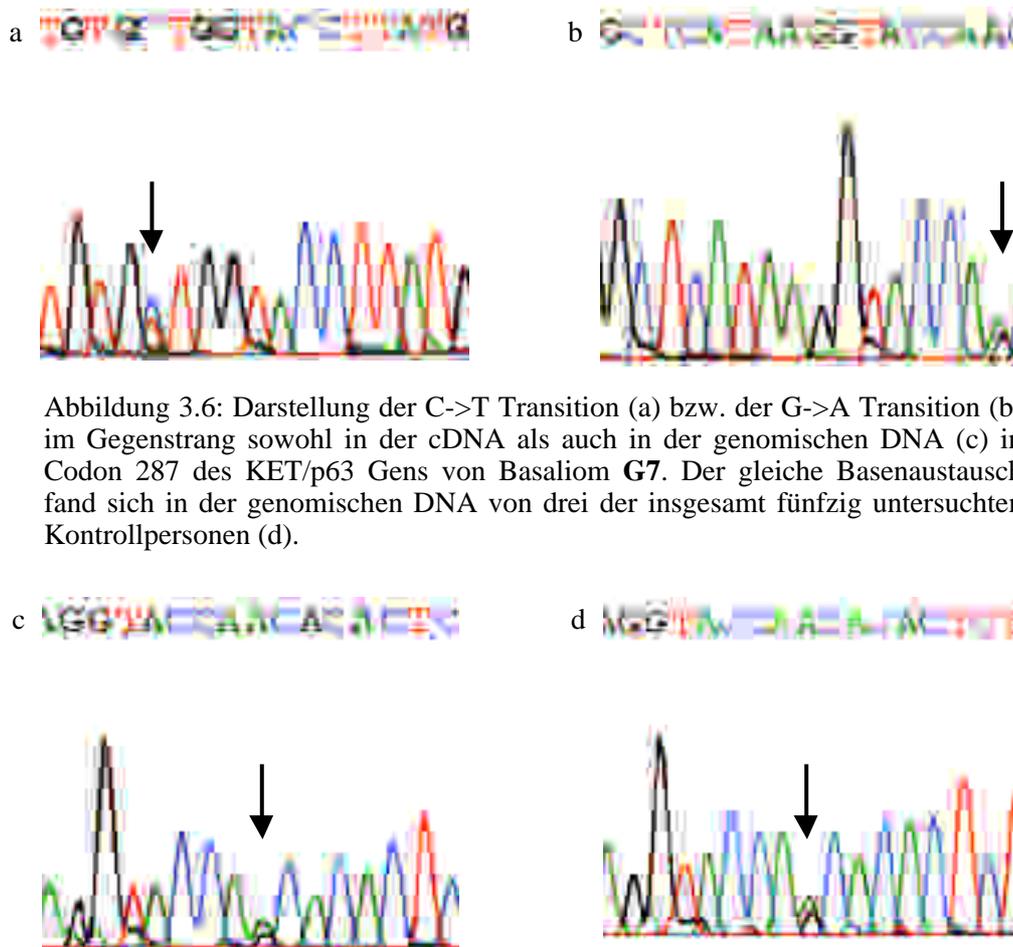


Abbildung 3.6: Darstellung der C->T Transition (a) bzw. der G->A Transition (b) im Gegenstrang sowohl in der cDNA als auch in der genomischen DNA (c) in Codon 287 des KET/p63 Gens von Basaliom **G7**. Der gleiche Basenaustausch fand sich in der genomischen DNA von drei der insgesamt fünfzig untersuchten Kontrollpersonen (d).

Zur Überprüfung, ob es sich bei dem Basenaustausch um einen in der Bevölkerung häufiger vorkommenden Polymorphismus handelt, wurde in der DNA von 50 Blutspendern, die mir freundlicherweise von PD Dr. W. Höppner aus dem Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung zur Verfügung gestellt wurde, nach dem gleichen Basenaustausch gesucht. Dazu wurde aus jeder einzelnen DNA das 301 bp lange Fragment von KET/p63 Exon und Intron 6 in der PCR amplifiziert und sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen ergab denselben Basenaustausch in der DNA von drei Probanden. Da hierbei DNA aus gesunden somatischen Lymphozyten untersucht wurde, also keinen Tumorzellen, kann von

einem Polymorphismus ausgegangen werden.

**Basaliom G8:** Auch in diesem Fall wurde in der Sequenz von Fragment 2 der DNA-bindenden Domäne von KET/p63, sequenziert mit dem sense-Primer hu53L33, am Ende von **Exon 6** ein Basenaustausch gefunden. Zusätzlich zur Wildtypsequenz war eine deutliche C->T Transition in Codon 293 an Basen-Position 905 sichtbar.

Dieser Basenaustausch führt in dem dazugehörigen Codon zu einer Umwandlung von CCC zu CTC, was zur Folge hat, daß auf Proteinebene ein Aminosäurewechsel von Prolin zu Leucin stattfindet. Damit stellt dieser Basenaustausch eine echte Mutation dar.

Auch in der Sequenz des Gegenstranges, sequenziert mit antisense-Primer hu53L36, fand sich der entsprechende Basenaustausch, eine G->A Transition an derselben Position (s. Abbildung 7). Allerdings konnte der Basenaustausch in dem vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht in der PCR von Exon und Intron 6 auf Ebene der genomischen DNA eindeutig bestätigt werden.

Deshalb wurde das PCR-Fragment wie unter 2.2.8. beschrieben in den Vektor pUC 18 Sma I/BAP subkloniert und in dem Bakterienstamm Epicurian Coli XL1-Blue vervielfältigt. Dieser Schritt wurde zusammen mit Frau H. Christiansen durchgeführt. Als Ergebnis fanden sich fünf positive Subklone von insgesamt 18 Subklonen, die die gleiche Punktmutation aufwiesen. Von diesen zeigten Subklon 3, 13 und 14 die G->A Transition in der mit dem forward Primer sequenzierten Sequenz, während Subklon 15 und 16 aufgrund der umgekehrten Orientierung die C->T Transition in der mit dem forward Primer sequenzierten Sequenz aufwiesen (s. Abbildung 3.7). Anhand der niedrigen Zahl an Subklonen, die die Mutation enthielten, nämlich nur etwa 25%, wird verständlich, daß die Mutation aufgrund von Überlagerung durch die Wildtypsequenz nicht in der Sequenz des PCR-Produktes aus der genomischen DNA zu sehen war.

Der Vergleich mit einer Datenbank von C. Caron de Fromental und T. Soussi [Caron de Fromental, Soussi 1992] über Mutationen von p53 bei Tumoren und Tumorzelllinien ergab, daß bei p53 an der entsprechenden Stelle, nämlich Codon 223 derselbe Aminosäureaustausch aufgrund desselben Basenaustausches in drei Prostatakarzinom-Zelllinien und einer Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie gefunden wurde [Isaacs et al. 1991, Carroll et al. 1993, Chi et al. 1994, Fagin et al. 1993].

Die gefundene Punktmutation liegt an einer zwischen den Genen p53, p73 und KET/p63 hochkonservierten Position innerhalb der DNA-Bindungsdomäne. Im Falle von p53 führt dieselbe Mutation zu einem Funktionsverlust mit nachfolgendem Tumorwachstum [Isaacs et al. 1991]. Interessant wäre es zu untersuchen, ob auch die Funktion von KET/p63 durch diese

Mutation eingeschränkt wird. Weiterhin fällt auf, daß es sich bei der Mutation um eine UV-spezifische C->T Transition handelt, wie sie bei Tumoren der Haut im Falle von p53 regelmäßig zu finden ist.

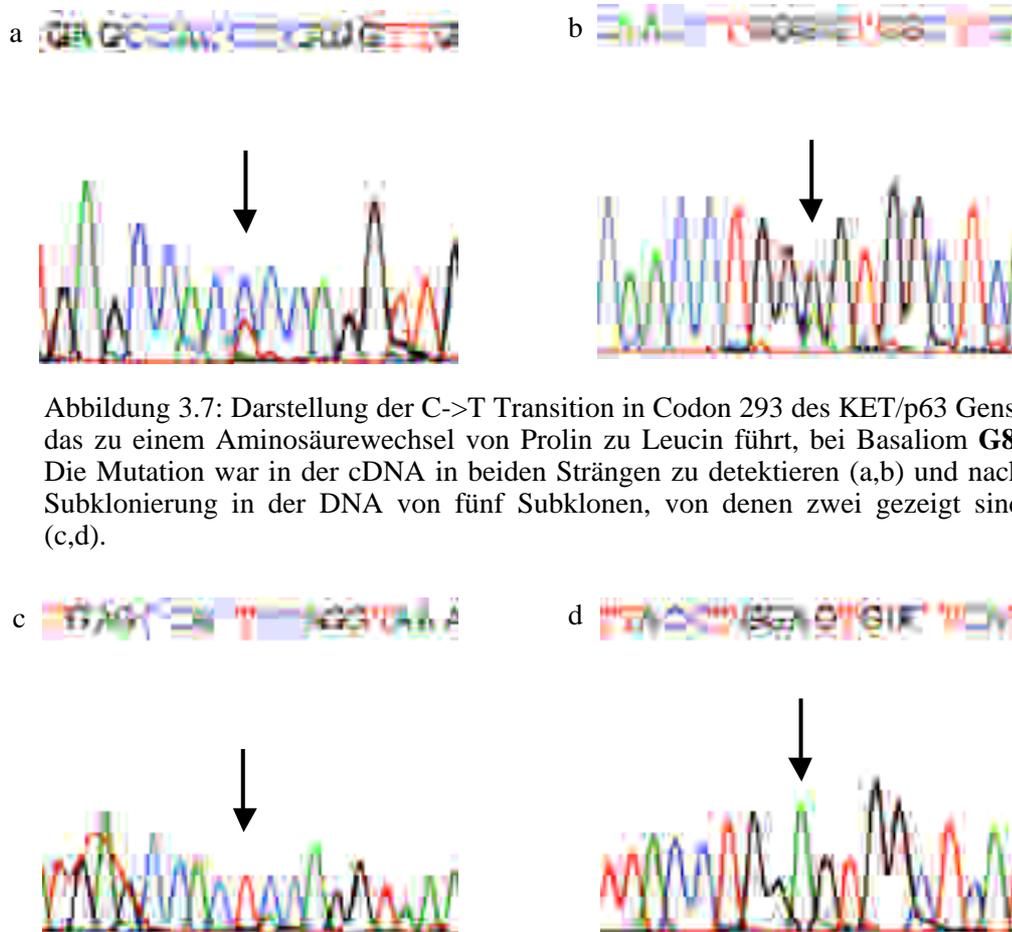


Abbildung 3.7: Darstellung der C->T Transition in Codon 293 des KET/p63 Gens, das zu einem Aminosäurewechsel von Prolin zu Leucin führt, bei Basaliom **G8**. Die Mutation war in der cDNA in beiden Strängen zu detektieren (a,b) und nach Subklonierung in der DNA von fünf Subklonen, von denen zwei gezeigt sind (c,d).

Bei der Kontrolle in bezug auf dieselbe Mutation in 100 Chromosomen der DNA der 50 Blutspender konnte erwartungsgemäß in keinem einzigen Fall derselbe Basenaustausch gefunden werden.

Zusammenfassend konnte also bei 30 Basaliomen nur in einem einzigen Fall eine Mutation in der DNA-Bindungsdomäne von KET/p63 gefunden werden.

### 3.6.2. p53

Die Auswertung der Sequenzen von p53 Exon 5-10 ergab Basenaustausche bei vier verschiedenen Basaliomen. Davon lag ein Polymorphismus in Exon 6, eine Mutation in Exon 7, und zwei Mutationen in Exon 8.

**Basaliom G3:** In der Sequenz der DNA-bindenden Domäne von p53, sequenziert mit dem sense-Primer hup53E5s, war in **Exon 8** in Codon 289/290 eine deutliche CC->TT Transition

an Basenpositionen 1002 und 1003 zusätzlich zur Wildtypsequenz sichtbar. Die entsprechende GG->AA Transition fand sich in der Sequenz des Gegenstranges, sequenziert mit Primer hup53E10as (s. Abbildung 3.8).

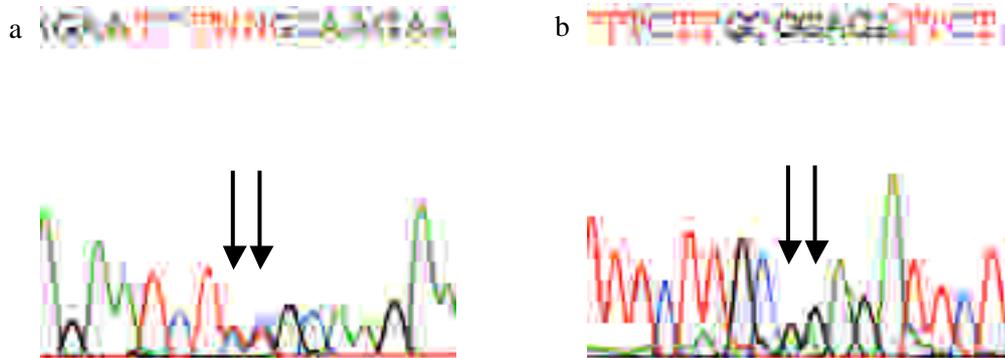


Abbildung 3.8: Darstellung der CC->TT Transition (a) in Codon 289/290 des p53 Gens in der cDNA von Basaliom **G3** bzw. der entsprechenden GG->AA Transition auf dem Gegenstrang (b). Hieraus resultiert ein Aminosäurewechsel von Arginin zu Cystein in Codon 290.

Daraufhin wurde in der genomischen DNA nach der Mutation gesucht, wofür die zwei Primer hup53E7s und hup53E8as zur Amplifikation der beiden Exons 7 und 8 einschließlich des Introns 7 angefertigt wurden. Die PCR des 616 Basenpaar langen Fragments aus der genomischen DNA gelang ohne Probleme (s. Abbildung 3.9), allerdings konnte nach Sequenzierung in dieser Sequenz die Mutation nicht bestätigt werden.

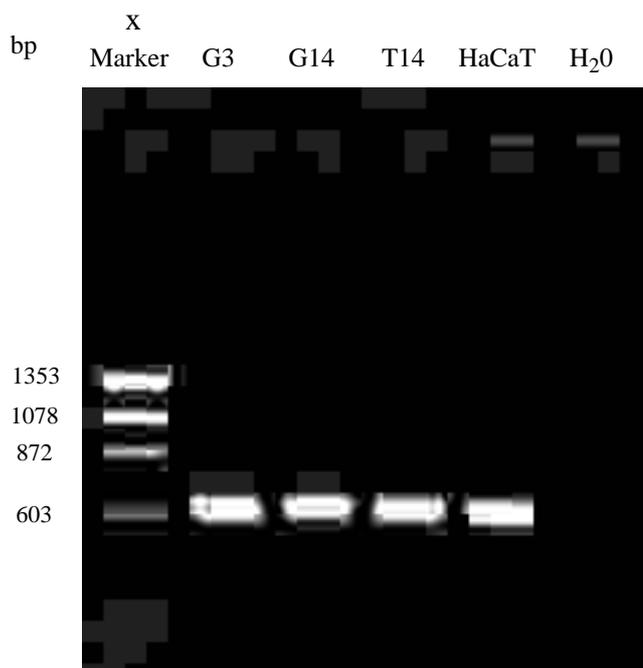


Abbildung 3.9: Darstellung des PCR-Produktes von Exon 7 und 8 des p53 Gens als 616 bp langes Fragment aus genomischer DNA von Basaliomen **G3**, **G14**, **T14** und der HaCaT-Zelllinie.

Der Basenaustausch in Codon 289 bewirkt eine Umwandlung des Triplets CTC zu CTT, wobei beide für die Aminosäure Leucin kodieren. Hingegen führt der Basenaustausch in Codon 290 zu der Umwandlung des Codons CGC zu TGC. Das hat auf Proteinebene einen Aminosäurewechsel von Arginin zu Cystein zur Folge und kann damit potentiell die Funktion von p53 beeinträchtigen. Beim Vergleich mit der oben genannten p53 Mutations-Datenbank fiel auf, daß diese Mutation bisher nicht bei Basaliomen gefunden wurde, sondern nur bei folgenden Tumorarten: B-Zell-Lymphom, Ovarialkarzinom, Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches und Melanom [Caron de Fromental, Soussi 1992].

Zusätzlich ist noch festzustellen, daß es sich bei dieser CC->TT Transition wiederum um eine Art von Mutation handelt, die hochspezifisch für UV-induzierte Tumoren ist (vgl 1.2.).

**Basaliom G13:** In der Sequenz des 586 Basenpaar langen Fragments von Exon 5-10, sequenziert mit Primer hup53E5s, fiel ein Basenaustausch in **Exon 6** zusätzlich zur Wildtypsequenz an Basenposition 774 auf. Dieser führt in Codon 213 durch eine A->G Transition zu dem Triplett CGG statt CGA. Da beide Triplets für die Aminosäure Arginin kodieren, könnte dieser Basenaustausch eine stille Mutation oder nur mehr einen Polymorphismus darstellen.

Auch in der Sequenz des Gegenstranges, sequenziert mit Primer hup53E10as, wurde der entsprechende T->C Basenaustausch gefunden (s. Abbildung 3.10).

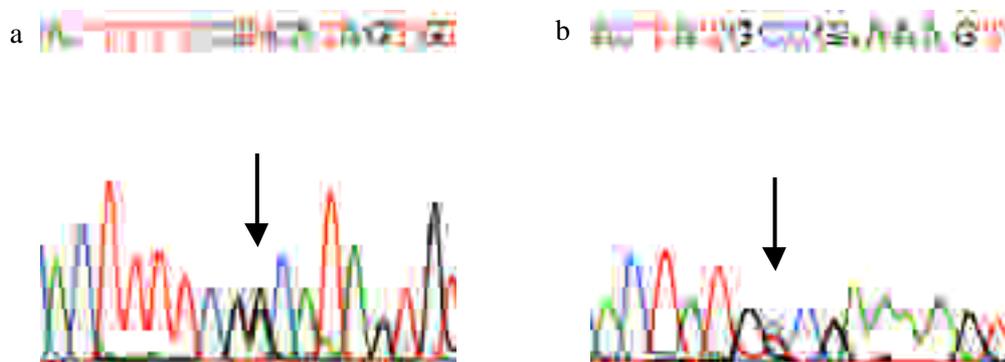


Abbildung 3.10: Darstellung der A->G Transition (a) in Codon 213 des p53 Gens in der cDNA von Basaliom **G13** bzw. der entsprechenden T->C Transition im Gegenstrang (b).

Der Vergleich mit der p53 Mutations-Datenbank ergab denselben Basenaustausch im Falle von zwei Burkitt-Lymphomen [Caron de Fromental, Soussi 1992].

**Basaliom G14:** Auch in diesem Fall fand sich in dem mit Primer hup53E5s sequenzierten Fragment der DNA-bindenden Domäne von p53 ein Basenaustausch. Dieser liegt in **Exon 8**

an Basenposition 960 und stellt eine T->G Transversion in Codon 275 dar. Im Gegenstrang war die entsprechende A->C Transversion zu finden, wenn auch weniger deutlich (s. Abbildung 3.11). Diese Transversion führt zum Austausch des Codons TGT durch das Codon TGG. Auf Proteinebene findet dadurch ein Aminosäurewechsel von Cystein zu Tryptophan statt.

Leider konnte auch in diesem Fall die Mutation in dem vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht durch PCR auf Ebene der genomischen DNA bestätigt werden. Interessant war jedoch, daß in der aus der genomischen DNA amplifizierten Sequenz von Exon 7 und 8 einschließlich des dazwischen liegenden Introns 7 gleich zwei Basenaustausche in der Intronsequenz zu finden waren.

Derselbe Basenaustausch mit daraus resultierendem Aminosäureaustausch wurde in der p53 Mutations-Datenbank nicht bei Basaliomen gefunden, sondern bei folgenden Tumorarten: Mammakarzinom, Magenkarzinom, Melanom, B-Chronisch Lymphatische Leukämie, Gliom [Caron de Fromentel, Soussi 1992].

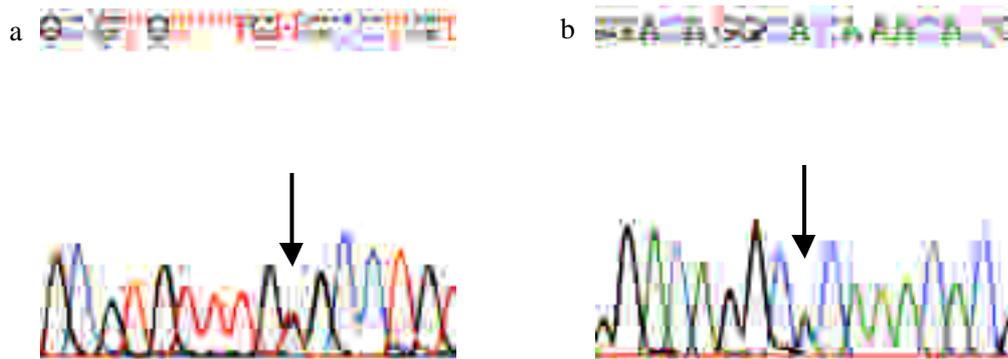


Abbildung 3.11: Darstellung der T->G Transversion (a) in Codon 275 des p53 Gens in der cDNA von Basaliom **G14** bzw. der entsprechenden A->C Transversion auf dem Gegenstrang (b). Es resultiert ein Aminosäurewechsel von Cystein zu Tryptophan.

**Basaliom T14:** Hier fand sich in der mit sense-Primer hup53E5s sequenzierten Sequenz der DNA-bindenden Domäne ein Basenaustausch in **Exon 7** an Basenposition 857. Zusätzlich zur Wildtypsequenz war im Codon 241 wiederum eine UV-spezifische C->T Transition zu sehen, die auch in dem mit antisense-Primer hup53E10as sequenzierten Gegenstrang als G->A Transition deutlich auffiel (s. Abbildung 3.12). Dieser Basenaustausch führt zur Umwandlung des Codons TCC zu TTC, was einen Aminosäurewechsel von Serin nach Phenylalanin zur Folge hat. Leider konnte auch in diesem Fall in dem vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht mit der PCR die Mutation auf Ebene der genomischen DNA bestätigt werden. Der Vergleich mit der p53 Mutations-Datenbank ergab dieselbe Mutation

bei einer Vielzahl von Tumoren und Tumorzelllinien, insgesamt bei 19 verschiedenen Tumorarten [Caron de Fromental, Soussi 1992], unter anderem auch bei Basaliomen [Hedrum et al. 1994, Matsumura et al. 1996].

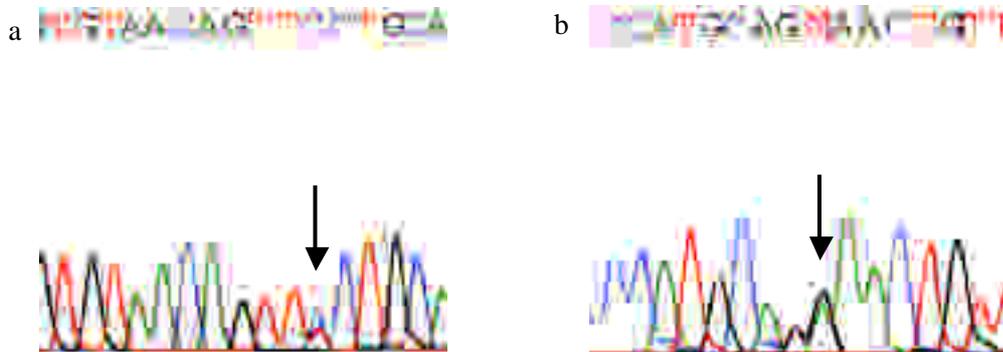


Abbildung 3.12: Darstellung der C->T Transition (a) in Codon 275 des p53-Gens, die zu einem Aminosäurewechsel von Serin zu Phenylalanin führt, in der cDNA von Basaliom **T14** bzw. der entsprechenden G->A Transition auf dem Gegenstrang (b).

Zusammenfassend konnte bei der Untersuchung der Basaliome auf p53-Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne abgesehen von dem Polymorphismus lediglich in der cDNA von 3 der insgesamt 30 Basaliome (10%) eine echte Mutation in dieser Region entdeckt werden.

### 3.6.3. HaCaT-Zelllinie

Freundlicherweise wurde mir ein Aliquot von Keratinozyten der HaCaT-Zelllinie (human aadult skin keratinocytes propagated under low Ca2+ conditions and elevated temperature) aus dem Dermatologischen Zentrum des Krankenhauses Buxtehude über Dr. B. Volkmer und Dr. R. Greinert zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie stellt eine für Forschungszwecke gut geeignete spontan immortalisierte Zelllinie dar, die noch die gleiche normale Differenzierung wie die Epidermis aufweisen kann und keine maligne Entartung zeigt [Boukamp et al. 1988]. Nach erfolgreicher DNA- und RNA-Aufreinigung mit anschließender cDNA-Synthese diente diese cDNA aufgrund der guten Qualität stets als Kontrolle für neue PCR-Ansätze. Zudem sind in dieser Zelllinie zwei zwischen den beiden Allelen des p53 Gens unterschiedliche Mutationen bekannt [Lehman et al. 1993], von denen die im Folgenden beschriebene Mutation mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung gefunden wurde und dadurch quasi als Positivkontrolle der Methodik diente.

In **Exon 8** konnte an den Basenpositionen 978 und 979 eine für UV-Licht hochspezifische CC->TT Transition entdeckt werden. Diese befindet sich am Ende von Codon 281 und am

Anfang von Codon 282 und hat nur einen Aminosäurewechsel zur Folge. In Codon 282 führt sie zu dem Triplet TGG statt CGG, was zu dem Aminosäurewechsel von Arginin zu Tryptophan führt, wohingegen in Codon 281 sowohl das Triplet GAC als auch das veränderte Triplet GAT für die Aminosäure Aspartat kodieren, sodaß in diesem Fall kein Aminosäurewechsel resultiert (s. Abbildung 3.13).

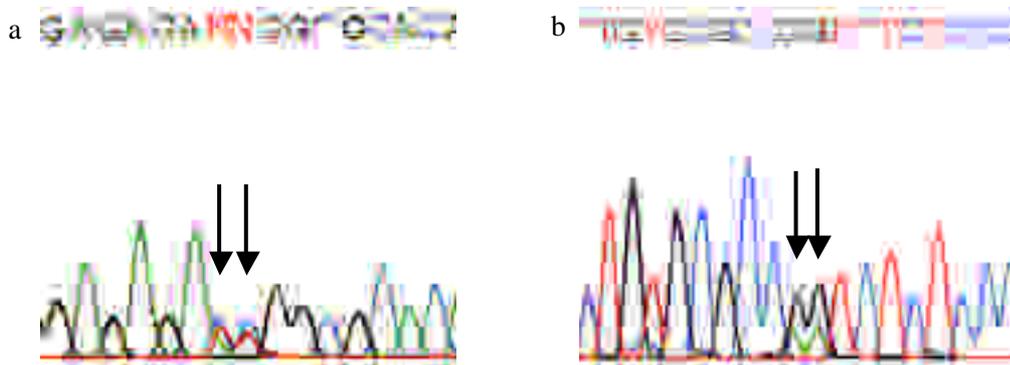


Abbildung 3.13: Darstellung der CC->TT Transition in den Codons 281 und 282 von p53 in der cDNA (a) und der entsprechenden GG->AA Transition in der genomischen DNA (b) der HaCaT-Zelllinie. In Codon 282 resultiert daraus ein Aminosäurewechsl von Arginin zu Tryptophan.

Diese Mutation konnte auch in der PCR durch Amplifizierung des Exon 8 (siehe oben) auf Ebene der genomischen DNA dargestellt werden und zeigte die entsprechende GG->AA Transition an erwarteter Stelle zusätzlich zur Wildtypsequenz. Interessant ist auch, daß diese Mutation an einer der in 1.2. gezeigten Mutations-hotspots von p53 liegt. Dabei fällt auf, daß Codon 282 ein Mutations-hotspot sowohl für Tumoren innerer Organe als auch für Hauttumoren ist.

Im Falle von KET/p63 konnte auch problemlos die DNA-Bindungsdomäne aus der cDNA der HaCaT-Zelllinie amplifiziert werden, es wurde jedoch kein Basenaustausch detektiert.

### 3.7. Expressions-Analyse der Spleißvarianten

Um die Expression der beiden verschiedenen Spleißvarianten des 5'-Endes von KET/p63 TAp63 (hier als +TA bezeichnet) einschließlich der Transaktivierungsdomäne und Np63 (hier als -TA bezeichnet) ohne die Transaktivierungsdomäne in den Basaliomen nachzuweisen und zu vergleichen, wurden mit der cDNA von jedem Basaliom je zwei zusätzliche PCR-Ansätze zur Amplifikation der beiden Spleißvarianten wie unter 2.2.4. beschrieben durchgeführt. Die anschließende Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte

ergab, daß das 441 bp lange Fragment des -TA 5'Endes in den Tumoren sehr viel stärker exprimiert wird als das 376 bp lange +TA 5'Ende (s. Abbildung 3.14). Als Positivkontrolle diente die cDNA von humanem Zungengewebe und als Negativkontrolle Aqua tridest.

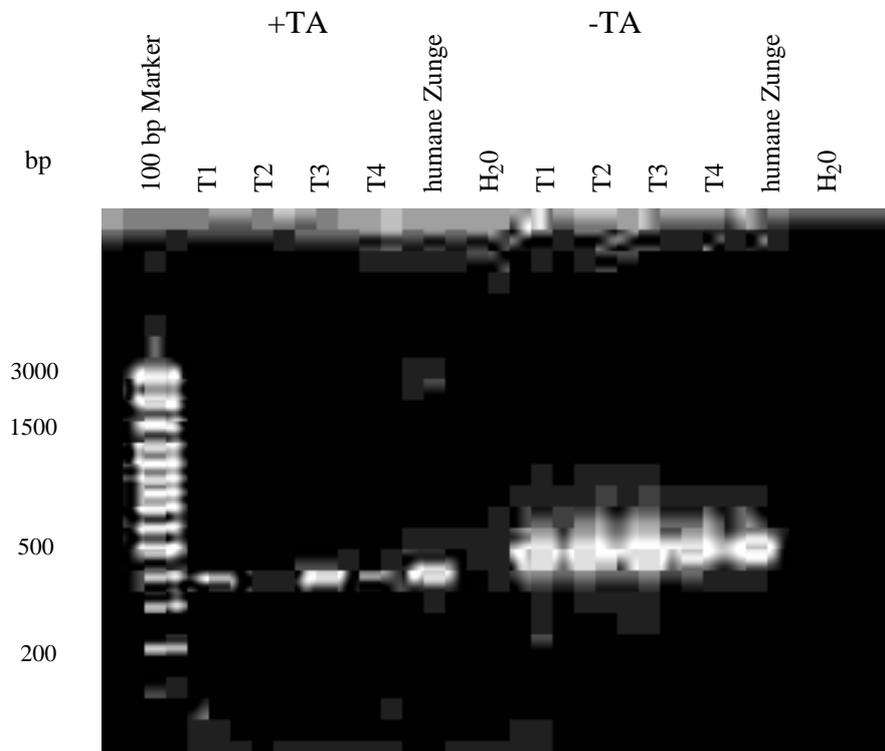


Abbildung 3.14: Darstellung der PCR-Produkte der beiden verschiedenen Spleißvarianten +TA und -TA (entspricht der N-Isoform) aus der cDNA von vier verschiedenen Basaliomen und humaner Zunge als Kontrolle. Die -TA Isoform erscheint sehr viel stärker exprimiert zu sein als die +TA Isoform.

## 4. DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es, die mögliche Funktion des neu entdeckten p53-verwandten Gens KET/p63 als Tumorsuppressorgen näher zu beleuchten. Dazu wurden 30 Basaliome auf Mutationen in der DNA-bindenden Domäne von KET/p63, der Region, die bei p53 in Tumoren am häufigsten Mutationen aufweist, untersucht. Als Vergleich und gleichzeitig als Positivkontrolle diente der Nachweis von Mutationen in der DNA-bindenden Domäne von p53 in demselben Material. Dabei wurde als Methode die RT-PCR aus aufgereinigter RNA der Basaliome mit anschließender direkter Sequenzierung der PCR-Produkte gewählt.

Bei der Mutationsanalyse von KET/p63 ergab sich mit 1 Mutation in 30 Basaliomen eine sehr geringe Rate an Mutationen als Ergebnis. Gleichzeitig zeigte aber auch die Mutationsanalyse von p53 mit 3 Mutationen in 30 Basaliomen, entsprechend 10%, eine auffallend niedrige Rate an Mutationen (s. Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Mutationsanalyse von Basalzellkarzinomen

Gen	Fall-Nr.	Alter	Lokalisation	Nukleotid-Austausch (Exon)	Aminosäure-Austausch
KET/p63 (Mut.)	G8	63	Schulter rechts	CCC->CTC (6)	Prolin <sup>293</sup> Leucin
KET/p63 (Polym.)	G7	76	Stirn rechts	CTG->TTG (6)	Leucin <sup>287</sup> Leucin
p53 (Mut.)	G3	73	Ohrhelix rechts	CCGC->TTGC (8)	Arginin <sup>290</sup> Cystein
p53 (Mut.)	G14	67	Oberschenkel links	TGT->TGG (8)	Cystein <sup>275</sup> Tryptophan
p53 (Mut.)	T14	78	Rücken	TCC->TTC (7)	Serin <sup>241</sup> Phenylalanin
p53 (Polym.)	G13	67	Thorax links	CGA->CGG (6)	Arginin <sup>213</sup> Arginin

Mut.=Mutation, Polym.=Polymorphismus

### 4.1. Methodische Probleme

Eine der Voraussetzungen für eine Mutationsanalyse in bestimmten Tumoren ist die Gewinnung reinen Tumormaterials ohne Vermischung mit gesundem Gewebe. Daher war ein Schwachpunkt der Untersuchung, daß histologisch nicht eindeutig gesichert werden konnte, ob die Stanzylinder aus dem Zentrum der Basaliome wirklich nur Tumorzellen enthielten oder auch gesundes Gewebe. Dieses möglicherweise inhomogene Material könnte der Grund für eine falsch niedrige Rate von Mutationen gewesen sein, da eventuell der Anteil an Tumor-RNA kleiner war als der Anteil an RNA aus gesundem Gewebe ohne Mutationen. Dadurch würde in der RT-PCR stärker die Sequenz aus gesundem Gewebe amplifiziert, sodaß die Mutationen aus dem Tumorgewebe nicht erkannt werden. Diese Problematik bei der Verwendung von Frischgewebe im Gegensatz zu Gewebe aus histologischen Schnitten insbesondere bei Basaliomen wird auch in der Literatur erwähnt [Ponten 1996].

Vor allem die im Vergleich mit der Literatur auffallend niedrige Rate an p53-Mutationen in den Basaliomen, 10% im Vergleich zu bis zu 56%, läßt Zweifel an der Genauigkeit der Methode aufkommen, obwohl die Angaben über p53-Mutationen in Basaliomen in der Literatur wie bereits unter 1.2. erwähnt sehr divergieren und auch in anderen Studien nur ein Anteil von 12% Mutationen in Basaliomen angegeben wird [Kubo et al. 1994]. Zudem hängt natürlich die gefundene p53-Mutationsrate auch immer von der Größe des untersuchten Genbereiches ab. So resultiert zum Beispiel die hohe p53-Mutationsrate von 56% [Ziegler et al. 1993] aus einer Untersuchung des gesamten kodierenden Bereiches von p53, also Exons 2-11, im Vergleich zu Untersuchungen nur von Exons 5-8/9 [D'Errico et al. 1997, Rady et al. 1992] entsprechend der DNA-Bindungsregion. Dabei wurden immerhin 25% der Mutationen außerhalb von Exons 5-8 gefunden. Eine Studie über p53-Mutationen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Halsbereiches, in der alle 11 Exons analysiert wurden, ergab sogar eine Mutationsrate von 91%, von denen 33% außerhalb der Exons 5-9 lagen [Kropveld et al. 1999]. Hieraus wird klar, daß die alleinige Analyse der DNA-Bindungsregion zu einer falsch niedrigen Mutationsrate führt.

Auf der anderen Seite stellt die Methode der direkten Sequenzierung unter den Methoden zur Detektion von Mutationen eine der sichersten dar und ist zum Beispiel der SSCP-(Single Stranded Conformational Polymorphism) und der HMA-(Heteroduplex Mobility Assay) Technik in bezug auf Genauigkeit überlegen [Schuster 1997]. So sind die beiden letztgenannten Techniken auch nur für PCR-Produkte mit einer Fragmentgröße bis zu 300 bp geeignet und werden mit zunehmender Fragmentgröße immer unpräziser (s. Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Vor- und Nachteile der verschiedenen Mutations-Detektions-Methoden [Schuster 1997]

Methode	Fragmentlänge	Erfogsrate	Lokalisation
SSCP	250	80%	nein
HMA	300	80%	nein
CMC	1700	>95%	ja
Sequenzierung	700	>99%	ja

Auch die Verwendung von mRNA bzw. durch das Enzym Reverse Transkriptase umgeschriebener cDNA ist als Template für die PCR der Verwendung von genomischer DNA insofern überlegen, da größere kodierende Abschnitte zusammenhängend amplifiziert und sequenziert werden können und schon bei geringeren Mengen an gewünschtem Ausgangsmaterial (hier also Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe) die

Amplifizierung der gesuchten Sequenz gelingt [Schuster 1997]. So ist ja im Gegensatz zur DNA, die in jeder Zelle gleichmäßig enthalten ist, die gesuchte mRNA nur in Zellen, die das entsprechende Gen auch wirklich exprimieren, in nachweisbarer Konzentration vorhanden im Falle von Genen, die nicht von allen Zellen gleichmäßig exprimiert werden. Dies ist sowohl bei KET/p63 mit hauptsächlichlicher Expression in Keratinozyten des Epithels (im Gegensatz zu Fibroblasten, die kein KET/p63 exprimieren, und Muskelzellen, die nur die +TA-Spleißvariante exprimieren) als auch indirekt bei p53 durch Hochregulation der Expression in Basaliomen, wie unter 1.2. beschrieben, gegeben.

Dadurch kann nicht so leicht wie im Falle der DNA in der PCR die gesuchte Sequenz (hier mit einer Mutation) durch kontaminierende Zellen mit normaler Sequenz ohne Mutationen überlagert werden. Das könnte auch der Grund dafür sein, daß in den Basaliomen G3, G14 und T14 jeweils die p53-Mutation und in Basaliom G8 die KET/p63-Mutation nicht durch PCR auf Ebene der genomischen DNA bestätigt werden konnte, da die DNA des gesunden Gewebes möglicherweise mitamplifiziert wurde und so die Sequenz des Tumoranteils verdeckt haben könnte. Auch wird dadurch verständlich, daß der KET/p63-Polymorphismus in Basaliom G7 im Gegensatz zu der KET/p63-Mutation in Basaliom G8 durch PCR auf der Ebene der genomischen DNA zu finden war, da ja ein Polymorphismus charakteristischerweise in der DNA jeder Zelle auftritt und nicht nur in Tumorzellen. Die Tatsache, daß die KET/p63-Mutation im Gegensatz zu dem Polymorphismus nicht durch direkte PCR-Sequenzierung sondern erst nach Subklonierung in einem Teil der Klone auf Ebene der genomischen DNA nachgewiesen werden konnte, kann wiederum als indirekter Beweis dafür genommen werden, daß die Mutation auch wirklich nur im Tumor vorhanden ist. Durch Verdünnung der Tumor-DNA mit Nichttumor-DNA der umliegenden Zellen konnte die Mutation nicht mehr aus der DNA detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte der Polymorphismus, der ja auch in der Nichttumor-DNA enthalten ist, sowohl auf Ebene der cDNA als auch der genomischen DNA nachgewiesen werden. Das gilt natürlich auch für die HaCaT-Zellen, die alle die p53-Mutation in ihrer DNA enthalten, sodaß hier die Mutation auch auf Ebene der genomischen DNA nachgewiesen werden konnte. Nach Abschluß der praktischen Arbeit wurde festgestellt, daß in Lymphozyten-DNA der Patientin mit Basaliom G8 tatsächlich keine Mutation vorliegt.

In bezug auf die sehr niedrige Mutationsrate von KET/p63 könnte das bedeuten, daß auch hier durch einerseits die Inhomogenität des verwendeten Frischgewebes mit einem unklaren Anteil an gesunder Haut und andererseits den auf die DNA-Bindungsdomäne beschränkten untersuchten Bereich eine falsch niedrige Mutationsrate resultiert.

Ein weiterer ausschlaggebender Gesichtspunkt in bezug auf die Verwendung von Frischgewebe mit gleichzeitiger Isolation von RNA und DNA war die geplante Analyse der unterschiedlichen Spleißvarianten von KET/p63, die nur anhand der mRNA möglich ist.

Durch die Expression mehrerer verschiedener Spleißvarianten unterscheidet sich dieses Gen grundlegend von p53, was auf eine besondere Rolle der verschiedenen Spleißvarianten hindeuten könnte.

Zudem ist durch die Möglichkeit, Mutationen sowohl in der RT-PCR als auch in der PCR mit genomischer DNA zu detektieren, eine vollständigere Analyse möglich, was auch in der Literatur so bewertet wird [Kropveld et al. 1999].

Zwar ist alternativ bei der Verwendung von Gewebe aus histologischen Schnitten das Ausgangsmaterial sauberer in bezug auf Kontamination durch Nicht-Tumorgewebe, jedoch kann dann nur noch die DNA aufgereinigt werden und daraus jedes einzelne Exon amplifiziert werden. Eine RNA-Aufreinigung aus histologischen Schnitten ist aufgrund der Degradation nicht mehr möglich.

#### 4.2. Vergleich mit der Literatur

Beim Vergleich mit Studien über KET/p63-Mutationsraten in anderen Tumorarten und Tumorzelllinien, die im Verlauf der Anfertigung der vorliegenden Arbeit publiziert wurden, fällt allerdings auf, daß im Vergleich zu p53 generell sehr wenige Mutationen zu finden sind:

Tabelle 4.3: KET/p63-Mutationsanalysen in humanen Tumoren und Tumorzelllinien

Autor	Jahr	Untersuchungsmaterial	Mutationsrate [%]	Mutationsart
Osada M et al.	1998	66 humane Tumoren verschiedenen Ursprungs	1/66 [1,5]	Ala <sup>148</sup> Pro * Plattenepithel-Ca d. Lunge
		67 humane Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs	2/67 [3,0]	Ser <sup>145</sup> Leu * Ca aus Kopf-Hals-Bereich Gln <sup>165</sup> Leu * Cervix-Ca
Hagiwara K. et al.	1999	54 humane Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs	2/54 [3,7]	Pro <sup>279</sup> His (CCC->CAC) Colon-Ca Ser <sup>560</sup> Ala (TCA->GCA) Ovarial-Ca
Sunahara M et al.	1999	80 Nicht-kleinzellige Bronchial-Ca	4/80 [5,0]	Gln <sup>31</sup> His (CAG->CAC) Gln <sup>31</sup> His (CAG->CAC) Ala <sup>148</sup> Pro (GCC->CCC) Leu <sup>248</sup> Leu(CTG->TTG)
		85 Mamma-Ca	0/85 [0,0]	
Tani et al.	1999	45 humane Lungen-Ca	0/45 [0,0]	
		44 humane Lungen-Ca-Zelllinien	1/44 [2,3]	Adenin-Insertion nach <sup>233</sup> Lys
Nishi et al.	1999	5 humane Cervix-Ca-Zelllinien	1/5 [20]	Val <sup>104</sup> Val (GTC->GTT)
		9 humane Cervix-Ca	0/9 [0]	
Hibi et al.	2000	14 humane Lungen-Ca	1/14 [7,1]	Lys <sup>298</sup> Arg *
		6 humane Plattenepithel-Ca-Zelllinien aus Kopf-Hals-Bereich	1/6 [16,7]	Glu <sup>14</sup> Gln *

\* ohne Angabe des Basenaustausches

So konnten in 170 humanen Tumorzelllinien lediglich 7 Mutationen gefunden werden, was einer Mutationsrate von 4,1% entspricht, und in 285 humanen primären Tumoren unterschiedlichen Ursprungs auch nur 6, davon fünf missense und eine stille Mutation. Das entspricht einer Mutationsrate von 2,1% (s. Tabelle 4.3).

Bei genauerer Betrachtung der gefundenen KET/p63-Mutationen fällt auf, daß mit Ausnahme der stillen Leu248Leu Mutation und der Adenin-Insertion alle anderen missense-Mutationen sind. Zudem werden zwei der Mutationen zweimal beobachtet: Gln31His und Ala148Pro.

Der von mir gefundene Polymorphismus in Codon 287 wurde in der Studie von Sunahara et al. als stille Leu248Leu Mutation in einer anderen Spleißvariante ( p63 ) nachgewiesen, woraus sich die unterschiedliche Angabe der Codons erklärt. Jedoch wurde die von mir gefundene Prolin->Leucin-Mutation in Codon 293 bisher noch nicht beschrieben. Auch wurden bisher noch keine Basaliome sowie andere Hauttumoren auf KET/p63-Mutationen hin untersucht. Das ist um so bedeutsamer, da KET/p63 wie unter 1.5. beschrieben eine gewebsspezifische und in der basalen Keratinozyten-Schicht der Epidermis ausgesprochen starke Expression zeigt.

Wenn man nun anhand der hier gefundenen sehr niedrigen p53-Mutationsrate, die normalerweise bis zu fünf mal höher sein müßte, theoretisch davon ausginge, daß die von mir gefundene KET/p63-Mutationsrate falsch niedrig sei und auch um den Faktor fünf höher sein müßte (also 5/30 Basaliomen mit Mutation, entsprechend einer Mutationsrate von 16,6%), könnte das bedeuten, daß Basaliome unter den bisher untersuchten Tumorarten eventuell eine Sonderstellung einnehmen und mit einer höheren KET/p63-Mutationsrate einhergehen. Auf der anderen Seite kann man natürlich nicht die hier gefundene niedrige KET/p63-Mutationsrate allein auf die Methodik zurückführen und proportional zur p53-Mutationsrate hochrechnen. Es ist deshalb erforderlich, die genaue Mutationsrate anhand von reinem Basaliomgewebe aus histologischen Schnitten zu ermitteln und dabei sämtliche kodierenden Exons miteinzubeziehen.

Durch die bisher gewonnenen Daten wird jedoch klar, daß Mutationen des KET/p63-Gens kein häufiges Ereignis in der Tumorgenese sind und KET/p63 wahrscheinlich nicht wie p53 als klassisches Tumorsuppressorgen durch Punktmutationen in seiner Funktion gestört wird und damit zur Entstehung von Tumoren beiträgt. Allerdings wird nicht ausgeschlossen, daß es nicht auf anderem Wege eine Rolle in der Carcinogenese einnimmt, zum Beispiel durch Bildung von Heterooligomeren zwischen den dominant-negativen Np63-Isoformen und anderen p63-Isoformen oder p73 [Sunahara et al. 1999]. So wurde unter anderem auch gezeigt, daß in Plattenepithelkarzinomen der Haut die Expression und Verteilung der Np63-Isoform in Abhängigkeit vom Entdifferenzierungsgrad des Tumors variiert. Je weniger differenziert der Tumor ist, desto stärker und ungeordneter wird Np63 exprimiert [Parsa et

al. 1999]. Dies zeigt wiederum die Wichtigkeit der Spleißvariantenanalyse in Tumorgewebe, die nur auf RNA-Ebene durchführbar ist.

Auf der anderen Seite wird die Möglichkeit diskutiert, daß aufgrund der gleichen Fähigkeit einiger Spleißvarianten von KET/p63 und p73 Apoptose zu induzieren, diese im Falle eines p53-Funktionsverlustes quasi als Reserve dessen Funktion übernehmen könnten [Osada et al. 1998].

Untersuchungen, ob die Tumorzellen mit KET/p63-Mutationen immer noch transaktivierende Fähigkeiten gegenüber p53-Promotoren besitzen, ergaben für zwei der untersuchten Promotoren (MDM2 und BAX) ein positives Ergebnis mit erhaltener Transaktivierung durch die beiden untersuchten Mutationen Ala148Pro und Gln31His im Gegensatz zu dem p21/WAF1 Promoter, der durch eine der beiden Mutationen, die Ala148Pro-Mutation nicht transaktiviert wurde [Kato et al. 1999]. Das zeigt, daß nicht jede der gefundenen KET/p63-Mutation trotz Position in der DNA-Bindungsdomäne typischerweise die Funktion von KET/p63 einschränkt wie es wohl die Mehrzahl der p53-Mutationen in bezug auf die Funktion von p53 tun.

### **4.3. Mögliche Funktionen von KET/p63**

Ein wichtiger Gesichtspunkt im Hinblick auf das Verständnis der Funktion von KET/p63 ist seine gewebespezifische Expression. Im Gegensatz zu p53, das ubiquitär exprimiert wird, zeigt KET/p63 eine stärkere Expression in Epithelien, vor allem in der basalen Schicht der Keratinozyten in der Epidermis. Das hat insofern Bedeutung, da diese Zellschicht für die Regeneration der Epidermis verantwortlich ist. Zudem wurde herausgefunden, daß humane Keratinozyten in der Epidermis hauptsächlich die potentiell dominant-negative Isoform N-p63 exprimieren, die keine Fähigkeit zur Induktion von Apoptose besitzt [Yang et al. 1998].

Dem entspricht auch das Ergebnis der Spleißvariantenanalyse in den Basaliomen, die in allen Fällen eine deutlich stärkere Expression des -TA 5'Endes, entsprechend der Np63-Isoform, in dem Tumormaterial im Vergleich zur Expression des +TA 5'Endes, entsprechend der TAp63-Isoform, zeigte.

Genauere Untersuchungen ergaben zudem, daß die KET/p63-Expression Keratinozyten mit hohem proliferativen Potential wie zum Beispiel den Stammzellen vorbehalten ist und Keratinozyten, die in die terminale Differenzierung übergehen, weniger bis gar keine Expression von KET/p63 aufweisen [Parsa et al. 1999]. Dabei wurde in der Zellkultur auch eine Korrelation zwischen der Zellgröße und der KET/p63-Expression gesehen, wobei mit zunehmender Zellgröße als Maß für zunehmende Differenzierung die Expression abnahm.

Das zeigt eine deutliche Korrelation zwischen dem irreversiblen Wachstumsstop mit Beginn der Differenzierung der suprabasalen Keratinozyten und dem Verschwinden der KET/p63-Expression. Durch in situ-Hybridisierung konnte die Lokalisation der p63-mRNA in den Basalzellen der Epidermis und des Haarfollikels detektiert werden (s. auch Abbildung 1.9 der Einleitung). Weiterhin wurde auch in der basalen Schicht der normalen Epidermis eine Inhomogenität in der Expression beobachtet, wobei basale Zellen mit starker Expression, möglicherweise die Stammzellpopulation, in Feldern zusammenlagen und von basalen Zellen mit weniger oder gar keiner Expression unterbrochen wurden [Para et al. 1999].

Die hieraus resultierende Annahme einer Funktion von KET/p63 in bezug auf die Stammzellpopulation in den basalen Keratinozyten der Epidermis wurde eindrücklich bekräftigt durch den weiter unten beschriebenen Phänotyp der p63<sup>-/-</sup>-Maus.

Im April 1999 wurden gleichzeitig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen Studien über p63-Knockout-Mäuse veröffentlicht, die übereinstimmende Ergebnisse zeigten [Mills et al. 1999, Yang et al. 1999]. Darin wurde die essentielle Bedeutung von KET/p63 für die Morphogenese und Differenzierung von Extremitäten, Epidermis und Hautanhangsgebilden verdeutlicht.

Die p63<sup>-/-</sup> Mäuse werden zwar lebend geboren, sterben aber nach wenigen Stunden und zeigen auffällige morphologische Defekte (s. Abbildung 4.1). Sie weisen craniofaziale

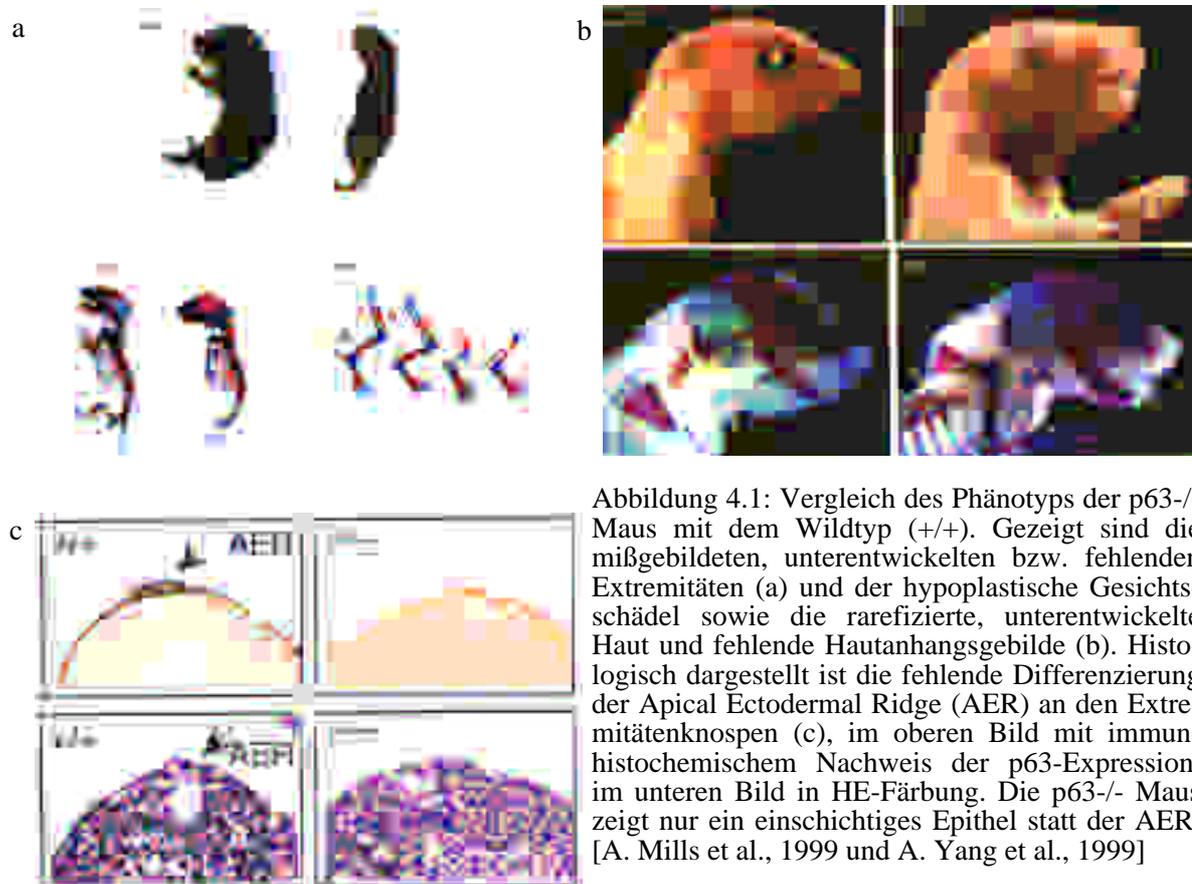


Abbildung 4.1: Vergleich des Phänotyps der p63<sup>-/-</sup>-Maus mit dem Wildtyp (+/+). Gezeigt sind die mißgebildeten, unterentwickelten bzw. fehlenden Extremitäten (a) und der hypoplastische Gesichtschädel sowie die rarefizierte, unterentwickelte Haut und fehlende Hautanhangsgebilde (b). Histologisch dargestellt ist die fehlende Differenzierung der Apical Ectodermal Ridge (AER) an den Extremitätenknospen (c), im oberen Bild mit immunhistochemischem Nachweis der p63-Expression, im unteren Bild in HE-Färbung. Die p63<sup>-/-</sup> Maus zeigt nur ein einschichtiges Epithel statt der AER. [A. Mills et al., 1999 und A. Yang et al., 1999]

Dysmorphien auf, die vorderen Extremitäten sind mißgebildet und verkürzt und die hinteren Extremitäten fehlen komplett. Weiterhin ist die Entwicklung der Epidermis gestört und zeigt keine Differenzierung zu einem mehrschichtigen verhornten Epithel, sondern bleibt auf einer frühen Entwicklungsstufe mit nur einer Einzellige von Keratinozyten stehen. Nach wenigen Stunden sterben die Mäuse durch Dehydratation aufgrund einer abnorm hohen Permeabilität dieser mißgebildeten, dysfunktionalen Haut und durch mütterliche Vernachlässigung.

Zusätzlich fehlen jegliche Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Brust-, Speichel-, Talg-, Tränendrüsen, Schnurrhaare und Zähne. Auch die Epithelien auf der Zunge, in Ösophagus, proximalem Magen, Blase, Vagina und Cervix zeigen eine fehlende Ausdifferenzierung zu mehrschichtigem Platten- bzw. Übergangsepithel. Stattdessen werden ektopes Flimmerepithel oder kubische Zellen gefunden, von denen angenommen wird, daß sie entweder kompensatorisch einwandern oder durch Metaplasie entstehen. All diesen mehrschichtigen Plattenepithelien ist gemein, daß sie normalerweise starke p63-Expression in ihrer Basalzellschicht einschließlich der Stammzellen aufweisen. Daraus wird eine starke Korrelation zwischen der p63-Expression und seiner Bedeutung für die normale Entwicklung eines mehrschichtigen Plattenepithels deutlich. Im Gegensatz dazu erscheint das intestinale Epithel, das normalerweise keine p63-Expression zeigt, völlig normal entwickelt.

Genauere Analysen der defekten Epidermis von p63<sup>-/-</sup> Mäusen in bezug auf die Expression von Differenzierungsmarkern ergaben, daß zwar Marker für die terminale Differenzierung wie Loricrin, Filaggrin und Involucrin durch die rudimentäre Epidermis exprimiert werden, aber keine Expression des Stammzellmarkers Keratin 5 stattfindet. Dieser Marker ist charakteristisch für die Stammzellschicht von mehrschichtigem Plattenepithel und wird normalerweise noch vor der Entwicklung mehrerer Schichten durch das primitive Ektoderm exprimiert. Das zeigt, daß die epidermalen Zellen in p63<sup>-/-</sup> Mäusen zwar normale terminale Differenzierung aufweisen, aber keine Stammzellpopulation für die notwendige ständige Regeneration existiert. Weiterhin ist dadurch zu vermuten, daß die Funktion von p63 mit der Erhaltung dieser Stammzellschicht verbunden sein muß und die epithelialen Defekte in den p63<sup>-/-</sup> Mäusen also aus dem Verlust der regenerativen Stammzellpopulation resultieren.

Bei Betrachtung der weiteren morphologischen Defekte der p63<sup>-/-</sup> Mäuse fällt auf, daß sämtliche unterentwickelten und mißgebildeten Strukturen ektodermalen Ursprungs sind. In gesunden Mäusen zeigen p63-Expressionsanalysen normalerweise eine starke Expression in genau diesen ektodermalen Strukturen und in der basalen Stammzellschicht vieler epithelialer Gewebearten wie Epidermis, Cervix, Urogenitaltrakt, Prostata und Mamma. In Mausembryos zeigt sich die Expression vor allem in den Extremitätenknospen, in den Kiemenbögen und in epidermalen Anhangsgebilden. Die Bedeutung von p63 für die Entwicklung dieser Strukturen wird durch das komplette Fehlen der Hautanhangsgebilde bzw. die nur rudimentäre Anlage

der Extremitäten, des Gesichtschädels und der genannten Epithelien sehr deutlich.

Defekte in der Morphogenese der Extremitäten werden in den p63<sup>-/-</sup>-Embryonen schon am 9. bis 12. Tag beobachtet, während einer Phase, in der die Ausknospung der Extremitäten von ektodermal-mesenchymalen Interaktionen und Signalen abhängt, die vor allem von einem spezialisierten mehrschichtigen ektodermalen Gewebe, der apical ectodermal ridge" (AER), ausgehen. Auch dieses spezialisierte Gewebe, das seinen Ursprung vom primitiven Ektoderm durch Wachstum und Differenzierung nimmt und seinerseits essentiell für das Wachstum und die Differenzierung des darunter liegenden Mesenchyms ist, zeigt normalerweise eine starke p63-Expression.

In p63<sup>-/-</sup> Mäusen ist die AER nicht nachweisbar und stattdessen entsprechend dem Befund bei der Epidermis nur ein rudimentäres einschichtiges Epithel vorhanden, sodaß auch hier wieder eine potentielle Funktion von p63 in der Entwicklung und Erhaltung der Struktur und Funktion der AER zu vermuten ist. Gleichzeitig sind die Defekte in der Morphogenese der Extremitäten auf die fehlende Entwicklung der AER aus dem Ektoderm zurückzuführen.

Zusammenfassend fällt auf, daß sowohl die Epidermis als auch andere in den p63<sup>-/-</sup> Mäusen veränderten Gewebe sowie die AER alle vom Ektoderm abstammen und normalerweise mehrschichtiges Epithel bilden. Dabei ist für die kontinuierliche, regenerative Proliferation dieser Epithelien vor allem die Stammzellpopulation in der basalen Schicht essentiell, aus der durch asymmetrische Teilung sowohl weitere Stammzellen als auch sich weiter differenzierende Zellen hervorgehen. Die letzteren verlieren zunehmend die Fähigkeit der Proliferation zugunsten der Ausdifferenzierung.

Die Expression von p63 ist normalerweise besonders stark in der basalen Schicht dieser Epithelien, also vermutlich in der Stammzellpopulation, und nimmt mit zunehmender Ausdifferenzierung drastisch ab. Aufgrund dieser Tatsache und auch anhand der oben genannten Ergebnisse wird eine Funktion von p63 in der Erhaltung der Fähigkeit dieser Stammzellpopulation zur Selbsterneuerung sehr wahrscheinlich (s. Abbildung 4.2). Durch

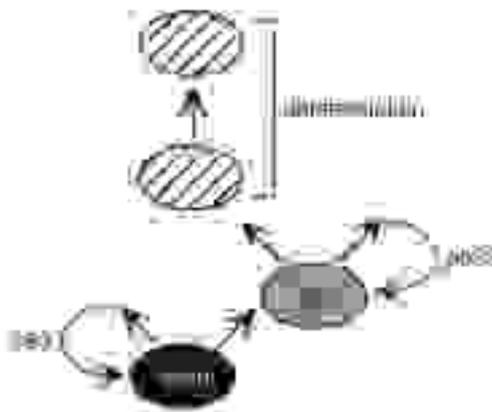


Abbildung 4.2: Schema zur Funktion von p63 in der Erhaltung der Fähigkeit proliferierender epithelialer Stammzellen (stem) zur Selbsterneuerung während der asymmetrischen Teilung in weitere Stammzellen und transient amplifizierende Zellen (TAC). Diese haben vermutlich auch limitierte Fähigkeit zur Regeneration, gehen jedoch in die terminale Differenzierung über. [A. Yang et al., 1999]

welche Mechanismen p63 hierbei wirkt und inwiefern ektodermal-mesenchymale Interaktionen dabei involviert sind, ist noch unklar und wird wohl Fragestellung zukünftiger Studien sein.

Bemerkenswert ist jedoch die essentielle Bedeutung von p63 sowohl für die Morphogenese der Epidermis als auch für die Entwicklung der Extremitäten. Damit unterscheidet es sich grundlegend von seinem verwandten Gen p53, dem im Gegensatz dazu keine Bedeutung in der Entwicklung und Differenzierung von Gewebe zukommt, wie an den morphologisch unauffälligen p53<sup>-/-</sup> Mäusen zu sehen ist. Diese zeigen zwar eine auffällige Neigung zur Entwicklung multipler Tumoren, unterscheiden sich aber morphologisch nicht vom Wildtyp.

Ob die p63<sup>-/-</sup> Mäuse eine entsprechende Neigung zur Tumorentwicklung besitzen, ist nicht zu sagen, da sie kurz nach der Geburt sterben. Daher ist auch, trotz der wichtigen Funktion von p63 in bezug auf die Entwicklung und Differenzierung der Epidermis, anhand der p63<sup>-/-</sup> Mäuse kein weiterer Aufschluß über eine potentielle Funktion als Tumorsuppressorgen speziell im Hinblick auf Tumoren der Haut möglich. Andererseits ist zu erwähnen, daß auch p73<sup>-/-</sup> Mäuse keine erhöhte Neigung zur Entwicklung von Tumoren besitzen, sondern ebenfalls einen charakteristischen Phänotyp zeigen. Dieser manifestiert sich unter anderem mit Störungen in der Entwicklung von Strukturen des Zentralnervensystems, in der Homöostasefunktion des Gastrointestinaltraktes sowie des Ventrikelsystems [Yang et al. 2000].

Einen weiteren Hinweis auf die mögliche Funktion von KET/p63 gaben verschiedene Studien über genetische Erkrankungen beim Menschen, die mit Mutationen des KET/p63-Gens in Verbindung gebracht wurden [Celli et al. 1999, van Bokhoven et al. 1999, Bamshad et al. 2000, Ianakiev et al. 2000, McGrath et al. 2001].

Dabei handelt es sich um autosomal-dominante Erbkrankheiten, die unter anderem mit Dysplasie der Extremitäten und weiterer Strukturen ektodermalen Ursprungs einhergehen und sich in Teilsymptomen überschneiden. Alle dieser Erkrankungen weisen jedoch auch einzelne charakteristische individuelle Defekte auf und unterscheiden sich in dem Grad der Expression klinischer Symptome. Zu nennen wären das Limb Mammary Syndrome (LMS), das Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Cleft lip/palate (EEC) Syndrome, Split-Hand/Split-foot Malformation (SHFM), das Acro-Dermato-Ungual-Lacrimar-Tooth (ADULT) Syndrome und das Lacrimo-Auricular-Dental-Digital (LADD) Syndrome. Da bei allen diesen Syndromen genetische Defekte des gleichen Genlokus, nämlich 3q27 zu finden sind und das EEC-Syndrome und SHFM erwiesenermaßen durch Mutationen im p63-Gen gekennzeichnet sind [Celli et al. 1999, Ianakiev et al. 2000], ist davon auszugehen, daß möglicherweise dieses Gen eine wichtige Rolle für die Entstehung aller dieser Erkrankungen spielt. Auf die zwei erstgenannten Syndrome soll im weiteren genauer eingegangen werden.

Im Jahr 1999 wurde ein neu entdecktes Syndrom mit dem Namen **Limb Mammary Syndrome (LMS)** beschrieben, dessen genetischer Defekt auf Chromosom 3q27 lokalisiert wurde [van Bokhoven et al. 1999], genau der Region, in der das KET/p63 Gen liegt. Charakterisiert wird dieses Syndrom, das in einer großen holländischen Familie mit 29 lebenden betroffenen Individuen beobachtet wurde, vor allem durch schwerwiegende Hand- und Fußanomalien und Hypo- oder Aplasie der Brustdrüse einschließlich der Mamille. Weniger regelmäßig zu finden sind eine Atresie der Milchdrüsengänge, Nageldysplasie, Hypohidrosis, Hypodontie und Gaumenspalten. Weiterhin scheint eine unterschiedliche Penetranz mit extremer Variabilität der klinischen Symptomatik typisch zu sein. So ist bei einigen Individuen lediglich Athelie festzustellen im Gegensatz zu schwersten Hand- und Fußanomalien einschließlich der anderen genannten Fehlbildungen.

Als Differentialdiagnose kommen zwei andere Syndrome in betracht: das **Ulnar Mammary Syndrome (UMS)**, dessen Fehlbildungen der Extremitäten sich jedoch unterscheiden, und vor allem das **Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia, and Clefting Syndrome (EEC)**, bei dem Haar- und Hautanomalien im Vordergrund stehen und Lippenspalten auftreten. Trotz Überschneidungen der klinischen Symptomatik mit diesen anderen Syndromen gilt die oben genannte Kombination von Symptomen als bisher unbeschrieben und auch der Genlokus wurde bis dahin nicht im Rahmen von genetischen Fehlbildungssyndromen der Extremitäten oder der Brustdrüse beschrieben.

Da zu dem Zeitpunkt der Verfassung dieser Studie der Genlokus des menschlichen p63 Gens noch nicht veröffentlicht war, wurde noch keine Verbindung zu diesem Gen gesehen. Eine spätere Studie fand heraus, daß das **Acro-Dermato-Ungual-Lacrima-Tooth (ADULT)** Syndrome genau an dem gleichen Genlokus zu finden ist und mit dem LMS auf dem gleichen Allel liegt.

Kurze Zeit später folgte eine Studie über p63-Mutationen im Rahmen des schon genannten **EEC-Syndroms**. Bei diesem Syndrom handelt es sich um ein autosomal dominant vererbtes Leiden, das aus einer Kombination von **Ektrodaktylie** (auch als Spalthand und/oder fuß bekannt), **Ektodermaldysplasie** (einhergehend mit zarter trockener Haut, spärlichem dünnen Haar, Talgdrüsendysplasie, Milchdrüsengangsobstruktion, Mikro- bis Anodontie und Nageldystrophie) und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (engl.: Clefting) besteht. Weitere Symptome können sein: Milchdrüsengang-Anomalien, Mißbildungen des Urogenitaltraktes, faciale Dysmorphien, Schalleitungsschwerhörigkeit, chronische Infektionen des Respirationstraktes und Entwicklungsverzögerung. Auch bei diesem Syndrom ist durch unterschiedliche Penetranz die Ausprägung der klinischen Symptomatik sehr variabel (s. Abbildung 4.3).

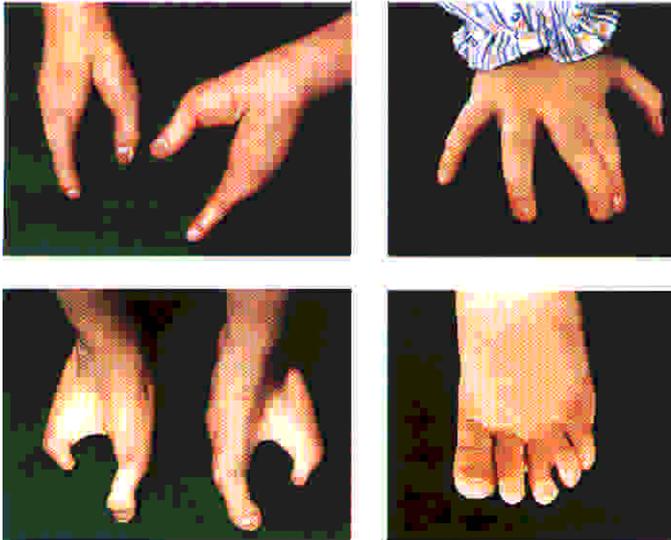


Abbildung 4.3: Klinische Ausprägung bei Patienten mit EEC-Syndrom und Mutationen des p63-Gens. Gezeigt sind links Spalthand/fuß als Extremvariante und rechts Syndaktilie der Finger/Zehen als weniger ausgeprägte Symptomatik (rechts). [J. Celli et al., 1999]

Aufgrund der Überschneidungen des Limb Mammary Syndroms mit dem EEC Syndrom wurde nach Kolo-kalisation des genetischen Defektes im EEC Syndrom auf dem Gen 3q27 gesucht und dies bei fünf unterschiedlichen Familien mit EEC Syndrom auch festgestellt, so daß die Vermutung nahe liegt, daß das gleiche Gen bei beiden Syndromen eine Rolle spielt. Daraufhin wurde eine Mutationsanalyse von Exon 5 bis 14 des p63 Gens in der DNA von 25 nicht verwandten EEC Syndrom-Patienten und von einem Patienten der LMS-Familie durchgeführt.

Diese ergab neun heterozygote Nukleotidaustausche bei Patienten mit EEC Syndrom, von denen acht missense-Mutationen darstellen und zu Aminosäureaustauschen führen im Gegensatz zu einer frameshift-Mutation, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führt. Auffällig ist, daß alle missense-Mutationen in der hochkonservierten DNA-Bindungsdomäne von p63 liegen und die DNA-Bindungs-kapazität sowie die Fähigkeit zur Transaktivierung beeinträchtigen, entweder durch Austausch direkt DNA-bindender Aminosäuren oder durch Konformationsänderung. Zudem stimmen alle Mutationen mit in den sogenannten hotspots von p53 häufig gefundenen Mutationen in Tumoren überein. Weiterhin konnte bewiesen werden, daß in mindestens fünf Familien die jeweilige Mutation de novo entstanden war und daß in 100 Kontroll-Chromosomen keine der Mutationen vorkam. Als Grund für das Fehlen von Mutationen in den restlichen Familien mit EEC Syndrom und in der Familie mit LMS wurde vermutet, daß Mutationen eventuell in den nicht analysierten Exons 1 bis 4 und 15 zu finden seien.

Anhand der oben genannten Ergebnisse scheint es jedoch gesichert zu sein, daß Mutationen des p63 Gens ein wichtiger Faktor für die Entstehung des EEC Syndroms sind. Unterstützt wird diese These noch zusätzlich durch die auffällige Ähnlichkeit der Symptome des EEC

Syndroms mit dem Phänotyp der p63<sup>-/-</sup> Maus. Dabei findet man bei EEC-Patienten eine entsprechende generalisierte ektodermale Dysplasie mit den oben angeführten Symptomen in bezug auf Haut, Haare, Zähne und Hautanhangsgebilde, entsprechende Anomalien der Extremitäten von Syndaktylie bis hin zu Spalthand und fuß, und auch die fazialen Dysmorphien sind durchaus vergleichbar. So entsprechen die Lippen-Kiefer-Gaumenspalten beim Menschen der hypoplastischen Mandibula und Maxilla einschließlich des hypoplastischen Gaumens der Mäuse.

Bei der Frage, wie die Mutationen sich auf die Funktion von p63 auswirken, ist um so interessanter, daß es sich um heterozygote Mutationen handelt, die sich in dominanter Weise durchsetzen und zu einer Vielfalt von unterschiedlichen Phänotypen mit sehr variabler klinischer Symptomatik führen. Berücksichtigt werden muß auch die Tatsache, daß sich die Mutationen auf die verschiedenen Spleißvarianten von p63 unterschiedlich auswirken. So können Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne die TAp63 -Isoformen in ihrer Fähigkeit zur Transaktivierung inaktivieren, wohingegen gleichzeitig die dominant-negative Eigenschaft einiger Np63-Isoformen gegenüber transaktivierenden Isoformen aufgehoben wird. Daraus kann sowohl eine Abnahme als auch eine Zunahme der Transaktivierungsaktivität resultieren. Besonders durch die frameshift-Mutation, die im C-Terminus in der SAM-Domäne lokalisiert ist, wird für die TAp63 -Isoform ein *gain of function* durch Zunahme der Transaktivierungsaktivität festgestellt. Dabei ist interessant, daß die SAM-Domäne normalerweise die Transaktivierungsaktivität inhibiert und durch die frameshift-Mutation diese inhibierende Funktion verloren geht. Hingegen wird durch einige mutierte Np63-Isoformen, deren dominant-negative Fähigkeit erhalten bleibt, durch Bildung von Heterooligomeren die Transaktivierungsaktivität anderer Wildtyp-Isoformen herabgesetzt. Auch hier wird wiederum die Wichtigkeit der Analyse der verschiedenen Spleißvarianten von KET/p63 in bezug auf ihre Funktion deutlich.

Insgesamt wird dabei deutlich, daß die Symptomatik des EEC Syndroms nicht ausschließlich durch eine aufgehobene Transaktivierungsaktivität des p63 Gens hervorgerufen wird, sondern sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der Transaktivierungsaktivität eine Rolle spielen müssen. Durch die vielen komplexen Möglichkeiten der Interaktion zwischen den verschiedenen mutierten und nicht-mutierten p63-Isoformen könnte auch die sehr variable Ausprägung der klinischen Symptomatik zustande kommen.

An dieser Stelle ist es interessant zu erwähnen, daß erst kürzlich ein weiteres autosomal-dominantes Erbleiden mit Namen Hay-Wells Syndrome oder Ankyloblepharon-Ectodermal dysplasia-Clefting (AEC), das klinische Überschneidungen mit dem EEC-, LMS- und dem ADULT-Syndrom zeigt, eindeutig auf Missense-Mutationen im Bereich der SAM-Domäne des p63-Gens zurückgeführt wurde [McGrath et al. 2001]. Da dieser Bereich des p63-Gens

nur in der  $\Delta$ -Isoform vorkommt und für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist, kommt den Mutationen in diesem Bereich eine grundsätzlich andere Bedeutung als denen im Bereich der DNA-Bindungsdomäne zu, was sich im Unterschied des Phänotyps zwischen EEC und AEC widerspiegelt.

Trotz der auffälligen Übereinstimmung der gefundenen p63-Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne mit den Mutations-hotspots im p53-Gen, läßt sich bei EEC-Patienten keine erhöhte Rate an Malignomen feststellen. Auch durch diese Tatsache wird wieder eine Rolle von p63 als Tumorsuppressorgen unwahrscheinlich.

#### 4.4. Fazit

Zusammenfassend stellt sich anhand der oben genannten Studien die Funktion von KET/p63 als relativ spezifisch für die Entwicklung und Differenzierung von Plattenepithelien und für die Morphogenese aller Strukturen dar, die vom Ektoderm ausgehen wie Extremitäten, Gesichtsschädel und Hautanhangsgebilde. Dabei spielt die Erhaltung der jeweiligen Stammzellpopulation eine besondere Rolle, für die KET/p63 essentiell zu sein scheint. Ohne diese Stammzellschicht ist eine Entwicklung bzw. Regeneration der jeweiligen Struktur nicht möglich, so daß es zu einer fehlenden oder verminderten Entwicklung dieser Strukturen kommt. Das läßt sich an den verkürzten und mißgebildeten Gliedmaßen und der unterentwickelten dysfunktionalen Haut der p63<sup>-/-</sup> Mäuse gut sehen.

Demgegenüber scheint eine Funktion als klassisches Tumorsuppressorgen wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, wie man an der geringen Mutationsrate von KET/p63 in verschiedenen Tumoren sehen kann. Ob Tumoren der Haut, speziell mit Ursprung in der für KET/p63 spezifischen Basalzellschicht, dabei eine Ausnahme bilden und mit einer höheren Mutationsrate einhergehen, konnte hier nicht bewiesen werden. Allerdings ist das Ergebnis dieser Studie aufgrund des möglicherweise inhomogenen Ausgangsmaterials nicht eindeutig, so daß weitere Untersuchungen in diesem Bereich sinnvoll wären.

Durch die zwischenzeitlich erschienene Literatur über KET/p63 ist jedoch die nach der Entdeckung der zwei p53-verwandten Gene ursprünglich vermutete Übereinstimmung in bezug auf die Funktion widerlegt. Trotz der strukturellen Homologie, die gerade in der für die Funktion besonders wichtigen DNA-Bindungsdomäne mit 75% sehr hoch ist, scheinen weder p73 noch KET/p63 eine ähnlich wichtige Funktion wie p53 hinsichtlich der Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose und damit auch in der Entstehung von Tumoren zu spielen [Nomoto et al. 1998, Osada et al. 1998, Takahashi et al. 1998, Hagiwara et al. 1999, Shishikura et al. 1999, Sunahara et al. 1999, Tani et al. 1999, Yang et al. 2000]. Vielmehr hat sich für KET/p63 die oben genannte essentielle Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung

spezifischer Strukturen mit ektodermaler Abstammung herausgestellt. Daraus wird klar, daß KET/p63 trotz der Verwandtschaft und strukturellen Homologie zu p53 eine ganz eigenständige und divergierende Funktion hat. Um diese noch genauer zu charakterisieren und zu spezifizieren, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Nach der Entdeckung von p73 und KET/p63 als verwandte Gene des Tumorsuppressorgens p53 im Jahr 1997 stellte sich unter anderem aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit die Frage, ob auch diese beiden Gene eine Funktion als Tumorsuppressorgen haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die potentielle Funktion von KET/p63 als Tumorsuppressorgen anhand einer Mutationsanalyse in Tumorgewebe untersucht. Da sich für dieses Protein eine auffällige Gewebespezifität mit Anreicherung vor allem in den basalen Keratinozyten der Epidermis herausstellte, wurden für die Mutationsanalyse Basaliome verwendet. Aufgrund der Konzentration der sogenannten Mutations-hotspots von p53 in der DNA-Bindungsdomäne, beschränkte sich die Suche nach Mutationen auf diesen Bereich des KET/p63-Gens.

Der experimentelle Teil der Arbeit gliederte sich in folgende Schritte: Nach gleichzeitiger Isolierung von RNA und DNA aus 30 Basaliomen erfolgte in der RT-PCR die Amplifizierung der DNA-Bindungsdomäne aus der RNA. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte folgte die Sequenzierung und eine Auswertung der Sequenzen per Computer sowie per Hand. Zum Vergleich wurde von jedem Basaliom auch die DNA-Bindungsdomäne von p53 amplifiziert, sequenziert und auf Punktmutationen hin untersucht. Zudem erfolgte durch Amplifikation der beiden Splicevarianten +TA und -TA in der semiquantitativen PCR eine Analyse der Expression dieser verschiedenen Isoformen in Basaliomgewebe, welche eine deutlich stärkere Expression der -TA Splicevariante ohne die Transaktivierungsdomäne ergab.

Insgesamt wurden bei der Mutationsanalyse in zwei Basaliomen einzelne Basenaustausche innerhalb der DNA-Bindungsdomäne von KET/p63 gefunden, die beide in Exon 6 liegen. In beiden Fällen handelt es sich um eine C->T Transition. Davon stellt sich der eine Basenaustausch als Polymorphismus dar, der auf Proteinebene nicht zu einem Aminosäurewechsel führt (Leucin<sup>287</sup>Leucin) und bei der Kontroll-PCR mit der DNA von 50 Probanden in der DNA von 3 dieser Probanden zu finden war. Die andere C->T Transition führt zu einem Aminosäurewechsel (Prolin<sup>293</sup>Leucin). Die Tatsache, daß dieser Basenaustausch zudem in keiner Kontroll-PCR mit der DNA der 50 Probanden zu finden war, läßt auf eine echte Mutation schließen. Im Vergleich dazu ergab die Mutationsanalyse für p53 3 Mutationen und 1 Polymorphismus in den 30 Basaliomen.

Die hier gefundene Mutationsrate von KET/p63 in Basaliomen ist mit 1 Mutation in 30 Basaliomen so gering, daß eine Funktion dieses Gens als Tumorsuppressorgen unwahrscheinlich wird. Weiterhin deckt sich die in dieser Arbeit festgestellte niedrige Mutationshäufigkeit mit den Resultaten von KET/p63-Untersuchungen in weiteren Tumorarten, was indirekt darauf hindeutet, daß diesem Gen eine ganz andere Funktion als seinem bekannten Vorgänger zukommt.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ananthaswamy HN, Pierceall WE (1990) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol* 52:1119-1136
- Arrowsmith CH (1999) Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ* 6:1169-1173
- Augustin M, Bamberger C, Paul D, Schmale H (1998) Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to Chromosome 3q27 and its murine homolog *Ket* to mouse Chromosome 16. *Mamm Genome* 9:899-902
- Bamshad M, Jorde LB, Carey JC (2000) Getting a LEAD on EEC. *Am J Med Genet* 90:183-184
- Barth J, Richter G, Altmeyer P (1991) *Dermatologie*. Johann Ambrosius Barth, Leipzig Heidelberg, Edition Zahnheilkunde
- Bokhoven H van, Jung M, Smits APT, van Beersum S, Rüschenhoff F, van Steensel M, Veenstra M, Tuerlings JHAM, Mariman ECM, Brunner HG, Wienker TF, Reis A, Ropers HH, Hamel BCJ (1999) Limb Mammary Syndrome: A New Genetic Disorder with Mammary Hypoplasia, Ectrodactyly, and Other Hand/Foot Anomalies Maps to Human Chromosome 3q27. *Am J Hum Genet* 64:538-546
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J Cell Biol* 106:761-771
- Brash DE et al. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 88:10124-10128
- Campbell C, Quinn Ag, Ro Y-S, Angus B, Rees JL (1993) p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J Invest Dermatol* 100:746-748
- Caron de Fromental C, Soussi T (1992) p53 mutation database. *Gene, Chromosome and Cancer* 4:1-15, erweiterte Version von April 1999
- Carroll AG, Voeller HJ, Sugars L, Gelmann EP (1993) p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* 23:123-134

- Celli J, Duijf P, Hamel BCJ, Bamshad M, Kramer B, Smits APT, Newbury-Ecob R, Hennekam RCM, Van Buggenhout G, Van Haeringen A, Woods CG, Van Essen AJ, de Waal R, Vriend G, Haber DA, Yang A, MC Keon F, Brunner HG, Van Bokhoven H (1999) Heterozygous Germline Mutations in the p53 Homolog p63 Are the Cause of EEC Syndrome. *Cell* 99:143-153
- Chen X (1999) The p53 family: same response, different signals? *Mol Med Today* 5:387-392
- Chi SG, White RWD, Meyers FJ, Siders DB, Lee F, Gumerlock PH (1994) p53 in prostate cancer frequent expressed transition mutations. *J Nat Cancer Inst* 86:926-933
- Chi SW, Ayed A, Arrowsmith CH (1999) Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J* 18, No 16:4438-4445
- Chorzelski TP, Olszewska M, Jarzabek-Chorzelska M, Jablonska S (1998) Is chronic ulcerative stomatitis an entity? Clinical and immunological findings in 18 cases. *Eur J Dermatol* 8:261-265
- Davison TS, Vagner C, Kaghad M, Ayed A, Caput D, Arrowsmith CH (1999) p73 and p63 Are Homotetramers Capable of Weak Heterotypic Interactions with each Other but Not with p53. *J Biol Chem* 274, No 26:18709-18714
- D'Errico M, Calcagnile AS, Corona R, Fucci M, Annessi G, Baliva G, Tosti ME, Pasquini P, Dogliotti E (1997) p53 Mutations and Chromosome Instability in Basal Cell Carcinomas Developed at an Early or Late Age. *Cancer Res* 57:747-752
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, Mc Arthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A, (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356:215-221
- Fagin IA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP (1993) High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 91:179-184
- Fan H, Oro AE, Scott MP, Khavari PA (1997) Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. *Nature medicine* 3, No7:788-792
- Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855-4878
- Grossman D, Leffell DJ (1997) The Molecular Basis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Arch Dermatol* 133:1263-1270

- Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K, Harris CC (1999) Mutational Analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET Gene in Human Cancer Cell Lines Using Intronic Primers. *Cancer Res* 59:4165-4169
- Hedrum A, Ponten F, Ren Z, Lundeberg J, Ponten J, Uhlen M (1994) Sequence-based analysis of the human p53 gene based on microdissection of tumor biopsy samples. *Biotech* 17:118
- Herz E. (1995) Maligne Tumoren und Paraneoplasien. In: Jung EG (Hrsg) *Dermatologie*, 3.Aufl. Hippokrates Verlag, Stuttgart, S 215-253
- Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D (2000) *AIS* is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *PNAS* Vol. 97: 5462-5467
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 Mutations in Human Cancers. *Science* 253:49-53
- Ianakiev P, Kilpatrick MW, Toudjarska I, Basel D, Beighton P, Tsipouras P (2000) Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27. *Am J Hum Genet* 67:59-66
- Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y (1999) p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 6:1154-1161
- Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM (1991) Wildtype p53 Suppresses Growth of Human Prostate Cancer Cells Containing Mutant p53 Allels. *Cancer Res* 51:4716-4720
- Jost CA, Marin MC, Kaelin Jr. WG (1997) p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389:191-194
- Jung EG (1995) *Dermatologie*. 3. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart
- Kaelin Jr. WG (1998) Another p53 Doppelgänger? *Science* 281:57-58
- Kaelin Jr. WG (1999) The p53 gene family. *Oncogene* 18:7701-7705
- Kaelin Jr. WG (1999) The Emerging p53 Gene Family. *J Nat Cancer Institute* 91, No. 7:594-598
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90:809-819

- Kato S, Shimada A, Osada M, Ikawa S, Obinata M, Nakagawara A, Kanamaru R, Ishioka C (1999) Effects of p51/p63 Missense Mutations on Transcriptional Activities of p53 Downstream Gene Promoters. *Cancer Res* 59:5908-5911
- Knudson Jr. AG (1985) Heredity cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res* 45:1437-1443
- Köhler D, Stadler R (1997) Klinik und Histologie des Basalioms. In: Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W (Hrsg) *Dermatologische Onkologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 135-149
- Kropveld A, Rozemuller EH, Leppers FGJ, Scheidel KC, de Weger RA, Koole R, Hordijk GJ, Slootweg PJ, Tilanus MGJ (1999) Sequencing Analysis of RNA and DNA of Exons 1 through 11 Shows p53 Gene Alterations To Be Present in Almost 100% of Head and Neck Squamous Cell Cancers. *Lab Invest* 79, No 3:347-353
- Kubo Y, Urano Y, Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuhara K, Arase S, Itakura M (1994) p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol* 102:440-444
- Lane DP (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16
- Lee LA, Prater C, Walsh P, Su LJ, Targoff IN, Chorzelski TP, Jablonska S (1998) The KET protein: a novel keratinocyte protein with homology to the p53 tumor suppressor is the target of autoantibodies in patients with a specific subset of chronic ulcerative stomatitis. Abstract at Tricontinental Meeting in Cologne
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig N, Rogan EM, Harris CC (1993) p53 Mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14, No.5:833-839
- Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Melino G, Wang JYJ (1999) Structure, function and regulation of p63 and p73. *Cell Death Differ* 6:1146-1153
- Lohrum MAE, Vousden KH (1999) Regulation and activation of p53 and its family members. *Cell Death Differ* 6:1162-1168
- Lübbe J, Kleihues P, Burg G (1994) Das Tumorsuppressor-Gen p53 und seine Bedeutung für die Dermatologie. *Hautarzt* 45:741-745
- Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H (1996) Characterization of p53 gene mutations in basal cell carcinomas: Comparison between sun-exposed and less-sun-exposed skin areas. *Int J Cancer* 65:778-780

- McGrath JA, Duijf PHG, Doetsch V, Irvine AD, de Waal R, Vanmolkot KRJ, Wessagowit V, Kelly A, Atherton DJ, Griffiths WAD, Orlow SJ, van Haeringen A, Ausems MGEM, Yang A, McKeon F, Bamshad MA, Brunner HG, Hamel BCJ, van Bokhoven H (2001) Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum Mol Genet* 10, No 3:221-229
- Moles JP, Moyret C, Guillot B, Jeanteur P, Guilhou JJ, Theilllet C, Basset-Seguin N (1993) p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene* 8:583-588
- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398:708-713
- Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi T, Takahashi To, Takahashi Ta (1998) Search for Mutations and Examination of Allelic Expression Imbalance of the p73 Gene at 1p36.33 in Human Lung Cancers. *Cancer Res* 58:1380-1383
- Nishi H, Isaka K, Sagawa Y, Usuda S, Fujito A, Ito H, Senoo M, Kato H, Takayama M (1999) Mutation and transcription analyses of the p63 gene in cervical carcinoma. *Int J Oncology* 15:1149-1153
- Oren M (1997) Lonely No More: p53 Finds Its Kin in a Tumor Suppressor Haven. *Cell* 90:829-832
- Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S (1998) Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nature Medicine* 4:839-843
- Parsa R, Yang A, Mc Keon F, Green H (1999) Association of p63 with Proliferative Potential in Normal and Neoplastic Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 113:1099-1105
- Petres J, Lohrisch I (1993) *Das Basaliom*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Ponten F (1996) *Growth Characteristics and p53 Alterations in Human Basal Cell Cancer*. Med. Dissertation. Acta Universitatis Upsaliensis.
- Potten CS (1981) Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytology* 69:271-318
- Rady P, Scinicariello F, Wagner Jr. RF, Tyring SK (1992) p53 Mutations in Basal Cell Carcinomas. *Cancer Res* 52:3804-3806
- Schmale H, Bamberger C (1997) A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 15:1363-1367

- Schuster D (1997) Mutations-Detektions-Methoden. In: Mertes G, Schäfer T, Schild TA, Schmidt G, Schuster D, vom Stein J (Hrsg) Automatische genetische Analytik. Wiley-VCH, Weinheim New York Chichester, S 100-109
- Senoo M, Seki N, Ohira M, Sugano S, Watanabe M, Tachibana M, Tanaka T, Shinkai Y, Kato H (1998) A second p53-related protein, p73 L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Comm* 248:603-607
- Sheikh MS, Fornace Jr. AJ (2000) Role of p53 Family Members in Apoptosis. *J Cell Physiol* 182:171-181
- Shimada A, Kato S, Enjo K, Osada M, Ikawa Y, Kohno K, Obinata M, Kanamaru R, Ikawa S, Ishioka C (1999) The Transcriptional Activities of p53 and Its Homologue p51/p63: Similarities and Differences. *Cancer Res* 59:2781-2786
- Shishikura T, Ichimiya S, Ozaki T, Nimura Y, Kageyama H, Nakamura Y, Sakiyama S, Miyauch M, Yamamoto N, Suzuki M, Nakajima N, Nakagawara A (1999) Mutational Analysis Of The p73 Gene In Human Breast Cancers. *Int J Cancer* 84:321-325
- Sunahara M, Shishikura T, Takahashi M, Todo S, Yamamoto N, Kimura H, Kato S, Ishioka C, Ikawa S, Ikawa Y, Nakagawara A (1999) Mutational analysis of p51A/TAp63, a p53 homolog, in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene* 18:3761-3765
- Takahashi H, Ichimiya S, Nimura Y, Watanabe M, Furusato M, Wakui S, Yatani R, Aizawa S, Nakagawara A (1998) Mutation, Allelotyping, and Transcription Analyses of the p73 Gene in Prostatic Carcinoma. *Cancer Res* 58:2076-2077
- Tani M, Shimizu K, Kawahara C, Kohno T, Ishimoto O, Ikawa S, Yokota J (1999) Mutation and expression of the p51 gene in human lung cancer. *Neoplasia* 1:71-79
- Thanos CD, Bowie JU (1999) p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Science* 8:1708-1710
- Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D (1998) A new human p53 homologue. *Nature Medicine* 4: 747-748
- Urano Y, Asano T, Yshimoto K, Iwahana H, Kubo Y, Kato S, Sasaki S, Takeuchi N, Uchida N, Nakanishi H, Arase S, Itakura M (1995) Frequent p53 Accumulation in the Chronically Sun-Exposed Epidermis and Clonal Expansion of p53 Mutant Cells in the Epidermis Adjacent to Basal Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol* 104:928-932
- Wallace-Brodeur RR, Lowe SW (1999) Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 54:64-75

- Weiß J, Hebst RA (1997) Onkogene und Tumorsuppressorgene bei Hauttumoren. In: Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W (Hrsg) Dermatologische Onkologie. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 3-12
- Wie Q, Matanowski GM, Farmer ER, Hedayati MA, Grosman L (1994) DNA repair and susceptibility to basal cell carcinoma.: a case-control study. *Am J Epidemiol* 140:598-607
- Yang A, Khaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998) p63, a p53 Homolog at 3q27-29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Molecular Cell* 2:305-316
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398:714-718
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumors. *Nature* 404:99-103
- Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE, Brash DE (1993) Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4216-4220

## **Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken,  
die am Zustandekommen und Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Schmale  
für die freundliche Überlassung des Themas der Dissertation  
sowie seine hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch  
bei Frau H. Christiansen und C. Bamberger  
für ihre Anleitung und Unterstützung  
bei der Versuchsdurchführung.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Julia Bethge  
Geburtsdatum: 30. Januar 1974  
Geburtsort: Hannover  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Appener Weg 7, 20251 Hamburg

### Schulbildung

1980 - 1984 Grundschole in Hannover  
1984 - 1990 Max Planck Gymnasium in Göttingen  
1990 - 1991 Stipendium von ASSIST (American Secondary Schools for International Students and Teachers) für ein Jahr an der Kimball Union Academy in Newhampshire, USA  
1991 - 1993 Klaus Groth Schule in Neumünster  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Sozialer Dienst

Sept. 1993 freiwilliger sozialer Dienst im Freeman Hospital, Academic  
- März 1994 Cardiology Department, University of Newcastle upon Tyne, UK

### Studium

seit 1994 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg  
März 1996 Physikum (Note: gut)  
März 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)  
Sept. 1997  
- Feb. 1998 Studium an der Universität in Chambéry , Frankreich  
März 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)  
Nov. 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

### Famulaturen

Juli - Aug. 1996 Gynäkologische Praxis in Hannover  
Juli - Aug. 1997 Kardiologie im AK St. Georg in Hamburg  
März - Apr. 1998 Pädiatrie im Universitätsklinikum Göttingen  
Feb. - März 1999 Geburtshilfe am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Juli - Aug. 1999 Dermatologie in der Praxis und Tagesklinik von Prof. Dr. med. V. Steinkraus in Hamburg

### Praktisches Jahr

Aug. - Dez. 2000 Innere Medizin: Klinikum Nord in Hamburg  
Dez. - März 2001 Dermatologie: AK St. Georg in Hamburg  
März - Mai 2001 Chirurgie: AK St. Georg in Hamburg  
Juni - Juli 2001 Chirurgie: Kantonsspital Uri in Altdorf, Schweiz

Hamburg, den 27. November 2001

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegeben Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.