

Abstract der Dissertation

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

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von Julia Bethge , 2001

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 (Leucin²⁸⁷Leucin) 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 (Prolin²⁹³Leucin). 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.