Häufige Punktmutationen im p53 Tumorsuppressorgen im humanen Vulvakarzinom

P.		Speiser
W.		Schmid
K.		Czervenka
U.		Peschke
R.		Zeillinger
E.		Kubista

I. Univers.-Frauenklinik Wien (Stellv. Vorst.: Prof. Dr. E. Kubista)

Dr. P. Speiser, I. Univers.-Klinik, Spitalgasse 23, A-1090 Wien

Das menschliche Genom enthält Gene, welche als hoch konserviert bezeichnet werden, da sie im Rahmen der Evolution keine wesentlichen Veränderungen durchgemacht haben. Die Ursache dafür dürfte ihre überaus große Wichtigkeit für die Regulation von Zellwachstum, -teilung und -differenzierung sein, sodaß der Evolution kaum Spielraum für Veränderungen blieb. Zu dieser Gruppe von Genen werden die sogenannten Protoonkogene und Tumorsuppressorgene gezählt. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, daß Mutationen dieser Gene zur Immortalisierung oder zur Entwicklung eines malignen Phänotyps von Zellen führen. Die Gruppe der Protoonkogene kodieren für Proteine, welche eine zentrale Rolle in der positiven Regulation des Zellwachstums spielen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Eine sehr häufige Art der Mutation, welche Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert, ist das Vorliegen von Genen in mehr als 2 Kopien. Diese Veränderung nennt man Amplifizierung, sie ist häufig mit einer Überexpression vergesellschaftet. Dieses mehr an Protein führt zu einem mehr an Funktion oder mit dem Fachausdruck zu „Gain of Function“, was in der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielt. Der Grad der Amplifizierung und damit der Überexpression bestimmter Gene korreliert in manchen Fällen mit der Malignität des Tumors und damit mit der Prognose des Patienten.

Die Gruppe der Tumorsuppressorgene kodieren für Proteine, welche eine zentrale Rolle in der negativen Regulation des Zellwachstums spielen. Eine häufige Art von Mutationen, welche Tumorsuppressorgene inaktivieren, sind Deletionen bzw. Punktmutationen. Sie werden auch als rezessive Onkogene bezeichnet, da Mutationen eines Alleles nicht ausreichen, um die tumorsuppressive Funktion auszuschalten. Erst wenn beide Allele mutiert vorliegen, kommt es zu einem Verlust an Protein und zu einem Verlust an Funktion oder mit dem Fachausdruck zu „Loss of Function“. Punktmutationen dieser Gene in Keimzellen können weiters die Disposition für maligne Erkrankungen vererben. Das erste Gen für diesen Zusammenhang gezeigt werden konnte ist das Retinoblastomgen 1, welches man in Retinoblastomen, einem familiär gehäuft auftretenden kindlichen malignen Augentumor, mutiert findet.

Das p53 Tumorsuppressorgen kodiert für ein DNA bindendes Kernprotein, welches eine zentrale Rolle in der negativen Regulation von Zellwachstum, -teilung und -differenzierung spielt. Es inhibiert den Zellzyklus in der Phase der DNA-Replikation.

Dieses Tumorsuppressorgen nimmt eine Sonderstellung ein, da Punktmutationen in bestimmten Regionen das Gen zu einem Onkogen aktivieren. Diese Punktmutationen führen zu einer Stabilisierung des ansonsten äußerst kurzlebigen Proteins und damit zu einer Verlängerung seiner HWZ. Über derzeit noch unbekannte Mechanismen wirkt dieses stabilere Protein proliferationsfördernd. Das bedeutet, daß es neben einem „Loss of Function“ zusätzlich noch zu einem „Gain of Function“ kommt.

Punktmutationen dieses Gens zählen zu den häufigsten derzeit bekannten Mutationen in menschlichen Tumoren, mit Bevorzugung von Plattenepithelkarzinomen. Sie dürften zu eher späten Ereignissen in der Tumorentstehung zählen, in den meisten Fällen vor der metastatischen Ausbreitung auftreten und eher aggressive Karzinome auszeichnen. Am häufigsten treten Punktmutationen in manchen Fällen kombiniert mit Deletionen in diesem Gen auf.

HPV und p53

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß humane Papillomaviren sowohl in benignen als auch in malignen Neoplasien der Zervix von Bedeutung sind. So fand man zum Beispiel in Condylomen vorwiegend HPV der Typen 6 und 11 und in bis zu 90 % der Karzinome HPV der Typen

16 und 18. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß das Virusgenom in benignen Zellen zyklisiert, das bedeutet in Ringform vorliegt, während es in Karzinomen linearisiert und in das Genom der Wirtszelle integriert gefunden wird.

HPV Typen, für die eine Assoziation mit malignen Erkrankungen gezeigt werden konnte, besitzen Onkogene, welche für Proteine kodieren, die das p53 Protein binden und einem beschleunigten Abbau zuführen können. So lange die Virus DNA jedoch in zyklischer Form vorliegt, wird ein Protein gebildet, welches die Expression dieses Onkogens unterbindet. Beim Vorgang der Linearisierung bricht die Virus DNA aber nicht an irgendeiner Stelle auf, sondern im Bereich jenes Gens, welches für den Suppressor des Onkogens kodiert. Die Folge ist die Bildung des Onkoproteins, welches das p53 Tumorsuppressorprotein zum Abbau bringt und schließlich den Ausbruch aus der Wachstumskontrolle verursacht.

Dieser Vorgang bietet der Zelle einen klonalen Vorteil im Vergleich zu p53 Punktmutationen. Aus diesem Grund fand man in Zervixkarzinomzelllinien mit HPV Typ 16 und 18 Befund niemals gleichzeitig eine p53 Punktmutation.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals die Häufigkeit von p53 Punktmutationen im Korpus-, Zervix- und Vulvakarzinomen zu untersuchen. Weiters sollte an humanen Tumoren überprüft werden ob sich die in vitro Daten bezüglich des Zusammenhanges von p53 Punktmutationen mit HPV Infektionen im Zervixkarzinom bestätigen lassen und eventuell auch auf das Vulvakarzinom übertragbar sind.

Bis vor kurzem konnten Punktmutationen lediglich durch Sequenzierung und damit nur sehr aufwendig detektiert werden. Das zunehmende Wissen über die Bedeutung von Punktmutationen führte zur Suche nach neuen weniger aufwendigen und schnelleren Methoden. Mit der Entwicklung der Polymerasekettenreaktion war es möglich, den zu untersuchenden Genabschnitt in praktisch unbegrenztem Maß zu vervielfältigen und damit einer besseren Untersuchung zugänglich zu machen.

Für diese Untersuchung kam eine Temperaturgradient-Gelelektrophorese-Analyse von PCR Produkten zur Anwendung. Diese Methode ist hoch sensitiv und erlaubt

eine rasche Untersuchung einer großen Zahl an Tumoren. Weiters macht diese Methode die Untersuchung von DNA-Präparationen aus Formalin-fixiertem Archivmaterial möglich. In unserer Studie beschränkten wir die Untersuchungen auf die am häufigsten mutierten Abschnitte (Exon 5 bis 8) des Gens.

Die untersuchten Tumore (n = 82) umfaßten einerseits benigne Neoplasien, wie zum Beispiel Condylomata acuminata, Uterusmyome und Probeexzisionen aus Metaplasien der Zervix, andererseits Korpus-, Zervix- und Vulvakarzinome. Die benignen Neoplasien zeigten in 90 % Infektionen mit HPV Typ 6 oder 11 jedoch keine Mutationen im p53 Gen. Die Korpuskarzinome waren ihrem histologischen Ursprung nach alle Adenokarzinome und zeigten mit 16 % eine im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen niedrige Frequenz von p53 Mutationen.

Alle untersuchten Zervixkarzinome waren HPV Typ 16 oder 18 positiv und wiesen keine Veränderungen im p53 Gen auf. Dieser Befund unterstützt den in Zelllinien gezeigten Zusammenhang von HPV 16 bzw. 18 Infektionen und p53 Mutationen. Die untersuchten Vulvakarzinome wiesen mit 60% eine überraschend hohe Frequenz von Punktmutation auf. In diesen Tumormustern fand sich in 20 % mehr als eine Mutation, was ebenfalls in der Literatur von keinem anderen Plattenepithelkarzinom gezeigt werden konnte. 91 % der untersuchten Vulvakarzinome waren HPV Typ 6, 11, 16 bzw. 18 positiv, zeigten jedoch ein buntes Bild an Mischinfektionen und keine Beziehung zu den gefundenen Mutationen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Punktmutationen im p53 Gen beim Korpuskarzinom wahrscheinlich keine große Bedeutung haben. Für das Zervixkarzinom konnte der Einfluß von HPV Infektionen auf die Frequenz von Punktmutationen im p53 Gen an humanen Tumoren nachvollzogen werden. Die untersuchten Vulvakarzinome zeigten ein häufiges Auftreten von Punktmutationen im p53 Gen. Es fand sich kein Zusammenhang dieser Mutationen mit HPV Infektionen. Auf Grund der großen Unterschiede bezüglich der HPV Befunde und der Frequenz von Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen, schließen wir, daß die Tumorgenese dieser 2 Malignome sehr unterschiedlich sein dürfte.

32

Speiser/Schmid/Czerwenka/Peschke/Häufige Punktmutationen im p53

Zeillinger/Kubista Tumorsuppressorgen im humanen

Vulvakarzinom