

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. R. Haas

Mutationen der mitochondrialen DNA in kolorektalen Karzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Korinna Pilz

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Professor Dr. med. Norbert Gattermann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Wolfram Müller

Inhalt

| | |
|---|-----|
| Tabellenverzeichnis | III |
| Abbildungsverzeichnis | IV |
| Abkürzungen | VI |
| Aminosäure Code | IX |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Mitochondrien | 1 |
| 1.1.1 Die mitochondriale DNA (mtDNA) des Menschen | 2 |
| 1.1.2 Heteroplasmie und replikative Segregation | 4 |
| 1.1.3 mtDNA-Mutationen bei Erkrankungen | 5 |
| 1.1.4 Die Atmungskette und die mitochondriale Theorie des Alterns | 8 |
| 1.1.5 Die Rolle der Mitochondrien in der Karzinogenese | 11 |
| 1.2 Das kolorektale Karzinom | 13 |
| 1.2.1 Epidemiologie | 13 |
| 1.2.2 Ätiologie | 13 |
| 1.2.3 Pathophysiologie | 14 |
| 1.2.4 Einteilung und Prognose | 15 |
| 1.2.5 molekulare Grundlagen | 15 |
| 2 Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| 3 Material und Methoden | 22 |
| 3.1 Untersuchungsmaterial | 22 |
| 3.2 DNA-Extraktion | 23 |
| 3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 23 |
| 3.3.1 Lösungen für PCR und Agarose-Gelelektrophorese | 24 |
| 3.4 Suche nach Punktmutationen der mtDNA mit Hilfe der Heteroduplex-Analyse | 24 |
| 3.4.1 Prinzip der Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE-System | 25 |
| 3.4.2 Heteroplasmie-Detektion | 27 |
| 3.4.3 Lösungen für die dHPLC | 29 |
| 3.4.4 PCR-amplifizierte mtDNA-Segmente für die Heteroduplex-Analyse | 30 |
| 3.5 Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) | 30 |
| 3.5.1 Prinzip der TGGE | 30 |
| 3.5.2 MtDNA-Segmente zur TGGE-Analyse | 33 |
| 3.5.3 Technische Handhabung der senkrechten TGGE | 33 |
| 3.5.4 Lösungen | 34 |
| 3.5.5 Eigenschaften der DNA-Proben | 36 |
| 3.5.6 Silberfärbung | 36 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4 | Ergebnisse | 37 |
| 4.1 | Auswahl der dargestellten Befunde | 37 |
| 4.2 | Mutation in der mitochondrialen tRNA für Leucin(UUR) | 37 |
| 4.3 | Mutationen in der 16 S rRNA | 41 |
| 4.3.1 | Probenpaar 33464 | 41 |
| 4.3.2 | Probenpaar 1112 | 43 |
| 4.3.3 | Probenpaar 32435 | 45 |
| 4.4 | Mutationen innerhalb der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase | 48 |
| 4.4.1 | Probenpaar 33464 | 49 |
| 4.4.2 | Probenpaar 26395 | 51 |
| 4.5 | Mutationen innerhalb der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase | 55 |
| 4.5.1 | Probenpaar 27561 | 55 |
| 4.5.2 | Probenpaar 25152 | 58 |
| 4.5.3 | Probenpaar 27665 | 60 |
| 4.6 | Mutationen innerhalb der Untereinheit IV der NADH-Dehydrogenase | 63 |
| 4.6.1 | Probenpaar 27562 | 63 |
| 4.7 | Mutationen innerhalb nicht-kodierender Bereiche | 65 |
| 4.7.1 | Probenpaar 29934 | 65 |
| 4.7.2 | Probenpaar 32435 | 66 |
| 4.7.3 | Probenpaar 32836 | 69 |
| 4.7.4 | Probenpaar 32530 | 72 |
| 4.8 | Bisher nicht bekannte Polymorphismen | 73 |
| 4.9 | Zusammenfassung der gefundenen Mutationen | 74 |
| 5 | Diskussion | 76 |
| 6 | Zusammenfassung | 81 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 83 |
| 8 | Anhang | 89 |
| 8.1 | PCR-amplifizierte mtDNA-Segmente für die Heteroduplex-Analyse | 89 |
| | Lebenslauf | 95 |
| | Danksagung | 96 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1-1: Klinische Syndrome, die mit ausgewählten assoziierten mtDNA-Mutationen einhergehen (nach www.mitomap.org)..... | 7 |
| Tab. 1-2: Stadieneinteilung und stadienabhängige Überlebensrate des kolorektalen Karzinoms (nach Herold, 1999)..... | 15 |
| Tab. 3-1: Gewebeproben..... | 22 |
| Tab. 3-2: Oligonukleotide für die PCR der TGGE-analysierten COX III-Genabschnitte..... | 33 |
| Tab. 4-1: Interspezies-Vergleich der tRNA ^{Leu(UUR)} -Nukleotidsequenz (Dihydrouridin-Loop)..... | 40 |
| Tab. 4-2: Interspezies-Vergleich der Nukleotidsequenzen im Bereich der 16S rRNA (Position np2841-2860)..... | 42 |
| Tab. 4-3: Interspezies-Vergleich der Nukleotidsequenzen im Bereich der 16S rRNA (Position np3041-3060)..... | 44 |
| Tab. 4-4: Interspezies-Vergleich der Nukleotidsequenzen im Bereich der 16S rRNA (Position np2241-2260)..... | 46 |
| Tab. 4-5: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 1 (Position 465 – 485)..... | 50 |
| Tab. 4-6: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 1 (Position 1-12). | 53 |
| Tab. 4-7: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 1 (Position 5-20). | 54 |
| Tab. 4-8: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 3 (Position 20-39). | 57 |
| Tab. 4-9: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 3 (Position 71-86). | 60 |
| Tab. 4-10: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 3 (Position 175-195). | 62 |
| Tab. 4-11: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der ND4 (Position 86-105). | 64 |
| Tab. 4-12: Übersicht der potentiell pathogenetisch relevanten mtDNA-Mutationen..... | 74 |
| Tab. 4-13: Übersicht der bislang nicht beschriebenen Polymorphismen..... | 74 |
| Tab. 4-14: Übersicht der vorbeschriebenen Polymorphismen..... | 75 |
| Tab. 8-1: Position der mtDNA-Segmente, die mit PCR amplifiziert und anschließend mittels Heteroduplex-Analyse untersucht wurden..... | 89 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1-1: Die Gene der humanen mtDNA | 2 |
| Abb. 1-2: Replikative Segregation mutierter Mitochondrien | 5 |
| Abb. 1-3: Zuordnung der OXPHOS-Einheiten zum mitochondrialen und nukleären Genom | 8 |
| Abb. 1-4: Stoffwechselwege im Mitochondrium (www.Mitomap.org/mitomap/mito_apop.pdf) | 10 |
| Abb. 1-5: genomische Veränderungen im Laufe der Kolonkarzinom-Entstehung | 16 |
| Abb. 3-1: Schema des WAVE-Systems (nach Transgenomic Preinstallation Guide, 1999)..... | 26 |
| Abb. 3-2: Heteroduplex-Bildung nach De- und Renaturierung eines DNA-Gemisches aus normaler (Ww) und mutierter (Mm) DNA. | 28 |
| Abb. 3-3: Ergebnis einer denaturierenden HPLC bei einem Wildtyp/Mutante-DNA- Gemisch (nach Xiao and Oefner 2001)..... | 29 |
| Abb. 3-4: Beispiel einer Schmelzkurve in der senkrechten TGGE | 31 |
| Abb. 3-5: Temperaturabhängige Denaturierung der Homo- und Heteroduplexe und ihre Zuordnung zu den entsprechenden Abschnitten der TGGE-Schmelzkurve. | 32 |
| Abb. 4-1: dHPLC-Analyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar mrR99a, 58°C)..... | 39 |
| Abb. 4-2: Sequenzanalyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar mrR 99a, np3250). | 40 |
| Abb. 4-3: Struktur der tRNA ^{Leu(UUR)} mit der Position von bekannten pathogenen Mutationen (aus www.Mitomap.org)..... | 41 |
| Abb. 4-4: Sequenzanalyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar mrR 99a, np2849). | 42 |
| Abb. 4-5: dHPLC-Analyse von Probenpaar 1112 (Primerpaar mrR99a, 61°C)..... | 43 |
| Abb. 4-6: Sequenzanalyse von Probenpaar 1112 (Primerpaar mrR 99a, np3047). | 44 |
| Abb. 4-7: dHPLC-Analyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar mrR 96a, 56°C)..... | 45 |
| Abb. 4-8: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar mrR 96a, np2248). | 46 |
| Abb. 4-9: Sekundärstruktur der 16S rRNA (5'-Ende) von <i>Xenopus laevis</i> (entnommen aus www.mitomap.org) | 47 |
| Abb. 4-10: Sekundärstruktur der 16 S rRNA (3'-Ende) von <i>Xenopus laevis</i> (entnommen aus www.mitomap.org)..... | 48 |
| Abb. 4-11: dHPLC-Analyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar Cox 77b, 59°C)..... | 49 |
| Abb. 4-12: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar Cox77b, np7321-7340) | 50 |
| Abb. 4-13: dHPLC-Analyse von Probenpaar 26395 (Primerpaar NAD 28a, 59°C) | 52 |
| Abb. 4-14: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 26395 (Primerpaar NAD28a, np5901-5920)..... | 52 |
| Abb. 4-15: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 26395 (Primerpaar NAD28a, np5941-5960)..... | 54 |
| Abb. 4-16: dHPLC-Analyse von Probenpaar 27561 und 1112 (Primerpaar Cox 31b, 60°C)..... | 56 |
| Abb. 4-17: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 27561 (Primerpaar Cox31b, np5281-5300). | 57 |
| Abb. 4-18: dHPLC-Analyse von Probenpaar 25152 (Primerpaar Cox 31b, 58°C)..... | 58 |
| Abb. 4-19: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 25152 (Primerpaar Cox31b, np9450)..... | 59 |

| | |
|---|----|
| Abb. 4-20: senkrechte TGGE des Probenpaares 25152 (Primerpaar COX III(16) / 31R, 35-65°C, 300V/45mA, 30 min, X: Crosslink der Einzelstränge erfolgt, Y: Crosslink der Einzelstränge nicht erfolgt)..... | 59 |
| Abb. 4-21: dHPLC-Analyse von Probenpaar 27665 (Primerpaar Cox 33b, 59°C). | 61 |
| Abb. 4-22: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 27665 (Primerpaar Cox33b, np9750). | 61 |
| Abb. 4-23: senkrechte TGGE des Probenpaares 27665 (Primerpaar COX III(16) / 31R, 35-65°C, 300V/43mA, 30 min) | 62 |
| Abb. 4-24: dHPLC-Analyse von Probenpaar 27652 (Primerpaar Nad 43a, 58°C, np11038, wt: Wildtyp). | 63 |
| Abb. 4-25: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 26395 (Primerpaar Nad43a, np11038). | 64 |
| Abb. 4-26: dHPLC-Analyse von Probenpaar 29934 (Primerpaar KR 81a, 59°C, np16175)..... | 65 |
| Abb. 4-27: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 29934 (Primerpaar KR81a, np16175)..... | 66 |
| Abb. 4-28: dHPLC-Analyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar KR 83a, 61°C, np16450 - np150). | 67 |
| Abb. 4-29: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar KR83a, np16488). | 68 |
| Abb. 4-30: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar KR83a, np74). | 68 |
| Abb. 4-31: dHPLC – Analyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR 85a, 58°C, np150–np380)..... | 69 |
| Abb. 4-32: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR85a, np180-200). | 70 |
| Abb. 4-33: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR85a, np255-275). | 70 |
| Abb. 4-34: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR85a, np300-320). | 71 |
| Abb. 4-35: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR85a, np215). | 71 |
| Abb. 4-36: dHPLC-Analyse von Probenpaar 32530 und 33763 (Primerpaar Nad 27a, 57°C, np5585)..... | 72 |
| Abb. 4-37: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32530 (Primerpaar Nad27a, np5585). | 73 |

Abkürzungen

| | |
|-------------------------------|---|
| A | Adenin |
| ACF | aberrant crypt foci |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AIF | Apoptosis-inducing Factor |
| AMP-PNP | Adenylylimidodiphosphat |
| ANT | Adenine Nucleotide Transporter |
| Apaf | Apoptosis Protease Activating Factor |
| APC | adenomatöse Polyposis coli-Gen |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BER | Base excision repair |
| C | Cytosin |
| CAD | Caspase Activated DNase |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| COX | Cytochrom-Oxidase |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| CYB | Cytochrom b |
| CPEO | chronic progressive external ophthalmoplegia |
| DCC | Deleted in Colorectal Cancer |
| DHODH | Dehydroorotat-Dehydrogenase |
| dHPLC | denaturierende HPLC |
| D-Loop | Displacement Loop |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPC | Deleted in Pancreatic Cancer |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FADH ₂ | Flavin-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form |
| FAP | Familiäre Adenomatöse Polyposis |
| G | Guanin |
| GPx | Glutathione Peroxidase |
| GSK3-β | Glykogen-Synthase-Kinase 3β |
| GTP | Guanin-Triphosphat |
| H ⁺ | Proton |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |

| | |
|----------------|---|
| HNPCK | hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom |
| HPLC | high pressure liquid chromatography |
| H-strand | schwerer Strang |
| JPS | juveniles Polyposis Syndrom |
| KSS | Kearns-Sayre-syndrome |
| LDH | Laktat-Dehydrogenase |
| LHON | Leber's hereditary optic neuropathy |
| LOH | loss of heterozygosity |
| L-strand | leichter Strang |
| MELAS | mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis and stroke-like episodic |
| MERRF | myoclonic epilepsy and ragged red muscle fibers |
| MM | mitochondrial myopathy |
| MMC | maternal myopathy and cardiomyopathy |
| mtDNA | mitochondriale DNA |
| NADH | Niokotinamid-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form |
| NARP | neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa |
| N-CAM | neural cell adhesion molecule |
| ND | NADH Dehydrogenase |
| nDNA | Nukleäre DNA |
| NER | Nukleotide Excision Repair |
| np | Nucleotide Position |
| O ₂ | Molekularer Sauerstoff |
| OXPPOS | Oxidative Phosphorylierung |
| PCR | Polymerase-Chain-Reaktion |
| PDH | Pyruvat Dehydrogenase |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reaktive Sauerstoff Spezies |
| rRNA | Ribosomale Ribonukleinsäure |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| T | Thymin |
| TEAA | Triethylammonium-Azetat |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TGGE | Temperaturgradienten Gelelektrophorese |
| Tis | Tumor <i>in situ</i> |
| TNM | Klassifikationssystem nach <u>T</u> umor, <u>N</u> odus, <u>M</u> etastasierung |
| tRNA | Transfer Ribonukleinsäure |
| TTP | Thymintriphosphat |

| | |
|------|-----------------------------------|
| U | Uracil |
| UICC | Union International Contre Cancer |
| UMP | Uridylmonophosphat |
| VDAC | Voltage-Dependent Anion Channel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Aminosäure Code

| | |
|---|----------------|
| A | Alanin |
| C | Cystein |
| D | Asparaginsäure |
| E | Glutaminsäure |
| F | Phenylalanin |
| G | Glycin |
| H | Histidin |
| I | Isoleucin |
| K | Lysin |
| L | Leucin |
| M | Methionin |
| N | Asparagin |
| P | Prolin |
| Q | Glutamin |
| R | Arginin |
| S | Serin |
| T | Threonin |
| V | Valin |
| W | Tryptophan |
| Y | Tyrosin |

1 Einleitung

1.1 Die Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen mit zylindrischer Form und einer Größe von ca. 0,5 bis 1 μm . Sie besitzen ein eigenes Genom in Form einer doppelsträngigen, ringförmigen DNA, die in 2-10 Kopien pro Mitochondrium vorliegt. Mitochondrien vermehren sich innerhalb der Eukaryontenzelle wie Bakterien durch Teilung. Mitochondrien sind sehr wahrscheinlich auch aus Bakterien (Purpurbakterien) entstanden (Endosymbiontenhypothese). Vor etwa 1,5 Milliarden Jahren stieg der Sauerstoffgehalt der Erdatmosphäre stark an. Die Prokaryonten passten sich an die veränderten Verhältnisse durch Weiterentwicklung bereits existierender Elektronentransportketten an, die Sauerstoff zu Wasser reduzieren und damit unschädlich machen konnten. Gleichzeitig diente die schrittweise Elektronenübertragung auf Sauerstoff im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette einer verbesserten Energiegewinnung. Es entstand eine Cytochrom-Oxidase, die Elektronen aus organischen und anorganischen Substraten auf O_2 als Elektronenakzeptor übertragen konnte. Die Endosymbiontenhypothese geht davon aus, dass eine Eukaryontenzelle sich ein Purpurbakterium einverleibte. Daraus entwickelte sich eine stabile endosymbiontische Beziehung. Die aktuelle revidierte Sicht der Eukaryonten-Entwicklung geht inzwischen davon aus, dass zwei Bakterientypen (aerob und anaerob) fusionierten und sich daraus ein primitiver Eukaryont entwickelte (Gray et al. 1999). In beiden Fällen erhielt ein Organismus Schutz und reichlich Nährstoffe und bot dem anderen verbesserte Energieproduktion und Entgiftung des Sauerstoffs.

Im Laufe der Evolution wurde das Genom des Protomitochondriums zum größten Teil in den Zellkern des Eukaryonten übernommen. Dies betrifft sowohl alle Gene für gemeinsame Stoffwechselwege der Symbionten als auch einen großen Teil der Gene für die Atmungskettenproteine. Heute sind in der mitochondrialen DNA (mtDNA) des Menschen von den ursprünglich 3000-4000 Genen des Protomitochondriums nur noch 37 Gene vorhanden. Eine Erklärung für den Verbleib dieser Gene im mitochondrialen Genom liegt möglicherweise im unterschiedlichen genetischen Code von Pro- und Eukaryonten, der die Aminosäureabfolge des translatierten Proteins bestimmt. Es entstünden wahrscheinlich funktionsuntüchtige Genprodukte, wenn die verbliebenen Mitochondrien-Gene im Zellkern exprimiert würden.

1.1.1 Die mitochondriale DNA (mtDNA) des Menschen

Die mtDNA des Menschen umfaßt 16569 Basenpaare. Sie ist ringförmig, doppelsträngig und liegt in 2-10 Kopien pro Mitochondrium vor. Sie wird im Gegensatz zur nukleären DNA (nDNA) nicht durch Histone geschützt. Die zirkuläre mtDNA besteht aus einem Guanin-reichen schweren Strang (heavy [H] strand) und einem Cytosin-reichen leichten Strang (light [L] strand). Der H-Strang codiert zwei rRNA-Gene, 14 tRNA-Gene und 12 Protein-Gene, der L-Strang enthält ein Protein-Gen und 8 tRNA-Gene. Zwischen den für die tRNA^(Phe) und tRNA^(Pro) kodierenden Genabschnitten liegt eine 1123 Basenpaare lange Region der mtDNA, die als displacement-loop (D-loop) bezeichnet wird. Dort befinden sich Genabschnitte, die für Replikation und Transkription der mtDNA von Bedeutung sind. Sämtliche von der mtDNA kodierte Proteine sind Bestandteile der Atmungskette (Abb. 1-1).

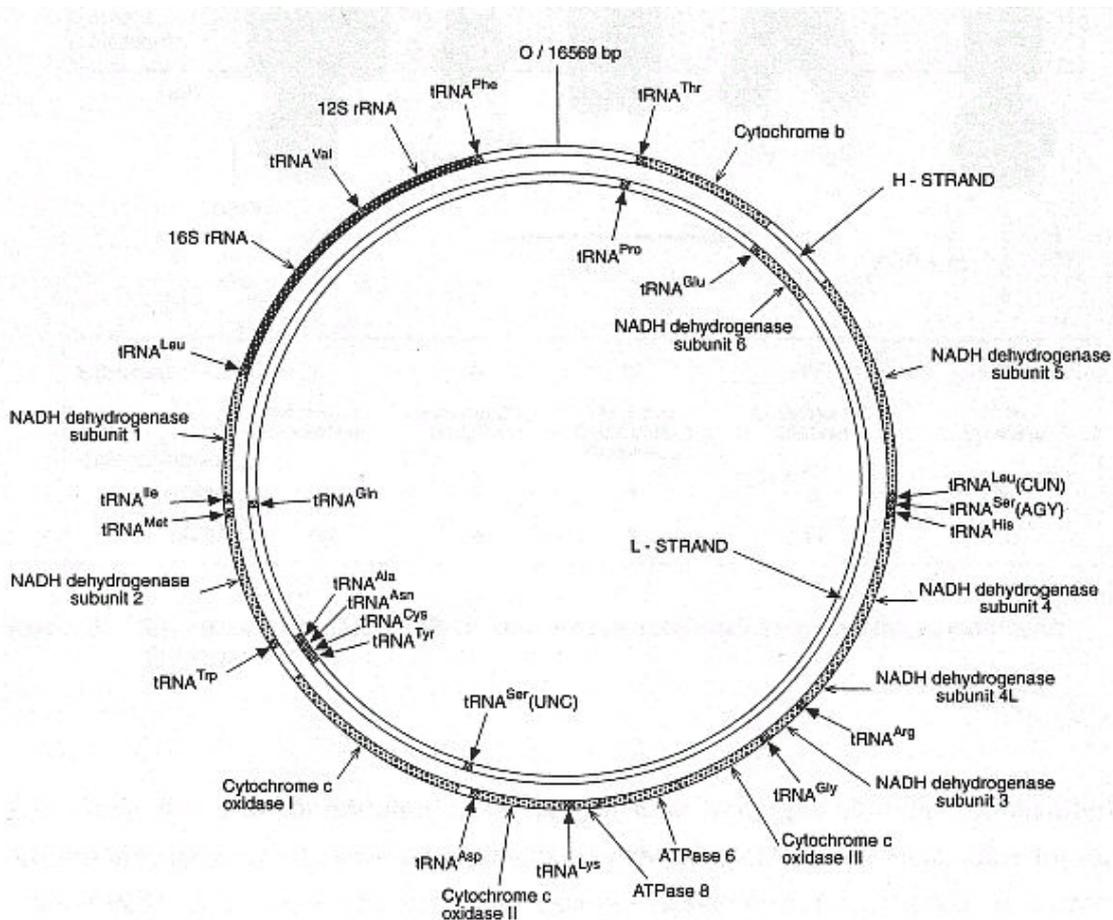


Abb. 1-1: Die Gene der humanen mtDNA

Replikation und Transkription unterscheiden sich in einigen Punkten zwischen mtDNA und nDNA. Die *Replikation der mtDNA* geschieht unabhängig vom Zellzyklus ununterbrochen, braucht aber mit ca. 2 Stunden sehr viel länger als die der nDNA. Die Replikation nimmt ihren Ausgang vom Replikationsursprung des H-Strangs (O_H) und verläuft zunächst im Uhrzeigersinn. Es werden ca. 2/3 des H-Strangs repliziert, dann ist der Replikationsursprung des L-Strangs (O_L) erreicht. Hier beginnt die Replikation des L-Strangs gegen den Uhrzeigersinn, während gleichzeitig der H-Strang im Uhrzeigersinn komplettiert wird. Zum Ende der Replikation liegen zwei ineinander verschränkte zirkuläre mtDNA-Stränge vor, die zuletzt von einer Topoisomerase getrennt werden.

Die Besonderheit der *Transkription der mtDNA* ist das Vorhandensein von nur je einem Transkriptionspromotor für den gesamten H- bzw. L-Strang. Bei der nukleären DNA existiert für jedes Gen ein eigener Promotor. Bei der Transkription der mtDNA entstehen so zwei lange Transkripte, die multiple Gene enthalten. Erst später werden sie durch Restriktionsenzyme aufgeteilt.

Auch bei der *Translation* gibt es Unterschiede zwischen nDNA und mtDNA. Der früher als einheitlich angenommene genetische Code weist für die mtDNA einige Abweichungen auf: AUA steht für Methionin statt Isoleucin, UGA codiert nicht ein Stop-Codon, sondern Tryptophan, und AGA und AGG stehen für ein Stop-Codon und nicht für Arginin (Anderson et al., 1981).

Neben diesen Unterschieden finden sich weitere Besonderheiten der mtDNA :

1. Die mtDNA wird maternal vererbt (Wallace et al. 1988). Dies liegt zum Teil an der ungleich verteilten Mitochondrienmenge in Eizelle und Spermium. Während Erstere ca. 200.000 Mitochondrienkopien enthält, trägt das Spermium kaum mtDNA zur Befruchtung bei (Gyllenstein et al. 1991). Reste der paternalen DNA werden aktiv von nukleär codierten Proteinen während der Embryogenese abgebaut (Shitara et al., 2000). Verursacht eine Mutation der mtDNA keine Einschränkung der Reproduktionsfähigkeit, aber klinische Symptome, so läßt sich ein maternaler Erbgang beobachten.
2. Es existieren keine Introns in der mitochondrialen DNA, sondern die Gene liegen unmittelbar nebeneinander. Diese Gendichte findet sich sonst nur bei viralen Genomen. So ist die Wahrscheinlichkeit für eine funktionelle Beeinträchtigung des Genoms durch eine Mutation höher als in der nDNA.
3. Die mtDNA weist im Gegensatz zur nDNA eine mindestens 10-fach erhöhte Mutationsrate auf (Brown et al. 1979, Miyata et al. 1982, Wallace et al. 1987). Dies wird einerseits durch die fehlende Kondensierung und nicht vorhandene Histone erklärt. Andererseits wird das

mitochondriale Genom kontinuierlich während des gesamten Zellzyklus repliziert. Dies macht die mtDNA anfällig für toxische Einflüsse, die besonders bei der DNA-Synthese wirksam werden. Dazu zählen vor allem die an der Atmungskette gebildeten toxischen Sauerstoffradikale (Richter et al. 1988, Shigenaga et al. 1994). Das Mitochondriengenom liegt in unmittelbarer Nähe der mitochondrialen Atmungskette.

4. Das Fehlen gewisser DNA-Reparaturmechanismen im Mitochondrium trägt zur Fixierung von mtDNA-Mutationen bei. So sind zwar neben base excision repair (BER) direct damage reversal, mismatch repair und Rekombinations-Reparatur-Mechanismen im Mitochondrium vorhanden, aber ein nucleotide excision repair (NER) konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Croteau 1999). Es zeigte sich, dass ROS-bedingte DNA-Schäden, die abhängig von der Dauer der Einwirkung im Zellkern repariert werden konnten, unter gleichen Bedingungen im Mitochondrium Wachstumsstillstand und Apoptose bewirkten (Yakes und van Houten 1997).

1.1.2 Heteroplasmie und replikative Segregation

Die meisten Zellen enthalten Hunderte von Mitochondrien und damit Tausende von mtDNA-Kopien. Es können somit mutierte und normale mtDNA-Moleküle nebeneinander in der gleichen Zelle vorhanden sein. Diesen Zustand bezeichnet man als Heteroplasmie. Teilt sich solch eine Zelle, werden die Mitochondrien nach dem Zufallsprinzip auf die Tochterzellen verteilt. Es können sich Zellpopulationen mit überwiegend normalen Mitochondrien neben solchen mit überwiegend mutierten Mitochondrien etablieren, falls die Mutation das Überleben bzw. die Proliferation der Zellen nicht wesentlich beeinträchtigt. Nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeitsrechnung werden sich im Laufe zahlreicher Zellteilungen kaum noch Zellen mit einem mittleren Anteil von mutierten Mitochondrien finden. Diese Verteilung in Richtung auf die beiden Enden des Spektrums wird als replikative Segregation bezeichnet (Wallace 1994) (Abb. 1-2).

Im Rahmen der Oogenese und der Embryogenese folgen die Zellteilungen sehr rasch aufeinander. Wegen fehlender Replikation der mtDNA während der frühesten Embryogenese wird die mtDNA in den Zellen zunächst stark „ausgedünnt“. Rasche Zellteilung und geringe Kopienzahl der mtDNA führen gemeinsam zu effizienter replikativer Segregation. Bei der Entstehung des neuen Organismus können so abhängig vom Zeitpunkt des Auftretens einer Mutation der gesamte Embryo (bei Vorliegen einer Keimbahnmutation bei der Mutter), einzelne Keimblätter (die Mutation hat sich in der Keimblatt Stammzelle durchgesetzt), einzelne Organe

(Organstammzelle) oder individuelle Stammzellen (somatische Mutationen) diese Mutation tragen.

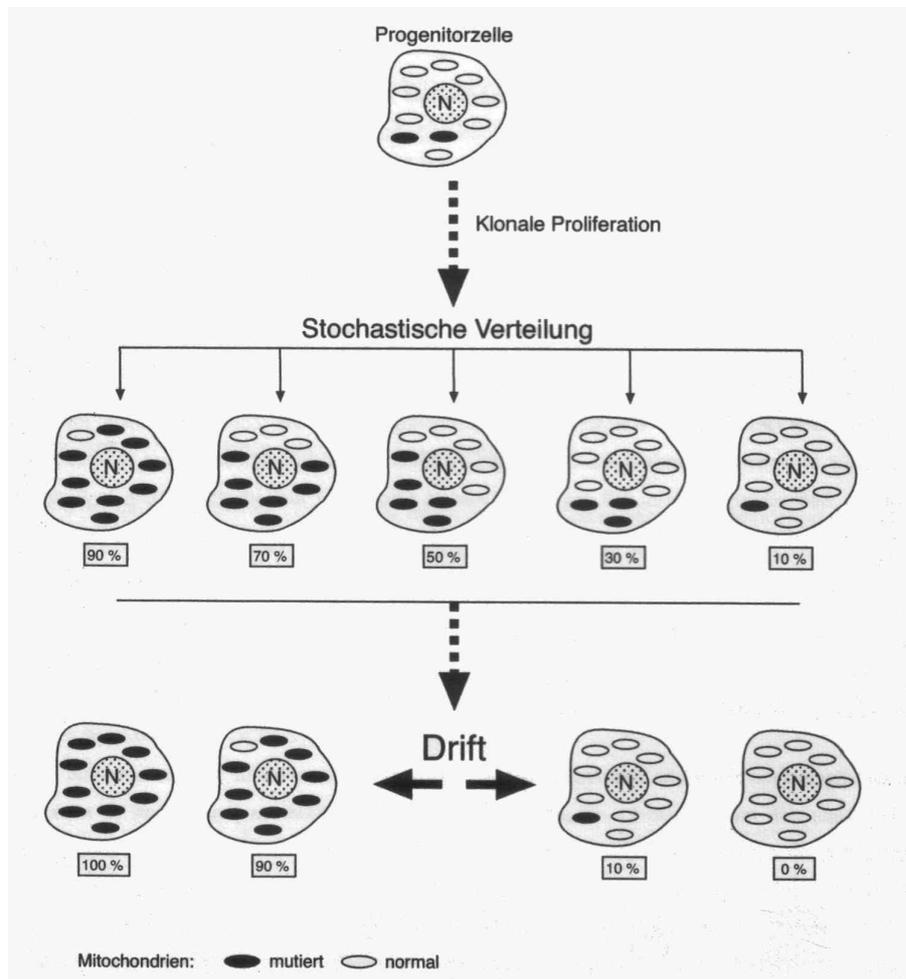


Abb. 1-2: Replikative Segregation mutierter Mitochondrien

1.1.3 mtDNA-Mutationen bei Erkrankungen

mtDNA-Mutationen können funktionell unbedeutend sein oder zu einer Funktionseinbuße mit klinischen Symptomen führen. Ist das Ausmaß einer vererbten Störung zu groß, wird die Keimentwicklung unterbrochen. Ist die Mutation mit dem Leben vereinbar, ist der Zeitpunkt des Auftretens von Symptomen davon abhängig, wie stark die Energieproduktion der Atmungskette von Geburt an eingeschränkt ist und wie schnell relevante somatische Mutationen im Laufe des weiteren Lebens hinzukommen (Wallace 1992). Hierbei gibt es einen kritischen Schwellenwert der klinischen Expression, der den Punkt kennzeichnet, an dem der Organismus nicht mehr in der Lage ist, die vorhandene Störung zu kompensieren. Dieses Modell trifft vor allem auf postmitotisches Gewebe zu, z.B. ZNS oder Muskulatur (Wallace 1994).

Seit den späten 80er Jahren kennt man den Zusammenhang zwischen mtDNA-Mutationen und bestimmten Erkrankungen. Bei Patienten mit mitochondrialen Myopathien konnten Holt et al. 1988 ausgedehnte Deletionen nachweisen. Außerdem wurde bei einem Patienten mit Leber'scher hereditärer Optikusneuropathie (LHON) ein Basenaustausch innerhalb der mitochondrialen DNA beschrieben, der eine Missense-Mutation zur Folge hatte (Wallace et al. 1988). In den darauf folgenden Jahren wurde die Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen durch die Entdeckung mitochondrialer DNA-Defekte klarer. Neben Muskeln und ZNS können auch Leber, Nieren, Blut oder andere Gewebe bzw. Zellen betroffen sein. Häufig sind mehrere Gewebe im Sinne einer Multisystemerkrankung betroffen. Hier sollte die Bezeichnung mitochondriale Zytopathie verwendet werden (Tab. 1-1).

Tab. 1-1: Klinische Syndrome, die mit ausgewählten assoziierten mtDNA-Mutationen einhergehen (nach www.mitomap.org)

| Erkrankung | Mutiertes Gen | Position | Basenaustausch | Aminosäure |
|--|-------------------------------------|--------------------------|----------------|------------|
| CPEO | verschiedene ausgedehnte Deletionen | | | |
| Exercise Intolerance | COX I | 5920 | G → A | W → Ter |
| | CYB | 15150 | G → A | W → Ter |
| | tRNA ^{Tyr} | 5874 | | tRNA |
| Fam. Diabetes mell. mit Taubheit | tRNA ^{leu(UUR)} | 3243 | A → G | tRNA |
| | 10.4 kb Deletion | | | |
| KSS | verschiedene ausgedehnte Deletionen | | | |
| Leigh-Syndrom | tRNA ^{Lys} | 8344 | A → G | tRNA |
| LHON | ND1 | 3394 | T → C | Y → H |
| | ND2 | 4640 | C → A | I → M |
| | ND4 | 10663 | T → C | V → A |
| | ND5 | 13730 | G → A | G → E |
| | ND6 | 14484 | T → C | M → V |
| | ATP6 | 9101 | T → C | I → T |
| | cyt b | 15257 | G → A | D → N |
| | COX I | 7444 | G → A | Term → K |
| | COX III | 9438 | G → A | G → S |
| | | tRNA ^{leu(UUR)} | 3275 | |
| MELAS | ND1 | 3308 | T → C | M → T |
| | ND4 | 11084 | A → G | T → A |
| | ND5 | 13513 | G → A | D → N |
| | ND6 | 14453 | G → A | A → V |
| | tRNA ^{Phe} | 583 | | tRNA |
| | rRNA2 | 3093 | | 16S rRNA |
| MERRF | tRNA ^{Lys} | 8296 | | tRNA |
| MM | COX II | 7671 | T → A | M → K |
| | CYB | 15059 | G → A | G → E |
| | tRNA ^{Phe} | 618 | | tRNA |
| | tRNA ^{leu(UUR)} | 3243 | | tRNA |
| | tRNA ^{Thr} | 15915 | | tRNA |
| MMC | tRNA ^{leu(UUR)} | 3303 | | tRNA |
| | tRNA ^{leu(UUR)} | 3260 | A → G | tRNA |
| NARP | ATPase | 8993 | T → G | L → R |
| Pearson- Syndrom | verschiedene ausgedehnte Deletionen | | | |
| Taubheit durch Aminoglykosid-Überempfindlichkeit | 12sRNA | 1555 | A → G | |

Abkürzungen: **CPEO**: chronic progressive external ophthalmoplegia; **KSS**: Kearns-Sayre-syndrome; **LHON**: Leber's hereditary optic neuropathy; **MELAS**: mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; **MERRF**: myoclonic epilepsy and ragged red muscle fibers; **MM**: mitochondrial myopathy; **MMC**: maternal myopathy and cardiomyopathy; **NARP**: neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa

1.1.4 Die Atmungskette und die mitochondriale Theorie des Alterns

Sämtliche von der mtDNA kodierte Proteine sind Bestandteile der Atmungskette. Die Atmungskette wird aus fünf Multienzymkomplexen gebildet, die in der inneren Mitochondrienmembran liegen. Insgesamt sind ca. 80 Untereinheiten an ihrem Aufbau beteiligt, von denen 13 von der mtDNA kodiert werden. Die restlichen Gene liegen auf der nukleären DNA. Auf der mtDNA liegen 7 der ca. 40 Untereinheiten des Komplex I (NADH-Dehydrogenase), eine von 10 Untereinheiten des Komplex III (Cytochrom c-Reduktase), 3 von 13 Untereinheiten des Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) und zwei von 12 Untereinheiten des Komplex V (ATP-Synthase) (s. Abb. 1-3).

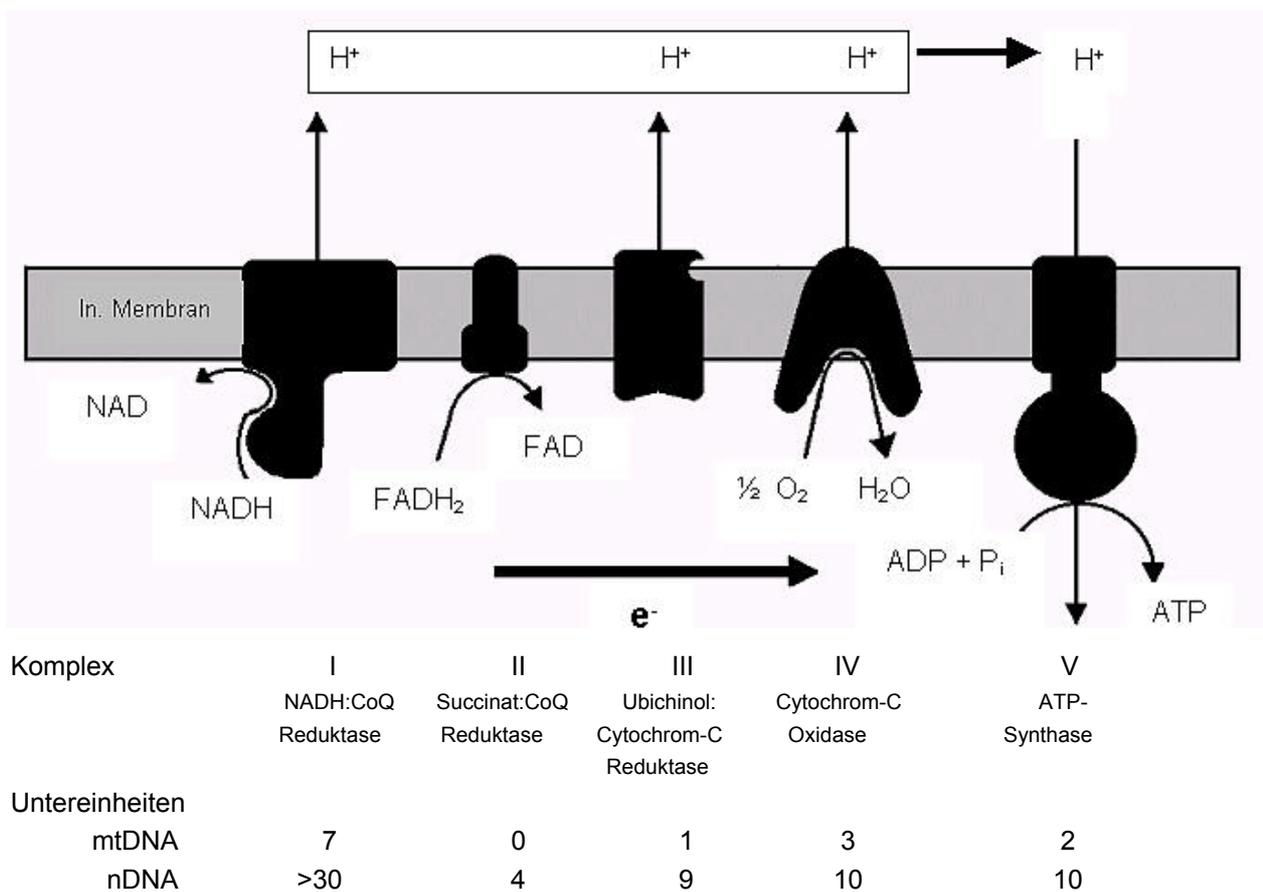


Abb. 1-3: Zuordnung der OXPHOS-Einheiten zum mitochondrialen und nukleären Genom

Die Aufgabe der Atmungskette besteht hauptsächlich darin, Energie in Form von ATP zu gewinnen. Dazu tragen folgende Vorgänge bei:

1. An NAD und FAD gebundener Wasserstoff wird in den Komplexen I und II in Protonen und Elektronen aufgespalten,
2. Die Enzymkomplexe I, III und IV transportieren Protonen aus dem Matrixraum in den Membranzwischenraum, so dass ein elektrochemischer Gradient über der inneren Mitochondrienmembran entsteht. Dieser treibt die ATP-Synthese im Komplex V an.
3. Elektronen werden entlang der Atmungskette weitergegeben und schließlich im Komplex IV zur Reduktion von molekularem Sauerstoff verwendet.

Im optimalen Fall wird dabei molekularer Sauerstoff in Wasser umgewandelt. Es gibt jedoch Redox-Komponenten in der Atmungskette, die ein einzelnes Elektron direkt auf Sauerstoff übertragen können und so toxische Superoxid-Radikale produzieren. Ca. 1-2 % des mitochondrial umgesetzten Sauerstoffs bildet Sauerstoffradikale. Unter normalen Stoffwechselbedingungen werden in jedem Rattenlebermitochondrium täglich 3×10^7 Superoxid-Radikale gebildet (Berechnung von Richter et al. 1988). Die meisten dieser Moleküle werden durch Mn-Superoxid-Dismutase in H_2O_2 umgewandelt. Dies wird von der mitochondrialen Katalase und Peroxidase abgebaut. Der Abbau geschieht jedoch nicht vollständig, so dass aus H_2O_2 das hochreaktive Hydroxyl-Radikal entstehen kann, welches wiederum Lipide, Proteine und Nukleinsäuren angreift (Abb. 1-4).

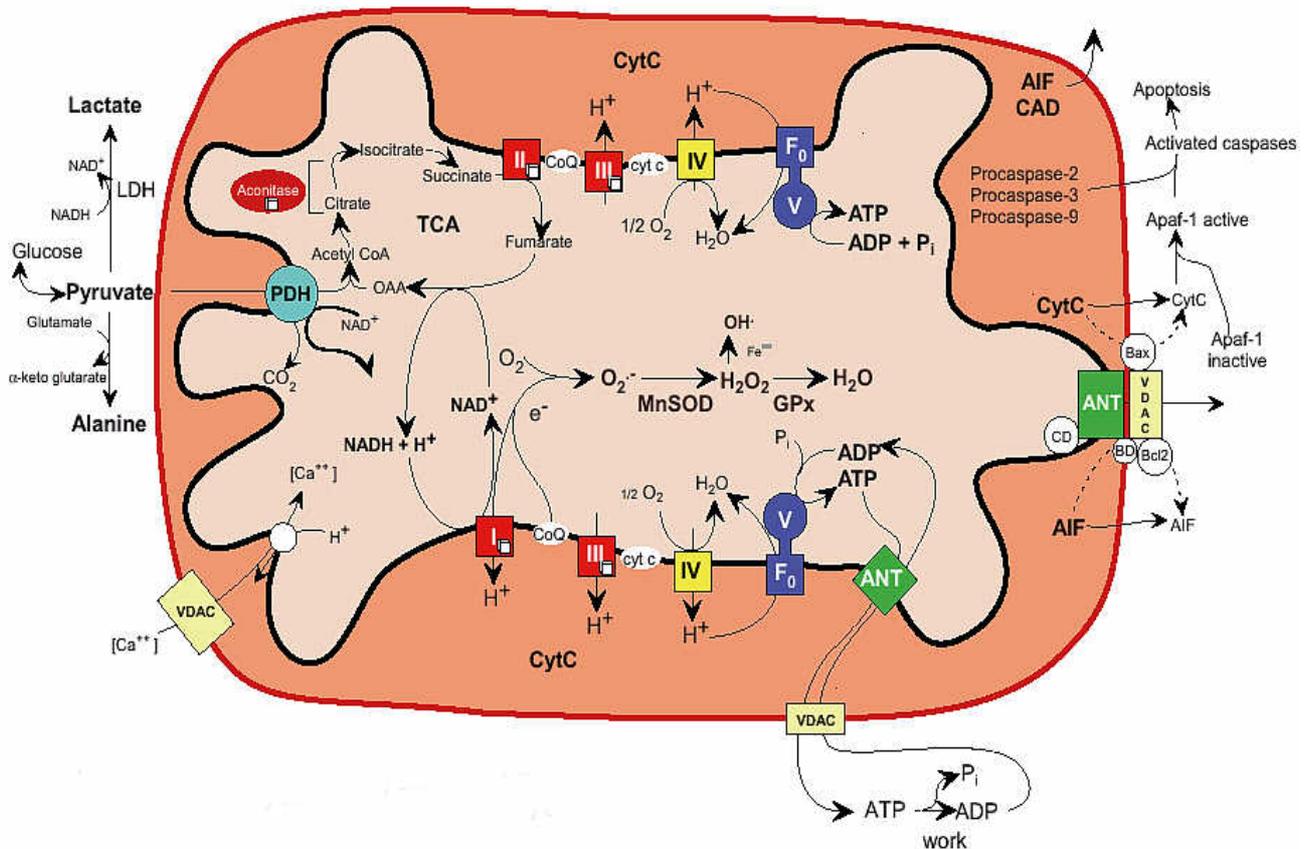


Abb. 1-4: Stoffwechselwege im Mitochondrium (www.Mitomap.org/mitomap/mito_apop.pdf)

Die Theorie des Alterns geht davon aus, dass Reparatur und Austausch defekter Moleküle in biologischen Systemen nie vollständig sein können. Dies führt zur Akkumulation von Defekten, die zunehmend störend auf Organfunktionen wirken. Haben sich genug Defekte angesammelt, sind die Funktionsstörungen schließlich nicht mehr mit dem Leben vereinbar. Dabei ist die jeder Spezies gegebene spezifische Lebensdauer in erster Linie durch die Menge der anfallenden Sauerstoffradikale bestimmt, welche eine Funktion des Sauerstoffverbrauchs darstellt:

1. Die Lebensspanne von Fruchtfliegen ist durch eine Absenkung der Umgebungstemperatur von 30°C auf 10°C von 14 auf 120 Tage verlängerbar. Bei niedrigen Temperaturen sinkt der Stoffwechselumsatz und damit der Sauerstoffverbrauch.
2. Die Menge der Nahrungsaufnahme nimmt Einfluß auf die Lebensdauer von Mäusen und Ratten (Holehan and Merry 1986, Masoro 1988, Weindruch und Walford 1988).
3. Die Lebenserwartung verschiedener Tierarten verhält sich umgekehrt proportional zu ihrem Grundumsatz, d.h. große Lebewesen mit weniger Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm

Körpergewicht leben länger als kleine Tiere mit hohem Sauerstoffverbrauch pro Gewichtseinheit.

Allen drei Beobachtungen ist gemeinsam, dass die Menge des Sauerstoffverbrauchs eine Rolle spielt – und: Je mehr Sauerstoff verbraucht wird, desto mehr Sauerstoff-Radikale entstehen. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden für das Altern von Organismen neben anderen Ursachen (z.B. Abnahme der Teilungsfähigkeit von Stammzellen durch Telomerlängenverlust) verantwortlich gemacht (Harman 1981). Besonders auffällig ist dies in Geweben mit hohem Sauerstoffverbrauch wie z.B. im Zentralnervensystem, der Leber und in der Muskulatur (Trounce et al., 1989; Wallace 1997). Hier konnte parallel zu einer Abnahme der OXPHOS-Enzym-Aktivität eine Zunahme der ROS und eine Akkumulation von somatischen mtDNA-Veränderungen nachgewiesen werden.

Die mtDNA liegt nahe an der Quelle der Sauerstoffradikale. Es entstehen modifizierte Basen (z.B. 8-Hydroxy-Guanin), die Punktmutationen und Strangbrüche bewirken können. Oxidative Schäden der mtDNA werden zudem nicht so effektiv behoben wie bei der nukleären DNA. Unter den Reparaturmechanismen für die mtDNA fehlt die Nukleotid Exzisions-Reparatur. Andere Reparaturmechanismen funktionieren weit weniger effektiv als im Zellkern (Croteau 1999).

MtDNA-Mutationen können zu funktionell eingeschränkten OXPHOS-Proteinen führen, was konsekutiv auch eine eingeschränkte ATP-Produktion zur Folge hat. Ist die Energieproduktion eingeschränkt, können differenzierte Zellen ihre Aufgaben nur noch in vermindertem Maße erfüllen. Dazu gehört neben spezialisierten Zellfunktionen und Erhaltung der Zellintegrität auch die Mitochondrienvermehrung (Miquel 1991). Zusätzlich führt eine Behinderung der Atmungskette zu vermehrtem Anfall von Sauerstoffradikalen proximal des Ortes der Störung (Turrens und Boveris 1980). So entsteht ein sich aufschaukelnder Zyklus gestörter OXPHOS-Funktion und vermehrter ROS-Produktion. Da Mitochondrien einem physiologischem „Turnover“ unterliegen und sich damit ständig erneuern, können oxidative Schäden nur dann persistieren, wenn sie genetisch fixiert werden, d.h. wenn Mutationen der mtDNA entstehen.

1.1.5 Die Rolle der Mitochondrien in der Karzinogenese

Die Theorie des Alterns stellt den Zusammenhang zwischen mtDNA-Mutationen und eingeschränkter Funktion der Mitochondrien her. Im Alter steigt die Wahrscheinlichkeit, an einer Neoplasie zu erkranken, deutlich an. Eine logische Verbindung dieser beiden Aussagen reicht sicherlich nicht als Beweis für die Beteiligung der Mitochondrien an der Krebsentstehung aus. Gibt es weitere Hinweise zur Stärkung dieser Hypothese?

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei der Apoptose (Abb. 1-4): Der programmierte Zelltod ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus, mit dem der Organismus veränderte oder funktionsgestörte Zellen beseitigen kann. Die Apoptose läuft in 3 Schritten ab, a) die Initiationsphase, die von unterschiedlichen Faktoren ausgelöst werden kann, b) die Entscheidungsphase und c) die Abbauphase. In der Entscheidungsphase ist die Zunahme der mitochondrialen Membranpermeabilität ein wichtiges Ereignis. Die Permeabilität wird durch Einbau eines Proteinkomplexes in die innere Mitochondrienmembran gesteigert. Dieser bildet eine Pore, durch die zytosolische Bestandteile frei passieren können. In der Folge geht das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran verloren, wodurch der irreversible Abbauprozess ausgelöst wird. Die Zusammensetzung der Pore ist bei normalen und malignen Zellen unterschiedlich (Barath et al. 1999), so dass auch die Schwelle zur Apoptose-Auslösung heraufgesetzt sein kann. Außerdem können auch assoziierte Proteine verändert sein, die z.B. die ROS-Resistenz erhöhen (Carayon et al. 1996).

Mitochondrien stellen ATP für den mitotischen Spindelapparat bereit. Die genetische Stabilität von Stammzellen ist von der exakten Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen abhängig. Dabei werden die Chromosomen vom Spindelapparat segregiert, der in hohem Maße ATP-abhängig ist. Unter anderem sind folgende ATP-abhängige Prozesse daran beteiligt (Abbondandolo et al. 1992, Hunter und Wordeman, 2000):

- ATP stimuliert den Aufbau von Mikrotubuli aus Tubulin (Zabrecki und Cole 1982).
- Die Richtung der Chromosomenwanderung bei der Zellteilung wird von ATP-abhängigen Motorproteinen am chromosomalen Kinetochor reguliert (Hyman und Mitchison 1991).
- Die Geschwindigkeit der Chromosomenwanderung in der Prometaphase wird durch ATP-Analoga, z.B. AMP-PNP vermindert (Lee 1989). Dabei scheint ein ATP-hydrolysierendes Motorprotein für den Beginn des Verkürzungsprozess der Spindel verantwortlich zu sein (Lombillo et al., 1995).

Eine Beeinträchtigung der ATP-Synthese durch Atmungskettendefekte aufgrund von mtDNA-Mutationen kommt somit als Ursache einer gestörten Chromosomenaufteilung während der Mitose in Betracht. Aneuploidie und ausgedehnte chromosomale Deletionen sind Merkmale vieler Karzinomzellen (Giaretti 1994).

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei der de-novo-Pyrimidinsynthese. Das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) ist in der inneren Mitochondrienmembran verankert und reduziert Ubichinon bei der Hydrolyse von Dihydroorotat zu Orotat (Löffler et al. 1997 und Rawls et al. 2000). Es führt den 4. Schritt in der Pyrimidinsynthese aus, ausgehend von der

Bildung von Carbamylphosphat aus Glutamin, ATP, CO₂ und Wasser und endend mit Uridylmonophosphat (UMP) (Jones 1980). Die DHODH ist das einzige Enzym in der Pyrimidinnukleotidsynthese, welches in der Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Seine Funktion ist von einer intakten Atmungskette abhängig (Löffler et al. 1997). Experimente aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Blockierung der Atmungskette eine massive Verminderung der Konzentration von Pyrimidinnukleotiden bewirkt. Ein Nukleotidungleichgewicht könnte die Replikation nukleärer DNA behindern und gleichzeitig die Mutationsrate erhöhen (Kunz et al., 1994).

1.2 Das kolorektale Karzinom

1.2.1 Epidemiologie

Kolorektale Karzinome treten in Nordamerika und Europa mit einer Inzidenz von ca. 30 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf, wobei Männer und Frauen gleich häufig betroffen sind. Nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen ist es jeweils das zweithäufigste Karzinom. In Asien, Afrika und Lateinamerika ist die Inzidenz geringer.

90 % der kolorektalen Karzinome finden sich nach dem 50. Lebensjahr, wobei sich die Inzidenz ab dem 40. Lebensjahr alle 10 Jahre verdoppelt. 75 % der kolorektalen Karzinome entfallen auf die Normalbevölkerung (> 40 Jahre, ohne Risikofaktoren) mit einem Erkrankungsrisiko von 5 %. 25 % der Karzinome treten in Risikogruppen mit einem Erkrankungsrisiko zwischen 10 % und 100 % auf. Die Grenze zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen wird bei 16 cm Entfernung vom aboralen Rand der Anokutanlinie gezogen. Ca. 60 % der Neoplasien sind im Rektum lokalisiert, während auf das Sigma 20 %, Zoekum und Ascendens sowie das übrige Kolon jeweils 10 % entfallen.

1.2.2 Ätiologie

Zu den *Risikofaktoren* zählt man zum einen ernährungsbedingte Faktoren wie fettreiche, fleischreiche, ballaststoffarme Kost sowie Übergewicht. Zum anderen sind langjähriges Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum zu nennen. Aber auch das Lebensalter als nicht beeinflussbarer Faktor spielt eine Rolle (s.o.).

Risikoerkrankungen wie z.B. langjährige chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Z.n. Ureterosigmoideostomie, aber auch vorangegangene kolorektale Karzinome und Adenome,

Karzinome von Mamma, Ovar und Corpus uteri führen zu einem gegenüber der Normalbevölkerung um 10 bis 15 % erhöhten Erkrankungsrisiko.

Hereditäre Faktoren spielen bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), den hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinomen (HNPKK = Lynch-Syndrom) und bei positiver Familienanamnese für sporadische Kolonkarzinome eine Rolle.

1.2.3 Pathophysiologie

Seit Vogelstein 1988 seine bahnbrechende Arbeit über chromosomale Veränderungen in Abhängigkeit vom Stadium kolorektaler Tumoren veröffentlicht hat, gilt die Hypothese einer Adenom-Karzinom-Sequenz als gesichert. Man kann heute vier Gruppen von Kolonkarzinomen unterscheiden:

- 1) Karzinome, die sich aus Adenomen bei familiärer adenomatöser Polyposis (=FAP) entwickeln,
- 2) hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinome (=HNPKK)
- 3) Kolonkarzinome bei Colitis ulcerosa oder juvenilem Polyposis Syndrom (=JPS)
- 4) sporadisch auftretende kolorektale Karzinome.

Die Adenom-Karzinom-Sequenz setzt genomische Veränderungen in Beziehung zu verschiedenen pathologischen Stadien der Entartung. Zuerst finden sich Bereiche aberranter Krypten (aberrant crypt foci = ACF), denen epitheliale Hyperplasie und gutartige Adenome folgen können. Gutartige Adenome können in Abhängigkeit von Lebensalter oder Häufigkeit des Auftretens maligne entarten. Diese Tumorprogression dauert ca. 5 Jahre. Hierbei spielen vier verschiedene Kategorien von genomischen Veränderungen eine Rolle. Dies sind

- 1) kleinere Sequenzveränderungen im Sinne von Punktmutationen, Deletion oder Insertion von wenigen Basenpaaren.
- 2) Veränderungen der Chromosomenanzahl im Sinne von Verlust oder Zugewinn von ganzen Chromosomen (Aneuploidie)
- 3) Chromosomentranslokationen, d.h. Fusion von verschiedenen Chromosomen bzw. Chromosomsegmenten
- 4) Genamplifikationen

Sind mehrere genetische Veränderungen eingetreten, kann eine lokal verdrängende adenomatöse Proliferation in ein unkontrolliertes invasives malignes Wachstum übergehen. In der Regel bilden hierfür aktivierte Onkogene bzw. inaktivierte Tumorsuppressorgene die Endstrecke der Veränderungen. Tumorsuppressorgene sind meist rezessiv, und beide Allele müssen durch

Deletion (loss of heterozygosity = LOH), Mutation oder eine Kombination von beidem verloren gehen. Onkogene können auch schon bei Veränderungen eines Allels wirksam werden.

1.2.4 Einteilung und Prognose

Zur Abschätzung der Prognose und Vergleichbarkeit der diagnostischen und therapeutischen Befunde sind verschiedene Klassifikationssysteme entwickelt worden. Die heute allgemein verbindliche und umfassendste Klassifikation ist das von der UICC (Union International Contre Cancer) erarbeitete TNM-System, aber auch die Einteilung nach Dukes (1929) und die vereinfachte Einteilung der UICC in Stadien sind gebräuchlich. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist abhängig vom Stadium (Tab. 1-2). Sie kann vor allem im TNM Stadium III durch adjuvante Chemotherapie um ca. 10 % verbessert werden.

Tab. 1-2: Stadieneinteilung und stadienabhängige Überlebensrate des kolorektalen Karzinoms (nach Herold, 1999)

| UICC | TNM-System | | Dukes | 5-Jahres-Überlebensrate | |
|------|------------|---------|-------|-------------------------|---------|
| 0 | Tis | N0 | M0 | 100 % | |
| I | T1-2 | N0 | M0 | A | 75-80 % |
| II | T3-4 | N0 | M0 | B | 60-70 % |
| III | jedes T | N1-3 | M0 | C | 40-45 % |
| IV | jedes T | jedes N | M1 | D | < 10 % |

1.2.5 molekulare Grundlagen

Die *familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)* ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die zur Entwicklung eines Colon-Karzinoms prädisponiert. Hier entwickeln sich schon im Lebensalter von 20 bis 30 Jahren Hunderte von Adenomen. Obwohl der einzelne Polyp kein erhöhtes Risiko der malignen Entartung aufweist, erhöht sich das Risiko für das Individuum durch die Vielzahl und das frühe Auftreten der Polypen. Deshalb wird bei FAP-Patienten eine prophylaktische Kolektomie durchgeführt. Zusätzlich haben FAP-Patienten ein erhöhtes Risiko für Schilddrüsen-, Dünndarm-, Magen- oder Hirntumore. Von Powell et al. wurde 1992 nachgewiesen, dass bei 60 % der FAP Patienten im Stadium der Polyposis eine Mutation des

Tumorsuppressorgens APC (adenomatous polyposis carcinogen) nachweisbar ist. APC liegt auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q21). Ist diese Mutation angeboren, entwickeln sich Hunderte von Kolon-Polypen in jungem Alter. Während des weiteren Wachstums und der Zunahme der Dysplasie treten gehäuft Mutationen im Onkogen *K-ras* auf. Sie werden in 10 % der frühen Adenome und 50 % der späten Adenome bzw. Karzinome gefunden (Vogelstein et al. 1988). Die Aktivierung des Onkogens erfolgt, wenn Punktmutationen zu einem spezifischem Aminosäureaustausch in Codon 12, 13 oder 61 des *K-ras p21*-Gens führen. Ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin in Position 35 des Codon 12 ist die am häufigsten in Verbindung mit humanen metastasiertem Colon-Karzinomen auftretende Mutation (Finkelstein et al. 1993).

Bei weiterer Progression des Tumors werden zwei zusätzliche Tumorsuppressorgene inaktiviert (Abb. 1-5). Dies ist zum einen das DCC-Gen (Deleted in Colorectal Cancer), welches bei 50-70 % der späten Adenome und Karzinome durch Allel-Verlust von Chromosom 18q verloren gegangen ist (Fearon et al. 1990). Zum anderen ist dies das *p53*-Supressorgen, lokalisiert auf Chromosom 17p. Hier findet sich üblicherweise ein missense Basenaustausch, der am häufigsten in vier hochkonservierten Regionen der Exons 5-8 vorkommt. Solche Mutationen finden sich bei 30 % der späten Adenome und in 75 % der Karzinome (Kikuchi-Yanoshita et al. 1992).

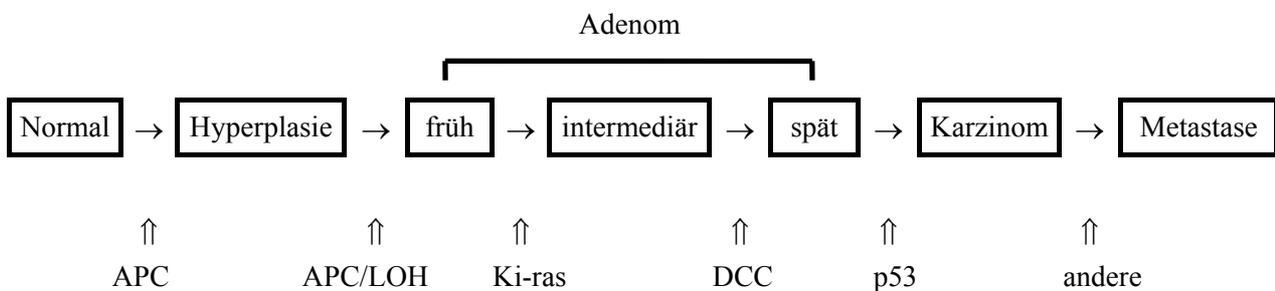


Abb. 1-5: genomische Veränderungen im Laufe der Kolonkarzinom-Entstehung

Bei den **hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinomen (HNPCK)** treten Karzinome gehäuft in einer Familie hauptsächlich im Bereich des proximalen Kolons ohne Vorhandensein von multiplen prädisponierenden Polypen auf. Henry Lynch beschäftigte sich mit dieser Gruppe von Kolonkarzinomen sehr eingehend, so daß dieses Syndrom auch als Lynch-Syndrom bekannt ist. Die Karzinomentstehung wird autosomal dominant vererbt, und 15 % der Kolonkarzinome gehören zu dieser Gruppe. Die Rate der malignen Transformation erscheint bei ihnen höher als bei den sporadischen Kolonkarzinomen. Zusätzlich ist das Risiko für Zweitkarzinome wie Endometrium- und Magenkarzinome erhöht (Lynch et al., 1991). Mit dieser Gruppe wird eine

weitere Art von genomischen Veränderungen in Verbindung gebracht. Dies sind Veränderungen der Mikrosatelliten-DNA in verschiedenen Bereichen des Genoms. Mit diesen zusammen tritt ein Genlocus auf Chromosom 2 in Erscheinung (Peltomaki et al., 1993), der die Gene für das mismatch repair System trägt. Dies ist verantwortlich für die Erkennung und Reparatur von Basenfehlpaarungen und Einzelstrang-DNA-Loops in der Größe von 1-4 Basen entstanden durch Insertion oder Deletion. Es umfaßt bisher insgesamt 6 Gene, die in Anlehnung an das vorher bekannte mismatch repair System der Bakterien benannt sind. (MutS Homologe hMsh2, hMsh3, hMsh6 und MutL Homologe hMlh1, hPms1, hPms2). Bei 70 % der HNPCK-Nachfahren konnten Keimbahnmutationen in hMsh2, hMlh1, hPms1 oder hPms2 nachgewiesen werden (Liu, et al., 1996). Kommt es hier zum Verlust oder Mutation des Wildtyp-Allels, kann keine mismatch-repair-Aktivität mehr nachgewiesen werden (Parsons et al., 1993). Daraus resultierend kommt es zu oben genannten Basenfehlpaarungen bevorzugt im Bereich von Mikrosatelliten-DNA. Zusätzlich zu dieser speziellen Art der Mutationen kommt es noch zu Mutationen in anderen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen wie APC, DCC und p53 (Huang et al., 1996; Ionov, et al., 1993; Konishi et al., 1996).

Patienten mit *juvenilem Polyposis Syndrom* entwickeln hamartomatöse Polypen. Sie haben gegenüber nicht erkrankten Personen ein erhöhtes Karzinomrisiko. Bei diesen Polypen proliferieren hauptsächlich Stromazellen, bei denen klonale Veränderungen nachgewiesen werden konnten. Diese betreffen Mutationen in PTEN (Lynch et al. 1997) und SMAD4 (Howe et al 1998), wovon letzteres im Signaltransduktionsweg des TGF- β -Rezeptors eine Rolle spielt. TGF- β hemmt das Wachstum normaler Zellen, und viele Tumorzellen sind resistent für die wachstumshemmende Wirkung von TGF- β (Fynan & Reiss, 1993). Hier stellt sich die Frage, ob über eine Veränderung des Mikroenvironments eine maligne Entartung der Epithelzellen getriggert werden kann (Kinzler und Vogelstein, 1998a). Diese Art der Karzinomentstehung ist zumindest bei der **Colitis ulcerosa** bekannt. Hier führt die Autoimmunerkrankung zu ständiger Entzündung und zystischem Epithel, welches nach ca. 15 Jahren maligne entarten kann. Der Entzündungsreiz führt zu ständiger Regeneration des Epithels und erhöht offenbar die Wahrscheinlichkeit von somatischen Mutationen.

Das *sporadisches Kolonkarzinom* entwickelt sich sehr häufig aus gutartigen Adenomen, die fast die Hälfte der Menschen in westlichen Industrieländern im Alter von 70 Jahren aufweisen. Das Gesamtrisiko für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms aus einem Adenom liegt bei ca. 5 %. Auch hier findet man genomische Veränderungen der „Endstrecke“, d.h. Mutationen in APC-, k-ras, p53 und anderen Genen. So kann man bei sporadischen Formen der Polyposis in gleichem Ausmaß wie bei FAP-Patienten Mutationen im APC-Gen finden (Nakamura et al. 1991). Auch

Punktmutationen im nukleären Genom im Sinne der HNPCK sieht man bei sporadischen Karzinomen (Barrett et al. 1990).

Das ***ras-Onkogen*** liegt in drei verschiedenen zellulären Varianten als *k-ras*, *h-ras*- und *n-ras* an verschiedenen Stellen des Genoms vor. Namensgebend waren die das Genom transformierenden Virenstämme Kirsten und Harvey Ratten-Sarkoma-Viren. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesen *ras*-Genen verantwortlich für die maligne Entartung für Zellen in Zellkultur sein können. (Bishop, J.M., 1991). In ca. 50 % der kolorektalen Karzinome > 1cm und 50 % der Adenokarzinome werden spezifische Mutationen im *k-ras*- oder *n-ras*-Gen gefunden. Diese betreffen meist Kodon 12 und 13 von *k-ras* (85 %), der Rest wird in Kodon 61 von *k*- oder *n-ras* gefunden. Ersetzt man das mutierte *ras*-Gen durch homologe Rekombination, verliert die Tumorzelle ihre malignen Eigenschaften in vitro (Shirasawa et al., 1993). *Ras*-Gen Mutationen sind jedoch nicht auf dysplastische Veränderungen beschränkt. In ACF findet man sie zu 100 % und in hyperplastischen Polypen zu 25 %. *Ras*-Mutationen spielen bei der Karzinom-Entwicklung also eine wichtige Rolle. Das *k-ras*-Gen codiert eine GTPase, welche an der Innenseite der Zellmembran liegt. Sie vermittelt im GTP-aktivierten Zustand Wachstumsfaktor-Signale und wird durch ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) zusätzlich reguliert. Die Mutation auf *einem* Allel reicht aus, um eine onkogene Aktivierung zu bewirken.

Das ***p53-Gen*** liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 (17p) und fungiert als Tumor-Suppressor-Gen (Baker et al., 1989). **Das *p53-Protein*** ist ein 393 Aminosäuren umfassendes Phosphoprotein, welches als Tetramer vorliegt. Seine Expression wird durch DNA-Schädigung (z.B. durch UV-Strahlung) aktiviert. Es bindet an eine spezifische Gensequenz und bewirkt damit, dass die Zelle durch Aktivierung von wachstumshemmenden Genen im G1-Stadium des Zellzyklus verharret. In der so „gewonnenen“ Zeit wird entweder die Mutation repariert oder Apoptose eingeleitet. Schon einzelne Punktmutationen können die Bindung an diese spezifischen DNA-Regionen und die Tumorsuppressorfunktion von p53 beeinträchtigen. Genomische Mutationen können akkumulieren (Lane 1992), da das durch *p53*-Protein vermittelte Verweilen im G1-Stadium ausbleibt.

Das ***DCC-Genprodukt*** liegt auf dem langen Arm von Chromosom 18 (18q). In sporadischen Kolonkarzinomen ist zu 73 % ein Allel des Chromosoms 18q verloren gegangen, während der Anteil verlorener Allele bei weniger weit fortgeschrittenen Adenomen kleiner ist (Kinzler&Vogelstein, 1998b). Einem Teil der Karzinome mit gestörtem Mismatch Repair System fehlt ebenfalls die DCC-Expression. Da sich ein gestörtes Mismatch Repair System besonders auf lange Wiederholungssequenzen auswirkt, ist eine Schädigung der langen Wiederholungssequenz in einem DCC Intron als Ursache für die fehlende Expression

anzunehmen (Fearon et al., 1990). Das DCC-Protein ähnelt stark dem neural cellular adhesion molecule (N-CAM). Die CAM's vermitteln Zell-Zell-Adhäsion sowie über die Interaktion mit dem Zytoskelett auch Prozesse wie Zellmigration, Proliferation, Differenzierung und Signal-Transduktion. Es wird eine Korrelation zwischen dem Anteil zytostrukturell unreifer Zellen und dem Fortschreiten in der Adenom-Karzinom-Sequenz angenommen (Ho, 1992). Ein weiterer Hinweis auf die Funktion des DCC-Gens als Tumorsuppressorgen fand sich durch die Transfektion von DCC-defizienten Tumorzellen mit dem DCC-Gen: Der Phänotyp veränderte sich und das Tumorwachstum wurde inhibiert (Klingelhutz et al., 1995).

Ebenfalls auf Chromosom 18 liegt das *Deleted in Pancreatic Cancer 4 (DPC4)* Tumorsuppressorgen. Ursprünglich in 90 % der Pankreaskarzinome nachgewiesen, finden sich auch Hinweise auf dessen Vorhandensein in kolorektalen Karzinomen (Thiagalingam et al., 1996). Das DPC4-Genprodukt weist Homologien zu Proteinen auf, die bei der Transforming-Growth-Factor beta (TGF- β) Signalkette eine Rolle spielen (s.o.).

Das *APC-Gen* liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q21). Chromosom 5 Verluste werden bei 20-50% der sporadischen Kolonkarzinome und bei allen FAP-Patienten gefunden (Nishisho et al., 1991). Bei letzteren Patienten ist dieser Verlust eine Keimbahnmutation. Der Verlust des APC-Allels ist schon in gutartigen Tumoren häufig nachzuweisen, so dass dieser Vorgang ein frühes Ereignis der Karzinogenese zu sein scheint (Powell et al., 1992). Das Genprodukt besteht aus 2843 Aminosäuren und beinhaltet mindestens 7 verschiedene Funktionsdomänen. Fast alle bekannten Mutationen führen zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation mit verkürzter Aminosäurekette. Bei den sporadischen, somatischen Mutationen liegen sie bevorzugt im Zentrum des open reading frame, während sie bei den Keimbahn-Mutationen vermehrt am 5'-Ende der APC-Sequenz vorkommen (Polakis, 1997). Die sieben Funktionsdomänen sind verantwortlich für die Bindung des APC mit sich selbst, mit Cateninen, Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3- β), Mikrotubuli, EBI-Protein und dem human discs large protein (hdlg).

Catenine spielen eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion (Ozawa. et al. 1989). Außerdem sind sie Bestandteil eines Signaltransduktionsweges, welcher T-Zell-Faktor (=TCF) / β -Catenin-abhängig Transkription steuert (Behrens, J. et al. 1996). Wildtyp-APC bindet β -Catenin und hindert es an der Interaktion mit TCF, indem es durch GSK3- β phosphoryliert und abgebaut wird (Morin, J., 1999). Bei Vorhandensein von mutiertem APC beobachtet man oft erhöhte Mengen an TCF gebundenem β -Catenin, welches die Transkription hochreguliert.

Im Bereich des C-terminalen Endes sind auffallend viele Arginin-, Lysin- und Prolin-Reste enthalten. Dies ist eine Eigenschaft von mikrotubulär assoziierten Proteinen (Aizawa, H. et al.

1990). In vitro Experimente konnten für das C-terminale Ende des APC-Proteins zeigen, dass es Tubulin-Polymerisation vermittelt (Munemitsu et al., 1994).

Welche Rolle die Oligomerisierung des APC-Produktes spielt, ist zur Zeit noch unklar. Ebenfalls weiß man noch nicht viel über die Bedeutung der hdlg-Proteinbindungsstelle und die EB1-Bindungsstelle des APC-Genproduktes.

2 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob bei intestinalen Tumoren gehäuft mitochondriale DNA-Mutationen vorkommen. Dazu wurde das gesamte Mitochondriengenom von 20 intestinalen Tumorproben im Vergleich zu den zugehörigen tumorfreien intestinalen Gewebeproben auf Punktmutationen untersucht. Die gefundenen Mutationen werden hinsichtlich ihrer möglichen funktionellen Auswirkungen diskutiert.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten 20 Gewebeproben von intestinalen Primärtumoren und die tumorfreien, intestinalen Gewebeproben von jeweils demselben Patienten als Kontrolle (im Folgenden mit E.-Nr/Tu bzw. E.-Nr/oB bezeichnet). Die Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. W. Müller aus dem Institut für Pathologie, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt und histologisch aufgearbeitet. Sie waren von Operationsmaterial gewonnen und bis zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion bei -20°C aufbewahrt worden. Tab. 3-1 gibt einen Überblick über die untersuchten Tumoren.

Tab. 3-1: Gewebeproben

| E.-Nr. | Lokalisation | Alter Patient (Jahre) | pT | pN | pM | Grading | R-Status | Tumorgröße (cm) |
|----------|---------------|-----------------------|----|----|----|---------|----------|-----------------|
| 25152/00 | Sigma | 80 | 4 | 2 | X | 2 | 0 | 6 |
| 25743/00 | C. ascendens | 69 | 3 | 2 | X | 2 | 0 | 6 |
| 26277/00 | Sigma | 77 | 3 | 0 | X | 2 | 0 | 6,5 |
| 26395/00 | Sigma | 51 | 3 | 0 | X | 2 | 0 | 6 |
| 26832/00 | Rektum | 55 | 2 | 1 | X | 2 | 0 | 5 |
| 27561/00 | Rektum | 53 | 2 | 0 | X | 2 | 0 | 7 |
| 27562/00 | C. descendens | 77 | 4 | 1 | X | 2 | 0 | 8 |
| 27665/00 | Rektum | 79 | 2 | 0 | X | 2 | 0 | 4,5 |
| 29385/00 | Rektum | 65 | 3 | 2 | X | 2 | 0 | 4 |
| 30385/00 | Rektum | 81 | 3 | 1 | X | 2 | 0 | 7 |
| 32435/00 | Sigma | 62 | 3 | 1 | X | 2 | 0 | 7 |
| 32530/00 | Sigma | 56 | 3 | 0 | X | 2 | 0 | 6 |
| 32836/00 | Rektum | 58 | 2 | 0 | X | 2 | 0 | 5 |
| 33464/00 | Sigma | 75 | 3 | 0 | X | 2 | 0 | 7,5 |
| 823/01 | Rektum | 67 | 3 | 0 | X | 3 | 0 | 6,5 |
| 1112/01 | Sigma | 61 | 3 | 1 | X | 2 | 0 | 4,5 |
| 27853/00 | Magen-Ca | 70 | 4 | 2 | X | 3 | 0 | 5 |
| 29152/00 | Magen-Ca | 48 | 2 | 2 | X | 3 | 0 | 6 |
| 29934/00 | Magen-Ca | 80 | 1 | 0 | X | 2 | 1 | 4 |
| 33763/00 | Magen-Ca | 81 | 3 | 3 | X | 3 | 0 | 20 |

3.2 DNA-Extraktion

Zur DNA-Extraktion wurde ein kommerzieller DNA-Extraktionskit nach Herstellerangaben verwendet (QIAamp[®] DNA Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden): 20-40 mg Gewebe wurde mit Lysepuffer und Proteinase K bis zu 24 Stunden bei 56°C inkubiert, um den Gewebeverband zu zerstören. Anschließend wurde die gewonnene Zellsuspension während einer zehnmütigen Inkubationszeit bei 76°C mit Guanidinhydrochlorid-haltigem Puffer lysiert. Das Lysat wurde auf eine QIAamp Spinsäule aufgebracht und bei 8000 U/min 60 s zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Säulenmatrix und kann durch zwei anschließende Waschschrirte von allen Verunreinigungen befreit werden. Im letzten Arbeitsschritt wurde die DNA mit Aqua dest. von der Säulenmatrix gelöst und eluiert. Es wird mit dieser Extraktion sowohl nukleäre als auch mitochondriale DNA gewonnen.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden bei jeder Gewebeprobe überlappende mtDNA-Segmente amplifiziert, die in ihrer Gesamtheit das vollständige mitochondriale Genom repräsentieren. Angaben zur genauen, auf die Cambridge-Sequenz (Anderson et al. 1981) bezogenen Position und Länge der Segmente sind dem Anhang 1 zu entnehmen. Die Amplifizierung der mtDNA-Segmente erfolgte jeweils mit einer PCR von 35 Zyklen. Ein Zyklus bestand aus 60 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 60 Sekunden Primerhybridisierung bei 49-59°C (abhängig von der Hybridisierungstemperatur der jeweiligen Primer) und 60 Sekunden DNA-Polymerisation bei 72°C. In 50 µl Reaktionsgemisch befanden sich neben 1,5 µl des unverdünnten Tumorlysats 40 pmol des jeweiligen Primers, 5 µl 10 x ThermoPol Reaktionspuffer, 1U Vent_R[®] DNA Polymerase (beides New England BioLabs Inc.) und jeweils 20 pmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Das Endvolumen von 50 µl wurde durch Zugabe von entsprechender Menge Aqua dest. erreicht. Die Primer wurden nach eigenen Vorgaben von der Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg hergestellt. Die automatische Steuerung der Zyklen wurde mit PCR-Geräten der Fa. Perkin-Elmer (GeneAmp System 9600) bzw. der Fa. Biometra (T3 Thermocycler) durchgeführt. Nach Beendigung der Amplifizierung wurden die PCR-Produkte durch Elektrophorese in einem Ethidiumbromid-haltigen 2%igen Agarosegel sichtbar gemacht. Als DNA-Marker wurde jeweils 1 µg pGEM[®] DNA Marker (Promega Corporation, Madison, WI) eingesetzt, der DNA-Fragmente zwischen ca. 50 und 2700

Basenpaaren enthält. 10 µl PCR-Amplifikat, 1 µg DNA-Marker und jeweils 2 µl 6x Blue/Orange Loading Dye (Promega) wurden gemischt und auf das Gel aufgetragen.

3.3.1 Lösungen für PCR und Agarose-Gelelektrophorese

| | |
|-----------------------------------|---|
| 1 x ThermoPol Puffer | 10 mM KCl 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM Tris-HCl 2,0 mM MgSO ₄ 0,1 % Triton-X 100 pH 8,8 bei 25°C |
| 50 x TAE | 2 M Tris-HCl 1 M Essigsäure 96% 50 mM EDTA 121,1 g Tris-HCl, 28,33 ml Essigsäure und 9,31 g EDTA werden mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. |
| Ethidiumbromid | 10 mg/ml |
| Agarosegel | 2 % Agarose 5 g Agarosepulver werden in 250 ml TAE-Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. 5 µl Ethidiumbromid hinzugeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilen. Fertige Lösung in die Gelkammer gießen, ggf. Luftblasen entfernen und erkalten lassen. |
| 6x Blue/Orange Loading Dye | 0,03% Bromphenol Blau 0,03% Xylen-Cyanol FF 0,4% Orange G 15% Ficoll® 400 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 500 mM EDTA (pH 8,0) |

3.4 Suche nach Punktmutationen der mtDNA mit Hilfe der Heteroduplex-Analyse

Die Suche nach Punktmutationen in der gesamten mitochondrialen DNA in 20 Gewebeproben von intestinalen Tumoren und den zugehörigen Normalgewebeproben erforderte eine effektive

Scanning-Methode. Die automatisierte DNA-Sequenzierung erschien nicht geeignet, da sich hiermit heteroplasmische Mutationen der mitochondrialen DNA nicht sicher von Artefakten unterscheiden lassen. Die Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE) stellt zwar ein sicheres Nachweisverfahren für homo- und heteroplasmische Punktmutationen dar, ist jedoch sehr zeitaufwendig. Mit der denaturierenden HPLC steht jetzt eine Untersuchungsmethode zur Verfügung, die überschaubare Genombereiche einer gründlichen Heteroduplexanalyse zugänglich macht, da halbautomatisiert zahlreiche Proben gleichzeitig bearbeitet werden können.

3.4.1 Prinzip der Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE-System

Die Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE-System beruht auf dem Verfahren der denaturierenden HPLC. Dieses Verfahren nutzt drei Prinzipien gleichzeitig – die klassische Chromatographie, die Separation von DNA in Abhängigkeit von ihrer Fragmentlänge und die Separation gleich langer DNA-Fragmente aufgrund unterschiedlich starker Bindung an eine Säule in einem Lösungsmittelgradienten. Das zu analysierende Material wird in einer flüssigen Phase über eine stationäre Phase (hydrophobe Säule) transportiert und in Abhängigkeit von seinen Bindungseigenschaften in der stationären Phase retardiert. Unterschiedliche Fraktionen des Analysats passieren zu verschiedenen Zeiten einen UV-Detektor (s. Abb. 3-1).

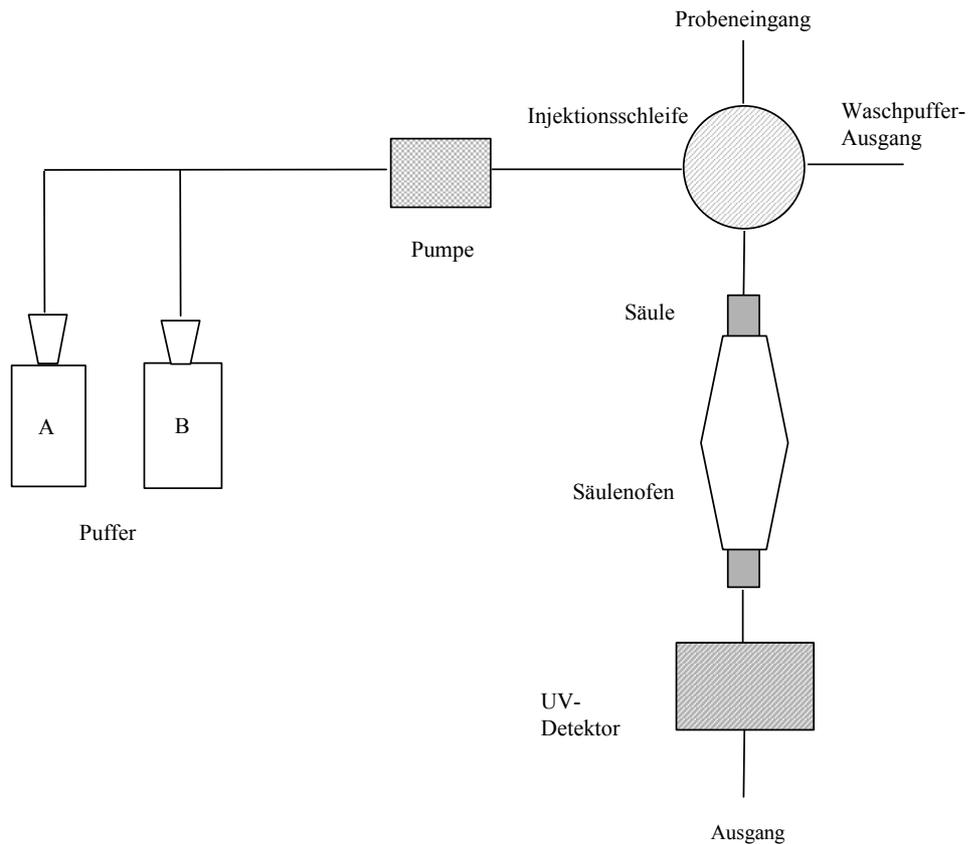


Abb. 3-1: Schema des WAVE-Systems (nach Transgenomic Preinstallation Guide, 1999)

Die DNA interagiert nicht direkt mit der stationären Phase, sondern ein „Brücken-Molekül“ vermittelt ähnlich wie ein Detergenz die Bindung an die hydrophobe Säule. Nukleinsäuren sind durch die Phosphatreste negativ geladen. Das Brückenmolekül, in diesem Fall Triethylammonium-Azetat (TEAA), besteht einerseits aus positiv geladenen Ionen, die die Nukleinsäuren binden, andererseits hat es hydrophobe, neutrale Anteile, die mit der stationären Phase der Säule interagieren können. Je länger das DNA-Fragment, desto mehr negative Ladung ist vorhanden und desto mehr TEAA-Moleküle werden gebunden. Gleichzeitig bedeuten mehr TEAA-Moleküle auch eine stärkere Bindung an die stationäre Phase. Die hydrophobe Bindung zwischen der stationären Phase und dem Brückenmolekül kann durch ansteigende Konzentration von Azetonitril in der flüssigen Phase gelöst werden. Mit steigendem Azetonitril-Gradienten werden dementsprechend immer längere DNA-Fragmente abgelöst. Das hat zur Folge, dass während eines Probenlaufs zuerst kürzere und dann längere DNA-Fragmente detektiert werden.

3.4.2 Heteroplasmie-Detektion

Es gibt zahlreiche Polymorphismen der mtDNA. Interindividuelle Unterschiede der Basensequenz der mtDNA sind demnach nicht gleichbedeutend mit pathogenetisch bedeutsamen Mutationen. Nach Shoffner und Wallace (1994) ergibt der Vergleich der mtDNA zweier Individuen im Durchschnitt ca. 50 Unterschiede. Dies erschwert die Suche nach krankheitsassoziierten Punktmutationen innerhalb der mtDNA. Bei der Hybridisierung mit einer beliebigen Referenz-DNA sind für jede Gewebeprobe eine Vielzahl von Basenfehlpaarungen zu erwarten, die durch unterschiedliche Polymorphismen verursacht werden.

Eine elegante Methode, dieses Problem zu vermeiden, ist der Verzicht auf einen *interindividuellen* Vergleich zugunsten einer *intraindividuellen* Heteroduplex-Analyse. Ein positiver Heteroduplexbefund zeigt an, dass gleichzeitig verschiedene mtDNA-Populationen (Wildtyp und Mutante) vorliegen. Die Heteroduplexanalyse mittels WAVE-System kann somit den zuverlässigen Hinweis auf eine mitochondriale Punktmutation erbringen.

Ein theoretischer Nachteil der *intraindividuellen* Analyse könnte sich bei einer Punktmutation ergeben, die sich innerhalb des prämaligen Klons vollständig durchgesetzt hat. In diesem Fall kann keine Heteroplasmie entdeckt werden. Dem ist entgegenzusetzen, dass sich auch bei soliden Tumoren immer Zellen finden, die nicht dem malignen Klon angehören. Anzuführen sind hier z.B. Endothelzellen aus einsprossenden Gefäßen. Da deren Anteil eventuell gering ist, kann man sich der DNA des Normalgewebes desselben Individuums bedienen. Diese wird mit der Tumor-DNA gemischt und der De- und Renaturierung unterworfen. Ist eine Punktmutation vorhanden, werden sich bei der Renaturierung neben den Homoduplices auch Heteroduplices bilden (s. Abb. 3-1).

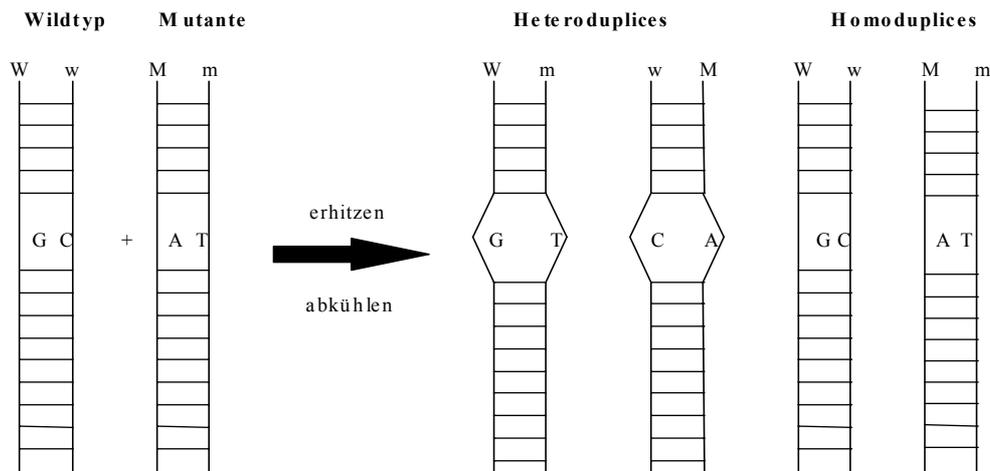


Abb. 3-2: Heteroduplex-Bildung nach De- und Renaturierung eines DNA-Gemisches aus normaler (Ww) und mutierter (Mm) DNA.

Das WAVE-System ist in der Lage, Heteroduplices von Homoduplices zu trennen und damit Punktmutationen nachzuweisen. Hierzu ist eine thermische Einheit integriert, die das Fragment-Gemisch der zu untersuchenden PCR-Produkte während der HPLC erhitzt. Mit zunehmender Temperatur kommt es zu einer fortschreitenden Denaturierung doppelsträngiger DNA. Dabei ist die Stabilität des Doppelstrangs abhängig von der Art der Basenpaarung. Basenstapelkräfte und Wasserstoffbrückenbindungsenergie sind bei der Paarung von Adenin und Thymin geringer als bei der Paarung von Guanin und Cytosin. Als Resultat denaturiert ein stark GC-haltiger Doppelstrang erst bei höheren Temperaturen als ein gleich langer, aber vorwiegend AT-haltiger Doppelstrang. Ist nach vorheriger De- und Renaturierung eine Basenfehlpaarung an Stelle einer Punktmutation vorhanden (Heteroduplex), dann fehlen hier die entsprechenden Bindungskräfte. Durch diese Destabilisierung denaturieren Heteroduplices bei niedrigerer Temperatur als die entsprechenden Homoduplex-Moleküle.

Aufgrund ihres unterschiedlichen Denaturierungszustandes können bei korrekt gewählter Temperatur im optimalen Fall alle 4 Doppelstrang-Populationen detektiert werden, die sich bei der De- und Renaturierung gebildet haben (Abb. 3-3).

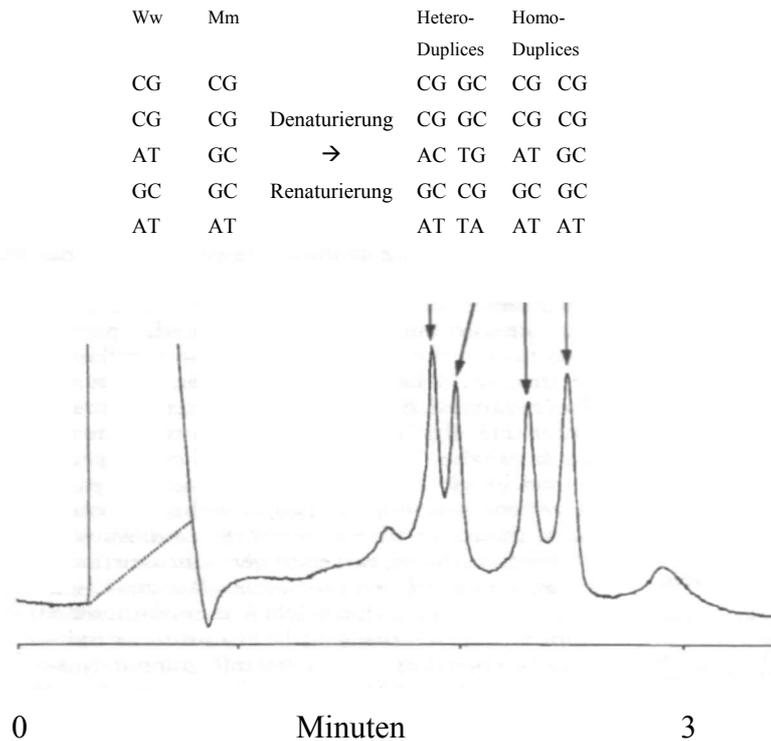


Abb. 3-3: Ergebnis einer denaturierenden HPLC bei einem Wildtyp/Mutante-DNA-Gemisch (nach Xiao and Oefner 2001)

Nach De- und Renaturierung eines Gemisches von PCR-Amplifikaten von Wildtyp (Ww) und Mutante (Mm) bilden sich Hetero- und Homoduplices. Bei 56°C weisen die Heteroduplices bereits eine partielle Denaturierung auf und werden deshalb schneller eluiert als die Homoduplices.

3.4.3 Lösungen für die dHPLC

20 x TEAA 2 M Triethylammonium-Azetat

Puffer A 0,1 M TEAA
50 ml 20xTEAA werden mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

Puffer B 0,1 M TEAA
25 % Azetonitril
50 ml 20xTEAA und 250 ml Azetonitril werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Injektionspuffer 8 % Azetonitril
80 ml Azetonitril werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Waschpuffer 75 % Azetonitril
750 ml Azetonitril werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

3.4.4 PCR-amplifizierte mtDNA-Segmente für die Heteroduplex-Analyse

Eine Liste der Position der mtDNA-Segmente, die mit PCR amplifiziert und anschließend mittels Heteroduplex-Analyse untersucht wurden, findet sich im Anhang 1 der Arbeit.

3.5 Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

Die Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) hat sich beim Nachweis von Heteroplasmien bewährt (Gattermann, 1999). Wegen des wesentlich größeren Aufwands im Vergleich zum WAVE-System eignet sie sich jedoch nur bedingt für die Untersuchung zahlreicher Proben auf Mutationen im gesamten Mitochondriengenom. Zu Verwendungsbeginn des WAVE-Systems wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte TGGE-Verfahren zur Bestätigung der im WAVE gewonnenen heteroplasmischen Befunde im COX III-Gen eingesetzt, wo die meisten Heteroplasmien nachgewiesen wurden.

3.5.1 Prinzip der TGGE

Die TGGE besitzt gegenüber der konventionellen Gelelektrophorese den Vorteil, dass sie Moleküle nicht nur nach Größe, Form und Ladung separiert. Zusätzlich nimmt auch hier die temperaturabhängige Konformation der DNA Einfluß auf die Auftrennung. Mit zunehmender Temperatur kommt es zu einer fortschreitenden Denaturierung doppelsträngiger DNA zu Einzelsträngen. Es entstehen Molekülkonformationen, die eine größere „Sperrigkeit“ im Gel bewirken. So besitzt partiell denaturierte DNA mit einer Y-förmigen Gestalt im Vergleich zu nicht denaturierter doppelsträngiger DNA einen wesentlich höheren Reibungswiderstand. Folglich vermindert sich die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Molekülen im Temperaturgradienten entsprechend ihrer zunehmenden Denaturierung (Riesner et al. 1989, Riesner et al. 1991).

Jeder DNA-Abschnitt zeigt in der TGGE eine charakteristische Übergangskurve, die den temperaturabhängigen Übergang des Moleküls zwischen den verschiedenen Konformationen beschreibt. Diese verschiedenen Konformationen bedingen unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten innerhalb des Gels. In der Abb. 3-4 wird eine solche Schmelzkurve schematisch erläutert.

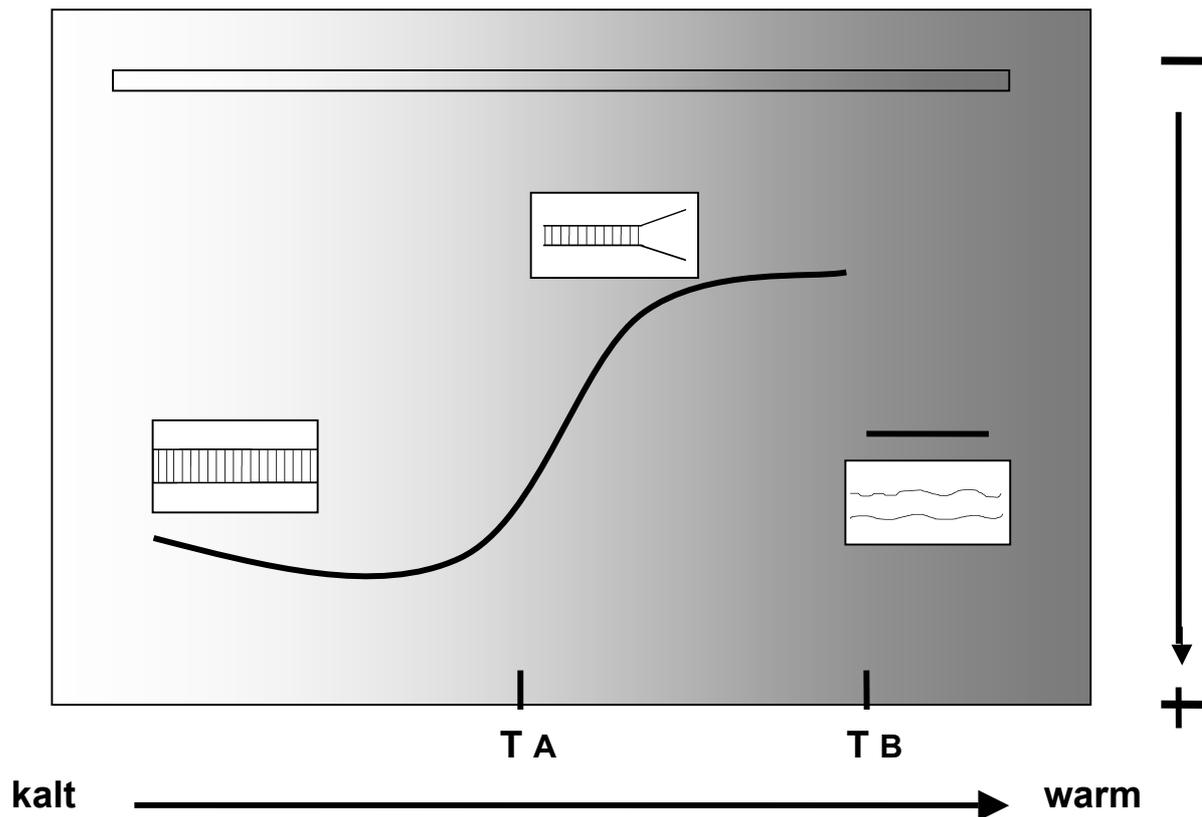


Abb. 3-4: Beispiel einer Schmelzkurve in der senkrechten TGGE

Die zu untersuchende DNA-Probe wird am Minuspol in eine, die gesamte Breite des Gels einnehmende, Gel-Tasche aufgetragen. Senkrecht zur Laufrichtung wird ein Temperaturgradient angelegt, d.h. Moleküle auf der linken Seite wandern in einer geringen, Moleküle auf der rechten Seite wandern in einer hohen Temperatur vom Minus- zum Pluspol.

Im abgebildeten Beispiel wurde das Denaturierungsverhalten einer doppelsträngigen Nukleinsäure analysiert. Es zeigen sich in höheren Temperaturbereichen zwei Denaturierungsübergänge. Im ersten Übergangsbereich (bei Temperatur TA) kommt es zur teilweisen, Y-förmigen Denaturierung der Doppelhelix. Im zweiten Übergangsbereich kommt es zur kompletten Trennung der Doppelstränge in Einzelstränge. Die partielle Denaturierung im ersten Übergangsbereich führt zur deutlichen Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit. Dagegen läßt sich im zweiten Übergangsbereich (bei Temperatur TB) eine abrupte Zunahme der Geschwindigkeit durch vollständige Dissoziation in Einzelstränge erkennen. Nach Färbung der Nukleinsäure im Gel ist die thermische Denaturierung als Übergangskurve abgebildet.

Liegt innerhalb einer doppelsträngigen DNA eine Mutation mit Veränderung der Nukleotidsequenz vor, so ändert sich die Übergangskurve der DNA. Dies ist auf eine Veränderung der Denaturierungstemperatur des betroffenen Abschnitts zurückzuführen. Handelt es sich hierbei lediglich um den Austausch eines einzigen Basenpaares in doppelsträngiger DNA (Punktmutation), so wird die thermische Stabilität in den meisten Fällen nur gering verändert, so dass die Übergangskurve kaum Abweichung im Vergleich zu einer Probe ohne Mutation zeigt. Dies trifft besonders für Transversionen zu, bei denen ein Austausch von G:C zu C:G oder A:T zu T:A stattfindet. Im Gegensatz dazu ist ein Austausch von A:T zu G:C oder multiple Punktmutationen bzw. Deletionen oder Insertionen einfacher zu entdecken. Durch die Bildung

von Hybriden aus Wildtyp und Mutante durch Denaturierung und anschließende Renaturierung läßt sich die Sensitivität der Methode so weit steigern, dass der Nachweis nahezu aller Mutationen erbracht werden kann (s.o.).

Es ist somit möglich, mittels Hybridisierung von homologer Referenz-DNA und mutanter DNA, die sich mindestens in einer Basenposition unterscheiden, anhand der Bildung von Hetero- und Homoduplices diese Mutationen durch eine charakteristische Veränderung der Übergangskurve in der TGGE nachzuweisen. Die TGGE erlaubt allerdings keine Aussage über den genauen Ort und die Art einer Mutation. Hierzu ist die gezielte DNA-Sequenzierung des betroffenen Genabschnittes erforderlich.

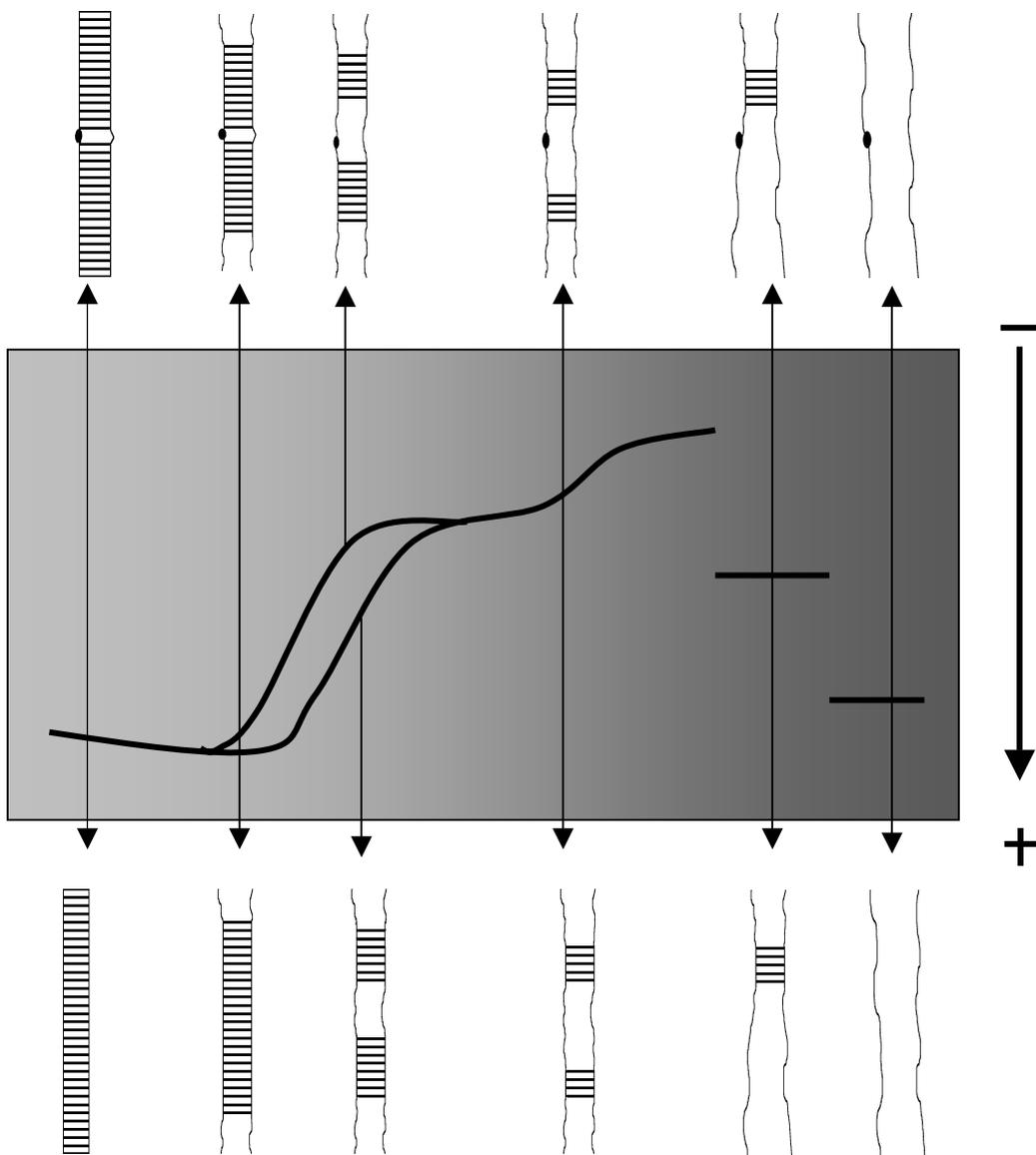


Abb. 3-5: Temperaturabhängige Denaturierung der Homo- und Heteroduplices und ihre Zuordnung zu den entsprechenden Abschnitten der TGGE-Schmelzkurve.

3.5.2 MtdNA-Segmente zur TGGE-Analyse

Für die Suche nach Heteroduplices mit der TGGE wurden die schon von Tapprich 2002 beschriebenen Primer genutzt. Die Positionen der Segmente sind in der folgenden Tabelle (Tab. 3-2) angegeben. Jeweils einer der beiden Primer eines Paares wurde durch Psoralen und zwei zusätzliche Adenin-Nukleotide (Psoralen-AA) am 5'-Ende modifiziert. Dies diente zur Verhinderung der vollständigen Dissoziation der doppelsträngigen PCR-Produkte während der Denaturierungsphase der TGGE. Psoralen interkaliert zwischen A-T-Basenpaaren einer Doppelhelix und stellt zwischen beiden eine kovalente Bindung her, wenn mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt wird. Die Crosslinking-Effektivität beträgt dabei etwa 50% (Wiese et al. 1995).

Alle in der TGGE eingesetzten Proben wurden mit einem Deckgläschen gegen UV-Strahlung <340 nm geschützt und 25 Minuten mit einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt.

Tab. 3-2: Oligonukleotide für die PCR der TGGE-analysierten COX III-Genabschnitte

| Cox III (np 9207-9990) | | | | |
|-------------------------------|------------|-----------------------|------------------------|--|
| Nr. | Länge [bp] | Primer | Position | Sequenz |
| XV | 204 | F 9155 R 9334 Psa* | 9155-9176 9358-9334 | 5' AAGCC TACGT TTTCA CACTT CT 3' 5' GTGTT GGTTA GTAGG CCTAG TATGA 3' |
| XVI | 235 | F 9270 R 9480 Psa* | 9270-9292 9504-9480 | 5' CTCTC AGCCC TCCTA ATGAC CTC 3' 5' CTCAG AAAAA TCCTG CGAAG AAAAA A 3' |
| XIX | 213 | F 9669 R 9857 Psa* | 9669-9693 9881-9857 | 5' AACCG AAACC AAATA AGCAC 3' 5' AAATA TTAGT TGGCG GATGA AGCAG 3' |

*Psoralen-Modifikation am 5'-Ende des Primers

3.5.3 Technische Handhabung der senkrechten TGGE

Bei der senkrechten Gelelektrophorese wird ein Temperaturgradient senkrecht zur Laufrichtung der Probe angelegt. Der Gradient wird durch eine Metallplatte erzeugt, die an zwei gegenüberliegenden Kanten mit je einem Thermostat verbunden ist. Dabei bedarf es auf der Seite der hohen Temperatur nur eines einfachen Thermostats. Auf der gegenüberliegenden Seite wird dagegen ein Kryostat mit guter Kühlleistung eingesetzt. Dieser gewährleistet eine konstante Temperatur trotz Wärmefluß von der wärmeren Seite. Zwischen beiden Kanten bildet sich nun ein linearer Temperaturgradient aus.

Die Platte (190 x 210 mm) mit doppelten, seitlichen Temperierkanälen ist aus einem kompletten Aluminiumblock hergestellt und durch eine umschließende Sinterschicht aus Polyamid bis 500 V elektrisch isoliert. Das komplette System wurde mit einer speziellen transparenten Elektrophoresekammer von der Fa. Biometra, Göttingen, bezogen.

Das Polyacrylamid-Gel wird auf einer 0,25 mm starken Gel-Bond-Folie kovalent polymerisiert, die vorher auf eine Glasplatte angepreßt wurde. Diese Folie stellt die Unterseite des Gels dar. Die Oberseite wird durch eine Glasplatte gebildet, die gleichzeitig durch Impression eine ca. 18 cm lange Geltasche auf dem Gel formt. Beide Platten sind durch 1 mm dicke Spacer getrennt, die auch während der Polymerisierung als Abdichtung dienen.

Die anschließende TGGE läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wandert die in Auftragspuffer gelöste DNA-Probe in ihrer nativen Konformation auf breiter Front mit Farbstoffzusatz ins Gel ein. Sind die DNA-Moleküle einige Millimeter in das Gel eingelaufen, wird die Spannungsquelle abgeschaltet und der Temperaturgradient eingestellt. Das Gel wird mit einer Folie vor dem Austrocknen geschützt und durch Auflegen einer Glasplatte wärmeisoliert. Ist der gewünschte Temperaturbereich eingestellt, wird die Spannung wieder angeschlossen und die Elektrophorese bei etabliertem Temperaturgradienten fortgesetzt.

Nach Ende der Elektrophorese kann die Denaturierungskurve (s. Abb. 3-5) mit einer hochempfindlichen Silberfärbung sichtbar gemacht werden.

3.5.4 Lösungen

Verwendete Pufferlösungen für Probenaufbereitung, Gelherstellung und Elektrophorese

| | |
|-------------------------------|---|
| Acrylamid-Fertiglösung | 30 % Acrylamid-Bisacrylamid (30:1) |
| APS | 10% Ammoniumpersulfat 2 g Ammoniumpersulfat in 20 ml Aqua dest. lösen. |
| Harnstoff | 5,7 M |
| 50 x ME-Puffer | 1 M MOPS 50 mM EDTA pH 8,0 209,3 g MOPS, 18,6 g EDTA 2H ₂ O und 36 g NaOH werden in 815 ml Aqua dest. gelöst. Das resultierende Gesamtvolumen von 1 Liter wird gefiltert. |
| 40% Glycerol | 1,4 % |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Polymerisationsbeschleuniger) |

Zur Gelherstellung werden 14,4 g Harnstoff, 8 ml Acrylamid, 0,6 ml 50 x ME-Puffer und 1,5 ml Glycerin in 20 ml Aqua dest. gelöst. Nach vollständiger Lösung des Harnstoffs werden 50 µl APS und 225 µl TEMED hinzugegeben und das Gel nach Anleitung Biometras gegossen.

| | |
|---------------------------------------|--|
| 0,7 x ME-Puffer | 0,1% Triton X-100 |
| (Elektrophoresepuffer) | 14 mM MOPS 0,7 mM EDTA |
| (Auftragspuffer mit Farbstoff) | 0,1% Xylen-Cyanol 0,1% Bromphenol-Blau pH 8,0 14 ml 50 x ME-Puffer werden mit 986 ml Aqua dest. verdünnt (Elektrophoresepuffer). Zur Herstellung des Auftragspuffers werden zu 10 ml Elektrophoresepuffer je 10 mg der beiden Farbstoffe gegeben. |

20 µl PCR-Produkt wurde mit 80 µl Aqua dest. und 100 µl Auftragspuffer versetzt und nach Herstellerangaben auf das Gel aufgetragen.

Puffer für die Silberfärbung der Polyacrylamid-Gele nach TGGE

| | |
|-----------------|---|
| Puffer A | 10% Ethanol 0,5% Eisessig |
| Puffer B | 0,1% AgNO ₃ 1g AgNO ₃ wird in 1 l Aqua dest. gelöst. Die Lösung kann ca. 5-10 mal verwendet werden |
| Puffer C | 1,5% NaOH 0,01% NaBH ₄ 0,015% Formaldehyd 15g NaOH werden in 1 l Aqua dest. gelöst. 0,1g NaBH ₄ und 4ml Formaldehyd (37% in Wasser) werden hinzugegeben. Der Puffer muß vor jeder Anwendung frisch hergestellt werden. |
| Puffer D | 0,75% Na ₂ CO ₃ 7,5g Na ₂ CO ₃ werden in 1 l Aqua dest. gelöst. |

3.5.5 Eigenschaften der DNA-Proben

Die TGGE erfordert DNA-Proben, die weitgehend frei von Proteinen, RNA und Polysacchariden ist. Treten Verunreinigungen auf, so treten diese durch die hochempfindliche Silberfärbung in Erscheinung. PCR-amplifiziertes Material kann ohne anschließende Aufreinigung für die TGGE verwendet werden. Es sollten aber unspezifische PCR-Produkte vermieden werden, die die Interpretation der Bandenmuster erschweren können.

3.5.6 Silberfärbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel vom Elektrophoreseblock genommen und auf der Trägerfolie in den verschiedenen Bädern inkubiert.

1. Inkubation in Puffer A für ca. 10 Minuten; Puffer verwerfen.
2. Inkubation in Puffer B für ca. 15 Minuten
3. 3-faches Waschen mit Aqua dest. für jeweils 10 Sekunden
4. Inkubation in Puffer C für ca. 15-20 Minuten (Fixierung)
5. Inkubation in Puffer D für ca. 10 Minuten

Die Polyacrylamid-Gele werden zur Vermeidung von Austrocknung in transparente Plastikfolie eingeschweißt. Die Aufbewahrung erfolgt an einem dunklen und kühlen Ort.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der dargestellten Befunde

Aus Platzgründen kann hier nur ein kleiner Teil der Heteroduplex-Befunde gezeigt werden. Dabei handelt es sich um pathologisch hochverdächtige Befunde, die auf Punktmutationen in den untersuchten Genabschnitten hindeuten. Normalbefunde werden nur im direkten Vergleich mit auffälligen Untersuchungsergebnissen gezeigt. Wenn in einem der systematisch untersuchten Genabschnitte ein auffälliger Befund erhoben wurde, erfolgte eine Kontroll-Analyse. Bei Bestätigung des Ergebnisses wurde eine DNA-Sequenzierung des amplifizierten Gensegments durchgeführt. Das betreffende Fragment wurde sowohl vom 5'- zum 3'-Ende des schweren Stranges (im Folgenden als „vorwärts“ bezeichnet) als auch vom 5'- zum 3'-Ende des komplementären leichten Stranges („rückwärts“) sequenziert. Die Ergebnisse der Rückwärtssequenzierung wurden für die Darstellung invertiert, d.h. die Nukleotidfolge erscheint in Richtung 3'-5'-Ende und „übersetzt“ in die Nukleotidfolge des schweren Stranges. Auf diese Weise wurde der Vergleich der Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung eines Fragments vereinfacht. Die Darstellung der Sequenzierungsergebnisse erfolgt, soweit aussagekräftig, in der Umgebung der Mutationsstelle für die Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzierung im direkten Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe. Als Standard-Normalsequenz wurde die überarbeitete Cambridge-Sequenz von Andrews et al. (1999) verwendet.

Wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, wurde bei einem kleinen Teil der Proben zusätzlich zur dHPLC-Analyse mit dem WAVE-System eine senkrechte TGGE durchgeführt. Dies erfolgte bei Proben, die im WAVE-System im Bereich des COX III Gens einen auffälligen Befund erbracht hatten. Die mit der TGGE erzielten Ergebnisse werden jeweils im Vergleich mit den dHPLC-Befunden dargestellt.

4.2 Mutation in der mitochondrialen tRNA für Leucin(UUR)

In der Probe 33464 fand sich mit dem Primerpaar mrR99a bei 58°C ein auffälliger Befund, der auf eine Heteroplasmie im Vergleichsgewebe hindeutete. Im korrespondierenden Tumorgewebe zeigte die dHPLC-Analyse dagegen einen unauffälligen Befund (Abb. 4-1). Bei der DNA-Sequenzierung fand sich eine Mutation in der Transfer-RNA^{Leu (UUR)}. Es handelte sich dabei um

eine Transition T→G in Position 3250, die im Normalgewebe heteroplasmisch, im Tumorgewebe dagegen homoplasmisch vorlag (Abb. 4-2).

Die Nukleotidposition 3250 liegt in der transkriptionslimitierenden Bindungsstelle (Abb. 4-3) der Dihydro-Uridin-Schleife der mitochondrialen tRNA^{Leu} (UUR). Aus Tab. 4-1 geht hervor, dass diese Nukleotidposition im Laufe der Evolution stark konserviert wurde.

Eine heteroplasmische Mutation in Position 3250 mit Transition T→C ist im Zusammenhang mit mitochondrialer Myopathie erstmalig 1992 von Goto et al. beschrieben worden. Diese Punktmutation konnte bei sieben betroffenen Familienmitgliedern in Blut und/oder Muskelbiopsien nachgewiesen werden. Dabei wiesen zwei von drei Muskelbiopsien eine NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Defizienz auf. Abb. 4-3 zeigt die Sekundärstruktur der tRNA^{Leu}(UUR) mit den bisher bekannten Mutationen und den mit ihnen verbundenen Erkrankungen.

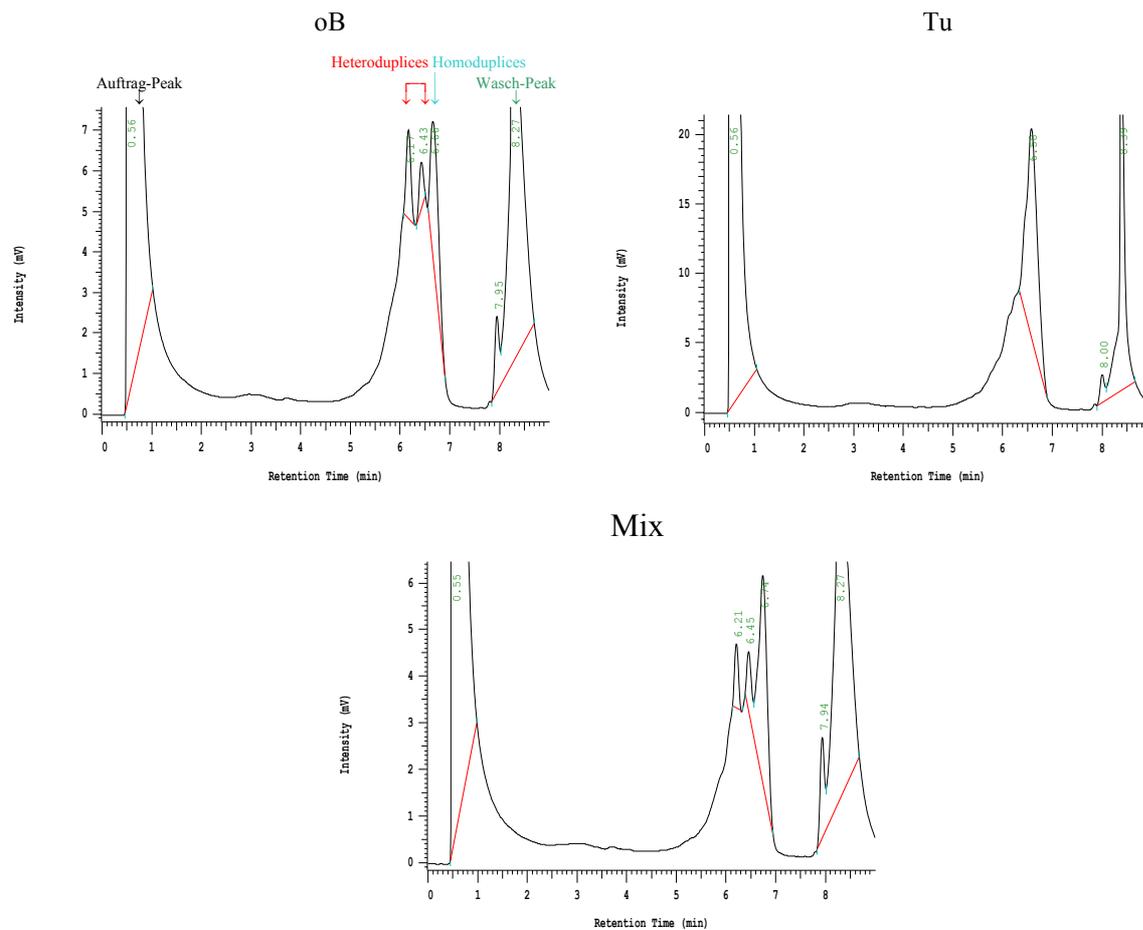


Abb. 4-1: dHPLC-Analyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar mrR99a, 58°C)

Es wurden jeweils 3 μ l PCR-Produkt (Primerpaar mrR99a) des Normalgewebes (oB), Tumorgewebes (Tu) und einer Mischung aus Normal- und Tumorgewebe (Mix) in das WAVE-System injiziert und bei 58°C bis zur Elution prozessiert. Um Normal- und Tumorgewebe annähernd in gleichem Verhältnis zu mischen, wurde die in der PCR gewonnene Fragment-Menge anhand eines Agarosegels abgeschätzt und jeweils eine entsprechende Menge Normal- und Tumorgewebe gemischt. Im Chromatogramm stellt sich als erster Peak der „Auftrag-Peak“ dar, der den Durchfluß aller nicht an der Säule haftenden und bei 260 nm absorbierenden Substanzen (z.B. die in der PCR verwendeten Nukleotide) repräsentiert. Es folgen die Peaks der Heteroduplices. Diese werden durch teildenaturierte Doppelstränge gebildet, in die sich die Heteroduplices bei 58°C früher auftrennen als die Homoduplices. Es folgt der Peak der Homoduplices und zum Schluß ein „Wasch-Peak“, der durch das Auswaschen der noch im System verbliebenen DNA-Reste mit einer höheren Azetonitrilkonzentration entsteht (s. auch 3.4.2).

Im vorliegenden Fall liegt im Bereich der tRNA^{Leu(UUR)} eine heteroplasmische Transition T3250G im Normalgewebe vor, während das Tumorgewebe homoplasmisch ein Guanin in 3250 trägt. Infolgedessen zeigen sich in der dHPLC im Chromatogramm des Normalgewebes (oB) zwei Peaks für die Heteroduplices und ein Homoduplex-Peak, während das Chromatogramm des Tumorgewebes (Tu) nur einen Homoduplex-Peak aufweist. Wie in der Vorwärtssequenzierung zu sehen ist, liegt im Normalgewebe ca. 50-70 % Thymidin in np3250 vor. Infolgedessen sind die Heteroduplex-Peaks etwa gleich hoch wie der Homoduplex-Peak. Werden nun Normal- und Tumorgewebe annähernd 1:1 gemischt, beträgt der Anteil der Thymidin/Adenin tragenden Stränge nur noch 30-50%. Dies erklärt die kleineren Heteroduplex-Peaks im Chromatogramm der Probenmischung (Mix).

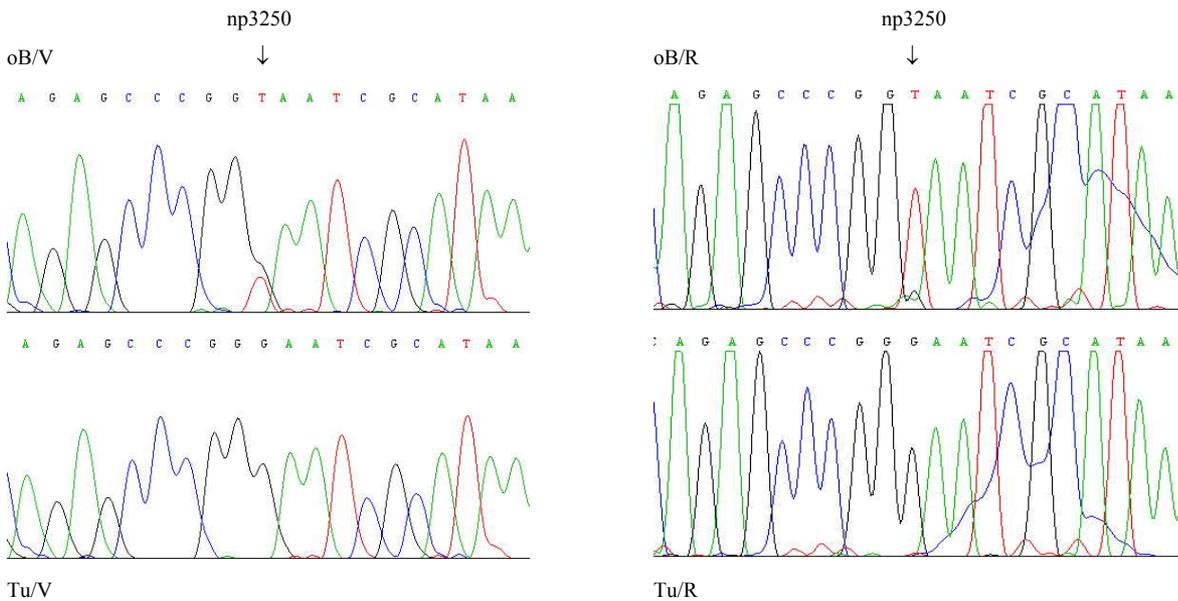


Abb. 4-2: Sequenzanalyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar mrR 99a, np3250).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Beim Normalgewebe zeigt sich eine geringgradige Heteroplasmie zugunsten der Transition T→G unabhängig von der Sequenzierungsrichtung in Position 3250, während das korrespondierende Tumorgewebe diese Transition homoplasmisch aufweist (Im Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz, Andrews et al. 1999).

Tab. 4-1: Interspezies-Vergleich der tRNA^{Leu(UUR)}-Nukleotidsequenz (Dihydrouridin-Loop)

| | | | | | |
|--------------------|-------|---------------|----------|---------|-------|
| Bandwurm | 339 | GT CAGAATTATA | T | GAGTTAG | 358 |
| Regenwurm | 12466 | GG CAGAATAGTG | C | CATAGGT | 12485 |
| Fruchtfliege | 3021 | GG CAGATTAGTG | C | AATAGAT | 3040 |
| Lungenfisch | 2673 | GG CAGAGATCGG | T | AAGTGCA | 2692 |
| Frosch | 4733 | GG CAGAGCCTGG | C | TAATGCG | 4752 |
| Huhn | 3976 | GG CAGAGCTCGG | C | AAATGCA | 3995 |
| Rind | 3033 | GG CAGAGCCCGG | T | AATTGCA | 3052 |
| Ratte | 2663 | GG CAGAGCCAAG | T | AATTGCG | 2682 |
| Hund | 2680 | G- CAGGGCCCGG | T | AACTGCG | 2698 |
| Schwein | 3854 | GG CAGAGACCGG | T | AATTGCG | 3873 |
| Gorilla | 2657 | GG CAGAGCCCGG | T | AATCGCA | 2676 |
| Schimpanse | 2657 | GG CAGAGCCCGG | T | AATTGCA | 2676 |
| Mensch (Afrika) | 2662 | GG CAGAGCCCGG | T | AATCGCA | 2681 |
| Mensch (Cambridge) | 3238 | GG CAGAGCCCGG | T | AATCGCA | 3257 |
| 33464/oB/Tu | 3238 | GG CAGAGCCCGG | G | AATCGCA | 3257 |

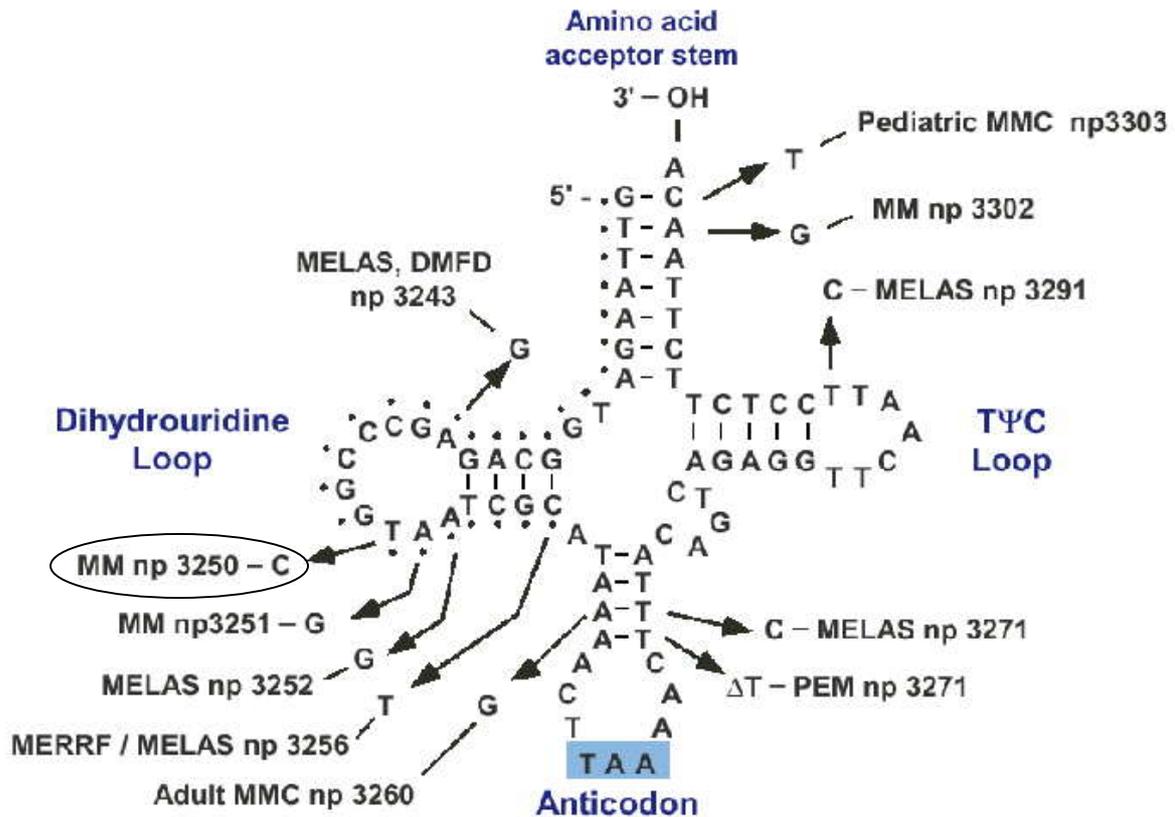


Abb. 4-3: Struktur der $tRNA^{Leu(UUR)}$ mit der Position von bekannten pathogenen Mutationen (aus www.Mitomap.org)

4.3 Mutationen in der 16 S rRNA

Insgesamt fanden sich in zwei verschiedenen Proben drei Mutationen, wobei es sich um eine homoplasmische Transition, eine heteroplasmische Transition und eine Deletion handelt.

4.3.1 Probenpaar 33464

Als Nebenbefund der Sequenzierung des auffälligen Heteroduplex-Befundes mit dem Primerpaar mrR 99a (Abb. 4-1) zeigte sich zusätzlich zu der oben beschriebenen Mutation der $tRNA^{Leu(UUR)}$ in Position 2849 eine homoplasmische Abweichung von der Standardsequenz sowohl im Normalgewebe als auch im Tumorgewebe. Hierbei handelt es sich um eine Transition $G \rightarrow A$ (Abb. 4-4). Tab. 4-2 zeigt den Interspeziesvergleich. Guanin ist in Position 2849 nicht konserviert. Bei den Wirbeltieren tritt sogar mit größerer Wahrscheinlichkeit Adenin in dieser Position auf. Wo das entsprechende Nukleotid in der zweidimensionalen Struktur der 16S rRNA des Frosches liegt, ist in Abb. 4-10 gezeigt. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Abweichung von der Standardsequenz nicht um eine somatische Mutation, sondern um einen bislang nicht beschriebenen Polymorphismus.

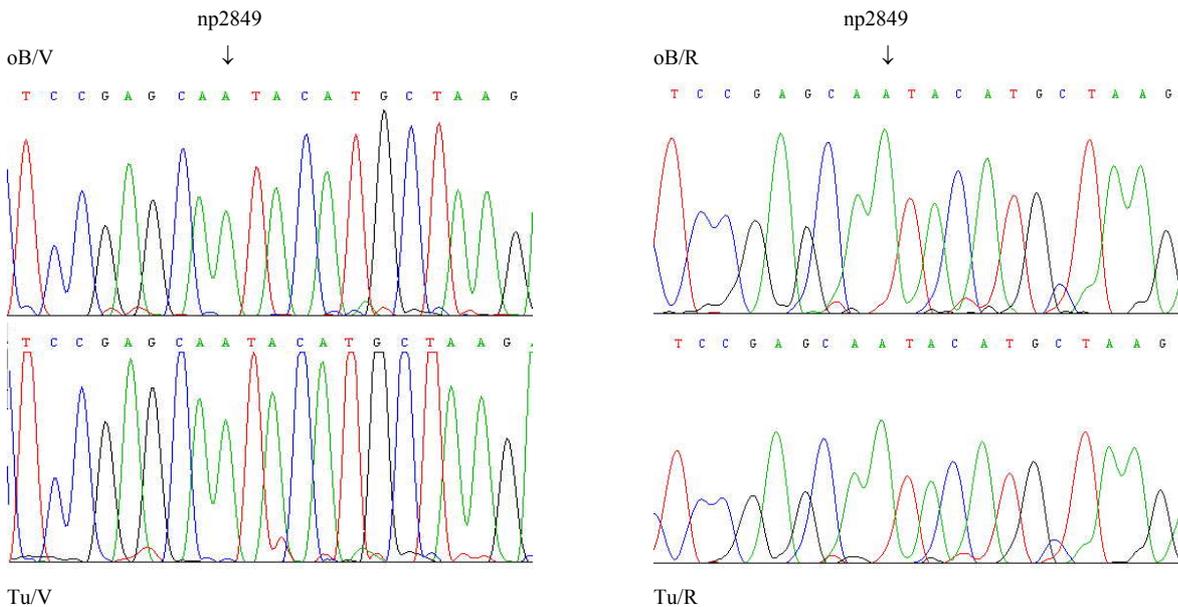


Abb. 4-4: Sequenzanalyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar mrR 99a, np2849).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Bei Normal- und Tumorgewebe zeigt sich eine homoplasmische Abweichung im Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz zugunsten der Transition G→A unabhängig von der Sequenzierungsrichtung in Position 2849 (im Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz, Andrews et al. 1999).

Tab. 4-2: Interspezies-Vergleich der Nukleotidsequenzen im Bereich der 16S rRNA (Position np2841-2860).

| | | | | | |
|---|--------|----------------|----------|--------------|--------|
| Schmalwand (<i>Arabidopsis Thaliana-18S</i>) | 362651 | TTCAGGCG_____ | █ | _____AGCC | 362662 |
| Regenwurm | 11925 | TCCCTA_____ | █ | _____AACAA | 11934 |
| Fruchtfliege | 13735 | TTAATTTT_____ | █ | _____T | 13743 |
| Lungenfisch | 2262 | TCCGCAA_____ | █ | _____TACAATT | 2275 |
| Frosch | 4312 | TCCTTGAAGAATAG | G | GCCTACCACC | 4336 |
| Huhn | 3556 | TCCAAACCCAC__ | A | GACCACAACCT | 3577 |
| Rind | 2637 | TCCGAGCG_____ | A | TTTTTAAAGAC | 2655 |
| Ratte | 2264 | TCCGAATG_____ | A | TT__ATAACC | 2280 |
| Hund | 2276 | CCCGAGTG_____ | A | TT__AAAATT | 2292 |
| Mufflon | 2281 | TCCGAGCG_____ | A | TTTTTAAAGAC | 2299 |
| Gorilla | 2260 | TCCGAACA_____ | A | CA__CATGCC | 2276 |
| Schimpanse | 2260 | TCCGAGCA_____ | A | TA__CATGCT | 2276 |
| Mensch (Afrika) | 2265 | TCCGAGCA_____ | G | TA__CATGCC | 2281 |
| Mensch (Cambridge) | 2841 | TCCGAGCA_____ | G | TA__CATGCT | 2857 |
| 33464/oB/Tu | 2841 | TCCGAGCA_____ | A | TA__CATGCT | 2857 |

4.3.2 Probenpaar 1112

Die dHPLC-Analyse von Probenpaar 1112 bei 61°C mit dem Primerpaar mrR 99a ergab einen auffälligen Befund im Tumorgewebe (Abb. 4-5): Bei der Sequenzanalyse wurde eine Transition G→A in Position 3047 deutlich, die im Tumorgewebe heteroplasmisch vorliegt und im Normalgewebe nicht vorhanden ist (Abb. 4-6). Wie der Interspezies-Vergleich in Tab. 4-3 zeigt, ist Guanin in dieser Position unter den Wirbeltieren konserviert. Nur der Lungenfisch trägt in Position 3047 ebenfalls ein Adenin. Insgesamt ist die Nukleotidsequenz in der Umgebung von Position 3047 eine in der Evolution konservierte Sequenz. Abb. 4-10 zeigt, wo das entsprechende Nukleotid in der zweidimensionalen 16S rRNA-Struktur des Frosches zu finden ist.

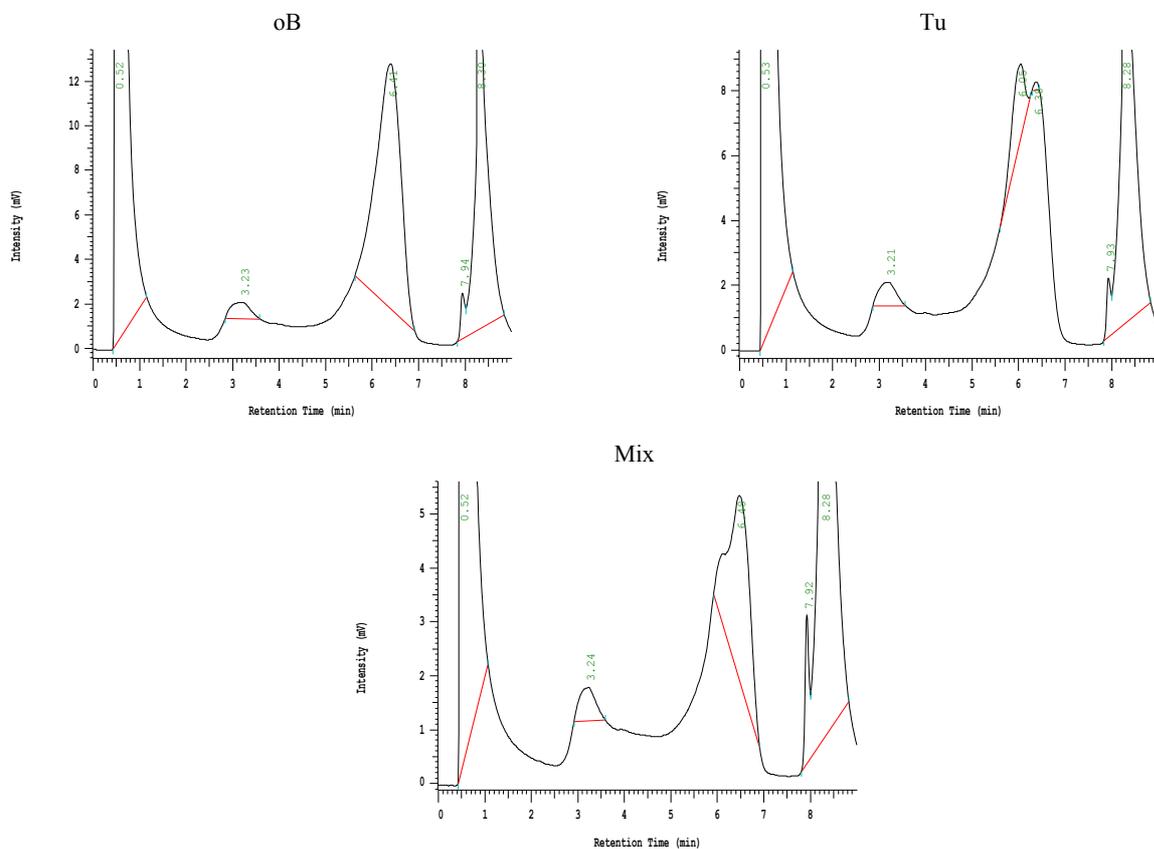


Abb. 4-5: dHPLC-Analyse von Probenpaar 1112 (Primerpaar mrR99a, 61°C)

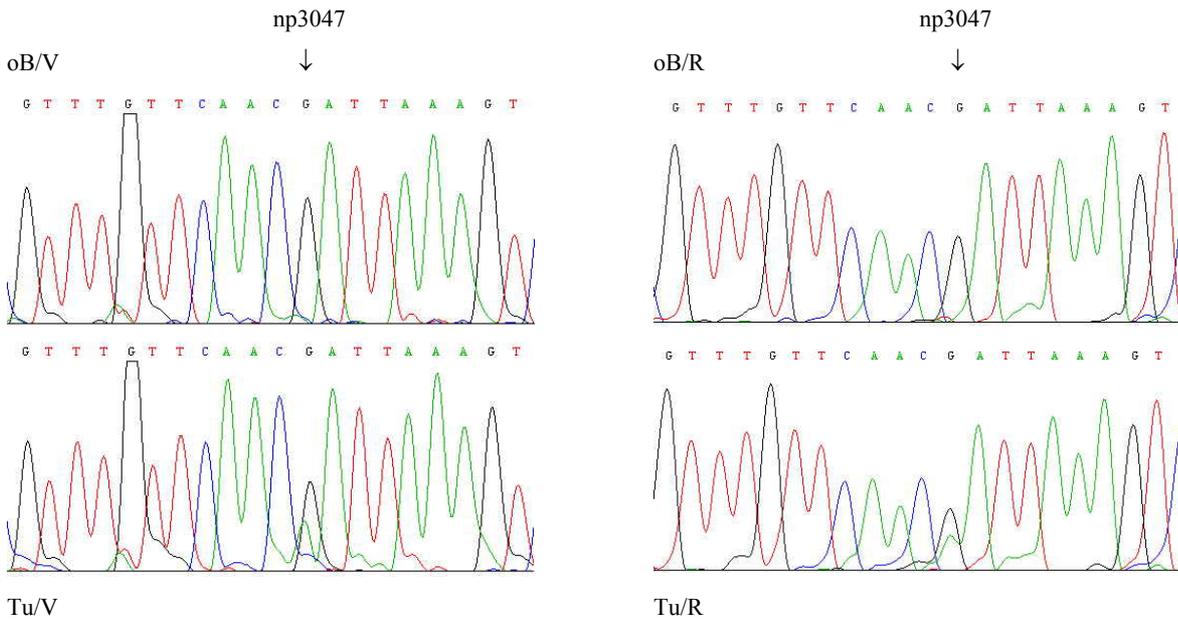


Abb. 4-6: Sequenzanalyse von Probenpaar 1112 (Primerpaar mrR 99a, np3047).
Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich in beiden Sequenzierungsrichtungen eine heteroplasmische Transition G→A in Position 3047 (im Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz, Andrews et al. 1999).

Tab. 4-3: Interspezies-Vergleich der Nukleotidsequenzen im Bereich der 16S rRNA (Position np3041-3060).

| | | | | | |
|---|--------|--------|----------|------------------|--------|
| Schmalwand (<i>Arabidopsis Thaliana-18S</i>) | 362966 | TAAGGC | G | GAGCGAATCCGAAAAG | 362988 |
| Regenwurm | 12103 | TTCAAC | C | _AATAA_CACCCTAC | 12122 |
| Fruchtfliege | 13915 | TTCGAC | T | _TTTAAAT_TCTTAC | 13934 |
| Lungenfisch | 2470 | TTCAAC | A | _ATTAA_TATCCTAC | 2489 |
| Frosch | 4533 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGCCCTAC | 4552 |
| Huhn | 3763 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 3783 |
| Rind | 2833 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 2854 |
| Ratte | 2472 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 2491 |
| Hund | 2474 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 2493 |
| Mufflon | 2479 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 2498 |
| Gorilla | 2460 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 2479 |
| Schimpanse | 2460 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 2479 |
| Mensch (Afrika) | 2465 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 2484 |
| Mensch (Cambridge) | 3041 | TTCAAC | G | _ATTAA_AGTCCTAC | 3060 |
| 1112 oB/Tu | 3041 | TTCAAC | A | _ATTAA_AGTCCTAC | 3060 |

4.3.3 Probenpaar 32435

Probenpaar 32435 wurde in der dHPLC-Analyse mit dem Primerpaar mrR 96a bei 56°C auffällig. Im Tumorgewebe ergab sich ein typischer Heteroduplex-Befund (Abb. 4-7). Die mutierte Sequenz weist eine Deletion von Thymidin in Position 2248 und Guanin in Position 2249 auf. (Abb. 4-8). Der Interspeziesvergleich in Tab. 4-4 zeigt, dass die Sequenz in dieser Region nicht konserviert ist. In Abb. 4-9 ist das Nukleotid 2249 an der entsprechenden Stelle in der zweidimensionalen 16S rRNA-Struktur des Frosches markiert.

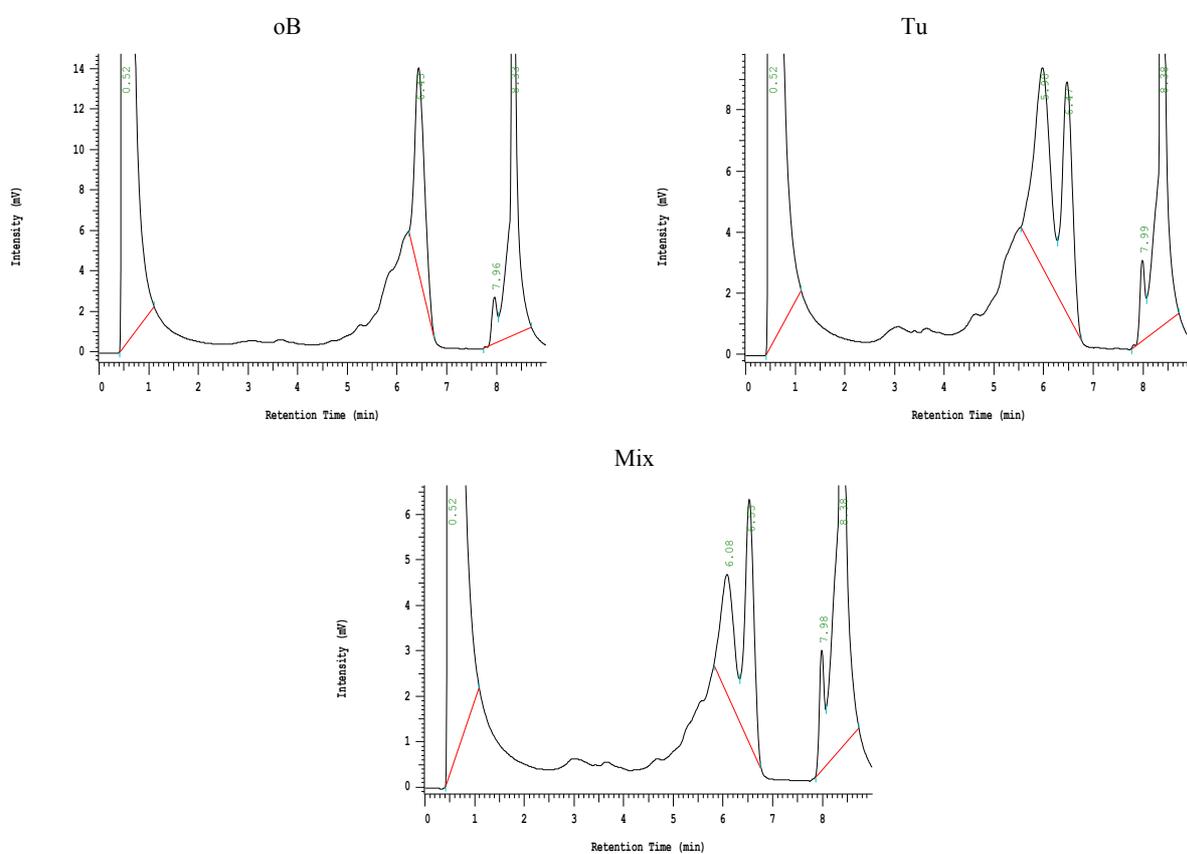


Abb. 4-7: dHPLC-Analyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar mrR 96a, 56°C)

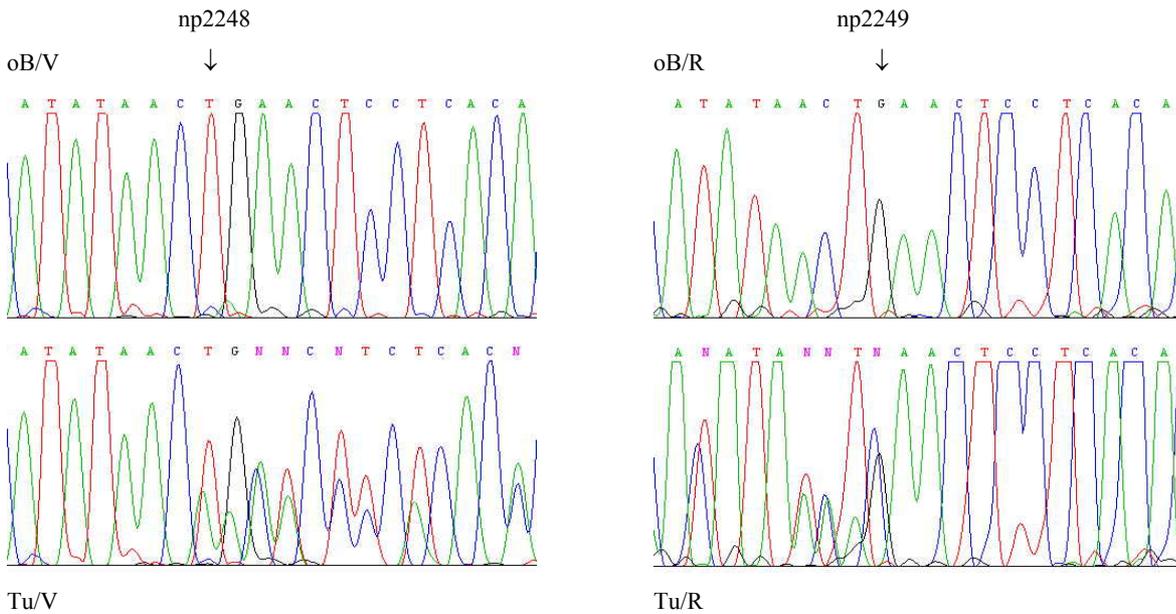


Abb. 4-8: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar mrR 96a, np2248).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich eine heteroplasmische Deletion von Thymin und Guanin in Position 2248 und 2249 in beiden Sequenzierungsrichtungen. Da es sich um einen Heteroplasmiebefund handelt, also Wildtyp- und mutierte Sequenz gleichzeitig vorhanden sind, kommt es in beiden Sequenzierungsrichtungen hinter der Deletion zur Überlagerung der um 2 Nukleotide gegeneinander versetzten Sequenzen. (Vergleich zur Cambridge-Sequenz, Andrews et al., 1999).

Tab. 4-4: Interspezies-Vergleich der Nukleotidsequenzen im Bereich der 16S rRNA (Position np2241-2260).

| | | | | | |
|---|--------|-------------|-----------|-------------|--------|
| Schmalwand (<i>Arabidopsis Thaliana-18S</i>) | 362048 | ATCTACGAAGG | AA | CGCCAAAAGCG | 362071 |
| Regenwurm | 11389 | ACTAGAT---- | -- | -ATGCCCTCCT | 11405 |
| Fruchtfliege | 13152 | GATAAGC---- | -- | --TATAAAATA | 13167 |
| Lungenfisch | 1661 | AAACAAT---C | AT | AATCCATCTTA | 1681 |
| Frosch | 3695 | AACTAAT---T | CT | AAACCCCAAAA | 3715 |
| Huhn | 2955 | CCCTATT---- | -T | GACTCCCTCAA | 2973 |
| Rind | 2033 | ACAAA---TGA | TT | AACTCCTAGCC | 2053 |
| Ratte | 1672 | ACCTCAA---- | -A | AA-TTCCAAAA | 1689 |
| Mufflon | 1675 | ATAACAT-TAG | CC | AACTCCTAGAT | 1697 |
| Hund | 1663 | ATACTAC---A | TC | AACTCCTAATT | 1683 |
| Gorilla | 1670 | ACACAAC---- | TG | AACTCCCTACA | 1679 |
| Schimpanse | 1670 | ATACAAC---- | CG | AACTCCTTACA | 1679 |
| Mensch (Afrika) | 1665 | ATATGAC---- | TG | AACTCCTCACA | 1684 |
| Mensch (Cambridge) | 2241 | ATATAAC---- | TG | AACTCCTCACA | 2260 |
| 32435 Tu | 2241 | ATATAAC---- | -- | AACTCCTCACA | 2260 |

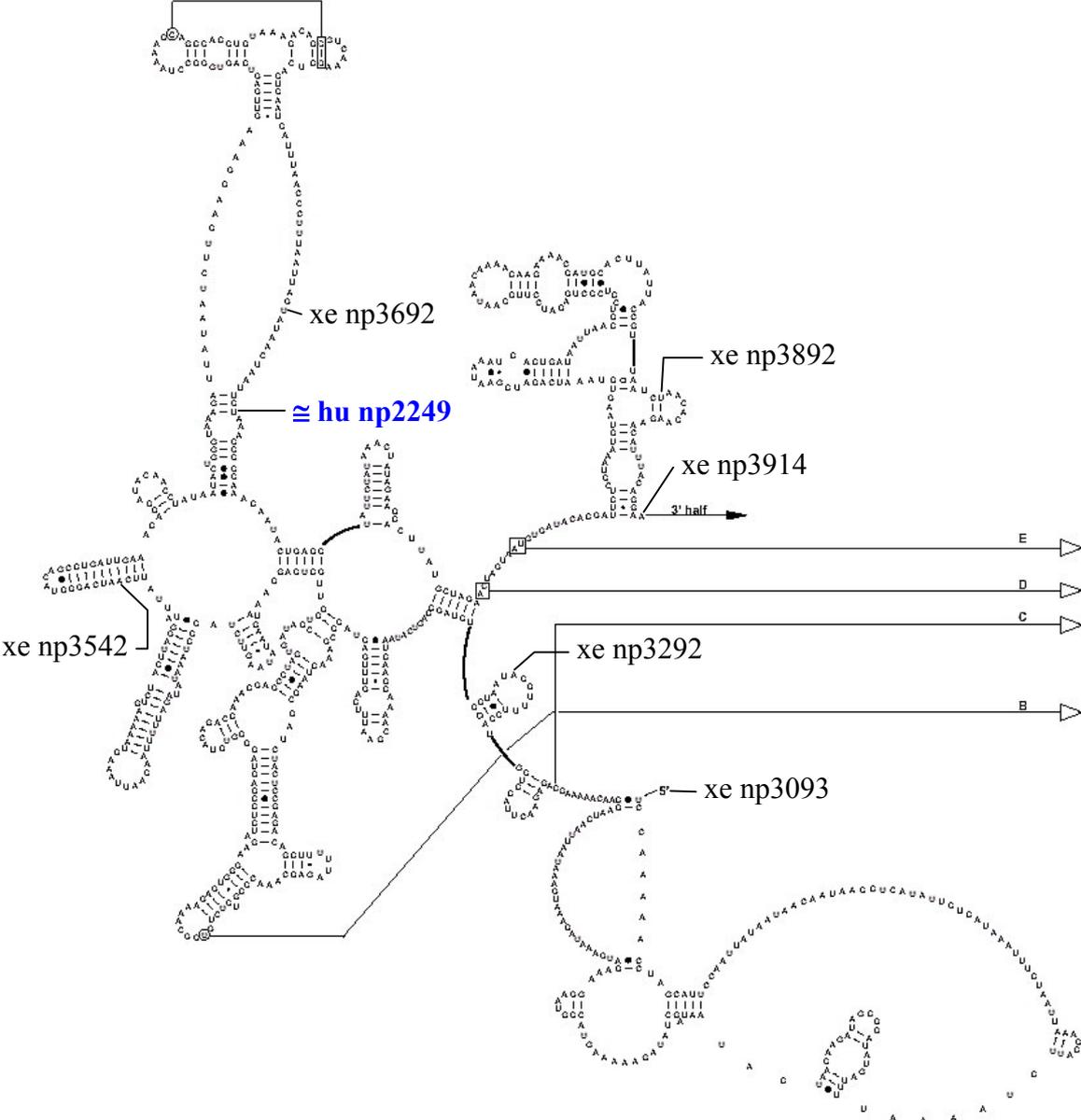


Abb. 4-9: Sekundärstruktur der 16S rRNA (5'-Ende) von *Xenopus laevis* (entnommen aus www.mitomap.org)

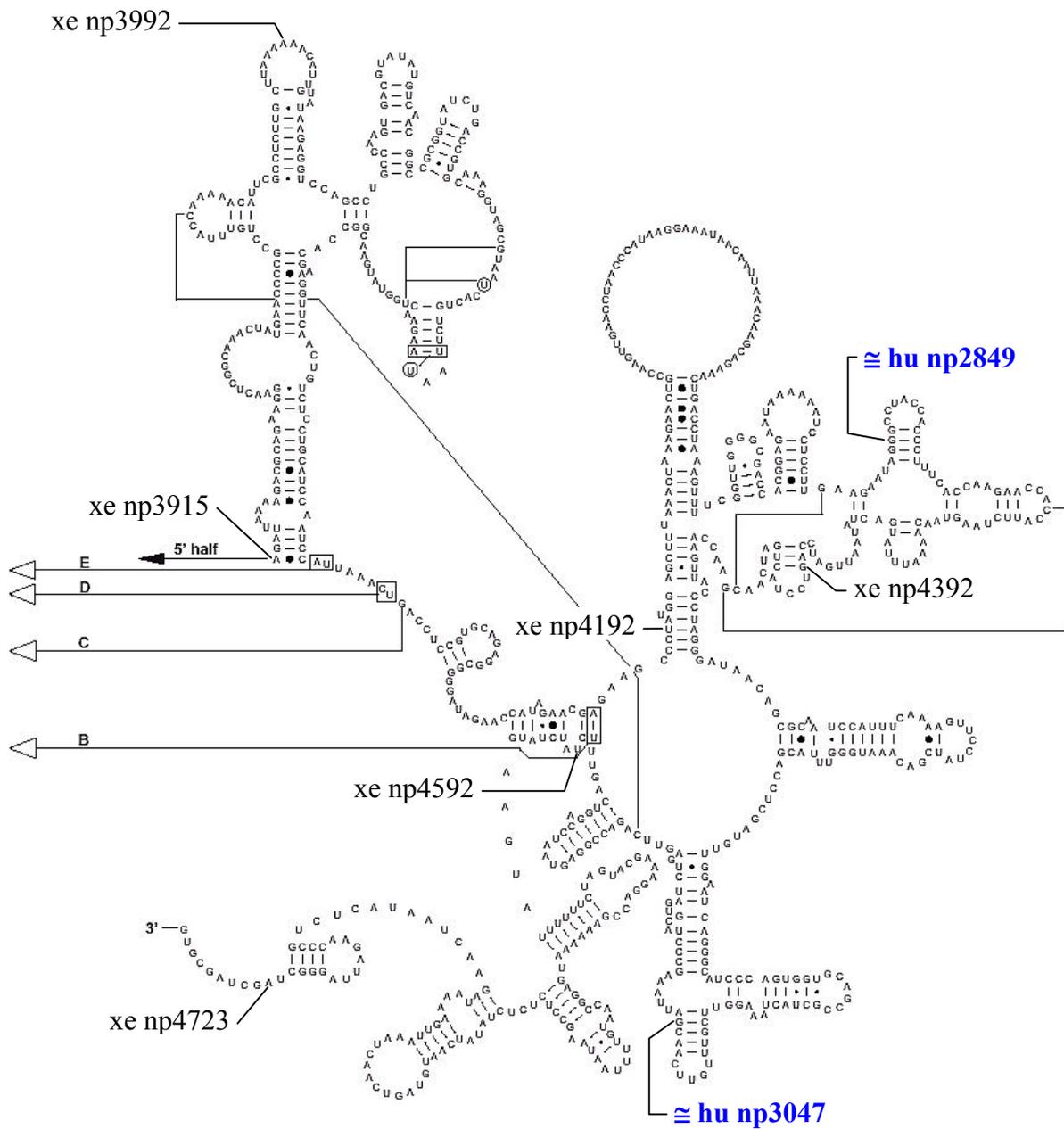


Abb. 4-10: Sekundärstruktur der 16 S rRNA (3'-Ende) von *Xenopus laevis* (entnommen aus www.mitomap.org)

4.4 Mutationen innerhalb der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase

Insgesamt fanden sich in drei Probenpaaren 4 Punktmutationen in der Untereinheit I der Cytochrom c-Oxidase (Cox I). Dabei handelte es sich um drei heteroplasmische und eine homoplasmische Mutation.

4.4.1 Probenpaar 33464

Hier fand sich bei der dHPLC-Analyse ein auffälliger Befund im Bereich des Primerpaares Cox 77b bei 56°C und 59°C (Abb. 4-11). Die DNA-Sequenzierung zeigte eine heteroplasmische Transition G→A in Position 7332, die nur im Tumorgewebe nachzuweisen war (Abb. 4-12). Durch diese Transition wird die 1. Base des Codons GCT ausgetauscht. Dadurch kommt es zu einem Austausch der Aminosäure (AS) Alanin (unpolare Aminosäure) gegen Threonin (ungeladen, polar) in Aminosäureposition 477 der Cox-Untereinheit (514 Aminosäuren). In Tab.4.5 wird gezeigt, dass Alanin bei den Säugetieren eine konservierte Aminosäure ist. Bei der Fruchtfliege und dem Bandwurm findet sich die ebenfalls unpolare AS Valin, während bei Huhn und Hefe eine ungeladene polare AS (Serin bzw. Asparagin) vorliegt.

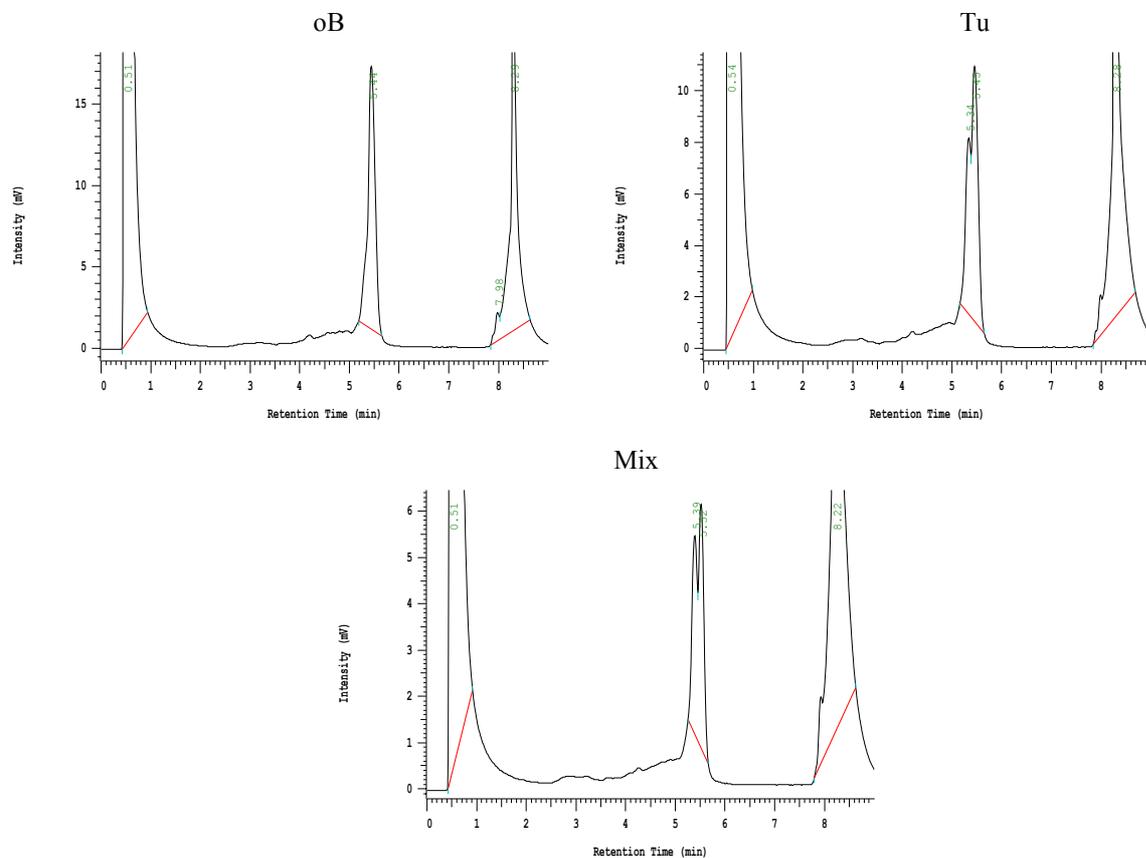


Abb. 4-11: dHPLC-Analyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar Cox 77b, 59°C).

Bei dieser Abbildung muß man davon ausgehen, dass sowohl die Homoduplices mit der Basenpaarung GC und AT als auch die Heteroduplices jeweils dieselbe Retentionszeit aufweisen. Unter der Voraussetzung, dass die Peakhöhe direkt proportional zu der Menge der DNA ist, kann man die Wahrscheinlichkeiten für das Vorkommen von Homo- bzw. Heteroduplices ermitteln. Geht man von einem Annäherungswert von ca. 70 % vorhandener Mutation (In der Sequenzierung vorhandene Schwankungsbreite zwischen Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung ca. 65-75%) im Tumorgewebe aus, entspricht die Menge Heteroduplices:Homoduplices 42%:58%. Dies bildet das Chromatogramm (Tu) mit einer Peakhöhe von 8:11 tatsächlich ab. Die Mischung von Tumor- und Normalgewebe verschiebt das Verhältnis von Heteroduplices:Homoduplices zu 46:54%, was dem Peakhöhenverhältnis von 5,5:6,5 entspricht.

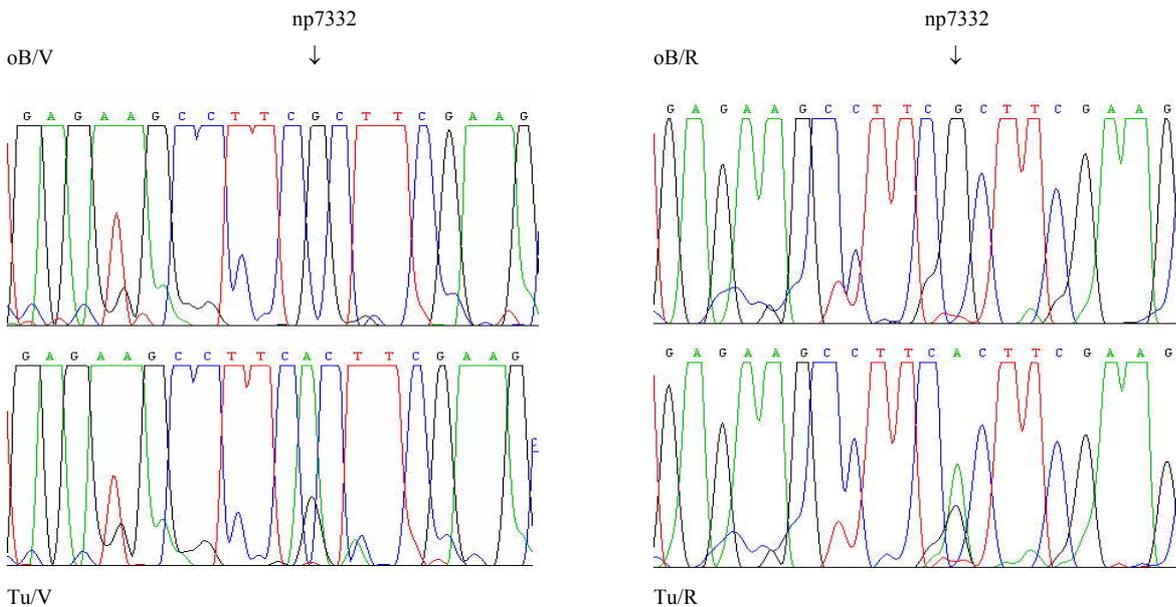


Abb. 4-12: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 33464 (Primerpaar Cox77b, np7321-7340)

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich eine heteroplasmische Transition G→A in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 7332, während das korrespondierende Normalgewebe die bekannte Basenabfolge der revidierten Cambridge-Sequenz aufweist (Andrews et al. 1999).

Tab. 4-5: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 1 (Position 465 – 485)

| | | | | | |
|---|-----|--------------|----------|---------------------|-----|
| Schmalwand (<i>Arabidopsis Thaliana</i>) | 466 | ICCFVVTITL | S | SGNNKRCAPSP-----WAL | 493 |
| Bäckerhefe | 492 | YIKMNPSRTTKM | N | KLYLSKEFYN----- | 515 |
| Bandwurm | 466 | GCFFVFILWESV | V | N---CNEVLG-----S | 486 |
| Regenwurm | 462 | LMLFIFILWEAF | A | S---QRSVIS-----S | 482 |
| Fruchtfliege | 464 | ILFFFFIIWESL | V | S---QRQVIY-----P | 484 |
| Lungenfisch | 465 | VILLLFIIWEAF | A | S---KREVNS-----I | 485 |
| Frosch | 465 | VIMMMFIIWEAF | A | A---KREVT-----Y | 485 |
| Huhn | 465 | VIMLMFIVWEAF | S | A---KRKVLQ-----P | 485 |
| Rind | 465 | VMLMVFIIWEAF | A | S---KREVL-----V | 485 |
| Ratte | 465 | VLVMIFMIWEAF | A | S---KREVL-----I | 485 |
| Hund | 465 | VMLMIFMIWEAF | A | S---KREVAM-----V | 485 |
| Schwein | 465 | VMLMIFIIWEAF | A | S---KREVS-----V | 485 |
| Gorilla | 465 | VMLMIFMIWEAF | A | S---KRKVLM-----I | 485 |
| Schimpanse | 465 | VMLMIFMIWEAF | A | S---KRKVLM-----V | 485 |
| Mensch (Afrika) | 465 | VMLMIFMIWEAF | A | S---KRKVLM-----V | 485 |
| Mensch (Cambridge) | 465 | VMLMIFMIWEAF | A | S---KRKVLM-----V | 485 |
| 33464/Tu | 465 | VMLMIFMIWEAF | T | S---KRKVLM-----V | 485 |

4.4.2 Probenpaar 26395

Bei der dHPLC-Analyse des Probenpaares 26395 ergab sich mit dem Primerpaar NAD 28a bei 59°C ein Heteroplasmie-Befund (Abb. 4-13). Die Sequenzanalyse zeigte neben einer heteroplasmischen Mutation im Tumorgewebe auch noch eine homoplasmische Abweichung von der Standardsequenz in beiden Gewebeproben (Abb. 4-14).

Bei der homoplasmischen Sequenzabweichung handelt es sich um eine Transition G→A in Position 5910. Dieser Nukleotidaustausch liegt an der 1. Stelle des Codons und ändert es von GCC nach ACC. Damit ist ein Aminosäurewechsel von Alanin nach Threonin an Position 3 von 514 Aminosäuren verbunden.

Tab. 4-6 zeigt den Interspeziesvergleich der Aminosäuresequenz im betroffenen Bereich: Alanin ist offensichtlich nicht konserviert, bei Schimpanse und Gorilla findet sich an dieser Stelle Threonin. Wahrscheinlich stellt die Sequenzabweichung in dieser Gewebeprobe einen Polymorphismus dar.

Die heteroplasmische Mutation ist ebenfalls eine Transition G→A (Abb. 4-15). Sie findet sich in Position np5949 und verursacht einen Austausch des 1. Nukleotids des Codons GGA für Glycin. Die mutierte Sequenz (AGA) kodiert an dieser Stelle ein Stop-Codon. Dies muß zu einem Abbruch der Translation nach der 15. Position der Aminosäuresequenz führen, so dass nur ein rudimentärer Anteil der Cox 1 synthetisiert werden kann (Tab. 4-7).

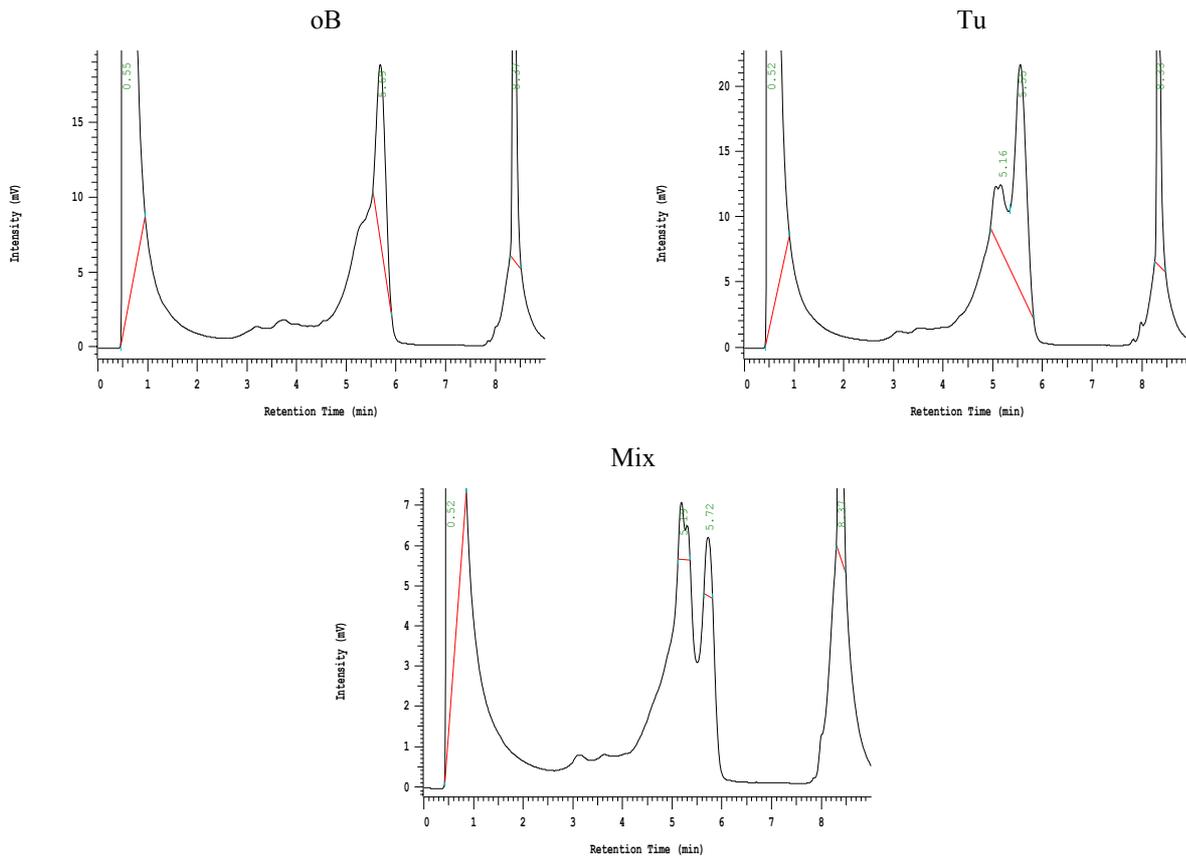


Abb. 4-13: dhPLC-Analyse von Probenpaar 26395 (Primerpaar NAD 28a, 59°C)

Da der Tumor einen hohen Heteroplasmie-Grad bezgl. der Mutation aufweist (s. Sequenzierergebnis), verstärkt sich der Heteroduplex-Peak durch Zumischung von Wildtyp-Sequenz.

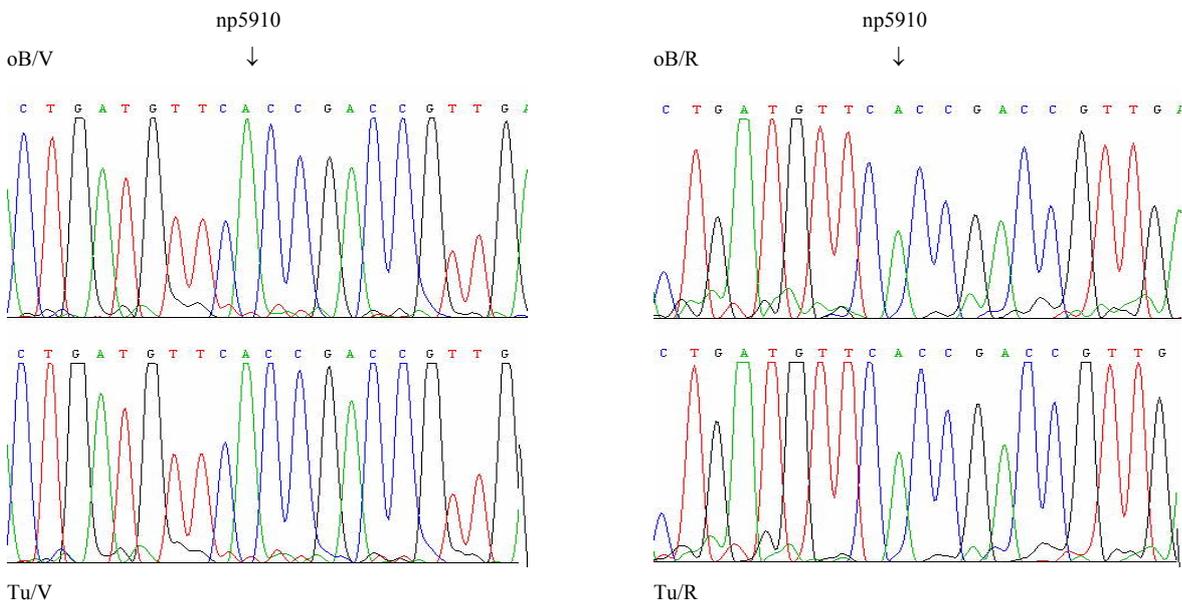


Abb. 4-14: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 26395 (Primerpaar NAD28a, np5901-5920)

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Bei Normal- und Tumorgewebe zeigt sich eine homoplasmische Transition G→A in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 5910 (im Vergleich zur bekannten Basensequenz der revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

Tab. 4-6: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 1 (Position 1-12).

| | | | | | |
|---|---|-------|----------|-----------|----|
| Schmalwand (<i>Arabidopsis Thaliana</i>) | 1 | --MKN | L | VRWLFSTNH | 13 |
| Bäckerhefe | 1 | ----M | V | QRWLYSTNA | 11 |
| Bandwurm | 1 | MNVNY | L | LSWIFTLDH | 15 |
| Regenwurm | 1 | ----- | - | MRWFYSTNH | 9 |
| Fruchtfliege | 1 | ----M | S | RQWLFSTNH | 11 |
| Lungenfisch | 1 | ---MT | L | TRWLFSTNH | 12 |
| Frosch | 1 | ---MA | I | TRWLFSTNH | 12 |
| Huhn | 1 | --MTF | I | NRWLFSTNH | 13 |
| Rind | 1 | ---MF | I | NRWLFSTNH | 12 |
| Ratte | 1 | ---MF | V | NRWLFSTNH | 12 |
| Hund | 1 | ---MF | I | NRWLFSTNH | 12 |
| Schwein | 1 | ---MF | V | NRWLYSTNH | 12 |
| Gorilla | 1 | ---MF | T | DRWLFSTNH | 12 |
| Schimpanse | 1 | ---MF | T | DRWLFSTNH | 12 |
| Mensch (Afrika) | 1 | ---MF | A | DRWLFSTNH | 12 |
| Mensch (Cambridge) | 1 | ---MF | A | DRWLFSTNH | 12 |
| 26395/oB/Tu | 1 | ---MF | T | DRWLFSTNH | 12 |

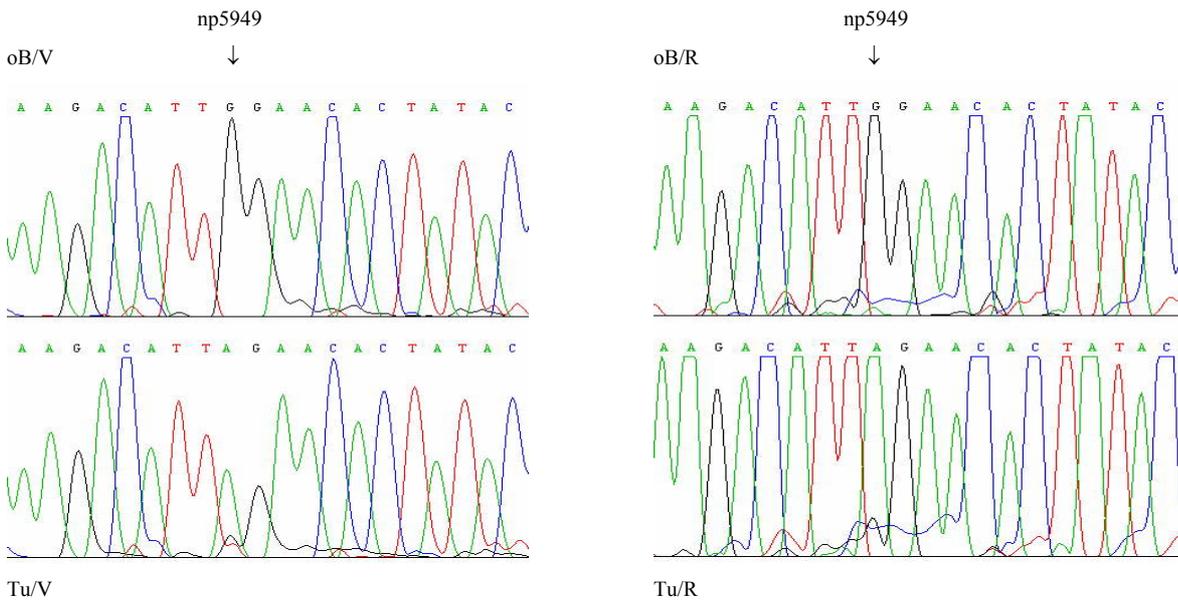


Abb. 4-15: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 26395 (Primerpaar NAD28a, np5941-5960)

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich eine hochgradige heteroplasmische Transition G→A in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 5949 (Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

Tab. 4-7: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 1 (Position 5-20).

| | | | | | |
|---|---|------------|-------------|-------|----|
| Schmalwand <i>Arabidopsis Thaliana</i> | 6 | RWLFSTNHKD | I | GTLYF | 21 |
| Bäckerhefe | 4 | RWLYSTNAKD | I | AVLYF | 19 |
| Bandwurm | 8 | SWIFTLDHKR | V | GIIYT | 23 |
| Regenwurm | 2 | RWFYSTNHKD | I | GTLYF | 17 |
| Fruchtfliege | 4 | QWLFSTNHKD | I | GTLYF | 19 |
| Lungenfisch | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYM | 20 |
| Frosch | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| Huhn | 6 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 21 |
| Rind | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| Ratte | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| Hund | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| Schwein | 5 | RWLYSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| Gorilla | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| Schimpanse | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| Mensch (Afrika) | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| Mensch (Cambridge) | 5 | RWLFSTNHKD | I | GTLYL | 20 |
| 26395/Tu | 5 | RWLFSTNHKD | Stop | | 15 |

4.5 Mutationen innerhalb der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase

Insgesamt fanden sich in drei verschiedenen Probenpaaren drei verschiedene Punktmutationen im Gen für die Untereinheit III der Cytochrom c-Oxidase (Cox 3). Alle Mutationen waren heteroplasmisch und mit einem Aminosäureaustausch verbunden.

4.5.1 Probenpaar 27561

Die dHPLC-Analyse mit dem Primerpaar Cox 31b ergab bei 60°C im Tumorgewebe einen positiven Befund (Abb. 4-16). Die DNA-Sequenzanalyse bestätigte im Tumorgewebe in Position 9288 eine Transition A→G, die im Normalgewebe nicht nachweisbar war (Abb. 4-17).

Die Transition in np9288 findet an erster Stelle des Codons ACC für Threonin (ungeladen, polar) statt. Die mutierte Sequenz GCC bewirkt einen Aminosäurenwechsel zu Alanin (unpolar) in Position 28. Die Untereinheit III der Cytochrom c-Oxidase umfasst 261 Aminosäuren. Threonin ist bis einschließlich des Lungenfisches eine bei Wirbeltieren streng konservierte Aminosäure. Die aufgeführten Vertreter der Arthropoden, Anneliden und Plathelminthen, sowie die Hefe, weisen in dieser Position eine andere unpolare Aminosäure auf. (Tab. 4-8).

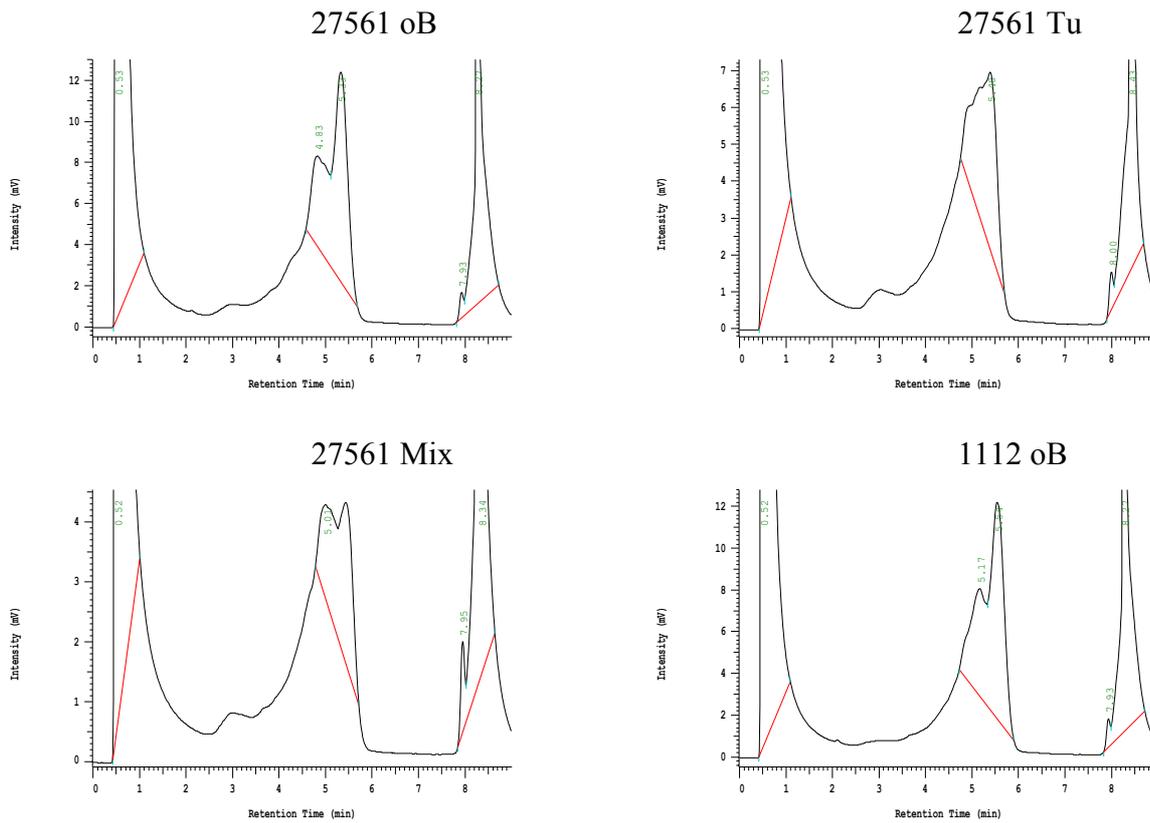


Abb. 4-16: dHPLC-Analyse von Probenpaar 27561 und 1112 (Primerpaar Cox 31b, 60°C)

In dieser Abbildung wird die Auswertung des Heteroduplex-Anteils durch einen für diesen Primer charakteristischen Vorpeak erschwert (Zum Vergleich ist die dHPLC-Analyse des Normalgewebes von Probe 1112 abgebildet). Parallel zu Abb. 4-11 ergibt sich unter Berücksichtigung des Vorpeaks ein geschätzter Heteroduplex-Anteil von ca. 30% im Tumorgewebe. Dies entspricht einem Mutationsanteil von ca. 80%. Die Sequenzierung Abb. 4-17 zeigt tatsächlich ein Überwiegen der Mutation im sequenzierten Fragmentamplifikat (Schwankungsbreite zwischen Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung ca. 65-80%).

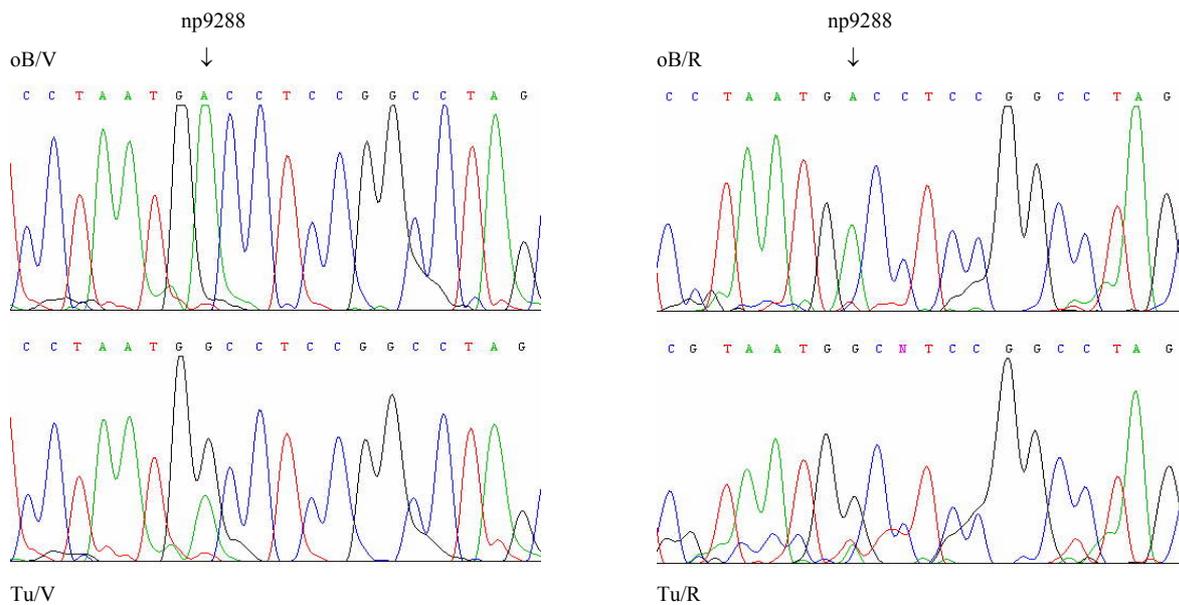


Abb. 4-17: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 27561 (Primerpaar Cox31b, np5281-5300). Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich eine heteroplasmische Transition G→A in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 9288 (Vergleich zur bekannten Basensequenz der Revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

Tab. 4-8: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 3 (Position 20-39).

| | | | | | |
|---|----|----------|----------|-------------|----|
| Schmalwand (<i>Arabidopsis Thaliana</i>) | 21 | GSLGALAT | T | VGGVMYMHSFQ | 40 |
| Bäckerhefe | 26 | VSFALLSL | A | LSTALTMHGYI | 45 |
| Bandwurm | 8 | NASFIGLF | L | VGLFLWKVWFF | 27 |
| Regenwurm | 18 | SSIGAFTL | A | IGLASWFHNHG | 37 |
| Fruchtfliege | 21 | GAIGAMTT | V | SGMVKWFHQYD | 40 |
| Lungenfisch | 20 | GATAALLM | T | SGLAIWFHYHT | 39 |
| Frosch | 20 | GAVAALLL | T | SGLAMWFHFGS | 39 |
| Huhn | 20 | GAAAALLT | T | SGLIMWFHYSS | 39 |
| Rind | 20 | GALSALLM | T | SGLTMWFHFNS | 39 |
| Ratte | 20 | GALSALLL | T | SGLVMWFHYNS | 39 |
| Hund | 20 | GALSALLM | T | SGLIMWFHYNS | 39 |
| Schwein | 20 | GALSALLM | T | SGLTMWFHFNS | 39 |
| Gorilla | 20 | GALSALLM | T | SGLAMWFHFHS | 39 |
| Schimpanse | 20 | GALSALLM | T | SGLAMWFHFYS | 39 |
| Mensch (Afrika) | 20 | GALSALLM | T | SGLAMWFHFHS | 39 |
| Mensch (Cambridge) | 20 | GALSALLM | T | SGLAMWFHFHS | 39 |
| 27561/Tu | 20 | GALSALLM | A | SGLAMWFHFHS | 39 |

4.5.2 Probenpaar 25152

Das Probenpaar 25152 wies bei der dHPLC-Analyse mit dem Primerpaar Cox 31 b bei 58°C im Tumorgewebe einen positiven Befund auf (Abb. 4-18). Bei der Sequenzierung stellte sich eine Transition G→A an der Position 9450 dar, die heteroplasmisch im Tumorgewebe vorhanden war. Das Normalgewebe zeigte keine Sequenzabweichungen (Abb. 4-19).

Nach der Sequenzierung wurde eine senkrechte TGGE zum Vergleich mit der dHPLC-Analyse durchgeführt. Auch hier stellte sich mit dem Primerpaar COX III(16)/31R ein Heteroplasmiebefund im Tumorgewebe dar, während das Normalgewebe einen unauffälligen Kurvenverlauf aufwies (Abb. 4-20).

Die Transition G→A an der Position 9450 hat einen Basenaustausch an der ersten Stelle des Codons GGG für Glycin zur Folge. Die veränderte Sequenz verursacht ein Stop-Codon (AGG) in dieser Position, was zum Abbruch der Translation des Cox 3-Genproduktes (514 AS) nach der 81. Aminosäure führt. Glycin in Position 82 ist eine während der gesamten Evolution stark konservierte Aminosäure, die sich auch bei Nicht-Wirbeltieren und im Pflanzenreich findet (Tab. 4-9). Wichtiger ist hier jedoch die Entstehung eines Stop-Codons.

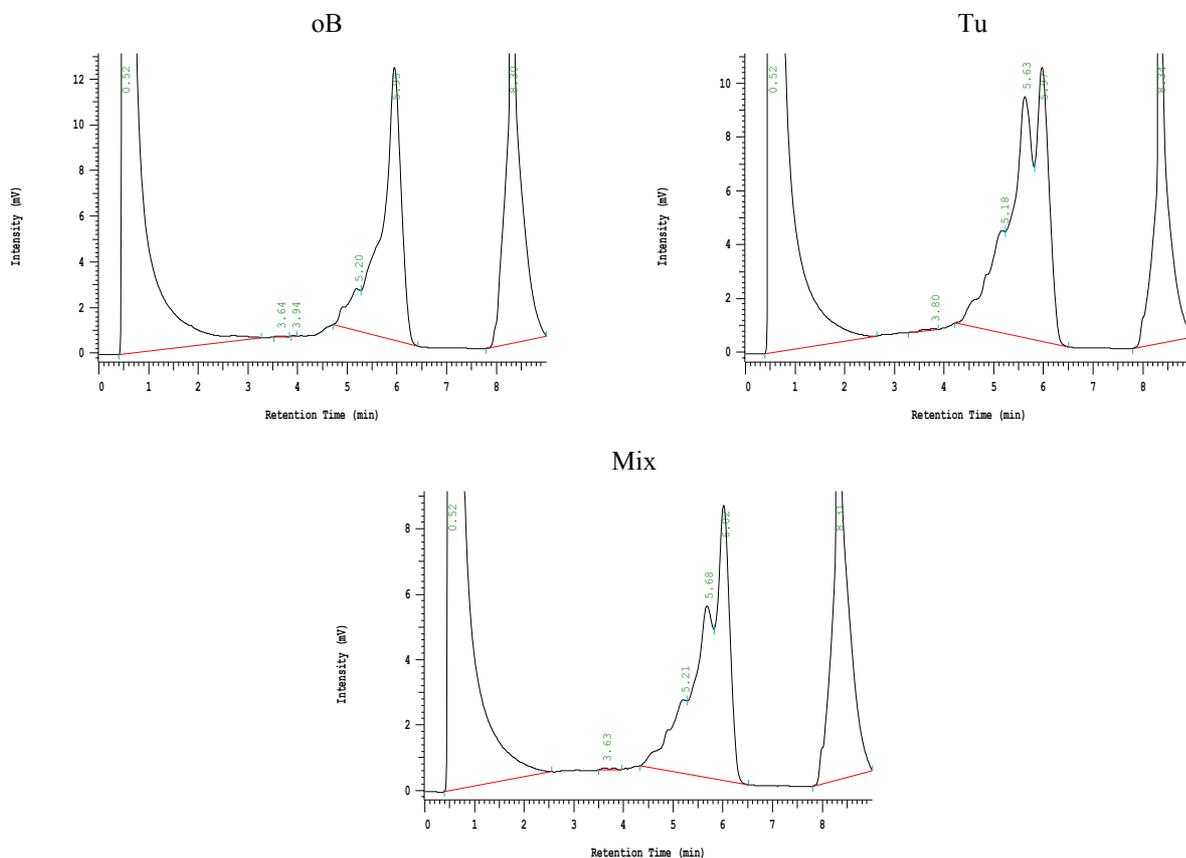


Abb. 4-18: dHPLC-Analyse von Probenpaar 25152 (Primerpaar Cox 31b, 58°C)

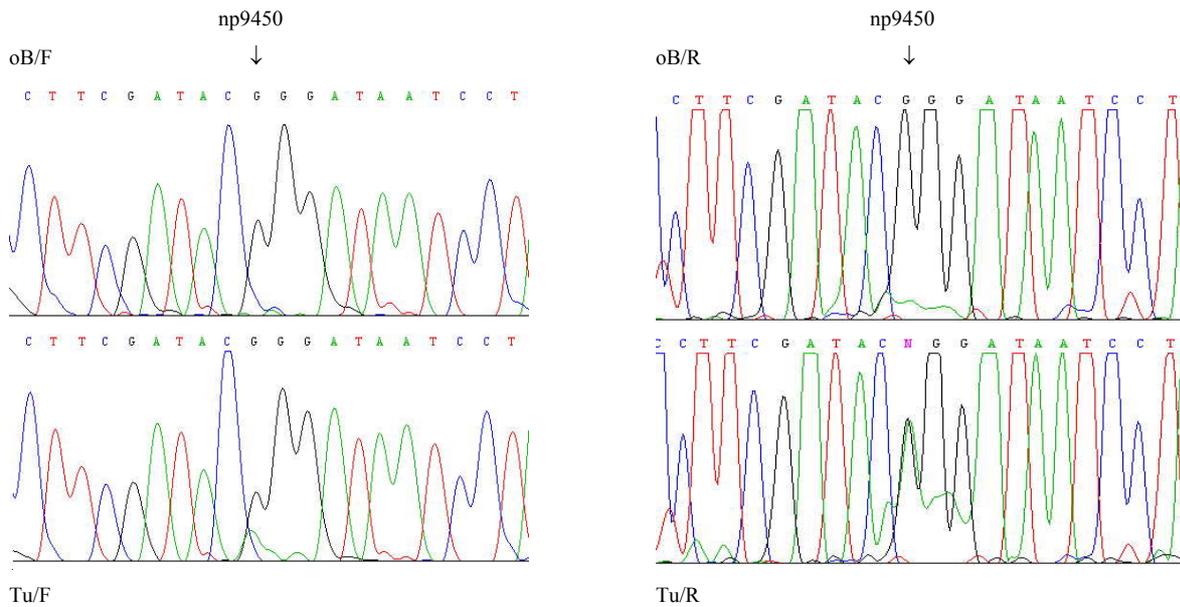


Abb. 4-19: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 25152 (Primerpaar Cox31b, np9450).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich eine heteroplasmische Transition G→A in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 9450 (Vergleich zur bekannten Basensequenz der Revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

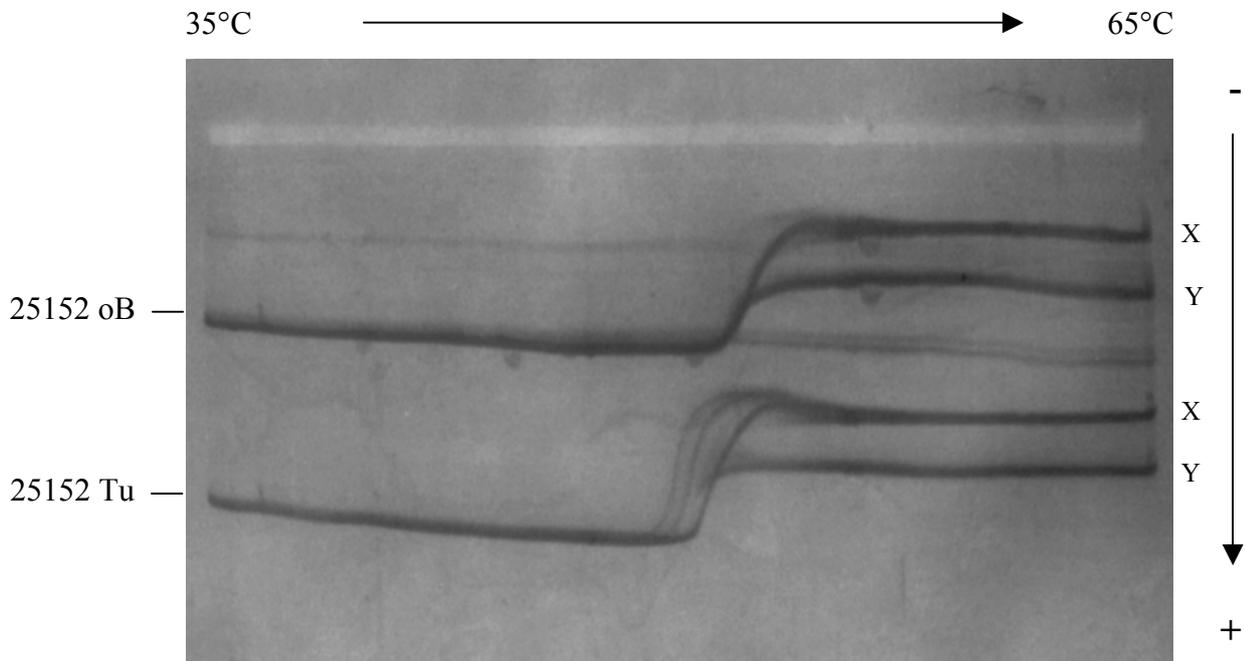


Abb. 4-20: senkrechte TGGE des Probenpaars 25152 (Primerpaar COX III(16) / 31R, 35-65°C, 300V/45mA, 30 min, X: Crosslink der Einzelstränge erfolgt, Y: Crosslink der Einzelstränge nicht erfolgt)

Tab. 4-9: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 3 (Position 71-86).

| | | | | | |
|---|----|-------------|-------------|--------------|----|
| Schmalwand (<i>Arabidopsis Thaliana</i>) | 74 | HTKVVQLGLRY | G | FI-----LF | 89 |
| Bäckerhefe | 79 | HTMAVRKGINL | G | FL-----MF | 94 |
| Bandwurm | 42 | ----VWDGL-- | G | KVFHYESAFWLF | 59 |
| Regenwurm | 69 | HTSLVTTGLRW | G | MI-----LF | 84 |
| Fruchtfliege | 72 | HTYAVTIGLRW | G | MI-----LF | 87 |
| Lungenfisch | 71 | HTAPVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Frosch | 71 | HTPPVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Huhn | 71 | HTPTVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Rind | 71 | HTPAVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Ratte | 71 | HTPIVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Hund | 71 | HTPIVQKGLRY | G | MV-----LF | 86 |
| Schwein | 71 | HTSVVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Gorilla | 71 | HTLPVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Schimpanse | 71 | HTPPVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Mensch (Afrika) | 71 | HTPPVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| Mensch (Cambridge) | 71 | HTPPVQKGLRY | G | MI-----LF | 86 |
| 25152/Tu | 71 | HTPPVQKGLRY | Stop | | 81 |

4.5.3 Probenpaar 27665

Beim Probenpaar 27665 ergab sich mit dem Primerpaar Cox 33b bei 59°C ein Heteroduplex-Befund im Tumorgewebe (Abb. 4-21). Die Sequenzanalyse zeigte eine heteroplasmisch vorliegende Transition T→C in Position 9750 im Gen der Cox 3 (Abb. 4-22). Das Normalgewebe zeigte im gleichen Bereich keine Abweichungen von der revidierten Cambridge-Sequenz.

Nach der Sequenzierung wurde eine senkrechte TGGE zum Vergleich mit der dHPLC-Analyse durchgeführt. Auch hier stellte sich mit dem Primerpaar COX III(16) / 31R ein Heteroplasmiebefund im Tumorgewebe dar, während das Normalgewebe einen unauffälligen Kurvenverlauf aufwies (Abb. 4-23).

Die Transition T→C führt zu einem Austausch des 1. Nukleotids des Codons TTC für Phenylalanin, so dass das Codon CTC für Leucin entsteht. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch von Phenylalanin gegen Leucin Position 182. Beim Vergleich mit anderen Spezies zeigt sich, dass die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin bei den Wirbeltieren an dieser Position vorherrschen (die einzige Ausnahme bildet das Huhn). Bei der Fruchtfliege und den Weichtieren ist jedoch keine aromatische Aminosäure in dieser Position zu finden (Tab. 4-10).

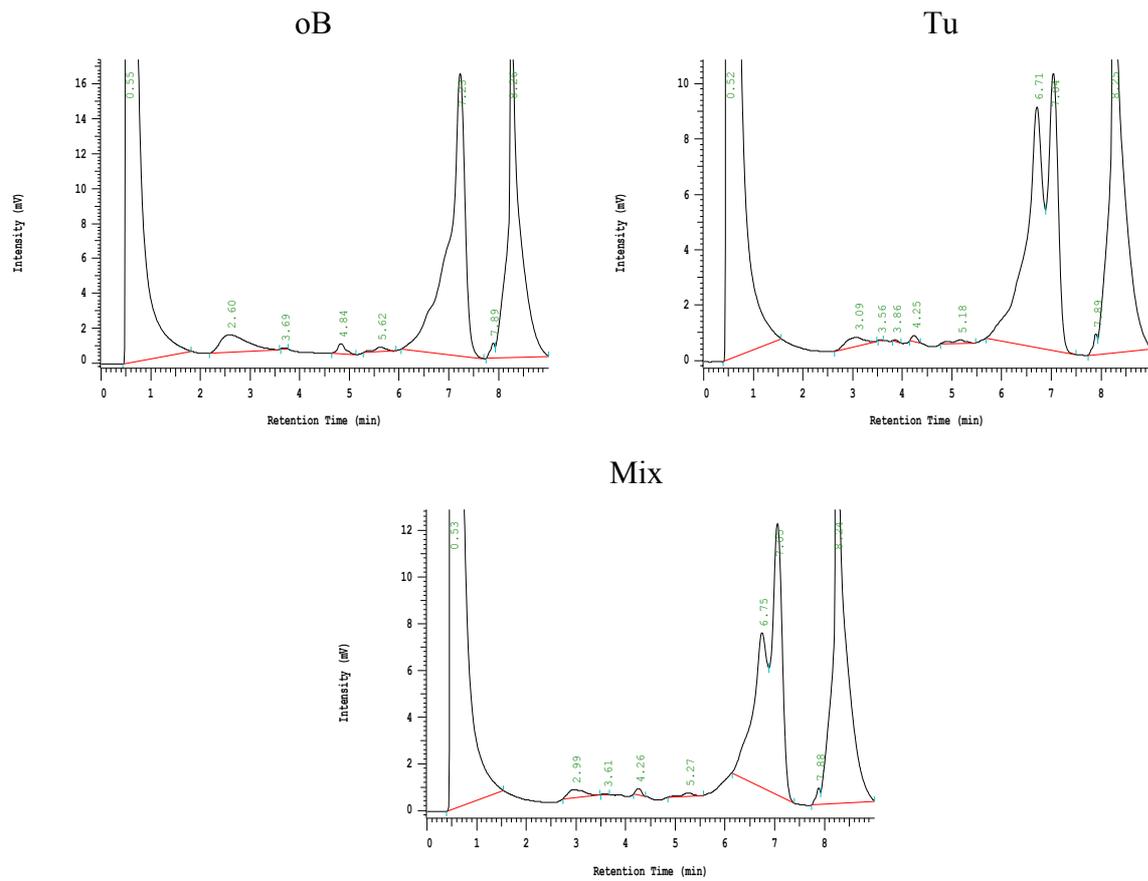


Abb. 4-21: dHPLC-Analyse von Probenpaar 27665 (Primerpaar Cox 33b, 59°C).

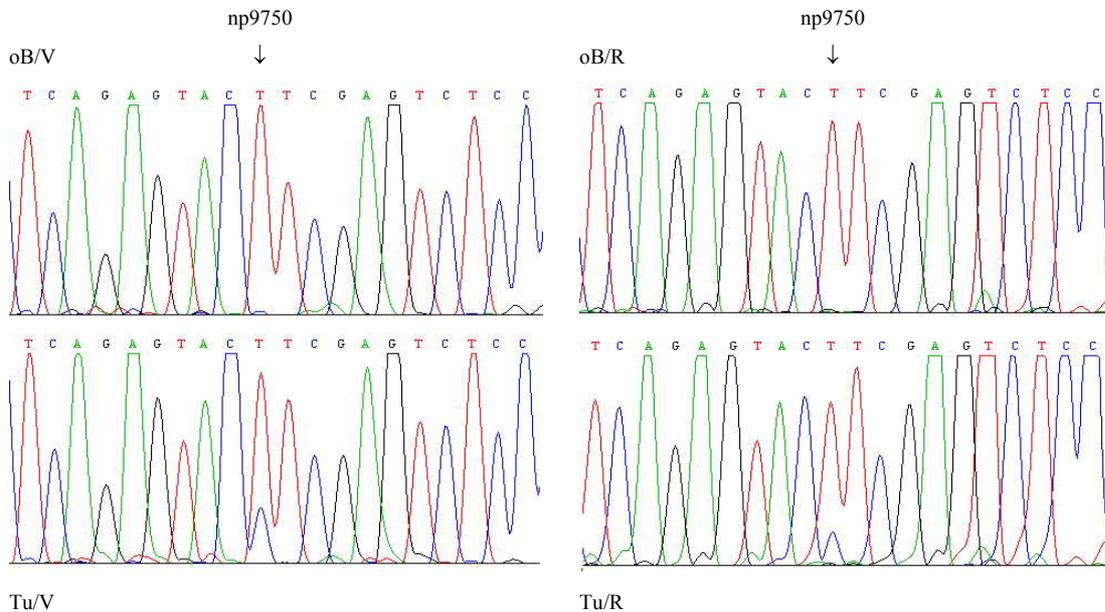


Abb. 4-22: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 27665 (Primerpaar Cox33b, np9750).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);
links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);
links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich eine heteroplasmische Transition T→C in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 9750 (Vergleich zur bekannten Basensequenz der Revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

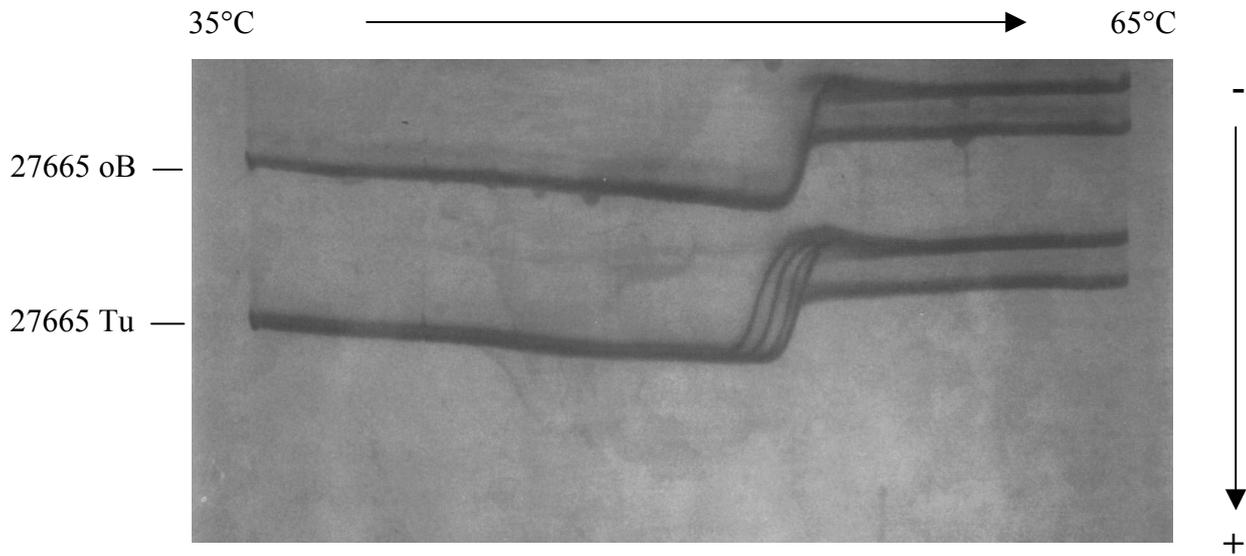


Abb. 4-23: senkrechte TGGE des Probenpaares 27665 (Primerpaar COX III(16) / 31R, 35-65°C, 300V/43mA, 30 min)

Tab. 4-10: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Cox 3 (Position 175-195).

| | | | | | |
|---|-----|---------|----------|---------------|-----|
| Schmalwand (<i>Arabidopsis Thaliana</i>) | 178 | GFQGMEY | Y | QAPFTISDSIYGS | 198 |
| Bäckerhefe | 183 | TCQYIEY | T | NAAFTISDGVYGS | 203 |
| Bandwurm | 134 | ALQIFEE | D | IGVNAF-DSSFHA | 153 |
| Regenwurm | 173 | FLQAGEY | M | AAPFSIADSVYGT | 193 |
| Fruchtfliege | 176 | ILQAYEY | I | EAPFTIADSIYGS | 196 |
| Lungenfisch | 175 | ALQAMEY | Y | EAPFTIADSVYGA | 195 |
| Frosch | 175 | ALQAMEY | Y | EAPFTIADGVYGS | 195 |
| Huhn | 175 | ALQAMEY | H | EASFSIADSVYGS | 195 |
| Rind | 175 | LLQASEY | Y | EAPFTISDGVYGS | 195 |
| Ratte | 175 | LLQASEY | F | ETSFSISDGIYGS | 195 |
| Hund | 175 | LLQASEY | Y | ETSFTISDGVYGS | 195 |
| Schwein | 175 | LLQASEY | Y | EAPFTISDGVYGS | 195 |
| Gorilla | 175 | LLQASEY | F | EAPFTISDGIYGS | 195 |
| Schimpanse | 175 | LLQASEY | F | ESPFTISDGIYGS | 195 |
| Mensch (Afrika) | 175 | LLQASEY | F | ESPFTISDGIYGS | 195 |
| Mensch (Cambridge) | 175 | LLQASEY | F | ESPFTISDGIYGS | 195 |
| 27665/Tu | 175 | LLQASEY | L | ESPFTISDGIYGS | 195 |

4.6 Mutationen innerhalb der Untereinheit IV der NADH-Dehydrogenase

4.6.1 Probenpaar 27562

Das Probenpaar 27562 fiel in der dHPLC-Analyse mit dem Primerpaar Nad 43a bei 58°C durch ein leicht verändertes Peak-Profil des Tumorgewebes auf, wobei diese Veränderung sich bei der Mischung mit dem korrespondierenden Normalgewebe stärker ausprägte (Abb. 4-24).

Bei der anschließend durchgeführten Sequenzierung stellte sich eine Deletion von Adenin in Position 11038 dar. (Abb. 4-25).

Die Deletion von Adenin in Position 11038 führt von dieser Stelle ausgehend zu einer Verschiebung aller weiteren Codons im Gen für die 4. Untereinheit der NADH („Frameshift“). Diese Verschiebung des Leserasters ab Aminosäure 93 führt nach fünf weiteren Aminosäuren zu einem illegitimen Stop-Codon (Tab 4-11). Es entsteht ein auf 98 Aminosäuren verkürztes Protein anstatt der kompletten aus 459 Aminosäuren bestehenden ND4.

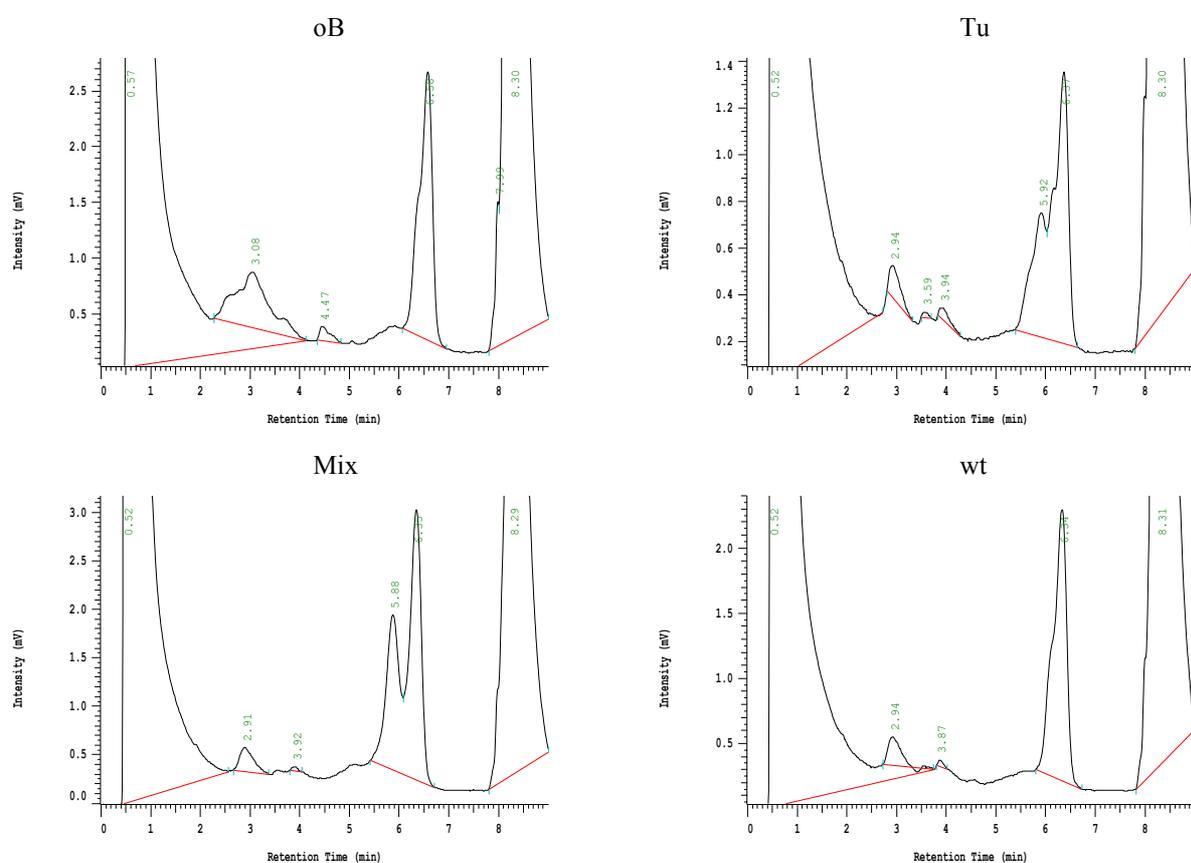


Abb. 4-24: dHPLC-Analyse von Probenpaar 27562 (Primerpaar Nad 43a, 58°C, np11038, wt: Wildtyp).

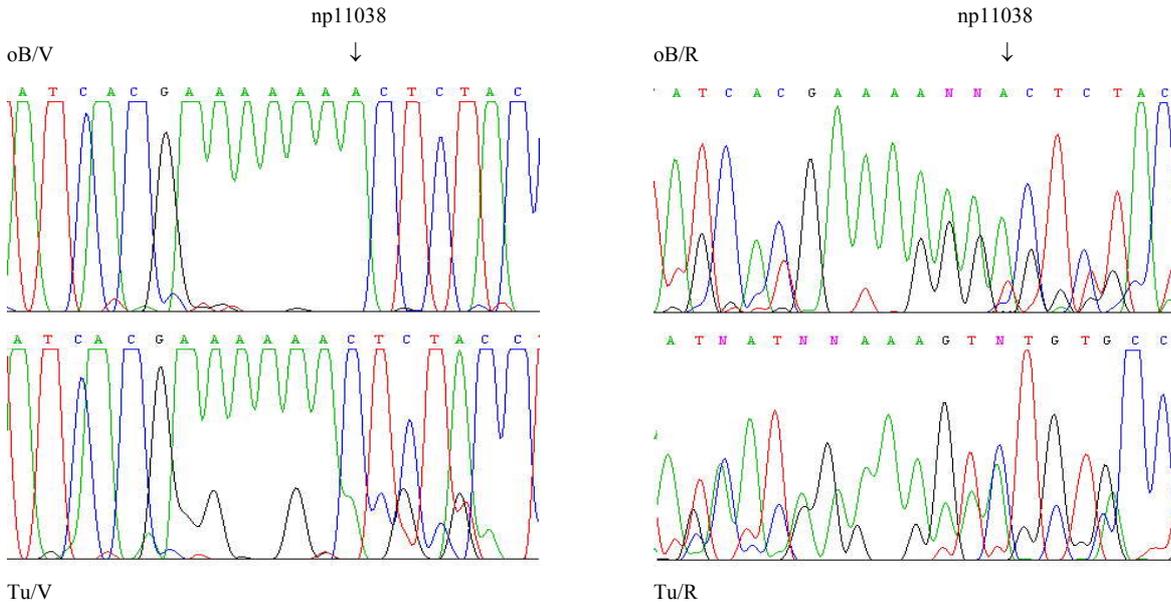


Abb. 4-25: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 26395 (Primerpaar Nad43a, np11038).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich eine Deletion von Adenin in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 11038. Die Rückwärtssequenzierungen waren auch in der Wiederholung von schlechter Qualität. Die Vorwärtssequenzierungen zeigten wiederholt die del 11038 im Tumorgewebe (Vergleich zur bekannten Basensequenz der revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

Tab. 4-11: Interspezies-Vergleich der Aminosäure-Sequenz der ND4 (Position 86-105).

| | | | | | |
|--------------------|----|---------|----------|-------------------|-----|
| Bandwurm | 86 | VYELSM | P | LLY__LIFSESP | 103 |
| Regenwurm | 83 | LN--MYP | K | MFMTNLVILLII | 100 |
| Fruchtfliege | 81 | HN__NYK | N | LFLLNIIILLII | 98 |
| Lungenfisch | 87 | HEPLQRQ | R | VYLILLMILQTF | 106 |
| Frosch | 86 | NEPISRQ | R | TFITMLVFLQLS | 105 |
| Huhn | 86 | HEPHKRK | R | MFISTLIIIQPF | 105 |
| Rind | 86 | KENLTRK | K | LFITMLISLQLF | 105 |
| Ratte | 86 | KENMMHQ | K | LYISMLISLQIL | 105 |
| Hund | 86 | KEPLTRK | K | LYISMLILLQLF | 105 |
| Schwein | 86 | KETTTRK | K | LYITMLILLQLF | 105 |
| Gorilla | 86 | NEPLSRK | K | LYLSMLISLQIS | 105 |
| Schimpanse | 86 | NEPLSRK | K | LYLSMLISLQIS | 105 |
| Mensch (Afrika) | 86 | SEPLSRK | K | LYLSMLISLQIS | 105 |
| Mensch (Cambridge) | 86 | SEPLSRK | K | LYLSMLISLQIS | 105 |
| 27562 Tu | 86 | SEPLSRK | N | STSLY Stop | 98 |

4.7 Mutationen innerhalb nicht-kodierender Bereiche

Bei der Kontrollregion handelt es sich um einen nicht-kodierenden Bereich der mtDNA. Er enthält Sequenzen, die für Replikation und Transkription der mtDNA von Bedeutung sind. In dieser 1123 Basenpaaren umfassenden Region herrscht eine hohe Variabilität und es finden sich viele Polymorphismen.

4.7.1 Probenpaar 29934

Das Probenpaar 29934 fiel im Bereich des Primerpaares KR 81a bei 59°C durch einen Doppelpeak im Normal- und Tumorgewebe auf, der in anderen Vergleichsproben nicht nachweisbar war (Abb. 4-26). In der Sequenzanalyse stellte sich eine Transition A→G in Position 16175 dar, die in beiden Gewebeproben heteroplasmisch vorlag (Abb. 4-27).

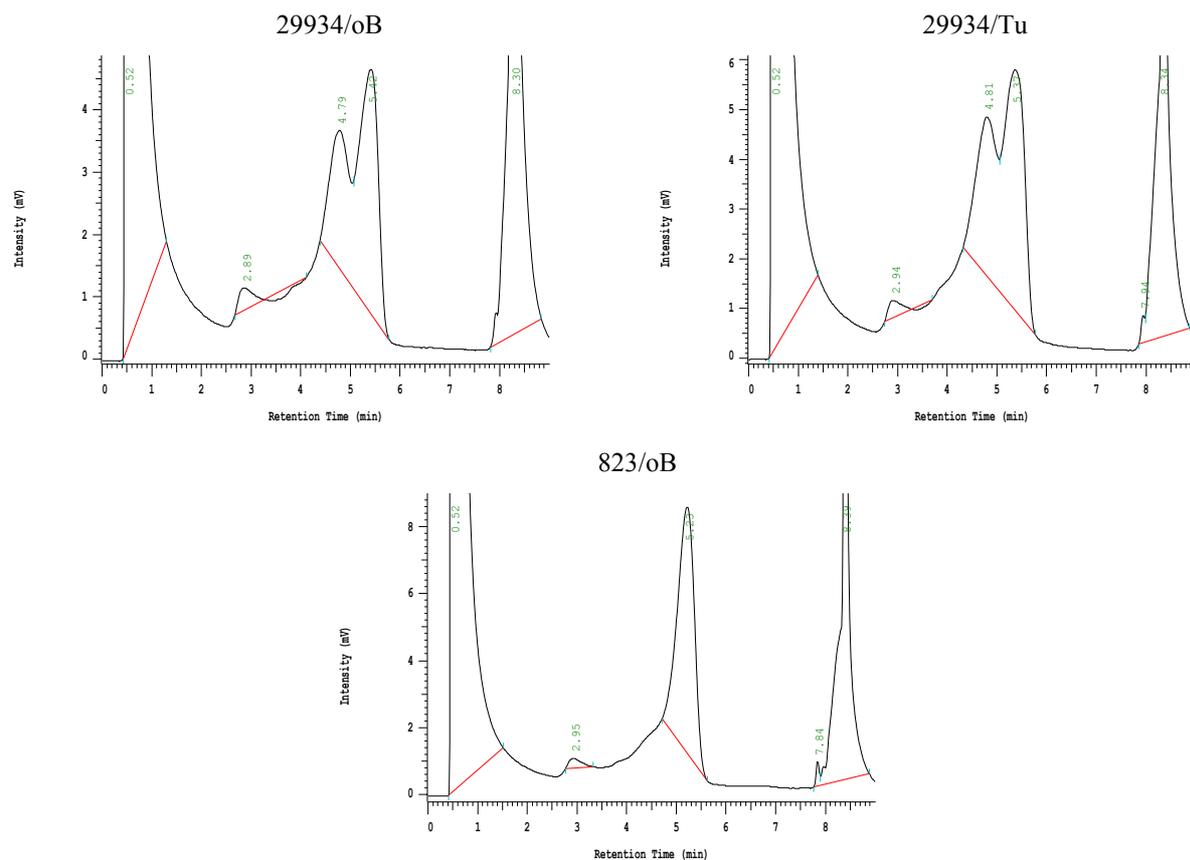


Abb. 4-26: dHPLC-Analyse von Probenpaar 29934 (Primerpaar KR 81a, 59°C, np16175).

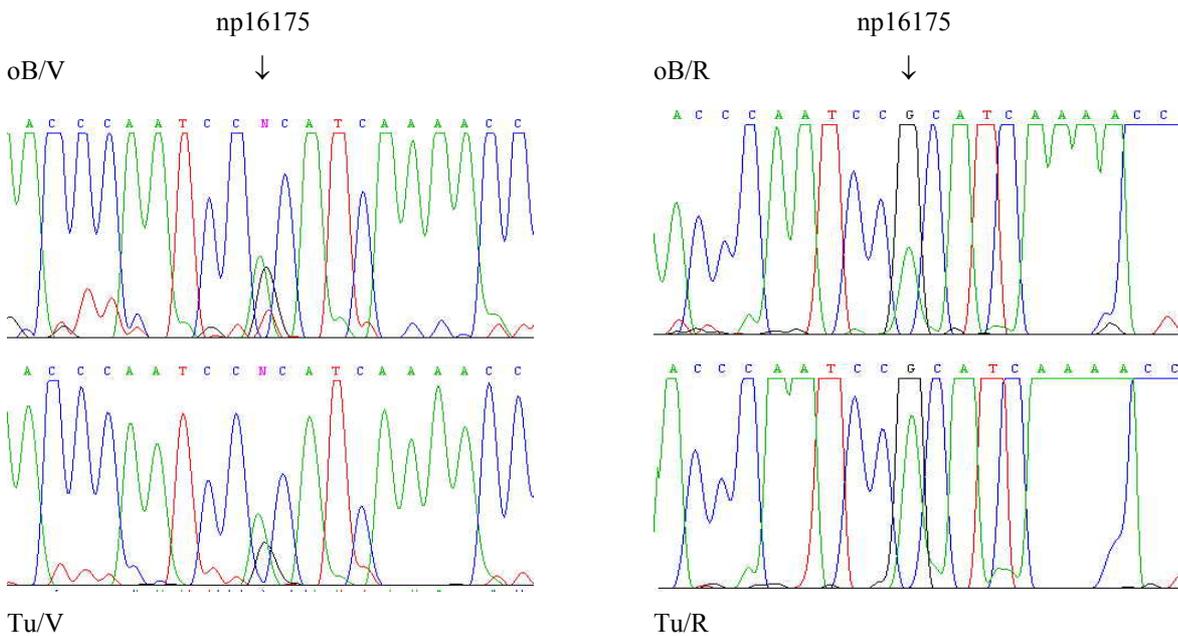


Abb. 4-27: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 29934 (Primerpaar KR81a, np16175).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Bei Normal- und Tumorgewebe zeigt sich eine heteroplasmische Transition A→G in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 16175 (Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

4.7.2 Probenpaar 32435

Das Probenpaar 32435 ergab mit dem Primerpaar KR 83a bei 61°C einen Heteroduplex-Befund im Tumorgewebe, welcher im Normalgewebe nicht auftrat (Abb. 4-28). Bei der Sequenzierung stellten sich zwei homoplasmische und eine heteroplasmische Mutation dar. Bei der homoplasmischen Transition T→C in Position 16519 handelt es sich um einen vorbeschriebenen Polymorphismus (s. Tab. 4-13) Die homoplasmische Transition A→T in Position 74 (Abb. 4-30) ist in der Referenz (Mitomap) noch nicht als Polymorphismus ausgewiesen. Beide Transitionen waren sowohl im Normal- wie im Tumorgewebe nachweisbar. Die heteroplasmische Transition C→T in Position 16488 konnte nur im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Abb. 4-29) und ist in der Referenz (Mitomap) ebenfalls noch nicht beschrieben.

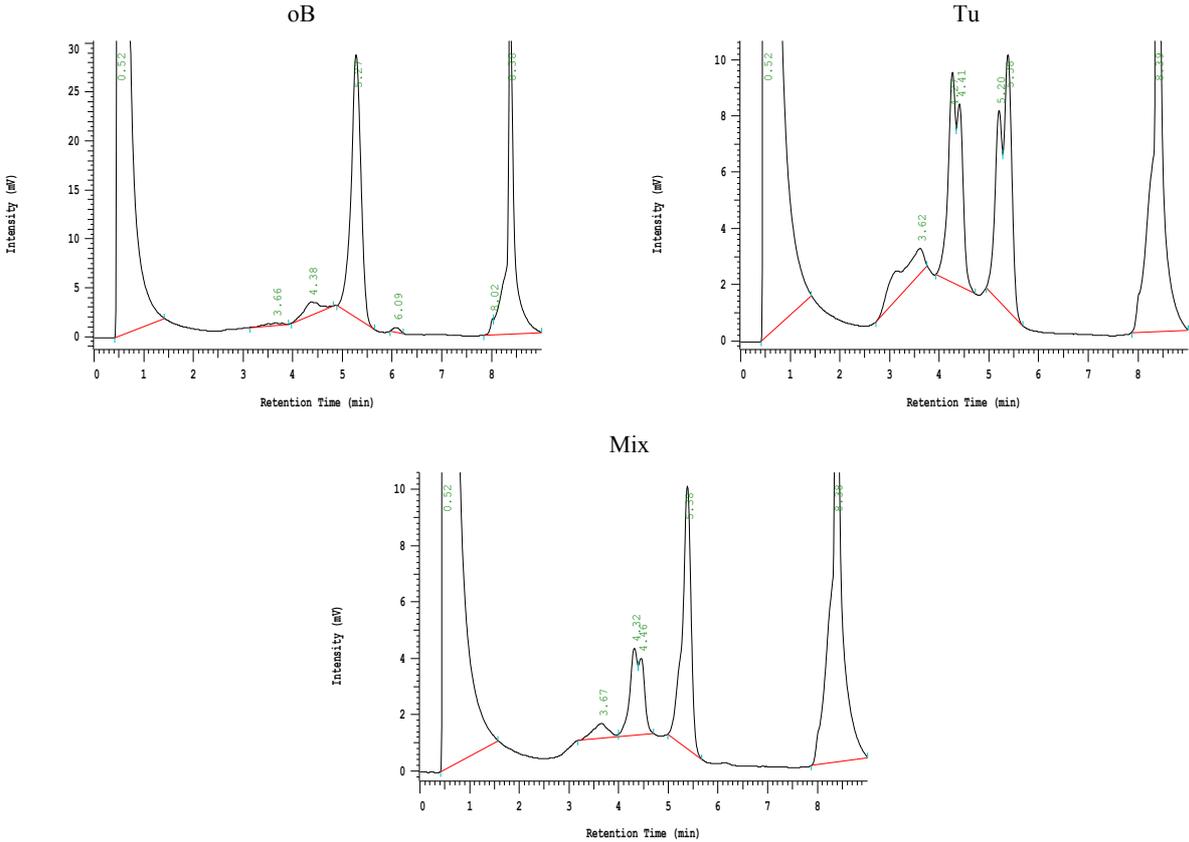


Abb. 4-28: dHPLC-Analyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar KR 83a, 61°C, np16450 - np150).

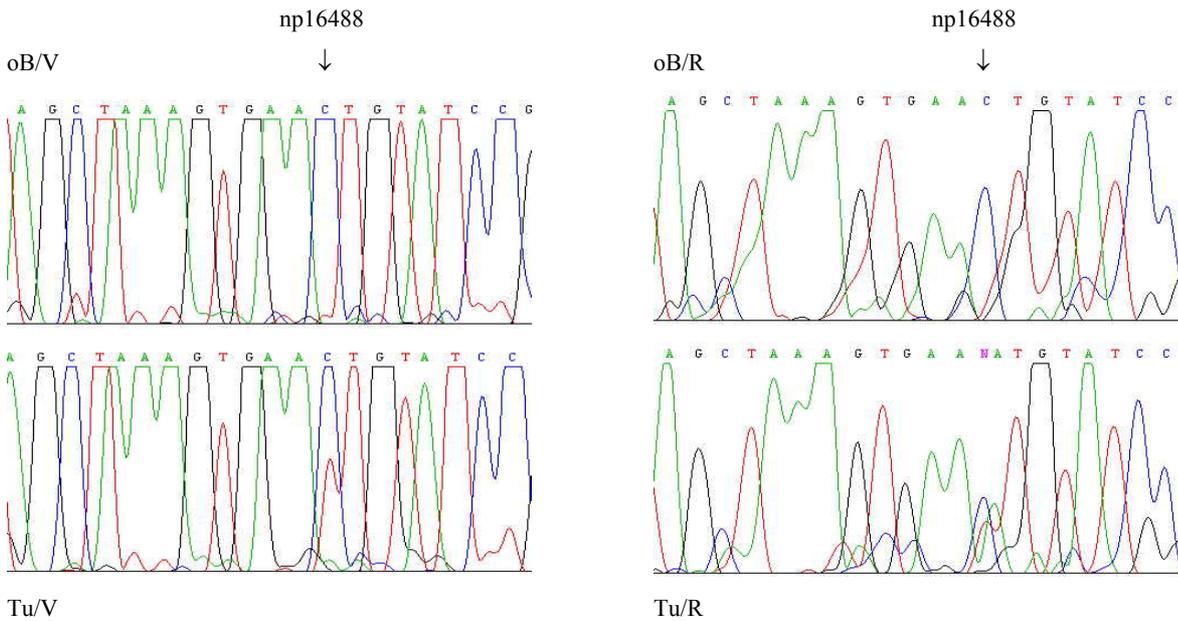


Abb. 4-29: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar KR83a, np16488).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Tumorgewebe zeigt sich eine heteroplasmische Transition C→T in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 16488 (Vergleich revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

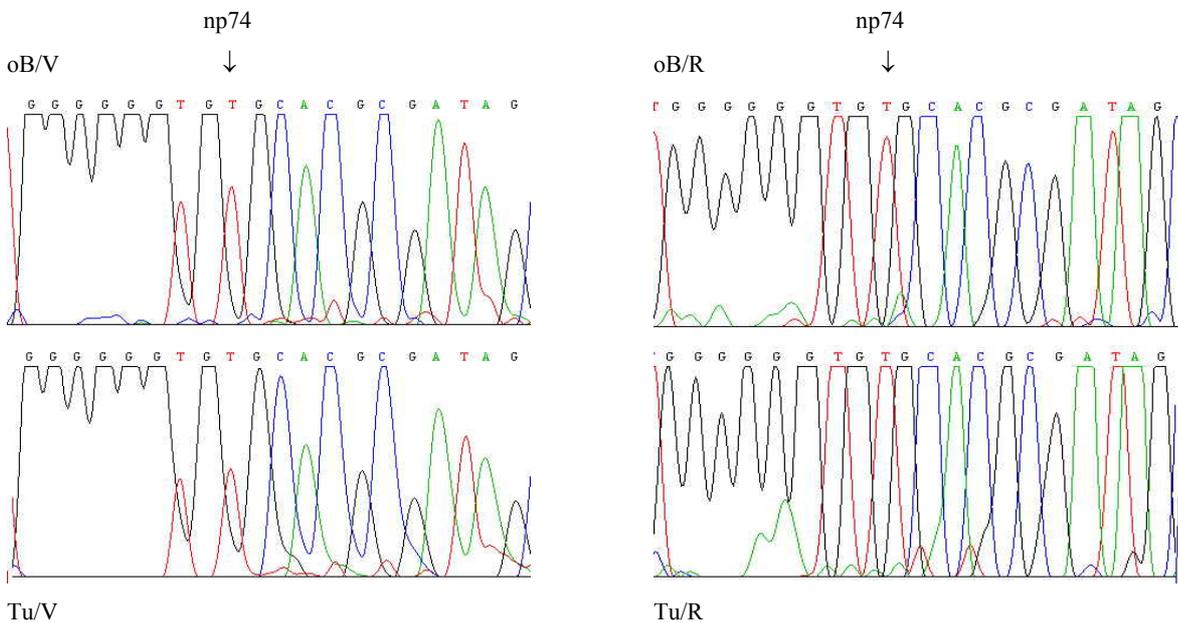


Abb. 4-30: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32435 (Primerpaar KR83a, np74).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Normal- und Tumorgewebe zeigt sich eine homoplasmische Transition A→T in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 74 (Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

4.7.3 Probenpaar 32836

Probenpaar 32836 zeigte mit dem Primerpaar KR 85a bei 58°C einen auffälligen Befund des Normalgewebes im Vergleich zum Tumorgewebe (Abb. 4-31). Bei der Sequenzierung fanden sich vier homoplasmische Transitionen im Normal- und Tumorgewebe (Abb. 4-32 und Abb. 4-33), zwei homoplasmische Insertionen (Abb. 4-34) und eine im Normalgewebe heteroplasmische Transition, die im Tumorgewebe homoplasmisch vorlag (Abb. 4-35). Transitionen A189G, T195C, A215G und A263G sowie Insertion 309C sind als pathogenetisch irrelevante Polymorphismen in der Referenz (www.mitomap.org) bereits vorbeschrieben. Transition T266C und Insertion 311C sind wahrscheinlich aufgrund des homoplasmischen Auftretens in Normal- und Tumorgewebe sowie ihrer Lage in der sehr variablen Kontrollregion ebenfalls als pathogenetisch irrelevante Polymorphismen einzustufen.

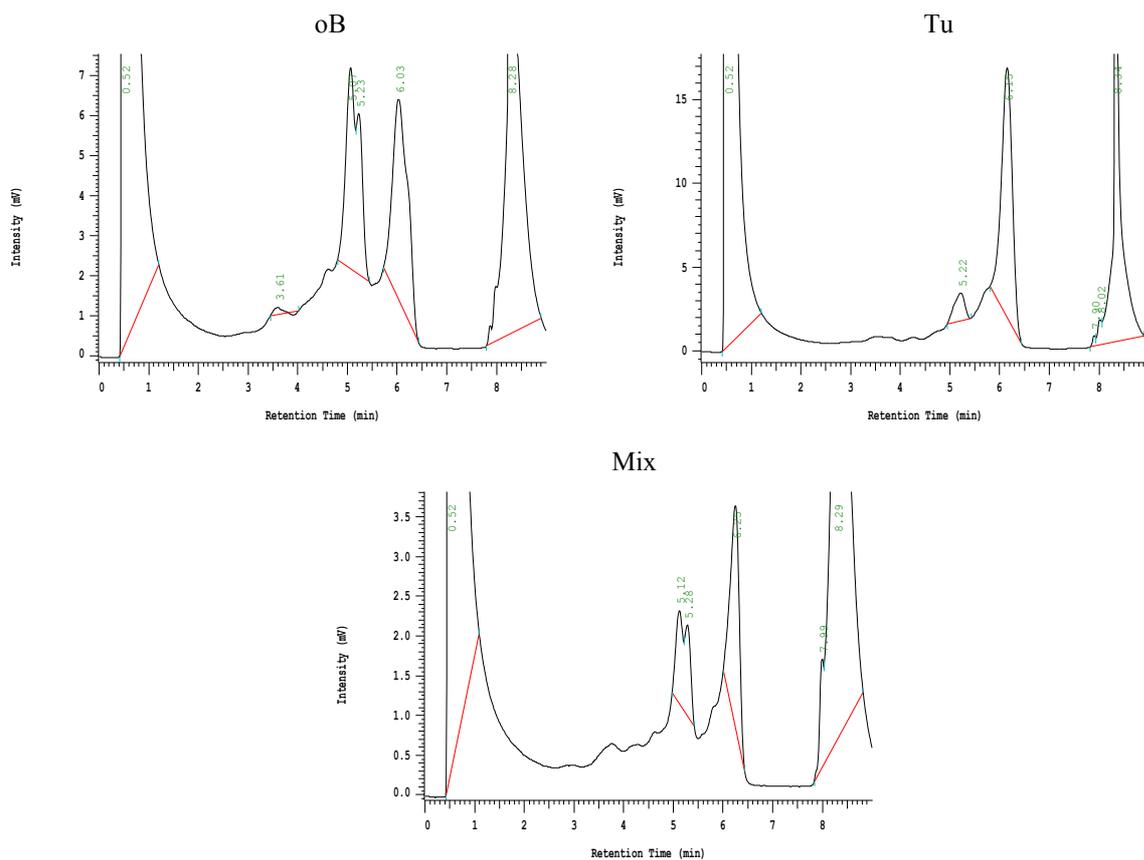


Abb. 4-31: dHPLC – Analyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR 85a, 58°C, np150–np380).

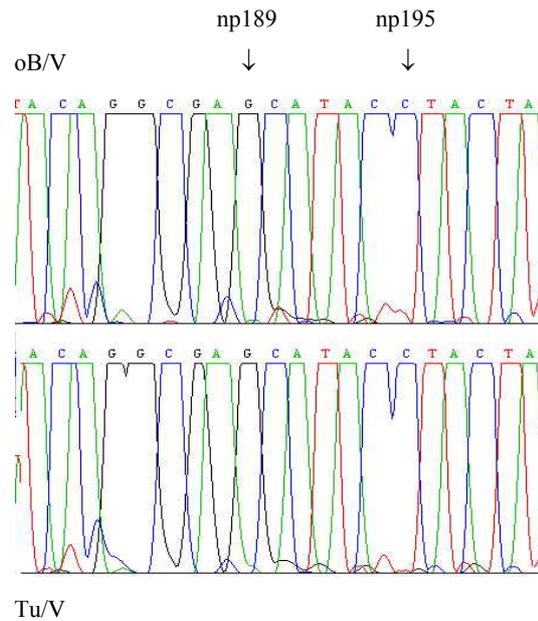


Abb. 4-32: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR85a, np180-200).
 Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB); Vorwärtssequenzierung (V)
 Untere Hälfte der Abbildung: Korrespondierendes Tumorgewebe (Tu); Vorwärtssequenzierung (V)
 Im Normal- und Tumorgewebe zeigt sich eine homoplasmische Transition A→G in Position 189 und eine Transition T→C in Position 195 (Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)). Die Rückwärts-Sequenzierung war in diesem Bereich nicht auswertbar.

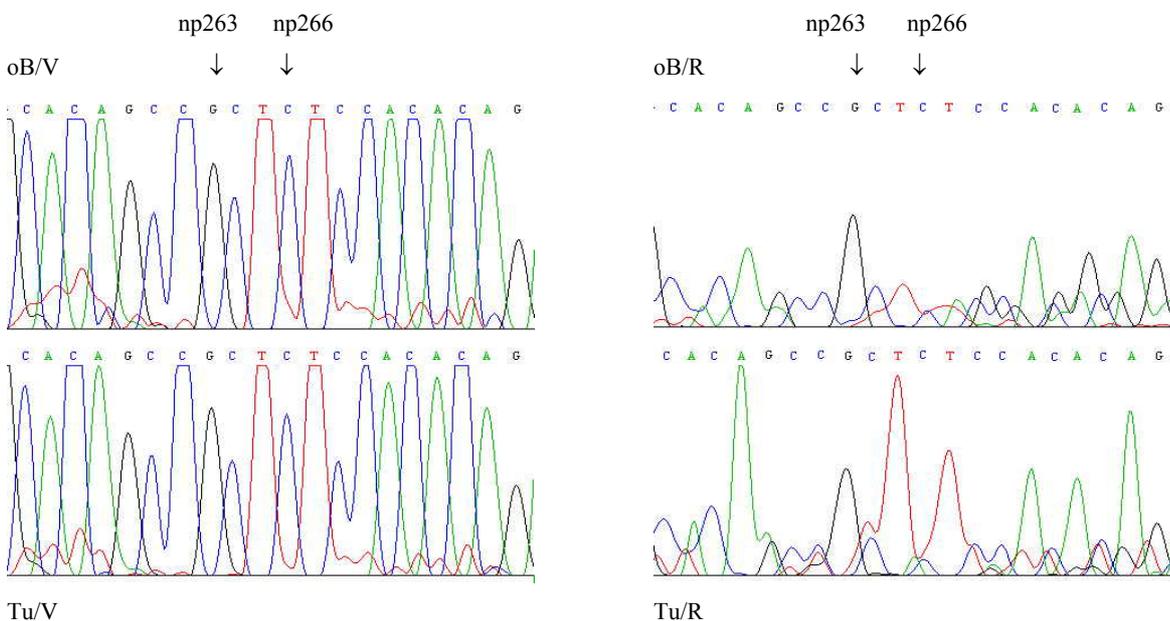


Abb. 4-33: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR85a, np255-275).
 Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);
 links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)
 Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);
 links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)
 Im Normal- und Tumorgewebe zeigt sich eine homoplasmische Transition A→G in Position 263 und eine Transition T→C in Position 266 in beiden Sequenzierungsrichtungen (Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

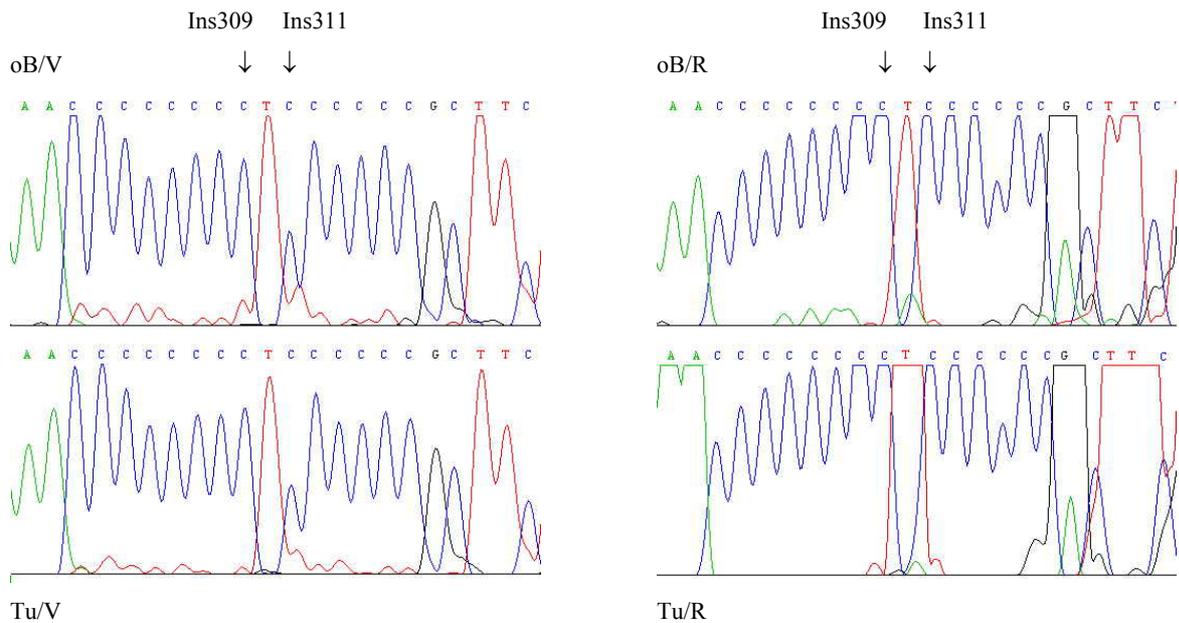


Abb. 4-34: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR85a, np300-320).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: Korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Normal- und Tumorgewebe zeigen sich zwei homoplasmische Insertionen von Cytosin in Position 309 und in Position 311 in beiden Sequenzierungsrichtungen (Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

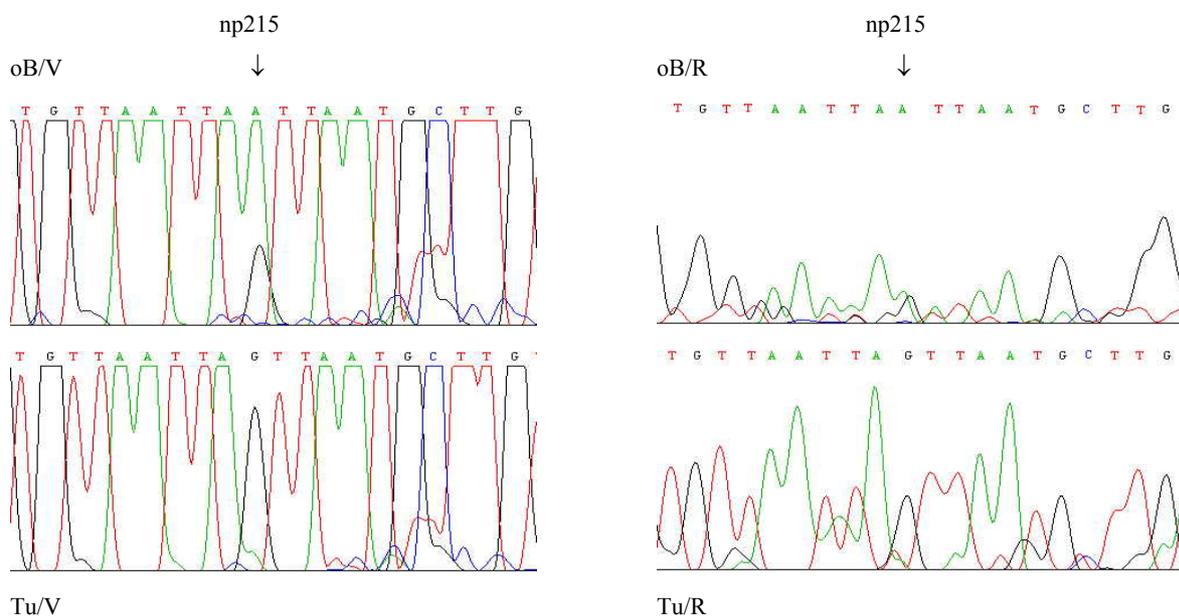


Abb. 4-35: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32836 (Primerpaar KR85a, np215).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: Korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Normalgewebe zeigt sich eine heteroplasmische Transition A→G in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 215, die im Tumorgewebe homoplasmisch vorliegt (Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

4.7.4 Probenpaar 32530

Auch beim Probenpaar 32530 fiel das Normalgewebe in der dHPLC-Analyse auf. Mit dem Primerpaar NAD 27a bei 57°C zeigte das Normalgewebe einen klaren Heteroduplex-Befund, während sich das Tumorgewebe praktisch unauffällig darstellte (Abb. 4-36). In der Sequenzierung stellte sich eine Transition G→A in Position 5585 dar, die im Normalgewebe heteroplasmisch und im Tumorgewebe homoplasmisch vorliegt (Abb. 4-37). Guanin in np5585 ist das letzte Nukleotid einer nicht-kodierenden Region zwischen den tRNAs für Tryptophan und Alanin. Dieser Polymorphismus ist in der Referenz (Mitimap) noch nicht beschrieben.

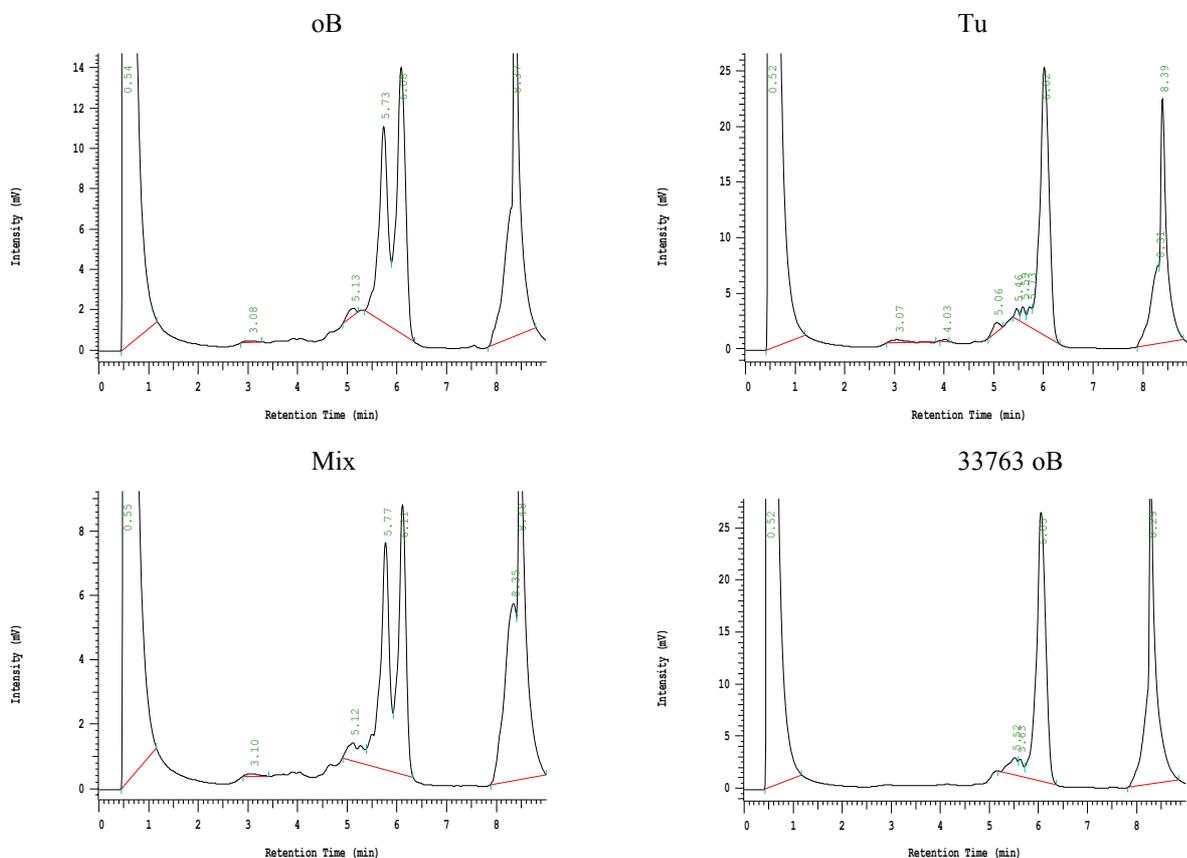


Abb. 4-36: dHPLC-Analyse von Probenpaar 32530 und 33763 (Primerpaar Nad 27a, 57°C, np5585).

Im Normalgewebe von Probe 32530 findet sich im Chromatogramm ein geschätzter Heteroduplex-Anteil von ca. 40% im Tumorgewebe. Dies entspricht rechnerisch einem Mutationsanteil von ca. 70%. Die Sequenzierung Abb. 4-37 zeigt tatsächlich ein Überwiegen der Mutation im sequenzierten Fragmentamplifikat (Schwankungsbreite zwischen Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung ca. 67-74%). Die im Chromatogramm der Tumorprobe zu findenden Vorpeaks zwischen 5,06 und 5,73 min stellen in diesem dHPLC-Lauf Artefakte dar, die in unterschiedlicher Ausprägung in allen untersuchten Proben unabhängig von Heteroduplexbefunden nachgewiesen wurden. (Zum Vergleich ist die dHPLC-Analyse des Normalgewebes von Probe 33763 abgebildet.)

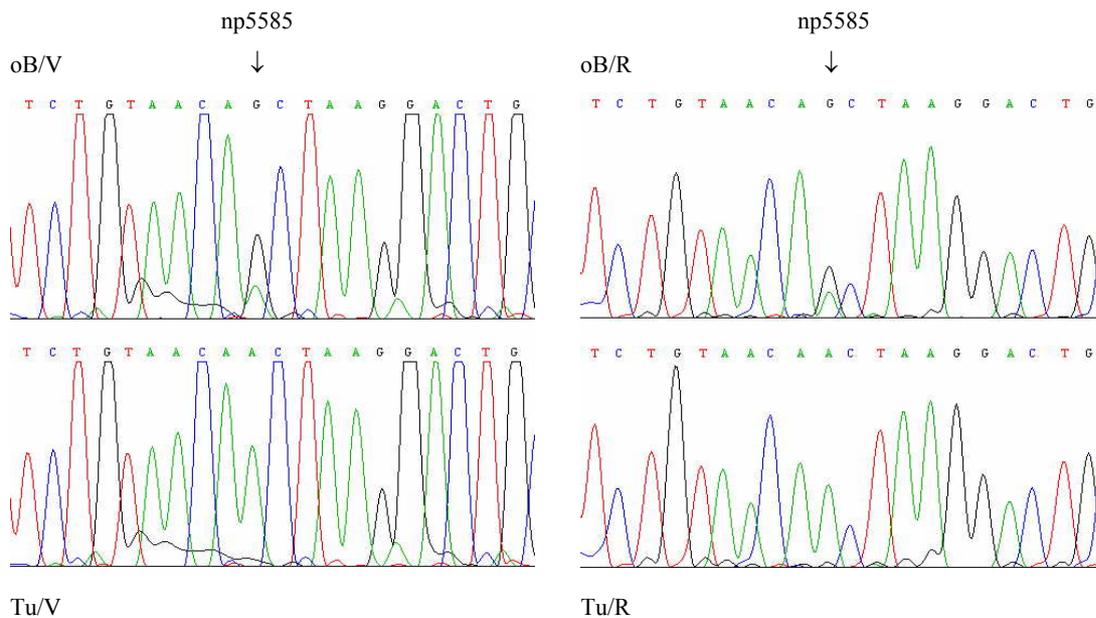


Abb. 4-37: Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von Probenpaar 32530 (Primerpaar Nad27a, np5585).

Obere Hälfte der Abbildung: Normales Vergleichsgewebe (oB);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Untere Hälfte der Abbildung: korrespondierendes Tumorgewebe (Tu);

links: Vorwärtssequenzierung (V), rechts: Rückwärtssequenzierung (R)

Im Normalgewebe zeigt sich die heteroplasmische Transition G→A in beiden Sequenzierungsrichtungen in Position 5585, während das korrespondierende Tumorgewebe diese Transition homoplasmisch aufweist (Im Vergleich zur revidierten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999)).

4.8 Bisher nicht bekannte Polymorphismen

Neben den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Mutationen, die bereits als noch nicht bekannte Polymorphismen eingestuft wurden, ergaben sich 2 Mutationen in Protein kodierenden Abschnitten, die zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führen. Diese sind ebenfalls als Polymorphismen zu interpretieren.

Es handelt sich zum einen dabei um eine heteroplasmische Transition G→A in Position 6446 innerhalb der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase im Tumorgewebe des Probenpaares 33763. Es ist das 3. Basenpaar des Codons ACG betroffen, so dass sich kein Aminosäureaustausch der AS Threonin in Position 181 ergibt. Die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase besteht aus 514 Aminosäuren.

Bei der zweiten Mutation handelt es sich um eine homoplasmische Transition G→A in Position 3591 innerhalb der Untereinheit I der NADH Dehydrogenase in Vergleichs- und Tumorgewebe des Probenpaares 26395. Hier ist das 3. Basenpaar des Codons CTG betroffen, so dass die AS Leucin in Position 95 erhalten bleibt. Die Untereinheit I der NADH Dehydrogenase besteht aus 318 Aminosäuren.

4.9 Zusammenfassung der gefundenen Mutationen

Tab. 4-12: Übersicht der potentiell pathogenetisch relevanten mtDNA-Mutationen

| Probe | PCR-Fragment | mtDNA-Position | mtDNA-Mutation | Plasmie-verteilung oB/Tu | AS-Position | AS-Wechsel | Protein/Untereinheit |
|-------------|--------------|----------------|----------------|--------------------------|-------------|------------|--------------------------|
| 33464 oB/Tu | mrR 99a | 3250 | T → G | hetero/homo | – | – | tRNA ^{Leu(UUR)} |
| 1112 Tu | mrR 99a | 3047 | G → A | hetero | – | – | 16S rRNA |
| 32435 Tu | mrR 96a | 2248–2249 | del | hetero | – | – | 16S rRNA |
| 33464 Tu | Cox 77b | 7332 | G → A | hetero | 477 | Ala→Thr | Cox I |
| 26395 Tu | Nad 28a | 5949 | G → A | hetero | 15 | Gly→Stop | Cox I |
| 27561 Tu | Cox 31b | 9288 | A → G | hetero | 28 | Thr→Ala | Cox III |
| 25152 Tu | Cox 31b | 9450 | G → A | hetero | 81 | Gly→Stop | Cox III |
| 27665 Tu | Cox 33b | 9750 | T → C | hetero | 182 | Phe→Leu | Cox III |
| 27562 Tu | Nad 43a | 11038 | del | hetero | 93 | frameshift | ND 4 |

Tab. 4-13: Übersicht der bislang nicht beschriebenen Polymorphismen

| Probe | PCR-Fragment | mtDNA-Position | mtDNA-Mutation | Plasmie-verteilung oB/Tu | AS-Position | AS-Wechsel | Protein/Untereinheit |
|-------------|--------------|----------------|----------------|--------------------------|-------------|------------|----------------------|
| 29934 oB/Tu | KR 81a | 16175 | A → G | hetero/hetero | – | – | Kontrollregion |
| 32435 oB/Tu | KR 83a | 74 | A → T | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32435 Tu | KR 83a | 16488 | C → T | hetero | – | – | Kontrollregion |
| 32836 oB/Tu | KR 85a | 266 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32836 oB/Tu | KR 85a | 310 | Ins C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32530 oB/Tu | Nad 27a | 5585 | G → A | hetero/homo | – | – | Noncoding |
| 33464 oB/Tu | mrR 99a | 2849 | G → A | homo/homo | – | – | 16S rRNA |
| 33763 Tu | Cox 74 | 6446 | G → A | hetero | 181 | Thr→Thr | Cox I |
| 26395 oB/Tu | Nad 28a | 5910 | G → A | homo/homo | 3 | Ala→Thr | Cox I |
| 26395 oB/Tu | Nad 12a | 3591 | G → A | homo/homo | 95 | Leu→Leu | ND 1 |

Neben den oben beschriebenen Mutationen, die bisher unbekannt sind, fanden sich eine Reihe von vorbeschriebenen Polymorphismen. Wegen der fehlenden pathologischen Relevanz werden diese Befunde im Folgenden ausschließlich tabellarisch ohne Präsentation der einzelnen WAVE- und Sequenzierungs-Ergebnisse dargestellt.

Tab. 4-14: Übersicht der vorbeschriebenen Polymorphismen

| Probe | PCR-Fragment | mtDNA-Position | mtDNA-Mutation | Plasmie-verteilung oB/Tu | AS-Position | AS-Wechsel | Protein/Untereinheit |
|-------------|--------------|----------------|----------------|--------------------------|-------------|------------|----------------------|
| 27562 Tu | mrR 95a | 1719 | G → A | hetero | – | – | 16 S RNA |
| 33464 oB/Tu | Cox 76 | 7028 | C → T | homo/homo | 375 | Ala → Ala | Cox/1 |
| 27853 oB/Tu | Cox 30b | 8860 | A → G | homo/homo | 112 | Thr → Ala | ATP-Synthase/6 |
| 25152 oB/Tu | Cox 31b | 9055 | G → A | homo/homo | 177 | Ala → Thr | ATP-Synthase/6 |
| 30385 oB/Tu | Nad 38a | 10398 | A → G | homo/homo | 114 | Thr → Ala | NADH/3 |
| 33464 oB/Tu | Nad 51a | 12705 | C → T | homo/homo | 123 | Iso → Iso | NADH/5 |
| 32836 oB/Tu | Cyb 02 | 14905 | G → A | homo/homo | 53 | Met → Met | Cytochrom b |
| 29385 oB/Tu | Cyb 04 | 15326 | A → G | homo/homo | 194 | Thr → Ala | Cytochrom b |
| 25152 oB/Tu | KR 81a | 16093 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 25152 oB/Tu | KR 81a | 16244 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 27853 Tu | KR 82a | 16259 | C → T | hetero | – | – | Kontrollregion |
| 27561 oB/Tu | KR 82a | 16293 | A → G | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 27561 oB/Tu | KR 82a | 16311 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 27853 oB/Tu | KR 82a | 16311 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 27853 oB/Tu | KR 82a | 16362 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 25743 oB/Tu | KR 83a | 16519 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32435 oB/Tu | KR 83a | 16519 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32836 oB/Tu | KR 85a | 189 | A → G | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32836 oB/Tu | KR 85a | 195 | T → C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32836 oB/Tu | KR 85a | 215 | A → G | hetero/homo | – | – | Kontrollregion |
| 29152 oB/Tu | KR 85a | 263 | A → G | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32836 oB/Tu | KR 85a | 263 | A → G | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 29152 oB/Tu | KR 85a | 308 | Ins C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |
| 32836 oB/Tu | KR 85a | 308 | Ins C | homo/homo | – | – | Kontrollregion |

5 Diskussion

Polyak et al. (1998) fanden erworbene Mutationen der Mitochondrien-DNA in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien. Da diese Befunde an malignen Zelllinien erhoben wurden, die bekanntermaßen genetisch instabil sind und daher in vitro zusätzliche genetische Läsionen entwickeln können, wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit primäres Tumormaterial von 20 kolorektalen Karzinomen verwendet, um das mitochondriale Genom auf erworbene Mutationen zu untersuchen. Dafür stand jeweils ein Probenpaar zur Verfügung, nämlich Tumorgewebe und histopathologisch unauffällige Darmmukosa des Patienten. Die Suche erbrachte insgesamt 43 Abweichungen von der sogenannten Cambridge-Sequenz (Andrews et al., 1999), die zusammen mit den bislang bekannten Polymorphismen regelmäßig als Referenz für solche Untersuchungen herangezogen wird. Die Sequenzabweichungen verteilten sich auf 17 der 20 untersuchten Probenpaare. Drei Probenpaare waren unauffällig, 10 wiesen 1-2 Sequenzunterschiede auf, 7 hatten ≥ 3 Sequenzabweichungen.

Von den 43 Sequenzabweichungen waren 24 bereits als Polymorphismen in der Mitochondrien-Datenbank (www.mitomap.org) registriert. Weitere 10 waren noch nicht als Polymorphismen registriert, wurden von uns aber als solche gewertet, da sie sowohl im Tumor als auch in der histopathologisch unauffälligen Umgebung vorhanden waren oder weil es sich um stumme Mutationen handelte (s. Tab. 1-14). Es blieben also 9 Sequenzabweichungen (in 8 Probenpaaren), die von pathophysiologischer Bedeutung sein können. Dabei handelte es sich in 6 Fällen um die Mutation einer proteinkodierenden Sequenz, die zum Austausch einer konservierten Aminosäure führte. Zwei der Mutationen veränderten die Sequenz der 16S rRNA; einmal war die tRNA^{Leu(UUR)} betroffen. Bei 8 Sequenzabweichungen lag eindeutig eine somatische Mutation vor, die im Tumor, aber nicht im Normalgewebe nachweisbar war. Die tRNA-Veränderung war zwar auch im histopathologisch unauffälligen Nachbargewebe zu finden, lag dort jedoch heteroplasmisch vor, also koexistent mit dem Wildtyp, was dafür spricht, daß es sich ebenfalls um eine erworbene Mutation handelte. Möglicherweise repräsentierte hier die „Normalprobe“ bereits einen expandierten Zellklon, der die mtDNA-Veränderung als Marker trug. Aus diesem prämaligen Klon hat sich wahrscheinlich durch weitere genetische Aberrationen (im Zellkern) der Subklon entwickelt, der zum Tumor führte.

Bei den potentiell pathophysiologisch relevanten Mutationen handelte es sich sechsmal um Transitionen (4x G→A, 1x A→G, 1x T→C), zweimal um Deletion eines bzw. zweier Nukleotide und nur einmal um eine Transversion (T→G). Dies entspricht in etwa dem von Polyak et al., 1998 beschriebenen Verteilungsmuster der von ihr gefundenen mtDNA-

Mutationen und ist konsistent mit dem durch Sauerstoffradikale verursachten Mutationsspektrum (Beckmann und Ames, 1997). Bei 10 von 11 Nukleotidveränderungen handelte es sich bei Polyak et al. um T→C oder G→A Transitionen. Das deutliche Übergewicht von Transitionen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Mitochondrien kein Mismatch-Reparatursystem für Transitionen besitzen. (Foury F, Hu J, Vanderstraeten S. Mitochondrial DNA Mutators. Cell. Mol. Life Sci. 2004;61:2799-2811).

Die Verteilung der erworbenen Mutationen auf dem mitochondrialen Genom ließ keine lokalen Anhäufungen im Sinne von „Hot spots“ erkennen. Dies könnte zwar ein Phänomen der kleinen Zahlen sein; andererseits ist gar nicht damit zu rechnen, daß solche hot spots auftreten. Da alle 13 Proteingene der mtDNA für Untereinheiten der Atmungskette kodieren und auch die tRNA- und rRNA-Gene des mitochondrialen Genoms an der Expression dieser Proteingene mitwirken, haben alle wirksamen Mutationen prinzipiell die gleiche Folge, nämlich eine Beeinträchtigung der Atmungskettenfunktion. Wegen dieser Konvergenz ihrer funktionellen Auswirkung können pathogenetisch relevante mtDNA-Mutationen weit über das mitochondriale Genom verstreut sein. Dies entspricht dem bekannten Phänomen, daß bei hereditären mitochondrialen Erkrankungen die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp nur schwach ausgeprägt ist. Ein großer Teil der phänotypischen Auswirkung läßt sich nicht durch die Lokalisation der Mutation erklären, sondern ist abhängig vom prozentualen Anteil der mutierten mtDNA-Moleküle (Grad der Heteroplasmie), der in verschiedenen Organen zudem sehr unterschiedlich sein kann.

In welchen Zellen sind die von uns nachgewiesenen somatischen Mutationen der mtDNA entstanden? In hochproliferativen Geweben wie dem hämatopoietischen System oder der gastrointestinalen Mukosa ist zu berücksichtigen, daß Mutationen nur dann persistieren können, wenn sie in Stammzellen auftreten. Differenzierte Zellen haben in diesen Geweben nur eine sehr begrenzte Lebensdauer, so daß in ihnen entstandene Mutationen durch den physiologischen Zelltod wieder eliminiert werden. In der Darmmukosa ist der Zellumsatz so organisiert, daß eine Stammzelle am Boden jeder Darmkrypte proliferiert und die Tochterzellen während ihrer Differenzierung langsam in Richtung Darmlumen verschoben werden, wo die Zellen schließlich durch Abschilferung verloren gehen. Im allgemeinen sind die Zellen einer Darmkrypte also klonal, da sie von einer gemeinsamen Stammzelle abstammen. Taylor et al. (2003) haben aus histopathologischen Schnittpräparaten einzelne Darmkrypten mittels Laserdissektion isoliert und die mitochondriale DNA der klonalen Zellen komplett sequenziert. Gleichzeitig wurden die histopathologischen Präparate durch Cytochrom-c-Oxidase-Färbung daraufhin überprüft, ob die Zellen der Darmkrypten einen funktionstüchtigen Komplex IV der Atmungskette aufwiesen. Die

wichtigsten Untereinheiten des Komplex IV (COX I, II u. III) werden von der mtDNA kodiert. Mit zunehmendem Alter der Probanden zeigte sich eine eindrucksvolle Zunahme der COX-defizienten Darmkrypten, von ca. 1% bei etwa 40-Jährigen auf ca. 15% bei 80-Jährigen. In praktisch allen COX-defizienten Krypten konnte eine klonale Mutation der mtDNA identifiziert werden, während dies in Krypten mit positivem Ausfall der COX-Färbung nicht der Fall war. Es läßt sich also feststellen, daß es mit zunehmendem Lebensalter zu einer Anhäufung von klonal expandierten mtDNA-Mutationen in den Stammzellen der Darmmukosa kommt. Die in der vorliegenden Doktorarbeit identifizierten mtDNA-Mutationen sind also mit hoher Wahrscheinlichkeit primär in Krypten-Stammzellen entstanden. Nach Anreicherung einer solchen Mutation in der betroffenen Stammzelle und der zugehörigen Krypte muß sich später aus nicht näher bekannten Gründen eine maligne Transformation der mutationstragenden Stammzelle entwickelt haben, die zu pathologischer klonaler Zellproliferation, zur Tumorentstehung und damit auch zur weiteren klonalen Ausbreitung der mtDNA-Mutation geführt hat.

Die primäre Anreicherung einer bestimmten mtDNA-Mutation in einer Stammzelle ist möglicherweise ein rein stochastisches, also von Zufallsereignissen gesteuertes Phänomen. Mithilfe mathematischer Modelle und computergestützter Simulationen konnten Elson et al. (2001) für postmitotische Zellen und Coller et al. (2001) für proliferierende Zellen zeigen, daß die Mutationsrate der mtDNA, der mitochondriale Turnover innerhalb der Zellen, die zelluläre Proliferationsrate sowie die Lebensspanne des Menschen ausreichen, um zufallsbedingt in zahlreichen Körperzellen mit hoher Wahrscheinlichkeit irgendeine mtDNA-Mutation stark anzureichern. Es ist hierbei nicht erforderlich, daß das mutationstragende mtDNA-Molekül durch die Mutation einen replikativen Vorteil gewinnt.

Die altersabhängigen mtDNA-Mutationen können funktionelle Auswirkung haben, was beispielsweise von Taylor et al. mittels der COX-Färbung belegt wurde. Neben den rein stochastischen Mechanismen könnten auch funktionelle Effekte an der intrazellulären Anreicherung von mtDNA-Mutationen beteiligt sein. Hierfür spricht, daß sich das Spektrum altersabhängig akkumulierender mtDNA-Mutationen in Kardiomyozyten drastisch von dem in Zellen der Mundschleimhaut unterscheidet (Nekhaeva et al., 2002). Dies kann nicht zufallsbedingt sein, sondern spricht für funktionelle Wechselwirkungen zwischen mtDNA-Mutationen und gewebsspezifischen Prozessen, die die Entstehung und/oder die intrazelluläre Expansion der Mutationen fördern.

Der Nachweis, daß es in postmitotischen Zellen, aber auch in Stammzellen zu altersabhängiger Akkumulation von mtDNA-Mutationen kommt, die auch funktionelle Auswirkungen haben,

stützt die mitochondriale Theorie des Alterns. Da altersabhängig auch die Inzidenz von Darmkrebs und anderen Tumorerkrankungen ansteigt, wäre es theoretisch möglich, daß mtDNA-Mutationen ursächlich an der Karzinogenese beteiligt sind. Welche Mechanismen könnten dabei eine Rolle spielen?

- 1) Es ist vorstellbar, daß unzureichende ATP-Produktion zu genomischer Instabilität beiträgt. Da die Motorproteine des mitotischen Spindelapparates ATP- bzw. GTP-abhängig sind, könnte es bei ATP-Mangel zu Funktionsstörungen des Spindelapparates mit konsekutiven Chromosomen-Fehlverteilungen kommen. Aneuploidie ist ein häufiges Merkmal von Tumorzellen.
- 2) Die mitochondriale Atmungskette ist funktionell an der de-novo Synthese von Pyrimidin-nukleotiden beteiligt, da ein wichtiges Enzym der Pyrimidinsynthese, die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH), nur im Zusammenspiel mit einer intakten mitochondrialen Atmungskette funktioniert (Löffler et al., 1997). Inhibition der Atmungskette bewirkt eine starke Beeinträchtigung der Pyrimidinsynthese mit entsprechenden Veränderungen im Nukleotidpool der Zellen (Gattermann et al., 2004). Eine Imbalance der intrazellulären Nukleotide führt zu fehlerhafter DNA-Replikation und erhöhter Mutationsrate im Zellkern (Kunz et al., 1994).
- 3) Wenn die Atmungskettenfunktion durch mtDNA-Mutationen beeinträchtigt ist, kann dies zu stark vermehrter Produktion von Sauerstoffradikalen führen, was in den betroffenen Zellen wiederum eine erhöhte Mutationsrate verursachen kann.
- 4) Da viele DNA-Reparaturmechanismen ATP-abhängig sind, könnte ein mitochondrialer Defekt die DNA-Reparaturkapazität beeinträchtigen.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Mutationen der mtDNA in human kolorektalen Karzinomen können einen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Defekten und Karzinogenese nicht beweisen, sondern die entsprechende Hypothese nur deskriptiv stützen. In Zukunft müßte versucht werden, durch Experimente, beispielsweise zur Auslösung genomischer Instabilität, stärkere Belege für eine tumorigene Wirkung mitochondrialer Defekte zu gewinnen. Wahrscheinlich können auch Tiermodelle, die vor kurzem schon die mitochondriale Theorie des Alterns stark untermauert haben (Trifunovic et al., 2004), wertvolle Hinweise liefern.

Falls sich herausstellen sollte, daß die meisten tumorassoziierten mtDNA-Mutationen keinen kausalen Zusammenhang mit der Tumorentwicklung aufweisen, sondern nur die altersabhängige Akkumulation von mtDNA-Mutationen in Stammzellen widerspiegeln, bleibt der Nachweis von mtDNA-Mutationen in Tumoren dennoch interessant. Sie könnten nämlich als klonale Marker

eine nützliche Rolle beim Nachweis minimaler Resterkrankung spielen (minimal residual disease, MRD). Da jede Zelle Hunderte von Kopien der mtDNA besitzt, könnte sich bei der Verwendung von mtDNA-Mutationen für die MRD-Diagnostik ein Sensitivitätsvorteil von etwa zwei Log-Stufen gegenüber dem Nachweis nukleärer Mutationen ergeben.

6 Zusammenfassung

Die Akkumulation von Mutationen der Mitochondrien-DNA (mtDNA) steht im Vordergrund der mitochondrialen Theorie des Alterns. Außerdem sind mitochondriale Defekte seit Otto Warburgs Entdeckung der aeroben Glykolyse in Tumorzellen immer wieder als pathogenetischer Faktor bei der Karzinogenese diskutiert worden. In den letzten Jahren berichteten verschiedene Arbeitsgruppen über erworbene Mutationen der mitochondrialen DNA in menschlichen Tumorzellen. Polyak et al. fanden erworbene Mutationen der Mitochondrien-DNA in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien. Da diese Befunde an malignen Zelllinien erhoben wurden, die bekanntermaßen genetisch instabil sind und daher in vitro zusätzliche genetische Läsionen entwickeln können, wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit primäres Tumormaterial von 20 kolorektalen Karzinomen verwendet, um das mitochondriale Genom auf erworbene Mutationen zu untersuchen. Dafür stand jeweils ein Probenpaar zur Verfügung, nämlich Tumorgewebe und histopathologisch unauffällige Darmmukosa des Patienten. Aus den Biopsaten wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das komplette mitochondriale Genom in 60 überlappenden Abschnitten amplifiziert. Zur Mutationssuche wurden die PCR-Produkte einer Heteroduplex-Analyse mittels denaturierender HPLC (dHPLC) unterzogen. Bei auffälligem dHPLC Befund erfolgte eine Sequenzierung des betreffenden Genabschnitts, um die zugrundeliegende Mutation genau zu charakterisieren. Die Suche erbrachte insgesamt 43 Abweichungen von der sogenannten Cambridge-Sequenz, die zusammen mit den bislang bekannten Polymorphismen regelmäßig als Referenz für solche Untersuchungen herangezogen wird. Die Sequenzabweichungen verteilten sich auf 17 der 20 untersuchten Probenpaare. Drei Probenpaare waren unauffällig, 10 wiesen 1-2 Sequenzunterschiede auf, 7 hatten ≥ 3 Sequenzabweichungen. Von den 43 Sequenzabweichungen waren 24 bereits als Polymorphismen in der Mitochondrien-Datenbank (www.mitomap.org) registriert. Weitere 10 waren noch nicht als Polymorphismen registriert, wurden von uns aber als solche gewertet, da sie sowohl im Tumor als auch in der histopathologisch unauffälligen Umgebung vorhanden waren oder weil es sich um stumme Mutationen handelte. Es blieben also 9 Sequenzabweichungen (in 8 Probenpaaren), die von pathophysiologischer Bedeutung sein können. Dabei handelte es sich in 6 Fällen um die Mutation einer proteinkodierenden Sequenz, die zum Austausch einer konservierten Aminosäure führte. Zwei der Mutationen veränderten die Sequenz der 16S rRNA; einmal war die tRNA^{Leu}(UUR) betroffen. Bei 8 Sequenzabweichungen lag eindeutig eine somatische Mutation vor, die im Tumor, aber nicht im Normalgewebe nachweisbar war. Eine der rRNA-Veränderungen war zwar auch im histopathologisch unauffälligen Nachbargewebe zu finden, lag

dort jedoch heteroplasmatisch vor, also koexistent mit dem Wildtyp, was dafür spricht, daß es sich ebenfalls um eine erworbene Mutation handelte. Die Ergebnisse dieser Mutationssuche bestätigen, daß in primärem Tumormaterial relativ häufig erworbene Mutationen der mtDNA zu finden sind, die Funktionsstörungen der mitochondrialen Atmungskette zur Folge haben können. Die identifizierten mtDNA-Mutationen können jedoch einen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Defekten und der Entstehung kolorektaler Karzinome nicht beweisen, sondern die entsprechende Hypothese nur deskriptiv stützen. In Zukunft müßte versucht werden, durch Experimente, beispielsweise zur Auslösung genomischer Instabilität, stärkere Belege für eine tumorigene Wirkung mitochondrialer Defekte zu gewinnen. Unabhängig von ihrer möglichen pathogenetischen Bedeutung könnten erworbene mtDNA-Mutationen als klonale Tumormarker in Zukunft eine nützliche diagnostische Rolle beim Nachweis minimaler Resterkrankung spielen.

7 Literaturverzeichnis

- Abbondandolo, A.; S. Bonatti; P. Pellerano and M. Simili** (1992): Possible targets for the aneugenic activity of alkylating agents. *Chromosome segregation and aneuploidy*. Ed. B.K. Vig. Springer, Berlin Heidelberg New York. 271-282.
- Aizawa, H., Y. Emori, H. Murofushi et al.** (1990): Molecular cloning of a ubiquitously distributed microtubule-associated protein with Mr 190.000. *J. Biol. Chem.* 265: 13849-13855.
- Anderson, S., A. T. Banitier, B.G. Barren et al.** (1981): Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Andrews, R.M., I. Kubacka, P.F. Chinnery et al.** (1999): Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Gen* 23: 147.
- Baker, S.J.; E.R. Fearon; J.M. Nigro et al.** (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244(4901): 217-221.
- Barath, P.; B. Albert-Fournier; K. Luciakova et al.** (1999): Characterization of a silencer element and purification of a silencer protein that negatively regulates the human adenine nucleotide translocator 2 promoter. *J. Biol. Chem.* 274(6): 3378-3384.
- Barrett, J.C., T. Tsutsui, T. Tlsty and M. Oshimura** (1990) in: *Genetic Mechanisms in Carcinogenesis and Tumor Progression*. Eds. C.C. Harris and L.A. Liotta (Wiley, NY): 97-114.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N.** (1997): Oxidative decay of DNA. *J Biol. Chem.* 272: 19633-19636.
- Behrens, J. et al.** (1996): Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-642.
- Bishop, J:M.** (1991): Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248.
- Brown, W.M., W. George Jr., and A.C. Wilson** (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS USA* 76: 1967-1971.
- Carayon, P., M. Portier, D. Dussossoy et al.** (1996): Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage. *Blood* 87(8): 3170-3178.
- Chinnery, P.F., and D.C. Samuels** (1999): Relaxed replication of mtDNA: a model with implications for the expression of disease. *Am J Hum Gent* 64: 1158-1165.
- Coller, H.A., K. Khrapko, N.D. Bodyak et al.** (2001): High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat. Genet.* 28: 147-150.
- Croteau, D.L., R. Stierum and V.A. Bohr** (1999): Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutation Res.* 434(3): 137-148.
- Dalton, T.P., H.G. Shertzner and A. Puga** (1999): Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 67-101.
- de Grey, A.D.** (1997): A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of ageing. *BioEssays* 19: 161-166.

- Elson, J.L., D.C. Samuels, D.M. Turnbull, and P.F. Chinnery** (2001): Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial mutations with age. *Am J Hum Genet* 68: 802-806.
- Fearon et al.** (1990): Identification of a chromosom 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 46-49.
- Finkelstein, S.D., R. Sayegh, S. Christensen et al.** (1993): Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behaviour correlates with *k-ras-2* mutation type. *Cancer* 71, 3827-3838.
- Foury F, Hu J, Vanderstraeten S.** (2004): Mitochondrial DNA Mutators. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:2799-2811.
- Fynan, T.M. and M. Reiss** (1993): Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-b and its role in oncogenesis. *Cit. Rev. Oncog.* 4: 493-540.
- Gattermann, N., C. Aul et al.** (1993): Is acquired idiopathic sideroblastic anemia (AISA) a disorder of mitochondrial DNA? *Leukemia* 7: 2069-2076.
- Gattermann, N.** (1999): Mutationen der mitochondrialen DNA im hämatopoetischen System. Institut für wissenschaftliche Publikationen, Bonn.
- Gattermann, N, M. Dadak, G. Hofhaus et al.** (2004): Severe impairment of nucleotide synthesis through inhibition of mitochondrial respiration. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004 Oct;23(8-9):1275-1279.
- Giaretti, W.** (1994): A model of DNA aneuploidization and evolution in colorectal cancer. *Lab.Invest.* 71(6): 904-910.
- Goto, Y., M. Tojo, J. Tohyama et al.** (1992): A novel point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a family with mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 31(6): 672-675.
- Gray, M.W., G. Burger and B.F. Lang** (1999): Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481.
- Gyllenstein,U., D. Wharton, A. Josefsson et al.** (1991): Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352: 255-257.
- Harman, D.** (1981): The ageing process. *PNAS USA* 78: 7124-7128.
- He, L., L. Luo, S.J. Proctor, P.G. Middleton et al.** (2003): Somatic mitochondrial DNA mutations in adult-onset leukemia. *Leukemia.* 2003 Dec;17(12):2487-91.
- Heerdt, B.G., M.A. Houston, G.M. Anthony and L.H. Augenlicht** (1998): Mitochondrial membrane potential in the coordination of p53-independent proliferation and apoptosis pathways in human colonic carcinoma cells. *Cancer Res.* 58 (13): 2869-75.
- Heerdt, B.G., M.A. Houston, A.J. Wilson and L.H. Augenlicht** (2003): The Intrinsic Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$) Is Associated with Steady-State Mitochondrial Activity and the Extent to Which Colonic Epithelial Cells Undergo Butyrate-mediated Growth Arrest and Apoptosis. *Cancer Res.* 63(19): 6311-6319.
- Herold, G. et al.** (1999): *Innere Medizin:* 390-394. Köln
- Ho, S.G.** (1992): Cytoskeleton and other differentiation markers in the colon. *J.Cell. Biochem. Suppl.* 16G, 119-128
- Holehan, A.M. and B.J. Merry** (1986): The experimental manipulation of ageing by diet. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society,* 61: 329-368.

- Howe, J.R., St. Roth, J.C. Ringold et al.** (1998): Mutations in the SMD4/DPC4 gene in juvenile Polyposis. *Science* 280: 1086-1088.
- Huang, J.; Papadopoulos, N.; McKinley, A. et al.** (1996): APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *PNAS USA* 93: 9049-9054.
- Hunter, A.W. and L. Wordeman** (2000): How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J. Cell Sci.* 113: 4379-4389.
- Hyman, A.A. and T.J. Mitchinson** (1991): Two different microtubule-based motor activities with opposite polarities in kinetochores. *Nature* 351: 206-211.
- Ionov, Y., Peinado, M., Malkhosyan, S. et al.** (1993): Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-561.
- Jones, M.E.** (1980): Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals. Genes, enzymes and regulation of UMP biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem* 49: 253-279.
- Kikuchi-Yanoshita, R., M. Konishi, S. Ito et al.** (1992): Genetic changes of both *p53* alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-adenomatous polyposis patients. *Cancer res.* 52, 3965-3971.
- Kinzler, W. and B. Vogelstein** (1998a): Landscaping the Cancer terrain. *Science* 280(5366): 1036-1037.
- Kinzler, W. and B. Vogelstein** (1998b): Colorectal Tumors. In: *The genetic basis of human cancer*. Toronto, McGraw-Hill, S. 565-587
- Klingelhutz, A.J., L. Hedrick, K.R. Cho et al.** (1995): The DCC-gene suppresses the malignant phenotyp of transformed human epithelial cells. *Oncogene* 10: 1581-1586.
- Konishi, M.; Kikushi-Yanoshita, R.; Tanaka, K. et al.** (1996): Molecular nature of colon tumors in HNPCC, FAP and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 111: 307-317.
- Khrapko, K. , H.A. Coller, P.C. André et al.** (1997): Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *PNAS USA* 94: 13798-13803.
- Kunz, B.A., S.E. Kohalmi T.A. Kunkel et al.** (1994): Desoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res* 318: 1-64.
- Lane, D.P.** (1992): *p53*, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lee, G.M.** (1989): Characterization of mitotic motors by their relative sensitivity to AMP-PNP. *J. Cell. Sci.* 94(3): 425-441.
- Liu, B.; R. Parsons; N. Papadopoulos et al.** (1996): Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat. Med.* 2: 169-174.
- Löffler, M.; J. Jöckel, G. Schuster and C. Becker** (1997): Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol. Cell. Biochem.* 174: 125-129.
- Lombillo, V.A.; R.J. Stewart, and J.R. McIntosh** (1995): Minus-end-directed motion of kinesin-coated microspheres driven by microtubule depolymerization. *Nature* 373: 161-164.
- Lynch, H.; Lanspa, S.; Smyrk, T. et al.** (1991): Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II): Genetics, pathology, natural history and cancer control, Part I. *Cancer Genet. Cytogenetics* 53: 143-160, 1991.

- Lynch, E.D.; E.A. Ostermeyer, M.K. Lee et al.** (1997): Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, Cowden disease and juvenile Polyposis. *Am.J.Hum. Gent.* 61: 1254-1260.
- Masoro, E.J.** (1988): Food restriction in rodents: an evaluation of its role in the study of aging. *J.Gerontol.Biol.Sci.* 43:B59-B64.
- Miquel, J.** (1991): An integrated theory of aging as a result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12: 99-117.
- MITOMAP** (2003): A human mitochondrial genome database. Center for molecular medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA. <http://www.mitomap.org>.
- Miyata, T., H. Hayashida, R.Kikuno et al.** (1982): Molecular clock of silent substitution: at least six fold preponderance of silent changes in mitochondrial genes over those in nuclear genes. *J mol. Evolution* 19: 28-35.
- Morin, P. J.** (1999): β -Catenin signaling and cancer. *BioEssays* 21: 1021-1030.
- Munemitsu, S., B. Souza, O. Muller et al.** (1994): The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Can. Res.* 54: 3676-3681
- Nakamura, J.; I.Nishisho, K.W. Kinzler et al.** (1991): Mutations of the APC gene in a familial polyposis coli patient and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symposia* 22: 285-292.
- Nekhaeva, E., N.D. Bodyak, Y. Kraytsberg et al.** (2002): Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *PNAS USA* 99: 5521-5526.
- Nishisho, I., Y Nakamura, Y. Miyoshi et al.** (1991): Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253: 665-669.
- Ozawa, M., H. Baribault and R. Kemler** (1989): The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8: 1711-1717.
- Parsons, R.; Li, G.-M.; Longley, M.G. et al.** (1993): Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 75: 1227-1236.
- Peltomaki, P.; L.A. Aaltonen; P. Sistonen et al.** (1993): Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260, 810-812.
- Penta, J.S., F.M. Johnson, J.T. Wachsman, and W.C. Copeland** (2001): Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 488: 119-133.
- Polakis, P.** (1997): The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim. Biophys. Acta* 1332: F127-F147.
- Polyak, K, Y. Li, H. Zhu, Ch. Lengauer et al.** (1998): Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Gen.* 20: 291-293.
- Powell, S.M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay et al.** (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235 -237.
- Rawls, J.; W. Knecht; K. Diekert et al.** (2000): Requirements for the mitochondrial import and localisation of dihydroorotate dehydrogenase. *Eur.J.Biochem.* 267: 2079-2087.
- Richter, C., J.W. Park, and B.N. Ames** (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *PNAS USA* 85: 645-646.

- Riesner, D., G. Steger, R. Zimmat et al.** (1989): Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis* 10: 377-389.
- Riesner, D., K. Henco, and G. Steger** (1991): Temperature-gradient gel electrophoresis: a method for the analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and proteins. *Advances in Electrophoresis*. Eds. A. Chrambach, M.J. Dunn and B.J. Radola. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim: 169-250.
- Shigenaga, M.K., T.M. Hagen, and B.M. Ames** (1994): Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *PNAS USA* 91: 10771-10778.
- Shirasawa, S.; M. Furuse; N. Yokoyama and T. Sasazuki** (1993): Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated k-ras. *Science* 260(5104): 85-88.
- Shitara, H., J.I. Hayashi, S. Takahama, H. Kaneda et al.** (2000): Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 156: 1277-1284.
- Shoffner, J.M. and D.C. Wallace** (1994): Recent advances in mitochondrial genetics. *Mitochondrial Disorders in Neurology*. Eds. A.H.V. Schapira and S. DiMauro. Butterworth-Heinemann, Oxford: 199-226.
- Taylor, R.W., M.J. Barron, G.M. Borthwick et al.** (2003): Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J.Clin.Invest.* 112 (9): 1351-1360.
- Thiagalingam, S., C. Lengauer, F.S. Leach et al.** (1996): Evaluation of Chromosome 18q in colorectal cancers. *Nat. Genet.* 13: 343-346.
- Toyokuni, S., K. Okamoto, J. Yodoi et al.** (1995): Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS letter* 358: 1-3.
- Transgenomic Preinstallation Guide** (1999): Version 2.0 : S.1-4. Omaha, USA.
- Trounce, I., E. Byrne, S. Marzuki** (1989): Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in aging. *Lancet* 1(8639):637-639.
- Turrens, J.F. and A. Boveris** (1980): Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 191: 421-427.
- Van Duppen, V., V. Raets, L. Raeymaekers et al.** (2003): CD34+ Progenitors from Low-Risk MDS Patients Are More Susceptible to Induced Oxidative DNA Damage and Have a Reduced DNA-Repair Capacity Compared to Healthy Control Subjects. *Blood* 102(11): Abstract #3410.
- Vogelstein, B., E.R. Fearon, S.R. Hamilton et al.** (1988): Genetic alteration during colorectal tumour development. *N Engl. J. Med.* 319, 525-532.
- Wallace, D.C., J.H. Ye, S.N. Neckelmann et al.** (1987): Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP-Synthase-b subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr. Gen.* 12: 81-90.
- Wallace, D.C., X. Zheng, M. Lott et al.** (1988): Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERFF): genetic, pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial disease. *Cell* 55: 601-610.
- Wallace, D.C.** (1992): Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu.Rev.Biochem.* 61: 1175-1212.
- Wallace, D.C.** (1994): Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *PNAS USA* 91: 8739-8746.

- Wallace, D.C.** (1997) in: The molecular and genetic basis of neurological disease. Eds. Rosenberg, R.N. et al. Butterworth-Heinemann, Boston. S. 237-269.
- Wallace, D.C.** (1999): Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283 (5407): 1482-88.
- Wallace, D.C., J.M. Shoffner, M.D. Brown, A. Torroni, M.T. Lott, and M. Cabell,** (1992): Mitochondrial DNA mutations associated with Alzheimer's and Parkinson's disease. *American Journal of Human Genetics* 51: A30.
- Wei, Y.H.** (1998): Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human ageing. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217: 53-63.
- Weindruch, R. und R.L. Walford** (1988): The retardation of aging and disease by dietary restriction. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
- Wiese, U., M. Wulfert, S.B. Pruisiner and D. Riesner** (1995): Scanning for mutations in the human prion protein open reading frame by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1995 Oct;16(10):1851-60.
- Xiao, W., P.J. Oefner** (2001): Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum. Mut.* 17: 439-474.
- Yakes, F.M. and B. van Houten** (1997): Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *PNAS USA* 94: 514-519.
- Zabrecki, J.R. und R.D. Cole** (1982): Binding of ATP to tubulin. *Nature* 296: 775-776.

8 Anhang

8.1 PCR-amplifizierte mtDNA-Segmente für die Heteroduplex-Analyse

Tab. 8-1: Position der mtDNA-Segmente, die mit PCR amplifiziert und anschließend mittels Heteroduplex-Analyse untersucht wurden

| Name | Länge [bp] | Position (ohne GC-Klammern) | Position (Nachweis) | Primerposition | Primersequenz | Analyse-temperatur/en im WAVE [°C] |
|---------|------------|-----------------------------|---------------------|----------------------------------|---|------------------------------------|
| KR 81a | 298 | 15962-16259 | 15987-16234 | F 15962-15986 R 16259-16235 | 5' AAAAAGTCT TTA ACTCCAC CATTAG 3' 5' GTGGCTTTG GAGTTGCAGT TGATGT 3' | 56/59 |
| KR 82a | 326 | 16180-16505 | 16205-14465 | F 16180-16204 R 16505-16481 | 5' A AAACCCCTC CCCATGCTTA CAAG 3' 5' ACCAG ATGTCGGATA CAGTTCACTT 3' | 60/62 |
| KR 83a | 126 | 16413-150 | 16438-74 | F 16413-16437 R 150-126 | 5' TGAAATCA ATATCCCGCA CAAGAGT 3' 5' GATGAGGCAG GAATCAAAGA CAGAT 3' | 61 |
| KR 84a | 135 | 42-153 | 67-128 | F 10~42-66* R 13+153-129* | 5' ccggggggccc TCCATGCATT TGGTATTTTC GTCTG 3' ** 5' gcgcggcggg cggTAGGATG AGGCAGGAAT CAAAGACA 3' | 63 |
| KR 85a | 361 | 104-385 | 129-360 | F 104-128 R 14+385-361 | 5' CCGGAGC ACCCTATGTC GCAGTATC 3' 5' ggcccggggc ccggTTAGGC TGGTGTTAGG GTTCTTTGT 3' | 58/61 |
| KR 86a | 481 | 322-794 | 347-769 | F 8~322-346 R 794-770 | 5' ccgcgcccGG CCACAGCACT TAAACACATC TCT 3' 5' AGGC TAAGCGTTTT GAGCTGCATT G 3' | 58 |
| mrR 91a | 480 | 741-1220 | 766-1195 | F 741-765 R 1220-1196 | 5' ATCAAAGGA ACAAGCATCA AGCAC 3' 5' TATCGATTAC AGAACAGGCT CCTCT 3' | 58/60 |
| mrR 92a | 415 | 1162-1576 | 1187-1465 | F 1162-1186 R 1576-1552 | 5' ACTCAAAGGA CCTGGCGGTG CTTCA 3' 5' CACTTACCAT GTTACGACTT GTCTC 3' | 60 |
| mrR 93a | 123 | 1440-1534 | 1465-1509 | F 10~1440-1464 R 18+1534-1510 | 5' gccgggcccgg GAGTAGAGTG CTTAGTTGAA CAGGG 3' 5' ccgcgcgcgcg ggcgcgcgcgGG GGTTTTAGTT AAATGTCCTT TGA 3' | 62 |

| Name | Länge [bp] | Position (ohne GC-Klammern) | Position (Nachweis) | Primerposition | Primersequenz | Analyse-temperatur/en im WAVE [°C] |
|---------|------------|-----------------------------|---------------------|----------------------------------|--|------------------------------------|
| mrR 94a | 295 | 1439-1733 | 1505-1708 | F 1439-1463 R 1733-1709 | 5' AGAGTAGAGT GCTTAGTTGA ACAGG 3' 5' GGTAATGGT TTGGCTAAGG TTGTC 3' | 59 |
| mrR 95a | 463 | 1628-2084 | 1653-2059 | F 1628-1652 R 6+2084-2060 | 5' CAACTTACAC TTAGGAGATT TCAAC 3' 5' cggggccTACA AGGGGATTTA GAGGGTTCTG T 3' | 59 |
| mrR 96a | 534 | 1998-2531 | 2023-2506 | F 1998-2022 R 2531-2507 | 5' TACCGAGCCT GGTGATAGCT GGTTG 3' 5' ATACTGGTGA TGCTAGAGGT GATGT 3' | 56/58 |
| mrR 97a | 183 | 2480-2642 | 2505-2617 | F 10~2480-2504 R 10+2642-2618 | 5' gggggcccggc AAATCTTACC CCGCCTGTTT ACCAA 3' 5' ccggggccccc GTGGAGCCAT TCATACAGGT CCCTA 3' | 59 |
| mrR 98a | 378 | 2517-2894 | 2542-2869 | F 2517-2541 R 2894-2870 | 5' TAGC ATCACCAGTA TTAGAGGCAC C 3' 5' ATTG AGTATAGTAG TTCGCTTTGA C 3' | 58/61 |
| mrR 99a | 627 | 2762-3389 | 2841-3364 | F 2762-2786 R 3389-3365 | 5' CTAACAAAC CCACAGGTCC TAAACT 3' 5' AGAATTTTT CGTTCGGTAA GCATTA 3' | 58/61 |
| Cox 70b | 211 | 5806-6118 | 5831-5991 | F 5806-5830 R 6118-5994 | 5' TATGA AAATCACCTC GGAGCTGGTA 3' 5' CTCGAATAAG GAGGCTTAGA GCTGT 3' | 59 |
| Cox 72b | 296 | 5973-6268 | 6048-6243 | F 5973-5997 R 6268-6245 | 5' GCATGAGC TGGAGTCCTA GGCACAG 3' 5' GCTCCGGC CTCCACTATA GCAGAT 3' | 60 |
| Cox 73b | 208 | 6188-6389 | 6238-6370 | F 6188-6212 R 6389-6371 | 5' CCG CATAAACAAC ATAAGCTTCT GA 3' 5' GATGGCCCC TAAGATAGAG 3' | 61 |
| Cox 74 | 313 | 6315-6628 | 6344-6607 | F 6315-6333 R 6628-6606 | 5' CACCCT GGAGCCTCCG TAG 3' 5' TCAGCGTG ACCGAAAAAT CAGAA 3' | 59/61 |
| Cox 75 | 360 | 6541-6900 | 6591-6879 | F 6541-6560 R 6900-6880 | 5' GCAACCTCAA CACCACCTTC 3' 5' TCATATTGCT TCCGTGGAGT 3' | 59 |
| Cox 76 | 430 | 6851-7280 | 6871-7259 | F 6851-6868 R 7280-7260 | 5' CGGCGTCAAA GTATTTAG 3' 5' GAATGAGCCT ACAGATGATA G 3' | 60 |
| Cox 77b | 297 | 7240-7536 | 7265-7510 | F 7240-7274 R 7536-7512 | 5' C ATACACCACA TGAAACATCC TATC 3' 5' ATGGTT TTTCTAATAC CTTTTTGAA 3 | 56/59 |

| Name | Länge [bp] | Position (ohne GC-Klammern) | Position (Nachweis) | Primerposition | Primersequenz | Analyse-temperatur/en im WAVE [°C] |
|---------|------------|-----------------------------|---------------------|----------------------------------|--|------------------------------------|
| Cox 21 | 353 | 7470-7822 | 7491-7770 | F 7470-7490 R 7822-7804 | 5' C CAAAGCTGGT TTCAAGCCAA 3' 5' TG GGAGGGCGAT GAGGACT 3' | 56/59 |
| Cox 22b | 567 | 7586-8152 | 7611-8120 | F 7586-7610 R 8152-8128 | 5' ATGGC ACATGCAGCG CAAGTAGGTC 3' 5' CG GTCGTGTAGC GGTGAAAGTG GTT 3' | 58/60 |
| Cox 23b | 548 | 7743-8290 | 7793-8222 | F 7743-7767 R 8290-8266 | 5' CTAACATC TCAGACGCTC AGGAAAT 3' 5' GATCTCCCC TAGAGGGGGT GCTAT 3' | 60 |
| Cox 24b | 481 | 8151-8623 | 8176-8560 | F 8151-8175 R 8+8623-8599 | 5' CGGGGTATA CTACGGTCAA TGTCT 3' 5' cccggcggTG GGGATCAATA GAGGGGAAA TAG 3' | 58 |
| Cox 30b | 557 | 8472-9028 | 8561-9003 | F 8472-8496 R 9028-9004 | 5' CTCCTCAC CAAAGCCCAT AAAAAT 3' 5' GGCCTGCA GTAATGTTAG CGGTTAG 3' | 57/59 |
| Cox 31b | 619 | 8966-9584 | 8991-9516 | F 8966-8990 R 9584-9560 | 5' TCAGC TACTCATTC AACCAATAGC 3' 5' GGGA TTTAGCGGG TGATGCCTGT T 3' | 58/60 |
| Cox 32c | 177 | 9480-9629 | 9511-9604 | F 15~9480-9504 R 12+9629-9605 | 5' cggcccgcgg cggccTTTTCTTCG CAGGATTTTT CTGAG 3' 5' ggcggccggc gcTCCTGATG CGAGTAATAC GGATGTG 3' | 62 |
| Cox 33b | 479 | 9510-9988 | 9601-9963 | F 9510-9534 R 9988-9964 | 5' T ACCACTCCAG CCTAGCCCCT ACCC 3' 5' GACCCTCA TCAATAGATG GAGACAT 3' | 59 |
| Cox 34 | 267 | 9930-10196 | 9951-10130 | F 9930-9950 R 10196-10179 | 5' T GGCATTTTGT AGATGTGGTT 3' 5' GGGGGA TATAGGGTCG AA 3' | 56 |
| NAD 11a | 266 | 3246-3495 | 3271-3470 | F 8~3246-3270 R 7+3495-3471 | 5' ggccgggcCC GGTAATCGCA TAAACTTAA AAC 3' 5' ccgcgccGGG TTTTAGGGGC TCTTTGGTGA AG 3' | 58/61 |
| NAD 12a | 361 | 3397-3757 | 3422-3744 | F 3397-3421 R 3757-3733 | 5' ATAC AACTACGCAA AGGCCCAAC G 3' 5' GTAGAAT GATGGCTAGG GTGACTTC 3' | 61 |
| NAD 13a | 326 | 3676-3997 | 3701-3880 | F 3676-3700 R 3997-3973 | 5' AACTC AACTACGCC CTGATCGGCG 3' 5' TGTTTGT GTATTCGGCT ATGAAGAA 3' | 59 |
| NAD 14a | 174 | 3856-3999 | 3880-3974 | F 15~3856-3880 R 15+3999-3976 | 5' cggcccgcgg ccgcgATATG ATTTATCTCC AACTAGCAG 3' 5' ggcggcgggc ggcgcAATGT TTGTGTATTC GGCTATGAA 3' | 62 |

| Name | Länge [bp] | Position (ohne GC-Klammern) | Position (Nachweis) | Primerposition | Primersequenz | Analyse-temperatur/en im WAVE [°C] |
|---------|------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------------------|---|------------------------------------|
| NAD 15a | 371 | 3911-4217 | 3974-4247 | F 3911-3935 R 10+4217-4271 | 5' AAGGGGAGTC CGAACTAGTC TCAGC 3' 5' cgcccgcgcg CATATTTCTT AGGTTTGAGG GGGA 3' | 58 |
| NAD 16a | 302 | 4214-4515 | 4240-4490 | F 4214-4238 R 4515-4491 | 5' GATATGT CTCCATACCC ATTACAAT 3' 5' CTGCA AAGATGGTAG AGTAGATGAC 3' | 56/59 |
| NAD 21a | 165 | 4438-4581 | 4463-4556 | F 10~4438-4581 R 11+4581-4557 | 5' ggcccgcgccc CCGAAAATGT TGGTTATTAT ACCCTTCC 3' 5' cgcgcccgcg gGCATGTTTA TTTCTAGGCC TACTCA 3' | 60 |
| NAD 22a | 241 | 4506-4738 | 4531-4713 | F 4506-4530 R 8~4738-4713 | 5' ATCTT TGCAGGCACA CTCATCACAG 3' 5' gccgcgcgGT AGTATTGGTT ATGGTTCATT GTC 3' | 58 |
| NAD 23a | 232 | 4660-4883 | 4685-4858 | F 4660-4684 R 8+4883-4859 | 5' C AACCGCATCC ATAATCCTTC TAAT 3' 5' gcggcgcccGG GGGCTAGTTT TTGTCATGTG AGA 3' | 56/60 |
| NAD 24a | 266 | 4792-5049 | 4859-5024 | F 4792-4816 R 8+5049-5025 | 5' TAGCCCCT TTCACTTCTG AGTCCC 3' 5' gcgcgggcgGA ACTGCTATTA TTCATCCTAT GTG 3' | 58 |
| NAD 25a | 236 | 4981-5211 | 5006-5187 | F 4981-5005 R 5+5211-5188 | 5' ACCAAACCCA GCTACGCAA ATCTT 3' 5' gcggcGGGTGGATGG AATTAAGGGT GTTA 3' | 57/59 |
| NAD 26a | 358 | 5154-5489 | 5300-5380 | F 10~5154-5177 R 12+5489-5465 | 5' cgcggccccc CTACTATCTC GCACCTGAAA CAAG 3' 5' cggcgcgggc ggGGAGATAGGT AGGAGTAGCG TGGTA 3' | 58/60 |
| NAD 27a | 348 | 5448-5795 | 5473-5770 | F 5448-5468 R 5795-5771 | 5' CCC AACTCATCG CCCTTACC 3' 5' AATTC GAAGAAGCAG CTTCAAACCT 3' | 57/59/60 |
| NAD 28a | 394 | 5702-6095 | 5730-6070 | F 5702-5726 R 6095-6071 | 5' AGCACCTA ATCAACTGGC TTCAA 3' 5' TACAA ATGCATGGGC TGTGACGATA 3' | 59/60 |
| NAD 37a | 342 | 9972-10293 | 9997-10268 | F 20~9972-9996 R 10293-10269 | 5' ggccgcgccc gcgcgccc ATCTATTGAT GAGGGTCTTA CTCTT 3' 5' GGG CTCATGGTAG GGGTAAAAGG 3' | 56/59 |
| NAD 38a | 576 | 10149-10594 | 10211-10569 | F 10149-10173 R 10594-10570 | 5' AT AGAAAAATCC ACCCCTACG AGT 3' 5' ATGA ACAGCGATAG TATTATTCCT T 3' | 56 |
| NAD 41a | 265 | 10501-10740 | 10526-10715 | F 15~10501-10525 R 10+10740-10716 | 5' cgggcgcccgc gccggCATTT ACCATCTCAC TTCTAGGAAT 3' 5' cggcgcgcg GTACGTAGTC TAGGCCATAT GTGTT 3' | 60/62 |

| Name | Länge [bp] | Position (ohne GC-Klammern) | Position (Nachweis) | Primerposition | Primersequenz | Analyse-temperatur/en im WAVE [°C] |
|---------|------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------------|---|------------------------------------|
| NAD 42a | 349 | 10690-11031 | 10715-11006 | F 10690-10714 R 7+11031-11007 | 5' G CCTAGCCCTA CTAGTCTCAA TCTC 3' 5' gcggcgcCGT GATAGTGGTT CACTGGATAA GT 3' | 58/60 |
| NAD 43a | 341 | 10949-11279 | 10974-11254 | F 10949-10973 R 10+11279-11255 | 5' CC CCTCCTAATA CTAACCTACCT GAC 3' 5' gggggcgccccg GTGAGCCTAG GGTGTTGTGA GTGTA 3' | 58/61 |
| NAD 44a | 544 | 11211-11754 | 11236-11720 | F 11211-11235 R 11754-11730 | 5' TCTACACCCT AGTAGGCTCC CTTCC 3' 5' GAGT TTGCTAGGCA GAATAGTAAT 3' | 58/60 |
| NAD 45a | 528 | 11685-12212 | 11710-12187 | F 11685-11709 R 12212-12188 | 5' TCACCG GCGCAGTCAT TCTCATAAT 3' 5' TT TCTCGGTAAA TAAGGGGTCG TAA 3' | 57/59 |
| NAD 46a | 486 | 12149-12634 | 12175-12575 | F 12149-12173 R 12634-12610 | 5' TT AACCAAAACA TCAGATTGTG AAT 3' 5' TGGA CCATGTAACG AACAAATGCTA 3' | 58 |
| NAD 51a | 474 | 12534-13007 | 12559-12982 | F 12534-12558 R 13007-12981 | 5' AACTGA GCCACAACCC AAACAACC 3' 5' GATTTGC CTGCTGCTGC TAGGAGGA 3' | 58/60 |
| NAD 52a | 310 | 12928-13227 | 12968-13202 | F 10~12928-12952 R 13227-13201 | 5' cccgcggggc CCACAACAAA TAGCCCTTCT AAACG 3' 5' GTCATTT TGTGTAAGGG CGCAGACT 3' | 60/62 |
| NAD 53a | 533 | 13162-13694 | 13186-13650 | F 13162-13186 R 13694-13670 | 5' CTAACACTA TGCTTAGGCG CTATCA 3' 5' GGGT TTAGTAGGGT GGGTTATTT T 3' | 59 |
| NAD 54a | 376 | 13613-13988 | 13638-13966 | F 13613-13637 R 13988-13965 | 5' TAATTCTT CTCACCCTAA CAGGTCA 3' 5' AGTAAAAA CAGGTTTTGG CTCGT 3' | 58/60 |
| NAD 61a | 437 | 13942-14378 | 13967-14241 | F 13942-13966 R 14378-14354 | 5' ACAATCCCC TATCTAGGCC TTCTTA 3' 5' AGGTAGGA TTGGTGCTGT GGGTGAA 3' | 58 |
| NAD 62a | 301 | 14208-14508 | 14233-14467 | F 14208-14232 R 14508-14482 | 5' TAACTACTACTAA TCAACGCCA TA 3' 5' TTTTAAAT TTATTTAGGG GGAATGA 3' | 59/61 |
| NAD 63a | 163 | 14442-14604 | 14467-14556 | F 14442-14466 R 14604-14580 | 5' ACTCCTCAA TAGCCATCGC TGTAGT 3' 5' TCTC CTATTTATGG GGGTTAGTA 3' | 56 |
| NAD 64a | 342 | 14516-14857 | 14557-14786 | F 14516-14540 R 14857-14833 | 5' AAACC CATATAACCT CCCCCAAAT 3' 5' AAGGAGT GAGCCGAAGT TTCATC 3' | 58 |

| Name | Länge [bp] | Position (ohne GC-Klammern) | Position (Nachweis) | Primerposition | Primersequenz | Analyse-temperatur/en im WAVE [°C] |
|---------|------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------------|---|------------------------------------|
| Cyb 01 | 172 | 14684-14855 | 14705-14804 | F 14684-14704 R 14855-14835 | 5' CGGACTA CAACCACGAC CAAT 3' 5' GGAGT GAGCCGAAGT TTCATC 3' | 58 |
| Cyb 02 | 189 | 14789-14987 | 14800-14934 | F 14789-14810 R 14987-14968 | 5' AA CCACTCATTC ATCGACCTCC 3' 5' AGCGGAT GATTCAGCCA TAA 3' | 61/63 |
| Cyb 03 | 337 | 14891-15227 | 14912-15170 | F 14891-14911 R 15227-15207 | 5' CTATTCCTAG CCATGCACTA C 3' 5' GTAT GTAACCCTGT CTGGATC 3' | 60/62 |
| Cyb 04 | 280 | 15086-15365 | 15107-15346 | F 15086-15106 R 15365-15347 | 5' AACAT CGGCATTATC CTCCTG 3' 5' TTGTTT GATCCCGTTT CGTG 3' | 60 |
| Cyb 05 | 294 | 15291-15584 | 15316-15560 | F 15291-15310 R 15584-15564 | 5' ACTTCATCTT GCCCTTCATT 3' 5' TTGT GTAGGCGAAT AGGAAAT 3' | 60 |
| Cyb 06b | 369 | 15503-15871 | 15528-15780 | F 15503-15528 R 15871-15847 | 5' CCAGACAA TTATACCCTA GCCAACCC 3' 5' T TTGTTTTCAA TTAGGGAGAT 3' | 59 |
| Cyb 07a | 286 | 15754-16039 | 15779-15990 | F 15754-15778 R 16039-16015 | 5' CTGAATC GGAGGACAAC CAGTAAGC 3' 5' CTTCCCAT GAAAGAACAG AGAATA 3' | 57 |

*X~ oder Y+: Anzahl zusätzlich zur Cambridge-Sequenz angefügter Nukleotide.

**Kleinbuchstaben zeigen angefügte Nukleotide an, Großbuchstaben geben die Cambridgesequenz wieder.

Lebenslauf

Name: **Pilz**
 Vorname: **Korinna**
 Wohnort: Eduard-Schloemann-Straße 46
 40237 Düsseldorf
 Geburtstag / -ort: 23.10.1965 in München
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Konfession: evangelisch

Schulbildung

1971 – 1975 Grundschole in Hilden
 1975 – 1984 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Hilden
 Abschluss: **Allgemeine Hochschulreife**

Universität

WS 1984/85 – SS 1985 Studium der **Philosophie**, HHU Düsseldorf
 WS 1985/86 – SS 1992 Studium der **Biologie**, HHU Düsseldorf
Abschluss: Diplom-Biologin
 SS 1992 – WS 1999 Studium der Humanmedizin, HHU Düsseldorf
Abschluss: ÄiP

Berufspraxis

06/1992 – 01/1996 **Wissenschaftliche Assistentin**, Institut für Medizinische
 Mikrobiologie und Virologie, HHU Düsseldorf
 04/1996 – 05/1997 **Wissenschaftliche Hilfskraft**, Knochenmarkspenderzentrale,
 HHU Düsseldorf
 03/1997 – 12/1999 **Stud. Hilfskraft**, Notaufnahme St. Lukas-Klinik, Solingen
 01/2000 – 06/2001 **ÄiP**, Abteilung für Hämatologie, Onkologie und klinische
 Immunologie, HHU Düsseldorf
 07/2001 – 06/2002 **Assistenzärztin**, Abteilung für Strahlentherapie und Onkologie,
 Marienhospital, Düsseldorf
 09/2002 – 01/2004 **Medical Science Physician**, klinische Forschung
 Antiinfektiva/Onkologie, Bayer Vital, Leverkusen
 seit 02/2004 **Medical Advisor**, klinische Forschung und Entwicklung/Medical
 Science, Merck KGaA, Darmstadt

Danksagung

Herrn Professor Gattermann danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas, die wertvollen Ratschläge und die kritische und sorgfältige Begleitung während der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. Müller möchte ich für die Bereitstellung des Probenmaterials und der klinischen Daten bedanken, ohne die die Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Nicht unerwähnt bleiben soll die freundliche Unterstützung der Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, hier möchte ich insbesondere Frau Pooten nennen, die mir bei der praktischen Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt der Geduld und Unterstützung meines Lebensgefährten Stefan, der viele Wochenenden ohne Murren auf mich verzichtete, technische Hilfestellung leistete und mit mir alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre durchlebt hat.

Dank auch an meine Eltern, die nie den Glauben an mich verloren haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden bedanken, die die Entstehung und Fertigstellung der Arbeit verfolgt haben, insbesondere Dirk, der mir beim Layout behilflich war.

Mutationen der mitochondrialen DNA in kolorektalen Karzinomen

vorgelegt von Korinna Pilz

Die Akkumulation von Mutationen der Mitochondrien-DNA (mtDNA) steht im Vordergrund der mitochondrialen Theorie des Alterns. Außerdem sind mitochondriale Defekte seit Otto Warburgs Entdeckung der aeroben Glykolyse in Tumorzellen immer wieder als pathogenetischer Faktor bei der Karzinogenese diskutiert worden. In den letzten Jahren berichteten verschiedene Arbeitsgruppen über erworbene Mutationen der mitochondrialen DNA in menschlichen Tumorzellen. Polyak et al. fanden erworbene Mutationen der Mitochondrien-DNA in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien. Da diese Befunde an malignen Zelllinien erhoben wurden, die bekanntermaßen genetisch instabil sind und daher in vitro zusätzliche genetische Läsionen entwickeln können, wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit primäres Tumormaterial von 20 kolorektalen Karzinomen verwendet, um das mitochondriale Genom auf erworbene Mutationen zu untersuchen. Dafür stand jeweils ein Probenpaar zur Verfügung, nämlich Tumorgewebe und histopathologisch unauffällige Darmmukosa des Patienten. Aus den Biopsaten wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das komplette mitochondriale Genom in 60 überlappenden Abschnitten amplifiziert. Zur Mutationssuche wurden die PCR-Produkte einer Heteroduplex-Analyse mittels denaturierender HPLC (dHPLC) unterzogen. Bei auffälligem dHPLC Befund erfolgte eine Sequenzierung des betreffenden Genabschnitts, um die zugrundeliegende Mutation genau zu charakterisieren. Die Suche erbrachte insgesamt 43 Abweichungen von der sogenannten Cambridge-Sequenz, die zusammen mit den bislang bekannten Polymorphismen regelmäßig als Referenz für solche Untersuchungen herangezogen wird. Die Sequenzabweichungen verteilten sich auf 17 der 20 untersuchten Probenpaare. Drei Probenpaare waren unauffällig, 10 wiesen 1-2 Sequenzunterschiede auf, 7 hatten ≥ 3 Sequenzabweichungen. Von den 43 Sequenzabweichungen waren 24 bereits als Polymorphismen in der Mitochondrien-Datenbank (www.mitomap.org) registriert. Weitere 10 waren noch nicht als Polymorphismen registriert, wurden von uns aber als solche gewertet, da sie sowohl im Tumor als auch in der histopathologisch unauffälligen Umgebung vorhanden waren oder weil es sich um stumme Mutationen handelte. Es blieben also 9 Sequenzabweichungen (in 8 Probenpaaren), die von pathophysiologischer Bedeutung sein können. Dabei handelte es sich in 6 Fällen um die Mutation einer proteinkodierenden Sequenz, die zum Austausch einer konservierten Aminosäure führte. Zwei der Mutationen veränderten die Sequenz der 16S rRNA; einmal war die tRNA^{Leu}(UUR) betroffen. Bei 8 Sequenzabweichungen lag eindeutig eine somatische Mutation vor, die im Tumor, aber nicht im Normalgewebe nachweisbar war. Eine der rRNA-Veränderungen war zwar auch im histopathologisch unauffälligen Nachbargewebe zu finden, lag dort jedoch heteroplasmatisch vor, also koexistent mit dem Wildtyp, was dafür spricht, daß es sich ebenfalls um eine erworbene Mutation handelte. Die Ergebnisse dieser Mutationssuche bestätigen, daß in primärem Tumormaterial relativ häufig erworbene Mutationen der mtDNA zu finden sind, die Funktionsstörungen der mitochondrialen Atmungskette zur Folge haben können. Die identifizierten mtDNA-Mutationen können jedoch einen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Defekten und der Entstehung kolorektaler Karzinome nicht beweisen, sondern die entsprechende Hypothese nur deskriptiv stützen. In Zukunft müßte versucht werden, durch Experimente, beispielsweise zur Auslösung genomischer Instabilität, stärkere Belege für eine tumorigene Wirkung mitochondrialer Defekte zu gewinnen. Unabhängig von ihrer möglichen pathogenetischen Bedeutung könnten erworbene mtDNA-Mutationen als klonale Tumormarker in Zukunft eine nützliche diagnostische Rolle beim Nachweis minimaler Resterkrankung spielen.