

5. Diskussion

5.1. Das KPNA2-Gen und dessen Bedeutung für die Zelle

Das KPNA2-Gen kodiert ein Protein, das große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Produkt des bei *Drosophila melanogaster* identifizierten Tumorsuppressorgens OHO 31 (TÖRÖK et al., 1995) besitzt und als SRP1 α (WEIS et al., 1995) oder RCH1 (CUOMO et al., 1994) bezeichnet wird. Es besitzt mit dem Eiweiß von OHO 31 eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 49.5 % und gehört zu einer Proteinfamilie (Importin α -Proteinfamilie), deren Mitglieder als Rezeptoren beim intrazellulären Proteintransport fungieren. Der Transport der im Cytoplasma synthetisierten Proteine in den Zellkern stellt für die Zelle einen Mechanismus dar, der, je nach Art des Proteins, in der Konsequenz unterschiedliche Bedeutung besitzt. So wäre z. B. die mögliche Beteiligung eines nicht voll funktionsfähigen KPNA2-Gens an der tumorösen Entartung einer Zelle bzw. an der Beschleunigung der Tumorprogression einer schon veränderten Zelle dadurch zu erklären, daß zellzyklusregulierende und andere an der Tumorgenese beteiligte Proteine zwar im Cytoplasma gebildet werden, jedoch bedingt durch einen defekten Transportrezeptor nicht oder in nicht ausreichender Menge in den Zellkern gelangen. Zur Klärung dieser Hypothese bedarf es eines enormen Aufwandes an Zeit und Geld, der den Rahmen einer Dissertation weit übersteigen würde. Des Weiteren befindet sich das Verständnis der Tumorentstehung und -entwicklung in großen Teilen der Krebsforschung noch immer in einer frühen Phase, deren Dauer durch die Komplexität der Mechanismen wesentlich mitbestimmt wird. Aus den angeführten Gründen kann diese Arbeit lediglich eine Grundlage für weitere Forschungsvorhaben auf diesem Gebiet sein.

5.2. Die physikalische Kartierung des KPNA2-Gens

Alle Methoden zur Identifizierung von Krankheitsgenen führen letztendlich zu Kandidatengen, für die man im einzelnen testen muß, ob sie mit der untersuchten Krankheit tatsächlich zusammenhängen. Wenn das Kandidatengen derselben chromosomalen Teilregion zuzuordnen ist wie das Krankheitsgen, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit deutlich, daß die beiden identisch sind. Derartige positionsabhängigen Kandidatengenverfahren haben sich z. B. bei der Erforschung der Alzheimer-Krankheit (betroffenes Gen: apoE), des familiären Melanomes [betroffenes Gen: p16; (SERRANO et al. 1993, KAMB et al. 1994, NABORI et al. 1994)] und des erblichen Nicht-Polyposis Dickdarmkrebses (betroffene Gene: hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2) als sehr wertvoll erwiesen. Aufgrund der Geschwindigkeit der Zuordnung menschlicher Gene zu chromosomalen Teilregionen im Rahmen des *Human Genome Project* wird diese Methode in den nächsten Jahren eine vorherrschende Rolle spielen.

Die physikalische Kartierung des KPNA2-Gens stellt für die Bearbeitung der oben angeführten Hypothese eine Grundvoraussetzung dar. Mit Hilfe des STS-Markers 1718-1738 / 1855-1834 aus der untranslatierten 3'-Region der KPNA2-cDNA-Sequenz und unter Verwendung des *Somatic Cell Hybrid Mapping Panel # 1* (vgl. Kap. 4.1.1.; S. 51) konnte das Gen dem Chromosom 17 zugeordnet werden. Dabei ist zu beachten, daß das für das Chromosom 17 typische Muster (Hybride 1-15: positiv, Hybride 16-18: negativ) das Muster aller anderen Chromosomen (außer der Chromosomen 9, 16 und X) überdeckt. Aus diesem Grund wurden die Zellhybride erneut untersucht, und zwar mit einer exonbasierenden, intronüberspannenden Primerkombination 6-25 / 189-169 aus der 5'-Region der KPNA2-cDNA-Sequenz. Es zeigte sich sowohl ein Produkt in der Größenordnung der cDNA-Sequenz (ca. 180 bp), als auch ein Produkt in der Größe von ca. 1400 bp. Das Hybridmuster der 180 bp großen Bande ergab eine vollständige Konkordanz mit dem Muster für das Chromosom 4, was darauf hindeutet, daß sich auf dem Chromosom 4 ein prozessiertes Pseudogen des KPNA2-Gens befinden könnte. Das Ergebnis der 1400 bp großen Bande stimmt mit dem des 3'-STS-Markers überein und unterstützt somit die Aussage, daß sich das KPNA2-Gen auf dem Chromosom 17 befindet.

Die weitere Eingrenzung der Position des KPNA2-Gens erfolgte mit Hilfe einer genomischen DNA-Bibliothek, die unter Verwendung von Hefezellen mit künstlichen Hefechromosomen (YACs) erstellt wurde und kommerziell angeboten wird. Die Untersuchung der *CEPH Human mega YAC* Bibliothek mit dem STS-Marker 1718-1738 / 1855-1834 ergab fünf positive Klone, die komplett aus dem YAC-Contig WC 17.9 des *Center for Genome Research* des *Whitehead Institute for Biomedical Research* stammen. Das YAC-Contig befindet sich auf dem distalen Abschnitt des langen Armes des Chromosomes 17, woraus man schließen kann, daß sich das KPNA2-Gen ebenfalls in dieser Region befindet. Eine weitere Untersuchung einzelner YAC-Klone aus diesem Kontig mit Markern aus der Region 17q22-24 lies eine weitere Präzisierung der Positionsangaben zu. Des Weiteren konnte das KPNA2-Gen zwischen dem STS Marker D17S2020 und dem Mikrosatellitenmarker D17S1870 lokalisiert werden (vgl. Abb.4.2.). In künstlicher Hefechromosomen lassen sich sehr große DNA-Fragmente (bis zu 2 Mb) klonieren, was jedoch den Nachteil besitzt, daß sich in einem Klon oft Fragmente von unterschiedlichen (sog. chimäre Klone) bzw. einzelnen Chromosomen befinden. Um Fehler, die aufgrund dieser Tatsache entstehen können, zu minimieren, wurde eine weitere physikalische Kartierung mit Hilfe von 5 somatischen Zellhybriden mit chromosomalen Fragmenten aus der Region 17q vorgenommen. Die definierten Bruchpunkte der enthaltenen Fragmente lassen eine weitere Präzisierung der Positionsangaben in der Form zu, daß sich das KPNA2-Gen in der Region 17q23 befindet. In der Literatur werden von verschiedenen Autoren tumorgenetische Veränderungen in dieser Region beschrieben (LEGGETT et al., 1994; BÄRLUND et al., 1997). Es ist durchaus denkbar, daß ein Teil der beobachteten Veränderungen auf eine Beteiligung des KPNA2-Gens an der Tumorentstehung und –entwicklung zurückzuführen sind.

5.3. Die Konstruktion eines PAC-/BAC-Contigs und dessen Bedeutung

Durch die Herstellung von DNA-Bibliotheken auf der Basis künstlicher Bakterienchromosome (BACs) und Bakteriophagen P1-abgeleiteter künstlicher Chromosomen (PACs) wurden die Nachteile der YACs größtenteils überwunden. Die eingefügten DNA-Fragmente sind trotz ihrer Größe von ca. 100 bis 300 kb relativ stabil und die Möglichkeit der Entstehung von Chimären ist sehr gering. Weiterhin bietet die Verwendung dieser Klonierungsvektoren durch den Einsatz neuentwickelter Fluoreszenzmarkierungen (Rhodamin) in Verbindung mit hochsensitiven Detektionsverfahren die Möglichkeit der direkten Sequenzierung, d.h. die vorherige Amplifikation der DNA, z.B. durch PCR, ist nicht notwendig. Die Bedeutung der Direktsequenzierung ist bei der Konstruktion eines eigenen Klon-Contigs und bei der Untersuchung der genomischen Struktur eines Gens enorm hoch. Einerseits ist man dadurch in der Lage, die Endsequenzen der genomischen Insertionsfragmente mit relativ geringem Aufwand zu detektieren, was für die Erstellung des Contigs und Sicherstellung der Kontinuität durch die Herstellung und Verwendung spezifischer STS-Marker unabdingbar ist. Andererseits ist durch dieses Verfahren die Möglichkeit gegeben, von einer bekannten DNA-Sequenz (Exon) direkt in einen unbekanntem Sequenzbereich (Intron) vordringen zu können. Des Weiteren ermöglichen Kenntnisse der exakten Positionierung benachbarter Gene zueinander bzw. zu repetitiven Sequenzen, wie z. B. Mikrosatellitenmarkern in Verbindung mit Ergebnissen von Heterozygotieverlustuntersuchungen, Aussagen über eine mögliche Beteiligung des jeweiligen Gens an der Entstehung und Entwicklung bestimmter Erkrankungen.

Die Konstruktion eines eigenen BAC-/PAC-Contigs, welches die Region um das KPNA2-Gen abdecken sollte, stellte sich als äußerst schwierig dar. Sowohl eigene PCR-Untersuchungen als auch Ergebnisse aus Sequenzvergleichen mit Hilfe des *BLAST servers* ergaben, daß die Region, in der sich das KPNA2-Gen befindet, mindestens verdoppelt vorliegt. Der bereits vollständig sequenzierte PAC A13_245, der im Internet unter der Identitätsnummer AC003663 verfügbar ist, enthält Fragmente des KPNA2-Gens, die teilweise exonischen und teilweise intronischen Ursprungs sind und höchstwahrscheinlich ein nicht prozessiertes Pseudogen darstellen. Außerdem ist in der Datenbank eine mRNA-Sequenz unter der Identitätsnummer AA604760 zu finden, die ebenfalls veränderte Fragmente des KPNA2-Gens enthält und durch eine hohe Sequenzidentität mit großer Sicherheit dem oben angeführten Pseudogen zuzuordnen ist. Da dieser mRNA-Klon zusätzlich Sequenzen des FAC1-Genes enthält, die ebenfalls auf dem PAC A13_245 wiederzufinden sind, wird die Theorie, daß die mRNA genau diesen DNA-Abschnitt widerspiegelt erhärtet. Weiterhin muß jedoch durch das Fehlen eines Leserasters die biologische Wirksamkeit (Translation) stark angezweifelt werden.

5.4. LOH-Untersuchung in der Region 17q23 und allgemeiner Mikrosatellitenstatus

Die LOH-Untersuchung der kolorektalen Karzinome in der Region 17q23 ergab einen durchschnittlichen Verlust der Heterozygotie von insgesamt 34,37 %, wobei jedoch 11,6 % fraglich sind. Am häufigsten verloren waren die Regionen, in denen sich die Marker D17S1813 (insges. 48,3 %; fraglich 20,7 %) und D17S1870 (insges. 44,4 %; fraglich 5,5 %) befinden. Die Untersuchung der Mammakarzinome ergab ein ähnliches Bild. Insgesamt traten bei 35,18 % der untersuchten Proben Heterozygotieverluste auf, von denen 13,83 % fraglich sind. Die Marker mit der höchsten Verlustrate sind auch hier D17S1813 (insges. 44 %; fraglich 12 %) und D17S1870 (insges. 40 %; fraglich 13,3 %). Eine ähnlich hohe Verlusthäufigkeit ist bei den Mammakarzinomen im Gegensatz zu den Kolonkarzinomen auch bei dem Marker D17S789 (Mamma: insges. 47,8 %; fraglich 26,1 %; Kolon: insges. 25,9 %; fraglich 11,1 %) zu beobachten. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die verlorene Region bei den Mammakarzinomen größer ist als bei den Kolonkarzinomen. Es ist ebenso denkbar, daß die Brustkrebszellen häufiger als die Darmkrebszellen den ganzen langen Arm des Chromosom 17 bzw. das komplette Chromosom verlieren. Die Kolonkarzinome wurden zusätzlich mit 6 weiteren Mikrosatellitenmarker untersucht und zeigten dabei einen durchschnittlichen Heterozygotieverlust von insgesamt 51,83 % (fraglich 5 %). Dieser allgemeine Mikrosatellitenstatus verdeutlicht durch den häufigen Verlust verschiedenster chromosomaler Regionen die Komplexität der Tumorentstehung und -entwicklung. Die durch die beiden Mikrosatellitenmarker D17S1870 und D17S1813 definierte Teilregion der chromosomalen Region 17q23 ist vor allem bei den kolorektalen Karzinomen am häufigsten verloren. Dies wiederum könnte ein Hinweis darauf sein, daß sich dort ein Gen befindet, welches in die Entstehung und Entwicklung von Darmkrebs involviert ist. Das KPNA2-Gen befindet sich nach eigenen Untersuchungen zwischen den Markern D17S1870 / D17S1813 und dem STS-Marker D17S2020 und wäre demzufolge ein mögliches Kandidatengen. Diese Hypothese muß jedoch durch weitere Untersuchungen bewiesen werden.

5.5. Sequenz und genomische Struktur des KPNA2-Gens

Die Sequenzierung und die Untersuchung der genomischen Struktur ergab, daß das KPNA2-Gen aus 11 Exons besteht und ohne den Promotor eine Größe von ca. 11000 bp besitzt. Es ist auffällig, daß außer den Introns 4 und 5 alle weiteren Introns in der Phase 0 vorliegen. Das heißt, der größte Teil der Introns unterbricht die codierende Sequenz zwischen zwei nebeneinanderliegenden Codons. Im Falle eines kompletten Exonverlustes im Rahmen von tumorgenetischen Veränderungen würde es demzufolge nur bei der Elimination der Exons 4, 5 und 6 zu einer Verschiebung des Leserasters und letztendlich zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteinsynthese kommen. Andererseits können auch Exonverluste, die ohne Leserasterverschiebung einhergehen, die Wirksamkeit des gebildeten Proteins beeinträchtigen. Die Sequenzuntersuchungen ergaben weiterhin, daß sich in den Introns 5, 7 und 9 ALU-Sequenzen befinden, das sind ca. 280 bp lange Wiederholungen, deren Funktion bis heute unbekannt ist. Jedoch ist es denkbar, daß durch das Vorhandensein mehrerer ALU-Sequenzen das Gen für interne Deletionen und Duplikationen besonders anfällig ist. Diesem Phänomen liegt der Mechanismus zugrunde, daß es zuerst zur Paarung von nichtallelen, repetitiven Sequenzen kommt, gefolgt vom Bruch und dem erneuten Verschmelzen der Fragmente.