

Leistungsbericht zum Forschungsprojekt:

(Berichtszeitraum: Januar 2018 bis Dezember 2018)

Nachweis von komplexen Mutationen am *Cdkn2a* Locus, welche zum kompletten Verlust der Tumorsuppressoren p19-Arf und p16-Ink4a in der Muskulatur und Sarkomen von muskeldystrophen Mäusen führen

(ein Fortsetzungsprojekt zum Thema: Sarkom-Entstehung bei muskeldystrophen Mäusen)

Einleitung:

Mäuse mit Mutationen in Muskeldystrophie-assoziierten Genen wie *Dmd* (Dystrophin) und *Dysf* (Dysferlin) entwickeln mit großer Häufigkeit Sarkome mit einem wiederkehrenden genetischen Profil (Schmidt et al., 2011). Tiere mit und ohne sichtbaren Tumor zeigen eine drastisch verkürzte Lebensspanne im Vergleich zu Mäusen ohne Mutationen in Muskeldystrophie-assoziierten Genen. Im Vorgängerprojekt „Sarkom-Entstehung bei muskeldystrophen Mäusen“ konnte gezeigt werden dass die genetischen Veränderungen der Sarkome ebenfalls in möglichen Tumorstufen („Mikrosarkome“) nachweisbar waren, welche sich in der Muskulatur von Mäusen mit mutiertem *Dmd* Gen (*mdx*) finden. Dies betraf vor allem den Verlust der bekannten Tumorsuppressoren *Cdkn2a* und *Nf1*. Auf der Suche nach weiteren genetischen Veränderungen in den untersuchten Sarkomen wurde bei einer deep-RNA Sequenzierung ein neues Fusionstranskript zwischen *Cdkn2a* und dem darauffolgendem Gen *Gm12606* entdeckt. Dieses Fusionstranskript ist spezifisch nachweisbar in Sarkomen und Muskeln und auch Mikrosarkomen von muskeldystrophen Mäusen, während es nicht in Muskeln von Wildtyp Tieren exprimiert wird. Ein Vergleich der *Cdkn2a* Deletionen in Sarkomen mit und ohne Expression des Fusionstranskripts zeigte eine Assoziation mit bestimmten Läsionen am *Cdkn2a* Locus. Ein Teil der Fusionstranskript-positiven Sarkome wies keine *Cdkn2a* Kopienzahländerungen auf, und ein Pilotexperiment mit einem solchen Sarkom zeigte nach Next-Generation-Sequencing eine kopienzahlneutrale Inversion von *Cdkn2a* die eine Erklärung für die Expression dieses Transkripts liefern konnte.

Fragestellung:

Es wird vermutet dass das muskeldystrophie-spezifische Fusionstranskript ein Marker für *Cdkn2a* Läsionen darstellt. Diese Ansicht wird gestützt durch die Expression dieses Transkripts in Sarkomen mit kompatibler *Cdkn2a* Deletion. Bei Sarkomen mit einer normalen *Cdkn2a* Kopienzahl trotz Fusionstranskript wird eine Inversion als Ursache vermutet, was sich durch Next-Generation-Sequencing beantworten lässt. Der Nachweis dieser Veränderungen wäre der indirekte Beweis des Verlusts des *Cdkn2a* Tumorsuppressors in Fusionstranskript-positiven Muskeln von muskeldystrophen Tieren.

Ergebnis:

Zur Untersuchung von kopienzahlneutralen Ereignissen als mögliche Ursache für die Expression von muskeldystrophie-spezifischen Fusionstranskripten (*Cdkn2a:Gm12606*) in Muskeldystrophie Maus Modellen, wurden vier Fusionstranskript-positive *mdx* Sarkome ohne nachweisbare Deletionen am *Cdkn2a* Locus, sowie Tumor-freies Kontrollgewebe derselben Tiere für Next-Generation Sequencing ausgewählt. Keines der getesteten Sarkome zeigte Veränderungen am *Cdkn2a* Locus (weder Punktmutationen, Deletionen, noch Inversionen). Ein Sarkom zeigte den Verlust von *Trp53* in Kombination mit einer Amplifikation der Onkogene *Met* und *Birc3*. Der Synergismus von *Trp53* und *Birc3* wurde ebenfalls in einem weiteren *mdx* Sarkom nach Untersuchung mittels aCGH beobachtet und ist in Osteosarkom Maus Modellen bekannt (Ma, Cai et al., 2009). Weitere Strukturelle Veränderungen betrafen größtenteils den Tumorsuppressor *Nf1*, welcher häufig in diesen Sarkomen deletiert vorliegt. Die Anzahl an mutierter Tumor-assoziierten Genen in den untersuchten Sarkomen war erstaunlich niedrig, mit nur fünf Genen (*Atrx*, *Gata2*, *Jak1*, *Map3k1*, *Trp53*) betroffen von relevanten Punktmutationen. Dies könnte auf die hohe Relevanz von Dystrophin als Tumorsuppressor rückschließen lassen.

Damit war das Sarkom aus dem Pilotexperiment das einzige mit nachweisbarer *Cdkn2a* Inversion kompatibel zur Expression des Fusionstranskripts. Während ein anderes Fusionstranskript (*Mtap:Dmrta1*) in einem *Dysf* mutantern Sarkom erfolgreich zu einer Deletion des gesamten *Cdkn2a* Locus, einschließlich *Cdkn2b* und *Gm12606*, zugeordnet werden konnte, scheint es für den Anteil von Sarkomen mit intaktem *Cdkn2a* Locus einen weiteren Mechanismus zur Expression von Fusionstranskripten zu geben. Durch die geringe Distanz der Fusionspartner am murinen Genom (~1 kb), bestand eine mögliche Erklärung für diese Transkripte in Readthrough Transcription. Es wurde bereits gezeigt dass dieser Mechanismus unter anderem durch Zellstress (Hitze, Osmotischer Stress, Sauerstoffradikale) ausgelöst werden kann (Vilborg et al., 2017), wodurch sich die Geschwindigkeit der RNA Polymerase beim Ablesen des Gens erhöht, das Endsignal überlesen wird, und ein Transkript mit aufeinanderfolgenden Genen entsteht. Dieser Stress ist kompatibel mit der Art von Stress die in Muskeln unter Abwesenheit von Dystrophin entsteht, und kann in Doppelmutanten (zB *mdx* + *Dysf*) stärker ausgeprägt sein. Dies passt wiederum zu der Beobachtung das *Cdkn2a:Gm12606* Fusionstranskripte tendenziell häufiger in *mdx/Dysf* Muskeln als in reinen *mdx* Muskeln nachweisbar waren. Für den spezifischen Nachweis von Readthrough Transcription am *Cdkn2a* Locus (codiert für *Arf* und *Ink4a*) wurde nun die pre-mRNA (enthält noch die intronischen Bereiche vor dem Splicen) von Wildtyp Fibroblasten und von Fusionstranskript-positiven Sarkom Zellkulturen verglichen, wobei tatsächlich die intergenische Region zwischen *Cdkn2a* und *Gm12606* in den Sarkom Zellkulturen nachweisbar waren, während die Wildtyp Fibroblasten nur positiv für die Kontrolle (*Arf* pre-mRNA) waren. Damit konnte Readthrough als Mechanismus für diese Muskeldystrophie-spezifischen Fusionstranskripte bestätigt werden.

Ob die Existenz der Fusionstranskripte ein Auslöser für Deletionen am *Cdkn2a* Locus waren, sollte ein Experiment mit *mdx* Muskeln in Langzeitzellkultur klären. Normalerweise treten *Cdkn2a* Läsionen recht früh in murinen Zellkulturen auf, und führen zu einer Immortalisierung. In diesem Fall zeigten die drei untersuchten Muskel Zellkulturen bereits nach 10 Passagen einen drastischen Anstieg der Proliferation (im gleichen Maß wie Sarkome), aber auch nach Passage 35 keinerlei Kopienzahländerungen am *Cdkn2a* Locus. Interessanterweise zeigten aber alle drei ein An/Aus der Fusionstranskript Expression, unabhängig von *Arf* Expression. Da das Fusionstranskript auch erfolgreich an Polyribosomen nachgewiesen werden konnte, und dieses für ein mögliches 16.7 kDa großes Protein codiert, wurde getestet ob solch ein Fusionsprotein nachweisbar ist. Erste Experimente mit einem Antikörper gegen den p19-Arf N-terminus (auch reaktiv gegen das mögliche

Fusionsprotein) zeigten zwar ein spezifisches Produkt dieser Größe in Fusionstranskript-positiven Sarkomen, ein spezifischer Antikörper gegen den von *Gm12606* codierten Teil des Fusionsproteins konnte dies jedoch nicht bestätigen. Der p19-Arf Antikörper erkannte anscheinend eine *Arf* Variante (*smArf*) die ebenfalls in den Sarkomen exprimiert wird.

Dennoch, die *Cdkn2a:Gm12606* Fusionstranskripte und seltenere Fusionstranskripte am selben Lokus sind hochspezifisch für Muskel, Mikrosarkome und Sarkome von muskeldystrophen Tieren. Die Expression ist assoziiert mit Readthrough Transcription sowie in einigen Fällen mit tatsächlichen *Cdkn2a* Läsionen. Diese Transkripte sind häufiger nachweisbar in Muskeln mit stärker ausgeprägtem Phänotyp der Muskeldystrophy, und obwohl kein Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte, wäre es von Interesse, ob ähnliche Ereignisse (Fusionstranskripte oder Readthrough Transcription) auch in Muskeln von humanen Muskeldystrophie Patienten nachweisbar sind.

Referenzen:

Ma O, Cai WW, Zender L, Dayaram T, Shen J, Herron AJ, Lowe SW, Man TK, Lau CC, Donehower LA (2009) MMP13, Birc2 (clAP1), and Birc3 (clAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression. *Cancer Res* 69: 2559-67

Schmidt WM, Uddin MH, Dysek S, Moser-Thier K, Pirker C, Hoger H, Ambros IM, Ambros PF, Berger W, Bittner RE (2011) DNA damage, somatic aneuploidy, and malignant sarcoma susceptibility in muscular dystrophies. *PLoS Genet* 7: e1002042

Vilborg A, Sabath N, Wiesel Y, Nathans J, Levy-Adam F, Yario TA, Steitz JA, Shalgi R (2017) Comparative analysis reveals genomic features of stress-induced transcriptional readthrough. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E8362-E8371