

Frauenklinik und Poliklinik der
Technischen Universität München des Klinikums rechts der
Isar
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

Differenzierung von risikomodifizierenden Genen bei
BRCA1/2-assoziierten und nicht-BRCA1/2-
assoziierten Ovarial- und Mammakarzinomen

Stefanie Klappenberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Priv.-Doz. Dr. B. Kuschel
	2. Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 13.12.07 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.08
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ätiologie des Ovarialkarzinoms	1
1.1.1 Risikofaktoren	1
1.1.2 Prävention	7
1.1.3 Therapie	8
1.2 Assoziierte Gene	9
1.2.1 BRCA1/2	9
1.2.1.1 Entdeckung und Genbeschreibung	9
1.2.1.2 BRCA1/2 Proteinfunktion	10
1.2.1.3 BRCA1/2-Genmutation	12
1.2.2 Gt-198	13
1.2.3 TBP-1 Interacting Protein	16
1.2.4 Aktueller Wissensstand	16
1.3 DNA-Reparatur	17
1.4 Strategien zur Identifizierung beteiligter Gene	23
2. Zielsetzung	26
2.1 Zielsetzung Ovarialkarzinome	26
2.2 Zielsetzung Gt-198	27
3. Material und Methoden	28
3.1 BRCA1/2	28
3.1.2 Proben für BRCA1/2-Mutationsanalyse in Ovarialkarzinomen	28
3.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Ovarialtumorgewebe	28
3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Blutlymphozyten	29
3.1.5 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	30
3.1.6 Mutationsdetektion	30
3.1.7 PCR-Amplifikation für die Mutationsanalyse in BRCA1 und BRCA2	33
3.1.8 Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen	34
3.1.9 Aufreinigung (Purifikation) der PCR-Produkte	36

3.1.10	Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte	37
3.1.11	Allgemeines zur Sequenzierung mit einem „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“	39
3.1.12	Sequenzreaktion	42
3.1.13	Präzipitation (Ausfällung) der DNA	43
3.1.14	Beladung des „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“	44
3.1.15	Sequenzanalyse	45
3.1.16	Allgemeines zur SNP-Detektion mittels TaqMan®	45
3.1.17	PCR zur SNP-Detektion mittels TaqMan®	47
3.1.18	Analyse der SNP-Detektion	50
3.1.19	Statistische Auswertung	50
3.2	Gt-198 Genanalyse	53
3.2.1	Proben für die Gt-198 Genanalyse	53
3.2.2	Zellimmortalisierung	54
3.2.3	RNA-Extrahierung	54
3.2.4	cDNA-Synthese	55
3.2.5	cDNA-Aufreinigung (Purifikation)	56
3.2.6	PCR zur Amplifikation des Gens Gt-198	57
3.2.7	Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen	58
3.2.8	Aufreinigung (Purifikation) der PCR-Produkte	58
3.2.9	Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte	59
3.2.10	Sequenzreaktion	59
3.2.11	Präzipitation (Ausfällung) der DNA der Sequenzreaktion, Beladung des „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“, Sequenzanalyse	60
4.	Ergebnisse	61
4.1	Ergebnisse der Ovarialkarzinome	61
4.1.1	Hypothese	61
4.1.2	Untersuchtes Material und Methoden	61
4.1.3	Ergebnisse	62
4.1.4	Tumore ohne Mutation	66
4.1.5	Weitere Sequenzvarianten	66
4.1.6	Zusammenfassung der Mutationsanalysen	68
4.1.7	SNP-Verteilung in DNA-Reparaturgenen	68
4.1.8	SNP-Verteilung in Assoziation zum BRCA Mutationsstatus	69
4.1.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der Ovarialkarzinome	71

4.2 Ergebnisse Gt-198	72
4.2.1 Hypothese Gt-198	72
4.2.2 Untersuchtes Material und Methoden Gt-198	72
4.2.3 Vorarbeiten für die Mutationsanalyse	72
4.2.4 Überprüfung der Gt-198 Sequenz DURF53/A05 auf Sequenzgleichheit im humanen Genom	76
4.2.5 Ergebnisse der Mutationsanalyse in Gt-198	77
4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Gt-198- Mutationsanalyse	83
5. Diskussion	84
5.1 Diskussion Ovarialkarzinome	84
5.2 Diskussion Gt-198	89
6. Schlussfolgerung	97
6.1 Schlussfolgerung Ovarialkarzinome	97
6.2 Schlussfolgerung Gt-198	98
7. Referenzen	99

1. Einleitung

Das Ovarialkarzinom ist sowohl in West- und Osteuropa als auch in den Vereinigten Staaten die am dritthäufigsten diagnostizierte Karzinomart des Genitaltraktes der Frau. Jährlich erkranken circa 191 000 Frauen weltweit am Ovarialkarzinom ^{Greenlee, et al. 2001}. Die Arbeitsgemeinschaft „Bevölkerungsbezogener Krebsregister“ und das Robert-Koch-Institut geben für das Jahr 2002 ca. 9950 Neuerkrankungsfälle in Deutschland an, das sind 4,8% aller weiblichen Krebserkrankungen ^{Robert-Koch-Institut 2006}. Bezüglich der Mortalität steht das Ovarialkarzinom in Deutschland an siebter Stelle (nach Mamma-, Darm-, Bronchial-, Magenkarzinom, Leukämien und Lymphomen und Pankreaskarzinom). Für das Jahr 2002 wurden ca. 5910 Sterbefälle aufgrund des Ovarialkarzinoms berichtet. Somit beträgt der Anteil an tumorbedingter Mortalität in Deutschland 5,9% für das Ovarialkarzinom ^{Robert-Koch-Institut 2006}. Die Überlebensrate der Patientinnen, die an einem Ovarialkarzinom erkrankt sind, hängt vom Stadium des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose ab. Wird das Ovarialkarzinom in Stadium FIGO I erkannt, liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei über 90% ^{Young, et al. 1990}. Diese sinkt bei Befall des kleinen Beckens auf 60-70%, bei Lymphknotenbeteiligung auf 20% und bei Fernmetastasen auf 10% ^{Heintz, et al. 2001}. Da die Symptome sehr unspezifisch sind, wird das Ovarialkarzinom häufig spät erkannt. In 3 von 4 Fällen hat der Tumor bei Diagnosestellung bereits die Grenzen des Ovars überschritten, mit der Folge, dass die Gesamt-5-Jahresüberlebensrate zwischen 35-41% liegt ^{Robert-Koch-Institut 2006; van Nagell, et al. 1995}. In fortgeschrittenem Stadium erweisen sich die bisherigen Behandlungsmethoden (Operation und Chemotherapie) nur in beschränktem Umfang als wirksam. Insgesamt nimmt das Ovarialkarzinom in der Statistik der Todesursachen bei der Frau die fünfte Position ein ^{Robert-Koch-Institut 2006; Runnebaum and Stickeler 2001}.

1.1 Ätiologie des Ovarialkarzinoms

1.1.1 Risikofaktoren

Die Ursachen für die Entstehung des Ovarialkarzinoms sind nur unzulänglich geklärt. Es wird von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen. Folgende Risikofaktoren sind bekannt: Alter, Kinderlosigkeit, Infertilität und deren Therapie

eine positive Familienanamnese für das Mamma- und Ovarialkarzinom. Im Folgenden wird auf die einzelnen Punkte genauer eingegangen.

Alter

Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms ist mit dem Alter ansteigend. Wie in *Abbildung 1* zu erkennen ist, nimmt die Inzidenz stetig zu, bis zu einem Höchststand in der Altersgruppe der 80- bis 84-jährigen. Danach ist die Inzidenz wieder leicht rückläufig. Da sich die Altersverteilung in der Bevölkerung zugunsten der Älteren verschieben wird, vermutet man, dass in den nächsten Jahren diese Zahlen noch weiter ansteigen werden ^{Edmondson and Monaghan 2001}.

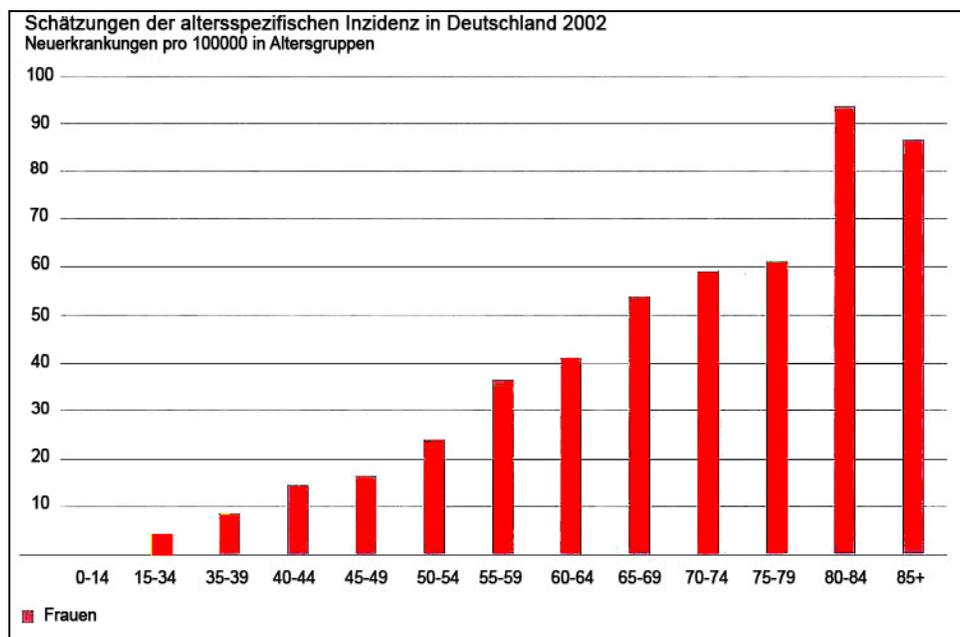


Abbildung 1: Inzidenzkurve des Ovarialkarzinoms in Deutschland 2002 basierend auf Schätzungen des Robert-Koch-Instituts ^{Robert-Koch-Institut 2006}.

Kinderlosigkeit

Frauen ohne vorausgegangene Schwangerschaften weisen ein höheres Risiko auf an Ovarialkarzinom zu erkranken, als Frauen, die einmal schwanger waren ^{Hankinson, et al. 1995}. Bei Frauen mit Ovarialkarzinom in der Verwandtschaft ersten oder zweiten Grades ist dieser Effekt ausgeprägter, als bei Frauen ohne familiäre Vorbelastung ^{Olson, et al. 2002}. Mit jeder weiteren Schwangerschaft sinkt das Risiko an Ovarialkarzinom

von nicht bis zum Termin ausgetragenen Schwangerschaften, wie Fehlgeburten und vorzeitig beendeten Schwangerschaften.

Infertilität und IF-Therapie

Bisher konnte nur ein schwacher Zusammenhang zwischen Infertilität, und der Entwicklung von Ovarialkarzinomen festgestellt werden ^{Purdie, et al. 1995; Venn, et al. 1995}.

Problematisch ist hierbei die Differenzierung zwischen Nulliparität und Infertilität, da Infertilität automatisch mit Nulliparität einhergeht. Ein erhöhtes Ovarialkarzinomrisiko infolge einer Infertilitätstherapie konnte bislang nicht bewiesen werden, Langzeitstudienresultate stehen noch aus ^{Mosgaard, et al. 1997; Venn, et al. 1999}.

Frühe Menarche (<12 J.) und späte Menopause (>50 J.)

Whittemore ^{Whittemore 1994} und Hankinson ^{Hankinson, et al. 1993} schreiben der Menarche nach dem 12. Lebensjahr bzw. der Menopause vor dem 50. Lebensjahr keinen signifikanten risiko-reduzierenden Effekt zu. Dem gegenüber stehen Studien die eine, allerdings nur schwache, Assoziation zwischen dem Alter bei der Menopause und dem Ovarialkarzinomrisiko aufzeigen ^{Schildkraut, et al. 2001}. Diese Daten führen zu der Vermutung, dass die frühe Menopause sich mit dem Ovarialkarzinom in Verbindung bringen lässt. Inzwischen gelten das frühe Alter zum Zeitpunkt der Menarche als auch zum Zeitpunkt der Menopause als Risikofaktoren ^{Brekelmans 2003}.

Positive Familienanamnese

Etwa 5-10% aller Ovarialkarzinome (*Abbildung 2*) weisen einen hereditären Hintergrund auf, der sich an folgenden genannten Merkmalen erkennen lässt

- eine Frau in der Familie mit einem Ovarialkarzinom das vor dem 40. Lebensjahr aufgetreten ist,
- eine Frau mit einem Mamma- und Ovarialkarzinom in der Erstlinienverwandtschaft,
- mindestens zwei Frauen in der Familie mit Ovarialkarzinomen,
- familiär gehäuft kolorektale Adenokarzinome mit früher Erstmanifestation (<50. Lebensjahr) zusammen mit Endometrium- oder Ovarialkarzinomen (hereditary nonpolyposis colorectal cancer = HNPCC),
- Keimbahnmutationen in BRCA1-, BRCA2-, „Mismatch-Repair-Genen“ wie MLH1, MSH2 oder TP53 die in einer Familie nachgewiesen wurden



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Verteilung des Ovarialkarzinoms.

Bei Familien, in denen

- mindestens zwei Frauen ein Mammakarzinom aufweisen, wobei mindestens eine Verwandte vor dem 50. Lebensjahr erkrankt ist,
- eine Frau mit bilateralem prämenopausalen Mammakarzinom,
- männliche Verwandte mit Mammakarzinomen auftreten,

sollte man an die Existenz des familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndroms auf der Basis von BRCA1/2-Mutationen denken.

Folgende hereditären Syndrome sind bekannt:

- Das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom ist das häufigste Syndrom. In etwa 90% aller hereditären Ovarialkarzinome liegt es vor. Es wird hauptsächlich auf autosomal dominant vererbte Keimbahnmutationen in den Brustkrebsgenen BRCA1 (Chromosom 17q21) und BRCA2 (13q12) zurückgeführt. Die Detektionswahrscheinlichkeit für eine BRCA1/2-Mutation steigt mit dem Alter der jüngsten Erkrankten bzw. der Anzahl der Erkrankten mit Mamma- und Ovarialkarzinom in einer Familie. Nicht in allen Risikofamilien wird eine Kopplung der Erkrankung mit dem BRCA1- oder BRCA2-Lokus gefunden.
- Ovarialkarzinome, aber auch das Endometriumkarzinom, kommen bei weiblichen Familienmitgliedern aus Familien mit hereditärem, nicht polypösen

Genen" wie MLH1 (Chromosom 3p21) oder MSH2 (2p15) gefunden werden.

- Keimbahnmutationen in p53 (17p13) kommen sehr selten vor (<1% aller hereditären Tumorsyndrome). In diesen so genannten Li-Fraumeni-Familien findet man ein sehr heterogenes Spektrum von Tumorerkrankungen (Osteo- und Weichteilsarkome, Gehirntumore, Leukämien, Mamma-, Lungen-, Prostata-, Pankreas-, Kolon- und Ovarialkarzinome), die teilweise bereits im Kindesalter auftreten.
- Weitere Suszeptibilitätsgene oder Gencluster mit unterschiedlichen Vererbungsmustern (autosomal dominant, autosomal rezessiv) werden bei hereditären Tumorerkrankungen vermutet, bei denen die genetische Ursache mit den bereits bekannten Genen nicht geklärt werden kann ^{Antoniu, et al. 2000}.

Aufgrund der Häufigkeit liegen die meisten klinischen Daten und damit auch Empfehlungen zum hereditären Ovarialkarzinom für BRCA1/2-Mutationsträgerinnen vor.

Erkrankungsrisiken bei positiver Familienanamnese

In der Literatur variieren die Penetranzschätzungen abhängig vom Gen und der untersuchten Population. Die umfangreichste Metaanalyse umfasst 22 Studien ^{Antoniu, et al. 2003}. Das kumulative Risiko für BRCA1-Mutationsträgerinnen bis zum 70. Lebensjahr am Mammakarzinom zu erkranken liegt bei 65%, für das Ovarialkarzinom bei 40% (*Abbildung 3*). Schätzungen für BRCA2-Mutationsträgerinnen liegen bei 45% für das Mammakarzinom, 11% für das Ovarialkarzinom (*Abbildung 4*). Diese Zahlen kontrastieren deutlich mit dem Risiko der Normalbevölkerung, hier liegt das Ovarialkarzinomrisiko zwischen 1% und 2%. Bei den BRCA1/2-Mutationsträgerinnen steigt das Erkrankungsrisiko für das Ovarialkarzinom ab dem 40. Lebensjahr, d.h. zumeist nach Abschluss der Familienplanung.

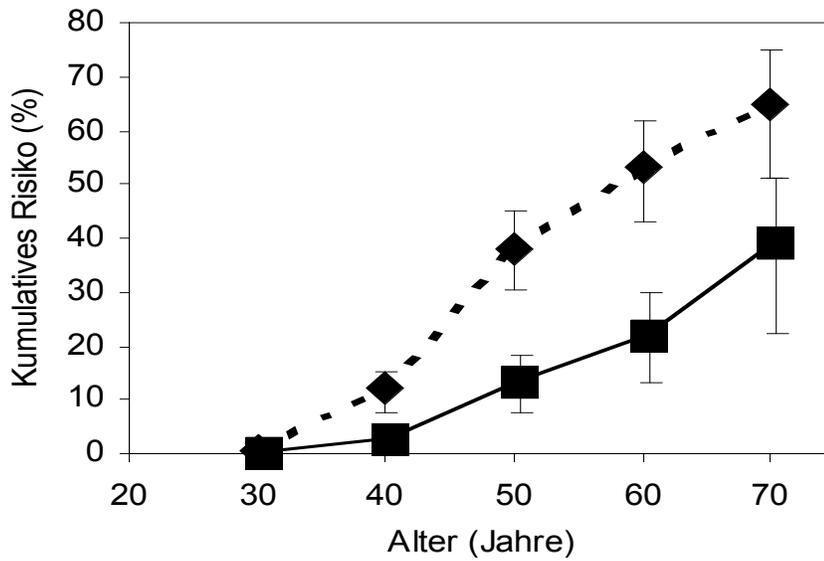


Abbildung 3: Kumulatives Erkrankungsrisiko für Mamma- (◆) und Ovarialkarzinom (■) bei BRCA1-Mutationsträgerinnen. Das Ovarialkarzinomrisiko steigt ab dem 40. Lebensjahr und ist deutlich höher als bei BRCA2-Mutationsträgerinnen (siehe *Abbildung 4*).

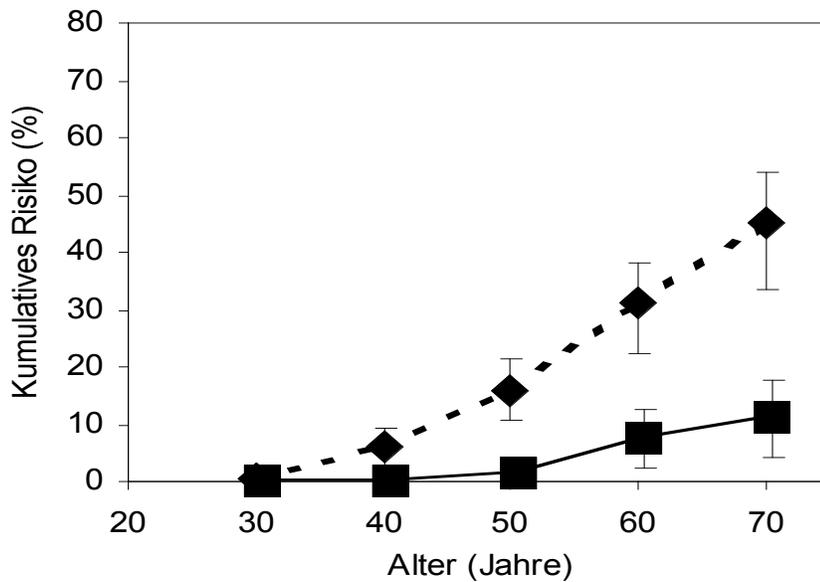


Abbildung 4: Kumulatives Erkrankungsrisiko für Mamma- (◆) und Ovarialkarzinom (■) bei BRCA2-Mutationsträgerinnen.

Ebenfalls ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht bei BRCA1-Familien für Kolon- (2x) und Prostatakarzinom (2x) ^{Ford, et al. 1994} möglicherweise auch für das Zervix-, Endometrium-, und Tubenkarzinom ^{Thompson and Easton 2002}. Bei BRCA2-Familien besteht ein signifikant erhöhtes Mamma- (1,5x), Prostata- (1x) und Brustkrebsrisiko (2x).

auf ^{Ford, et al. 1994; Ford, et al. 1995}

Die Histopathologie und Überlebensdaten bei BRCA-assozierten Ovarialkarzinomen wurden bislang weniger gut untersucht, als entsprechende Mammakarzinome, bei denen insbesondere BRCA1-assozierte Tumore häufiger andere histopathologische Charakteristika aufzuweisen scheinen ^{Lakhani, et al. 2000}. Es zeichnet sich dennoch ab, dass BRCA1-assozierte Ovarialkarzinome ein höheres Grading und einen höheren Prozentsatz an soliden Tumorkomponenten als sporadische Tumore aufweisen und damit als aggressiver eingeschätzt werden müssen. Somatische p53-Mutationen werden ebenfalls häufiger beobachtet ^{Moslehi, et al. 2000} (persönliche Kommunikation S. Lakhani, 2003). Mehrere Studien zeigten einen höheren Anteil seröser Adenokarzinome bei familiären Ovarialtumoren (89%) im Vergleich zu nicht-familiären Tumoren ^{Chang, et al. 1995; Johannsson, et al. 1997; Rubin, et al. 1996}.

In einigen Studien wurde die Vermutung geäußert, dass der BRCA1/2 Mutationsstatus das Gesamtüberleben beeinflusst. Sehr widersprüchliche Daten gibt es insbesondere für BRCA1 Mutationsträgerinnen, bei denen sich die Tendenz zu einem schlechteren Gesamtüberleben abzeichnet. Das 5-Jahresgesamtüberleben einer BRCA1-Mutationsträgerin mit epithelalem Ovarialkarzinom wurde in einer Studie auf 21%, das einer BRCA2-Mutationsträgerin auf 25% angegeben –insgesamt signifikant schlechter als das Überleben bei sporadischen Ovarialkarzinomen ^{Pharoah, et al. 1999}.

1.1.2 Prävention

Genauso wie es Faktoren gibt, die das Risiko des Ovarialkarzinoms erhöhen, gibt es Faktoren die einen protektiven Effekt ausüben können, auf die im Weiteren eingegangen wird.

Tubale Ligation

Die tubale Ligation scheint einen protektiven Effekt auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms zu haben ^{Hankinson, et al. 1993}. Allerdings gilt dies nur für BRCA1/2-Mutationsträgerinnen, für Frauen ohne Mutation ist dieser positive Effekt nicht

Oophorektomie

Bilaterale prophylaktische Oophorektomie reduziert das Ovarialkarzinomrisiko um 96% bei BRCA1- oder BRCA2-Mutationsträgerinnen^{Kauff, et al. 2002; Rebbeck, et al. 1999b}. Es besteht jedoch weiterhin ein Restrisiko von ca. 4%^{R.K. Schmutzler, et al. 2002} für das extraovarielle Ovarialkarzinom, insbesondere bei familiärer Vorbelastung. Das Erkrankungsrisiko für Mammakarzinom von BRCA1/2-Mutationsträgerinnen wird durch die rechtzeitige (vor dem 50. Lebensjahr durchgeführte) prophylaktische Oophorektomie um 53% erniedrigt^{Rebbeck, et al. 1999b; Rebbeck, et al. 2002}.

Orale Kontrazeptiva

Es gibt Daten über den protektiven Effekt von prämenopausal verwendeten oralen Kontrazeptiva auf das Ovarialkarzinomrisiko in der Normalbevölkerung^{Whittemore, et al. 1992}. Eine retrospektiv erhobene Analyse von oralen Kontrazeptiva bei BRCA1 und BRCA2 Mutationsträgerinnen zeigt ebenfalls einen protektiven Effekt in Abhängigkeit von der Einnahmedauer: Orale Kontrazeptiva-Einnahmen von 6 und mehr Jahren führen zu einer Risikoreduktion von 60%^{Narod, et al. 1998}. Aufgrund der geringen Fallzahlen scheint es dennoch zu früh, orale Kontrazeptiva als Prävention beim hereditären Ovarialkarzinom einzusetzen, da es eine widersprüchliche Studie^{Modan, et al. 2001} und noch keine prospektiv erhobenen Daten gibt. Zudem wird gerade beim hereditären Mamma- und Ovarialkarzinomsyndrom durch die lange Einnahmedauer oraler Kontrazeptiva das Mammakarzinomrisiko möglicherweise erhöht^{Grabrick, et al. 2000}. Aus diesem Grund sollte man, wenn überhaupt, auf niedrig dosierte Östrogen-/Progesteronpräparate zurückgreifen.

Stillen

Whittemore^{Whittemore 1994} zeigt einen schwach protektiven Effekt des Stillens auf.

1.1.3 Therapie

Die Behandlung des Ovarialkarzinoms hängt von dem Stadium des Karzinoms, dem Zellsubtyp, dem Alter und dem allgemeinen Gesundheitszustand ab^{München 2004}. Aufgrund fehlender Daten über ein unterschiedliches Therapieansprechen unterscheiden sich die Therapie und das operative Vorgehen des hereditären Ovarialkarzinoms nicht von den Standards des sporadischen Ovarialkarzinoms.

1.2 Assoziierte Gene

1.2.1 BRCA1/2

1.2.1.1 Entdeckung und Genbeschreibung

Bereits im vorletzten Jahrhundert beschrieb Paul Broca Familien mit gehäuftem Auftreten von Mammakarzinomen ^{B.Broca 1886}. Mary-Claire King und Mitarbeiter beobachteten bereits 1990 in einigen Fällen eine Kopplung des familiären Auftretens des Mammakarzinoms mit dem Chromosomensegment 17q21. Diese Entdeckung führte 1994 zur Identifizierung des BRCA1 Gens ^{Miki, et al. 1994}. Wenig später gelang die Identifizierung des zweiten Brustkrebsgens BRCA2 auf dem Chromosom 13 ^{Wooster, et al. 1994}.

BRCA1 ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert. Es besteht aus 24 Exons, davon kodieren 22 Exons für ein nukleäres Phosphoprotein. Dieses Protein besteht aus 1863 Aminosäuren und ist 207 kDalton schwer.

BRCA2 ist auf Chromosom 13q12-q13, auf einem Intervall von 600kb lokalisiert ^{Wooster, et al. 1994}. Es besitzt 26 kodierende Exons und kodiert ein Protein, bestehend aus 3418 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 384 kDalton. *Abbildung 5* stellt die Beteiligung in DNA-Reparaturwegen sowohl von BRCA1 als auch von BRCA2 dar.

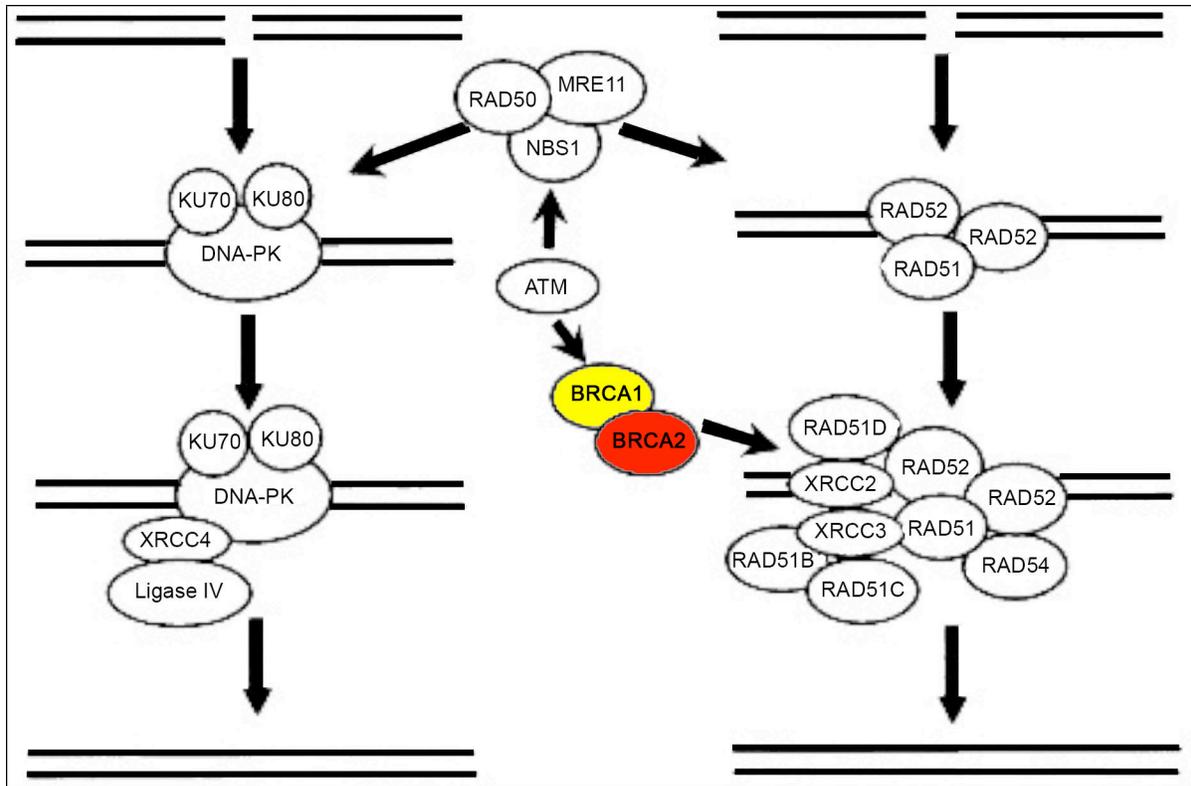


Abbildung 5: Interaktionen von BRCA1/2 in DNA-Reparaturwegen. Der initiale Schritt in beiden Reparaturwegen ist Erkennung und Signalisierung eines DNA Doppelstrangbruchs durch einen Proteinkomplex, der NBS1, MRE11 und RAD50 beinhaltet. In NHEJ bindet Ku70/80 an den Doppelstrangbruch. Daraufhin wird die DNA-PK rekrutiert und aktiviert. XRCC4 und Ligase IV werden direkt rekrutiert und durch DNA-PK phosphoryliert und die DNA-Enden werden ligiert. In HR, katalysiert RAD51 die Austauschreaktion einzelner Stränge und wird durch RAD52 über direkte Interaktion beeinflusst. RAD54 interagiert ebenfalls direkt mit RAD51 und stimuliert dessen Aktivität. Die RAD51-verwandten Proteine RAD51B-D, XRCC2 und XRCC3 sind ebenfalls in der homologen Rekombination involviert. XRCC3 interagiert direkt mit RAD51. BRCA2 interagiert direkt mit RAD51 und indirekt mit BRCA1. ATM reguliert über Phosphorylierung BRCA1 und NBS1 Kuschei, et al. 2002.

1.2.1.2 BRCA1/2 Proteinfunktion

Man geht davon aus, dass beide Brustkrebsgene Tumorsuppressorgene darstellen. Diese wirken inhibierend auf die Zellproliferation. Fällt diese Inhibition weg, kommt es zur unphysiologischen Zellteilung und somit zu malignem Zellwachstum. Knudsons Zwei-Schrittmodell Knudson 1971 beschreibt die Annahme, dass zwei aufeinander folgende Mutationen („Hits“) notwendig sind, um ein Tumorsuppressorgen zu inaktivieren. Die hereditären Keimbahnmutationen in BRCA1/2 stellen somit die erste Mutation, „first hit“, dar. Erst wenn das zweite Gen durch eine weitere Genveränderung (z.B. durch Mutation oder Chromosomenarmverlust) seine Funktion verliert, kommt der Entartungsprozess in Gang. Somit hängt das persönliche Risiko

einer Mutationsträgerin von dem Eintreffen und dem Zeitpunkt des zweiten Genverlustes („second hit“) ab.

Das BRCA1-Protein hat mehrere Domänen: ein RING-Finger-Motiv für Protein-Protein-Interaktionen, eine Domäne für die nukleäre Lokalisation, eine Domäne für RAD51-Interaktion, das Granin Motiv, die BRCT-Domäne für DNA-Reparatur oder für den Metabolismus (RAD9, XRCC1) sowie eine Transkriptions-Domäne ^{Houvras, et al. 2000; Welch, et al. 1998}

Im BRCA2 Gen sind ähnliche Domänen nachgewiesen. Eines dieser Motive des BRCA2-Proteins stellt eine achtfache Kopie von 30-80 Aminosäurewiederholungen („BRC repeat“) dar. Dieses Motiv ist in dem Teil des Proteins lokalisiert, das durch Exon 11 kodiert wird. Diese „BRC repeats“ können an das Protein RAD51 binden. Das Protein RAD51 ist wiederum in DNA Reparatur- und Rekombinationsmechanismen eingebunden ^{Lo, et al. 2003}

BRCA1 wird mit einer Vielfalt an zellulären Prozessen wie DNA-Reparatur, Regulation des Zellzyklus, Regulation der Transkription sowie Remodellierung des Chromatins, in Verbindung gebracht. BRCA2 scheint auf Rekombinierung der DNA sowie auf Reparaturprozesse beschränkt zu sein.

BRCA1 hat multiple Funktionen in der mRNA-Transkription, in der Öffnung der Chromatin-Verpackung des Genoms, der Protein-Ubiquitinierung, der Regulation von Wachstum und Apoptose und ist an verschiedenen DNA-Reparatur-Prozessen beteiligt ^{Venkitaraman 2002 Turner, et al. 2005}

DNA-Doppelstrangbrüche können über verschiedene Mechanismen repariert werden. Bevorzugt zu betrachten sind NHEJ (non-homologous end-joining) ^{Karran 2000 Khanna and Jackson 2001} und HR (Homologe Rekombination) (*siehe Kapitel 1.3*) ^{Khanna and Jackson 2001 Turner, et al. 2005}

Als Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche wird BRCA1 durch Kinasen mit Kontrollfunktion wie ATM ^{Cortez, et al. 1999} und ATR (ATM-related Kinase) ^{Lee, et al. 2000} phosphoryliert. Durch die Art der Phosphorylierung von BRCA1 nimmt BRCA1 Einfluss auf die Detektion und die Signalisierung von DNA-Schäden. Des weiteren ist BRCA1 eine Komponente eines großen Proteinkomplexes BASC (erCA1-associated genome-surveillance complex), welcher Einfluss auf die Wahl des Mechanismus der DNA-Reparatur abhängt von der Art des DNA-Schadens nehmen kann ^{Wang et al. 2000}

Durch die Wahl eines Reparaturmechanismus, wie z.B. das fehlerbehaftete NHEJ, entsteht somit chromosomale Instabilität ^{Venkitaraman 2002}.

Der Einfluss auf die Regulation des Zellwachstums und der Apoptose scheint in der bevorzugten Expressierung von BRCA1 in der späten G1-Phase sowie der frühen S-Phase des Zellzyklus begründet ^{Gudas, et al. 1996}. Die Funktion von BRCA1, nämlich die Arretierung in der S-Phase oder G1-Phase des Zellzyklus, ist auch hier über die eigene Phosphorylierung geregelt ^{Deming, et al. 2001}.

Auf den beobachteten Interaktionen von BRCA1 und RNA Helikase zur Aufwindung der Doppelhelix und der Interaktion mit CtIP einem Komplex zur Transkription beruht die Vermutung BRCA1 nehme Einfluss auf mRNA-Transkription sowie auf die Öffnung der Chromatin-Verpackung des Genoms ^{Scully, et al. 1997 Li, et al. 1999 Anderson, et al. 1998}.

BRCA2 fördert ebenfalls die HR bei DNA-Doppelstrangbrüchen. BRCA2 belädt hierbei die neben dem Bruch entstandenen, einzelsträngigen DNA-Überhänge mit RAD51-Molekülen ^{Pellegrini, et al. 2002}, wodurch im Anschluss der DNA-Austausch von RAD51 ausgeführt werden kann ^{Yang, et al. 2005}. Dies ist der Grund, weshalb DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur-Prozesse, welche in Zellen mit mutiertem BRCA2 ablaufen, nicht den Weg der HR einschlagen, sondern stattdessen NHEJ oder SSA zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen herangezogen wird ^{Tutt, et al. 2001}. Durch derartige fehlerbehaftete Reparatur, die Deletionen, also den Verlust ganzer DNA-Abschnitte verursachen kann ^{Venkitaraman 2002}, entsteht auch hier chromosomale Instabilität.

1.2.1.3 BRCA1/2-Genmutation

Pathogene Keimbahnmutationen beider Gene, BRCA1 und BRCA2, werden in der gesamten kodierenden Sequenz gefunden. So werden weltweit über 1200 Mutationen, Polymorphismen und Varianten in BRCA1 beschrieben. Für BRCA2 existieren über 1300 derartiger Mutationen, Polymorphismen und Varianten (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). In unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen werden vereinzelte Mutationen mit gehäufte Frequenz gefunden. Diese konnten teilweise über viele Jahrhunderte in den entsprechenden Populationen zurückverfolgt

werden. Sie werden als so genannte Gründermutationen („founder-mutations“) bezeichnet.

Eine ethnische Gruppe, in der solche Gründermutationen mit einem überrepräsentativen Anteil an Mutationen in BRCA1/2 vorkommen, stellen die Ashkenazi-Juden dar. In dieser Bevölkerungsgruppe treten drei solcher Gründermutationen (185delAG und 5382insC in BRCA1 sowie 1617delT in BRCA2) in BRCA1 und BRCA2 mit einer Häufigkeit von 2,3% in der Bevölkerungsgruppe der Ashkenazi-Juden auf. Davon sind 0,9% Träger der Mutation 185delAG in BRCA1. Die Mutation 5382insC ebenfalls in BRCA1 kommt mit einer Frequenz von 0,1% und die dritte Gründermutation 1617delT in BRCA2 mit 1,5% vor ^{Oddoux, et al. 1996; Roa, et al. 1996; Struewing, et al. 1995}. Man vermutet, dass 29-41% aller Ovarialkarzinome unter Ashkenazi-Jüdinnen in einer dieser drei Gründermutationen begründet liegt ^{Modan, et al. 2001; Moslehi, et al. 2000}.

Französisch-kanadische Gründermutationen in BRCA1/2

In der französisch-stämmigen Bevölkerung von Quebec kommen ebenfalls Gründermutationen vor. In 3 Studien ^{Chappuis, et al. 2001; Manning, et al. 2001; Tonin, et al. 1998; Tonin, et al. 2001} werden zwei Mutationen als französisch-kanadische Gründermutationen beschrieben: R1443X (C4446T) ist im BRCA1-Gen und 8767delAG im BRCA2-Gen lokalisiert. R1443X (C4446T) stellt die am häufigsten auftretende Mutation in den beiden BRCA-Genen in der französisch-kanadischen Bevölkerung dar. 16 weitere BRCA1/2-Mutationen treten ebenfalls gehäuft in der französisch-kanadischen Bevölkerung auf (*Tabelle 1 und Tabelle 2, Kapitel 3.1.4;*) ^{F. Guenard Oct 2002}. Die Vererbungslinien solcher Gründermutationen können bis auf Immigranten des 17. Jahrhundert zurückverfolgt werden. Zu dieser Zeit ließen sich über 5000 Immigranten aus Europa in Kanada nieder, von denen die meisten aus Frankreich stammten. Bis zu 4000 dieser Immigranten haben Nachkommen in der heutigen Bevölkerung von Quebec. Sie sind für den größten Teil des genetischen Pools der circa 5 Millionen französisch-stämmigen Einwohner der Provinz Quebec verantwortlich. Daten über ein gehäuftes Auftreten dieser Mutationen in Frankreich liegen nicht vor.

1.2.2 GT-198

Im Rahmen der BRCA1-Detektion stellten Hall et al (1990) ^{Hall, et al. 1990} eine

welcher im Chromosom 17q21 lokalisiert ist. Narod ^{Narod, et al. 1991} untersuchte 5 Familien mit einer scheinbar erblichen Prädisposition für Brust- und Ovarialkarzinome. 3 dieser Familien zeigten eine Verknüpfung zu dem Marker D17S74, der von Hall ^{Hall, et al. 1990} ebenfalls eingesetzt wurde. Daraus wurde gefolgert, dass bei circa 60% der Brustkarzinom-Familien eine Verbindung zwischen einer Anfälligkeit für Brust- und Ovarialkarzinom und dem Locus auf Chromosom 17 existiert. Lynch und Watson ^{Lynch and Watson 1992} berichten von einer Erweiterung dieser Studien auf 19 Familien, die meisten dieser Familien weisen das erblich bedingte Brust- und Ovarialkarzinomsyndrom auf. Hier wird sogar in 70% der Fälle eine Verbindung zu dem Locus 17q hergestellt.

Alle diese Studien weisen darauf hin, dass BRCA1 auf Chromosom 17q lokalisiert ist. O'Connell ^{O'Connell, et al. 1994} entwickelte eine „radiation hybrid map“ der BRCA1-Region. Diese diente als Grundlage für „YAC cloning“ und „pulsed field gel electrophoretic mapping“ der Region, die für BRCA1 gehalten wurde. Ein Gen, welches Gt-198 genannt wurde, ist ebenfalls auf Chromosom 17q12-q21 lokalisiert (*Abbildung 6*). Wie man in *Abbildung 6* sieht, liegt Gt-198 direkt benachbart zu dem Marker, den man für das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinom verantwortlich machte. Aufgrund dieser Lokalisation wurde das Gen Gt-198 für kurze Zeit als Kandidat für BRCA1 angesehen ^{Rommens, et al. 1995}.

Miki et al. ^{Miki, et al. 1994} widerlegten diese Theorie, indem sie durch „positional cloning“ einen „Kandidaten“ identifizierten, der mit höchster Wahrscheinlichkeit BRCA1 war. Weitere Mutationsanalysen identifizierten die Region zwischen 41570-41650K als BRCA1. Diese so identifizierte Region ist für eine Prädisposition verantwortlich und befindet sich auf Chromosom 17 in der Region q21, genau neben der Lokalisation von GT-198. Schnell wurde durch weitere Mutationsanalysen in Risikofamilien bestätigt, dass es sich hierbei um das gesuchte Mamma- und Ovarialkarzinomprädispositionsgen BRCA1 handelt. Folglich wurde die Theorie, Gt-198 könne BRCA1 sein, wieder verworfen ^{Friedman, et al. 1994; Futreal, et al. 1994; Miki, et al. 1994;}

^{Tonin, et al. 1994}

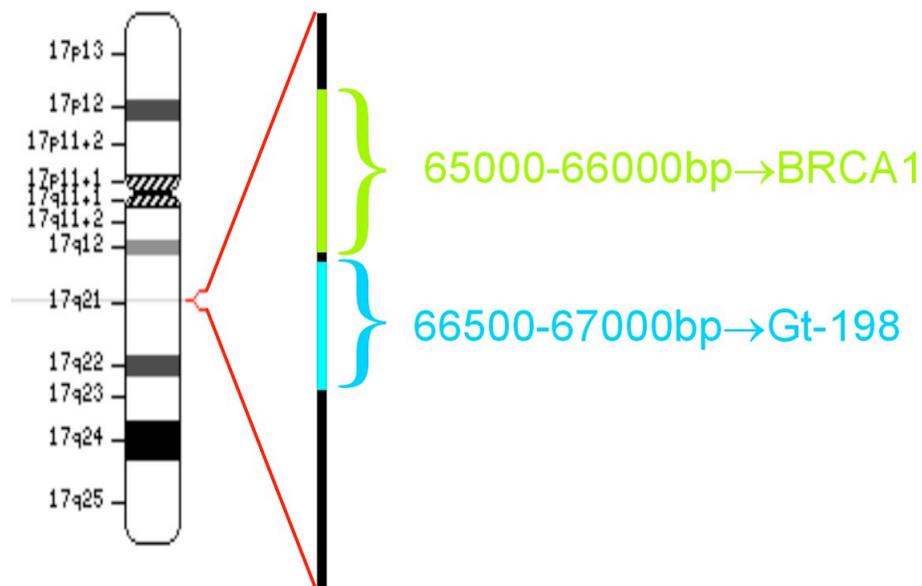


Abbildung 6: Darstellung der Lokalisation von Gt-198 auf Chromosom 17

Heute ist über GT-198 bekannt, dass es ein genomisches Transkript mit einem „Open Reading Frame“ ist ^{Rommens, et al. 1995}. Es setzt sich aus 8 Exons zusammen. Diese überspannen circa 6 Kilobasen. Die cDNA ist circa 1kb groß und codiert für ein nukleäres Protein, das sich aus 217 Aminosäuren zusammensetzt ^{Ko, et al. 2002}.

2001 konnte Lan Ko ^{Ko, et al. 2002} zeigen, dass Gt-198 eine gewebsspezifische Expression besitzt. Es wurden erhöhte Werte der mRNA von Gt-198 in den Hoden, der Milz und dem Thymus festgestellt (ähnliche Expressionsmuster sind für BRCA1 ebenfalls beschrieben). Weiterhin zeigte Lan Ko ^{Ko, et al. 2002}, dass die Transkription von Gt-198 stimuliert werden kann. Dies wird durch verschiedene Hormonrezeptoren, wie Östrogen- und Androgenrezeptoren vermittelt. Die Funktion von Gt-198 unterscheidet sich deutlich von der Funktion der Liganden bindenden Koaktivatoren, die mit nukleären Rezeptoren interagieren. Solche Koaktivatoren sind zum Beispiel TRBP, CBP und SRC-1. Verschiedene Proteinkinasen wie z.B. die Proteinkinasen A und C, können Gt-198 phosphorylieren. Die Cotransfektion dieser Kinasen reguliert die Aktivität der Transkription von Gt-198. Diese Daten führen zu der Annahme, dass Gt-198 ein gewebsspezifischer Nuklearrezeptor-Koaktivator ist, der durch verschiedene Kinasen reguliert werden kann. Vermutlich interagiert Gt-198 mit DNA-Bindungsstellen der Nuklearrezeptoren.

1.2.3 TBP-1 Interacting Protein

TBPIP wurde durch „Radiation hybrid Mapping“ auf Chromosom 17q12-21 lokalisiert. Interessanterweise wurde auch GT-198 auf den BRCA1-Lokus auf Chromosom 17q12-21 lokalisiert. Weiterhin ist die Nukleotidstruktur von GT-198 und TBPIP sehr ähnlich. Dies lässt vermuten, Gt-198 könnte eine mutierte Form des humanen TBPIP sein ^{Ijichi, et al. 2000}.

TBP ist ein Molekül, das mit dem HIV-Tat-Protein interagiert. Es hat Einfluss auf Tat-vermittelte Transaktivierung von HIV. Weiterhin wurde erkannt, dass TBP-1 eine Komponente der Regulationsuntereinheit 19S des Multiproteinkomplexes 26S-Proteasom ist. Dieser Multikomplex ist essentiell für einige grundlegende Ereignisse in der Zelle, zum Beispiel für die Regulation des Zellzyklus durch Degradierung von Proteinen ^{Nakamura, et al. 1998; Tanaka, et al. 1997}.

Als weiterer Faktor wurde „TBP-1 Interacting Protein“ bei Mäusen, der mit Maus-TBP-1 interagiert, geklont. Dieser Faktor enthält verschiedene Stellen zur Phosphorylierung der Kinasen und ist colokalisiert mit TBP-1. Vermutlich übernimmt „TBP-1 Interacting Protein“ (TBPIP) eine Schlüsselfunktion in der Tat-vermittelten Transaktivierung ^{Tanaka, et al. 1997}.

1.2.4 Aktueller Wissensstand

Heute weiß man, dass es sich bei Gt-198 und TBPIP um das gleiche Gen mit unterschiedlichen Splice-Varianten handelt. In der Gendatenbank (Mai 2007) werden die beiden Splice-Varianten als NM_016556 und als NM_013290 geführt. Die Sequenz NM_016556 entspricht der Sequenz NM_016556.1 bis auf ein Basenpaar an Position 73. Hier findet sich heute ein G. NM_013290 wird alternativ gesplitt und ist um die Basenabfolge CTCAAGGA ATTATCTAGTGCCCTGACCA CACCAGA kürzer als NM_016556 (*siehe Abbildung 7*).

AACTACAACG	TCCGGCTTTC	TGAGTTGGGT	GGCGGGAAAAG	GCGATGAGTA	50
AAGGCCGGGC	AGAAGCTGCG	GCGGGAGCCG	CCGGGATCCT	CCTGAGGTAC	100
CTGCAGGAaC	AGAACCGGCC	CTACAGCTCC	CAGGATGTGT	TCGGGAACCT	150
ACAGCGGGAA	CACGGACTGG	GCAAGGC GGT	GGTGGTGAAG	ACGCTGGAGC	200
AGCTGGCGCA	ACAAGGCAAG	ATCAAAGAGA	AGATGTACGG	CAAGCAGAAG	250
ATCTATTTTG	CGGATCAGGA	CCAGTTTGAC	ATGGTGAGTG	ATGCTGACCT	300
TCAAGTCCTA	GATGGCAAAA	TCGTGGCCCT	CACTGCTAAG	GTGCAGAGCT	350
TGCAGCAGAG	CTGCCGCTAC	ATGGAGGCTG	AGCTCAAGGA	ATTATCTAGT	400
GCCCTGACCA	CACCAGAGAT	GCAGAAAGAA	ATCCAGGAGT	TAAAGAAGGA	450
ATGCGCTGGC	TACAGAGAGA	GATTGAAGAA	CATTAAAGCA	GCTACCAATC	500
ATGTGACTCC	AGAAGAGAAA	GAGCAGGTGT	ACAGAGAGAG	GCAGAAGTAC	550
TGTAAGGAGT	GGAGGAAGAG	GAAGAGGATG	GCTACAGAGC	TGTCTGATGC	600
AATACTTGAA	GGATACCCCA	AGAGCAAGAA	GCAGTTCTTT	GAGGAAGTTG	650
GGATAGAGAC	GGATGAAGAT	TACAACGTC	CACTCCAGA	CCCCTGAGGG	700
GCCACGGTC	AGGACTGGTG	GGGACTGCAG	GATGTCAGAA	GAGTGAGATG	750
TCTTGCACTG	GCTACCTTGT	TTTTGGTTGG	CTTTTGTGT	TGTTCCtT	800
ACTTTtcaact	ttAGCAGAGC	AGTCAGGAGA	CAAGCATAAA	CCAGAGCACT	850

Abbildung 7: Gensequenz NM_016556. Die Exon-Exongrenzen wurden schwarz markiert. Die rosa markierten Basen fehlen in der Splicevariante NM_13290.

1.3 DNA Reparatur

Die DNA ist in fast allen Zellen ständigen Schäden durch endogene und exogene Mutagene ausgesetzt. Die Schäden der DNA würden unweigerlich in Apoptose oder in unreguliertem Zellwachstum münden, wenn keine Möglichkeit der Reparatur bestünde. Die Zellmaschinerie kann diese Schäden erkennen und über 5 verschiedenen Reparaturwege („Base Excision Repair“, „Mismatch-Repair“, „Nucleotid Excision Repair“ und für DNA-Doppelstrangbrüche homologe Rekombination und „Non-Homologous-End-Joining“) wieder korrigieren (*Abbildung 8*).

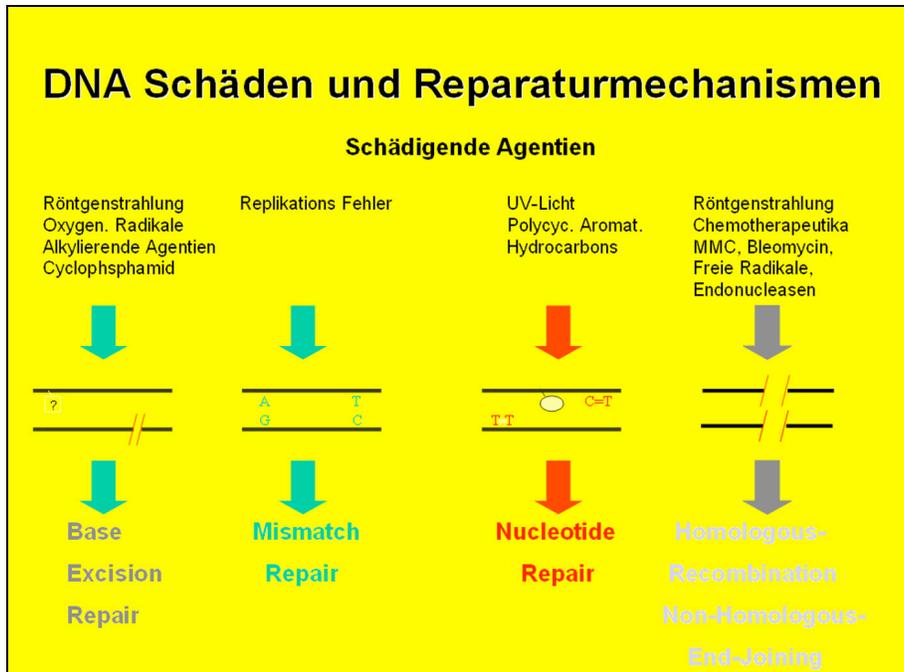


Abbildung 8: Schematische Darstellung der unterschiedlichen DNA-Schäden und den entsprechenden Reparaturmechanismen. Base Excision Repair: einzelne fehlende Basen werden korrigiert. Mismatch-Repair: Schreibfehler durch die DNA-Polymerase, wie der Einbau falscher Basen werden erkannt und korrigiert. Nucleotide Repair: Multienzymkomplexe erkennen DNS-Schäden, schneiden die DNS zu beiden Seiten des Schadens ein und entfernen zwischen diesen beiden Schnitten ein Oligonukleotid. Reparation von DSB's über homologe Rekombination und „Non-Homologous-End Joining“; Homologe Rekombination: DNA-Enden werden durch eine Nuklease in 5' → 3'-Richtung geschnitten. Die daraus resultierenden 3'-Einzelstrang-Enden dringen in die Doppelhelix eines homologen unbeschädigten Stranges ein und die DNA-Polymerase kopiert den unbeschädigten Strang. Danach überkreuzen die DNA-Stränge und vereinigen sich mit dem ursprünglich gegenüberliegenden Strang wieder zu zwei kompletten und intakten DNA-Molekülen. „Non-Homologous End-Joining“: zwei abgebrochene Enden werden direkt wieder miteinander verknüpft de Boer and Hoeijmakers 2000

Im Folgenden wird auf die DNA-Doppelstrangreparatur und Nucleotidexzisionsreparatur ausführlicher eingegangen, da im Rahmen dieser Arbeit Assoziationen zwischen Ovarialkarzinom und Polymorphismen in Genen dieser Reparaturwege untersucht wurden.

DNA Doppelstrangbrüche

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB's) entstehen durch ionisierende Strahlung, chemotherapeutische Medikamente und mechanischen Stress auf die Chromosomen. Sie werden als biologisch sehr wichtig betrachtet, da ihr Reparatursmechanismus im Vergleich zu anderen DNA-Schäden komplizierter ist. Fehlerhaftes Wiedervereinigen von Bruchstücken kann zu einem Verlust oder zur Amplifikation von chromosomalem Material führen. Unter bestimmten Umständen entstehen Translokationen, und somit ein Austausch von Segmenten oder ganzen Armen der Chromosomen. Chromosomale Translokationen können zu Genfusionen führen, welche die Funktion von Proto-Onkogenen dysregulieren. Dies begünstigt wiederum die Tumorentstehung.

DNA Doppelstrangbruch-Reparatur

Um derartige DNA-Schäden und somit die Tumorentstehung zu verhindern, gibt es für DNA-Doppelstrangbrüche zwei Reparaturmechanismen, die homologe Rekombination (homologous recombination/RH) und „non-homologous end-joining“ (NHEJ).

Homologe Rekombination

Zu Beginn der homologen Rekombination werden die DNA-Enden durch eine Nuklease in 5' → 3'-Richtung geschnitten. Die daraus resultierenden 3'-Einzelstrangenden dringen in die Doppelhelix eines homologen, aber unbeschädigten Stranges ein und werden dann durch eine DNA-Polymerase verlängert. Die DNA-Polymerase kopiert dazu die Informationen von einem unbeschädigten Strang. Durch Überkreuzung der DNA-Stränge und Vereinigung mit dem ursprünglich gegenüberliegenden Strang entstehen zwei komplette und intakte DNA-Moleküle (*Abbildung 9*) Khanna and Jackson 2001 Karran 2000

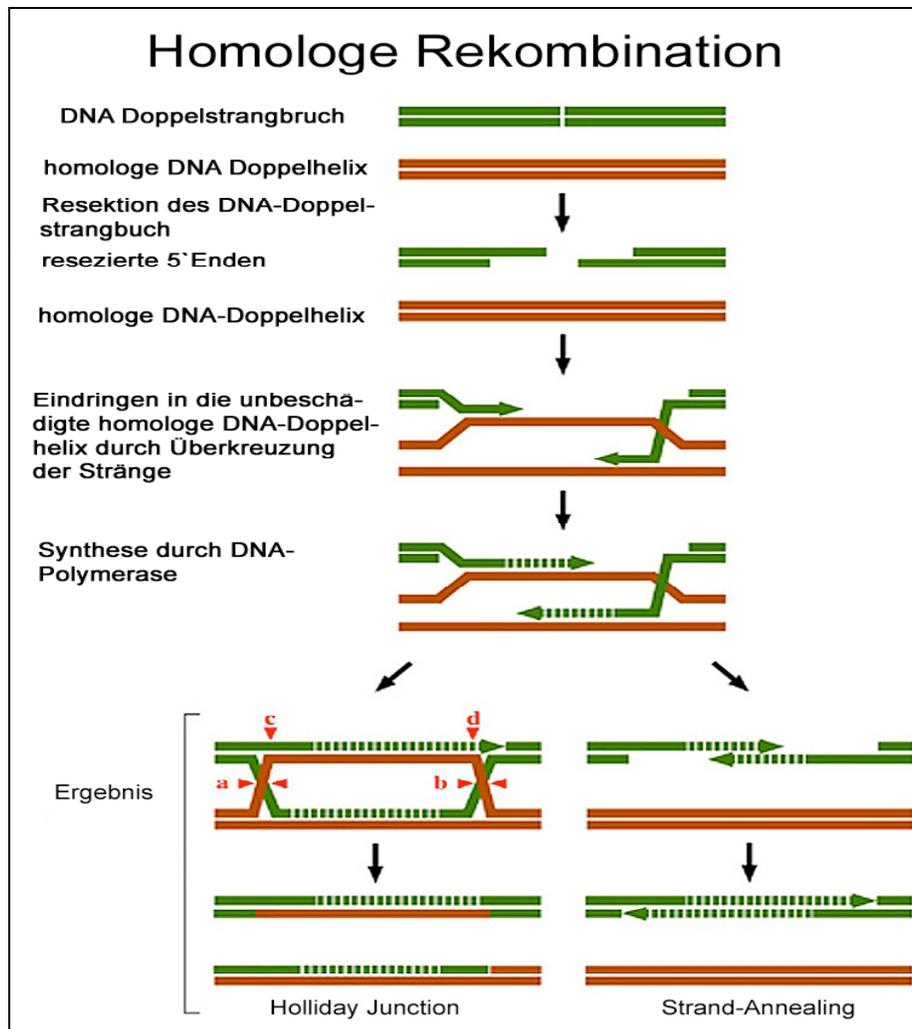


Abbildung 9: Schematische Darstellung der homologen Rekombination. Über einen Komplex werden DSB's erkannt und die Enden aufbearbeitet. Über einen homologen Strang wird eine Kopie angefertigt und neu eingebaut. In diesen Reparatursweg sind RAD51 und mit ihm verwandte Proteine wie RAD51B-d, XRCC2 und XRCC3 involviert.

„Non-Homologous-End-Joining“ (NHEJ)

Zur „NHEJ“ wird im Gegensatz zur homologen Rekombination kein intakter und unbeschädigter Partnerstrang benötigt. Hier werden einfach die zwei abgebrochenen Enden direkt wieder miteinander verbunden. „NHEJ“ ist schneller als homologe Rekombination, wahrscheinlich aber fehlerbehafteter ^{Karran 2000 Khanna and Jackson 2001}.

„Mismatch-Repair-Gene“ sind in beiden Reparaturmechanismen, homologe Rekombination sowie „NHEJ“, involviert. Mutationen dieser Gene sind eine häufige Ursache für das bereits erwähnte HNPCC-Syndrom. Im Rahmen dieses Syndroms sind Mutationen in „Mismatch-Repair-Genen“ für circa 1% aller hereditären Ovarialkarzinome verantwortlich (Abbildung 10)

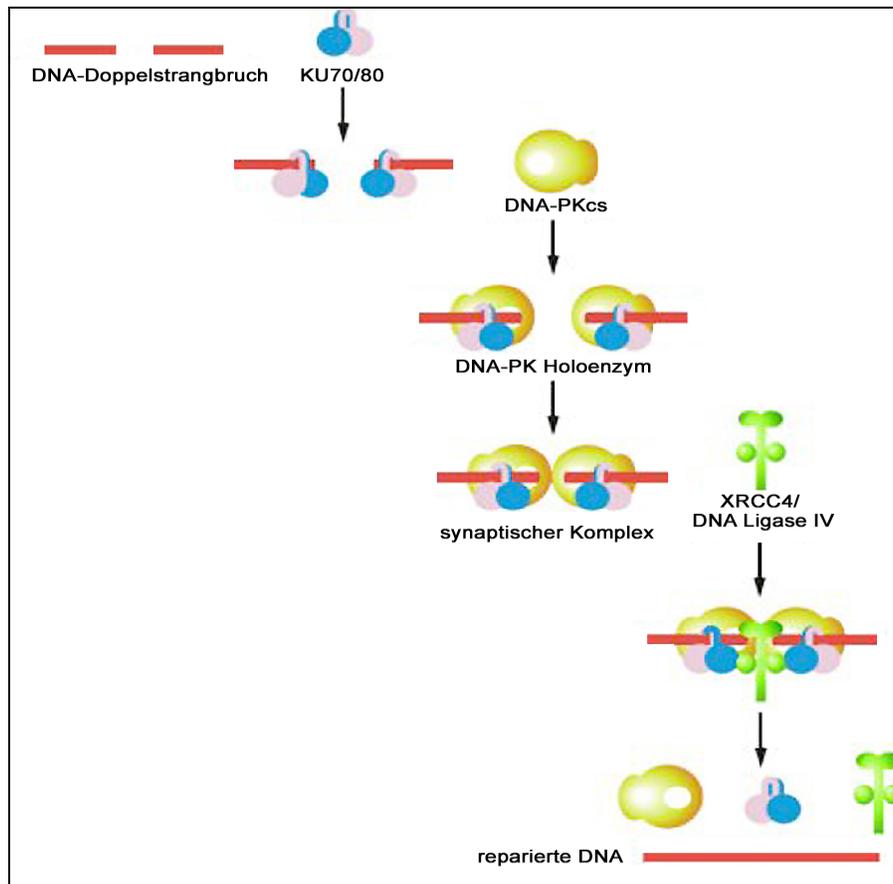


Abbildung 10: Schematische Darstellung des „Non-Homologous End-Joining“. Während der Reparationsdurchführung bindet KU70/80 an einen Doppelstrangbruch gefolgt von einer Rekrutierung und Aktivierung der DNA-pk. XRCC4 und Ligase 4 werden direkt rekrutiert und durch DNA-PK phosphoryliert. Die DNA-Enden werden ligiert.

Nukleotidexzisionsreparatur

Während der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) werden umfangreiche Mängel wie Pyrimidin Dimere, andere Photo-Produkte, große chemische Nebenprodukte oder Querverbindungen repariert. Der NER-Pathway beinhaltet vier Stufen der Reparatur (*Abbildung 11*).

- (a) Erkennung eines Fehlers über einen Komplex, der XPC beinhaltet.
- (b) Entwindung der DNA durch den TFIIH Komplex, der XPD beinhaltet.
- (c) Entfernung des defekten Einzelstrangfragments durch Moleküle eines Komplexes, die ERCC1 und XPF beinhalten.
- (d) Erneute Synthese durch eine DNA-Polymerase.

Als ein Teil des TFIIH-Komplexes besitzt XPD sowohl Aktivität für Einzelstrang DNA-abhängige ATPase als auch 5' → 3' DNA-Helikase. Weiterhin scheint der Komplex an der Entwindung der DNA während der NER und der Transkription beteiligt. Er ist in die Apoptose und die Regulation des Zellzyklus involviert. Da XPD für viele verschiedene zelluläre Aufgaben sehr wichtig ist und Mutationen in XPD in genetischen Defekten mündet, wurde vermutet XPD fungiere als genetischer Suszeptibilitätsfaktor.

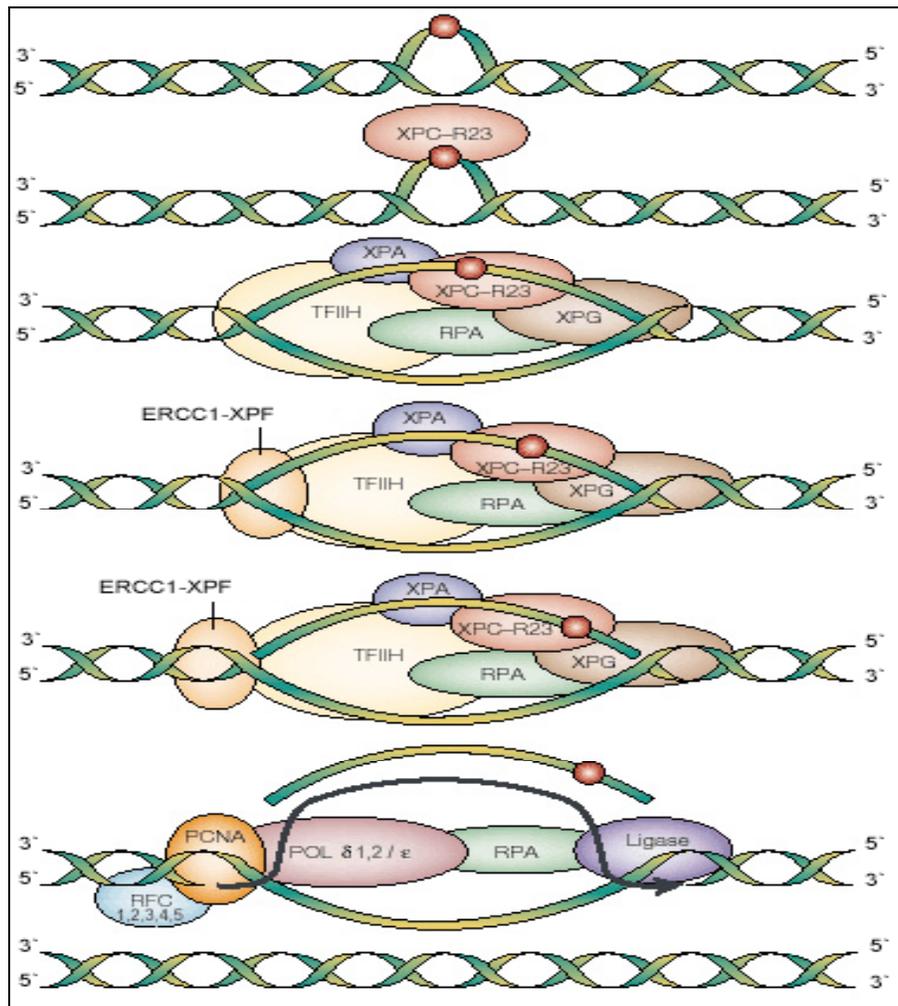


Abbildung 11: NER repariert größere Defekte oder Adducts. Dieser Reparaturmechanismus beinhaltet Erkennung von Defekten, Formation des TFIIH-Komplexes, Entwindung der DNA, Inzision und Entfernung von ca. 25-30 Nucleotiden. Durch erneute Synthese wird der DNA-Strang wieder komplettiert.

1.4 Strategien zur Identifizierung beteiligter Gene

5-10% aller Ovarialkarzinome weisen einen hereditären Hintergrund auf. Nur ein Teil hiervon lässt sich durch Keimbahnmutationen in BRCA1/2 oder in „Mismatch-Repair-Genen“ erklären. 40% (BRCA1) bzw. 11% (BRCA2) aller Mutationsträgerinnen erkranken im Laufe ihres Lebens am Ovarialkarzinom. Vererbte Mutationen in anderen Tumorsuszeptibilitätsgenen wie p53 werden für weniger als 1% verantwortlich gemacht. Endokrine Einflüsse (*siehe Kapitel 1.2*) haben keinen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsrisiko, welches mit einer positiven Familienanamnese assoziiert ist. Inwieweit Umweltfaktoren mit genetischer Prädisposition interagieren ist unklar. Aus diesen Gründen legt die verbleibende Anzahl ungeklärter familiärer Erkrankungscluster das Vorhandensein von weiteren genetischen Faktoren nahe. Möglich ist das Zusammenspiel von vielen verschiedenen, zum Großteil noch unbekanntem genetischen Faktoren (z.B. autosomal rezessiv vererbte und/oder verschiedene niedrig penetrante Genvarianten). Um derartige Faktoren aufzudecken, kann man folgende Studientypen verwenden:

Kopplungsstudien

Kopplung bezeichnet die Kombination von verschiedenen Genloci. Gemeint ist, dass Personen, die ein bestimmtes Allel an einem Locus aufweisen, ein zweites anderes Allel an einer anderen Lokalisation ebenfalls aufweisen, das mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit vorkommt. Die Wahrscheinlichkeit beide Allele gleichzeitig bei einer Person aufzufinden muss größer sein als durch Zufall erklärbar. So kann in Kopplungsstudien z. B. getestet werden, ob ein so genannter Marker mit einer Krankheit innerhalb einer bestimmten Personengruppe oder Familie verknüpft ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, ob Marker und Krankheit gemeinsam vererbt werden. Solch eine Verknüpfung wird als Kopplungsungleichgewicht (Linkage-disequilibrium) bezeichnet. Das Ausmaß eines solchen Ungleichgewichts hängt von der Entfernung des Markers zu dem Krankheitsloкус ab. Weiterhin untersteht dieses Ungleichgewicht noch dem Einfluss unbekannter Faktoren innerhalb einzelner Populationen ^{Brown 1999; Strachnan and Read 1996}.

Assoziationsstudie

Bei Assoziationsstudien werden im Gegensatz zu den Kopplungsstudien Beziehungen zwischen einzelnen Allelen und nicht zwischen den einzelnen Loci der Allele hergestellt. Eine Assoziation von Krankheit mit Markern findet man durch den Vergleich der Häufigkeiten eines Markerallels in einer Gruppe von Patienten mit der Häufigkeiten des gleichen Markers in einer Reihe von gesunden Kontrollpersonen (Fall-Kontroll-Studie). Fall-Kontroll-Studien werden häufig mit zu kleinen Studiengruppen durchgeführt. Die Kontrollgruppen sind oft nicht äquivalent zur Fallgruppe ausgewählt ^{Goode, et al. 2002}.

Chipanalysen

Ein DNA-Chip trägt eine große Anzahl von DNA-Sonden auf einem Silicium- oder Glasträger. Jede einzelne Sonde besitzt eine andere Sequenz und sitzt an einer genau definierten Position an der Oberfläche des Chips. Bei diesen Sonden kann es sich um synthetische Oligonukleotide oder andere kurze DNA-Moleküle wie z. B. cDNA handeln. Erst wird die Ziel-DNA mit den gebundenen Oligonukleotiden hybridisiert. Anschließend hängt eine DNA-Polymerase ein fluoreszenzmarkiertes Ketten-Abbruch-Nukleotid an. Durch einen Laser werden die fluoreszierenden Signale detektiert. Diejenigen Bereiche an denen die DNA-Kette nicht mehr verlängert wurde, können erkannt und Fehlpaarungen zwischen der Zielsequenz und der Standardsequenz markiert werden. DNA-Chips ermöglichen eine parallele Durchführung sehr vieler Hybridisierungen. Chipanalysen finden häufig Anwendung in groß angelegten Screening-Untersuchungen. Die Verarbeitung und Interpretation der Vielzahl dieser Daten stellt eine Herausforderung an die Bioinformatik dar ^{Brown 1999}.

Mikrosatelliten

Mikrosatelliten sind DNA-Sequenzwiederholungen (z.B. CA-Repeat: $[CA]_n$) von einfachen Basenmotiven, mit einer Länge von meist weniger als 60 Basenpaaren (bp). Sie werden auch als Polymorphismen kurzer, repetitiver Tandemsequenzen, „short tandem repeat polymorphisms“ („STRP“), bezeichnet. Bei den repetitiven Einheiten mit nur einem Nukleotid findet man häufig eine Folge von A oder T. Meist sind die zugrunde liegenden repetitiven Einheiten aus zwei Nukleotiden bestehend. Sehr oft handelt es sich dabei um CA-Repeats, die bis zu 100-mal wiederholt werden können. Man findet ca. 50.000-100.000 dieser repetitiven Sequenzen im gesamten

menschlichen Genom verstreut, mit einem mittleren Abstand von etwa 10 kb. Repetitive Tri- oder Tetranukleotide sind seltener. Über die biologische Funktion dieser repetitiven DNA-Sequenzen ist nichts bekannt. Man vermutet, dass sie vielleicht an der Genregulation beteiligt sind. Oft stellen sich Mikrosatelliten mit einem hochgradigen Polymorphismus dar. Meist sind sie in nicht-codierenden Regionen oder in der DNA zwischen den einzelnen Genen lokalisiert, jedoch wurden auch Fälle in codierenden Regionen bereits beschrieben. Allele lassen sich aufgrund ihrer Anzahl der Sequenzwiederholungen eindeutig voneinander unterscheiden. Inzwischen sind diese Mikrosatellitenmarker bestimmten Lokalisationen zugeordnet und in genetischen Karten gelistet. Es existieren eine Reihe verschiedener genetischer Karten des menschlichen Genoms.

2. Zielsetzung

2.1 Zielsetzung Ovarialkarzinome

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit „Modifier-Genen“ BRCA1/2-assoziiertes Ovarialkarzinome. BRCA1 und BRCA2 kodieren für Proteine, die in der DNA-Reparatur wichtige Funktionen übernehmen. Nicht alle BRCA1/2-Mutationsträgerinnen erkranken am Ovarialkarzinom. Im statistischen Mittel weisen 5-10% der Ovarialkarzinome eine positive Familienanamnese auf. Ca. 90% der hereditären Ovarialkarzinome lassen sich auf Keimbahnmutationen in den Genen BRCA1 oder BRCA2 zurückführen. Ursache hierfür könnten weitere Genveränderungen in anderen DNA-Reparaturgenen sein, die das individuelle Erkrankungsrisiko variieren bzw. beeinflussen ^{Goode, et al. 2002 Forsti, et al. 2004}. Eine Möglichkeit derartige Genveränderungen zu identifizieren, stellen Assoziationsstudien dar.

Fragestellung:

Gibt es weitere genetisch determinierte Faktoren, die zur Entstehung des Ovarialkarzinoms bei BRCA1/2-Mutationsträgerinnen beitragen?

Im Rahmen eines Assoziationsstudiendesign sollen 56 Ovarialkarzinomgewebe aus der französisch-kanadischen Bevölkerung zuerst auf BRCA1/2-Mutationen hin untersucht werden. Dann soll das gesamte Gewebekollektiv auf bekannte Genvarianten in zwei DNA-Reparaturgenen (XRCC3, XPD) überprüft werden. Um eine Assoziation herausarbeiten zu können, soll dann geschaut werden, ob die Genvarianten in XPD und/oder XRCC3 eine andere Häufigkeit bei den BRCA-mutierten Geweben zeigen als bei den nicht-mutierten Geweben.

2.2 Zielsetzung Gt-198

Das BRCA1-Gen liegt auf dem Chromosom 17 direkt neben einem Gen, welches GT-198 heißt. Während der Klonierung von BRCA1 wurde das Areal um Gt-198 kurzfristig als ein Gen angesehen, welches mit hereditärem Mamma- und Ovarialkarzinom in Verbindung steht. In dieser Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass Genveränderungen auf GT-198 bei BRCA1/2-Mutationsträgerinnen ebenfalls mit einem erhöhten Krankheitsrisiko für das Mamma- und Ovarialkarzinom einhergehen. Somit würde GT-198 als Modifizergen für das Erkrankungsrisiko bei BRCA1/2-Mutationsträgerinnen detektiert werden können.

Fragestellung:

Gibt es bei Hochrisiko-Familien Genveränderungen auf GT-198? Wenn ja, kommen diese Varianten bei erkrankten BRCA1/2-Mutationsträgerinnen häufiger oder weniger häufig vor als bei nicht erkrankten BRCA1/2-Mutationsträgerinnen?

100 cDNAs aus Lymphozyten-Zelllinien von Hochrisiko-Familien sollen auf Sequenzvarianten in GT-198 untersucht werden. Wenn Sequenzvarianten gefunden werden, sollen die Häufigkeiten dieser Varianten bei den erkrankten Mutationsträgerinnen mit denen von den nicht erkrankten Mutationsträgerinnen im Rahmen einer Assoziationsstudie verglichen werden.

3. Material und Methoden

3.1 BRCA1/2

3.1.2 Proben für BRCA1/2-Mutationsanalyse in Ovarialkarzinomen

Zur Verfügung stand Tumormaterial von 56 Ovarialkarzinompatientinnen, die im Zeitraum von 1994 bis April 2002 in der Klinik Hotel-Dieux de Quebec behandelt wurden. Das Ovarialkarzinomgewebe wurde direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Normal-DNA wurde im Nachhinein aus Blutlymphozyten nur von den Patientinnen gewonnen, bei denen im Tumorgewebe eine Mutation in BRCA1 oder BRCA2 gefunden worden war. Von den jeweiligen Patientinnen wurde für die Blutentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken eine schriftliche Einwilligung erhalten.

3.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Ovarialtumorgewebe

Material:

- „DNeasy Mini Columns“ (Mikrozentrifugationssäulen Qiagen®)
- ATL-Puffer (Qiagen®)
- Proteinkinase K (Qiagen®)
- AL-Puffer (Qiagen®)
- AW1-Puffer (Qiagen®)
- AW2-Puffer (Qiagen®)
- AE-Puffer (Qiagen®)
- Ethanol (100%)

Durchführung:

Nach der Entnahme aus der -80°C Truhe wurde das Tumorgewebe zu Raumtemperatur equilibriert, dann mit einem Skalpell zerkleinert und circa 25 mg der

Anschließend wurde dies mit 20µl Proteinkinase K versetzt, gevortext und bei 55°C unter Schütteln solange inkubiert, bis die Gewebestückchen komplett lysiert waren. Nach dem Vortexen wurde dem Gemisch 200µl AL-Puffer zugefügt, nochmals gevortext und für 10 min bei 70°C inkubiert. Zu den Proben wurde 200µl Ethanol gegeben. Sie wurden noch einmal gevortext, danach wurde der gesamte Inhalt der Eppendorfcups auf DNeasy Mini Columns (Mikrozentrifugationssäulen) in ein 2ml Cup pipettiert und zentrifugiert (1 min, 8000 rpm). Anschließend wurden die DNeasy Mini Columns den Cups entnommen, auf neue 2ml Cups gesetzt und 500µl AW1-Puffer zugegeben. Nach Zentrifugation (1 min, 8000 rpm) wurden die Säulen wieder auf neue Cups gesetzt, diesmal mit 500µl AW2-Puffer versetzt und nochmals zentrifugiert (3 min, 13000 rpm). Die DNA wurde aus den Säulen durch zweimaliges Waschen mit 100µl AE-Puffer in ein frisches 1,5ml Eppendorfcup eluiert und bei -20°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (*Kapitel 3.1.3*).

3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Blutlymphozyten

Material:

- „QIAamp Maxi Säulen“ (Qiagen®)
- Protease (Qiagen®)
- AI-Puffer (Qiagen®)
- AW1 (Qiagen®)
- AW2-Puffer (Qiagen®)
- AE-Puffer (Qiagen®)
- Patientenblut (mit 0,1mM EDTA verdünnt)
- Ethanol (100%)

Durchführung:

Zur Isolierung von DNA aus Lymphozyten wurde zunächst 10ml Patientenblut (mit 0,1mM EDTA) mit 500µl Protease versetzt und gemischt. Nachdem 12ml AI-Puffer zugegeben worden war, wurde ebenfalls wieder gut gemischt und bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10ml Ethanol (100%) zugegeben, gemischt

verteilt. Nach der Zentrifugation (3 min, 3000 rpm) wurde die Flüssigkeit, die sich in den Tubes befand, verworfen. Die zweite Hälfte des Gemisches wurde auf die Säulen gegeben und damit genauso verfahren wie vorher.

Nun wurden die Zentrifugationssäulen zweimal mit 5ml Puffer, AW1-Puffer gefolgt von AW2-Puffer, beschickt und durch Zentrifugation (AW1: 1 min, 5000 rpm; AW2: 15 min, 5000 rpm) gewaschen. Nach Equilibrierung zu Raumtemperatur (RT) und Inkubation für 5 Minuten bei RT, wurde die in der Säule zurückgehaltene DNA mit 1ml AE-Puffer, durch Zentrifugation (5 min, 4500 rpm) in ein frisches 50ml Zentrifugentube eluiert.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (*Kapitel 3.1.3*).

3.1.5 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die aromatischen Ringsysteme der Nukleinsäuren der DNA haben die Eigenschaft, im kurzwelligen Bereich Licht zu absorbieren. Bei einer Wellenlänge von 260nm wurde in einer Quarzküvette ein Aliquot der DNA vermessen und die ermittelten Absorptionswerte folgendermaßen ausgewertet:

Für doppelsträngige DNA gilt:

$$\text{Konzentration} = \frac{\text{Gemessene OD 260nm} \times 50 \mu\text{g}}{\text{Probenvolumen}}$$

1 OD 260nm entspricht 50 μg DNA

OD=optische Dichte

3.1.6 Mutationsdetektion

BRCA1 ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert. Es besteht aus 24 Exons, davon kodieren 22 Exons für ein nukleäres Phosphoprotein. Dieses Protein besteht aus 1863 Aminosäuren und ist 207kDalton schwer. 10 Mutationen in BRCA1 wurden zur Mutationsdetektion ausgewählt (*Tabelle 1*). Diese Mutationen waren bereits in anderen Projekten in der französisch-kanadischen Bevölkerung als am häufigsten

Exon	5'-Primer	3'-Primer	Länge in bp	Mutation (Codon)	Auswirkung
11	GCTGCTAT TTAGTGTT ATCCAAG G	GAGAGGC ATCCAGAA AAGTATCA GG	372	962G → A (W321X)	Tryptophan → Stop- codon 321
11	CAACTTAA GCCATGT AACTG	CTTGACCA TTCTGCTC CGT	218	1504delTTAAA (502)	frameshift → Stop- codon 503
11	CTGAGGA GGAAGTC TTCTACCA GG	CTTCCCTA GAGTGCT AACTTCCA G	549	1961insA (654)	frameshift → Stop- codon 672
11	CTGGTACT GATTATGG CACTCAG G	TTCCTCAA AGTTTTCC TCTAGCA G	698	2477C → A (826)	Threonin → Lysin 826
11	CTGGTACT GATTATGG CACTCAG G	TTCCTCAA AGTTTTCC TCTAGCA G	698	2834delGTA+ insC (945)	frameshift → Stop- codon 950
11	GATAACTT AGAACAG CCTATGG G	TTCCTCAC TAAGGTG ATGTTCTT G	474	3586insA (1196)	Frames- hift → Stop- codon 1218
11	GATAACTT AGAACAG CCTATGG G	TTCCTCAC TAAGGTG ATGTTCTT G	474	3649insA (1218)	frameshift → Stop- codon 1219
13	GCTAGAA CTTGTAGT TCCATACT AGG	TGACAACA TGAATGAC TGCCTTG G	503	4328C → T (1443)	Arginin → Stop 1443
18	TCCTCTGG TCTTAACT TCATATCA G	GACCCATT TTCCCAGC ARCACCA G	501	5102delTG (1701)	frameshift → Stop- codon 1714
9	CCGATGC TTGTCAGA CCTCTGA G	TGGGAAG AGGGAGA AATTCAG	485	591C → T (197)	keine Ver- änderung der Aminosäure

Tabelle 1: Darstellung der Primer und deren zugehörigen Mutationen in BRCA1 in der internationalen Schreibweise gelistet. Die Auswirkung der jeweiligen Mutation ist ebenfalls gelistet. Referenzsequenz *NM_007295* der Gendatenbank www.ncbi.nlm.nih.gov

BRCA2 ist auf Chromosom 13q12-q13, auf einem Intervall von 600kb lokalisiert (Wooster, et al. 1995; Wooster, et al. 1994). BRCA2 besteht aus 27 Exons und kodiert ein Protein das aus 3418 Aminosäuren besteht (Tavtigian, et al. 1996). Das Protein hat ein Gewicht von 384 kDalton (<http://www.expasy.ch>). BRCA1 und 2 sind sich in einigen Eigenschaften sehr ähnlich. So haben beide ein sehr langes zentrales Exon 11 und besonders AT-

Es wurden zur Mutationsdetektion in BRCA2 8 Mutationen, die ebenfalls in vorangegangenen Projekten ein häufiges Auftreten in der französisch-kanadischen Bevölkerung zeigten, ausgewählt. (Tabelle 2)

Exon	5'-Primer	3'-Primer	Länge in bp	Mutation/ Position	Auswirkung
3	CCATCTTGT AACTTTTGT GAACTCTT G	TCCTAGTTT GTAGTTCTC CCCAG	503	125A → G (Y42C) (42)	Tyrosin → Glycin 42
11	TTCCCATG GAAAAGAA TCAAGATG	TCTGAAGC TACCTCCAA AACTGTG	593	2588insA (2816insA) (863)	frameshift → Stopcodon 880
11	TTCCCATG GAAAAGAA TCAAGATG	TCTGAAGC TACCTCCA AACTGTG	593	2806delAAAC (3034del4) (936)	frameshift → Stopcodon 958
11	TACGAGGC ATTGGATG ATTCAGAG	GTTGAAATT GAGAGAGA TATGGAG	799	5858G → T (E1953X) (1953)	Glutamin- säure → Stop- codon 1953
11	TACGAGGC ATTGGATG ATTCAGAG	GTTGAAATT GAGAGAGA TATGGAG	799	6275delTT (6503delTT) (2092)	frameshift → Stopcodon 2098
20	AGAGAAGG GGTTTCATC ATGTTGG	TCTGTCCCT TGTTGCTAT TCTTTG	506	8537delAG (8765delAG) (2846)	frameshift → Stop 2867
21	CACACCAC TGCACTCC CAGATTGG	CCCACTC GTCTGGCA CATCACTG	481	8676delA (8904delA) (2892)	frameshift → Stopcodon 2908
27	CTTGAGTA GACTGCCT TTACC	CGATACAC AAACGCTG AGGTA	586	10253delTCTA (10481del4) (3418)	frameshift → Stopcodon 3425

Tabelle 2: Darstellung der Primer und deren zugehörigen Mutationen in BRCA2 in der internationalen Schreibweise und in der in dem Labor: Centre de Recherche, Pavillon CHUL, Université Laval Quebec üblichen Schreibweise. In Klammern ist die Mutation gelistet. Die Auswirkung der jeweiligen Mutation ist ebenfalls gelistet. Referenznummer: *NM_000059* der Gendatenbank www.ncbi.nlm.nih.gov

3.1.7 PCR-Amplifikation für die Mutationsanalyse in BRCA1 und BRCA2

Material:

- „Perkin Elmer Applied Biosystems Gene Amp® PCR system 9700” (Applied Biosystems®)
- „PCR-96-HS-C Mikroplatten” (Oxygen Scientific®)
- 10X PCR Reaktionspuffer (200mM Tris-HCl, pH=8.4, 500mM KCl; Invitrogen™ life technologies)
- 1mM dNTP Mix; je 0,25mM (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
- „Platinum® Taq DNA Polymerase” (Invitrogen™ life technologies)
- Magnesium-Chlorid (50mM) (Invitrogen™ life technologies)

Durchführung:

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR Reaktionen wurden in 50µl Ansätzen pipettiert. Sie enthielten 25ng DNA, 10X PCR Reaktionspuffer, jeweils 1mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 5'- und 3'- Primer sowie Taq Platinum-Polymerase. Die PCR-Ansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt:

PCR-Ansatz:	5µl	10X PCR-Puffer
	30µl	H ₂ O
	5µl	dNTP mix (1mM)
	1,5µl	Magnesium Chlorid
	0,5µl	Taq-Polymerase
	2,5µl	Primer Forward
	2,5µl	DNA
	3µl	Primer Reverse

Die Taq Platinum-Polymerase verfügt über eine „proof-reading“- bzw. 3`-/5`- Exonuklease-Aktivität. Dies ist ein Reparaturmechanismus, der die Polymerase befähigt, an die Stelle des DNA-Stranges zurückzuwandern, an der ein falsches Nukleotid eingebaut worden ist. An einer solchen Stelle kann keine Hybridisierung

erkennt diese Stelle, kann den Strang zerschneiden und das falsche Nukleotid durch das Richtige ersetzen. Die Taq Platinium-Polymerase ist bei Raumtemperatur nicht aktiv und kann deshalb in dem PCR-Ansatz zusammen mit den Primern vermischt werden. Primer liegen als Einzelstränge vor. Wenn die Polymerase aktiv wäre, würde sie die Primer zerschneiden. Die Sequenzen der einzelnen Primer sind den *Tabelle 1* und *Tabelle 2* zu entnehmen. Die PCR Produkte wurden in „Cyclern“ mit beheizbarem Deckel („Perkin Elmer Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700“) in „PCR-96-HS-C Mikroplatten“ amplifiziert. Dadurch wird eine Übersichtung des PCR-Ansatzes mit Mineralöl, das zur Zerstörung der Säulenmatrix führt, vermieden. Am Schluss jeder PCR Reaktion wurde eine „final extension“ (7 min bei 72°C) durchgeführt, um einen vollständigen Abschluss aller Reaktionen zu ermöglichen. Die PCR Cycler-Bedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Nach 3 Minuten Aktivierung der Taq Platinium-Polymerase und Denaturierung der DNA bei 94°C folgten 35 Zyklen nach folgendem Schema:

40 sek.	bei	94°C
40 sek.	bei	60°C
60 sek.	bei	72°C

Die PCR-Produkte wurden nach der „final extension“ (7 min bei 72°C) entweder bei -20°C gelagert oder die nächsten Schritte der PCR-Reaktion angeschlossen (entweder Aufreinigung oder die Auftrennung mit Agarosegelen)

Wie unter *Kapitel 1.3.3* beschrieben wurde auch teilweise eine elektrophoretische Auftrennung der PCR angeschlossen.

3.1.8 Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen

Material:

- 1kb Leiter (Invitrogen™ life technologies®)
- Agarose (Multicell® Agarose)
- 1X TBP-Puffer (10,8g Tris-Base; 5,5g Borsäure; 4ml 0,5M EDTA ph=8, mit hochsterilisiertem Wasser auf 200ml auffüllen)

Durchführung:

Um die Größe der PCR-Produkte, Effektivität der Amplifizierung und somit indirekt die Qualität der DNA zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte auf 1%-ige Agarosegele aufgetragen. Dies wurde nur mit der jeweils ersten PCR-Reaktion nach der DNA-Extraktion durchgeführt, so dass jede DNA einmal auf einem Gel überprüft worden ist (*Abbildung 12*). Als Längenstandard wurde eine 1kb Leiter von Invitrogen™ life technologies® aufgetragen, mit deren Hilfe die Fragmentlänge der aufgetrennten PCR-Produkte ermittelt werden konnte. Es wurden 1,0g Agarose in 100ml 1X TBP-Puffer geschmolzen. 4µl einer Ethidiumbromid-Lösung (10µg/ml) wurden dem flüssigen Gel untergemischt. Nach Abkühlen der Agarose wurde sie in einen Schlitten mit einem Kamm für die Taschen gegossen. Nachdem das Gel ausgekühlt und erhärtet war, wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt und dies mit 1X TBP-Puffer aufgefüllt, bis das Gel und dessen Taschen bedeckt waren. 10µl PCR-Produkt wurden mit 2µl Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 Volt über 25 Minuten. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge=312nm) kann die Fluoreszenz des in die DNA-Stränge interkalierten Ethidiumbromid-Agens angeregt und die DNA-Fragmente nachgewiesen werden.

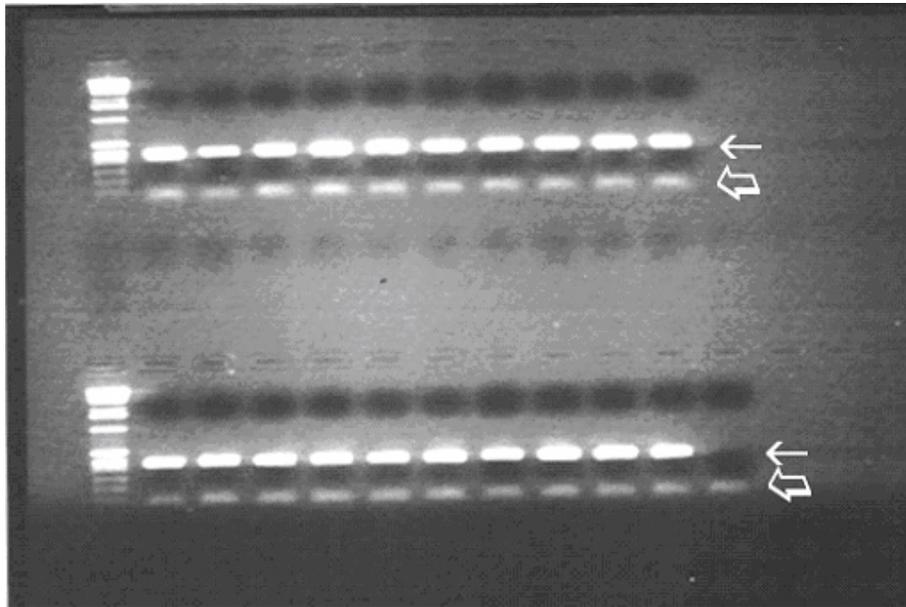


Abbildung 12: Darstellung eines Agarosegels mit 20 verschiedenen Patientenproben. Die ersten stark dargestellten Banden werden durch die PCR-Produkte, die zur Mutationsdetektion W321X in BRCA1 amplifiziert wurden, hervorgerufen. Sie weisen eine Länge von ca. 370 bp auf (schmaler Pfeil). Dies wird mit dem Vergleich mit der 1kb Leiter bestätigt. Die zweite schwächere und wesentlich kürzere Bande (hohler Pfeil) wird durch die Primer hervorgerufen.

3.1.9 Aufreinigung (Purifikation) des PCR-Produkts

Material:

- Filter Platte (Unifilter® 350 Whatman®, Whatman Inc.)
- Unterplatte des Unifiltersets (Mikrotiter Plate 96 Well/V Bottom von Ulident)
- PB-Puffer (Qiagen®)
- Reinigungspuffer (20mM TRIS; ph=7.5; 80% ETOH)

Durchführung:

Im Anschluss an die Amplifikation wurden dem PCR-Produkt zur Aufreinigung 150µl PB-Puffer zugegeben, vermischt und auf eine Filterplatte übertragen. Falls die PCR-Produkte vorher auf einem Agarosegel überprüft worden sind, (*Kapitel 3.1.4.2*) wurden an dieser Stelle nur 120µl PB-Puffer eingesetzt, da nur noch 40µl des ursprünglichen Volumens vorhanden waren. Es wurde ein Vakuum angeschlossen und das PCR-Produkt mit 200µl Reinigungspuffer gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt und danach die Filterplatte zur Entfernung des

60µl hochgereinigtem Wasser aus dem Filter in der Unterplatte des Unifiltersets durch nochmalige Zentrifugation (10 min bei 3250 rpm) ausgewaschen und bei – 20 °C gelagert.

3.1.10 Konzentrationsbestimmung des PCR-Produkts

Material:

- „FL 600 Microplate Fluorescence Reader“ (BIO-TEK®)
- „Picogreen® ds DNA quantitation reagent“ (Molecular Probes, Inc.)
- Lambda DNA standard (Component C) (1ml 100µg/ml in TE)
- 20X TE-Puffer (25ml 200 mM Tris-HCl, , 20mM EDTA, pH=7,5 Nukleinsäurefrei, DNase-frei, zu 1X mit hochsterilisiertem Wasser verdünnen)

Durchführung:

Zur Konzentrationsbestimmung des PCR-Produktes wurde „Picogreen® ds DNA quantitation reagent“ verwendet. Dies ist ein ultrasensitiver Fluoreszenznukleinsäuredetektor für Doppelstrang-DNA. Zu Beginn wurde erst eine Verdünnungsreihe eines DNA-Standards hergestellt. Dazu wurde von Lambda-DNA, einer von der Firma bereits mitgelieferten DNA mit bekannter Konzentration (100µg/ml), 1,4ml einer Verdünnung mit einer Konzentration von 4ng/µl in 1X TE hergestellt. Danach wurde nach dem folgendem Pipettierschema weiter verfahren (*Tabelle 3*).

TE 1X	500µl	487,5µl	475µl	450µl	400µl	350µl	300µl	250µl
+Verdünnung der Lambda- DNA	0µl	12,5µl	25µl	50µl	100µl	150µl	200µl	250µl
=Endkonzentration der DNA in ng/25µl	0	2.5	5	10	20	30	40	50

Tabelle 3: Pipettierschema zur Herstellung der Standardkurve

25µl dieses Standards wurden mit ansteigender Konzentration in die letzte Reihe spezieller Platten pipettiert.

2,5µl des purifizierten PCR-Produktes wurden mit 22,5µl 1X TE und damit die restliche Platte gefüllt, somit befanden sich in jedem „Well“ 25µl. Diesen 25µl wurden weitere 25µl eines Gemischs, bestehend aus Picogreen in TE 1X (1:150), zugegeben. Die Konzentration wurde in einem „FL 600 Microplate Fluorescence Reader“ im Vergleich zu der Standardkurve bestimmt (*Abbildung 13*).

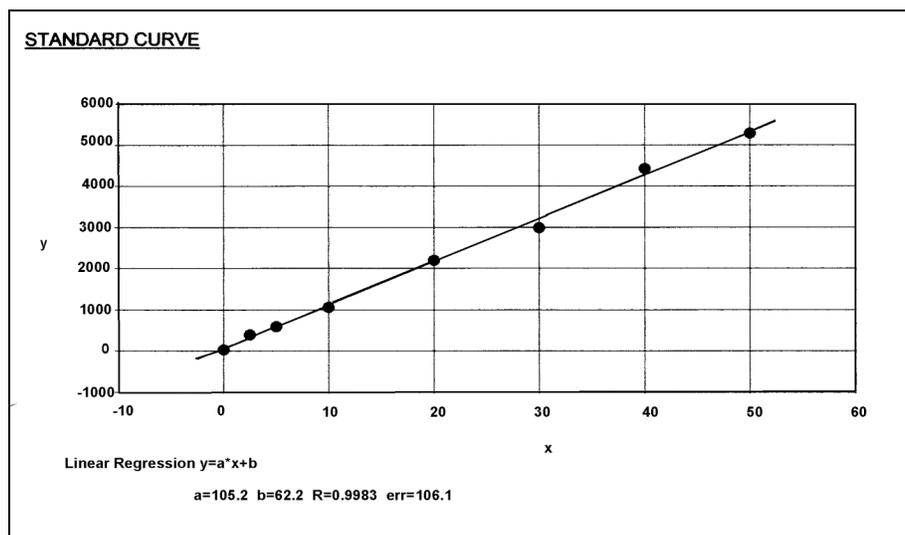


Abbildung 13: Darstellung einer Standardkurve, die mit Lambda Standard DNA hergestellt wurde. Diese Kurve dient als Vergleichsgröße zur Bestimmung der Konzentration der PCR-Produkte. Die gemessene Fluoreszenzemission der PCR-Produkte wird mit der Fluoreszenzemission der Standard DNA von der die Konzentration bekannt ist verglichen

Zur Ermittlung des Verdünnungsgradienten wurde wie folgt verfahren:

$$\text{Verdünnungsgradient} = \frac{\text{Gemessene Konzentration} \times \text{Endkonzentration}}{2.5}$$

Die PCR-Produkte wurden auf 1,2ng/μl verdünnt, bei -20°C gelagert oder direkt im Anschluss weiterverarbeitet.

3.1.11 Allgemeines zur Sequenzierung mit einem „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“

Die Sequenzierung wurde mit einem „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems®) durchgeführt. Das Gerät ist ein Kapillarsequenzierer (*Abbildung 14* und *Abbildung 15*).

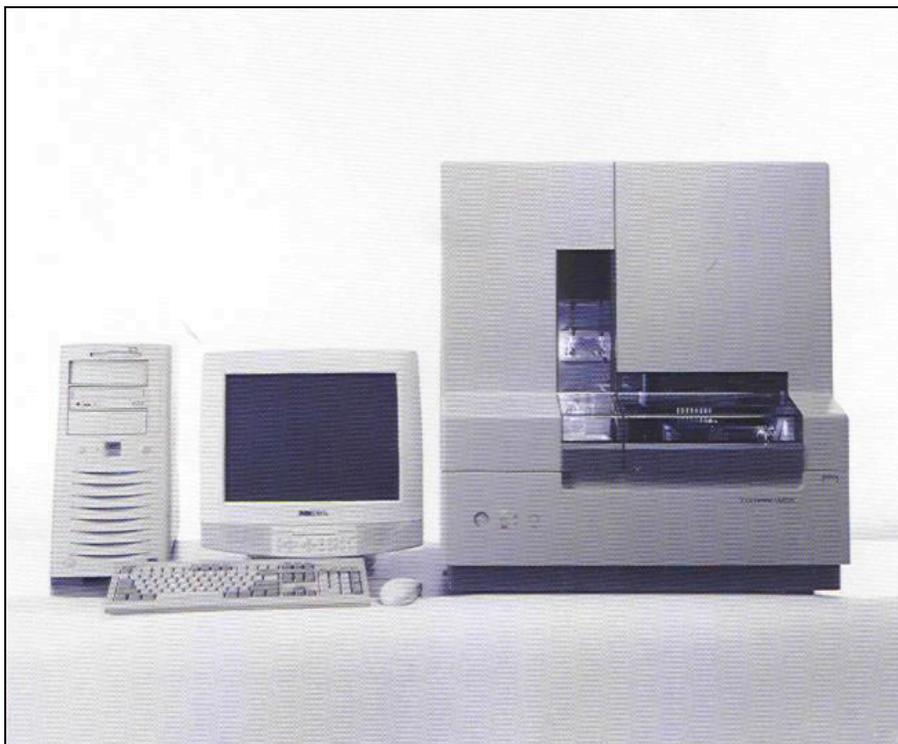


Abbildung 14: „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“

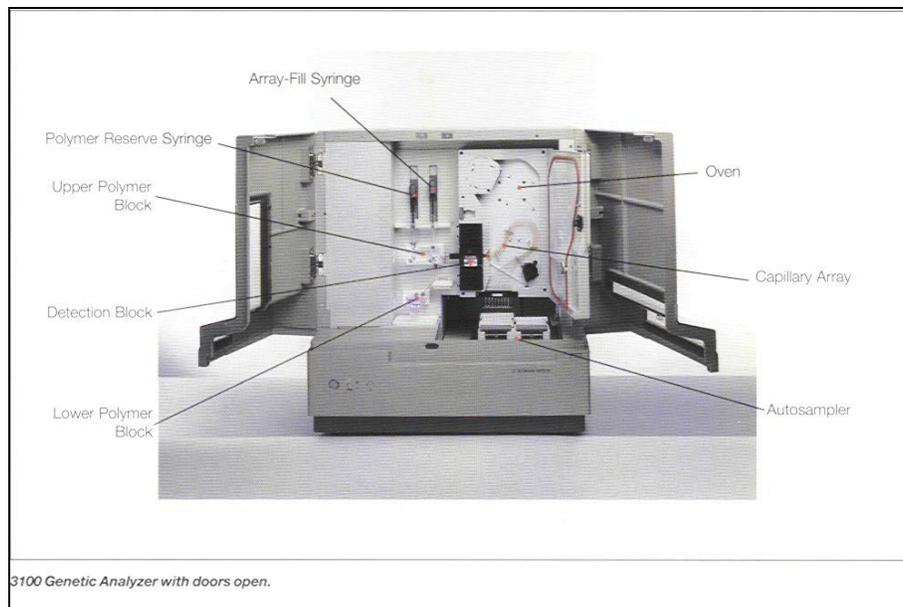


Abbildung 15: „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“ mit offenen Türen

Ein flüssiges Polymer („POP-6™ Polymer ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“) wird in 16 Kapillare gefüllt. Dieses Polymer stellt das Medium für die Elektrophorese dar. Es wird für jeden Lauf eines PCR Produktes in die Kapillaren und nach Beendigung des Laufs in einen Auffangbehälter gepresst. Man kann drei verschiedene Längen der Kapillaren auswählen. In diesem Projekt wurde mit 36cm langen Kapillaren gearbeitet. Mit diesen können Sequenzen von circa 500-600bp Länge abgelesen werden. Mit 50cm oder 80cm langen Kapillaren können entsprechend längere Sequenzen analysiert werden. Wie in *Abbildung 16* dargestellt befindet sich an den Kapillaren ein Sichtfenster. Durch dieses Fenster wird mittels Laser die mit Fluoreszenz beladene Nukleinsäure detektiert.

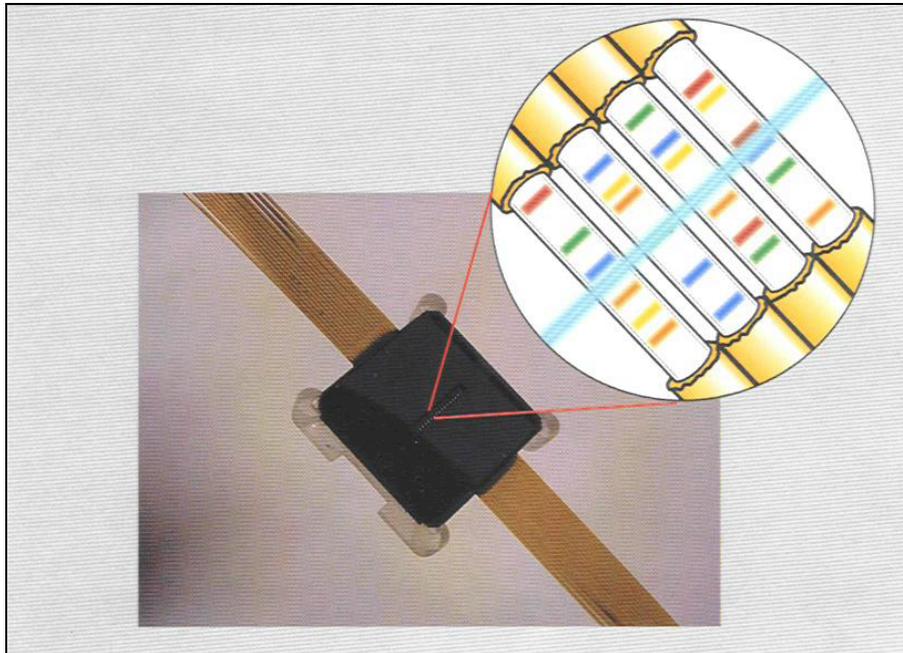


Abbildung 16: Kapillaren des „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“ mit Sichtfenster. Durch dieses Fenster wird mittels Laser die mit Fluoreszenz beladene Nukleinsäure detektiert.

Diese Beladung des PCR-Produktes mit Fluoreszenz markierten Nukleinsäuren erfolgt in der Sequenzreaktion (*Kapitel 3.1.4.6*). Der „Big Dye™ Terminator“ enthält zwei verschiedene Arten an dNTPs:

- (1) freie Nukleotide und
- (2) fluoreszenzmarkierte dideoxy-NTPs mit 4 verschiedenen Fluoreszenzmarkern für die 4 verschiedenen Nukleotide.

In der Sequenzreaktion wird jede Basenposition statistisch mit einer bestimmten Anzahl dieser fluoreszenzmarkierten dideoxy-NTPs besetzt und der Strang danach abgebrochen. Am Ende befinden sich also unterschiedlich lange DNA Fragmente, die an ihrer letzten Position eine Fluoreszenz-beladene Nukleinsäure tragen. Je nach ihrer Länge wandern diese Fragmente unterschiedlich schnell in der Elektrophorese. Das kürzeste Fragment passiert somit als erstes den Laser, gefolgt von demjenigen, das genau eine Base länger ist und so weiter. Der Laser registriert nur die Fluoreszenz-beladenen dNTPs und deren Reihenfolge, in der sie ihn passieren (*Abbildung 16*). Diese Informationen werden mit dem Programm „3100 Data

Sequencing Analysis Software Version 3.7" (Applied Biosystems®) führt im Anschluss an die Kollektion der Rohdaten (*Abbildung 17*) die Analyse durch. Das Ergebnis dieser Analyse stellt sich wie beispielsweise in *Abbildung 20* (*Kapitel 4.1.3*) dar.

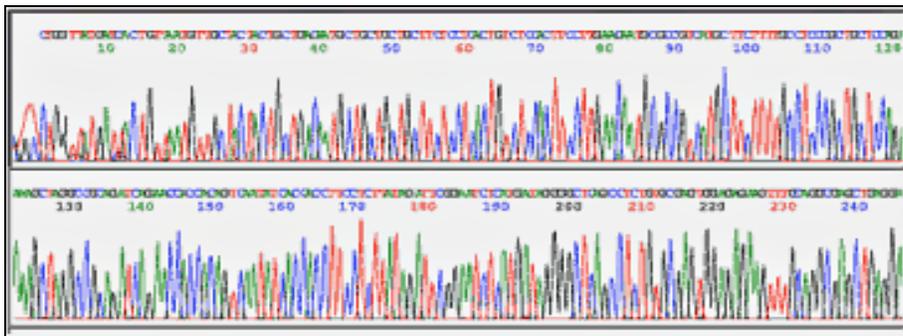


Abbildung 17: Darstellung der Rohfassung einer Sequenz. Diese Daten werden mit dem „DNA Sequencing Analysis Software Version 1.0.1“ überarbeitet.

3.1.12 Sequenzreaktion

Material:

- „Micro Amp® Optical 96-well Reaction Platten“ (Applied Biosystems®)
- „Perkin Elmer Applied Biosystems® Gene Amp® PCR system 9700“ mit beheizbarem Deckel
- „ABI Prism® Big Dye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Kit“ mit „AmpliTaQ® DNA Polymerase“, FS (Applied Biosystems®)
- 5X „Big Dye™ Puffer“ (Applied Biosystems®)
- Sequenzierprimer (3µM)

Durchführung:

Wie unter *Kapitel 3.1.4.6* beschrieben, wurde nach Aufreinigung der PCR-Produkte die Sequenzreaktion durchgeführt. Als Sequenzierprimer wurden die in *Tabelle 1* und *Tabelle 2* (*Kapitel 3.1.4*) aufgeführten jeweiligen Reversen Primer in einer Konzentration von 3µM eingesetzt. Ein Sequenzieransatz, mit einem Gesamtvolumen von 20µl, war wie folgt zusammengesetzt:

Sequenzieransatz:	10µl	aufgereinigtes PCR-Produkt mit 1,5ng/µl DNA
	1µl	Sequenzierprimer (3µM)
	1µl	Big Dye Terminator
	3,5µl	5X Big Dye Puffer
	4,5µl	hochgereinigtes Wasser

Die Sequenzierreaktion wurde in „Micro Amp® Optical 96-well Reaction Plates“, die später auch in den Sequenzer eingebaut werden können, durchgeführt. Als Cycler wurde wieder ein „Perkin Elmer Applied Biosystems® Gene Amp® PCR System 9700“ mit beheizbarem Deckel eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Nach 30sek bei 94°C folgten 25 Zyklen nach folgendem Schema mit jeweils

10 sek.	bei	94°C
5 sek.	bei	53°C
2 min.	bei	60°C

Im Anschluss an die Sequenzreaktion wurden die Platten bei –20°C gelagert oder direkt die Präzipitation (Ausfällung) durchgeführt.

3.1.13 Präzipitation (Ausfällung) der DNA

Material:

- Isopropanol 75%
- Ethanol 72%

Durchführung:

Bevor die eigentliche Sequenzierung auf dem „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“

der Sequenzreaktion 80µl Isopropanol 75% zugefügt und das Ganze bei Raumtemperatur über 30 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 3250 rpm) wurde das Isopropanol vorsichtig entfernt. Nun wurde mit 50µl Ethanol (72%) gewaschen, um möglichst alle Reste des Isopropanols zu entfernen. Nach Zentrifugation (10 min, 3250 rpm) wurde der Ethanol vorsichtig abgeschüttet, das Pellet getrocknet und bei -20°C gelagert, sofern die Beladung des Sequenzers nicht im direkten Anschluss an die DNA-Ausfällung erfolgte.

3.1.14 Beladung des „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“

Material:

- „POP-6™ Polymer ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems®)
- „ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems®)
- „3100 Data Collection Software Version 1.0.1“ (Applied Biosystems®)
- 1X Running Puffer (Applied Biosystems®)
- „Hi-Di-Formamid“ (Applied Biosystems®)

Durchführung:

Um die Sequenzierung zu starten, wurde dem Pellet 10µl „Hi-Di-Formamid“ zugefügt und kurz zentrifugiert, um sicher zu stellen, dass sich keine Blasen unter dem Formamid im Cup befinden. Im Anschluss wurden die Platten in den ABI Prism 3100 Genetic Analyzer eingebaut. Mit der Data Collection Software wurde ein so genanntes „Sample Sheet“ verfasst. Dort wurde beschrieben, wo genau in den Platten sich welche Probe befindet, es wurde hiermit festgelegt, in welche „Wells“ die Kapillaren zur Injektion eintauchen müssen. Mit dem „Sample Sheet“ wurde ebenfalls festgelegt, mit welchem Programmstatus der Lauf stattfinden soll. Es wurde ausschließlich mit dem Status „Rapid Sequencing“, einem bereits von Applied Biosystems® standardisiertem Programm, gearbeitet. Die Auftrennungsdistanz liegt hier bei 36cm. Das entspricht der Länge, die die einzelnen unterschiedlich langen DNA-Stücke in dem flüssigen Polymer zurücklegen, bevor sie den Laser passieren (entspricht der Länge der Kapillaren). Ein Lauf dauert ca. 60 Minuten bei einer Temperatur von 50°C. Die Elektrodenspannung fand bei einer konstanten Spannung von

15000 Volt statt. Nachdem die Platte mit dem entsprechenden „Sample Sheet“ verknüpft worden war, wurde der Lauf gestartet.

3.1.15 Sequenzanalyse

Material:

- „DNA Sequencing Analysis Software Version 3.7“ (Applied Biosystems®)
- „Staden Version1999“ (Staden Package University of Cambridge)

Durchführung:

Die während eines Laufs mit der „3100 Data Collection Software Version 1.0.1“ gesammelten Daten wurden mit der „DNA Sequencing Analysis Software Version 3.7“ überarbeitet. Danach wurden diese Daten zur Auswertung der Sequenzanalyse auf eine Unixstation mit dem Programm „Staden Version1999“ (Staden Package University of Cambridge) transferiert und dort bearbeitet und analysiert.

3.1.16 Allgemeines zur SNP-Detektion mittels TaqMan®

Die Real-Time quantitative PCR ist eine Methode, die sowohl zur Genexpressionsanalyse, Genotypisierung, Mutationsscreening, als auch zur DNA Quantifizierung eingesetzt werden kann. Diese Technik verwendet einen „ABI Prism® 9700 HAT Sequence Detection System“ (Applied Biosystems®) (TaqMan®), um die Akkumulation von PCR-Produkten während der PCR zu detektieren. Dies erlaubt eine einfache und sehr genaue Quantifizierung in der frühen exponentialen Phase der PCR. Die Basis hierfür stellen Sonden, so genannte „TaqMan®“-Sonden, die mit zwei Fluoreszenzmarkern (VIC und FAM) versehen sind, dar. Diese Sonden sind aus kurzen Oligodesoxynukleotiden zusammengesetzt, circa 20-25 Basen lang. Am 5'-Ende dieser Fluoreszenzmarker-Sonden befindet sich ein so genannter „Reporter“ und am 3'-Ende ein „Quencher“. Deren Sequenz ist homolog zu einem internen Teil einer Sequenz der PCR Produkte. Zur SNP-Detektion entspricht die Sequenz einer der beiden Sonden der Wildtypsequenz und die andere der Sequenz, die den SNP aufweist. Solange die Sonde intakt ist, findet ein Energieaustausch zwischen den beiden Fluoreszenzmarkern statt und die Emission des Reporters ist durch

den „Quencher“ unterdrückt. Während der PCR werden die Sonden durch 5' Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase zerstückelt und somit der „Reporter“ vom „Quencher“ getrennt (*Abbildung 18*).

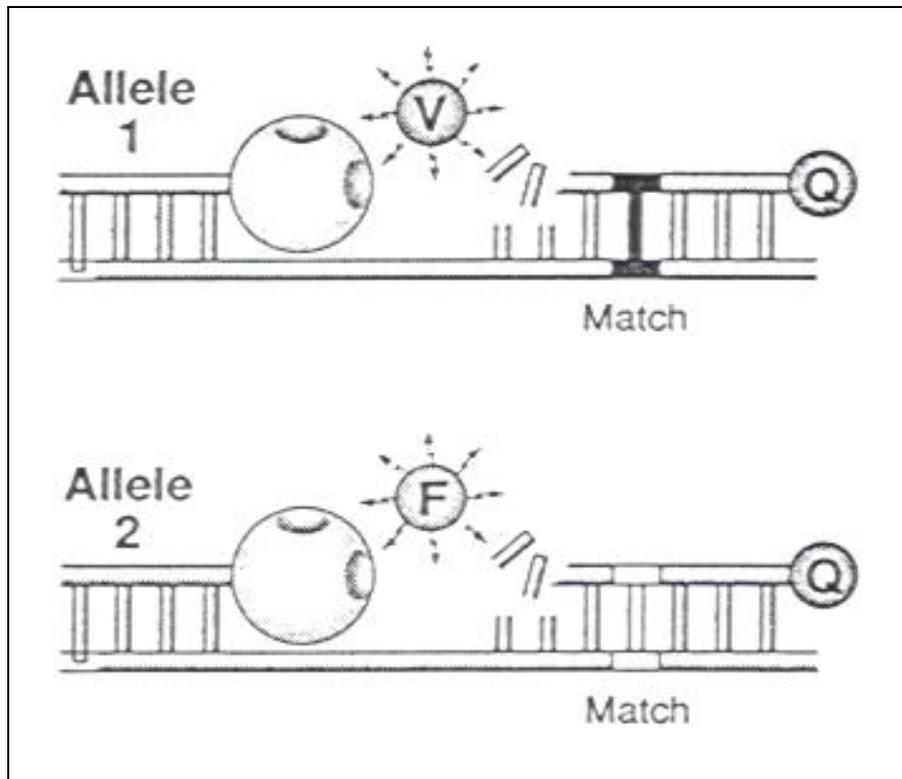


Abbildung 18: Darstellung des Mechanismus der TaqMan-Sonden. In dieser Abbildung wird gerade der Quencher vom Reporter durch die Zerstückelung durch die AmpliTaq Gold Polymerase getrennt. Dadurch wird die Absonderung der Sondenfluoreszenz verändert. V=VIC-Reporter; F=FAM-Reporter; Q = Quencher

Dies führt zu einer Emissionssteigerung des VIC- oder FAM-Reporters. Diese beiden unterschiedlichen Reporter weisen unterschiedliche Emissionsspektren und Emissionsintensitäten auf. Der ABI Prism® 9700 misst das jeweilige Emissionsspektrum und die Intensität in den einzelnen Proben der Patienten. Anhand dieser Emissionsspektren kann festgestellt werden, welche der beiden Sonden zwischen den beiden Primern eingebaut worden ist. Somit kann festgestellt werden, ob die Probe homozygot für eine der beiden Sonden ist und somit homozygot für die jeweilige Sequenz, oder die Emissionsspektren beider Sonden

detektiert worden sind und die Probe heterozygot ist. Die Software des ABI Prism® 9700 stellt die Daten wie in *Abbildung 19* dar.

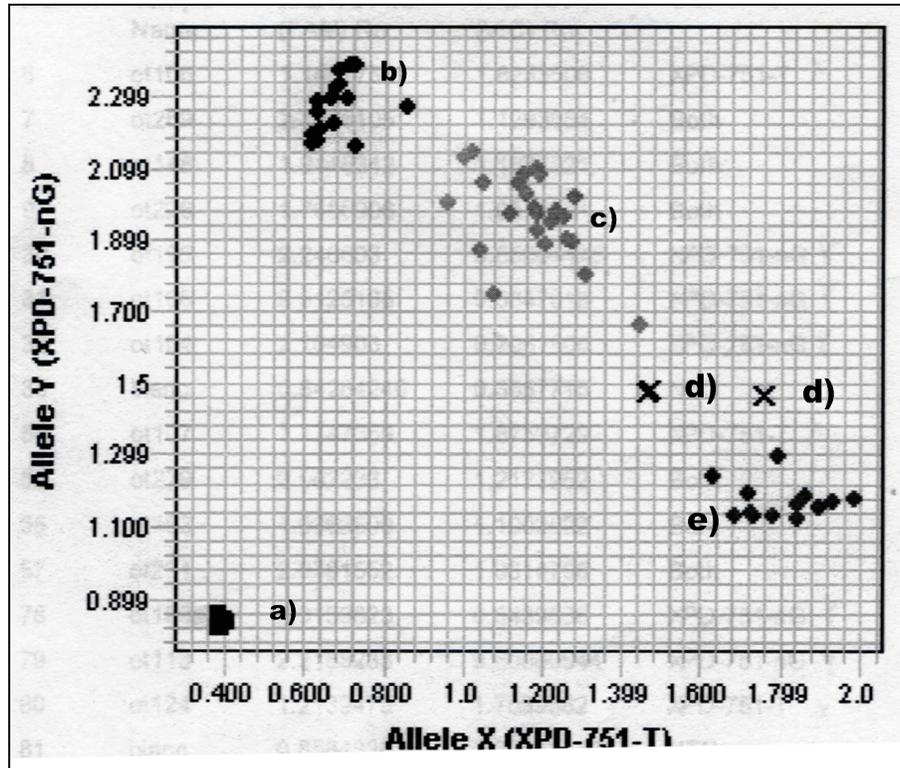


Abbildung 19: Grafik zur Darstellung der detektierten Allele in einem PCR Ansatz. a) Negativproben. b) Proben, die homozygot für das Allel Y und somit für den SNP sind. c) Proben, die heterozygot für die Allele X und Y sind. d) Unsichere Daten, diese wurden deshalb nicht ausgewertet. e) Proben, die homozygot für Allel X sind. Diese Patientinnen tragen den untersuchten SNP nicht auf ihrem genetischen Code. Sie besitzen den Wildtyp.

3.1.17 PCR zur SNP-Detektion mittels TaqMan®

Material:

- „ABI Prism® 7900 HAT Sequence Detection System“ (Applied Biosystems®)
- „Primer Express Oligo Design Software v0.1“ (Applied Biosystems®)
- „Perkin Elmer Applied Biosystems® Gene Amp® PCR System 9700“ (Applied Biosystems®)
- „TaqMan® Universal Master Mix“ (Applied Biosystems®)

Durchführung:

Die Primer und Sonden für die TaqMan®-PCR wurden mit dem Programm „Primer Express Oligo Design Software v0.1“ erstellt. Sie wurden so entworfen, dass die PCR-Produkte in der Regel eine Länge von vorzugsweise circa 500bp aufwiesen. Falls dies nicht möglich war, sollten sich mindestens 100bp auf jeder Seite des Polymorphismus befinden. Das 3'-Ende der Primer sollte so nah wie möglich an der Sonde liegen, ohne sich mit dieser zu überlappen.

Der zu untersuchende SNP sollte idealerweise innerhalb des mittleren Drittels der gesamten circa 20-25 Basen langen Sonde liegen. Die Sonden sollten weiterhin nicht mehr Guanosin- als Cytosinreste besitzen. Ebenfalls sollte sich kein Guanosin am 5'-Ende befinden und sie hatten keine 4 Guanosinreste am Stück aufzuweisen.

Die Primer sollten eine Länge von ca. 9-40 Basen haben und es haben maximal 2 G/C innerhalb der letzten 5 Basenpaare des 3'-Endes aufzutreten.

Die Ovarialtumoren wurden auf vier verschiedene SNPs (*Tabelle 4*) hin untersucht. Die jeweiligen Primer, Sonden und die zugehörigen Bedingungen sind der *Tabelle 4* zu entnehmen.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 10µl durchgeführt, das sich aus 2µl DNA (25ng/µl) und 8µl des jeweiligen Master-Ansatzes zusammensetzte. Ein Master-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

Master-Ansatz:	350µl	Master-Mix
	0,4-1,4µl	Primer Forward
	1,2µl	Primer Reverse
	1,2µl	VIC-Sonde
	1,2µl	FAM-Sonde
	206,7µl	hochsterilisiertes Wasser

SNP	Primer	Konzentration	Annealingtemperatur in °C
XRCC3-SNP59	Prim For: GGTCGAGTGACAGTCCAAACG	900	62
	Prim rev: GGACCTTCTTATTACACACTCCAA	900	
	VIC-Sonde: CTCTGTGCACATCCTGCTGAGAACTTG	200	
	Vac-Sonde: CTCTGTGCACACCCTGCTGAGAACTT	200	
XRCC3-SNP60	Prim For: GGCTAAAAATACGAGCTCAGGG	900	62
	Prim Rev: CCAGGCATCTGCAGTCCC	900	
	VIC-Sonde: CACGCAGCATGGCCCC	200	
	FAM-Sonde: ACGCAGCGTGGCCCC	100	
XPD IVS4	Prim For: GAGACTGGGACCTGGCAGG	300	62
	Prim Rev: CTCTTCAATCACCTACTCCAAAGTTG	300	
	VIC-Sonde: TGCCTCCAATGAGCACAAGCTCC	100	
	FAM-Sonde: TGCCTCCAATGAACACAGCTCCC	100	
XPD Lys 751	Prim For: ACCGCCCCACTCAGAG	300	62
	Prim Rev: CTCAGCCTGGAGCAGCTAGAA	300	
	VIC-Sonde: TGCTCTATCCTCTTCAGCGTCTCCTCTG	100	
	FAM-Sonde: TGCTCTATCCTCGCAGCGTCTCCTC	100	

Tabelle 4: Darstellung der Sequenzen der unterschiedlichen Primer und Sonden, die zur SNP-Detektion eingesetzt wurden. Die jeweiligen Konzentrationen und Annealingtemperatur für die PCR sind ebenfalls gelistet.

Die PCR-Amplifikation wurde abermals in einem „Perkin Elmer Applied Biosystems® Gene Amp® PCR system 9700“ mit beheizbarem Deckel durchgeführt.

Die Amplifikation fand unter folgenden Bedingungen statt:

2 min	bei	50°C
10 min	bei	95°C

Dem schlossen sich 40 Zyklen mit

15 sek .	bei	95°C	
1 min.	bei	62°C	an.

Im Anschluss wurde die Fluoreszenzmissionsmessung mit einem „ABI Prism® 7900 HAT Sequence Detection System“ durchgeführt.

3.1.18 Analyse der SNP-Detektion

Im Anschluss wurden die Frequenzen der Allele für homozygote Form für das seltene Allel und für das häufige Allel und für die heterozygote Form der einzelnen SNPs berechnet. Die Tumoren wurden in zwei Gruppen unterteilt, einmal in Tumoren mit und einmal in Tumoren ohne BRCA1/2-Mutation, und danach die Frequenzen der einzelnen Allele innerhalb dieser Gruppen untereinander verglichen. Die Ergebnisse sind in der *Tabelle 7 (Kapitel 4.1.8.)* aufgeführt.

3.1.19 Statistische Auswertung

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

In den Jahren 1908 und 1909 zeigten der Engländer G. H. HARDY und der Stuttgarter Stabsarzt W. WEINBERG unabhängig voneinander, daß die Häufigkeit der Homozygoten und Heterozygoten über Generationen hinweg konstant bleibt, wenn

- Die Population sehr groß ist
- Die Individuen sich uneingeschränkt paaren können (vorausgesetzt natürlich, sie gehören unterschiedlichen Geschlechtern an und leben zur gleichen Zeit am gleichen Ort)
- Es keine Selektion bestimmter Allele gibt
- Keine Genwanderung (Genmigration) vorkommen und
- Keine Erbänderungen (Mutationen) auftreten

Ihr mathematischer Ansatz ging als HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht in die Literatur ein.

Ableitung:

gegeben: ein Allelpaar A und a

angenommen: Häufigkeit von A sei $p = 0,9$ (= 90%), die von a sei $q = 0,1$ (= 10%)

daraus folgt: $p + q = 1$

Die gebildeten Gameten hätten demnach die Konstitution A oder a. Wenn sie zufallsgemäß untereinander gekreuzt werden, muss berücksichtigt werden, dass A-haltige Gameten mit der Häufigkeit p und a-haltige mit der Häufigkeit q in Erscheinung treten. In der Population können daher die Genotypen AA, Aa und aa vorkommen. Nur die Homozygoten (aa) fallen durch Erkrankung auf. Die Heterozygoten (Aa) bleiben unerkannt und sind nach dem Erscheinungsbild (Phänotyp) von den Homozygoten (AA) nicht zu unterscheiden.

In der nachfolgenden Generation erscheinen dann die Genotypen

- $AA = 0,9 \times 0,9 = 0,81$
- $Aa = 0,9 \times 0,1 = 0,18$
- $aa = 0,1 \times 0,1 = 0,01$

also: $AA = p^2$ $Aa + aA = 2pq$ $aa = q^2$ oder $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = \text{konstant}$

Genhäufigkeiten in Populationen stehen (unter den genannten Voraussetzungen) in einem stabilen Gleichgewicht zueinander. Die Zahl der Allele pro Gen in einer Population kann beliebig hoch sein. Das Genom eines Individuums ist daher nur eine zufällige Auswahl (Stichprobe) aus dem gesamten Genpool.

Odds Ratio (Das Chancenverhältnis)

Der Odds Ratio stellt ein Verfahren zum Vergleich der Expositionshäufigkeit von Fällen und Kontrollen dar. Sie ist ein Chancenverhältnis oder eine relative Risikoquote, definiert als Odds=Quote dafür, dass ein Fall exponiert ist, geteilt durch die Odds=Quote, dass eine Kontrolle exponiert ist.

Überschreitet die Odds Ratio die 1 ist damit ein erhöhtes Risiko angezeigt, wenn die Expositionshäufigkeit bei den Fällen höher ist als bei den Kontrollen. Je enger die Assoziation zwischen Exposition und Krankheit ist, desto höher ist die Odds Ratio. Liegt die Odds Ratio jedoch unter 1, zeigt sie einen protektiven Effekt an, wenn die Expositionshäufigkeit bei den Fällen niedriger ist.

χ^2 -Test

Der χ^2 -Unabhängigkeitstest erlaubt es, zu testen, ob zwei nominalskalierte Merkmale voneinander unabhängig sind oder nicht. Dabei werden Abweichungen der beobachteten Häufigkeiten in einer Kreuztabelle von den unter der Unabhängigkeitshypothese erwarteten Häufigkeiten evaluiert. Unter der Unabhängigkeitshypothese ergeben sich die erwarteten relativen Häufigkeiten in einer Zeile i,j durch Multiplikation der zugehörigen relativen Randhäufigkeiten.

Es wird eine Kreuztabelle erstellt:

Zeilenindex i (1,2,...,l) Spaltenindex j (1,2,...,m)

n_{ij}			n_1
			n_i
			n_l
n_1	n_j	n_m	n

Berechnung der erwarteten Häufigkeiten bei Unabhängigkeit der Merkmale

$$\text{Erwartete Häufigkeit} = \frac{\text{Zeilensumme} \times \text{Spaltensumme}}{\text{Gesamtsumme}}$$

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^m \frac{(\text{Beobachteter Wert}_{ij} - \text{Erwarteter Wert}_{ij})^2}{\text{Erwarteter Wert}_{ij}}$$

l = Anzahl der Spalten

m = Anzahl der Zeilen

3.2 Gt-198 Genanalyse

3.2.1 Proben für die Gt-198 Genanalyse

Für die Gt-198-Analyse wurden Lymphozytenzelllinien von Familienmitgliedern aus französisch-kanadischen Familien mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen verwendet. Diese Zelllinien wurden seit 1996 im Rahmen einer Studie in Krankenhäusern der Provinz Quebec gesammelt. Die Einschlusskriterien, die in dieser Studie festgelegt wurden, beinhalten:

- 1 Mindestens 4 Personen der Familie (Mutter, Tochter, Schwester oder selbst erkrankt) haben ein Mammakarzinom, wobei die Personen zum Zeitpunkt der Erkrankung unter 60 Jahre alt gewesen sein mussten, und/oder haben ein Ovarialkarzinom bei Verwandten ersten oder zweiten Grades, egal welchen Alters.
- 2 Die Person muss volljährig und ohne geistige Behinderung sein.
- 3 Die Person muss eine Einverständniserklärung unterschrieben haben.

Jedes Familienmitglied, das diese Richtlinien erfüllt hat, wurde auf die in der *Tabelle 1 (Kapitel 3.1.4)* gelisteten Mutationen hin untersucht. Danach wurde nach folgenden Kriterien festgelegt, von welchen Personen Lymphozyten immortalisiert werden sollten:

- 1 Die Person ist selbst Indexperson.
- 2 Die Person ist eine Mutationsträgerin.

Die Lymphozytenimmortalisierung wurde mit Epstein-Barr-Viren durchgeführt und stand als Probenmaterial für dieses Projekt wie auch für andere Projekte zur Verfügung.

3.2.2 Zellimmortalisierung

Unter dem Begriff Zellimmortalisierung versteht man das „Unsterblich“ machen von Zellen, dies wird erreicht durch Transformation. Während der Transformation wird genetische Information durch Aufnahme von Virus-DNA oder –RNA in die zu immortalisierende Zelle übertragen. Häufig wird dazu das Epstein-Barr-Virus (EBV) verwendet. Das EBV etabliert eine liposomale latente Infektion ohne Integration ins Wirtsgenom. Die mit EBV infizierten B-Lymphozyten werden an der Apoptose gehindert, wodurch sie sich in kontinuierlich wachsende immortalisierte Zellen verwandeln. Damit kann eine Quelle für Zellen, wie z. B. den Zellen der Hochrisiko-Familien hergestellt werden um über Jahre hinweg Projekte mit diesen Zelllinien durchzuführen.

3.2.3 RNA-Extrahierung

Material:

- „TriReagent“ (Molecular Research Center, Inc.®)
- Chloroform
- Isopropanol (100%)
- Ethanol (72%)

Durchführung:

In einem Falcon-Tube befand sich ein bei 4°C gelagertes Pellet, das circa 6 Millionen immortalisierte Zellen (*Kapitel 3.2.2*) enthielt. Dieses Pellet wurde mit 6ml „TriReagent“ resuspendiert und auf Schraubcups mit jeweils circa 1ml verteilt. Dem wurden 200µl Chloroform hinzugefügt, durch vortexen gut vermischt und bei Raumtemperatur über 15 Minuten inkubiert. Nachdem dieses Gemisch bei 4°C und

wässrige Phase enthält RNA und wurde mittels Pipette in ein neues Cup überführt. In der unteren Phenol-Chloroform-Phase befindet sich DNA und Protein, kann somit verworfen werden. Nach Zufügen von 500µl Isopropanol wurden die vorherigen Schritte wiederholt (vortexen, inkubieren über 15 min bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 4°C mit 13000 rpm). Nach der Zentrifugation sollte ein weißliches Pellet sichtbar sein. Die Flüssigkeit wurde mit einer Pipette entnommen. Es wurden dann wieder die oben genannten Schritte, aber diesmal mit 500µl Ethanol wiederholt. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur. Auch hier wurde die Flüssigkeit mit einer Pipette entnommen.

Die RNA wurde entweder nach der letzten Zentrifugation in Form des Pellets bei -80 °C aufbewahrt oder gleich im Anschluss an die Isolation mit 30µl hochgereinigtem Wasser resuspendiert und dann bei -80°C gelagert. Ab dem Zeitpunkt, da die RNA resuspendiert, muss darauf geachtet werden, dass sich die Cups möglichst immer auf Eis befinden, um Zersetzungen der ubiquitär vorkommenden RNA-Polymerasen zu vermeiden. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch (*Kapitel 3.2.2.4*).

3.2.4 cDNA-Synthese

Material:

- Oligo (dT) 12-18 (500µg/ml) (Invitrogen life technologies)
- 10mM dNTP Mix (10mM je dATP, dGTP, dCTP und dTTP bei neutralen pH) (Invitrogen™ life technologies)
- 5X „First-Strand Puffer“
- 0.1mM DTT
- 1µl „RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor“ (40units/µl) (Invitrogen™ life technologies)
- „SUPERScript™ 2 RNase H- Reverse Transkriptase“ (Invitrogen™ life technologies)

Durchführung:

Aus der extrahierten RNA wurde cDNA synthetisiert. Dazu sollten circa 10µg der

entsprechend, entsprechende Volumina RNA eingesetzt und mit Wasser auf 27,5µl aufgefüllt. Diesem Gemisch wurde folgendes addiert:

2µl	Oligo (dT)
2.5µl	10mM dNTP Mix

Zur Inkubation befanden sich die Cups über 5 Minuten in einem Wasserbad bei 65°C. Nach Abkühlung auf Eis wurde über 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert.

Im Anschluss daran wurden 16µl eines Mix bestehend aus:

10µl	5X First-Strand Puffer
5µl	0.1M DTT
1µl	„RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor“ (40units/µl)

hinzugefügt und gut vermischt. Nach Inkubation bei 42°C über 2 Minuten wurden

2µl	„SUPERSCRIPT 2“
-----	-----------------

zugefügt, mittels auf- und abpipettieren gut vermischt und für die cDNA-Synthese bei 42°C über 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 15 Minuten bei 65°C inaktiviert. Nach Abkühlung auf Eis wurden die cDNA Proben bei -20°C gelagert.

3.2.5 cDNA-Aufreinigung

Material:

- PB-Puffer (Quiagen®)
- Mikrozentrifugations-Säulen (Quiagen®)
- PE-Puffer (Quiagen®)

Durchführung:

Bevor die cDNA in die Polymerasekettenreaktion eingesetzt werden konnte, musste sie noch aufgereinigt werden. Dazu wurde sie mit 5 Volumen PB-Puffer versetzt und auf Mikrozentrifugations-Säulen pipettiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation (1 min, 10000 rpm) wurde zweimal mit 500µl PE-Puffer gewaschen und nochmals zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Die sich im Filter der Mikrozentrifugationssäulen befindliche DNA wurde mit 100µl hochgereinigtem Wasser in ein frisches Eppendorfcup durch Zentrifugation (1 min, 1000 rpm) eluiert.

3.2.6 PCR zur Amplifizierung des Gt-198 Gens**Material:**

- „Perkin Elmer Applied Biosystems® Gene Amp® PCR System 9700“ (Applied Biosystems®)
- „PCR-96-HS-C Mikroplatten“ (Oxygen Scientific®)
- 10X PCR Reaktionspuffer (200mM Tris-HCl, pH=8.4, 500mM KCl; Invitrogen™ life technologies)
- 1mM dNTP Mix; je 0,25mM (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
- „Platinum® Taq DNA Polymerase“ (Invitrogen™ life technologies)
- Magnesium-Chlorid (50mM) (Invitrogen™ life technologies)

Durchführung:

Wie im Ergebnisteil (*Kapitel 4.2.3*) beschrieben, war die Etablierung der PCR-Bedingungen durch unspezifische Banden erschwert (*Tabelle 10, Kapitel 4.2.3*). Die PCR wurde endgültig mit DURF53 (GACCACCAACTACAACGTCCG) als Primer Forward und A05 (CACAAGCCCAGCAGGTCCT) als Primer Reverse durchgeführt.

Die PCR-Konditionen stellten sich wie folgt dar:

PCR-Ansatz:	2,0µl	aufgereinigte cDNA
	5,0µl	cNTP Min (1mM)
	2,5µl	Primer Reverse (10mM)
	2,5µl	Primer Forward (10mM)
	5,0µl	10X Puffer
	1,0µl	Taq-Platinum Polymerase (2U)
	30,5µl	hochsterilisiertes Wasser

Nach 3 Minuten Aktivierung der Taq-Platinum Polymerase und Denaturierung der DNA bei 94°C folgten 40 Zyklen nach folgendem Schema:

40 sek.	bei	90°C
40 sek.	bei	58°C
2 min.	bei	72°C

Eine „final extension“ (7 min bei 72°C) wurde angeschlossen, um den vollständigen Abschluss aller Reaktionen zu ermöglichen.

3.2.7 Die elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung wurde wie unter *Kapitel 3.1.8* beschrieben durchgeführt.

3.2.8 Aufreinigung (Purifikation) der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde wie unter *Kapitel 3.1.9* beschrieben durchgeführt.

3.2.9 Konzentrationsbestimmungen der PCR-Produkte

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem Schema wie unter *Kapitel 3.1.10* beschrieben.

3.2.10 Sequenzreaktion

Material:

- „Micro Amp® Optical 96-well Reaction Plates” (Applied Biosystems®)
- „Perkin Elmer Applied Biosystems® Gene Amp® PCR System 9700” mit beheizbarem Deckel
- „ABI Prism® Big Dye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Kit” mit „AmpliTaq® DNA Polymerase”, FS (Applied Biosystems®)
- 5X Big Dye™ Puffer (Applied Biosystems®)
- Sequenzierprimer (3µM)

Durchführung:

Wie unter *Kapitel 3.1.4.6* beschrieben, wurde nach Aufreinigung der PCR-Produkte die Sequenzreaktion durchgeführt. Als Sequenzierprimer wurden sowohl DURF53 und AO5 (*Kapitel 3.2.6*) in einer Konzentration von 3µM eingesetzt.

Ein Sequenzieransatz, mit einem Gesamtvolumen von 20µl, war wie folgt zusammengesetzt:

Sequenzieransatz:	10µl	aufgereinigtes PCR-Produkt mit 1,5ng/µl DNA
	1µl	Sequenzierprimer (3µM)
	1µl	Big Dye Terminator
	3,5µl	5X Big Dye Puffer
	4,5µl	hochgereinigtes Wasser

Die Sequenzreaktion wurde in „Micro Amp® Optical 96-well Reaction” Platten, die

ein „Perkin Elmer Applied Biosystems® Gene Amp® PCR System 9700“ mit beheizbarem Deckel eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Nach 30 sek. bei 94°C folgten 25 Zyklen nach folgendem Schema mit jeweils

10 sek .	bei	94°C
5 sek .	bei	53°C
1,3 min.	bei	59°C

Im Anschluss an die Sequenzreaktion wurden die Platten bei –20°C gelagert oder es wurde direkt die Präzipitation (Ausfällung) durchgeführt.

3.2.11 Präzipitation (Ausfällung) der DNA der Sequenzreaktion, Beladung des Sequenzers, Sequenzanalyse

Die Punkte Präzipitation, Beladung des Sequenzers und Sequenzanalyse wurden wie unter den *Kapiteln 3.1.13, 3.1.14 und 3.1.15* beschrieben durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Untersuchung der Ovarialkarzinomgewebe

Keimbahnmutationen in bekannten Hochrisikosuszeptibilitätsgenen wie BRCA1 und BRCA2 sind für etwa ein Drittel aller familiären Brust und Ovarialkarzinome verantwortlich. Es erkrankten nicht alle Mutationsträgerinnen an einem Karzinom [79]. Aber auch nicht alle familiär auftretenden Mammakarzinome und Ovarialkarzinome lassen sich auf Mutationen in BRCA1 oder BRCA2 zurückführen. BRCA1 und BRCA2 sind beide an DNA-Doppelstrangreparaturmechanismen beteiligt ^{Khanna and Jackson 2001}.

4.1.1 Hypothese

Zur Überprüfung der Hypothese, dass BRCA-mutierte Ovarialkarzinomzellen eine andere SNP-Verteilung in DNA-Reparaturgenen als nicht-BRCA-mutierte Ovarialkarzinomzellen aufweisen, wurden die Frequenzen vier verschiedener SNP's in zwei Kandidatengenen des DNA-Doppelstrang-Reparaturmechanismus getestet.

4.1.2 Untersuchtes Material und Methoden

Es wurde genomische DNA von 56 Ovarialkarzinomen extrahiert und auf 18 verschiedene BRCA1/2-Mutationen (*Tabelle 1* und *Tabelle 2*) hin getestet. Die Sequenzanalysen wurden anhand der „DNA Sequencing Analysis Software Version 3.7“ durchgeführt (*Kapitel 3.1.4.9*). Mittels „TaqMan-Technik“ (*Kapitel 3.1.6*) wurden die Proben auf 4 SNPs in DNA-Reparaturgenen (*Tabelle 4 Kapitel 3.1.6.1*) in der genomischen DNA getestet.

4.1.3 Ergebnisse

Alle darstellbaren Sequenzen der 56 Tumoren wurden sowohl in 5' → 3'- als auch in 3' → 5'-Richtung auf Varianten im humanen Genom analysiert. Im Folgenden sind die gefundenen Veränderungen beschrieben.

BRCA1: 962G → A (321) (W321X)

Alle 56 Tumoren konnten mit einer gut verwertbaren Sequenz dargestellt werden.

Bild A)

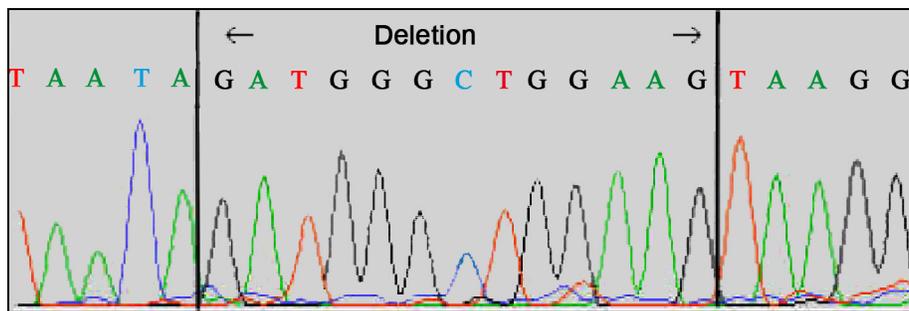


Bild B)

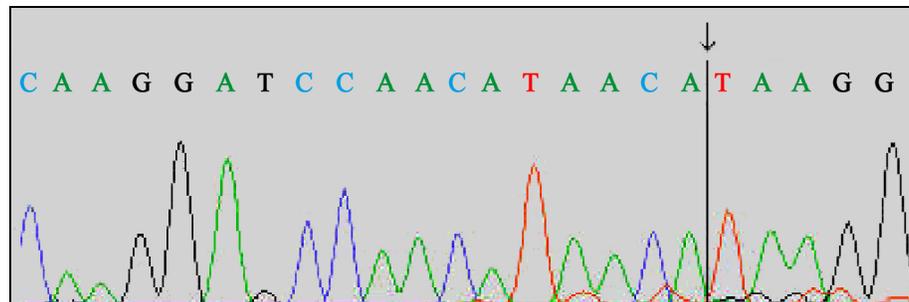


Bild C)

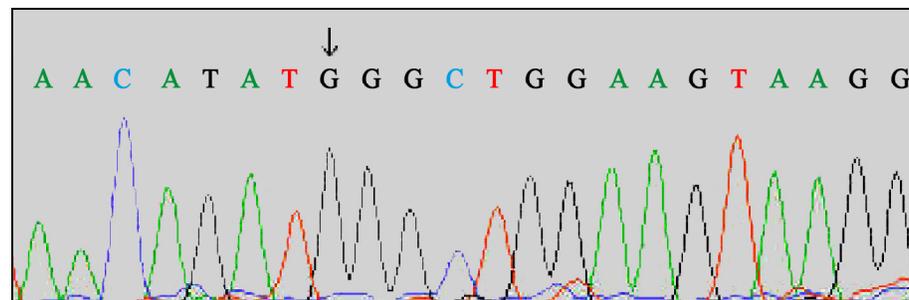


Abbildung 20: Sequenzierung von Mutation W321X (Tabelle 1 Kapitel 3.1.4) Bild A) Wildtypsequenz. Deletion aus Bild B) befindet sich zwischen den beiden Markierungslinien. Bild B) Sequenz mit genannter Deletion. Ein Pfeil und eine Linie ist die Stelle markieren die Stelle der Deletion von 13 Basenpaare. Bild C) Mit einem Pfeil ist diejenige Base G markiert, die im Falle einer Mutation mit einem A vertauscht wäre.

In keiner der dargestellten Sequenzen konnte der gesuchte Basenaustausch von G zu A gefunden werden. Jedoch wies eine Probe eine Deletion von 13 Basenpaaren (*Abbildung 20*) auf ^{F. Guenard Oct 2002}. Wie aus der *Abbildung 20* deutlich wird, umfasste diese Deletion genau den Bereich der gesuchten Mutation. Diese Mutation ist bisher noch nicht beschrieben ^{F. Guenard Oct 2002}.

BRCA1: 4328C → T (R1443X) (Arg → Stop1443)

Alle 56 Tumoren konnten mit einer gut verwertbaren Sequenz dargestellt werden. Die Gründermutation 4328C → T (R1443X) konnte in zwei Tumoren dargestellt werden ^{F. Guenard Oct 2002} (*Abbildung 21*).

Bild A)

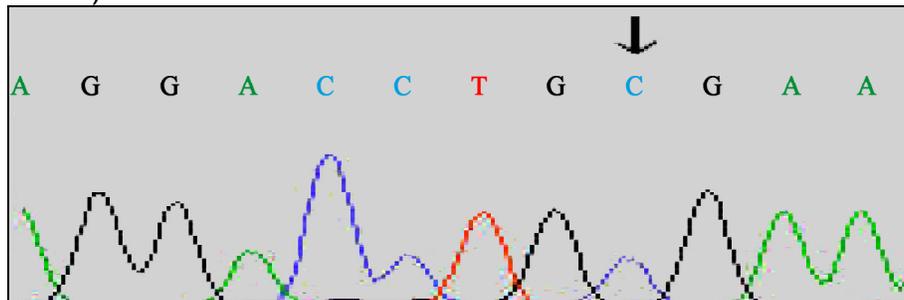


Bild B)

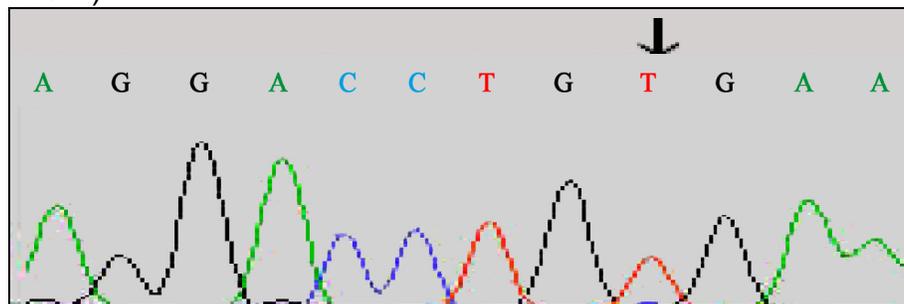


Bild C)

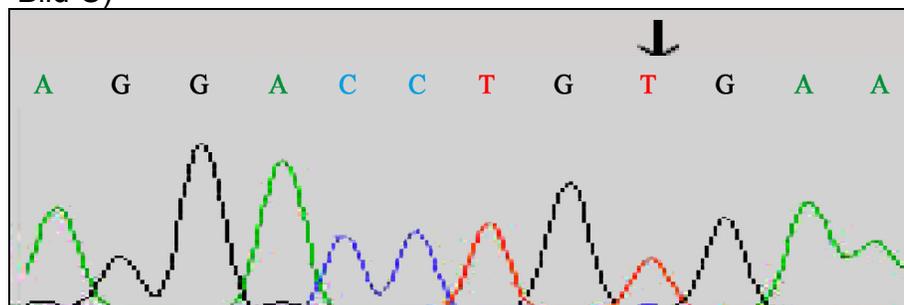


Abbildung 21: Sequenzierung der Mutation 4328C → T (R1443X) (*Tabelle 1, Kapitel 3.1.4*) Bild A) Wildtypsequenz. Bild B und Bild C) Ausschnitte der beiden Sequenzen mit Mutation. Der Pfeil markiert die ausgetauschte Base, C → T

Beide Tumor-DNA's zeigten die Mutation 4328C→T (R1443X) in homozygoter Form. Es sollte überprüft werden, ob in der Keimbahn dieser Patientinnen diese Mutation ebenfalls in homozygoter Form vorliegt. Deshalb wurde von den Kliniken Blut beider Patientinnen angefordert. Es war nur Blut einer der beiden Probanden verfügbar. Die DNA wurde aus dem Blut extrahiert und bezüglich Verlust der Heterozygotie getestet.

Die Mutation 4328C→T (R1443X) stellte sich im Blut in heterozygoter Form dar (*Abbildung 22*). Dies bedeutet, dass das zweite Allel ohne die Keimbahnmutation 4328C→T (R1443X) im Tumorgewebe verloren gegangen ist, da im Blut der Patientin noch beide Allele zu detektieren waren.

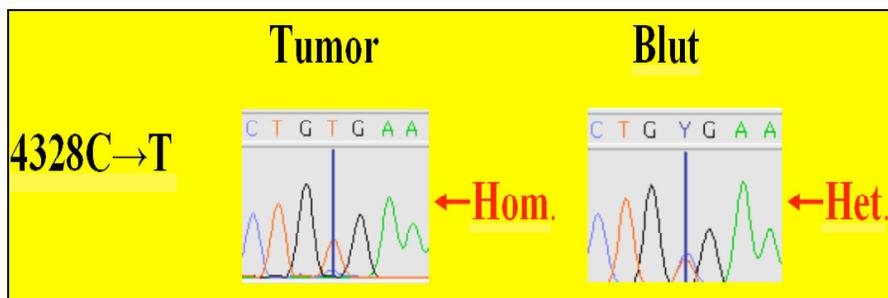


Abbildung 22: Sequenzierung der Mutation 4328C → T (R1443X) im Blut der Patientin, die bereits eine Mutation in Tumorgewebe gezeigt hatte. Die Mutation 4328C → T (R1443X) liegt sowohl im Blut in heterozygoter Form und im Tumorgewebe in homozygoter Form vor. Folglich ist in dem Tumorgewebe nur noch das Allel, das die Keimbahnmutation trägt, vorhanden (Loss of Heterozygosity)

BRCA2: 8537delAG (frameshift → Stopcodon 2846)

54 der 56 untersuchten Tumoren konnten mit einer gut auswertbaren Sequenz dargestellt werden. Die Gründermutation 8537delAG wurde in einem Tumor gefunden^F.

Guenard Oct 2002. Die Mutation lag in heterozygoter Form vor (*Abbildung 23*). Insgesamt wiesen 53 der 54 Proben die Wildtypsequenz auf.

Bild A)

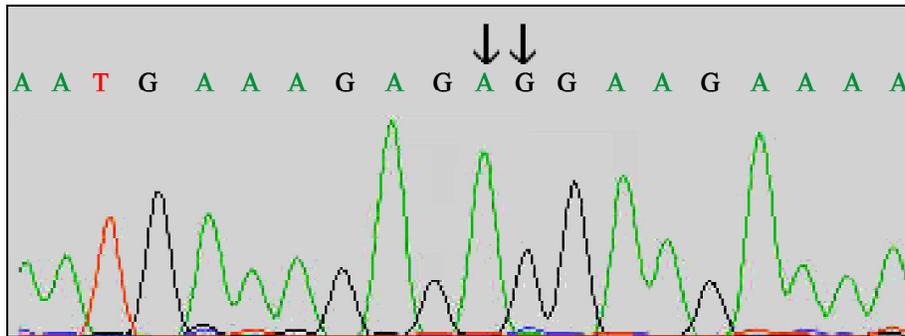


Bild B)

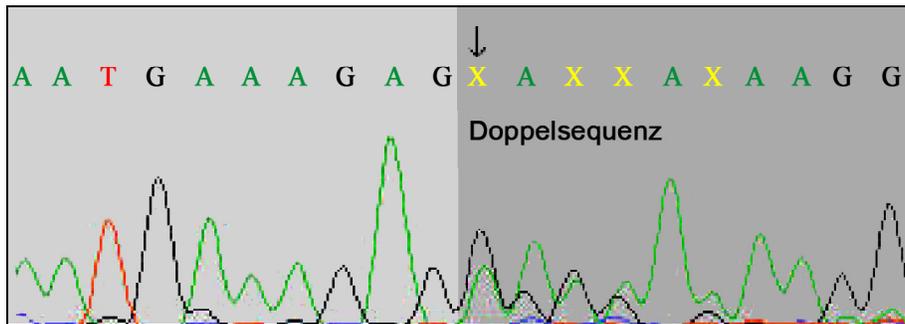


Abbildung 23: Sequenzierung der Mutation 8537delAG (2846)
 Bild A) Ausschnitt einer Sequenz des Wildtyps. Bild B) Ausschnitt einer Sequenz mit der beschriebenen Doppelsequenz. Die Stelle der in dieser Sequenz ursprünglich gesuchten Mutation, ist mit einem Pfeil markiert. Der Bereich der Doppelsequenz, die durch die heterozygote Deletion der Nukleotide A und G entstanden ist, ist grau unterlegt.

Die Mutation 8537delAG stellte sich im Blut ebenfalls in heterozygoter Form dar (

Abbildung 24). Dies wurde gefolgert, dass es sich hierbei um eine Keimbahnmutation handelt und nicht um eine Mutation, die erst im Laufe der Zeit aufgetreten ist.

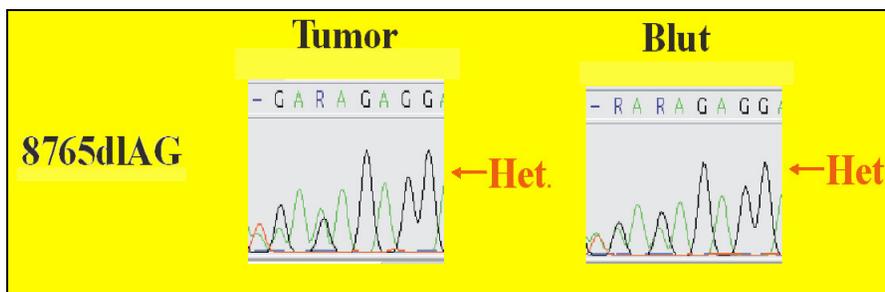


Abbildung 24: Sequenzierung der Mutation 8537delAG im Blut der Patientin, die bereits eine Mutation in Tumorgewebe gezeigt hatte. Die Mutation 8537delAG liegt sowohl im Blut also auch in Tumorgewebe in heterozygoter Form vor. Folglich ist die detektierte Mutation eine Keimbahnmutation

4.1.4 Tumore ohne Mutation

Es konnte in den 56 analysierten Tumoren keine weitere Mutation, der in *Tabelle 1* und *Tabelle 2 (Kapitel 3.1.4)* gelisteten Mutationen detektiert werden. Es wurden nicht alle zur Verfügung stehenden Proben analysiert. Bei einigen Proben ließen sich auch nach mehrfacher Sequenzierung keine verwertbaren Informationen gewinnen. Da es sich bei den Ausfällen immer wieder um unterschiedliche Proben handelte, wurde mangelnde DNA als Grund für diese Ausfälle ausgeschlossen. Von jeweils 56 Ovarialkarzinomen konnten für 43 bis 56 Proben der 18 verschiedenen detektierten Mutationen verwertbare Sequenzen gefunden werden.

4.1.5 Weitere Sequenzvarianten

Im Rahmen der Sequenzierung wurden n=8 vom Wildtyp abweichende Sequenzvarianten gefunden. Alle gefunden SNPs sind in *Tabelle 5* aufgeführt. Sie wurden in zwei SNP-Datenbanken (NCBI = National Center of Biotechnology Information: <http://ncbi.nlm.nih.gov> und Interactiva: <http://hgbase.de>) hinsichtlich Ihrer Vorbeschreibung abgefragt.

Gefundener SNP	Anzahl der Heterozygoten in n	Anzahl der Homozygoten in n	Im Rahmen der Mutationssuche von	Mutationseffekt
G → A an Position 2077 im Codon 693 mit AS-Wechsel von Asp → Asn	3	2	BRCA1 1961insA Exon 11	Polymorphismus
C → T an Position 2082 in Codon 694 ohne Änderung der AS	10	9	BRCA1 1961insA Exon 11	Polymorphismus
C → T an Position in 2731 Codon 871 mit AS-wechsel von Pro → Leu	18	7	BRCA1 Exon11 T826K	Missense-Mutation, nicht-klassifizierte Mutation
A → G an Position 3548 in Codon 1183 mit AS-Wechsel Lys → Arg	14	10	BRCA1 3705insA / 3768insA	Missense-Mutation, nicht-klassifizierte Mutation
T → C an Position 4309 in Codon 1436 ohne AS-Austausch	16	13	BRCA1 4328C → T (1443) Exon 13	Missense-Mutation, Polymorphismus
G → A im Intron	17	10	BRCA1 5221delTG	Polymorphismus
C → T im Intron	4	0	BRCA1 5221delTG	Polymorphismus
G → C an Position 223 in Codon 75	1	0	BRCA2 Y42C	Missense-Mutation, nicht-klassifizierte Mutation

Tabelle 5: SNPs, die während der Mutationssuche detektiert wurden. In der Tabelle sind deren Identifikationsnummern der Datenbanken von NCBI und HGBASE dargestellt. Teilweise konnten die SNPs nur in einer Datenbank gefunden werden. Alle aufgefundenen Daten sind gelistet, sowie Häufigkeit des Auftretens in homo- und heterozygoter Form unter den Tumoren und deren Auswirkung im genetischen Code.

Alle der aufgefundenen SNPs sind bereits in SNP Datenbanken beschrieben. Es handelt sich um 4 Missense-Mutationen, die nicht näher klassifiziert sind und um 4 Polymorphismen.

4.1.6 Zusammenfassung der Mutationsanalysen

Gründermutationen konnten in insgesamt 3 Tumoren von jeweils 3 unterschiedlichen Patienten gefunden werden, wovon zwei in homozygoter und eine in heterozygoter Form vorlagen. Zusätzlich fand man 8 weitere Sequenzvarianten (SNPs).

4.1.7 SNP-Verteilung in DNA-Reparaturgenen bei den untersuchten Ovarialkarzinomgeweben

Nach der Mutationsanalyse von den 56 Tumoren wurden diese mittels „TaqMan Technik“ auf vier SNP's in 2 DNA-Reparaturgenen hin untersucht (*Kapitel 3.1.5*). Zwei der getesteten SNP's befinden sich im Gen XPD (Xeroderma Pigmentosa Gen D), welches am „Nucleotide Excision“-Reparaturweg beteiligt ist. Die beiden anderen SNPs liegen im Gen XRCC3, welches in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination involviert ist.

Einer der beiden untersuchten SNPs (XPD IVS 4 G → A) befindet sich in Intron 4 (IVS 4 G → A an Position 18814) und der zweite SNP (XPD Lys751 → Gln) an Position 35931 (A → C). Der zweite SNP bewirkt einen Aminosäureaustausch Lys → Gln im Codon 751. Lunn et al.^{Lunn, et al. 2000} konnte nachweisen, dass dieser Polymorphismus mit einer geringeren Reparaturrate für durch Röntgenstrahlung hervorgerufene DNA-Defekte einherging. In der Normalbevölkerung erwartet man für den Intron 4-SNP eine Allelfrequenz von etwa 21% für das seltene Allel A, und eine Allelfrequenz von 33% für den SNP Lys751 → Gln^{Shen, et al. 1998}.

Im XRCC3-Gen, welches im homologen Rekombinationsweg der DNA-Doppelstrangreparatur beteiligt ist, wurden im Intron 5 (IVS5-14) der SNP A → G an der Position 17893 und an der Position 18067 der Basenaustausch C → T untersucht, der in einem Aminosäureaustausch Thr → Met am Codon 241 führt^{Shen, et al. 1998}. In der Normalbevölkerung erwartet man für den Intron 5 SNP eine Allelfrequenz von etwa 34% für das seltene Allel G, und eine Allelfrequenz von 36% für das seltene Allel T im SNP Thr241Met^{Kuschel, et al. 2002}.

Die verwendeten TaqMan Proben für XRCC3 Thr → Met am Codon 241 (*Kapitel 3.1.5*) haben zu keinen verwertbaren Ergebnissen geführt, so dass diese aus der Analyse ausgeschlossen wurden und keine Ergebnisse zur Verfügung stehen.

Die Ergebnisse der Proben XPD Lys751 → Gln A → C Position 35931, XPD IVS 4 G → A Position 18814 und XRCC3 IVS5-14 A → G Position 17893 sind in *Tabelle 6* dargestellt.

SNP	Anzahl der homozygoten Für Allel X (Frequenz)	Anzahl der Homozygoten für Allel Y (Frequenz)	Anzahl der Heterozygoten (Frequenz)	Frequenz seltenes Allel	HWE p-Wert	Nicht verwertbar in n
XPD Lys751 → Gln A → C Position 35931	13	16	24	0,47	0,51	3
XPD IVS 4 G → A Position 18814	27	8	21	0,33	0,25	0
XRCC3 IVS5-14 A → G Position 17893	26	8	20	0,33	0,21	2

Tabelle 6: Auflistung der Ergebnisse der einzelnen getesteten SNPs. Die untersuchten Allelfrequenzen weichen nicht von dem zu erwartenden Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ab.

4.1.8 SNP-Verteilung in Assoziation zum BRCA-Mutationsstatus der Tumoren

Um einen Vergleich der SNP-Verteilung in den untersuchten DNA Reparaturgenen bezüglich der BRCA Assoziation anstellen zu können, wurden die Tumoren in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe umfasste die Tumoren mit BRCA1/2 Mutationen, während die andere Gruppe Proben ohne Mutation in BRCA1/2 enthielt.

Stratifiziert man nun die SNP Verteilung in den untersuchten Tumoren nach dem Vorhandensein von Veränderungen in BRCA1/2, kommt man zu in *Tabelle 7* aufgezeigtem Ergebnis.

SNP	Tumoren	Seltene Allelfrequenz	Homozygot für Wildtyp (n)	Heterozygot (n)	Homozygot für SNP (n)	HWE p-Wert	Ausfälle
XRCC3 A → G at nt	mit Mutation in BRCA Genen(4)	0,375	2	1	1	0,35	0
	ohne Mutation in BRCA Genen (52)	0,33	24	19	7	0,31	2
XPD- IVS4	mit Mutation in BRCA Genen	0,625	0	3	1	0,23	0
	ohne Mutation in BRCA Genen	0,615	27	18	7	0,18	0
XPD- Lys751	mit Mutation in BRCA Genen	0,375	2	1	1	0,35	0
	ohne Mutation in BRCA Genen (49)	0,54	11	23	15	0,70	3

Tabelle 7: Verteilung der Häufigkeiten der einzelnen SNPs in BRCA 1/2 positiven und negativen Tumoren mit dem zu erwartenden Hardy-Weinberg-Equilibrium

Auch hier weichen die untersuchten Allelfrequenzen nicht von dem zu erwartenden Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ab.

Im Sinne einer Assoziationsstudie (sind BRCA1/2 Tumoren häufiger mit einem der untersuchten SNPs assoziiert als negative Tumoren?) wurden nun die BRCA1/2 positiv getesteten Tumoren als „Fälle“ betrachtet und die negativ getesteten als „Kontrollen“. Odds Ratios (geschätzte relative Risiken) wurden für diese Fall-Kontroll-Subjekte errechnet (*Tabelle 8*)

SNP	Heterozygotenrisiko		Homozygotenrisiko(seltene Allel)	
	OR	95%KI	OR	95% KI
XRCC3 A → G at nt	0,63	0,05-7,5	1,71	0,13-21,82
XPDIVS4	4,5	0,43-46,74	3,86	0,21-69,67
XPDIvs751	0,24	0,02-2.93	0,37	0,03-4,57

Tabelle 8: Genotyp-spezifische Risiken (OR und 95% Konfidenzintervalle) zwischen Mutationsträgern (Fälle) und Nicht-Mutationsträgern (Kontrollen)

Die Fallzahlen sind sehr gering, weswegen die Konfidenzintervalle weit gespannt sind. Folglich konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Wenn die Odds Ratio den Wert 1 überschreitet, wird ein erhöhtes Risiko angezeigt, d.h. BRCA1/2 positiv getestete Tumoren sind assoziiert mit den heterozygoten Allelen von XPDIVS4 und den homozygoten Allelen von XRCC3 A→G und XPDIVS4. Umgekehrt zeigt das Odds Ratio unter 1 einen protektiven Effekt an. Die heterozygoten Träger des SNPs XRCC3 A→G sind seltener mit BRCA1/2 Mutationen assoziiert. Dies gilt auch für die heterozygoten sowie für die homozygoten Träger des SNPs XPD Lys751 → Gln.

4.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Ovarialkarzinome

Die Frequenzen der seltenen Allele der SNPs, XPD IVS 4 G→A Position 18814 und XRCC3 A→G Position 17893, weichen in der Gruppe der Probanden mit Mutation in BRCA1/2 nicht signifikant von den Frequenzen der Probanden ohne Mutation ab. Der SNP XPD Lys751 → Gln A→C Position 35931 weist in der Gruppe mit Mutation eine Frequenz von 0,375 für das seltene Allel auf. Hingegen zeigt die Gruppe ohne Mutation eine Allelfrequenz für das seltene Allel von 0,54 auf. Alle diese Werte weichen jedoch nicht von den zu erwartenden Hardy-Weinberg-Equilibrien ab. Aufgrund der geringen Fallzahl verfügen diese Daten über keine signifikante Aussagekraft.

4.2 Ergebnisse Gt-198

4.2.1 Hypothese Gt-198

Die Entscheidung warum mit Gt-198 gearbeitet wurde, begründet sich auf zwei Voraussetzungen,

- (a) die Lokalisation von Gt-198 in der Nähe von BRCA1 auf Chromosom 17q12-21 (Kapitel 1.3) und
- (b) die Vermutungen, dass Gt-198 ein gewebspezifischer Koaktivator ist, der mit DNA-Bindungsstellen von nukleären Rezeptoren interagiert ^{Ko, et al. 2002}.

Die Hypothese, dass Gt-198 ein „Modifier-Gen“ für BRCA1 ist und somit Einfluss auf das Erkrankungsrisiko für Mamma- und/oder Ovarialkarzinom nehmen könnte, entstand aufgrund dieser beiden Voraussetzungen sowie aufgrund von Ergebnissen, die z.B. einen funktionellen Polymorphismus eines Gens der an der durch DNA-Schäden hervorgerufenen Apoptose beteiligt ist ^{Seker, et al. 2001} zeigen konnten.

4.2.2 Untersuchtes Material und Methoden Gt-198

Es wurden 100 cDNAs, die aus Lymphozyten-Zelllinien von Hochrisiko-Familien gewonnen wurden, auf Sequenzveränderungen in Gt-198 untersucht (*Kapitel 3.2.1*). Die gefundenen Sequenzveränderungen in Gt-198 sollten in einem weiteren Schritt mit der Erkrankung bzw. Nicht-Erkrankung von Mutationsträgerinnen korreliert werden.

4.2.3 Vorarbeiten für die Mutationsanalyse in Gt-198

Zu Beginn wurde die cDNA aus RNA immortalisierter Zelllinien von Hochrisikofamilien synthetisiert (*Kapitel 3.2.2 bis 3.2.5*). Für die Amplifizierung von Gt-198 mussten Oligonucleotide und PCR-Konditionen erstellt werden. Die im Folgenden aufgelisteten Konditionen (*Tabelle 10*) und unterschiedlichen Primerkombinationen der in

Tabelle 9 aufgeführten Primer wurden aufgrund unspezifischer Banden oder PCR

Produkte anderer Chromosomenabschnitte verworfen.

Primer Forward	Primer Reverse
<u>DURF51</u> : GAACCAACAGACCAGGCA	<u>DURF52</u> : GAGCCAAGATATGCTTGACA
<u>Sim426</u> : GGCTTCTGAGTTGGGTGGC	<u>A05</u> : AGGACCTGCTGGGCTTGTG
<u>Sim425</u> : GATGGCTACAGAGCTGTCTTG	<u>A06</u> : ACCAGAGCACTGGGTAGAGAGG
<u>DURF53</u> : GACCACCAACTACAACGTCCG	
<u>DURF54</u> : AGTGCCCTGACCACACCAGA	

Tabelle 9: Darstellung der getesteten Primer Forward und Primer Reverse. Die unterschiedlichen Kombinationen und dazu gehörigen PCR-Konditionen sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Primer-kombination	Temperaturgradient	Zeit
DURF51+DURF52	94°C 52°C/ 54°C/ 55°C/ 58°C/ 62°C 72°C	40 sec 40 sec 2 min
Sim425+DURF52	94°C 52°C/ 54°C/ 57°C/ 62°C 72°C	40 sec 40sec 2 min
Sim426+DURF52	94°C 54°C 72°C	40 sec 40 sec 2 min
DURF53+DURF52	94°C 58°C 72°C	40 sec 40 sec 2 min
Sim425+ A05	94°C 54°C 72°C	40 sec 40 sec 2 min
Sim426+ A05	94°C 52°C/ 54°C/ 56°C/ 58°C/ 60°C/ 62°C/ 72°C	40 sec 40 sec 2 min
DURF51+A05	94°C 52°C/ 54°C/ 56°C/ 58°C/ 60°C/ 62°C/ 72°C	40 sec 40 sec 2 min
Sim425+ A06	94°C 54°C 72°C	40 sec 40 sec 2 min
Sim426+ A06	94°C 52°C/ 54°C/ 56°C/58°C/ 60°C/ 62°C/ 63°C/ 64°C/ 65°C/ 66°C 72°C	40 sec 40 sec 2 min
DURF51+A06	94°C 52°C/ 54°C/ 56°C/ 58°C/ 60°C/ 62°C/ 72°C	40 sec 40 sec 2 min
DURF53+A06	94°C 58°C/60°C/62°C 72°C	40sec 40sec 2min

Tabelle 10: Darstellung der getesteten PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von Gt-198, für alle Primerkombinationen mit den jeweiligen unterschiedlichen Temperaturgradienten. Alle gelisteten Kombinationen wurden verworfen. Die Gründe waren: unspezifische Banden, PCR-Produkte anderer Chromosomen und keine Erzielung eines PCR-Produktes. Zur Amplifikation der 100 cDNAs wurde die Kombination DURF53 und A05 verwendet. Amplifikation mit DURF54 und A06 wurde nur an 8 Zelllinien durchgeführt, da diese eine Doppelsequenz zeigten. Die Konditionen sind dem folgenden Text zu entnehmen

Die endgültige Amplifikation von Gt-198 ohne unspezifische Bandenmuster wurde mit den Primern DURF53, A05 und den folgenden PCR-Konditionen erreicht.

PCR-Ansatz:	5µl	10XPuffer
	5µl	dNTP
	22,5µl	H ₂ O
	1,5µl	MgCl ₂
	1µl	Polymerase
	2,5µl	DURF53
	2,5µl	AO5

PCR-Amplifizierung: 94°C für 40 sec.

94°C für 40 sec.	}	40X
60°C für 40 sec.		
72°C für 2 min.		

72°C für 7 min.

Hier fanden sich spezifische Banden auf dem Agarosegel, die der Größe des erwarteten PCR-Produktes (860Kb) entsprachen (*Abbildung 25*).

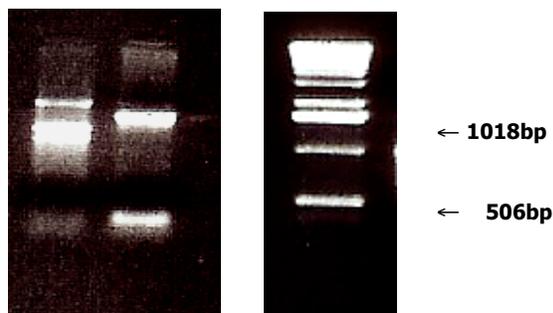


Abbildung 25: Ausschnitt eines Agarosegels. Linkes Bild) Die linke Bande zeigt das Amplikon der Primerkombination DURF53 und A06 mit unspezifischen Banden, die rechte Bande das Amplikon der Primerkombination DURF53 und A05 mit einer spezifischen Bande einer Größe von ca. 860 bp. Rechtes Bild) 1kb Leiter (Invitrogen™ life technologies®), die als Referenzsubstanz verwendet wurde

4.2.4 Überprüfung der Gt-198-Sequenz DURF53/AO5 auf Sequenzgleichheit im humanen Genom

Aufgrund der schwer zu erstellenden Oligonukleotide und PCR-Konditionen für Gt-198 wurde vermutet, dass die mit den verwendeten PCR-Konditionen erhaltene Sequenz nicht Gt-198 entsprach. Es könnte sein, dass eine andere Sequenzfolge in Form eines Pseudogens vorlag. Die erhaltene Sequenz, in *Abbildung 26* dargestellt, wurde in die Datenbank vom NCBI (National Center of Biotechnology Information) eingegeben.

```

G GCA GAA GCT GCG GCG GGA GCC GCC GGG ATC CTC CTG
AGG TAC CTG CAG GAG CAG AAC CGG CCC TAC AGC TCC CAG
GAT GTG TTC GGG AAC CTA CAG CGG GAA CAC GGA CTG GGC
AAG GCG GTG GTG GTG AAG ACG CTG GAG CAG CTG GCG CAA CAA
GGC AAG ATC AAA GAG AAG ATG TAC GGC AAG CAG AAG ATC
TAT TTT GCG GAT CAG GAC CAG TTT GAC ATG GTG AGT GAT
GCT GAC CTT CAA GTC CTA GAT GGC AAA ATC GTG GCC CTC
ACT GCT AAG GTG CAG AGC TTG CAG CAG AGC TGC CGC TAC
ATG GAG GCT GAG CTC AAG GAA TTA TCT AGT GCC CTG ACC
ACA CCA GAG ATG CAG AAA GAA ATC CAG GAG TTA AAG AAG
GAA TGC GCT GGC TAC AGA GAG AGA TTG AAG AAC ATT AAA
GCA GCT ACC AAT CAT GTG ACT CCA GAA GAG AAA GAG CAG
GTG TAC AGA GAG AGG CAG AAG TAC TGT AAG GAG TGG AGG
AAG AGG AAG AGG ATG GCT ACA GAG CTG TGT GAT GCA ATA
CTT GAA GGA TAC CCC AAG AGC AAG AAG CAG TTC TTT GAG
GAA GTT GGG ATA GAG ACG GAT GAA GAT TAC AAC GTC ACA
CTC CCA GAC CCC TGA GGG GCC CAC GGT CAG GAC TGG TGG
GGA CTG CAG GAT GTC AGA AGA GTG AGA TGT CTT GCA CTG
GCT ACC TTG TTT TTG GTT GGC TTT TGT TGT TGT TCC T

```

Abbildung 26: Sequenz, die mit den Primern DURF53 (Primer Forward) und A05 (Primer Reverse) erzielt wurde. Diese Sequenz wurde zur Überprüfung, ob tatsächlich Gt-198 amplifiziert wurde, in die Datenbank vom NCBI eingegeben. Rosa: Differenz zwischen Amplifikat und Ref Gt-198 ref XM_032813.1 Blau: Differenz zwischen Amplifikat und Referenzsequenzen Homo sapiens Gt-198 ref NM_016556.1 und Homo sapiens mRNA für TBP-1 interacting protein dbj AB030304.1 Grün: vermuteter Basenaustausch 592C → T in 2 cDNA's

Über 100 Referenzen wurden aufgezeigt. Darunter befanden sich 7, die eine Übereinstimmung von 98% oder mehr aufwiesen. Eine vollkommene Übereinstimmung zwischen dem PCR-Produkt der Zelllinien und den Ergebnissen des Sequenzvergleichs („BLAST“) zeigte sich nicht.

Die Sequenz und die Referenz „Gt-198“ mit der Genbankaccession-Nummer XM_032813.1 unterscheiden sich in vier Basenpaaren (*Abbildung 26* rosa markierte bp).

Zwei weitere ähnliche Sequenzen, Homo sapiens Gt-198 ref NM_016556.1 und Homo sapiens mRNA für TBP-1 interacting protein dbj AB030304.1, waren aufgeführt. Diese beiden sind untereinander vollkommen identisch. Hier ist nur ein Basenpaar zu der zu überprüfenden Sequenz unterschiedlich (Basenposition 109 der Referenzsequenzen NM_016556.1 und AB030304.1, *Abbildung 26* blau markiertes bp). Die restlichen 4 Referenzsequenzen wiesen mehr Sequenzdifferenzen auf und wurden deshalb nicht als mögliche Gt-198-Kandidaten angesehen.

Trotz der Übereinstimmung der beiden Referenzsequenzen für zwei unterschiedliche Gene, Gt-198 und TBP-Interacting-Protein, wurde vermutet, dass Gt-198 amplifiziert wurde. Es blieb zum Zeitpunkt der Sequenzanalyse unklar, ob es sich tatsächlich um zwei unterschiedliche Gene oder um ein Gen mit unterschiedlichen Namen handelte. Wie bereits unter Kapitel 3.1.2.4 beschrieben, weiß man heute, dass es sich hier nicht um zwei verschiedene Gene handelt, sondern um zwei verschiedene Splice-Varianten. Die hier amplifizierte Sequenz ist mit der Referenzsequenz NM_016556, bis auf die bereits erwähnte Base an Position 109, identisch. Alle amplifizierten Zelllinien stellten sich in der Referenznummer NM_016556 entsprechenden Isoform des Gens Gt-198 dar. Die Isoform entsprechend der Referenznummern NM_013290 wurde nicht amplifiziert.

4.2.5 Ergebnisse der Mutationsanalyse in Gt-198

Die 100 cDNA-Zelllinien wurden mit den beiden Primern DURF53 und A05 amplifiziert, da davon ausgegangen wurde Gt-198 als PCR-Produkt erzielt zu haben. Nach der PCR-Amplifikation wurde die Sequenzreaktion sowohl mit dem Primer Forward, DURF53, und dem Primer Reverse, A05, durchgeführt. Folglich wurden von jeder Zelllinie Sequenzen in 5' → 3'- und 3' → 5'-Richtung erzielt (*Kapitel 3.2.6*).

Alle Sequenzen wurden mit der „DNA Sequencing Analysis Software Version 3.7.8“ (*Kapitel 3.2.10*) analysiert. 78 von den 100 untersuchten cDNA's zeigten klare Sequenzen. Die restlichen 22 ließen sich auch nach Wiederholung der oben genannten Schritte (Amplifikation, Purifikation und Sequenzreaktion) nicht klar darstellen. 70 Zellreihen stellten sich in der Wildtypsequenz dar.

Doppelsequenz (frame-shift) in 8 cDNA's

Zwei Zellreihen zeigten einen Wechsel von 592C → T (Basenposition entsprechend der Referenzsequenz Gt-198 ref XM_032813.1 *Abbildung 26* grün markierte Position) und 1 bp nach diesem Basenaustausch eine Doppelsequenz im Sinne einer frameshift-Mutation (*Abbildung 27*). Der Basenaustausch bedeutet einen Aminosäurewechsel von Serin zu Phenylalanin. 6 weitere cDNA's zeigten ebenfalls die gleiche Doppelsequenz ohne den vorangegangenen Basenaustausch 592C → T.

Bild A)

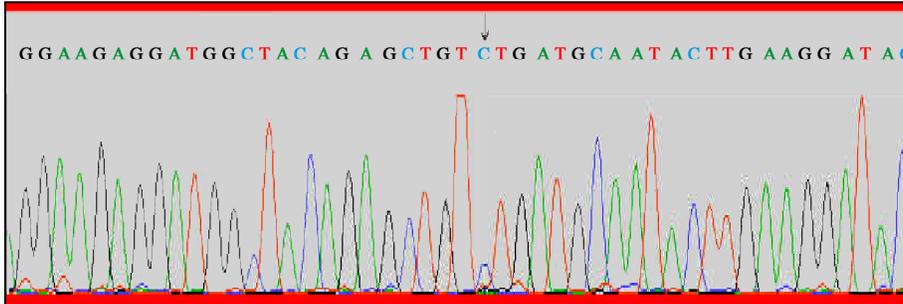


Bild B)

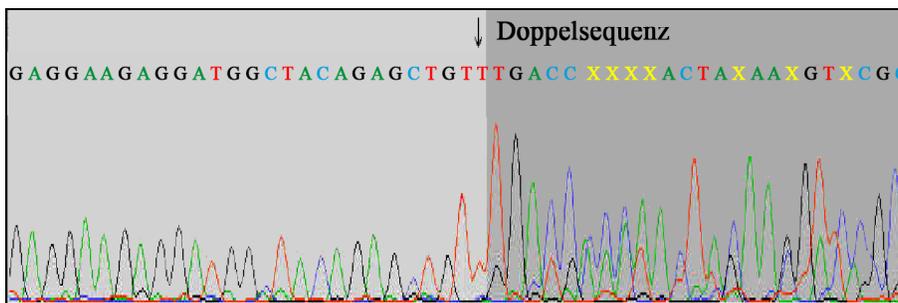


Bild C)

A	ACTACAACG	TCCGGCTTTC	TGAGTTGGGT	GGCGGAAAAG	GCGATGAGTA	50
A	AGGCCGGGC	AGAAGCTGCG	GCGGGAGCCG	CCGGGATCCT	CCTGAGGTAC	100
C	TGCAGGAaC	AGAACCGGCC	CTACAGCTCC	CAGGATGTGT	TCGGGAACCT	150
A	ACAGCGGGAA	CACGGACTGG	GCAAGGC	GGTGGTGAAG	ACGCTGGAGC	200
A	AGCTGGCGCA	ACAAGGCAAG	ATCAAAGAGA	AGATGTACGG	CAAGCAGAAG	250
A	ATCTATTTTG	CGGATCAGGA	CCAGTTTGAC	ATGGTGAGTG	ATGCTGACCT	300
T	CAAGTCCTA	GATGGCAAAA	TCGTGGCCCT	CACTGCTAAG	GTGCAGAGCT	350
T	GCAAGCTAC	CTGCCGCTAC	ATGGAGGCTG	AGCTCAAGGA	ATTATCTAGT	400
G	CCCTGACCA	CACCAGAGAT	GCAGAAAGAA	ATCCAGGAGT	TAAAGAAGGA	450
A	ATGCCTGGC	TACAGAGAGA	GATTGAAGAA	CATTAAAGCA	GCTACCAATC	500
A	ATGTGACTCC	AGAAGAGAAA	GAGCAGGTGT	ACAGAGAGAG	GCAGAAGTAC	550
T	GTAAGGAGT	GGAGGAAGAG	GAAGAGGATG	GCTACAGAGC	TGTGTGATGC	600
A	AATACTTGAA	GGATACCCCA	AGAGCAAGAA	GCAGTTCTTT	GAGGAAGTTG	650
G	GATAGAGAC	GGATGAAGAT	TACAACGTCA	CACTCCCAGA	CCCCTGAGGG	700
G	CCCACGGTC	AGGACTGGTG	GGGACTGCAG	GATGTCAGAA	GAGTGAGATG	750
T	TCTGCACTG	GCTACCTTGT	TTTTGGTTGG	CTTTTGTGT	TGTTCTctT	800
A	CTTTtcaact	ttAGCAGAGC	AGTCAGGAGA	CAAGCATAAA	CCAGAGCACT	850
G	GGTAGAGAG	GATGAGGGCT	GGTGCTGGG	GGTAGACCCc	aCgCATTTCa	900

Abbildung 27: Darstellung der gefundenen Sequenzvariation in den untersuchten cDNA's. Bild A) Darstellung der Wildtyp-Sequenz. Die unter Bild B veränderte Base ist mit einem Pfeil markiert. Bild B) Sequenzausschnitt einer der Zellreihen, die einen Basenaustausch 592Cytosin → Thymin und ein bp danach eine Doppelsequenz zeigte. Der Basenaustausch ist mit einem Pfeil und die Doppelsequenz mit grauem Hintergrund markiert. Bild C) Darstellung der Sequenz NM_016556 mit schwarz markierten Exon-Exon-Grenzen. Der fragliche Basenaustausch ist pink markiert.

Die Veränderungen (C → T bzw. Doppelsequenz) fanden sich im letzten Drittel der untersuchten Gt-198-Sequenz. Sie konnten in allen Fällen nur im Reverse-Strand

PCR-Produktes bereits vor diesem Punkt abgebrochen war. *Abbildung 27* zeigt die im codierenden Bereich liegenden Exon-Exon-Grenzen. Der hier detektierte Basenaustausch liegt nicht an einer dieser Exon-Exon-Grenzen.

Überprüfung der Doppelsequenz anhand neuer Primer

Um zu unterscheiden, ob diese Doppelsequenz durch ein homologe Sequenz einer anderen Lokalisation im menschlichen Genom verursacht worden war, oder ob es sich hierbei um eine tatsächliche Mutation oder SNP in GT-198 handelt, wurde ein neuer Primer, DURF54 (AGTGCCCTGACCACACCAGA), synthetisiert und mit Primer A06 (ACCAGAGCACTGGGTAGAGAGG) zu einem neuen Primerpaar kombiniert. Mit dieser Primerkombination und somit einem neuen PCR-Produkt von einer Länge mit ca. 740bp, war es möglich die Region der Doppelsequenz erneut zu amplifizieren.

Die PCR-Konditionen waren folgendermaßen:

94°C	für	3 min		
94°C	für	40 sec	}	40X
60°C	für	40 sec		
72°C	für	2 min		
2°C	für	7 min		

Nach Messung der jeweiligen Konzentrationen und Aufreinigung der PCR-Produkte (*Kapitel 3.2.8.*) wurde die Sequenzreaktion ebenfalls mit den beiden Primern der Amplifikation, DURF54 und A06, durchgeführt.

DURF53 wurde als zweiter Primer in reverser Richtung für die Sequenzreaktion verwendet. Jede der 8 Proben zeigte also eine Sequenz vorwärts (5' → 3') und zwei Sequenzen rückwärts (3' → 5'). Alle Zellreihen stellten sich somit in folgender Sequenz dar (*Abbildung 28*).

```

G AAC CTA CAG CGG GAA CAC GGA CTG GGC AAG GCG GTG
GTG GTG AAG ACG CTG GAG CAG CTG GCG CAA CAA GGC AAG
ATC AAA GAG AAG ATG TAC GGC AAG CAG AAG ATC TAT TTT
GCG GAT CAG GAC CAG TTT GAC ATG GTG AGT GAT GCT GAC
CTT CAA GTC CTA GAT GGC AAA ATC GTG GCC CTC ACT GCT
AAG GTG CAG AGC TTG CAG CAG AGC TGC CGC TAC ATG GAG
GCT GAG CTC AAG GAA TTA TCT AGT GCC CTG ACC ACA CCA
GAG ATG CAG AAA GAA ATC CAG GAG TTA AAG AAG GAA TGC
GCT GGC TAC AGA GAG AGA TTG AAG AAC ATT AAA GCA GCT
ACC AAT CAT GTG ACT CCA GAA GAG AAA GAG CAG GTG TAC
AGA GAG AGG CAG AAG TAC TGT AAG GAG TGG AGG AAG AGG
AAG AGG ATG GCT ACA GAG CTG TCT GAT GCA ATA CTT GAA
GGA TAC CCC AAG AGC AAG AAG CAG TTC TTT GAG GAA GTT
GGG ATA GAG ACG GAT GAA GAT TAC AAC GTC ACA CTC CCA
GAC CCC TGA GGG GCC CAC GGT CAG GAC TGG TGG GGA CTG
CAG GAT GTC AGA AGA GTG AGA TGT CTT GCA CTG GCT ACC
TTG TTT TTG GTT GGC TTT TGT TGT TGT TCC TGC TAC TTT
CAC CTT TAA GCA GAG CAG TCA GGA GAC AAG CAT AAA CCA
GAG CAC TGG GTA GAG AGG ATG AGG GCT GGT GGC TGG
GGG TAG ACC CAG CCC ATT TCA TTG TCT AAA TTG CAG TAG
CTT GAG GTT AAC ATT TAG ACT TGG AAC AAT GCT AAA GGA
AAG CAT TTG GCA ATA TTT ATT ATA ATT TAA TTT TAT ATA AAA
ATA TTT AAT TTC CTC TGG ATA GTC AAA CCT GCC AG

```

Abbildung 28: Darstellung der Sequenz DURF 54 (5' → 3') und A06 (3' → 5'). Der mit diesen Primern neu dargestellte Bereich, welcher jedoch nicht mehr im codierenden Bereich für Gt-198 liegt, ist farbig markiert.

Überprüfung der Sequenz DURF54/A06 auf Sequenzgleichheit im Humanen Genom

Wie anhand der *Abbildung 29* zu erkennen ist, sind sowohl DURF54 als auch A06 in der Sequenz im Verlauf später lokalisiert, als die beiden Primer der ersten Amplifikation. Wegen der Lokalisation von A06 zeigte die erneute Amplifikation einen weiteren bisher noch nicht dargestellten Bereich der Sequenz, jedoch in einem Bereich für Gt-198 der nicht codierenden Bereich gelegen ist (

Abbildung 28 lila markierter Bereich).

AACTACAACG	TCCGGCTTTC	TGAGTTGGGT	GGCGGAAAG	GCGATGAGTA	50
AAGGCCGGGC	AGAAGCTGCG	GCGGGAGCCG	CCGGGATCCT	CCTGAGGTAC	100
CTGCAGGAaC	AGAACCGGCC	CTACAGCTCC	CAGGATGTGT	TCGGGAACCT	150
ACAGCGGGAA	CACGGACTGG	GCAAGGCGGT	GGTGGTGAAG	ACGCTGGAGC	200
AGCTGGCGCA	ACAAGGCAAG	ATCAAAGAGA	AGATGTACGG	CAAGCAGAAG	250
ATCTATTTTG	CGGATCAGGA	CCAGTTTGAC	ATGGTGAGTG	ATGCTGACCT	300
TCAAGTCCTA	GATGGCAAAA	TCGTGGCCCT	CACTGCTAAG	GTGCAGAGCT	350
TGCAGCAGAG	CTGCCGCTAC	ATGGAGGCTG	AGCTCAAGGA	ATTATCTAGT	400
GCCCTGACCA	CACCAGAGAT	GCAGAAAGAA	ATCCAGGAGT	TAAAGAAGGA	450
ATGCGCTGGC	TACAGAGAGA	GATTGAAGAA	CATTAAAGCA	GCTACCAATC	500
ATGTGACTCC	AGAAGAGAAA	GAGCAGGTGT	ACAGAGAGAG	GCAGAAGTAC	550
TGTAAGGAGT	GGAGGAAGAG	GAAGAGGATG	GCTACAGAGC	TGTCTGATGC	600
AATACTTGAA	GGATACCCCA	AGAGCAAGAA	GCAGTTCTTT	GAGGAAGTTG	650
GGATAGGAC	GGATGAAGAT	TACAACGTCA	CACTCCCAGA	CCCCTGAGGG	700
GCCACGGTC	AGGACTGGTG	GGGACTGCAG	GATGTCAGAA	GAGTGAGATG	750
TCTTGCACTG	GCTACCTTGT	TTTTGGTTGG	CTTTTGTGTG	TGTTCTeT	800
ACTTTtcact	ttAGCAGAGC	AGTCAGGAGA	CAAGCATAAA	CCAGAGCACT	850
GGGTAGAGAG	GATGAGGGCT	GGTGGCTGGG	GGTAGACCCc	aCgCATTTCa	900
TTGTCTAAAT	TGCAGTAGCT	TGAGGTTAAC	ATTTAGACTT	GGAACAATGC	950
TAAAGGAAAG	CATTTGGCAA	TATTTATTAT	AATTTAATTT	TATATAAAAA	1000
TATTTAATTT	CCTCTGGATA	GTCAAACCTG	CCAGATATCA	AACCTGAGGA	1050
AGGCAGAAGT	GAATTTGGAG	AACTAGGGTA	GAGAGAGGTT	GCTATAAAAC	1100
GAGCATTGG	AGGGCCCACG	GCTTCACTCA	GGACCTGCTG	GGCTTGTGTA	1150
CCCCAGGAGC	CCTTTTAAGT	ATCTTTTGTA	CGCTTTTCAC	CCCACCCCA	1200
AGTCCTGGGA	GAAATGCAGG	CAACACTGAG	ACATGGGAGA	GGCCAAGATA	1250
TGCTTGACAG	AAAGGGTGAT	TTTGAGGCTC	AGTTAATATT	TCAAAATTGT	1300
AACCGTAGCA	AAACTGCATT	GGTATTTAGA	AAAATAAAAA	ATTTCCAAT	

Abbildung 29: Darstellung der cDNA des Gens Gt-198 mit Lokalisation der jeweiligen Primer im Verlauf der Sequenz, die zur Amplifikation verwendet wurden. Gelb) Primerkombination, die zur Amplifikation und zur Sequenzreaktion aller cDNAs eingesetzt wurden. Dies resultierte in die Sequenz *Abbildung 26*. Grau) Primerkombination, die zur Amplifikation und zur Sequenzreaktion der 8 Zelllinien, die eine Doppelsequenz aufwiesen, verwendet wurde. Graue Schrift) Sequenzbereich der langen Isoform von Gt-198

Mutationsanalyse der Sequenz DURF54/A06

Nach Analyse der Sequenzprodukte der Primerkombination DURF65 und A06 zeigten alle 8 Proben Wildtyp-Sequenz im Bereich der zuvor dargestellten Doppelsequenz. Auch die beiden Proben, die während der ersten Amplifikation einen Basenaustausch von C→T gezeigt hatten, waren nun in Wildtyp-Sequenz dargestellt. Der Basenaustausch war nicht mehr zu sehen (*Abbildung 30*), weder in forwärts gerichteter (5' → 3') noch in rückwärts gerichteter (3' → 5') Translation.

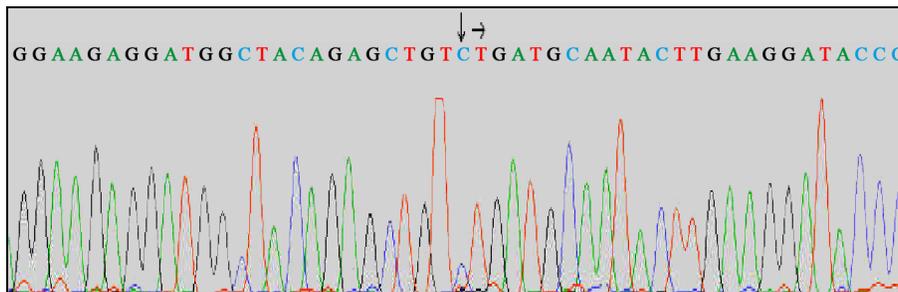


Abbildung 30: Originalausdruck der gleichen Sequenz wie in Abbildung 24 mit DURF54 (Primer Forward) und A06 (Primer Reverse). Die Stellen an denen sich vorher der Basenaustausch von C zu T und der Beginn der Doppelsequenz darstellten, sind wieder mit einem Pfeil markiert. Diesmal stellt sich die Sequenz als Wildtyp dar, eine Mutation konnte somit nicht verifiziert werden.

4.2.6 Zusammenfassung der Gt-198-Mutationsanalyse

Es konnten 78 von 100 cDNA-Zellreihen von BRCA1/2-Mutationsträgerinnen mit einer eindeutigen Wildtyp-Sequenz dargestellt werden. Im Gegensatz zu den in den Genomdatenbanken dargestellten Sequenzen für Gt-198 haben alle 78 Zellreihen an der Position 73 ein G anstelle eines T (*Abbildung 26 rosa markierte Base*). Dies würde einen Aminosäureaustausch von Valin zu Glycin im Codon 10 bedeuten. Somit würde es sich hierbei um eine funktionell relevante Veränderung handeln. Somit wiesen 156 Allele von BRCA1/2-Mutationsträgerinnen keine Mutation oder Sequenzvariante in Gt-198 auf. An diesem Punkt wurde eine weitere Mutationsanalyse in Gt-198 abgebrochen, da Gt-198 als „Modifier-Gen“ für die Erkrankungswahrscheinlichkeiten bei BRCA1/2-Mutationsträgerinnen unwahrscheinlich erscheint.

5. Diskussion

5.1 Diskussion über die Ergebnisse der Ovarialkarzinome

Die Ovarialkarzinompenetranz liegt bei BRCA1/2-Mutations-trägerinnen nicht bei 100%. Die umfangreichste Metaanalyse ^{Antoniou, et al. 2003} beschreibt das kumulative Risiko für BRCA1-Mutationsträgerinnen bis zum 70. Lebensjahr an Ovarialkarzinom zu erkranken mit 44% bzw. für BRCA2 Mutationsträgerinnen mit 20%. Diese Zahlen kontrastieren deutlich zu dem Risiko der Normalbevölkerung, in der das Risiko bei 1-2% anzusiedeln ist. Es gibt Daten, die die Hypothese der Heterogenität von Allelen in Bezug auf das Erkrankungsrisiko unterstützen. Gemeint ist, dass unterschiedliche Mutationen mit unterschiedlichem Erkrankungsrisiko verbunden sind. Speziell BRCA2-Mutationen in Familien mit einem oder mehreren Fällen von Ovarialkarzinom tendieren dazu, sich in einer zentralen Region, „Ovarian Cancer Cluster“ genannt, anzuhäufen. Eine Studie des „Breast-Cancer-Linkage-Cosortiums“ zeigt, dass Mutationen in eben diesen Ovarialkarzinom-Cluster-Regionen sowohl mit einem niedrigeren Risiko für Mammakarzinom als auch mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Ovarialkarzinom im Vergleich zu Mutationen außerhalb dieser Regionen verbunden sind ^{Antoniou, et al. 2003}.

Da nicht 100% der Mutationsträgerinnen an Ovarialkarzinom erkranken, sollte nach weiteren genetischen Einflussfaktoren, z.B. assoziierende Polymorphismen in anderen Kandidatengenomen gesucht werden.

In dieser Arbeit sollte anhand einer Assoziationsstudie festgestellt werden, ob zwischen SNPs in DNA-Reparationswegen (homologe Rekombination und „Non-Homologous End-Joining“) und der Erkrankungswahrscheinlichkeit eine Verbindung besteht. Es wurde DNA aus Ovarialtumoren auf Mutationen in BRCA1/2 hin untersucht und im Anschluss per real-time quantitativer PCR überprüft, ob unter BRCA1/2-Mutationsträgerinnen eine höhere Frequenz bestimmter SNPs nachzuweisen ist, als bei Nicht-Mutationsträgerinnen. Die hier detektierten SNPs waren bereits Inhalt mehrerer Studien, sowohl bezüglich ihrer modifizierenden Potenz und der Brustkrebserkrankungshäufigkeit als auch ihrer Ovarialkarzinomerkrankungs-

Mechanismen seien Kandidaten, die die Suszeptibilität von Mutationsträgerinnen beeinflussen. Es wurden SNPs in XRCC3, welches in der homologen Rekombinations-Reparatur involviert ist, und XPD, welches an der Nucleotid Exzision-Reparatur beteiligt ist, für die Detektion ausgewählt.

Bisher wurde in Studien versucht eine Assoziation zwischen Polymorphismus und Erkrankung nachzuweisen. In dieser Studie sollte festgestellt werden, ob BRCA-mutationsassoziierte Ovarialkarzinome eine andere SNP-Verteilung in DNA Reparaturgenen aufweisen als nicht-BRCA-mutationsassoziierte Ovarialkarzinome.

XRCC3: A17893G

In der vorliegenden Untersuchung wurde Tumorgewebe von Ovarialkarzinomen auf das Vorhandensein bereits beschriebener Polymorphismen in DNA-Reparaturmechanismen (XRCC und XPD) analysiert. Der von uns untersuchte SNP XRCC3 wurde von Auranen et al. ^{Auranen, et al. 2005} in Keimbahn-DNA von Ovarialkarzinompatientinnen untersucht. Sowohl die von uns untersuchten Tumorgewebeproben (mit oder ohne Mutation in BRCA1/2) als auch die von Auranen et al. ^{Auranen, et al. 2005} untersuchten Keimbahn-DNA-Proben weisen gleiche Allelfrequenzen für das seltene Allel „G“ auf (33%).

Kuschel et al. ^{Kuschel, et al. 2002} konnten bei Mammakarzinomassoziationsstudien für XRCC3 A17893G einen protektiven Effekt ($P=0,008$) detektieren: sowohl heterozygote als auch homozygote Träger des seltenen Allels G hatten ein signifikant niedrigeres Risiko, ein Mammakarzinom zu entwickeln, verglichen mit den homozygoten AA-Allel-Trägern (homozygote $OR=0,8; 95\%KI\ 0,7-0,9$; heterozygote $OR=0,8; 95\%KI\ 0,6-1,0$). Auranen et al. ^{Auranen, et al. 2005} sowie Kuschel et al. ^{Kuschel, et al. 2005} stellten jedoch fest, dass selbst bei Fallzahlen von bis zu $n=3634$ untersuchten Keimbahn-DNA's kaum Assoziationen von DNA Reparaturgenpolymorphismen zu Mamma- bzw. Ovarialkarzinomerkrankungen erzielt werden können. Ihr Patientenkollektiv bestand aus Patientinnen, die an Ovarialkarzinom erkrankt waren, während ihre Kontrollgruppe aus einer randomisierten anonymen weiblichen Probandengruppe selektiert worden war. Untersucht wurden die Polymorphismen in Keimbahn-DNA. Lediglich in einer Untergruppe von serös epithelialen Ovarialkarzinomen war der SNP XRCC3 A17893G in Keimbahn-DNA sowohl für die heterozygoten Allele als auch für die selteneren homozygoten Allele mit einem leicht protektiven Effekt ($OR\ 0,9$ stat. signifikant bzw. $OR\ 0,8$ stat. nicht signifikant) verbunden.

Han et al. ^{Han, et al. 2004} konnten keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus XRCC3 A17893G und Mammakarzinom feststellen. Jedoch wurden hier die 1004 Fälle nicht nach ihrem histologischen Typ unterteilt.

Somit stellt sich die Frage, ob sich dieser protektive Effekt bei serös epithelialen Ovarialkarzinomen unter Tumorgewebe ähnlich darstellt wie in der Keimbahn-DNA. Da hier jedoch ebenso wie bei Han et al. ^{Han, et al. 2004} keine genauen Angaben über die Histologie der einzelnen Tumoren zur Verfügung standen, kann hierzu keine Aussage gemacht werden. Weiterhin kann aufgrund der Fallzahl keine Unterscheidung bezüglich der Effekte des SNPs in serösen epithelialen Tumoren gemacht werden. Man sollte diesen SNP erneut an serösen Ovarialkarzinomen mit einer größeren Fallzahl, sowohl in Keimbahn als auch an Tumorgewebe untersuchen. Dadurch könnte ein eventuell vorhandener protektiver Effekt des SNP bewiesen werden.

Ein Vorteil dieser Arbeit ist, dass nach BRCA1/2 stratifiziert werden konnte, was bisher bei Ovarialkarzinomen noch nicht durchgeführt worden ist. Die beiden Patientenkollektive wurden in Mutationsträgerin und Nicht-Mutationsträgerin unterschieden. Mit einer OR von 1,7 für homozygote SNP-Trägerinnen wird hier suggeriert, es könne eine andere SNP-Verteilung in der Gruppe der Tumoren, die BRCA1/2 assoziiert sind, vorliegen als in der Gruppe der Tumoren, die nicht BRCA1/2-Mutations assoziiert sind. Auch hier stellt sich die geringe Fallzahl als Fehlerquelle für falsch-positive Ergebnisse dar.

XRCC3: T241M

Der Polymorphismus XRCC3 T241M, der ebenfalls Bestand dieser beiden vorangehenden Studien ^{Auranen, et al. 2005; Kuschel, et al. 2005} war, sollte hier ebenfalls untersucht werden. Jedoch konnten hier keine Ergebnisse erzielt werden.

Gründe für möglichen Ausfall der TaqMan Detektion des Polymorphismus XRCC3 T241M können vielerorts sein. Möglicherweise handelt es sich um einen systematischen Fehler. Hierbei kann es sich um Pipettierfehler, falsch gewählte Annealingtemperaturen etc. handeln. Aufgrund eines technischen Defektes konnte diese Versuchsreihe nicht wiederholt werden und somit die Ursache für das Misslingen dieser Testreihe nicht eliminiert werden. Folglich wurden für diesen SNP keine verwertbaren Ergebnisse erzielt.

XPD

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle in dem Nukleotide-Excision Reparaturmechanismus stellen Polymorphismen in XPD weitere mögliche Kandidaten für Suszeptibilitätsgene von Karzinomen dar. So konnten Lunn et al. ^{Lunn, et al. 2000} eine höhere Anzahl an Chromatidaberrationen in Individuen mit dem Genotypus Lys/Lys751 XPD feststellen, als innerhalb der Individuen mit dem Allel Gln751. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung das häufige Allel Lys751 verändere das Proteinprodukt so, dass es zu einer suboptimalen Reparatur von DNA-Schäden kommt, die z.B. durch Strahlenbelastung hervorgerufen worden war. Unterstützend kommt hinzu, dass bereits ein Einfluss auf das Mammakarzinomerkrankungsrisiko unter BRCA1-Mutationsträgerinnen beobachtet werden kann ^{B. Amirmani, et al. 2001}. So waren Polymorphismen in XPD und das Risiko an einem Karzinom zu erkranken bereits Inhalt verschiedenster Studien. Diese Studien umfassten unterschiedliche Karzinome wie, Blasen- ^{Matullo, et al. 2001}, Ösophagus-, Bronchial- ^{Divine, et al. 2001; Hou, et al. 2002; Le Marchand, et al. 2002; Park, et al. 2002; Zhou, et al. 2002}, Mamma- ^{Tang, et al. 2002}, Prostata- ^{Rybicki, et al. 2004}, und Magenkarzinom ^{Shen, et al. 2000} sowie auch reife Gliome ^{Chen, et al. 2000}. Die Ergebnisse dieser Studien waren nicht schlüssig, allerdings wurde von Goode et al. ^{Goode, et al. 2002} gefolgert, dass aufgrund zu kleiner Fallzahlen der einzelnen Studien möglicherweise falsch-positive oder auch falsch-negative Ergebnisse erzielt worden waren.

Es liegen für das XPD (=ERCC2) Gen in der Literatur keine Daten zu Ovarialkarzinomen vor. Eine Arbeit von Kuschel et al. ^{Kuschel, et al. 2005} zeigt an Keimbahn-DNA von Mammakarzinompatientinnen, dass die seltenen Allele von Lys751 → Gln (37%) und von IVS4 A → G (46%) in ähnlichen Bereichen liegen.

Die hier untersuchten SNPs stellten sich in dieser Arbeit im Tumorgewebe genauso verteilt dar, wie in der Keimbahn-DNA ^{Auranen, et al. 2005; Kuschel, et al. 2005}. Dies scheint unabhängig von der Tatsache zu sein, ob (Tumorgewebe oder Keimbahn-DNA) BRCA1/2 positiv ist oder nicht (*Tabelle 6, Kapitel 4.1.7* und *Tabelle 7, Kapitel 4.1.8*). Nur bei XPD Lys751 → Gln scheint die seltene Allelfrequenz bei den BRCA1/2 – negativ getesteten Tumoren häufiger zu sein (*70%, Tabelle 7, Kapitel 4.1.8*). In der Gruppe der Tumoren mit Mutation in BRCA wurde eine Frequenz für das seltene Allel von 0,375 festgestellt, während in der Kontrollgruppe die Frequenz bei 0,54 lag. Sowohl die OR für Heterozygot (0,24) als auch die OR für Homozygot (0,37) lassen

eine Assoziation zwischen der Wildtypsequenz und nicht BRCA1/2 assoziierten Tumoren vermuten.

Auch in der Arbeitsgruppe um Rebbeck konnte für das Lys-Allel des SNPs Lys751 → Gln in Exon 23 des XPD-Gens eine Assoziation mit erhöhtem Erkrankungsrisiko unter BRCA1-Mutationsträgerinnen festgestellt werden ^{B. Amirimani, et al. 2001} (age-adjusted OR=2,29; 95% KI 1,00-5,24). Die Hypothese einer solchen Modifier-Funktion wird zusätzlich unterstützt von den Resultaten der Arbeitsgruppe um Seker ^{H. Seker, et al. 2001}. Hier wurde festgestellt, dass vorhandene Polymorphismen (Lys751 → Gln, Asp312 → Asn und Lys751 → Gln/Asp312 → Asn) in XPD die DNA Reparaturkapazität negativ beeinflussen, allerdings bei gleichbleibender Bindungskapazität an p53 ^{H. Seker, et al. 2001}.

In einer weiteren Studie ^{Justenhoven, et al. 2004} mit n=688 Fällen mit Mammakarzinom und 724 Kontrollpersonen ohne Mammakarzinom wurde ein signifikant erhöhtes Risiko für das Allel GG des Polymorphismus XPD 6540G → A (OR=2,06; 95%KI=1,39-3,07) festgestellt. Für XPD Lys751 → Gln konnte kein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Fällen detektiert werden. Jedoch schien das beobachtete Risiko noch durch ein kombiniertes Auftreten der beiden Polymorphismen XPD 6540GG und XPD Lys751 → GlnCC signifikant weiter gesteigert zu werden (OR=3,96; 95%KI=1,76-7,74). Wie in einer bereits vorausgegangen Studie ^{Seker, et al. 2001}, in der geringere apoptotische Tätigkeit, in denjenigen Zellen die homozygot für Asn an Position 312 waren, festgestellt worden war, konnte auch hier für homozygote Träger für Asp an Position 312 eine geringere apoptotische Kapazität und somit ein erhöhtes Risiko für Mammakarzinom detektiert werden.

In einer weiteren Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass diejenigen mit einer suboptimalen DNA Reparatur mit einem größeren Risiko durch PAH-DNA-Produkte (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) und Rauchen verbunden sind als diejenigen, die effiziente Reparaturmechanismen besitzen ^{Terry, et al. 2004}. Es wurde eine stärkere Assoziation zwischen dem Genotyp und Mammakarzinomrisiko unter Frauen mit einem höheren Niveau an PAH-Produkten wie unter Frauen mit nichtdetektierbaren PAH-Produkten gezeigt. Verschiedene Studien untersuchten die funktionale Signifikanz des XPD-Gens. Eine Studie berichtet von einer Assoziation zwischen dem XPD-Gln-Allel und Defekten in der DNA Reparatur Nucleotide Excision Repair ^{Au, et al. 2003}. Andere Studien fanden heraus, dass das Allel Gln mit

all diese Studien stimmen überein, im Gegenteil es existieren neben Studien^{Duell, et al. 2000}, die keine Korrelation zwischen XPD und den DNA Reparaturmarkern polyaromatische Produkte und Schwesterchromatid-Austausch detektieren konnten, sogar Studien^{Lunn, et al. 2000}, die von einer Assoziation des Allels Lys in homozygoter Form und einer nicht optimalen DNA Reparatur berichten.

Diese Studie weist auf eine Modifier-Funktion von XPD hin und zeigt eine Assoziation der seltenen Allelfrequenz unter BRCA1/2-negativ getesteten Tumoren. Dies muss nun an größeren Kollektiven statistisch überprüft werden.

5.2. Diskussion Gt-198

Gt-198 ist ein dem BRCA1-Gen benachbartes Gen, welches im Rahmen der Klonierung des BRCA1-Gens kurzzeitig für das BRCA1-Gen gehalten wurde. In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Gt-198 bei Vorliegen von Genveränderungen einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko für das Mamma- und/oder Ovarialkarzinom als so genanntes „Modifizieren“ ausübt. In Hochrisikofamilien sollte eine Mutationsanalyse durchgeführt werden.

In einem zweiten Schritt standen n=140 DNA-Proben von BRCA1/2-positiv getesteten gesunden Probandinnen sowie an Ovarialkarzinom oder Mammakarzinom erkrankten Probandinnen zur Verfügung. Es sollte der in der Mutationsanalyse unter den Hochrisikofamilien detektierte Single Nucleotide Polymorphismus oder die detektierte aberrierende Mutation mittels TaqMan in dem Kollektiv der Mutationsträgerinnen untersucht werden. Im Anschluss sollten die Ergebnisse dieser SNP-Detektion mit dem Erkrankungsstatus der Mutationsträgerinnen korreliert werden.

Alle Proben der Hochrisikofamilien wurden auf Sequenzveränderungen in Gt-198 untersucht. Es konnte jedoch keine Genvariation detektiert werden. Die Differenz zwischen der hier amplifizierten Sequenz und der in der Datenbank als Gt-198 beschriebenen Sequenz bleibt ungeklärt. Es wurde in allen hier amplifizierten Zelllinien die gleiche Sequenz amplifiziert. Es musste daher der Entschluss gefasst werden, den zweiten geplanten Schritt, nämlich die Detektion eines SNPs oder einer

Dies führt zu der Annahme, dass die Detektion einer Sequenzveränderung, die nach den Ergebnissen dieser Arbeit eine derart niedrige Frequenz unter Hochrisikofamilien (144 Mutationsträgerinnen und Mutationsträgern) hat, zu keinem signifikanten Ergebnis führt.

Hieraus schließen wir, dass Gt-198 kein Modifier-Gen für das Mamma- bzw. Ovarialkarzinom ist.

Frühzeitig wurde vermutet, dass neben BRCA1/2 andere genetische und auch nicht-genetische Faktoren eine Rolle in der Tumorgenese der unterschiedlichen Individuen spielen. Das Proto-Onkogen HRAS1 auf Chromosom 11p15.5 beinhaltet eine unterschiedliche Anzahl an Tandemwiederholungen (VNTR). Die unterschiedliche Anzahl der Tandemwiederholungen von HRAS1 ist ein möglicher genetischer Modifier für die Penetranz von Karzinomen. Vier gewöhnliche Allele sind bisher identifiziert worden. Sie unterscheiden sich in der Anzahl der Wiederholungen (30, 46, 68 und 84). Phelan et al. ^{Phelan, et al. 1996} konnte ein 2,11-fach höheres Risiko für ein Ovarialkarzinom unter BRCA1-Mutationsträgerinnen für diejenigen Probandinnen zeigen, die ein oder zwei dieser seltenen Allele der VNTR's des Protoonkogen HRAS1 tragen.

TP53 enthält neben einer Vielzahl an Mutationen auch verschiedene Polymorphismen. Einer dieser Polymorphismen, eine Variation eines einzigen Basenpaares G→C, das zu einem Aminosäureaustausch (Prolin zu Arginin) führt, befindet sich an Nukleotidposition 215 (Codon72). Die Ergebnisse von Martin et al. ^{Martin, et al. 2003} ließen vermuten, TP53 sei ein weiterer Modifier für die Manifestationswahrscheinlichkeit unter BRCA1-Mutationsträgerinnen. Die Arbeitsgruppe um Martin et al. ^{Martin, et al. 2003} stellte fest, dass die Anwesenheit des R72-Allels in TP53 mit einem niedrigeren Alter zum Diagnosezeitpunkt von Mammakarzinom unter den 27 untersuchten BRCA1-Mutationsträgerinnen assoziiert war.

Mehrere Studien untersuchen den Einfluss der Länge der CAG-Wiederholungen in dem Androgenrezeptor-Gen AR, auf das Erkrankungsrisiko unter BRCA1-Mutationsträgerinnen. Rebbeck et al. ^{Rebbeck, et al. 1999a} verglich unter BRCA1-Mutationsträgerinnen 165 Frauen, die an Mammakarzinom erkrankt waren mit 139 Frauen, die nicht erkrankt waren. Diese Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass Mutationsträgerinnen mit langen CAG-Wiederholungen in dem

Wiederholungen. Sowohl Kadouri et al. ^{Kadouri, et al. 2001} als auch von Dagan et al. ^{Dagan, et al. 2002} konnten dies in ähnlich großen jüdischen Probandengruppen weder beweisen noch widerlegen. Menin et al. ^{Menin, et al. 2001} konnten in einer kleinen Gruppe von 11 BRCA1/2-Mutationsträgerinnen keine Assoziation zwischen der Länge an AR-CAG Wiederholungen und dem Alter zum Diagnosezeitpunkt bei Patientinnen mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinom herstellen.

Wang et al. ^{Wang, et al. 2001} untersuchten genetische Variationen in RAD51. RAD51 beteiligt sich ähnlich wie BRCA1/2-Genprodukte an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination. Es wurden Polymorphismen zwischen BRCA1/2-Mutationsträgerinnen mit (n=317) und ohne (n=263) Mammakarzinom verglichen. Es konnte ein nicht-translatierter SNP 135G→C in RAD51 identifiziert werden. Es wurde gefolgert, dass eine signifikante Assoziation zwischen Mammakarzinomrisiko und dem selteneren Allel „C“ an Nukleotidposition 135 besteht. BRCA1/2-Mutationsträgerinnen hatten ein 3-fach höheres Risiko verglichen mit denjenigen Mutationsträgerinnen ohne SNP. Ein gegensätzlicher Effekt wurde unter den Ovarialkarzinompatientinnen beobachtet. Jakubowska et al. ^{Jakubowska, et al. 2003} konnten in einer Fall-Kontroll-Studie mit 83 Paaren weiblicher BRCA1-Mutationsträgerinnen (5381insC, Fall =Probandin mit Mammakarzinom, Kontrolle =Probandin ohne Mammakarzinom) zeigen, dass das Allel 135C des RAD51 ein Modifier für das Mammakarzinomrisiko unter polnischen BRCA1-Mutationsträgerinnen darstellt.

Levy-Lahad et al. ^{Levy-Lahad, et al. 2001} stellte fest, dass das Allel mit der Variante 135C mit einem 4-fach erhöhten Mammakarzinomrisiko unter BRCA2–6174delT Mutationsträgern verbunden ist und keinen Einfluss auf das Risiko bei BRCA1 185delAG/5382insC-Mutationsträgerinnen nimmt. Die Ergebnisse von Levy-Lahad et al. ^{Levy-Lahad, et al. 2001} konnten von Kadouri et al. ^{Kadouri, et al. 2004} bestätigt werden. Auch hier wurde eine Assoziation zwischen dem Allel 135C und einem erhöhten Risiko für Mammakarzinom bei BRCA2-Mutationsträgerinnen festgestellt. Kadouri et al. ^{Kadouri, et al. 2004} konnte jedoch im Gegensatz zu Jakubowska et al. ^{Jakubowska, et al. 2003} keinen Einfluss des genannten SNP bei BRCA1-Mutations-trägerinnen bzw. bei Nicht-Mutationsträgerinnen aufweisen.

Die Arbeitsgruppe um Amirimani et al. ^{B. Amirimani, et al. 2001} stellte die Hypothese auf, dass SNPs im Nucleotide-Excision-Reparatur-Gen XPD das Erkrankungsrisiko bei Mammakarzinom beeinflusst. Sie untersuchten 155 Mammakarzinompatientinnen (100 mit

und 50 Fälle ohne Mammakarzinom) hinsichtlich 4 verschiedener SNPs in XPD (Exon6 C → A 156Arg, Exon10 Asp312 → Asn, Exon22 C → T Asp711 und Exon23 Lys751 → Gln) und fanden heraus, dass der SNP Lys751 → Gln in Exon 23 mit einem erhöhten Risiko für Mutationsträgerinnen an Mammakarzinom zu erkranken assoziiert war. Die Fallzahl ist jedoch klein, so bleibt eine Überprüfung dieser Ergebnisse abzuwarten.

Chromosomale Aberrationen sind in Mammatumoren von BRCA1/2-Mutationsträgerinnen häufiger als in sporadisch auftretenden Tumoren zu finden Johannsdottir, et al. 2004. Auch anhand von Linkage-Studien wurde nach Modifiern für BRCA1/2-Mutationsträgerinnen gesucht. Nathanson et al. Nathanson, et al. 2002 stellten die Hypothese auf, dass Modifier-Gene Regionen der Imbalanz in den Tumoren von BRCA1-Mutationsträgerinnen lokalisiert sind, wie sie beispielsweise für Chromosom 4p,4q und 5q bereits beschrieben worden sind Tirkkonen, et al. 1997; Tirkkonen, et al. 1998. Die Arbeitsgruppe beobachtete eine signifikante Kopplung der Position D5S1471 auf Chromosom 5q und BRCA1-Mutationsträgerinnen. Dies lässt auf Chromosom 5q33-34 ein oder mehrere Gene vermuten, die das Risiko für Mammakarzinom unter BRCA1-Mutationsträgerinnen beeinflussen können.

Dennoch ist davon auszugehen, dass weitere Faktoren das Erkrankungsrisiko der Mutationsträgerinnen beeinflussen, da die Krankheitspenetranz nicht 100% beträgt.

Aufgrund der Ergebnisse einer populationsbasierten Studie vermutet Antoniou et al. Antoniou, et al. 2001 mindestens ein weiteres Suszeptibilitätsgen für Mammakarzinome neben BRCA1 und BRCA2. So könne entweder ein nach den Mendelschen Vererbungsregeln rezessiv vererbtes Gen oder eine Anzahl von Genen mit niedriger Penetranz mit zusätzlichem Einfluss auf die familiär bedingten Mammakarzinome unabhängig von BRCA1/2-mutationstragenden-Familien verantwortlich gemacht werden Antoniou, et al. 2001.

Penetranzschätzungen des Mamma- sowie Ovarialkarzinoms sind grundsätzlich in Studien, die auf Familien mit mehreren Krankheitsfällen basieren, höher als in Studien, die auf unselektierten Fällen basieren. Eine Studie, basierend auf einer Familienhistorie von 120 freiwilligen Ashkenazi Juden, unter denen eine von drei Foundermutationen, die für diese Population üblich ist, detektiert worden war, wurden noch niedrigere Penetranzschätzung erhoben, als in Studien mit Familien mit mehreren Krankheitsfällen.

Es gibt Daten, die die Hypothese der Heterogenität von Allelen in Bezug auf das Erkrankungsrisiko unterstützen. Gemeint ist, dass unterschiedliche Mutationen mit unterschiedlichem Erkrankungsrisiko verbunden sind. Speziell BRCA2-Mutationen in Familien mit einem oder mehreren Fällen von Ovarialkarzinom tendieren dazu, sich in einer zentralen Region, „Ovarian Cancer Cluster“ genannt, anzuhäufen. Eine Studie des „Breast-Cancer-Linkage-Consortiums“ zeigt, dass Mutationen in eben diesen Ovarialkarzinom-Cluster-Regionen sowohl mit einem niedrigeren Risiko für Mammakarzinom als auch mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Ovarialkarzinom im Vergleich zu Mutationen außerhalb dieser Region verbunden sind ^{Antoniou, et al. 2003}.

Neben diesen inhaltlichen Punkten sind auch technische Probleme bei der Sequenzierung zu diskutieren:

Als erstes muss diskutiert werden, ob es sich bei der mit den Primern A und B amplifizierten Sequenz überhaupt um Gt-198 handelte. Da es unklar war, ob es sich bei den Proteinen Gt-198 und TBP-Interacting-Protein um ein und dasselbe Protein handelt oder ob es sich hier um zwei unterschiedliche Gene mit einer großen Übereinstimmung der Gensequenz handelt. Es konnte zum Zeitpunkt der Laborarbeiten keine Sequenz mit 100%iger Übereinstimmung in der Datenbank gefunden werden. Sowohl die Referenznummern Genbankaccession-Nummer XM_032813.1 als auch die Referenznummer Homo sapiens mRNA für TBP-1 interacting protein dbj AB030304.1 wiesen, wie unter *Kapitel 4.2.4* bereits beschrieben, Differenzen zu den in unseren Versuchen sequenzierten Amplifikaten auf. Auch die zu diesen beiden Genen veröffentlichten Artikel ließen keinen endgültigen Schluss zu.

Heute jedoch weiß man, dass es sich bei den beiden beschriebenen Genen um ein Gen mit verschiedenen Splice-Varianten handelt. Die von uns als Gt-198 vermutete Sequenz auch die Differenz an Position 73 wurde in der heute gelisteten Sequenz verbessert. Geblieben ist noch die Differenz an Position 109.

Eine Überprüfung der heute gelisteten SNPs bringt keine weiteren Erkenntnisse. Es sind 3 SNPs in der Datenbank für den codierenden Bereich von Gt-198 gelistet (wie in *Abbildung 31* dargestellt).

A	A	A	A	A	50
A	A	A	A	A	100
C	A	A	A	A	150
A	C	A	A	A	200
A	A	A	A	A	250
A	T	C	A	A	300
T	C	A	A	A	350
T	G	C	A	A	400
G	C	C	A	A	450
A	T	G	C	A	500
A	T	G	C	A	550
T	G	T	A	A	600
A	A	T	A	A	650
G	G	A	T	A	700
G	C	C	A	A	750

Abbildung 31: Darstellung der Lokalisation der in der Datenbank gelisteten SNPs im codierenden Bereich von GT-198 mit der Referenznummer NM_016556. Gelb) refSNP34493813; Grün) refSNP9903184; Lila) ref SNP 2292754 Des Weiteren sind die Exon-Exon-Grenzen von GT-198 schwarz dar-gestellt.

Der Basenaustausch an Position 109 entspricht jedoch keinem der in der Datenbank aufgeführten SNPs.

Wenn man jedoch die Penetranz der einzelnen SNPs betrachtet, fällt auf, dass in unterschiedlichen Populationen die Penetranz einzelner SNPs bei fast 1,0 liegt (SNP rs2292754 T/T 1,0). Da das Patientenkollektiv der hier untersuchten Probandinnen französisch-stämmig ist, wäre ein SNP an der Position 109 mit einer sehr hohen Penetranz unter französisch-stämmiger Population denkbar.

Das Auftreten der Doppelsequenz bleibt letztendlich nicht geklärt. Heute weiß man, dass Gt-198 zwei verschiedene Splice-Varianten besitzt. Somit wäre hier ein Splicing unterschiedlicher Exons, zum einen die Exonvariante mit der längeren Sequenz und zum anderen die Exonvariante mit der kürzeren Sequenz als Ursache für die Doppelsequenz denkbar. Auch ein Fehler beim Splicing der einzelnen Exons wäre eine Erklärung für das detektierte Phänomen. Jedoch wie in *Abbildung 31* zu erkennen ist, liegt der Beginn der Doppelsequenz nicht an einer Exon-Exon-Grenze. Somit kann dies nicht ursächlich für das aufgetretene Phänomen sein. Somit bleiben technische Fehler zu diskutieren.

Während der Suche eines geeigneten Primerpaares zur Sequenzierung von Gt-198, ergaben sich Komplikationen, da immer wieder unspezifische Banden oder Teile anderer Chromosomenabschnitte ebenfalls mit dargestellt waren. Dabei können die Probleme an unterschiedlichen Stellen des Versuchs begründet liegen.

cDNA Synthese

Es wurde in Erwägung gezogen, zu wenig cDNA synthetisiert zu haben. Folglich wurde die cDNA-Synthese wiederholt und die Konzentrationen mit guten Ergebnissen erneut gemessen. Auch die hiermit nochmals durchgeführte PCR und anschließende Sequenzierreaktion konnte bei den genannten Proben keine besseren Ergebnisse erzielen.

Primer der Polymerasekettenreaktion

Prinzipiell gilt bei der PCR die Primerwahl als Fehlerquelle. Da sich aber mit der Primerkombination DURF53 und A05 sehr gute Sequenzen darstellen ließen, ist die Primerwahl an sich als Ursache für die hier nicht verwertbar erhaltenen Sequenzen unwahrscheinlich. Es ist nicht auszuschließen, dass Primer z.B. aufgrund mangelhafter Lagerung (zu warm) fehlerhaft andocken. Dies hätte dazu führen müssen, dass für alle mit diesem defekten Primer synthetisierten Sequenzen eine schlechte bzw. gar keine Sequenz vorliegt. Da sich mit den Primern immer wieder sehr gute Sequenzen darstellen ließen, wurde diese Fehlermöglichkeit verworfen.

Es muss sich theoretisch um einen Fehler handeln, der spezifisch für diejenigen Zelllinien ist, die mehrfach nicht zur Darstellung gebracht werden konnten. Ein derartiger möglicher jedoch sehr seltener Fehler, der als weitere Ursache für Fehler während der Sequenzierung der 22 Zellreihen diskutiert werden kann, stellt das Mispriming dar. Wie bei Kuschel et al. ^{Kuschel, et al. 2001} beschrieben worden ist, kann z.B. Mispriming aufgrund eines Mismatches der Primer an der Andockstelle durch einen SNP oder eine Mutation entstehen. Dies setzt jedoch eine homozygote Form der DNA-Variante voraus. Bei einer heterozygoten Mutation würde das normale Allel amplifiziert werden. Somit würde eine Mutation an dieser Stelle unerkant bleiben. Falls hier ein Mispriming die Ursache für das Misslingen der Sequenzierreaktion ist, müssten alle 22 Proben einen SNP oder eine Mutation in homozygoter Form im Bereich der Andockstelle des Primers aufweisen. Dies erscheint jedoch so

unwahrscheinlich, dass auch dieser systematische Fehler als Ursache verworfen wurde.

Annealingtemperatur

Grundsätzliche Fehlerquellen, wie ungünstige Annealingtemperatur oder zu geringe Magnesiumkonzentration, werden als unwahrscheinlich erachtet. Solch ein systematischer Fehler kann nicht zu einem Ausfall nur einzelner Sequenzen führen.

Sequenzreaktion

Als weitere Fehlerquelle muss die Sequenzreaktion betrachtet werden. Viele Möglichkeiten eines systematischen Fehlers lassen sich nennen. Jedoch wären Fehler bezüglich falscher Mengen während des Pipettierens des Mixes am Ende des Pipettierens aufgefallen. Dies hätte dazu geführt das entweder etwas von dem Master-Mix übrig geblieben wäre oder aber zu wenig vorhanden gewesen wäre. Da dies nicht der Fall war, bleiben noch weitere systematische Fehler (4) wie das Pipettieren falscher Ingredienzen oder zu geringer Konzentrationen der entsprechenden Zutaten übrig. Natürlich ist durch mehrmaliges Wiederholen der Sequenzierreaktion nicht auszuschließen, dass der gleiche Fehler mehrmals oder verschiedene Fehler mit der gleichen Konsequenz, nämlich Ermangelung einer sauber auswertbaren Sequenz, aufgetreten ist, jedoch erscheint diese Möglichkeit gering. Nicht eingebaute Nukleotide oder Primer können zu einem starken Hintergrundrauschen führen, der das Lesen erschwert. Dies sollte durch die vorherige Reinigung mittels Ethanol fällung geschehen sein. Bei mangelhafter Ethanol fällung könnte dieses Hintergrundrauschen Ursache für eine unsaubere Sequenz sein. Es fielen immer wieder die gleichen Proben aus, die sich auf verschiedensten Platten befanden. Proben, die in der Rangfolge innerhalb dieser Platte vor und nach den ausgefallenen Proben standen wiesen jedoch mehrfach sehr gut verwertbare Sequenzen auf. Daher wird es als sehr unwahrscheinlich erachtet, dass der Grund für den mehrmaligen Ausfall in einem systematischer Fehler liegt

Letztendlich bleibt unklar, warum einige Proben nicht zur Darstellung gebracht werden konnten. Insgesamt wurden 176 Allele von beiden Richtungen sequenziert und analysiert. Es konnte keine Mutation oder SNP detektiert werden.

6. Schlussfolgerung

6.1 Schlussfolgerung Ovarialkarzinome

Die erste Hypothese besagt, dass BRCA-assoziierte Ovarialkarzinome eine andere SNP-Verteilung in DNA-Reparaturgenen als nicht-BRCA-assoziierte Ovarialkarzinome aufweisen.

Es wurde genomische DNA von 56 Ovarialkarzinomen extrahiert und auf 18 verschiedene BRCA1/2-Mutationen hin getestet. Im Anschluss wurden die Frequenzen vierer verschiedener SNPs in zwei Kandidatengenen des DNA-Doppelstrang-Reparaturmechanismus getestet.

Im Sinne einer Assoziationsstudie wurden nun die BRCA1/2 positiv getesteten Tumoren als „Fälle“ betrachtet und die negativ getesteten als „Kontrollen“. Odds Ratios (geschätzte relative Risiken) wurden für diese Fall-Kontroll-Subjekte errechnet. In der Gruppe der Tumoren mit Mutation liegt die Frequenz für das seltene Allel (mutiertes Allel) des SNPs XPD IVS 4 G→A Position 18814 bei 0,5 und in der Kontrollgruppe (ohne Mutation) bei 0,307. Somit ist das mutierte Allel häufiger in der Gruppe der Tumoren mit Mutation in BRCA1/2 anzutreffen.

Bei den beiden anderen SNPs, XPD Lys751→Gln A→C Position 35931 und XRCC3 IVS5-14 A→G Position 17893, liegt das Verhältnis in umgekehrter Form vor. Das mutierte Allel ist in den Gruppen ohne Mutation häufiger anzutreffen als in den Gruppen mit Mutation in BRCA1 oder 2. Der vierte untersuchte SNP XRCC3 T241M führte zu keinen verwertbaren Ergebnissen.

Die hier erzielten Ergebnisse sowie die Ergebnisse vorausgegangener Studien weisen zwar auf eine Modifier-Funktion hin und lassen eine Assoziation der seltenen Allelfrequenz unter BRCA1/2-negativ getesteten Tumoren vermuten. Jedoch besitzen die hier gewonnenen Daten aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Aussagekraft und müssen anhand von größeren Datenmengen in geplanten Folgestudien überprüft werden.

6.2 Schlussfolgerung Gen Gt-198

Für das zweite Projekt wurde die Hypothese aufgestellt, Gt-198 sei ein „Modifizier-Gen“ für BRCA1/2 und nehme Einfluss auf das Erkrankungsrisiko von Mamma- und/oder Ovarialkarzinom.

Um diese These zu beweisen, wurden 100 cDNAs, die aus Lymphozyten-Zelllinien von Hochrisiko-Familien gewonnen wurden, auf Sequenzveränderungen in Gt-198 untersucht (*Kapitel 3.2*). Die gefundenen Sequenzveränderungen in Gt-198 sollten in einem weiteren Schritt in BRCA1/2-Mutationsträgerinnen detektiert werden. Im Anschluss daran sollte eine Korrelation zwischen dem SNP und der Erkrankung bzw. Nicht-Erkrankung dieser Mutationsträgerinnen hergestellt werden.

Insgesamt wurden 176 Allele aus Lymphozyten-Zelllinien von Hochrisiko-Familien in beiden Richtungen sequenziert und analysiert. Es konnte keine Mutation oder SNP detektiert werden, sodass im Weiteren auch keine Korrelation zwischen Mutation des Gens Gt-198 und der Erkrankung an Mamma- bzw. Ovarialkarzinom hergestellt werden konnte. Aufgrund der hohen Anzahl der untersuchten Allele, die keine Genveränderung aufwiesen, ergab sich dass Gt-198 kein Modifiziergen für das Mamma- bzw. Ovarialkarzinom ist.

7. Referenzen

- Anderson SF, Schlegel BP, Nakajima T, Wolpin ES, Parvin JD. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet* 1998;**19**(3):254-6.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003;**72**(5):1117-30.
- Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF, Ponder BA, Easton DF. Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol* 2000;**18**(2):173-90.
- Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA, Easton D. Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genet Epidemiol* 2001;**21**(1):1-18.
- Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* 2003;**111**(15):1843-50.
- Auranen A, Song H, Waterfall C, et al. Polymorphisms in DNA repair genes and epithelial ovarian cancer risk. *Int J Cancer* 2005;**117**(4):611-8.
- B. Amirani, Rebbeck TR, Weber aBL. Role of Polymorphisms in XRCC1 and XPD as Breast Cancer Risk Modifier in BRCA-Mutation-Carrier. *American Association for Cancer Research* 2001;**Volume 42**.
- B.Broca. Traite des tumeurs. *P. Asselin* 80 1886.
- Brekelmans CT. Risk factors and risk reduction of breast and ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;**15**(1):63-8.
- Brown TA. Genomes. BIOS Scientific Publishers Ltd. ed, 1999.
- Chang J, Fryatt I, Ponder B, Fisher C, Gore ME. A matched control study of familial epithelial ovarian cancer: patient characteristics, response to chemotherapy and outcome. *Ann Oncol* 1995;**6**(1):80-2.
- Chappuis PO, Hamel N, Paradis AJ, et al. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected French Canadian women with breast cancer. *Clin Genet* 2001;**59**(6):418-23.
- Chen P, Wiencke J, Aldape K, et al. Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;**9**(8):843-7.
- Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999;**286**(5442):1162-6.
- Dagan E, Friedman E, Paperna T, Carmi N, Gershoni-Baruch R. Androgen receptor CAG repeat length in Jewish Israeli women who are BRCA1/2 mutation carriers: association with breast/ovarian cancer phenotype. *Eur J Hum Genet* 2002;**10**(11):724-8.
- de Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000;**21**(3):453-60.
- Deming PB, Cistulli CA, Zhao H, et al. The human decatenation checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**(21):12044-9.
- Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, et al. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res* 2001;**461**(4):273-8.

- Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000;**21**(5):965-71.
- Edmondson RJ, Monaghan JM. The epidemiology of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2001;**11**(6):423-9.
- F. Guenard, S. Klappenberger, Y. Labrie, M. Plante, B. Tetu and F. Durocher. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian cancer patients from the French-Canadian population. *American Journal of Human Genetics* Oct 2002;**71**(4):233-233 355 Suppl.S.
- Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 1994;**343**(8899):692-5.
- Ford D, Easton DF, Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet* 1995;**57**(6):1457-62.
- Forsti A, Angelini S, Festa F, et al. Single nucleotide polymorphisms in breast cancer. *Oncol Rep* 2004;**11**(4):917-22.
- Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 1994;**8**(4):399-404.
- Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994;**266**(5182):120-2.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;**11**(12):1513-30.
- Grabrick DM, Hartmann LC, Cerhan JR, et al. Risk of breast cancer with oral contraceptive use in women with a family history of breast cancer. *Jama* 2000;**284**(14):1791-8.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;**51**(1):15-36.
- Gudas JM, Li T, Nguyen H, Jensen D, Rauscher FJ, 3rd, Cowan KH. Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell Growth Differ* 1996;**7**(6):717-23.
- H. Seker, E.D. Bowman, E. Spillare, D. Butkiewicz, M. Hedayati LG, Harris aCC. Functional and Physical Significance of XPD Polymorphic Variants on P53-Binding and DNA Repair Capacity. *American Association for Cancer Research* 2001;**Volume 42**.
- Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990;**250**(4988):1684-9.
- Han J, Hankinson SE, Ranu H, De Vivo I, Hunter DJ. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis* 2004;**25**(2):189-95.
- Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, et al. A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1995;**76**(2):284-90.
- Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA, et al. Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. A prospective study. *Jama* 1993;**270**(23):2813-8.
- Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the ovary. *J Epidemiol Biostat* 2001;**6**(1):107-38.
- Hemminki K, Xu G, Angelini S, et al. XPD exon 10 and 23 polymorphisms and DNA repair in human skin in situ. *Carcinogenesis* 2001;**22**(8):1185-8.

- Hou SM, Falt S, Angelini S, et al. The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;**23**(4):599-603.
- Houvras Y, Benezra M, Zhang H, Manfredi JJ, Weber BL, Licht JD. BRCA1 physically and functionally interacts with ATF1. *J Biol Chem* 2000;**275**(46):36230-7.
- Ijichi H, Tanaka T, Nakamura T, Yagi H, Hakuba A, Sato M. Molecular cloning and characterization of a human homologue of TBPIP, a BRCA1 locus-related gene. *Gene* 2000;**248**(1-2):99-107.
- Jakubowska A, Narod SA, Goldgar DE, et al. Breast cancer risk reduction associated with the RAD51 polymorphism among carriers of the BRCA1 5382insC mutation in Poland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;**12**(5):457-9.
- Johannsdottir HK, Johannsdottir G, Agnarsson BA, et al. Deletions on chromosome 4 in sporadic and BRCA mutated tumors and association with pathological variables. *Anticancer Res* 2004;**24**(5A):2681-7.
- Johannsson OT, Idvall I, Anderson C, et al. Tumour biological features of BRCA1-induced breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1997;**33**(3):362-71.
- Justenhoven C, Hamann U, Pesch B, et al. ERCC2 genotypes and a corresponding haplotype are linked with breast cancer risk in a German population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;**13**(12):2059-64.
- Kadouri L, Easton DF, Edwards S, et al. CAG and GGC repeat polymorphisms in the androgen receptor gene and breast cancer susceptibility in BRCA1/2 carriers and non-carriers. *Br J Cancer* 2001;**85**(1):36-40.
- Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies breast cancer risk in BRCA2 carriers, but not in BRCA1 carriers or noncarriers. *Br J Cancer* 2004;**90**(10):2002-5.
- Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 2000;**10**(2):144-50.
- Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2002;**346**(21):1609-15.
- Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;**27**(3):247-54.
- Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;**68**(4):820-3.
- Ko L, Cardona GR, Henrion-Caude A, Chin WW. Identification and characterization of a tissue-specific coactivator, GT198, that interacts with the DNA-binding domains of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 2002;**22**(1):357-69.
- Kuschel B, Auranen A, McBride S, et al. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2002;**11**(12):1399-407.
- Kuschel B, Chenevix-Trench G, Spurdle AB, et al. Common polymorphisms in ERCC2 (Xeroderma pigmentosum D) are not associated with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**(7):1828-31.
- Kuschel B, Gayther SA, Easton DF, Ponder BA, Pharoah PD. Apparent human BRCA1 knockout caused by mispriming during polymerase chain reaction: implications for genetic testing. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;**31**(1):96-8.
- Lakhani SR, Gusterson BA, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. *Clin Cancer Res* 2000;**6**(3):782-9.
- Le Marchand L, Donlon T, Lum-Jones A, Seifried A, Wilkens LR. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;**11**(4):409-12.

- Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 2000;**404**(6774):201-4.
- Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, et al. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**(6):3232-6.
- Li S, Chen PL, Subramanian T, et al. Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. *J Biol Chem* 1999;**274**(16):11334-8.
- Lo T, Pellegrini L, Venkitaraman AR, Blundell TL. Sequence fingerprints in BRCA2 and RAD51: implications for DNA repair and cancer. *DNA Repair (Amst)* 2003;**2**(9):1015-28.
- Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, et al. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 2000;**21**(4):551-5.
- Lynch HT, Watson P. Genetic counselling and hereditary breast ovarian cancer. *Lancet* 1992;**339**(8802):1181.
- Manning AP, Abelovitch D, Ghadirian P, et al. Haplotype analysis of BRCA2 8765delAG mutation carriers in French Canadian and Yemenite Jewish hereditary breast cancer families. *Hum Hered* 2001;**52**(2):116-20.
- Martin AM, Kanetsky PA, Amirimani B, et al. Germline TP53 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers: is TP53 a modifier of BRCA1? *J Med Genet* 2003;**40**(4):e34.
- Matullo G, Guarrera S, Carturan S, et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer* 2001;**92**(4):562-7.
- Menin C, Banna GL, De Salvo G, et al. Lack of association between androgen receptor CAG polymorphism and familial breast/ovarian cancer. *Cancer Lett* 2001;**168**(1):31-6.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;**266**(5182):66-71.
- Modan B, Hartge P, Hirsh-Yechezkel G, et al. Parity, oral contraceptives, and the risk of ovarian cancer among carriers and noncarriers of a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2001;**345**(4):235-40.
- Mosgaard BJ, Lidegaard O, Kjaer SK, Schou G, Andersen AN. Infertility, fertility drugs, and invasive ovarian cancer: a case-control study. *Fertil Steril* 1997;**67**(6):1005-12.
- Moslehi R, Chu W, Karlan B, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000;**66**(4):1259-72.
- München T. Maligne Ovarialtumoren; Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 2004.
- Nakamura T, Tanaka T, Takagi H, Sato M. Cloning and heterogeneous in vivo expression of Tat binding protein-1 (TBP-1) in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1998;**1399**(1):93-100.
- Narod SA, Feunteun J, Lynch HT, et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 1991;**338**(8759):82-3.
- Narod SA, Risch H, Moslehi R, et al. Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. *N Engl J Med* 1998;**339**(7):424-8.

- Narod SA, Sun P, Ghadirian P, et al. Tubal ligation and risk of ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study. *Lancet* 2001;**357**(9267):1467-70.
- Nathanson KL, Shugart YY, Omaruddin R, et al. CGH-targeted linkage analysis reveals a possible BRCA1 modifier locus on chromosome 5q. *Hum Mol Genet* 2002;**11**(11):1327-32.
- O'Connell P, Albertsen H, Matsunami N, et al. A radiation hybrid map of the BRCA1 region. *Am J Hum Genet* 1994;**54**(3):526-34.
- Oddoux C, Struwing JP, Clayton CM, et al. The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat Genet* 1996;**14**(2):188-90.
- Olson JE, Cerhan JR, Janney CA, Anderson KE, Vachon CM, Sellers TA. Postmenopausal cancer risk after self-reported endometriosis diagnosis in the Iowa Women's Health Study. *Cancer* 2002;**94**(5):1612-8.
- Park JY, Lee SY, Jeon HS, et al. Lys751Gln polymorphism in the DNA repair gene XPD and risk of primary lung cancer. *Lung Cancer* 2002;**36**(1):15-6.
- Pellegrini L, Yu DS, Lo T, et al. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 2002;**420**(6913):287-93.
- Pharoah PD, Easton DF, Stockton DL, Gayther S, Ponder BA. Survival in familial, BRCA1-associated, and BRCA2-associated epithelial ovarian cancer. United Kingdom Coordinating Committee for Cancer Research (UKCCCR) Familial Ovarian Cancer Study Group. *Cancer Res* 1999;**59**(4):868-71.
- Phelan CM, Rebbeck TR, Weber BL, et al. Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus. *Nat Genet* 1996;**12**(3):309-11.
- Purdie D, Green A, Bain C, et al. Reproductive and other factors and risk of epithelial ovarian cancer: an Australian case-control study. Survey of Women's Health Study Group. *Int J Cancer* 1995;**62**(6):678-84.
- R.K. Schmutzler, Beckmann MW, Kiechle aM. Prävention: Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom. *Deutsches Ärzteblatt* 2002;**99**:A-1372.
- Rebbeck TR, Kantoff PW, Krithivas K, et al. Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen-receptor CAG repeat. *Am J Hum Genet* 1999a;**64**(5):1371-7.
- Rebbeck TR, Levin AM, Eisen A, et al. Breast cancer risk after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 1999b;**91**(17):1475-9.
- Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002;**346**(21):1616-22.
- Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* 1996;**14**(2):185-7.
- Robert-Koch-Institut GdeKiDeViZmd. Krebs in Deutschland-Häufigkeiten und Trends. 2006;**5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.**
- Rommens JM, Durocher F, McArthur J, et al. Generation of a transcription map at the HSD17B locus centromeric to BRCA1 at 17q21. *Genomics* 1995;**28**(3):530-42.
- Rubin SC, Benjamin I, Behbakht K, et al. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *N Engl J Med* 1996;**335**(19):1413-6.
- Runnebaum IB, Stickeler E. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;**127**(2):73-9.

- Rybicki BA, Conti DV, Moreira A, Cicek M, Casey G, Witte JS. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;**13**(1):23-9.
- Schildkraut JM, Cooper GS, Halabi S, Calingaert B, Hartge P, Whittemore AS. Age at natural menopause and the risk of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2001;**98**(1):85-90.
- Scully R, Anderson SF, Chao DM, et al. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**(11):5605-10.
- Seker H, Butkiewicz D, Bowman ED, et al. Functional significance of XPD polymorphic variants: attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with the XPD 312 Asp/Asp genotype. *Cancer Res* 2001;**61**(20):7430-4.
- Shen H, Xu Y, Qian Y, et al. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2000;**88**(4):601-6.
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998;**58**(4):604-8.
- Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 2001;**61**(4):1354-7.
- Strachan T, Read aAP. Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford* 1996.
- Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, et al. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet* 1995;**11**(2):198-200.
- Tanaka T, Nakamura T, Takagi H, Sato M. Molecular cloning and characterization of a novel TBP-1 interacting protein (TBPIP):enhancement of TBP-1 action on Tat by TBPIP. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**239**(1):176-81.
- Tang D, Cho S, Rundle A, et al. Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002;**75**(2):159-66.
- Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 1996;**12**(3):333-7.
- Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, et al. Polymorphism in the DNA repair gene XPD, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;**13**(12):2053-8.
- Thompson D, Easton DF. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002;**94**(18):1358-65.
- Tirkkonen M, Johannsson O, Agnarsson BA, et al. Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res* 1997;**57**(7):1222-7.
- Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;**21**(3):177-84.
- Tonin P, Serova O, Simard J, et al. The gene for hereditary breast-ovarian cancer, BRCA1, maps distal to EDH17B2 in chromosome region 17q12-q21. *Hum Mol Genet* 1994;**3**(9):1679-82.
- Tonin PN, Mes-Masson AM, Futreal PA, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1998;**63**(5):1341-51.

- Tonin PN, Perret C, Lambert JA, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in early-onset French Canadian breast cancer cases unselected for family history. *Int J Cancer* 2001;**95**(3):189-93.
- Turner N, Tutt A, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Curr Opin Pharmacol* 2005;**5**(4):388-93.
- Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, et al. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *Embo J* 2001;**20**(17):4704-16.
- van Nagell JR, Jr., Gallion HH, Pavlik EJ, DePriest PD. Ovarian cancer screening. *Cancer* 1995;**76**(10 Suppl):2086-91.
- Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002;**108**(2):171-82.
- Venn A, Watson L, Bruinsma F, Giles G, Healy D. Risk of cancer after use of fertility drugs with in-vitro fertilisation. *Lancet* 1999;**354**(9190):1586-90.
- Venn A, Watson L, Lumley J, Giles G, King C, Healy D. Breast and ovarian cancer incidence after infertility and in vitro fertilisation. *Lancet* 1995;**346**(8981):995-1000.
- Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, et al. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;**10**(9):955-60.
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 2000;**14**(8):927-39.
- Welch PL, Schubert EL, King MC. Inherited breast cancer: an emerging picture. *Clin Genet* 1998;**54**(6):447-58.
- Whittemore AS. Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecol Oncol* 1994;**55**(3 Pt 2):S15-9.
- Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992;**136**(10):1184-203.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995;**378**(6559):789-92.
- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;**265**(5181):2088-90.
- Yang H, Li Q, Fan J, Holloman WK, Pavletich NP. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature* 2005;**433**(7026):653-7.
- Young RC, Walton LA, Ellenberg SS, et al. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med* 1990;**322**(15):1021-7.
- Zhou W, Liu G, Miller DP, et al. Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. *Cancer Res* 2002;**62**(5):1377-81.

Danksagung

Ich möchte mich noch bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle:

meinen Eltern für Ihren Rückhalt in allen Lebenslagen und dafür, mich bisher immer vor den schlimmsten Fehlern meines Lebens bewahrt zu haben, ohne deren Beistand ich niemals mein Studium und natürlich auch nicht diese Arbeit beendet hätte.

meinem Bruder, der mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und der mir bei jeglichen heftigen Auseinandersetzungen mit der Computerwelt zur Seite stand und zwischen uns Frieden gestiftet hat, und dafür, dass er der beste Bruder ist, den man sich wünschen kann.

Frau Priv.- Doz. Dr. med. Bettina Kuschel für die jahrelange gute Betreuung meiner Doktorarbeit, die Bereitschaft mir viele freie Nachmittage und Abende zu opfern, mir mit Artikeln, Bildern, Büchern und Rat hilfsbereit unter die Arme zu greifen und dafür, dass Sie mir trotz rezidivierender längerer Abwesenheit meinerseits immer freundlich und unterstützend entgegengekommen ist.

Frau Univ.- Prof. Dr. M. Kiechle für die Möglichkeit, diese Arbeit an Ihrem Lehrstuhl anzufertigen und für die freundliche Unterstützung beim Korrekturlesen.

Frau Dr. Francine Durocher, PhD, die mir nicht nur ermöglichte in Ihrer Forschungsgruppe mitzuwirken, sondern mir auch Haus und Heim und eine Freundschaft in einem fernen Land anbot.

Herrn Yvan Labrie für seine Geduld mit meiner Ungeduld und dafür, dass er mir mit absolut stoischer Ruhe alle Techniken, die zum Gelingen dieser Arbeit notwendig waren beigebracht hat.

Herrn Dr. Meindl für die freundliche Unterstützung und für das unter die Arme greifen um Unklarheiten zu beseitigen.

Meiner restlichen Familie, die mir immer einen liebevollen familiären Background gegeben hat. Und zu guter Letzt meinem kleinen Cousin, dafür dass er mit seiner Ankunft auf dieser Welt die Prioritäten aller wieder ins richtige Licht gerückt hat, und einem zeigt, dass das Gelingen einer Dissertation nur ein Sahnehäubchen und nicht der Mittelpunkt auf dem Weg zum Glück ist.