

**Genotyp-Phänotyp Charakterisierung und
Genexpressionsuntersuchungen bei familiären
multiplen Exostosen (HME) sowie
Funktionsanalysen von Missense-Mutationen im
humanen MMR-Protein hMLH1 in der Hefe
*Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural – Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Düsseldorf

vorgelegt von
Karin Hardt
aus Willich

Düsseldorf 2008

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Institutsdirektorin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Royer-Pokora)

angefertigt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Referentin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Royer-Pokora
Koreferent: Herr Prof. Dr. rer. nat. Johannes H. Hegemann
Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2008

Für meine Juwelen
Eliza, Matthias und Lara

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Tumorentstehung	10
1.1.1 Protoonkogene	11
1.1.2 Tumorsuppressorgene	11
1.1.3 Mutatorgene	12
1.1.4 DNA-Schäden und DNA-Reparatur	12
1.2 Das erbliche nicht-polypöse kolorektale Karzinom (Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC).....	15
1.2.1 Die Gene des humanen MMR-Systems und der Vergleich mit homologen Proteinen in der Hefe	18
1.2.1.1 MutS.....	18
1.2.1.2 MutL.....	20
1.2.1.3 Verbundprojekt „Familiärer Darmkrebs“ HNPCC.....	24
1.2.2 Analyseverfahren zur Untersuchung von Missense-Mutationen in MMR-Proteinen in humanen Zellsystem	24
1.2.3 Hefe als Testsystem humaner MMR-Proteine.....	25
1.3 Hereditäre Multiple Osteochondrome	30
1.3.1 Embryonale Skelettbildung.....	30
1.3.2 Knorpelgewebe.....	32
1.3.3 Biosynthese von Heparansulfat (HS)	33
1.3.4 Hereditäre Multiple Osteochondrome.....	34
1.3.5 Die <i>EXT</i> -Genfamilie.....	36
1.3.5.1 Das Gen <i>EXT1</i>	38
1.3.5.2 Das Gen <i>EXT2</i>	38
1.3.5.3 Der Genort <i>EXT3</i>	39
1.3.5.4 Die Gene <i>EXTL1-3</i>	39
1.3.6 Funktion der <i>EXT</i> - Genfamilie	40
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	42
1.4.1 Funktionelle Analysen des MMR-Proteins hMLH1	42
1.4.2 Analysen zu hereditären multiplen Osteochondrome	43
2 Material.....	45
2.1 Allgemeines.....	45
2.2 Knorpelmaterial	45
2.3 Blut.....	45
2.4 Chemikalien	45
2.5 Sonstige Materialien.....	47
2.6 Antikörper.....	47
Primäre Antikörper.....	47
Sekundäre Antikörper	47
2.7 Enzyme.....	47
2.7.1 Restriktionsendonukleasen	47
2.7.2 Polymerasen	48
2.7.3 Weitere Enzyme	48
2.7.4 Kits	48
2.8 Puffer und Lösungen.....	49
2.9 Größenstandards.....	50
2.9.1 100bp DNA-Leiter (PeqLab)	50

2.9.2	Track It 1 kb ladder (Invitrogen)	50
2.9.3	GenRuler (Fermentas)	50
2.9.4	Proteingrößenstandard	50
2.10	Oligonukleotide.....	51
2.10.1	Oligonukleotide zur indirekten Mutationsanalyse	51
2.10.1.1	<i>EXT1</i>	51
2.10.1.2	<i>EXT2</i>	52
2.10.1.3	<i>EXT3</i>	52
2.10.2	Oligonukleotide zur DHPLC Mutationsanalyse und Sequenzierung in den <i>EXT</i> -Genen	52
2.10.2.1	Oligonukleotide für <i>EXT1</i> (Exons 1- 11)	52
2.10.2.2	Oligonukleotide für <i>EXT2</i> (Exons 2- 14)	53
2.10.3	Oligonukleotide zur Einführung von Missense-Mutationen	55
2.11	Plasmide	57
2.12	Stämme.....	57
2.12.1	<i>Escherichia coli</i>	57
2.12.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
2.13	Medien.....	58
2.13.1	Medien für <i>E. coli</i>	58
2.13.2	Medien für <i>S. cerevisiae</i>	58
2.13.2.1	YPD+.....	58
2.13.2.2	SD-Minimal Medium	58
2.13.2.3	Selektiv Medium	59
2.13.3	Medium für humane Knorpelzellen.....	59
2.14	Seren und Zusatzstoffe	60
2.15	Verbrauchsmaterial.....	60
2.16	Geräte	61
2.17	Software.....	61
3	Methoden	62
3.1	DNA-Isolierung.....	62
3.1.1	DNA-Isolierung aus Blut	62
	Isolierung von DNA mit QiaAmp Blood Midi Kit	62
3.1.2	Plasmid-Midi-Präparation aus <i>E.coli</i>	63
3.1.3	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E.coli</i>	63
3.1.4	DNA-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i>	63
3.1.5	DNA-Mengenbestimmung durch photometrische Messung.....	64
3.2	DNA-Amplifikation (Polymerasen Kettenreaktion = PCR).....	64
3.2.1	PCR- Bedingungen zur Kopplungsanalyse.....	64
3.2.2	PCR- Bedingungen für DHPLC- Analysen	66
3.2.3	Mutagenisierende PCR	67
3.3	Gelelektrophorese.....	69
3.3.1	Polyacrylamidgelelektrophorese	69
3.3.2	Gelelektrophorese	69
3.4	DNA-Restriktionsanalysen.....	70
3.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	70
3.6	Aufreinigung von PCR- Fragmenten.....	70
3.7	DNA-Fällung.....	70
3.8	Sequenzierung	71
3.8.1	Mutationsdetektion mittels DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography)	71
3.8.2	Bedingungen zur Mutationdetektion in den <i>EXT</i> -Genen auf der DHPLC	73
3.8.3	Bedingungen zur Mutationdetektion im <i>hMLH1</i> -Gen auf der DHPLC.....	74

3.9	Expressionsanalysen.....	74
3.9.1	30k-Array von MWG.....	74
3.9.2	Quantitative Real-Time PCR mit TaqMan-Sonden	75
3.9.3	5'-Nuklease Assay.....	77
3.9.4	„Assay on Demand“	78
3.9.4.1	Lage der Sonden in den einzelnen Genen.....	78
3.9.4.2	cDNA-Synthese für Assay on Demand-Untersuchungen	78
3.9.4.3	Assay On Demand.....	79
3.10	Hefemethoden.....	79
3.10.1	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	79
3.10.2	Integration von DNA-Fragmenten in <i>S. cerevisiae</i> über homologe <i>in vivo</i> Rekombination	79
3.10.3	Hefetransformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
3.10.4	Mutationsratenbestimmung mit dem Lysin-PolyA-Strang-System	81
3.10.5	Statistische Analyse der Mutationsratenbestimmung	82
3.11	<i>E.coli</i> -Methoden.....	84
3.11.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	84
3.11.1.1	Elektroporation.....	84
3.11.1.2	„Ein-Minuten-Transformation“	84
3.12	Zellkultur von Chondrozyten	85
3.12.1	Knorpelpräparation.....	85
3.12.2	Anzucht.....	85
3.12.3	„Passagieren“	85
3.12.4	Kryokonservierung der Zellen.....	86
3.12.5	RNA- Extraktion aus Chondrozyten.....	86
3.12.6	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	86
3.13	Proteinanalysen	86
3.13.1	Herstellen von Protein-Rohextrakte aus Hefezellen (Western Blot-Analysen).....	86
3.13.2	Proteinmengenbestimmung (Bradford)	87
3.13.3	Proteinprobenpräparation für SDS-Polyacrylamidgele.....	87
3.13.4	Auftrennung von Proteinen mittels SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	87
3.13.4.1	Herstellung des Trenngels:.....	88
3.13.4.2	Herstellung eines Sammelgels.....	88
3.13.4.3	SDS-Gelelektrophoresese.....	88
3.13.5	Färbung eines Proteingels mittels Coomassie-Blau	89
3.13.6	Western Blot-Analyse.....	89
3.13.6.1	Aufbau der Blotapparatur.....	89
3.13.6.2	Abbau der Blotapparatur.....	89
3.13.7	Antikörperreaktion auf der Nylonmembran.....	90
3.13.8	Farbentwicklung von Western Blots mittels alkalischer Phosphatase	90
3.14	Hefe Zwei-Hybrid-Analyse mit hMLH1 und hPMS2.....	90
3.14.1	Qualitativer Hefe Zwei Hybrid-Assay (X-Gal-Overlay)	91
3.14.2	Herstellung von Protein-Rohextrakten für quantitative β -Gal- Aktivitätsmessungen	91
3.14.3	Messung der Reaktion der β -Galaktosidase mit ONPG.....	92
3.14.4	Immunfluoreszenz-Färbung	93
4	Ergebnisse.....	94
4.1	Funktionelle Analysen des MMR-Reparaturproteins hMLH1	94
4.1.1	Herstellung der hMLH1-Varianten im Hefe-Zwei-Hybrid-Vektor.....	94
4.1.2	Funktionelle Analysen von Allelen des humanen MMR-Proteins MLH1	97
4.1.2.1	Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen von hMLH1 und hPMS2.....	98

4.1.2.2	Quantitative Bestimmung der Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktion von hMLH1 mit hPMS2	100
4.1.3	Funktionelle Analyse der Poly-A-Strang-Stabilität mit dem Lys2-Protein als Mutationsreporter	101
4.1.4	Expressionanalyse von hMLH1-Varianten	103
4.2	Untersuchungen in der Gen-Familie <i>EXT</i>	107
4.2.1	Phänotyp-/ Genotypuntersuchungen	107
4.2.1.1	Indirekte Mutationsanalyse (Kopplungsanalyse)	107
4.2.1.2	DHPLC- Untersuchungen.....	125
4.2.1.3	Sequenzierung.....	130
4.2.1.4	Genotyp-Phänotyp-Korrelation.....	134
4.2.2	Etablierung von Zelllinien aus Osteochondroma-Tumoren	136
4.2.3	Expressions-Analysen mittels Array-Hybridisierung	136
4.2.4	Expressionsanalysen mittels quantitativer real-time-PCR.....	139
4.2.5	Expressionsanalysen mittels Immunfluoreszenz-Färbung.....	141
5	Diskussion.....	144
5.1	Analysen des humanen MMR-Proteins MLH1	144
5.1.1	Übersichtsliste von Missense-Mutationen im MMR-Protein hMLH1	144
5.1.2	Einfluss von hMLH1-Missense-Mutationen auf die Interaktion mit hPMS2.....	145
5.1.3	Missense-Mutationen in der ATPase-Domäne können einen Mutatoreffekt in Hefe auslösen.....	147
5.1.4	Die Ergebnisse von Interaktionsassay und Mutatoreffekt liefern widersprüchliche Aussagen.....	148
5.1.5	Proteinstabilität von Wildtyp-MLH1 und MLH1-Varianten.....	150
5.1.6	Strukturelle 3D-Computer-Analysen der MLH1-Allele der ATPase-Domäne..	151
5.1.6.1	Vergleichende strukturelle Untersuchungen	152
5.1.7	Abschließende Betrachtung zur Analyse des humanen MMR-Proteins MLH1 .	157
5.2	Untersuchungen zur Erkrankung multipler hereditärer Osteochondrome	160
5.2.1	Kopplungsanalysen und Mutationsdetektion der <i>EXT</i> -Gene in MO-Familien...	160
5.2.2	Genotyp/Phänotyp Korrelationen von <i>EXT1</i> und <i>EXT2</i>	162
5.2.3	Expressionsprofile von Genen der Knorpelentwicklung in <i>EXT1</i> -Tumoren....	163
	Literaturverzeichnis	167
	Anhang I.....	188
	Anhang II.....	
	Summary.....	
	Danksagung	
	Eidesstattliche Erklärung.....	
	Curriculum Vitae.....	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galaktosidase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BD	Bindedomäne
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
cDNA	copy DNA
°C	Temperatur in Grad Celsius
DAPI	4, 6- Diamino 2- phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMF	2,5-Dimethylformamid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EXT	hereditäre multiple Exostosen
EZM	Extrazellulärmatrix
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fötales Kälber Serum
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GST	Glutathione-S-Transferase
HNPCC	hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis
Ihh	Indian hedgehog
IMISE	Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
mM	Milimolar
min	Minute
MMR	Mismatch-Reparatur
mRNA	messanger RNA
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₄ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
pH	„potentia Hydrogenii“, Säurestärke
PTHrP	Parathyroid hormone-related Protein
QRT-PCR	quantitative real-time PCR
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale RNA

RT-PCR	reverse transcription PCR
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
STR- Marker	short tandem repeat- Marker
Tab.	Tabelle
TEAA	Triethylaminacetat
TGFs	Transforming growth factors
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumina pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galacto-pyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose

Zusammenfassung

Genomische Stabilität ist vom Einzeller bis hin zum Menschen von großer Bedeutung. Die Reparaturmechanismen einer Zelle sorgen für den kontinuierlichen Erhalt der genomischen Stabilität. Genetische Veränderungen können unter anderem zur Entstehung von Krebs führen. Um dies zu verhindern, gibt es teilweise evolutionär hoch konservierte Mechanismen, die die Zellen vor Mutationen schützen. Die DNA-Fehlpaarungsreparatur ist eine dieser Mechanismen, die von Prokaryoten bis hin zum Menschen konserviert ist und postreplikativ fehlgepaarte DNA repariert. Keimbahnmutationen in Fehlpaarungsreparaturgenen führen u. a. zu einer erhöhten Anfälligkeit für Dickdarmkrebs. Dieses Krankheitsbild wird als HNPCC (Hereditary non-polyposis colorectal cancer) oder auch als Lynch-Syndrom bezeichnet. In HNPCC-Patienten werden in ungefähr 30 % der Fälle Missense-Mutationen gefunden, die zum Einbau einer veränderten Aminosäure in einem Fehlpaarungs-Reparaturprotein führen und dessen Einfluss auf die Funktion des Proteins nicht vorherzusagen ist. Eine funktionelle Analyse solcher Mutationen ist also von großer Wichtigkeit. Als Modellorganismus für diese Analyse diente aufgrund der hohen evolutionären Konservierung die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. In dieser Arbeit wurden 17 Missense-Mutationen aus HNPCC-Patienten in die ATP-Bindungs- und die hPMS2-Interaktionsdomäne des humanen Fehlpaarungs-Reparaturgens *hMLH1* eingeführt und im Hefe-2-Hybrid-System mit seinem Komplexpartner hPMS2 untersucht. Für 8 Allele aus der ATPase-Domäne wurden die Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen quantitativ überprüft. Diese wurden zudem im dominant-negativen Mutatorphänotyp-Assay auf die Störung der Hefe-Fehlpaarungsreparatur durch die Expression der *hMLH1*-Allele hin untersucht. Zur Bestimmung der Mutationsrate wurde das in Hefe bestehende *LYS2*_{A14}-Testsystem verwendet. Für eine abschließende Beurteilung der Funktionalität von Allelen wurde ihre Proteinmenge bestimmt. Drei der untersuchten Missense-Mutationen im Bereich der ATPase-Domäne wurden als pathogen eingestuft. Die restlichen 5 Allele konnten nicht mit Bestimmtheit als pathogen eingestuft werden, zeigen aber eine deutliche Tendenz in diese Richtung.

Ein weiterer Bereich dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung von Familien, die an der Erkrankung der multiple hereditären Osteochondrome (MO) leiden. MO ist eine dominant vererbte Krankheit mit einer Häufigkeit von 1:50 000. Bei Osteochondromen handelt es sich um Auswüchse an den langen Röhrenknochen. Während der Haupt-

wachstumsphase in der Kindheit bis zur Pubertät besitzen sie ihre größte Wachstumsaktivität.

In dieser Arbeit wurde unter anderem der Zusammenhang zwischen Genort und Ausprägung der Erkrankung untersucht. Hierzu wurden 12 Familien einer sogenannten Kopplungsanalyse unterzogen und mittels Mikrosatellitenmarkern wurde der Genort eingeschränkt. Anschließend wurde eine Mutationsanalyse des identifizierten Genortes mittels DHPLC-Analyse durchgeführt. In Erhebungsbögen wurden klinische Daten der betroffenen Personen dokumentiert und mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen, um Aussagen zu einer Genotyp-/Phänotypkorrelation machen zu können. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Erkrankung und dem betroffenen Genort hergestellt werden. Demnach sind *EXT1*-Patienten häufig schwerer betroffen als *EXT2*-Patienten. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Ulnalänge zur Größe eines Patienten und dem Genort *EXT1* hergestellt werden. Dieser Parameter kann in der klinischen Diagnostik Anwendung finden, da nun nach der Bestimmung des Verhältnisses Ulnalänge zu Patientengröße eine Vorauswahl getroffen werden kann, welches Gen als erstes in die molekulare diagnostische Untersuchung eingeht. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war der Versuch, Aussagen über die molekularen Unterschiede zwischen Osteochondromen und normalem Knorpelgewebe zu machen. Die Gene *EXT1* und *2* kodieren Glycosyltransferasen, welche die Verlängerung der Polysaccharidkette Heparansulfat steuern. Über die Wirkung der Gene auf die Signalwege der Chondrozytendifferenzierung und insbesondere die Frage, auf welche Weise Mutationen der *EXT*-Gene zu Exostosen führen können, ist jedoch noch wenig bekannt. Molekulare Untersuchungen sollten deshalb einen möglichst breiten Überblick über die Stoffwechselbesonderheiten von Osteochondromzellen liefern. Hierzu wurden aus Tumorgewebe adhärente Primärzellkulturen angelegt und in Arrayuntersuchungen die Genexpression analysiert. Der Vergleich der Transkription von Tumorzellkulturen mit normalen Knorpelkulturen zeigte Expressionsunterschiede von Genen, die in Zusammenhang mit der Entwicklung von Knorpelgewebe gebracht werden können. Die hoch- oder herunterregulierten Gene wurden mittels quantitativer real-time PCR untersucht. In den Tumorzelllinien herunterreguliert waren u. a. die Gene *Decorin*, *Cathepsin D*, *Kollagen Typ 12*, *Metalloprotease 2 (MM2)* und *IHH*. Hochreguliert waren *Cyclin D1* und *PTHrP*. Diese Gene sind in Signalwegen der Chondrozytendifferenzierung involviert oder Bestandteil der Extrazellulärmatrix im Knorpel. *EXT1* zeigte weder bei der Arrayuntersuchung noch bei der quantitativen real-time-PCR Expressionsunterschiede.

1 Einleitung

1.1 Tumorentstehung

Tumoren treten bei allen höheren Lebewesen auf. Dabei handelt es sich aus der Sicht der Medizin um eine Zunahme des Gewebsvolumens jedweder Ursache.

Grundsätzlich können zwei Arten von Tumoren unterschieden werden:

1. Maligne Tumoren

Diese werden im Sprachgebrauch häufig als Krebs bezeichnet. Sie entstehen aus mesenchyalem oder epithelalem Gewebe. Sie zeigen meist ein rasches, zerstörerisches Wachstum; im fortgeschrittenen Stadium verlassen sie eingegrenzte Gewebereiche und metastasieren. Maligne Tumoren führen in der Regel ohne Therapie zum Tod.

2. Benigne Tumoren

Sie bestehen aus differenzierten Zellen und zeigen häufig ein langsames, verdrängendes Wachstum. In der Regel sind diese Art von Tumoren nicht direkt lebensbedrohlich, können aber durch Beeinträchtigungen in angrenzenden Gewebereiche gefährdend wirken oder durch weitere genetische Veränderungen maligne werden.

Die Veränderung eines oder mehrerer Gene im Genom ist die Basis für die Entstehung von Tumoren. Diese Mutationen betreffen zumeist Gene, die Einfluss auf das Zellwachstum haben. Dies hat zur Folge, dass sich die Zellen unkontrolliert teilen. Es sind häufig mehrere unabhängige genetische Veränderungen in einer Zelle notwendig, um dieses Ereignis in Gang zu setzen (Mehrstufenmodell der Tumorentstehung). Dieses Mehrschrittkarzinogenesemodell ist für kolorektale Tumoren bereits weitgehend verifiziert. Danach führt eine Akkumulation von genetischen Veränderungen zur Umwandlung des normalen Kolonepithels zu hyperproliferativen Zellen, die dann übergehen in frühe, intermediäre und dann in späte Stadien von Adenomen und schließlich zu Karzinomen und letztendlich zu Metastasen führen können (Fearon & Vogelstein 1990).

Es gibt grundsätzlich zwei Mechanismen, die in Kombination zur Entstehung von Tumoren führen können:

1. Eine Mutation steigert die Zellproliferation.
2. Eine Mutation beeinträchtigt die Stabilität des gesamten Genoms und erhöht so die Mutationsrate.

Genetische Veränderungen mit Relevanz für die Tumorentstehung betreffen vorrangig folgende Gengruppen:

1.1.1 Protoonkogene

Protoonkogene regulieren das Zellwachstum und die –differenzierung. Durch eine genetische Veränderung werden sie aktiviert. Aktivierte Protoonkogene nennt man Onkogene. Diese fördern aktiv die Zellproliferation. Sie wirken dominant, d.h. eine funktionelle Beeinträchtigung der Zellen erfolgt bereits, wenn eine Allelkopie mutiert ist. Die Aktivierung kann durch Mutationen, Amplifikation oder auch durch chromosomale Translokationen erfolgen. Häufig gehören Protoonkogene in die Gruppe von Genen, die für Wachstumsfaktoren, Signal-Transduktions-Proteine, Zellzyklus-Regulationsproteine, Transkriptionsfaktoren oder Zelloberflächenrezeptoren kodieren (Shum & Nuckolls 2001; Knippers 2006).

1.1.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene sind negative Regulatoren der Zellproliferation. Sie üben normalerweise eine negative Kontrolle aus und sie stoppen den Zellzyklus. Durch Mutationen können Tumorsuppressorgene ihre Funktion verlieren, dadurch kommt es zu einem verstärkten Zellwachstum. Damit es zu einem funktionellen Verlust kommt, müssen immer beide Allele des Gens in der Zelle inaktiviert sein. Dies kann durch eine Keimbahnmutation oder auch sporadisch in einem der beiden Allele geschehen; hierbei geht die zweite Kopie des Alleles teilweise oder komplett z. B. durch LOH (loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotie), Mutation oder Methylierung verloren (Two-Hit-Modell nach Knudson 1971). Durch das Auftreten der beiden Mutationsergebnisse in einer Körperzelle kann ein sporadischer Tumor ohne familiäre Veranlagung entstehen.

Zu den Tumorsuppressorgenen gehören häufig Gene, die eine zentrale Rolle bei der Kontrolle im Ablauf des Zellzyklus (*p53*, *p21*, *CDKN2*, *ATM*, *BRCA1*), der Signaltransduktion (*NF1*, *ATM*) und der Apoptoseinduktion spielen. Als Beispiele für Defekte in Tumorsuppressorgenen seien hier Wilms-Tumor und auch Osteochondrome genannt (Knippers 2006).

1.1.3 Mutatorgene

Mutatorgene gewährleisten die Integrität des Genoms und die Zuverlässigkeit des Informationstransfers. Durch den Verlust der Funktion beider Allele kann es zu einer erhöhten Mutationsrate kommen. Dabei können solche zufälligen Mutationen auch Tumorsuppressorgene und Protoonkogene betreffen. Mutatorgene sind z.B. *MLH1* und *MSH2*, die beide eine wesentliche Rolle in Reparaturprozessen nach der DNA-Replikation spielen.

1.1.4 DNA-Schäden und DNA-Reparatur

Das Überleben aller Organismen hängt davon ab, dass die genetische Information der Zellen korrekt an die Tochtergenerationen weitergegeben wird. Die Genomstabilität ist essentiell, da Veränderungen unkontrolliertes Wachstum, Tumorbildung oder Apoptose nach sich ziehen können. Doch immer wieder kommt es im Genom zu Veränderungen der Chromosomenstruktur oder -zahl, sowie zu Veränderungen der DNA-Sequenz. Diese können spontan oder induziert sein. Spontane Mutationen treten mit einer Häufigkeit von ca. 10^{-6} pro Gen pro Zellteilung auf. Mutationen können endogen, wie z. B. durch die Fehlverteilung von Chromosomen bei der Meiose, durch eine fehlerhafte Chromosomen-Rekombination oder durch fehlerhafte DNA-Replikation verursacht werden, oder durch exogene Einflüsse, wie chemische oder physikalische Mutagen. Chemische Mutagen sind Basenanalogue, desaminierende, alkylierende oder interkalierende Agenzien. Physikalische Ursachen können UV- und andere ionisierende Strahlung sowie Hitzeeinwirkung und damit einhergehende Hydrolyse sein.

Um die Stabilität der DNA-Sequenz zu erhalten, stehen dem Organismus je nach Art der Mutation verschiedene Reparaturprozesse zur Verfügung. Alkylierungen von Basen können direkt durch Alkyltransferasen repariert werden. Daneben korrigieren Exzisionsreparaturmechanismen den falschen Einbau von Nukleotiden. Die Basen-Exzisionsreparatur (BER) schneidet eine falsche Base aus einem DNA-Strang, indem die N-glykosidische Verknüpfung zum Zucker durch eine DNA-Glykosylase entfernt wird. BER repariert DNA-Schädigungen wie Methylierung, Oxidation oder Fragmentierung von Basen durch ionisierende Strahlung oder oxidativen Stress. Die Nukleotid-Exzisions Reparatur (NER) repariert bei umfangreicheren DNA-Schädigungen, wie z. B. der Bildung von Thymin-Dimeren nach UV-Schädigung. Der Ablauf des Reparatur-

systems NER kann in vier Schritten beschrieben werden: Erkennung des Schadens, Strangbruch und Beseitigung, Auffüllung der Lücke und Ligation. Mutationen in Proteinen des NER führen zur Ausbildung des Krankheitsbildes Xeroderma pigmentosa, einer extreme UV-Sensibilität mit erhöhtem Krebsrisiko nach UV-Exposition.

Doppelstrangbrüche entstehen unter physiologischen Bedingungen, wie z. B. durch eine somatische Rekombination oder durch oxidative Einflüsse. Hier greift die Doppelstrangreparatur (DSBR, Double Strand Break Repair) ein (Yu et al. 1999). Bei Doppelstrangbrüchen besteht die Möglichkeit, die fehlende Information für den betreffenden DNA-Abschnitt vom homologen Chromosom oder vom Schwesterchromatid zu bekommen. Dies funktioniert über nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ, non homologous end joining) oder auch durch homologe Rekombination. Eine Störung dieses Reparatursystems führt häufig zur Ausbildung des Nijmegen-Breakage-Syndroms, einer Erkrankung bei der es zu verstärkten Doppelstrangbrüchen

kommt.

Basenfehlpaarungen entstehen während der DNA-Replikation oder durch Desaminierung von 5'-Methylcytosin zu Uracil, welche zur G•T-Fehlpaarung führt. Basenfehlpaarungen können weder durch Exzision- noch durch Direkt-Reparatur korrigiert werden. Vielmehr wird dieser Fehler durch die Fehlpaarungs-Reparatur beseitigt (MMR, Mismatch Repair) (Jiricny 2000). Während der Replikation können auch Insertions-/Deletionsschleifen (IDL) durch das Verrutschen des neusynthetisierten Stranges gegen die Matrix entstehen, wobei die Replikationsmaschinerie kurzzeitig von den DNA-Strängen abgelöst wird. Es werden dann zusätzliche Nukleotide eingebaut oder deletiert, so dass es keine komplementären Nukleotide gibt und Einzelstrangschleifen in der

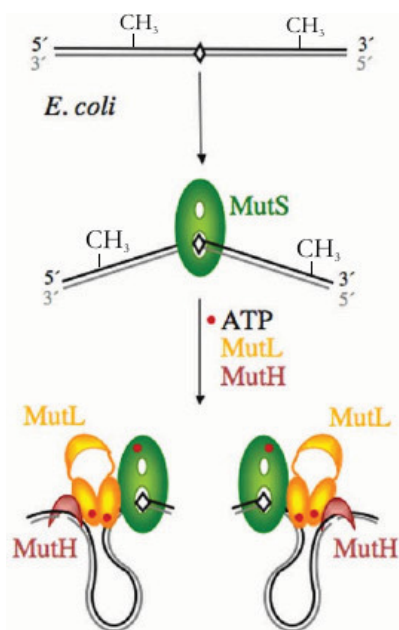


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des MMR-Systems in *E. coli*. A= MutS α (grün) bindet an fehlgepaarte DNA, Elternstrang durch Methylierung gekennzeichnet, B= Bindung von MutL α (gelb) und MutH (rot); (aus Yang et al. 2007)

DNA-Helix entstehen (Plotz et al. 2006, Fishel et al 1999, Kunkel & Erie 2005).

Erstmalig nachgewiesen wurde die DNA-Fehlpaarungs-Reparatur in *E. coli* (Rydberg, 1978). MMR ist evolutionär ein hoch konservierter Prozess und im Vergleich zu Zellen mit intaktem MMR ist die Mutationsrate für den neu synthetisierten Strang in MMR-defizienten Zelllinien 100-1000fach erhöht. Das MMR-System von *E. coli* ist sehr intensiv untersucht. Die wichtigsten am MMR-System in *E. coli* beteiligten Proteine sind MutS, MutL und MutH (Modrich, 1989) (Abb.1.1.). Ein Dimer aus MutS-Protein bindet an fehlgepaarter DNA. Dann interagiert das β -Ringklemmen-Protein mit MutS und verstärkt so wahrscheinlich die Bindung von MutS an die Fehlpaarung. In einer ATP-abhängigen Reaktion bindet das Homodimer MutL an MutS und aktiviert die Nukleaseaktivität von MutH. MutH gehört zur Familie der Typ II – Restriktionsendonukleasen und schneidet den neu synthetisierten nicht methylierten Strang. Der entstehende Einzelstrangbruch kann sowohl 3' als auch 5' von der Fehlpaarung liegen. Die Entwindung der DNA-Helix erfolgt über eine Helikase II (UvrD), die MutL-abhängig agiert und an den Einzelstrang bindet (Guarné et al. 2004). Darüber hinaus sind noch verschiedene Endonukleasen (wie RecJ, ExoVII, ExoI und ExoX) an

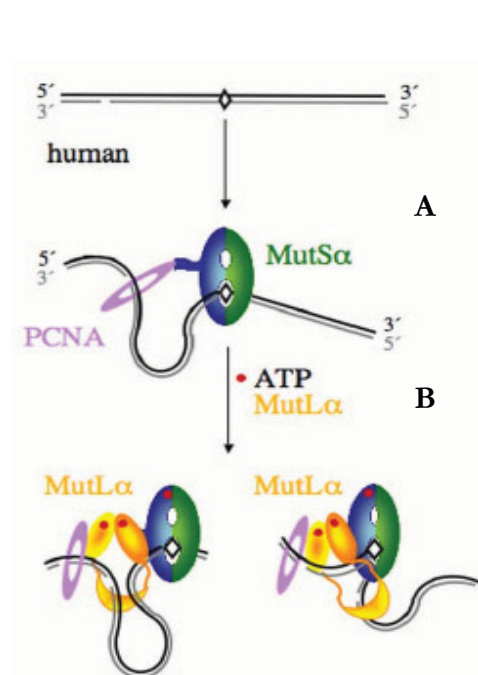


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des MMR-Systems in Eukaryoten. A= MutS α (MSH2 (blau) und MSH6 (grün)) interagiert mit PCNA (pink), Tochterstrang durch Bruch gekennzeichnet, B= Bindung von MutL α (MLH1 (orange) und PMS2 (gelb)); (aus Yang et al. 2007)

der Exzision falscher Nukleotide beteiligt. Die entstandene Einzelstranglücke wird durch das Einzelstrang-Bindeprotein (SSB, single strand binding protein) stabilisiert und die Synthese des neuen Stranges erfolgt über eine Auffüllreaktion mittels Polymerase III und anschließender Ligation und Methylierung des Stranges (Kunkel & Erie 2005, Matson & Robertson 2006, Rasmussen et al. 1998).

In Homologie zum MMR-System in *E. coli* gibt es auch ein MMR-System in Eukaryoten. Anstelle des MutS Homodimers in *E. coli* bindet bei Eukaryoten ein Heterodimer aus MSH2 und MSH6 an fehlgepaarte DNA. Nach der Initiation der Fehlpaarungsreparatur interagiert der Heterodimerkomplex MutL mit dem Komplex MutS. Ähnlich wie bei *E. coli*

werden weitere Proteine zur Fortsetzung des Reparaturmechanismus benötigt (PCNA, EXO1, Pol δ , RPA, DNA-Ligase) (Abb1.2.).

Ein dritter Komplex, Mut γ , besteht aus den Proteinen MLH1 und MLH3 (in Hefe Mlh1p-Mlh3p); er scheint aber bei der Fehlpaarungsreparatur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Funktion des MLH1/MLH3-Komplexes ist nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass er an der Reparatur von IDLs beteiligt ist (Kunkel & Erie 2005, Fishel 2001, Harfe & Robertson 200). Detailliertere Erläuterungen folgen im Abschnitt 1.2.1.

Defekte im MMR-System führen beim Menschen zu verschiedenen Krebserkrankungen, so z. B. zum Turcot-Syndrom und zum hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom.

1.2 Das erbliche nicht-polypöse kolorektale Karzinom (Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)

Ein Verlust des DNA-Fehlpaarungs-Reparatursystems führt in einer Zelle zu einer erhöhten genetischen Instabilität und somit zu stark erhöhten Mutationsraten (Parsons, et al. 1993). Das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC, hereditary non-polyposis colon cancer), auch Lynch Syndrom genannt, wird durch Keimbahnmutationen in den MMR-Genen *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* und *hPMS2* hervorgerufen (Robinson et al. 2007; Peltomäki 2004). Es tritt mit einer Häufigkeit von 1-5 % aller Darmkrebsarten auf und ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit der Bildung von kolorektalen Karzinomen in frühem Alter (ca. 45 Jahre) (Lynch & de la Chapelle 1999, Peltomäki 2001). Hinzu kommt ein verstärktes Risiko für andere Krebsarten, wie z. B. im Endometrium, Magen, Nierenbecken, Ovarien, Pankreas, Gehirn und Haut. Männer haben dabei ein höheres Risiko als Frauen (Robinson et al. 2007, Rustgi 2007, Engel 2006, Umar et al. 2004, Lynch & de la Chapelle 2003). Mit ca. 61.000 Neuerkrankungen pro Jahr gilt Darmkrebs als zweithäufigste Tumorerkrankung in Deutschland. Bei etwa 10 % der Erkrankten wird ein familiärer Hintergrund angenommen (Engel IMISE. 2008). Das Risiko an Dickdarmkrebs zu erkranken liegt bei Mutationsträgern mit familiärem Hintergrund bei ca. 80 % (Rustgi 2007).

Zur klinischen Diagnose werden die Amsterdam-Kriterien herangezogen, welche 1991 zuerst postuliert und 1999 erweitert wurden (Vasen et al. 1991, Vasen et al. 1999).

Während die Amsterdam-Kriterien I nur kolorektale Karzinome beinhalten, schließen die Amsterdam-Kriterien II auch andere HNPCC-assoziierte Karzinome ein. Die Kriterien lauten:

1. Mindestens drei Verwandte in zwei Generationen müssen an einem Kolorektalkarzinom erkrankt sein.
2. Ein Betroffener muss ein Verwandter 1. Grades gegenüber den beiden anderen sein.
3. Die Erkrankungen müssen in mindestens zwei aufeinander folgenden Generationen auftreten.
4. Das Erkrankungsalter des Betroffenen liegt unter 50 Jahren.
5. Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) muss bei jedem Betroffenen mit kolorektalem Karzinom ausgeschlossen sein.

90 % der Patienten, die die Amsterdam-Kriterien erfüllen, zeigen eine Mutation in den MMR-Genen (Lagerstedt Robinson et al. 2007).

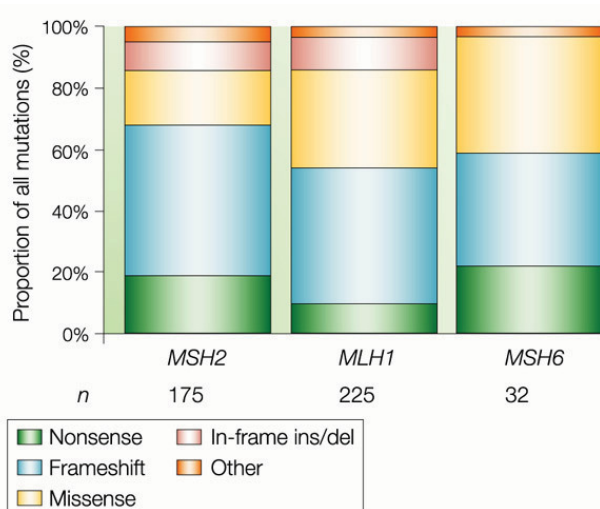
Da nicht alle Patienten bzw. Familien mit nachgewiesener Keimbahnmutation die sehr strengen Amsterdam-Kriterien erfüllen, wurde ein erweiterter Kriterienkatalog definiert (Bethesda-Kriterien) und später überarbeitet (Umar 2004):

1. Der Patient ist bei der Diagnose jünger als 50 Jahre.
2. Das Auftreten HNPCC-assoziiierter Tumore ist unabhängig vom Alter des Betroffenen.
3. Der Tumor weist eine hohe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) auf und muss in einem Patienten unter 60 Jahren diagnostiziert werden.
4. Es finden sich kolorektale Karzinome in einem oder mehreren Verwandten 1. Grades im Alter unter 50 Jahren.
5. Das Auftreten eines kolorektalen Karzinom in mindestens einem Verwandten 1. oder 2. Grades eines Betroffenen unabhängig vom Alter.

Bei HNPCC-assoziierten Tumoren liegt in etwa 90 % der Fälle eine Mikrosatelliten-Instabilität vor (Aaltonen and Peltomaki, 1994), wohingegen bei spontanen Tumoren nur in etwa 15 % der Fälle eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) in Tumorgewebe gefunden wird (Rustgi 2007). Bei Mikrosatelliten handelt es sich um Sequenzwiederholungen von typischerweise Mono- oder Dinukleotiden. Sie sind über das ganze Genom verteilt (Plotz et al., 2006). Durch Fehler in der Replikation werden solche DNA-

Abschnitte instabil. MSI ist daher ein üblicher Marker, um Fehlpaarungs-Reparaturdefekte in Tumoren zu identifizieren. Üblicherweise werden bei einem Test auf MSI fünf verschiedene Mikrosatelliten-Loci untersucht. Sind mindestens zwei der fünf Marker positiv, spricht man von „MSI-high“ Tumoren (Umar et al 2004).

Ein weiteres genspezifisches Screeningverfahren ist der Nachweis der Veränderung der MMR-Proteinexpression im Tumor. Durch immunhistochemische Färbung werden die Genprodukte der verschiedenen Gene des Reparatursystems nachgewiesen. Der Verlust oder die Abschwächung der Färbung eines Proteins im Zellkern zeigt eine verminderte Expression oder Stabilität dieses Proteins an und gibt damit einen Hinweis nicht nur auf einen Fehler im MMR-System, sondern auch auf das von einer Mutation be-



Nature Reviews | Cancer

Abb. 1.3: Verteilung der Mutationen in den am häufigsten betroffenen Genen bei HNPCC-Patienten. (aus: de la Chapelle „2004)

troffene Gen (Plaschke et al. 2002; Vossen et al. 1998; Dietmayr et al. 1997).

Abbildung 1.3. zeigt die Verteilung der bekannten Mutationen in den drei am häufigsten betroffenen Reparaturproteinen. Spleiß- und Kettenabbruch-Mutationen werden zu ca. 70 % im *MSH2*-, ca. 55 % im *MLH1*- und ca. 60 % im *MSH6*-Gen gefunden. Mutationen dieser Art führen im All-

gemeinen zum Funktionsverlust des Proteins. Auch Leserasterverschiebungen, wie sie bei Insertionen oder Deletionen entstehen, bedingen in der Regel einen vorzeitigen Kettenabbruch und liefern somit zumeist ein funktionsloses Protein. Die Auswirkung einer Missense-Mutation ist dagegen nicht vorhersagbar. Zirka 32 % der *MLH1*-, 17 % der *MSH2*- und 38 % der *MSH6*-Mutationen sind Missense-Mutationen (de la Chapelle, 2004). Bei den Missense-Mutationen kommt es zum Austausch eines Nukleotidpaares in der DNA-Sequenz, was im Genprodukt zu einer Aminosäure-Änderung führt. Solche Mutationen können das kodierte Protein komplett inaktivieren, die Wirkungsweise des Proteins verändern, oder aber wie stille Mutationen ohne Einfluss auf die

Proteinfunktion sein (Ellison et al. 2001). Da sich die Pathogenität einer Missense-Mutation nicht vorhersagen lässt, werden sie auch als Varianten unklarer funktioneller Relevanz (UV, unclassified variant) bezeichnet.

1.2.1 Die Gene des humanen MMR-Systems und der Vergleich mit homologen Proteinen in der Hefe

1.2.1.1 MutS

Die Gene der MutS-Familie sind in Pro- und Eukaryoten hoch konserviert. Prokaryotisches MutS-Protein bildet bei der Fehlpaarungs-Reparatur ein Homodimer. Die eukaryotischen Homologe von MutS unterscheiden sich durch die Bildung von Heterodimeren. Das humane MutS α ist ein Komplex aus hMSH2 und hMSH6 (in Hefe yMsh2p-yMsh6p (Lee et al. 2007)). Dieser Komplex erkennt hauptsächlich einzelne Nukleotidfehlpaarungen und initiiert den Reparaturprozess. hMSH2 und hMSH3 (in Hefe yMsh2p-yMsh3p) bilden den Komplex MutS β (Lee et al. 2007). Dieser bindet an Insertions-/Deletionsschleifen mit bis zu 16 zusätzlichen Nukleotiden in einem Strang. Die Proteine der MutS-Familie besitzen mehrere gemeinsame Domänen. Im N-terminalen Bereich befindet sich eine DNA-Bindedomäne, darauf folgt eine Core-Domäne, die die DNA-Bindedomäne und die Interaktionsdomäne in der Faltung in räumliche Nähe zueinander bringt. Weiterhin besitzt das Protein eine zweigeteilte Interaktionsdomäne im zentralen Bereich des Proteins, welche die Interaktion mit dem Interaktionspartner vermittelt, weiterhin eine „Klammer“-Domäne und im C-terminalen Bereich des Proteins eine ATPase-Domäne (Abb. 1.4.). Die Klammer-Domäne stabilisiert die DNA-Bindedomäne und schließt sich bei ATP-Bindung enger um die fehlgepaarte DNA (Abb. 1.5.) (Lamers et al 2004).

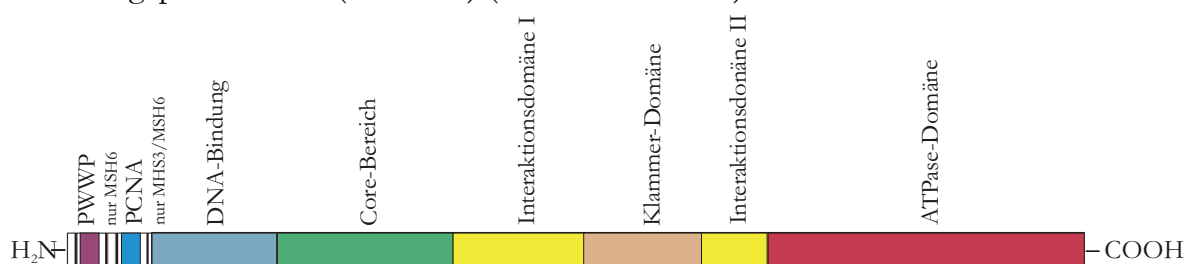


Abb. 1.4: Genereller Aufbau der MutS-Proteine. Weitere Erläuterungen im Text. PCNA= proliferating cell nuclear antigen, PWWP= Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin-Motiv (nach : Lamers et al. 2004; Obmalova et al .2000; Olilla et al. 2006; Guerrette et al 1998; Warren et al. 2007; Clark et al. 2007)

Neben den fünf, allen MutS-Proteinen gemeinsamen, Domänen verfügen die Proteine hMSH3 und hMSH6 vor der DNA-Bindedomäne im N-Terminus über eine PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-Bindedomäne. PCNA wird in der Fehlpaarungsreparatur eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung der MutL α -Endonuklease-Aktivität zugeschrieben, außerdem ist es ebenfalls beim Reparatur-Syntheseschritt notwendig (Iyer et al. 2008). Humanes MSH6 besitzt außerdem im N-terminalen Bereich eine sogenannte PWWP-Domäne. Sie hat ihren Namen nach einem konservierten Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin-Motiv. Die Funktion ist unklar, aber es wird vermutet, dass es sich um eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne handelt. (Clark et al. 2007; Stec et al 2000).

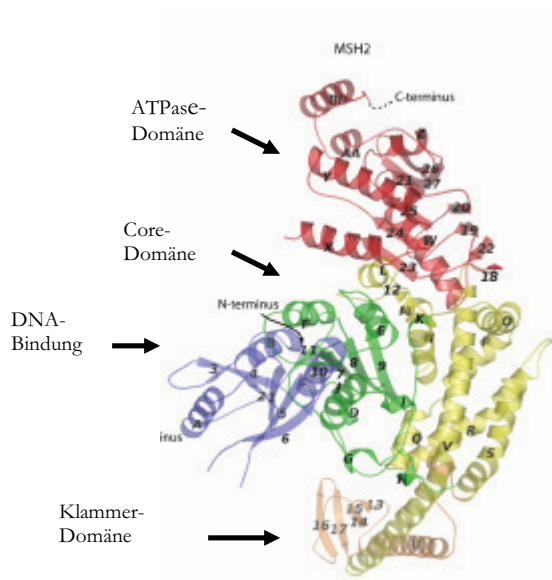


Abb.: 1.5: 3D-Struktur von hMSH2 mit den entsprechenden Domänen. rot= ATase-Domäne, grün = Core-Domäne; blau = DNA-Bindedomäne; beige = Klammer-Domäne, gelb = Interaktionsdomäne (aus: Warren et al. 2007)

MutS erkennt als Schlüsselprotein der DNA-Fehlpaarungs-Reparatur fehlgepaarte oder ungepaarte Basen und besitzt eine intrinsische ATPase-Aktivität. Die ATP-Bindung wirkt nach Erkennung der Fehlpaarung wie ein Schalter, der die Bindung von MutS an die DNA verstärkt, die Bindung von MutL erlaubt und anschließend die Reparatur initiiert (Lamers et al. 2004). Weiterhin wird vermutet, dass die ATP-Affinität in den beiden Monomeren unterschiedlich ist und, während ATP im einen Monomer ge-

bunden ist, spaltet das andere Monomer das γ -Phosphat. Daher spricht man auch von einer zusammengesetzten ATPase (Lamers et al. 2000). Die MutS-ATPasen gehören zur Großfamilie der ABC-(ATP binding cassette) ATPasen. Sie besitzen DNA-Abschnitte mit hochkonservierten Walker A- und Walker B-Motiven, die für die ATP-Bindung und -Hydrolyse erforderlich sind (Abb.1.6.).

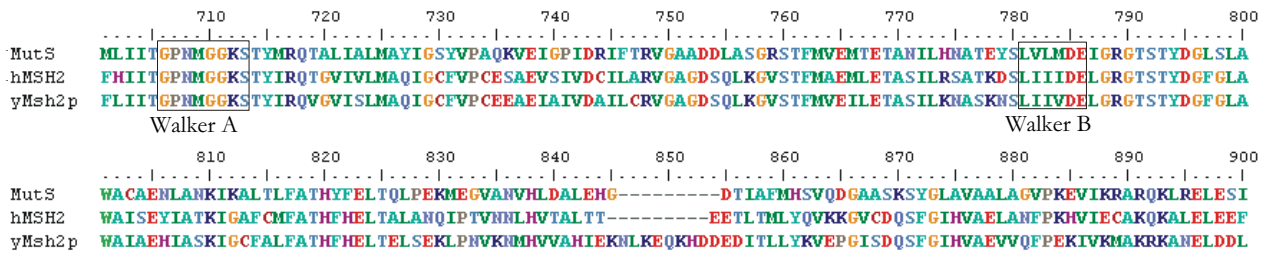


Abb. 1.6: Sequenzvergleich der ATPase-Domäne von MutS aus *E. coli*, Hefe Msh2p, Humanes MSH2; die Rahmen markieren Walker-A- und Walker-B-Motiv, die für die Bindung und Hydrolyse von ATP essentiell sind.

Von einem Helix-Turn-Helix-Motiv im C-Terminus wird angenommen, dass es in MutS α -DNA-Komplexen die ATPase in der richtigen Orientierung hält (Warren 2007).

1.2.1.2 MutL

Zu den MutL-Proteinen gehören sowohl pro- als auch eukaryotische Vertreter. Bakteriell MutL bildet im Reparatursystem ein Homodimer. Eukaryotisches MutL ist ein Heterodimer. Humanes MutL α besteht aus den Proteinen hMLH1 und hPMS2 (in Hefe Mlh1p-Pms1p (Hall et al. 2003)). Dieser Komplex ist an der Reparatur von Nukleotid-Fehlpaarungen beteiligt. Das zweite Heterodimer MutL β bestehend aus MLH1 und PMS1 (in Hefe Mlh1p-Mlh2p) ist in die Reparatur von IDLs involviert (Fishel et al. 1998; Kondo et al. 2003). Beide Heterodimere binden im Reparaturmechanismus an den MutS α - oder MutS β -Komplex. Neben Funktionen in der Reparatur von Missense-Mutationen spielt MLH1 sowohl im humanen als auch im Hefesystem eine Rolle in Rekombinationsprozessen (Baker et al. 1996). Im N-terminalen Bereich der MutL-Genfamilie ist eine stark konservierte ATP-Domäne lokalisiert (Raevaara et al. 2005, Ellison et al. 2004) und im C-Terminus liegt die Interaktionsdomäne (Kondo et al. 2001, Guerrette et al. 1998) (Abb. 1.7.).

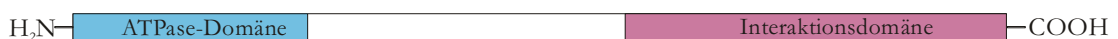


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der MutL-Proteine. (nach: Kondo et al 2005; Fishel et al. 1998; Raevaara et al. 2005; Guerrette et al. 1998)

Die konservierte ATPase-Domäne gehört zu der GHKL-Superfamilie von ATPasen. Im Gegensatz zu der ATPase der MutS-Proteine besitzen sie keine Walker-Motive. Die

GHKL-ATPasen zeichnen sich durch vier aufeinanderfolgende Sequenzmotive (I-IV) aus (Abb. 1.8.), die sowohl in *E. coli* in der GyraseB als auch im humanen „heat shock protein“ HSP90 vorkommen (Pang et al 1997, Ban et al. 1999; Räschle et al. 2002; Dutta et al. 2000).

```

1      MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIQRPANAIKEMIENCLDAKSTSIQVIVKEGGLKLIQ
      I
61     IQDNGTGIIRKEDLDIVCERFTTSKLSQSFEDLASISTYGFRGEALASISHVAHVTTITTKTA
      II                               III
121    DGKCAYRASYSDGKLKAPPKPCAGNQGTQITVEDLFYNIATRKRKALKNPSEEYGKILEVV
      IV
  
```

Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Sequenzmotive I-IV der ATPase-Domäne von hMLH1; in rot wichtige hochkonservierte Aminosäurereste. Das Motiv I enthält die Sequenz EXXXNXXD, das Motiv II birgt DXG**X**G, das Motiv III umfasst GXXG**X**G/A und Motiv IV beinhaltet GT.

Die in den MutL-Proteinen in der ATPase-Domäne katalytisch aktiven Aminosäuren sollen im Folgenden näher beschrieben werden. Im Motiv I des humanen MLH1 (einer α -Helix) finden sich die katalytisch aktiven Aminosäuren E34 und N38 (Abb. 1.8.), welche bei der Bindung von Mg^{2+} involviert sind. Die Motive II und IV sind Bestandteile einer β -Faltblattstruktur. Der darin enthaltene Aminosäurerest D63 (Abb. 1.8. Motiv II) ist wichtig für die Bindung von Nukleotiden. Das Motiv III enthält die ATP-Bindetasche. Bakteriellies MutL und hPMS2 besitzen ebenfalls diese hochkonservierten Aminosäurereste. (In *E. coli* sind dies die Aminosäurereste E29, N33 und D58) (Abb.: 1.9.) (Räschle et al. 2002).



Abb.1.9: Schematische Darstellung der Entfaltung der ATP-Bindetasche im hPMS2-Protein. Der Pfeil deutet auf das Motiv III, welches sich öffnen muss, um ATP zu binden. Römische Ziffern bezeichnen die anderen drei Motive. grau= ATP und Mg^{2+} (verändert aus Räschle et al. 2002)

In der Interaktionsdomäne wird die Dimerisierung mit anderen Proteinen vermittelt (PMS2, MLH3 usw.). hPMS2, hPMS1 und hMLH3 interagieren mit hMLH1 im Bereich der Aminosäurereste von 492-756. Dabei scheint der Bereich zwischen den Aminosäureresten 695-756 für die Bindung von hPMS2 von großer Bedeutung zu sein. Eine Deletion dieser Region verhindert eine Interaktion von hMLH1 und hPMS2 voll-



Abb.: 1.10: 3D-Struktur von hMLH1 mit den vier Sequenz-Motiven I-IV und den katalytischen Aminosäuren zur ATP-Bindung (Struktur erstellt über EsyPred 1BKN, Lambert et al. 2001)

ständig, wohingegen die Interaktion mit hPMS1 und hMLH3 noch intakt ist (Kondo et al.2003). Im C-terminalen Bereich der Proteine hMLH1 und yMlh1p ist ein sogenanntes CTH-Motiv in den letzten 13 Aminosäuren zu finden. Dieses scheint auf die MMR-Funktion einen Einfluss zu haben, wohl aber nicht auf die Interaktion mit dem jeweiligen Partner-Protein (Pang et al.1997, Shcherbakova et al. 2001). MutL-Proteine können nicht an fehlerhafte DNA binden, aber sie besitzen eine schwache DNA-Einzelstrang-Affinität und DNA verändert die Fähigkeit von MutL ATP zu binden oder zu hydrolysieren, was für bakterielles MutL demonstriert wurde (Ban et al. 1999).

Humanes MutL α besitzt in den Monomeren hMLH1 und hPMS2 unterschiedliche Affinitäten für die Bindung von ATP. Es wird angenommen, dass die Bindung von DNA oder anderen MMR-Proteinen die ATP-Bindungseigenschaften im Komplex MutL α ändern und so zu einem Ringschluss führen kann. Damit wird die Immobilisation von MutL α ausgelöst und erst die Hydrolyse von ATP bewirkt das Lösen der Ringklemme und damit die Entlassung von Einzelstrang-DNA (Räschle et al 2002, Ban et al. 1999). Der konservierte N-terminale Bereich von bakteriellem MutL (bezeichnet mit LN40, trägt die Datenbankbezeichnung (PDB-ID) 1BKN) und humanem PMS2 (N-terminales Fragment von hMutL α ; PDB-ID: 1H7S) sind in ihrer Struktur aufgeklärt. Aufbauend auf der Analyse von LN40 sind Struktur-Berechnungen für hMLH1 möglich. Abb.1.10. zeigt die aktiven Zentren der ATPase-Domäne. Führen Mutationen in diesem Zentrum zu einer Konformationsänderung, kann dadurch möglicherweise die MMR-Aktivität reduziert oder gar aufgehoben werden. Missense-Mutationen in diesem Bereich können Einfluss auf die Bindung von Proteinen haben, die in der Interaktionsdomäne binden würden.

Die Tabelle 1.1. stellt noch einmal die Proteine des MMR-Systems in *E. coli*, *S.cerevisiae* und *H. sapiens* gegenüber.

Proteine des DNA Fehlpaarungs-Reparatur Systems

<i>E. coli</i>	Funktion	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Funktion
MutS	Bindet Fehlpaarungen	MutS α (Msh2p-Msh6p)	MutS α (hMSH2-hMSH6)	Erkennt Einzelfehlpaarungen-oder 1-2 bp IDLs
MutL	bindet an MutS, koordiniert MMR Schritte	MutS β (Msh2p-Msh3p) MutL α (Mlh1p-Pms1p) MutL β (Mlh1p-Mlh2p)	MutS β (hMSH2-hMSH3) MutL α (MLH1-PMS2) MutL β (MLH1-PMS1)	Erkennt IDLs von 2-16 bp paart mit MutS zur DNA-Reparatursynthese Funktion in <i>H. sapiens</i> unbekannt
-		MutL γ (Mlh1p-Mlh3p)	MutL γ (MLH1-MLH3)	in Hefe beteiligt an IDL MMR Involviert in Meiose
MutH	bricht unmethylierten Strang an GATC	nicht bekannt	nicht bekannt	
UvrD	DNA Helikase	nicht bekannt	nicht bekannt	
RecJ, ExoVII ExoI, ExoX	5' – 3' Exonuklease 3' – 5' Exonuklease	ExoI	EXO1	5' – 3' Doppelstrang-Exonuklease
Pol III		Pol δ	Pol δ	
β -Ringklemme	Initiierung der DNA-Synthese	PCNA	PCNA	Initiierung von MMR, DNA-Resynthese
SSB	Vermittlung bei Exzision und DNA-Synthese		RPA	Einzelstrangbindung, Terminierung der Exzision
DNA Ligase	Ligation	DNA Ligase	DNA Ligase	Ligation

Tab. 1.1: Proteine des MMR-Systems (Harfe & Robertson 2000, Kunkel & Erie 2005, Modrich 2006, Li 2008, Flores-Rozas & Kolodner 1998; Browsers et al. 2001, Plotz et al. 2006, Nielsen et al. 2004, Knudsen et al. 2007) IDL= Insertion-/Deletionsschleife; MMR= Fehlpaarungs-Reparatur-System; bp= Basenpaare

1.2.1.3 Verbundprojekt „Familiärer Darmkrebs“ HNPCC

1999 wurde das Deutsche HNPCC-Konsortium gegründet, um Familien mit Verdacht auf HNPCC eine umfassende medizinische Betreuung und Diagnostik zu liefern. In sechs interdisziplinären Zentren werden die vorhandenen Kompetenzen gebündelt, um ein umfassendes Vorsorge- und Früherkennungsprogramm zu gewährleisten. Es werden Daten aus den Bereichen Diagnostik und Früherkennung erhoben und ausgewertet. Darunter fallen Analysen zur Mikrosatelliteninstabilität, Immunhistochemische Untersuchungen und Mutationsdetektion. Daten über die individuellen Tumoren der Familienmitglieder, wie z.B. molekulare und histopathologische Tumoranalysen und die Ergebnisse von Vorsorgeuntersuchungen, sind in der zentralen Datenbank des Deutschen HNPCC-Konsortiums erfasst (Engel 2008, Engel et al. 2006). In frühem Stadium entdeckt ist ein kolorektales Karzinom in 90 % der Fälle heilbar; durch Metastasenbildung sinkt die Heilungschance auf 5 % (de la Chapelle 2004). Patienten mit pathogenen Mutationen sollten in ein engmaschiges Früherkennungsprogramm integriert werden, deshalb ist eine Identifizierung von Risikopersonen von großer Bedeutung. Auf der anderen Seite kann ein Patient aus einer Risikofamilie entlastet werden, wenn er die pathogene Mutation nicht besitzt.

1.2.2 Analyseverfahren zur Untersuchung von Missense-Mutationen in MMR-Proteinen in humanen Zellsystem

In verschiedenen Testsystemen wird mit unterschiedlichen Ansätzen versucht, Missense-Mutationen funktionell zu klassifizieren. So wird zum Beispiel die Interaktionsfähigkeit von MutS α mit MutL α untersucht, um Auswirkungen von in *MLH1* eingefügten Missense-Mutationen zu charakterisieren (Trojan et al. 2002, Raevaara et al. 2005, Nyström-Lahti et al. 2002, Plotz et al. 2006, Takahashi et al. 2007). In diesen Versuchen wird Heteroduplex-DNA auf einem Plasmid zusammen mit aufgereinigtem MMR-Protein-Komplex inkubiert. Die Heteroduplex-DNA ist das Substrat, indem eine eingeführte Fehlpaarung vom MMR-System repariert werden soll. Diese Fehlpaarung ist so konstruiert, dass durch die erfolgreiche Reparatur eine Restriktionsschnittstelle entsteht und so die Funktionalität des MMR-Systems getestet werden kann. Das zu testende Protein wird in für das betreffende Gen defizienten Zelllinien durch tran-

siente Transfektion generiert und hieraus Proteinextrakt für den Assay hergestellt. Defiziente Zellen für das *MLH1*-Gen sind zum Beispiel HCT 116- und 293T-Zellen. Für *MSH2* können dies LoVo- und für *MSH6* HCT115-Zellen sein (Raevaara et al. 2005; Ollila et al. 2006, Kariola et al. 2002).

Andere *in vitro*-Analysen untersuchen die Interaktion der humanen Proteine MLH1 oder PMS2. Dazu werden GST (Glutathione-S-Transferase)-MLH1 Fusionsproteine oder Varianten (mit Missense-Mutationen) und myc-PMS2-Fusionsprotein zusammen inkubiert und mittels Immunopräzipitation deren Interaktionen analysiert (Belvederesi et al. 2006). Andere Versuchsanordnungen benutzen Fusionsproteine aus Wildtyp bzw. mutiertem *MSH2*, *MSH3* oder *MSH6* mit GST (in *E. coli* generiert) und dem jeweiligen Interaktionspartner, über IVTT (*in vitro* transkription translation) markiert mit ³⁵S, hergestellt, um Interaktionen zwischen *MSH2/MSH3* bzw. *MSH2/MSH6* zu analysieren (Guerette et al. 1998). Ähnliche Versuche sind auch für MLH1 durchgeführt worden (Kondo et al. 2001).

Auch Veränderungen in der ATP-Bindungsaktivität können durch Missense-Mutationen in den Genen des MMR-Systems hervorgerufen werden. Bei Mutationen in den jeweiligen MMR-Genen (*hMLH1*, *hMSH2*) werden zu diesem Zwecke die jeweiligen Heterodimere *hMLH1-hPMS2* oder *hMSH2-hMSH6* an radioaktivmarkiertem Adenosin- γ -Phosphaten gebunden. Durch Zugabe von ATP kann in Abhängigkeit der Zeit die Freisetzung des Nukleotids beobachtet werden (Heinen et al 2002, Räschle et al. 2002).

Neben den eben beschriebenen *in vitro*-Untersuchungen wurden *in vivo* die subzelluläre Proteinlokalisierung unter Einsatz von *hMLH1-EGFP* und *hPMS2* untersucht. So wurde gezeigt, dass der Kerntransport des Dimers *MLH1/PMS2* durch Mutationen im *MLH1*-Gen gestört sein kann (Raevaara et al. 2005).

1.2.3 Hefe als Testsystem humaner MMR-Proteine

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird häufig als Modellorganismus zur Untersuchung homologer Gene anderer Eukaryoten verwendet. Die Hefe besitzt ein relativ kleines Genom mit 16 Chromosomen und einer Gesamtgröße von 12,5 Mb. Außerdem ist das komplette Genom sequenziert (Goffeau, et al., 1996; Goffeau, et al., 1997). Die Generationszeit liegt bei etwa 90 Minuten. Die meisten der im Labor verwendeten

Hefestämme sind haploid und somit leicht zu handhaben, da sich Mutationen dann direkt auf den Phänotyp auswirken. Homologien von Hefe-Proteinen zu Proteinen höherer Eukaryoten, die auch ähnliche Funktionen besitzen wie die Hefe-Proteine, machen *S.cerevisiae* zu einem Modellorganismus, in dem z. B. humane Proteine auf Funktionalität getestet werden können (Tab. 1.2.).

MutL	Anzahl Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]	Vergleich Human/Hefe Ident./Hom.
hMLH1	756	85	37%/57%
yMlh1p	769	87	
hPMS2	862	96	42%/62%
yPms1p	873	99	
hMLH3	1453	164	24%/47%
yMlh3p	715	82	

Tab. 1.2: Homologe Proteine des MMR-Systems in Hefe und Mensch (siehe auch Tab.1.1.); Ident= Identität; Hom= Homologie; h= human; y= yeast/Hefe; kDa= kilo Dalton

Solche *in vivo* Funktionsanalysen beruhen auf der Annahme, dass hoch konservierte Proteindomänen in einem Hefe- und Humanprotein die gleichen Funktionen repräsentieren und Mutationen in spezifischen konservierten Aminosäuren zu ähnlichen Defekten führen. So werden Aminosäuren in hochkonservierten Regionen des MLH1-Proteins ausgetauscht und auf ihre Funktionalität getestet (Räschle et al. 2002).

Ist der Bereich, in dem die humane Mutation liegt, nicht so hoch konserviert, kann unter Umständen ein Hybridprotein generiert werden, wobei ein Teil des Hefeproteins durch das homologe menschliche Protein an entsprechender Stelle eingefügt wird. Falls dieses Hybridprotein funktionell ist, können im Bereich des humanen Abschnitts Punktmutationen zur Funktionsanalyse eingeführt werden. Hiermit kann der Einfluss von Mutationen in dem humanen Proteinbereich auf die MMR-Funktion untersucht werden (Ellison et al. 2001). Ähnliche Untersuchungen konnten kürzlich erstmalig auch für Msh2p/hMSH2-Hybride durchgeführt werden (Diplomarbeit Frauke Herbst 2007).

Die Präzision der Replikation einschließlich der nachgeschalteten Korrekturprozesse, inkl. MMR, liegt bei ungefähr 1 Nukleotidaustausch pro 10^9 bis 10^{10} Nukleotiden pro Zellgeneration (Janning & Knust 2004). DNA-Abschnitte mit sich wiederholenden Sequenzen, wie z. B. Homopolymerstränge oder Mikrosatelliten) weisen jedoch deut-

lich höhere Mutationsraten auf. Dies wird genutzt, um funktionelle *in vivo* DNA-MMR-Analysen in der Hefe durchzuführen und Aufschluss über die Funktionalität von humanen Missense-Mutationen zu bekommen.

Für die *in vivo* Analyse der MMR-Aktivität sind Testsysteme in Hefe etabliert, die auf der Anwesenheit von Homopolymer- oder Heteropolymersträngen in Biosynthesegenen, wie zum Beispiel dem Lysin-, Uracil- oder Adeningen, beruhen (Clark et al. 1999; Shcherbakova et al. 1999, Ellison et al. 2001, Takahashi et al. 2007). Das Prinzip dieser Methode sei am Beispiel des *LYS2*-Gens erläutert (Abb. 1.11.). In das genomische *LYS2*-Gen wird ein A₁₄-Homopolymer-Strang eingefügt. Dadurch verschiebt sich das Leseraster des Reportergens um ein Basenpaar, das gebildete Protein ist nicht funktionell und die Zelle damit Lysin-auxotroph (Tran et al. 1997). Ein intaktes MMR-System kann Fehler während der Replikation in den Wiederholungsbereichen mit hoher Effizienz korrigieren. Ein selten auftretender, nicht reparierter Fehler bei der Replikation des Homopolymer-Stranges führt zum Verlust eines einzelnen A•T Basenpaares und dadurch zur Wiederherstellung eines funktionsfähigen *LYS2*-Reportergens - und damit zu Lysin-Prototrophie. Mutierte Zellen sind somit in der Lage, auf Medium ohne Lysin zu wachsen, während nicht-mutierte Zellen kein Wachstum zeigen (Shcherbakova et al. 1999). Dies geschieht in wildtypischen Hefezellen in Abhängigkeit vom verwendeten Hefestamm, mit einer Frequenz von $\sim 1,5 \times 10^{-7}$ (Wanat et al. 2007).

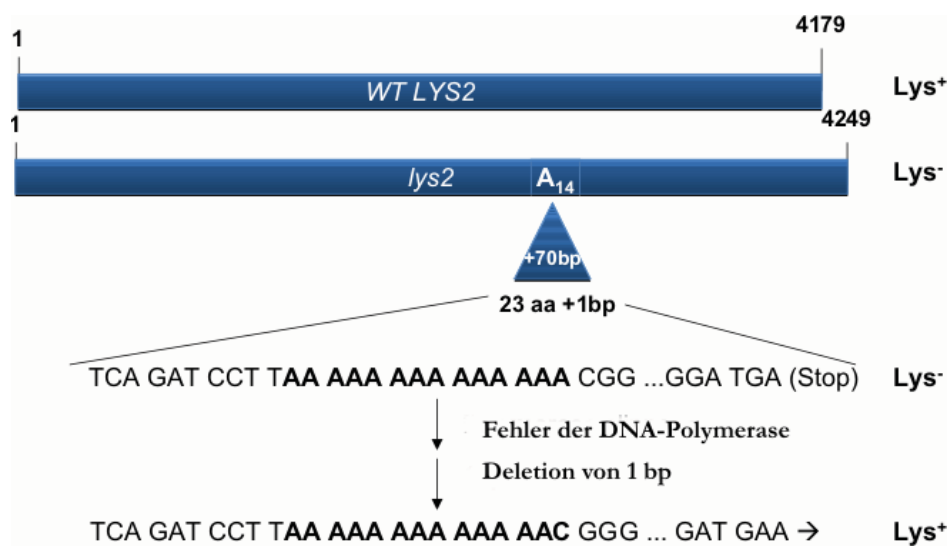


Abb.1.11: Prinzip des *LYS2*-A₁₄-Reportersystems; aa = Aminosäure

Eine weitere Möglichkeit humane MMR-Proteine funktionell in Hefe zu testen, ist der so genannte dominant negative Mutatorphänotyp. In dieser Analyse wird die Tatsache

nutzbar gemacht, dass eine starke Expression von humanem Wildtyp-MLH1 in *S.cerevisiae* zu einer Störung in der Fehlpaarungsreparatur und damit zu einer erhöhten Mutationsrate führt (Abb.1.12.). Die Expression nicht-funktioneller Allele zeigt hingegen keine Erhöhung der Mutationsrate. Der Phänotyp wird wahrscheinlich durch die Interaktion von hMLH1 mit Hefe-Pms1p, sowie weiterer nicht identifizierter Komponenten des Reparatursystems, ausgelöst, was zur Bildung nicht funktioneller Proteinkomplexe führt (Shimodaira et al. 1998).

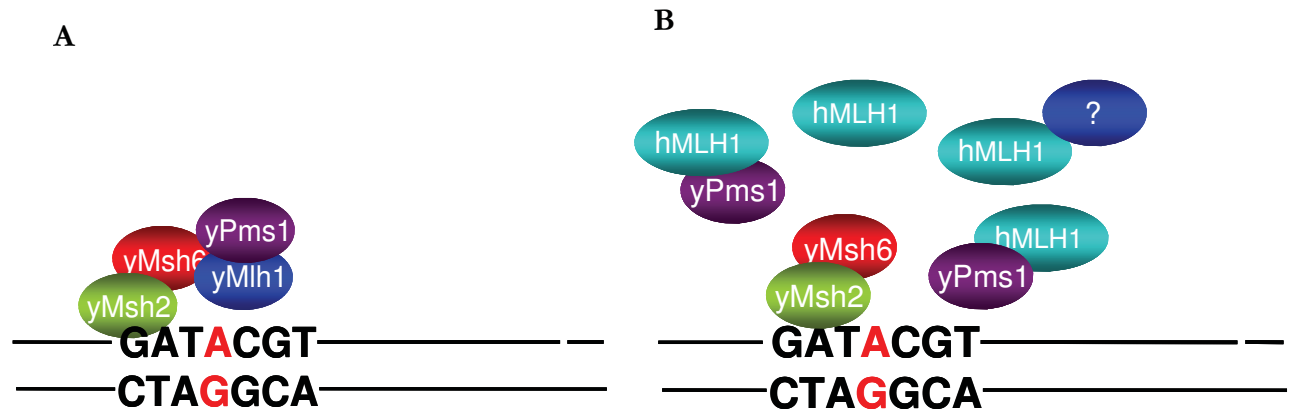


Abb. 1.12. Schematische Darstellung der Auslösung des dominant-negativen Mutatorphänotyps in *S. cerevisiae* durch die Expression von hMLH1. A= normale Situation in *S. cerevisiae* => Fehlpaarung wird repariert; B=erhöhte Expression von hMLH1 in *S. cerevisiae* => Reparatursystem wird gestört => eine erhöhte Mutationsrate. Die mögliche Interaktion mit anderen Komponenten des Hefe-MMR-Systems ist mit „?“ angedeutet. (verändert nach Heick 2008)

Eine weitere Möglichkeit, Auswirkungen von Punktmutationen zu untersuchen, ist die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse, bei der Protein-Protein-Interaktionen überprüft werden. Hierbei wird die zu analysierende Punktmutation in das entsprechende Gen integriert, um die Auswirkungen dieser Mutation auf die Interaktion des Proteins mit seinen Komplexpartnern zu untersuchen. Diese Analysen sind bisher nur mit hMLH1 und den Komplexpartnern hEXO1 und hPMS2 durchgeführt und publiziert worden (Kondo, et al., 2003).

In diesem Assay wird auf einem Shuttlevektor humanes MLH1 hinter die DNA-Bindedomäne des LexA-Protein fusioniert, so dass es als lexA-hMLH1-Fusionsprotein exprimiert wird. Ein zweiter Shuttlevektor trägt die VP16-Aktivator-domäne mit fusioniertem hPMS2. Durch Kotransformation in einen Hefestamm, der das LacZ-Gen unter der Kontrolle des lexA-Operators trägt, kommt es durch die Interaktion der beiden zu untersuchenden humanen Proteine zur räumlichen Nähe von Binde- und Aktivator-domäne (Abb. 1.13.). Das Reporter-gen kann somit exprimiert werden. Dadurch

kommt es bei der Interaktion von hMLH1 und hPMS2 im X-Gal-Overlay-Assay zur Blaufärbung der Hefekolonien (Kondo et al. 2003).

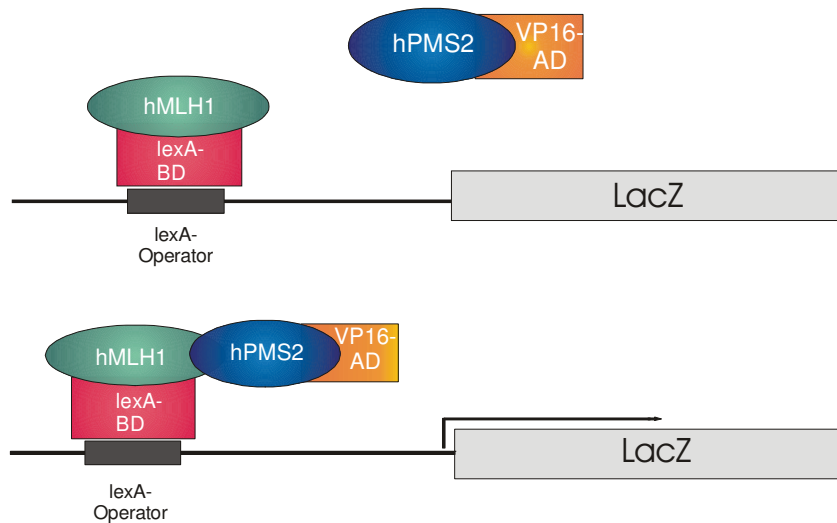


Abb. 1.13: Schematische Darstellung eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems. Die Interaktion von MLH1 und PMS2 erlaubt die Expression des *LacZ*-Gens.

Interaktionsanalysen mittels IVTT-hergestellten und radioaktiv markierten Proteinen mit dem jeweiligen GST-fusionierten Interaktionspartner können wie zuvor beschrieben (Abschnitt 1.1.2.) auch in der Hefe durchgeführt werden (Kondo et al 2003).

1.3 Hereditäre Multiple Osteochondrome

1.3.1 Embryonale Skelettbildung

Das menschliche Skelett ist ein kompliziertes und komplexes Organ. Es dient nicht nur als Bewegungsapparat, sondern auch zum Schutz der inneren Organe und ist im Wesentlichen für das Wachstum zuständig. Die Entwicklung des Skeletts ist genetisch festgelegt und in unterschiedliche Phasen unterteilt. In der Organogenese werden die Anlagen der zukünftigen Knochen von mesenchymalen Vorläuferzellen durch Kondensation und Differenzierung gebildet. Die weitere Differenzierung verläuft entweder über die enchondrale oder desmale Ossifikation. Desmale Ossifikation erfolgt im Wesentlichen in der Schädelkalotte, im Unterkiefer und im Schlüsselbein. In den langen Röhrenknochen und den Wirbeln findet man enchondrale Ossifikation. Aus den mesenchymalen Vorläuferzellen entwickeln sich bei der enchondralen Ossifikation Chondrozyten, bei der desmalen Ossifikation Osteoblasten. Bei der enchondralen Knochenentwicklung spielt die Wachstumsfuge eine entscheidende Rolle. Beim Längenwachstum kommt es zu einer Umwandlung von Knorpel in Knochen. Die Röhrenknochen bestehen aus einer knöchernen Diaphyse, die mit Knochenmark gefüllt ist und zwischen den beiden knorpeligen Epiphysen liegt. Während des Längenwachstums ist zwischen Diaphyse und Epiphyse die Wachstumsfuge, auch Epiphysenfuge genannt. In diesem Bereich liegt der Entwicklungsprozess von Knorpel zu Knochen (Abb.1.14).

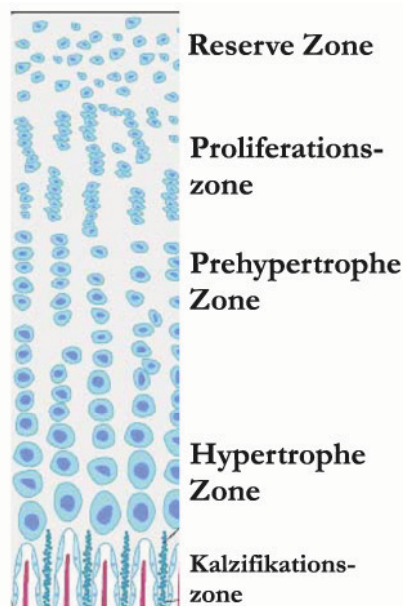


Abb. 1.14: Ausschnitt aus der Wachstumsfuge mit der Entwicklung der Chondrozyten (aus Stickens & Evans 1998)

Knorpel in Knochen. Die Röhrenknochen bestehen aus einer knöchernen Diaphyse, die mit Knochenmark gefüllt ist und zwischen den beiden knorpeligen Epiphysen liegt. Während des Längenwachstums ist zwischen Diaphyse und Epiphyse die Wachstumsfuge, auch Epiphysenfuge genannt. In diesem Bereich liegt der Entwicklungsprozess von Knorpel zu Knochen (Abb.1.14).

In der Wachstumszone sind die Chondrozyten im oberen Bereich in der sogenannten Reservezone eingebettet. Es handelt sich hier um eine lockere Zellordnung, die von relativ viel Matrix umgeben ist.

Auf die Reservezone folgt die Proliferationszone. Hier

ordnen sich die Chondrozyten säulenartig an. Zwischen diesen Säulchen ist viel Matrix. Danach kommt der Übergang zu hypertrophen Chondrozyten. In dieser Zone verändert sich die Morphologie der Zellen. Die Zellen werden größer und nehmen eine runde Form an. Die Extrazellulärmatrix nimmt ab. Bevor die Chondrozyten die Knochen-

zone erreichen werden sie apoptotisch. Die Matrix kalzifiziert, die Chondrozyten werden von Osteoblasten und die Knorpelmatrix durch eine Knochenmatrix ersetzt. (Mundlos 2004, Stickens & Evans 1998). Durch diese Komplexität des Skelettes lässt sich leicht vorstellen, dass es dadurch häufig von Erkrankungen betroffen ist. Multiple Osteochondrome sind ein Beispiel für Fehlbildungen dieses komplizierten Systems. Um die unterschiedlichen Differenzierungsschritte bei der Knochenentwicklung zu kontrollieren ist ein komplexes Signalnetzwerk notwendig. Ein wichtiger Faktor ist das Protein „Indian hedgehog“ (IHH). Es reguliert die Differenzierung von wichtigen Organ- und Körperstrukturen. Auch bei der Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten in der enchondralen Ossifikation spielt es eine wichtige Rolle. Die Chondrozytenproliferation und -differenzierung wird in der Wachstumsfuge über einen negativen Rückkopplungskreis reguliert. Während der Knorpelentwicklung differenzieren die proliferierenden Chondrozyten über ein Zwischenstadium, den prehypertrophen -, zu hypertrophen Chondrozyten (Abb1.14.). Mit der Initiation dieses Differenzierungssignalwegs bei prehypertrophen Chondrozyten exprimieren Knorpelzellen das Protein PTHrP (parathyroid hormone-related peptide) und IHH. Der PTH/ PTHrP- Rezeptor ist in den Knorpelzellen vor Beginn der IHH-Expression exprimiert. Die Expressionsdomänen der beiden Gene überlappen in Maus und Huhn. Ziel des ausgeschütteten IHH ist das Perichondrium, welches durch die Expression von mind. zwei weiteren Proteinen antwortet. Diese IHH- Antwort im Perichondrium direkt oder indirekt resultiert in der Expression von PTHrP im periartikulären Perichondrium. PTHrP gibt ein Signal zurück an den PTH/ PTHrP- Rezeptor in den prehypertrophen Zellen; hindert zusätzliche Chondrozyten daran den Differenzierungsweg fort zu schreiten und IHH zu exprimieren. Sind die prehypertrophen Chondrozyten vollständig zu hypertrophen differenziert, wird die IHH- Expression abgeschaltet. Diese Reduktion des IHH-Levels schwächt den negativen feedback-loop und erlaubt neuen Zellen den Differenzierungsweg einzuschlagen. Der durch die prehypertrophen Chondrozyten produzierte IHH-Level begrenzt seinerseits die Anzahl der Zellen, welche den hypertrophen Differenzierungsweg beschreiten. Dies liefert einen Mechanismus für die Regulation der Rate der hypertrophen Differenzierung (Vortkamp et al. 1996). Neben diesem IHH/PTHrP- Signalweg sind zum Beispiel auch „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) und „Fibroblast Growth Factors“ (FGFs) in die Regulation von Chondrozy-

ten-Proliferation, das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung und das Durchlaufen des Differenzierungsprozesses beteiligt. BMP-Signale aktivieren die Proliferation. Das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung wird durch BMP verzögert. Der Differenzierungsprozess der Chondrozyten wird durch BMP unabhängig vom IHH/PTHrP-System gehemmt. FGF wirkt antagonistisch zu BMP (Minina et al. 2001).

1.3.2 Knorpelgewebe

Neben den Knochen ist Knorpelgewebe das Stützgewebe des menschlichen Körpers. Wie Bindegewebe entwickelt es sich aus Mesenchym. Knorpelgewebe zeichnet sich durch seine Druckelastizität aus. Es ist in der Lage Gewicht zu tragen und Komponenten gegeneinander gleiten zu lassen.

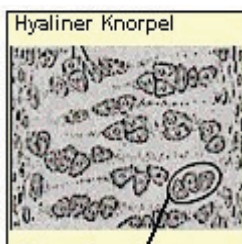


Abb. 1.15: Hyaliner Knorpel aus: <http://www.medizininfo.de/rheuma/anatomie/knorpel.htm>

Knorpel besteht aus wasserreichen Knorpelzellen und aus Interzellulärsubstanz. Es gibt drei verschiedene Arten von Knorpelgewebe:

1. Hyaliner Knorpel (Abb. 1.15.) kommt am häufigsten im menschlichen Körper vor: z. B. bei der embryonalen Skelettbildung, in den Rippen, den Gelenken, der Nase, dem Kehlkopf, der Luftröhre und den

Bronchien. Das interzelluläre Gewebe besteht aus einer amorphen Grundsubstanz. Darin eingebettet sind kollagene Fasern meist vom Typ 2.

Nach der Beendigung des Wachstums verbleibt hyaliner Knorpel an den gelenkbildenden Knochenenden, wo er sie als ca. 2 mm dicker Gelenkknorpel überzieht. Neben hyalinem Knorpel kommen im Körper auch noch 2. Elastischer- und 3. Faserknorpel vor. Chondroblasten können als Knorpelbildner bezeichnet werden, da sie die Extrazellulär-Matrix synthetisieren und nach außen abgeben. So rücken die Zellen immer weiter auseinander. Nach einer gewissen Zeit ist jede Zelle von Extrazellulärer Matrix (EZM) umgeben, nun spricht man von Chondrozyten. Durch die Matrix sind die Chondrozyten nur noch begrenzt teilungsfähig und die Tochterzellen können sich nicht mehr räumlich trennen. So entstehen die Chondrone, die ca. zwei bis acht Zellen enthalten. Da die Chondrozyten in der EZM eingemauert sind, muss das Wachstum von außen erfolgen. Dies geschieht über das Perichondrium, welches aus einer Schicht

Fibroblasten besteht. Das Wachstum erfolgt appositionell, d. h. die Zellen werden von außen ins Gewebe abgegeben und nicht innerhalb gebildet. Auch die Ernährung des Knorpelgewebes läuft über das Perichondrium ab. Da Knorpel grundsätzlich gefäßlos ist, diffundieren die Nährstoffe über das Perichondrium oder der Gelenkflüssigkeit in die Extrazellulärmatrix.

Die Knorpelmatrix besteht im Wesentlichen aus zwei Hauptkomponenten: einer flüssigen Phase mit Wasser und Elektrolyten und einer festen Phase mit Kollagenen, großen und kleinen Proteoglykanen und nicht kollagenen Glykoproteinen um nur einige zu nennen. Diese Komponenten geben dem Knorpel die schon genannten spezifischen Eigenschaften. Die Hauptbestandteile der festen Phase sind Kollagen Typ II und Aggrecane, dies sind große Proteoglykane, wie z. B. Perlekan. Sie machen zusammen mit dem Wasser und den Elektrolyten ca. 95 % der Hauptmasse aus.

Knorpel-Kollagen Typ II, der vorherrschende Kollagentyp im Knorpel, bildet die fibrilläre Grundstruktur in der Extrazellulärmatrix; es ist ein Homotrimer und wird wie andere Glykoproteine in den Chondrozyten synthetisiert. Im Knorpel sind die Kollagenmoleküle über Pyrimidine kovalent netzartig miteinander verknüpft. Der Abbau von Kollagen Typ II und anderen Matrix-Bestandteilen wird durch proteolytische Enzyme, wie z. B. Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP 7) erreicht. Aggrecane sind die sogenannten großen Proteoglykane. Sie bestehen aus einem zentralen Coreprotein und Glykosaminoglykan-Seitenketten. Die Seitenketten sind kovalent über Diesterbindungen mit dem Core-Protein verknüpft. Ein Beispiel einer Glykosaminoglykan-Seitenkette ist das Heparansulfat. Die restlichen 5 % der Knorpelmasse sind andere Kollagene, Pyrimidine und kleine Proteoglykane. Decorin ist ein solches kleines Proteoglykan. Es kann an Kollagen binden und die Kollagen-Fibrillogenese regulieren. Decorin bindet auch an TGF- β und spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Zellwachstums (Habenhauer et al. 2003).

1.3.3 Biosynthese von Heparansulfat (HS)

Heparansulfat-Proteoglykane sind im gesamten Organismus verbreitet, wie z. B. auf der Zelloberfläche und der Extrazellulärmatrix. Sie bestehen aus sulfatierten Glykosaminoglykan-Seitenketten, die an verschiedenen Core-Proteinen kovalent gebunden sind.

Die Initiation der Glykosylierung beginnt für alle Glykoproteine gleich. An ein Core-Protein wird entweder an einem Serin- oder Threonin- bzw. Asparagin-Rest ein Xylosyl-Rest glykosidisch verknüpft. Es folgt eine bestimmte Anzahl von definierten Zuckerresten:

Serin-O- 1 β Xyl 4- 1 β Gal 3- 1 β Gal 3- 1 β GlcA 4

An diese Initiation folgen für die einzelnen Glykosaminoglykane spezifische Zuckerreste.

Heparansulfat entsteht über die Initiation an einem Serin am Core-Protein. Nach der Verbindung aus den oben genannten Zuckerresten folgt ein Disaccharid aus einem Glukoronsäure- oder am C-2 sulfatierten Glukoronsäurerest, oder einem Iduronsäure- oder einem am C-2 sulfatierten Iduronsäurerest mit Derivaten der Glukosamine (N-Acetyl- Glukosamine (GlcNAc), N-sulfatierte Glukosamine (GlcNS) und unsubstituierte Glukosamine (GlcNH₃)). Bisher wurden 23 verschiedene Disaccharide in Heparansulfat oder als Zwischenprodukte in der Biosynthese bestimmt (Esko et al. 2002). Die Kettenlänge kann je nach Zelltyp und Core-Protein bis zu zehnfach variieren. Die Mechanismen der Kettentermination sind weitgehend unbekannt. Heparansulfat-Ketten beinhalten in der Regel 50- 150 Disaccharide. Nach ihrer Fertigstellung kommt es zu einer Reihe von enzymatischen Reaktionen, welche die Heparansulfat-Ketten modifizieren.

Heparansulfat (HS) Polysaccharide spielen eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen, z. B. der Zelladhäsion und der Regulation von enzymatischer Katalyse. Durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen erlangen die HS-Polysaccharide ihre biologischen Eigenschaften. Syndekane bilden eine ganze Gruppe von Proteoglykanen, die HS-Seitenketten tragen. Sie sind Bestandteile von Zellmembranen. Perlekan ist ein weiterer Vertreter eines Proteoglykans mit Heparansulfat-Seitenketten. Auch Perlekan ist auf Zelloberflächen zu finden.

1.3.4 Hereditäre Multiple Osteochondrome

Multiple hereditäre Osteochondrome, auch hereditäre multiple Exostosen genannt, sind eine dominant vererbte Krankheit mit einer Häufigkeit von 1:50 000 (Wuyts, van

Hul 2000). Osteochondrome sind in der Regel benigne knöcherne Auswüchse an den langen Röhrenknochen (Abb. 1.16.). Sie bestehen aus hartem Knochenmaterial, das

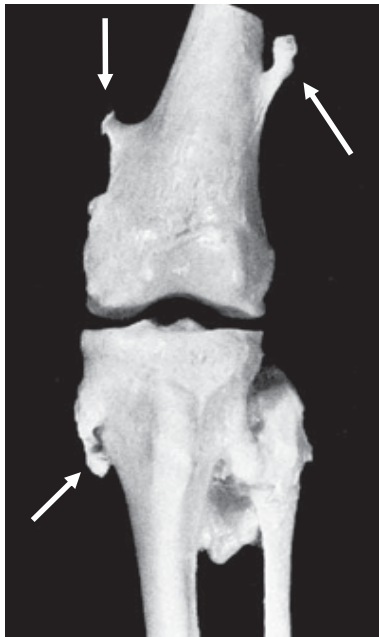


Abb. 1.16: Auswüchse an einem Knie; Pfeile deuten auf Osteochondrome; (aus: Stickens et al. 1998)

von einer Kappe mit hyalinem Knorpel überzogen ist. Während der Hauptwachstumsphase in der Kindheit bis zur Pubertät besitzen sie ihre größte Wachstumsaktivität. Es kann zu Verbiegungen und Deformationen der Röhrenknochen kommen. Des Weiteren können Funktionsstörungen durch Gefäß- und/oder Nervenkompression entstehen. (Rupprecht et al. 1972). Bei ca. 0,5 - 2% der Osteochondrom-Patienten tritt eine Entartung zu malignen Chondrosarkomen auf (Raskind et al. 1995). Ein Chondrosarkom ist ein maligner Tumor, dessen Zellen Knorpel bilden.

Man geht davon aus, dass es sich um eine Er-

krankung handelt, die dem „Two-Hit-Model“ nach Knudson folgt. Die Gene *EXT1* und *EXT2*, in denen in den meisten Fällen die Keimbahnmutation gefunden werden kann, wurden vor etwa zwanzig Jahren isoliert und damit molekularen Untersuchungen zugänglich gemacht. In sogenannten „Linkage“- Studien werden über Mikrosatellitenmarker chromosomale Regionen eingegrenzt. Solche Untersuchungen haben die Erkrankung der multiple hereditäre Osteochondrome mit den Genen *EXT1* auf Chromosom 8 und *EXT2* auf dem Chromosom 11 in Beziehung gesetzt. *EXT3* auf Chromosom 19 scheint nur in wenigen Fällen eine Verbindung zu zeigen (Blanton et al., 1996; Cook et al. 1993; Legai- Mallet et al. 1997). Ende 2007 waren 113 Mutationen in *EXT1* in Datenbanken registriert; für *EXT2* waren es 49 (nach HGMD). Beinahe jede Familie trägt ihre eigene Mutation (Dopson- Stone et al. 2000, Wuyts et al. 1998, Seki et al. 2001, Gigante et al. 2001)

In Mutationsuntersuchungen zeigt sich gelegentlich, dass sich trotz Kopplung zu *EXT1* oder *EXT2* keine Mutationen in den Genen finden lassen. Hier wird vermutet, dass in solchen Fällen die Mutationsereignisse außerhalb der kodierenden Region oder in der Promotorregion liegen (Hecht et al. 1995; Wuyts et al. 1997; Wells et al. 1997;

Xu et al. 1999). Spätere Studien haben außerdem gezeigt, dass zumindest einige dieser Fälle auf exonübergreifende Deletionen zurückgehen, die mit Sequenzierung nicht zu erfassen sind. Untersuchungen auf den Verlust der Heterozygotie lassen vermuten, dass es sich bei *EXT1* und *EXT2* um Tumorsuppressorgene handelt, da es zu Allelverlusten in Tumoren kommt (Hecht et al. 1995; Raskind et al. 1995). Auch in sporadischen Osteochondromen und malignen Chondrosarkomen werden Verluste beider Allelen in den Tumoren aufgezeigt (Bouvée et al. 1998).

Zytogenetische Studien lassen Allelverluste sowohl bei familiären als auch sporadischen Tumoren erkennen. Aus Chondrozytenkulturen lassen sich mittels GTG-Bänderung Verlust oder Neuordnung von 8q zeigen. Auch auf dem Chromosom 11 kann ein Verlust von 11p beobachtet werden. Des Weiteren treten auch zufällige chromosomale Abnormalitäten oder Deletionen auf Chromosom 8 auf (Bridge et al. 1993).

Immunhistochemische Analysen zeigen dass in 82 % der Tumoren das *EXT1*-Protein und in 54 % der Tumoren das *EXT2*-Protein vermindert exprimiert wird. In Zellkulturen von Osteochondrom-Chondrozyten zeigen 4 % keine Expression der beiden *EXT*-Gene (Bernard et al. 2001). Neben zytogenetischen und LOH- Untersuchungen wurden Analysen zur Bestimmung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen vorgenommen. In einer Studie wurden 42 Familien untersucht; 93 % der Familien zeigten eine Kopplung zu einem der *EXT*-Loci 1-3. Dabei zeigte sich eine Beziehung zwischen den Genotypdaten und der klinischen Ausprägung. *EXT1*-Mutationen gehen häufiger mit einem klinisch als „schwer“ eingestuften Phänotyp einher (Francannet et al 2001).

In den Genen *EXTL1-3*, die über Homologiestudien identifiziert wurden, konnten noch keine Mutationen gefunden werden, die mit der Erkrankung der multiplen Osteochondrome in Zusammenhang stehen (Wise et al. 1997; Wuyts et al. 1997; van Hul et al. 1998).

1.3.5 Die *EXT*-Genfamilie

Bei der Genfamilie von *EXT* wird angenommen, dass sie zu den Vertretern der Tumorsuppressorgenen gehören. Zu dieser Familie gehören die Gene *EXT1*, *EXT2*, *EXTL1*, *EXTL2*, *EXTL3* und der Genort *EXT3*. Die Einordnung der Gene *EXT1* und -2, sowie *EXTL1-3* zu einer Genfamilie liegt aus folgenden Gründen nahe: die

Sequenzen weisen große Homologien auf, zeigen eine ubiquitäre Expression und die Anwesenheit eines Signalpeptids. Sequenzvergleiche der *EXT1*-, *EXT2*- und *EXTL1*-*3*-Proteine zeigen Homologien in 260 Aminosäuren im Carboxyl- Terminus. Desweiteren existieren einige kurze homologe Aminosäure-Abschnitte stromaufwärts der vorher erwähnten homologen Region. Auf der Basis der Homologie der 260 Aminosäuren der *EXT*-Gene erstellte phylogenetische Baum illustriert eine enge Beziehung zwischen den Genen *EXT1* und *EXTL1*, *EXT2* und *EXTL3* (Abb.1.17.)

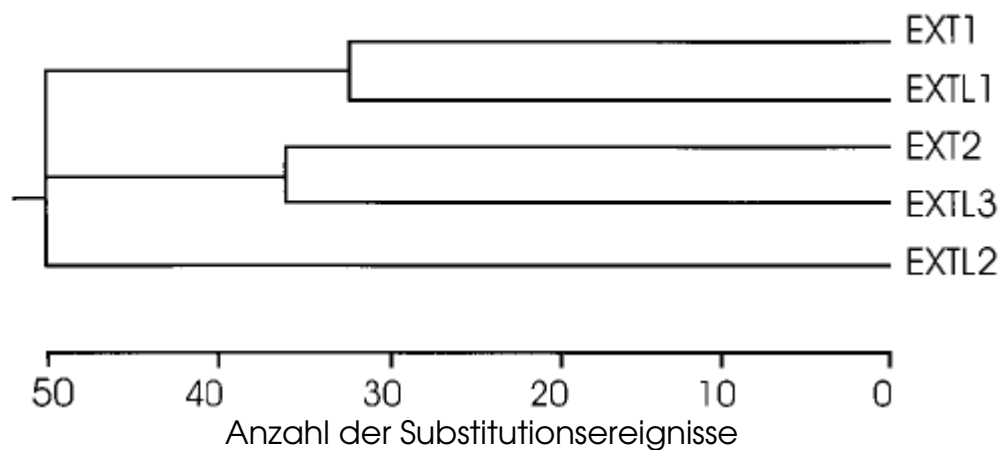


Abb.1.17: Phylogenetischer Baum der fünf Mitglieder der EXT-Familie

(aus: van Hul et al. 1998)

EXTL2 divergiert dabei am stärksten, was auf eine frühzeitige evolutionäre Abspaltung aus der Genfamilie hinweist. Humanes *EXT1* weist zu Maus *Ext1* 98 % Homologie auf. Es wird vermutet, dass es sich bei den Genen *EXT1* und *EXT2* um evolutionär „junge“ Gene handelt, die nur in Säugern konserviert sind. Die Identität zwischen humanen *EXT1* und *EXT2* liegt bei ca. 35 % (Stickens et al.1996). Auch für *EXT2* wurde ein Maus Homolog mit ca. 94 % Homologie identifiziert. Die Identität im C-Terminus von *EXT1*- und *EXT2*- Protein steigt sogar auf ca. 44 %, was vermuten lässt, dass diese Region von signifikanter funktioneller Relevanz ist. Die Identität zwischen Maus *EXT1* und *EXT2* liegt bei ca. 34 % (Clines et al. 1997, Wise et al. 1997). Clines et al. (1997) konnten für *EXT1* und *EXT2* homologe Gene in *Caenorhabditis elegans* ausfindig machen. Das *EXT1*- Homolog wird dem *C. elegans*-Chromosom 4 zugeordnet, mit einer Identität von ca. 55 % zwischen humanen *EXT1* und *EXT1* von *C. elegans* für das vermutete Gen. Das *EXT2*- Homolog wird dem Chromosom 3 zuge-

ordnet. Auch in *Drosophila melanogaster* wurde ein homologes Gen der *EXT*-Familie gefunden (Bellaiche et al. 1998)

Die meisten Gene der *EXT*-Familie sind praktisch überall exprimiert. *EXTL1* zeigt sich dabei restriktiver, denn es wird hauptsächlich in Skelettmuskel, Hirn und Herz exprimiert (van Hul et al. 1998).

1.3.5.1 Das Gen *EXT1*

EXT1 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 8 im Bereich 8q24.1 zwischen den STR-Markern D8S 85 und D8S199 (Blanton et al., 1996; Cook et al. 1993). STR-Marker sind kurze Sequenzwiederholungen (STR, short tandem repeats), die innerhalb eines Gens im Intron oder außerhalb von Genen liegen können. Ein einzelner STR besitzt je nach Individuum eine unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen. Aufgrund der unterschiedlichen Zahl der Wiederholungen der verschiedenen STRs kann man DNA-Profile erstellen, die für ein Individuum spezifisch sind. Ein Allel eines STR-Markers wird jeweils vom Vater und der Mutter ererbt. Bekannte STR-Marker innerhalb des *EXT1*-Gens sind 65G5CA und 46F10CA in den Introns eins und sieben (Bernard et al. 2001).

Das Gen *EXT1* ist 2241 Basenpaare lang, es besteht aus elf Exons mit einer Größe von 90 bis 962 bp. Das Protein besitzt 746 Aminosäuren (Ahn et al. 1995) (Abb. 1.18.). Die Promotorregion weist CpG- Inseln auf und eine CAAT-Box jedoch keine TATA-Box. (Lüdecke et al. 1996)

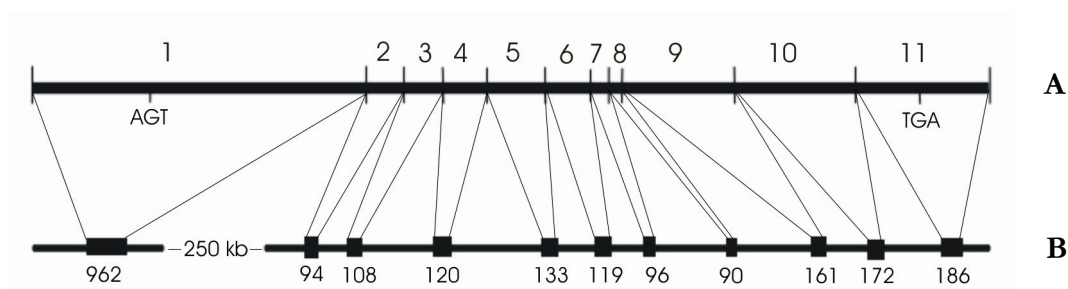


Abb.: 1.18 schematische Darstellung von *EXT1*. A = Protein, B = DNA mit Exongrößen.

1.3.5.2 Das Gen *EXT2*

EXT2 ist in einer 3 cM Region auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert. Zwischen den STR-Markern D11S 1355 und D11S 554 (Wuyts et al. 1995; Wu et al. 1994) liegt es im Bereich 11p11.2.

Das offene Leseraster von *EXT2* enthält 2154 bp und kodiert für 718 Aminosäuren (Stickens et al. 1996, Wuyts et al. 1996) (Abb. 1.1.9). Als innergenischer Marker wird der STR-Marker D11S 903 beschrieben, er liegt im Intronbereich zwischen den Exons 4 und 5 (Stickens et al. 1996).

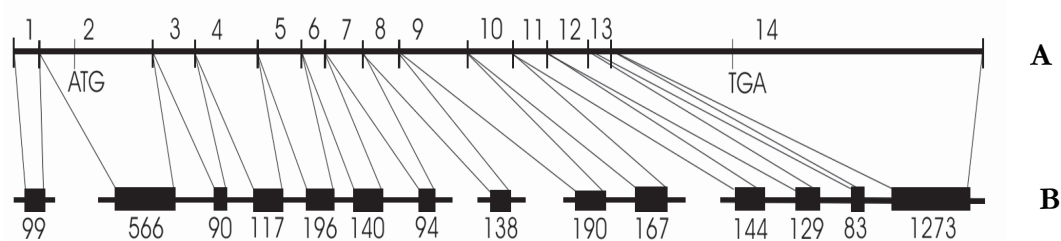


Abb. 1.19: schematische Darstellung von *EXT2*. A = Protein, B = DNA mit Exongrößen

1.3.5.3 Der Genort *EXT3*

Das Gen *EXT3* ist auf dem kurzen Arm vom Chromosom 19 lokalisiert. Es liegt in einem Intervall zwischen den STR-Markern D19S 413 und D19S 221 (Le Merrer et al. 1994). Durch Linkage-Studien wurde eine Beziehung zum Genort hergestellt, aber die genaue Position des Gens und seine Sequenz sind nicht bekannt. Deshalb war auch keine Mutationsanalyse in den wenigen mit *EXT3* gekoppelten Familien möglich, die bisher in der Literatur beschrieben wurden.

1.3.5.4 Die Gene *EXTL1-3*

EXTL1 liegt zwischen den Markern D1S 458 und D1S 511 auf dem Chromosom 1p36.1. Das Protein besteht aus 676 Aminosäuren (Wise et al. 1997).

EXTL2 kodiert für 330 Aminosäuren und liegt auf dem kurzen Arm vom Chromosom 1 in der Bande p21.2. Es wurde anfangs zwischen den STR-Markern D1S 206 und D1S 248 vermutet (Wuyts et al. 1997), konnte aber später genauer zwischen den Markern D1S 2761 und D1S 206 positioniert werden (Ensembl Genome Browser).

EXTL3 ist das größte Gen der *EXT/EXTL*-Genfamilie mit 919 Aminosäuren. Es zeigt wie die anderen „Like“-Gene eine hohe Homologie zu den *EXT*-Genen vor allem im Carboxyl-Terminus (van Hul et al. 1998). Wegen der großen Homologie zu

EXT1 und *EXT2* wird vermutet, dass dieses Gen in Zusammenhang mit der Krankheit der familiären multiplen Osteochondrome steht (Wise et al. 1997). Dies konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden.

1.3.6 Funktion der *EXT*- Genfamilie

Die Funktion der Genfamilie *EXT* war lange unbekannt. Die Tatsache, dass die einzigen homologen Gene zur Genfamilie selbst gehörten, machte es schwierig genaueres über die Zusammenhänge zur Entstehung von familiären multiplen Osteochondromen heraus zu finden. Durch den Phänotyp in Patienten mit hereditären multiplen Osteochondromen lag die Vermutung nahe, dass die Genfamilie eine Funktion in der Knochenentwicklung hat. Anderen Vermutungen zufolge sollen die *EXT*-Proteine in weitere bisher unbekannte Prozesse involviert sein. Als Indiz wurden die Maus- Homologe von *EXT1* und *EXT2* herangezogen; sie sind nicht nur ubiquitär, sondern auch in sehr frühen embryonalen Entwicklungsstadien exprimiert (Stickens et al. 1997). Interessant ist, dass *C. elegans* auch zwei *EXT*-Homologe besitzt, obwohl hier weder Knochen noch Knorpel gebildet wird (Clines et al. 1997). Bei der Synthese von Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten scheint die *EXT*-Genfamilie eine entscheidende Rolle zu spielen.

Sog 9-Maus-Zellen sind nicht in der Lage Heparansulfat-Glykosaminoglykane zu synthetisieren und somit weitgehend resistent für eine Infektion mit dem *Herpes simplex*-Virus. Überexpression von *EXT1*-cDNA stellte das Vermögen zur *H. simplex*-Type I-Infektion in Sog9- Maus-Zellen wieder her. Durch die Überexpression von *EXT1*-cDNA kann die Synthese zu 99 % wieder hergestellt werden. Somit wurde gezeigt, dass die Expression von *EXT1* an der Synthese von Oberflächen-Heparan-Sulfat-Glykosaminoglykanen beteiligt ist. *EXT1* kann den *EXT1*-Defekt in Sog9-Zellen komplementieren, so dass es zu einer Infektion mit *H. simplex*-Viren kommen kann. Die anderen Mitglieder der *EXT*-Genfamilie sind hierzu nicht in der Lage (McCormick et al. 1998).

In Zwei-Hybrid-Analysen kann eine Interaktion zwischen *EXT2* und der N-Acetyl-Galaktosyl-Transferase-(GalNAc)-T5 gezeigt und damit eine direkte Beziehung zwischen *EXT*-Proteinen und bekannten Komponenten der Glykosaminoglykan-Synthese *in vitro* hergestellt werden. GalNAc-T5 ist eine von bisher fünf identifizierten Gyko-

syltransferasen und in Säugern weitgehend homolog (Simmons et al. 1999). Weiterhin wurde aus bovinen Kälberserum ein Protein mit Glukuronsäure- und N-Acetyl-Glukosamin-Transferase-Aktivität isoliert. Es wurde festgestellt, dass es sich bei diesem Protein um das EXT2-Protein handelt, das als HS-Polymerase arbeitet. Diese sogenannten HS-Polymerasen übertragen ein Disaccharid bestehend aus GlcNAc und GlcAc an eine initiierte Heparansulfat-Kette (Lind et al. 1998). Untersuchungen belegen auch, dass EXT2 alleine keine hohe Transferaseaktivität besitzt. Im Gegenteil zeigt sich, dass EXT1 und EXT2 einen Komplex bilden und im Golgi-Apparat akkumulieren. So wurde geschlussfolgert, dass es sich bei der Komplexbildung um eine biologisch relevante Form handelt (McCormick et al. 2000).

Für *EXT*-like-Gene wurden ähnliche Funktionen identifiziert. Aus einer humanen Sarcinazelle (malignant fibrous histiocytoma) konnte ein Enzym mit α -N-Acetylhexosaminyltransferase-Aktivität isoliert werden. Es stellte sich heraus, dass es sich um das Genprodukt von *EXTL2* handelte. Auch *EXTL2* kodiert also für eine Glykosyltransferase, die über α -1-4-Bindung N-Acetyl-Galaktosaminyl- oder N-Acetyl-Glukosaminyl-Reste auf die allgemeine Glykosaminoglykan-Protein-Bindungsregion transferiert (Kitagawa et al. 1999). Später konnten auch für die Proteine EXTL1 und EXTL3 Funktionen in der Initiation sowie Elongation und Determination von Heparansulfat-Ketten gezeigt werden. Demnach handelt es sich auch bei EXTL1 um eine N-Acetyl-Glukosaminyl-Transferase des Typs II, deren Aufgabe in der Elongation der Saccharid-Kette besteht. EXTL2 ist in die Initiation der Heparansulfat-Kette involviert und eine N-Acetyl-Glukosaminyl-Transferase des Typs I. EXTL3 wirkt praktisch überlappend, denn es besitzt Transferaseaktivität sowohl des Typs I als auch des Typs II. Allen drei Proteinen fehlt die Möglichkeit Glucoronyl-Reste zu übertragen (Kim et al. 2001).

Die Mitglieder der Gen-Familie *EXT* gehören alle zu der Gruppe der Transferasen mit unterschiedlichen Affinitäten. EXT1 ist eine GlcNAc-Transferase des Typs II, ebenso wie EXTL1. EXT2 besitzt GlcAc-Transferaseaktivität des Typs II. EXTL2 ist eine GlcNAc-Transferase I. EXTL3 besitzt eine Zwitterstellung zwischen GlcNAc-Transferase I und GlcNAc-Transferase des Typs II (Abb. 1.20).

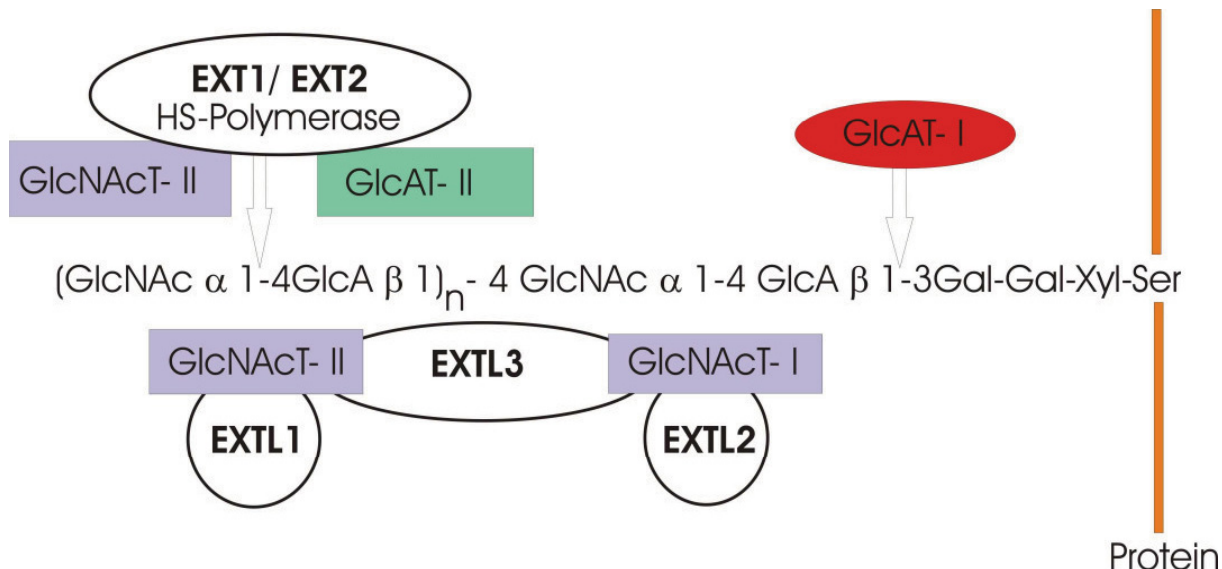


Abb. 1.20: Schematische Darstellung der Funktion der *EXT* Familie. EXT1/2 verknüpfen die Monosaccharide; EXTL1-3, hängen die Disaccharide an das Polysaccharid. Nähere Erläuterungen im Text.

Die Unterscheidung der beiden Transferaseaktivitäten von EXT1 und EXTL1 liegt darin, dass EXTL1 nur einmal einen GlcNAc-Rest übertragen kann.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

1.4.1 Funktionelle Analysen des MMR-Proteins hMLH1

Keimbahnmutationen in den DNA-Fehlpaarungs-Reparaturgenen *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS1* und *hPMS2* werden mit dem hereditären nicht polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) assoziiert. Mutationen in einem der genannten MMR-Gene werden bei 90% der HNPCC-Patienten entdeckt. Als eindeutig pathogen lassen sich Mutationen einstufen, die einen Kettenabbruch oder Spleißdefekte erzeugen. Die zu ca. 30 % gefundenen Missense-Mutationen lassen sich nicht einstufen, da ihre Funktionalität unklar bleibt.

Ziel dieser Arbeit war es daher mit Hilfe funktioneller Analysen neue bei HNPCC-Patienten identifizierte Missense-Mutationen im Fehlpaarungs-Reparatur-Gen *MLH1* in *S. cerevisiae* funktionell zu untersuchen, um Einschätzungen zur Pathogenität dieser Mutationen machen zu können.

Grundlage der Analysen sollten eine Zusammenstellung sämtlicher Missense-Mutationen sein, die bei Patienten des deutschen Konsortiums gefunden wurden, sowie alle in der Literatur beschriebenen Mutationen im *MLH1*-Gen und deren bisherige funktionelle Charakterisierung.

Missense-Mutationen aus der ATPase- und der Interaktionsdomäne von hMLH1 sollten in einer Zwei-Hybrid-Analyse auf ihre Interaktion mit humanen PMS2 untersucht werden. Neben dieser quantitativen *in vitro*-Untersuchung sollten funktionelle *in vivo*-Analysen von Missense-Mutationen in der ATPase-Domäne durchgeführt werden. Hierzu sollten die hMLH1-Varianten in einem wildtypischen Hefestamm stark exprimiert werden, um ihre Fähigkeit zur Generierung eines dominant negativen Mutatorphänotyps zu testen. Diese Daten sollten die Basis für eine erste Einschätzung der Missense-Mutationen bezüglich ihrer Pathogenität bilden.

1.4.2 Analysen zu hereditären multiplen Osteochondrome

Bei multiplen hereditären Osteochondromen (MO) handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit einer Häufigkeit von 1:50 000. Osteochondrome sind in der Regel benigne knöcherne Auswüchse an den langen Röhrenknochen. Sie bestehen aus hartem Knochenmaterial, das von einer Kappe mit hyalinem Knorpel überzogen ist. Während der Hauptwachstumsphase in der Kindheit bis zur Pubertät besitzen sie ihre größte Wachstumsaktivität und führen so zu Verbiegungen und Deformationen der Röhrenknochen. Des Weiteren können Funktionsstörungen durch Gefäß- und/oder Nervenkompression entstehen. Bei ca. 0,5- 2% der Osteochondrom-Patienten tritt eine Entartung zu malignen Chondrosarkomen auf, dies ist ein maligner Tumor, dessen Zellen Knorpel bilden. Mutationen in den Genen *EXT1* und *EXT2* sind hauptsächlich für die Erkrankung verantwortlich. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen mit der Fragestellung, ob es einen Zusammenhang zwischen Genort und Ausprägung der Erkrankung gibt. Dieser Frage sollte in dieser Arbeit nachgegangen werden. In Erhebungsbögen sollten klinische Untersuchungen der betroffenen Personen erfasst und mit den Ergebnissen dieser Arbeit abgeglichen werden, um Aussagen über eine Korrelation von Geno- und Phänotyp machen zu können.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es, molekulare Unterschiede zwischen Osteochondromen und normalem Knorpelgewebe – über die familiäre *EXT*-Mutation hinaus – zu identifizieren. Dafür sollte die Chondrozyten-Zellkultur generell etabliert und Zellkulturen von *EXT*-Tumoren angelegt werden, um so Aufschlüsse über die Involvierung der *EXT*-Gene in weiteren Signalwegen zu erhalten. Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, auf welche Weise Mutationen der *EXT*-Gene zu Osteo-

chondromen führen können. In Expressionsanalysen sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit Mutationen in den *EXT*-Genen die Entwicklung und Differenzierung von Knorpelzellen beeinflussen.

2 Material

2.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besitzen, wenn nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad „pro analysi“. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser (Hauswasseranlage mit nachgeschaltetem ‚Wasserreinigungssystem‘), nachfolgend als ‚Aqua dest‘. oder ddH₂O (dd=doppelt destilliert) bezeichnet, verwendet.

2.2 Knorpelmaterial

Die Knorpelgewebeproben von Patienten mit multiplen hereditären Osteochondromen oder von Patienten ohne Osteochondrome wurden dankenswerterweise von verschiedenen orthopädischen Kliniken in Düsseldorf, Münster, Hamburg und Koblenz zur Verfügung gestellt. Die Spender gehörten zum größten Teil der „Exostosen Selbsthilfe Gruppe“ e.V. an.

2.3 Blut

4- 16 ml Blutproben von Familien mit multiplen hereditären Osteochondromen wurden bei den klinischen Erhebungen entnommen oder zusammen mit Tumormaterial gespendet. Die Einverständniserklärungen liegen vor.

2.4 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Lieferant</u>
Acrylamid (Rotiphorese)	Roth
Adenin	Roth
Agar	Difco /Gibco
Agarose	FMC Biozym
Alanin	Merck
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ammoniumpersulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Anti fade (Mounting Medium für Fluoreszenz)	Vectashield
Arginin	Fluka
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Merck
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto yeast nitrogen base (YNB)	Difco

Borsäure	Roth
Bovines Serumalbumin	Bio Rad
Bradford Reagenz	Biorad
Bromphenolblau	Fluka
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyl Phosphat)	Sigma
Cystein	Merck
D(+)-Glukose	Roth
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	Boehringer
Desoxynukleosid- 5`-Phosphate (dNTPs); einzeln als dATP, dTTP, dGTP und dCTP	Fermentas
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
DMF (N, N-Dimethylformamid)	Roth
DMF (2, 5-Dimethylfuran)	Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
EDTA (Na-Ethylendiamintetraacetat)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (96 %)	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Roth
Formamide	Gibco
Ficoll	Serva
Glutamin	Merck
Glutaminsäure	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Difco
Histidin	Roth
Isoleucin	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogencarbonat	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
β -Mercaptoethanol	Roth
Methionin	Merck
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumsulfat	Sigma
Nitrotetrazolium Blue Chlorid	Sigma
ONPG (2-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranoside)	Serva
para-Aminobenzoessäure	Sigma
Phenylalanin	Acros
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Roth
Polylysin	Sigma

Prolin	Merck
Salzsäure	Roth
SDS (Natriumdodexylsulfat)	Sigma
Serin	Merck
N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Threonin	Merck
Tris-(hydroxymethyl) –aminomethan (Tris)	Roth
Tris HCl	Sigma
Tris Base	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tryptophan	Roth
Tyrosin	Merck
Uracil	Roth
Ultrapure dNTP Set (je 100 mM)	Amersham
Valin	Merck
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3- Indolyl - β -D-Galactopyranosid)	Serva

2.5 Sonstige Materialien

Lachssperma-DNA (Carrier DNA)	Sigma
-------------------------------	-------

2.6 Antikörper

Primäre Antikörper

EXT1 polyklonal anti Hase, 1:10 Immunfluoreszenz,	Proteintech
hMLH1 monoclonal anti Maus	BD
Maus Anti-Calnexin Monoklonal 1:200 Immunfluoreszenz	Proteintech

Sekundäre Antikörper

Cy3 anti Hase	1:200 Immunfluoreszenz	Sigma
IgG FITC anti mouse	1:20 Immunfluoreszenz	Sigma
AP-Anti Maus Kaninchen	1:7500 Western Blot	Promega

2.7 Enzyme

2.7.1 Restriktionsendonukleasen

<i>Bam</i> HI	G [^] GATCC
<i>Eco</i> 130I	C [^] CWWGG

<i>Kpn</i> 21	T [^] CCGGA	
<i>M</i> l <i>I</i>	TGG [^] CCA	
<i>P</i> vuII	CAG [^] CTG	alle Fermentas

2.7.2 Polymerasen

Platinum Pfx-DNA Polymerase	Invitrogen
Taq Polymerase	eigene Herstellung (Frau I. Volfson)
Taq Polymerase	Invitrogen

2.7.3 Weitere Enzyme

RNase A	Sigma
Rekombinant RNasin	Promega
Proteinase K	Sigma
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
Trypsin/EDTA 1x	PAA
Collagenase 4 mg/ml	PAA

2.7.4 Kits

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Assays on Demand	Applied Biosystems
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	ABI
No AmpErase UNG	Applied Biosystems
Nucleo Spin L RNA-Extraktionskit	Macherey & Nagel
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QiaexII Kit	Qiagen
QiaAmp DNA Blood Midi Kit	Qiagen
QiaQuick PCR-Purificationkit	Qiagen
TaqMan Universal PCR Master Mix,	Applied Biosystems
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems

2.8 Puffer und Lösungen

Lysepuffer

8,29g Ammoniumchlorid
1,00g Kaliumhydrogencarbonat
0,034g EDTA
ad 1l H₂O pH 7,4

SE- Puffer

4,39g NaCl
0,34g EDTA
ad 1l H₂O
Lösung autoklavieren,
kühl aufbewahren

Proteinase K

20mg/ml
in 0,01M Tris (pH 8,0)

TE- Puffer

10mM Tris (pH 7,4)
1mM EDTA (pH 8,0)
ad 100ml H₂O

10x PBS- Puffer

8,00g NaCl
0,20g KCl
1,44g Na₄HPO₄
0,24g KH₂PO₄
ad 1l H₂O pH 7,4

10x TBE- Puffer

162,0g TrisBase
27,5g Borsäure
9,3g EDTA
ad 1l H₂O

Probenpuffer (SDS-Gel)

50mM Tris/HCl pH 6,9
2% SDS
0,1% Bromphenolblau
5% Glycerin

BCIP-Lösung

0,5g BCIP in 10ml DMF

APS 10%

1g Ammoniumpersulfat
ad 10 ml H₂O

Formamid-Puffer

95% Formamide deionisiert
10mM EDTA
0,1 Bromphenolblau

5x Auftragspuffer

25% Ficoll 400
25mM EDTA
0,1% Bromphenolblau

Wave Optimized Buffer A (DHPLC)

0,1M TEAA

Wave Optimized Buffer B(DHPLC)

0,1M TEAA; 25% Acetonitril

Wave Optimized Solution D (DHPLC)

75% Acetonitril

Wave Optimized Syringe Wash (DHPLC)

4% Acetonitril

P1

50mM Tris
10mM EDTA
100 g/ml RNase A
ad 1l H₂O; pH 8,0

P2

0,2M NaOH
1% SDS
ad 1l H₂O

P3

3M KAc
ad 1l H₂O; pH 5,5

X-Gal

0,2g
in 10ml DMF
lösen,
bei -20°C lagern.

4x Trenngelpuffer
1,5M Tris/HCl pH8,8
0,4% SDS

4x Sammelgelpuffer
0,5M Tris HCl, pH 6,8
0,4% SDS

Laufpuffer
0,05M Tris/HCl pH 8,3
0,2M Glycin
0,2% SDS

Transferpuffer
48mM Tris/HCl
39mM Glycin
0,037% (v/v) SDS
20% Methanol

Detektionspuffer
0,1M Tris/HCl
0,1M NaCl
50mM MgCl₂; pH 9,5

NBT-Lösung
0,5g NBT
in 10ml 70%igem DMF

Blockierlösung
3 Milchpulver
0,05% Tween 20
in 1x PBS

Coomassie-Färbelösung
0,25g Coomassie Brilliant Blau (R250)
in 90ml eines Wasser : Methanol
Gemisches (1:1 v/v) und
10ml Eisessig gelöst.
Die Lösung wird durch einen Faltenfilter
gefiltert

lacZ-Puffer
50mM Na-P-Puffer oder
K-P-Puffer pH 7
10mM KCl
1mM MgSO₄

Dulbecos PBS-Puffer ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

PAA

2.9 Größenstandards

2.9.1 100bp DNA-Leiter (PeqLab)

80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031.

2.9.2 Track It 1 kb ladder (Invitrogen)

75,134,154, 201, 220, 298, 344, 396, 506/517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108,
7126, 9162, 10.180, 11.198, 12.216.

2.9.3 GenRuler (Fermentas)

250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10.000.

Protein

2.9.4 Proteingrößenstandard

Protein Längenstandard von MBI Fermentas: Pageruler Prestained

Proteingrößen in kDa: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11

2.10 Oligonukleotide

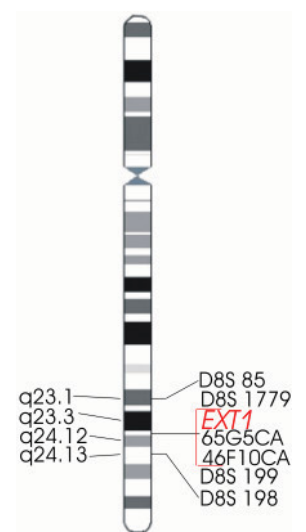
2.10.1 Oligonukleotide zur indirekten Mutationsanalyse

Die Oligonukleotide für die indirekte Mutationsanalyse werden von der Firma Metabion bezogen. Die molekulargenetische Mikrosatellitenanalyse beruht auf dem Nachweis hochpolymorpher Basen-Repeat-Regionen in der genomischen DNA. Für die Koppelungsanalyse werden kurze Tandem Repeatmarker verwendet. Die Forward- Primer sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert. Die Heterozygotierate der Marker beträgt mindestens 75%. Die verwendeten Mikrosatellitenmarker D8S 85, D8S 198, D11S 905, D11S 903 und D11S 554 sind von Bovée et al. 1999 beschrieben. Die Primer 65G5CA und 46F10CA sind nach Bernard et al. 2001 ausgewählt.

2.10.1.1 *EXT1*

	Name	Sequenz	PCR Produktgröße
1.	D8S 85 R	5'- AGT TTA ACC ATG TCT CTC CCG -3'	74- 84 bp
	D8S 85 LIRD800	5'- AGC TAT CAT CAC CCT ATA AAA T -3'	
2.	D8S 1779 R	5'- ACC TCC AAA AGG ACT GAA AAT -3'	189- 203 bp
	D8S 1779 IRD800	5'- TGA GCC ATG ACT GCA CC -3'	
3.	65CG 5CA R	5'- GTA TGT GCA CCC TCC ATA CAG -3'	ca. 150 bp
	65CG5CA IRD800	5'- GCT GAA ATC CTA CCA TGT TCC -3'	
4.	46F 10CA R	5'- CTG GAA TAA GGA AAG GTG GAC -3'	ca. 150 bp
	46F 10CA IRD800	5'- GTT GTG ACT ATC ACA GGG TAA CC -3'	
5.	D8S 199 R	5'- AGT CAC AGA GTA AAT GAT GG -3'	204- 230 bp
	D8S 199 IRD800	5'- CCT TCT TTT TCT GCT CTG CT -3'	
6.	D8S 198 R	5'- TAG GGA CTA CAC ATG ATG GA -3'	ca. 155 bp
	D8S 198 IRD800	5'- AACCAGATTAGGGACAAAGA -3'	

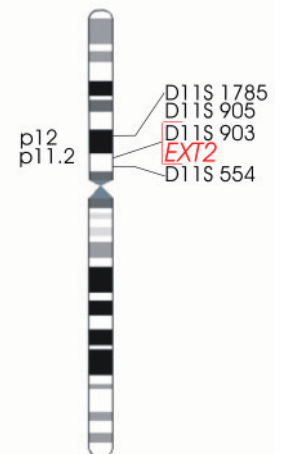
Die Marker 3. und 4. liegen innerhalb des Gens, die anderen flankierend.



2.10.1.2 *EXT2*

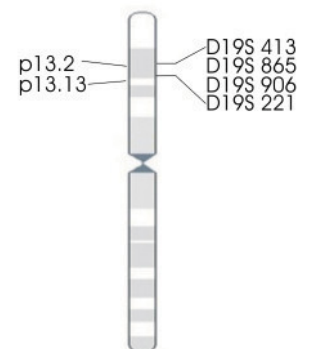
	Name	Sequenz	PCR Produktgröße
1.	D11S 1785R	5'- TTC TGG ACC AGT ACA TTG GTA G -3'	268- 276 bp
	D11S 1785 LIRD800	5'- AGC TGC TCA TTT AGG GAA CTC -3'	
2.	D11S 905 R	5'- ATA CAG GGG CCA AAT AGG TT -3'	208- 228 bp
	D11S 905 IRD800	5'- CAG GCA TCT GAA ACT TCT TG -3'	
3.	D11S 903 R	5'- AGC TGA GAG CGC ATG TAT AA -3'	99- 109 bp
	D11S 903 IRD800	5'- AAC ACT TCG ATG TTC CTT CC -3'	
4.	D11S 554 R	5'- CAC CTT CAT CCT AAG GCA GC -3'	174- 254 b
	D11S 554 IRD800	5'- GGT AGC AGA GCA AGA CTG TC -3'	

Der Marker 3. liegt intragenisch



2.10.1.3 *EXT3*

	Name	Sequenz	PCR Produktgröße
1.	D19 S 413 R	5'- CCA TCA ACT CAC CTA CTT ATC GT -3'	69- 91 bp
	D19S 413 IRD800	5'- GTT TAT TTT AAA TGC TCT TAC CAC A -3'	
2.	D19S 865 R	5'- GAA ATC GCA CAG TAT TTG TCT CAC -3'	220- 253 bp
	D19S 865 IRD800	5'- GCT ATT TGG GGT CTC TAT CAA TG -3'	
3.	D19S 906 R	5'- TTC CCG CCT AGT AAC GGA C -3'	158- 182 bp
	D19S 906 IRD800	5'- AGA TCG CAC CAC TGT ACT CC -3'	
4.	D19S 221 R	5'- CAT AGA GAT CAA TGG CAT GAA A -3'	191- 211 bp
	D19S 221 IRD800	5'- GCA AGA CTC TGA CTC AAC AAA A -3'	



2.10.2 Oligonukleotide zur DHPLC Mutationsanalyse und Sequenzierung in den *EXT*-Genen

2.10.2.1 Oligonukleotide für *EXT1* (Exons 1- 11)

Gen, Exon, Primer	Sequenz	Größe	PCR-Beding MgCl ₂
<i>EXT1</i> , Exon 1 (1a)F	5'-TGG GAA ACT TGG GTG ATT CTT-3'	164 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (1a)R	5'-GGC TGT GGC TCC ATG C-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (1b)F	5'-CTC AGC TGG CTC TTG TCT CG-3'	235 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (1B)R	5'-GTT GGC ATC TCG CTT CTG C-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (2)F	5'-CCC TTC GTT CCT TGG GAT C-3'	276 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (2)R	5'-GAC AAA GAG GCA CGC CTG-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (3)F	5'-GTT ACC AAA ACA TTC TAG CG-3'	268 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (3)R	5'-CCT TGG CCA GCA TCG CCT GG-3'		2,0 mM

<i>EXT1</i> , Exon 1 (4)F	5'-TTT ATA TTC CGG CAC TTG GC-3'	242 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (4)R	5'-TCC CTG TCA GGT ACC TCT TCC-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (5)F	5'-TTC AAC ACC ATC CCT CCT C-3'	246 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 1 (5)R	5'-CAA GGC TGA CTC CCA AAG AC-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 2F APR 114	5'-CCC ACA TTC GCA ATG AGT CTT C-3'	207 bp	b, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 2R APR 214	5'-AAC CCA CTT AAT CTG GCT TC-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 3F APR 113	5'-TTC CTC ACA TTC ACG AAG TC-3'	204 bp	b, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 3R APR 213	5'-AAA GTT TGA CGG GGG CAG C-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 4F APR 112	5'-TGA TCA AGT GCA TCT CTT TG-3'	271 bp	c, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 4R APR 212	5'-CCA ATC ACA CAT CCC TAA TAG-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 5F APR 105	5'-TGA TTC AGC ATC ATC CTT TCC-3'	246 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 5R APR 205	5'-TCA GGG TAA ACA AGG GCA AC-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 6F APR 106	5'-CTT TCC AGC GCT TCA TTA GG-3'	232 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 6R APR 206	5'-GTA AGG AGG GCG GAG TCT CT-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 7F APR 102	5'-TAC ATC CTA CCC CAG CCA TC-3'	203 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 7R APR 202	5'-AAG TGC CCC ATG GAG AAA C-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 8F APR 101	5'-GGG AGA ATT GTC CTG AAA AC-3'	203 bp	b, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 8R APR 201	5'-ACC TGC TGC TCC TCA GG-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 9F APR 103	5'-CAC TGT TGA TTG CTT GTT TGG-3'	259 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 9R APR 203	5'-GCA GCA GCC AAT ATA AAA AGC-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 10F APR 104	5'-GAT AAT GGC CCC CTG TGA-3'	251 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 10R APR 204	5'-CCA GTG AGT GAA GCA AGG AA-3'		2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 11F	5'-GCA CTT CTC TCA TAT TAT CC-3'	289 bp	b, 2,0 mM
<i>EXT1</i> , Exon 11R	5'-AAG AGA GAG CAG CTT GAC-3'		
Primer mit der Bezeichnung „APR“ aus (Wells et al. 1997)			

2.10.2.2 Oligonukleotide für *EXT2* (Exons 2- 14)

Gen, Exon, Primer	Sequenz	Größe	PCR- Beding MgCl ₂
<i>EXT2</i> , Exon 2(1)F	5'-GTC TTT TCA AGT GTC ATT TGC-3'	235 bp	a, 2,0 mM

<i>EXT2</i> , Exon 2(1)R	5'-CCA AAA CTG AAA CAT GCC AG-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 2(2)F	5'-AAG AAT GAA GAC CAA GCA CC-3'	247 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 2(2)R	5'-GAA GCC ACA GCG ATA GAC AT-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 2(3)F	5'-CAG CCG ACA GTC CCA TCC C-3'	258 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT2</i> , Exon 2(3)R	5'-CGA TGG AGG GAA CAA ACA GA-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 2(4)F	5'-CTT TGG CGT CTC TGT CAG CA-3'	227 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 2(4)R	5'-CAA GTA TCT CCT GGG GGC TG-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 3F	5'-GAC TCT TGT CTT TTC ATA GTT-3'	192 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 3R	5'-ATC TGG AAC CCA TCA TAA GG-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 4F	5'-GTA ATT CCT GTT CCT CTC CAC-3'	244 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 4R	5'-CAC AGA TTC AGT AAA GGC AC-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 5F	5'-CTG CAA TTT TCC AAT CAC CTG-3'	270 bp	a, 2,0 mM
<i>EXT2</i> , Exon 5R	5'-TCC TGA GCC TTT GCG AGA G-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 6F	5'-CTA GTT TGT AAT CTC TTG CCT-3'	220 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 6R	5'-CGC AGA ACC ACT AAT GTA GA-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 7F	5'-CTG TGA AGG GCT GTG TGT ATG-3'	200 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 7R	5'-CCA GTC AG GCC ACC ATT TC-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 8F	5'-GTC TCG CTT GCT CAC TTA AAA-3'	233 bp	a, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 8R	5'-CTT CCA CCC ACC CTG ACA G-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 9F	5'-GCT TTT CTG ACC CGT GTT AAT-3'	270 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 9R	5'-CCA TCC AAA ATT GAT CCA GC-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 10F	5'-CTC ACA AAA GTT AGG AGA AT-3'	251 bp	f, 2,0 mM
<i>EXT2</i> , Exon 10R	5'-TAT TAA ACA TAT AAA CAC ACT-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 11F	5'-TGG TTG CTG TCT GAA TTG GGA-3'	242 bp	b, 2,0 mM
<i>EXT2</i> , Exon 11R	5'-GTA TCA TTC TCT CAG TTT TGT-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 12F	5'-TTA TCA GCT AAA GGG AAC TG-3'	227 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 12R	5'-CCC AAG ATC ACA AAG CAA GT-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 13F	5'-AGC ATG ATT TTA TTG TCC TTG-3'	198 bp	e, 2,5 mM
<i>EXT2</i> , Exon 13R	5'-GGC AGG AAA TAG AGA TCA GA-3'		
<i>EXT2</i> , Exon 14F	5'-CTC CTC CCC ACC TCC TCT C-3'	215 bp	d, 2,0 mM
<i>EXT2</i> , Exon 14R	5'-CCC TCT GTC CCA GCC TCA C-3'		

Exon 1 von *EXT1* wird wegen seiner Größe (1615 bp) in fünf Teilfragmenten amplifiziert. *EXT2* Exon 2 wird wegen der Größe (566 bp) in vier Teilfragmente gegliedert. Exon 1 von *EXT2* wird nicht verwendet, da es keine kodierende Sequenz enthält. Die Exons 2- 11 von *EXT1* und 3- 14 von *EXT2* werden jeweils in einem Fragment amplifiziert, wobei das Fragment im Intronbereich ca. 30-40 bp vor dem Exon beginnt und im Intronbereich hinter dem Exon in ebensolchem Abstand endet.

Primer für die DHPLC- Analyse aus Dobson- Stone et al. 2001.

2.10.3 Oligonukleotide zur Einführung von Missense-Mutationen

Plasmid	Sequenz	interne ID*
A21E F	5'-CGC ATC GCG GAG GGG GAA GTT-3'	#1633
A21E R	5'-AAC TTC CCC CTC CGC GAT GCG-3'	#1634
P28L F	5'- ATC CAG CGG CTA GCT AAT GCT-3'	#1715
P28L R	5'- AGC ATT AGC TAG CCG CTG GAT-3'	#1716
M35R F	5'- ATC AAA GAG AGG ATT GAG AAC-3'	#1717
M35R R	5'- GTT CTC AAT CCT CTC TTT GAT-3'	#1718
Q48P F	5'-ACA AGT ATT CCA GTG ATT GTT -3'	#1635
Q48P R	5'-AAC AAT CAC TGG AAT ACT TGT -3'	#1636
N64S F	5'-ATC CAA GAC AGT GGC ACC GGG-3'	#1637
N64S R	5'-CCC GGT GCC ACT GTC TTG GAT-3'	#1638
F80V F	5'-ATG TGA AAG GGT CAC TAC TAG -3'	#1639
F80V R	5'-CTA GTA GTG ACC CTT TCA CAT-3'	#1640
K84E F	5'-CAC TAC TAG TGA ACT GCA GTC-3'	#1641
K84E R	5'-GAC TGC AGT CTA GTA GTG -3'	#1642
G101V F	5'-GGC TTT CGA GTT GAG GCT TTG-3'	#1643
G101V R	5'-CAA AGC CTC AAC TCG AAA GCC -3'	#1644
pBTMd-973 F	5'-TCA GCA GAG CTT CAC CAT TGA-3'	#1645
367 R	5'-ACT TGC TCT GTA TGC ACA CTT-3'	#1646
L550P F	5'- TTATAC CTT CCC AAC ACC AG-3'	#1625
L550P R	5'-CTG GTG TTG GGA AGG TAT AA-3'	#1626
L574P F	5'- TTG GTG TTC CCA GGT TAT CGG-3'	#1628
L574P R	5'- CCG ATA ACC TGG GAA CAC CAA-3'	#1629
L585P F	5'-AGC ACC GCC CTT TGA CCT T-3'	#1623
L582P R	5'-AAG GTC AAA GGG CGG TGC T-3'	#1624
A589D F	5'-TGC CAT GCT TGA CTT AGA TA-3'	#1621
A589D R	5'-TAT CTA AGT CAA GCA TGG CA-3'	#1622
P648L F	5'-AAC TAT GTG TCC CCT TTG GA-3'	#1619
P648L R	5' TCC AAA GGG GAC ACA TAG TT-3'	#1620
P648S F	5'-AAC TAT GTG CTC CCT TTG GAG-3'	#1617
P648S R	5' CTC CAA AGG GAG CAC ATA GTT-3'	#1618
P654L F	5'-AGG GAC TGC TTA TCT TCA TT-3'	#1615
P654L R	5'-AAT GAA GAT AAG CAG TCC CT-3'	#1616
R659P F	5'-TCA TTC TTC CAC TAG CCA CTG-3'	#1631

R659P R	5'-CAG TGG CTA GTG GAA GAA TGA-3'	#1632
L676P F	5'-TTG AAA GCC CCA GTA AAG AAT-3'	#1613
L676P R	5'-ATT CTT TAC TGG GGC TTT CAA-3'	#1614
A681T F	5'-AAA GAA TGC ACT ATG TTC TAT T-3'	#1611
A681T R	R-5' AATAGAACATAGTGCATTCTTT-3'	#1612
1505 F	5'-ACC TCA CTA GTG TTT TGA GTC -3'	#1627
2183 R	5'- ATGTGTGAGCGCAAGGCTTTA-3'	#1630
N551S F	5'- TAC CTT CTC AGC ACC ACC AAG-3'	#1719
N551S R	5'- CTT GGT GGT GCT GAG AAG GTA-3'	#1720
Q562P F	5'- CTG TTC TAC CCG ATA CTC ATT-3'	#1670
Q562P R	5'- AAT GAG TAT CGG GTA GAA CAG-3'	#1671
A586P F	5'- CTT TGA CCT TCC CAT GCT TGC-3'	#1721
A586P R	5'- GCA AGC ATG GGA AGG TCA AAG-3'	#1722
P603R F	5'- GAA GAT GGT CGC AAA GAA GGA-3'	#1723
P603R R	5'- TCC TTC TTT GCG ACC ATC TTC-3'	#1724
K618R F	5'- CTG AAG AAG AGG GCT GAG ATG-3'	#1725
K618R R	5'- CAT CTC AGC CCT CTT CTT CAG-3'	#1726
P640S F	5'- GAT TGG ATT ATC CCT TCT GAT-3'	#1731
P640S R	5'- ATC AGA AGG GAT AAT CCA ATC-3'	#1732
P640L F	5'- ATT GGA TTA CTC CTT CTG ATT-3'	#1729
P640L R	5'- AAT CAG AAG GAG TAA TCC AAT-3'	#1730
Q689R F	5'- ATC CGG AAG CGG TAC ATA TCT-3'	#1727
Q689R R	5'- AGA TAT GTA CCG CTT CCG GAT-3'	#1728
*Sammlung Arbeitsgruppe Hegemann		

2.11 Plasmide

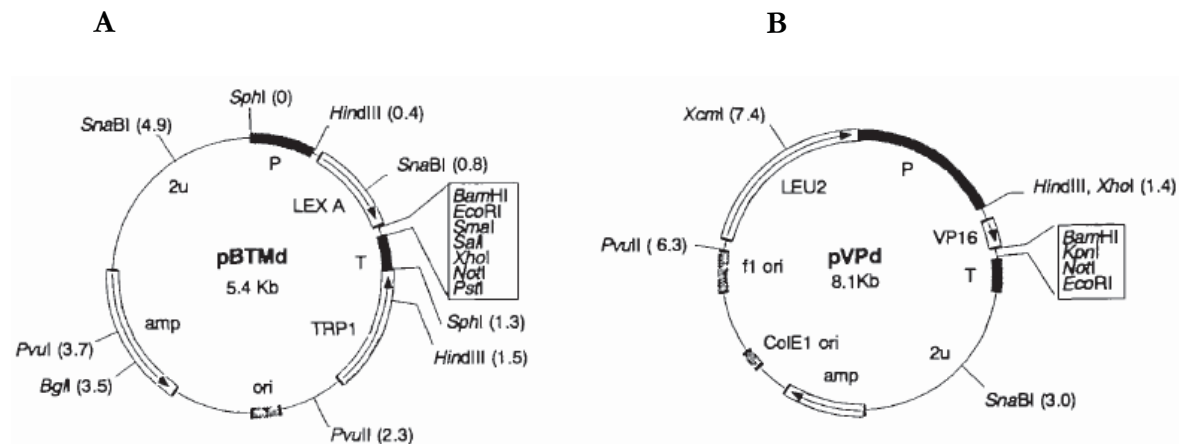


Abb. 2.1. Plasmidkarten der Shuttle-Vektoren pBTMd-MLH1 und pVPd-hPMS2 für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse. A= pBTMd-MLH1 enthält humanes MLH1, in diesen Vektor werden die verschiedenen Missense-Mutationen eingeführt werden. B= pVPd-hPMS2, diesem Vektor liegt der Vektor pVP16 zugrunde. Die Zahlen in den Klammern geben die Position der Restriktionsschnittstellen an. (aus Kondo et al. 1999)

Plasmid	Marker	Konstrukt	Referenz	interne ID*
pBTMd-hMLH1	2 μ , <i>TRP1</i> , <i>amp</i>	hMLH1 mit 3'untranslatierter Region fusioniert an LexA-DNA- Bindedomäne;	Kondo et al. 2003	#1193
pVPd-hPMS2	2 μ , <i>LEU2</i> , <i>amp</i>	hPMS2 fusioniert an VP16- Transaktivatorodomäne	Kondo et al. 2003	#1198
pBTMd	2 μ , <i>TRP1</i> , <i>lexA</i> , <i>amp</i> ;	LexA-Bindedomäne	Kondo et al. 2003	#1192
pVPd	2 μ , <i>LEU2</i> , <i>amp</i>	VP16 Transaktivatorodomäne	Kondo et al. 2003	#1196

2.12 Stämme

2.12.1 *Escherichia coli*

XL1-Blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F' proAB lacIq ZDM15 Tn10(tetr)]* (Stratagene)

2.12.2 *Saccharomyces cerevisiae*

CEN.PK2-1c: MATa *leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3 Δ 1 MAL2-8c SUC2*

(Entian and Kötter, 1998)

L40: MATa *his3 Δ 200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(4lexAop-His3) URA3::(8lexAop-lacZ) GAL4* (Invitrogen)

E134: MAT α ade5-1 his7-2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 lys2::InsE-A14 1500

(Clark et al., 1999)

2.13 Medien

2.13.1 Medien für *E. coli*

LB – Medium:

10g Bacto Trypton

5g Hefeextrakt

5g NaCl

13,5g Agar (Nur für Platten)

auf 1000ml mit ddH₂O auffüllen, lösen. Vor dem Autoklavieren auf pH = 6 einstellen.

LB + Amp: Zugabe von Ampicillin auf eine Endkonzentration von 50mg/l.

2.13.2 Medien für *S. cerevisiae*

2.13.2.1 YPD+:

10g Hefeextrakt

20g Casein Hydrolysat (Pepton)

14g Agar (bei Platten)

2ml Adeninstocklösung (2mg/ml)

4ml Tryptophanstocklösung (5mg/ml)

auf 900ml mit ddH₂O auffüllen, lösen und autoklavieren.

20g Glukose

auf 100ml mit ddH₂O auffüllen, lösen und autoklavieren.

Beide Lösungen zusammengeben (1000ml), mischen und in 250ml Flaschen portionieren bzw. Platten gießen.

2.13.2.2 SD-Minimal Medium

20g Agarose

20g Glukose

1,7g Yeast Nitrogen Base

5g Ammoniumsulfat

2g Drop Out-Mix

ad 1l H₂O

Die Lösung wird autoklaviert.

2.13.2.3 Selektiv Medium

wie SD- Medium, jedoch ohne die entsprechende Aminosäure im Drop out-Mix.

Drop out Mix:

Der Drop out Mix besteht aus den folgenden Basen, Aminosäuren und Chemikalien. Beim Selektivmedium für die Selektion von Transformanten fehlen die entsprechenden Aminosäuren. Der Mix wurde für mindestens 15 min. unter Zugabe von sterilen Metallkugeln durchmischt.

Adenin	0,5g	Leucin	10g
Alanin	2,0g	Lysin	2,0g
Arginin	2,0g	Methionin	2,0g
Asparagin	2,0g	para-Aminobenzoesäure	0,2g
Asparaginsäure	2,0g	Phenylalanin	2,0g
Cystein	2,0g	Prolin	2,0g
Glutamin	2,0g	Serin	2,0g
Glutaminsäure	2,0g	Threonin	2,0g
Glycin	2,0g	Tryptophan	2,0g
Histidin	2,0g	Tyrosin	2,0g
Inositol	2,0g	Uracil	2,0g
Isoleucin	2,0g	Valin	2,0g

2.13.3 Medium für humane Knorpelzellen

1000ml DMEM 1g/l Glukose ohne L- Glutamin PAA

15ml L-Glutamin (Enkonzentration 3 µmol/ml)

7,5ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 7,5*10² U/ml - 7,5*10² µg/ml)

90ml FKS (Endkonzentration 15%)

2.14 Seren und Zusatzstoffe

Fetales Kälberserum	Cyrogen
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml – 10.000µg/ml)	Cytogen
L- Glutamin (200mM)	PAA

2.15 Verbrauchsmaterial

Capstrips (0,2ml)	Biozym
Cryoröhrchen 1ml	Nunc
Deckgläschen Ø 12mm	Roth
Eppendorfgefäße (0,5ml, 1,0ml)	Eppendorf
Einmal- Petrischalen	Sarstedt
Einmal- Pipetten (steril 5, 10, 25ml)	Costar
Einmal- Skalpelle	Nunc
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	Becton Dickinson
Glasperlen	Braun
Haushaltsfolie	Melitta
96-well-Platten	Costar
optical 96-well-Platten	ABI
optical Capstrips	ABI
Pasteurpipetten	Brand
PCR- Strips mit Deckel	Biozym
Pipettenspitzen (20µl, 200µl, 1ml)	Biozym
Pipettenspitzen gestopft (20µl, 200µl, 1ml)	Biozym
Polyesthermembran für Western Blot	Schleich & Schuell
Saugpapier für Western Blot	Schleicher & Schuell
Stickstoff	Linde
Vier-well-Platten	Nunc
Zellkulturflaschen (25m ² , 75cm ²)	Biozym

2.16 Geräte

Eppendorfzentrifuge	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Haereus
Wave System D-7000	Transgenomic
ND1000 Spectrophotometer	NanoDrop

2.17 Software

Word 2003	Microsoft
Excel 2003	Microsoft
Power Point 2003	Microsoft
PhotoImpact	Ulead
Corel Draw 10	Corel
Corel Photo Paint 10	Corel
HSM (DHPLC)	Hitachi (HPLC System Manager)
Wavemaker	Transgenomic
Imagemanipulater	MWG
Bildgebung Zellkultur	IrfanView
NanoDrop 3.0.1.	NanoDrop
RasWin	RasMol Version 2.4.7.2.

3 Methoden

3.1 DNA- Isolierung

3.1.1 DNA-Isolierung aus Blut

Aus dem EDTA- Blut der Familien, die an der Genotyp-/Phänotypstudie teilgenommen haben, wurde nach der sogenannten Aussalzungsmethode DNA isoliert.

Ausgangsmaterial sind 8ml EDTA- Blut:

- Blut und 30ml kalten Lysepuffer (pH 7,4) in einem 50ml Falconröhrchen gründlich mischen.
- Ca. 1 h auf Eis stellen, zwischendurch kräftig schütteln
- Die Leukozyten für 15 min bei 3000U/min bei 6°C abzentrifugieren
- Den Überstand vorsichtig abgießen; Röhrchen gut abtropfen lassen
- Das Leukozytensediment in 10ml kalten Lysepuffer vollständig lösen und erneut abzentrifugieren (s. o.).
- Vorgang wiederholen.
- Das Pellet in 5ml kaltem SE- Puffer vollständig lösen.
- 12,5µl Proteinase K (20mg/ml) und 500µl 10% SDS dazugeben.
- Die Proben über Nacht bei 56°C im Wasserbad inkubieren.
- Nach der Proteolyse 1,5ml 5M NaCl- Lösung dazugeben und 15 sec vortexen.
- 15 min bei 3000U/min bei Raumtemperatur zentrifugieren.
- Den Überstand in ein neues Falconröhrchen überführen.
- DNA- Präzipitation mit 2 Volumen Ethanol 96%.
- Fischen der DNA mit steriler Pasteurpipette.
- DNA 2x mit 70% EtOH waschen und abzentrifugieren.
- Das Pellet kurz an der Luft trocknen lassen und in 500µl TE- Puffer über Nacht lösen lassen.
- Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte (siehe Abschnitt 3.2.).

Isolierung von DNA mit QiaAmp Blood Midi Kit

Aus dem EDTA- Blut von Tumorpatienten wird die DNA nach Herstellervorschrift mittels „QiaAmp Blood Midi-Kit“ isoliert.

3.1.2 Plasmid-Midi-Präparation aus *E.coli*

Die Durchführung erfolgt laut Herstelleranweisung der Firma Qiagen mit dem „Plasmid Midi Kit“.

3.1.3 Plasmid-Mini-Präparation aus *E.coli*

- Übernachtkultur (ÜN): 2,0ml LB-Medium (+Amp) mit einer *E.coli*-Kolonie animpfen.
- 1,5ml der ÜN-Kultur in 1,5ml Reaktionsgefäß überführen.
- 15 sec bei 13.000 U/min zentrifugieren; Überstand verwerfen.
- 300µl P1-Puffer (+RNaseA) zugeben; Pellet resuspendieren.
- 300µl P2-Puffer hinzufügen; invertieren.
- Inkubation: 5 min bei Raumtemperatur.
- 300µl P3-Puffer zugeben.
- Zentrifugation bei 13.000U/min für 15 min.
- Überstand in ein neues 1,5ml Gefäß überführen.
- 500µl absoluten Ethanol (EtOH abs.) zufügen.
- 30 min bei 13.000U/min zentrifugieren; Überstand entfernen.
- Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol (EtOH).
- 10 min bei 13.000U/min zentrifugieren; Überstand abziehen.
- Pellet in der SpeedVac trocken.
- In 200µl ddH₂O lösen.

3.1.4 DNA-Präparation aus *S. cerevisiae*

- Ansetzen einer 5ml Übernachtkultur in Selektivmedium.
- 5 ml Kultur in 15ml Falconröhrchen überführen.
- 5 min bei 3500U/min zentrifugieren; Überstand verwerfen.
- Pellet in 4ml ddH₂O lösen.
- 5 min bei 3500U/min zentrifugieren; Überstand verwerfen.
- 1ml P1-Puffer (Qiagen) plus RNaseA gekühlt zugeben; Pellet resuspendieren.
- 1ml P2-Puffer zugeben; vorsichtig mischen.
- 2/3 Volumen Glasperlen zugeben.
- Zellaufschluß bei 4°C für 15 min im Vibrax.
- 1ml Überstand in neues 1,5ml Röhrchen geben.
- 500µl P3-Puffer dazugeben.
- 10 min auf Eis inkubieren.

- 15 min bei 13.000U/min zentrifugieren.
- 2x 750µl Lösung in zwei neue 1,5ml Gefäße geben.
- Je 750µl Isopropanol zugeben, gut vortexen.
- 30 min bei 13.000U/min zentrifugieren; Überstand entfernen.
- Pellet mit 70%igem EtOH waschen.
- Pellet in trocken in der Speed Vac.
- DNA in 30µl ddH₂O lösen.

3.1.5 DNA-Mengenbestimmung durch photometrische Messung

Eine DNA-Lösung wird 1:20 in einem Endvolumen von 1000µl dest. H₂O verdünnt und in eine Quarküvette pipettiert. Der Abgleich erfolgt gegen 1000µl dest. H₂O.

Das Absorptionsergebnis bei 260 nm ist die Menge DNA in µg pro µl in der Ausgangslösung. Die Reinheit der DNA-Lösung kann durch Messung des Quotienten zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2 DNA-Amplifikation (Polymerasen Kettenreaktion = PCR)

3.2.1 PCR- Bedingungen zur Kopplungsanalyse

Bei den Primern handelt es sich um 19- 25-mer Oligonukleotide. In der untenstehenden Tabelle sind die Komponenten der PCR-Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Primer angegeben. In einem Reaktionsansatz mit einem Volumen von 15µl sind enthalten:

65G5CA, 46F10CA, D8S 198, D8S 199, D19S 413, D19S 865 und D19S 906	D8S 85, D11S 905 und D11S 903
2µl dNTPs (4 µM) 1,5µl 10x Reaktionspuffer 1,5µl Primermix (Forward- + Reverse- je 2µM) 0,45µl MgCl ₂ (50mM) 2µl DNA (100ng/µl) 0,125µl Taq-DNA- Polymerase (1/8U) ad 15µl H ₂ O	2µl dNTPs (4µM) 1,5µl 10x Reaktionspuffer 1,5µl Primermix (Forward- + Reverse-je 2µM) 0,9µl MgCl ₂ (50 M) 2µl DNA (100ng/µl) 0,125µl Taq-DNA- Polymerase (1/8U) ad 15µl H ₂ O
D8S 1779 und D19S 221	D11S 1785
3µl dNTPs (4µM) 1,5µl 10x Reaktionspuffer 5µl Primermix (Forward- + Reverse- je 2µM) 0,45µl MgCl ₂ (50mM) 1,5µl DNA (100ng/µl) 0,125µl Taq-DNA- Polymerase (1/8U) ad 15µl H ₂ O	3µl dNTPs (4µM) 1,5µl 10x Reaktionspuffer 5µl Primermix (Forward- + Reverse- je 2µM) 0,9µl MgCl ₂ (50mM) 1,5µl DNA (100ng/µl) 0,125µl Taq-DNA- Polymerase (1/8U) ad 15µl H ₂ O

Tab. 3.1: PCR-Ansatz zur indirekten Mutationsanalyse mit verschiedenen MgCl₂-, Primer und dNTP-Bedingungen

Cycler-Bedingungen für die PCR zur Kopplungsanalyse:

1.	94 °C	2:00
2.	94 °C	1:00
3.	55 °C	1:00
4.	72 °C	0:45
5.	ab 2.	34x
6.	72 °C	10:00
7.	4 °C	∞

1µl Taq-Polymerase (1U/µl)

34µl ddH₂O

PCR-Bedingungen 1 werden für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus der Interaktionsdomäne von *hMLH1* mit dem Primer-Paar 1505-F/2183-R und die PCR-Bedingungen 2 für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus der ATPase-Domäne von *hMLH1* mit dem Primer-Paar 973-F/367-R verwendet.

3.2.3 Mutagenisierende PCR

Um gezielt Punktmutationen in ein DNA-Fragment einzubringen werden komplementäre Oligonukleotide benutzt, die zentral die auszutauschende Base enthalten. In zwei unabhängigen PCRs werden mit dem mutagenen Forward- und dem flankierenden Reverse-Oligonukleotid sowie dem mutagenen Reverse- mit dem flankierenden Forward-Oligonukleotid Teilfragmente amplifiziert, die dann in einer weiteren PCR mit den flankierenden Oligonukleotiden zu einem Fragment zusammengefügt werden (Abb. 3.1.). Template ist immer das Plasmid pBTM_d-*hMLH1* (#1193).

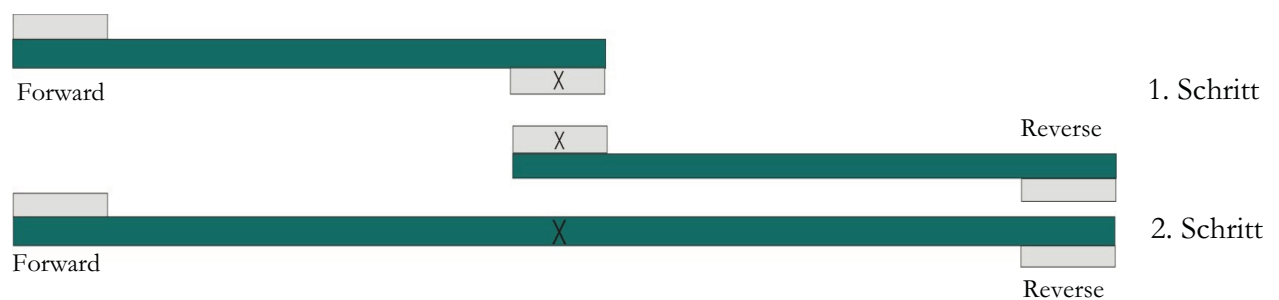


Abb. 3.1: Schema der mutagenisierenden PCR. 1. Schritt: Je 1 flankierender Primer und 1 mutagenisierende Primer werden zu 2 Teilfragmenten amplifiziert; 2. Schritt: Die flankierenden Primer und die 2 Fragmente des 1. Schrittes als Template in die zweite PCR eingesetzt. Forward= Primer 1505-F für Mutationen in der Interaktionsdomäne und Primer 973-F für Mutationen in der ATPase-Domäne; Reverse= Primer 2183-R für Mutationen in der Interaktionsdomäne und Primer 367-R für Mutationen in der ATPase-Domäne. Die Primer für die Mutagenese sind mit „X“ bezeichnet.

Die Primer 1505-F und 2183-R dienen bei den Fragmenten aus der Interaktionsdomäne von *hMLH1* als flankierende Primer. Zur Amplifikation von Fragmenten aus der ATPase-Domäne werden die flankierende Primer 367-F als Forward- und 973-pBTM_d-R als Reverse-Primer verwendet.

Für die Amplifikation von Fragmenten aus der Interaktionsdomäne von *hMLH1* wird eine Annealing-Temperatur von 50°C, für Fragmente aus der ATPase-Domäne dagegen eine Annealing-Temperatur von 52°C gewählt.

PCR-Asatz:

2,5µl dNTPs
 5µl PCR-Puffer (10x)
 3µl MgCl₂ (25mM)
 1µl Primer 1 (Forward 10 µM)
 1µl Primer 2 (Reverse 10 µM)
 2µl Plasmid-DNA (100ng)
 1µl Platinum Pfx Polymerase
 (1U/µl)

34µl H₂O

PCR-Bedingungen 1:

1. 94°C 5:00
 2. 94°C 0:45
 3. 50°C 0:30
 4. 68°C 2:00
 5. ab 2. 34x
 6. 68°C 7:00
 7. 4°C ∞

PCR-Bedingungen 2:

1. 94°C 5:00
 2. 94°C 0:45
 3. 52°C 0:30
 4. 68°C 2:00
 5. ab 2. 34x
 6. 68°C 7:00
 7. 4°C ∞

	1505 F (Primer)	2183 R (Primer)
L550P F		544 bp
L550P R	157 bp	
N551S F		543 bp
N551S R	158 bp	
A586P F		440 bp
A586P R	261 bp	
A589D F		427 bp
A589D R	269 bp	
P603R F		386 bp
P603R R	313 bp	
K618R F		341 bp
K618R R	358 bp	
P640S F		274 bp
P640S R	424 bp	
P640L F		276 bp
P640L R	423 bp	
P648L F		252 bp
P648L R	447 bp	
P648S F		252 bp
P648S R	447 bp	
P654L F		232 bp
P654L R	466 bp	
R659P F		217 bp
R659P R	483 bp	
L676P F		166 bp
L676P R	533 bp	
Q689R F		128 bp
Q689R R	571 bp	
2183 R	678 bp	

Primer	Größe	Größe
	973pBTMd-F (Primer)	367 R (Primer)
A21E F	145 bp	
A21E R		325 bp
P28L F	166 bp	
P28L R		304 bp
M35R F	186 bp	
M35R R		284 bp
Q48P F	226 bp	
Q48P R		245 bp
N64S F	196 bp	
N64S R		274 bp
F80V F	321 bp	
F80V R		160 bp
K84E F	136 bp	
K84E R		339 bp
G101V F	66 bp	
G101V R		385 bp
367 R	450 bp	

Tab. 3.2: Größe der Teilfragmente
 bp=Basenpaare; F=Forward; R= Reverse;
 973pBTMd-F +1505-F = Forward-Primer; 367-R + 2183-R = Reverse-Primer

Tabelle 3.2. listet die Größe der entstehenden Teilfragmente auf. Die Gesamtfragmentgröße, d. h. mit den beiden flankierenden Primer amplifiziert, beträgt für die Interaktionsdomäne 678 bp und für die ATPase-Domäne 450 bp.

3.3 Gelelektrophorese

3.3.1 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Analyse der fluoreszenzmarkierten Fragmente der Kopplungsanalyse werden 25 cm lange und 0,25 mm dicke Polyacrylamidgele (PAA) verwendet.

Gelzusammensetzung:	15ml	Sequagel 6%
	3,75ml	Sequagelpuffer
	200µl	DMSO
	150µl	APS 10%

Die Auftrennung der Proben erfolgt mit einem Licor Sequencer. Es werden 2µl PCR-Produkt mit 2µl Formamid-Puffer versehen, für 3 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Von diesem Ansatz werden 1,5µl aufs PAA- Gel aufgetragen.

Laufbedingungen:

1000V	37mA	50W	50° C
-------	------	-----	-------

3.3.2 Gelelektrophorese

Beim Durchlaufen der Gelmatrix im elektrischen Feld wird Nukleinsäure aufgrund der Fragmentgröße aufgetrennt.

PCR- Produkte werden zur Kontrolle von Qualität und Quantität in einem Agarosegel aufgetrennt. Für ein 1%-iges Gel werden 0,5g Agarose eingewogen, mit 50ml 1x TBE-Puffer im Erlenmeyerkolben aufgefüllt und in der Mikrowelle aufgekocht.

Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird der Gellösung 1µg Ethidiumbromid/ml hinzugefügt.

Aufgetragen aufs Gel werden:

2µl PCR- Produkt

2µl H₂O

1µl 5x Auftrags- Puffer

3.4 DNA-Restriktionsanalysen

Mutagenisierte *hMLH1*-Plasmide werden mit der Restriktionsendonuklease *PvuII* geschnitten. Bei vollständigem Plasmid, d. h. integriertem *hMlh1*, entstehen zwei Fragmente mit einer Größe von 3364 und 6822 bp.

Durch den Doppelverdau von pBTMD-*hMLH1* mit den Restriktionsendonukleasen *Kpn21* und *Eco130I* entstehen zwei Fragmente mit einer Größe von 441 bp und 7782 bp. Für das Restriktionsenzym *Kpn21* wird eine Reaktionstemperatur von 55°C für die anderen 37°C verwendet.

Bei der Restriktion mit *BamHI* und *MsiI* werden zwei Fragmente von 450 bp und 7762 bp Größe generiert.

Ansatz:

4,00µl Plasmid-DNA (100ng/µl)

2,00µl Restriktionspuffer 10x

13,75µl H₂O bidest.

0,25µl Enzym (1 Unit)

3.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgt mit dem „QIAEX II Gel Extraction“-Kit der Firma Qiagen.

3.6 Aufreinigung von PCR- Fragmenten

PCR-Fragmente, amplifiziert aus Gesamt-DNA, werden vor der Sequenzierung aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgt mit dem „QiaQuick PCR-Purification“-Kit (Qiagen) nach Herstellervorschrift.

3.7 DNA-Fällung

Zur Fällung von DNA aus einer Lösung wird 3M Natriumacetat (1/10 des Volumens) als Fällungssalz verwendet. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe des 2,5 fachen Volumen Ethanol (96%ig), und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge pico). Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird

einmal in Ethanol (70%ig) gewaschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Aufnahme der DNA erfolgt im gewünschten Volumen ddH₂O.

3.8 Sequenzierung

Zur Verifikation der eingeführten Basenaustausche wird die Plasmid-DNA sequenziert.

Ansatz:

500ng Plasmid-DNA
 1,5µl Big Dye Buffer 5x
 1,0ml Big Dye Terminator Mix
 0,5µl Sequenzier-Primer (10 µM)
 ad 10µl ddH₂O

Fällung:

10,0µl Ansatz
 46,0µl ddH₂O
 6,3µl NaAc (3 M)
 156µl EtOH 96%
 30 min bei -20°C fällen
 20 min bei 12.000 U/min zentrifugieren
 zweimal Waschen mit 200µl 70%igem EtOH
 10 min bei 12.000 U/min zentrifugieren; Überstand abnehmen
 Pellet trocken in der Speed Vac

PCR-Programm:

1. 94°C	2:00
2. 96°C	0:10
3. 50°C	0:05
4. 60°C	4:00
5. ab 2.	24 x
6. 4°C	∞

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte im automatischen ABI-Sequencer des BMFZ.

3.8.1 Mutationsdetektion mittels DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography)

Bei der Untersuchung mittels DHPLC handelt es sich um eine Säulenchromatographie. Die stationäre Phase besitzt an eine Säule gebundene Beads. Die mobile Phase besteht aus zwei Komponenten, dem Triethylamoniumacetat (TEAA) und Acetonitril. TEAA tritt über seine positiv geladenen Enden mit der negativ geladenen DNA in Wechselwirkung. Die freien Enden des TEAA binden reversibel an die Beads. Acetonitril ist das Agens, welches die Bindung zwischen Beads und TEAA lösen kann. Mit steigender Konzentration von Acetonitril und einer exonspezifischen Schmelztemperatur wird der Verband TEAA-DNA von der Säule gewaschen.

Bei der DHPLC-Analyse nutzt man die Heteroduplexbildung von DNA zur Mutationsdetektion. Zur Heteroduplexbildung kommt es bei Vorliegen einer heterozygoten Sequenzveränderung oder durch das Gemisch von homozygoter Wildtyp-DNA mit homozygot veränderter DNA. Durch Denaturierung und langsame Renaturierung der DNA wird die Heteroduplexbildung erzielt.

Um die Unterschiede in der Bildung von Homo- zu Heteroduplex darstellen zu können, wird eine Exonspezifische Schmelztemperatur benötigt, bei der die Fragmente von der Säule gelöst werden. Dabei wird das Heteroduplex durch die Herabsetzung der Schmelztemperatur als erstes von der Säule gewaschen, gefolgt vom Homoduplex.

Anhand der DNA-Sequenz wird die spezifische Schmelztemperatur ermittelt. Eine entsprechende Software des Herstellers ermöglicht es anhand der Fragmentsequenz eine Schmelzkurve zu erstellen (Abb. 3.3.).

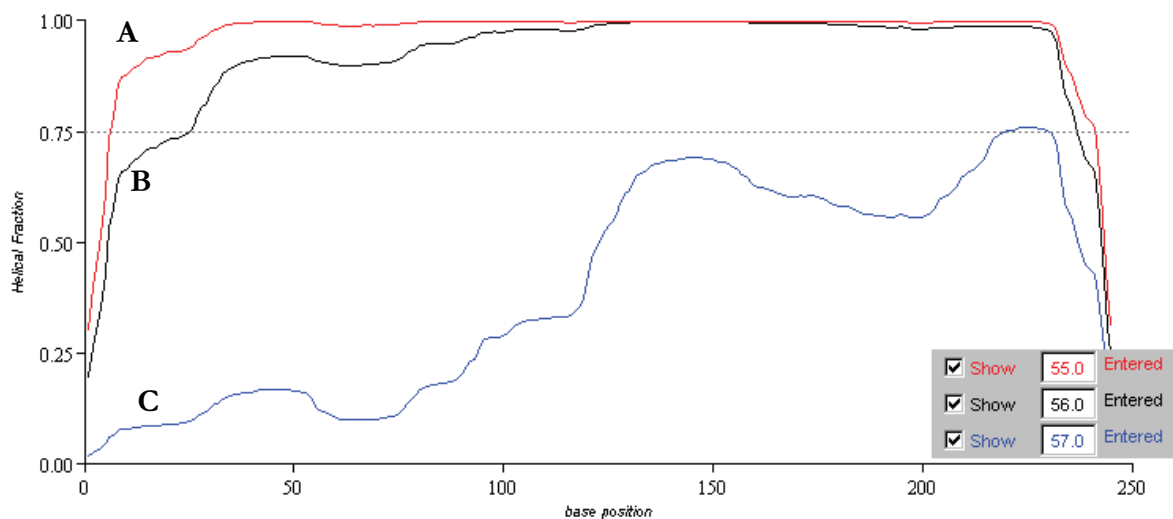


Abb. 3.3: Schmelzkurven des Fragmentes *EXT1* Exon 5 bei verschiedenen Temperaturen der Säule. A= Die rote Kurve zeigt das Aufschmelzen des Fragments bei einer Säulentemperatur von 55 °C. Eine Aufschmelzung ist nur im vorderen Bereich des Fragments zu erkennen. B= In der schwarzen Schmelzkurve bei einer Temperatur von 56 °C ist der Bereich der Aufschmelzung gewachsen. C= Bei 57 °C ist mehr als 75 % des Fragments aufgeschmolzen, daher ist diese Temperatur zu hoch.

Des Weiteren wird ein Vorschlag für eine Analysetemperatur gemacht, bei der der Doppelstrang zu etwa 75% als Einzelstrang vorliegt. Bei der Detektion der Mutationen zeigen sich für Homoduplices bei den entsprechenden Temperaturen einzelne Peaks. Heteroduplices präsentieren sich als Doppelpick, da es bedingt durch die Fehlpaarung zur Herabsetzung der Schmelztemperatur kommt, so dass sich Homo- und Heteroduplex-Peaks getrennt voneinander darstellen. Idealerweise ergeben sich vier Peaks,

wenn beide Homo- und beide Heteroduplexe voneinander trennt werden (Abb. 3.4). Die benötigte Säulentemperatur zur optimalen Auflösung der Heterduplexstruktur muss für jedes Amplikon experimentell ermittelt werden. Die Temperatur kann optimiert werden durch die Analyse einer Kontroll-DNA. Zur Analyse wird ein Puffergradient aus den Puffern A und B mit gleich bleibender Menge TEAA, aber ansteigender Menge Acetonitril über 5 min gewählt, welcher dann den Elutions-Peak enthält. Die Analyse der Fragmente erfolgt mit dem Programm HSM der Firma Hitachi

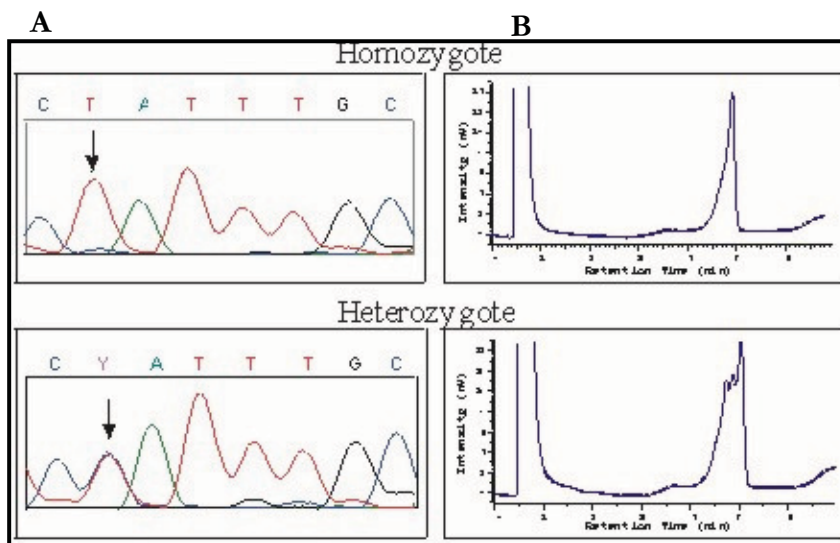


Abb. 3.4: Darstellung von Homo- und Heteroduplex im Chromatogramm (B) im Vergleich zum Sequenzierungsmuster (A). (aus: User manual Transgenomic 2002)

3.8.2 Bedingungen zur Mutationsdetektion in den *EXT*-Genen auf der DHPLC

Zur Analyse von Mutationen in den *EXT*-Genen wurde der Denaturierungsschritt direkt an das PCR-Programm zur Amplifizierung der DNA-Fragmente angeschlossen. Da es sich bei Mutationen in diesen Genen immer um heterozygote Mutationen handelt, muss nicht mit Wildtyp-DNA gemischt werden.

EXT1 Exon (Amplikon)	Gradient Puffer B [%]	Temperatur	EXT2 Exon (Amplikon)	Gradient Puffer B [%]	Temperatur
1(a)	50-60; 46-56	57°C ; 60°C	2(1)	53-63; 50-60	56°C ; 59°C
1(b)	57-67; 55-65	59°C ; 62°C	2(2)	56-66; 54-64; 50-60	58°C ; 60°C ; 63°C
1(2)	54- 64; 52- 62	61°C ; 63°C	2(3)	53-63; 53-63	58°C ; 60°C
1(3)	58-68; 55-65; 53-63	56°C ; 59°C ; 61°C	2(4)	54-64; 52-62	58°C ; 60°C
1(4)	52-62; 50-60	59°C ; 61°C	3	46-56;	58°C ; 60°C
1(5)	55-65; 53-63	59°C ; 61°C	4	52-62; 49-59	57°C ; 60°C
2	53-63; 51-61	57°C ; 60°C	5	53-63	59°C
3	54-64	60°C	6	52-62; 50-60	57°C ; 60°C
4	55-65; 53-63	54°C ; 56°C	7	53-63; 51-61	58°C ; 59°C

5	53-63	56°C	8	56-66; 53-63	55;5°C ; 61°C
6	54-64; 48-58	57°C ; 63°C	9	52-62; 49-59	58°C ; 61°C
7	53-63; 51-61	59°C ; 61°C	10	55-65; 53-63; 51-61	54°C ; 56°C ; 58°C
8	57-67; 53-63	58°C ; 60°C	11	54-64; 52-62;	57°C ; 61°C ; 62°C
9	54-64; 52-62; 50-60	57°C ; 59°C ; 61°C	12	53-63; 50-60; 49-59	55°C ; 57°C ; 60°C
10	54-64; 52-62	56°C ; 59°C	13	50-60; 48-58	59°C ; 61°C
11	56-66; 54-64; 52-62	59°C ; 60°C ; 62°C	14	52-62	60°C

Tab. 3.3. Puffergradient und Schmelztemperatur für die Analyse von *EXT1* und *EXT2*. Gradient Puffer B [%] gibt den Gehalt von Puffer B an, der zur Elution des Fragmentes von der Säule führt. Zu jedem Gradienten gehört eine Schmelztemperatur. Erläuterungen siehe Abschnitt: 3.8.1.

3.8.3 Bedingungen zur Mutationdetektion im *hMLH1*-Gen auf der DHPLC

Mutagenisierte Plasmide wurden über homologe Rekombination in der Hefe generiert. Ziel dieser Analyse ist es, die Klone, die ein mutiertes Plasmid tragen, von Wildtypklonen oder auch Klonen, die ein mehrfach mutiertes Plasmid tragen, zu trennen. Da die eingeführte Nukleotidveränderung im Plasmid homozygot vorliegt, wird die Plasmid-DNA mit Wildtyp-DNA des Plasmids pBTMdh-*hMLH1* gemischt. Durch Denaturierung und langsames Abkühlen der gemischten DNA kann es zur Heteroduplexbildung kommen. Analysiert werden die Proben mittels der vorher ermittelten Analysebedingungen (Tab. 3.4.) auf der DHPLC. Dieser Gradient wurde mit dem Programm Wavemaker der Firma Transgenomic entworfen.

Genbereich	Gradient Puffer B [%]	Temperatur
ATPase Domäne	55-65	59°C
Interaktionsdomäne	59-69	59°C

Tab. 3.4: Puffergradient und Schmelztemperatur zur Mutationsdetektion von *hMLH1* auf der DHPLC

3.9 Expressionsanalysen

3.9.1 30k-Array von MWG

Array-Analysen können ein wichtiges Instrument zur Identifikation von krankheitsauslösenden Genen sein oder Aufschlüsse über Zusammenhänge von Signalwegen verschiedener Gene geben. Array Analysen in dieser Arbeit wurden von der Firma MWG durchgeführt. Verwendet wurde ein 30K Array mit insgesamt 29.550 humanen Genen auf drei Arrays mit jeweils 9850 Oligonukleotiden. Die repräsentierten Gene stammen

aus verschiedenen Datenbanken (NCBI, EBI, Ensembl, GoldenPath). Auf dem Array A liegen Gene bekannter oder klar definierte Proteindomänen. Array B enthält weitere bekannte Gene und zusätzlich in Ensembl annotierte „Open Reading Frames“ (ORF) mit experimentell gezeigter Bedeutung. Array C enthält weitere durch „Ensembl ORF’s“ und „Ensembl GenScan“ vorhergesagte ORF’s. Zur Hybridisierung des Arrays wird RNA aus Chondrozyten zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung, welche Art der Markierung die beste ist, werden folgende Kombinationen getestet. 1. Eine Cy3-Markierung der cDNA, 2. eine Cy5-Markierung, 3. eine Cohybridisierung Cy3/Cy5 und 4. eine vergleichende T7-Amplifikation, in der vor der Hybridisierung auf den Array die cDNA-Menge durch Amplifikation mit der T7-Polymerase vervielfacht und erst dann zur Hybridisierung eingesetzt wird. Die Cy3-Markierung wird für die Kontroll-Probe und die 4 Tumor-Proben verwendet. Für die anderen Markierungen werden je nur eine Kontrolle und 1 Tumorprobe eingesetzt. Es werden 50-mer Oligonukleotide auf den Arrays verwendet, die eine hohe Spezifität garantieren. Des Weiteren sind auf dem Array *Arabidopsis* Proben als Kontrollen gespottet. Zur Auswertung werden die Messergebnisse der Kontroll-Knorpel-Probe mit den 4 Tumor-Knorpel-Proben verglichen. Wenn alle 4 Tumor-Proben eine Erhöhung der Messwerte um den Faktor 2 gegenüber der Kontroll-Probe aufweisen, werden sie als hochreguliert eingestuft. Wenn die Messwerte aller 4 Tumor-Proben um mindestens den Faktor 2 gegenüber der Kontroll-Probe herabgesetzt sind, werden sie als herunterreguliert eingestuft. Von diesen evaluierten Genen gehen nur solche in die weiterführenden Untersuchungen ein, die in ihrer Funktion am Knorpel- bzw. Knochenentwicklungsprozess oder deren Signalwege involviert sind.

3.9.2 Quantitative Real-Time PCR mit TaqMan-Sonden

Bei der real-time PCR kann während der gesamten PCR die Entstehung des Produktes in Echtzeit verfolgt werden. Dabei wird die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase genutzt. Die Hybridisierungssonde wird am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (FAM) markiert; das 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff und zusätzlich noch durch ein Phosphatrest blockiert um weitere Elongation zu verhindern. Durch die räumliche Nähe von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher wird bei einer Anregung mit spezieller Wellenlänge (488 nm) durch einen Fluoreszenz-

Resonanz-Energietransfer (FRET) die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffes unterdrückt. Fluoreszenzlicht wird emittiert, wenn Fluoreszenzfarbstoff und Quencher durch Hydrolyse des Oligonukleotids getrennt werden.

In der Annealing-Phase der PCR binden Primer und Sonde an den Matrizenstrang. In der Elongationssphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase zerschnitten und die räumliche Nähe von Reporterfarbstoff und Quencher aufgehoben; es entsteht das Fluoreszenzsignal. Das gebildete Signal ist sequenzspezifisch, da nur eine 100%ig bindende Sonde hydrolysiert werden kann. Das Fluoreszenzsignal kann nun detektiert werden. Je mehr PCR-Produkt entsteht, desto stärker wird das Signal des Reporters. In jedem Zyklus der PCR wird es aufgezeichnet.

Die Auswertung der Analyse erfolgt über den C_T -Wert (= *threshold cycle*). Der C_T -Wert gibt die Zyklenzahl an, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über der Grundlinie registriert wird. Je kleiner der C_T -Wert ist, desto früher erscheint das Produkt. Im sogenannten „*amplification plot*“ wird das normalisierte Reportersignal über die Zyklenzahl dargestellt. Der normalisierte Reporter-Wert R_n entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporterfarbstoffes dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffes ROX, der in allen TaqManTM Reagenzien enthalten ist. Dadurch lassen sich unspezifische Einflüsse wie z. B. Konzentrationsveränderungen durch Pipettierfehler (Voluminaschwankungen), ausgleichen.

Bei einer relativen Quantifizierung, der sogenannten $\Delta\Delta C_T$ -Methode wird das Verhältnis der Expression einer Zielsequenz zur Expression einer zweiten Kontrollsequenz bestimmt. Für die Quantifizierung wird eine endogene Kontrolle herangezogen. So kann die relative Quantifizierung zwischen einzelnen Experimenten normalisiert werden. Die Menge der Zielsequenz wird semiquantitativ auf das Signal der Kontrolle bezogen. Endogene Kontrolle ist hier 18S rRNA. Normalisiert wird über die Berechnung des ΔC_T -Wertes. Dabei wird der C_T -Wert der endogenen Kontrolle von dem des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta C_T = C_T \text{ Gen} - C_T \text{ housekeeper}$). Bei der Berechnung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Gen} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$), d. h. der quantitativen Bestimmung der Expression der zu untersuchenden Gene, werden diese in Beziehung zu einer Kontrollprobe gesetzt. Detektiert wird dieser Prozess mit einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector.

3.9.3 5'-Nuklease Assay

Der 5'-Nuklease Assay funktioniert prinzipiell wie die „real-time“- PCR-Technologie. Während der Amplifikation bindet die TaqMan-minor groove binder (MGB)-Sonde spezifisch an die komplementäre Sequenz zwischen den beiden Primern. Solange die Sonde nicht hydrolysiert wird führt die räumliche Nähe von Reporter und Quencher zu einer Unterdrückung des Fluoreszenzsignals mittels Förster-Energietransfers (siehe Abb. 3.6.).

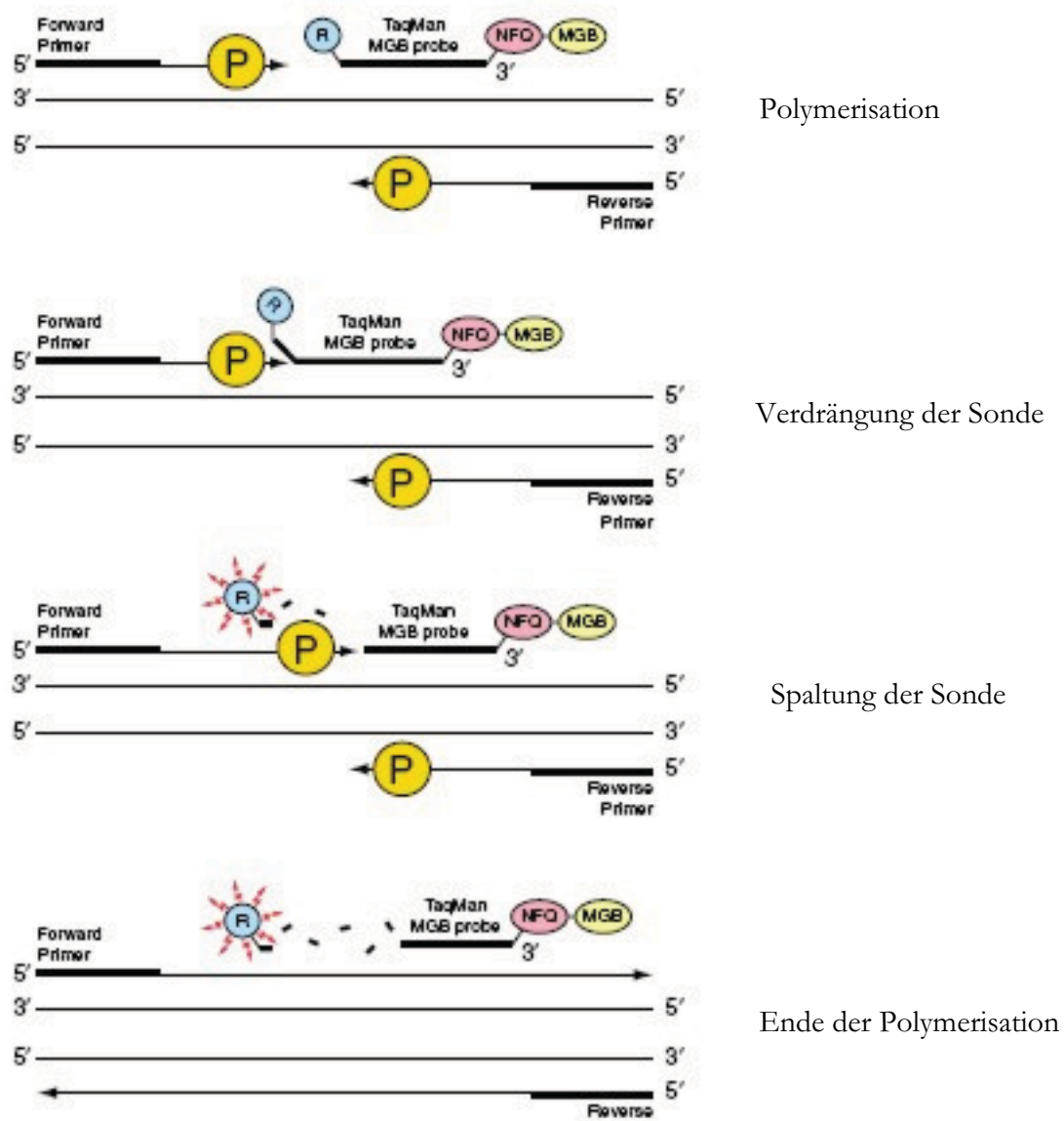


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des 5' Nuklease Assays (Applied Biosystems)

3.9.4 „Assay on Demand“

Assay on Demand-Analysen basieren auf der real-time TaqMan-PCR-Technologie.

Bei dieser Untersuchung handelt es sich um optimierte Produkte der Firma Applied Biosystem basierend auf „5'-Nuklease-Assays“ für die Detektion und Quantifizierung spezifischer humaner Nukleinsäuresequenzen. In einer zweistufigen RT-PCR wird die Genexpression quantifiziert, wobei der PCR-Schritt an einen 5' fluorogenen Nachweis gekoppelt ist (Abb. 3.6). Die cDNA wird mit Hilfe des TaqMan Universal PCR Master Mix amplifiziert und enthält Primer in nicht-limitierender Konzentration. Die TaqMan-MGB-Sonde trägt einen Reporterfarbstoff (6-FAM) am 5'-Ende der Sonde. Am 3'-Ende der Sonde befinden sich ein „minor groove binder“ (MGB) und ein nicht-fluoreszierender Quencher. Der MGB sorgt für eine höhere Schmelztemperatur, ohne dass es zu einer Verlängerung der Sonde kommen muss.

3.9.4.1 Lage der Sonden in den einzelnen Genen

Gen	RefSeq-Nr. der Datenbank	Anzahl der Exons im Gen	Position der Sonde (Exongrenze)	Amplikonlänge (bp)
<i>EXT1</i>	NM_000127.2	11	8-9	59
<i>Decorin</i>	NM_133503.2	8	8	109
<i>Cathepsin D</i>	NM_001909.3	9	1-2	95
<i>Metalloprotease 2</i>	NM_004530.2	13	12-13	83
<i>Collagen XII a1</i>	NM_080645.2	65	51	133
<i>Cyclin D1</i>	NM_053056.2	5	2-3	94
<i>IHH</i>	NM_002181.2	3	3	120
<i>PTHrP (PTH LH)</i>	NM_198964.1	3	2-2	65
<i>BMP 7</i>	NM_001719.1	7	3-4	81

Tab. 3.5: Größe und Lage der verwendeten „Assay on Demand“-Sonden

Die genaue Lage der Sonden wurde von der Firma bislang nicht bekannt gegeben. Die Informationen zu den einzelnen Sonden sind in Tabelle 3.5. dargestellt.

3.9.4.2 cDNA-Synthese für Assay on Demand-Untersuchungen

PCR-Ansatz:

10x TaqMan RT-Puffer	1,0µl
25mM MgCl ₂	2,2µl
dNTPs Mixture	2,0µl
Random Hexamers	0,5µl
RNase Inhibitor	0,2µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/µl)	0,25µl
DEPC H ₂ O	2,6µl

PCR-Bedingungen:	
25°C	10:00
48°C	30:00
95°C	5:00
4°C	∞

RNA (12,5 ng/ μ l)	1,25 μ l
	ad 10,0 μ l

3.9.4.3 Assay On Demand

PCR-Ansatz:

2 x TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG)	10,0 μ l
Assay On Demand	1,0 μ l
cDNA	4,0 μ l
H ₂ O	5,0 μ l

PCR-Bedingungen:

1.	95°C	10:00
2.	95°C	0:15
3.	60°C	1:00
4.	ab 2.	60x

3.10 Hefemethoden

3.10.1 Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Hefen erfolgt bei 30°C in Vollmedium (YPD) oder Minimalmedium (SD). Dem synthetischen Medium wird Glukose (2% (w/v)) als Kohlenstoffquelle zugegeben. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen werden die entsprechende Base bzw. Aminosäure im Medium weggelassen. Hefe-Kulturen werden zur Lagerung über längere Zeiträume bei –80°C im Verhältnis 3:1 mit Glycerin versetzt.

3.10.2 Integration von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* über homologe *in vivo* Rekombination

Um ein mutagenisiertes DNA-Fragment in ein Plasmid in Hefe zu klonieren, wird ein DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert (Abschnitt: 3.3.4.). Für das PCR-Fragment ist der Vektor pBTMdhMLH1 (#1193) sowohl Template als auch Zielplasmid. Dadurch ergeben sich Homologien zwischen dem Fragment und dem Zielplasmid. Durch einen zweifachen Restriktionsendonukleaseverdau wird der Vektor linearisiert (für die Bereiche in der ATPase-Domäne mit *Bam*HI und *M*slI; für die Interaktionsdomäne mit *E*- ω 130I und *K**pn*21 geschnitten) und über Agarose-Gelextraktion (Abschnitt 3.6.) aufgereinigt. Für die Integration in das Plasmid wird das zuvor hergestellte PCR-Produkt zusammen mit dem linearisierten Ziel-Plasmid in den Hefestamm CEN.P.K2-1C transformiert. Die Schnittstellensequenzen finden sich in der Sequenz des Fragments wieder. Dadurch entstehen homologe Bereiche zwischen dem Amplikon und dem Plasmid, so dass es zur Intergration des Fragmentes in das Plasmid kommen kann.

3.10.3 Hefetransformation in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von Plasmiden in Hefezellen folgt einem hocheffizienten Protokoll von Agatep et al. 1998.

- Übernachtskultur des Hefestammes in einer 50ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,01 angeimpft und bei 30°C inkubiert.
- Ernten der Zellen am nächsten Morgen bei einer OD₆₀₀ von ca. 4-6
- Kultur in ein 50ml Falconröhrchen überführen und für 5 min. bei 3500U/min sedimentieren.
- Überstand verwerfen und Sediment in 25ml ddH₂O resuspendieren
- Sedimentation bei 3500U/min für 5 min.
- Zellsediment in 1ml LiAc (100mM) pH 8,4 – 8,9 resuspendieren und in 1,5ml Reaktionsgefäß überführen.
- Zentrifugation bei 13.000U/min; Überstand verwerfen
- Resuspension des Pellets in 100mM LiAc (Menge variiert, je nach Ausgangs-OD); die Zellzahl soll bei 2x10⁹ liegen.
- 50µl Aliquot in neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführen
- 5 sec bei 13.000U/min zentrifugieren; Überstand abziehen
- Carrier-DNA (Lachssperma-DNA) (2mg/ml) 10 min bei 100°C denaturieren; auf Eis abkühlen
- Transformationsmix:
 - 240µl PEG (50% w/v)
 - 36µl LiAc (1M)
 - 50µl Carrier-DNA
 - Xµl DNA (abhängig von der DNA-Konzentration und der Art der Verwendung)
 - (34– X)µl H₂O
- Ansätze gut vortexen
- 30 min bei 30°C im Rad inkubieren
- Hitzeschock bei 42°C für 30 min im Thermoblock
- Ausplattieren auf Agarplatten mit Selektionsmedium je 10% und 90% des Transformationsansatzes.

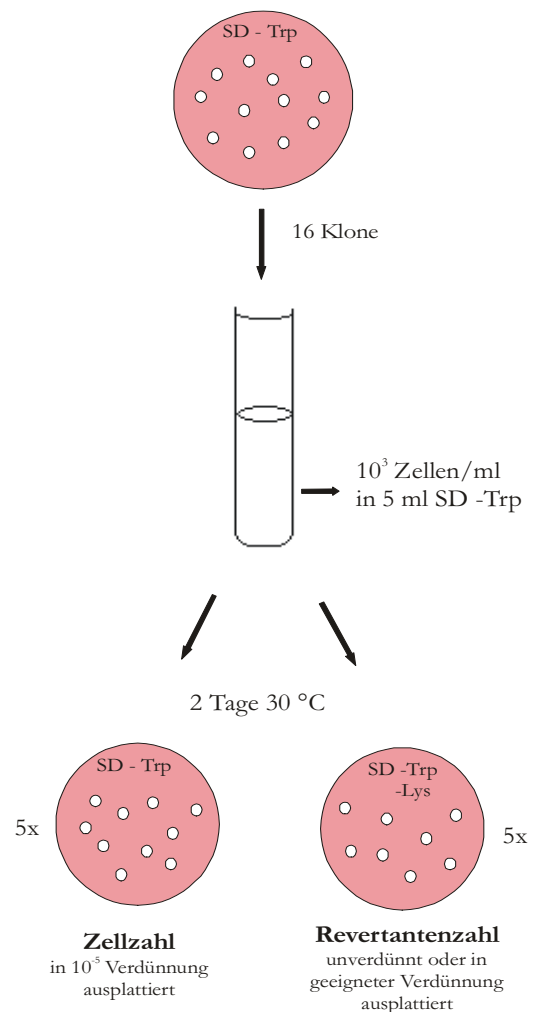
Bei der Transformation mit dem Hefestamm CENP.K2-1c werden nach 24 h je 8 Kolonien auf eine Selektiv-Agarplatte (-Trp) vereinzelt.

Bei Transformation in den Hefestamm L40 werden nach drei Tagen je 8 Klone auf eine Agarplatte mit Selektivmedium (-Leu, -Trp) vereinzelt.

Bei einer Transformation im Hefestamm E134 werden nach 48 Stunden 16 Klone auf Selektivmedium-Platten (SD -Trp) vereinzelt.

3.10.4 Mutationsratenbestimmung mit dem Lysin-PolyA-Strang-System

Um die Mutationsraten der unterschiedlichen *hMLH1*-Konstrukte zu ermitteln, wird der Wildtyp-Stamm E134 frisch aus dem Glycerinstock (-80°C) entnommen und ausplattiert. Es folgt eine Transformation mit den *hMLH1*-Konstrukten (Fusion von *lexA* und *hMLH1*) in E134. Als Kontrollen dienen Wildtyp-*hMLH1* (ohne *lexA*) und „Leervektor“ (*lexA* ohne *hMLH1*). Die Transformationsansätze werden auf SD -Trp-Selektivmedium ausplattiert und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Von jedem Ansatz werden 16 Klone vereinzelt und einen weiteren Tag inkubiert. Eine Pipettenspitze der vereinzelt Klone wird nun in sterilem H₂O resuspendiert. Die Zellzahl dieser Suspensionen wird mikroskopisch mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt (es werden 4x4 Quadrate ausgezählt) und jeweils 5ml Flüssigkulturen SD -Trp mit einer Zellzahl von 10³ Zellen/ml angeimpft. Die Kulturen werden 2 Tage bei 30°C im Schüttler inkubiert. Parallel wird auf eine Selektivplatte (SD -Trp, -Lys) je ein Tropfen der Zellsuspensionen aufgebracht und diese Platte bei 30°C für 2 Tage inkubiert. Um eine repräsentative und statistisch auswertbare Datenmenge zu erhalten werden von jedem Ansatz 16 unabhängige Klone untersucht. Die Flüssigkulturen wer-



den in verschiedenen Verdünnungen auf Selektivmedium ausplattiert. Zur Bestimmung der Lebend-Zellzahl in den Kulturen werden 10^{-5} -Verdünnungen in 5 Verdünnungsschritten hergestellt und von dieser Verdünnung jeweils 100 μ l auf 5 SD -Tryp-Platten ausplattiert.

Zur Bestimmung der Anzahl der revertierten Zellen werden der erwarteten Mutationsrate entsprechende Verdünnungen auf SD -Trp, -Lys-Platten ausplattiert. Bei „wildtypischen“ Mutationsraten werden 5 mal 100 μ l der unverdünnten Zellsuspension ausplattiert, ansonsten werden 100 μ l von Verdünnungen zwischen 1:10 bis 1:100 analysiert. Die Platten werden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die am besten geeignete Verdünnung wurde in Voruntersuchungen mit nur 4 Klonen bestimmt.

3.10.5 Statistische Analyse der Mutationsratenbestimmung

Zur Bestimmung der Mutationsraten werden die Kolonien auf den Platten gezählt. Für 16 unabhängige Klone pro Variante werden insgesamt 160 Platten ausgezählt. Es werden 5 Platten mit der 10^{-5} Verdünnung für die Zellzahl ausgezählt. Für jeden einzelnen Klon wird der Mittelwert der Zellzahlen aus den 5 Platten gebildet und auf die Zellzahl des Ausgangsvolumen (hier 1ml) umgerechnet. Von den 5 Platten mit Revertanten werden ebenfalls die Kolonien gezählt, der Mittelwert gebildet und der Median aus den Mittelwerten der 16 unabhängigen Klone gebildet. Dem Median wird anhand der Tabelle von Lea und Coulson (Lea und Coulson, 1949) der Wert r_0/m zugeordnet.

r_0	r_0/m	r_0	r_0/m	r_0	r_0/m	r_0	r_0/m
1,4	1,3	15,3	2,9	1170	4,5	787,0	6,1
1,6	1,4	17,4	3,0	132,0	4,6	884,0	6,2
1,9	1,5	19,9	3,1	150,0	4,7	993,0	6,3
2,3	1,6	22,7	3,2	169,0	4,8	1115,0	6,4
2,7	1,7	25,9	3,3	190,0	4,9	1251,0	6,5
3,2	1,8	29,5	3,4	215,0	5,0	1404,0	6,6
3,7	1,9	33,5	3,5	242,0	5,1	1575,0	6,7
4,3	2,0	38,1	3,6	273,0	5,2	1767,0	6,8
5,0	2,1	43,3	3,7	307,0	5,3	1981,0	6,9
5,7	2,2	49,2	3,8	346,0	5,4	2221,0	7,0
6,6	2,3	55,8	3,9	389,0	5,5	2490,0	7,1
7,7	2,4	63,2	4,0	438,0	5,6	2791,0	7,2
8,8	2,5	71,6	4,1	493,0	5,7	3127,0	7,3
10,1	2,6	81,1	4,2	554,0	5,8	3503,0	7,4
11,6	2,7	91,7	4,3	623,0	5,9	3924,0	7,5
13,3	2,8	104,0	4,4	700,0	6,0	4395,0	7,6

Tab. 3.6: Tabelle zur Bestimmung des r_0/m -Wertes (Lea & Coulson 1949)

Bei r_0 -Werten zwischen zwei in der Tabelle 3.6. angegebenen Werten wird der r_0/m -Wert interpoliert. Der Quotient aus dem Median und r_0/m -Wert wird Mean genannt. Der Mean dividiert durch den Mittelwert der errechneten Zellzahlen/ml ergibt die Mutationsrate pro Zellteilung. Bei hohen Revertanten-Anzahlen wird nicht die Zell- und Revertanten-Anzahl der Ausgangslösung bestimmt, sondern die der verwendeten Verdünnung, mit der ausplattiert wird. Beispielhaft soll an 4 Klonen die Berechnung demonstriert werden:

Zellzahl 1:100000				
	79	57	55	88
	88	72	62	72
	69	57	55	95
	77	84	51	69
	81	54	64	96
MW	79	65	57	84
*10 ⁶	8,E+07	6,E+07	6,E+07	8,E+07
Tab. 3.7. ausgezählte Zellzahlen, MW= Mittelwert				

Die Zellzahlen der 5 Platten werden aufaddiert und der Mittelwert gebildet. Es erfolgt die Bestimmung der Zellzahl in der Ausgangskultur durch Multiplikation mit 10^6 . Aus diesen Zahlen wird erneut der Mittelwert gebildet. Im Beispiel ergibt sich der **7×10^7** .

Revertantenzahl unverdünnt			
70	60	70	100
90	40	80	90
60	40	20	80
40	50	20	60
10	40	70	40
54	46	52	74
Tab. 3.8. Revertantenzahlen und deren Mittelwerte			

Für die Revertantenzahlen werden die Mittelwerte der 5 Platten gebildet und aus diesen Mittelwerten der Median bestimmt (Tab. 3.8.). Hier ist er 53, da bei einer geraden Anzahl der Median der Mittelwert der beiden mittleren Werte der Größenfolge ist. Aus der Tabelle zur von Lea und Coulson wird der r_0/m -Wert 3,89 abgelesen. Es wird der Quotient Median und r_0/m -Wert gebildet und der Mean durch die mittlere Zellzahl dividiert.

$$\frac{53}{3,89} = 13,62$$

$$\frac{13,62}{7 \times 10^7} = 1,95 \times 10^{-7}$$

$1,95 \times 10^{-7}$ ist die beispielhaft errechnete Mutationsrate.

3.11 *E.coli*-Methoden

3.11.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue wird in LB-Medium in aeroben Schüttelkulturen bei 37°C angezogen und zur Selektion von Plasmid-Transformanten dem Medium Ampicillin zugefügt.

3.11.1.1 Elektroporation

Ansatz:

- 40µl ddH₂O
- 2µl Plasmid-DNA
- 40µl elektrokompente *E. coli*-Zellen
- Die Elektroporation erfolgt in gekühlten geeigneten Küvetten bei 2,1kV; 200Ω; 25µF (Bio-Rad Gene Pulser und Bio-Rad Pulse Controller).
- 1ml LB-Medium (ohne Ampicillin) zugeben und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführen
- Inkubation bei 37°C für 30 min im Rad
- 15 sec bei 13.000U/min zentrifugieren; Überstand abnehmen
- In 100µl ddH₂O resuspendieren
- Ausplattieren auf Agarplatten plus Ampicillin
- Inkubation bei 37°C für max. 24 h

3.11.1.2 „Ein-Minuten-Transformation“

Ansatz:

7µl DMSO-kompetente Zellen auf Eis auftauen

1µl Plasmid (mind. 0,5ng/µl)

Inkubation für 1 min bei 42°C

100µl LB-Medium zugeben

Ausplattieren auf LB-Agarplatten plus Ampicillin

3.12 Zellkultur von Chondrozyten

3.12.1 Knorpelpräparation

Die Präparation von Knorpelmaterial aus Osteochondromen erwies sich als aufwendig, da es sich um sehr unregelmäßiges Gewebe handelte. Das Gewebe war oftmals sehr faserig und erforderte eine sorgfältige Präparation. Zur Isolierung des Knorpels musste über der Knorpelschicht die Knorpelhaut entfernt werden. Der Knorpel selbst ist ein elastisches hyalines Gewebe.

3.12.2 Anzucht

Der präparierte Knorpel wurde in Einmalpetrischalen unter der Sterilbank zerkleinert. Mit einem sterilen Skalpell wurde das Knorpelmaterial in eine Kulturflasche (25cm²) mit Collagenase 4 (0,4mg/ml) überführt und für 3 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das restliche Enzym entfernt und Medium auf die freigelegten Zellen gegeben. Das Minimalmedium wurde wie folgt angesetzt: 500ml DMEM; 18% FKS; 15ml L- Glutamin (200mg/ml) und 7,5ml Penicillin/Streptomycin (10.000U/10mg/ml). Alle zwei Tage wurde das Medium während der Wachstumsphase gegen frisches ausgetauscht.

3.12.3 „Passagieren“

Ist die Fläche der Kulturflasche zu 2/3 konfluent bewachsen, wurden die Zellen von der 25cm² Flasche auf vier 75cm² Flaschen umgesetzt.

Von der 25cm² Flasche wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS- Puffer für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Der Puffer wurde nach dieser Zeit wieder abgenommen und die Zellen mit 5ml Trypsin/EDTA (0,05%; 0,02% in PBS ohne Glutamin) überschichtet. Ca. 4ml der Lösung wurden sofort wieder entfernt; der Rest wird für 5 min. bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in 8ml Medium suspendiert und auf die vorbereiteten großen Flaschen verteilt und mit Medium auf 12ml Inhalt aufgefüllt. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37°C mit 95% Luftfeuchte und 5% CO₂-Begasung inkubiert.

3.12.4 Kryokonservierung der Zellen

Zur Konservierung der Zellkulturen wurde ein 75cm² Flasche, welche zu 2/3 bewachsen war, 30 Minuten mit PBS-Puffer inkubiert. Das Medium wurde vorher entfernt. Nach dem Abziehen des Puffers wurden 5ml Trypsin/EDTA zugeben, bis auf einen Milliliter wieder entfernt und 5 min. inkubiert. Hatten sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst, wurden sie in 2ml Einfriermedium aufgenommen und auf zwei Kryoröhrchen verteilt. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren und zur weiteren Konservierung in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.12.5 RNA- Extraktion aus Chondrozyten

Waren die Kulturflaschen zu 66% bewachsen, wurden die Zellen abgelöst, in einer Neubauerzählkammer gezählt und anschließend RNA aus diesen Zellen extrahiert. Die Isolation erfolgte mit dem „RNA-Extraktions-Kit“ nach Herstellervorschrift der Firma Macherey & Nagel.

3.12.6 RNA-Konzentrationsbestimmung

Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte mit dem ND1000 Spectrophotometer der Firma NanoDrop mit der entsprechenden Software. Aufgetragen wurde 1µl RNA.

3.13 Proteinanalysen

3.13.1 Herstellen von Protein-Rohextrakte aus Hefezellen (Western Blot-Analysen)

- 50ml Hefezellen werden bei einer OD₆₀₀ von 7 „geerntet“
- 5 min zentrifugieren bei 3.500rpm
- verwerfen des Überstandes
- Zellpellet in 25µl dest. H₂O resuspendieren
- 5 min zentrifugieren bei 3.500rpm
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 200µl Lysis-Puffer und 200µl Glasperlen
- Zellaufschluss für 1 h bei 4°C

- Abnahme des Überstandes in 2ml Reaktionsgefäße
- zentrifugieren bei 4°C für 10 min mit 6.000rpm
- Überstand in neues Reaktionsgefäß
- Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

3.13.2 Proteinmengenbestimmung (Bradford)

790µl Wasser werden mit 10µl Proteinrohextrakt und 200µl Bradford-Reagenz vermischt, 10 min bei RT inkubiert und die Absorption anschließend bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer (Beckmann DU 7400) gemessen. Die Proteinmenge im Rohextrakt wurde anschließend anhand einer BSA-Eichreihe mit definierten Proteinkonzentrationen (0 bis 10µg BSA in 2 µg-Schritten) aus den Absorptionswerten berechnet.

3.13.3 Proteinprobenpräparation für SDS-Polyacrylamidgele

Um Proteinproben der Größe nach im Polyacrylamidgel zu separieren, müssen diese denaturiert werden.

- 100µl Proteinrohextrakt
- 25µl Ladepuffer (4x konzentriert) (50mM Tris/HCl pH 6,9; 2% SDS; 0,1% Bromphenolblau; 5% Glycerin) zugeben
- 10µl DTT (1M) zusetzen
- 10 min bei 65°C inkubieren, dann auf Eis abkühlen

3.13.4 Auftrennung von Proteinen mittels SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse der Proteine wurden 10%ige Polyacrylamidgele verwendet. Die benötigten Glasplatten und Abstandhalter wurden sorgfältig mit Essigsäure, anschließend mit 70%igen Ethanol und zuletzt mit Wasser gereinigt und getrocknet.

Die Proteingele hatten eine Größe von 7cm x 9cm.

3.13.4.1 Herstellung des Trenngels:

Im Trenngel werden die Proteine aufgrund der unterschiedlichen Größe separiert.

- 13,3ml Acrylamidlösung (30:0,8) und 10ml 4x Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl pH8,8; 0,4% SDS) zusammenpipetieren und gut mischen
- 50µl TEMED und
- 200µl Ammoniumpersulfat (10%ige Stocklösung) zugeben
- Gelmasse zügig ohne Blasenbildung, bis 2cm unter den oberen Rand, zwischen die Glas- und die Aluminiumplatte gießen.
- mit Isopropanol überschichten
- nach dem Auspolymerisieren wird das Isopropanol abgenommen und die Geloberkante vorsichtig mit dest. Wasser gespült.

3.13.4.2 Herstellung eines Sammelgels

Ein Sammelgel wird für eine bessere und saubere Bandenbildung der Proteine eingesetzt. Die Proteine im Gel werden fokussiert bevor sie aufgetrennt werden.

- 1,5ml Acrylamidlösung (30:0,8)
- 2,5ml 4x Sammelgelpuffer (0,5M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS)
- 6ml dest. H₂O mischen
- 200µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung und
- 20µl TEMED hinzugeben
- Sammelgel auf das Trenngel ohne Blasen gießen
- Kamm ins Sammelgel stecken, damit sich Ladetaschen bilden können.
- nach dem Auspolymerisieren kann das Gel für die Elektrophorese verwendet werden
- Kamm ziehen, Ladetaschen mehrfach mit Puffer spülen.

3.13.4.3 SDS-Gelelektrophoresese

Das Gel in die Apparatur einspannen und beide Kammern mit Laufpuffer (0,05M Tris/HCl pH 8,3; 0,2M Glycin; 0,2% SDS) soweit füllen, dass das Gel Kontakt zum Laufpuffer hat. Max. 20µl Proteinprobe werden aufgetragen und eine Spannung von max. 100V bei etwa 20mA für ca. 1,5 h angelegt.

3.13.5 Färbung eines Proteingels mittels Coomassie-Blau

Das Proteingel wird mit der Färbelösung für mindestens 1 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Färbelösung wird vorsichtig abgenommen und entsorgt. Das Gel wird mit einer Entfärbelösung (45% Methanol, 10% Eisessig, 45% dest. Wasser) für 1–3 h unter leichtem Schwenken inkubiert.

3.13.6 Western Blot-Analyse

Dieses Verfahren beruht auf einem Transfer von Proteinen aus einem Acrylamidgel auf eine Nylonmembran. Die Proteine werden dadurch auf der Membran immobilisiert. Auf der Membran können die gebundenen Proteine mittels Antikörper nachgewiesen werden.

3.13.6.1 Aufbau der Blotapparatur

Sechs Stücke Filterpapier werden auf eine Größe von ca. 7 cm x 9 cm zugeschnitten. Sie werden in Transferpuffer (48mM Tris/HCl; 39mM Glycin; 0,037% (v/v) SDS; 20% Methanol) inkubiert. Ein Stück Nylonmembran (7 cm x 9 cm) wird in Methanol inkubiert und anschließend in dest. Wasser gespült. Auf die Graphitplatte der Blotapparatur werden 3 Blatt Filterpapier, ein Blatt Nylonmembran, das Acrylamidgel und 3 Blatt Filterpapier luftblasenfrei aufeinander gestapelt. Etwaige Luftblasen können mit einer sterilen Glaspipette durch Auswalzen vorsichtig entfernt werden.

Die zweite Graphitplatte wird auf den Stapel gelegt und über Kontakte an eine Stromquelle angeschlossen. Ein Gewicht von etwa 1 kg wird auf die Apparatur platziert um den Transfer zu begünstigen. Der Transfer auf die Membran findet bei 300mA für 1,25 h statt.

3.13.6.2 Abbau der Blotapparatur

Nach dem Abschalten des Stroms wird die Apparatur abgebaut.

Die Nylonmembran wurde mittels einer sterilen Pinzette in ein sauberes Gefäß transferiert und in Blockierlösung (3% Milchpulver; 0,05% Tween 20 in 1xPBS) für 1 h inkubiert.

3.13.7 Antikörperreaktion auf der Nylonmembran

- Zur Detektion der MLH1-Proteine wird ein hMLH1-spezifischer Antikörper in der Verdünnung 1:500 eingesetzt.
- Die Membran wird mit 5ml spezifischen Primärantikörper inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers geschieht mit Blockierlösung.
- Inkubation der Membran unter leichtem Schwenken über Nacht bei 4°C.
- Abziehen der Antikörperlösung und 3x Waschen mit PBS für jeweils 10 min.
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (hier anti-Mouse). Dieser liegt in Lösung mit alkalischer Phosphatase gekoppelt vor und wird in einer Verdünnung von 1: 7.500 in Blockierpuffer angewendet.
- Membran 3x für 10 min in PBS waschen.

3.13.8 Farbentwicklung von Western Blots mittels alkalischer Phosphatase

- Inkubation der Membran für 5 min in Detektionspuffer (0,1M Tris/HCl; 0,1M NaCl; 50mM MgCl₂; pH 9,5)
- Einlegen der Membran in:
- 20ml Farbsubstrat-Lösung (Detektionspuffer + 33µl BCIP-Lösung (0,5g BCIP in 10ml DMF) und 66µl NBT-Lösung (0,5g NBT in 10ml 70%igem DMF))
- inkubieren für mind. 5 min bis 45 min
- Abstoppen der Reaktion durch mehrfaches Waschen mit Wasser.

3.14 Hefe Zwei-Hybrid-Analyse mit hMLH1 und hPMS2

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine *in vivo*-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Die zu untersuchenden Proteine werden dazu an eine Aktivator-Domäne bzw. die DNA-Binde-Domäne eines Transkriptionsfaktors z. B. *GAL4* fusioniert. Diese beiden Domänen behalten ihre Funktion bei, wenn sie in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Findet eine Interaktion der beiden zu testenden Proteine statt, kommen die Aktivator- und die Binde-Domäne zusammen und die Aktivator-domäne löst die Expression eines Reportergens aus. In dieser Arbeit wird das LexA-Zwei-Hybrid-System verwendet (Gyuris et al., 1993). Im Ausgangsvektor

pBTMd-hMLH1 (#1193) ist hMLH1 an die *lexA*-Bindedomäne fusioniert, der Vektor pVPd-hPMS2 (#1198) trägt hPMS2 fusioniert an die VP16-Transaktivatorodomäne. Als Reportergen dient *LacZ*, welches in das Genom des Hefestamms L40 integriert ist und für β -Galaktosidase codiert. Als Positivkontrolle werden beide Plasmide in den Hefestamm L40 transformiert, des weiteren werden die verschiedenen Plasmide mit definierten Punktmutationen im hMLH1-Gen zusammen mit pVPd-hPMS2 ebenfalls in den Hefestamm L40 transformiert.

3.14.1 Qualitativer Hefe Zwei Hybrid-Assay (X-Gal-Overlay)

Zur Darstellung der Interaktion von hMLH1 bzw. mutagenisierten Varianten von hMLH1 mit hPMS2 wird ein X-Gal-Overlay durchgeführt. X-Gal ist die Kurzform für 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-Galaktopyranosid, welches ein spezifisches Substrat für die β -Galactosidase darstellt. Das Enzym β -Galaktosidase hydrolysiert X-Gal zu 5-Brom-4-Chlor-indoxyl und Galaktose. 5-Brom-4-Chlor-indoxyl oxidiert im Kontakt mit Luft zu einem tiefblauen Farbstoff 5,5'-dibrom-4,4'-dichlor-indigo. Interagieren hMLH1 und hPMS2 wird das Gen angeschaltet und die β -Galaktosidase exprimiert. Es kommt zu Spaltung des Indikatorfarbstoffes und somit zur Blaufärbung, wenn die beiden humanen Interaktionspartner interagieren.

Ansatz: (für 2 Platten)

- o 100mg Agarose in 10ml H₂O aufkochen bis die Agarose gelöst ist
- o 10ml Natriumphosphatpuffer (1M) pH 7,0 zugeben
- o auf 70°C erwärmen
- o 400 μ l SDS 10% zugeben
- o 400 μ l X-Gal-Lösung zugeben
- o Platte vorsichtig mit 10ml dieser Lösung überschichten
- o Inkubation bei 30°C für 24 h

3.14.2 Herstellung von Protein-Rohextrakten für quantitative β -Gal-Aktivitätsmessungen

Für die quantitative Bestimmung der *lacZ*-Aktivität wurden Proteinextrakte von 50 ml Hefekulturen präpariert. Die OD₆₀₀ der angesetzten Kulturen wurden optimal engegli-

chen. Geerntet wurde bei einer OD_{600} von ca. 4. Danach wurde nach folgender Methode vorgegangen:

- Zellen 5 min abzentrifugieren bei 4°C und 3000U/min
- Resuspendieren in 10ml lacZ-Puffer
- 5 min zentrifugieren bei 4°C; 3000U/min, Überstand verwerfen
- Pellet in 300µl lacZ-Puffer resuspendieren
- Zugaben von 500µl Glasperlen
- Zellaufschluß für 30 min bei 4°C im Vibrax
- 200µl Suspension in 1,5ml Reaktionsgefäß überführen
- 10min zentrifugieren bei 13.000U/min
- Überstand in neues Reaktionsgefäß geben

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Jede Probe wird auf eine Konzentration von 100µg in 200µl lacZ-Puffer eingestellt.

3.14.3 Messung der Reaktion der β -Galaktosidase mit ONPG

Zur Quantifizierung der Interaktion von hMLH1 und hPMS2 wird eine sogenannte „LacZ-Flüssigmessung“ herangezogen. Vor einer Messung wurde eine Kotransformation der mutagenisierten Plasmide mit dem Interaktionspartner pVPd-hPMS2 (#1198) in den Hefestamm L40 vorgenommen und auf Selektivmedium SD-Trp, -Leu-Platten ausplattiert. Nach drei Tagen Inkubation werden acht Klone auf SD-Trp, -Leu-Platten vereinzelt und erneut einen Tag bei 30°C inkubiert. Davon werden je 4 unabhängigen Klone in je einer 5ml Übernachtskultur angesetzt und Proteinrohextrakte hergestellt. (siehe nächster Abschnitt). Vor der quantitativen Bestimmung der Substratumsetzung der β -Galaktosidase wird eine Proteinmengenbestimmung nach Bradford (BioRad) vorgenommen, so dass definiert 80µg Protein eingesetzt werden kann.

- Küvetten und ONPG auf 30°C vorwärmen
- 800µl ONPG plus 200µl Proteinextrakt (80µg) in lacZ-Puffer
- Nach 3 min Reaktion mit 500µl Natriumcarbonatpuffer stoppen
- Messen der OD bei 420 nm
- Blank: 800 µl ONPG + 200 µl lacZ-Puffer + 500 µl Natriumcarbonatpuffer

Auswertung erfolgte über die Formel:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{\Delta A_{420\text{nm}} \times 1000 \mu\text{g}}{\epsilon \times d \times (C \times \mu\text{l eingesetzt})}$$

$\Delta A_{420\text{nm}}$:	Extinktionsänderung im Verlauf von 3 Minuten bei 420nm
ϵ :	Extinktionskoeffizient für ONPG (0,0045/mM · cm)
d :	Schichtdicke (1cm)
C :	Proteinkonzentration der Probe in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Für jede hMLH1-Variante wird aus allen berechneten Aktivitäten der Mittelwert gebildet, um die finale Enzymaktivität zu erhalten.

3.14.4 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung ist eine Färbemethode, welche die Sichtbarmachung von Antigenen mit Hilfe von spezifischen Primär- und Sekundär-Antikörpern ermöglicht. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Zur Markierung von humanen Chondrozyten mit fluorogenen Markern, werden diese zuvor auf Deckgläschen von 1,2cm \varnothing angezüchtet. Verwendet werden eine Kontrollzelllinie aus Knorpel ohne Exostosen und 2 Tumorzelllinien. Die Zellen werden für ca. 2 Tage nach dem Überimpfen auf die Deckgläschen wie folgt weiterverarbeitet:

- Fixierung der Zellen für 1 h in 500 μl Methanol
- 3x waschen in 1xPBS
- 20 μl 1. Antikörper (EXT1 1:10; ER-Marker 1:200) für 1h bei 37°C
- 3x waschen mit 1xPBS für 10 min
- 20 μl 2. Antikörper (anti mouse-Fitc (grün) 1:20; anti rabbit-Cy3 (rot) 1:200) 1h bei 37°C; 3x waschen mit 1xPBS
- 3 min Dapifärbung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 1x waschen in 1xPBS
- Deckgläschen trocknen; eindeckeln mit anti-fade
- umranden des Deckgläschens mit Nagellack

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Analysen des MMR-Reparaturproteins hMLH1

In dieser Arbeit sollten Missense-Mutationen im *MLH1*-Gen charakterisiert werden, die in HNPCC-Patienten neu identifiziert worden waren. In einer Übersichtsliste sind alle Missense-Mutationen, die in Patienten des deutschen HNPCC-Konsortiums gefunden wurden und solchen, die in der Literatur beschrieben sind, zusammengefasst worden (siehe Anhang II). Aus der Liste wurden 17 Punktmutationen des Fehlpaarungsreparatur-Proteins hMLH1 sowohl aus der ATPase-Domäne als auch aus der Interaktionsdomäne ausgewählt, um sie funktionell zu untersuchen. Auswahlkriterien waren, 1. dass sie im Deutschen Konsortium erstmalig registriert waren und 2. für diese Mutationen keine Analysen vorlagen.



Abb. 4.1: Lage der in dieser Arbeit analysierten Substitutionen im hMLH1-Protein. Die *MLH1*-Allele P28L und M35R wurden als nicht funktionelle Kontrollen verwendet (Kondo et al. 2003).

4.1.1 Herstellung der hMLH1-Varianten im Hefe-Zwei-Hybrid-Vektor

Die *MLH1*-Varianten wurden im Plasmid pBTMd-*MLH1* erzeugt. Dieser Vektor wurde zusammen mit dem hPMS2-kodierenden Plasmid von der Arbeitsgruppe Kondo zur Verfügung gestellt (Vektorkarten im Abschnitt 2.11.) (Kondo et al. 2003).

Die Missense-Mutationen im Wildtyp-*MLH1*-Gen wurden mittels zweier mutagenisierender PCRs erzeugt (Abb. 4.2.) (siehe Abschnitt 3.2.4.).

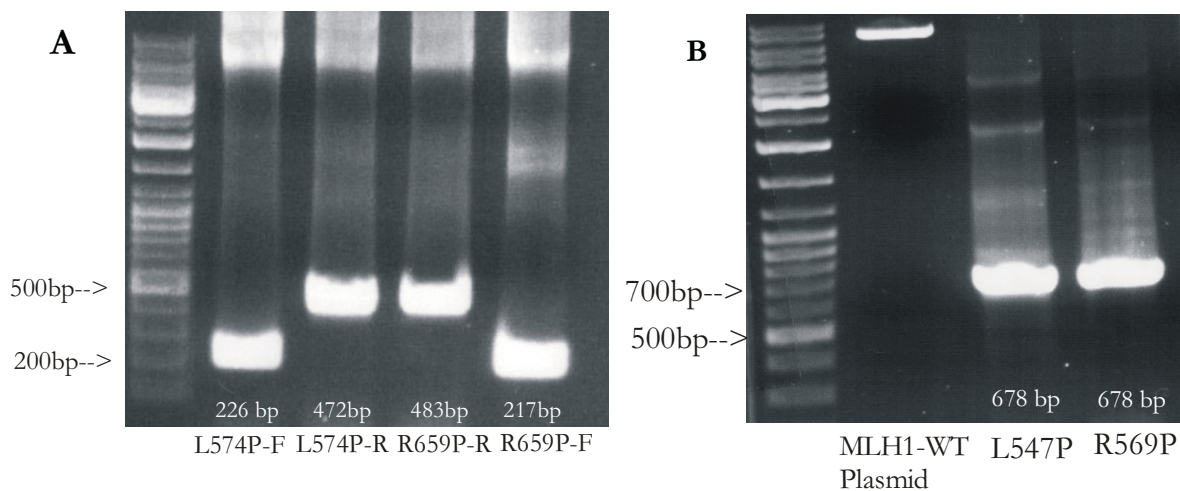


Abb.4.2: Geldokumentation der mutagenisierenden PCRs der Allele L574P und R659P. Die flankierenden Primer sind 1505F und 2183R. A= erste mutagenisierende PCR mit mutagenisierenden Primern L574P-F und R659P-F. F = Forward-Primer; L574P-R und R659P-R. R = Reverse-Primer. B = zweite mutagenisierende PCR der Allele L574P und R659P mit den flankierenden Primern. Nähere Erläuterungen siehe Abschnitt 3.2.4..

Um das MLH1-Fragment in den Vektor zu integrieren wurden das mutagenisierte Fragment und der linearisierte Vektor in den Hefestamm CEN.PK2-1c transformiert. Die Integration erfolgte über homologe Rekombination in der Hefe. Nach Plasmid-Extraktion aus der Hefe folgte eine Transformation in *E. coli* mit anschließender erneuter Plasmidextraktion. Zur Überprüfung, ob das Fragment ins Plasmid integriert wurde, erfolgte eine Spaltung der Vektor-DNA mit der Restriktionsendonuklease *PvuII*. Es entstanden zwei DNA-Fragmente (3364bp und 6822bp), die über Gelelektrophorese aufgetrennt wurden (Abb. 4.3.).

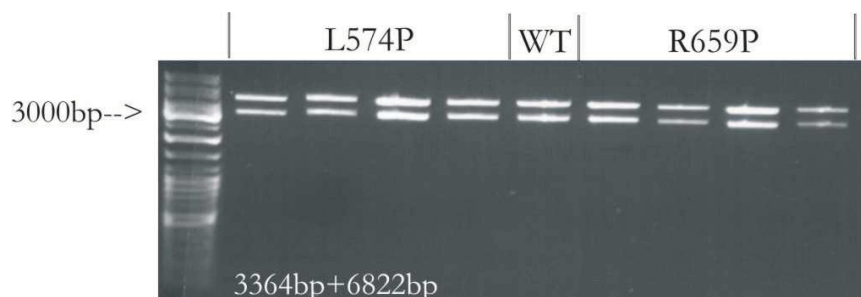


Abb. 4.3: Doppelt geschnittenes Plasmid pBTMd-*MLH1* oder pBTMd-*MLH1*-Varianten (L574P und R659P); 3364bp und 6822bp= Fragmentgrößen des geschnittenen Plasmids

Da die Spaltung mit Restriktionsenzymen nur die korrekte Insertion des DNA-Fragments in das Plasmid anzeigt, wurde die Plasmid-DNA der putativen *hMLH1*-

Variante mit Wildtyp-*MLH1*-DNA gemischt und über DHPLC-Analyse analysiert, um mutagenisierte von nicht mutagenisierten Klonen zu unterscheiden (Abb.4.4).

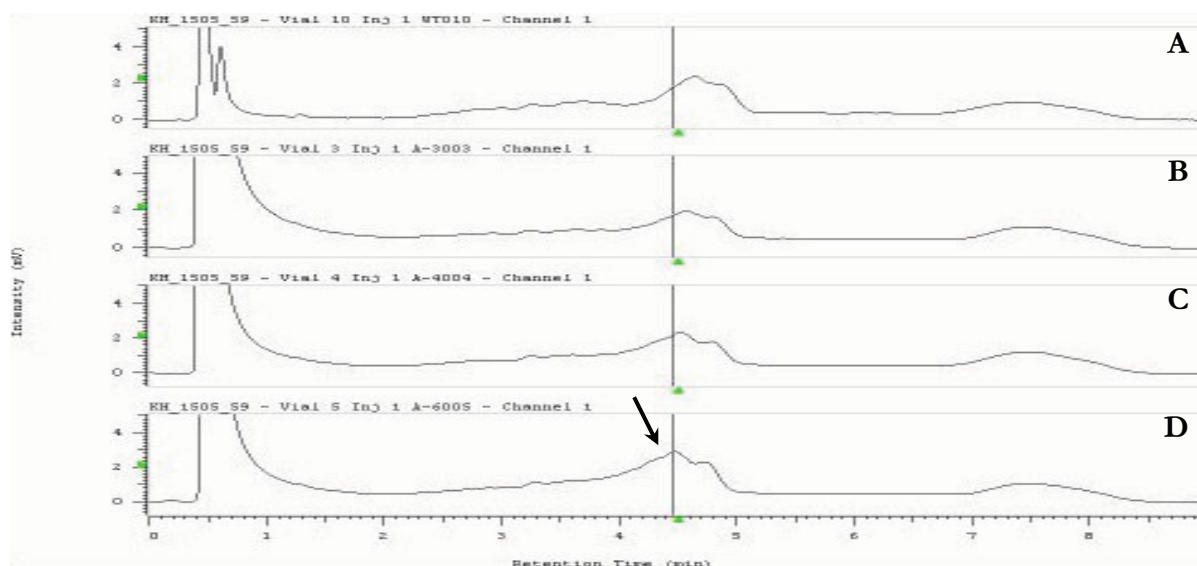


Abb. 4.4: Chromatogramm der DHPLC-Analyse von 3 Plasmidklonen der *hMLH1*-Variante N551S (B-D) im Vergleich zu Wildtyp (A). Der Klon D ist auffällig durch die Verschiebung des Peaks nach links (im Vergleich zu Wildtyp, siehe Pfeil). Durch die Heteroduplexbildung wird die Schmelztemperatur herabgesetzt (siehe Abschnitt 3.10.)

Diejenigen Plasmidklone, die sich der DHPLC-Analyse von der Wildtyp-Probe unterscheiden, wurden durch Sequenzierung verifiziert (Abb. 4.5.).

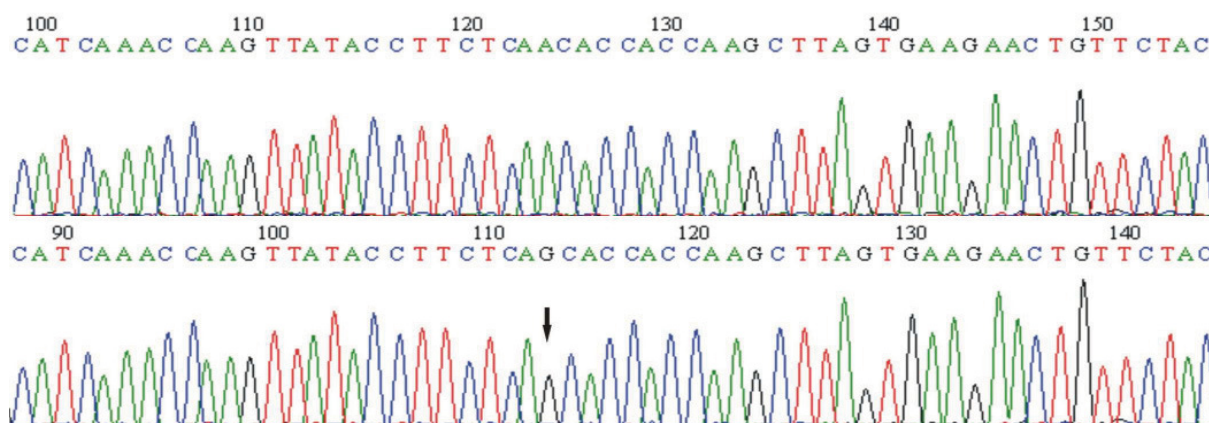


Abb. 4.5: Sequenzierung von pBTMd-*MLH1* und Variante (Basenaustausch von A>G im Kodon 551)

Nach diesem Schema wurden die folgenden 17 *hMLH1*-Varianten erzeugt (Tab. 4.1.).

Plasmid	Konstrukt	interne ID*
p <i>MHL1</i> -A21E	Austausch von c.62C>A	#1274
p <i>MLH1</i> -P28L	Austausch von c.83C>T	#1376
p <i>MLH1</i> -M35R	Austausch von c.104T>G	#1421

p <i>MLH1</i> -Q48P	Austausch von c.143A>C	#1377
p <i>MLH1</i> -N64S	Austausch von c.191A>G	#1275
p <i>MLH1</i> -F80V	Austausch Von c.238T>G	#1378
p <i>MLH1</i> -K84E	Austausch von c.250A>G	#1379
p <i>MLH1</i> -G101V	Austausch von c.302G>T	#1276
p <i>MLH1</i> -N551S	Austausch der c.1652A>G	#1416
p <i>MLH1</i> -Q562P	Austausch von c.1685A>C	#1417
p <i>MLH1</i> -A586P	Austausch von c.1756G>C	#1422
p <i>MLH1</i> -P603R	Austausch von c.1808C>G	#1418
p <i>MLH1</i> -K618R	Austausch von c.1853A>G	#1419
p <i>MLH1</i> -P640L	Austausch von c.1919C>T	#1375
p <i>MLH1</i> -P640S	Austausch von c.1918C>T	#1423
p <i>MLH1</i> -A681T	Austausch von c.2041G>A	#1272
p <i>MLH1</i> -Q689R	Austausch von c.2066A>G	#1420
Tab. 4.1: generierte Plasmide, die eine spezifische Missense-Mutationen im h <i>MLH1</i> -Gen tragen. * = Interne Sammlung der Arbeitsgruppe Hegemann. c=cDNA als Referenzsequenz		

4.1.2 Funktionelle Analysen von Allelen des humanen MMR-Proteins MLH1

Im DNA-Reparatursystem besitzt das Protein hMLH1 eine zentrale Rolle. Der Protein-Komplex MutL α aus hMLH1 und hPMS2 bindet an den an der DNA-Fehlpaarung gebundenen Komplex MutS α . MutL α vermittelt die Bindung weiterer Proteine, die für die Fehlpaarungs-Reparatur von Bedeutung sind. Mit Hilfe einer Hefe Zwei Hybrid-Analyse sollte die essentielle Interaktion von humanem hMLH1 mit seinem Komplexpartner hPMS2 sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht werden. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die hMLH1-Varianten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, wie das wildtypische hMLH1 einen dominant negativen Mutatorphänotyp in Hefe auszulösen. Mit Hilfe des *LYS2*_{A14}-Testsystem wurden die Mutationsraten quantitativ bestimmt und so der Grad der Störung des Hefe-Fehlpaarungsreparatur-Systems ermittelt.

4.1.2.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen von hMLH1 und hPMS2

Insgesamt gingen 17 verschiedene Missense-Mutationen innerhalb der Interaktionsdomäne und der ATPase-Domäne von hMLH1 in die qualitative Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung ein. Nach Kotransformation des hPMS2-exprimierenden Plasmids und des jeweiligen hMLH1-Plasmids wurden jeweils 6 unabhängige Transformanten mit Hilfe des X-Gal-Overlay-Assay auf Interaktion analysiert (siehe Abschnitt 3.14.1.).

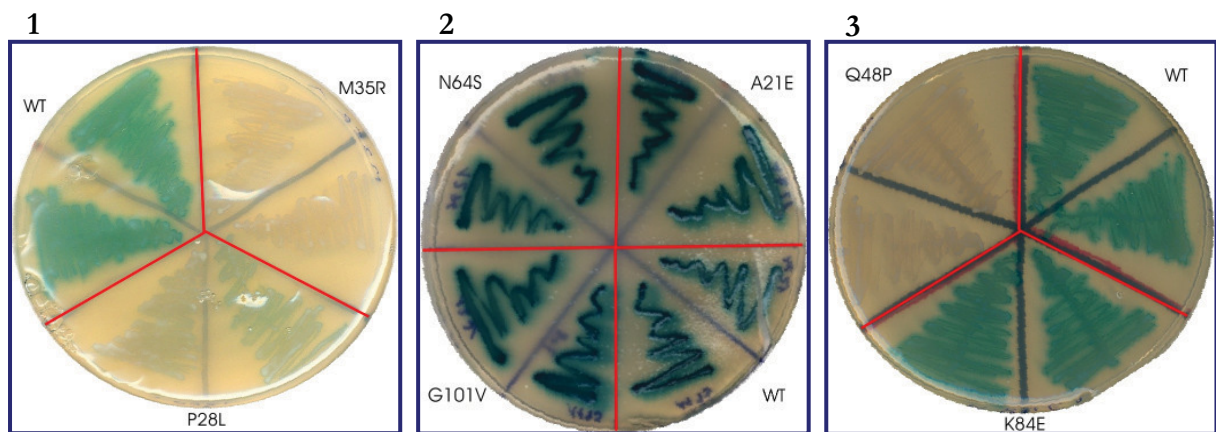


Abb. 4.6: X-Gal-Overlay-Assay der Interaktion von hMLH1 und hPMS2.

Auf jeder Platte ist je eine Wildtyp-Kontrolle (WT) vertreten. Platte 1: Die hMLH1-Varianten P28L und M35R; Platte 2: die hMLH1-Varianten A21E, N64S und G101V; Platte 3: die hMLH1-Varianten Q48P und K84E

Die hMLH1-Allele M35R und Q48P zeigten keine Interaktion, das Allel P28L dagegen eine schwache und die Allele A21E, N64S, K84E und G101V wiesen wildtypische Interaktion auf (Abb. 4.6. 1-3).

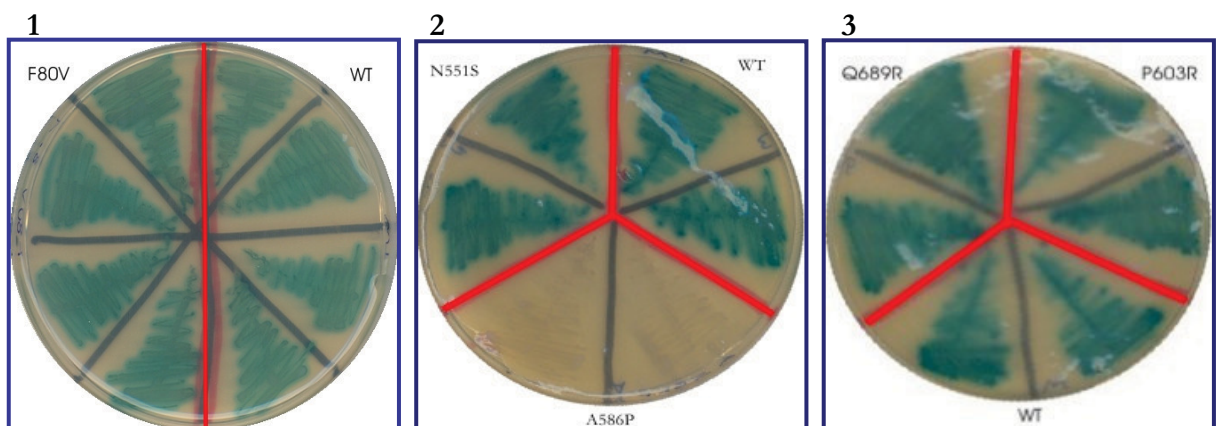


Abb. 4.7: X-Gal-Overlay-Assay der Interaktion von hMLH1 und hPMS2. Auf jeder Platte ist je eine Wildtyp-Kontrolle (WT) vertreten. Platte 1: die hMLH1-Varianten F80V; Platte 2: die hMLH1-Varianten N551S und A586P; Platte 3: die hMLH1-Varianten P603R und Q689R.

Die hMLH1-Varianten F80V, N551S, P603R und Q689R zeigten Interaktion wie Wildtyp, einzig das Allel A586P wies keine Interaktion auf (Abb. 4.7. 1-3).

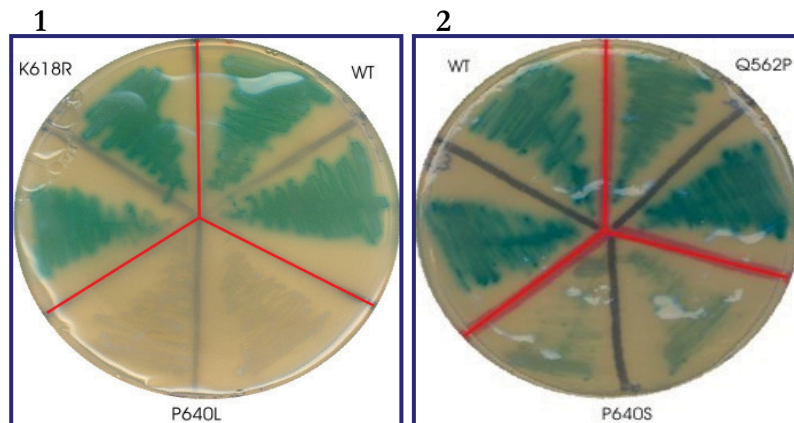


Abb. 4.8 X-Gal-Overlay-Assay der Interaktion von hMLH1 und hPMS2: WT= Wildtyp; auf Platte 1: die hMLH1-Allele P640L und K618R; auf Platte 2: Q562P und P640S

Die hMLH1-Varianten Q562P und K618R wiesen Interaktion wie Wildtyp auf, die Variante P640L zeigte keine und die hMLH1-Variante P640S eine schwache Interaktion (Abb. 4.8. 1+2). Die Tabelle 4.2. zeigt die Ergebnisse noch einmal im Überblick.

hMLH1-Variante + hPMS2	Stärke der Interaktion
Wildtyp	+++
lexA-hPMS2	-
N551S	+++
Q562P	+++
A586P	-
P603R	+++
K618R	+++
P640L	-
P640S	+
Q689R	+++
A21E	+++
P28L	+
M35R	-
Q48P	-
N64S	+++
F80V	+++
K84E	+++
G101V	+++

Tab. 4.2: Ergebnisse der qualitativen Zwei-Hybrid-Analyse. +++= Interaktion wie Wildtyp; += stark reduzierte Interaktion; -= kein Interaktion

4.1.2.2 Quantitative Bestimmung der Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktion von hMLH1 mit hPMS2

Für die quantitative Bestimmung der Interaktion wurden die 8 Allele der ATPase-Domäne untersucht. In die Analysen gingen jeweils 4 unabhängige Klone der Kotransformation von hMLH1/hPMS2 zur quantitativen Bestimmung der Interaktion der Proteine hMLH1 und hPMS2 ein. Als Positivkontrolle diente wildtypisches hMLH1 mit hPMS2, während hMLH1 alleine und *lexA* zusammen mit hPMS2, als Negativkontrollen fungierten. Die wildtypische Interaktion zeigte eine durchschnittliche Enzymaktivität von 37 mU/mg. Die Negativkontrollen *lexA*/hPMS2 und hMLH1/- wiesen hingegen eine durchschnittliche Enzymaktivität von 2mU/mg bzw. 1 mU/mg auf (Abb. 4.9).

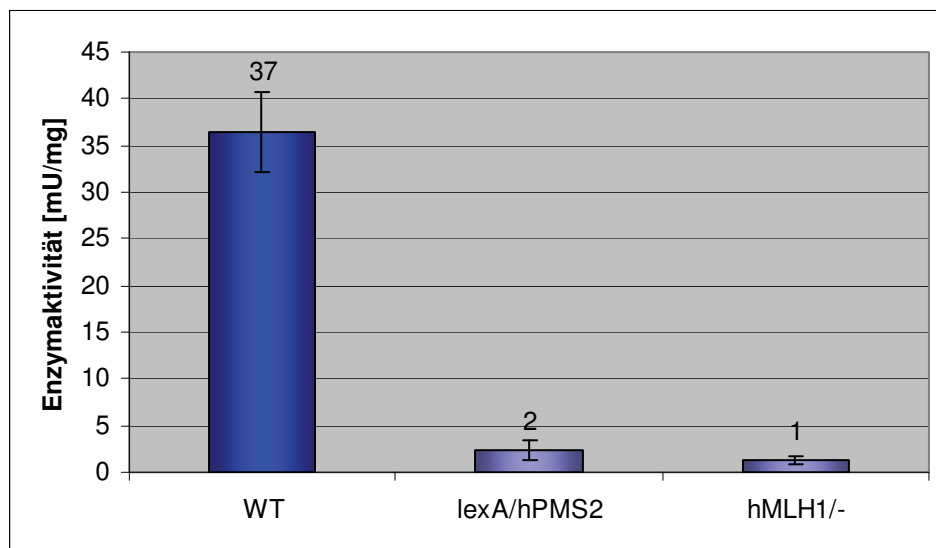


Abb.4. 9: Enzymaktivität der β -Galaktosidase; WT= Wildtyp-hMLH1/hPMS2; Standardabweichung (Stabw)= ± 4 ; *lexA*= Kotransformation von *lexA*/hPMS2 Stabw= ± 1 ; hMLH1/-= alleinige Transformation von hMLH1; Stabw= ± 0 ; Der Wert über dem Balken entspricht dem Mittelwert.

Die Analyse der 8 hMLH1-Allele der ATPase-Domäne wies eine große Variabilität in der Interaktion mit hPMS2 auf. 3 der 8 Allele zeigten keine Interaktion, dies sind P28L mit 3 mU/mg, M35R und Q48P mit je 1 mU/mg Enzymaktivität. Die genannten Varianten zeigen eine Reduzierung der Aktivitäten um den Faktor 13 bis 37 gegenüber der Wildtyp-Enzymaktivität. Als intermediär wurden hMLH1-Varianten mit einer Enzymaktivität um den Faktor 8 schlechter als Wildtyp eingestuft; dies betraf das Allel G101V mit 5 mU/mg. Wildtyp-ähnliche Allele waren solche, die maximal um den Faktor 2

gegenüber Wildtyp reduziert waren. Hierzu zählten die hMLH1-Varianten K84E mit 36 mU/mg, N64S mit 19 mU/mg und A21E mit 26 mU/mg Enzymaktivität. Sie waren reduziert um einen Faktor zwischen 1 bis 1,9. Es wurde ein Allel gefunden, das eine deutlich größere Enzymaktivität als Wildtyp selbst aufwies. Das Allel F80V ist um den Faktor 2,8 erhöht und zeigte 102 mU/mg Enzymaktivität (Abb. 4.19.).

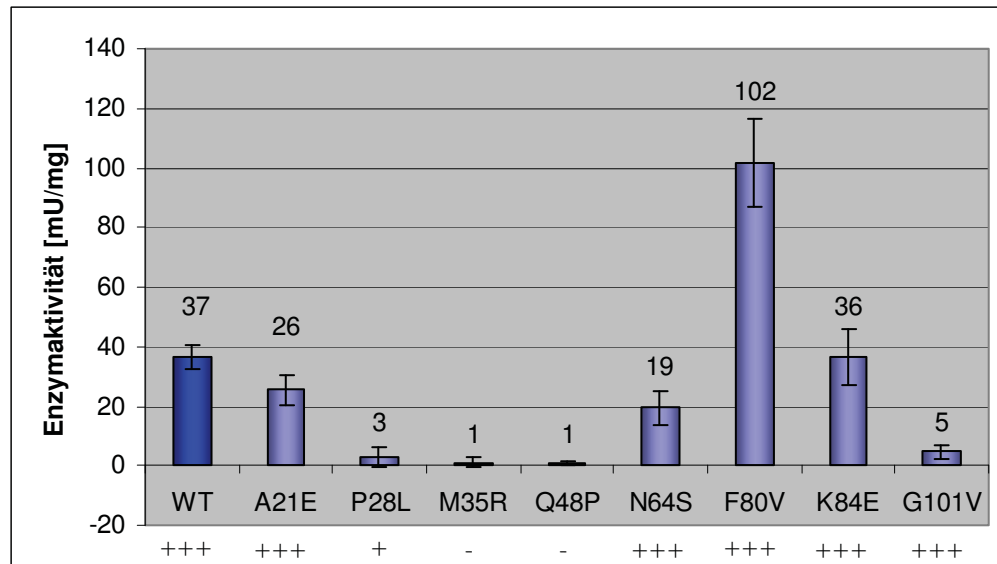


Abb. 4.10: Ergebnisse der 8 untersuchten hMLH1-Varianten der ATPase-Domäne mit der jeweiligen Standardabweichung. WT= ± 4 , A21E= ± 5 , P28L= ± 3 , M35R= ± 1 , Q48P= ± 1 , N64S= ± 6 , F80V= ± 15 , K84E= ± 9 , G101V= ± 2 . Der Wert über dem Balken entspricht dem Mittelwert. Unter der Allelbezeichnung sind die Ergebnisse der qualitativen Analyse notiert. +++= Wildtypisch; += reduzierte Interaktion; -= keine Interaktion

Insgesamt wurden 3 nicht funktionelle, ein intermediäres und 3 wildtyp-ähnliche Allele sowie ein Allel mit größerer Enzymaktivität identifiziert.

4.1.3 Analysen zum dominant negativen Mutatorphänotyp

Die Überexpression einiger Gene des MMR-Systems kann zu einer Genominstabilität führen und einen deutlichen Mutatoreffekt auslösen. Das humane MLH1-Protein kann einen solchen Effekt in der Hefe auslösen (Shimodaira et al. 1998).

Die *lexA-hMLH1* Expressionsvektoren, die zur Bestimmung der Interaktion mit hPMS2 verwendet wurden, sollten auch für die Analysen zum dominant negativen Mutatorphänotyp eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der *hMLH1*-Expressionsvektor einen Mutatoreffekt im Wildtyp Hefestamm E134 auslösen kann (Diplomarbeit Heick 2008). Zur Bestimmung der Mutationsraten wurden je *hMLH1*-Variante 16 unabhängige Klone getestet und mittels der Lea & Coulson-Kalkulation

berechnet (Lea & Coulson 1949). Die Stabilität des Poly A-Stranges im *LYS2*-Gen, d.h. der Verlust eines A•T-Basenpaares und damit einhergehend die Wiederherstellung des *LYS2*-Leserasters, lag im Wildtyp-Hefestamm E134 bei $3,9 \times 10^{-7}$. Wildtyp-Hefezellen mit der Expression von wildtypischem hMLH1 dagegen zeigten eine Mutationsrate von $6,4 \times 10^{-4}$.

hMLH1-Varianten, die keinen Mutatoreffekt in der Hefe auslösen konnten, wurden als nicht funktionell eingestuft. 2 der 8 untersuchten Allele aus der ATPase-Domäne lösten keine Erhöhung der Mutationsrate aus, dies betraf die beiden Aminosäure-Austausche M35R und Q48P (Faktor 1). Die 6 restlichen Allele lösten keine so starke Erhöhung der Mutationsrate wie Wildtyp aus, sondern es wurde lediglich eine schwache Erhöhung mit erheblichen Schwankungen für die einzelnen Allele beobachtet. P28L zeigte eine Erhöhung um den Faktor 62 gegenüber Hefewildtyp. Die hMLH1-Varianten F80V und N64S ließ eine Erhöhung um den Faktor 103 und 162 im Vergleich zur LexA-Kontrolle erkennen. Die stärksten Erhöhungen zeigten die Allele A21E (Faktor 308), G101V (Faktor 513) und K84E (Faktor 585). Die Ergebnisse der Mutationsratenbestimmung sind in Tabelle 4.3. zusammengefasst.

hMLH1-Allel	Mutationsrate	Faktor vgl. mit Leervektor
	A	B
WT-hMLH1	6,4E-04	1618
leerer Vektor	3,9E-07	1
A21E	1,2E-04	308
P28L	2,4E-05	62
M35R	4,5E-07	1
Q48P	5,0E-07	1
N64S	6,5E-05	185
F80V	4,0E-05	103
K84E	2,3E-04	585
G101V	2,0E-04	513

Tab. 4.3: Ergebnisse der Mutationsratenbestimmung von hMLH1-lexA-Varianten im dominant negativen Mutatorphänotyp-Assay; A= Mutationrate nach Expression der entsprechenden hMLH1-Allele; B= Erhöhung gegenüber der LexA-Leerkontrolle

4.1.4 Expressionanalyse von hMLH1-Varianten

Missense-Mutationen im *hMLH1*-Gen können einen deutlichen Einfluss auf die Expressionshöhe haben. Dies hat möglicherweise Auswirkungen auf die Ergebnisse funktioneller Studien (Shimodaira et al. 1998). Des Weiteren kann die Koexpression zweier mit einander interagierender Proteine zu einer Stabilisierung der beteiligten Proteine führen (Raevaara et al. 2005). Daher wurde die Expression der hMLH1-Allele aus der ATPase-Domäne in dem Zwei-Hybrid-Hefestamm L40 in Koexpression mit hPMS2 untersucht. Außerdem wurde die Proteinmenge von hMLH1-Varianten ohne die Expression von hPMS2 im Wildtyp-Hefestamm E134 analysiert. Die Ergebnisse der beiden Analysen wurden mit einander verglichen, um Aufschluss über die Proteinstabilität der hMLH1-Varianten in Anwesenheit oder Abwesenheit von dem Interaktionspartner hPMS2 zu erhalten. Da sich der Nachweis von hMLH1 als schwierig erwies, wurden von jedem Hefestamm Proteinextrakte aus 50 ml Kulturen gewonnen, die Proteinmengen über Proteinbestimmung und Coomassie-gefärbte Proteingele angeglichen, bevor die Western Blot-Analysen durchgeführt wurden. Wildtypisches hMLH1 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 85 kDa, dies entspricht der hier detektierten Bande (Abb. 4.11., 4.12.). In Fusion mit *lexA* ergibt sich eine Größe von ungefähr 108 kDa. Auch diese Bande kann detektiert werden (mit einem roten Pfeil markiert in Abb. 4.11, 4.12.). Unterhalb der Bande des Fusionsproteins zeigt sich eine zweite unspezifische Bande, die auch in den Kontrolle zu sehen ist.

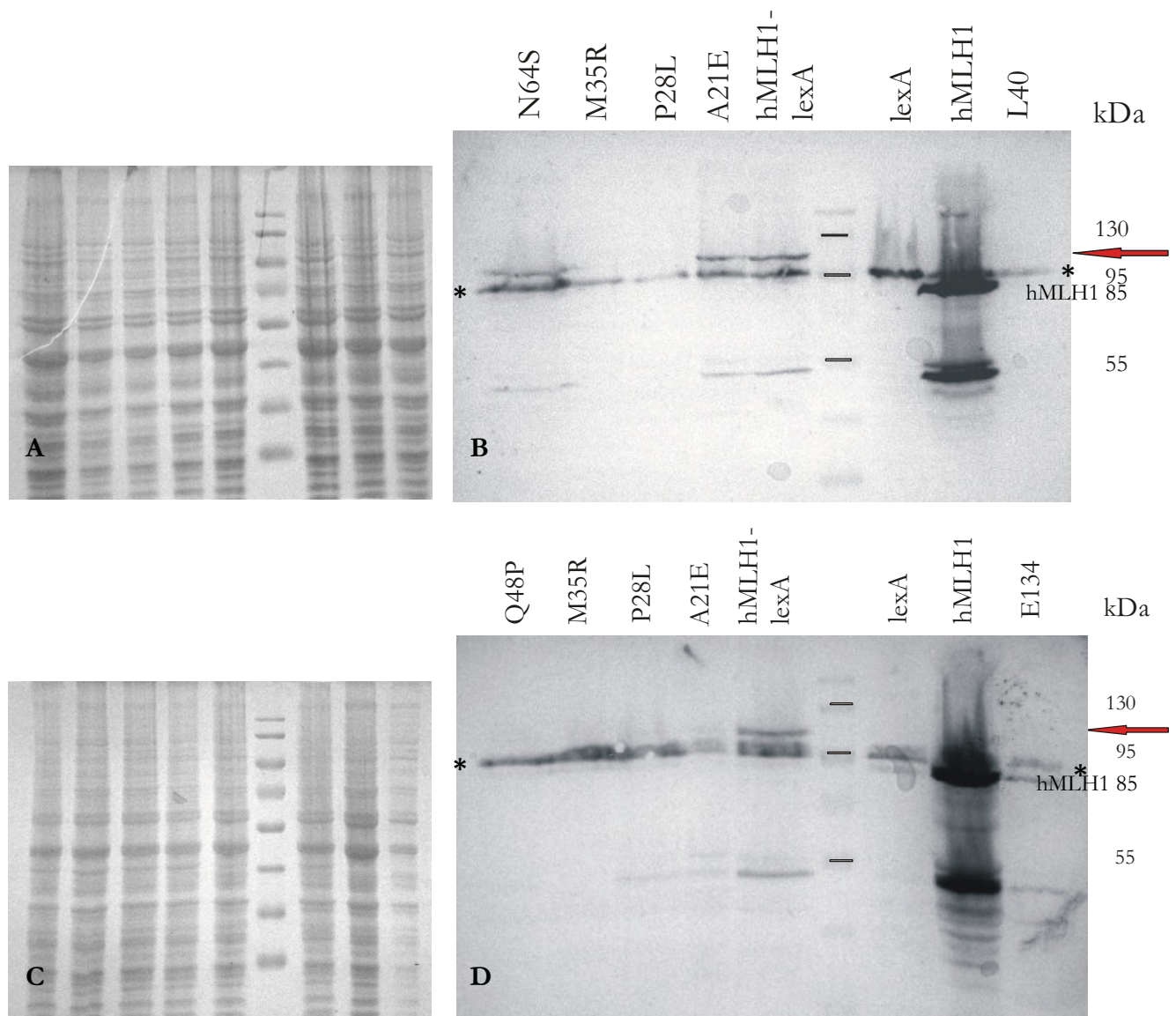


Abb. 4.11: Expressionsanalysen von hMLH1-Varianten in den Hefe-Stämmen L40 und E134. A= Gesamtprotein-Ladekontrolle von L40-Proben mit Coomassie gefärbt (geladen 50 μ g); B= Detektion der hMLH1-lexA-Allele zusammen mit hPMS2 im Hefestamm L40 (107 kDa); Kontrollen: 1. L40=Proteinextrakt aus L40 ohne hMLH1, 2. hMLH1= WT-hMLH1 ohne lexA (85 kDa), 3. lexA=ohne hMLH1; C= Gesamtprotein-Ladekontrolle von E134-Proben mit Coomassie gefärbt (50 μ g); D= Detektion der hMLH1-Varianten im Hefestamm E134; Kontrollen: 1. E134= Proteinextrakt aus E134 ohne hMLH1, 2. hMLH1=WT-hMLH1 ohne lexA (85 kDa), 3. lexA=ohne hMLH1; roter Pfeil markiert die Laufhöhe des Fusionsproteins hMLH1-lexA; „*“ kennzeichnet unspezifische Bande
kDa= kilo Dalton; SDS-Gel 10%; Proteinauftrag der Allele 150 μ g.

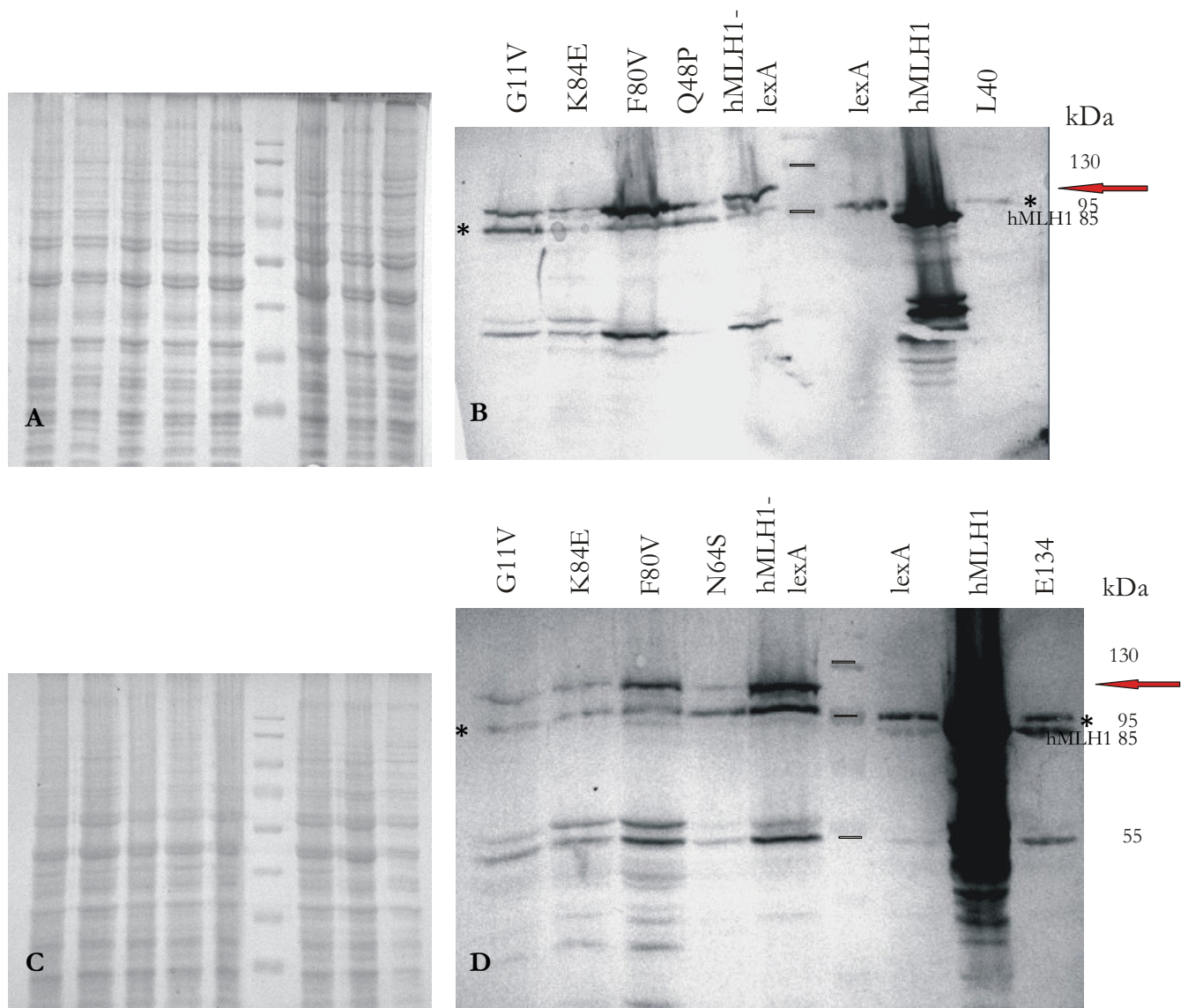


Abb. 4.12: Expressionsanalysen der hMLH1-Varianten in den Hefe-Stämmen L40 und E134. A= Gesamtprotein-Ladekontrolle von L40-Proben mit Coomassie gefärbt (geladen 50 μ g); B= Detektion der hMLH1-lexA-Allele zusammen mit hPMS2 im Hefestamm L40 (105 kDa); Kontrollen: 1. L40=Proteinextrakt aus L40 ohne hMLH1, 2. hMLH1=ohne lexA (85 kDa), 3. lexA=ohne hMLH1; C= Gesamtprotein-Ladekontrolle von E134-Proben mit Coomassie gefärbt (50 μ g); D= Detektion der hMLH1-Varianten im E134; Kontrollen: 1. E134= Proteinextrakt aus E134 ohne hMLH1, 2. hMLH1=ohne lexA (85 kDa), 3. lexA=ohne hMLH1; roter Pfeil markiert die Laufhöhe des Fusionsproteins hMLH1-lexA; „*“ kennzeichnet unspezifische Bande
kDa= kilo Dalton; SDS-Gel 10%; Proteinauftrag der Allele 150 μ g.

In der Tabelle 4.4. sind die Ergebnisse der Proteinstabilitätsanalysen der hMLH1-Varianten noch einmal vergleichend dargestellt.

Allel (hMLH1)	WB	
	E134	L40
WT	++	++
lexA	-	-
A21E	+	++
P28L	-	-
M35R	-	-
Q48P	-	-
N64S	+	++
F80V	++	↑
K84E	+	+
G101V	+	++

Tab. 4.4: Abschätzung der Proteinmengen der hMLH1-Allele in Abhängigkeit von den eingesetzten Hefestämme E134 und L40; +++= wildtypische, += reduzierte, -= keine Expression; ↑= stärkere Expression als Wildtyp-hMLH1; E134= enthält lexA-hMLH1; L40 = enthält lexA-hMLH1/hPMS2
WB = Western Blot

Die Proteinmengen variierten in den hMLH1-Allelen A21E, N64S, F80V und G101V, je nach Hefestamm, in dem exprimiert wurde. Für die Allele P28L, M35R und Q48P wurde kein Protein nachgewiesen und das Allel F80V wurde im Hefestamm L40 stärker exprimiert als Wildtyp selbst, nur die hMLH1-Variante K84E wurde in beiden Hefestämmen gleich stark exprimiert.

4.2 Untersuchungen in der Gen-Familie *EXT*

4.2.1 Phänotyp-/ Genotypuntersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Untersuchungen eine nähere Einschätzung der Korrelationen zwischen Phänotyp und Genotyp bei familiären multiplen Osteochondromen ermöglichen. Dazu gehört die Einengung des Genortes bzw. Kopplung zu einem Gen, eine Mutationsanalyse und die Verifikation der gegebenenfalls gefundenen Mutation. Als erstes werden die Familien einer Kopplungsanalyse unterzogen, um eine Beziehung zu einem Genort herzustellen, danach wurde ein betroffener Vertreter der Familie ausgewählt und einer Mutationsanalyse des entsprechenden Gens mittels DHPLC-Analyse zugeführt. Bei Auffälligkeiten in der DHPLC-Untersuchung wurde das jeweilige amplifizierte Exon des Gens bei dem betreffenden Patienten sequenziert.

4.2.1.1 Indirekte Mutationsanalyse (Kopplungsanalyse)

Im Gegensatz zur direkten DNA-Analyse muss bei der indirekten DNA-Analyse immer DNA von mehreren betroffenen und nicht-betroffenen Familienangehörigen untersucht werden. Mit der Kopplungsanalyse wird in einer Familie die Vererbung von DNA-Polymorphismen untersucht, von denen man weiß, dass sie in der Nähe des Gens liegen.

Bei den betroffenen Familien ist der Phänotyp der Erkrankung bekannt, aber das auslösende Gen unbekannt. Um das Gen im Genom zu lokalisieren kann die Vererbung der genomischen Region, die die unbekannt Mutation enthält, in einer Familie verfolgt werden.

Drei verschiedene Genorte (*EXT1-3*) auf den Chromosomen 8, 11 und 19 kommen für Osteochondrome in Frage. Drei weitere Genorte auf den Chromosomen 1 und 8, welche als *EXT-like* Gene bezeichnet werden, sollten ebenfalls in diese Untersuchungen mit einbezogen werden, falls sich keine Kopplung zu *EXT1*, -2 oder -3 für eine Familie aufzeigen ließe.

Hierzu wurden 13 Familien gesammelt und der Kopplungsanalyse unterzogen. Die Positionen der verwendeten Mikrosatellitenmarker sind in der Abbildung 4.13. zusammengefasst. Für *EXT1* sind sie mit roter, *EXT2* in blauer und *EXT3* in grüner Umrandung abgebildet.

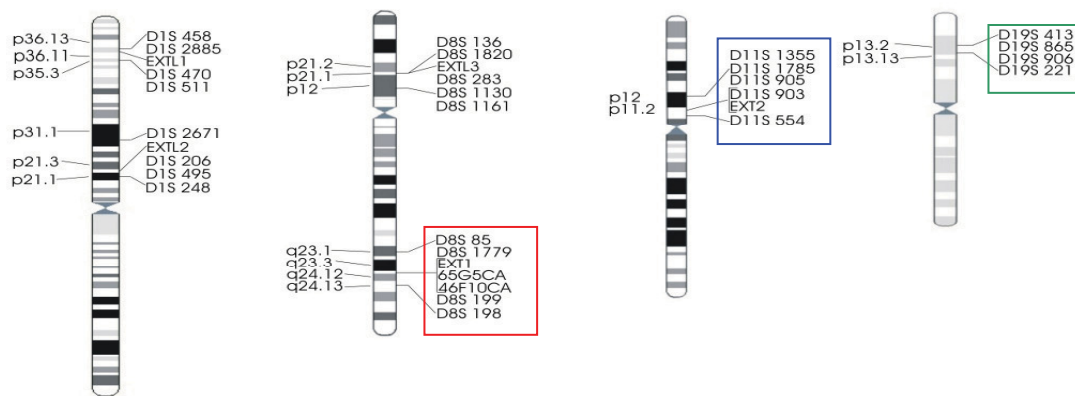


Abb.: 4.13. Schema der verwendeten Mikrosatellitenmarkerpositionen
(nach Ensemble Genome Browser)

Zur Einengung des Genortes wurde für jede Familie eine eigene Analyse durchgeführt. Unter Zuhilfenahme des Stammbaums wurden auf diese Weise die Haplotypen erstellt. Die Haplotypen entstehen, wenn durch Amplifizierung verschiedener DNA-Abschnitten eine Allel-Verteilung für die einzelnen Familienmitglieder vorgenommen werden kann. Je nach Größe der Mikrosatellitenbereiche ergibt sich für jede Person ein spezifisches Bandenmuster, welches vererbt wird. Jede Person besitzt ein spezielles Bandenmuster aus zwei Hauptbanden und vererbt eine der spezifischen Bande weiter. Die auf dem Gel detektierten Banden werden in Relation zu einander gesetzt, wobei in jeder Familie die oberste Bande mit der Zahl „Eins“ versehen und dann entsprechend der Bandenanordnung weiter gezählt wird. Vergleichbar ist diese Analyse jedoch nur, wenn innerhalb der Familie mehrere Mitglieder untersucht werden können. Dabei gilt, je mehr Familienmitglieder verfügbar sind, desto aussagekräftiger sind diese Analysen. Die Allele werden, falls es nicht zu Kopplungsbrüchen kommt von Mutter und Vater in der derselben Reihenfolge der Markeranordnung an die nächste Generation weitergegeben. So entsteht der Haplotyp wie unter dem Stammbaum durch Zahlen dargestellt. Die Allelverteilung des Vaters ist im Haplotyp in der linken Spalte angegeben, die der Mutter rechts. Zusammenhänge werden durch farbige Balken verdeutlicht. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. In der ersten untersuchten Generation standen zumeist keine übergeordnete Generation für Untersuchungen zur Verfügung, so dass die Festlegung des Haplotyps in dieser Generation willkürlich geschah, ohne darauf zu achten, ob die Allelkombination vom Vater oder der Mutter vererbt worden ist.

Kopplung bedeutet, dass betroffene Familienangehörige eine bestimmte Allelkombination nur an Betroffene der nächsten Generation weitervererben; Nichtbetroffene tragen diese Kombination nicht. Ausgefüllte Symbole im Stammbaum zeigen, dass Familienangehörige von der Erkrankung betroffen sind. Ein Ausschluss wird angenommen, wenn sich die Muster der polymorphen Marker nicht über die Generationen der Betroffenen hinweg verfolgen lassen. Pro Gen wurden in dieser Untersuchung zwischen drei bis sechs Marker verwendet. Ausführlich wird die Auswertung für die Familien 1 und 3 dargestellt. In gleicher Weise wurden die anderen Familien analysiert, wobei hier nur die Ergebnisse summarisch abgebildet wurden.

Geldokumentation der Familie Nr. 3.

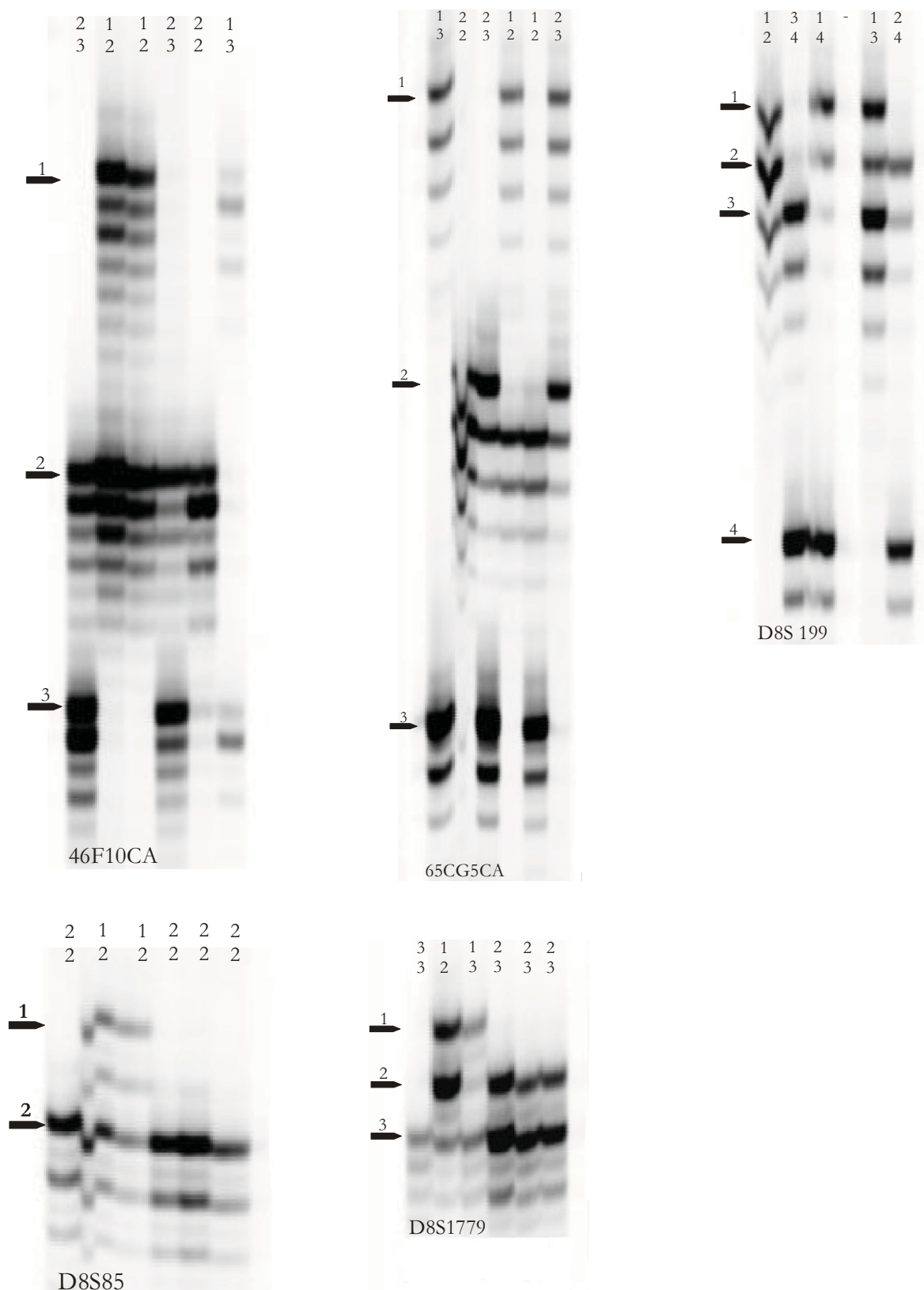


Abb.4.14: Geldokumentation zur Kopplungsanalyse der Familie Nr. 3 für das Chromosom 8, *EXT1*. Es wurden 5 Marker von Chromosom 8 auf einem 6 % SDS-Gel analysiert. Auftragsreihenfolge Vater, Mutter, 4 Kinder, wie im Stammbaum (Abb. 4.16.). Die Pfeile deuten auf die Allele. Die Zahlenpaare über den Gelspuren zeigen den Haplotypen für die betreffende Person.

Beispiel: Der Marker D8S 1779: Der Vater (linke Spur) besitzt nur die Bande 3 (homozygot), die Mutter zeigt die Banden 1 und 2, das 1. Kind die Banden 1 und 3, das 2. Kind trägt 2 und 3, ebenfalls die beiden nächsten Geschwister.

Geldokumentation der Familie Nr. 3.

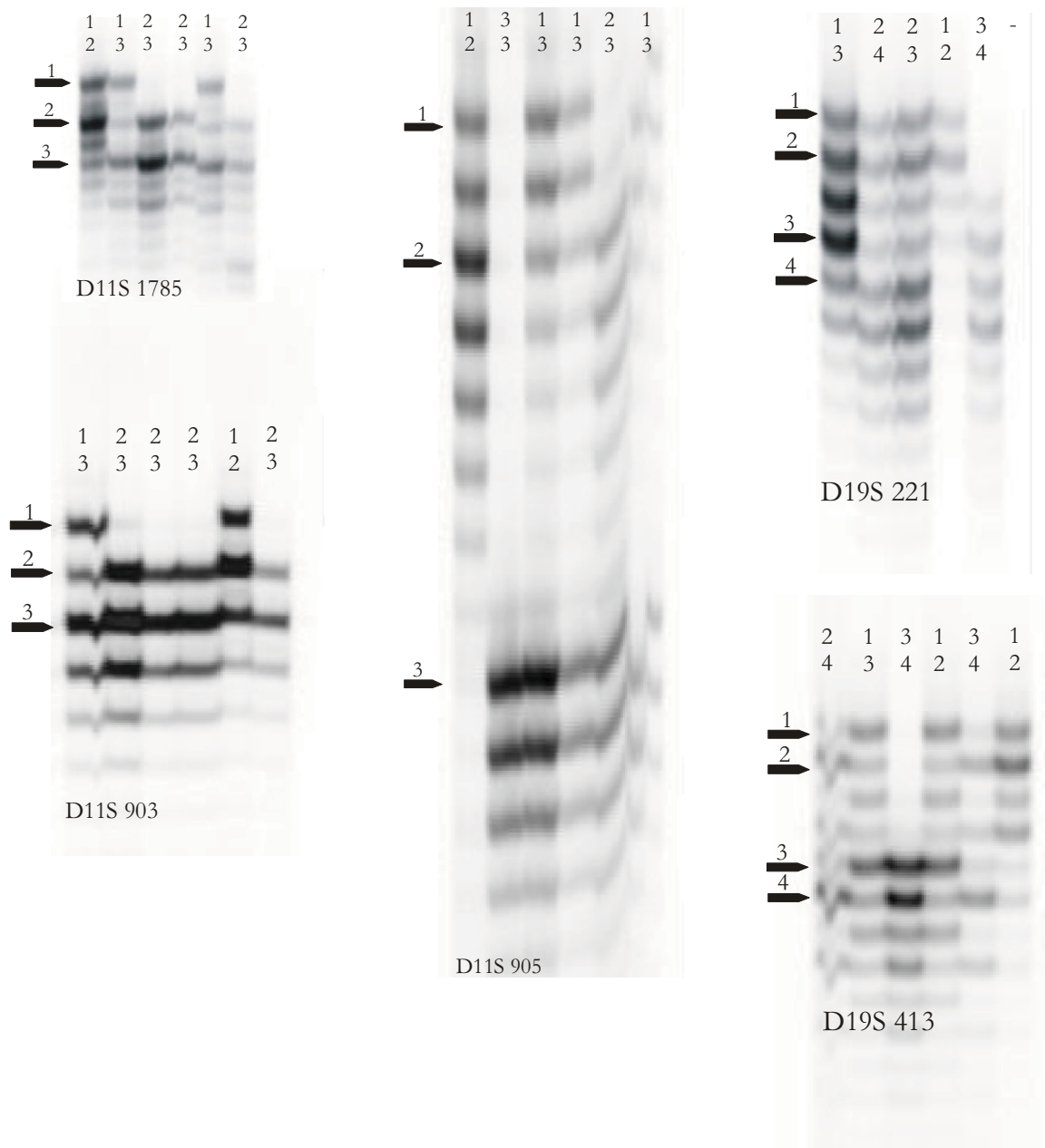


Abb.4.15: Geldokumentation der Kopplungsanalyse der Familie Nr. 3 für das Chromosom 11 (*EXT2*) und 19 (*EXT3*). Es sind 2 Marker für *EXT3* und 3 Marker für *EXT2* auf einem 6 % SDS-Gel analysiert worden. Auftragsreihenfolge Vater, Mutter, 4 Kinder, wie im Stammbaum (Abb. 4.16.). Die Pfeile deuten auf die Allele hin. Die Zahlenpaare über den Gelspuren zeigen den Haplotypen für die betreffende Person.

Stammbaum der Familie Nr.3.

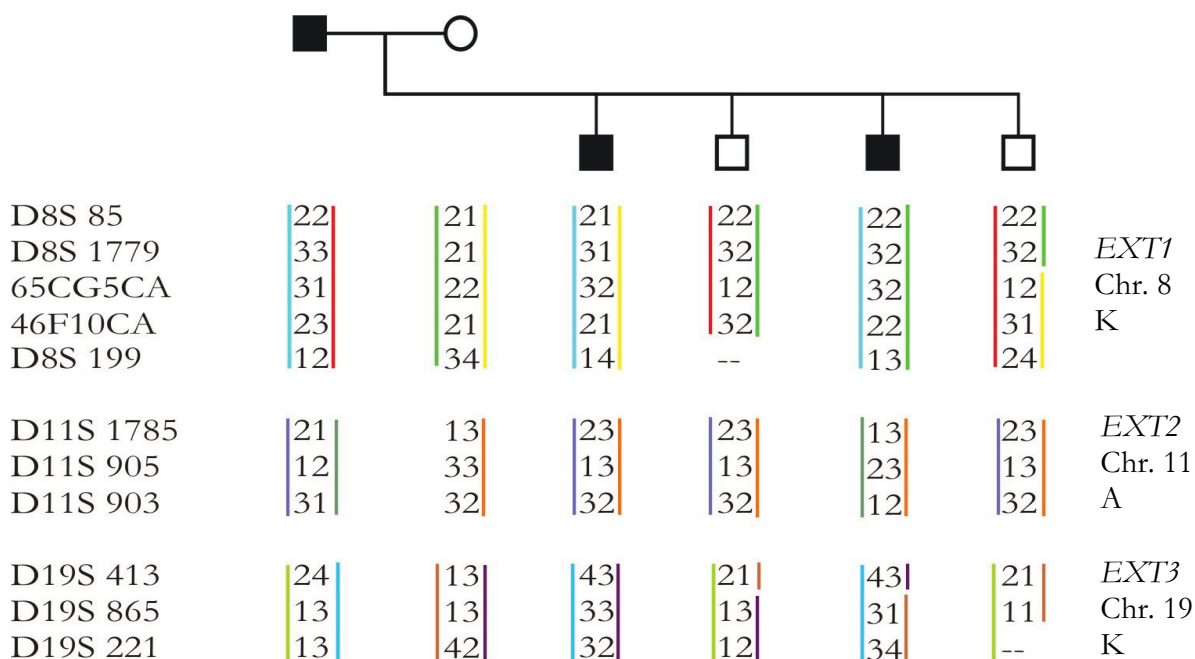


Abb.: 4.16. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 3. Entsprechend der Gelbilder aus Abb. 4.2. sind die Haplotypen notiert. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom

Analysiert wurden die Angehörigen für die Marker der Chromosomen 8, 11 und 19. Die Familie Nr. 3 besitzt 6 Mitglieder in zwei Generationen. Für *EXT1* wurden 5 Marker verwendet, für *EXT2* und *EXT3* je 3 Marker. Von jedem Familienmitglied wurde DNA mit den Oligonukleotiden der betreffenden Marker amplifiziert. Zum Vergleich wurden die PCR-Produkte auf einem 6 % SDS-Gel nebeneinander aufgetragen und analysiert (Abb. 4.14. und 4.15.). Die mit Ziffern benannten Banden wurden nun unter dem Stammbaum zu jeder Person notiert und durch die Kombination der Marker der Haplotyp erstellt. Für *EXT1* besitzt der Vater eine hellblau und eine rot gekennzeichnete Allelkombination. An seine nicht betroffenen Kinder gab dieser Vater zweimal die „rote“ und an die betroffenen Kinder zweimal die „blaue“ Allelkombination weiter (jeweils in der linken Spalte zu sehen). Für *EXT2* hat der Vater eine violette und eine grün gekennzeichnete Allelkombination weitervererbt. Es tragen aber sowohl betroffene als auch nicht betroffene Kinder die violette Allelkombination, daher kann keine Beziehung der Erkrankung zum Gen *EXT2* bestehen. Für *EXT3* besitzt der Vater eine grüne und eine blaue Allelverteilung und gibt die „Blau“ an betroffene und die „Grüne“ an nicht betroffene Kinder weiter. Die Ergebnisse sind kompartibel mit einer möglichen Kopplung zu *EXT1* und *EXT3* (Abb. 4.16.).

Geldokumentation der Familie Nr. 1.

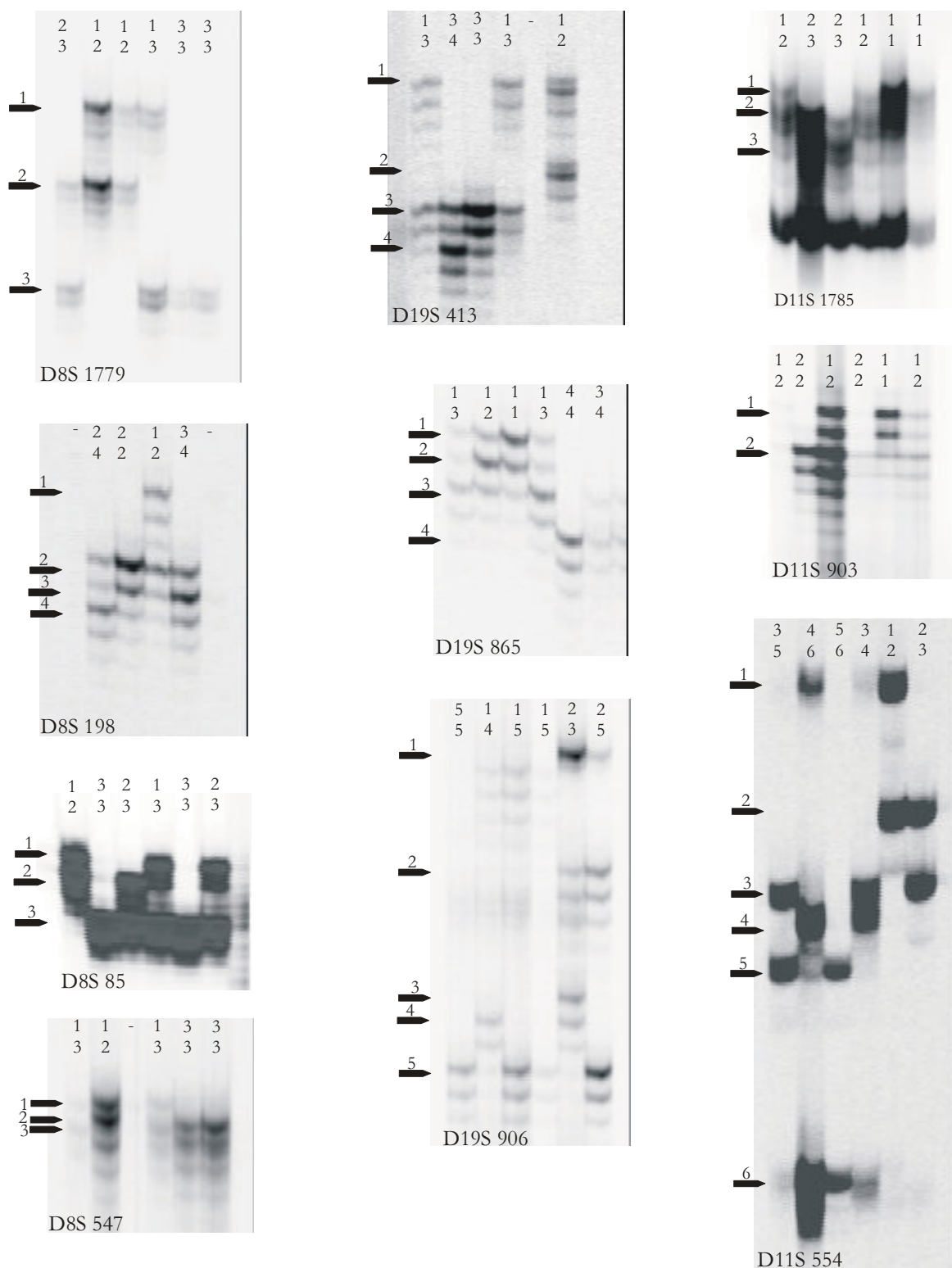


Abb. 4.17. Geldokumentation zur Kopplungsanalyse der Familie 1. In der ersten Spalte Marker des Chromosoms 8, *EXT1*. In der zweiten Spalte sind Marker des Chromosoms 19 *EXT3* vertreten und in der rechten Spalte Marker des Chromosoms 11, *EXT2*. Pfeile deuten auf die Allele. Aufgetragen in der Reihenfolge Vater, Mutter, 1. Kind, 2. Kind, Ehegatte von Kind 2, Enkel auf ein 6 % SDS-Gel. Haplotyp über den einzelnen Spuren dokumentiert. „-“,=kein Ergebnis

Stammbaum der Familie Nr. 1.

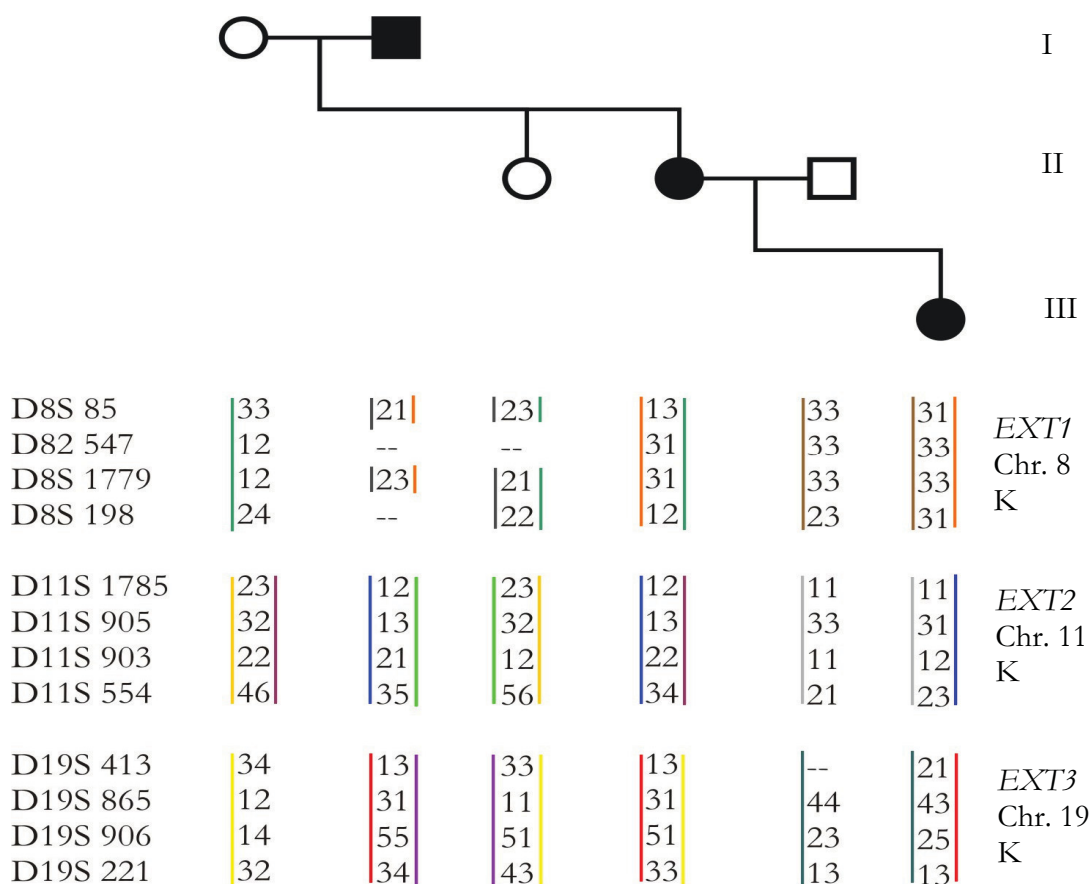


Abb.: 4.18. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 1. Entsprechend der Gelbilder aus Abb. 4.17. sind die Haplotypen notiert. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom

Die Familie Nr. 1 wies eine mögliche Kopplung zu allen drei Genorten auf, der betroffene Großvater (I) vererbte an seine nicht betroffene Tochter (II) die grün gekennzeichnete Allelkombination und an die betroffene Tochter die orange-farbene. Das betroffene Enkelkind (III) erbt die Allelkombination, die auch schon die anderen Betroffenen der Familie zeigen. Für *EXT2* besitzt der Vater eine blau und eine grün gekennzeichnete Kombination. Weitergegeben hat er an die beiden Töchter jeweils unterschiedliche Allele, aber die Enkeltochter, weist die gleiche Allelkombination auf wie die anderen Betroffenen der Familie. Ebenso verhält es sich für *EXT3*. Hier wird die rot gekennzeichnete Allelanordnung von allen Betroffenen geteilt. (Abb. 4.18.).

Stammbaum der Familie Nr. 2

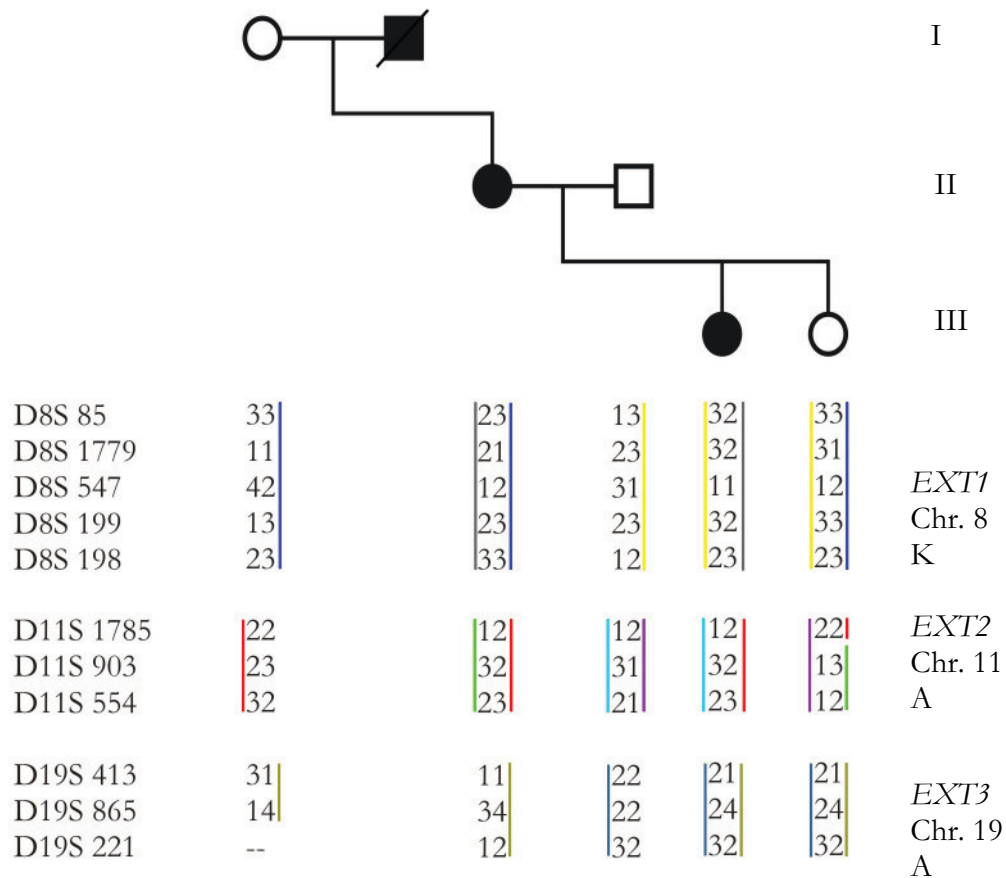


Abb.: 4.19. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 2. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farblich dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom.; I-III= Generation 1-3 (Erläuterungen siehe Text)

Familie Nr. 2 besitzt 6 Angehörige, wobei der betroffene Großvater der Untersuchung nicht zur Verfügung stand und somit nur 5 Personen in die Analyse gingen. Es wurde eine Kopplung zu *EXT1* angenommen, da die betroffene Mutter (II), die in grau gekennzeichnete Allelkombination von ihrem Vater (I) geerbt haben muss. An die betroffene Tochter (III) wird die Kombination des Großvaters (I) weitergegeben. Die nicht betroffene Tochter weist die blau gekennzeichnete Allelanordnung auf (von der nicht betroffenen Großmutter I). Für *EXT2* und *EXT3* wird ein Ausschluss angenommen, da die entscheidenden Allelkombinationen des betroffenen Vaters/Großvaters (I) (für *EXT2* in grün und *EXT3* ohne Markierung) nicht weitergegeben wurden (Abb. 4.19.).

Stammbaum der Familie Nr. 4.

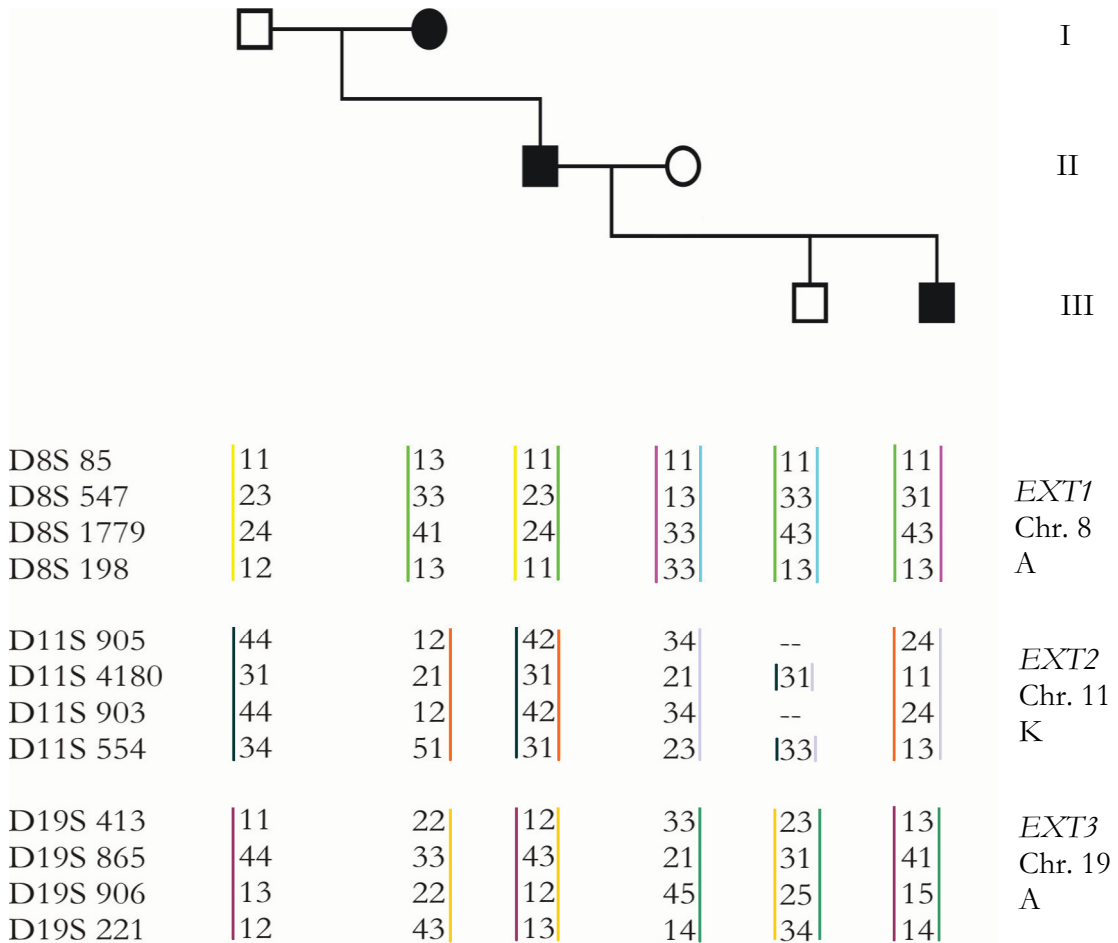


Abb.: 4.20. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 4. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom.; I-III= Generation 1-3 (Erläuterungen siehe Text)

Die Familie Nr. 4 besitzt 6 Angehörige in 3 Generationen und zeigten eine mögliche Kopplung zum Gen *EXT2*, da alle betroffenen Familienangehörigen die gleiche Allelkombination aufwiesen (orange). *EXT1* wurde ausgeschlossen, weil die betroffene Großmutter (I) auch an den nicht betroffenen Enkel, die grün gekennzeichnete Allelanordnung über die Generationen weitergegeben hat (Abb. 4.20.). Ähnlich war es für *EXT3*, hier ist es die gelb gekennzeichnete Allelkombination der Großmutter (I), die über die betroffene Mutter (II) an den nicht betroffenen Enkel (III) weitervererbt wurde.

Stammbaum der Familie Nr. 5

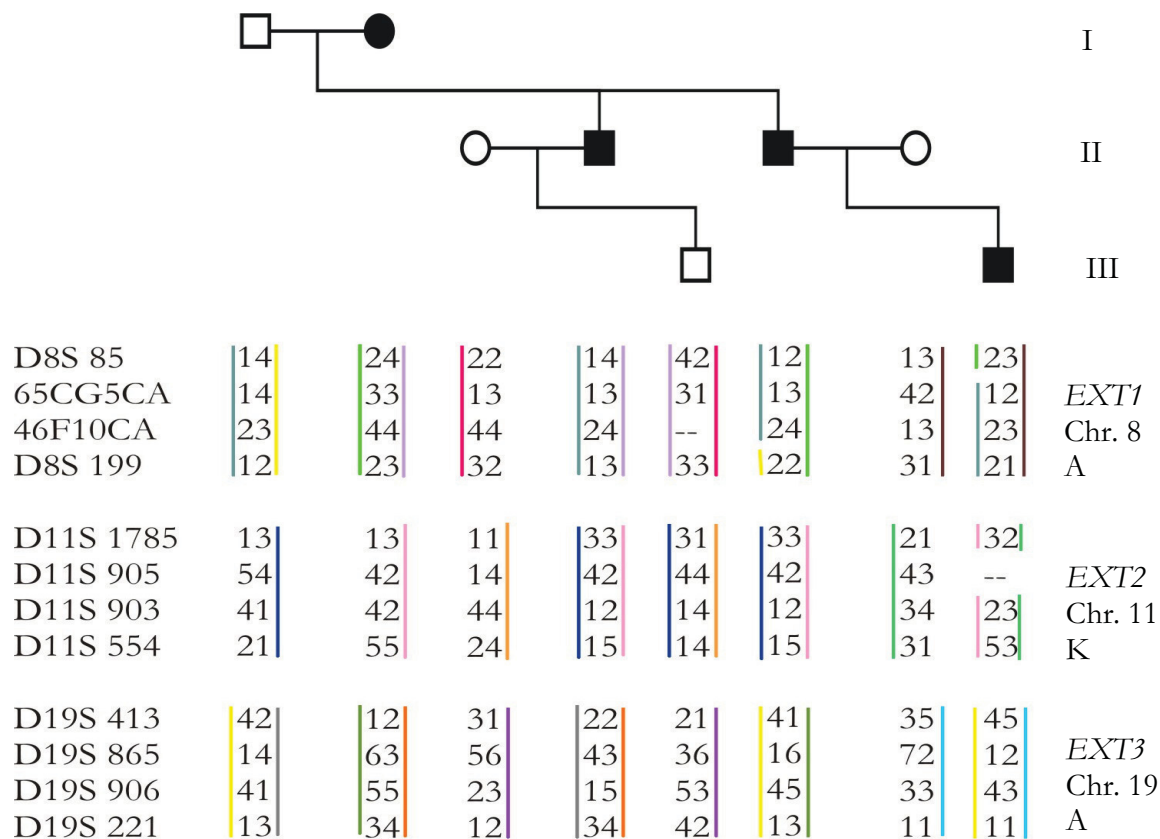


Abb.: 4.21. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 5. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleich Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom.; I-III= Generation 1-3 (Erläuterungen siehe Text)

Die Familie Nr. 5 koppelt zum Gen *EXT2*. Die Familie besteht aus 8 Mitgliedern in 3 Generationen. Die entscheidende Allelkombination in *EXT2*, in rosa dargestellt, ist an alle betroffenen Familienmitglieder weitervererbt worden (Abb. 4.21.). Während die Großmutter (I) an die beiden erkrankten Söhne (II) in *EXT1* und *EXT3* jeweils unterschiedliche Kombinationen vererbte.

Stammbaum der Familie Nr. 6.

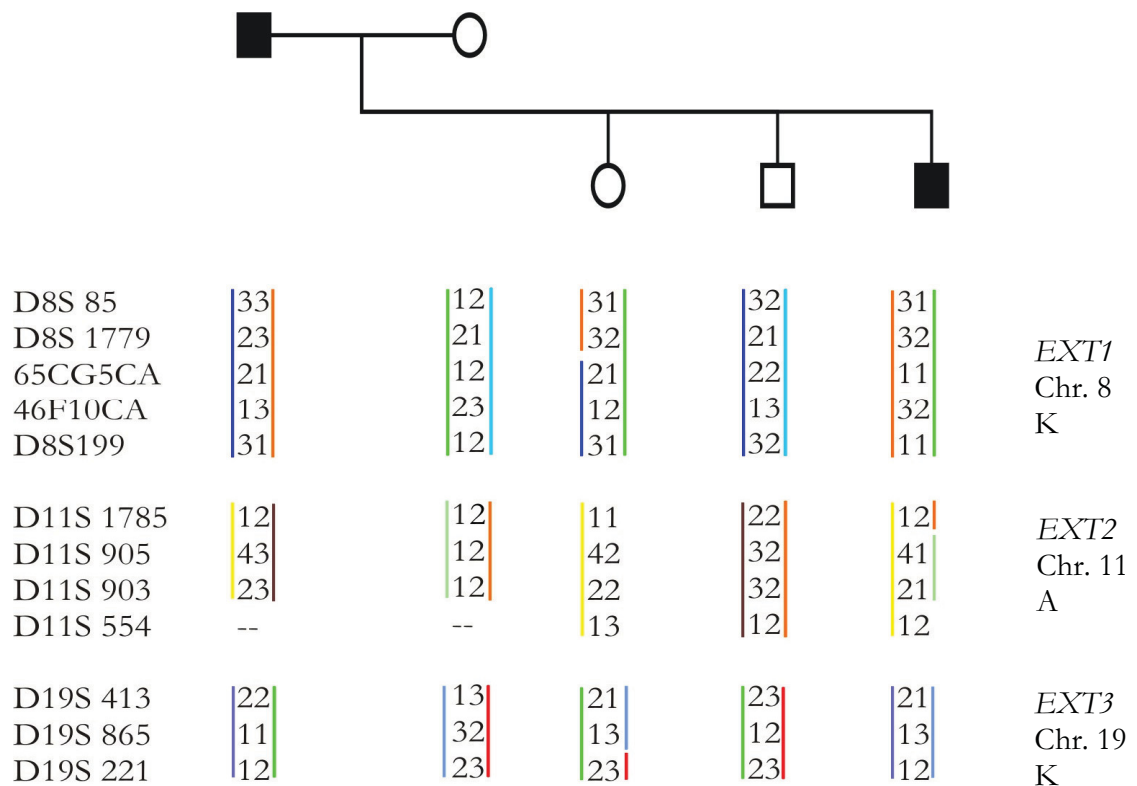


Abb.: 4.22. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 6. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleich Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom (Erläuterungen siehe Text)

Bei der Familie Nr. 6 mit 6 Mitgliedern in 2 Generationen wurde eine Kopplung zu den Genen *EXT1* und *EXT3* angenommen. Der erkrankte Vater hat für *EXT1* die orange gekennzeichnete Allelanordnung an den betroffenen Sohn vererbt. Die beiden nicht betroffenen Kinder tragen die blau markierte Allelkombination. Für *EXT3* wurde die violett gefärbte Allelanordnung nur an den erkrankten Sohn weitergegeben (Abb.4.22.). *EXT2* wurde ausgeschlossen, da sich sowohl ein erkranktes als auch ein gesundes Kind ein Allel des Vaters (in gelb dargestellt) teilen.

Stammbaum der Familie Nr.7.

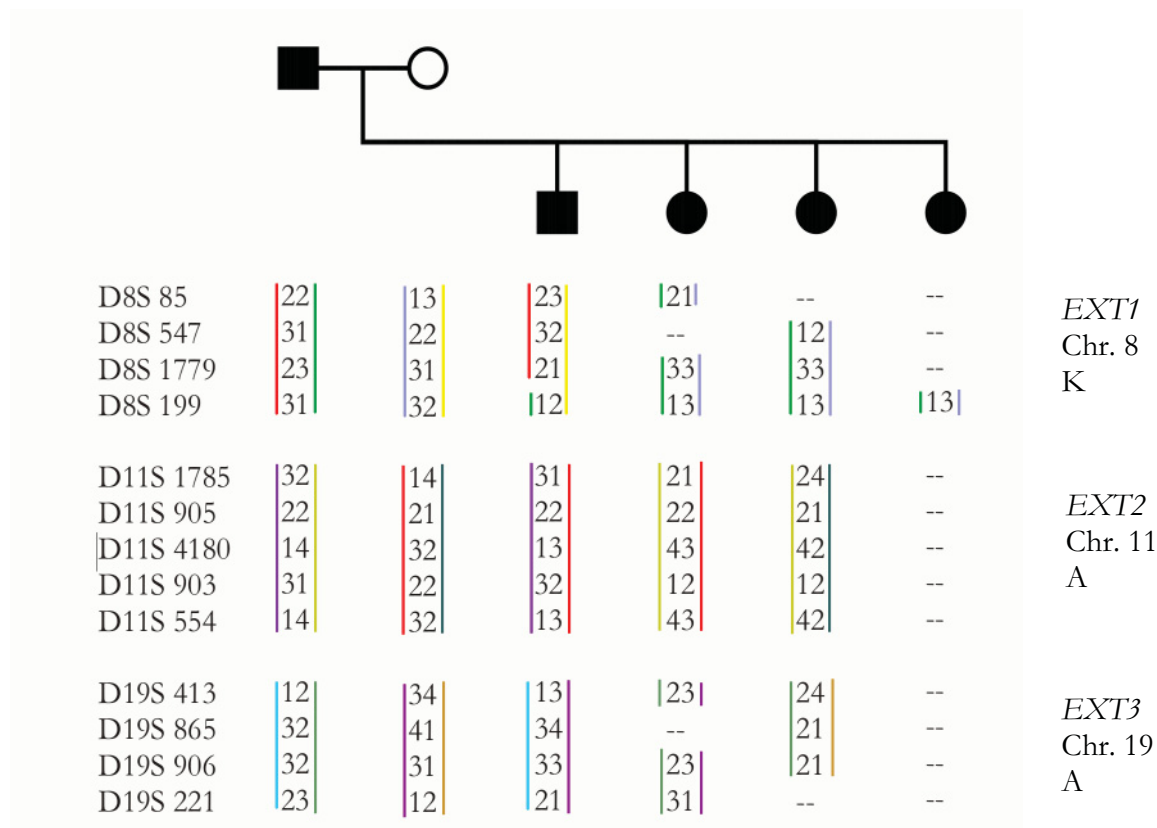


Abb.: 4.23. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 7. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom (Erläuterungen siehe Text)

Familie Nr. 7 ist mit 4 Kindern und den Eltern insofern interessant, da im ersten Ansatz nur drei der Kinder zur Verfügung standen. Danach ergab sich für den Genort *EXT1* ein Ausschluss, da nur die stromaufwärts des Gens gelegenen Marker in der Analyse Ergebnisse brachten (siehe Abb. 4.13.). Erst mit dem 4. Marker, der stromabwärts des Gens liegt konnte eine Kopplung aufgezeigt werden, d. h. der Sohn hatte eine Kopplungsbruch im Chromosom 8, der vor dem Gen liegen muss, da auch er betroffen ist. So wurde das 4. betroffene Kind nur noch auf diesem einen Marker hin getestet und zeigte die Kopplung zu *EXT1*. Ausschlüsse für *EXT2* und *EXT3* konnten auf Grund der unterschiedlichen Verteilung seitens des Vaters angenommen werden. Die erkrankten Kinder besitzen verschieden Allelkombinationen des Vaters (Abb. 4.23.).

Stammbaum der Familie Nr. 8.

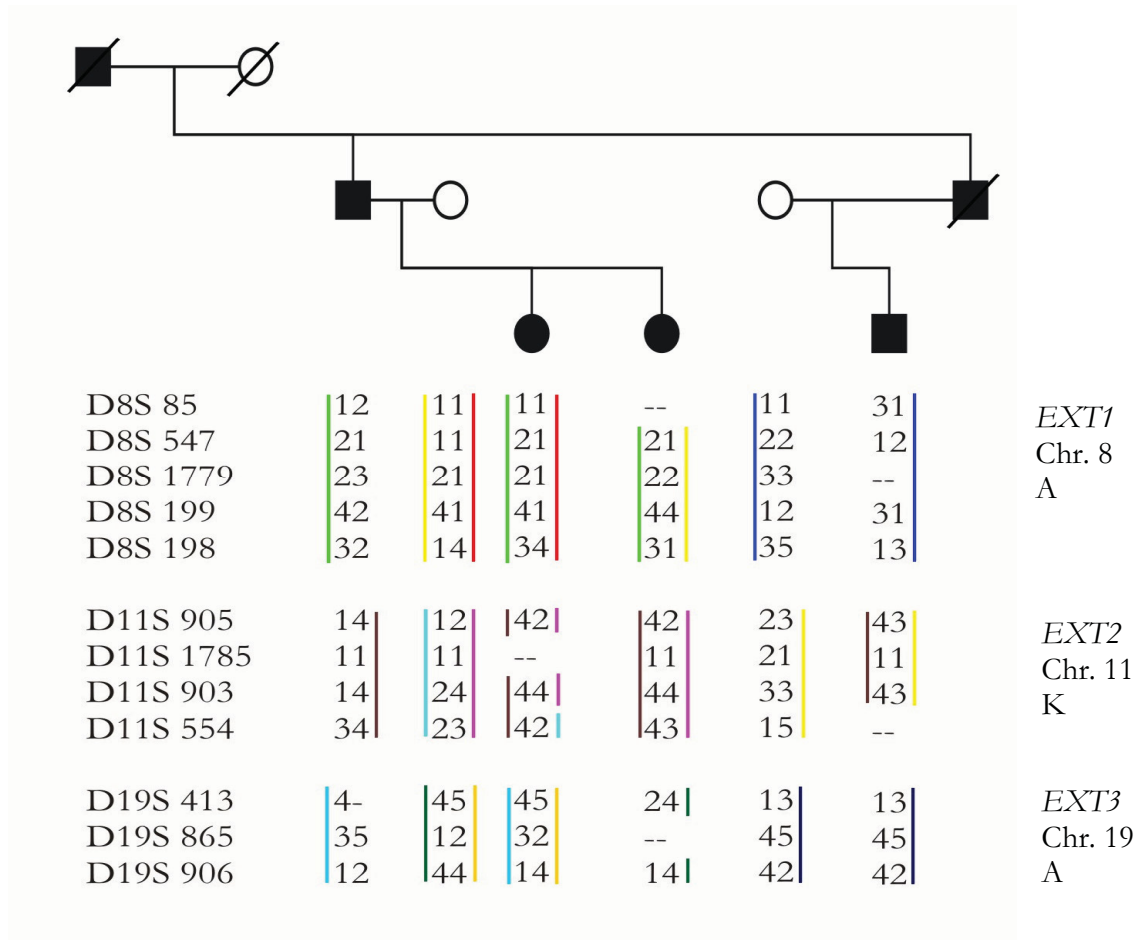


Abb.: 4.24. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 8. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom (Erläuterungen siehe Text)

Eine Kopplung zum Gen *EXT2* zeigte sich bei der Familie Nr. 8. Sie besitzt 6 Angehörige, die über 2 Generationen verteilt sind. Die braun gekennzeichnete Allelanordnung war in diesem Fall von Bedeutung (Abb. 4.24). In dieser Familie konnte beobachtet werden, wie das Gen *EXT2* segregiert. Der Vater hat die entsprechende Allelverteilung an seine Töchter vererbt, ebenso trägt der Neffe diese Allelkombination (durch seinen Vater, der für diese Untersuchung nicht zur Verfügung stand, siehe Stammbaum). Die Gene *EXT1* und *EXT3* wurden ausgeschlossen, bedingt durch die Allelanordnungen des Neffen. Sie unterscheiden sich von denen der anderen Verwandten.

Stammbaum der Familie Nr. 9.

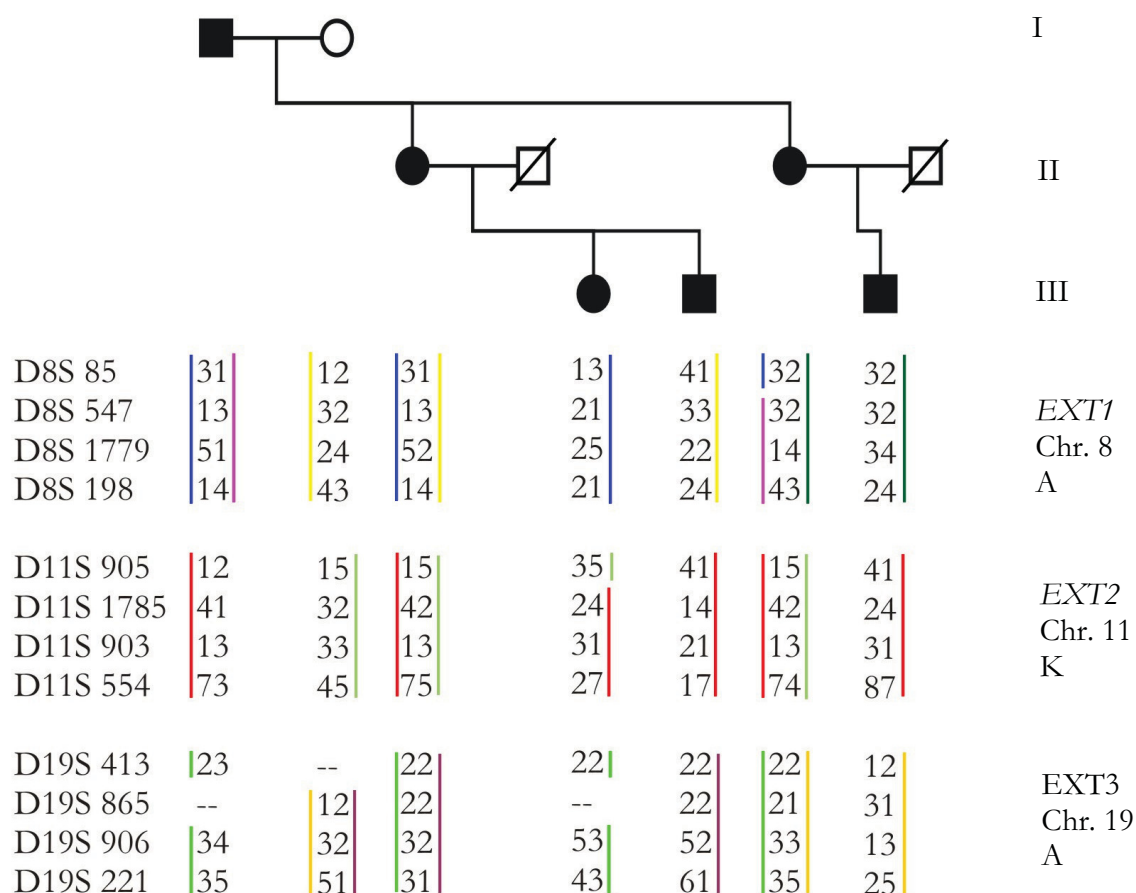


Abb.: 4.25. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 9. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom (Erläuterungen siehe Text), I-III= Generationen 1-3

Die Familie Nr. 9, mit 7 Familienmitgliedern aus 3 Generationen, wies eine Kopplung zu *EXT2* auf. Die entsprechende Allelverteilung ist hier rot gekennzeichnet und ließ sich über die Generationen bei allen Betroffenen verfolgen. Zusätzlich weist die Enkelin aus der Generation III einen Kopplungsbruch auf dem Chromosom 11 auf. Dieser Bruch liegt aber stromaufwärts und hat keinen Einfluss auf die Kopplung. Eine Kopplung zu den Genorten *EXT1* und *EXT3* war nicht möglich, da sich die Allelkombinationen des Großvaters aus der Generation I, nicht bei den Erkrankten verfolgen ließen (Abb. 4.25.).

Stammbaum der Familie Nr. 10.

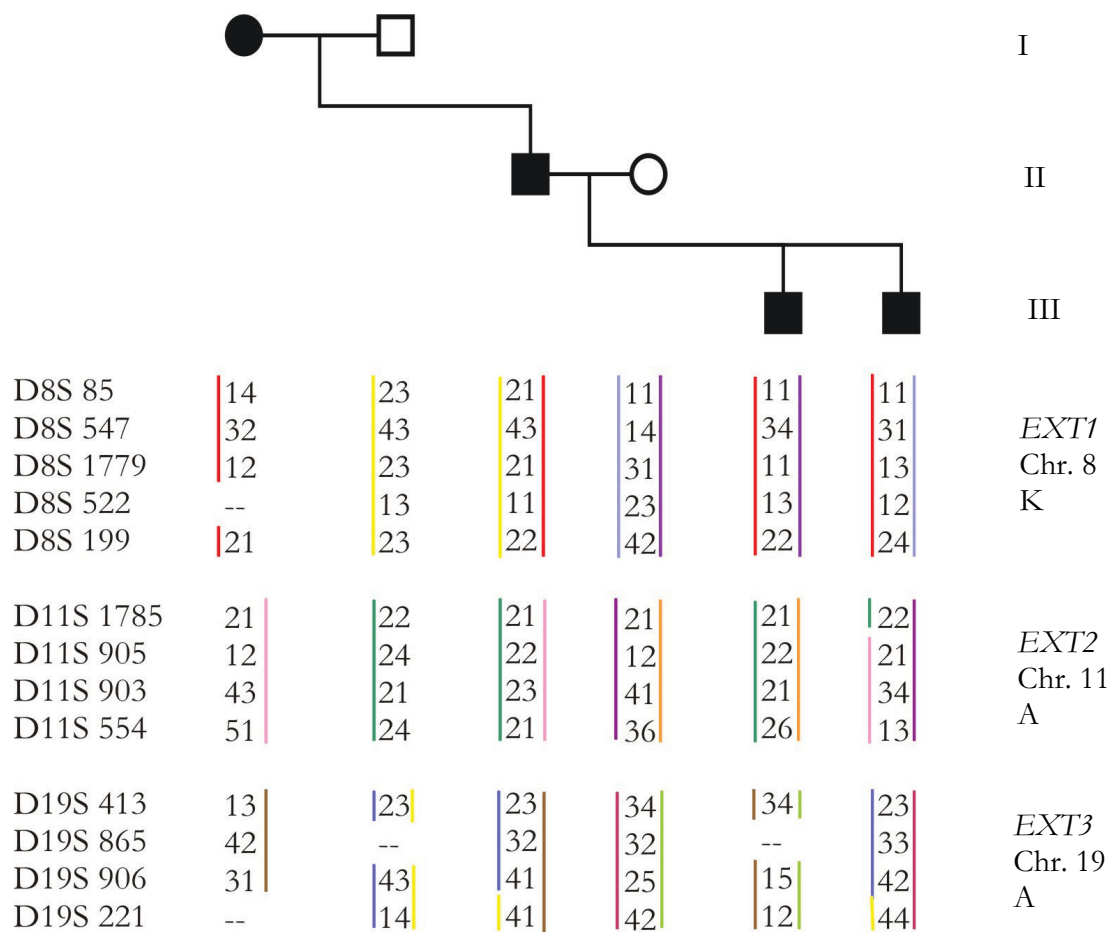
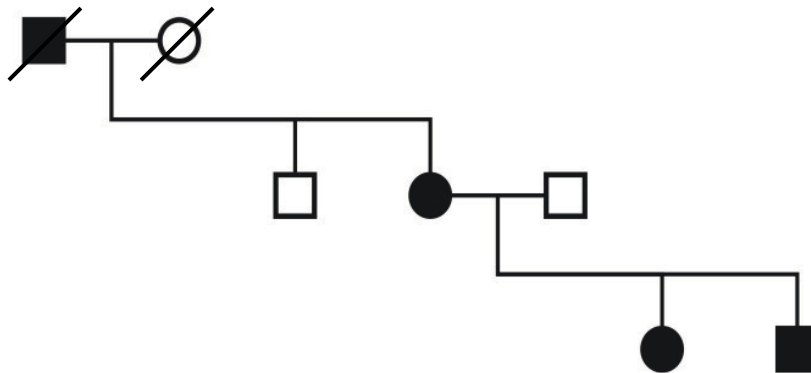


Abb.: 4.26. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 10. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom (Erläuterungen siehe Text), I-III= Generationen 1-3

Familie 10 wies eine Kopplung zu dem Chromosom 8 bedingt durch die segregierte Allelanordnung (in rot dargestellt) auf, die sich bei allen Betroffenen findet. *EXT2* und *EXT3* zeigten einen Ausschluss, da sich die Allelkombinationen nicht über die Generationen verfolgen ließen (Abb. 4.26.).

Stammbaum der Familie Nr. 11.

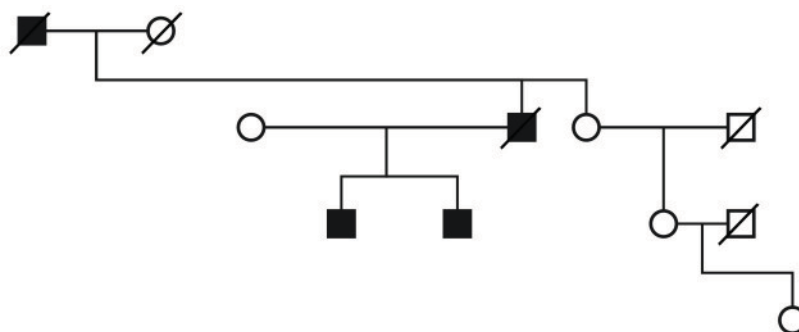


D8S 85	12	32	13	13	13	<i>EXT1</i> Chr. 8 K
D8S 1779	23	13	21	21	21	
65CG5CA	13	23	22	22	22	
46F10CA	11	11	21	21	21	
D8S 199	--	21	31	32	32	
D11S 1785	22	21	23	32	32	<i>EXT2</i> Chr. 11 A
D11S 905	22	22	11	12	12	
D11S 903	31	32	13	33	33	
D11S 554	23	23	41	12	12	
D19S 413	24	23	13	32	32	<i>EXT3</i> Chr. 19 A
D19S 865	--	23	41	12	12	
D19S 906	21	--	33	32	32	
D19S 221	12	13	23	31	31	

Abb.: 4.27. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 10. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom (Erläuterungen siehe Text),

Für die Familie 11, mit 5 Mitgliedern in 2 Generationen, wurde eine Kopplung zum Gen *EXT1* aufgezeigt, durch den roten Farbcode gekennzeichnet (Abb. 4.27.). Es wurde ein Ausschluss für *EXT2* und *EXT3* gefunden, da ein nicht betroffenes Familienmitglied die gleichen Allelkombinationen wie die erkrankten Personen besitzt (für *EXT2* in blau und *EXT3* in orange gekennzeichnet).

Stammbaum der Familie Nr. 12.



D8S 85	44	24	24	11	31	11	<i>EXT1</i> Chr.8 K
D8S 547	22	32	32	13	13	13	
D8S 1779	13	33	33	23	23	33	
65G5CA	12	22	22	34	34	34	
46F10CA	31	11	11	33	43	13	
D8S 199	13	--	13	24	34	24	
D8S198	--	--	12	23	33	--	
D11S 1785	12	12	12	22	22	22	<i>EXT2</i> Chr. 11 K
D11S 905	13	23	23	13	13	13	
D11S 4180	11	31	31	14	24	22	
D11S 903	44	44	44	34	24	14	
D11S 554	54	24	24	13	33	53	
D19S 413	12	--	--	21	32	12	<i>EXT3</i> Chr. 19 A
D19S 865	11	31	11	23	32	22	
D19S 906	12	12	51	34	43	33	
D19S 221	--	34	34	21	22	--	

Abb.: 4.28. Stammbaum mit Haplotyp der Familie 10. Zur Verdeutlichung sind die Allelkombinationen farbig dargestellt. Gleiche Farben bedeuten gleiche Haplotypen. A= Ausschluss; K= Kopplung; Chr.=Chromosom (Erläuterungen siehe Text),

Für die Familie 12 ergab sich eine Kopplung zu *EXT1* und *EXT3*. Die Kopplung folgte aus der Verteilung in *EXT1* in grün kodiert und *EXT3* in violett dargestellt (Abb. 4.28.).

Zusammengefasst erbringt die Haplotypanalyse der 12 Familien folgende Ergebnisse:

Familie	Familiengröße	EXT1 Ch. 8q 24	EXT2 Ch. 11p 11	EXT3 Ch. 19p
1.	6 Per./ 3 Gen.	+	+	+
2.	5 Per./ 3 Gen.	+	-	-
3.	6 Per./ 2 Gen.	+	-	+
4.	6 Per./ 3 Gen.	-	+	-
5.	8 Per./ 3 Gen.	-	+	-
6.	5 Per./ 2 Gen.	+	-	+
7.	5 Per./ 3 Gen.	+	-	-
8.	6 Per./ 2 Gen.	-	+	-
9.	7 Per./ 3 Gen.	-	+	-
10.	6 Per./ 3 Gen.	+	-	-
11.	5 Per./ 2 Gen.	+	-	-
12.	6 Per./ 2 Gen.	+	+	-

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Kopplungsanalyse; +=Kopplung; -=keine Kopplung; Per= Personen; Gen= Generationen

Bei zwölf Familien war in vier Familien eine Kopplung zu *EXT1* und in vier Familien eine Kopplung zu *EXT2* möglich. Bei einer Familie war eine Kopplung zu *EXT1* und *EXT2*, bei zwei Familien zu *EXT1* und *EXT3*, sowie bei einer Familie zu allen drei Genorten gegeben (Tab.4.1). Bei dieser

Art von Untersuchungen ist

zu beachten, dass es sich hier nicht um eine sichere Kopplung, sondern lediglich um eine wahrscheinliche handelt. Es wird lediglich eine Wahrscheinlichkeit angegeben.

4.2.1.2 DHPLC- Untersuchungen

Nachdem für jede Familie ein Hinweis auf einen Genort erfolgt war wurde je ein Betroffener pro Familie zur direkten Mutationssuche herangezogen. Je nach „Kopplungs-ort“ wurden die DNA-Abschnitte des entsprechenden Gens exonweise amplifiziert und durch Auftrennung mittels DHPLC nach Sequenzunterschieden gefahndet. Es konnten aber nur Untersuchungen für *EXT1* und *EXT2* vorgenommen werden, da das *EXT3*-Gen noch nicht bekannt ist. Es wurden für die Familien 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11 und 12 alle Exons (11) von *EXT1* amplifiziert und diese auf der DHPLC analysiert. Bei den Familien 4, 5, 8 und 9 wurde das Gen *EXT2* (13 Exons) analysiert. Neben der Patienten-DNA wurde stets eine Kontroll-DNA, die für *EXT* wildtypisch ist, amplifiziert und unter den ermittelten Temperaturen und Puffergradienten analysiert (siehe Abschnitt 3.8.2.)

Durch die unterschiedliche Darstellung von Homo- und Heteroduplices zeigt sich für die gefundenen Sequenzveränderungen folgende Erscheinungsformen am DHPLC:

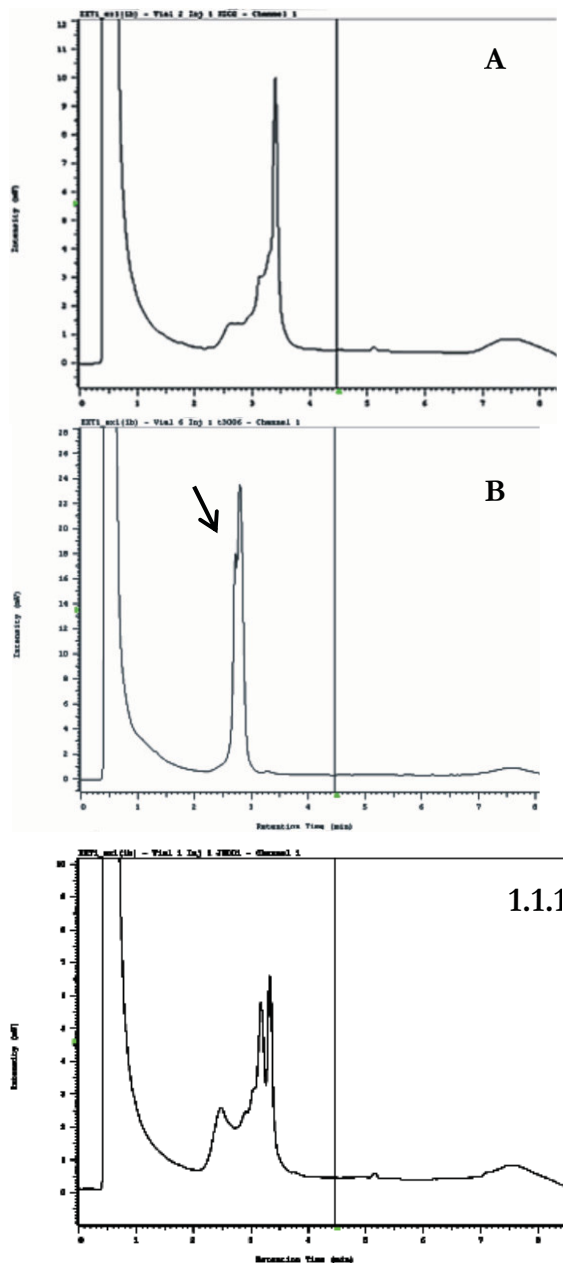


Abb. 4.29: Chromatogramm von *EXT1* Exon 1 der Familien 7 bzw. 11; A= Wildtyp; B= Fam. 7 (Pfeil deutet auf die Veränderung); C= Fam. 11

Abbildung 4.29. zeigt die Chromatogramme von *EXT1* im Exon 1. Allen Chromatogrammen gemeinsam waren die sogenannten „Waschpeaks“ jeweils zu Beginn und am Ende einer Analyse. Der Hauptpeak wurde nach ca. 4,5 Minuten von der Säule gelöst und war entweder als diskreter Peak zu erkennen, manchmal auch mit Verunreinigungen und damit einhergehend zusätzlichen Peaks versehen. Die Entscheidung, ob eine Veränderung vorlag oder nicht wurde von dem Vergleich mit dem Wildtyppeak abhängig gemacht.

In den Familien 7 und 11 sind Veränderungen des Exons gegenüber dem Wildtyp-Peak zu erkennen. In der ersten Patienten-Probe (Abb. 4.29. B) war keine typische Heteroduplexbildung zu sehen, aber eine Verschiebung und eine Schulter auf der linken Seite des Peaks. Dennoch wurde dieser Patient als putativer Mutatonsträger angesehen. Die zweite Patienten-Probe (Abb. 4.29. C) zeigte eine deutliche Heteroduplexbildung. In

der Familie 10 fanden sich zwei Veränderungen bei der DHPLC-Analyse. Zum einen eine Auffälligkeit im Exon 5 (Abb. 4.30.) und die Zweite im Exon 6 (Abb. 4.31.).

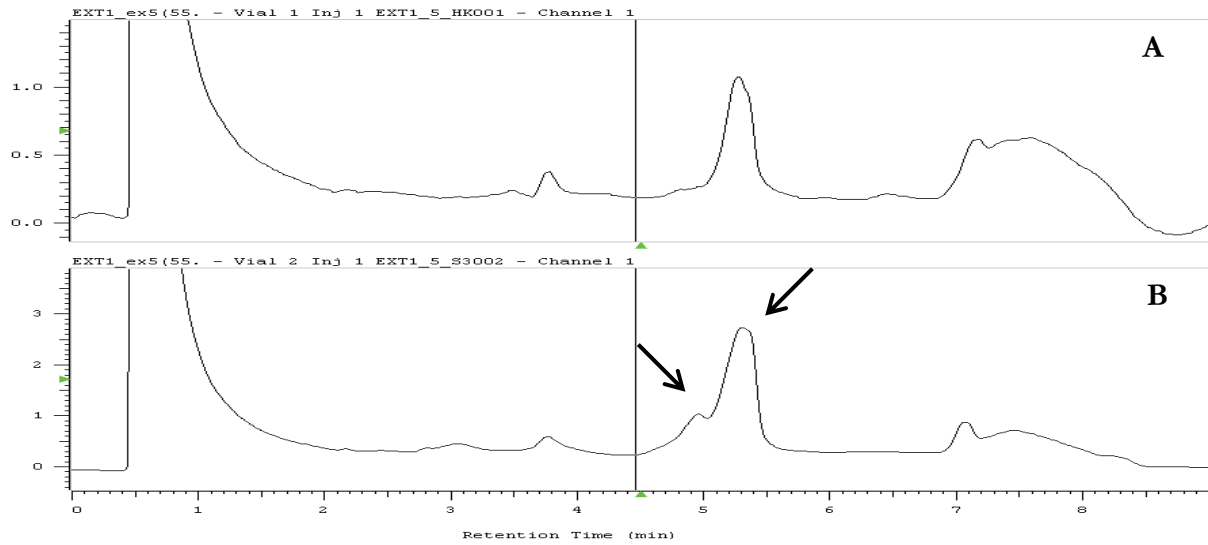


Abb. 4.30: Chromatogramm von *EXT1* Exon 5 der Familie 10; A= Wildtyp; B= Analyse der PatientendNA. Die Pfeile deuten auf die Veränderungen

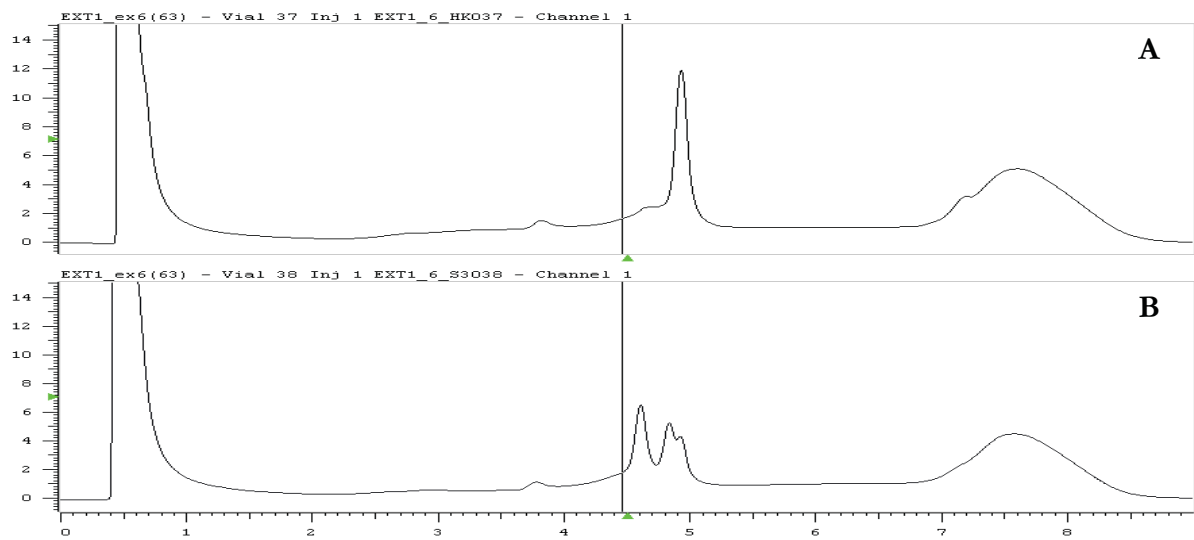


Abb. 4.31: Chromatogramm von *EXT1* Exon 6 der Familie 10; A= Wildtyp; B= Analyse der PatientendNA

Ebenfalls eine Auffälligkeit im Exon 6 von *EXT1* fand sich bei der Familie 1 (Abb. 4.32.) und bei Betroffenen der Familie 3 (Abb. 4.33).

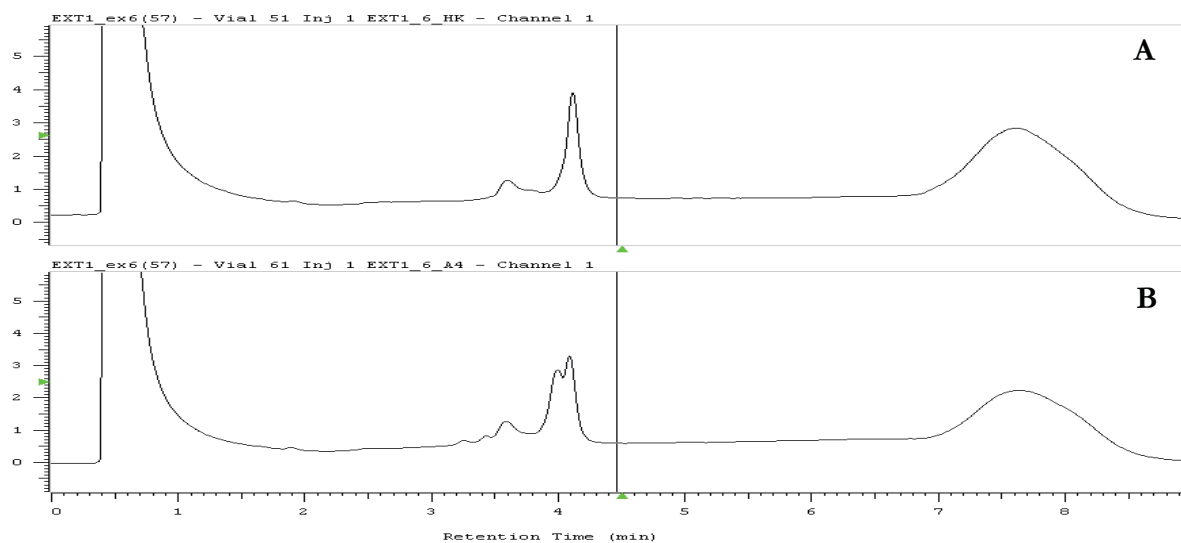


Abb. 4. 32: Chromatogramme von *EXT1* Exon 6 der Familie Nr. 1; A= Wildtyp; B= Analyse der Patienten-DNA

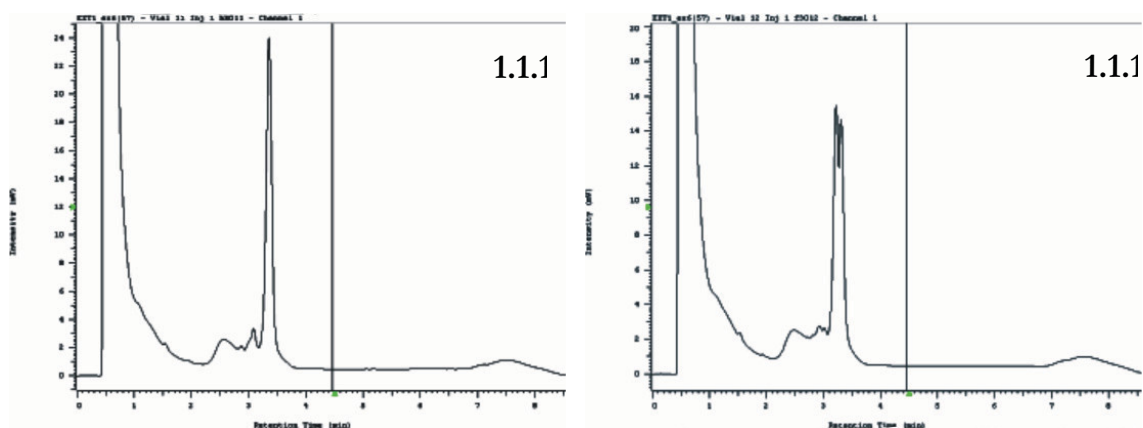


Abb. 4. 33: Chromatogramme von *EXT1* Exon 6 der Familie Nr. 3; A= Wildtyp; B= Analyse der Patienten-DNA

Ein weiterer Patient im Folgenden mit „Z“ benannt, ging ebenfalls in die DHPLC-Analyse mit ein, obwohl keine weiteren Familienmitglieder zur vorhergehenden Koppelungsanalyse verfügbar waren. Dieser Patient zeigte eine Veränderung im Exon 7 (Abb. 4.34.).

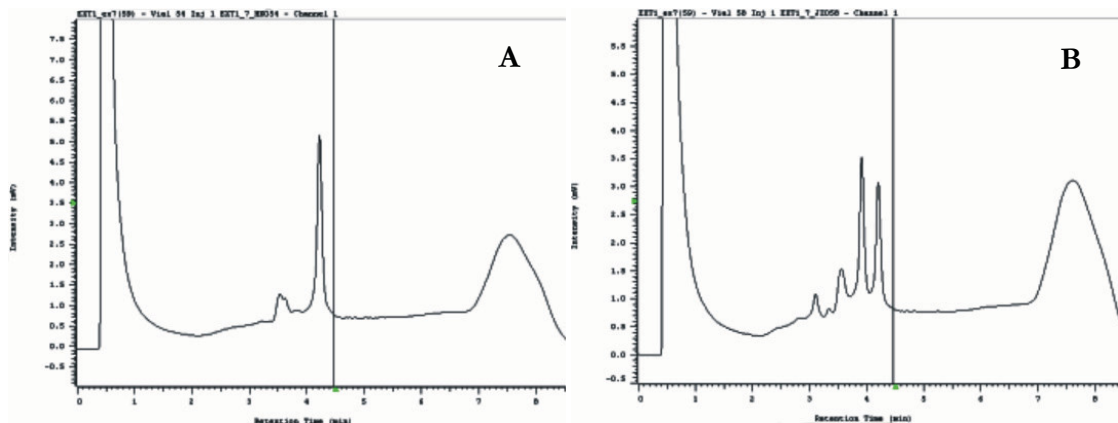


Abb. 4.34: Chromatogramme von *EXT1* Exon 7 Familie Z; A= Wildtyp; B= Analyse der Patienten-DNA

In der Familie 2 wurde im Exon 8 eine Veränderung gefunden (Abb. 4.35.).

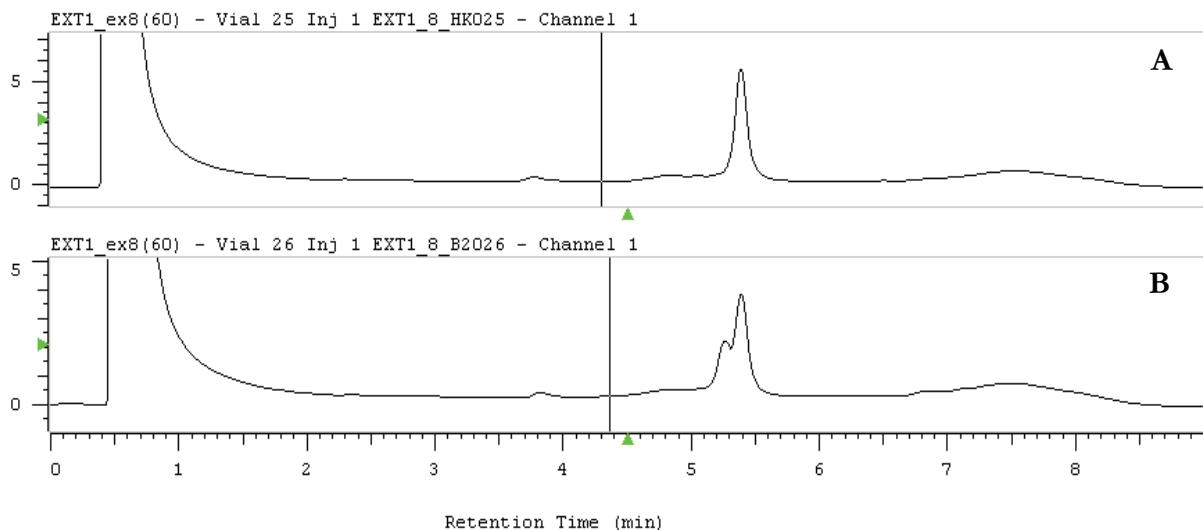


Abb. 4.35: Chromatogramme von *EXT1* Exon 8 der Familie Nr. 2; A= Wildtyp; B= Analyse der Patienten-DNA

Im Gen *EXT2* konnten ebenfalls 2 Veränderungen detektiert werden. Bei der Familie Nr. 8 im Exon 2 (Abb. 4.36.) und bei der Familie Nr. 4 im Exon 3 (Abb: 4.37.).

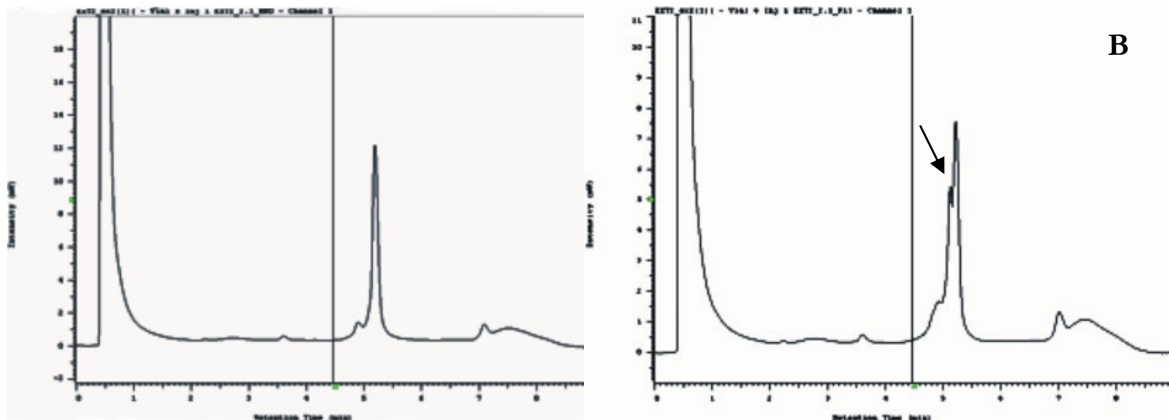


Abb. 4. 36: Chromatogramme von *EXT2* Exon 2 in der Familie Nr. 8; A= Wildtyp; B= Analyse der Patienten-DNA

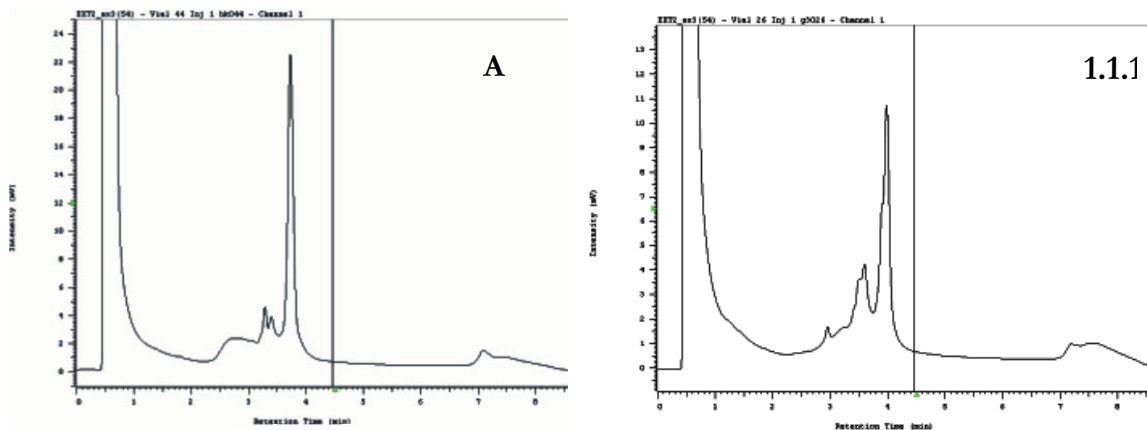


Abb. 4. 37: Chromatogramme von *EXT2* Exon 3 der Familie Nr. 4; A= Wildtyp; B= Analyse der Patienten-DNA

Da sich für die Familien Nr. 1 und 12, mit Kopplung zu *EXT1* und -2, im Gen *EXT1* keine Veränderung fand, wurde auch *EXT2* analysiert. Jedoch ließen sich auch in diesem Gen keine Auffälligkeiten detektieren. Auch in den Familien 5 (Kopplung zu *EXT2*) und 6 (Kopplung zu *EXT1*) konnte keine Abweichungen gegenüber Wildtyp gefunden werden.

4.2.1.3 Sequenzierung

Zur exakten Identifizierung einer Mutation wurden die in der DHPLC-Darstellung veränderten PCR-Produkte sequenziert. Bei zwölf untersuchten Personen konnten insgesamt zehn Veränderungen der DNA-Sequenz detektiert werden. In *EXT1* fanden sich acht und in *EXT2* zwei Veränderungen. Für *EXT1* waren dies zwei Sequenzände-

rungen im Exon 1; zum einen eine Deletion an Position c.115delG in der Familie 11 (Abb. 4.38.) und eine Missense-Mutation in der Familie 7 c.122G>A.

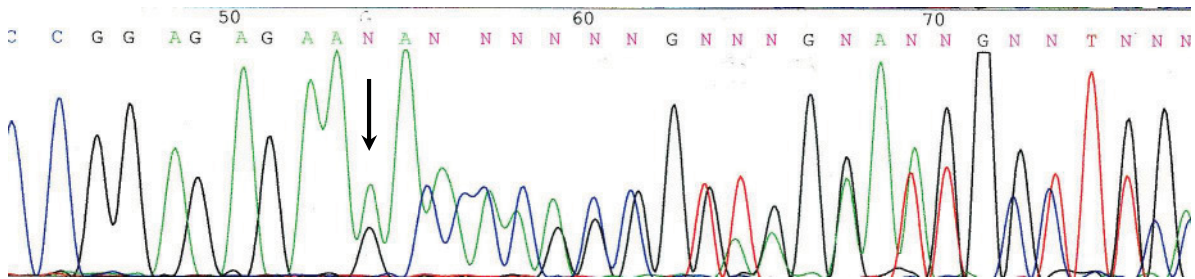


Abb. 4.38: Sequenzierung des PCR-Produktes der Familie 11 in *EXT1* Exon 1; der Pfeil kennzeichnet die Veränderung. Die Deletion (im Codon 39) führt zum vorzeitigen Kettenabbruch an der Aminosäure-Position 135.

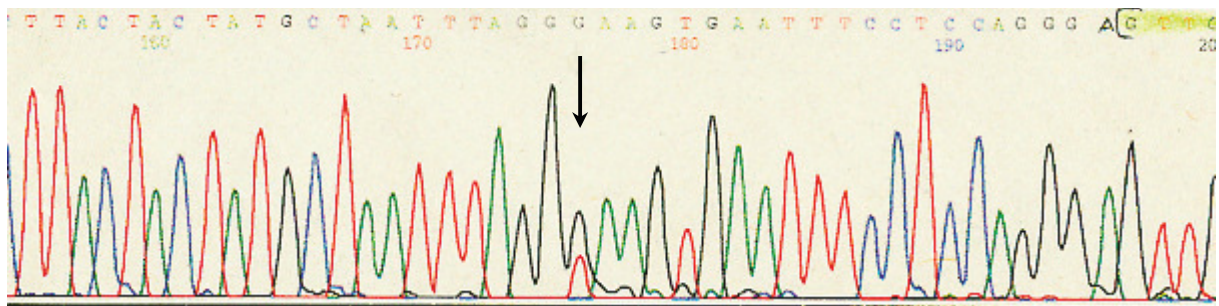


Abb. 4.39: Sequenzierung des PCR-Produktes der Familie 10 in *EXT1* Exon 5; der Pfeil kennzeichnet die Veränderung. Dieser Basenaustausch in der Spleißstelle führt zu einer Veränderung von T nach G. Er liegt an der Position +2 im Intron 5.

Eine Spleiß-Mutation im Intron 5 wurde bei der Familie Nr. 10 gefunden. Es handelt sich um einen Basenaustausch von AGgt nach AGgg (Abb. 4.39.). Beim gleichen Patienten wurde eine Sequenzveränderung im Exon 6 gefunden; ebenso bei der Familie Nr. 2 (Abb. 4.40.).

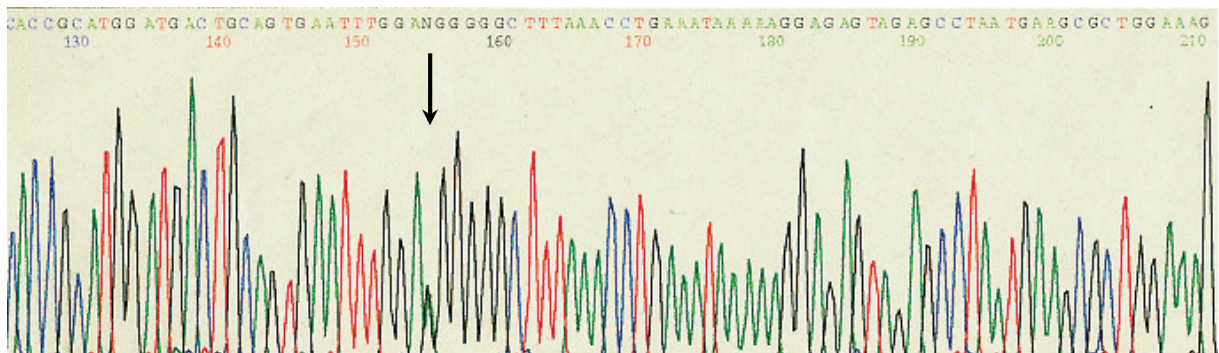


Abb. 4.40: Sequenzierung des PCR-Produktes der Familie 10 in *EXT1* Exon 6; der Pfeil kennzeichnet die Veränderung. Zu sehen ist die Reverse-Sequenz.

Dieser Basenaustausch der Familie 10 und 1 im Exon 6 c.1431C>T wurde bei den anderen Familienmitglieder der beiden betroffenen Familien auf der DHPLC untersucht und sequenziert. Es zeigte sich, dass auch nicht betroffene Familienangehörige diesen Basenaustausch tragen.

Im Exon 6 von *EXT1* fand sich bei der Familie Nr. 3 eine Insertion an der Position c.1431_32insC (Abb. 4.41).

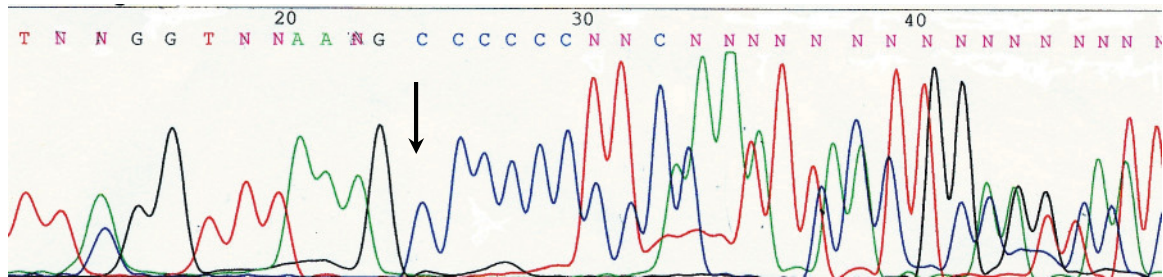


Abb. 4.41: Sequenzierung des PCR-Produktes der Familie 3 in *EXT1* Exon 6; der Pfeil kennzeichnet die Veränderung. Die Insertion (an Aminosäure-Position 478) bewirkt einen vorzeitigen Kettenabbruch an der Aminosäure-Position 520.

Die Familie Z besitzt eine Frameshift-Mutation in *EXT1* Exon 7 an der Position c.1571-1584del. Es handelt sich um eine Deletion von 14 bp (Abb. 4.42).

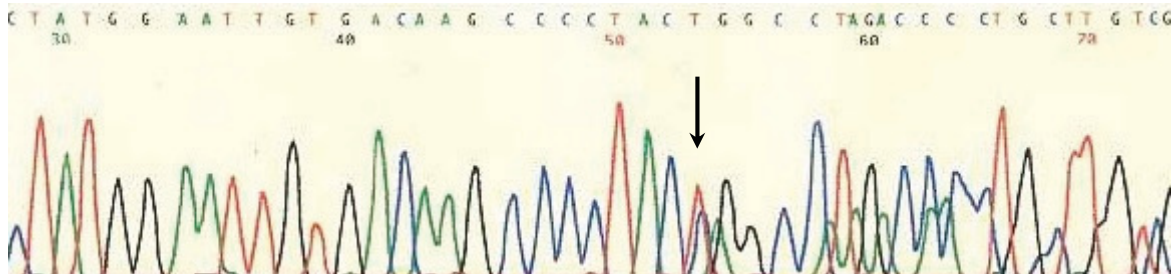


Abb. 4.42: Sequenzierung des PCR-Produktes der Familie Z in *EXT1* Exon 7; der Pfeil kennzeichnet die Veränderung. Diese Mutation (an Aminosäure-Position P524) führt zu einem vorzeitigen Kettenabbruch im Codon 535.

Familie Nr.2 weist eine Deletion an Position c.1645del C im Exon 8 auf (Abb. 4.43).

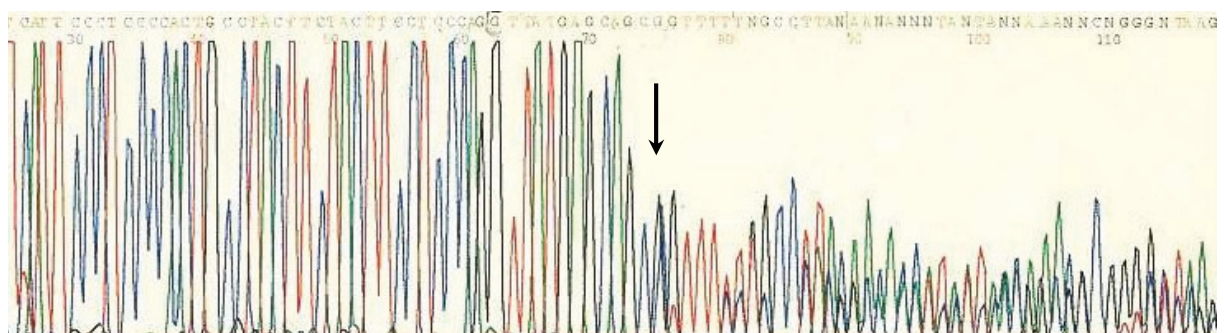


Abb. 4.43: Sequenzierung des PCR-Produktes der Familie 2 in *EXT1* Exon 8; der Pfeil kennzeichnet die Veränderung. Die Mutation (an Aminosäure-Position R549) führt zu einem vorzeitigen Kettenabbruch im Codon 620

Im Gen *EXT2* auf Chromosom 11 fanden sich bei sechs untersuchten Personen zwei Mutationen. Exon 2 beherbergt eine Deletion G an der Position c.63delG in der Familie 8 (Abb. 4.44.).

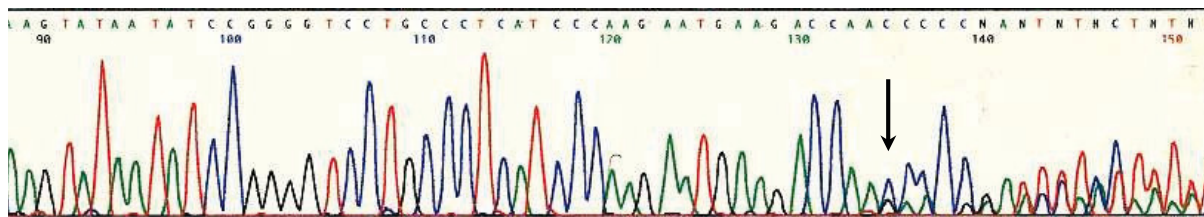


Abb. 4.44: Sequenzierung des PCR-Produktes der Familie 2 in *EXT2* Exon 2; der Pfeil kennzeichnet die Veränderung. Die Veränderung (Codon 21) führt zu einem vorzeitigen Kettenabbruch im Codon 58.

Bei der Familie 4 wurde eine Deletion G an Position c.589delG in *EXT1* Exon 8 detektiert (Abb. 4.45.).

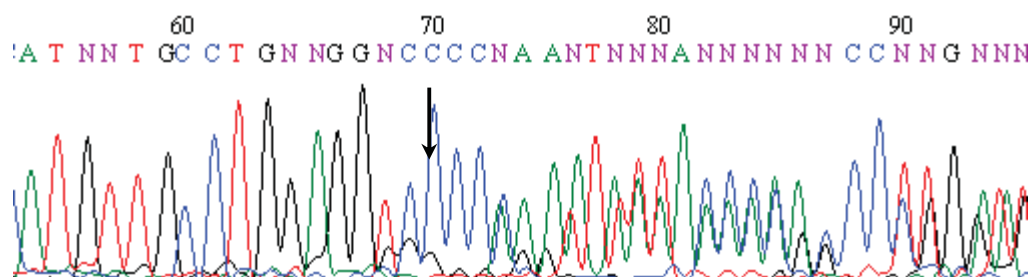


Abb. 4.45: Sequenzierung des PCR-Produktes der Familie 2 in *EXT1* Exon 8; der Pfeil kennzeichnet die Veränderung. Der Austausch (Im Codon 197) bewirkt einen Kettenabbruch im Codon 269

Tabelle 4.2 fasst die Ergebnisse der Sequenzierungen in den Genen *EXT1* und *EXT2* zusammen.

Familie	Lokation	Art der Mutation	DNA Änderung	Protein Änderung
11	<i>EXT1</i> , Exon 1	Frameshift	c.115delG	E39fsX135
7	<i>EXT1</i> , Exon 1	Missense	c.122G>A	S41N
10	<i>EXT1</i> , IVS 5 <i>EXT1</i> , Exon 6	Spleiß Missense	c.1417+2T>G c.1431C>T	P477P
3	<i>EXT1</i> , Exon 6	Frameshift	c.1431_32insC	S478fsX520
Z	<i>EXT1</i> , Exon 7	Frameshift	c.1571_1584del	P524fsX535
2	<i>EXT1</i> , Exon 8 <i>EXT1</i> , Exon 6	Frameshift Missense	c.1645delC c.1431C>T	R549fsX620 P477P
8	<i>EXT2</i> , Exon 2	Frameshift	c.63delG	K21fsX58
4	<i>EXT2</i> Exon 3	Framshift	c.589delG	P197fsX269

Tabelle 4.2: Mutationsdetektion; Position der Mutation und die Auswirkung auf die Translation

4.2.1.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Für die Untersuchungen zur Geno- und Phänotyp-Korrelation standen 11 Familien zu Verfügung. Außerdem wurde eine weitere betroffene Person in die Analysen einbezogen. Die Analysen zur Kopplung ließen in 9 der 11 Familien entweder *EXT1* oder *EXT2* ausschließen. In der Familie Nr. 12 war eine Kosegregation zu beiden Genen *EXT1* und *EXT2* möglich. In der Familie Nr. 1 war eine Kosegregation zu *EXT1*, *EXT2* und *EXT3* möglich. Insgesamt ergaben sich dadurch 7 *EXT1*-Familien mit 19 betroffenen Mitgliedern und 4 *EXT2*-Familien mit 17 betroffenen Angehörigen. In den 9 identifizierten Familien wurden 7 neue Sequenzveränderungen der DNA (6 *EXT1*, 1 *EXT2*) gefunden. In der Familie Nr. 7 wurde eine Missense-Mutation bei dem betroffenen Elternteil, aber nicht bei den betroffenen Kindern gefunden.

Zur Auswertung der Studie wurden verschiedenen Parameter herangezogen. Das Geschlecht und das Alter bei der Untersuchung waren in beiden *EXT1*- und *EXT2*-Gruppen ähnlich (42% zu 47% weiblich; mittleres Alter bei der Untersuchung 34 zu 33 Jahren). Andere Kriterien waren Alter bei der Diagnose, die Anzahl der Osteochondrome, die Statur (Percentile), Grad der Deformation, Grad der Extremitätenverkürzung, Länge der Elle und Einschränkung der Beweglichkeit.

Diese Werte wurden für *EXT1*- und *EXT2*-Betroffene in Relation gesetzt und statistisch ausgewertet. Als einziger Parameter dieser Arbeit trennte die Länge der Ulna (in %) *EXT1*- von *EXT2*-Familien. Die mittlere Spanne überlappte zwischen den beiden Gruppen nicht (*EXT1*: Spanne 11,5- 13,9; *EXT2*: spanne 14,3- 15,2). Die Unterschiede der Ulnalänge (in %) war statistisch signifikant. Alle anderen Parameter unterschieden sich nicht signifikant, jedoch zeigte sich eine Tendenz, dass *EXT1*-Familien mehr Osteochondrome bilden, von kleinerer Statur sind, häufiger Knochdeformationen auftreten und mehr funktionelle Beeinträchtigungen zeigen als *EXT2*-Patienten.

	<i>EXT1</i> N=19	<i>EXT2</i> N=17	p-values	Bonferroni adjusted p-values
Geschlecht weiblich/männlich	8/11	8/9		
Alter bei Untersuchung (Jahren) Median Range	34 5-72	33 3-67		
Anzahl der Osteochondroma Median range	14 4-45	10 2-20	0.14	1
Alter bei Diagnose (Jahren) Median Range	4.75 1-25	4 2-19	0.67	1
Statur Percentile Median Range	26 <1-88	32 2->99	0.23	1
Grad an Deformation* Median Range Ulnar Länge% * Gliedermaßenverkürzung Knie deformation *	4 2-12	2 0-11	0.02 0.003 0.08 0.71	0.26 0.04 1 1
Ulna/height ratio (%)* Alle Individuen (beide Unterarme) Median aller Individuen Range aller Individuen Median des familiären Medians Range des familiären Medians Indexpatient aller Familien (median beider Unterarme)	13.0 11.5-17.0 13.3 11.5-13.9 11.5 11.5 11.85 12.25 12.6 12.9 13.75	14.5 11.7-17.0 14.4 14.3-15.2 13.9 14.6 15.2 15.7	0.00001	0.00013
Verkürzung der Extremitäten ≥ 2cm Oberarm Untearm Oberschenkel Unterschenkel	16 4 7 3 1	10 1 4 2 1	0.39	1
Funktionelle Einstufung* Median Range Unterarm: Spanne der Rotation * Ellenbogen: Spanne der Beweglichkeit * Knie: Spanne der Beweglichkeit *	6 0-12	4 2-8	0.08 0.07 0.86 0.25	1 0.91 1 1
Chondrosarcome	1	1		

Tabelle 4.3: Phänotyp Parameter von *EXT1* versus *EXT2* Patienten. *nach Porter et al., 2004

4.2.2 Etablierung von Zelllinien aus Osteochondroma-Tumoren

Zur Etablierung der Chondrozyten-Zellkultur erfolgten Voruntersuchungen mit dem Ziel die beste Präparationsmöglichkeit zu finden. Dafür wurden Analysen zum Vorverdau mit Collagenase vorgenommen und unterschiedliche Medien mit unterschiedlichem Gehalt an fetalem Kälberserum getestet. Bei der Präparation wurde das Knorpelgewebe mechanisch zerkleinert. Die beste Methode war nach der mechanischen Präparation ein Vorverdau mit Collagenase 4 für 3 Stunden bei 37 °C. Kultiviert wurde anschließend in DMEM-Medium mit hohem Glukosegehalt, einem Gehalt an Kälberserum von 18 % und einem Magnesiumchlorid-Gehalt von 1,5 %. Angezüchtet wurde in 25 cm² Kulturfläschchen. Das erste Passagieren erfolgte dann in 4x 75 cm² Kulturflaschen, um große Mengen an Knorpelzellen zur RNA-Extraktion (100µg RNA) anzuzüchten. Diese Prozedere war notwendig, um der Dedifferenzierung entgegen zu wirken. Abbildung 4.46. zeigt eine Chondrozyten Kontroll-Kultur (A) und 2 Tumorzelllinien (B+C).

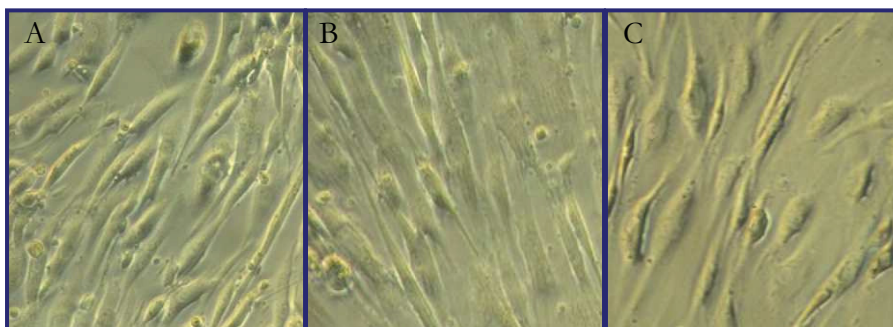


Abb 4.46.: Chondrozyten in Monolayerkultur; A: normale Knorpelzellen; B+C: Tumorzellen. Vergrößerung: 250fach

Chondrozyten bilden in Monolayerkulturen lanzettförmige Zelltypen. Sie wachsen besonders gut in räumlicher Nähe zueinander. Mikroskopisch sind keine deutlichen Unterschiede zu „normalen“ Chondrozyten zu erkennen. Aber in Kultur wuchsen die hier angezüchteten Tumorzellen in einigen Fällen sehr schlecht. Insgesamt wurden Kulturen von 20 Osteochondromen erfolgreich angelegt und konserviert.

4.2.3 Expressions-Analysen mittels Array-Hybridisierung

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Genen an der Proliferation und Differenzierung von Knorpelzellen beteiligt sind (Abschnitt 1.4.). Um die Gen-Expression auf breiter

Ebene zu analysieren werden cDNA-Analysen auf einem cDNA-Array durchgeführt. Für die auswärtigen Arrayuntersuchungen bei der Firma MWG wurden je 100 µg RNA von 4 Tumor-Proben und 1 Kontroll-Probe eingesendet. Die Markierung, die Hybridisierung, das „Scanning“ und die Auswertung wurden dort vorgenommen.

Um die bestmögliche Hybridisierungs-Methode zu finden, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Eine Cy3-Markierung für 4 Tumor- und 1 Kontrollprobe, eine Cy3-Markierung für 1 Tumorprobe und Cy5-Markierung für 1 Kontrollprobe und ein so genannter „dye-swap“, d. h. ein Wechsel der Markierung von Cy3-Markierung für 1 Tumor- und Cy5-Markierung für 1 Kontrollprobe und umgekehrt die Cy5-Markierung für die Tumorprobe und die Cy3-Markierung für die Kontrollprobe bei vorheriger T7-Amplifikation, da für diese Art der Analyse nur 10 µg RNA benötigt wurden. Die anderen Ansätze benötigten jeweils 100 µg RNA. Die T7-Amplifikation bewirkte bereits optisch eine deutliche Verfälschung der Ergebnisse. Beim T7-dye swap waren 166 Gene herunter- und 149 hochreguliert. Dabei gab es aber nur 1 Übereinstimmung mit den herunterregulierten Genen und 2 Übereinstimmungen bei den hochregulierten Genen der Cy3-Markierung. Die Abbildung 4.47. verdeutlicht die Differenzen der unterschiedlichen Markierungen anhand der Kontroll-Knorpelprobe.

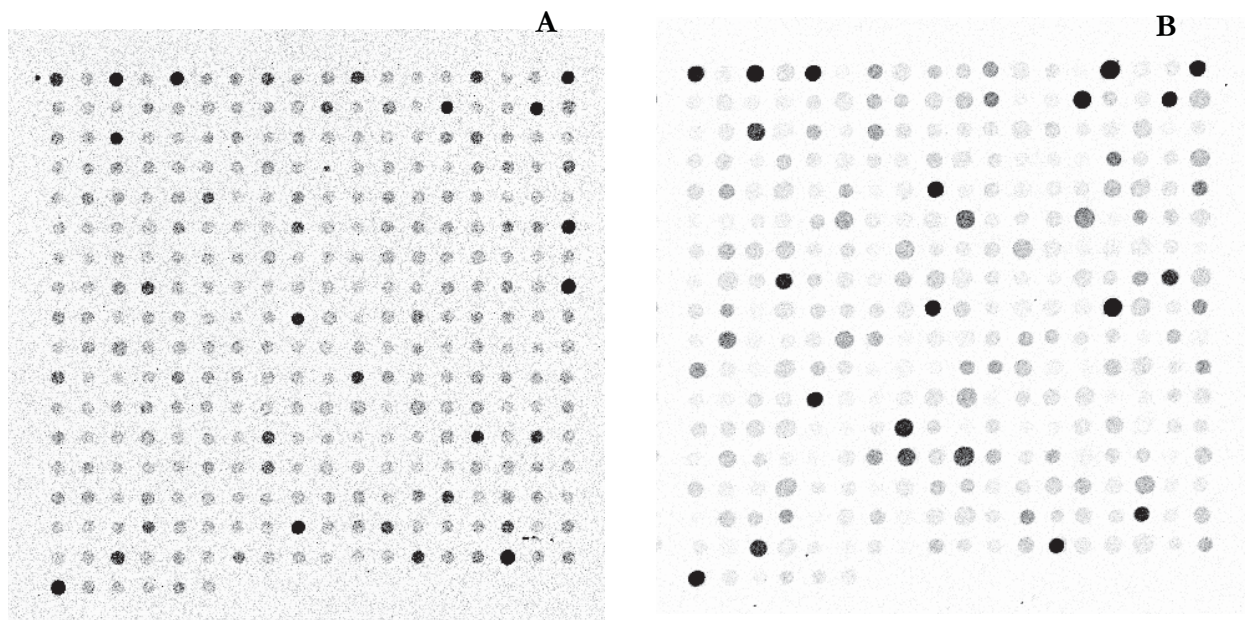


Abb. 4.47: Scanner-Bild der Knorpel-Kontrollprobe mit Cy3 (A) oder T7-Amplifikation-Cy3 (B).

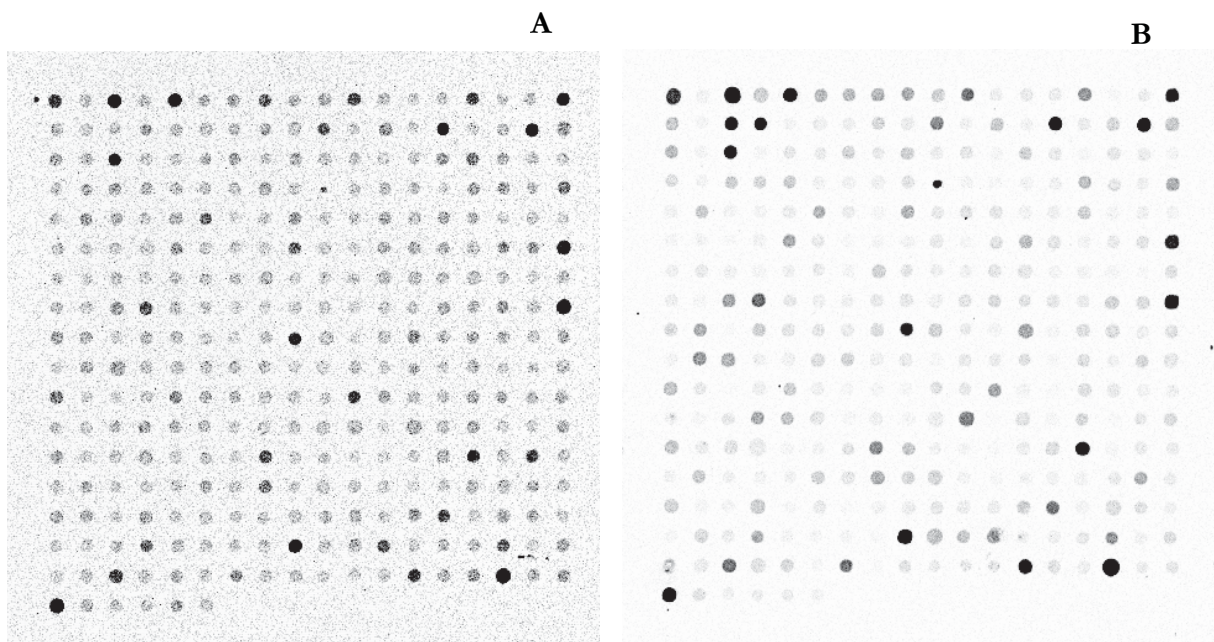


Abb 4.48.: Scanner-Bilder der Knorpel-Kontrollprobe mit Cy3 (A) oder Cy5 (B) markiert.

Vergleiche der Einzelhybridisierung (Cy3) zu Kohybridisierung (Cy3/Cy5) ergaben eine Übereinstimmung in der Ratio von 5 hochregulierten und 20 herunterregulierten Genen. Es zeigte sich eine Verschiebung zu Gunsten der herunterregulierten Gene. Die Abbildung 4.48. zeigt einen Vergleich der Kontroll-Knorpelprobe mit unterschiedlichen Markierungen. Bei der Kohybridisierung zeigen sich Verschiebungen zugunsten herunterregulierter Gene. Im Vergleich von Einzel-Markierung zu Kohybridisierung ergaben sich 136 herunter und 219 hochregulierte Gene in der Einzel- (Cy3)- und 4135 herunter und 96 hochregulierte Gene. Übereinstimmung zeigen nur 5 hochregulierte und 20 herunterregulierte Gene.

Die Einstufung hoch oder herunterreguliert ergab sich aus dem Vergleich der 4 Tumorproben zur Kontroll-Knorpelprobe. Wenn alle 4 Tumorproben um den Faktor mindestens 2 höher lagen als die Kontroll-Probe wurde das betreffende Gen als hochreguliert angesehen. Ähnlich verhielt es sich mit den herunterregulierten Genen. Die Tumorproben mussten alle um den Faktor mindestens 0,5 geringer als die Kontrollprobe sein.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Cy3-Markierung die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferten.

Insgesamt waren 57 Gene in allen 4 Exostosen hochreguliert (ration>2), darunter z. B. *BMP 7* und *Cyclin D1*. Beide Gene stehen mit der Entwicklung von Knorpel im Zu-

sammenhang. Herunterreguliert waren 29 Gene (ration $<0,5$), darunter *Decorin*, *Cathepsin D*, *Matrix Metalloproteinase 2 (MM2)* oder *Kollagen Typ 12*.

4.2.4 Expressionsanalysen mittels quantitativer real-time-PCR

Aus den Ergebnissen der Array-Analyse wurden Gene, die mit der Knorpelentwicklung oder mit deren Signalwegen im Zusammenhang stehen, ausgewählt. In einer quantitativen Bestimmung wurde die Expression der Gene *IHH*, *Decorin*, *Cathepsin D*, *MM2*, *Collagen Typ 12*, *PTHrP* und *Cyclin D1* in den 4 Tumorproben im Vergleich zur Kontroll-Knorpelprobe gemessen. Die Berechnung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte ist in Abschnitt 3.9.2. beschrieben. Folgende Gene zeigten im Vergleich zur „normalen“ Knorpelprobe eine verringerte Expression (Abb. 4.49., Tab. 4.4.).

o *Decorin*

Gegenüber dem Wildtyp sind die einzelnen Tumorproben um 0,08- 0,13 fach erniedrigt

- o *Cathepsin D* war um 0,21- 0,35 herabgesetzt;
- o *Collagen Typ 12* zwischen 0,39 und 0,68 verringert;
- o *Metalloprotease 2* um 0,15-0,51 fach erniedrigt und
- o *IHH* 0,07- 0,24 fach herabgesetzt (Abb 4.30.)

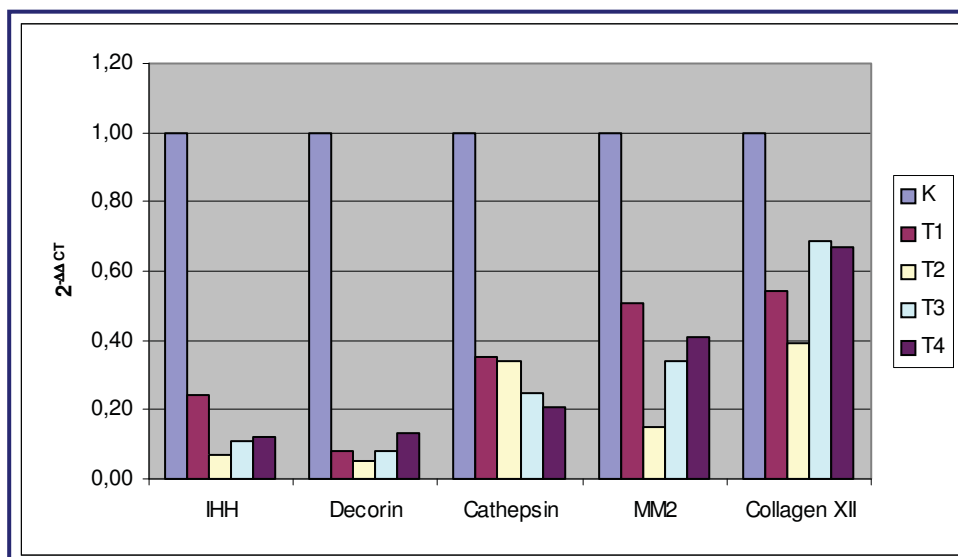


Abb.: 4.49. Expression von *IHH*, *Decorin*, *Cathepsin D*, *MM2*, *Collagen Typ12*
K=Kontrolle; T1-4=Tumormaterial

Gene, welche im Vergleich zur „normalen“ Knorpelprobe eine erhöhte Expression zeigen waren:

- *PTHrP* erhöhte Expression um den Faktor 1,12- 2,68
- *Cyclin D1* Erhöhung zwischen 2,35 und 6,76 (Abb. 4.50).

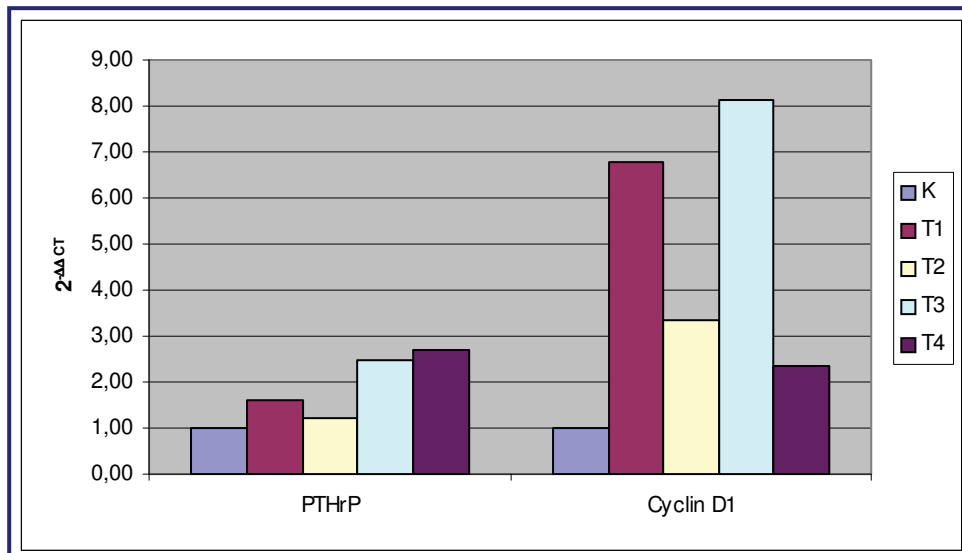


Abb.: 4.50. Expression von *PTHrP* u. *Cyclin D1* in den verschiedenen Tumoren
K=Kontrolle; T1-4=Tumormaterial

EXT1 war bei der Array-Analyse weder hoch- noch herunterreguliert. In der quantitativen realtime-PCR zeigt dieses Gen in zwei Fällen ein um 0,8- bzw. 0,85-fach verringerte Expression und zweimal eine um 1,82- bzw. 1,17-fach erhöhte Expression (Abb. 4.51.).

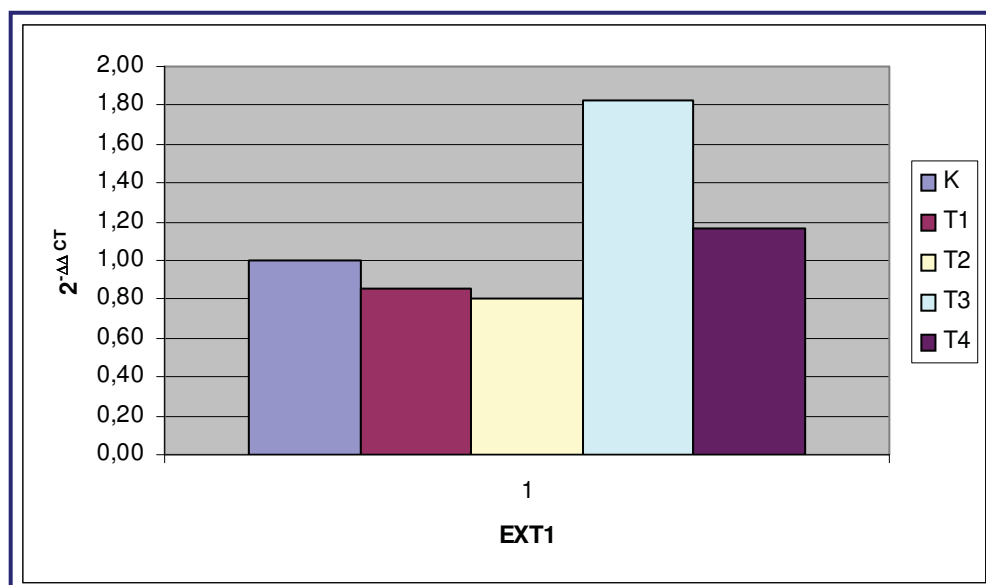


Abb.: 4.51. Expression von *EXT1*; K=Kontrolle, T1-4=Tumormaterial

Die einzelnen Gene zeigten bei der Expression in den einzelnen Tumoren starke Schwankungen. Am stärksten sind diese in den Genen *MM2* und *IHH*. Die Schwankungen liegen, zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert in den Tumorproben, um den Faktor 3,4 auseinander. Es folgt das Gen *Cyclin D1* mit dem Faktor 2,88. Die Gene *PTHrP* und *EXT1* schwanken um den Faktor 2,4 und 2,2 und die Gene *Cathepsin D* und *Kollagen Typ 12* differieren um die Faktoren 1,67 und 1,74.

EXT2 konnte nicht näher untersucht werden, da es nicht auf dem Array repräsentiert war noch gab es die Möglichkeit zur quantitativen Untersuchung, da dieser Assay nicht angeboten wurde.

Tabelle 4.4. listet die Daten der individuellen Expressionsmuster von Kontroll- und Tumorproben auf.

$2^{-\Delta\Delta CT}$	<i>EXT1</i>	<i>IHH</i>	<i>PTHrP</i>	<i>Decorin</i>	<i>Cathepsin</i>	<i>MM2</i>	<i>Collagen 12</i>	<i>Cyclin D1</i>
K	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
T1	0,85	0,24	1,61	0,08	0,35	0,51	0,54	6,76
T2	0,80	0,07	1,21	0,05	0,34	0,15	0,39	3,33
T3	1,81	0,11	2,46	0,08	0,25	0,34	0,68	8,13
T4	1,18	0,12	2,68	0,13	0,21	0,41	0,67	2,35

Tab. 4.4: Ergebnisse der Expression von 1 Kontrollprobe und 4 Tumorproben.

4.2.5 Expressionsanalysen mittels Immunfluoreszenz-Färbung

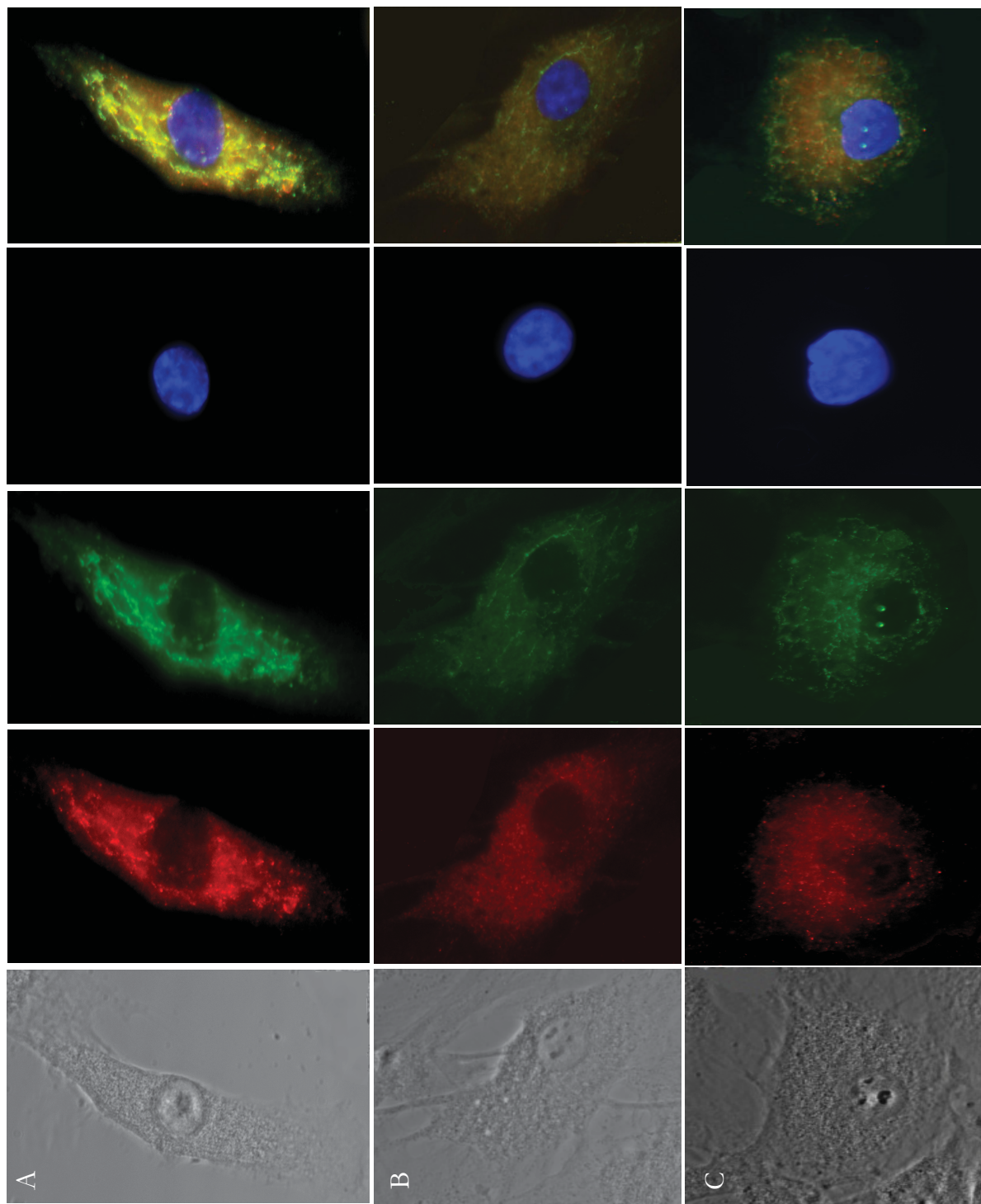
Zur Darstellung des Proteins *EXT1* in den adherenten Knorpelzellen sollten Western Blot-Analysen durchgeführt werden. Da es aber nicht gelang über diesen Weg das Protein nachzuweisen, sollte dies über eine Immunfluoreszenz-Färbung geschehen.

Untersucht wurde die Expression von *EXT1* in Knorpelzellen und Tumorzellen durch einen Antikörper gegen *EXT1*. Zur besseren Orientierung in der Zelle wurde ein zweiter Antikörper gegen ein im Endoplasmatischen Retikulum (ER)-gebundenes Protein (*Calnexin*) eingesetzt, da *EXT1* ebenfalls ER-gebunden ist. In der Kontrollzelllinie ließ sich *EXT1* gut entlang des ERs darstellen. In den Tumorzelllinien ist die Verteilung von *EXT1* diffus. Klare Strukturen wie bei der Kontrolle lassen sich nicht darstellen. In den Abbildungen ist das *EXT1*-Protein und dessen Verteilung in der Zelle in rot

dargestellt. Calnexin durch die Cy3-Markierung ist grün dargestellt. Der Kern wird durch DAPI-Färbung blau angezeigt.

Das fünfte Bild in der Abbildung 4.52. zeigt eine überlagerte Darstellung der drei Färbemethoden.

Abb. 4.52: Immunfluoreszenz-Färbung in humanen Knorpel- und EXT1-Tumorzellen.
 A: Kontroll Knorpelzelle; B + C: EXT1-Tumorzelle
 rot= EXT1-Protein; grün= ER-Marker (Calnexin); Blau= Dapi-Kernfärbung; grau= Phasenkontrastabbildung



5 Diskussion

5.1 Analysen des humanen MMR-Proteins MLH1

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen der westlichen Industrienationen. Bei ca. 20 % wird ein familiärer Hintergrund angenommen und ca. 10 % aller familiären kolorektalen Karzinome gehen mit dem Krankheitsbild HNPCC einher. Bei Betroffenen mit familiärem Hintergrund steigt das Risiko an Dickdarmkrebs zu erkranken auf 80 % (Engel 2008, Rutsgi 2007). HNPCC wird durch Keimbahnmutationen in den DNA-Reparatur-Genen ausgelöst. Bisher wurden Mutationen in den Genen *MLH1* (60% der Familien), *MSH2* (30% der Familien), *MSH6* und *PMS2* festgestellt. Durch die molekulare Gendiagnostik können Risikopersonen identifiziert werden. In Deutschland wird diese Diagnostik flächendeckend in verschiedenen Zentren u. a. im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Düsseldorf angeboten. Für den Molekulargenetiker liegt die Schwierigkeit des Gentests in der Befundinterpretation der genetischen Analyseergebnisse: Eindeutig pathogene Mutationen (Frame-Shift-, Spleiß- und Kettenabbruch-Mutationen) ermöglichen eine relativ sichere Einschätzung. Vollkommen unklar dagegen ist die Bedeutung vieler Missense-Mutationen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe verschiedener funktioneller Analyseverfahren eine erste Bewertung von Missense-Mutationen im *hMLH1*-Gen bezüglich ihrer Pathogenität vorgenommen werden. Im Folgenden werden die Daten der verschiedenen Untersuchungsmethoden dargestellt und eine Einschätzung dieser Methoden in Bezug auf ihre Aussagekraft vorgenommen.

5.1.1 Übersichtsliste von Missense-Mutationen im MMR-Protein hMLH1

Zunächst wurde eine Übersichtsliste erarbeitet, die sämtliche Missense-Mutationen enthält, die bei Patienten des deutschen HNPCC-Konsortiums gefunden wurden, sowie in der Literatur beschriebene Mutationen im Gen *hMLH1*. Weiterhin sind die Analyseverfahren und die Ergebnisse notiert, mit denen einzelne Mutationen bereits untersucht wurden. Aus dieser Liste sind für diese Arbeit Missense-Mutationen ausgewählt worden, die beim Deutschen HNPCC-Konsortium registriert und noch keiner weiteren Analyse zugeführt worden waren. Ein zweites Kriterium war, dass diese Mu-

tationen in der ATPase- oder der Interaktionsdomäne von h*MLH1* liegen. Insgesamt wurden 17 Missense-Mutationen für die Analysen ausgewählt; 9 aus der Interaktions- und 8 aus der ATPase-Domäne, da es sich bei diesen beiden Domänen um hoch konservierte Bereiche des h*MLH1*-Gens handelt. 11 Missense-Mutationen, die bei Patienten des deutschen Konsortiums gefunden wurden, sind bisher nicht in der Literatur untersucht worden. Dies sind A21E, Q48P, G101V, N551S, Q562P, L582P, K618R, P640L, P640S, L676P und Q689R. Die Übersichtstabelle findet sich im Anhang II.

5.1.2 Einfluss von h*MLH1*-Missense-Mutationen auf die Interaktion mit h*PMS2*

Die durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen untersuchen den Einfluss der 17 Missense-Mutationen auf die Interaktion zwischen humanem *MLH1* und humanem *PMS2*, welche für die Funktion des h*MLH1*-Proteins erforderlich ist.

Im X-Gal-Overlay zeigen M35R, Q48P, A586P und P640L keine Interaktion mit h*PMS2*. Reduzierte Interaktionen zeigen P28L und P640S. Wie der Wildtyp verhalten sich die h*MLH1*-Varianten N64S, F80V, K84E, G101V, N551S, Q562P, P603R, K618R, A681T und Q689R. Mit diesem Analyseverfahren lassen sich nur qualitative Aussagen treffen. Es gibt kein breites Spektrum für Einstufungen, da gute keine Unterscheidung der „Blaufärbung“ möglich ist. Die Ergebnisse werden 12 h nach Überschichtung abgelesen. Innerhalb dieser Zeitspanne wurden die Ergebnisse nicht verfolgt. Daher kann keine Aussage getroffen werden, ob Unterschiede in der Umsetzung des Substrats in Abhängigkeit von der Zeit vorliegen. Außerdem ist die eingesetzte Proteinmenge nicht bekannt. Eine sichere Beurteilung zur Pathogenität der *MLH1*-Varianten lässt sich mit dieser Versuchsanordnung daher nicht erzielen. Allerdings deutet sich für die Varianten, die keine Interaktion zeigen, die Tendenz „nicht funktionell“ an.

LacZ-Assay		
Allel	qualitativ	quantitativ
WT	+++	100%
lexA	-	3%
A21E	+++	70%
P28L	(+)	4%
M35R	-	3%
Q48P	-	3%
N64S	+++	53%
F80V	+++	275%
K84E	+++	99%
G101V	+++	13%

Tabelle 5.1: Vergleich der qualitativen und quantitativen LacZ-Aktivität

Die quantitative Bestimmung der lacZ-Aktivität sollte eine bessere Differenzierbarkeit der hMLH1-Varianten liefern. Die Varianten P28L, M35R und Q48P zeigen in der quantitativen Bestimmung keine Interaktion; die gemessenen Werte liegen bei 1-2 % des Wildtyp-Wertes. Somit besteht hier eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des X-Gal-Overlays. Insgesamt allerdings zeigen Varianten, die sich im X-Gal-Overlay wie der Wildtyp verhalten, mit Werten von 13 – 275 % große Unterschiede bei den quantitativen Messungen (Tabelle 5.1.). Deshalb ist mit dieser Methode eine Einstufung in stark reduziert bis leicht reduziert im

Vergleich zu Wildtyp möglich. Interessanterweise zeigt die MLH1-Variante F80V eine stärkere Interaktion mit hPMS2 als Wildtyp-MLH1. Es ist durchaus denkbar, dass auch diese zu starke Interaktion von MLH1 und PMS2 die Funktion des Reparatursystems beeinflusst und diese Mutation daher ebenfalls als pathogen einzustufen ist.

Die quantitative Bestimmung der lacZ-Aktivität mit MLH1-Varianten, die Mutationen in der Interaktionsdomäne tragen, wurde von Heick durchgeführt (Diplomarbeit 2008). Im X-Gal-Overlay zeigen 9 von 18 Varianten die Blaufärbung wie der Wildtyp. 4 zeigen eine reduzierte und 5 keine Interaktion. Vergleiche mit der quantitativen lacZ-Bestimmung belegen, dass bei Aktivitäten von 11 % keine Unterscheidung der Varianten vom Wildtyp im X-Gal-Overlay möglich sind, d. h. trotz einer Reduktion von 90 % der Interaktionsfähigkeit ist optisch beim X-Gal-Overlay eine Wildtyp-Funktion anzunehmen.

Wie erwartet ist der große Vorteil der quantitativen Bestimmung der LacZ-Aktivität gegenüber dem X-Gal-Overlay die Sensitivität, die eine bessere Differenzierbarkeit gegenüber Wildtyp zulässt.

5.1.3 Missense-Mutationen in der ATPase-Domäne können einen Mutatoreffekt in Hefe auslösen

Es ist gut untersucht, dass Mutationen in *MLH1*, die zu einem inaktiven Protein führen, oder der Verlust der *MLH1*-Expression infolge von Hypermethylierung des Promotors das MMR-System inaktivieren und zur Genominstabilität führen können (Fox et al. 2006, Murata et al. 2002). Die verschiedenen Daten der Literatur verdeutlichen, wie wichtig die Balance zwischen den einzelnen MMR-Proteinen für ein exakt arbeitendes MMR-System ist.

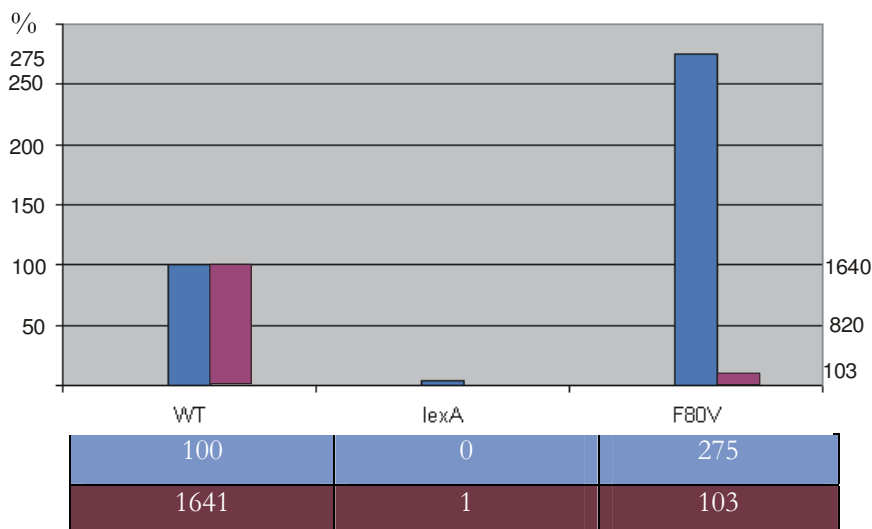
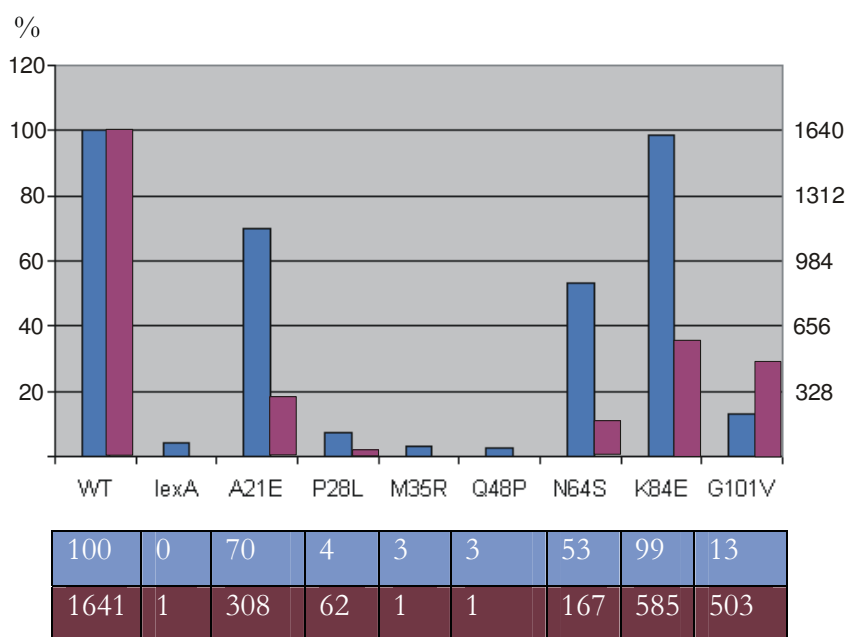
Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Überexpression einiger Gene des MMR-Systems zu einer Genominstabilität führen kann und einen deutlichen Mutatoreffekt auslösen. *hMLH1* kann einen solchen Effekt in Hefe auslösen. Bei der Überexpression von humanem *MSH2* in Hefe ist dieser Effekt nicht zu beobachten (Drotschmann et al. 1999). Allerdings kann in Koexpression mit *hMSH3* oder *hMSH6* ein Mutatoreffekt für *hMSH2* beobachtet werden (Diplomarbeit Herbst 2006). Untersuchungen mit *hMSH3* zeigen, dass es zu einer verstärkten Interaktion von *hMSH2* und *hMSH3* kommt, falls *hMSH3* überexprimiert wird, und auf diese Weise die Interaktion mit dem Interaktionspartner *hMSH6* herabgesetzt wird (Marra et al 1998).

Aufgrund der starken Homologien zwischen humanem und Hefe *MLH1* wird angenommen, dass überexprimiertes humanes *MLH1* mit anderen Proteinen des MMR-Systems um Interaktionspartner (vor allem *yPms1p*) konkurriert (Shcherbakova et al. 1999). Diese Tatsache wurde in dieser Arbeit genutzt, um die *MLH1*-Varianten aus der ATPase-Domäne funktionell in *in vivo*-Untersuchungen zu testen.

Die Mutationen P28L, M35R und Q48P können im Vergleich zum *hMLH1*-Wildtyp keinen Mutatoreffekt auslösen, d. h. es handelt sich um nicht funktionelle Aminosäure-Austausche. Die anderen Mutationen können nur schwache bis mittlere Mutatoreffekte auslösen, d. h. sie erreichen nicht die Größenordnung des Wildtyp-Mutatoreffektes. Daraus lässt sich folgern, dass diese *MLH1*-Varianten in ihrer Funktion teilweise beeinträchtigt sind. Für die Mutationen P28L, M35R und Q48P zeigen die Ergebnisse die gleiche Tendenz: „nicht funktionell“.

5.1.4 Die Ergebnisse von Interaktionsassay und Mutatoreffekt liefern widersprüchliche Aussagen

Vergleiche des Interaktionsassays mit den Analysen zum dominant negativen Mutatorphänotyp liefern keine übereinstimmenden Ergebnisse. Die Allele P28L, M35R und Q48P weisen in die gleiche Richtung, aber bei den anderen Mutationen sind die Ergebnisse weniger konform und daher schwieriger zu interpretieren. So zeigt der Aminosäure-Austausch A21E mit 70% Interaktion zwischen MLH1 und PMS2 einen um etwa 300fach erhöhten Mutatoreffekt. Der Austausch K84E zeigt mit 99% Interaktion einen um fast 600fach erhöhten Mutatoreffekt. Der Austausch G101V mit einer Interaktion von nur 13 % erzeugt eine Erhöhung des Mutatoreffektes von etwa 500fach im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Abb. 5.1.).



Auf der anderen Seite zeigt F80V einen extrem kleinen dominanten Mutatoreffekt ca. 100fach bei einer Interaktion mit hPMS2 von 275 % aus (Abb. 5.2.). Für die Interpretation dieser Mutation stellt sich die Frage, welcher Assay wie zu bewerten ist.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen für P28L, M35R N64S, F80V und K84E ebenfalls Mutatoreffekte (Wanat et al. 2007, Takahashi et al. 2007, Shimodaira et al. 1998, Shcherbakova et al. 1999, Ellison et al. 2004). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. Auch in *E. coli* löst der Aminosäure-Austausch K84E einen Mutatoreffekt aus und bedingt durch seine Lage im hoch konservierten Proteinbereich wird vermutet, dass direkt über Wasserstoffbrückenbindung die ATP-Bindung beeinflusst wird (Quaresima et al. 2003).

Missense-Mutationen aus der Interaktionsdomäne zeigen stringendere Ergebnisse. 14 von 18 (75 %) MLH1-Varianten in der Interaktionsdomäne büßen ihre Funktion ein (Heick Diplomarbeit 2008). Von diesen 14 zeigt fast die Hälfte im X-Gal-Overlay eine wildtypische Interaktion mit hPMS2. Ab einer LacZ-Aktivität von über 60 % können Mutatoreffekte ausgelöst werden. Nur 4 der 18 (ca. 22 %) Proteine mit Missense-Mutationen sind funktionell. Anders als bei Mutationen in der ATPase-Domäne sind die Mutatoreffekte so stark wie im Wildtyp. Eine Korrelation von lacZ-Aktivität und Mutatoreffekt lässt sich für den Austausch der Dimerisierungsdomäne also gut darstellen. Für die Mutationen in der ATPase-Domäne wurde dies nicht gefunden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass für Mutationen in der Interaktionsdomäne beide Assays gleichermaßen gut geeignet sind. Für Mutationen in der ATPase-Domäne könnten diese dagegen nur bedingt geeignet sein, wenn z. B. durch die Mutation eine Konformationsänderung eintritt und deshalb die Interaktion beeinflusst wird. In jedem Fall wäre die Funktion gestört.

Insgesamt sind die Übereinstimmungen zwischen den Daten des Hefe-Zwei-Hybrid- und des Mutator-Assays für Mutationen in der Interaktionsdomäne größer als für Mutationen in der ATPase-Domäne. Für Untersuchungen von Missense-Mutationen aus der Interaktionsdomäne ist die Kombination der Analyseverfahren, Bestimmung der LacZ-Aktivität und dominant negativer Mutatorphänotyp somit eine gute Wahl zur Einstufung der Funktionalität und damit auch der Pathogenität. Für Missense-Mutationen aus der ATPase-Domäne genügen diese beiden Untersuchungsmethoden nicht.

5.1.5 Proteinstabilität von Wildtyp-MLH1 und MLH1-Varianten

Die Einschätzung der Punktmutationen bezüglich ihrer Pathogenität mit Hilfe funktionaler Analysen wird dadurch erschwert, dass die mutierten Protein-Varianten in der Zelle unterschiedlich stabil sind. Daher ist es wichtig für alle Allele die Proteinmenge mittels Western Blot-Analysen zu bestimmen und in die Betrachtung zur Pathogenität mit einzubeziehen.

Der Proteinnachweis von MLH1 in Fusion mit *lexA* erwies sich im Western Blot als äußerst schwierig. Es mussten daher große Mengen Proteinextrakt im SDS-Gel eingesetzt und die Denaturierungstemperatur auf 65 °C herabgesetzt werden, um das Fusionsprotein letztendlich nachweisen zu können.

Bei Varianten aus der ATPase-Domäne lässt sich das Protein in 3 von 8 Allelen in beiden Hefestämmen (E134; L40) nicht nachweisen. Die fehlende Expression bei P28L, M35R und Q48P impliziert RNA und/oder Proteininstabilität und damit einen Verlust der Funktionalität. Die Proteinexpression für die Varianten A21E, N64S, F80V und G101V ist unterschiedlich und scheinbar abhängig von der Koexpression von hPMS2. Möglicherweise kann hPMS2 instabile hMLH1-Varianten in der Zelle stabilisieren und so vor dem Abbau schützen und möglicherweise auch Schutz vor Degradation bei der Proteinisolierung bieten. Die Intensitäten der Protein-Banden im Blot erscheinen im Stamm L40 in Kotransformation mit humanem Wildtyp-PMS2 stärker. Als eindeutig pathogen aufgrund der Proteinstabilität lassen sich demnach die Varianten P28L, M35R und Q48P einstufen. Für die anderen MLH1-Varianten aus der ATPase-Domäne bleibt die Charakterisierung unklar. Die Expression für A21E, N64S und G101V ist reduziert, jedoch bleibt die Frage, wie viel Protein für eine Funktion nötig ist. Eine wildtypische Expression zeigt nur die MLH1-Variante F80V, die nach dieser Analyse als nicht pathogen einzustufen ist.

Anders als bei Proteinen mit Mutationen aus der hMLH1-ATPase-Domäne kann bei Allelen mit Veränderungen in der Interaktionsdomäne die Proteinexpression „normal“, aber die Ergebnisse der Zwei-Hybrid- und der dominant negativen Mutator-Phänotyp-Analysen negativ sein (L574P, R659P, L676P, P648S und P654L) (Heick Diplomarbeit 2008). Bei diesen Varianten ist der Verlust der Funktionalität also nicht auf den Verlust der Proteinstabilität zurück zu führen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sinnvoll erscheint die durchgeführten Western Blot-Analysen vor anderen funktionellen Studien durchzuführen. Fehlt das Protein, kann auf weitere Assays verzichtet werden, bei Proteinnachweis muss die Funktionalität des Proteins nachgewiesen werden.

5.1.6 Strukturelle 3D-Computer-Analysen der MLH1-Allele der ATPase-Domäne

Strukturelle Veränderungen von Proteinen können ebenfalls zum Funktionsverlust führen. Durch Konformationsänderungen kann die Fähigkeit zur Bindung anderer Interaktionspartner (z. B. auch ATP) beeinträchtigt oder sogar völlig zerstört werden. Inwieweit Missense-Mutationen im Bereich der ATPase-Domäne Einfluss auf die Konformation von hMLH1 haben können, kann mit Hilfe von Strukturvorhersageprogrammen analysiert werden. Die jeweiligen 3D-Modelle des MLH1-Proteins bzw. der Varianten wurden durch das Programm ESyPred3D erstellt. Als Vorlage wird aus der Proteindatenbank das bakterielle MutL-Fragment 1BKN Kette A (PDB-Identifikation) verwendet, dies entspricht den Aminosäuren 24-324. Erstellt wurde das Modell durch [ESyPred3D](#) und im PDB-Format ausgegeben (Lambert C et al. 2002). Die Darstellung der Proteine der HMLH1-Varianten erfolgte durch das Programm RasWin.

Alle 8 MLH1-Varianten aus der ATPase-Domäne zeigen demnach Veränderungen in der Konformation im Vergleich zu Wildtyp, was nicht verwundert, da eine Aminosäure ausgetauscht wird. Inwieweit diese theoretischen Betrachtungen tatsächlich mit der Funktion der Allele korrelieren, können nur experimentelle Untersuchungen zeigen. Strukturanalysen können dabei aber nützliche Hinweise zur Beurteilung der Funktionalität liefern, da das Ausmaß der Änderung sehr unterschiedlich sein kann. So können kaum sichtbare Veränderungen, z. B. die Änderung eines Turns eintreten, oder aber neue Faltblatt oder Helixstrukturen entstehen. Ausserdem ist bekannt, dass geladene Aminosäuren in der ATPase-Domäne sowohl im MLH1-Protein als auch in PMS-Proteinen, hoch konserviert sind (Plotz et al. 2006). Eine der hier identifizierten Mutationen betrifft eine solche positiv geladene Aminosäure (K84E). Der Austausch zu einer negativ geladenen Aminosäure könnte Einfluss auf die Konformation und damit auch auf die Funktionalität des Proteins nehmen.

5.1.6.1 Vergleichende strukturelle Untersuchungen

Es gibt einen Einfluss zwischen Konservierung und Funktion eines Proteins. Veränderungen in der Struktur können eine Veränderung der Funktionalität nach sich ziehen (Takahashi et al. 2007) Es wurden vergleichende strukturelle Analysen der MLH1-Varianten aus der ATPase-Domäne gegenüber Wildtyp-MLH1 vorgenommen um Vorhersagen zur Funktionalität machen zu können. In allen hMLH1-Allelen lassen sich strukturelle Veränderungen gegenüber hMLH1-Wildtyp aufzeigen. Die Strukturen sind so gedreht, dass die Änderungen optimal sichtbar werden (Abb. 5.3.-5.10.).

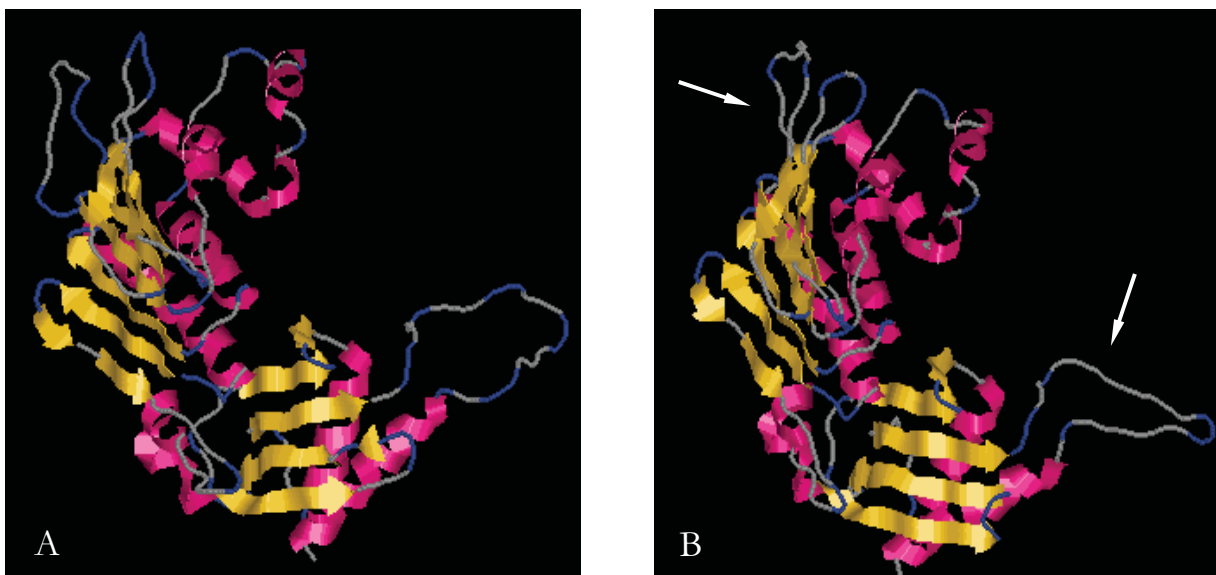


Abb. 5.3: 3D-Struktur des Aminosäure-Austausch A21E; A21E ist in der Grafik nicht zu sehen, da die gezeigte Sequenz erst mit der Aminosäure 24 beginnt; Pfeile deuten auf die strukturellen Veränderungen gegenüber Wildtyp; A= A21; B= E21. Alpha-Helices sind in magenta, β -Faltblattstrukturen in gelb dargestellt, „Turns“ sind in blau gekennzeichnet und alle übrigen Strukturen sind in weiß dargestellt.

In der Struktur der Aminosäureänderung A21E ist oben links und unten rechts in der Grafik eine Veränderung der Loop-Struktur zu erkennen. Der Bereich, in dem der Austausch liegt, ist in dieser Grafik nicht abgebildet (Abb. 5.3. B).

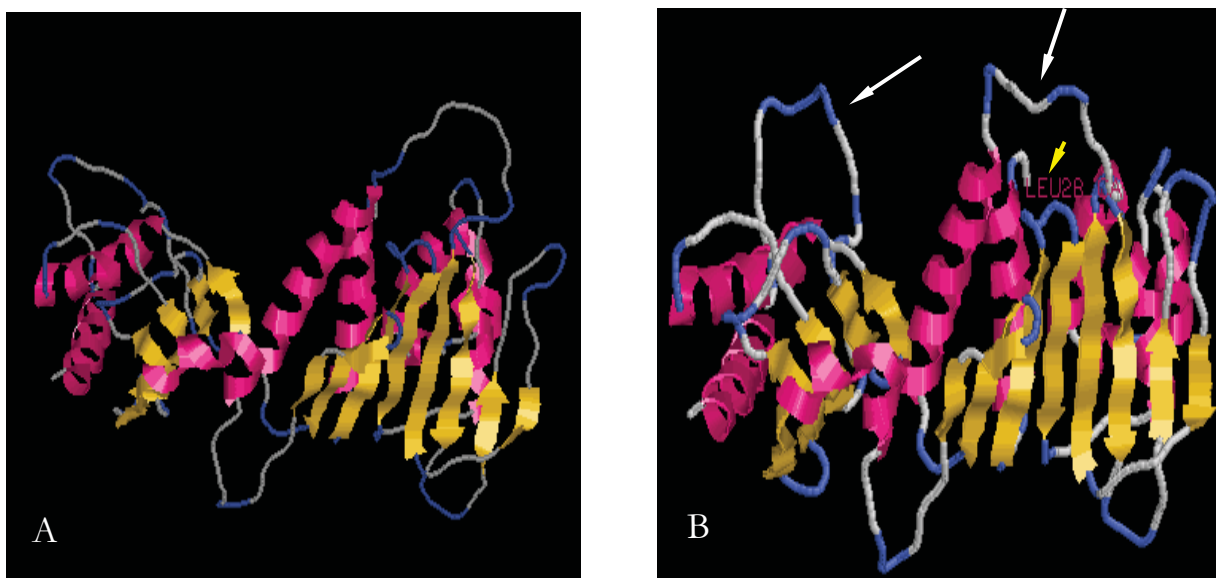


Abb. 5.4: 3D-Struktur des Aminosäure-Austausch P28L; weiße Pfeile deuten auf die strukturellen Veränderungen gegenüber Wildtyp; A= P28; B= L28; gelber Pfeil deutet die Position des Austausches an.

Im Allel P28L sind im oberen Bereich der Grafik Veränderungen in der Loop-Struktur zu erkennen (Abb. 5.4. B).

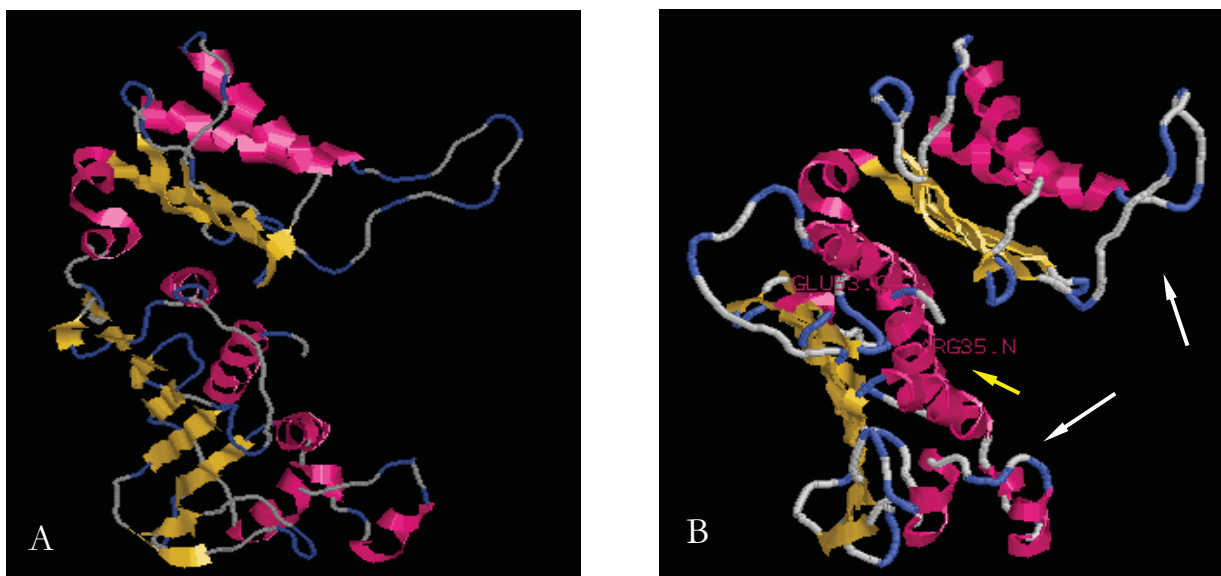


Abb. 5.5: 3D-Struktur der Aminosäure-Austausch M35R; weiße Pfeile deuten auf die strukturellen Veränderungen gegenüber Wildtyp; A= M35; B= R35; gelber Pfeil deutet die Position des Austausches an.

Im rechten Bereich der Grafik von M35R sind Veränderungen in Loop-Strukturen zu erkennen. Die Loops klappen zum Protein hin und das Protein wirkt insgesamt kompakter (Abb. 5.5. B).



Abb. 5.6: 3D-Struktur der Aminosäure-Austausch Q48P; weiße Pfeile deuten auf die strukturellen Veränderungen gegenüber Wildtyp; A= Q48; B= P48; gelber Pfeil deutet die Position des Austausches an.

In der Grafik des Allels Q48P ist auf der rechten Seite eine Loop-Struktur zum Protein hin eingeklappt. Auf der linken Seite ist eine Helix-Struktur im mittleren Bereich des Bildes entstanden und im Bereich unten links gibt es eine Veränderung in einem Turn (Abb. 5.6. B).

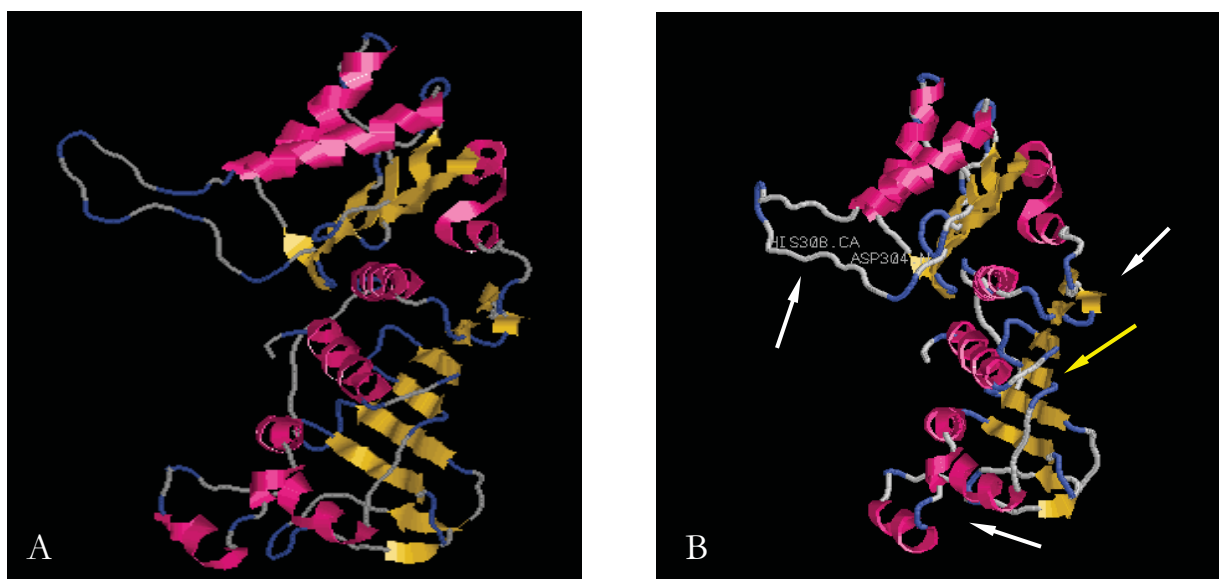


Abb. 5.7: 3D-Struktur der Aminosäure-Austausch N64S; weiße Pfeile deuten auf die strukturellen Veränderungen gegenüber Wildtyp; A= N64; B= S64; gelber Pfeil deutet die Position des Austausches an.

Die Veränderungen im Allel N64S sind nicht sehr deutlich. Eine loop-Struktur auf der linken Seite der Grafik ist verändert und im unteren Bereich ist eine Loop-Struktur zum Protein hin eingeklappt (Abb. 5.7.B).

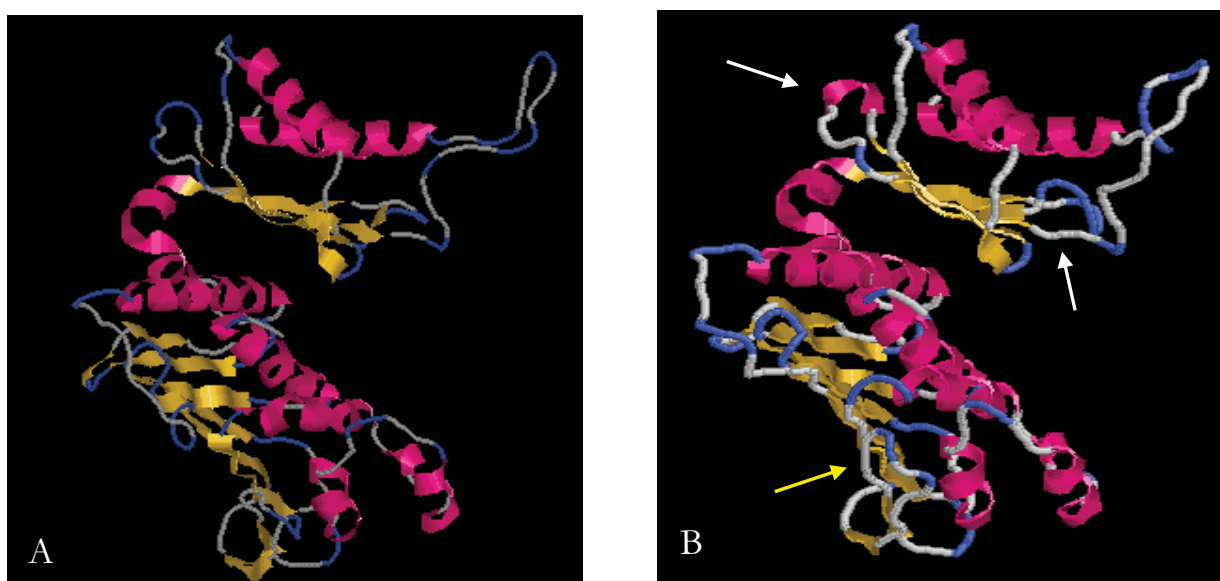


Abb. 5.8: 3D-Struktur der Aminosäure-Austausch F80V; weiße Pfeile deuten auf die strukturellen Veränderungen gegenüber Wildtyp; A= F80; B= V80; gelber Pfeil deutet die Position des Austausches an.

Der Aminosäure-Austausch F80V weist die Entstehung einer Helix-Struktur im linken oberen Bereich der Grafik und den Wegfall einer Faltblatt-Struktur auf der rechten Seite der Grafik auf (Abb. 5.8 B).

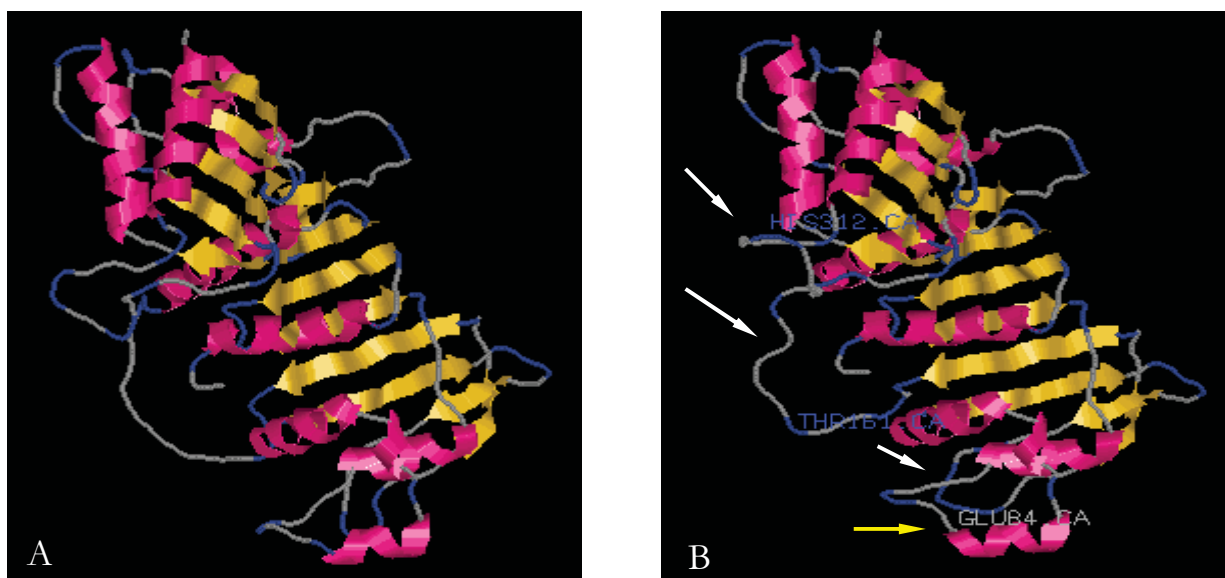


Abb. 5.9: 3D-Struktur der Aminosäure-Austausch K84E; weiße Pfeile deuten auf die Veränderungen gegenüber Wildtyp; A= K84; B= E84; gelber Pfeil deutet die Position des Austausches an.

Das Allel K84E weist Veränderungen in drei Loop-Strukturen auf der linken Seite der Grafik auf (Abb. 5.9 B).

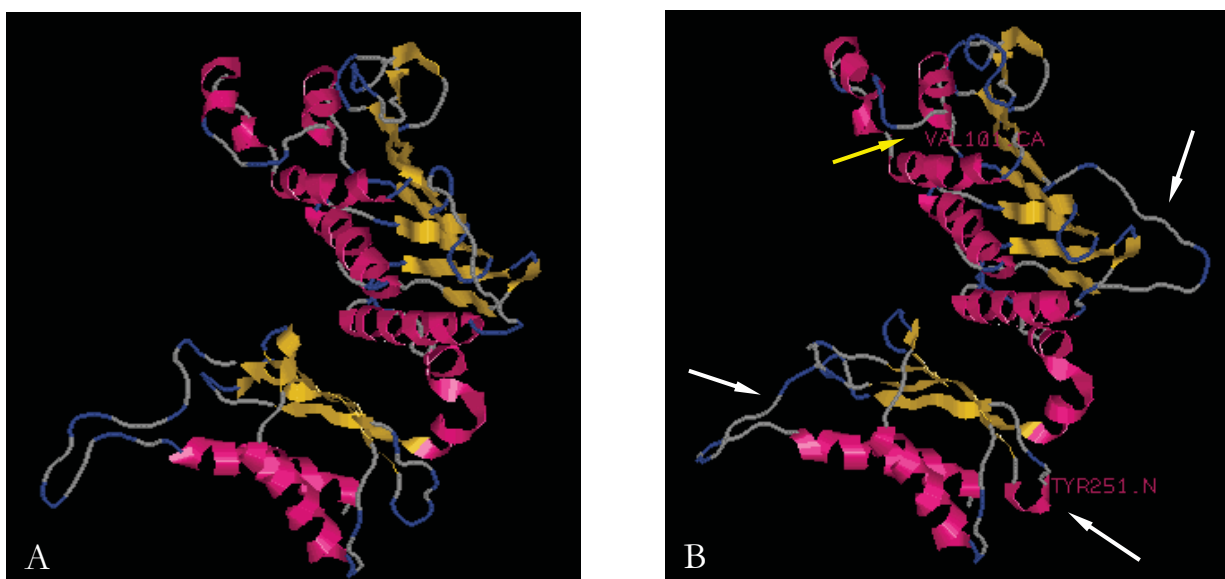


Abb. 5.10: 3D-Struktur der Aminosäure-Austausch G101V; weiße Pfeile deuten auf die Veränderungen gegenüber Wildtyp; A= G101; B= V101; gelber Pfeil deutet die Position des Austausches an.

Auf der rechten Seite der Grafik ist eine Loop-Struktur nach außen geklappt und auf der linken Seite etwas kompakter geworden. Zusätzlich hat sich im unteren Bereich der Grafik eine Helix-Struktur gebildet (Abb. 5.10. B).

5.1.7 Abschließende Betrachtung zur Analyse des humanen MMR-Proteins MLH1

Die Tabelle 5.2. fasst die Vergleiche der in dieser Arbeit bezielten Ergebnisse zusammen und vergleicht sie mit publizierten Daten. Die hMLH1-Varianten A21E, Q48P und G101V sind bisher nicht bearbeitet worden. Die MLH1-Variante Q48P wird in dieser Arbeit als pathogen eingestuft, da kein Protein detektiert werden konnte und alle anderen Analysen einen Funktionverlust aufzeigen. Die MLH1-Variante A21E bleibt unklar charakterisiert, da nur ein schwacher Mutatoreffekt ausgelöst werden kann und die Interaktion mit hPMS2 70 % beträgt. Auch das Allel G101V bleibt unklar charakterisiert, da zwar die Interaktion mit hPMS2 auf 13 % reduziert ist, jedoch ein Mutatoreffekt ausgelöst wird.

Die Allele P28L und M35R, die als nicht funktionelle Kontrollen gewählt wurden, sind gut untersucht und in allen Publikationen als pathogen eingestuft (Kondo et al 2003, Raevaara et al. 2005, Takahashi et al. 2007). Auch in dieser Arbeit werden sie aufgrund der fehlenden Interaktion und des fehlenden Mutatoreffekts als pathogen eingestuft. Das Allel N64S zeigt in dieser Arbeit einen schwachen Mutatoreffekt und 53 % Interaktion mit hPMS2. In anderen Untersuchungen kann diese Allel in 2 von 3 Assays keinen Mutatoreffekt auslösen und zeigt eine reduzierte Effizienz bei der Interaktion der Komplexe MutS und MutL (Takahashi et al 2007, Plotz et al. 2006). Daher ist auch diese hMLH1-Variante als pathogen einzustufen. Die hMLH1-Variante F80V weist in dieser Arbeit eine verstärkte Interaktion zu hPMS2 auf und löst nur einen schwachen Mutatoreffekt aus. In den Assays anderer Autoren ist dieses Allel in der Kernlokalisation herabgesetzt und in der MMR-Aktivität defizient, weist aber eine hohe Mikrosatelliteninstabilität bei stabilem Protein auf (Raevaara et al. 2005, Takahashi et al. 2007). Daher ist dieses Allel pathogen. Die MLH1-Variante K84E kann in dieser Arbeit einen mittleren Mutatoreffekt auslösen, zeigt eine wildtypische Interaktion mit hPMS2, aber eine herabgesetzter Proteinstabilität und gilt deshalb als tendenziell pathogen. In den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ist K84E in der MMR-Aktivität defizient und löst einen schwachen Mutatoreffekt aus (Raevaara et al. 2005, Takahashi et al. 2007, Ellison et al. 2004).

hMLH1 sense Mutationen	AS Änderung	Y2H	Mutator- phänotyp	Expres- sion in Hefe	Y2H	Mutator- phänotyp	<i>in vitro</i> - Interak- tionsassay	<i>in vitro</i> MMR Assay	Expres- sion in humanen Zellen	Subzelluläre Loka- lisation von hMLH1 in humanen Zellen	Subzelluläre Lokalisation von PMS2 mit MLH1 in hu- manen Zellen	Interaktion MLH1/ PMS2 Koimu- noprezipita- tion	Interaktion von MutL α und MutS α
Kommentar	diese Arbeit												
		Erhöhung gegenüber Leervektorkon- trolle=1, WT=1641			Färbung, wenn MLH1 und PMS2 interagie- ren	Hefe- WT, wenn hMLH1 nicht funk- tionell		WT= 100%	WT= 100%	WT- MLH1 lokali- siert im Kern	hPMS2 allein im Zytoplasma, WT- hMLH1 zum Kerntransport		
hMLH1 c.62C>A	A21E	70	308	normal									
hMLH1 c.83C>T	P28L	4	62	-	Nicht funktio- nell (1)	Hefe- WT (10), 2- (6*)	defizient (2), 9,2 % (6),	herabge- setzt (2), >75 % (6),	herabge- setzt (2), >75 % (6),		herabge- setzt(2)	normal (2),	
hMLH1 c.104T>G	M35R	3	1	-	Nicht funktio- nell (1)	Hefe- WT (10, 11), 3- (6*)	23,4 % (6)	25-75 % (6)					
hMLH1 c.143A>C	Q48P	3	1	-									
hMLH1 c.191A>G	N64S	53	167	normal		2- (6*)	36,6 % (6)	>75 % (6)					reduzierte Effizienz (9),
hMLH1 c.238T>G	F80V	275	103	normal		2- (6*)	defizient (2), 23,7 % (6)	normal (2), >75 % (6)	normal (2)	normal (2)	normal (2)	normal (2)	
hMLH1 c.250A>G	K84E	99	585	herabge- setzt		1- (6*)	defizient (2), 66-34 % (5), 22,5 % (6),	normal (2), >75 % (6),	her- abge- setzt (2),	normal (2),	normal (2),	normal (2),	
hMLH1 c.302G>T	G101V	13	513	normal									

Tab. 5.2: Untersuchte hMLH1-Varianten im Vergleich mit publizierten Daten. Der Auszug aus der Gesamttabelle vergleicht die Ergebnisse dieser Arbeit (im schwarzen Rahmen) mit den publizierten Daten. WT=Wildtyp, *= Gibt die Anzahl der Assays an, in den kein Mutatoreffekt ausgelöst werden kann (Anzahl der Assays insgesamt $\bar{3}$)
In Klammer stehende Zahlen geben die Referenz an: (1)= Kondo et al. 2003, (2)= Raevaara et al. 2005, (6)= Takahashi et al. 2007. (9)= Plotz et al. 2006, (10)= Shimodaira et al. 1998, (11)= Shcherbarkova et al. 1999,

Insgesamt kann gesagt werden, dass die Zwei-Hybrid-Untersuchung auch für Missense-Mutationen im Bereich der ATPase-Domäne sinnvoll ist, wie das Beispiel für den Aminosäure-Austausch F80V belegt. Zur eindeutigen Charakterisierung von Punktmutationen aus dem ATPase-Bereich wären weitere funktionelle Analysen, z. B. zur ATPase-Aktivität wünschenswert, da die strukturellen 3D-Analysen in allen hier untersuchten Fällen Konformationsänderungen vorher sagen und daher ein Effekt zu erwarten ist. Zur Bestimmung der Pathogenität gilt prinzipiell: je mehr Daten aus funktionellen Assays zur Verfügung stehen desto sicherer wird die Einschätzung.

5.2 Untersuchungen zur Erkrankung multipler hereditärer Osteochondrome

Osteochondrome gehören zu den am häufigsten auftretenden Knochentumoren. Über 15 % der gutartigen Knochentumoren sind multiple hereditäre Osteochondrome (Hameetman et al. 2007). Synonym werden auch die Bezeichnungen multiple Osteochondrome (MO) und multiple hereditäre Exostosen verwendet. MO ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung und tritt mit einer Häufigkeit von 1:50.000 auf. Die Hauptwachstumsphase der Tumoren liegt in der ersten Lebensdekade der Patienten und endet meistens mit dem Abschluss der Pubertät, wenn sich die Wachstumsfuge schließt (Bovée et al. 2008). Für die Erkrankung MO sind hauptsächlich Veränderungen in zwei Gene verantwortlich, *EXT1* und *EXT2*. Die Proteinprodukte von *EXT1* und *EXT2*, Exostosin 1 und -2 sind transmembrane Typ-II-Glykoproteine, die in der Biosynthese von Heparansulfat (HS) involviert sind und im Golgi-Apparat einen Hetero-Oligomer-Komplex bilden (McCormick et al. 2000, Simmons et al. 1999).

5.2.1 Kopplungsanalysen und Mutationsdetektion der *EXT*-Gene in MO-Familien

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Segregation von MO an 12 Familien mit hereditären multiplen Exostosen vorgenommen. Jeweils 4 der untersuchten Familien (33 %) weisen eine Segregation zu den Genen *EXT1* oder *EXT2* auf. Eine Segregation zu *EXT1* und *EXT3* zeigen 2 von 12 Familien (16,7 %). Je eine Familie (8,4 %) zeigt eine Segregation zu *EXT1* und *EXT2* bzw. zu allen drei Genorten.

Verschiedene Untersuchungen mit französischen, italienischen und japanischen Populationen zeigen eine proportionale Verteilung der Häufigkeit von *EXT1*- zu *EXT2*-Mutationen zwischen 74-77 %/23-26 % (Francannet et al. 2001, Seki et al. 2001, Pedrini et al. 2004). Eine weitere italienische Studie, die eine relativ kleine Probandengruppe mit 9 nicht verwandten *EXT*-Familien präsentiert, weist eine Verteilung von *EXT1* zu *EXT2* von je 40 % auf (Gigante et al. 2001). Eine britische Untersuchung zeigt eine Proportion von 53 %/47 % für *EXT1* / *EXT2* (Lonie et al. 2006). Insgesamt ergibt sich dadurch eine Häufigkeit von 40-77 % in *EXT1* zu 23-47 % in *EXT2* (Hameetman et al. 2007; Francannet et al. 2001; McCormick et al. 2000; Simmons et al. 1997). Re-

gistriert sind in der Human Mutation Data Base (HGMD)-Datenbank für *EXT1* 157 zu 71 *EXT2* in der Literatur beschriebene Mutationen, dies ergibt eine statistische Verteilung von 69 % für *EXT1* zu 31 % für *EXT2* und scheint ein statistisches Mittelmaß darzustellen. Einzig die Arbeit von Alvarez et al. scheint ein Ungleichgewicht zu zeigen, mit einer proportionalen Verteilung von *EXT1* mit 37,5 % zu 62,5 % im *EXT2*-Gen (Alvarez et al. 2006), so dass vermutete werden kann, dass die proportionale Verteilung auf patienten und populationsabhängigen Unterschieden beruht.

Die Mutationsrate liegt in dieser Arbeit bei 46 % für *EXT1* und für *EXT2* bei 15 %. Bei der Familie Nr. 1, welche eine Segregation zu allen drei Genorten aufwies und bei der DHPLC-Analyse keine Auffälligkeit zu finden war, konnte eine große Deletion im Gen *EXT2* (g.EX8-10del) mittels MLPA-Untersuchung detektiert werden (Leube et al. 2007). Bei zwei weitere Familien Nr. 3 und 6, die eine Segregation zu den Chromosomen 8 (*EXT1*) und 19 (*EXT3*) zeigen, wurde in der Familie 3 eine pathogene Mutation in *EXT1* und in der Familie Nr. 6 keine Mutation nachgewiesen.

Im Gen *EXT1* wurden in dieser Arbeit insgesamt 7 Sequenzveränderungen gefunden. Davon sind 5 noch nicht in der Literatur beschrieben. Es handelt sich um 3 Nonsense-Mutationen (E39fsX135; S48fsX520 und P524fsX535) eine Spleiß- (c.1417+2T>G) und eine Missense-Mutation (S41N). Eine weitere Nonsense-Mutation in *EXT1* (R549fsX620) und eine Missense-Mutation (P477P) sind bereits beschrieben (Wuyts et al. 1997, Signori et al 2006). Während die Nonsense-Mutationen zum vorzeitigen Kettenabbruch führen, sind die Auswirkungen der Missense-Mutationen nicht immer eindeutig. Sie können ohne funktionelle Auswirkung auf das Protein sein oder aber einen teilweisen oder kompletten Funktionsverlust hervorrufen. Einige andere Autoren stufen gefundene Missense-Mutationen als pathogene Mutationen ein, ohne jedoch den pathogenen Effekt zu klären. Allein der Verweis auf andere Publikationen und die Annahme, dass die Mutation im Bereich einer funktionellen Domäne des Proteins liegt, reichen für eine eindeutige Einstufung nicht aus (Porter et al. 2004, Wuyts et al. 2000). Auch der Hinweis, dass eine Missense-Mutation in einem Kontrollkollektiv von 100 Personen nicht gefunden wurde, reicht nicht aus, um sie als pathogen einzustufen (Lonie et al. 2000). Um eine eindeutige Einstufung der Pathogenität vorzunehmen bedarf es einer möglichst großen Anzahl an Untersuchungsmethoden, um eine Missense-Mutation zu klassifizieren (siehe Abschnitt 5.1.7.). Bei den hier gefunden Missense-

Mutationen in MO-Patienten handelt es sich um Polymorphismen. Im ersten Fall hat der Vater der Familie 7 diese Sequenzveränderung (S41N) an keines seiner betroffenen Kinder weitervererbt. Die Missense-Mutation P477P ist in zwei Familien zu beobachten und kann sowohl bei Betroffenen als auch bei nicht Betroffenen nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist sie in der Literatur bereits als Polymorphismus beschrieben worden (Signori et al 2007).

Im Gen *EXT2* sind zwei Mutationen identifiziert worden, die bisher nicht in der Literatur beschrieben sind. Diese sind als pathogen einzustufen, da sie zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen (K21fsX58 und P197fsX269). Es wurden insgesamt 6 Mutationen gefunden, die eine eindeutige Assoziation zu den Genen *EXT1* (46 %) und *EXT2* (20 %) erlauben, einen Verlust der Funktion zur Folge haben und damit als pathogen einzustufen sind (67 %).

In 5 Familien (Nr. 1; 5; 6; 9 und 12) konnten keine Mutationen mit Hilfe der DHPLC-Analysen nachgewiesen werden. In der Familie Nr. 1 konnte eine große Deletion mittels MLPA- (multiplex ligation-dependent probe amplification) Untersuchung gefunden werden, die mit DHPLC-Analysen nicht detektierbar ist (Leube et al. 2007).

Bei den anderen Familien, in denen keine Mutation gefunden werden konnte, könnte durch Hypermethylierung der Promotorregion eine transkriptionelle Inaktivierung von *EXT1* hervorgerufen worden sein, wie es für einige *EXT1*-Tumorzelllinien bestätigt werden konnte (Ropero et al. 2004).

Insgesamt sind in 13 Familien 10 Sequenzveränderungen gefunden worden. Dies bedeutet eine Mutationsrate von 76 %. Diese Mutationsraten sind mit den publizierten Daten vergleichbar, trotz der geringeren Anzahl an Probanden (Pedrini et al. 2005; Jenness et al. 2008).

5.2.2 Genotyp/Phänotyp Korrelationen von *EXT1* und *EXT2*

Seit sich *EXT1* und *EXT2* als Hauptgenorte für MO etabliert haben, sind vergleichende Genotyp-Phänotyp Studien angefertigt worden (Francannet et al. 2001; Porter et al. 2004, Alvarez et al. 2006). Allen gemeinsam ist die Hervorhebung, dass Mutationen im *EXT*-Gen durchschnittlich etwas schwerere Manifestationen in MO-Patienten auslösen. Innerhalb der einzelnen Familien und zwischen den Familien ist jedoch eine hohe

Variabilität in der Ausprägung mit deutlichen Überlappungen zwischen den *EXT1*- und *EXT2*-Familien zu beobachten. Francannet et al. 2001 berichtet von Chondrosarkomen und einer Statur unter der dritten Percentile nur in *EXT1*-Familien. In anderen Studien wurden von Chondrosarkomen in *EXT2*-Familien berichtet (Porter et al. 2004, Kivioja et al. 2000). Auch in dieser Arbeit kann sowohl von einer *EXT2*-Familie als auch von einer *EXT1*-Familie mit Chondrosarkomen berichtet werden. In dieser Studie sind eine *EXT1*- (4 Angehörige) und eine *EXT2*-Familie (1 Angehöriger) von sehr kleiner Statur unter der 3. Percentile dokumentiert, allerdings betrifft dies insgesamt nur sehr wenige MO-Patienten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es keine zuverlässigen Parameter zur Unterscheidung von *EXT1* und *EXT2*-Patienten gibt. Nur für die Ulna-Länge im Verhältnis zur Körperhöhe lässt sich ein signifikanter Unterschied für *EXT1*- und *EXT2*-Familien darstellen. Dieser Parameter könnte in der klinischen Diagnostik Anwendung finden. Nach der Bestimmung des Ulna/Größenverhältnisses kann eine Vorauswahl getroffen werden kann, welches Gen in der molekularen diagnostischen Untersuchung zuerst analysiert werden sollte.

5.2.3 Expressionsprofile von Genen der Knorpelentwicklung in *EXT1*-Tumoren

Die Expression der Gene sollte eingehender untersucht werden. Ziel war es, Einblicke in Signalwege der Chondrozytenentwicklung zu bekommen, um ein besseres Verständnis für die Auswirkungen von MO zu bekommen. Die Expressionsanalysen bestätigten die Ergebnisse der Array-Analysen. Jedoch unterlag die Expression der einzelnen Gene in den Tumoren starken Schwankungen. Diese Schwankungen in der Expression von Genen können auf individuellen Unterschieden der Patienten beruhen. Dies wurde bereits in einer früheren Arbeit für *Kollagen Typ-1* und *-2* in frisch kultivierten Chondrozyten gezeigt (Dissertation Wuerz 2006). Inwieweit die Schwankungen der in dieser Arbeit untersuchten Gene patientenabhängig oder auch von den Kulturbedingungen der Chondrozyten abhängig sind, lässt sich an dieser Stelle nicht beurteilen. Die Kultivierung von Chondrozyten in zweidimensionalen Monolayer-Kulturen hat immer eine Dedifferenzierung der Chondrozyten zur Folge. Dies geschieht im steigenden Maße mit der Anzahl der Subkulturen. Dadurch ändern sich die Stoffwechselpro-

zesse in den Zellen (von der Mark et al. 1977). Deshalb wurden Kulturen mit großen Zellenzahlen und wenigen Subkulturen angesetzt. RNA für die Expressionsanalysen wurden aus Zellen der 3. Subkultur (Kontrolle und Tumor 3) und Zellen der 2. Subkultur (Tumor 1 und -4) extrahiert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Subkultivieren einen Einfluss auf die untersuchten Gene hat. Für *Perlekan* ist z. B. bekannt, dass sich die Expression in Monolayer-Kulturen nicht ändert; die Expression für *Syndeskan* ändert sich dagegen sehr (Dissertation Ettrich 2007).

In der Chondrozytendifferenzierung ist ein komplexes Signalnetzwerk notwendig, um die verschiedenen Entwicklungsschritte der Knochenentwicklung zu steuern. Das „Indian Hedgehog“-Protein (IHH) hat entscheidenden Einfluss auf diesen Prozess. Während der enchondralen Ossifikation wird *IHH* von prehypertrophen Chondrozyten exprimiert.

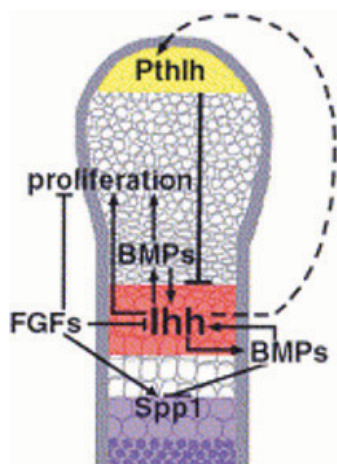


Abb. 5.1: Integration von FGF, BMP und IHH/PTHrP-Signalproteinen in einem Kontrollnetzwerk der Chondrozytenentwicklung; Erläuterungen im Text. ssp1= Osteopoin (Secreted Phospho Protein1) (aus Minina et al. 2002)

Zusammen mit einem zweiten Signalfaktor „Para Thyroid Hormon related Protein“ (PTHrP) steuert IHH in einem negativen Rückkopplungsmechanismus das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung. Dadurch verhindern die IHH/PTHrP-Signale die Differenzierung der *IHH*-exprimierenden Zellen. Darüber hinaus wird direkt von IHH, in PTHrP-unabhängigen Mechanismen, die Proliferation der Chondrozyten reguliert (Vortkamp et al 1996, Bo-vée 2008). Neben dem IHH/PTHrP-Signalweg gibt es noch weitere wichtige Faktoren, beispielsweise „Bone Morphogenic Proteins“ (BMPs) und „Fibroblast Growth Factors“ (FGFs), in der Chondrozytenentwicklung. BMP- und IHH-Signale regulieren die Chondrozytenproliferation, wobei beide Signale parallel agieren. Außerdem regulieren BMPs die Expression von IHH und koordinieren so die Chondrozytenproliferation und das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung. Die wird durch den BMP-Signalweg verzögert (Minina et al. 2001). Als dritte Gruppe von Wachstumsfaktoren regulieren die FGFs die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten. Durch FGFs wird die Expression von IHH reduziert und das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung

beschleunigt. FGF und BMP-Signale wirken antagonistisch (Abb. 5.1.) (Minina et al 2002).

Es ist bekannt, dass das EXT1-Protein an der Biosynthese von Heparansulfat beteiligt ist. Durch Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) in der Extrazellulärmatrix des Knorpels kann IHH über größere Entfernungen zu seinem Rezeptor diffundieren. Ein Defekt oder die Abwesenheit von EXT kann dadurch den negativen Rückkopplungsmechanismus beeinträchtigen, da das Fehlen der Heparansulfat Seitenketten Einfluss auf die Diffusion von IHH nimmt (Bové 2008). In früheren Untersuchungen konnte in in situ-Hybridisierungen *IHH* in EXT-Tumoren nachgewiesen werden (Hameetman et al 2006; Benoist-Lasselin et al. 2006). In dieser Arbeit ist *IHH* in der Expression-Analyse stark reduziert im Mittel um den Faktor 7,4 gegenüber der Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist das Gen *PTHrP* in der Expression erhöht, wohin gegen in den Literaturdaten kein Protein in Tumoren nachzuweisen ist (Bové 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen also im Widerspruch zu Literaturdaten und müssten mit Untersuchungen an einer größeren Anzahl an Tumoren überprüft werden.

Decorin zählt zu den kleinen leucinreichen Proteoglykanen. Es wird angenommen, dass Decorin regulierend in Zellteilung und -differenzierung eingreift und TGF β binden kann (Yamaguchi et al 1990). Da TGF β die Chondrozytenentwicklung durch das Eingreifen in den Regelkreis von *IHH* und *PTHrP* beeinflusst, indem *PTHrP* hochreguliert wird, könnte *Decorin* über diesen Weg involviert sein. Bei *Cathepsin D* und *MM2* handelt es sich um Proteasen. Zudem gehört *MM2* zu den HS-bindenden Faktoren im Knorpelgewebe (Dissertation Ettrich 2007). In dieser Arbeit sind beide Gene herunterreguliert. Die Zusammenhänge müssten in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Neben *PTHrP* ist auch das Gen *Cyclin D1* hochreguliert. Cyclin D1 ist die regulatorische Untereinheit einer cyclinabhängigen Kinase, die eine wichtige Funktionen im Zellzyklus besitzt. Man weiß, dass eine Überexpression von *Cyclin D1* Zellen unter verstärkten Proliferationsdruck setzt. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass es eine erhöhte *Cyclin D* Expression in Risikopatienten zum Oesophaguskrebs gibt und die Cyclin D-Expression als Marker eingesetzt werden kann (Kamal et al. 2000). Um die genauen Zusammenhänge und Differenzierungsprozesse und die Beteiligung der hier untersuchten Gene zu erforschen, müssten weitere Analysen durchgeführt werden.

So wäre es wünschenswert, die Expressionsanalysen an einer Vielzahl von Tumorproben verifizieren zu können.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von *EXT2* in Tumoren mit niedriger *EXT1*-Expression herabgesetzt war, ebenso die Expression von *EXT1* und *EXT2* in Osteochondroma-Zellkulturen (McCormick et al. 2000, Bernard et al. 2001). Die Regulation der beiden Gene scheint zusammenzuhängen. In dieser Arbeit konnten Expressionsanalysen an *EXT2* nicht vorgenommen werden, da es keinen „Assay on Demand“ für *EXT2* gab. Die Untersuchung dieses Gens ist aber von Bedeutung, da für die funktionelle Heparan-Sulfat-Biosynthese beide Proteine benötigt werden. In *EXT*-Tumoren konnte eine intrazelluläre Anhäufungen von HSPG detektiert werden, was darauf hinweist, dass es zu einem Verlust der Funktion vom *EXT1/EXT2*-Komplex kommt (Hameetman et al. 2007).

Literaturverzeichnis

EXT

Ahn, Jung; Lüdecke, Hermann- Josef; Lindow, Steffi; Horton, William A.; Lee, Brendan; Wagner, Micheal J.; Horsthemke, Bernhard; Wells, Dan e.

„Cloning of the putativer tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses EXT1“

Nature Genetics, Vol. 11: 137- 143, 1995

Alvarez C, Tredwell S, De Vera M, Hayden M

„The genotype–phenotype correlation of hereditary multiple exostoses“

Clin Genet: 70: 122–130; 2006

Bellaiche, Yohanns; The, Inge; Perrimon, Norbert

„Tout velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT1 and is needed for Hh diffusion“

Nature, 85- 88, 1998

Benoist-Lasselin, Catherine; de Margerie, Emmanuel; Gibbs, V; Cormier, Sarah

Caroline Silve, Gisèle Nicolas, Martine LeMerrer, Jean-Francois Mallet, Arnold Munnich

Jacky Bonaventure, Louise Zylberberg, Laurence Legeai-Mallet

“Defective chondrocyte proliferation and differentiation in osteochondromas of MHE patients”

Bone 39; 17–26; 2006

Bernard, Mark A.; Hall, Chatherine E.; Hogue, Deborah A.; Cole ,William G.; Scott, Allison; Snuggs, Mark B.; Clines, Gregory A.; Lüdecke, Hermann- Josef; Lovett, Michael; Van Winkle, W. Barry; Hecht, Jacqueline T.

„Diminished Levels of the Putative Tumor Suppressor Proteins EXT1 and EXT2 in Exostoses Chondrocytes“

Cell Motility and the Cytoskeleton 48: 149- 162, 2001

Blanton, Susan Halloran; Hogue, Deborah ; Wagner, Micheal; Wells, Dan; Young, Ian D.; Hecht, Jaqueline

„Hereditary Multiple Exostoses: Conformation of Linkage to Chromosom 8 and 11”
American Journal of Medical Genetics 62: 150- 159, 1996

Bovée, Judith V.; Cleton- Jansen, Anne- Marie; Wuyts, Wim; Caethoven, Goedele;
Taminiau, Antonie H. M.; Bakker, Egbert; van Hul, Wim; Cornelisse, Cees J.; Hogen-
doorn, Pancras C. W

„EXT- Mutation Analysis and Loss of Herterozygosity in Sporadic and Hereditary Osteo-
chonfromas and Secondary Chonfrosarcomas”

American Journal of Human Genetics 65: 689- 698, 1999

Bovée, Judith VMG

“Multiple osteochondromas”

Orphanet Journal of Rare Diseases Vol 3(3): 2008

Bridge, Julia A.; Bhatia, Paramjit Sö.; Anderson, James R.; Neff , James R.

„Biologic and Clinical Significance of Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Abnormali-
ties in Benign and Malignant Cartilaginous Lesions”

Cancer Genetics and Cytogenetics Vol. 69, Nr. 2: 79- 90, 1993

Bridge, Julia A.; Nelson, Mari; Örndal, Charlotte; Bhatia, Paramit; Neff, James R.

„Clonal Karyotypic Abnormalities of the Hereditary Multiple Exostoses Chromosomal
Loci 8q24.1 (EXT1) and 11p11-12 (EXT2) in Patient with Sporadic and Hereditary Os-
teochondromas”

Cancer, Vol 82, Nr. 9, 1998

Bovée, Judith VMG

„Multiple osteochondromas“

Orphanet Journal of Rare Diseases 1750-1172, 2008

Benoist-Lasselin, C; de Margerie, E; Gibbs, L; Cormier, S; Silve, C; Nicolas, G; LeMerrer,
M; Mallet, JF; Munnich, A; Bonaventure, J; Zylberberg, L; Legeai-Mallet, L

„Defective chondrocyte proliferation and differentiation in osteochondromas of MHE patients”

Bone, Vol 39: 17-26; 2006

Clines, Gregory A.; Ashley, Jennifer A.; Shah, sangeeta; Lovett, Michael

„The Structure of the Human Multiple Exostoses 2 Gene and Characterizatio of Homologs in Mouse and Caenorhabditis elegans”

Genome Research, 359-367, 1997

Cook, April; Raskind, Wendy; Halloran Blanton, Susan; Pauli, Richard M.; Gregg Ronald G.; Francomano, Clare A; Puffenberger, Eric; Conrad, Ernest U.; Schmale, Gregory; Schellenberg, Gerard; Wijsman, Ellen; Hecht, Jaqueline ; Wells, Dan

„Genetic Heterogeneity in Families with Hereditary Multiple Exostoses”

American Journal of Human Genetics Vol 53: 71- 79, 1993

Cheung, Peter K. Craig McCormick, Brett E. Crawford, Jeffrey D. Esko, Frank Tufaro, Gillian Duncan

“Etiological Point Mutations in the Hereditary Multiple Exostoses Gene

EXT1: A Functional Analysis of Heparansulfate Polymerase Activity”

American Journal of Human Genetics Vol 69: 55–66, 2001

Dobson- Stone, Carol; Cox, Roger D.; Lonie, Lorne; Southam, Lorraine; Fraser, Maria; Wise, Carol; Bernier, François; Hodgson, Shirley; Porter, Daniel E.; Simpson, A. Hamish RW.; Monaco Anthony P.

„Comparison of fluorescent single- strand conformation polymorphism analysis and denaturing high- performance liquid chromatography for detection of EXT1 and EXT2 mutatuins in hereditary mltiple exostoses”

European Journal of Human Genetics Vol: 8, 24- 32, 2000

Dunnen, Journal T. den; Antonarakis E.

„Nomenclature for the description of human sequence variations“

Human Genetics Vol 109: 121- 124, 2001

Esko, Jeffrey D; Selleck Scott B

„Order out of Chaos: Assembly of Ligand Binding Sites in Heparansulfate“

Annual Review of Biochemistry Vol 71: 435- 471, 2002

Ettrich, Thomas Jens

„Einfluss des Differenzierungszustandes auf die Heparansulfat-Proteoglycan-Synthese humaner Chondrozyten“

Dissertation 2007, Universität Ulm

Francannet, C.; Cohen- Tanugi, A.; Merrer, M. Le; Munnich, A.; Bonaventure, J.; Legeai-Maller, L.

„Genotype- phenotype correlation in hereditary multiple exostoses“

Journal of Medical Genetics Vol 38: 430- 434, 2001

Gigante, Maddalena; Matera, Maria G.; Seripa, Davide; Izzo, Apollonia M.; Venanzi, Riccardo; Giannotti, Aldo; Digilio, Maria C.; Gravina, Carolina; Lazzari, Marzia; Monteleone, Giovanni; Monteleone, Maurizio; Dallapiccola, Bruno; Fazio, Vito M.

„EXT- mutation analysis in Italian sporadic and hereditary osteochondromas“

International Journal of Cancer, Vol 95, Issue 6: 378- 383, 2001

Habenhauer, G.; Feyertag, J; Dunky, A.

„Knorpel- Stoffwechsel: Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) als „Prognostikum“ der Gelenksknorpel- Destruktion“

Journal für Mineralstoffwechsel Vol 10: 17- 21, 2003

Hecht, Jacqueline T.; Hogue, Deborah; Strong, Louise C.; Hansen, Marc F. ; Blanton, Susan H.; Wagner, Micheal

„Hereditary Multiple Exostosis and Chondrosarcoma: Linkage to Chromosome 11 und Loss of Heterozygosity for EXT- Linked Markers on Chromosomes 11 and 8“

American Journal of Human Genetics 56: 1125- 1131, 1995

Hameetman, L; Rozeman, LB; Lombaerts, M; Oosting, J; Taminiou, AH; Cleton-Jansen, AM; Bovée, JV; Hogendoorn, PC

„Peripheral chondrosarcoma progression is accompanied by decreased Indian Hedgehog signalling”

American Journal of Pathology Vol 209(4): 501-11, 2006

Hameetman, Liesbeth, Szuhai, Karoly , Ayse Yavas , Jeroen Knijnenburg , Mark van Duin , Herman van Dekken , Antonie H .-M. Taminiau, Anne-Marie Cleton-Jansen , Judith V. M . G. Bovée, Pancras C. W. Hogendoorn

“The Role of EXT1 in Nonhereditary Osteochondroma: Identification of Homozygous Deletions”

Journal of the National Cancer Institute Vol 99: 396 – 406; 2007

Jennes, Ivy; Entius, Mark M.; Van Hul, Els; Parra, Alessandro; Sangiorgi, Luca and Wuyts Wim;

„Mutation Screening of EXT1 and EXT2 by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography, Direct Sequencing Analysis, Fluorescence in Situ Hybridization, and a New Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Probe Set in Patients with Multiple Osteochondromas”

Journal of Molecular Diagnostics Vol. 10, Nr. 1: 85- 92, 2008

Kamal Bani-Hani, Martin; Iain, G.; Hardie, Laura J.; Mapstone, Nicholas; Briggs, Jackie A.; Forman, David; Wild, Christopher P.

„Prospective Study of Cyclin D1 Overexpression in Barrett’s Esophagus: Association with Increased Risk of Adenocarcinoma”

Journal of the National Cancer Institute Vol 92: 1316–1321, 2000

Kim, Byung-Taek; Kitagawa, Hiroshi; Junichi Tamura, Toshiyuki Saito, Marion Kusche-Gullberg, Ulf Lindahl and Kazuyuki Sugahara

“Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode α1,4-N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in Heparansulfate heparin biosynthesis”

PNAS, Vol 98 Nr. 13, 7176–7181, 2001

Kivioja, A; Ervasti, H; Kinnunen, J; Kaitila, I; Wolf, M; Böhling, T.

„Chondrosarcoma in a family with multiple hereditary exostoses”

Journal of Bone and Joint Surgery Vol 2(2): 261-6, 2000

Kitagawa, H; Shimakawa, H; Sugahara, K

„The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1,4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of Heparansulfate”

Journal of Biological Chemistry Vol 274: 13933-13937, 1999

Kozziel, Lydia; Kunath, Melanie; Kelly, Olivia G.; and Vortkamp, Andrea

„Ext1-Dependent Heparansulfate Regulates the Range of Ihh Signaling during Endochondral Ossification”

Developmental Cell, Vol. 6: 801- 813, 2004

Von der Mark, Klaus; Gauss, Verena; Von der Mark, Helga and Müller, Peter

„Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture”

Nature Vol 267: 531- 532, 1977

Leube, Barbara; Hardt, Karin; Portier, Sebastian; Westhoff, Bettina; Jäger, Marcus;

Krauspe, Rüdiger and Royer-Pokora, Brigitte

„Ulna-Height Ratio as Clinical Parameter Separating EXT1 from EXT2 Families?”

Genetic Testing Vol 12, Nr. 1: 129- 134, 2008

Legeai- Mallet, Laurence; Margaritte- Jeannin, Patricia; Lemdani, Mohamed; Le Merrer Martine; Plauchu, Henry; Maroteaux, Pierre; Munnich, Arnold; Clerget-Darpoux, Françoise

„An extension of the admixture test for the study of genetic heterogeneity in hereditary multiple exostoses”

Human Genetics Vol 99: 298- 302, 1997

Le Merrer, Martine; Legeai- Maller, Laurence; Margaritte Jeannin, Patricia; Bernhard Horsthemke, Schinzel, Albert; Plauchu , Henri; Toutain , Annick; Achard , Frédéric; Munich, Arnold; Maroteaux, Pierre

„A Gene for hereditary multiple exostoses maps to chromosome 19p”

Human Molecular Genetic Vol. 3, No. 5: 717- 722, 1994

Lind, Thomas ; Frank Tufaro, Craig McCormick, Ulf Lindahl and Kerstin Lidholt

“The Putative Tumor Suppressors EXT1 and EXT2 Are Glycosyltransferases Required for the Biosynthesis of Heparansulfate“

Journal of Biological Chemistry Vol. 273, Nr. 41: 26265–26268, 1998

Lonie, Lorne; Porter, E. Daniel; Fraser, Maria; Cole, Trevor; Wise, Carol; Yates, Laura; Wakeling, Emma; Blair, Ed; Morava, Eva; Monaco, Anthony, P., Ragoussis, Jiannis

“Determination of the Mutation Spectrum of the *EXT1/EXT2* Genes in British Caucasian Patients with Multiple Osteochondromas, and Exclusion of Six Candidate Genes in *EXT* Negative Cases”

Human Mutation (Mutation in Brief #938), 1- 12, 2006

Lüdecke, Hermann- Josef; Ahn, Jung; Lin, X.; Hill, A.; Wagner, Michael J.; Schomburg, Lutz; Horsthemke, Bernhard; Wells, Dan E.

„Genomic Organization and Promoter Structure of the Human EXT1 Gene“

Genomics Vol 40: 351- 354, 1997

McCormick, Craig; Leduc, Yves; Martindale, Diane; Mattison, Kirsten; Esford, Lesley E.; Dyer, Angela P.; Tufaro, Frank

„The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell- surface Heparansulfate”

Nature Genetics Vol. 19: 158- 161, 1998

McCormick, Craig; Duncan, Gillian; Goutsos, K. Tina and Frank Tufaro*

“The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of Heparansulfate”

PNAS, Vol 97, Nr. 2: 668- 673, 2000

Minina , Eleonora; Wenzel, Hans Markus; Kreschel, Conny; Karp, Seth; Gaffield, William; McMahon, Andrew P.; Vortkamp, Andrea

„BMP and Ihh/ PTHrP signaling to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation”

Development Vol 128: 4523- 4534, 2001

Minina, Eleonora; Kreschel, Conny; Naski, Michael C; David M. Ornitz, Andrea Vortkamp

“Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation”

Developmental Cell, Vol 3: 439- 449, 2002

Mundlos, Stefan

Institut für Medizinische Genetik, Charité Berlin

„Entwicklung und Wachstum des Skelett- biologische Grundlagen“

Medizinische Genetik Vol 16: 5- 8, 2004

Pedrini, E.; De Luca, A.; Valente, EM.; Maini, V.; Capponcelli, S.; Mordenti, M.; Mingarelli, R.; Sangiorgi, L.; Dallapiccola, B.

„Novel EXT1 and EXT2 mutations identified by DHPLC in Italian patients with multiple osteochondromas”

Human Mutation (Mutation in Brief #830), 1- 10, 2005

Porter, D. E. ; L. Lonie, M. Fraser, C. Dobson-Stone, J. R. Porter, A. P. Monaco, A. H. R. W. Simpson

“Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses”

The Journal of Bone and Joint Surgery Vol 86: 1041-1046, 2004

Raskind, Wendy H.; Conrad, Ernest U.; Chansky, Howard; Matsushita, Manrk

„Loss of Hererozygosity in Chondrosarcomas for Markers Linkes to Hereditary Multiple Exostoses Loci on Chromosomes 8 and 11”

American Journal of Human Genetics Vol 56: 1132- 1139, 1995

Ropero, Fernando Setien; Espada, Jesus; Fraga, Mario F.; Herranz, Michel; Asp, Julia; Benassi, Maria Serena; Alessandro, Franchi; Patiño, Ana; Ward, Laura S.; Bovee, Judith; Cigudosa, Juan C.; Wim, Wuyts and Esteller, Manel

„Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (EXT1) disrupts Heparansulfate synthesis in cancer”

Human Molecular Genetics Vol 13: 2753- 2765, 2004

Rydberg, B.

„Bromouracil mutagenesis and mismatch repair in mutator strains of Escherichia coli”

Mutation Research Vol 52: 11- 24, 1978

Seki, Hiroshi; Kubota, Takeo; Ikegawa, Shiro; Hagaq, Nobuhiko; Fujioka, Fumio; Ohzeki, Satoru; Wakui, Keiko; Yoshikawa, Hideki; Takaoka, Kunio; Fukushima, Yoshimitsu

„Mutatuin frequencies of EXT1 and EXT2 in 43 Japanese families with hereditary multiple exostoses”

American Journal of Medical Genetics Vol. 99: Issue 1, 59- 62, 2001

Shum, Lillian and Nuckolls, Glen

„The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton”

Arthritis Research Vol 4: 94- 106, 2002

Simmons, Andrew D.; Musy, Maurice M.; Lopes, Carla S.; Hwang, Larn- Yuan; Yang, Ya- Ping; Lovett, Michael

„A direct interaction between EXT proteins an glycosyltransferases is defective in hereditary multiple exostoses”

Human Molecular Genetics Vol. 8, Nr. 12: 2155- 2164, 1999

Stickens, Dominique; Clines, Gregory; Burbee, David; Ramos, Purita; Thomas, Sylvia; Hogue, Deborah; Hecht, Jacqueline T.; Lovett, Michael; Evans, Glen A.

„The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes”

Nature Genetics Vol. 14: 25- 32, 1996

Stickens, Dominique; Evans, Glen A.

„A sugar fix for bone tumours?”

Nature Genetics Vol. 19: 110- 112, 1998

van Hul, Wim; Wuyts, Wim; Hendrickx, Jan; Speleman, Fank; Wauters, Jan; de Boouille, Kristel; van Roy, Nadine; Bossuyt, Paul; Willems, Patrick J.

„Identification of a Third EXT- like Gene (EXTL3) Belonging to the EXT Gene Family”

Genomics Vol 47: 230- 237, 1998

Vortkamp, Andrea; Lee, Kaechoong; Lanske, Beae; Segre, Gino V.; Kronenberg, Henry M.; Tabin, Clifford J.

„Regulation of Rate of Cartilage Differentiatin by Indian Hedgehog and PTH- Related Protein“

Science Vol 273: 613- 622, 1996

Wells, Dan E.; Hill, April; Lin, Xin; Ahn, Jung; Brown, Nicholas; Wagner, Michael J.

„Identification of novel mutations in the human EXT1 tumor suppressor gene“

Human Genetics Vol: 99: 612- 615, 1997

Wise, Carol A.; Clines, Gregory A.; Massa, Hillary; Trask, Barbara j.; Lovett, Michael

„Identification and Localization of the Gene for EXTL, a Third Member of the Multiple Exostoses Gene Family”

Genome Research Vol 7: 10- 16, 1997

Wuerz, Thomas Hartmann

„Spender- und kulturabhängige Expression knorpelrelevanter Markergene humaner artikulärer Chondrozyten“

Dissertation 2006 Universität Tübingen

Wuyts, Wim; van Hul, Wim; Wauters, Jan; Nemtsova, Marina; Reyniers, Edwin; van Hul, Els; De Boulle, Kristel; de Vries, Bert B. A.; Hendrickx, Jan; Herrygers, Ilde; Bossuyt, Pausl; Balemans, Wendy; Fransen, Erik; Vits, Lieve; Coucke, Paul; Nowak, Norma J.; Shows, Thomas B.; Mallet, Laurence; van den Ouweland, Ans M. W.; Mc Gaughran, Julie; Halley, Dicky J. J.; Willems, Patrick J.

„Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses”

Human Molecular Genetics Vol. 5, Nr. 10: 1547- 1557, 1996

Wuyts, Wim; van Hul, Wim; Hendrickx, Jan; Speleman, Frank; Wauters, Jan; De Boulle, Kristel; van Roy, Nadine; van Agtmael, Tom; Bouyt, Paul; Willems, Patrick

„Identification and Characterization of a Novel Member of the EXT Gene Family, EXTL2”

European Journal of Human Genetics Vol 5: 382- 389, 1997

Wuyts, Wim; van Hul, Wim; De Boulle, Kristel; Hendrickx, Jan; Bakker, Egbert; Vanhonenacker, Filip; Mollica, Florindo; Lüdecke, Hermann- Josef; Sayli, Bekir Sitki; Pazzaglia, Ugo E.; Mortier, Geert; Hamel, Ben; Conrad, Ernest U.; Matsushita, Mark; Raskind, Wendy H.; Willems, Patrick J.

„Mutation in the EXT1 and EXT2 Genes in Hereditary Multiple Exostoses”

American Journal of Human Genetics Vol 62: 346- 354, 1998

Wuyts, Wim; van Hul, Wim

„Molecular Basis of Multiple Exostoses: Mutations in the EXT1 and EXT2 Genes”

Human Mutation Vol 15: 220- 227; 2000

Xu Lei, Xia, Jiahui; Jiang, Hujun; Zhou, Jiangnan; Li, Hejun; Wang, Daping; Pan, Qian; Long, Zhigao; Fan, Chaohong; Deng, Han- Xiang

„Mutation analysis of hereditary multiple exostoses in the Chinese”

Human Genetics Vol 105: 45- 50, 1999

Wu, Yuan-Qing; Heutink, Peter; de Vries, Bert B.A.; Sandkuijl, Lodewijk A.; van den Ouweland, Ans M.W.; Niermeijer, Martinus F.; Galjaard, Hans; Reyniers, Edwin; Willems, Patrick J.; Halley, Dicky J.J.

„Assignment of a second locus for multiple exostoses to the pericentromeric region of chromosome 11“

Human Molecular Genetics Vol. 3, No.1: 167- 171, 1994

HNPCC

Aaltonen, L. A. and Peltomaki, P

„Genes involved in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma“

Anticancer Research Vol 14: 1657- 1660, 1994

Baker, Sean M.; Plug, Annemieke W.; Prolla, Tomas A.; Bronner, C. Eric; Harris, Allie C.; Yao, Xiang; Christie, Donna-Marie; Monell, Craig; Arnheim, Norm; Bradley, Allan; Ashley, Terry; Liskay, R. Michael

„Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over“

Nature Genetics Vol 13: 336- 342, 1996

Ban, Changill; Junop, Murray; and Yang, Wei

„Transformation of MutL by ATP Binding and Hydrolysis: A Switch in DNA Mismatch Repair“

Cell Vol 97: 85- 97, 1999

Clark, A. B., Cook, M. E., Tran, H. T., Gordenin, D. A., Resnick, M. A. and Kunkel, T. A.
“Functional analysis of human MutS α and MutS β complexes in yeast“

Nucleic Acids Research Vol 27: 736- 742; 1999

Clark, Alan B.; Deterding, Leesa; Tomer, Kenneth B. and Kunkel, Thomas A.

„Multiple functions for the N-terminal region of Msh6“

Nucleic Acids Research Vol. 35, Nr. 12: 1- 10, 2007

de la Chapelle, A.

“Microsatellite instability”

New England Journal of Medicine Vol 349: 209- 210, 2003

de la Chapelle, A.

“Genetic predisposition to colorectal cancer”

Nature Reviews Cancer Vol 4: 769- 780, 2004

Drotschmann, K., Clark, A. B. and Kunkel, T. A.

„Mutator phenotypes of common polymorphisms and missense mutations in MSH2”

Current Biology Vol 9: 907- 910; 1999

Duncan, B. K. and Miller, J. H.

“Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA”

Nature Vol 287: 560- 561, 1980

Dutta, Rinku and Inouye, Masayori

„GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily”

Trends in Biochemical Sciences Vol 25, Nr 1: 24- 28, 2000

Ellison, A. R., Lofing, J. and Bitter, G. A.

“Functional analysis of human MLH1 and MSH2 missense variants and hybrid human-yeast MLH1 proteins in *Saccharomyces cerevisia*”

Human Molecular Genetics Vol 10: 1889- 1900; 2001

Ellison, Aaron R.; Joan Lofing and Grant A. Bitter

„Human MutL homolog (MLH1) function in DNA mismatch repair: a prospective screen for missense mutations in the ATPase domain”

Nucleic Acids Research, Vol 32, Nr. 18: 5321- 5338; 2004

Engel, Christoph; Forberg, Jochen; Elke Holinski-Feder, Constanze Pagenstecher, Jens Plaschke, Matthias Kloor, Christopher Poremba, Christian P. Pox, Josef Reuschhoff,

Gisela Keller, Wolfgang Dietmaier, Petra Reummele, Nicolaus Friedrichs, Elisabeth Mangold, Reinhard Buettner, Hans K. Schackert, Peter Kienle, Susanne Stemmler, Gabriela Moeslein, Markus Loeffler and the German HNPCC Consortium
“Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer“
International Journal Cancer Vol 118: 115- 112, 2006

Engel; www.imise.uni-leipzig.de/Projekte/HNPCC_2008

Entian, K.-D und Kötter, P 1998
„Yeast mutant and plasmid collections“
Methods in Microbiology Vol. 26: 431- 450, 1998

Flores- Rozas, Hernman and Kolodner, Richard D
„The Saccharomyces cerevisiae MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations“
PNAS Vol. 95: 12404–12409, 1998

Fearon, ER; Vogelstein, B
„A genetic model for colorectal tumorigenesis“
Cell Vol 61, Nr. 5: 759-67, 1990

Guarné, Alba; Ramon-Maiques, Santiago; Wolff, Erika M; Ghirlando, Rodolfo; Hu, Xiaojian; Miller, Jeffrey H. and Yang, Wei
„Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair“
The EMBO Journal Vol 23: 4134- 4145, 2004

Guerette, S; Wilson, T; Gradia, S; Fishel, R
„Interactions of Human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: Examination of Mutations Found in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer“
Molecular and Cellular Biology Vol 18, Nr 11: 6616–6623, 1998

Hall, Mark C.; Shcherbakova, Polina V.; Fortune, John M.; Borchers, Christoph H.;
Dial, J. Michael; Tomer, Kenneth B. and Kunkel, Thomas A.
„DNA binding by yeast Mlh1 and Pms1: implications for DNA mismatch repair”
Nucleic Acids Research Vol 31, Nr. 8: 2025- 2034, 2003

Harfe, Brian D. and Robertson, Sue Jinks
„Sequence Composition and Context Effects on the Generation and Repair of Frameshift
Intermediates in Mononucleotide Runs in *Saccharomyces cerevisiae*”
Genetics Vol 156: 571- 578, 2000

Heick, Sven Boris
„Funktionelle Analyse von Punktmutationen in den humanen DNA-Fehlpaarungsrepara-
turproteinen hMLH1 und hMSH2 in *Saccharomyces cerevisiae*“
Diplomarbeit 2008, Universität Düsseldorf

Herbst, Frauke
„Funktionelle Analyse humaner DNA-Reparaturproteine in *Saccharomyces cerevisiae*“
Diplomarbeit 2006, Universität Düsseldorf

Hidaka, Masumi; Takagi, Yasumitsu; Takano, Tomoko Y. and Sekiguchi, Mutsuo
„PCNA–MutSa-mediated binding of MutLa to replicative DNA with mismatched bases
to induce apoptosis in human cells”
Nucleic Acids Research, 2005, Vol 33, No. 17 5703–5712

Iyer, R; Pohlhaus, J; Chen, S; Hura, G;
Dzantiev, L; Beese, L and Modrich, P
“The Mut α -PCNA Interaction in Human DNA Mismatch Repair”
Journal of Biological Chemistry Vol 7: 13310- 13319, 2008

Jiricny, Josef

„The DNA repair picture in humans becomes more complete with the identification of MLH3, a homologue of MutL and a heterodimeric partner of MLH1”

Nature Genetics Vol 24: 6- 8, 2000

Kondo, Emiko; Suzuki, Hideyuki; Horii, Akira and Fukushige, Shinichi

„A Yeast Two-Hybrid Assay Provides a Simple Way to Evaluate the Vast Majority of hMLH1 Germ-Line Mutations”

Cancer Research Vol 63: 3302- 3308, 2003

Kondo, Emiko; Horii, Akira; Fukushige, Shinichi

„The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2”

Nucleic Acids Research Vol. 29, Nr. 8: 1695- 1702, 2001

Knippers 2006 “Molekulare Genetik”, Thieme Verlag

Knudsen, Nina Østergaard; Nielsen, Finn Cilius; Vinther, Lena; Bertelsen, Ronni; Holten-Andersen, Stehen; Liberti, Sascha Emilie; Hofstra, Robert; Kooi, Krista and Rasmussen, Lene Juel

„Nuclear localization of human DNA mismatch repair protein exonuclease 1 (hEXO1)”

Nucleic Acid Research Vol. 35, Nr. 8: 2609- 2619, 2007

Lamers, Meindert H.; Anastassis Perrakis, Jacqueline H. Enzlin, Herrie H. K. Winterwerp, Niels de Wind & Titia K. Sixma

“The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G•T mismatch”

Nature Vol 407: 2000

Lamers, Meindert H.; Dubravka Georgijevic, Joyce H. Lebbink, Herrie H. K. Winterwerp, Bogos Agianian, Niels de Wind, and Titia K. Sixma

“ATP Increases the Affinity between MutS ATPase Domains”

Journal of Biological Chemistry Vol. 279, Nr. 42: 43879- 43885, 2004

Lagerstedt Robinson, Kristina; Tao Liu , Jana Vandrovcova , Britta Halvarsson , Mark Clendenning, Thierry Frebourg, Nickolas Papadopoulos , Kenneth W . Kinzler , Bert Vogelstein , Päivi Peltomäki , Richard D . Kolodner , Mef Nilbert , Annika Lindblom
„Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Diagnostics”

Journal of National Cancer Institut Vol 99: 291- 299, 2007

Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E.,
“ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures.”

Bioinformatics Vol 18, Nr. 9: 1250- 1256, 2002

Lea und Coulson, 1949

„The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations”

Journal Genetics Vol 49: 264, 1949

Li, G.- M. and Modrich, P.

„Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs”

PNAS Vol 92: 1950- 1954, 1995

Matson, Steven W. and Robertson, Adam B.

„The UvrD helicase and its modulation by the mismatch repair protein MutL”

Nucleic Acids Research, Vol. 34, Nr. 15: 4089– 4097, 2006

Modrich, Paul

„Mechanism in Eukariotic Mismatch Repair”

Journal of Biological Chemistry Vol 281 Nr. 41: 30305-30309, 2006

Murata, Hiroaki; Khattar, Nada H ; Kang, Yuna ;Liya Gu and Guo-Min Li

“Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability”

Oncogene Vol 21: 5696- 5703; 2002

T., Strachan; Read, A. P.

„Molekulare Humangenetik“

Spektrum Verlag, 1996

Obermann, WM; Sondermann, H; Russo, AA; Pavletich, NP; Hartl, FU

„In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis“

Journal of Cell Biology Vol 143, Nr. 4: 901- 910, 1998

Olilla, S.; Sarantaus, L.; Kariola, R.; Chan, P.; Hampel, H.;

Holinski–Feder, E. ; Macrae, F. ; Kohonen–Corish, M. ; Gerdes, A-M.; Peltomäki, P. ;

Mangold, E. ; de la Chapelle, A.; Greenblatt, M. ;and Nyström, M

“Pathogenicity of MSH2 Missense Mutations Is Typically Associated With Impaired Repair Capability of the Mutated Protein”

Gastroenterology Vol: 131: 1408- 1417, 2006

Pang, Q, Prolla, T-A and Liskay, R-M

“Functional Domains of the *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1p and Pms1p DNA Mismatch Repair Proteins and Their Relevance to Human Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-Associated Mutations”

Molecular and Cellular Biology Vol. 17, Nr. 8: 4465- 4473, 1997

Parsons, R.; Li, G. M.; Longley, M. J.; Fang, W. H.; Papadopoulos, N.; Jen, J.; de la Chapelle, A.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. and Modrich, P.

„Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells”

Cell Vol 75: 1227- 1236; 1993

Peltomäki, P

DNA mismatch repair and cancer

Mutation Research Vol 488: 77- 85, 2001

„Pschyrembel Klinisches Wörterbuch“

259. Auflage, de Gruyter Verlag, 2001

Plotz, Guido; Welsch, Christoph

„Mutations in the MutSa interaction interface of MLH1 can abolish DNA mismatch repair“

Nucleic Acids research Advance Access 2006

Stec, Ingrid; Nagl, Sylvia B.; van Ommena, Gert-Jan B.; den Dunnen, Johan T.

„The PWWP domain: a potential protein- protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation?“

Federation of European Biochemical Societies Letters Vol 473: 1- 5, 2000

Quaresima, Barbara; Alifano, Pietro.; Tassone, Pierfrancesco; Avvedimento, Enrico V.; Costanzo, Francesco S. and Venuta, Salvatore

„Human mismatch-repair protein MutL homologue 1 (MLH1) interacts with Escherichia coli MutL and MutS in vivo and in vitro : a simple genetic system to assay MLH1 function“

Biochemical Journal Vol: 371, 183- 189, 2003

Räschle, Markus; Dufner, Patrick; Marra, Giancarlo; and Jiricny, Josef

„Mutations within the hMLH1 and hPMS2 Subunits of the Human MutL Mismatch Repair Factor Affect Its ATPase Activity, but Not Its Ability to Interact with hMutS“

Journal of Biological Chemistry Vol. 277, Nr. 24, Issue 14: 21810- 21820, 2002

Raevaara, Tiina E; Korhonen, Mari K ; HannesLohi, Heather Hampel, Elly Lynch, Karin E. Lönnqvist, Elke Holinski-Feder, C. Sutter, W. McKinnon, S. Duraisamy, A.-M. Gerdes, P. Peltomäki, M. Kohonen-Corish, E. Mangold, F. Macrae, M. Greenblatt, A.de la Chapelle and M. Nyström

“Functional Significance and Clinical Phenotype of Nontruncating Mismatch Repair Variants of MLH1“

Gastroenterology Vol 129: 537- 549; 2005

Rustgi, Anil, K.

„The genetics of hereditary colon cancer“

Genes and Development Vol 21: 2525- 2538; 2007

Santucci- Darmanin, Sabine ; Walpita, Deepika; Oise, Lespinasse Franc; Desnuelle, Claude; Ashley, Terry and Paquis- Flucklinger, Veronique

„MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis”

Federation of American Societies for Experimental Biology Journal Vol: 14: 1539- 1547, 2000

Shcherbakova, Polina V. and Kunkel, Thomas A.

„Mutator Phenotypes Conferred by MLH1 Overexpression and by Heterozygosity for *mlh1* Mutations”

Molecular and Cellular Biology 3177- 3183, 1999

Shcherbakova, Polina V.; Hall, Mark C.; Lewis, Marc S.; Bennett, Samuel E.; Martin, Karla J.; Bushel, Pierre R.; Afshari, Cynthia A. and Kunkel, Thomas A.

„Inactivation of DNA Mismatch Repair by Increased Expression of Yeast MLH1”

Molecular and Cellular Biology 940- 951, 2001

Shimodaira, Hideki; Filosi, Nicole; Shibata, Hiroyuki; Suzuki, Takao; Radice, Paolo; Kanamaru, Ryunosuke; Friend, Stephen H.; Kolodner, Richard D. and Ishioka, Chikashi

„Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*”

Nature 1998

Takahashi, Masanobu; Shimodaira, Hideki; Andreutti-Zaugg, Corinne; Iggo, Richard; Kolodner, Richard D.; and Ishioka, Chikashi

“Functional Analysis of Human MLH1 Variants Using Yeast and In vitro Mismatch Repair Assays“

Cancer Research Vol 67: 4595-4604, 2007

Tran, H. T., Keen, J. D., Krickler, M., Resnick, M. A. and Gordenin, D. A.

“Hypermutability of homonucleotide runs in mismatch repair and DNA polymerase proofreading yeast mutants”

Molecular and Cellular Biology Vol 17: 2859- 2865, 1997

Umar, Asad; Boland, C. Richard; Terdiman, Jonathan P.; Syngal, Sapna; de la Chapelle, Albert; Rüschoff, Josef; Fishel, Richard; Lindor, Noralane M.; Burgart, Lawrence J.; Hamelin, Richard; Hamilton, Stanley R.; Hiatt, Robert A.; Jass, Jeremy; Lindblom, Annika; Lynch, Henry T.; Peltomäki, Päivi; Ramsey, Scott D.; Rodriguez-Bigas, Miguel A.; Vasen, Hans F. A.; Hawk, Ernest T.; Barrett, J. Carl; Freedman, Andrew N.; Srivastava, Sudhir

„Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability“

Journal of the National Cancer Institute Vol. 96, Nr. 4: 2004

Vasen, H. F.; Mecklin, J. P.; Khan, P. M. and Lynch, H. T.

„The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)“

Diseases of the Colon and Rectum Vol 34: 424- 425, 1991

Vasen, H. F.; Watson, P.; Mecklin, J. P. and Lynch, H. T.

„New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC“

Gastroenterology 116, 1453- 1456, 1999

Wanat, Jennifer J.; Singh Nikhil and Eric Alani

“The effect of genetic background on the function of *Saccharomyces cerevisiae* mlh1 alleles that correspond to HNPCC missense mutations”

Human Molecular Genetics, Vol. 16, Nr. 4: 445- 452; 2007

Warren, Joshua J.; Pohlhaus, Timothy J.; Changela, Anita; Iyer, Ravi R.; Modrich, Paul L.; and Beese, Lorena S.

„Structure of the Human MutSa DNA Lesion Recognition Complex“

Molecular Cell Vol 26: 579- 592, 2007

Yu, Zhe; Chen, Jian; Ford, Barry N.; Brackley, Moyra E. and Glickman, Barry W.

„Human DNA Repair Systems: An Overview“

Environmental and Molecular Mutagenesis Vol 33: 3- 20, 1999

Anhang I

Allel	Klone	420nm	mU/mg	Mittelwert	STABW
WT	A	0,1532	43	37	4
	B	0,1315	37		
	C	0,1225	34		
	D	0,1185	33		
lexA	A	0,0053	9	2	1
	B	0,0053	1		
	C	0,0136	1		
	D	0,0090	4		
A21E	A	0,1469	22	26	5
	B	0,1440	22		
	C	0,1626	25		
	D	0,2162	33		
P28L	A	0,0272	8	3	3
	B	0,0062	2		
	C	0,0039	1		
	D	0,0023	1		
M35R	A	0,0039	1	1	1
	B	0,0118	3		
	C	0,0008	0		
	D	0,0000	0		
Q48P	A	0,0037	1	1	1
	B	0,0000	0		
	C	0,0037	1		
	D	0,0060	2		
N64S	A	0,0506	14	19	6
	B	0,0928	26		
	C	0,0557	15		
	D	0,0810	23		
F80V	A	0,3259	93	102	15
	B	0,3259	91		
	C	0,3613	100		
	D	0,4228	123		
K84E	A	0,1286	36	36	9
	B	0,1203	37		
	C	0,1791	50		
	D	0,1214	34		
	E	0,0805	24		
G101V	A	0,0346	5	5	2
	B	0,0190	3		
	C	0,0190	3		
	D	0,0526	8		
hMLH1-Wildtyp und hMLH1-Varianten im Hefestamm L40; Tab. AI.1: Rohdaten der quantitativen Bestimmung der β -Galaktosidase- Aktivität.					

Rohdaten der Untersuchungen zum dominant negativen Mutatorphänotyp

hMLH1-lexA							
Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	5,94E+05	2,81E+03	1674	6,09	2,75E+02	5,38E+05	5,10E-04
2	4,84E+05	2,66E+03					
3	5,24E+05	2,43E+03					
4	5,24E+05	1,97E+03					
5	5,66E+05	1,98E+03					
6	4,76E+05	2,83E+03					
7	5,48E+05	2,59E+03					
8	5,66E+05	2,29E+03					
9	5,12E+05	1,62E+03					
10	6,20E+05	1,92E+03					
11	6,12E+05	2,02E+03					
12	5,24E+05	1,92E+03					
13	4,64E+05	4,70E+03					
14	5,28E+05	1,66E+03					
15	5,64E+05	2,16E+03					
16	5,10E+05	1,67E+03					

Wildtyp + lexA							
Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean (m)	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	8,80E+07	2,06E+02	187	5	38,24	9,80E+07	3,9012E-07
2	1,09E+08	1,78E+02					
3	1,67E+08	5,60E+02					
4	1,15E+08	1,64E+02					
5	8,74E+07	1,96E+02					
6	1,19E+08	2,00E+02					
7	1,05E+08	1,50E+02					
8	8,34E+07	1,58E+02					
9	1,01E+08	4,66E+02					
10	8,56E+07	1,98E+02					
11	8,70E+07	1,56E+02					
12	9,84E+07	1,74E+02					
13	8,80E+07	1,76E+02					
14	8,60E+07	2,12E+02					
15	7,36E+07	3,48E+02					
16	7,50E+07	1,48E+02					

hMLH1-A21E							
Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	6,78E+05	4,35E+02	450	5,69	7,92E+01	6,65E+05	1,19E-04
2	6,60E+05	4,17E+02					
3	6,12E+05	4,56E+02					
4	5,44E+05	3,70E+02					
5	6,08E+05	4,14E+02					
6	6,50E+05	3,54E+02					
7	7,72E+05	4,78E+02					
8	5,46E+05	4,42E+02					
9	8,84E+05	4,76E+02					
10	7,22E+05	4,99E+02					
11	6,80E+05	4,45E+02					
12	5,92E+05	4,19E+02					
13	6,14E+05	9,27E+02					
14	7,08E+05	8,59E+02					
15	7,42E+05	5,46E+02					
16	6,30E+05	8,69E+02					

hMLH1-P28L							
Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	6,46E+06	6,08E+02	7,53E+02	6,01	1,25E+02	5,20E+06	2,41E-05
2	3,80E+06	5,39E+02					
3	2,30E+06	5,32E+02					
4	3,90E+06	5,54E+02					
5	4,26E+06	9,20E+02					
6	4,60E+06	1,82E+03					
7	3,56E+06	5,16E+02					
8	3,80E+06	8,78E+02					
9	6,62E+06	1,25E+03					
10	5,54E+06	8,38E+02					
11	6,86E+06	6,97E+02					
12	6,28E+06	6,87E+02					
13	5,46E+06	5,71E+02					
14	6,70E+06	1,21E+03					
15	5,84E+06	8,09E+02					
16	7,18E+06	9,37E+02					

hMLH1-M35R

Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	5,60E+07	1,12E+02	112	4,49	2,49E+01	5,51E+07	4,53E-07
2	6,08E+07	1,00E+02					
3	6,45E+07	8,80E+01					
4	8,90E+07	1,80E+02					
5	5,68E+07	3,66E+02					
6	5,30E+07	1,08E+02					
7	5,18E+07	1,34E+02					
8	6,74E+07	1,28E+02					
9	5,56E+07	8,40E+01					
10	4,98E+07	8,60E+01					
11	4,36E+07	9,60E+01					
12	5,24E+07	1,50E+02					
13	2,44E+07	1,88E+02					
14	5,50E+07	1,36E+02					
15	4,60E+07	1,12E+02					

hMLH1-Q48P

Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	6,28E+07	9,80E+02	136	4,69	2,90E+01	5,75E+07	5,04E-07
2	6,28E+07	2,40E+02					
3	6,04E+07	1,02E+02					
4	6,44E+07	1,38E+02					
5	5,94E+07	1,20E+02					
6	2,84E+07	5,00E+01					
7	5,98E+07	1,02E+02					
8	6,24E+07	1,70E+02					
9	6,54E+07	1,42E+02					
10	6,06E+07	1,60E+02					
11	5,22E+07	1,74E+02					
12	5,76E+07	2,00E+02					
13	6,68E+07	1,34E+02					
14	6,24E+07	1,22E+02					
15	2,48E+07	4,60E+01					
16	7,04E+07	1,02E+02					

hMLH1-N64S							
Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	6,08E+06	3,23E+03	3113,00	7,39	4,21E+02	6,53E+06	6,45E-05
2	3,68E+06	1,62E+03					
3	5,38E+06	3,00E+03					
4	3,26E+06	3,54E+03					
5	5,62E+06	5,35E+03					
6	5,34E+06	1,54E+03					
7	4,50E+06	2,55E+03					
8	5,22E+06	4,02E+03					
9	2,62E+06	9,20E+02					
10	1,88E+06	7,80E+02					
11	4,92E+06	5,84E+03					
12	3,46E+06	3,46E+03					
13	1,70E+07	3,38E+03					
14	1,75E+07	3,50E+03					
15	8,13E+06	1,62E+03					
16	9,82E+06	1,98E+03					

hMLH1-F80V							
Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	5,18E+06	2,12E+02	919	6,29	1,46E+02	3,65E+06	4,01E-05
2	3,32E+06	2,46E+02					
3	4,28E+06	8,32E+02					
4	3,16E+06	1,90E+02					
5	3,74E+06	2,04E+03					
6	2,90E+06	5,50E+02					
7	2,94E+06	8,56E+02					
8	4,00E+06	3,76E+02					
9	4,20E+06	9,82E+02					
10	3,70E+06	1,32E+03					
11	2,96E+06	2,51E+03					
12	3,96E+06	1,05E+03					
13	3,96E+06	2,88E+02					
14	1,94E+06	2,04E+03					
15	4,26E+06	1,10E+03					
16	3,86E+06	1,27E+03					

hMLH1-K84E							
Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	2,22E+05	1,28E+02	488	5,69	8,58E+01	3,76E+05	2,28E-04
2	4,66E+05	1,32E+03					
3	4,80E+05	1,25E+03					
4	4,64E+05	3,42E+02					
5	1,52E+05	2,43E+02					
6	3,58E+05	1,68E+02					
7	5,14E+05	6,66E+02					
8	4,34E+05	5,66E+02					
9	3,32E+05	4,50E+02					
10	2,92E+05	2,60E+02					
11	3,82E+05	5,17E+02					
12	2,72E+05	6,60E+02					
13	4,42E+05	4,06E+03					
14	3,12E+05	2,28E+02					
15	4,10E+05	4,60E+02					
16	4,78E+05	7,70E+02					

hMLH1-G101V							
Klon	Zellzahl	Revertanten	Median r0	r0/m	Mean	MW Zellzahl	Mutationsrate
1	4,48E+05	1,80E+02	391	5,59	6,99E+01	3,43E+05	2,04E-04
2	1,42E+05	9,67E+01					
3	2,60E+05	3,16E+02					
4	4,88E+05	4,86E+03					
5	3,58E+05	4,40E+02					
6	1,60E+05	2,90E+02					
7	2,34E+05	1,84E+02					
8	3,98E+05	1,84E+03					
9	4,98E+05	4,10E+02					
10	4,10E+05	2,74E+02					
11	2,76E+05	3,72E+02					
12	3,04E+05	1,38E+03					
13	2,40E+05	1,46E+02					
14	2,88E+05	9,20E+02					
15	6,02E+05	5,20E+02					
16	3,76E+05	4,16E+02					

Anhang II

(1)Kondo et al. 2003

Y2H-Interaktionsassay

In vitro-Interaktionsassay (IVTT-GST)

(2)Raevaara et al. 2005

Subzelluläre Lokalisation von hMLH1 alleine oder mit hPMS2

In vitro-MMR-Assay

Expression in 293T-Zellen

Koimmunoprecipitation von hMLH1 und hPMS2

(3)Heick Diplomarbeit 2008

Expression in Hefe (Kotransformation mit hPMS2 oder hMLH1)

DNM in E134

Quantitative LacZ-Aktivitätsbestimmung

* diese Arbeit Methoden wie Heick

(4)Ellison et al. 2001

Mutatoreffekte in Hybridprotein yMlh1p/hMLH1

Mit eingeführten Missense-Mutationen

(5)Ellison et al. 2004

Mutatoreffekte in Hybridprotein yMlh1p/hMLH1

Mit eingeführten Missense-Mutationen

(6) Takahashi et al. 2007

Expression in humanen HCT116 Zellen (in %)

3 Assays des DNM (LacZ, GFP, ADE2), 3- = in allen 3 Assays kein ME; 3+ = in allen 3 Assays

ME ausgelöst,

in vitro-MMR-Aktivität in %

(7)Wanat et al. 2007

DNM in verschiedenen Hefestämmen: S288c/SK1

NM= keine Mutator, LM= low Mutator; IM= intermediärer Mutator, M= Mutator, HM= High Mutator

(8)Pagenstecher et al. 2006

Spleiß-Analyse auf RNA-Level

Theoretische Bestimmung mittels ESE-Finder

Und BHDP (Baltimore Huntington's Disease Program)

(10)Shimodaira et al. 1998

DNM-Analysen

(11)Shcherbakova et al. 1999

DNM-Analysen

p= pathogen

n= normal (Wildtyp)

gelb gekennzeichnete Zellen = Missense-Varianten des deutschen Konsortiums

DNM= Dominant Negativ Mutatorphänotyp

ME= Mutatoreffekt

Summary

Genome stability is ensured by DNA-repair mechanism and is conserved from bacteria to men. Unrepaired alterations in the DNA can cause diseases for example cancer. One of these repair mechanisms is the highly conserved postreplicative DNA-mismatch-repair system. Germline mutations in the mismatch repair genes are the reason for an increased susceptibility for colon cancer in HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal carcinoma) patients. Mutations in DNA repair genes can be nonsense, frameshift or splicesite mutations with clear pathogenicity. 30 % of all HNPCC-patients have missense mutations in the mismatch repair gene *hMLH1*. The characterisation of the pathogenesis of missense mutations is difficult, because an alteration of an amino acid can influence the function of the protein. Functional analyses of amino acid substitutions are important for the classification of such mutations into pathogenic or non-pathogenic variants.

In this work *Saccharomyces cerevisiae* was used as model organism for the functional analyses of the human mismatch repair protein hMLH1. 17 missense mutations were inserted into the ATPase-domain and the hPMS2-interaction domain of hMLH1 and the interaction with the partner hPMS2 was analysed in a yeast-2-hybrid system (Y2H). Quantitative Y2H-analyses were made for 8 alleles of the ATPase domain. Additionally these mutations were analysed in a system called the dominant negative mutator phenotype assay. The interference of the hMLH1 protein with the yeast mismatch repair system reveals information about the protein function. To determine the mutation rate, an existing yeast LYS2A14 reporter system was used. For further characterisation of the alleles analysed, the protein amount was determined. In these studies three missense mutations in the ATPase domain were classified as pathogenic. The characterisation of the other five missense mutations in the ATPase domain revealed only slight effects on protein function.

The analysis of multiple hereditary osteochondroma (MO) was another topic of this thesis. MO is a dominant hereditary disease with a prevalence of 1:50 000. MO is characterised by development of cartilage capped bony outgrowths (osteochondromas) of the long bones and show an increase in size in the first decade of life. Osteochondromas may cause pain, functional problems and deformities especially of the long bones of the extremities. The disease is based on mutations of at least three different genes.

In this thesis the correlation between the gene loci and the phenotype of the disease was analysed. For this purpose, family data were collected and the involved gene loci were identified by linkage studies. Mutation detection was performed by DHPLC analysis. Clinical data of patients were collected in the orthopaedic clinic and compared with the results of this work to make a phenotype-genotype correlation. There was a positive correlation between the ratio of the ulna length and height of the patient and the gene locus of *EXT1*.

A further aspect of this work was the finding of molecular differences between osteochondroma and normal cartilage tissue. The genes *EXT1* and 2 encode glycosyl transferases, which are involved in the elongation of the polysaccharide chain heparansulfate. Currently there is limited information about signalling pathways involved in the formation of the osteochondroma. Molecular analyses of osteochondroma cells should give further insights into the metabolism. For this purpose, primary adherent cells were created from tumor tissue and analysed in array analyses. The comparison between the transcriptome of tumor cells and normal chondrocyte cells showed deregulated expression of genes, which can be associated with the development of cartilage tissue. The up- or down regulated genes of interest were analysed with quantitative real time PCR analysis. The *EXT1*-gene itself showed no difference in the array analyses and quantitative real time PCR. There was a down regulation of the genes *Decorin*, *Chathapsin D*, *Kollagen Typ 12*, *Metalloprotease 2 (MM2)* and *IHH*. Up regulation was found for *Cyclin D1* and *PTbRP*. Some of these genes are involved in signalling pathways during chondrocytes differentiation pointing to a disturbed differentiation; others are components of the extra cellular matrix (ECM) of the cartilage, demonstrating that EXT might be involved in the formation of the correct ECM.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mir bei dem Gelingen meiner Arbeit geholfen haben und die ich jetzt wieder vergesse zu erwähnen.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Royer-Pokora für die Möglichkeit die Arbeit an ihrem Institut durchzuführen, die konstruktive Kritik und die Korrekturen bei der Anfertigung der Dissertation.

Frau Dr. Barbara Leube danke ich, für die Möglichkeit ein interessantes Themegebiet bearbeiten zu können und ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft auch in schwierigen Zeiten.

Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann danke ich für die Übernahme des Koreferats. Danke auch für die große Unterstützung, die mir in seinem Institut zuteil wurde und den Abschluss dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe der „Hefen und Chlamydien“ bedanke ich mich. Ihr seid wie eine Mutter zu mir. Besonderer Dank geht an Katja, für die Geduld bei meinen ewigen Fragen und der Unterstützung am Mikroskop und im Labor überhaupt. Vergessen möchte ich auch Boris nicht, mit dem ich einige nette Stunden beim Plattieren verbringen durfte. Danke an Anne, Frauke und Irina für die gute Stimmung im Labor und Steffi für manches geschnorrte Zigarettchen. Als „Gastarbeiter“ fühle ich mich sehr wohl bei euch. Danke auch an Eleni, Gido, Tim und Rafat für eure Anteilnahme und Hilfe. Danke auch an Gabi K. für die Einführung ins Hefelabor.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei den netten Kollegen aus der Humangentik. Besonders erwähnen möchte ich Karin, der ich meine Kenntnisse der Zellkultur verdanke. Die mich immer wieder mit Brezel und Wasser versorgt hat, so dass ich nicht verhungern musste. Vielen Dank auch an dich Beate, für deine Unterstützung und deine unermüdlichen Korrekturvorschläge. Hab vielen Dank. Danken möchte ich auch Silke und Edith für die Hilfe und manch geliehene Unit Polymerase.

Danke auch an Gela und Jutta für die netten Gespräche über meine Tiere. Auch den „Tumor“-Leuten danke ich für eure Mutmachparolen und manch nettes Gespräch.

Meiner Freundin Dörte danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und die Freundschaft, die du mir entgegen bringst.

Thomas danke ich für die Unterstützung in der stressigen Zeit.

Zuletzt danke ich Eliza, Matthias und Lara. Durch eure Geduld und Unterstützung habt ihr sehr zum Abschluss der Arbeit beigetragen. Ich liebe euch.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Karin Hardt

Curriculum Vitae

Persönliche Informationen

Name, Vorname Hardt, Karin	Geburtsdatum 10.10.1961	Geburtsort Sevelen/ Issum
Adresse Prinz- Ferdinand- Platz 2 47877 Willich	Telefon 02156/2767	E- Mail karin.hardt@arcor.de
Familienstand verheiratet	Staatsangehörigkeit deutsch	Kinder drei

Schulbildung

Hauptschule	1972- 1977
Handelsschule mit Abschluss	1977- 1979
FOS für Gestaltung mit Abschluss	1982- 1983
Abendgymnasium des Kreises Viersen	1985- 1987

Studienverlauf

Mathematik an der GH Duisburg	1982- 1984
Biologie an der Uni Bielefeld und Uni Düsseldorf mit Abschluss „Diplom“	1988- 1996

Berufliche Qualifikationen

Ausbildung zur Malerin- und Lackiererin	08.1979 bis 07.1982
Tätigkeit im Institut für Humangenetik im Universitätsklinikum Düsseldorf	04. 2002 bis 12. 2004
Wissenschaftl. Hilfskraft in der Nuklearmedizinischen Klinik Düsseldorf	04. 2005 bis 08. 2005
Tätigkeit im Institut für Funktionelle Genomforschung Universität Düsseldorf	10.2007 bis 02.2008
Tätigkeit im Institut für Humangenetik im Universitätsklinikum Düsseldorf	08.2005 bis 07.2008