

**Molekulare Untersuchung der Tumorsuppressorgene
BRCA1 und *BRCA2* bei familiären und sporadischen
Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Beate Betz

aus Hilden

Düsseldorf 2000

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ.-Prof. Dr. M. W. Beckmann

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. C. P. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2001

Elektronisch veröffentlicht unter:

<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/betz.html>

MEINEN ELTERN

1. Einleitung.....	1
1.1. Molekulargenetik des Mammakarzinoms	3
1.1.1. Familiäres Mamma-und/oder Ovarialkarzinom-Syndrom	4
1.1.1.1. Das Tumorsuppressorgen <i>BRCA1</i>	5
1.1.1.2. Das Tumorsuppressorgen <i>BRCA2</i>	7
1.1.2. Tumorsuppressorgene in sporadischen Mammakarzinomen.....	8
1.1.2.1. Das Tumorsuppressorgen <i>TP53</i> (p53)	8
1.1.2.2. Der Zellzyklusinhibitor p21	10
1.2. Prädiktive Diagnostik.....	11
1.2.1. Direkte DNA Sequenzierung.....	12
1.2.2. DHPLC	13
1.3. Aufgabenstellung	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Patientenmaterial	16
2.1.1. Proben für die <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i> Analyse.....	16
2.1.2. Tumormaterial.....	16
2.1.2.1. Mammakarzinome	16
2.1.2.2. Ovarialkarzinome	17
2.2. Zellkultur	18
2.2.1. Zellkulturlösungen	18
2.2.2. Kulturbedingungen	18
2.2.3. Kultivierung der Zelllinien.....	18
2.2.4. Subkultivierung und Ernten der Zellen	18
2.2.5. Kryokonservierung von Zellen	19
2.3. DNA Isolierung	19
2.3.1. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	19
2.3.2. Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen	20
2.3.3. Isolierung genomischer DNA aus Blutlymphozyten.....	20
2.4. RNA Isolierung	20
2.4.1. RNA Isolierung aus Gewebe.....	21
2.4.2. RNA Isolierung aus Zellkulturen	21
2.5. cDNA Synthese	21
2.5.1. Kontrolle der cDNA durch β -Actin PCR	21

2.6. PCR-Amplifikation	22
2.6.1. PCR zur Amplifikation der <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i> Fragmente zur direkten Sequenzierung.....	28
2.6.2. PCR zur Amplifikation der <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i> Fragmente zur Mutationsanalyse mittels DHPLC	29
2.6.2.1. Psoralenmodifikation von Exon 5 / <i>BRCA1</i>	30
2.6.3. PCR zur Amplifikation von <i>TP53</i> zur Mutationsanalyse mittels DHPLC	31
2.6.4. PCR zur Analyse der Exon 13 Duplikation	31
2.6.5. PCR zur LOH-Analyse des <i>BRCA1</i> Gens.....	32
2.6.6. Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA Expression	33
2.6.6.1. RT-PCR zur Quantifizierung der <i>BRCA1</i> Expression	33
2.6.6.2. RT-PCR zur Quantifizierung der <i>p21</i> Expression	34
2.6.7. PCR zur Amplifizierung des <i>BRCA1</i> Promotors	34
2.6.8. PCR zur Amplifikation des Exon 13 / <i>BRCA1</i> aus cDNA	35
2.6.8.1. Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i>	35
2.7. Sequenzierung von <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	35
2.8. Elektrophoretische Auftrennungsmethoden	37
2.8.1. Die elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen.....	37
2.8.2. Die elektrophoretische Auftrennung mit dem A.L.F. und A.L.F.express	38
2.9. DHPLC Analyse.....	39
2.10. Mikrobiologische Methoden	42
2.10.1. Stämme und Medien	42
2.10.1.1. Bakterienstämme	42
2.10.1.2. Medien und Aufzucht von <i>E. coli</i>	42
2.10.2. Plasmide.....	43
2.10.3. Klonierung	43
2.10.3.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
2.10.3.2. Restriktionsanalysen.....	44
2.10.3.3. Ligation	44
2.10.3.4. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	44
2.10.3.4.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	44
2.10.3.4.2 Elektroporation.....	45
2.10.3.5. Plasmidpräparation	45
2.10.4. Transfektion humaner Karzinom-Zelllinien mit FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim)	45

2.10.5. Reporter Gen Assay	46
2.10.5.1. Messung der Luciferaseaktivität (Luciferase Assay, Promega):	46
2.10.5.2. Messung der Galaktosidaseaktivität (Galaktolight Assay, Promega):	46
3. Ergebnisse	47
3.1. Methoden der Mutationsanalyse	47
3.1.1. Direkte DNA-Sequenzierung.....	47
3.1.1.1. Etablierung der PCR.....	48
3.1.1.1.1 Primerdesign für die <i>BRCA2</i> -PCR.....	49
3.1.1.1.2 Automatisierung der <i>BRCA2</i> -PCR.....	49
3.1.1.2. Etablierung der <i>BRCA2</i> -Sequenzierung.....	50
3.1.1.2.1 Automatisierung der Sequenzierreaktion.....	50
3.1.1.2.2 Auswertung der Sequenzierung	51
3.1.2. DHPLC	51
3.1.2.1. Etablierung der PCR.....	51
3.1.2.1.1 Taq-Polymerase.....	52
3.1.2.1.2 Primerdesign und PCR Bedingungen für die DHPLC Analyse der Gene <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	53
3.1.2.1.3 Automatisierung der PCR für die <i>BRCA1/2</i> Analyse.....	53
3.1.2.2. Etablierung der DHPLC-Analyse.....	54
3.1.2.2.1 Bestimmung des Gradienten	54
3.1.2.2.2 Bestimmung der Analysetemperatur.....	55
3.1.2.2.3 DHPLC Bedingungen für <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	58
3.1.2.3. Positivkontrollen für <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	59
3.1.2.3.1 Amplifizierung der Positivkontrollen	60
3.1.2.3.2 Entwicklung eigener Positivkontrollen.....	60
3.1.2.3.3 Überprüfung der Analysebedingungen mittels der Positivkontrollen	61
3.1.2.3.4 Sensitivitätsermittlung mittels der Positivkontrollen	62
3.1.2.3.5 Nicht-detektierbare Positivkontrollen	62
3.1.2.3.6 Detektion von Mutationen in "high-melting domains"	62
3.1.2.3.6.1 Vergleich TGGE-DHPLC ohne Modifikation	63
3.1.2.3.6.2 Vergleich TGGE-DHPLC mit Modifikation.....	65
3.1.2.4. Interpretierbarkeit des Elutionsprofils	67
3.1.2.5. Analyse rekurrenter <i>BRCA1/2</i> Mutationen	69
3.2. Analyse der Gene <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i> in Mamma- und/oder Ovarialkarzinomfamilien.....	70

3.2.1. BRCA2 Mutationsanalyse in 12 Risikofamilien mittels DNA Sequenzierung.....	70
3.2.2. BRCA1/2 Mutationsanalyse in 42 Risikofamilien mittels DHPLC	72
3.2.3. UV-Analyse des <i>BRCA2</i> Gens	73
3.2.4. Polymorphismencluster in <i>BRCA1</i>	75
3.2.5. Exon 13 Duplikation.....	75
3.3. Mutationsanalyse von TSG in sporadischen Mammakarzinomen	77
3.3.1. Analyse des <i>TP53</i> Gens	79
3.3.1.1. PCR und Etablierung der DHPLC Analyse.....	80
3.3.1.2. Ergebnisse der DHPLC	80
3.3.1.3. Verifizierung des DHPLC Ergebnisses durch direkte Sequenzierung	81
3.4. Analyse von <i>BRCA1</i> und <i>p21</i> in sporadischen Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen	82
3.4.1. LOH Analysen.....	83
3.4.1.1. LOH der drei intragenischen <i>BRCA1</i> Marker D17S855, D17S1322 und D17S1323 in sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen.....	84
3.4.2. Expression	85
3.4.2.1. Expression von <i>BRCA1</i>	85
3.4.2.1.1 Expression von <i>BRCA1</i> in sporadischen Mammakarzinomen.....	86
3.4.2.1.2 Expression von <i>BRCA1</i> in sporadischen Ovarialkarzinomen.....	87
3.4.2.1.3 Statistische Auswertung.....	88
3.4.2.1.3.1 Auswirkungen des <i>BRCA1</i> Allelverlusts auf die <i>BRCA1</i> Expression ..	88
3.4.2.1.3.2 Expression <i>BRCA1</i> - Klinische Daten.....	88
3.4.2.2. Expression von <i>p21</i>	89
3.4.2.2.1 <i>p21</i> Expression in sporadischen Mammakarzinomen	90
3.4.2.2.2 <i>p21</i> Expression in sporadischen Ovarialkarzinomen	91
3.4.2.3. Korrelation zwischen <i>BRCA1</i> und <i>p21</i> Expression	92
3.4.3. Klonierung des <i>BRCA1</i> Promotors aus Tumoren unterschiedlicher <i>BRCA1</i> Expression.....	92
3.4.4. Allelspezifische Expression von <i>BRCA1</i>	94
3.4.4.1. Verteilung der Allelotypen in sporadischen Mammakarzinomen und einem Kontrollkollektiv	95
3.4.4.2. RFLP-Analyse von cDNA von sporadischen Mammakarzinomen und Normalgewebe	96
4. Diskussion.....	98
4.1. Das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinom.....	98

4.1.1. Präventive Gendiagnostik für <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	98
4.1.2. Ergebnisse der Familienanalyse im Vergleich zu den Daten des Deutschen Konsortiums	106
4.2. Das sporadische Mamma- und/oder Ovarialkarzinom.....	109
4.2.1. <i>BRCA1</i> -Expressionsanalysen.....	110
4.2.2. <i>p21</i> -Expressionsanalysen	113
4.2.3. Allelspezifische Expression in Normal- und Tumorgewebe	115
5. Zusammenfassung	119
6. Literaturverzeichnis.....	121
7. Abkürzungsverzeichnis.....	136
8. Danksagung	139
9. Erklärung.....	140
10. Anhang	141
10.1. Patientendaten	141
10.2. Positivkontrollen für <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	144
10.3. Mutationen in den Genen <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	146
10.4. LOH Daten.....	150
10.5. Bestimmung der relativen Expression von <i>BRCA1</i> und <i>p21</i>	155

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren hat sich das Wissen über die genetischen Hintergründe wichtiger menschlicher Krankheiten durch die Identifizierung krankheitsrelevanter Veränderungen (Mutationen) im menschlichen Genom erweitert. Ursache vieler Krankheitsbilder sind Wechselwirkungen zwischen genetischen und zahlreichen nichtgenetischen (z. B. Mutagene in der Umwelt) modulierenden Faktoren. Dabei kann die Gewichtung der genetischen Faktoren unterschiedlich sein. Monogene Erkrankungen, die durch die genetische Veränderung eines Gens verursacht werden, sind sehr selten. Häufiger sind multifaktorielle Krankheiten, die durch eine Vielzahl genetischer und nicht genetischer Faktoren verursacht werden. Die meisten multifaktoriellen Erkrankungen, wie z. B. Tumorerkrankungen, treten sporadisch auf, wobei familiäres Vorkommen mit unterschiedlicher Häufung beobachtet wird (durchschnittlich 10-20%) (Wolf G., 2000). Zu vielen komplexen Krankheitsbildern sind inzwischen Kandidatengene beschrieben, in denen sowohl Keimbahn- als auch somatische Mutationen nachgewiesen werden (Ganten and Ruckpaul, 1998a und b). Obwohl an der Krebserkrankung in der Regel somatische Mutationen beteiligt sind, werden familiäre Formen von fast allen Tumortypen beschrieben. Der Anteil hereditärer Tumoren an der Gesamtheit der Tumoren ist generell gering (1-5%) kann aber, wie im Fall des Retinoblastoms bis zu ca. 40% betragen (Buchanan and Cavenee, 1987; Lohmann and Hosthempke, 1998). Beim Mammakarzinom liegt der Anteil der Karzinome mit einem familiären Hintergrund bei etwa 25%, während 75% der Karzinome sporadisch entstehen (B. Weber, St. Gallen, 1998).

Die Tumorentstehung und Entwicklung stellt einen Mehrschrittprozeß dar, in dem auf molekularer Ebene u. a. die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen involviert sind (Alberts et al., 1990; Prescott und Flexer, 1990). Angelehnt an das von Fearon und Vogelstein (Fearon et al., 1990) für das Kolorektalkarzinom vorgeschlagene Mehrschrittkarzinogenese-Modell kann ein analoges hypothetisches Modell für die Entstehung des Mammakarzinoms postuliert werden (Beckmann et al., 1997b). Zu den beeinflussenden Faktoren gehören unter anderem physiologische Wachstumsfaktoren, Hormone und genetische Veränderungen, die einerseits DNA-Schäden im Erbgut und damit eine genetische Prädisposition, andererseits spontane DNA-Schäden (Punktmutation, Deletion, Insetion, Translokation, Amplifikation) umfassen. Erst das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren führt letztendlich zur Entstehung eines invasiven Karzinoms, wobei das zeitliche Auftreten und die Interaktion der einzelnen Faktoren noch ungenügend erforscht sind. Genetische Veränderungen betreffen die Gruppen der Onkogene und der Tumorsuppressorgene.

Proto-Onkogene sind Gene, die physiologischerweise wachstumsfördernde Funktionen besitzen. Durch Aktivierung in Folge genetischer Veränderungen (Punktmutation, Chromosomale Translokation oder Gen-Amplifikation) werden diese Proto-Onkogene zu Onkogenen, die die Tumorentstehung und Progression fördern (Beckmann et al., 1993 und 1997; Prescott und Flexer, 1990). Aufgrund ihrer Lokalisation, Struktur und Funktion in der Zelle lassen sie sich in mehrere Klassen einteilen: Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, GTP-bindende Proteine und Zellkernproteine (Alberts et al., 1990; Bishop, 1991).

Die Genprodukte von Tumorsuppressorgenen wirken als negative Regulatoren der Zellproliferation (Beckmann et al., 1993 und 1997; Alberts et al., 1990). Werden sie inaktiviert, haben sie die gleiche Bedeutung bei der Entstehung und Progression von Malignom-erkrankungen wie Onkogen-Produkte. In der normalen Zelle besitzen die Tumorsuppressorgene verschiedene Funktionen, wie z. B. in der Zelladhäsion (*DCC*), der Signaltransduktion (*NF-1*, *ATM*), der Kontrolle der Transkription (*TP53*, *RB*, *BRCA1*, *BRCA2*) und in der DNA-Reparatur (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*). Sie können ebenfalls in die Kontrolle des Zellzyklus involviert sein (*TP53*, *p21*, *CDKN2*, *ATM*, *BRCA1*) und Apoptose induzieren (*TP53*, *BRCA1*) (Bryant, 1993; Chapman and Verma, 1996; Milner et al., 1997; Monteiro et al., 1996; Levine, 1993; Savitsky et al., 1995; Scully et al., 1997; Shao et al., 1996; Sharan et al., 1997).

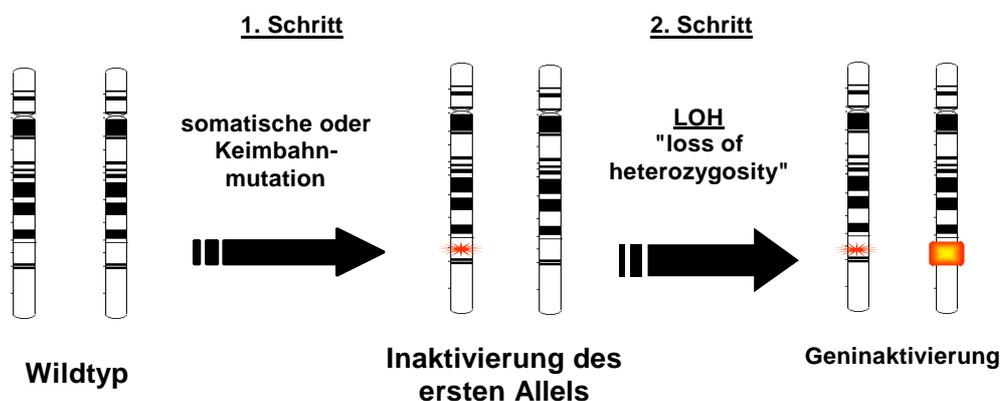


Abbildung 1.1 "Zwei-Schritt"-Modell von Knudson (1971): Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen verläuft in zwei Schritten. Nach der Inaktivierung des ersten Allels durch eine Mutation, kommt es durch Verlust der Heterozygotie zur Geninaktivierung.

Nach der Zweischnitt-Hypothese von Knudsen (1971) erfolgt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in zwei Schritten (siehe Abb. 1.1): Zunächst wird eine Genkopie durch eine Mutation inaktiviert. Diese Mutation kann eine Keimbahnmutation sein oder sporadisch entstehen. Der teilweise oder komplette Verlust des zweiten Allels führt dann zur

vollständigen Inaktivierung des Gens und damit zu einem in der Tumorgenese möglicherweise entscheidendem Schritt.

1.1. Molekulargenetik des Mammakarzinoms

Im Jahr 1998 erkrankten nach Schätzungen des statistischen Bundesamtes in der Bundesrepublik Deutschland 125.000 Frauen an Krebserkrankungen. Das Mammakarzinom ist die häufigste Malignomerkrankung bei Frauen in westlichen Industrienationen. In der Altersgruppe der Frauen zwischen 35 und 50 Jahren ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache. In Deutschland gibt es etwa 50.000 Neuerkrankungen pro Jahr, die Gesamtzahl erkrankter Frauen wird auf 450.000 geschätzt. Pro Jahr sterben etwa 17.500 Frauen am Mammakarzinom.

Unter den etwa 80 Onkogenen, die für menschliche Karzinome bislang als amplifiziert beschrieben wurden, finden sich bei Mammakarzinomen nur eine kleine Untergruppe. Diese umfassen die Lokalisation 8q24 (*c-MYC*), 11q13 (*INT2*, *BCL2*, *EMS1*, *FGF3/4*, *CCND1*) und 17q12 (*c-ERBB2*) (Tsuda et al., 1989; Theillet et al., 1989; Lidereau et al., 1988; McGuire et al., 1992; Hartmann et al., 1992).

In Familien, in denen auffällig viele an Mammakarzinom erkrankte Familienmitglieder vorkommen, wurden Gene identifiziert, die als Tumorsuppressorgene von Bedeutung sind. Bislang sind fünf Gene bekannt, die nachweislich für Mammakarzinome prädisponierende Gene darstellen und etwa 20-25% aller familiär gehäuft auftretenden Mammakarzinomerkrankungen erklären (siehe Tabelle 1.1, Easton 1999).

Gen	Lokalisation	Geschätzter Anteil	
		alle Mammakarzinome (%)	Familiär gehäufte Mammakarzinome (%)
<i>BRCA1</i>	17q	1-2	8
<i>BRCA2</i>	13q	1-2	8
<i>TP53</i>	17p	<1	<1
<i>PTEN</i>	10q	<<1	<1
<i>ATM</i>	11q	2	2

Tabelle 1.1: Bekannte bzw. vermutete Mammakarzinom-Prädispositionsgene

Keimbahnmutationen treten überwiegend in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* auf. Durch sie werden hohe familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinom-Risiken bedingt. Ein weiteres Gen, *TP53* prädisponiert zum Li-Fraumeni-Syndrom, zu dem neben anderen Tumorerkrankungen

auch das (hereditäre) Mammakarzinom gehört, welches bei sehr jungen Frauen auftritt. Keimbahnmutationen im *PTEN*-Gen führen zum Cowden-Syndrom, bei dem ebenfalls das Mammakarzinom eines der Hauptmerkmale ist. Mutationen in einem fünften Gen, dem Androgenrezeptor-Gen, prädisponieren zu dem sehr selten auftretenden Mammakarzinom beim Mann (Wooster et al., 1992). Zusätzlich gibt es Hinweise, daß Keimbahnmutationen im *ATM*-Gen zu einem erhöhten Mammakarzinomrisiko führen. Eine Assoziation mit einem in der Bevölkerung selten vorkommenden Allel auf dem *HRAS*-Genlocus mit einem etwa zweifach erhöhten relativen Mammakarzinomrisiko wird diskutiert (Krontiris et al. 1993). Da die Typisierung dieses Genortes technisch sehr aufwendig ist, wurden bisher keine ausreichend großen Fall-Kontrollstudien zur Überprüfung dieser Assoziation durchgeführt (Easton 1999).

1.1.1. Familiäres Mamma-und/oder Ovarialkarzinom-Syndrom

Das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinom-Syndrom ist hauptsächlich auf Keimbahnmutationen in den Genen *BRCA1* (**bre**ast **c**ancer gene 1) und *BRCA2* (**bre**ast **c**ancer gene 2) zurückzuführen. In den Tumoren der *BRCA1/2*-Mutationsträgerinnen zeigte sich in allen untersuchten Tumoren - in Übereinstimmung mit der Knudson-Hypothese - ein Verlust der Heterozygotie (LOH) in der *BRCA1/2*- Region (Niederacher und Beckmann 1998). Die Detektionswahrscheinlichkeit für eine *BRCA1/2*- Keimbahnmutation steigt mit dem Alter der jüngsten Erkrankten bzw. der Anzahl der Erkrankten mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinom in einer Familie. Nicht in allen Risiko-Familien wird eine Kopplung mit dem *BRCA1*- oder *BRCA2*-Lokus gefunden, was für das Vorhandensein von weiteren Suszeptibilitätsgenen spricht (Ford et al. 1998; Easton 1999). Nach Statistiken des Breast Cancer Linkage Consortiums kann das kumulative Risiko für Trägerinnen mit einem *BRCA1* Gendefekt, bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken, bei 82%, für Trägerinnen mit einem *BRCA2* Gendefekt bei 84% liegen (Frauen-Allgemeinpopulation: 9% bis zum 70. Lebensjahr). Hiervon erkranken mehr als 60% der Patientinnen vor dem 50. Lebensjahr. Das Risiko der *BRCA1* Gendefekträgerinnen bis zum 70. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, liegt bei 44%, für *BRCA2* Gendefekträgerinnen bei 27% (Frauen-Allgemeinpopulation: 0,63% bis zum 70. Lebensjahr). In Abhängigkeit von der Lokalisation der Mutation im *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gen ist eine Häufung von Mamma- (*BRCA1*: Exon 11-24) oder Ovarialkarzinomen (*BRCA1*: Exon 1-11; *BRCA2*: Exon 10-11) nachzuweisen (Gayther et al., 1995 und 1997).

1.1.1.1. Das Tumorsuppressorgen *BRCA1*

BRCA1 wurde im Oktober 1994 von Miki et al. kloniert und ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q21) zwischen den Mikrosatellitenmarkern D17S1321 und D17S1325 lokalisiert. Es enthält 24 Exons und erstreckt sich über 100 kb. *BRCA1* wird in zahlreichen Geweben als 7,8 kb großes Transkript exprimiert und kodiert für ein 1863 Aminosäuren langes Protein von 220.000 Dalton. Die Funktion des *BRCA1* Gens in der Zelle scheint multifunktionell zu sein und ist bis heute noch nicht völlig geklärt. Auf einige Funktionen kann auf Grund struktureller Eigenschaften und Interaktionen zu anderen Genen geschlossen werden:

Im N-terminalen Bereich des *BRCA1* Gens (AS 1-112) befindet sich ein RING-Finger-Motiv (Miki et al., 1994). RING-Domänen vermitteln Protein-Protein bzw. Protein-DNA Interaktionen. Viele RING-Finger Proteine vermitteln eine E2 abhängige Ubiquitinierung (Lorick et al., 1999). In Gegenwart Ubiquitin-konjugierender Enzyme wird u. a. die RING-Domäne des *BRCA1* Gens in vitro ubiquitiniert. Möglicherweise bewirkt *BRCA1* mit oder sogar als Ubiquitin-Protein Ligase die Kennzeichnung von Proteinen, die vom Proteasom abgebaut werden sollen. Ein *BRCA1* Funktionsverlust könnte somit eine hohe Konzentration an proliferationsfördernden Proteinen zur Folge haben (Welch et al., 2000). Die *BRCA1* RING-Finger-Region ist darüberhinaus die Stelle, an der *BRCA1* Heterodimere mit BARD1 ("BRCA1-associated RING domain 1 protein") (Wu et al., 1996) und BAP1 ("BRCA1 associated protein") (Jensen et al., 1998) ausbildet. BAP1 ist ein de-ubiquitinierendes Enzym. Es ist fraglich, ob BAP1 zusammen mit *BRCA1* die Ubiquitinierung anderer Proteine beeinflusst, oder ob es für den Ubiquitin-abhängigen Abbau von *BRCA1* selbst verantwortlich ist (Welch et al., 2000).

Im C-terminalen Bereich des *BRCA1* Gens befinden sich schwach konservierte Wiederholungseinheiten BRCT ("*BRCA1* C-terminal"), die auf eine Rolle des Gens in der Transkriptionsaktivierung hinweisen. Dies wird auch durch die Interaktion des Gens mit RNA-Polymerase II, sowie anderen Transkriptionsfaktoren (TFIIF, TFIIE und TFIIH) unterstützt (Scully et al., 1997b). Intaktes *BRCA1* aktiviert u. a. die Transkription des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors *p21* und kann dadurch wahrscheinlich einen Zellzyklusarrest bewirken (Somasundaram et al. 1997). Derzeit noch ungeklärt ist, ob *BRCA1* direkt mit p53 interagiert und die Transkription reguliert, oder ob es sich um voneinander unabhängige Prozesse handelt.

Im Exon 11 des *BRCA1* Gens konnten zwei Kernlokalisierungsdomänen NLS 1 und 2 ("nuclear localisation signals") identifiziert werden (Thakur et al., 1997), über die eine Interaktion mit Importin α , einer Untereinheit des nukleären Transport Signal Rezeptors, nachgewiesen werden konnte (Chen et al., 1996). Bis heute ist jedoch nicht klar, ob das BRCA1 Protein cytoplasmatisch gespeichert wird und bei seiner Aktivierung in den Zellkern gelangt, oder ob es immer im Zellkern lokalisiert ist.

BRCA1-mRNA und -Protein werden hauptsächlich während der G1/S- und der G2/M-Phase exprimiert. Die Wildtypallel-Expression von *BRCA1* in proliferierenden Zellen ist erhöht (Gudas et al., 1995; Vaughn et al., 1996; Wang et al., 1997). In mitotischen Zellen interagieren BRCA1 und BRCA2 mit RAD51. Alle drei Proteine sind in sog. nukleären "Dots" kolokalisiert, während sie in meiotischen Zellen an den sich neu entwickelnden Spindelfasern lokalisiert sind (Scully et al., 1997; Chen et al., 1998). In der G1/S-Phase des Zellzyklus wird die BRCA1-Funktion durch Phosphorylierung reguliert: Durch eine endogene Kinaseaktivität erfolgt die Hyperphosphorylierung, die Dephosphorylierung ereignet sich in der M-Phase. Möglicherweise ruft BRCA1 Retinoblastom (RB)-Protein-abhängig einen Zellzyklusarrest hervor (Aprelikova et al., 1999). In der G2/M-Phase wird vermutet, daß BRCA1 zusammen mit BRCA2 eine ordnende Funktion der entstehenden Mitosespindeln übernimmt und für eine geordnete Aufteilung der Chromosomen zu ihren Tochterzellen sorgt (Xu et al., 1999; Lee et al., 1999). Normalerweise werden in einer nicht unbedeutenden Anzahl mitotischer Zellen Zentrosomen amplifiziert, was zu einer abnormalen Chromosomenaufteilung und Aneuploidie führt. G2/M-regulierende Proteine, wie p53- und das Rb-Protein, sind am Zentromer der Chromosomen lokalisiert. BRCA1 ist während der Mitosephase ebenfalls zentromer lokalisiert und interagiert mit γ -Tubulin, einem Bestandteil des Zentromers (Hsu und White, 1998). Mutantes, fehlendes oder Expressions-reduziertes BRCA1 führt möglicherweise zu genetischer Instabilität, da die regulierende Einheit bei der Zentromer-Duplikation gestört ist.

Die Rolle von BRCA1 und BRCA2 bei der DNA-Reparatur und homologen Rekombination wird aufgrund ihrer Kolokalisation und biochemischen Interaktion mit Proteinen vermutet, von denen bereits bekannt ist, daß sie Schlüsselrollen im Rahmen dieser Reparaturvorgänge einnehmen (RAD51, RAD50, BARD1, ATM). BRCA2 und RAD51 interagieren direkt miteinander und kolokalisieren in DNA-geschädigten Zellen in einem BRCA1-BRCA2-RAD51-Komplex. RAD51 wird sowohl während der Mitose, als auch während der Meiose für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen benötigt. Ein anderes, in homologe Rekombinationsprozesse einbezogenes Protein ist RAD50, welches mit BRCA1 assoziiert. Die Phospho-

rylierung des BRCA1-Proteins ist bei DNA-Schäden wahrscheinlich ATM-abhängig (Welch et al. 2000). Außerdem konnte eine Funktion von BRCA1 im TCR ("transcription coupled repair") gezeigt werden (Gowen et al., 1998).

Beim familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinom sind genetische Veränderungen des *BRCA1* Gens von Bedeutung. In sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen konnten dagegen bisher nur einige wenige Mutationen des *BRCA1* Gens nachgewiesen werden (Futeral et al., 1994; Merajver et al., 1995; Langston et al., 1993), obwohl in bis zu 42% der sporadischen Erkrankungen ein Verlust des *BRCA1* Gens mittels intragenischer Marker (LOH) beschrieben worden ist. Dies kann auf eine wesentliche Bedeutung des Gens und seines Proteins in der Karzinogenese des sporadischen Mammakarzinoms hinweisen (Niederacher und Beckmann, 1998). Die meisten sporadischen, entdifferenzierten, duktal invasiven Mammakarzinome zeigen keine oder nur eine verminderte *BRCA1*-Expression (Wilson et al., 1999). Die Hypermethylierung im Promotorbereich von *BRCA1* spielt in sporadischen Karzinomen mit LOH im *BRCA1* Bereich eine Rolle bei der Inaktivierung des zweiten Allels dieses Tumor-Suppressor-Gens (Esteller et al., 2000).

1.1.1.2. Das Tumorsuppressorgen *BRCA2*

BRCA2 wurde 1996 von Tavtigian et al. kloniert und sequenziert. Es ist auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q12-13) lokalisiert. Es enthält 27 Exons und erstreckt sich über 70 kb. *BRCA2* wird in zahlreichen Geweben als 11 kb großes Transkript exprimiert und kodiert für ein 3418 Aminosäuren langes Protein von 384.000 Dalton. Obwohl das *BRCA2* Gen dem *BRCA1* Gen im strukturellen Aufbau nicht verwandt ist, scheinen sie doch an gleichen Funktionen in der Zelle beteiligt zu sein. Auch im Fall des *BRCA2* Gens ist die Funktion noch nicht völlig geklärt, jedoch lassen sich Rückschlüsse von Struktur und Interaktion des Gens mit anderen Proteinen ziehen. Die Expression von *BRCA2* zeigt ein simultanes Verhalten zur *BRCA1* Expression. Sie ist zellzyklusabhängig mit der höchsten Expression in der G1- und in der S-Phase und korreliert mit Proliferation und Differenzierung der Brustepithelzellen (Vaugh et al., 1996; Rajan et al., 1996).

Wie *BRCA1* verfügt auch *BRCA2* im Exon 11 über "BRC-Repeats". Diese umfassen 8 Kopien einer 30-80 Aminosäuren langen Sequenz und sind für die Interaktion des *BRCA2* Gens mit RAD51 verantwortlich (Wong et al., 1997). Im N-terminalen Bereich des Gens befinden sich mögliche Transkriptions-Aktivierungsdomänen; daneben interagiert *BRCA2* ebenfalls mit verschiedenen Transkriptionsregulatoren (Milner et al., 1997). Im C-terminalen Bereich des

BRCA2 Gens befindet sich ein nukleäres Lokalisierungs-Signal (Mc Allister et al., 1997). Die Funktion des *BRCA2* Proteins bei der Aufteilung der Chromosomen in die Tochterzellen sowie in der DNA Reparatur wurde in Abschnitt 1.1.1.1 bereits eingehend dargestellt. Derzeit noch unklar ist die Rolle von *BRCA2* bei der transkriptionellen Regulation.

Beim familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinom sind genetische Veränderungen des *BRCA2* Gens von Bedeutung. In sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen konnten dagegen nur in wenigen Fällen Mutationen des *BRCA2* Gens nachgewiesen werden (Lancaster et al., 1996; Miki et al., 1996). Analog zu *BRCA1* weisen LOH Raten von bis zu 40% auf eine Bedeutung des Gens und seines Proteins in der Karzinogenese des sporadischen Mammakarzinoms hin (Niederacher und Beckmann, 1998).

1.1.2. Tumorsuppressorgene in sporadischen Mammakarzinomen

Bei der Entstehung der weitaus häufigeren sporadischen Form des Mammakarzinoms bleibt die Rolle der Gene *BRCA1* und *BRCA2* bisher unklar. Jedoch spielt eine Vielzahl von anderen Tumorsuppressorgen eine entscheidende Rolle. Im folgenden soll auf zwei weitere Tumorsuppressorgene, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, näher eingegangen werden.

1.1.2.1. Das Tumorsuppressorgen *TP53* (p53)

Das Gen für den Transkriptionsfaktor p53 (Chromosom 17p13) ist derzeit das am besten studierte Tumorsuppressorgen. Es ist lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1) und kodiert für ein 393 Aminosäuren langes Protein von 53.000 Dalton (Wagener, 1996).

Funktionell können verschiedene Domänen unterschieden werden. Der N-terminale Bereich besitzt eine Transaktivierungsdomäne (Vogelstein und Kinzler, 1992). In diesem Bereich sind die Bindungsstellen für die Proteine des Transkriptionsapparates, das adenovirale E1B-Protein und MDM2 lokalisiert (Wagener, 1996). Im mittleren Bereich des Proteins befindet sich die Core-Domäne, die für die sequenzspezifische DNA Bindung verantwortlich ist (Gottlieb und Oren, 1996). Die C-terminale Domäne beinhaltet u. a. die Oligomerisierungsdomäne sowie die Signalsequenz für die Lokalisierung von p53 im Zellkern. Phosphorylierungsstellen befinden sich sowohl im N-terminalen, als auch im C-terminalen Bereich. Der N-terminale Bereich wird durch die DNA-abhängige Proteinkinase, der C-terminale Bereich

durch die Cyclin-abhängige Kinase, die Proteinkinase C und die Caseinkinase II phosphoryliert (Gottlieb und Oren, 1996).

p53 besitzt wichtige Funktionen im Rahmen der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur. In Zellen mit DNA-Schäden kommt es zu einer gesteigerten *TP53* Expression, die wahrscheinlich auf einer posttranslationalen Proteinstabilisierung beruht. Der Zellzyklus wird in der G1-Phase unterbrochen, so daß DNA-Reparaturmechanismen wirksam werden können. Verläuft die DNA-Reparatur erfolgreich, so wird der Zellzyklus fortgesetzt, anderenfalls stirbt die Zelle ab (Apoptose). Ebenso kann p53 im Übergang von der G2- zur M-Phase im Zellzyklus kontrollierend eingreifen (Hermeking et al., 1997). Zellen mit mutantern p53-Protein arretieren nicht in der G1-Phase. Somit bleibt keine Zeit für DNA-Reparaturen, und die Zelle akkumuliert mit jeder Zellteilung weitere DNA-Schäden (Varley et al., 1997). p53 wirkt dabei als Transkriptionsregulator. Der molekulare Mechanismus der Transkriptionsaktivierung beruht auf der Bindung einer Erkennungssequenz und der Interaktion von p53 mit der Transkriptionsmaschinerie. Die p53-spezifische Erkennungssequenz besteht aus zwei Kopien des 10 bp langen Motivs 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3', wobei der Verlust einer Kopie oder die Trennung der beiden Kopien um mehr als 13 bp eine Bindung verhindern kann (Vogelstein und Kinzler, 1992). p53 aktiviert vor allem die Transkription solcher Gene, die in der Zellzyklusregulation und der Apoptose eine Rolle spielen. p53 reguliert die Transkription von *GADD45*, *p21* (einem Zellzyklusinhibitor), *MDM2* und *BAX* (ein pro-apoptotisches Gen). Liegt ein DNA-Schaden in der Zelle vor, und wird intaktes Wildtyp p53 Protein exprimiert, so spielt die transkriptionale Aktivierung von *p21* bei der Arretierung der G1-Phase eine entscheidende Rolle (Kinzler und Vogelstein, 1997). Das Genprodukt von *p21* verhindert die Bildung von Komplexen aus Cyclin und Cyclin-abhängiger Kinase und hindert die Zelle daran, von der G1- in die S-Phase überzutreten. Der Signalweg p53 -> p21 -> G1-Arrest hindert also Zellen mit DNA-Schäden daran, weiter am Zellzyklus teilzunehmen. Die Transkription anderer Gene mit Proto-Onkogen-Funktion, wie *BCL-2*, *c-MYC* und *c-FOS*, kann durch p53 unterdrückt werden. Mutationen in *TP53* können das Protein daran hindern, an die regulatorischen DNA-Sequenzen dieser Gene zu binden.

Etwa 50% aller humanen Karzinome zeigen Mutationen im *TP53* Gen. Dabei handelt es sich zumeist um Missensemutationen, die zu 90% in den 4 konservierten Regionen der Core Domäne vorkommen (Wagener, 1996). Verschiedene Stoffwechselwege können hierdurch beeinträchtigt werden: Verlust der p53-Tumorsuppressor-Funktionen, der Zellzyklus-Regulation, aber auch der Verlust der apoptotischen Antwort auf DNA-Schäden. Bestimmte Muta-

tionen können auch zu einem Funktionsgewinn führen, der zusätzlich auf onkogene Eigenschaften von p53 hinweist und mit genomischer Instabilität verbunden zu sein scheint (Gualberto et al., 1998). Zellen mit inaktiviertem p53 haben generell eine erhöhte Proliferationsrate, eine höhere genomische Instabilität und einen Verlust der G1- zu S-Phase-Kontrolle. Unter bestimmten Bedingungen kann der Verlust eines funktionsfähigen p53 Proteins zur Apoptose-Resistenz führen (Medina et al., 1998).

1.1.2.2. Der Zellzyklusinhibitor p21

Das *p21* Gen ist lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21.2) und kodiert für ein 21.000 Dalton großes Protein. Synonym werden auch die Namen *WAF1* ("wildtype-p53 activated fragment") und *CIP1* ("cyclin dependent kinase (CDK) interacting protein") verwendet.

p21 gehört zu der Gruppe der Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen (CDK). Cyclinabhängige Kinasen sind zellzyklusregulierende Proteine. Sie werden durch die Bindung eines spezifischen Cyclins und einer sich dieser Komplexbildung anschließenden Phosphorylierung durch CAKs ("CDK activating kinases") an bestimmten hochkonservierten Threoninbindungsstellen koaktiviert. Für die Aktivierung von p21 ist ein quaternärer Komplex aus p21, AP2 ("activating protein 2") und PCNA ("proliferating cell nuclear antigen") notwendig (Zeng et al., 1997). Die Inhibierung erfolgt entweder durch Dissoziation des Cyclin-Kinase-Komplexes oder durch Bindung spezifischer CDK-Inhibitoren (CKIs) (Sherr and Roberts, 1995). Zwei Klassen von CKIs werden unterschieden. Die INK4-Familie umfaßt p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Sie inhibieren spezifisch CDK4 und CDK6 (Sherr and Roberts, 1995). Die CIP/KIP-Familie umfaßt die Proteine p21^{CIP}, p27^{KIP} und p57^{KIP2}. Die Proteine dieser Familie inhibieren ein breiteres Spektrum von CDKs. Überraschenderweise können mindestens zwei Mitglieder dieser Familie, p21 und p27 in aktiven Kinasekomplexen proliferierender Zellen gefunden werden (Zhang et al., 1994; Florenes et al., 1996; Soos et al., 1996). Die genaue Funktionsweise von p21 ist noch ungeklärt. Es scheint aber, daß die Wirkung von p21 auf CDKs vom stöchiometrischen Verhältnis zwischen p21 und dem CDK-Komplex abhängt. Bei einem Verhältnis größer 1 kommt es zu einer Inhibierung des CDK-Komplexes, bei einem Verhältnis kleiner 1 nicht. Am Beispiel von CDK4-Komplexen konnte gezeigt werden, daß p21 nicht nur inhibierend wirkt, sondern in bestimmten Konzentrationen die Komplexbildung von Cyclin und Cyclin-abhängiger Kinase fördert (LaBaer et al., 1997).

Die Rolle des p21 Proteins in der Zellzykluskontrolle wird durch verschiedene Bindestellen für an der Regulation des Zellzyklus beteiligte Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich von *p21* bestärkt. Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte im Promotorbereich von *p21* eine AP2-Bindestelle identifiziert werden. AP2 ist ein 52 kDa großer, DNA-bindender Transkriptionsfaktor, der an der Signalkette der terminalen Zelldifferenzierung beteiligt ist (Zeng et al., 1997). Des Weiteren konnten zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor E2F nachgewiesen werden (Hiyama et al., 1997), sowie upstream des *p21* Promotors zwei Bindestellen für p53 (El-Deiry et al., 1995). Neben der p53-abhängigen Aktivierung von *p21* konnte 1997 gezeigt werden, daß es im Promotorbereich des *p21* Gens eine ca. 50 bp große Sequenz gibt, die für eine BRCA1-abhängige und p53-unabhängige Expressionsaktivierung von *p21* verantwortlich ist. Es ist jedoch unklar, ob BRCA1 direkt an diese Sequenz bindet oder über andere Proteine mit *p21* interagiert (Somasundaram et al., 1997).

Der Mechanismus der p21-Wirkung beruht nach überwiegender Meinung verschiedener Arbeitsgruppen auf Über- oder Unterexpression des Gens. Mutationen des *p21* Gens in sporadischen Karzinomen sind allerdings selten (Shiohara et al., 1994; Vidal et al., 1995; Ruggeri et al., 1997). Eine reduzierte p21 Expression wird jedoch mit der Entstehung und Entwicklung sporadischer Kolorektalkarzinome in Verbindung gebracht (Sinicrope et al., 1998).

1.2. Prädiktive Diagnostik

Die Identifizierung der beiden Gene *BRCA1* und *BRCA2* und das Wissen um ihre Bedeutung bei der Entstehung des familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinoms ermöglichen die Entwicklung eines Gentests. In den letzten Jahren ist der Bedarf für Familien mit gehäuftem Auftreten von Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen an genetischer Beratung, psychologischer und medizinischer Betreuung und ggf. einer genetischen Testung gewachsen. Aus diesem Grund wird seit 1996 eine von der deutschen Krebshilfe geförderte Studie zur Untersuchung familiärer Mamma- und/oder Ovarialkarzinome durchgeführt. Die Düsseldorfer Frauenklinik ist eins von 12 deutschen Zentren, die an dieser Studie beteiligt sind. Ziel dieser Zentren ist eine interdisziplinäre Beratung karzinombelasteter Familien durch Gynäkologen, Humangenetiker, Psychotherapeuten und Molekulargenetiker. Nach eingehender Beratung kann bei Erfüllung der Einschlusskriterien eine genetische Testung der Gene *BRCA1* und *BRCA2* erfolgen. Vom Ergebnis dieser molekulargenetischen Analyse hängen die weiteren Maßnahmen, wie intensives Früherkennungsprogramm oder Angebot präventiver Medikamente oder Operationen ab (Kuschel et al., 2000).

Die Analysemethode muß so sensitiv wie möglich sein. Im Sinne der Patienten muß die genetische Analyse jedoch auch in einem vertretbaren Zeitrahmen erfolgen. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die zur Zeit häufig angewandten Analysemethoden.

Methode	Vorteile	Nachteile
PTT ("protein truncation test")	direkter Test einfache Durchführung	eingeschränkte Sensitivität (nur Frameshift- und Nonsensemutationen)
SSCP ("single strand conformation polymorphism")	direkter Test einfache Durchführung	eingeschränkte Sensitivität und Spezifität (Polymorphismen)
EMD ("enzymatic mutation detection")	direkter Test hohe Sensitivität	hohe falsch Positivraten kostenintensiv
DHPLC ("denat. High-performance liquid chromatogr.")	direkter Test hohe Sensitivität	Verifizierung der Mutation durch Sequenzierung nur heterozygote Mutationen
direkte Sequenzierung	direkter Test "Goldstandard"	arbeitsaufwendig kostenintensiv

Tabelle 1.2 Methoden der Mutationsdetektion

1.2.1. Direkte DNA Sequenzierung

Die direkte DNA Sequenzierung gilt als der „Goldstandard“ in der Mutationsanalyse. Mit einer Sensitivität von über 98% gilt sie als die sicherste Methode zum Nachweis von Mutationen. Die Sequenzierung ist die einzige Methode, die eine Charakterisierung der Mutation bzgl. ihrer Art und Position zuläßt. Es können alle bekannten Mutationen (Punkt-, Frameshift- und Nonsensemutationen) sowohl homo- als auch heterozygot nachgewiesen werden. Die vollständige Doppelstrangsequenzierung ist trotz Automatisierung zeitaufwendig und labor- und kostenintensiv. Dies gilt besonders für die Analyse sehr großer Gene, wie z. B. *BRCA1* und *BRCA2*, mit uniformer Mutationsverteilung über das gesamte Gen. Aufgrund der hier dargestellten Nachteile ist die Durchführung von Vorscreeningmethoden unvermeidbar. Vorscreeningmethoden sind direkte Tests, die mit geringem Arbeitsaufwand durchgeführt werden können. Der Nachteil dieser Methoden liegt oft in einer geringeren Sensitivität (PTT, SSCP) hohen falsch Positivraten und hohen Analysekosten (EMD). Eine erst kürzlich entwickelte Vorscreeningmethode hoher Sensitivität ist die DHPLC („denaturing high- performance liquid chromatography“), auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

1.2.2. DHPLC

Die denaturierende Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (DHPLC) ist eine Vorscreening-Methode, die in den letzten Jahren stark an Bedeutung für die Mutationsdetektion gewonnen hat. Aufbau und Prinzip dieser Methode werden im folgenden am Beispiel des "Wave Systems" der Firma Transgenomics dargestellt. Das Wave System besteht aus einer Hochdruckpumpe, die die flüssige Phase des Systems, bestehend aus zwei Puffern A und B, im gewünschten Verhältnis über eine Chromatographiesäule pumpt. Die zu analysierenden Proben werden in einer "Autosampler"-Einheit im Microtiter-Platten Format (8 x 12 Reaktionsgefäße) vorgelegt. Durch das darin enthaltene Kühlaggregat wird gewährleistet, daß die Proben die gewünschte Temperatur haben. Die Injektion der Proben erfolgt automatisch. Reihenfolge und Analysebedingungen der Injektionen werden im Programm D-7000 HSM festgelegt. Die Chromatographiesäule selbst befindet sich in einer Ofen-Einheit. Die Proben werden in einer der Säule vorgeschalteten Temperierungs-Spirale auf die gewünschte Analysetemperatur erhitzt. Die von der Säule eluierten DNA Fragmente werden über einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260nm detektiert und können bei Bedarf mittels eines Kollektors fraktioniert werden.

Das Trennprinzip der DHPLC besteht aus zwei verschiedenen Komponenten. Zunächst kann über die "ion-pair reversed-phase"-Chromatographie die Trennung doppelsträngiger DNA Moleküle (dsDNA) zwischen 100 und 1500 bp in Abhängigkeit von ihrer Länge erzielt werden. Kernstück dieser Chromatographie ist eine Säule, deren Matrix aus 2.1 +/- 0.12 µm großen, mit Divinylbenzol vernetzten Polystyrol-Partikeln besteht. Diese stationäre Phase ist elektrisch neutral, jedoch hydrophob. Die flüssige Phase des Systems wird von zwei Puffern A und B gebildet, die unterschiedliche Konzentrationen eines amphiphilen Ions (Triethylammoniumacetat, TEAA) und eines hydrophilen Gegenions (Acetonitril) besitzen. TEAA dient dabei als Brückenmolekül zwischen dem hydrophoben Säulenmaterial und den negativ geladenen DNA Fragmenten. Über die positiv geladenen Ammoniumionen bindet TEAA an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA Moleküle. Über die Alkylketten findet die hydrophobe Interaktion und damit die Bindung der DNA an die Säulenmatrix statt. Die Ladungsdichte an der Oberfläche der dsDNA (Oberflächenpotential) ist konstant. Mit zunehmender Länge der dsDNA nimmt jedoch die Größe der Kontaktfläche zu, d. h. die Bindung wird fester. Mit steigender Konzentration von Acetonitril im Elutionspuffer werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen TEAA und der Säulenmatrix reduziert und die DNA wird eluiert. Die Retentionszeit steigt dabei linear zur Größe des DNA Fragments. Ein zweites Trennprinzip dsDNA Moleküle kann über die Kontrolle der Ofen-Temperatur erzielt werden. Bei

Temperaturen über 50°C kann auf diese Weise eine sequenzabhängige Trennung erreicht werden. In Abhängigkeit von der Basensequenz ändert sich bei steigender Temperatur das Schmelzverhalten verschiedener DNA Fragmente. Auf Grund der erhöhten Flexibilität des Einzelstrang- Anteils (ssDNA) wird die Interaktion zwischen DNA und Säulenmatrix reduziert und es kommt zu einer vorzeitigen Elution. Im Fall einer heterozygoten Mutation werden nach Denaturierung und Renaturierung neben den beiden Homoduplices auch die beiden Heteroduplices gebildet. Diese zeigen wegen ihrer unterschiedlichen Basensequenzen unterschiedliche Schmelzverhalten und können so voneinander getrennt werden.

1.3. Aufgabenstellung

Das Mamma- und/oder Ovarialkarzinom wird in etwa 75% auf einen sporadischen Ursprung zurückgeführt, während in ca. 25% ein familiärer Hintergrund besteht. Dieser wird in ca. 5-10% auf Keimbahnmutationen der beiden Brustkrebsgene *BRCA1* und *BRCA2* zurückgeführt. Seit 1994 besteht eine interdisziplinär arbeitende Tumorrisikosprechstunde der Frauenklinik Düsseldorf (gynäkologische Onkologie, Humangenetik, Psychotherapie, Molekulargenetik) für Hochrisikofamilien mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinomerkrankungen, die seit Dezember 1996 von der Deutschen Krebshilfe als eines von zwölf Zentren in Deutschland gefördert wird (Beckmann et al., 1997a und 1998; Kuschel et al., 2000a). Ein Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten ist die genetische Analyse der Brustkrebsgene *BRCA1* und *BRCA2* in hereditären sowie sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen. Hieraus ergaben sich die folgenden Fragestellungen:

1) Für die hereditären Mamma- und/oder Ovarialkarzinome sollte die direkte Sequenzierung des *BRCA2* Gens als sensitivste Methode der Mutationsdetektion in einem automatisierten Verfahren etabliert werden. Da die direkte Sequenzierung jedoch sehr zeit- und kostenintensiv ist, sollte darüberhinaus die Methode der DHPLC als Vorscreeningmethode zur Detektion von *BRCA1* und *BRCA2* Mutationen etabliert werden.

2) In sporadischen Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen spielen Mutationen der Gene *BRCA1* und *BRCA2* im Gegensatz zu den hereditären Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen offensichtlich keine Rolle bei der Inaktivierung dieser Gene. Trotzdem deuten die LOH Analysen auf eine Funktion dieser Gene bei der Entstehung der sporadischen Karzinome hin. Expressionsanalysen des *BRCA1* Gens und des *p21* Gens sowie RFLP-Analysen des *BRCA1* Gens sollten zum einen alternative Inaktivierungsmechanismen, wie z. B. reduzierte, bzw. allelspezifische Expression des *BRCA1* Gens untersuchen und zum anderen Hinweise auf eine mögliche Funktion des *BRCA1* Proteins als Transkriptionsaktivator von *p21* in der Zellzykluskontrolle bestätigen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patientenmaterial

2.1.1. Proben für die *BRCA1* und *BRCA2* Analyse

Für die *BRCA1*- und *BRCA2*-Analyse wurden Blut und Tumormaterial von Familienmitgliedern aus Familien mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen verwendet. Die Einschlusskriterien, die in der Studie der deutschen Krebshilfe zum familiären Brustkrebs festgelegt wurden, beinhalten:

1. Mindestens 2 Personen der Familie (Mutter, Tochter, Schwester oder selbst erkrankt) haben ein Mamma-und/oder Ovarialkarzinom, wobei mindestens eine Frau zum Zeitpunkt der Erkrankung unter 50 Jahre alt gewesen ist.
2. Eine Frau in der Familie (Mutter, Tochter, Schwester oder selbst erkrankt) hat ein einseitiges Mammakarzinom, wobei die Erkrankung im Alter von 30 Jahren oder früher aufgetreten ist.
3. Eine Frau in der Familie (Mutter, Tochter, Schwester oder selbst erkrankt) hat ein beidseitiges Mammakarzinom oder ein Mamma- und Ovarialkarzinom.
4. Eine Frau in der Familie (Mutter, Tochter, Schwester oder selbst erkrankt) hat ein Ovarialkarzinom, wobei die Erkrankung im Alter von 40 Jahren oder früher aufgetreten ist.
5. Ein männlicher Verwandter hat ein Mammakarzinom.
6. Hinweise auf das Vorliegen von Tumoren aus dem Spektrum des Li-Fraumeni-Syndroms.

2.1.2. Tumormaterial

2.1.2.1. Mammakarzinome

Tumor- und Normalgewebe von Mammakarzinompatientinnen mit sporadischem Mammakarzinom [invasiv ductal (IDC) und invasiv lobulär (ILC)], die im Zeitraum von Oktober 1992 bis heute in der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf behandelt wurden, wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Normal-DNA konnte außerdem aus Blutlymphozyten der Patientinnen isoliert werden. Die histopathologische Beurteilung umfaßt:

TNM-Klassifikation (nach den Richtlinien der UICC): T = Tumorgröße, N = Befall der regionalen Lymphknoten, M = Fernmetastasen

Histologisches Grading (Klassifikation nach Graden nach Scarff-Bloom-Richardson)

Hormonrezeptorstatus: Östrogen- und Progesteronrezeptor.

Die klinischen Daten der untersuchten Tumoren sind in Tabelle 10.1 zusammengefaßt.

2.1.2.2. Ovarialkarzinome

Tumormaterial von 26 im Zeitraum von 1993-1997 in der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf behandelten Patientinnen mit Ovarialkarzinomen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Normal-DNA wurde aus Blutlymphozyten gewonnen. Die histopathologische Beurteilung erfolgte analog zu den Mammakarzinomen.

Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden von "American Type Culture Collection" (ATCC) bezogen und sind folgendermaßen charakterisiert:

BT-20 (ATCC HBT 19)

BT-20 ist eine Mammakarzinom-Zelllinie, die 1958 von E.Y. Lasfargues und L. Ozello aus dem Tumor einer 74-jährigen Patientin kultiviert wurde. Die Zellen sind hyperdiploid und zeigen zahlreiche Chromosomenanomalien, wie z. B. Brüche, Translokationen und Fragmentierungen.

MCF-7 (ATCC HTB 22)

Diese Mammakarzinom-Zelllinie wurde durch H.D. Soule et al., 1973 durch Punktion nach einem Pleuraerguß bei einer 69-jährigen Patientin isoliert. Die Zellen sind hypertriploid. Die Zelllinie ist ER positiv, der PgR wurde nicht bestimmt.

SK-BR-3 (ATCC HBT 30)

Die Zelllinie wurde 1970 von G. Tempe und L.J. Old aus dem Mammakarzinom einer 43-jährigen Frau etabliert. Die Zellen sind hypertriploid bis hypotetraploid.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zellkulturlösungen

- DMEM (Dulbecco's modified eagle-Medium, mit 110 mg/l Glucose und dem Indikatorfarbstoff Phenolrot von Gibco BRL)
- Antibiotika/Antimykotik-Lösung (10000 IE Penicillin, 10000 µg Streptomycin, 25 µg Amphotericin B in 0,85% Kochsalzlösung, Gibco BRL)
- MEM-Vitamin-Lösung 100 x (NaCl, D-Ca Panthothenat, Cholinchlorid, Folsäure, i-Inositol, Nikotinamid, Pyridoxal HCl, Riboflavin und Thiamin, Gibco BRL)
- 0,05% Trypsin/0,02% EDTA (Gibco)
- PBS (Seromed)

2.2.2. Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco's modified eagle-Medium, mit 110 mg/l Glucose und dem Indikatorfarbstoff Phenolrot von Gibco BRL) kultiviert. Zugewetzt wurden dem Medium 10% FCS, Antibiotika/Antimycotica/L-Glutamin-Lösung und MEM 100 x Vitamimlösung.

2.2.3. Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden in 250 ml Gewebekulturflaschen (Greiner GmbH, Solingen) in 10 ml Medium kultiviert. Die Zellen wurden bis zu konfluentem Wachstum im Begasungsbrutschrank (Heraeus) bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% konstanter Feuchte bebrütet. Zweimal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel mittels steriler Einmalpipetten.

2.2.4. Subkultivierung und Ernten der Zellen

Wenn der Boden der Gewebekulturflasche zu 80-90 % bewachsen war, erfolgte die Passagierung von Zellen konfluenten Kulturen. Hierzu wurde das Medium entfernt, die adhären Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung maximal 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe gleichen Volumens Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen in ein steriles Gewebekulturröhrchen überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Kanüle vereinzelt. Schließlich erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Thoma-Kammer. Zum Anlegen einer neuen Kultur wurde entsprechend der

verwendeten Gewebekulturflasche die jeweilige Zellzahl ausgesät (ca. 5×10^5 Zellen in 10 ml frischem Medium in 250 ml Gewebekulturflaschen). Zur DNA-Isolierung wurden ca. 1×10^7 Zellen in Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.5. Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden wie unter 2.2.4 beschrieben geerntet. 5×10^6 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen (2 ml, Greiner) bei -80°C eingefroren. Nach 12 Stunden erfolgte eine Überführung in flüssigen Stickstoff.

2.3. DNA Isolierung

2.3.1. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Nach der Entnahme aus der -80°C Truhe wurde das Tumor- bzw. Normalgewebe mit einem Skalpell zerkleinert und nach Abkühlung in flüssigem Stickstoff mechanisch im Mikrodisseminator (Braun Biotech Int., Melsungen) 1 Minute bei 2000 rpm pulverisiert. Anschließend wurde das Gewebe in 3-4 ml Verdauerpuffer (10mM Tris/HCl, pH 8.0; 25mM EDTA, pH 8.0; 100mM NaCl, 0.5% SDS) mit Proteinase K (0.1 mg Proteinase K/ml Verdauerpuffer) resuspendiert und über Nacht bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Die Extraktion der DNA erfolgte mit PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1). Die Proben wurden dazu im gleichen Verhältnis mit PCI gemischt und zur Phasentrennung für 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der wässrige DNA-haltige Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt und zur vollständigen Entfernung des Phenols mit gleichem Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) gemischt und erneut zentrifugiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem absoluten Ethanol und 0,5 Volumen Ammoniumacetat. Nach mindestens 60 Minuten bei -20°C wurde die präzipitierte DNA durch Zentrifugation (15 Minuten bei 4000 rpm) sedimentiert und anschließend mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde die DNA getrocknet und in Aqua dest. gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit einem Lambda Bio UV/VIS Spektrometer von Perkin Elmer bei 260 und 280 nm ($1E_{260\text{nm}}$ entspricht $50 \mu\text{g/ml}$ DNA).

2.3.2. Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen

Frisch geerntete Zellen oder bei -20°C gelagerte Zellen wurden in Verdauerpuffer resuspendiert (0,3 ml Verdauerpuffer / 3×10^7 Zellen). DNA-Extraktion und Fällung erfolgten wie unter 2.3.1 beschrieben.

2.3.3. Isolierung genomischer DNA aus Blutlymphozyten

Zur Isolierung von DNA aus Lymphozyten wurde zunächst 3 ml Patientenblut (mit 0,1 mM EDTA) mit 9 ml Erythrozyten-Lysispuffer (155 mM Ammoniumchlorid, 10mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA, pH 7,4) versetzt, gemischt und für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lymphozyten wurden bei 4°C , 1000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes mit den lysierten Erythrozyten wurde das Lymphozytenpellet mit 5 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (1000 rpm, 10 Minuten, 4°C). Danach wurden die Lymphozyten in 3 ml SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8,0) mit 10% SDS resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μg Proteinase K erfolgte eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Aufreinigung wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion wie unter 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Lymphozyten wurden bei -20°C gelagert, sofern die DNA-Isolierung nicht im direkten Anschluß an die Lymphozyten-Isolierung erfolgte.

Zur DNA-Isolierung wurden ausschließlich Mikrozentrifugations-Säulen verwendet (Qiagen). 200 μl Vollblut gemischt mit 25 μl Proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 200 μl Puffer AL wurden zur Zell-Lyse für 10 Minuten auf 70°C erwärmt. Nach Zugabe von 210 μl Ethanol (96%) wurde das Gemisch auf eine Mikrozentrifugations-Säule gegeben, für 1 Minute zentrifugiert (Mikrozentrifuge), zweimal mit je 500 μl Puffer AW beschickt und durch Zentrifugation jeweils für 1 Minute gewaschen. Anschließend wurde die Säule ein weiteres Mal für 2 Minuten zentrifugiert, um eventuelle Pufferreste sicher zu entfernen. Die in der Säule zurückgehaltene DNA wurde mit 200 μl 10 mM Tris-HCl (pH 9,0, 70°C) durch Zentrifugation für 1 Minute eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

2.4. RNA Isolierung

Um bei der RNA Isolierung Kontaminationen durch RNAsen zu vermeiden, müssen alle verwendeten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt werden. Hierzu wird DEPC im Verhältnis 1:10 mit absolutem Ethanol gemischt und anschließend im Verhältnis 1:100 den entsprechenden Lösungen zugesetzt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht werden die DEPC-Lösungen autoklaviert.

2.4.1. RNA Isolierung aus Gewebe

Der Gewebeaufschluß erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Das pulverisierte Gewebe wurde in 1 ml Trizol (Gibco BRL, Eggstein) aufgenommen und homogenisiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Proben ca 15 Sekunden geschüttelt. Nach 2-3 Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein neues Eppendorf Cup überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 12000 rpm) pelletiert, mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 9500 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde das RNA Pellet im Heizblock bei 55°C für 5-10 Minuten getrocknet und in 20 bis 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgte photometrisch.

2.4.2. RNA Isolierung aus Zellkulturen

Frisch geerntete Zellen wurden mit 10 x PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Trizol resuspendiert. Die RNA Isolierung erfolgt wie unter 2.4.1 beschrieben.

2.5. cDNA Synthese

Bei der cDNA Synthese wurden mit Hilfe der Reversen Transkriptase unter Einsatz unspezifischer Random Primer (Hexanukleotide) 5µg Gesamt-RNA in cDNA translatiert. Der Einsatz unspezifischer Random Primer ermöglicht es, mehrere Transkripte gleichzeitig zu untersuchen und auch zu quantifizieren. Zunächst wird die RNA (5µg) für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz so pipettiert, daß folgende Konzentrationen vorlagen: 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, 7.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 15 mM DTT, je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 U/µl RNasin, 1000 pmol Random Primer und 9.5 U (0.5 µl) Reverse Transkriptase. Für die cDNA Synthese wurde der Reaktionsansatz 10 Minuten bei 25°C und danach 45 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 5 Minuten bei 95°C inaktiviert. Nach Abkühlung auf Eis wurden die cDNA Proben bei -20°C gelagert.

2.5.1. Kontrolle der cDNA durch β-Actin PCR

Die synthetisierte cDNA wurde mittels einer β-Actin-PCR auf eine Kontamination mit genomischer DNA und ihre Qualität untersucht. Die Primer (β-Actin: 5'-

AGAGATGGCCACGGCTGCTT-3'; 5'-ATTTGCGGTGGACGATGGAG-3'; 35 Zyklen: 94°C 1 Minute, 62°C 1 Minute, 72°C 1 Minuten) waren so gewählt, daß genomische DNA aufgrund der zusätzlichen Intronsequenzen mit 652 bp ein größeres Fragment ergab als das cDNA-Fragment (446bp).

2.6. PCR-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen pipettiert. Sie enthielten 50 ng DNA, 1 x PCR Reaktionspuffer, jeweils 125 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 5'- und 3'- Primer sowie Taq Polymerase. Die Sequenzen der einzelnen Primer sind den Tabellen 2.1 - 2.10 zu entnehmen. Sollte eine Detektion mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers erfolgen, so war der 5'-Primer Cy5-markiert. Für die PCR Reaktionen wurden verschiedene Taq Polymerasen eingesetzt. Die PCRs zur Amplifikation von Fragmenten, die auf der DHPLC analysiert werden sollten, mußten, um die Fehlerrate möglichst gering zu halten, mit der Expand High Fidelity Taq Polymerase (Roche) amplifiziert werden. Diese verfügt über eine 3'-5'-Exonuklease Aktivität. Außerdem müssen die PCR Produkte in Cyclern mit beheizbarem Deckel (Thermocycler der Firma Biometra) amplifiziert werden. Dadurch wird eine Überschichtung des PCR-Ansatzes mit Mineralöl, das zur Zerstörung der Säulenmatrix führt, vermieden. Auch die automatisierte PCR Amplifikation der *BRCA1* und *BRCA2* Fragmente zur Sequenzierung benötigte eine spezielle Polymerase. Hier kam die HotStarTaq DNA Polymerase der Firma QIAGEN zum Einsatz. Die Amplifikation erfolgte in einem MWG PTC 200 Cycler mit beheizbarem Deckel. Für alle anderen PCR Reaktionen wurde Taq DNA Polymerase (amersham pharmacia biotech) eingesetzt. Für diese Reaktionen wurde ein Hybaid Omnigene PCR-Cycler benutzt. Zum Schutz vor Verdunstung mußten diese Reaktionen mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet werden. Zur Vermeidung unspezifischer Nebenreaktionen wurden die PCR Reaktionen mit einem "Hot-Start" gestartet, d. h. die Polymerase wurde während einer Vorlaufphase von 10 Minuten bei 94°C zugegeben. Die PCR Bedingungen der einzelnen Reaktionen sind in den Tabellen 2.11-2.17 zusammengefaßt. Am Schluß jeder PCR Reaktion wurde eine "final extension" (8 Minuten bei 72°C) durchgeführt, um einen vollständigen Abschluß aller Reaktionen zu ermöglichen.

Tabelle 2.1: Primer zur *BRCA1* Amplifikation für die direkte Sequenzierung. Alle Forward- Primer sind mit der M13 Universal Sequenz (CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT), alle Reverse- Primer sind mit der M13 Reversal Sequenz (CAGGAAACAGCTATGACC) versehen. Dadurch wird es möglich, Cy5-markierte M13-Primer als Sequenzierprimer für alle Exons des *BRCA1* Gens zu verwenden.

Exon	5' Primer	3' Primer	Länge(bp)
1.	TAGCCCCTTGGTTTCCGTG	TCACAACGTTACGCCTC	316 bp
2.	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT	248 bp
3.	CTCAGTTCTGACACAGCAGAC	GGAGGTTGGATTTTCGTTCTCACTTA	349 bp
4.	GTCAAAGAGATAGAATGTGAGC	CCCGTCTCTACAGAAAACAC	200 bp
5.	GGCTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	CTTTTCTACTGTGGTTGCTTCC	241 bp
6.	AAGGTTGATAATCACTTGCTG	GTAATGTGCAAACCTTCCTG	210 bp
7.	GCATACATAGGGTTTCTCTTGG	TCGGGTTCACTCTGTAGAAG	217 bp
8.	CATGTTAGCTGACTGATGATGG	GGAATCCAGCAATTATTATAAATAC	271 bp
9.	TACCTGCCACAGTAGATGCTCAG	AATAGGAAAATACCAGCTTCATAGA	219 bp
10.	TAAGATTGGTCAGCTTTCTGTAATC	ACAGTACTGTATCTACCCACTCTC	255 bp
11.1	GATTTCCACCTCCAAGGTGTATGA	GGGAGTCCGCCTATCATTACAT	415 bp
11.2	ACAGCCTGGCTTAGCAAGGAG	ATGAGGATCACTGGCCAGTAAGTC	385 bp
11.3	TGTATTGGACGTTCTAAATGAGGT	TGTGGCTTCAGTAACAAATGCTCC	239 bp
11.4	AGAGTTCACTCCAAATCAGTAGAGAG	TCTATTGGGTTAGGATTTTCTCA	381 bp
11.5	CAAACGGAGCAGAATGGTCA	GCCTGGTAGAAGACTTCCTCCTC	244 bp
11.6	ACAATTCAAAGCACCTAAAAAG	CTCTGGGAAAGTATCGCTGTCTAT	296 bp
11.7	GCAACTGGAGCCAAGAAGAGTAAC	TTTTGCCTTCCCTAGAGTGCTAAC	363 bp
11.8	TATGGCACTCAGGAAAGTATCTCG	GCGCTTTGAAACCTTGAATGTAT	270 bp
11.9	ACAGTCGGGAAACAAGCATAGAA	TTTGGCATTATCAACTGGCTTATC	314 bp
11.10	AGGCTTTCCTGTGGTTGGT	ACTGGAGCCCACTTCATTAGTAC	392 bp
11.11	CCAAGTACAGTGAGCACAATTA	AGATGCATGACTACTTCCCATAGG	372 bp
11.12	TCCTGGAAGTAATTGTAAGCATCC	GGCCCTCTTCGGTAACC	325 bp
11.13	TCCTAGCCCTTTCACCCATACA	AGATGCCTTTGCCAATATTACCTG	274 bp
11.14	TGCTACCGAGTGTCTGTCTAA	AGAAAGGATCCTGGGTGTTTGTAT	211 bp
11.15	GCTAGCTTGTTCCTTCCACAGTGC	AAATGTGCTCCCAAAGCATAAA	301 bp
12.	CCAGTCCTGCCAATGAGAAGAAA	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT	266 bp
13.	CATTTAATGGAAAGCTTCTCAAAG	AAATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC	329 bp
14.	ATTCTAACCTGAATTACTACTATCA	AAAGTGATAAATGCCTGTATGCAAA	318 bp
15.1	TGGCTGCCCAGGAAGTATG	ACATCAACAACCTTAATGAGCT	191 bp
15.2	ATAGGTGGTACATGCACAGTT	AACCAGAATATCTTTATGTAGGA	232 bp
16.1	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	ATTGCATTATACCCAGCAGT	284 bp
16.2	AAAGTTCCCAATTGAAAGT	AAAACCTTTCCAGAATGTTGT	249 bp
17.	GTGTAGAACGTGCAGGATTG	TCGCCTCATGTGGTTTA	263 bp
18.	GAGGCTCTTTAGCTTCTTAGG	AAAGAGACCCATTTTCCAGCA	366 bp
19.	CTGTCAATCTTCCCTGTGCTC	CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC	249 bp
20.	ATATGACGTGTCCTGCTCCAC	GGGAATCCAAATTACACAGC	401 bp
21.	AAGCTCTTCCTTTTGAAAGTC	GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT	298 bp
22.	TCCCATTGAGAGGTCTTGCT	GAGAAGACTTCTGAGGCTAC	297 bp
23.	CAGAGCAAGACCCTGTCTC	ACTGTGCTACTCAAGCACCA	255 bp
24.	ATGAATTGACATAATCTTCTGC	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA	280 bp

Tabelle 2.2: Primer zur *BRCA2* Amplifikation für die direkte Sequenzierung. Alle Forward- Primer sind mit der M13 Universal Sequenz (CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT), alle Reverse- Primer sind mit der M13 Reversal Sequenz (CAGGAAACAGCTATGACC) versehen. Dadurch wird es möglich, Cy5-markierte M13-Primer als Sequenzierprimer für alle Exons des *BRCA2* Gens zu verwenden.

Exon	5' Primer	3' Primer	Länge(bp)
1.	CTGAGAAAATACCCGCAAGC	TGGACTGGGACTGCGGAAG	376 bp
2.	CAGGAGATGGGACTGAATTAG	TACTGGGTTTTAGCAAGCAT	302 bp
3.	TCTTTAACTGTTCTGGGTCAC	AGTTTGTAGTTCTCCCCAGTC	362 bp
3 kurz	TTTTAAATAGATTTAGGACCAATAA	AGTTTGTAGTTCTCCCCAGTC	300 bp
4.	TAAACACTCCAAAGAATGCA	GCTCTTAGCCAAAATAATTAGC	288 bp
5.-6.	TGCCAGTTTTTTAAAATAACC	TGTTAAATCTCAGGGCAAAGG	313 bp
7.	TACCTTTGCCCTGAGATTTAC	ATCAACCTCATCTGCTCTTTC	318 bp
8.	GATGTGCTTTTTGATGTCTGA	GAGACAGCAGAGTTTCACAGG	305 bp
9.	GGATAAGGGGGGACTAC	CAACAACAACAAAAAACCTG	232 bp
10.1	CTATGAGAAAGGTTGTGAGAAT	CCTTGGAGATTTTGTCACTTC	442 bp
10.2	AATGTAGCAAATCAGAAGCC	TGCATTGAAAGTCTCTTTAGG	450 bp
10.3	CAGTGGCTTCTTCATTTTCAG	AGAGGTACCTGAATCAGCATT	440 bp
11.1a	AGTGAATGTGATTGATGGTAC	CATGACAGAGAATCAGCTTC	277 bp
11.1b	ACAGTAATCTCTCAGGATCT	TTTGTATGATTCTTTGCCTCT	341 bp
11.2	GAAAATGCCAGCACTCTTAT	TGGATTGACAGTTATTTTTGAA	342 bp
11.3a	CAATTCAACCAAAACACAAA	CAAGGAGATGTCCGATTTTA	384 bp
11.3b	TTGCAGAGGAGAACAAAAAT	TTAATTGACTGAGGCTTGCT	346 bp
11.4	TTGTAAATACCTTGGCATTAGAT	TGCATTCCTCAGAAGTGGTC	339 bp
11.5a	ATGGAAAAGAATCAAGATGTAT	ACAGTTTCACAGCTTTTTGC	328 bp
11.5b	GTTTTAGGGGCTTTTATTCT	ACTGGCAGCAGTATATTTGTT	341 bp
11.6	TTGAAATGACTACTGGCACTT	TTGAGCTTTTCGCAACTTCC	296 bp
11.7	GCCAGTTTATGAAGGAGGG	CAACTGGGACACTTTCTTTC	384 bp
11.8	AAGTTATGAGGAAACAGACATAGTT	TCAATGGTCTCACATGCTAA	318 bp
11.9	AGTACAGAGAGGCCTGTAAAGA	CAAATAATTTCTACATAATCTGC	443 bp
11.10	TGGCTTAGAGAAGGAATATTTG	AGCTAGTCACAAGTTCCTCAAC	376 bp
11.11	AAATGCATACCCACAAACTG	AAAAACCTTATGTGAATGCG	373 bp
11.12	TGGATGATTCAGAGGATATTC	GAGCTGGTCTGAATGTTCA	386 bp
11.13	AGTACCAAGCAAGTCTTTTCC	GTGCTGGGTTTCTCTTATC	333 bp
11.14	TCAAAAATACTTCTCTCGTGT	AGTTTTCAGTTTTACCAATTTCC	291 bp
11.15	TTTGGAAAAGAACAGGCT	AAAATAGTGATTGGCAACACG	348 bp
12.	CTGATATTATTTGCCTTAAAAACA	CCATNAACCTATAGAGGGAGAAC	190 bp
13.	AGCATCCGTTACATTCCTG	CGTTAGTGTCAATTATTTTAGAA	289 bp
14.1	ATGTAGCAAATGAGGGTCTG	CAACTCTGTGAAAATGTGAT	343 bp
14.2	AGTCTTTGTTCCACCTTTTA	AAAGGGGGAAAACCATCAG	312 bp
15.	GGGTTGTGCTTTTTAAATTTT	CACTCTGTCATAAAAGCCATC	281 bp
16.	CAGTTTTGGTTTGTATAATTGTT	AAAGAGGGATGAGGGAATAC	333 bp
17.	AATTCAGTATCATCCTATGTGG	GGGATGGCAACTGTCCTG	349 bp
18.1	TCACACTTCCTAAAATATGCA	ACAGCTAAGAGGGGAGGATC	280 bp
18.2	AGATGGGTGGTATGCTGTTA	AATTGAGCATCCTTAGTAAGC	266 bp
19.	TTAAGGCAGTTCTAGAAGAATG	TGGTAAGTTTCAAGAATACATC	280 bp
20.	GACTTTTTTGGTGTGTGTAAC	TCCCTTTGCTATTCTTTG	355 bp
21.	CCTTCTTTGGGTGTTTTATG	ATACTCCTTCTGTGATGGC	303 bp
22.	ACTTTTTTGTCTGATTGCTT	AAAACCTGATAAAAAACAAAGCAT	282 bp
23.	CTTCCATTGCATCTTTCTCA	GAGATTCCATAAACTAACAAGC	260 bp
24.	CTGGTAGCTCCAACCTAATC	ACCGGTACAAACCTTTTATTG	293 bp
25.	AGAGTTTCTTTCTTGCATCT	TACCAAAATGTGTGGTGATG	358 bp
26.	TTGGAAACATAAATATGTGGG	GAATATACGATGGCCTCCA	269 bp
27.1	TTAGGAGTTAGGGGAGGGAG	ACAAATGGGACTAACAGGTG	343 bp

Exon	5' Primer	3' Primer	Länge(bp)
27.2	AAAAGAGAAGAGCCTTGGAT	TGTTTTTCTCCTGTTGAACC	286 bp
27.3	CAAGCTCTTTTGTCTGGTTC	GTGGTTTGAAATTATATTCCAGTCTT	287 bp

Tabelle 2.3: Primer zur *BRCA1* Amplifikation für die Analyse mittels DHPLC. Der mit "Pso"-gekennzeichnete Forward Primer von Exon 5 besitzt eine Psoralenmodifikation, um eine Stabilisierung des Doppelstrangs nach UV-Bestrahlung (365nm) erzielen zu können.

Exon	5' Primer	3' Primer	Länge (bp)
2	AGGACGTTGTCATTAGTTCTTTG	AAGGTCAATTCTGTTTCATTTGC	319
3	CAGTTCCTGACACAGCAGACA	TTCTGGGTTATGAAGGACAAA	360
5	GCTTGTAAATTCACCTGCCAT	TTCTACTGTGGTTGCTTCC	269
5-Pso	Pso-GCTTGTAAATTCACCTGCCAT	TTCTACTGTGGTTGCTTCC	269
6	AGGTTTTCTACTGTTGCTGCAT	AAAAGGTCTTATCACCACGTCA	306
7	GGGTTTCTCTTGGTTTCTTTG	GGAGGACTGCTTCTAGCCTG	329
7int	GGGTTTCTCTTGGTTTCTTTG	AGAAGAAGAAACAAATGGT	249
8	AGCTGACTGATGATGGTCAA	AAATTCACTTCCCAAAGCTG	338
9	TGCCACAGTAGATGCTCAGT	CACATACATCCCTGAACCTAAA	300
10	TTGGTCAGCTTTCTGTAATCG	CCATACCACGACATTTGACA	346
11A	TAGCCAGTTGGTTGATTTCC	CCCATCTGTTATGTTGGCTC	394
11B	CCATGTGGCACAATACTCA	TGATTCAGACTCCCCATCAT	399
11C	GAAACTGCCATGCTCAGAGA	ATTTATTTGTGAGGGGACGC	437
11D	TCCCAACTTAAGCCATGTA	AGAAGACTTCTCCTCAGCC	437
11E	TTCAAACGAAAGCTGAACC	TTGGAAGGCTAGGATTGACA	445
11F	GGTAAAGAACCTGCAACTGG	TCAAATGCTGCACACTGACT	416
11G	GAAAGGGTTTTGCAAAGTGA	TTCTCTTCTGCATTTCTTG	381
11H	TGAACTTGATGCTCAGTATTTGC	AGTCCAGTTTCGTTGCCTCT	345
11I	TAAGCCAGTTGATAATGCCA	TTTTGGCCCTCTGTTTCTAC	430
11J	ACTAATGAAGTGGGCTCCAG	CAGGTCATCAGGTGTCTCAG	309
11K	TTCTGGAAGTAATTGTAAGCA	TAACCTGAGCCAAATGTGTAT	313
11L	GACATTAAGGAAAGTTCTGCTG	TTTGCCAATATTACCTGGTTAC	329
11M	ACCGTTGCTACCGAGTGTCT	GTGCTCCCCAAAAGCATAAAA	438
12	GTCCCAAAGCAAGGAATTTA	TCAAAGAGATGATGTCAGCAA	327
13	GGTGATTTCAATTCCTGTGC	AAATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC	373
14	TGTGTATCATAGATTGATGCTTTTG	GCAATAAAAGTGTATAAATGCCTGT	361
15	TTGCCAGTCATTTCTGATCT	AAACCTTGATTAACACTTGAGC	482
16	CACTGTATTCATGTACCCATTT	CACAGAAGTGTGATTGTTTTCT	564
17	TGTAGAACGTGCAGGATTGC	CAAAGTGCTGCGATTACAGG	298
18	AGTGGTGTTCAGCCTCTG	CTCAGACTCAGCATCAGCAA	342
19	TTAAAGGGCTGTGGCTTTAG	AAGGAAAGTGGTGCATTGAT	279
20	TGCTAGGATTACAGGGGTGAG	TTTATGTGGTTGGGATGGAAG	380
21	CAGGTGGTGAACAGAAGAAA	ACATTTAGCAATCTGAGGA	298
22	CATCCGGAGAGTGTAGGGTA	CATCCATAGGGACTGACAGG	240
23	CCCTGTCTCAAAAACAAACA	CAAGCACCAGGTAATGAGTG	234
24	TGGAGTCGATTGATTAGAGC	AGCCAGGACAGTAGAAGGAC	311

Tabelle 2.4: Primer zur *BRCA2* Amplifikation für die Analyse mittels DHPLC. Das mit einem “ # ”-gekennzeichnete Primerpaar des Exons 8 liegt innerhalb des Exons und hat ein eingebautes Mismatch, um damit in Kombination mit den Exon 8 Primern eine künstliche Mutation kreieren zu können.

Exon	5'Primer	3'Primer	Länge (bp)
2	TGTTCCCATCCTCACAGTAAG	GTAAGGGTTTTTAGCAAGCA	336
3	AACTGTTCTGGGTCAAAAT	AGAGGCCAGAGAGACTGATT	439
4	AACACTTCCAAAGAATGCAA	TACCAGGCTCTTAGCCAAA	292
5 + 6	TGGCATTITTAACATCACTTG	CTCAGGGCAAAGGTATAACG	450
7	AGCATTCTGCCTCATACAGG	TCAACCTCATCTGCTCTTTCTT	284
8	TCACTGTGTTGATTGACCTTTC	GGCATTCCAAAATTGTTAGC	278
8 #	GAAGCATCTGAGACTGTATTTCC	GAAATACAGTCTCAGATGCTTC	
9	GGACCTAGGTTGATTGCAGA	AGAGCAAGACTCCACCTCAA	316
10.1	TAGAAGAACAGGAGAAGGGG	TCATTTGGTTCCACTTCAGA	480
10.2	GCAAACGCTGATGAATGTG	GAAATGAAGAAGCCACTGGA	490
10.3	AGCAGCATCTTGAATCTCAT	GGTACCTGAATCAGCATTTG	503
11A	AAGCAGTCTTCTGCCTCAG	GCAGCCAAGACCTCTTCTTTT	449
11B	CCCCAGAAGCTGATTCTCTGT	TTTCAGGTGGCAACAGCTC	405
11C	TCCCATGGAAAAGAATCAAG	CCTCTGCAAGAACATAAACCA	422
11D	CGAATCCATTTTCAAGAACT	GGCTTGCTCAGTTTCTTTTG	432
11E	GAAATCAAGCTCTCTGAACA	ATTGCTTGCTGCTGTCTACC	500
11F	AAGTGCCTGAAAACCAGATG	CAACAAAAGTGCCAGTAGTCA	492
11G	GTCATGATTCTGTCGTTTCA	GACTCTTTGGCGACACTAAT	532
11H	TGCTACTAAAACGGAGCAAA	GGTCTTTACAGGCCTCTCTG	497
11i	GGAATCTTTGGACAAAGTGA	GGTTGACCATCAAATATTCC	498
11j	TCAGTCCCCTTATTAGTCA	TGCAGGGTGAAGAGCTAGT	491
11K	CTTGGATTCTGGTATTGAGC	CACTCTGAATGTCAGCAAAA	479
11L	ATTATGGCAGGTTGTTACGA	TCCAGAGAAAGCAGATGAAT	507
11M	ATTAGACCAGCTCACAAGA	AGGTGAAGCCTGTTCTTTTC	500
11N	TGTTGAAGGTGGTTCTTCAG	CCCCAACTGACTACACAAA	565
12	TGTGGTATCTGGTAGCATCTG	CACAGTGGCTCATGTCTGTA	500
13	GTGAGTTATTTGGTGCATAGTC	CGAGACTTTTCTCATACTGTATTAG	317
14.1	GGTAGCCTTGAAAAATGTG	AAAGACTTTGGTTGGTCTGC	382
14.2	GCAATTTAGCAGTTTCAGGAC	GGGCTTTAAAATTACCACCA	428
15	GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT	ATTTCAATTCATCCATTCTGC	369
16	GCAGACTGTGGAATGTATGG	AGAAAGAGGGATGAGGGAAT	468
17	CAGAGAATAGTTGTAGTTGTTGAA	AGAAACCTTAACCCATACTGC	305
18	TCAGTGACTTGTTTAAACAGTG	CATCTAAGAAATTGAGCATCC	537
19	AAGGCAGTTCTAGAAGAATGAAA	CAAGAGACCGAAACTCCATC	342
20	GGTGATCCACTAATCTCAGC	TGTCCCTTGTGCTATTCTT	452
21	CTTTGGGTGTTTTATGCTTG	CATATTCCTTCTGTGATGG	300
22	TTTGTCTGTTTAAAGCCATC	AGTGGATTTTGTCTCTCTGA	409
23	CCACTACTAATGCCACAAA	CAAGCACTTATCAAACTGAAA	324
24	ACCGGTACAAACCTTTTATT	AATTTGCCAACTGGTAGCTC	334
25	AGCACTGTAAGCAACAGGTC	TACCAAAATGTGGTGATG	463
26	GGTCCCAAACCTTTTATTTC	AGAATATACGATGGCCTCCA	310
27.1	CTGTGTGTAATATTTGCGTGCT	TCAATGCAAGTTCTTCGTCA	500
27.2	CCAAATACGAAACACCCATA	CGCTGAGGTAAATTTGAAAC	477

Tabelle 2.5: Primer zur *TP53* Amplifikation für die Analyse mittels DHPLC

Primernamen	DNA-Lokus	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge	Referenz
<i>TP53</i> Exon 5	p53	5'-GACTTTCAACTCTGTCTCCT-3' 5'-ATCAGTGAGGAATCAGAGGC-3'	290 bp	Rhei et al., 1998
<i>TP53</i> Exon 6	p53	5'-GCCTCTGATTCCCTCACTGAT-3' 5'-CACTGACAACCACCCTTAAC-3'	196 bp	s.o.
<i>TP53</i> Exon 7	p53	5'-CCTCATCTTGGGCCTGTGTT-3' 5'-CAGTGTGCAGGGTGGCAAGT-3'	169 bp	s.o.
<i>TP53</i> Exon 8	p53	5'-GGACCTGATTCCTTACTGC-3' 5'-GCTTCTTGCTCCTGCTTGCTT-3'	209 bp	s.o.

Tabelle 2.6: Primer für die LOH Analyse. Die mit einem "*" markierten Primer sind Cy5-markiert, um die PCR Produkte in der Analyse mittels des A.L.F.-Sequenzers detektieren zu können.

Primernamen	DNA-Lokus	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge	Referenz
D17S855	<i>BRCA1</i> Intron 20	5'-GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG-3'* 5'-ACACAGACTTGCCTACTGCC-3'	143 - 155 bp	Andersen et al., 1992
D17S1322	<i>BRCA1</i> Intron 19	5'-CTAGCCTGGGCAACAAACGA-3'* 5'-GCAGGAAGCAGGAATGGAAC-3'	115 - 130 bp	Goldgar et al., 1994
D17S1323	<i>BRCA1</i> Intron 12	5'-TAGGAGATGGATTATTGGTG-3'* 5'-AAGCAACTTTGCAATGAGTG-3'	mind. 155 bp	Goldgar et al., 1994

Tabelle 2.7: Primer für die quantitative RT-PCR. Die mit einem "*" markierten Primer sind Cy5-markiert, um die PCR Produkte in der Analyse mittels des A.L.F.-Sequenzers detektieren zu können.

Primernamen	DNA-Lokus	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge	Referenz
<i>BRCA1</i> (141)	<i>BRCA1</i>	5'-CAGGGAGTTGGTCTGAGTGAC-3'* 5'-GCTTGTTTCACTCTCACACCC-3'	141 bp	Picard, 1997
<i>p21</i>	<i>p21</i>	5'-AAGACCATGTGGACCTGTCA-3'* 5'-GGCTTCCTCTTGGAGAAGAT-3'	169 bp	Hui et al., 1997
<i>GAPDH</i> (195)	<i>GAPDH</i>	5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'* 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	195 bp	Taylor et al., 1994

Tabelle 2.8: Primer zur Amplifikation des *BRCA1* Promotors. Der 5'-Primer hat zusätzlich eine *KpnI*-Schnittstelle (GGTACC), der 3'-Primer hat zusätzlich eine *BglII*-Schnittstelle (AGATCT), um das Promotorfragment in die MCS des Vektors pGL2-basic klonieren zu können.

Primernamen	DNA-Lokus	Sequenz (5'-3')	Referenz
5-42.2	<i>BRCA1</i>	5'-GGGGTACCCTGAACTTCTCCAAACCCTC-3'	Barker et al., 1996
3-120.2	<i>BRCA1</i>	5'-GAAGATCTTCCCAGTACCCAGAGCATCA-3'	s.o.

Tabelle 2.9: Primer zur Amplifikation der *BRCA1* Exon 13 Duplikation

Primernamen	DNA-Lokus	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge	Referenz
dup 13	<i>BRCA1</i>	5'-GATTATTTCCCCCAGGCTA-3' 5'-AGATCATTAGCAAGGACCTGTG-3'	1100 bp	Puget et al., 1999

Tabelle 2.10: Primer zur Amplifikation des Exon13 / *BRCA1* aus cDNA

Primername	DNA-Lokus	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge	Referenz
Ex 13- cDNA	<i>BRCA1</i>	5'- GCATCTGGGTGTGAGAGTGA-3' 5'- CTTCCACTCCTGGTTCTTT-3'	379 bp	selbst konstruiert

2.6.1. PCR zur Amplifikation der *BRCA1* und *BRCA2* Fragmente zur direkten Sequenzierung

Zur Analyse wird das *BRCA1* Gen in 39 Fragmente unterteilt. Die Exons 1-10, 12-14 und 17-24 werden in einem Fragment amplifiziert. Die Exons 15 und 16 werden in zwei und das Exon 11 in 15 sich überlappenden Fragmenten amplifiziert. Das *BRCA2* Gen wird in 48 Fragmenten amplifiziert, je ein Fragment von Exon 1-9, 12, 13, 15-17 und 19-16, zwei Fragmente von Exon 14 und 18, drei Fragmente von Exon 10 und 27 sowie 18 Fragmente von Exon 11. Um den Arbeitsaufwand der PCR einzuschränken, wurde die Analyse so etabliert, daß eine Automatisierung möglich ist. Die Primer (siehe Tab. 2.1 und 2.2) zur Amplifikation wurden so ausgewählt, daß für die PCR-Reaktionen nur zwei verschiedene Annealingtemperaturen erforderlich sind. Exon 11 und Exon 23 von *BRCA1* werden bei einer Annealingtemperatur von 60 °C amplifiziert, alle anderen Exons von *BRCA1*, sowie alle Exons von *BRCA2* werden bei einer Annealingtemperatur von 55 °C amplifiziert.

Tabelle 2.11 PCR Bedingungen zur *BRCA1* und *BRCA2* Amplifikation

Fragment	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
<i>BRCA1</i> , Exon 1-10, Exon 12-22, 24	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94 °C 30 sec 55 °C 30 sec 72 °C 1 min 35 Zyklen
<i>BRCA1</i> , Exon 11, 23	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94 °C 30 sec 60 °C 30 sec 72 °C 1 min 35 Zyklen
<i>BRCA2</i> , alle Exons	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94 °C 30 sec 55 °C 30 sec 72 °C 1 min 35 Zyklen

2.6.2. PCR zur Amplifikation der *BRCA1* und *BRCA2* Fragmente zur Mutationsanalyse mittels DHPLC

Die DHPLC stellt eine geeignete Vorscreeningmethode zur Mutationsdetektion da. *BRCA1* wird in 34 Fragmenten amplifiziert. Die Exons 2-10 und 12-24 werden als je ein Fragment amplifiziert. Das Exon 11 ist auf Grund seiner Größe in 13 sich überlappende Fragmente unterteilt. *BRCA2* wird in 42 Fragmenten amplifiziert. Dabei sind die Exons 14 und 27 in zwei, das Exon 10 in drei und das Exon 11 in 14 sich überlappende Fragmente unterteilt. Die Primer sind in den Tabellen 2.3 und 2.4 zusammengestellt. Die PCR-Bedingungen variieren in ihren Annealingtemperaturen von 54-58°C und 60°C. Zusätzlich müssen zwei Fragmente mit Touch-Down PCR amplifiziert werden. Im Hinblick auf eine Automatisierung wurden die PCR Bedingungen so etabliert, daß jeweils 8 Fragmente der Gene *BRCA1* und *BRCA2* unter gleichen Bedingungen amplifiziert werden können. Im Anschluß an die PCR Reaktion werden PCR Fragmente im Cycler denaturiert und anschließend renaturiert. Dazu werden die PCR Produkte für 3 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend in 30 Minuten auf 65°C abgekühlt (1°C/min).

Tabelle 2.12: PCR Bedingungen zur *BRCA1* und *BRCA2* Amplifikation zur Analyse mittels DHPLC

Fragment	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
I) <i>BRCA1</i> : Exon 7	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94 °C 30 sec TD 55-48°C 30 sec 72 °C 2 min 35 Zyklen
I) <i>BRCA1</i> : Exon 12, 15, 19, 21 <i>BRCA2</i> : Exon 11C, 11L, 11M, 18	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94°C 30 sec 54°C 30 sec 72°C 1 min 35 Zyklen
I) <i>BRCA1</i> : Exon 6, 8, 10, 11M, 16, 17 <i>BRCA2</i> : Exon 11I, 11K	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94°C 30 sec 55°C 30 sec 72°C 1 min 35 Zyklen
I) <i>BRCA1</i> : Exon 11H, 11L, 24 <i>BRCA2</i> : Exon 9, 11G, 11N, 15, 17	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94°C 30 sec 56°C 30 sec 72°C 1 min 35 Zyklen

Fragment	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
I) BRCA1 : Exon 9, 23 BRCA2 : Exon 3, 4, 10.1, 10.2, 10.3, 11E II) BRCA2 : Exon 13, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 26 III) BRCA2 : Exon 27.1, 27.2	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94°C 30 sec 57°C 30 sec 72°C 1 min 35 Zyklen
I) BRCA1 : Exon 2, 3, 5, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E II) BRCA1 : Exon 11F, 11G, 13, 18 BRCA2 : Exon 2, 5+6, 7, 8 III) BRCA2 : Exon 11B, 11D, 11F, 11J, 14.1, 14.2, 19, 21	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94°C 30 sec 58°C 30 sec 72°C 1 min 35 Zyklen
I) BRCA1 : Exon 11I, 11J, 11K, 14, 22 BRCA2 : Exon 11A, 12, 11H	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94°C 30 sec 60°C 30 sec 72°C 1 min 35 Zyklen
I) BRCA1 : Exon 20	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94°C 30 sec TD 63-59°C 30 sec 72°C 1 min 35 Zyklen

2.6.2.1. Psoralenmodifikation von Exon 5 / *BRCA1*

Zur Stabilisierung des Exons 5 des *BRCA1* Gens wurde das Fragment unter Einsatz eines psoralenmodifizierten 5'-Primers nach den unter 2.6.1 für das Exon 5 beschriebenen Bedingungen amplifiziert. Das PCR Produkt wurde nach der Denaturierung und anschließenden Renaturierung für 20 Minuten mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt. Dadurch sind die beiden Einzelstränge kovalent gebunden, was einen Zerfall des Doppelstrangs in die beiden Einzelstränge verhindert.

2.6.3. PCR zur Amplifikation von *TP53* zur Mutationsanalyse mittels DHPLC

Zur Analyse von sporadischen Mammakarzinomen auf Mutationen des Gens *TP53* wurden die Exons 5-8 (Primer siehe Tab. 2.5) amplifiziert. In diesen Exons befinden sich über 90% aller bisher nachgewiesenen *TP53* Mutationen.

Tabelle 2.13: PCR Bedingungen zur *TP53* Amplifikation zur Analyse mittels DHPLC

Fragment	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
<i>TP53</i> Exon 5 und 6	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94 °C 1 min 60°C 1 min 72 °C 2 min 35 Zyklen
<i>TP53</i> Exon 7 und 8	Primer 25 pMol Taq-Aktivität 2U	94 °C 1 min 62°C 1 min 72 °C 2 min 35 Zyklen

2.6.4. PCR zur Analyse der Exon 13 Duplikation

Die Mutation ins6kb Exon 13 im *BRCA1* Gen kann durch die direkte Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis muß mittels einer PCR Reaktion erfolgen. Dabei sind die Primer (siehe Tab 2.9) so gewählt, daß nur im Falle einer Duplikation ein 1,1 kb großes Fragment amplifiziert werden kann.

Tabelle 2.14: PCR Bedingungen zur Amplifikation eines 1,1 kb großen Fragments bei Vorliegen einer Exon 13 Duplikation im *BRCA1* Gen

Fragment	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
<i>BRCA1</i> Exon 13 Duplikation	Primer 40Mol Taq-Aktivität 2U	94°C 30 sec 60°C 30 sec 72°C 1 min 35 Zyklen

2.6.5. PCR zur LOH-Analyse des *BRCA1* Gens

Für die LOH Analysen des *BRCA1* Gens wurden DNA Sequenzen mit polymorphen Mikrosatelliten Markern amplifiziert. Die drei Marker D17S855, D17S1322 und D17S1323 (Primer siehe Tabelle 2.6) liegen intragenisch im *BRCA1* Gen in den Intronbereichen 20, 19 und 12. Die Amplifikation erfolgt wie in Tabelle 2.15 beschrieben. Die PCR Fragmente und die quantitative Bestimmung der Produktmengen erfolgt mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers und der Fragment Manager Software (Pharmacia).

Tabelle 2.15: PCR Bedingungen zur LOH Analyse von *BRCA1*

Fragment	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
<i>BRCA1</i> D17S855	Primer 40Mol Taq-Aktivität 2U	94°C 1 min 55°C 1 min 72 °C 1 min 30 Zyklen
<i>BRCA1</i> D17S1322	Primer 40Mol Taq-Aktivität 2U	94°C 1 min 58°C 1 min 72 °C 1 min 27 Zyklen
<i>BRCA1</i> D17S1323	Primer 40Mol Taq-Aktivität 2U	94°C 1 min 58°C 1 min 72 °C 1 min 27 Zyklen

Die LOH Analyse erfolgt parallel am Normal- und Tumorgewebe einer Patientin. Die Analyse des Normalgewebes zeigt, ob eine Patientin bezüglich des untersuchten Markers informativ, d. h. heterozygot ist. In diesem Fall erhält man zwei PCR Produkte für die beiden Allele. In nicht informativen, d.h. homozygoten Fällen, weist der Patient die gleiche Zahl von Wiederholungseinheiten des Repeats in beiden Allelen auf. Man erhält nur ein PCR Produkt und kann keinen Allelverlust nachweisen. Bei heterozygoten Fällen kann der Verlust eines Allels durch die Signalreduktion beim Vergleich von Normal- und Tumorgewebe nachgewiesen werden. Dafür wird das Verhältnis der beiden Allele im Normal- und Tumorgewebe [Ratio (normal) und Ratio (Tumor)] bestimmt. Das Allelverhältnis Q wird aus dem Verhältnis von Ratio (Tumor) zu Ratio (normal) errechnet:

$$\text{Ratio (normal)} = \frac{\text{Fläche (1.Allel)}}{\text{Fläche (2.Allel)}} \quad , \quad \text{Ratio (Tumor)} = \frac{\text{Fläche (1.Allel)}}{\text{Fläche (2.Allel)}}$$

$$\text{Allelverhältnis Q} = \frac{\text{Ratio (Tumor)}}{\text{Ratio (normal)}}$$

Bei einem Verlust des kürzeren Allels ergibt sich ein Allelverhältnis größer 1. In diesem Fall wird der Kehrwert bestimmt.

2.6.6. Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA Expression

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wird die mRNA Expression der beiden Gene *BRCA1* und *p21* bestimmt. Die Primer sind in Tab 2.7 gelistet. Das Prinzip beruht auf einer simultanen Koamplifikation des zu untersuchenden Gens und eines "single copy" Gens, d. h. eines in nur einer Kopienzahl vorliegenden Referenzgens in einem PCR Ansatz. Als Referenzgen wurde *GAPDH* gewählt. Die Bedingungen müssen so gewählt sein, daß die Menge des gebildeten PCR Produkts unabhängig von der eingesetzten Menge an Primer, Nukleotiden und Taq-Polymerase ist und die Reaktion im logarithmischen Bereich abläuft. Zum Ausgleich von Schwankungen zwischen einzelnen PCR Reaktionen wurde die Expression immer auch in den beiden Mammakarzinom Zelllinien BT-20 und MCF7 als interner Standard gemessen. Die Detektion der PCR Produkte sowie die quantitative Bestimmung der Produktmengen erfolgte mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers und der Fragment Manager Software (Pharmacia).

2.6.6.1. RT-PCR zur Quantifizierung der *BRCA1* Expression

PCR Ansatz:	cDNA	1,0 µl
	dNTPs	3,0 µl (150 µM)
	Primerpaar <i>BRCA1</i>	je 4,0 µl (40 pmol)
	Primerpaar <i>GAPDH</i>	je 2,0 µl (20 pmol)
	10 x Puffer	5,0 µl
	Taq-Polymerase	0,4 µl (2 U)

Nach 10 Minuten Denaturierung bei 94°C folgten 24 Zyklen nach folgendem Schema:

94°C	1 min
58°C	1 min
72°C	1 min

2.6.6.2. RT-PCR zur Quantifizierung der *p21* Expression

PCR Ansatz:	cDNA	1,0 µl
	dNTPs	3,0 µl (150 µM)
	Primerpaar <i>p21</i>	4,0 µl (40 pmol)
	Primerpaar <i>GAPDH</i>	je 2,0 µl (20 pmol)
	10 x Puffer	5,0 µl
	Taq-Polymerase	0,4 µl (2 U)

Der 5'-Primer von *GAPDH* wurde sowohl CY5-markiert, als auch unmarkiert in einem Verhältnis von 1:8 eingesetzt. Nach 10 Minuten Denaturierung folgten 27 Zyklen nach folgendem Schema:

94°C	1 min
57°C	1 min
72°C	1 min

2.6.7. PCR zur Amplifizierung des *BRCA1* Promotors

Um die Promotoraktivität des *BRCA1* Promotors verschiedener Tumoren zu analysieren, wurde ein 1,3 kb großes Fragment des *BRCA1* Promotors amplifiziert. Die Primer (siehe Tabelle 2.8) wurden zur Klonierung in einen Expressionsvektor mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *KpnI* und *BglII* versehen.

Tabelle 2.16: PCR Bedingungen zur Amplifikation des *BRCA1* Promotors

Fragment	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
<i>BRCA1</i> Promotor	Primer 40Mol Taq-Aktivität 2U	94 °C 30 sec 58°C 60 sec 72 °C 90 sec 28 Zyklen

2.6.8. PCR zur Amplifikation des Exon 13 / *BRCA1* aus cDNA

Um die allelspezifische Expression des *BRCA1* Gens zu untersuchen, wurden RFLP Analysen in der cDNA von Normal- und Tumorgewebe der gleichen Patientin durchgeführt. Dazu wurde ein 379bp großes Fragment amplifiziert. Die Primer (Tabelle 2.10) wurden flankierend zum Exon 13 in Exon 12 und Exon 14 gelegt. Innerhalb dieser Sequenz liegt der Polymorphismus A4427G, der in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *EatI* liegt. Liegt die Wildtypsequenz vor, so erhält man nach Restriktion Produkte der Größe 206bp und 173bp. Bei Vorliegen des Polymorphismus erhält man die ungeschnittene Sequenz.

Tabelle 2.17: PCR Bedingungen zur Amplifikation des Exon 13 / *BRCA1* aus cDNA

Fragment	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
<i>BRCA1</i> Ex13 cDNA	Primer 40Mol Taq-Aktivität 2U	94 °C 30 sec 58°C 60 sec 72 °C 90 sec 35 Zyklen

2.6.8.1. Restriktionsverdau mit *EatI*

Die Restriktion des amplifizierten Fragments erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Restriktionsansatz: y µl PCR Produkt
 0,25 µl *EatI*-Enzym (10 U/µl)
 2 µl 10 x Puffer
 ad 20 µl Aqua dest.

Der Restriktionsansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der Banden erfolgte über ein 1,5% Agarosegel.

2.7. Sequenzierung von *BRCA1* und *BRCA2*

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit" (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Dieses Kit beruht auf dem Prinzip der Sequenzierung nach Sanger und setzt den Einsatz fluoreszenzmarkierter Primer zur Detektion der Sequenzierprodukte auf einem automatischen Laser-Sequenzierer voraus. Um Störsignale durch bei der Reaktion nicht verbrauchte Primer und dNTPs zu vermeiden, müssen die PCR Produkte vor der Sequenzierung aufgereinigt werden. Dies geschieht mit Hilfe

der MicroSpin™ S400 Säulen von Pharmacia, Biotech. Die mit TE-Puffer voräquilibrierten Säulen werden 1 Minute bei 3000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend werden sie mit 50 µl PCR Produkt beladen und erneut für 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Eluat kann direkt in die Sequenzierung eingesetzt werden. Die Sequenzierreaktion erfolgte in 4 PCR-"Cups" pro Probe (je ein Cup pro Base).

Ein Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
 1 µl Sequenzierprimer (1p/Mol/µl)
2 µl Reaktionsmix (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP)
8 µl Gesamtvolumen

Als Sequenzier Primer wurden die Cy5-markierten M13 Universal- oder Reversal-Primer eingesetzt. Die Reaktion wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und wie in Tabelle 2.18 angegeben, durchgeführt.

Tabelle 2.18: Sequenzen der Sequenzierprimer und Bedingungen für die Sequenzierung mit der Thermostsequenase (*:Cy5-Markierung)

Sequenzierprimer	Sequenz in 5' -> 3' Richtung	Bedingungen
<i>BRCA1, BRCA2,</i> universal	*CGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	60°C 30 sec 95°C 30 sec 30 Zyklen
<i>BRCA1, BRCA2,</i> reversal	*CAGGAAACAGCTATGAC	55°C 30 sec 95°C 30 sec 30 Zyklen

Durch die Zugabe von 5 µl Stopplösung wurde die Sequenzierreaktion abgebrochen und das Sequenzier-Produkt anschließend sorgfältig vom Mineralöl abgetrennt. Die Auftragung und Detektion mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben.

2.8. Elektrophoretische Auftrennungsmethoden

Material:

-1 x TBE

0,2 M Tris

0,17 M Borsäure

2 mM EDTA, pH 8,0

-Bindsilan

4 ml Ethanol absolut

15 µl Bindsilan (Pharmacia)

1 ml 10% Essigsäure

-Monomerenlösung (29:1)

29% Acrylamid

1% N,N-Methylen-bisacrylamid

-Monomerenlösung (19:1)

19% Acrylamid

1% N,N-Methylen-bisacrylamid

-Gellösung für A.L.F.-Gele

25,2 g Harnstoff

9 ml Monomerenlösung (40 %)

25,5 ml Aqua dest.

6 ml 6 x TBE

0,2 ml 10% APS

40 µl Temed

2.8.1. Die elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen

Um die Größe der PCR-Produkte zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte auf 1,5%-ige Agarosegele aufgetragen. Als Längenstandard wurde eine 1kb ladder von EuroGentec aufgetragen, mit deren Hilfe die Fragmentlänge der aufgetrennten PCR-Produkte ermittelt werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte je nach der aufzutrennenden Fragmentlänge bei

einer Spannung von 100 bis 110 Volt für 45 bis 90 Minuten. Das Gel wurde nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) für mindestens 30 Minuten gefärbt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=312$ nm) konnte die Fluoreszenz des interkalierten Agens angeregt und die DNA-Fragmente nachgewiesen werden.

2.8.2. Die elektrophoretische Auftrennung mit dem A.L.F. und A.L.F.express

Mit Hilfe der zwei Sequenzierautomaten (A.L.F. und A.L.F.express von Pharmacia) ist die Auftrennung und Quantifizierung auch geringer Probemengen möglich. Die Fluoreszenz der markierten PCR-Produkte wird durch einen Laserstrahl im unteren Drittel des vertikalen Polyacrylamidgels angeregt. Senkrecht zum Laserstrahl erfolgt die Detektion der emittierten Strahlung über Photodioden bei einer Wellenlänge von 632,8 nm (Helium-Neon-Laser). Den Detektoren vorgelagert sind optische Filter, um die Hintergrundstrahlung und das Streulicht zu eliminieren.

In der Analyse mit dem A.L.F. werden Cy5-markierte PCR-Produkte verwendet. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz wird direkt während der elektrophoretischen Auftrennung durch das optische System des A.L.F. oder A.L.F.express gemessen und die Daten werden durch eine gekoppelte EDV erfaßt und gespeichert. Nach Beendigung des Laufs können die Rohdaten mit Hilfe der Software (Fragment-Manager) ausgewertet werden. Je nach Experiment werden die Gelzusammensetzung und der Lauf unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

Für die Gellösung wurden 25,2 g Urea und 9 ml Monomerenlösung in 25,4 ml Aqua dest. gelöst und mit 5 g Amberlite für 10 Minuten gerührt. Für ein Sequenziergel wird die Monomerenlösung 19:1, für eine Fragmentanalyse die Monomerenlösung 29:1 eingesetzt. Nach dem Filtrieren von 6 ml 6 x TBE und der Lösung wurde die Gellösung entgast. Dann wurden 40 µl TEMED und 200 µl 10%iges APS zugegeben und die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen.

Für die Fragmentanalysen wurden die PCR-Produkte mit Aqua dest. verdünnt (Verdünnung zwischen 1:5 und 1:30). 5 µl der Verdünnung wurden mit 5 µl A.L.F.-Probenauftragspuffer versetzt. Sowohl für die Fragment- als auch für die Sequenzanalysen wurden die Proben vor dem Gelauftrag 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und 3 Minuten auf Eis abgekühlt.

Laufbedingung	Fragmentanalyse	Sequenzieranalysen
Spannung:	1500 Volt	1500 Volt
Strom:	34 mA	34 mA
Leistung:	38 Watt	30 Watt
Temperatur:	40°C	50°C
Laufpuffer:	0,6 x TBE	0,6 x TBE

2.9. DHPLC Analyse

Material: 2M Triethylammonium Acetat (TEAA) Buffer (TRANSGENOMIC)
Acetonitril (J. T. Baker)
Li Chrosolv Wasser für die Chromatographie (Merck)

Puffer A: 50 ml 2M TEAA
250 µl HPLC grade Acetonitril
ad 1 l Li Chrosolv Wasser

Puffer B: 50 ml 2M TEAA
250 ml HPLC grade Acetonitril
ad 1 l Li Chrosolv Wasser

Puffer C: 750 ml HPLC grade Acetonitril
ad 1 l Li Chrosolv Wasser

Syringe (wash solution): 80 ml HPLC grade Acetonitril
ad 1 l Li Chrosolv Wasser

Die Bedingungen einiger allgemeiner Methoden (Reinigung der Säulenmatrix und Ruhezustand) sowie die Bedingungen (Gradient und Temperaturen) zur DHPLC Analyse der Gene *BRCA1*, *BRCA2* und *TP53* sind in den Tabellen 2.19 - 2.22 aufgeführt.

Tab.2.19: Allgemeine DHPLC Methoden zur Reinigung der Säulenmatrix (Column Clean Up und Instrument Clean Up) sowie für den Ruhezustand (Sleep)

Methode	Temp [°C]	Gradient [%B]	Gradient [%C]	Zeit [min]	Flußrate [ml/min]
Sleep	50	50		5.0	0.05
Column Clean Up	56	5-100; 100-100		30.0; 3.0	0.5
Instrument Clean Up	60	100%C - 50	100	30.0 5.0	0.9

Tab.2.20: DHPLC Bedingungen zur Analyse des *BRCA1*

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Gradient [%B]	Zeit [min]
Exon2	51	55	54-59; 59-65; 65-100 50-55; 55-61; 61-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5
Exon3	56		51-56; 56-62; 62-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon5	56		49-54; 54-62; 62-100	0.1; 4.0; 0.1
Exon6	57		53-58; 58-64; 64-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon7	56		52-57; 57-63; 63-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon8	59	55	52-57; 57-63; 63-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon9	54		54-59; 59-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon10	57		57-62; 62-68; 68-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11A	58		52-57; 57-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11B	59		55-60; 60-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11C	57	53	57-62; 62-68; 68-100 52-57; 57-63; 63-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5
Exon11D	57		54-59; 59-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11E	56		52-57; 57-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11F	56		56-61; 61-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11G	58		54-59; 59-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11H	58		53-58; 58-66; 66-100	0.1; 4.0; 0.1
Exon11I	57		53-58; 58-64; 64-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11J	56		53-58; 58-64; 64-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11K	58		51-56; 56-62; 62-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon11L	59	55	47-52; 52-62; 62-100 52-57; 57-65; 65-100	0.1; 4.0; 0.1 0.1; 4.0; 0.1
Exon11M	59		52-57; 57-63; 63-100 54-59; 59-65; 65-100 55-60; 60-66; 66-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5
Exon12	62	59	49-54; 54-62; 62-100	0.1; 4.0; 0.1
Exon13	60	58, 53	52-57; 57-65; 65-100 55-60; 60-66; 66-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5
Exon14	55		55-60; 60-66; 66-100	0.5; 3.0; 0.5

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Gradient [%B]	Zeit [min]
Exon15	60	56	52-57; 57-65; 65-100 55-60; 60-66; 66-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5
Exon16	60	55	51-56; 56-62; 62-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon17	58		52-57; 57-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon18	58		54-59; 59-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon19	56	60	54-59; 59-65; 65-100 52-57; 57-63; 63-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5
Exon20	60	53	54-59; 59-65; 65-100 56-61; 61-67; 67-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5
Exon21	60	56	55-60; 60-66; 66-100 48-53; 53-59; 59-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5
Exon22	59		52-57; 57-63; 63-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon23	59	55	48-53; 53-59; 59-100 51-56; 56-62; 62-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon24	62	57	52-57; 57-65; 65-100 54-59; 59-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5 0.5; 3.0; 0.5

Tab.2.21: DHPLC Bedingungen zur Analyse des *BRCA2* Gens

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Gradient [%B]	Zeit [min]
Exon2	58		54-59; 59-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon3	57		53-58; 58-67; 67-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon4	54		51-56; 56-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon5+6	54	53	51-56; 56-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon7	57		47-52; 52-61; 61-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon8	54		47-52; 52-61; 61-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon9			48-53; 53-62; 62-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon10.1	56	52	53-58; 58-67; 67-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon10.2	58	57	54-59; 59-68; 68-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon10.3	58	56	52-57; 57-66; 66-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11A	55		50-55; 55-64; 64-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11B	58		51-56; 56-66; 66-100	0.5; 5.0; 0.1
Exon11C	57		50-55; 55-64; 64-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11D	56		53-58; 58-67; 67-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11E	59	57	50-55; 55-64; 64-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11F	55		56-61; 61-70; 70-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11G	54		53-58; 58-67; 67-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11H	58	56	51-59; 59-64; 64-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11I	57		51-56; 56-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11J	55		51-56; 56-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11K	57		52-57; 57-66; 66-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11L	56	57	54-59; 59-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11M	55		53-58; 58-67; 67-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon11N	56		52-57; 57-66; 66-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon12	62	59	51-56; 56-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon13	54		50-55; 55-64; 64-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon14.1	57		49-54; 54-63; 63-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon14.2	57		50-55; 55-64; 64-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon15	57	61	49-54; 54-63; 63-100 53-58; 58-67; 67-100	0.5; 4.5; 0.1 0.5; 4.5; 0.1

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Gradient [%B]	Zeit [min]
Exon16	58	54	50-55; 55-64; 64-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon17	56		54-59; 59-65; 65-100	0.5; 3.0; 0.5
Exon18	60	56, 52	51-56; 56-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon19	58	54	48-53; 53-62; 62-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon20	58		50-55; 55-64; 64-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon21	59	55	47-52; 52-61; 61-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon22	59	56, 52	51-56; 56-65; 65-100 55-60; 60-69; 69-100	0.5; 4.5; 0.1 0.5; 4.5; 0.1
Exon23	56		51-56; 56-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon24	57	53	48-53; 53-62; 62-100 52-57; 57-66; 66-100	0.5; 4.5; 0.1 0.5; 4.5; 0.1
Exon25	59	55	52-57; 57-66; 66-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon26	58	54	48-53; 53-62; 62-100 52-57; 57-66; 66-100	0.5; 4.5; 0.1 0.5; 4.5; 0.1
Exon27.1	57	53	51-56; 56-65; 65-100 55-60; 60-69; 69-100	0.5; 4.5; 0.1 0.5; 4.5; 0.1
Exon27.2	56		51-56; 56-65; 65-100	0.5; 4.5; 0.1

Tab.2.22: DHPLC Bedingungen zur Analyse des *TP53* Gens

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Gradient [%B]	Zeit [min]
Exon5	62	67	44-49; 49-58; 58-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon6	62		44-49; 49-58; 58-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon7	62		44-49; 49-58; 58-100	0.5; 4.5; 0.1
Exon8	59	64	44-49; 49-58; 58-100	0.5; 4.5; 0.1

2.10. Mikrobiologische Methoden

2.10.1. Stämme und Medien

2.10.1.1. Bakterienstämme

Es wurde ausschließlich mit dem *E. coli* Stamm DH5 α F' gearbeitet, der wie folgt charakterisiert ist: F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA, supE44, λ thi-1, gyrA96, relA1

2.10.1.2. Medien und Aufzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl

Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 50 µg/µl Ampicillin zugesetzt (LB-Amp).

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,5% Agar.

Die Aufzucht erfolgte bei 37°C.

2.10.2. Plasmide

pGL2-Basic (Promega)

Der pGL2-Basic dient der Untersuchung von Genexpression regulierenden Faktoren bei Säugertellen. Diese Faktoren können cis-aktivierende Elemente sein, wie z. B. Promotoren oder Enhancer, aber auch trans-aktivierende Elemente, wie z. B. DNA-bindende Proteine. Dieser Vektor enthält die für die Leuchtkäfer Luziferase kodierende Region, die zur Kontrolle für die Transkriptionsaktivität transformierter eukaryontischer Zellen eingesetzt wird. Für die Selektion transfizierter E. coli Zellen besitzt der Vektor eine Ampicillinresistenz.

2.10.3. Klonierung

2.10.3.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Qia-Quick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Nach der Auftrennung wurden die gewünschten Banden unter einer UV-Handlampe aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel mittels eines Skalpellens herausgeschnitten und in ein Eppendorf Cup überführt. Nach der Gewichtsbestimmung des Agaroseblöckchens wurde dieses mit dem dreifachen Volumen des Puffers QX1 versetzt und bei 50°C geschmolzen. Nach der Zugabe eines Volumens Isopropanol wurde das Gemisch auf die Säule aufgetragen und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Aufreinigung der an die Siliconmembran der Säule gebundenen DNA wurde diese nach Herstellerangaben mit einer Waschlösung (Puffer PE) behandelt und erneut 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit 30 µl Elutionspuffer durch erneute Zentrifugation von der Säule eluiert.

2.10.3.2. Restriktionsanalysen

Alle Restriktionen wurden unter den vom Hersteller der Restriktionsenzyme angegebenen Bedingungen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Für die Klonierung des *BRCA1* Promotors in den Vektor pGL2-Basic wurden Fragment und Vektor mit den Enzymen *KpnI* und *BglII* (Boehringer, Mannheim) geschnitten. Da die Enzyme unter gleichen Pufferbedingungen arbeiten, konnte die Restriktion in einem Ansatz erfolgen. Die Restriktion wurde in 20 μl Ansätzen durchgeführt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Restriktionsansatz:	DNA	y μl
	10 x Puffer H	2 μl
	<i>KpnI</i>	1 μl (10 U / μl)
	<i>BglII</i>	1 μl (10 U / μl)
	Aqua dest.	ad 20 μl

2.10.3.3. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20 μl Gesamtvolumen, wobei die molare Menge des Insertionsfragmentes das 4-fache der Vektor-DNA ausmachen soll. Die Ligation erfolgte in Gegenwart von 1U T4-Ligase (Boehringer, Mannheim) bei Raumtemperatur für 2 Stunden oder über Nacht bei 16°C.

2.10.3.4. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

2.10.3.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurde zunächst eine 10 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft. Das Zellwachstum wurde photometrisch bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ verfolgt. Bei einer optischen Dichte von ca. $\text{OD}_{600} = 0,6$ wurden die Zellen geerntet und in Zentrifugenröhrchen 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C und 4000 g für 15 Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem Wasser (500 ml und 250 ml) gewaschen und zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 10 ml 10%igem Glycerin und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert, á 40 μl in Eppendorf Cups aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.10.3.4.2 Elektroporation

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Vektor gemischt. Das Gemisch wurde in Elektroporationsküvetten (BioRad, Elektrodenabstand = 0,2 cm) gegeben. Die Elektroporation erfolgte in einem BioRad Gene Pulser durch einen exponentiell abfallenden Spannungspuls bei 2,5 kV, 25 μ F, 299 Ω und $\tau = 0,4$. Nach dem Puls wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette herausgespült und in einem Eppendorf Cup für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Amp Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C gelagert.

2.10.3.5. Plasmidpräparation

Für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA wurden verschiedene Kits verwendet. Die Plasmidpräparation aus einer 2 ml Übernachtskultur erfolgte mittels des GFX™ Micro Plasmid Prep Sample Kits von Pharmacia. Für eine Midipräparation aus einer 250 ml Übernachtskultur wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit verwendet. Die Präparationen erfolgten nach den vom Hersteller beschriebenen Angaben.

2.10.4. Transfektion humaner Karzinom-Zelllinien mit FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim)

Die Zellen (SKBR-3) werden auf Medium ohne Phenolrot gesetzt. Nach 48 Stunden werden die Zellen trypsiniert und so ausgesät, daß sie am nächsten Tag 50-80% konfluent sind (SKBR-3: 1×10^5 Zellen pro 12-Loch-Platte). Nach 24 Stunden wird der Zustand der Zellen mikroskopisch überprüft und vor der Transfektion das Medium erneuert (800 μ l/well, ohne Phenolrot, mit SFCS). Pro well werden 100 μ l Optimen Medium in ein 250 ml Falcon Tube vorgelegt. Anschließend wird pro well 1 μ l Fugene zugesetzt und vorsichtig gemischt. FuGENE6 muß direkt zum Medium gegeben werden, um eine Absorption am Röhrchen zu verhindern. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die DNA (0,5 μ g/well/6-well) in ein separates 15 ml Falcon Tube vorgelegt und das verdünnte Fugene tropfenweise zugesetzt. Anschließend vorsichtig mischen. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird das DNA-Fugene Gemisch tropfenweise zu den Zellen mit normalem Kulturmedium gegeben. Anschließend werden die Platten geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erzielen. Nach 24 Stunden werden die Zellen durch Zugabe von Östrogen, Tamoxifen bzw. Raloxifen in einer Endkonzentration von 10^{-7} mol stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen zweimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und die Zellen mit 60

µl/well Lysispuffer (mit 1 mM DTT) lysiert. Anschließend werden die Zellen abgekratzt und können bis zur späteren Verwendung bei -80°C eingefroren werden.

2.10.5. Reporter Gen Assay

Vor Beginn des Versuchs müssen der 1 x Lysispuffer, das Luciferase Assay Reagenz und das Galaktolight Assay Reagenz auf Raumtemperatur temperiert sein. Außerdem muß die Zentrifuge vorgekühlt werden.

Das Kulturmedium wird von den Zellen abgezogen und die Zellen werden zweimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Pro well werden 60 µl Lysispuffer zugegeben und die Zellen nach 15 Minuten Inkubationszeit mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und die Zellsuspension in ein Eppi überführt. Danach wird die Zellsuspension 10 Sekunden gevortext.

2.10.5.1. Messung der Luciferaseaktivität (Luciferase Assay, Promega):

20 µl der Zellsuspension werden in ein Messröhrchen überführt. Die Messung erfolgte in einem Luminimeter der Firma Berthold. durch automatische Injektion werden 140 µl Luciferase Assay Substratlösung (Promega) zugesetzt. Die Messung erfolgt automatisch 30 Sekunden nach der Injektion.

2.10.5.2. Messung der Galaktosidaseaktivität (Galaktolight Assay, Promega):

Dem Galaktolight Assay Reagenz (accelerator) wird vor Gebrauch eine 30%-ige H_2O_2 Lösung (1 µl/ml accelerator) zugegeben. 10µl der Zellsuspension werden in einem Messröhrchen vorgelegt und mit Lysispuffer auf 20 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 µl Galactolight Reaktionspuffer wird die Suspension gut gemischt. Die Zugabe des Reaktionspuffers zu den einzelnen Proben erfolgt im Abstand von 10 Sekunden. Anschließend werden die Zellextrakte für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgt im Luminimeter der Firma Berthold nach automatischer Injektion von 100 µl Light Emission Accelerator II.

3. ERGEBNISSE

3.1. Methoden der Mutationsanalyse

Etwa 75% aller Mamma- und Ovarialkarzinome entstehen sporadisch, während in 25% der Fälle ein familiärer Hintergrund vorliegt. In ca. 7 % aller Mamma- und Ovarialkarzinome mit familiärem Hintergrund werden Keimbahnmutationen der beiden Brustkrebsgene *BRCA1* und *BRCA2* als Ursache vermutet. Die Möglichkeit der genetischen Analysen der beiden Gene *BRCA1* und *BRCA2* ermöglicht es, das Risiko eines Patienten an Brustkrebs zu erkranken, einzuschätzen. Dazu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Neben der direkten Sequenzierung der Gene werden auch Vorscreening-Methoden, wie z. B. der PTT ("Protein Truncation Test"), die SSCP- ("Single Strand Conformation Polymorphism"), die EMD- ("Enzymatic Mutation Detection") oder auch die DHPLC- ("Denaturing High-Pressure Liquid Chromatography") Analyse durchgeführt.

3.1.1. Direkte DNA-Sequenzierung

Die direkte DNA-Sequenzierung der *BRCA*-Gene gilt als der Gold-Standard der genetischen Analyse-Methoden. Im Gegensatz zu den Vorscreening-Methoden erlaubt die direkte Sequenzierung eine genaue Bestimmung der Art und der Position der Mutation und gilt als die Methode mit der höchsten Sensitivität. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, daß die Analyse sehr großer Gene, wie z. B. *BRCA1* und *BRCA2*, sehr arbeits- und zeitaufwendig und somit auch sehr kostenintensiv ist. Da sich die bisher bekannten Mutationen über den gesamten codierenden Bereich der Gene verteilen, ist es erforderlich, jedes Exon dieser beiden Gene zu sequenzieren. Dabei werden sowohl Hin- als auch Rückstrang sequenziert. Die Sequenzierstrategie ist in Abb. 3.1 dargestellt. Mittels *BRCA*-spezifischer Primer werden die einzelnen Fragmente amplifiziert. Um bei der nachfolgenden Sequenzierung den Einsatz fragmentspezifischer Primer zu umgehen, sind alle PCR-Primer mit einem Tag versehen. Alle Universal-Primer enthalten zusätzlich zur *BRCA*-spezifischen Sequenz 5' die M13-Universal Sequenz, alle Reversal-Primer die M13 Reversal Sequenz. Die Sequenzierung erfolgt so ausschließlich mittels der M13-Universal- und Reversal-Primer. Die Cy5-Markierung der Sequenzier-Primer ermöglicht eine Analyse der Sequenzierprodukte auf einem automatischen DNA-Sequencer (A.L.F., Pharmacia Biotech).

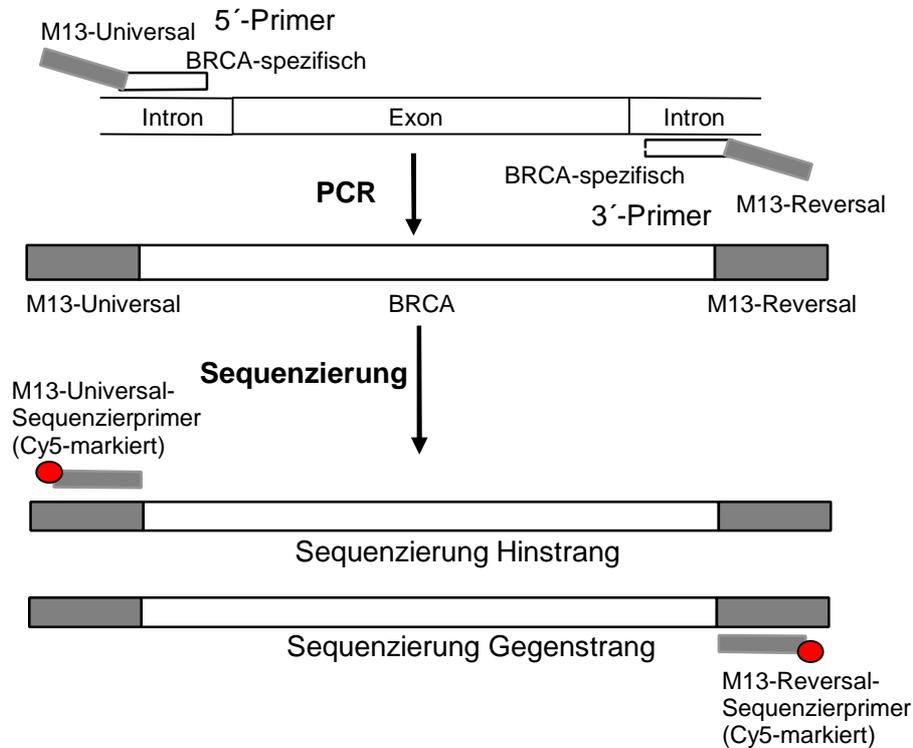


Abb. 3.1: Sequenzierstrategie der *BRCA*-Gene. Die *BRCA*-spezifischen Primer enthalten zusätzlich die M13-Universal bzw. die M13-Reversal Sequenz. Auf diese Weise können alle PCR Produkte einheitlich mittels CY5-markierter M13- Universal bzw. Reversal Primer sequenziert werden.

3.1.1.1. Etablierung der PCR

Aufgrund der Größe der beiden Gene *BRCA1* und *BRCA2* ist es notwendig, sie zur Sequenzierung in mehrere Fragmente zu unterteilen. Das *BRCA1* Gen besteht aus 24 Exons mit ca 5,7 kb kodierender Sequenz, die einen Bereich von 81 kb genomischer DNA umspannen (Smith et al., 1996). Zur Analyse wird das Gen in 39 Fragmente unterteilt. Die Exons 1-10, 12-14 und 17-24 werden in einem Fragment amplifiziert. Die Exons 15 und 16 werden in zwei und das Exon 11 in 15 sich überlappenden Fragmenten amplifiziert. Das *BRCA2* Gen besteht aus 27 Exons, erstreckt sich über einen Bereich von 10,2 kb und umfaßt einen Gesamtbereich von 100 kb genomischer DNA. Zur Analyse dieses Gens werden insgesamt 48 Fragmente amplifiziert: jeweils ein Fragment von Exon 1-9, 12, 13, 15-17 und 19-26, jeweils zwei Fragmente von Exon 14 und 18, jeweils drei Fragmente von Exon 10 und 27 sowie 18 Frag-

mente von Exon 11. Die Fragmente weisen eine durchschnittliche Größe von 200 bis 400 bp auf. Bei Fragmenten dieser Größenordnung kann die Analyse auf einem automatischen Sequenzer (A.L.F.) durchgeführt werden. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der *BRCA2* Sequenzierung.

3.1.1.1.1 Primerdesign für die *BRCA2*-PCR

Die Primer des *BRCA2* Gens werden so ausgewählt, daß im Hinblick auf eine spätere Automatisierung einheitliche PCR Bedingungen zur Amplifikation erforderlich sind. Das Primerdesign erfolgt mit Hilfe eines Programms des "Whitehead Institute for Biomedical Research" in Cambridge, Massachusetts, USA, welches per Internet (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) zugänglich ist. Die Primersequenzen werden so ausgewählt, daß bei maximaler Spezifität alle Primer gleiche T_m -Werte besitzen. Die Primer liegen im Intronbereich, um eine Analyse des gesamten Exons sowie der Splicestellen zu ermöglichen. Erfordert die Größe der Exons eine Unterteilung, so muß bei der Anordnung der Primer gewährleistet sein, daß sich die beiden Fragmente ausreichend überlappen. Die ausgewählten Primer (siehe Tabelle 2.2) können alle bei einer einzigen Annealing-Temperatur von 55°C eingesetzt werden. Ein Problem tritt bei der Sequenzierung des Exons 3 auf. Die amplifizierte Sequenz weist am 5'-Ende des Exons eine Poly-T Sequenz auf, die bei der Sequenzierung mit dem Universal-Primer zu Abbrüchen der Sequenzierreaktion führt. Hier muß ein zweiter Forward-Primer ausgewählt werden. Dieser zusätzliche Primer reicht 15 Basen ins Exon. Da diese 15 Basen nicht durch die Sequenzierung überprüft werden können, amplifiziert man das Exon 3 mit beiden Primerpaaren. Die Reversal Reaktion wird mit den ursprünglichen Primern, die Universal Richtung dagegen mit den neuen Primern analysiert. Durch diese Vorgehensweise wird die kleinstmögliche Anzahl von Basen (15) nur durch eine Richtung der Sequenzierung abgedeckt.

3.1.1.1.2 Automatisierung der *BRCA2*-PCR

Durch Einsatz einer automatischen Pipettierstation (Biomek 2000, Beckman) können die PCR Reaktionen zeitsparend durchgeführt werden. Zudem entspricht die Automatisierung den Anforderungen der diagnostischen Sequenzierung in Bezug auf z. B. die Minimierung manueller Fehlermöglichkeiten, die Reproduzierbarkeit und die Dokumentationsmöglichkeit bei gleichzeitig hohem Probendurchsatz. Mit Hilfe der Programmiersprache BioScript wurde ein Programm geschrieben, das es ermöglicht, die PCR Ansätze direkt in einen an das System angeschlossenen Thermo Cycler zu pipettieren. Im Rahmen der Programmierung der Pipet-

tierschritte wurde die für die Durchführung des Versuchs günstigste Anzahl der parallel zu analysierenden DNA Proben mit jeweils 48 Fragmenten ermittelt. Der Thermo Cycler bietet Platz für eine 96-Loch-Platte, auf der waagrecht je 12 und senkrecht je 8 Reaktionsgefäße angeordnet sind. Für jedes Fragment muß zusätzlich eine Negativkontrolle amplifiziert werden. Die o. g. Voraussetzungen führen zu folgender Versuchsanordnung: Pro Pipettierdurchgang werden jeweils 16 Fragmente von 5 DNA Proben analysiert. In den Reihen 1 und 7 werden die Negativkontrollen und in den Reihen 2-6 sowie 8-12 jeweils 8 Fragmente von 5 verschiedenen DNA Proben amplifiziert. Dazu wird zunächst der Mastermix, bestehend aus Wasser, dNTPs, 10 x Puffer und Taq-Polymerase pipettiert und auf alle 96 Reaktionsgefäße verteilt. Danach erfolgt die Verteilung der Primer, sowie der Proben-DNA. Nach der PCR Amplifikation werden die PCR Produkte auf einem 1,5%-igen Agarosegel überprüft, bevor sie nach ihrer Aufreinigung in die Sequenzierung eingesetzt werden.

3.1.1.2. Etablierung der *BRCA2*-Sequenzierung

Vor der Sequenzierung werden die PCR Produkte mit Hilfe von Microspin-Säulen (S-400, Pharmacia) von kurzen DNA-Fragmenten, wie z. B. den Primern oder überschüssigen dNTPs gereinigt. Die direkte Sequenzierung von PCR Produkten nach der "dye-Primer" Methode erfordert den Einsatz fluoreszenzmarkierter, fragmentspezifischer Primer. Um universelle Bedingungen für die "cycle-sequencing"-Methode zu schaffen, werden die PCR Primer mit einem Tag versehen. Jeder 5'-Primer enthält zusätzlich zur *BRCA*-spezifischen Sequenz 5' die Sequenz des M13-Universal Primers; jeder 3'-Primer enthält analog dazu die Sequenz des M13-Reversal Primers. Auf diese Weise ist es möglich, alle *BRCA2* Fragmente in beiden Sequenzierrichtungen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter M13 Universal- und Reversal-Primer bei einer einheitlichen Reaktionsbedingung durchzuführen. Die Universal Reaktion wird bei einer Temperatur von 60°C, die Reversal Reaktion bei einer Temperatur von 55°C durchgeführt.

3.1.1.2.1 Automatisierung der Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion der *BRCA2* Fragmente soll analog zur PCR mit Hilfe des Pipettierroboters automatisiert werden, um die in Abschnitt 3.1.1.2 bereits dargestellten Anforderungen der diagnostischen Sequenzierung zu erfüllen. Der Roboter wurde so programmiert, daß pro Durchgang jeweils 20 Fragmente (4 Fragmente von je 5 DNA Proben) in 80 Sequenzierreaktionen (jeweils A-, C-, G- bzw. T-Reaktionen/Ansatz) sequenziert werden. Man analysiert

die Sequenzierreaktionen eines Durchgangs auf jeweils zwei Sequenziergelen im automatischen DNA-Sequenzier (A.L.F. Express, Kapazität: 40 Spuren). Die gesamte Analyse des *BRCA2* Gens von 5 DNA Proben erfordert 3 PCR- und 24 Sequenzierdurchgänge mit dem Pipettier Roboter; gefolgt von der Analyse der Sequenzierprodukte auf insgesamt 48 Sequenziergelen.

3.1.1.2.2 Auswertung der Sequenzierung

Die Rohdaten der Sequenziergele werden durch den Einsatz der System Software A.L.F.win 1.0 prozessiert. Verschiebungen der A-, C-, G- und T-Spuren im Gel können ausgeglichen werden. Zur automatischen Auswertung der Sequenzierreaktion wird die Originalsequenz des *BRCA2* Gens zunächst fragmentweise und mit den darin enthaltenen, bereits bekannten Mutationen und Polymorphismen in das Programm "Configuration Manager" eingegeben. Bei der anschließenden Ausführung des Programms "Mutation Analyzer", das auf die im "Configuration Manager" erfaßten Daten Zugriff nimmt, werden die Daten beider Sequenzierrichtungen mit der Originalsequenz verglichen und Abweichungen zur Wildtypsequenz markiert. Jede angegebene Abweichung ist vom Auswerter mit Hilfe der Gegenstrangsequenz zu analysieren. Eine sehr gute Qualität der Sequenzierreaktion und der Elektrophorese bilden die Voraussetzung für die automatische Auswertung. Ein häufig auftretendes Elektrophoreseproblem besteht darin, daß die Signale - vor allem bei langen Sequenzierprodukten - gegen Ende der Analyse breiter werden. Dies führt zur teilweisen Überlagerung aufeinanderfolgender Signale, die beim "base-calling" der Sequenzier Software (A.L.F.win 1.0) zum Teil als zusätzliche Signale interpretiert werden. Eine Auswertung erfolgt in diesen Fällen durch eine zeitaufwendige Überprüfung mit Hilfe der Rohdaten. Teilweise muß die Sequenzierung eines Stranges wiederholt werden.

3.1.2. DHPLC

3.1.2.1. Etablierung der PCR

Bei der Durchführung der Mutationsanalyse mittels DHPLC werden wie bei der Sequenzierung die einzelnen Fragmente des zu untersuchenden Gens mittels PCR amplifiziert. Die DHPLC erlaubt die Detektion eines einzelnen Mismatches in DNA Fragmenten bis zu 1000 bp. Die Verifizierung des positiven DHPLC-Ergebnisses erfolgt durch die direkte DNA Sequenzierung. Voraussetzung für die direkte Sequenzierung der Fragmente ist eine Größe von max. 600-800 bp (je nach Sequenzer). Die PCR Produkte müssen in Cyclern mit beheiz-

barem Deckel amplifiziert werden. Dadurch wird eine Überschichtung des PCR-Ansatzes mit Mineralöl, das zur Zerstörung der Säulenmatrix führt, vermieden.

3.1.2.1.1 Taq-Polymerase

Durch die DHPLC-Analyse können bereits geringste Mengen mutierter DNA detektiert werden. Im Rahmen dieser Untersuchung soll getestet werden, welche Auswirkung der Einsatz verschiedener Taq-Polymerasen mit unterschiedlichen Fehlereinbauraten auf das DHPLC-Ergebnis hat. Zu diesem Zweck werden Wildtyp-DNA Proben mit verschiedenen Taq-Polymerasen (mit und ohne 3'-5'-Exonuklease Aktivität) amplifiziert und mittels DHPLC analysiert. Für die Taq DNA Polymerase (amersham pharmacia biotech) wird eine Fehlereinbaurrate von 2.6×10^{-5} angegeben. Die Expand High-Fidelity Taq Polymerase (Roche), die eine "Proof-Reading" Funktion hat, hat eine Fehlereinbaurrate von nur 8.5×10^{-6} . Abb. 3.2 zeigt die Elutionsprofile am Beispiel von zwei verschiedenen DNA Fragmenten, die jeweils mit der Pharmacia Taq DNA Polymerase (A und C) und mit der Expand High-Fidelity Taq Polymerase (Roche) (B und D) amplifiziert wurden. Der Einsatz einer Taq Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease Aktivität führt zu eindeutigen, scharfen Signalen (B und D). Der Einsatz von Taq Polymerasen mit höherer Fehlereinbaurrate kann sich durch die Ausbildung von Schultern (A) oder einem zusätzlichen Peak (C) darstellen.

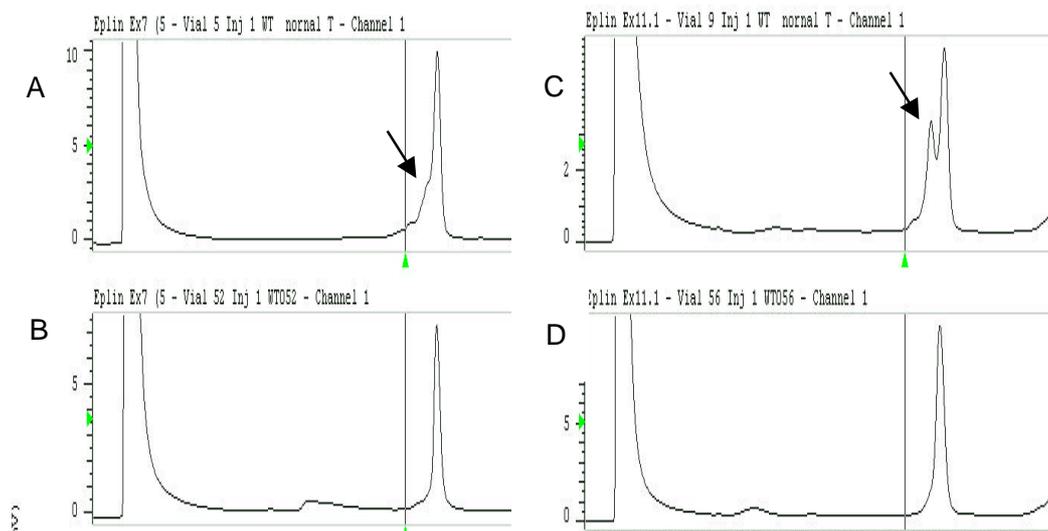


Abb. 3.2: Auswirkung verschiedener Taq-Polymerasen mit (B und D) und ohne (A und C) 3'-5'-Exonuklease Aktivität auf das Ergebnis der DHPLC Analyse zweier DNA Fragmente.

3.1.2.1.2 Primerdesign und PCR Bedingungen für die DHPLC Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2*

Analog zur DNA-Sequenzierung werden die beiden Gene in mehreren Fragmenten amplifiziert. *BRCA1* wird in 34 Fragmenten analysiert. Die Exons 2-10 und 12-24 werden als je ein Fragment amplifiziert. Das Exon 11 ist auf Grund seiner Größe in 13 sich überlappende Fragmente unterteilt. *BRCA2* wird in 42 Fragmenten amplifiziert. Dabei sind die Exons 14, und 27 in zwei, das Exon 10 in drei und das Exon 11 in 14 sich überlappende Fragmente unterteilt. Die PCR-Bedingungen variieren in ihren Annealing Temperaturen von 54-58°C und 60°C. Zusätzlich müssen zwei Fragmente mit Touch-Down PCR amplifiziert werden.

3.1.2.1.3 Automatisierung der PCR für die *BRCA1/2* Analyse

Im Zuge einer Automatisierung der PCR zur *BRCA1* und *BRCA2* Analyse werden die PCR Bedingungen so etabliert, daß jeweils 8 Fragmente bei der gleichen Annealingtemperatur amplifiziert werden können (siehe Tabelle 2.12). Bei dieser Analysestrategie müssen zwei überzählige Fragmente mit einer Annealing-Temperatur von 57 °C sowie die beiden Touch-Down PCRs manuell amplifiziert werden. Alle anderen Fragmente werden mit der automatischen Pipettierstation Biomek 2000 von Beckman pipettiert und in dem angeschlossenen Cycler amplifiziert. Man amplifiziert jeweils 12 DNA Proben von acht verschiedenen Fragmenten einer Annealing Temperatur in 96-Loch-Mikrotiter-Platten. Bei Amplifikation eines Leerwertes zur Kontaminationskontrolle (Nullprobe) können so 11 Familien parallel analysiert werden. Die Pipettierstation wurde mit der Programmiersprache BioScript so programmiert, daß zunächst ein Mastermix, bestehend aus Wasser, dNTPs, 10xPuffer und Taq-Polymerase pipettiert und für alle 96 PCR Reaktionen vorgelegt wird. Anschließend erfolgt die Verteilung der acht verschiedenen Primerpaare in den vorgelegten Mastermix. Abschließend wird das Wasser in die erste senkrechte Reihe als Leerwert, sowie die DNA von 11 verschiedenen Patienten in die Reihen 2-12 pipettiert. Anschließend erfolgt die PCR Reaktion. Die so hergestellten 96 Proben können nach Überprüfung auf einem 1,5%-igen Agarosegel direkt mit der 96-Loch-Platte in der DHPLC analysiert werden.

3.1.2.2. Etablierung der DHPLC-Analyse

Die Mutationsanalyse unter Einsatz der DHPLC setzt voraus, daß für jedes DNA Fragment die optimalen Elutionsbedingungen und Analysetemperaturen bestimmt werden.

3.1.2.2.1 Bestimmung des Gradienten

Die Analyse eines DNA Fragments durch DHPLC setzt sich aus vier Phasen zusammen, die sich durch die unterschiedliche Kombinationen der Puffer A und B (25% Acetonitril) in der mobilen Phase voneinander unterscheiden. Die Puffer werden mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.9 ml/min über die Säule gepumpt. Die 4 Phasen werden anhand eines typischen Elutionsprofils (Abb. 3.3 A) sowie des dazugehörigen Gradienten (Abb. 3.3 B) erläutert.

In der ersten Phase ("Loading") erfolgt die Injektion der DNA Probe. Diese Phase dauert 0.5 Minuten. Der Anteil des Puffers B wird dabei um 5% (+1.25% Acetonitril) erhöht.

In der zweiten Phase ("Gradient") findet die Elution des DNA Fragments von der Säule statt. In dieser Phase variiert der Anteil des Puffers B zwischen 48% (12% Acetonitril) und 69% (17,25% Acetonitril). Die Konzentration des Puffers B wird konstant um 2% pro Minute (0.5% Acetonitril) erhöht. Innerhalb des Gradienten wird die Konzentration an Acetonitril erreicht, bei der die Elution des DNA Fragments von der Säulenmatrix stattfindet. Durch eine Optimierung des Gradienten kann die Analysezeit verkürzt werden. Es ist jedoch darauf zu achten, daß die zur Elution des DNA Fragments benötigte Konzentration an Acetonitril zur Halbzeit des Gradienten erreicht wird.

In der dritten Phase ("Clean") wird die Säulenmatrix gereinigt. Zu diesem Zweck wird die Acetonitrilkonzentration für 0.5 Minuten auf 25% (100% PufferB) erhöht. So werden alle noch mit der Säulenmatrix interagierenden DNA Fragmente eluiert. Im Elutionsprofil macht sich dies durch den sog. Endpeak bemerkbar.

Die vierte Phase ("Equilibrate") dient der Equilibrierung der stationären Phase mit der ursprünglichen Pufferkonzentration. Diese Phase dauert mindestens zwei Minuten.

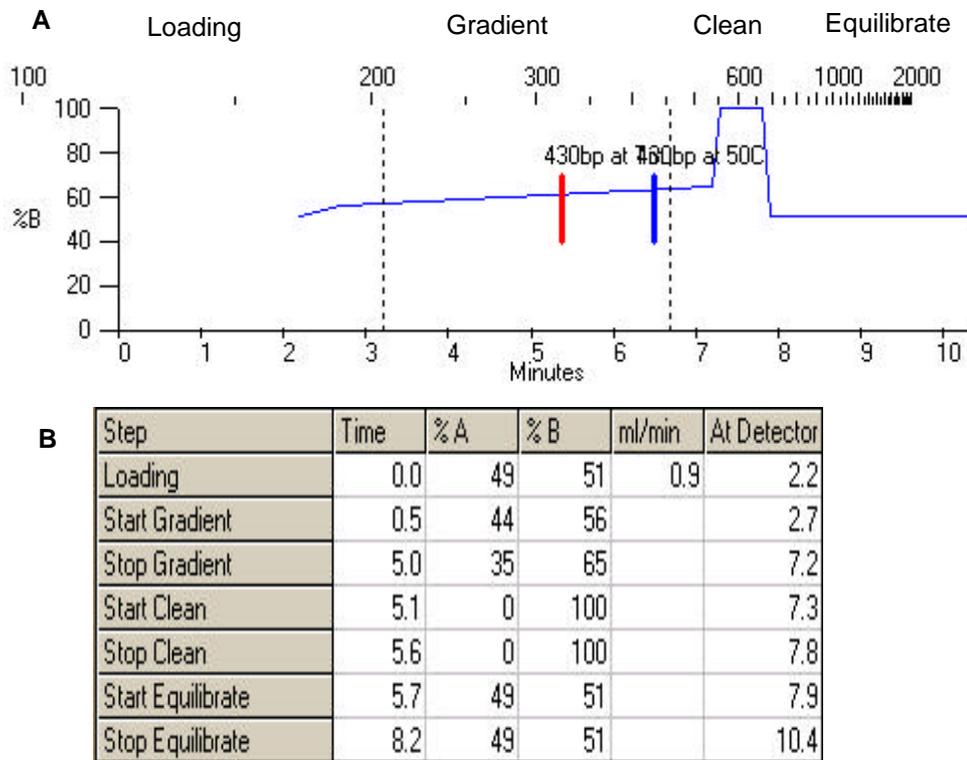


Abb. 3.3: Darstellung eines typischen Elutionsprofils eines DNA Fragments (A) sowie des dazugehörigen Gradienten (B). Die Analyse läßt sich in vier Phasen unterteilen: "Loading", "Gradient", "Clean" und "Equilibrate", die durch unterschiedliche Zusammensetzungen der mobilen Phase geprägt sind.

3.1.2.2.2 Bestimmung der Analysetemperatur

Im Fall einer heterozygoten Mutation werden nach Denaturierung und Renaturierung neben den beiden Homoduplices auch die beiden Heteroduplices gebildet. Diese zeigen wegen ihrer unterschiedlichen Basensequenzen unterschiedliche Schmelzverhalten und können so voneinander getrennt werden. Bei der idealen Analysetemperatur weichen die Einzelstranganteile von Homo- und Heteroduplices am stärksten voneinander ab. Dies ist i. a. der Fall, wenn das DNA Fragment zu 25% als Einzelstrang vorliegt.

Abb. 3.4 zeigt die Elutionsprofile eines DNA Fragments (Exon4, *BRCA2*) bei verschiedenen Temperaturen (50-56°C). Abb. 3.4 A zeigt die Elutionsprofile des Wildtyp-DNA Fragments. Die gesamte DNA wird bei einer bestimmten Konzentration Acetonitril von der Säule eluiert. Dies zeigt sich im Elutionsprofil in einem einzigen, scharfen Peak. Die Zunahme des Einzelstranganteils des DNA Fragments bei steigender Temperatur bewirkt eine Elution des DNA Fragments von der Säule bei einer geringeren Acetonitrilkonzentration. Im Vergleich dazu sind in Abb. 3.4 B die entsprechenden Elutionsprofile des gleichen DNA Fragments bei Vor-

liegen einer heterozygoten Mutation dargestellt. Zusätzlich zu dem Wildtyppeak erhält man je nach Temperatur bis zu drei zusätzliche Peaks. Diese sind auf das unterschiedliche Elutionsverhalten der beiden Homo- und Heteroduplexe zurückzuführen, die bei gleicher Temperatur voneinander abweichende Schmelzverhalten zeigen. Unter nicht denaturierenden Bedingungen von 50°C erhält man wie bei der Wildtyp-DNA nur ein Signal, d. h. Homo- und Heteroduplexe liegen als dsDNA vor. Bei 51°C werden zunächst Hetero- und Homoduplexmoleküle voneinander getrennt. Bei 52°C sind beide Heteroduplexe deutlich voneinander zu unterscheiden und bei der idealen Analysetemperatur (53°C) liegen alle vier möglichen dsDNA Moleküle voneinander differenziert vor. Bei höheren Temperaturen zeigen die beiden Heteroduplexe kein unterschiedliches Schmelzverhalten mehr, wohingegen sich die beiden Homoduplexe bei 54°C noch deutlich voneinander unterscheiden. Bei 55°C erhält man nur zwei Signale für Homo- und Heteroduplexe. Bei 56°C liegen schließlich alle 4 DNA Moleküle vollständig denaturiert vor es zeigt sich wie beim Wildtyp Fragment nur ein Signal im Elutionsprofil.

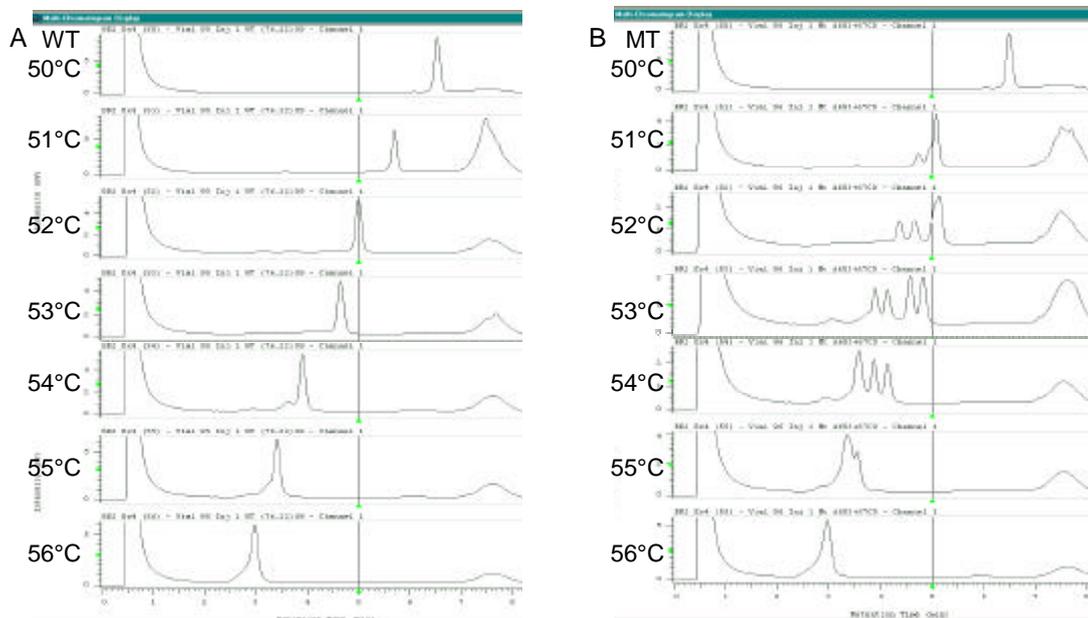


Abb. 3.4: Elutionsprofile eines DNA Fragments bei verschiedenen Temperaturen (50-56°C). (A) Die Wildtyp-DNA wird in Abhängigkeit vom ss-Anteil bei steigender Temperatur bei niedrigeren Acetonitrilkonzentrationen von der Säule eluiert. (B) Bei Vorliegen einer heterozygoten Mutation zeigt das Elutionsprofil des gleichen DNA Fragments zusätzliche Signale für die Homo- und Heteroduplexe.

Der Anteil an ds/ss-DNA läßt sich mit entsprechender Software (z. B. Wave Maker von Transgenomics) prognostizieren, basierend auf der Berechnung der Schmelzkurven von DNA Fragmenten. Das Programm Wave Maker gibt eine Analysetemperatur vor, die über das gesamte DNA Fragment gemittelt ist. Obwohl Mutationen erfahrungsgemäß über einen größeren Temperaturbereich nachzuweisen sind (mindestens 2-3°C bis zu 6-7°C; Oefner and Underhill, 1998), sollte die Analyse bei nur einer Temperatur lediglich bei Fragmenten erfolgen, die ein gleichmäßiges Schmelzverhalten aufweisen. Fragmente, die unterschiedliche Schmelzdomänen besitzen, sollten dagegen bei mindestens 2 verschiedenen Temperaturen analysiert werden. Abb. 3.5 zeigt ein Schmelzprofil des DNA Fragments 15, *BRCA2* mit unterschiedlichen Schmelzdomänen. Das Programm "Wave Maker" gibt eine Analysetemperatur von 57°C an. Im folgenden wird erläutert, warum es sinnvoller ist, die Analyse bei mindestens 2 Temperaturen (57°C und 61°C) durchzuführen. Die Analyse zweier Positivkontrollen hat ergeben, daß zwar die Mutation G7709A, nicht aber die Mutation C7786T bei 57°C detektiert werden kann. Die Mutation C7786T kann erst bei einer Analyse-Temperatur von 61°C detektiert werden.

Ein weiteres Programm zur Ermittlung der Analysetemperatur wird von der Universität Stanford über das Internet (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>) angeboten. Auch bei diesem Programm wird eine über das gesamte DNA Fragment gemittelte Temperatur vorgeschlagen. In Fragmenten mit AT- oder GC- reichen Regionen wird zusätzlich eine niedrigere bzw. höhere Analysetemperatur (+/- 5°C) vorgeschlagen. Für das oben dargestellte Beispiel werden von diesem Programm die Analyse-Temperaturen 55°C und 60°C vorgeschlagen.

Um optimale Analysetemperaturen zu erreichen, ist es sinnvoll, die Schmelzkurven aller zu analysierenden Fragmente durch eines der o. g. Programme erstellen zu lassen und die Analysetemperaturen in Abhängigkeit von den Schmelzdomänen individuell festzulegen.

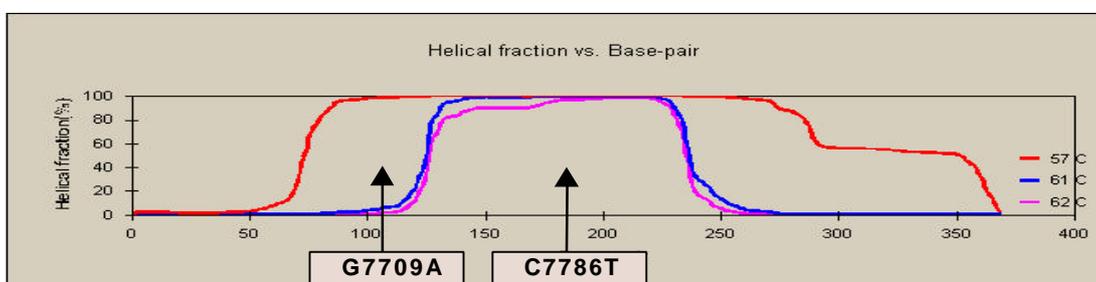


Abb. 3.5: Schmelzprofil des Exon15/*BRCA2*. Die Abbildung zeigt, daß das Fragment über verschiedene Schmelzdomänen verfügt. Die Analyse sollte daher bei zwei Temperaturen (57°C und 61°C) erfolgen.

3.1.2.2.3 DHPLC Bedingungen für *BRCA1* und *BRCA2*

Die in den Abschnitten 3.1.2.2.1 (Gradient) sowie 3.1.2.2.2 (Analysetemperatur) allgemein dargestellten Vorgehensweisen zur Ermittlung der idealen Analysebedingungen werden im folgenden auf die Analyse der amplifizierten DNA Fragmente der Gene *BRCA1* und *BRCA2* übertragen (siehe Tabellen 2.20 und 2.21). Die Elutionsgradienten sind für alle Fragmente so optimiert, daß die max. Analysedauer 10 Minuten beträgt.

Aufgrund ihrer Schmelzprofile sind für 11 *BRCA1* Fragmente bzw. 16 *BRCA2* Fragmente zwei verschiedene Analysetemperaturen und für ein *BRCA1* Fragment bzw. zwei *BRCA2* Fragmente drei verschiedene Analysetemperaturen notwendig. Die mittels automatisierter PCR amplifizierten DNA Fragmente können in der Mikrotiter- Platte direkt in die Autosampler-Einheit der DHPLC transferiert werden. Die Reihenfolge der Analysen richtet sich nach der Analysetemperatur der einzelnen Fragmente. Der Ofen kann sehr schnell aufgeheizt werden, kühlt sich jedoch nur langsam wieder ab. Daher ist es zur zeitlichen Optimierung der Analyse sinnvoll, die Fragmente mit ansteigenden Temperaturen zu analysieren.

Vor der Analyse einer Mikrotiter-Platte mit 96 Proben ist es erforderlich, die Dauer der Analyse und den daraus resultierenden Pufferverbrauch zu berechnen. Dazu wird pro Analyse eine Dauer von ca. 13 Minuten (10 min Gradient + 1 min Equilibrierung + 1 min Baselinetest) mit einem Pufferverbrauch von 0.9 ml/min zu Grunde gelegt.

In Abhängigkeit von der Nutzung der DHPLC kann zwischen verschiedenen Reinigungsprogrammen gewählt werden. Im Anschluß an die Analyse einer 96 Loch-Platte wird die Säule durch die Anwendung des Programms "Instrument clean up" gereinigt. Hierbei wird die Säule bei 60°C für 30 Minuten mit 100 % Puffer C (75% Acetonitril) gespült und somit von allen DNA Fragmenten, die noch an die Säulenmatrix gebunden sind, gereinigt. Bei täglicher Nutzung des Wave Systems reinigt man die Säulenmatrix einmal wöchentlich mit dem Programm "Column clean up". Dabei wird eine Reinigungslösung ("DNA Sep-wash solution") auf die Säule appliziert. Diese enthält u. a. EDTA zur Entfernung zweiwertiger Ionen. Mit dem Programm "Sleep" wird die DHPLC in ihren Ruhezustand versetzt. Dabei werden je 50% Puffer A und B mit einer Fließ-Geschwindigkeit von 0.05 ml/min bei 50 °C über die Säule gepumpt (siehe Tabelle 2.19).

3.1.2.3. Positivkontrollen für *BRCA1* und *BRCA2*

Um die Etablierung der Methode abzusichern und ggf. zu optimieren, werden die theoretisch ermittelten Analysebedingungen durch die Analyse von Positivkontrollen, d. h. DNA mit bekannten Mutationen, überprüft. Die Zielsetzung dieses Untersuchungsteils besteht darin, für alle amplifizierte DNA Fragmente der beiden Gene mindestens eine Mutation als Positivkontrolle einzusetzen. In Fragmenten mit verschiedenen Schmelzbereichen sollten jeweils Positivkontrollen für die verschiedenen Domänen getestet werden. Darüberhinaus soll es sich bei den Positivkontrollen möglichst um Punktmutationen handeln, da der Nachweis von Punktmutationen oft schwieriger ist, als der Nachweis von Deletionen oder Insertionen.

Auf der Basis dieser Zielsetzung wurden in zwei Datenbanken geeignete Mutationen von *BRCA1* und *BRCA2* gesucht. Es handelt sich um die BIC-Datenbank (Breast Cancer Information Core), eine weltweite Datenbank für *BRCA1* und *BRCA2* Mutationen (http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic), sowie um die German BIC-Datenbank (<http://www.pedgen.med.uni-muenchen.de/BRCA>), eine innerhalb des Konsortiums gegründete Datenbank, die die in Deutschland bisher gefundenen Mutationen zusammenfaßt. Die Labore, die die Mutationen beschrieben hatten, wurden angeschrieben und um Zusendung von ca. 1 µg Blut-DNA der Mutationsträger gebeten. Die Resonanz auf diese Aktion war sehr positiv. Insgesamt wurden 85 verschiedene *BRCA1* Mutationen aus allen amplifizierten Fragmenten, sowie 105 verschiedene *BRCA2* Mutationen für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt. (siehe Tabellen 10.3 und 10.4). Für das *BRCA2* Gen fehlen Positivkontrollen für die Fragmente 8, 12, 14.1, 19 und 26. Für alle anderen Fragmente beider Gene konnten die ermittelten Analysebedingungen durch die Positivkontrollen bestätigt und in einigen Fällen optimiert werden. So konnte beispielsweise für das Fragment 11E gezeigt werden, daß zur Analyse aller darin enthaltenen Mutationen zwei Temperaturen erforderlich sind, obwohl die Mutationen nicht in völlig voneinander abweichenden Schmelzdomänen liegen. Die beiden Analysetemperaturen weichen lediglich um 2°C voneinander ab. Die Mutationen C3743T und G3744A können tatsächlich nur bei einer einzigen Temperatur (59°C) detektiert werden, während die Mutation A3624G bereits bei 57°C detektierbar ist. Anhand der Positivkontrollen zeigte sich, daß die Mutationen in diesem Fragment nicht über einen größeren Temperaturbereich nachgewiesen werden können.

3.1.2.3.1 Amplifizierung der Positivkontrollen

Die zur Verfügung stehende DNA Menge der Positivkontrollen ist sehr begrenzt. Es müssen daher Vorgehensweisen entwickelt werden, um sie möglichst sparsam in die PCR einzusetzen, bzw. in Form einer Mutationsbank auf Dauer zu erhalten.

Zunächst stellt man PCR-Produkte der einzelnen Fragmente zwecks Reamplifikation her. Diese PCR Produkte können als Template in einer Verdünnung von 10^{-8} erneut in die PCR eingesetzt werden, ohne daß sich Auswirkungen auf das Peakmuster des Fragments in der DHPLC Analyse zeigen. Da durch den Einsatz von PCR Produkt als Template die Gefahr einer Kontamination des PCR-Platzes besteht, wird die Reamplifikation der Positivkontrollen räumlich getrennt von der automatisierten PCR durchgeführt.

Da die *BRCA1*- und *BRCA2* Mutationen langfristig in Form einer Mutationsbank zur Verfügung stehen sollen, wird die mutierte DNA der einzelnen DHPLC Fragmente in das Vektorsystem "pGEM-T Easy Vector System I" von Promega kloniert.

3.1.2.3.2 Entwicklung eigener Positivkontrollen

Eine weitere Aufgabenstellung besteht darin, eine Strategie zu entwickeln, um in Fragmente, für die keine Positivkontrollen zur Verfügung stehen, künstlich Mutationen einzubauen. Das Prinzip ist am Beispiel von Exon 8 / *BRCA2* in Abb. 3.6 schematisch dargestellt. Man wählt Primer, die innerhalb des Fragments in Universal- und Reversal Richtung komplementär binden, und die ein Mismatch enthalten (Ex8 #). In zwei getrennten PCR Reaktionen (1. und 2. PCR) werden jeweils mit einem das Exon 8 flankierenden und einem innerhalb des Fragments liegendem, fehlerhaften Primer zwei Fragmente amplifiziert. Anschließend werden diese beiden PCR Produkte in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, und nach Denaturierung und Renaturierung mit den beiden äußeren flankierenden Primern amplifiziert (3. PCR). Auf diese Weise erhält man das Fragment von Exon 8 mit einer homozygoten Mutation. Die Mutation kann mittels direkter DNA Sequenzierung verifiziert werden. Da man mittels DHPLC nur heterozygote Mutationen nachweisen kann, muß das PCR Produkt mit der Mutation im Verhältnis 1:1 mit dem PCR Produkt der Wildtyp DNA gemischt werden.

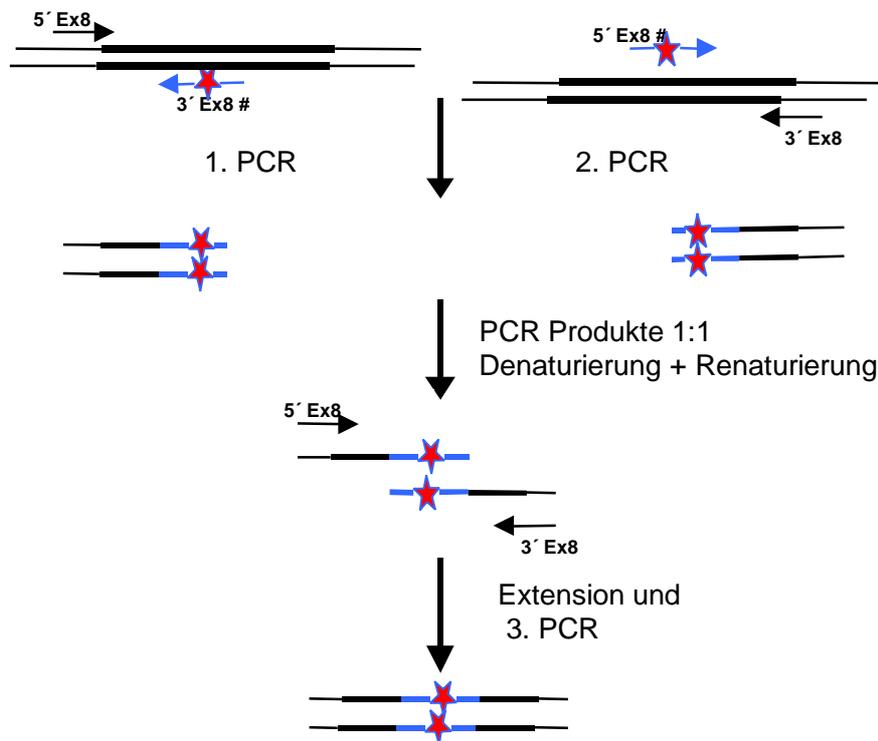


Abb.3.6: Schematische Darstellung des Einbaus einer homozygoten Mutation in eine Wildtyp DNA mittels PCR unter Verwendung von Primern mit eingebautem Mismatch (Ex8 #).

3.1.2.3.3 Überprüfung der Analysebedingungen mittels der Positivkontrollen

Der routinemäßige Einsatz der DHPLC in der Mutationsanalyse erfordert die vollständige Reproduzierbarkeit der etablierten Analysebedingungen. Problematisch bei der DHPLC Analyse ist die Kontrolle der Analyse-Temperatur. Der Säulenofen zeigt aufgrund seiner Ein-Punkt-Eichung Abweichungen zwischen der Soll- und der Ist- Temperatur auf der Säule. Die Ist-Temperatur wird darüberhinaus durch äußere Bedingungen wie z. B. die Raumtemperatur und die Temperatur des Puffers beeinflusst. Die Analyse der Positivkontrollen zeigt, daß die ideale Analyse-Temperatur je nach äußeren Temperaturbedingungen um 1°C nach oben bzw. unten von der zuvor etablierten Analyse-Temperatur abweichen kann. Um den Einfluß der Temperaturschwankungen auf das Analyseergebnis auszuschließen, werden die Analysebedingungen vor jeder Analyse in einem Vorlauf getestet und je nach Analyseergebnis ggf. korrigiert. Zu diesem Zweck werden die Negativkontrollen der automatisierten PCR (Reihe 1 der 96-Loch Platte) durch Positivkontrollen für die auf dieser Platte vorgelegten 8 Fragmente ersetzt und zuerst analysiert. Im Anschluß an die Detektion aller Positivkontrollen erfolgt die Analyse der unbekannt DNA-Fragmente unter diesen Bedingungen.

3.1.2.3.4 Sensitivitätsermittlung mittels der Positivkontrollen

Durch den Einsatz der Positivkontrollen wird das Ziel verfolgt, die Sensitivität der DHPLC zu ermitteln. Zu diesem Zweck amplifiziert und analysiert man alle zur Verfügung stehenden DNA-Proben mit bekannten Mutationen. Es stellt sich heraus, daß nur vier der insgesamt über 200 Positivkontrollen nicht unter den etablierten Bedingungen nachweisbar sind. Auch nach Veränderung der Bedingungen können diese Positivkontrollen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dennoch liegt die Sensitivität der DHPLC in der Analyse der *BRCA1* und *BRCA2* Gene nach der Etablierung bei über 95% und ist damit mit der Sensitivität der DNA Sequenzierung vergleichbar.

3.1.2.3.5 Nicht-detektierbare Positivkontrollen

Auch nach Optimierung der Analysebedingungen können die Mutationen 928delT im Exon 9 sowie T4229A und G4486T im Fragment 11G von *BRCA2* nicht nachgewiesen werden, da die Wildtyp DNA bei allen Analyse-Temperaturen ein breites Signal mit ausgeprägten Schultern zeigt. Dieses Problem kann evtl. auf die Basensequenz der Fragmente zurückgeführt werden. So befindet sich z. B. im Fragment 9 am 3'-Ende eine Poly-T-Sequenz. Kommt es, selbst unter Verwendung der High-Fidelity Taq-Polymerase, zu Einbaufehlern in diesem Bereich, können Homo- und Heteroduplices ausgebildet werden. Durch eine Verschiebung des 3'-Primers, die die Amplifikation der Poly-T Sequenz ausschließt, kann in diesem Fall erreicht werden, daß die Wildtyp DNA ein eindeutiges Signal zeigt.

3.1.2.3.6 Detektion von Mutationen in "high-melting domains"

Die Mutation T300G im Exon 5 von *BRCA1* ist eine weitere Mutation, die mittels DHPLC nicht reproduzierbar nachweisbar ist. Diese Mutation liegt in einem Bereich mit extrem hohem T_m -Wert. Aus den mit der TGGE (Temperaturgradienten Gelelektrophorese) - einer weiteren Methode der Heteroduplex-Analyse - vorliegenden Erfahrungen ist bekannt, daß ein Nachweis von Mutationen in "high-melting-domains" problematisch sein kann. Mit der TGGE werden Homo- und Heteroduplices über ein Gel, an das ein Temperaturgradient angelegt wird, voneinander getrennt. In Fragmenten mit unterschiedlichen Schmelzdomänen tritt sehr oft das Phänomen auf, daß die "high-melting domain" schlagartig aufschmilzt, und das Fragment ohne Übergang vollständig in die Einzelstränge zerfällt. Eine Mutation, die in diesem Bereich liegt, kann nicht detektiert werden. Um diese Mutationen dennoch detektieren zu können, werden die Fragmente mit Hilfe von GC-Klammern oder mittels einer Psoralen-Modifikation (Appligen) stabilisiert. Psoralen ist eine chemische Modifikation eines Primers. Je

nachdem, welchen Bereich des Fragments man stabilisieren möchte, wird der 5'- oder der 3'-Primer mit Psoralen gekoppelt. Nach Bestrahlung des PCR Produkts mit UV-Licht der Wellenlänge 365nm bildet sich eine kovalente Bindung zwischen beiden Strängen aus, die den Zerfall in die beiden Einzelstränge verhindert. Im Rahmen dieser Arbeit werden Fragmente mit Mutationen in "high-melting domains" ohne und mit Psoralenmodifikation vergleichend in DHPLC und TGGE analysiert.

3.1.2.3.6.1 Vergleich TGGE-DHPLC ohne Modifikation

Abb. 3.7 zeigt die Schmelzkurven des Fragments 16 von *BRCA2*. Während die Mutation IVS15-116delTAG im Bereich mit niedrigem T_m -Wert liegt, befindet sich die Mutation G7986A in einer "high-melting domain". Die DNA Fragmente werden ohne Modifikation amplifiziert und mittels TGGE und DHPLC analysiert. Die Analyseergebnisse sind in den Abb. 3.8 (TGGE-Gel) und 3.9 (DHPLC-Ausdruck) dargestellt. Mittels TGGE kann nur die Mutation IVS15-116delTAG eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.8 A), während die Mutation G7986A nicht detektiert wird (Abb. 3.8 B). Die Analyse des gleichen Fragments durch DHPLC zeigt, daß beide Mutationen detektiert werden können. Allerdings muß die Analyse des Fragments aufgrund der verschiedenen Schmelzdomänen bei zwei Analyse-Temperaturen durchgeführt werden. Während die Mutation IVS15-116delTAG bei einer Analyse-Temperatur von 54°C detektiert werden kann (Abb. 3.9.A/B), wird die Mutation G7986A bei 58°C detektiert (Abb. 3.9 C/D).

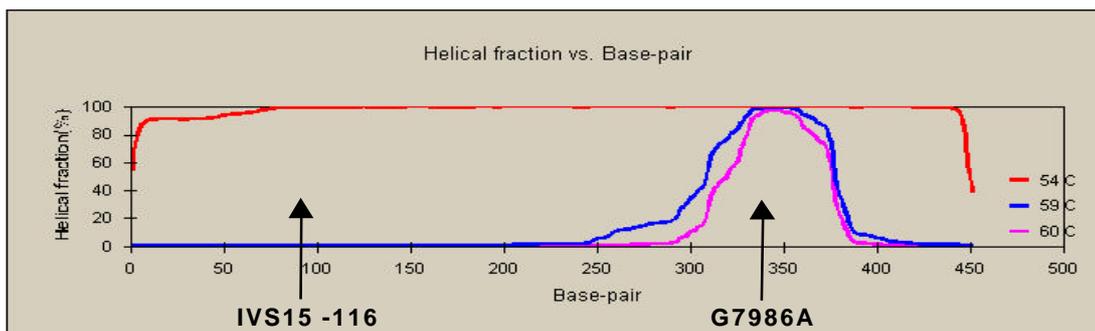


Abb. 3.7: Schmelzkurve des Fragments 16, *BRCA2* mit einer „high-melting domain“ im Bereich der Mutation G7986A.

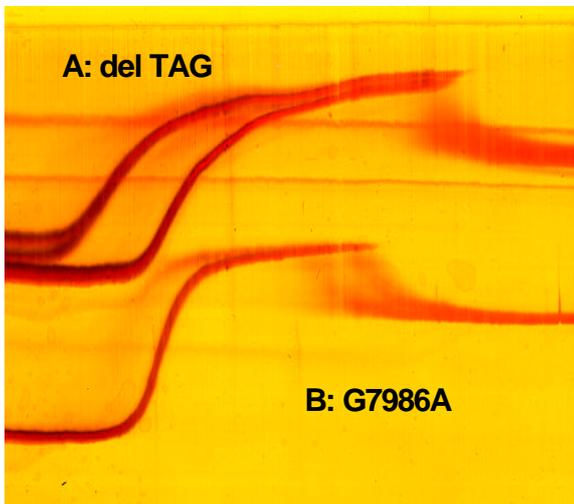


Abb. 3.8: Analyseergebnis der TGGE.
(A) Mutation IVS15-116delTAG
und (B) Mutation G7986A.

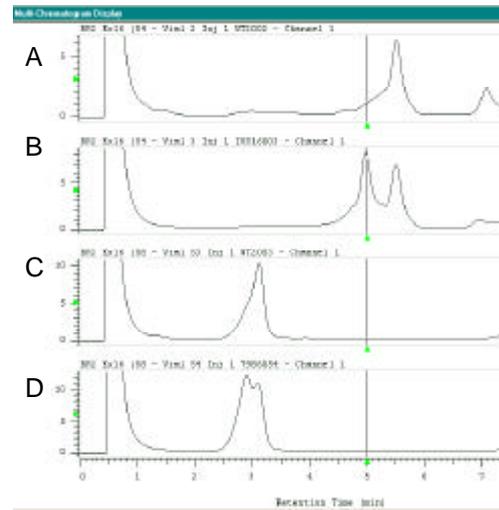


Abb.3.9: Analyseergebnisse der DHPLC.
(A/B) Wildtyp und Mutation IVS15-116delTAG
und (C/D) Wildtyp und Mutation G7986A.

Auch das Fragment 11L von *BRCA2* weist eine "high-melting domain" auf. Für dieses Fragment gibt es vier verschiedene Positivkontrollen; eine der Mutationen (6174delT) liegt in der "high-melting domain" (siehe Schmelzkurve, Abb. 3.10). Der Nachweis der Mutation 6174delT kann durch DHPLC, nicht jedoch durch TGGE (TGGE-Gel, Abb. 3.11) erfolgen. Wie auch für alle anderen Mutationen dieses Fragments C6092A, A6265T und C6293G (Abb. 3.12 A/C/D) zeigen sich im Elutionsprofil der DHPLC Analyse zwei Peaks (Abb. 3.12 B). Während alle Mutationen dieses Fragments bei 56°C analysiert werden, muß die Mutation 6174delT bei einer Analyse-Temperatur von 57°C analysiert werden.

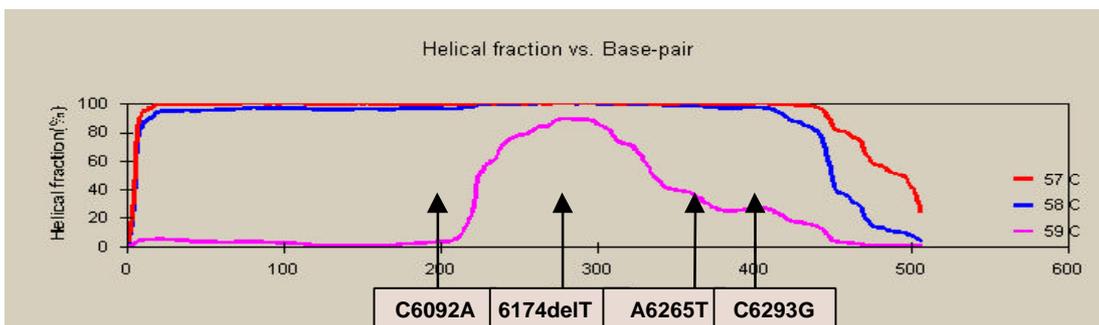


Abb. 3.10: Schmelzkurve des Fragments 11L, *BRCA2* mit einer „high-melting domain“ im Bereich der Mutation 6174delT.

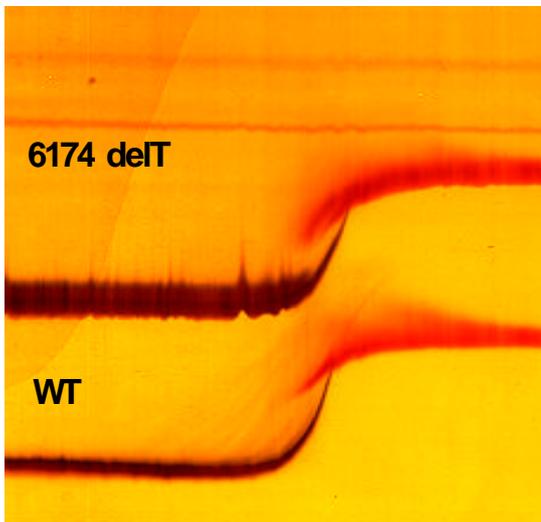


Abb. 3.11: Analyseergebnis der TGGE für die Mutation 6174delT

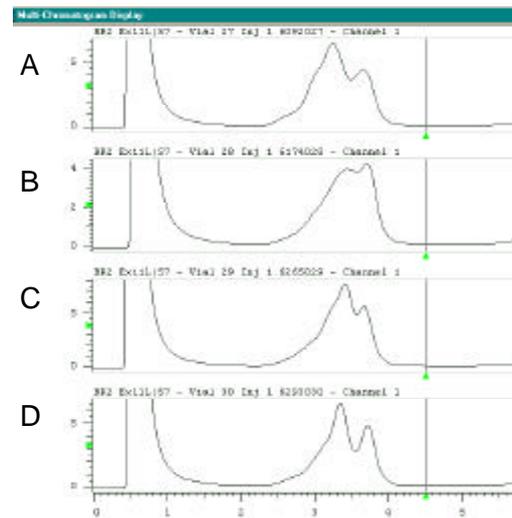


Abb.3.12: Analyseergebnisse der DHPLC: für die Mutationen (A) C6092A; (B) 6174delT, (C) A6265T und (D) C6293G.

Dieser direkte Vergleich der beiden Methoden TGGE und DHPLC zeigt, daß die DHPLC der TGGE bei der Detektion von Mutationen in "high-melting domains" generell überlegen ist.

3.1.2.3.6.2 Vergleich TGGE-DHPLC mit Modifikation

Die in Abschnitt 3.1.2.3.6 bereits erwähnte Mutation T300G liegt innerhalb des Fragments 5 von *BRCA1* ebenfalls in einem Bereich mit sehr hohem T_m -Wert. Diese Mutation kann in der TGGE überhaupt nicht und in der DHPLC-Analyse nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. Trotz idealer Analysebedingungen läßt sich das Signal der Mutation nicht immer vom Wildtyp Signal unterscheiden (Abb. 3.13 A und B). Es stellt sich somit die Aufgabe, zu überprüfen, ob durch eine Psoralenmodifikation des Fragments ein positives Analyseergebnis reproduzierbar erzielt werden kann. In Abb. 3.14 ist anhand der Schmelzkurven dargestellt, wie sich das Schmelzverhalten des Fragments 5 durch die Psoralenmodifikation des 5'-Primers verändert. Ohne Psoralenmodifikation (Abb. 3,14 A) schmilzt der Bereich um die Mutation T300G erst bei sehr hohen Temperaturen auf. Durch eine Psoralenmodifikation des 5'-Primers wird das Fragment so stabilisiert, daß es insgesamt ein gleichmäßiges Schmelzverhalten zeigt. Tatsächlich kann die Mutation nach Psoralenmodifikation des DNA Fragments mittels DHPLC reproduzierbar in einem Temperaturintervall von 2°C nachgewiesen werden (Abb. 3.15 A/B: 55°; C/D: 56°C). In Abb. 3.15 A/B ist hinter dem eigentlichen Signal noch ein zusätzliches Signal erkennbar, das auf ungekoppeltes Psoralenprodukt zurückzuführen ist. Dies bedeutet, daß ungekoppeltes Psoralen Wechselwirkungen mit der Säulen-

matrix einget. Ungeklärt ist derzeit noch, welche Wechselwirkungen bestehen. Es ist nicht bekannt, ob psoralenmodifizierte Produkte vollständig von der Säule eluiert werden, oder ob die Kapazität der Säulenmatrix evtl. durch den Einsatz psoralenmodifizierter Produkte beeinträchtigt wird. Alternativen zur Stabilisierung der Fragmente und zum Nachweis von Mutationen in "high-melting-domains" bestehen im Einsatz von GC-Klammern bzw. von 7-deaza-2'-dGTP statt dGTP in der PCR.

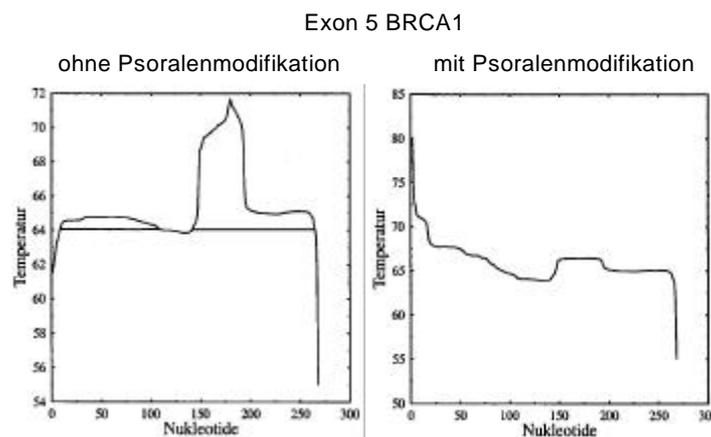


Abb. 3.14: Schmelzprofil des Fragments 5 von *BRCA1* ohne (A) und mit Psoralenmodifikation (B).

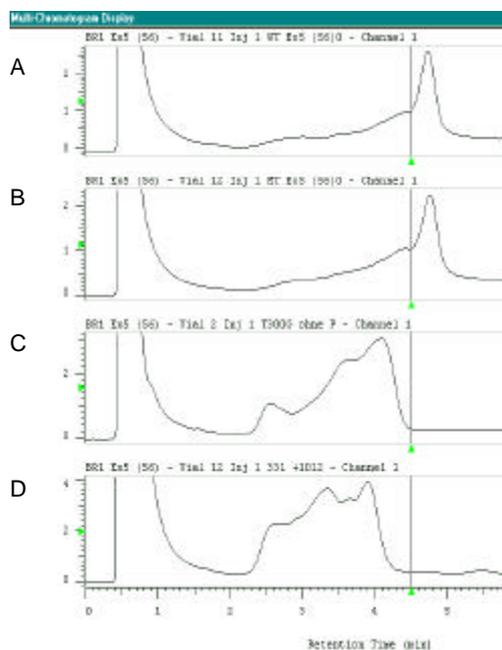


Abb. 3.13: Analyseergebnisse der DHPLC für das Fragment 5 von *BRCA1*: Wildtyp (A) sowie die Mutationen T300G (B und C) und 331+1 (D) ohne Psoralenmodifikation.

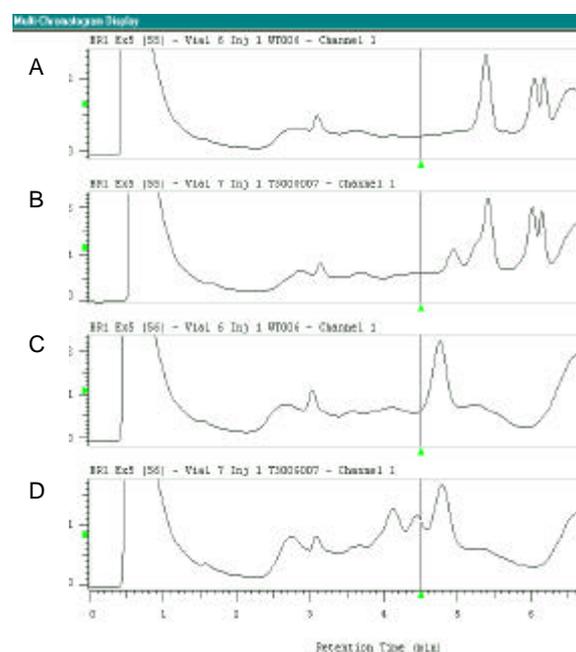


Abb.3.15: Analyseergebnisse der DHPLC für das Fragment 5 von *BRCA1*: Wildtyp und Mutation T300G bei 55°C (A/B) und bei 56°C (C/D) mit Psoralenmodifikation.

3.1.2.4. Interpretierbarkeit des Elutionsprofils

Die DHPLC ist -wie alle anderen Vorscreening-Methoden- eine Methode zur Mutationsdetektion. Eine Charakterisierung (Bestimmung von Art und Position) der Mutation ist mit dieser Methode nicht möglich. Positive DHPLC Ergebnisse müssen durch direkte DNA Sequenzierung verifiziert werden. Dies ist vor allem durch die große Anzahl der Polymorphismen in den beiden Genen *BRCA1* und *BRCA2* sehr zeitaufwendig und kostenintensiv. Es stellt sich daher die Aufgabe, Polymorphismen von potentiellen Mutationen in dem gleichen Fragment bereits durch Einsatz der DHPLC eindeutig zu unterscheiden. Dabei sind zwei Punkte zu berücksichtigen. Zum einen müssen Polymorphismus und Mutation bei zunächst gleichem Elutionsprofil eindeutig voneinander zu differenzieren sein. Zum anderen muß sich das Signal von Polymorphismus und Mutation gemeinsam in einem Fragment vom Signal des Polymorphismus allein unterscheiden. Dieser Sachverhalt wird am Beispiel des Fragments 11i von *BRCA1* untersucht. Zunächst wird das Fragment 11i mit Polymorphismus (A3232G) bzw. mit Mutation (3228insT) analysiert. In Abb. 3.16 sind die Elutionsprofile des Wildtypfragments (A), sowie der Mutation (B) und des Polymorphismus (C) dargestellt. Bei einer Analyse-Temperatur von 56°C können beide Veränderungen detektiert werden. Obwohl es sich um sehr unterschiedliche Veränderungen handelt (Insertion bzw. Punktmutation), sind die Elutionssignale nicht eindeutig voneinander zu unterscheiden. Es ist daher nicht möglich, eine Aussage bezüglich der Mutation zu treffen.

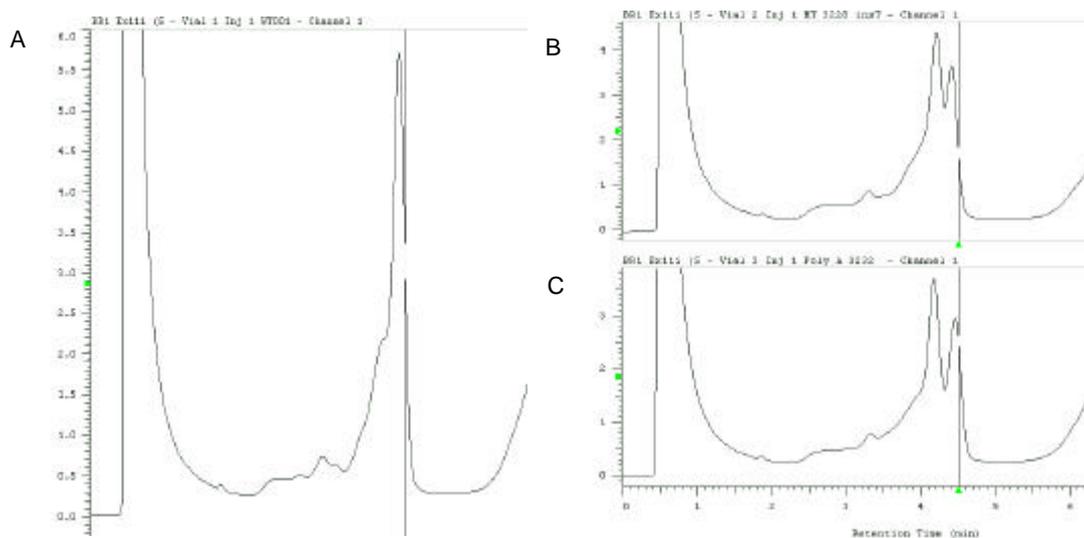


Abb. 3.16: Elutionsprofil des Fragments 11i: (A) Wildtypfragment (B) Mutation 3228insT (C) Polymorphismus A3232G

Aus diesem Grund führt man ein Mischexperiment durch. Die PCR Produkte der Fragmente mit Polymorphismus bzw. Mutation werden im Verhältnis 1:1 gemischt und nach Denaturierung und anschließender Renaturierung unter gleichen Bedingungen erneut analysiert. Das Elutionsprofil ist in Abb. 3.17 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß das Elutionsprofil des Mischexperiments sich von den Elutionsprofilen der Fragmente mit einer einzelnen Veränderung (siehe Abb. 3.16 B und C) unterscheidet.

Des weiteren muß sichergestellt sein, daß das Elutionsprofil sich bei Vorliegen von zwei Veränderungen gleichzeitig in einem Fragment ebenfalls von dem Elutionsprofil des Fragments mit Polymorphismus unterscheidet. Zu diesem Zweck wird das gleiche DNA Fragment mit zwei verschiedenen Polymorphismen (A3232G und A3238G) analysiert. Das Elutionsprofil ist in Abb. 3.18 dargestellt. Auch ohne Mischexperiment ist das Elutionsprofil von zwei Veränderungen in einem Fragment von dem Elutionsprofil des einzelnen Polymorphismus (Abb. 3.16 C) deutlich zu unterscheiden. Diese Aussage kann durch die Analyse anderer Fragmente bestätigt werden.

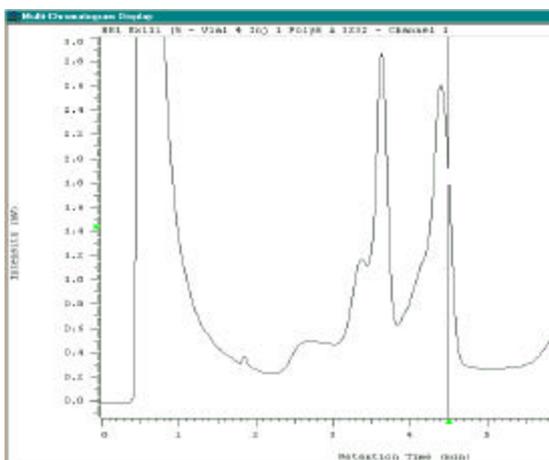


Abb. 3.17: Elutionsprofil des Fragments 11i nach Mischen der PCR Produkte von Polymorphismus (A3232G) und Mutation (3228insT).

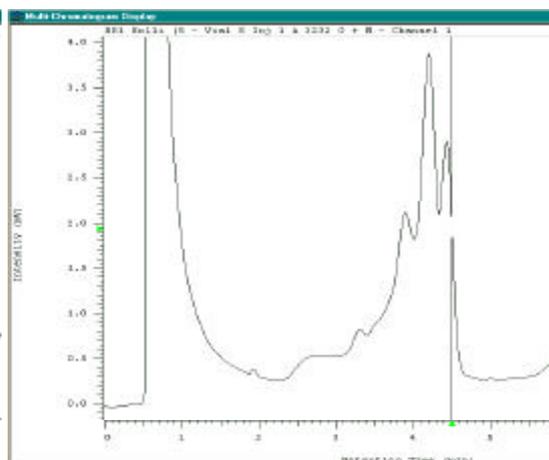


Abb.3.18: Elutionsprofil des Fragments 11i: 2 Polymorphismen in einem Fragment (A3232G und A3238G).

Aus diesen Experimenten resultiert folgende Analysestrategie bei Einsatz der DHPLC: Zunächst werden alle Fragmente von *BRCA1* und *BRCA2* unter den etablierten Bedingungen analysiert. In Fragmenten mit bekannten Polymorphismen werden die PCR Produkte bei positivem Analyseergebnis, sofern das Signal nicht vom Signal des Polymorphismus zu unterscheiden ist, mit dem PCR Produkt des Polymorphismus-Fragments gemischt und erneut analysiert. Ist das positive Signal auf den Polymorphismus zurückzuführen, so ändert

sich das Elutionsprofil durch Zumischen von DNA mit diesem Polymorphismus nicht. Im Fall einer Mutation ist ein verändertes Elutionsprofil zu erwarten. Abschließend müssen alle vom Wildtyp- und vom Polymorphismussignal abweichenden Elutionsprofile durch direkte Sequenzierung der DNA verifiziert werden.

3.1.2.5. Analyse rekurrenter *BRCA1/2* Mutationen

Die vollständige Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* ist auf Grund der Gengröße und Struktur sehr zeitaufwendig. Es sind keine Hot-Spots für diese Gene beschrieben, d. h. die bisher gefundenen Mutationen sind über die gesamte Sequenz der Gene verteilt. Dennoch ist zu untersuchen, ob es Mutationen gibt, die vor allem in der deutschen Population mit höherer Frequenz auftreten. Zu diesem Zweck führt man eine Datenbankanalyse der German BIC und der International BIC bezüglich der Frequenz der bisher beschriebenen Mutationen durch. Die bisher in der deutschen Population beschriebenen Mutationen sind in den Tabellen x und Y zusammengefaßt. Aus den dort angegebenen Frequenzen geht hervor, daß es einige Mutationen gibt, die in der deutschen Population gehäuft auftreten. Diese können für *BRCA1* durch gezielte Analyse der Fragmente 5, 11D, 11 G, 11K, 11L, 11M, 12, 20 und 24 und für *BRCA2* durch Analyse der Fragmente 10.2, 10.3, 11C, 11H, 11K, 11L, 11M, 17 und 23 untersucht werden. Unter der Voraussetzung, daß die Sensitivität der DHPLC unter optimalen Analysebedingungen bei über 95% liegt, können durch Analyse dieser Fragmente potentiell 65% aller *BRCA1* bzw. 68% aller *BRCA2* Mutationen, die in der German BIC beschrieben sind, detektiert werden. Bei einer Analyse dieser Fragmente findet man 39% der *BRCA1* und sogar 53% der *BRCA2* Mutationen, die in der International BIC beschrieben sind. Dabei werden in der prozentualen Berechnung nur die tatsächlichen Mutationen dieser Exons berücksichtigt, nicht jedoch die darin liegenden UVs oder Polymorphismen.

Aus den oben beschriebenen Untersuchungsergebnissen resultiert folgende Analysestrategie: Zunächst erfolgt eine Analyse der rekurrenten Mutationen. Bei Vorliegen einer *BRCA1* bzw. *BRCA2* Mutation wird diese mit 65%-iger bzw. 68%-iger Wahrscheinlichkeit detektiert. Im Falle eines negativen Ergebnisses wird die komplette Analyse der beiden Gene durchgeführt.

3.2. Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* in Mamma- und/oder Ovarialkarzinomfamilien

3.2.1. *BRCA2* Mutationsanalyse in 12 Risikofamilien mittels DNA Sequenzierung

Eine prädiktive Genanalyse des *BRCA2* Gens mittels direkter Sequenzierung wurde an 12 Risikofamilien durchgeführt. Dabei wird nicht die Ratsuchende selbst auf Mutationen des *BRCA2* Gens untersucht, sondern eine Indexperson. Diese Indexperson, die durch eine Analyse des Familienstammbaumes ermittelt wird, sollte Mutationsträger sein, sofern eine *BRCA* Mutation in der Familie vorliegt. Die direkt DNA Sequenzierung der 12 DNA Proben ergab folgendes Resultat: In zwei der analysierten DNA Proben konnte eine Mutation des *BRCA2* Gens detektiert werden. Des weiteren konnten 15 verschiedene genetische Veränderungen gefunden werden, die alle in der BIC bereits als Polymorphismen beschrieben sind (siehe Tabelle 3.1).

Tab. 3.1: Sequenzpolymorphismen des *BRCA2* Gens

Exon/Intron	Nukleotid	Kodon	bp-Veränd.	Veränd. d. AS
Exon 2	203 vor cd1	-	G -> A	non-coding
Intron 4	Intron 4 + 67	-	A -> C	non-coding
Intron 8	Intron 8 + 56	-	C -> T	non-coding
Exon 10	1093	289	A -> C	Asn -> His
Exon 10	1342	372	A -> C	His -> Asn
Exon 10	1593	455	A -> G	Ser -> Ser
Exon 11	2457	743	T -> C	His -> His
Exon 11	3199	991	A -> G	Asn -> Asp
Exon 11	3624	1131	A -> G	Lys -> Lys
Exon 11	4035	1269	T -> C	Val -> Val
Exon 11	5427	1733	C -> T	Ser -> Ser
Exon 11	5972	1915	C -> T	Thr -> Met
Exon 14	7470	2414	A -> G	Ser -> Ser
Intron 14	Intron 14+53	-	C -> T	non-coding
Exon 22	9079	2951	G -> A	Ala -> Thr

Bei den *BRCA2* Mutationen handelt es sich um die Mutationen 6633delCTTAA im Exon 11 (Familie 110) und 5445delTTTAAGTA in Exon 11 (Familie 176). In Abb. 3.19 sind die positiven Befunde dieser DNA Sequenzierung dargestellt. Bei den Mutationen handelt es sich in beiden Fällen um eine Frameshift Mutation. Diese Mutationen, die zu einer Rasterverschiebung führen, sind im Sequenzierausdruck leicht erkennbar: Ab der Mutationsstelle ist die Sequenz des mutierten Gens gegenüber der Sequenz des intakten Gens verschoben und es kommt zu einer Überlagerung verschiedener Signale. Bei den Polymorphismen handelt es

sich um Punktmutationen. Die Erkennung dieser Mutationen setzt eine hohe Qualität des Sequenzierergebnisses voraus, da nur an einer einzigen Base in der gesamten Sequenz zwei Signale überlagert sind.

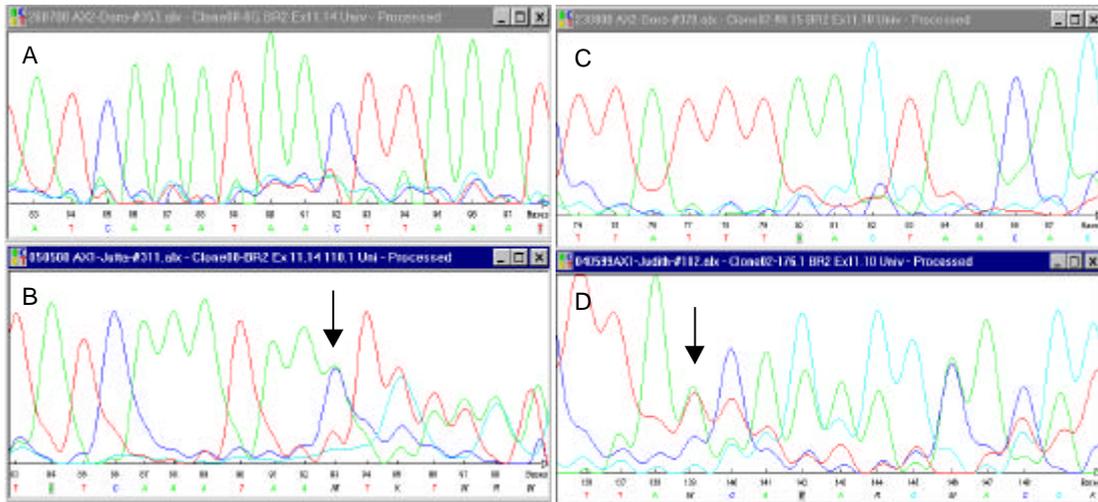


Abb. 3.19 BRCA2 Mutationen: (B) Mutation der Familie 110 (6633delCTTAA). Dargestellt ist die Sequenzierung mit dem M13-Universal-Primer. Ab der Mutationsstelle ist die Sequenz des mutierten Gens gegenüber der Sequenz des intakten Gens (A) verschoben und es kommt zu einer Überlagerung verschiedener Signale. (D) Mutation der Familie 176 (5445delTTTAAGTA). Dargestellt ist die Sequenzierung mit dem M13-Universal-Primer. Es handelt sich ebenfalls um eine Frameshiftmutation, die, im Vergleich zur Wildtypsequenz (C), durch Überlagerung zweier Signale erkennbar ist.

Da bei einem positiven Befund die Sequenzierung für die restlichen Fragmente des Gens nicht fortgeführt werden, können die Allelotypen bzgl. der gefundenen Polymorphismen nur für 10 der 12 DNA Proben dargestellt werden (siehe Tabelle 3.2). Für die Familien 110 und 176 fehlen diese Angaben.

Tab. 3.2: Allelotypen von 10 der 12 analysierten DNA Proben

Pat. No.	203v . cd1	Int 4 + 67	Int 8 + 56	1093	1342	1593	2457	3199	3624	4035	5427	5972	7470	Int 14 + 53	9079
23D	A/A	A/A	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	C/C	G/G
33A	A/A	A/A	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T	C/C	C/T	A/G	C/C	G/G
37B	G/A	A/A	C/C	A/A	A/C	A/A	T/T	A/A	A/G	T/T	C/C	C/C	A/G	C/C	G/G
45B	G/A	A/A	C/T	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	A/G	T/T	C/C	C/C	A/G	C/C	G/G
51A	G/A	A/A	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	A/G	T/C	C/C	C/C	A/G	C/C	G/G
57C	G/A	A/C	C/C	A/C	A/A	A/G	T/C	A/G	A/G	T/T	C/C	C/C	A/G	C/T	G/A
71.1	G/A	A/A	C/T	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	A/G	T/T	C/C	C/C	A/G	C/C	G/G
76.22	G/A	A/A	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	C/C	G/G
83.12	G/G	A/A	C/T	A/A	A/C	A/A	T/T	A/A	A/A	T/T	C/C	C/C	A/A	C/C	G/G
91.3	G/G	A/A	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	A/A	A/G	T/C	C/C	C/C	A/G	C/C	G/G

3.2.2. BRCA1/2 Mutationsanalyse in 42 Risikofamilien mittels DHPLC

Mittels DHPLC wurden insgesamt 41 verschiedene DNA Proben analysiert. In 10 Familien (40C, 55A, 56B, 60A, 67.1, 73.3, 75.1, 81.15, 85.3, 88.9) wurde eine Hotspot Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.2.5). 9 Familien wurden komplett für *BRCA1* und *BRCA2* analysiert (41B, 43A, 49.3, 84.1, 89.1, 93.1, 94.8, 100.1, 149.1). In 23 Familien (3C, 8G, 18A, 27A, 31B, 38A, 44C, 52C, 63.3, 64.3, 66.13, 70.8, 77.1, 78.8, 82.10, 95.9, 96.3, 98.1, 99.15, 102.3, 103.9, 159.1, 167.1), für die die *BRCA1* Analyse mittels DNA Sequenzierung bereits ohne Befund abgeschlossen wurde, wurde nur das *BRCA2* Gen analysiert. Im Rahmen dieser Analysen konnten zwei weitere Polymorphismen in den Intronbereichen des *BRCA2* Gens detektiert werden (siehe Tabelle 3.3). Diese Bereiche werden bei der direkten Sequenzierung nicht überprüft. Bei der DHPLC Analyse fielen sie durch Abweichung des Elutionsprofil vom Wildtypprofil auf und wurden durch die direkte Sequenzierung bestätigt.

Tab. 3.3: Zusätzliche Sequenzpolymorphismen im *BRCA2* Gen

Exon/Intron	Nukleotid	Kodon	bp-Veränd.	Veränd. d. AS
Intron 16	IVS 16 -14	-	T -> C	non-coding
Intron 21	IVS21 -66	-	C ->T	non-coding

Eine Einteilung der DNA Proben bzgl. der Allelotypen ist bei der Analyse mittels DHPLC nicht sinnvoll, da nur heterozygote Polymorphismen detektiert werden können. Die Aufstellung wäre daher nicht vollständig.

Zusätzlich zu den Polymorphismen konnten drei "unclassified variants" (UVs) detektiert und mittels direkter DNA Sequenzierung verifiziert werden. Ein UV ist im Exon 11 [G4486T (Familie 49)], die beiden anderen UVs sind in Exon 27 des *BRCA2* Gens [A10204T (Familie 55) und 10323delC ins11 (Familie 77)] lokalisiert. Bei einem UV (10323 delC ins11) handelt es sich um eine Frameshift Mutation. Diese ist im Sequenzierausdruck wieder leicht durch die Überlagerung der beiden Sequenzen erkennbar. Bei den anderen beiden UVs handelt es sich um Punktmutationen. Im Sequenzierausdruck sind nur an einer einzigen Base in der gesamten Sequenz zwei Signale überlagert.

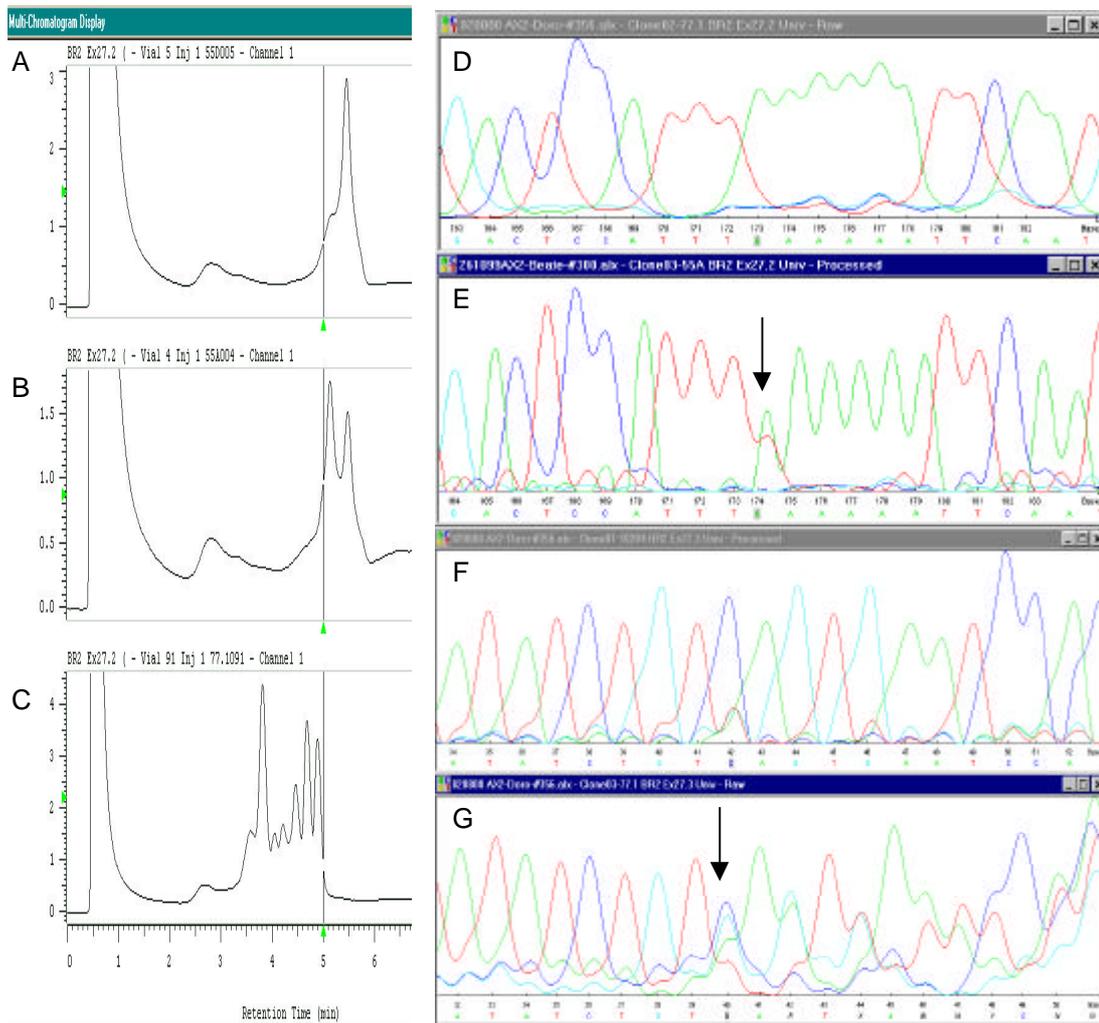


Abb. 3.20: BRCA2 UVs. Dargestellt sind die Elutionsprofile des Fragments 27.2 von BRCA2: (A) Wildtyp; (B) UV A10204T (Fam. 55) und (C) UV 10323delC ins11bp (Fam. 77) sowie die Sequenzierausdrucke zur Verifizierung der DHPLC Ergebnisse (D/E) Wildtypsequenz und UV A10204T (Fam. 55) und (F/G) Wildtypsequenz und UV 10323delC ins11bp (Fam. 77). Beide Sequenzierungen erfolgten mit dem M13-Universal-Primer. Beim UV A10204T handelt es sich um eine Punktmutation, d. h. an der Mutationsstelle sind zwei Signale überlagert. Beim UV 10323delC ins11 handelt es sich um eine Frameshift Mutation. Ab der Mutationsstelle kommt es zu einer Verschiebung der Sequenz des mutierten Gens gegenüber der Sequenz des intakten Gens. Dies resultiert in einer Überlagerung beider Signale.

3.2.3. UV-Analyse des *BRCA2* Gens

Bei der Betrachtung des Mutationsspektrums von *BRCA1* und *BRCA2*, das im Rahmen des deutschen Konsortiums aufgestellt wurde, fallen die Missense Mutationen auf, deren Funktion unbekannt ist und die deshalb als Unclassified Variants (UVs) bezeichnet werden. In der deutschen Population sind für das *BRCA1* Gen 18 UVs (siehe Tabelle 10.7) und für das

BRCA2 Gen 21 verschiedene UVs (siehe Tabelle 3.4) beschrieben. Mittels DHPLC Analyse und - bei positivem Befund - anschließender DNA Sequenzierung wurden alle UVs des *BRCA2* Gens in den Zentren Kiel und Düsseldorf bei jeweils 100 Kontrollpersonen untersucht. Die UVs G8410A in Exon 18, sowie G9079A wurden jeweils einmal im Düsseldorfer Zentrum in dem untersuchten Kontrollkollektiv gefunden. Alle anderen UVs konnten dort nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.4). Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse (Vorkommen der UVs in Kontrollen = 0.5%) und der geringen Probenzahl läßt sich keine eindeutige Klassifizierung der UVs als Polymorphismen treffen. Bezieht man allerdings eine von Wagner et al. (1999) durchgeführte Studie in die Analyse ein, können die UVs G4486T, G8410A und G9079A als Polymorphismen klassifiziert werden.

Tab. 3.4: Übersicht über die „Unclassified Variants“ im *BRCA2* Gen

Exon	Nukleotid	Effekt	BIC	Zentrum	# der Allele	ID	Kategorie	# der Allele in 200 Kontr.
3	353 A->G	Y42C	38x	WÜ BN	2	G96184 BN156	B C1	0
3	451 G->C	A75P	7x	WÜ	1	G970681	A2	0
10	1206 C->A	S326R	6x	L	1	506	C1	0
10	1239 C->G	N337K	0x	B	1	B51	C1	0
10	1379C->T	S384F	12x	U/BN	2	U91, BN207	2xC1	0
10	1570 C->T	R448C	1x	B	1	B64	C1	0
10	1613 A->G	E462G	9x	U	1	130	B	0
11	2192 C->G	P655R	23x	K	1	A0010	B	0
11	2719 A->G	V831I	0x	L	1	187	C3	0
11	3743 C->T	S1172L	6x	U B	2	167001 B304	A1 A2	0
11	4486 G->T	D1420Y	103x	D				0
11	4813G->A	G1529R	13x	BN	2	BN94,132	A1,B	0
11	5547del24	del 8aa	0x	MÜ	1	M45	A1	0
17	8106 G->C	W2626C	1x	K	1	K0164	C1	0
18	8377 G->T	A2717S	19	MS	2	MS117, 166	2x C1	0
18	8396 A->T	D2723V	0x	K	1	K0105	B	0
18	8395 G->A	D2723H	6x	B	1	B17	C1	0
18	8410 G->A	V2728I	44x	D	1	49	A1	1
20	8795 A->C	E2856A	28x	WÜ	1	95231	B	0
22	9078 G->T	K2950N	15x	MS/K	2	MS072/K0219	A1/B	0
22	9079 G->A	A2951T	33x					1
25	9599 A->T	N3124I	4x	WÜ L B	3	G980643 676 B61	A2 A1 C1	0
27	10204 A->T	K3326X	154x	D	1	55	C1	0
27	10323 delC ins11	Stop 3369	4x	D	1	77	B	0

3.2.4. Polymorphismencluster in *BRCA1*

Die Auswertung aller bis dahin analysierten 80 Familien zeigt eine weitere Besonderheit bei den Polymorphismen des *BRCA1* Gens. Es konnte nachgewiesen werden, daß bestimmte Polymorphismen gekoppelt in einem Cluster auftreten. Dieses Cluster umfaßt, wie die Abb. 3.21 zeigt, die Polymorphismen von C2201T in Exon 11 bis Intron 16 -68 G/A. Alle diese 9 Polymorphismen zeigen die gleiche Verteilung. Ist eine Patientin für einen dieser Polymorphismen homozygot WT bzw. heterozygot, so ist sie es auch für jeden anderen Polymorphismus dieses Clusters. Dieses Polymorphismencluster erstreckt sich über einen Bereich von 22% des gesamten Gens und sogar über 60% des translatierten Bereichs. Vier dieser Polymorphismen haben einen Aminosäureaustausch zur Folge: C2731T (Pro->Leu), A3232G (Glu->Gly), A3667G (Lys->Arg) und A4956G (Ser->Gly). Zwei dieser Polymorphismen, C2731T (Pro->Leu) und A3232G (Glu->Gly) liegen in dem Bereich von Exon 11, in dem sich die Interaktionsstelle zu RAD51 (AS 758-1064) befindet. Nicht unmittelbar betroffen sind die ebenfalls im Exon 11 lokalisierten Kernlokalisierungssignale NLS1 (AS 501-507) und NLS2 (AS 607-614).

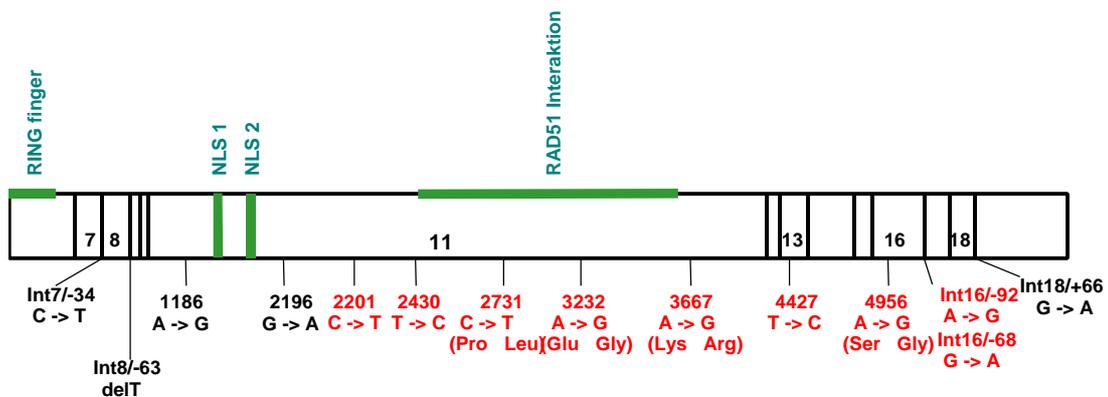


Abb. 3.21: Polymorphismencluster des *BRCA1* Gens

3.2.5. Exon 13 Duplikation

Die Duplikation von Exon 13 wurde zunächst in drei US-Familien europäischer Abstammung, sowie in einer portugiesischen Familie (Puget et al., 1999) nachgewiesen. Es handelt sich dabei um eine ins6kbEx13 Mutation. Diese Mutation kann nur in einem auf PCR basierenden Mutationsscreening durch die Wahl geeigneter Primer nachgewiesen werden. Die Primer werden so gewählt, daß im Falle der Duplikation ein 1,1 kb großes Fragment amplifiziert wird (siehe Abb. 3.22).

Im Rahmen einer weltweiten Studie unter der Leitung von S. Mazoyer wurde untersucht, wie verbreitet diese Exon 13 Duplikation in Familien mit familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen ist, und ob diese Mutation einen bestimmten Ursprung hat. Bestandteil der hier vorgelegten Dissertation war die Mitwirkung an dieser Studie durch Analyse der im Düsseldorfer Zentrum auf hereditäre *BRCA1* und *BRCA2* untersuchten Familien auf die Exon 13 Duplikation. Es wurde Blut-DNA von 54 Patientinnen aus 47 voneinander unabhängigen Risikofamilien untersucht. Bei 45 dieser Familien traten in 36 Familien nur Mammakarzinome, in 8 Familien Mamma- und Ovarialkarzinome sowie in einer Familie nur Ovarialkarzinome auf. Zusätzlich wurden zwei Familien untersucht, in denen die Patientinnen unter 40 Jahren am Mammakarzinom erkrankten. Bei keiner der untersuchten Patientinnen konnte eine Duplikation von Exon 13 nachgewiesen werden.

Die Auswertung der gesamten Studie ergab bei einer Analyse von 3580 voneinander unabhängigen Patientinnen aus 19 verschiedenen Ländern, sowie 934 Early-onset-Patientinnen, daß im ersten Patientinnen Kollektiv 10 weitere Exon 13 Duplikationen in Australien (1), Canada (1), Großbritannien (6) und Amerika (2), sowie eine in einer belgischen Early-Onset-Familie auftraten. Zusammen mit den vier bereits o. g. Familien sind somit 15 Familien mit Exon 13 Duplikation bekannt. Haplotypanalysen mit 7 polymorphen intra- und extragenischen Mikrosatellitenmarkern des *BRCA1* Gens in 8 dieser Familien legen einen gemeinsamen Ursprung für die Entstehung dieser genetischen Veränderung nahe. Mit Ausnahme einer Familie können alle Familien auf einen britischen Ursprung zurückgeführt werden, bzw. auf ein Land, daß geschichtliche Verbindungen zu Großbritannien hatte. Dies führt zu dem Schluß, daß es sich bei der Exon 13 Duplikation um eine Founder Mutation britischen Ursprungs handelt. (The *BRCA1* Exon 13 Duplication Screening Group, 2000).

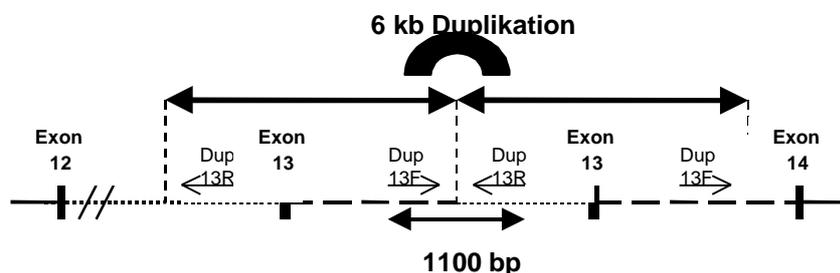


Abb. 3.22: Schematische Darstellung des auf PCR basierenden Nachweises einer Exon 13 Duplikation (The *BRCA1* Exon 13 Duplication Screening Group, 2000). Durch die Auswahl der Primer wird im Falle einer Exon 13 Duplikation ein ca. 1,1 kb großes PCR Produkt amplifiziert.

3.3. Mutationsanalyse von TSG in sporadischen Mammakarzinomen

Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) setzt eine Inaktivierung beider Allele des Gens voraus (Knudson, 1971). Das erste Allel wird durch eine somatische oder Keimbahnmutation inaktiviert. Der Verlust des zweiten Allels (LOH) führt zur Geninaktivierung. Der LOH ist daher ein häufiges Merkmal in Tumorsuppressorgenen. Bei hereditären Karzinomerkrankungen kann die prädisponierende Mutation in Blut DNA detektiert werden, da alle Zellen des Körpers von der Keimbahnmutation betroffen sind. Da in dem Normalgewebe der Verlust des zweiten Allels (LOH) ausgeschlossen werden kann, ist bei heterozygoten Mutationen das Verhältnis von Wildtyp-Allel und mutiertem Allel immer 1:1. Die Detektion sporadischer Mutationen in Karzinomgeweben gestaltet sich wesentlich schwieriger. Die Tumorzellen sind heterogen, d.h. nicht alle Tumorzellen zeigen die Mutation oder ggf. auch einen Allelverlust. Handelt es sich bei dem Tumormaterial nicht um mikrodisektiertes Material, so besteht zusätzlich eine Heterogenität des Materials bzgl. Normal- und Tumorgewebe. Das Verhältnis von Wildtyp-Allel und mutiertem Allel verschiebt sich dann zu Ungunsten des mutierten Allels. Die Heterogenität des Tumormaterials und damit der Anteil des mutierten Allels läßt sich über das Ausmaß der Signalreduktion bei der LOH Analyse abschätzen.

Der Anteil der mutierten DNA wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$X = \frac{n}{n + 2 \times (100 - n)}$$

X = Anteil mutierter DNA

n = Signalreduktion = Anteil der Tumorzellen mit Mutation bzw. Allelverlust

Diese Formel verdeutlicht, daß der Anteil der mutierten DNA unter 50% liegt, sobald die Signalreduktion weniger als 66% (LOH = 0,33) beträgt.

Es stellt sich daher die Frage, ob die bekannten Mutationsanalysetechniken bei geringen Anteilen mutierter DNA sensitiv genug sind. Die Sensitivität der DHPLC wird durch Mischexperimenten analysiert. Man mischt dazu die Proben von Wildtyp- und mutierter DNA in verschiedenen Verhältnissen und analysiert sie durch DHPLC. In den Abb. 3.23 und 3.24 sind die Elutionsprofile der Fragmente 2 und 4 von *BRCA2* bei einem Wildtyp DNA Anteil von 50% (A), 70% (B), 80% (C) und 90% (D) dargestellt. Selbst bei 90% Wildtyp DNA ist ein vom

100%-igem Wildtypsignal abweichendes Signal zu erkennen, d. h. selbst ein Anteil von nur 5% mutiertem Allel ist mittels DHPLC nachweisbar.

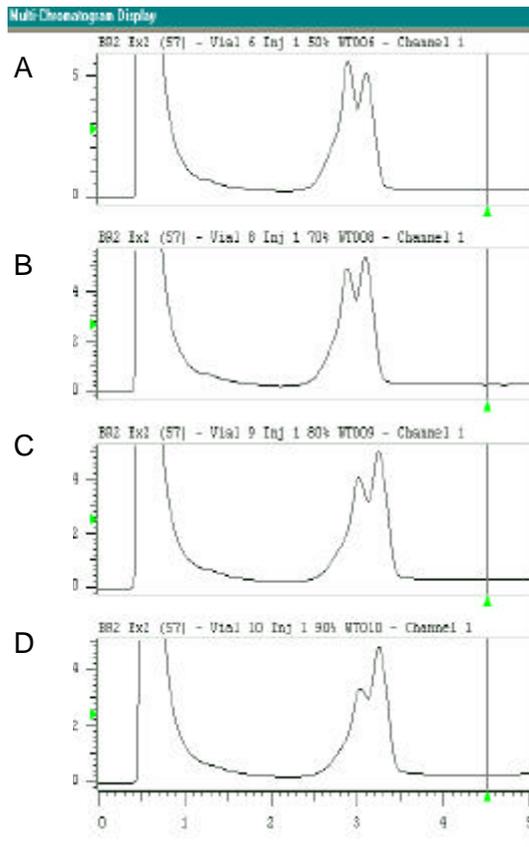


Abb. 3.23: Elutionsprofile des Fragments 2 von *BRCA1* nach Mischen von Wildtyp- und mutierter DNA. Der Wildtyp DNA Anteil liegt bei 50% (A), 70% (B), 80% (C) und 90% (D).

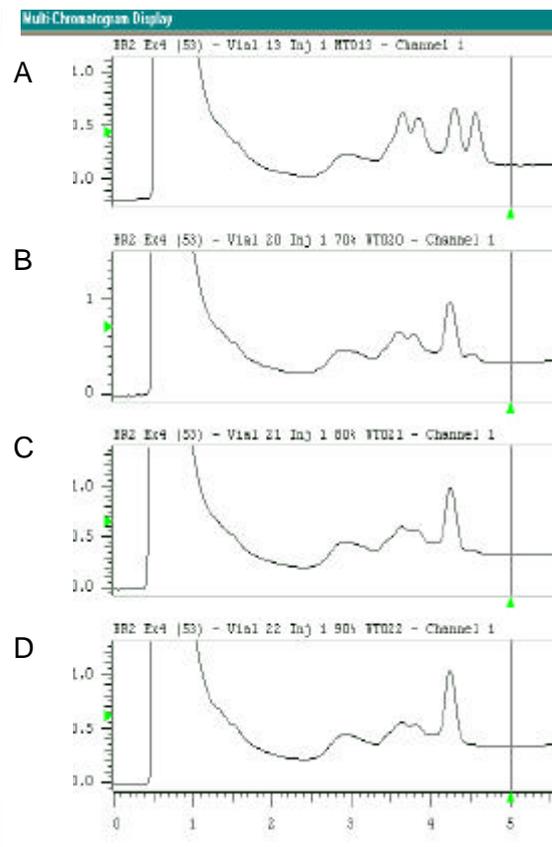


Abb. 3.24: Elutionsprofile des Fragments 4 von *BRCA1* nach Mischen von Wildtyp- und mutierter DNA. Der Wildtyp DNA Anteil liegt bei 50% (A), 70% (B), 80% (C) und 90% (D).

In einem weiteren Versuch werden DNA Proben mit bekannter Mutation und bekanntem LOH analysiert. Den DNA Proben wird zusätzlich Wildtyp DNA im Verhältnis 1:1 zugemischt. Die Elutionsprofile sind in den Abb. 3.25 und 3.26 dargestellt. Abb. 3.25 zeigt die Elutionsprofile des Exons 6 von p53: den Wildtyp (A), die mutierte DNA (B) und die mutierte DNA gemischt mit Wildtyp DNA (C). Der LOH p53 für diese DNA Probe beträgt 0,2. Gemäß der oben dargestellten Formel liegt der Anteil mutierter DNA bei 66%. Die Mutation kann mittels DHPLC deutlich nachgewiesen werden (B). Durch Zumischen von Wildtyp DNA läßt sich dieses Ergebnis jedoch verbessern (C). Abb. 3.26 zeigt die Elutionsprofile des Exons 8 von p53: den Wildtyp (A), die mutierte DNA (B) sowie die mit Wildtyp DNA gemischte mutierte DNA (C).

Der LOH p53 für diese DNA Probe beträgt 0,6. Gemäß obiger Formel liegt der Anteil mutierter DNA bei nur 25%. Dennoch ist die Mutation mittels DHPLC nachweisbar (B). Zusätzliches Zumischen von Wildtyp DNA verschlechtert in diesem Fall erwartungsgemäß das Analyseergebnis (C), da der Anteil der mutierten DNA noch weiter reduziert wird. Obwohl der Anteil an mutierter DNA sehr gering ist, weicht das Signal vom Wildtypsignal ab. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Ergebnisse des Mischungsexperiments.

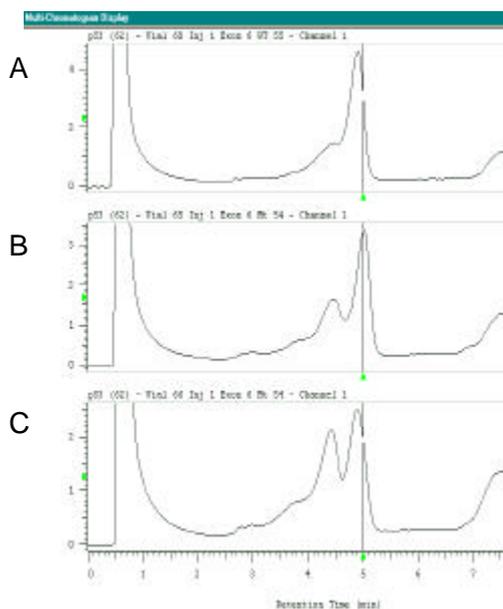


Abb. 3.25: Elutionsprofile des Exons 6 von p53. (A) Wildtyp DNA; (B) Mutation und (C) Mutation und Wildtyp DNA im Verhältnis 1:1 gemischt. Der LOH p53 liegt bei dieser DNA Probe bei 0,2, d. h. der Anteil mutierter DNA beträgt 66%. Durch Zumischen von Wildtyp DNA fällt das Analyseergebnis deutlicher aus.

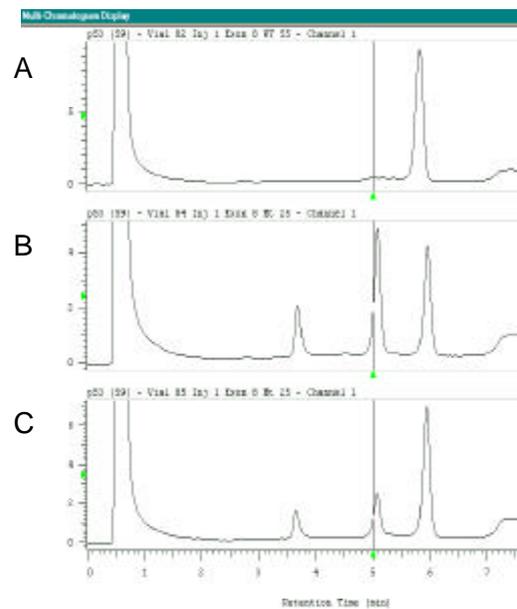


Abb. 3.26: Elutionsprofile des Exons 8 von p53. (A) Wildtyp DNA; (B) Mutation und (C) Mutation und Wildtyp DNA im Verhältnis 1:1 gemischt. Der LOH p53 liegt bei dieser DNA Probe bei 0,6, d. h. der Anteil mutierter DNA beträgt nur 25%. Durch Zumischen von Wildtyp DNA wird das Analyseergebnis negativ beeinflusst.

Die DHPLC kann aufgrund ihrer hohen Sensitivität als Analysetechnik zur Detektion von Mutationen in Karzinomgeweben eingesetzt werden.

3.3.1. Analyse des *TP53* Gens

Um die Sensitivität der DHPLC in der Mutationsdetektion in Karzinomgeweben zu überprüfen, werden 136 sporadische Mammakarzinome auf Mutationen des *TP53* Gens untersucht. p53 Mutationen sind frühe Ereignisse in der Entstehung sporadischer Mamma- und Ovarialkarzinome. In den Mammakarzinomen sind daher häufig *TP53* Mutationen zu erwarten. Des weiteren wurde das Kollektiv bereits bzgl. eines LOH in p53 mittels der Marker *TP53* und p53

Alu untersucht. In einem Teil des Kollektivs wurde bereits eine Mutationsanalyse mittels direkter DNA Sequenzierung durchgeführt. Die Analyse ist auf die Exons 5-8 beschränkt, da in diesem Bereich des Gens über 90% aller bisher beschriebenen *TP53* Mutationen lokalisiert sind.

3.3.1.1. PCR und Etablierung der DHPLC Analyse

Die Primersequenzen sowie die PCR Bedingungen zur Amplifikation der Exons 5-8 von *TP53* wurden der Literatur (Rhei et al., 1998) entnommen.

Die DHPLC Bedingungen werden, wie bereits bei der Etablierung der DHPLC Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* dargestellt (vgl. Abschnitt 3.1.2.2), zunächst theoretisch ermittelt. Mit Hilfe der bereits mittels DNA Sequenzierung detektierten Mutationen konnten die Bedingungen verifiziert werden. Die Analysebedingungen (Gradient und Temperaturen) sind in Tabelle 2.22 zusammengefaßt. Aufgrund unterschiedlicher Schmelzdomänen müssen die Exons 5 und 8 bei zwei verschiedenen Temperaturen analysiert werden.

3.3.1.2. Ergebnisse der DHPLC

Die Ergebnisse der Analyse von 136 sporadischen Mammakarzinomen auf p53 Mutationen sind in Tab 3.5 dargestellt. Mittels DHPLC konnten 3 Mutationen im Exon 5, jeweils 7 Mutationen in Exon 6 und 7 sowie 6 Mutationen im Exon 8 nachgewiesen werden. Das Resultat der DHPLC Analyse zeigte bei zwei DNA Proben (25 und 110) positive Befunde, die bei der zuvor durchgeführten DNA Sequenzierung keine Mutationen aufgewiesen hatten.

Tab. 3.5: Mutationen des *TP53* Gens in sporadischen Mammakarzinomen

Probe	Exon	Nukleotid	Kodon	Aminosäure	Effekt
5	5	C776G	175	Arg/Gln	Missense Mut.
60	5	C723G	158	Arg/Gly	Missense Mut.
142	5	G775A	175	Arg/His	Missense Mut.
30	6	903delG	218	Stop cd 246	Frameshift Mut
54	6	A890G	213	Arg/Arg	Polymorphismus
110	6	886del2bp	212	0	Frameshift Mut
150	6	A890G	213	Arg/Arg	Polymorphismus
159	6	A890G	213	Arg/Arg	Polymorphismus
198	6	A829T	193	His/Leu	Missense Mut.
202	6	A890G	213	Arg/Arg	Polymorphismus

Probe	Exon	Nukleotid	Kodon	Aminosäure	Effekt
54	7	A958G	236	Tyr/Cys	Missense Mut.
56	7	1023delG	258	Stop cd 344	Frameshift Mut
161	7	970del6bp	240	stop cd 246	Frameshift Mut
162	7	G994A	248	Arg/Gln	Missense Mut.
166	7	G962T	237	Met/Ile	Missense Mut.
185	7	C993T	248	Arg/Trp	Missense Mut.
197	7	G994A	248	Arg/Gln	Missense Mut.
15	8	1084G	278	Pro/Arg	Missense Mut.
16	8	G1069A	273	Arg/His	Missense Mut.
25	8	1058del37bp	269	Stop cd 246	Frameshift Mut.
124	8	C1167T	306	Sto cd 306	Nonsense Mut.
160	8	C1068T	273	Arg/Cys	Missense Mut.
215	8	A1154C	301	Pro/Pro	Missense Mut.

3.3.1.3. Verifizierung des DHPLC Ergebnisses durch direkte Sequenzierung

Die positiven DHPLC Ergebnisse müssen durch eine direkte Sequenzierung verifiziert werden. Bei dieser Methode wirft die Heterogenität des Tumormaterials Probleme auf. In Tumormaterial mit LOH-Werten kleiner 0,33 liegt der Anteil der mutierten DNA bei 50% oder höher. In diesen Fällen ist eine Verifizierung der Mutation mittels direkter Sequenzierung der DNA möglich. Das Sequenziersignal entspricht in diesen Fällen dem Signal einer heterozygoten oder im Falle eines 100%-igen LOHs dem einer homozygoten Mutation. Bei einem LOH des Tumormaterials über 0,4 steigt der Anteil des Wildtyp Allels an (> 57%). Dies erschwert die Detektion der Mutation mittels direkter DNA Sequenzierung, da das Signal der Mutation vom Hintergrundsignal nur schwer oder gar nicht zu unterscheiden ist. Abb. 3.27 zeigt das Elutionsprofil eines Fragments mit LOH p53 = 0,5. Die Mutation kann durch DHPLC Analyse eindeutig detektiert werden. In Abb. 3.28 ist das "Print-out" der Sequenzierung dieser DNA Probe dargestellt. Im Universal Strang wird die Mutation von der Software angezeigt. Im Reversal Strang dagegen wird die Mutation nicht erkannt. Dieser Sachverhalt liefert die Begründung dafür, warum bei zwei der Proben mit negativem Sequenzierergebnis mittels DHPLC eine Mutation nachweisbar ist.

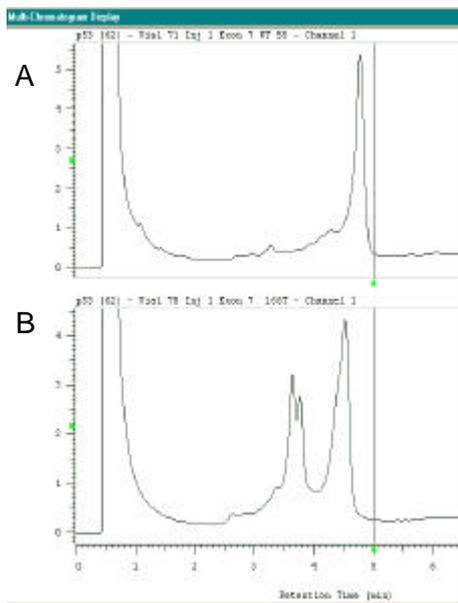


Abb. 3.27: Elutionsprofile des Exons 7 von p53. (A) Wildtyp DNA und (B) Mutation. Der LOH p53 liegt bei dieser DNA Probe 0,5, d. h. der Anteil mutierter DNA beträgt etwa 33%.

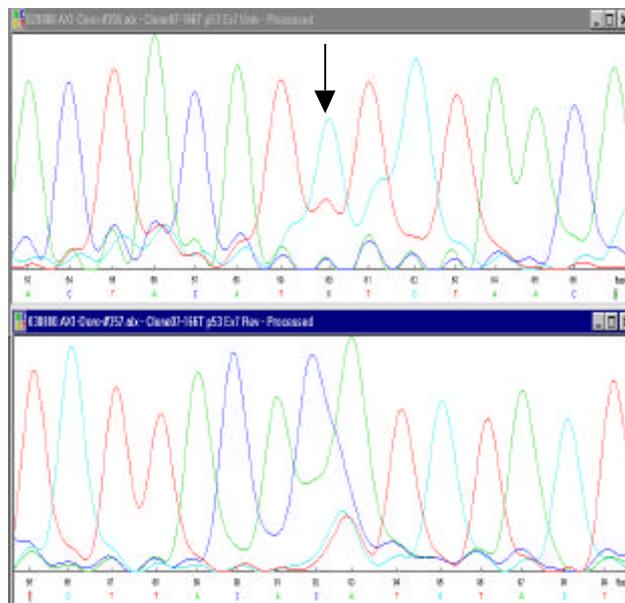


Abb. 3.28: "Print-out" der direkten Sequenzierung der mutierten DNA. Während die Mutation im Universalstrang detektiert wird, wird sie im Reversalstrang von Hintergrundsignalen überdeckt.

Das Resultat dieser Untersuchung ist, daß die Sequenzierung als Analyseverfahren zur Mutationsdetektion in Tumorgewebe nur begrenzt einsetzbar ist. Es muß daher geklärt werden, wie positive DHPLC Ergebnisse verifiziert werden können.

3.4. Analyse von *BRCA1* und *p21* in sporadischen Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen

Etwa 75% aller Mamma- und Ovarialkarzinome entstehen sporadisch. Aus der prädisponierenden Eigenschaft von *BRCA1/2*- Keimbahnmutationen in der Karzinogenese familiärer Karzinome resultiert die Frage, ob bei der Entstehung von sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen die Gene *BRCA1* und *BRCA2* ebenfalls eine Rolle spielen. Nach der Zweischnitt-Hypothese von Knudsen erfolgt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in zwei Schritten. Zunächst wird eine Genkopie durch Mutation inaktiviert. Diese Mutation kann eine Keimbahnmutation sein oder sporadisch entstehen. Der teilweise oder komplette Verlust des zweiten Allels führt dann zur vollständigen Inaktivierung des Gens. Dieser Allelverlust kann somit ein Hinweis auf das Vorhandensein eines Tumorsuppressorgens sein.

3.4.1. LOH Analysen

Ein Allelverlust („loss of heterozygosity“, LOH) kann mit Hilfe polymorpher Mikrosatelliten-Marker bestimmt werden. Dabei handelt es sich um kurze, repetitive Sequenzen. Zur Durchführung einer LOH-Analyse benötigt man Normal- und Tumorgewebe des Patienten. Das Normalgewebe gibt Auskunft darüber, ob ein Patient bezüglich des zu untersuchenden Markers informativ, d. h. heterozygot ist. Ist dies der Fall, werden zwei unterschiedlich große PCR-Produkte amplifiziert, da beide Allele der homologen Chromosomen eine unterschiedliche Anzahl der für diesen Marker spezifischen, repetitiven Einheit besitzen. Bei Homozygotie werden von beiden Allelen identische PCR-Produkte erhalten und eine Auskunft über einen evtl. Allelverlust kann nicht gegeben werden (nicht informativ). Nach PCR Amplifikation werden die fluoreszenzmarkierten Produkte, die man durch Einsatz Cy5-markierter Primer erhält, elektrophoretisch mit einem DNA Sequenzer (A.L.F., Pharmacia, Biotech) aufgetrennt.

Abb. 3.29 zeigt ein Beispiel für eine homozygote, d. h. nicht informative Probe sowie zwei informative Proben mit und ohne Allelverlust am Beispiel des Markers D17S1323. Die detektierten Fragmente können mit Hilfe der Fragment Manager Software ausgewertet werden. Man erhält eine graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit zur Laufzeit. Dabei ist das Integral der Peakfläche direkt proportional zur Menge des gebildeten PCR Produkts. Bei heterozygoten Proben erfolgt die Berechnung einer möglichen Signalreduktion im Tumorgewebe gemäß der folgenden Formel:

$$\text{Allelverhältnis } Q = \frac{\text{Fläche 1. Allel}_{\text{normal}} / \text{Fläche 2. Allel}_{\text{normal}}}{\text{Fläche 1. Allel}_{\text{Tumor}} / \text{Fläche 2. Allel}_{\text{Tumor}}}$$

Dabei erhält man Werte zwischen 0.0 und 1.0, wobei ein Wert von 0.0 einem 100%-igem Allelverlust entspricht. Das Tumormaterial ist heterogen. Handelt es sich bei dem eingesetzten Tumormaterial nicht um mikrodisektiertes Material, so enthält es zusätzlich verschieden große Anteile an Normalgewebe. Es ist daher notwendig, für die Definition eines LOH einen Schwellenwert zu ermitteln. Zu diesem Zweck wird die Häufigkeitsverteilung der ermittelten Allelverhältnisse in einem untersuchten Probenkollektiv ermittelt. Aus dieser graphischen Darstellung läßt sich der Cut-off-Wert für jeden Marker definieren.

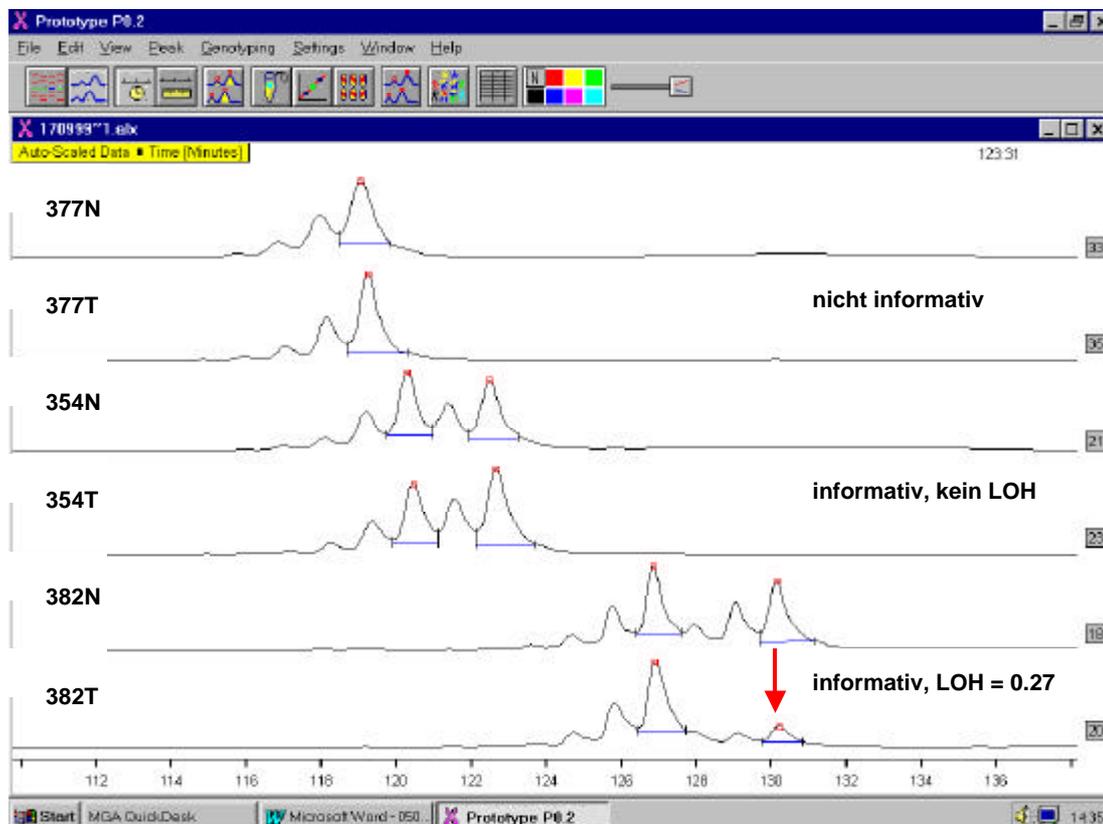


Abb. 3.29: A.L.F.-Ausdruck einer LOH Analyse mit dem polymorphen Mikrosatelliten Marker D17S1323. (Reihe 33 und 35: 377 N/T, nicht informativ; Reihe 21 und 23: 354 N/T, kein LOH; Reihe 18 und 20: 382 N/T, LOH)

3.4.1.1. LOH der drei intragenischen BRCA1 Marker D17S855, D17S1322 und D17S1323 in sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen

Das Probenkollektiv wird durch Einsatz dreier intragenischer Mikrosatelliten Marker untersucht. Die Bedingungen und Cut-off-Werte wurden für diese drei Marker bereits etabliert. Die Marker D17 S855, D17S1322 und D17S1323 sind im *BRCA1* Gen in den Intronbereichen 20, 19 bzw. 12 lokalisiert. Die Marker zeigen PIC-Werte (PIC = Prozent der informativen Fälle) von 80%, 64% bzw. 59%. Die LOH Daten sind in Tabelle 10.8 (sporadische Mammakarzinome) sowie Tabelle 10.9 (sporadische Ovarialkarzinome) zusammengefasst. Ein Allelverlust kann in den sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen in 30-43% der Mammakarzinome sowie in 42% der Ovarialkarzinome nachgewiesen werden. Die Korrelation der LOH Daten mit den klinischen Parametern zeigt keine statistische Signifikanz. In die Untersuchung gehen folgende Parameter ein: TNM-Status (T= Tumorgröße, N= Nodalstatus, M= Fernme-

tastasen), histologisches Grading, Hormonrezeptorstatus von Östrogen- und Progesteronrezeptor und das Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Erkrankung.

3.4.2. Expression

Obwohl sich in den sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen ein häufiger Allelverlust nachweisen läßt, sind im Gegensatz zu familiären Mamma- und Ovarialkarzinomen bis heute nur wenige Mutationen für *BRCA1* in sporadischen Karzinomen beschrieben. Um herauszufinden, ob in sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen die Funktion des *BRCA1* Gens durch reduzierte Expression eingeschränkt ist, wird mittels quantitativer RT-PCR die mRNA Expression in einem Set von 95 Mammakarzinomen, 52 dazu passenden Normalgeweben sowie 26 Ovarialkarzinomen untersucht. In einer Multiplex-PCR werden ein 141 bp großes *BRCA1* Fragment sowie ein 195bp großes *GAPDH* Fragment als Referenzgen koamplifiziert und ihr Expressionsverhältnis ermittelt. *GAPDH* (Taylor et al., 1994) eignet sich als Referenzgen, da es in jedem Gewebe gleich stark exprimiert wird und das amplifizierte Fragment aufgrund seiner Größe die Voraussetzungen zur Durchführung der Analyse erfüllt. Die Analyse verschieden großer Fragmente (*BRCA1*=141 bp, *p21*=169 bp, *GAPDH*=195 bp, *Bax*=382 bp und *β-Actin*=500 bp) hat gezeigt, daß das Expressionsverhältnis zweier Fragmente bei verschiedenen Analysen durch eine hohe Differenz in der Größe der betroffenen Fragmente stark variieren kann. Je weiter die Größe des Zielgens und des Referenzgens differieren, desto stärker können sich Abweichungen im Laufverhalten der Proben bemerkbar machen. Zum Vergleich verschiedener PCR Läufe werden als externer Standard zusätzlich die Expressionen der beiden Gene in den Mammakarzinom Zelllinien BT-20 und MCF-7 untersucht. Die PCR Produkte werden mit CY5-markierten Primern amplifiziert und elektrophoretisch auf einem DNA Sequenzer aufgetrennt. Die Auswertung der Peaks erfolgt analog zur LOH-Analyse mit Hilfe der Fragment Manager-Software.

3.4.2.1. Expression von *BRCA1*

In dem untersuchten Probenkollektiv variiert die relative *BRCA1* Expression von 0.01 bis 0.85 (siehe Tabellen 10.10 und 10.11). Die Normal- und Tumorgewebe werden entsprechend ihrer Expression in drei Gruppen eingeteilt, mit niedriger (0.01-0.13), mittlerer (0.13-0.25) und hoher (>0.25) *BRCA1* Expression im Vergleich zur mittleren Expression im Normalgewebe (0.19). Zusätzlich werden die drei Mammakarzinome aufgeführt, die eine auffällig hohe *BRCA1* Expression von 1.26, 1.64 und 1.84 aufweisen.

3.4.2.1.1 Expression von *BRCA1* in sporadischen Mammakarzinomen

Die Expression von *BRCA1* wird in 98 Mammakarzinomgeweben sowie in 54 Normalgeweben untersucht (Tabelle 3.6):

Table 3.6: *BRCA1* Expression in 98 Mammakarzinomen und 54 Normalgeweben. Die Gesamtheit der analysierten Gewebe ist eingeteilt in Gewebe mit niedriger (0.01-0.13), mittlerer (0.13-0.25) und hoher (0.25- 0.85) *BRCA1* Expression im Vergleich zur mittleren Expression im Normalgewebe (0.19). Zusätzlich aufgeführt sind drei Mammakarzinome mit extrem hoher (> 1.0) *BRCA1* Expression.

<i>BRCA1</i> Expression	Normalgewebe n=54		Tumorgewebe n=98	
	n	%	n	%
0.01 - 0.13	19	35	49	50
0.13 - 0.25	20	37	27	28
0.25 - 0.85	15	28	19	19
>1.0	0	0	3	3

Tumoren zeigen im Vergleich zu Normalgeweben deutlich häufiger eine verringerte Expression (50% im Vergleich zu 35% im Normalgewebe) und seltener eine mittlere und hohe Expression (28% und 19% im Vergleich zu 37% und 28% im Normalgewebe). Extrem auffällig sind die drei Tumore mit einer ungewöhnlich hohen *BRCA1* Expression von über 1.0 (1.26, 1.64 und 1.84).

Vergleicht man dagegen die *BRCA1* Expression in Tumor- und dazu passenden Normalgeweben, so findet man annähernd die gleiche Anzahl von Geweben mit niedriger Expression (42% bzw. 43%). Es gibt allerdings mehr Normalgewebe (15/52) als Tumorgewebe (10/52) mit hoher *BRCA1* Expression. Eine statistisch signifikante Reduktion der *BRCA1* Expression in Tumorgeweben wird nicht erreicht (Tab. 3.7; Abb. 3.30).

21 (40%) der Paare zeigen gleiche Expressionslevel (± 0.06). In 18 Tumorproben (34%) ist die Expression niedriger und in 14 Tumorproben (26%) ist die Expression höher als in den dazugehörigen Normalgeweben.

Table 3.7: *BRCA1* Expression in 53 Mammakarzinomen und passenden Normalgeweben. Die Gesamtheit der analysierten Gewebe ist eingeteilt in Gewebe mit niedriger (0.01-0.13), mittlerer (0.13-0.25) und hoher (>0.25) *BRCA1* Expression im Vergleich zur mittleren Expression im Normalgewebe (0.19).

<i>BRCA1</i> Expression	Normalgewebe n=53		Tumorgewebe n=53	
	n	%	n	%
0.01 - 0.13	22	42	23	43
0.13 - 0.25	16	30	20	38
> 0.25	15	28	10	19

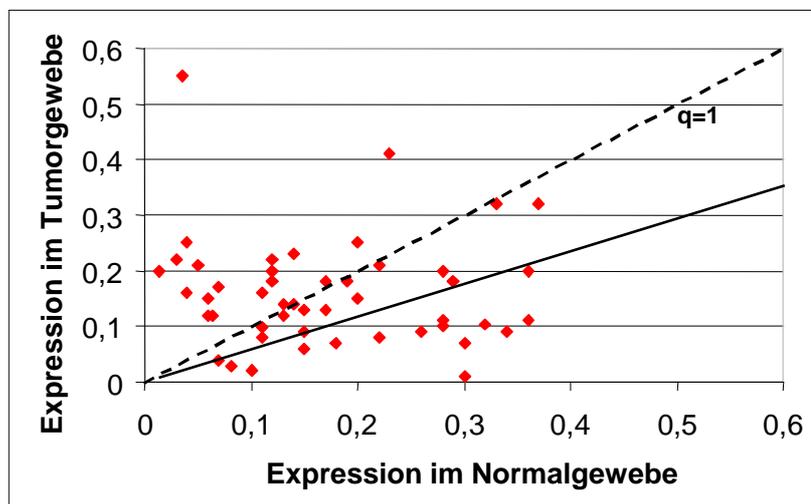


Abb. 3.30: *BRCA1* Expression in 53 Tumor- und dazu passenden Normalgeweben. Die gestrichelte Linie entspricht Tumor und Normalgeweben mit annähernd gleicher *BRCA1* Expression eines Patienten ($q=1$).

3.4.2.1.2 Expression von *BRCA1* in sporadischen Ovarialkarzinomen

Für die Expressionsanalyse in den Ovarialkarzinomen steht kein Normalgewebe zu Vergleichszwecken zur Verfügung. Die 26 untersuchten Ovarialkarzinome zeigen eine relative *BRCA1* Expression zwischen 0.01 und 0.9 und werden ebenfalls in drei Gruppen mit niedriger (0.01-0.09), mittlerer (0.09-0.17) und hoher (>0.17) Expression aufgeteilt. Die Anzahl der Tumoren mit niedriger Expression liegt bei 46%, mit mittlerer Expression bei 31% und mit hoher Expression bei 23% (Tab. 3.8). Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Analyse in den Mammakarzinomen zeigt eine analoge Verteilung der Tumore in diesen drei Gruppen.

Tab. 3.8: *BRCA1* Expression in 26 Ovarialkarzinomen. Normalgewebe des Ovars stehen nicht zur Verfügung. Die analysierten Gewebe sind eingeteilt in Gewebe mit niedriger (0.01-0.09), mittlerer (0.09-0.17) und hoher (>0.17) *BRCA1* Expression.

<i>BRCA1</i> Expression	Tumorgewebe n=26	
	n	%
0.01 - 0.09	12	46
0.09 - 0.17	8	31
> 0.17	6	23

3.4.2.1.3 Statistische Auswertung

3.4.2.1.3.1 Auswirkungen des *BRCA1* Allelverlusts auf die *BRCA1* Expression

Die LOH Analyse wurde mittels der drei intragenischen Mikrosatellitenmarker D17S855, D17S1322 und D17S1323 durchgeführt. Bei gleich starker Expression beider Allele hat der Verlust eines Allels eine 50%-ige Reduktion der Expression zur Folge. Obgleich ein häufiger Allelverlust des *BRCA1* Lokus in 30-43% der untersuchten Mammakarzinome (n=95) gezeigt werden kann, existiert keine statistisch signifikante Korrelation zwischen LOH *BRCA1* und erniedrigter *BRCA1* Expression (p=0.28). Analog zeigt die Analyse von 26 sporadischen Ovarialkarzinomen mittels der Marker D17S855 und D17S1322 einen häufigen Verlust eines *BRCA1* Allels (42%), jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen LOH *BRCA1* und erniedrigter *BRCA1* Expression (p=0,87).

3.4.2.1.3.2 Expression *BRCA1* - Klinische Daten

Die Expression des *BRCA1* Gens wird mit den klinischen Daten der Patientinnen korreliert. Dabei wird der Zusammenhang zwischen erniedrigter *BRCA1* Expression und TNM-Status (T= TumorgroÙe, N= Nodalstatus, M= Fernmetastasen), histologischem Grading, Hormonrezeptorstatus von Östrogen- und Progesteronrezeptor und dem Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Erkrankung untersucht. Auch hier zeigt sich keine statistische Signifikanz (siehe Tab. 3.9).

Tab 3.9: Statistische Berechnung der Korrelation von *BRCA1* Expression und klinischen Parametern (TNM-Status, histologisches Grading, Hormonrezeptorstatus von Östrogen- und Progesteronrezeptor und das Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Erkrankung). Es konnte für keinen der untersuchten Parameter eine statistische Signifikanz gezeigt werden.

Kriterium		Anzahl der auf <i>BRCA1</i> Expression analysierten Tumore	p-Wert
Alter	≤ 50 Jahre	30	0,42
	> 50 Jahre	54	
TumorgroÙe	T1	23	0,99
	T2	50	
	T3/T4	11	
LK	N1	42	0,23
	N2	38	
Metastasen	M1	59	0,09
	M2	11	
Grading	I	7	0,19
	II	40	
	III	28	
ER	negativ	26	0,26
	positiv	51	
PgR	negativ	26	0,19
	positiv	50	

3.4.2.2. Expression von *p21*

Für die Expressionsanalyse des *p21* Gens gelten die gleichen Optimierungsschritte wie in Abschnitt 3.4.2 zur Bestimmung der *BRCA1* Expression dargestellt. Nach Isolierung der Gesamt RNA werden mittels quantitativer RT-PCR ein 169 bp großes *p21* Fragment sowie das 195 bp große *GAPDH* Fragment koamplifiziert. Die Primersequenzen zur Amplifikation von *p21* wurden der Literatur entnommen (Hui et al., 1997). Nach Ermittlung der optimalen Menge an Primern, Nukleotiden und TAQ-Polymerase wird die Zyklenabhängigkeit bestimmt. Zu diesem Zweck werden nach Beendigung eines jeden Zyklus PCR-Proben entnommen und auf dem automatischen A.L.F. Sequenzer analysiert. Der graphischen Darstellung in Abb. 3.31 kann man entnehmen, daß die PCR bei einer Zyklenzahl von 27 im logarithmischen Bereich liegt. Da *p21* im Gewebe wesentlich schwächer exprimiert wird als *GAPDH*, ist es nicht möglich, beide Signalintensitäten gleichzeitig auszuwerten. Bei einer für die Auswertung ausreichenden Menge an *p21* PCR Produkt ist die Menge des parallel dazu amplifizierten

GAPDH Produkts für eine gleichzeitige Auswertung zu groß. Zur Abschwächung des Signals wird der fluoreszenzmarkierte Primer 1:8 mit nicht fluoreszenzmarkiertem Primer verdünnt.

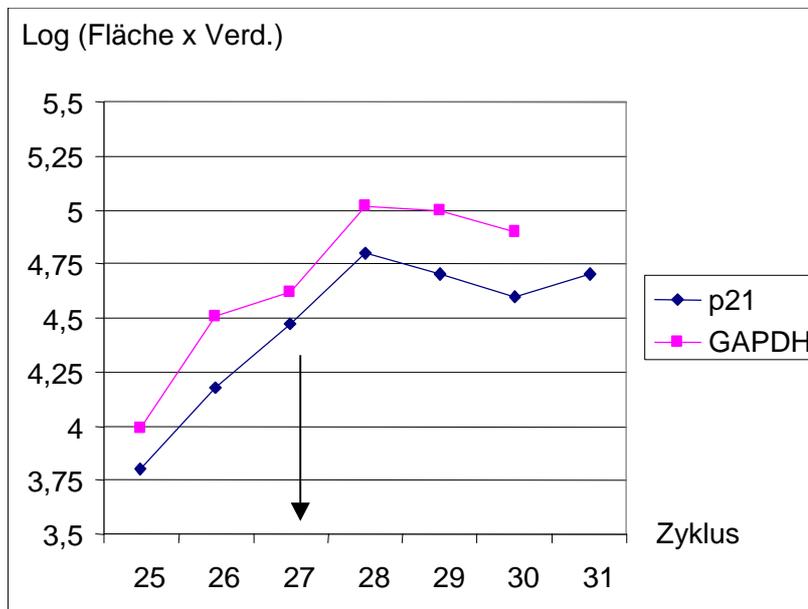


Abb. 3.31: Graphische Darstellung zur Ermittlung der Zyklusabhängigkeit. Der Logarithmus aus dem Produkt der ermittelten Fläche (*p21* bzw. *GAPDH*) und der Verdünnung, mit der die Probe auf das A.L.F. Gel aufgetragen wird, wird gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen.

3.4.2.2.1 *p21* Expression in sporadischen Mammakarzinomen

Die Expression von *p21* wird in einem Teil der Gewebeproben untersucht, in dem bereits die *BRCA1* Expression bestimmt wurde. Bei einer Analyse von 59 Mammakarzinom- sowie 18 dazu passende Normalgewebe variiert die relative Expression von 0,01 - 3,8 (siehe Tab. 10.10). Die mittlere Expression im Normalgewebe beträgt 1,2. Dementsprechend werden die Gewebe in drei Gruppen unterteilt mit niedriger (0,01-0,8), mittlerer (0,8-1,6) und hoher (>1,6) *p21* Expression (Tab. 3.10). Ein Vergleich der *p21* Expression aller untersuchten Gewebe zeigt, daß der Anteil der Gewebe mit niedriger *p21* Expression in den Tumorgeweben deutlich höher ist (81%) als im Normalgewebe (44%).

Tab. 3.10: *p21* Expression in 59 Mammakarzinomen und 18 dazu passenden Normalgeweben. Die Gesamtheit der analysierten Gewebe ist eingeteilt in Gewebe mit niedriger (0.01-0.8), mittlerer (0.8-1.6) und hoher (>1.6) *p21* Expression im Vergleich zur mittleren Expression im Normalgewebe (1.2).

<i>p21</i> Expression	Normalgewebe n=18		Tumorgewebe n=59	
	n	%	n	%
0,01 - 0,8	8	44	48	81
0,8 - 1,6	5	28	6	10
> 1,6	5	28	5	9

Der Vergleich der *p21* Expression in Paaren von Normal- und Tumorgeweben (Tab. 3.11) zeigt eine Verschiebung der Häufigkeiten in allen drei Gruppen. 29% der untersuchten Probenpaare weisen in Normal- und Tumorgewebe eine vergleichbare *p21* Expression auf. Bei 47% der Proben ist die *p21* Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe verringert, bei 24 % der Proben erhöht. Diese Expressionsverteilung in den Probenpaaren zeigt keine statistische Signifikanz ($p = 0,55$).

Tab. 3.11: Untersuchung der *p21* Expression in Normal- und Tumorgeweben von 19 Patienten. Die größere Anzahl von Tumorgeweben in der Gruppe mit niedriger Expression (65% im Vergleich zu 42% der Normalgewebe) ist nicht statistisch signifikant ($p = 0,55$).

<i>p21</i> Expression	Normalgewebe n=17		Tumorgewebe n=17	
	n	%	n	%
0,01 - 0,8	7	42	11	65
0,8 - 1,6	5	29	2	12
> 1,6	5	29	4	23

3.4.2.2.2 *p21* Expression in sporadischen Ovarialkarzinomen

Die Analyse der *p21* Expression wird analog zur *BRCA1* Expression in den dort analysierten 26 sporadischen Ovarialkarzinomen bestimmt. Die relativen Expressionswerte variieren von 0,01-0,82, was den Werten in den Mammakarzinomen entspricht. Für diese Untersuchung steht kein Normalgewebe zur Verfügung. Die Tumore werden entsprechend ihrer Expression in drei Gruppen eingeteilt: mit niedriger (0,01-0,22), mittlerer (0,22-0,4) und hoher (>0,4) *p21* Expression. In der Tabelle 3.12 ist dargestellt, daß 41 % der Ovarialkarzinome eine niedrige, 32% eine mittlere und 27 % eine hohe *p21* Expression aufweisen. Die Einteilung der Tumor-

gewebe mit in die drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher *p21* Expression weichen in Mamma- und Ovarialkarzinomen stark voneinander ab.

Abb. 3.12: *p21* Expression in 22 Ovarialkarzinomen. Die analysierten Gewebe sind eingeteilt in Gewebe mit niedriger (0.01-0.22), mittlerer (0.22-0.4) und hoher (>0.4) *p21* Expression im Vergleich zur mittleren Expression 0.31).

<i>p21</i> Expression	Tumorgewebe n=22	
	n	%
0,01 - 0,22	9	41
0,22 - 0,4	7	32
> 0,4	6	27

3.4.2.3. Korrelation zwischen *BRCA1* und *p21* Expression

Bei einem Vergleich der Expression der beiden Gene *BRCA1* und *p21* in 57 sporadischen Mammakarzinomen zeigt sich eine statistisch signifikante, direkte Korrelation ($p = 0,008$; bestimmt nach Kendall-Tau-b und Spearman-Rho). Dieses Ergebnis untermauert die Aussage bzgl. einer *BRCA1*-abhängigen *p21* Expression.

Der Vergleich der Expression der beiden Gene *BRCA1* und *p21* in 26 Ovarialkarzinomen ergibt jedoch keine statistisch signifikante Korrelation ($p = 0,1$; nach Kendall-Tau-b und Spearman-Rho). Der Grund hierfür liegt ggf. in der geringen Anzahl der untersuchten Ovarialkarzinome.

3.4.3. Klonierung des *BRCA1* Promotors aus Tumoren unterschiedlicher *BRCA1* Expression

Die reduzierte *BRCA1* Expression kann in sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen nicht auf Mutationen des Gens zurückgeführt werden. Es stellt sich daher die Frage, ob die Ursache für eine verringerte Expression in einer veränderten Aktivität des Promotors liegt. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wird ein Teil des *BRCA1* Promotors aus DNA von Tumoren unterschiedlicher Expression amplifiziert und in den Expressionsvektor pGL2basic kloniert. Durch den Einsatz dieses Vektorsystems kann man die Aktivität des Promotors in einem Luziferase-Assay bestimmen.

Zur Analyse des *BRCA1* Promotors α wird ein 1302 bp großes Promotor Fragment mittels PCR amplifiziert (Barker et al, 1996). Dieses PCR Fragment umfaßt die Positionen 2217-3519 der von Xu et al. (1995) beschriebenen Sequenz (U37574) und beginnt 1127 bp upstream des ersten *BRCA1* Exons. In diesem Fragment ist auch die von Xu et al. 1997 beschriebene "Ap1 Site" enthalten. Der 5'-Primer enthält zusätzlich zu der *BRCA1*-homologen Sequenz eine KpnI-Schnittstelle; der 3'-Primer eine BGLII-Schnittstelle. Dies ermöglicht eine Klonierung des PCR Produkts in die MCS des Expressionsvektors pGL2-basic vor dem Luziferase Gen. Die Promotoren werden aus der DNA der Tumorgewebe 38T und 262T amplifiziert. Sie zeigen jeweils stark voneinander abweichende *BRCA1* Expression 1,26 bzw. 0,02. Die erhaltenen Vektorkonstrukte werden mittels FuGENE™6 (Boehringer Mannheim) in die Mammakarzinom Zelllinie SKBR3 transfiziert. Um einen möglichen Einfluß von Östradiol zu überprüfen, wird in einem 2. Versuchsansatz ein Vektor mit ER α kotransfiziert.

Die Abb. 3.32 stellt die Ergebnisse des Luziferase-Assays dar. Die beiden untersuchten Promotoren zeigen keinen Unterschied bzgl. ihrer Aktivität. Die Kotransfektion von ER α bewirkt in beiden Fällen einen leichten Anstieg der Aktivität.

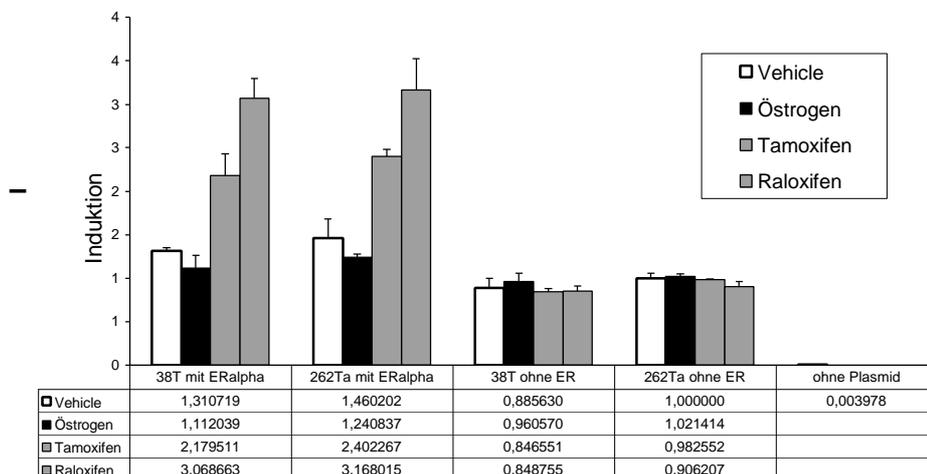


Abb 3.32: Ergebnisse des Luziferase Assay. Die beiden untersuchten Promotoren 38T und 262T zeigen keinen Unterschied bzgl. ihrer Aktivität. Die Kotransfektion von ER α bewirkt in beiden Fällen einen leichten Anstieg der Aktivität.

3.4.4. Allelspezifische Expression von *BRCA1*

In einem weiteren Versuch soll untersucht werden, ob eine allelspezifische Expression der beiden *BRCA1* Allele (Wildtypallel A1 und Allel mit Polymorphismus A2) als Regulationsmechanismus für die *BRCA1* Expression in Frage kommt. Die Analyse von ca. 80 Familien auf *BRCA1* Mutationen mittels Sequenzierung zeigte, daß im *BRCA1* Gen 9 verschiedene Polymorphismen, die sich über einen Bereich von Exon 11 bis Exon 16 erstrecken, immer im Cluster auftreten. Tritt ein Polymorphismus bei einer Patientin homozygot bzw. heterozygot auf, so trifft dies auch für alle anderen Polymorphismen des Clusters zu (siehe Abschnitt 3.2.4). Durch RFLP (restriction fragment length polymorphism)-Analyse kann die Allelverteilung mittels einer dieser Polymorphismen (T4427C) untersucht werden. Das Prinzip der RFLP-Analyse ist in Abb. 3.33 dargestellt. Der hier untersuchte Polymorphismus liegt in Exon 13 des *BRCA1* Gens. Im Wildtyp Allel (A2) ist dieser Polymorphismus Teil einer Restriktionschnittstelle für das Enzym *EcoRI*. Nach PCR-Amplifikation und anschließendem Restriktionsverdau mit *EcoRI* kann man nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5%-igen Agarosegel die beiden Produkte nachweisen. Die Sequenz mit dem Polymorphismus (A2) kann durch das Enzym *EcoRI* nicht mehr erkannt werden. Aus dem erhaltenen Bandenmuster ergibt sich der Allelotyp.

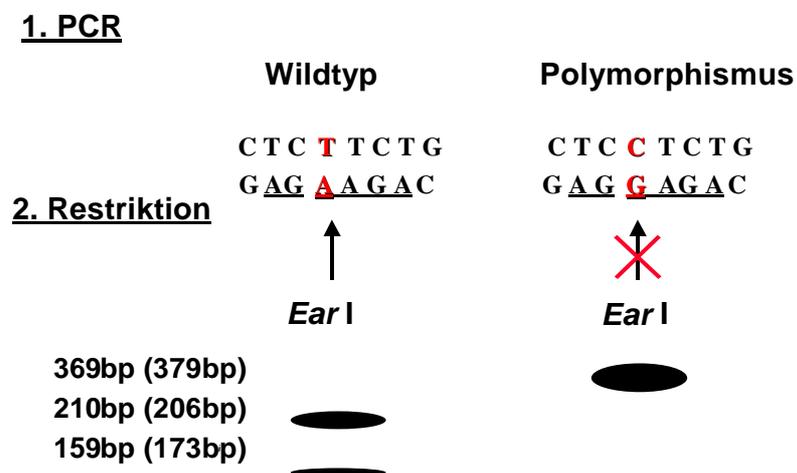


Abb.3.33: Modell der SNP (single nucleotide polymorphism) Analyse. Das Fragment der Wildtypsequenz A1 (369 bp Fragment für DNA- und 379bp Fragment für cDNA- Untersuchung) kann mittels des Restriktionsenzym *EcoRI* in zwei Fragmente geschnitten werden (210 bp und 159 bp für DNA sowie 206 bp und 173 bp für cDNA); das Fragment des Allels mit dem Polymorphismus A2 kann nicht von *EcoRI* erkannt werden. Daraus resultieren unterschiedliche Bandenmuster für die unterschiedlichen Allelotypen A1/A1, A1/A2 und A2/A2 nach elektrophoretischer Auftrennung.

3.4.4.1. Verteilung der Allelotypen in sporadischen Mammakarzinomen und einem Kontrollkollektiv

Zur Bestimmung der Allelotypen werden 98 Mammakarzinompatientinnen mittels der in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen RFLP Analyse untersucht. Des weiteren wird ein Kontrollkollektiv, bestehend aus 60 gesunden Frauen ohne familiäre Prädisposition für Mamma- und Ovarialkarzinome in einem Alter über 50 Jahren analysiert. Aus Blut-DNA wird das 369 bp große Fragment von Exon 13 amplifiziert. Nach PCR Amplifikation und vollständigem Restriktionsverdau mit *EarI* läßt sich der Allelotyp nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel aus dem erhaltenen Bandenmuster bestimmen (siehe Abb. 3.33). Die Analyse der Brustkrebspatientinnen und des Kontrollkollektivs ergibt folgende Allelotypverteilung: Das Allel A2 tritt bei den Brustkrebspatientinnen deutlich häufiger auf (40%) als im Kontrollkollektiv (29%) (siehe Tab. 3.13). Stellt man das Vorkommen des homozygoten Wildtypallels A1/A1 dem Vorkommen der heterozygoten Allelverteilung A1/A2 und des homozygoten Allels mit Polymorphismus A2/A2 gegenüber, so läßt sich eine statistische Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Allels A2 in Mammakarzinompatientinnen von $p = 0,06$ berechnen.

Tab. 3.13: Allelotypisierung von Mammakarzinompatientinnen. Das Auftreten der beiden *BRCA1* Allele A1 (WT) und A2 (P) wird bei 98 Mammakarzinompatientinnen bestimmt. Zum Vergleich wird ein Kontrollkollektiv von 60 gesunden Frauen analysiert. Das *BRCA2* Allel A2 wird mit größerer Frequenz bei den Mammakarzinompatientinnen (40%) als in der Kontrollgruppe (29%) gefunden.

<i>BRCA1</i> Allele A1 (WT) und A2 (p)	Mammakarzinompat. n=98		Kontrollkollektiv n=60	
	n	%	n	%
A1 / A1	35	36	31	52
A1 / A2	48	49	23	38
A2 / A2	15	15	6	10

3.4.4.2. RFLP-Analyse von cDNA von sporadischen Mammakarzinomen und Normalgewebe

Zur Analyse der allelspezifischen Expression des *BRCA1* Gens wird mittels RFLP Analyse die Allelverteilung der Allele A1 (Wildtypallel) und A2 (Allel mit Polymorphismus) in der cDNA von Normal- und Tumorgewebe der gleichen Patientin untersucht. Dazu wird ein 379 bp großes Fragment amplifiziert. Die Primersequenzen liegen flankierend zum Exons 13 in Exon 12 und Exon 14. Bei Amplifikation der Wildtypsequenz erhält man nach Restriktion mit *EarI* die Restriktionsprodukte der Größe 206 bp und 173 bp. Insgesamt stehen für diese Untersuchung Gewebeproben von 150 Patienten mit sporadischem Mammakarzinom zur Verfügung. Diese werden nach folgenden Kriterien für die Analyse ausgewählt: Zunächst untersucht man anhand der DNA Proben dieser Patienten, ob diese homozygot oder heterozygot sind. Die Analyse ergibt folgende Allelverteilung. 54 Patienten sind heterozygot, 48 homozygot WT und 25 homozygot für das Allel mit dem Polymorphismus. Bei den übrigen Patienten ist eine eindeutige Bestimmung des Allelotyps nicht möglich.

Die für dieses Allel heterozygoten Patienten werden in zwei Gruppen unterteilt: mit und ohne LOH *BRCA1*. Die LOH-Analyse wurde zuvor mittels der drei intragenischen Marker des *BRCA1* Gens (siehe 3.4.1.1) durchgeführt. Bei heterozygoten Patienten ohne LOH soll die allelspezifische Expression von A1 und A2 untersucht werden. Bei heterozygoten Patienten mit LOH soll untersucht werden, ob ein bestimmtes Allel A1 oder A2 häufiger vom LOH betroffen ist. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tab 3.14 und 3.15 zusammengefaßt. Die Zahl der analysierten Proben ist stark reduziert, weil nicht von allen Patienten des ursprünglichen Probenkollektivs cDNA von Normal- und Tumorgewebe zur Verfügung steht. Es zeigt sich, daß von 22 heterozygoten Patienten ohne LOH 7 Patienten im Normalgewebe das Wildtypallel oder beide Allele exprimieren, im Tumorgewebe aber nur noch das Allel mit dem Polymorphismus. 9 Patienten exprimieren im Normalgewebe das Wildtypallel oder beide Allele und zeigen im Tumorgewebe das heterozygote Expressionsmuster, wobei das Signal des Allels A2 deutlich stärker ist als die Signale des Wildtypallels A1. Sechs Patienten zeigen sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe ein heterozygotes Expressionsmuster. Um auszuschließen, daß das Signal von Allel A2 im Tumormaterial auf unvollständige Restriktion zurückzuführen ist, wurde dieses Ergebnis durch Sequenzierung einiger cDNA-Proben exemplarisch bestätigt. Es handelt sich bei dem Tumormaterial nicht um mikrodisektiertes Material, d. h. es enthält unterschiedlich große Mengen an Normalgewebe. So kann erklärt werden, warum im Tumormaterial neben dem Signal des Allels A2 auch das Signal des

Wildtypallels A1 mehr oder weniger stark nachgewiesen werden kann. Auffallend ist, daß keine Patientin im Normalgewebe nur das Allel mit dem Polymorphismus bzw. im Tumorgewebe nur das Wildtypallel exprimiert (siehe Tab. 3.14).

Die Untersuchung der heterozygoten Patienten mit LOH zeigt in sechs Fällen den Verlust des Wildtypallels im Tumorgewebe und nur in einem Fall den Verlust des Allels mit dem Polymorphismus. In drei Fällen ist im Tumorgewebe trotz LOH *BRCA1* die Expression beider Allele nachweisbar (siehe Tab. 3.15). Dies kann ebenfalls auf einen Anteil von Normalgewebe im Tumormaterial zurückzuführen sein. Die LOH Daten dieser Proben von 0,4-0,5 deuten auf eine Heterogenität des Tumormaterials in Höhe von 40-50% hin.

Diese Untersuchungsergebnisse geben einen Hinweis auf einen möglichen prädisponierenden Effekt der Expression des Allels mit dem Polymorphismus in sporadischen Mammakarzinomen.

Tab. 3.14 RFLP-Analyse von cDNA (Mammakarzinom und Normalgewebe) von 22 heterozygoten Patientinnen ohne LOH

Karzinome ohne LOH <i>BRCA1</i>	Expression in normaler cDNA	Expression in Tumor cDNA
7	nur A1 oder A1/A2	nur A2
9	nur A1 oder A1/A2	überwiegend A2
6	A1 /A2	A1 /A2

Tab. 3.14 RFLP-Analyse von cDNA (Mammakarzinom und Normalgewebe) von 10 heterozygoten Patientinnen mit LOH

Karzinome mit LOH <i>BRCA1</i>	Expression in normaler cDNA	Expression in Tumor cDNA
6	A1 /A2	A2
1	A1 /A2	A1
3	A1 /A2	A1 /A2

4. DISKUSSION

In Deutschland beträgt das Risiko einer Frau, an einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom zu erkranken, etwa 10-12%. Etwa jede 10. Frau erkrankt in ihrem Leben an einem Mammakarzinom. Dabei liegt in 25% der Fälle ein familiärer Hintergrund vor, während 75% der Patienten an einem sporadischen Mammakarzinom erkranken. Bei der Entstehung des familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinoms konnte eine ursächliche Beteiligung der Brustkrebsgene *BRCA1* und *BRCA2* eindeutig nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser beiden Gene für die Entstehung sporadischer Karzinome ist dagegen nach wie vor unklar.

4.1. Das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinom

Derzeit sind fünf Gene (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN* und *ATM*) bekannt, bei denen es sich ohne Zweifel um für Mammakarzinome prädisponierende Gene handelt und die etwa 20-25% aller familiär gehäuft auftretenden Brustkrebserkrankungen erklären (Easton et al., 1999): Keimbahnmutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* sind die häufigsten.

Seit 1994 wird in der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf eine interdisziplinäre Beratung in einer Tumorrisikosprechstunde (gynäkologische Onkologie, Humangenetik, Psychotherapie und Molekulargenetik) für Hochrisikofamilien mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinomerkran- kungen angeboten. Seit Dezember 1996 wird das Düsseldorfer Zentrum als eines von zwölf Zentren in Deutschland von der deutschen Krebshilfe gefördert (Beckmann et al., 1997a und 1998; Kuschel et al., 2000). Schwerpunkt der Forschungsaktivität ist die genetische Analyse der Brustkrebsgene *BRCA1* und *BRCA2* in Familien mit hereditären Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen.

4.1.1. Präventive Gendiagnostik für *BRCA1* und *BRCA2*

Die präventive Gendiagnostik eröffnet neue Perspektiven in der modernen Medizin. Durch eine Genanalyse kann eine Aussage bzgl. des Erkrankungsrisikos getroffen werden. Die prä- ventive Gendiagnostik beinhaltet Vor- und Nachteile für den Patienten, die vor der Analyse gegeneinander abgewogen werden müssen. Daher ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit von gynäkologischer Onkologie, Humangenetik, Psychotherapie und Molekulargenetik sehr wichtig. Vor allem die direkten emotional – psychischen Probleme der Ratsuchenden und ihrer Familien müssen berücksichtigt werden. Die Analyse wird bei Ratsuchenden durchge-

führt, die die möglichen Auswirkungen der Erkrankung bereits aus dem nächsten Familienkreis kennen. Durch psychotherapeutische Beratung gilt es zu erkennen, ob die Erleichterung bei einem negativen Ergebnis die Erhöhung der Angst nach einem positiven Testergebnis aufwiegt. Im Falle eines positiven Ergebnisses wird aus der unbestimmten Furcht eine konkrete Angst. Die Ratsuchende hat Sorge um nicht getestete Nachkommen und entwickelt unter Umständen Schuldgefühle gegenüber betroffenen Familienangehörigen. Auch gesellschaftliche Auswirkungen sind nicht auszuschließen: Einstellungsverweigerungen im Berufsleben oder die Verweigerung von Versicherungsleistungen können die Folge eines positiven Gentests sein. Eine intensive psychologische Betreuung der Ratsuchenden und ihrer Familie ist daher wichtig. In Schweizer Arbeitsgruppen gibt es besonders ausgebildete Berater ("Family Study Professionals"), die sich um die Erhebung und Ergänzung von Familienanamnesen und um die Kontakte zu den betroffenen Familienangehörigen bemühen. In einigen europäischen Ländern (z. B. Großbritannien) werden spezielle "genetic nurses" - ausgebildete Krankenschwestern bzw. Sozialarbeiter – für die Langzeitbetreuung dieser Familien eingesetzt (Kuschel et al., 2000).

Der Ausschluß einer Mutation kann zur Beruhigung von Ratsuchenden bei zufälligem Auftreten von mehreren spontanen, nicht auf einer genetischen Veränderung beruhenden Karzinomen beitragen. Der Ausschluß einer Mutation bei einer Person mit einem solchen familiär nachgewiesenen Gendefekt kann ebenfalls eine erhebliche psychische Entlastung bewirken. Der Nachweis einer Mutation bedeutet für die Betroffenen eine verbesserte Prognose durch ein individuelles Betreuungs- und Früherkennungsprogramm. Präventive medikamentöse (Einsatz chemopräventiver Agenzien wie z. B. Tamoxifen oder Raloxifen) und ggf. chirurgische Maßnahmen (prophylaktische Mastektomie) können angeboten werden (Kuschel et al., 2000).

Grundsätzlich gilt, daß keine molekulare Untersuchung ohne ausreichende und regelgerechte Beratung oder Information durchgeführt wird. Die Ratsuchende soll zwischen alternativen Handlungsmöglichkeiten entscheiden können. Daher sollte die präventive Diagnostik auf erbliches Mamma- und/oder Ovarialkarzinom in nächster Zeit ausschließlich in Zentren in Form einer kontrollierten Studie unter Einschluß umfassender Beratungsangebote durchgeführt werden (Beckmann et al., 1997).

Auf wissenschaftlicher Ebene können durch den Gentest neue Erkenntnisse über genetische Veränderungen gewonnen und neue Analyseverfahren evaluiert werden. Eine Schwierigkeit

des Gentests liegt für den Molekulargenetiker in der Befund-Interpretation des genetischen Analyseergebnisses.

Ein positiver Befund ermöglicht eine relativ sichere Einschätzung des Erkrankungsrisikos. Im Falle eines positiven Befundes stellt sich jedoch die Frage nach der Penetranz der nachgewiesenen genetischen Veränderung. So werden Polymorphismen nicht als Ursache für die Entstehung eines Mammakarzinoms angesehen. Nicht geklärt ist derzeit die Bedeutung von Missense Mutationen mit unbekannter Funktion, sog. "unclassified variants" (UVs). Bei den in Düsseldorf untersuchten Familien konnten drei Missense Mutationen im *BRCA2* Gen nachgewiesen werden, die als UVs klassifiziert werden müssen. Im gesamten Konsortium wurden 17 verschiedene *BRCA1* UVs (siehe Tabelle 10.7) und 24 verschiedene *BRCA2* UVs (siehe Tabelle 3.4) gefunden. Bei der Frage nach der Bedeutung dieser UVs ist eine sichere Abgrenzung zwischen Polymorphismus und UV erforderlich. Diese wird über die Häufigkeit der genetischen Veränderung in einem Kontrollkollektiv definiert. Ein UV tritt mit einer Frequenz von unter 1% auf. Liegt die Frequenz über 1%, so werden die Missense Mutationen als Polymorphismen klassifiziert. Um diese Abgrenzung für die UVs treffen zu können, wurde eine Kontrollgruppe von jeweils 200 gesunden Frauen im Alter über 55 Jahren, ohne familiäre Prädisposition für Krebserkrankungen auf alle UVs in den *BRCA1* und *BRCA2* Genen untersucht. Mit einer Ausnahme (C5214T) konnten alle *BRCA1* UVs nur einmal in den über 500 analysierten Familien und der Kontrollgruppe gefunden werden. Sieben dieser UVs sind keinmal, vier sind einmal und sechs sind zweimal oder häufiger in der Datenbank der BIC (Breast Cancer Information Core) aufgeführt. Die in *BRCA2* gefundenen UVs konnten zum Teil (G4486T, G8410A und G9079A) in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Sieben *BRCA2* UVs sind in der internationalen Datenbank BIC häufig (>10) aufgeführt. Basierend auf den Untersuchungen dieser Arbeit sowie auf den Untersuchungen anderer Gruppen (Wagner et al., 1999), sind drei Missense Mutationen (G4486T, G8410A und G9079A) auf Grund ihrer Frequenzen als Polymorphismen einzustufen und daher bei der Interpretation des Analyseergebnisses entsprechend zu berücksichtigen.

Im Gegensatz zu einem positiven Analyseergebnis ist die Befundinterpretation eines negativen Analyseergebnisses schwierig. Zunächst ist die Sensitivität und die Spezifität der angewandten Analysemethode zu beurteilen. Des Weiteren stellt sich die Frage nach dem Einfluß von zusätzlichen endogenen Faktoren oder zusätzlichen Genen, die die Karzinomentstehung fördern (Beckmann et al., 1997b).

Im folgenden wird zunächst eine Einschätzung der möglichen Analysemethoden vorgenommen. Die Spezifität einer Methode ist nicht nur von der Art der Methode, sondern auch von ihrem Anwender abhängig. Je größer die Erfahrung des Anwenders bzgl. einer Methode ist, desto höher ist die Spezifität, die er mit dieser Methode erzielen kann. Voneinander abweichende Angaben in der Literatur bzgl. der Spezifität der Methoden lassen sich u. a. auf die unterschiedlich großen Erfahrungen der Anwender beim Einsatz der Methoden zurückführen. Darüber hinaus kann eine Optimierung der Analysebedingungen für das zu analysierende Gen die Spezifität der Methode bei jedem konkreten Fall erhöhen.

Die direkte DNA Sequenzierung gilt als der „Goldstandard“ in der Mutationsanalyse. Mit einer Sensitivität von über 98% gilt sie als die sicherste Methode zum Nachweis von Mutationen. Die Sequenzierung ist die einzige Methode, die eine Charakterisierung der Mutation bzgl. ihrer Art und Position zulässt. Es können alle bekannten Mutationen (Punkt-, Frameshift- und Nonsensemutationen) sowohl homo- als auch heterozygot nachgewiesen werden. Voraussetzung für die Sicherheit dieser Methode in der Diagnostik ist eine Automatisierung. Neben einer Reduktion von Arbeits- und Zeitaufwand können durch die Automatisierung manuelle Fehlermöglichkeiten eingeschränkt werden. Die Reproduzierbarkeit wird erhöht und es wird eine optimale Dokumentation des Arbeitsablaufs und des Analyseergebnisses gewährleistet. Die vollständige Doppelstrangsequenzierung ist trotz der Automatisierung zeitaufwendig und labor- und kostenintensiv. Dies gilt besonders für die Analyse sehr großer Gene, wie z. B. *BRCA1* und *BRCA2*, mit uniformer Mutationsverteilung über das gesamte Gen. Aufgrund der hier dargestellten Nachteile wird im nächsten Abschnitt die Durchführung verschiedener Vor-screeningmethoden als Ergänzung zur direkten Sequenzierung diskutiert.

Durch den PTT („protein truncation test“) können nur Frameshift- oder Nonsensemutationen nachgewiesen werden, die ein verkürztes Protein zur Folge haben. 80% der bisher beschriebenen *BRCA1/2*-Mutationen sind Frameshift- oder Nonsensemutationen. Damit liegt die Sensitivität des PTT für die Analyse dieser beiden Gene bei 80%. Es können etwa 1-1,5 kb große DNA Abschnitte analysiert werden. *BRCA1* und *BRCA2* enthalten eine große Anzahl kleinerer Exons. Der PTT ist daher nur für die Analyse der großen Exons 10 und 11 sinnvoll (Niederacher et al., 1999).

Für die SSCP („single strand conformation polymorphism“)-Analyse wird eine Sensitivität zwischen 60 und 80-90% (Niederacher et al., 1999) angegeben. Unter optimalen Analysebe-

dingungen kann für die Analyse des *BRCA1* Gens eine Sensitivität von 94% erzielt werden. (Gross et al., 1999).

Die EMD ("enzymatic mutation detection")-Analyse scheint eine der Sequenzierung ähnliche Sensitivität zu haben, sie ist jedoch für die *BRCA1/2*- Analyse noch nicht ausreichend validiert. Ein Nachteil dieser Methode liegt in hohen falsch Positivraten und hohen Kosten für die Analyse (Wagner et al., 1999).

Eine erst kürzlich entwickelte Methode zur Mutationsdetektion ist die DHPLC ("denaturing high-performance liquid chromatography")-Analyse. Im Gegensatz zu den anderen Vorscreeningmethoden ist bei ihrer Durchführung eine Automatisierung möglich. Das zeitaufwendige Gießen und Beladen herkömmlicher Gelsysteme entfällt und es wird eine hohe Trennleistung bei sehr kurzer Analysezeit (15 min/Probe) gewährleistet (Wagner et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DHPLC für die Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* so optimiert, daß eine Sensitivität von 98% erzielt wurde. Damit ist die Sensitivität dieser Methode mit der direkten DNA Sequenzierung vergleichbar. Diese hohe Sensitivität der DHPLC in der Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* konnte auch durch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden (Wagner et al., 1999; Arnold et al., 1999; Gross et al., 2000). Zur Verifizierung der gefundenen Mutationen muß das analysierte Fragment sequenziert werden. Die zu analysierenden Fragmente sollten daher nicht größer als 600-800 bp groß sein (je nach Sequencer). Außerdem konnte gezeigt werden, daß das Analyseergebnis wesentlich von der in der PCR eingesetzten Taq-Polymerase abhängt. Der Einsatz einer Taq-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität ist erforderlich (siehe Abschnitt 3.1.2.1.1). Durch die Automatisierung erfüllt die DHPLC Analyse wie die Sequenzierung die Anforderungen einer diagnostischen Methode bzgl. Minimierung manueller Fehlermöglichkeiten, Reproduzierbarkeit und Dokumentationsmöglichkeit bei gleichzeitig hohem Probendurchsatz (siehe Abschnitt 3.1.2.1.3). Es konnte im Rahmen der Etablierung der DHPLC mit Hilfe der Positivkontrollen gezeigt werden, daß auch die Wahl der geeigneten Analyse-Temperatur die Sensitivität der Methode beeinflusst. Nicht jede Mutation ist über ein größeres Temperaturintervall nachzuweisen und so sollten vor allem für Fragmente mit unterschiedlichen Schmelzdomänen mehrere Analysetemperaturen festgelegt werden (siehe Abschnitt 3.1.2.2.2). Da der Ofen Abweichungen zwischen Soll- und Ist-Temperatur aufweist, ist es erforderlich, vor jeder Analyse die optimalen Bedingungen in einem Vorlauf durch Analyse der Positivkontrollen zu überprüfen (siehe Abschnitt 3.1.2.3.3). In Fragmenten mit unterschiedlichen Schmelzdomänen können Mutationen in "high-melting domains" mit der DHPLC mit höherer Sensitivität

nachgewiesen werden als mit der TGGE, einer weiteren Heteroduplex-Analyse-Methode (siehe Abschnitt 3.1.2.3.6.1). Durch den Einsatz psoralenmodifizierter Primer (siehe Abschnitt 3.1.2.3.6.2) kann der Nachweis von Mutationen in "high-melting domains" noch verbessert werden. Da jedoch noch nicht geklärt ist, ob Psoralen, das mit der Säulenmatrix Wechselwirkungen eingeht, die Kapazität der Säulenmatrix beeinflusst, kann in der PCR alternativ auf Einsatz von Primern mit G-C-Klammern oder 7-deaza-2'-dGTP an Stelle von dGTP zur Stabilisierung der Fragmente (Hayward-Lester et al., 1997) zurückgegriffen werden. Der Nachweis von Mutationen in Fragmenten mit bekannten Polymorphismen durch Sequenzierung ist wegen der Häufigkeit der Polymorphismen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* sehr arbeitsaufwendig. Durch Entwicklung einer Strategie, die eine Interpretation des Elutionsprofils hinsichtlich Polymorphismus oder Mutation zulässt (siehe Abschnitt 3.1 2.4), kann auf eine Sequenzierung der Fragmente bei Vorliegen eines Polymorphismus verzichtet werden. Die Etablierung der DHPLC für die Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* hat gezeigt, wie stark die Sensitivität von der Optimierung der Analysebedingungen und der Kontrolle der etablierten Bedingungen abhängt. Durch zusätzliche Optimierungsschritte (z. B. Einsatz psoralengekoppelter Primer) kann die Sensitivität weiter erhöht werden. Für die Analyse von *BRCA1* und *BRCA2* hat sich die DHPLC durch ihre hohe Sensitivität und den geringen Arbeitsaufwand klar gegen die anderen Vorscreeningmethoden durchgesetzt.

Auch für die Mutationsdetektion in sporadischen Karzinomen (zur p53 Mutationsanalyse vgl. Abschnitt 3.3) zeichnet sich die DHPLC durch ihre hohe Sensitivität aus. Tumormaterial hat im Gegensatz zu Blut als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung den Nachteil, daß es heterogen bezüglich der Tumorzellen mit und ohne Mutation bzw. Allelverlust ist. Wird keine Mikrodissektion durchgeführt, die ihrerseits sehr zeitaufwendig ist, so enthält Tumormaterial zusätzlich unterschiedliche Mengen an Normalgewebe. Das Verhältnis von Wildtyp-Allel und mutiertem Allel verschiebt sich dann zu Ungunsten des mutierten Allels. Mischexperimente mit Wildtyp- und mutierter DNA zeigten, daß selbst bei einem Anteil von nur 10% mutierter DNA (das entspricht einem Anteil des mutierten Allels von 5%) ein Heteroduplexsignal nachgewiesen werden kann. Bei der Analyse sporadischer Mammakarzinome auf p53 Mutationen wurden Karzinome mit unterschiedlichen LOH-Werten für p53 mit und ohne Zugabe von Wildtyp-DNA untersucht. Erwartungsgemäß zeigten Karzinome mit nahezu vollständigem Allelverlust (80%) bei Zugabe von Wildtyp-DNA ein ausgeprägteres Heteroduplexsignal, während in Karzinomen mit geringerem Allelverlust (50%) und damit hohem Anteil des Wildtyp Allels durch Zugabe weiterer Wildtyp-DNA das Heteroduplexsignal abgeschwächt wurde. Es konnte jedoch in allen Fällen unabhängig von LOH oder Zugabe der Wildtyp-DNA ein Hete-

roduplexsignal nachgewiesen werden, wodurch die Sensitivität der Methode bestätigt wird. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, daß eine vorherige Abschätzung des Anteils des mutierten Allels durch LOH Analyse vorteilhaft sein kann. Bei der Verifizierung der entdeckten Mutationen durch die direkte DNA Sequenzierung zeigte sich die Heterogenität des Materials als Nachteil. Liegt der Anteil der mutierten DNA bei 50% oder höher, entspricht das Sequenziersignal dem Signal einer heterozygoten oder im Falle eines 100%igen LOHs dem einer homozygoten Mutation. In diesen Fällen kann die Mutation problemlos nachgewiesen werden. Bei einem LOH des Tumormaterials über 0,4 steigt der Anteil des Wildtyp Allels an (> 57%). Dies erschwert die Detektion der Mutation mittels direkter DNA Sequenzierung, da das Signal der Mutation von Hintergrundsignalen nur schwer oder gar nicht zu unterscheiden ist. In solchen Fällen hat sich die DHPLC als wesentlich sensitiver erwiesen als die Sequenzierung. Fraglich ist, wie eine Verifizierung des positiven DHPLC Signals erzielt werden kann. Eine Möglichkeit, die jedoch sehr zeitaufwendig und daher in routinemäßigen Einsätzen eher ungeeignet ist, ist die Klonierung der DNA und die anschließende Sequenzierung einzelner Klone. Dabei muß jedoch ausgeschlossen werden, daß PCR-bedingt (z.B. durch Einsatz einer Taq ohne Proof-Reading Funktion) zu viele Klone Mutationen aufweisen. Ein positiver DHPLC Befund kann auch durch Einsatz einer zweiten Methode, wie z. B. EMD bestätigt werden. Rückschlüsse auf Art und die Position der Mutation können so jedoch nicht gezogen werden. Trotz dieses Nachteils der Verifizierung des Analyseergebnisses hat sich die DHPLC als eine sichere Methode erwiesen, um ein großes Probenkollektiv in kurzer Zeit auf Mutationen zu untersuchen.

Trotz der hohen Sensitivität der eingesetzten Methoden ist die Interpretation eines negativen Analyseergebnisses in der Diagnostik schwierig. Es muß berücksichtigt werden, daß bestimmte Mutationen mittels der herkömmlichen Analysemethoden nicht detektiert werden können. Dies gilt vor allem für Mutationen, die zu einer Duplikation bzw. Deletion eines ganzen Exons führen. Im *BRCA1* Gen sind bisher drei solcher Veränderungen als niederländische Foundermutationen beschrieben (Petrij-Bosch et al., 1997). In den bekannten Fällen sind ganze Exonbereiche des *BRCA1* Gens deletiert. Diese Foundermutationen, dazu gehören die 510bp Deletion des Exons 22, die 3835bp Deletion des Exons 13, sowie eine 14kb Deletion, die die Exons 13-16 betrifft, bilden 36% der in den Niederlanden gefundenen *BRCA1* Mutationen. Eine weitere genetische Veränderung, die durch Sequenzierung nicht detektiert werden kann, ist die Duplikation von Exon 13. Es handelt sich dabei um eine ins6kbEx13 Mutation, die zunächst in drei US-Familien europäischer Abstammung, sowie in einer portugisischen Familie entdeckt wurde (Puget et al., 1999b). Die Mutation kann nur

durch ein auf PCR basierendem Mutationsscreening durch die Wahl geeigneter Primer nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.2.5). Die Untersuchungsergebnisse einer internationalen Studie unter der Leitung von S. Mazoyer (Université Claude Bernard, Lyon, France) legten einen gemeinsamen Ursprung für die Entstehung dieser genetischen Veränderung nahe. Mit Ausnahme einer Familie konnten alle Familien auf einen britischen Ursprung zurückgeführt werden, bzw. auf ein Land, daß geschichtliche Verbindungen zu Großbritannien hatte. Dies legt den Schluß nahe, daß es sich bei der Exon 13 Duplikation um eine Founder Mutation britischen Ursprungs handelt. (The *BRCA1* Exon 13 Duplication Screening Group, 2000).

Diese Untersuchung verdeutlicht, daß im Rahmen der routinemäßigen *BRCA1* und *BRCA2* Analyse zu beachten ist, daß bestimmte Mutationen nicht durch herkömmliche Methoden (Sequenzierung oder Vorscreening-Methoden) nachzuweisen sind. Es stellt sich die Frage, ob diese Mutationen nicht im Rahmen einer zusätzlichen Analyse überprüft werden sollten. Wird bei der Beratung festgestellt, daß die Patientin aus einem Land mit bereits bekannter Founder Mutationen stammt, ist diese Analyse empfehlenswert. Im Düsseldorfer Zentrum bietet sich die Analyse holländischer Founder Mutationen aufgrund der grenznahen Lage an, denn die Frequenz dieser Foundermutationen beläuft sich in der holländischen Population auf 36%. Eine dieser Mutationen (510bp Deletion des Exons22) wurde bei einer im Düsseldorfer Zentrum analysierten Familie nachgewiesen.

Für die Interpretation eines negativen Analyseergebnisses steht darüber hinaus außer Frage, daß noch weitere Gene für die Entstehung des hereditären Mammakarzinoms verantwortlich sind. Findet man bei einer Patientin keine Mutation in den Genen *BRCA1* und *BRCA2*, kann dennoch eine erbliche Veranlagung für das Mammakarzinom nicht ausgeschlossen werden.

Die präventive Gendiagnostik ist - durch die hohe Sorgfalt, mit der die Analyse durchzuführen ist- sehr zeitaufwendig. Die lange Wartezeit auf ein Analyseergebnis kann die psychische Situation der Ratsuchenden verschlechtern. In Hochrisikofamilien kann es in der Zeit zwischen Beratung und Analyseergebnis zum Ausbruch der Krankheit kommen. In diesen Fällen kann eine 2-Stufen Analyse durchgeführt werden. Datenbankanalysen haben ergeben, daß durch die Analyse bestimmter Fragmente bereits 65% aller *BRCA1* bzw. 68% aller *BRCA2* Mutationen, die in der German BIC beschrieben sind detektiert werden (siehe Abschnitt 3.1.2.5). Im Falle eines positiven Befundes kann auf diese Weise die Dauer der Analyse verkürzt werden. Im Falle eines negativen Befundes sagt dieser jedoch nichts über das Erkrankungsrisiko aus. Die Analyse der restlichen Fragmente muß folgen. Die Entwick-

lung der automatisierten Analysestrategie für *BRCA1* und *BRCA2* spricht gegen eine 2-Stufen Analytik. Besonders beim Einsatz der DHPLC wurde eine Strategie entwickelt, in die alle zu analysierenden Fragmente der beiden Gene einbezogen wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Analysebedingungen der Fragmente (verschiedene PCR Bedingungen) ist es nachteilig, einige Fragmente aus der Gesamtanalyse herauszunehmen und im Vorfeld zu analysieren. Das Angebot kommerziell durchgeführter Gentests bedient sich dieser Strategie. Die Entwicklung eines allgemein einsetzbaren Tests wird derzeit von mehreren amerikanischen Firmen betrieben. Der Test ist auch in den USA derzeit noch nicht erhältlich und bezüglich seines Einsatzes und der Möglichkeit des kommerziellen Mißbrauchs sehr umstritten (Beckmann et al., 1997a). In Deutschland wird die Testung auf *BRCA1* und *BRCA2* Mutationen derzeit von verschiedenen Analyselaboren angeboten (z. B. vom Institut für Medizinische Molekular Diagnostik (IMMD), Berlin). Diese wecken jedoch oft falsche Hoffnungen bezüglich der Genauigkeit der Analyse und der Befundung. IMMD bietet eine 2-Stufen Analytik an. In der ersten Phase können nur 50% der beschriebenen Mutationen nachgewiesen werden. Im Falle eines negativen Ergebnisses kann keine Aussage bzgl. des Erkrankungsrisikos getroffen werden. Trotzdem wird in diesem Fall die zweite Stufe des Tests nur dann durchgeführt, wenn diese unter Berücksichtigung des familiären Risikos und/oder einer klinischen Anamnese erforderlich scheint. Ist dies nicht der Fall, gilt der Befund der Phase 1 als Endbefund und das Erkrankungsrisiko wird mit dem der Normalbevölkerung gleichgesetzt. Auch die angegebene Sensitivität der CSGE ("conformation sensitiv gel electrophoresis") von 97% ist zu hinterfragen, da der Nachweis der Sensitivität und Validierung dieser Methode zur *BRCA1/2*-Analyse noch nicht erbracht wurde. Bevor die Gentestung kommerziell vermarktet wird, sollten die Grundsätze eines prädiktiven Gentests genau definiert werden.

4.1.2. Ergebnisse der Familienanalyse im Vergleich zu den Daten des Deutschen Konsortiums

Die bisher in der Literatur zusammengestellten Daten bezüglich der Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* beziehen sich zum größten Teil auf Nord-Amerika bzw. auf andere heterogene Populationen, die möglicherweise nicht das Mutationsprofil eines bestimmten Landes widerspiegeln (Shattuck-Eidens et al., 1995; Gayther et al., 1996; Ford et al., 1998). In Europa gibt es bislang nur eine Studie innerhalb der niederländischen Bevölkerung, die eine große Anzahl von Personen (>400) auf *BRCA1* Mutationen getestet hat (Peelen et al., 1997). In anderen Populationen, wie der französischen (Stoppa-Lyonnet et al., 1997), der schwedischen (Hakansson et al., 1997) sowie der finnischen (Vehmanan et al., 1997) wurden stets weniger als 200 Personen getestet. Außerdem wurden in diesen Populationen stets weniger

als 150 Personen auf Mutationen des *BRCA2* Gens getestet (Peelen et al., 2000; Serova-Sinilnikova et al., 1997; Hakansson et al., 1997; Vehmanen et al., 1997). Im Rahmen des Deutschen Konsortiums für familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinome wurden bis heute erstmals Mitglieder aus 850 voneinander unabhängigen deutschen Familien analysiert. Die Einschlusskriterien für die genetische Testung von *BRCA1* und *BRCA2*, wurden wie folgt definiert:

A1: Familien mit zwei oder mehr Fällen von Mammakarzinomen, mit mindestens zwei Fällen, die unter 50 Jahren aufgetreten sind.

A2: Familien mit mindestens einem männlichen Mammakarzinom.

B: Familien mit mehreren Mammakarzinomen und mindestens einem Ovarialkarzinom.

C1: Familien mit zwei oder mehr Fällen von Mammakarzinomen, wobei mindestens ein Fall vor dem 50. Lebensjahr aufgetreten ist.

C2: Familien mit einem Fall von Mammakarzinom, welches vor dem 35. Lebensjahr aufgetreten ist.

C3: Familien mit zwei oder mehr Fällen von Mammakarzinomen, unabhängig vom Erkrankungsalter.

D: Familien mit mindestens einem Ovarialkarzinom.

Im Düsseldorfer Zentrum wurden im Rahmen dieser Studie bislang 745 Mitglieder aus 646 Familien klinisch beraten. Von diesen wurde 451 Personen aus 382 Familien die genetische Analyse angeboten. Die genetische Analyse von bislang 80 Patientinnen für *BRCA1* und *BRCA2* mittels direkter Sequenzierung und DHPLC Analyse ergab folgende Ergebnisse: Von den im Deutschen Konsortium insgesamt 66 verschiedenen *BRCA1* (siehe Tabelle 10.5) sowie 52 verschiedenen *BRCA2* (siehe Tabelle 10.6) Mutationen konnten im Düsseldorfer Zentrum bislang 10 verschiedene *BRCA1* Mutationen (8 Frameshift, 1 Missense, 1 Nonsense), sowie zwei verschiedene *BRCA2* Mutationen (2 Frameshift Mutationen) nachgewiesen werden. Die Frameshift und Nonsense Mutationen (innerhalb des Konsortiums wurden 56 bzw. 47 Frameshift und Nonsense Mutationen und 7 bzw. 5 Splice Mutationen in *BRCA1* bzw. *BRCA2* gefunden) führen zu vorzeitigen Abbrüchen des Proteins, die Nonsense Mutation T300G liegt innerhalb der 5'-RING Finger Domäne. Vier der gefundenen *BRCA1* Mutationen (1458insG, 1996ins4bp, 5256delG, IVS21-36del510) sowie die beiden *BRCA2* Mutationen (5445delTTTAAGTA, 6633delCTTAA) wurden bisher nur einmal innerhalb des Deutschen Konsortiums gefunden. Fünf der *BRCA1* Mutationen (T300G, C1740T, 3604delA, 3819del5bp, 4184delG) gehören zu den rekurrenten Mutationen, die innerhalb des Konsor-

tiums dreimal oder häufiger gefunden wurden. Insgesamt sind 15 der 66 *BRCA1* Mutationen rekurrent. Sie bilden einen Anteil in Höhe von 65% aller im Konsortium gefundenen *BRCA1* Mutationen. Eine dieser Mutationen (C1740T) sowie die Mutationen 1458insG und 3222insT scheinen für die deutsche Population spezifische Mutationen zu sein. Insgesamt trifft dies auf 21 der insgesamt 66 *BRCA1* Mutationen zu.

Die Mutation IVS21-36del510 ist eine *BRCA1* Mutation, die zu den niederländischen Founder Mutationen gehört. Sie konnte bei den im Düsseldorfer Zentrum untersuchten Familien einer Familie niederländischer Abstammung zugeordnet werden.

Die *BRCA1* Mutation 5382insC, die in der deutschen Population am häufigsten auftritt (Backe et al., 1999), konnte dagegen im Düsseldorfer Zentrum bisher nicht nachgewiesen werden.

Nach Gayther et al. (1995) lassen sich verschiedene Genotyp-Phenotyp Korrelationen aufstellen. So werden Mutationen, die in der Region 5' von Nukleotid 4422 liegen vor allem in Familien mit Mamma- und Ovarialkarzinomen gefunden, während Mutationen in der Region 3' dieses Nukleotids in Familien mit ausschließlich Mammakarzinomen gehäuft auftreten. Die Düsseldorfer Befunde konnten diese These nicht unterstützen. Für beide Bereiche war das Verhältnis der Familien A1 (nur Mammakarzinome) und B (Mamma- und Ovarialkarzinome) 1:1. Die Daten des gesamten Konsortiums dagegen untermauern diesen Befund. Im Bereich der Exons 1-11 beträgt das Verhältnis der Gruppen B zu A1 2:1. Für den Bereich der Exons 12-24 beträgt das Verhältnis B zu A1 dagegen 1:1. Auch für das *BRCA2* Gen wurde eine Genotyp-Phenotyp Korrelation aufgestellt. Mutationen im Bereich 3035-6629 finden sich vermehrt bei Familien mit Ovarialkarzinomen. Auch diese Aussage bestätigt sich in Düsseldorf nur zum Teil. Die gefundene Mutation in diesem Bereich (5445delTTTAAGTA) wurde in einer reinen Mammakarzinom-Familie detektiert. Die zweite Mutation (6633delCTTAA) liegt streng genommen außerhalb des definierten Bereichs. Sie wurde jedoch in einer Familie mit Mamma- und Ovarialkarzinomen detektiert. Im deutschen Gesamtkollektiv läßt sich diese Aussage bezüglich der Genotyp-Phenotyp Korrelation der *BRCA2* Mutationen ebenfalls nicht treffen.

Die Familien des Düsseldorfer Zentrums mit *BRCA1* und *BRCA2* Mutationen gehören alle zu den Gruppen A1 bzw. B. Dies entspricht durchaus den Erwartungen, denn nach Auswertung aller Daten des Deutschen Konsortiums ergeben sich für das Vorkommen der Mutationen in den einzelnen Gruppen die folgenden Sequenzen:

Tab. 4.1 Mutationsfrequenzen in den Genen BRCA1 und BRCA2 in Abhängigkeit von den Karzinom-erkrankungen in der Familie

Gruppe	BRCA1	BRCA2
A1	22,8 %	15,2 %
A2	4,2 %	37,5 %
B	41,8 %	17,1%
C1	3,2 %	9,3 %
C2	9,3 %	2,7 %
C3	2,1 %	7,4 %
D	16,7 %	-

Innerhalb des Düsseldorfer Zentrums wurden nach Analyse von 80 Familien nur 12 Mutationen gefunden. Der Grund hierfür besteht darin, daß es sich bei den betreffenden Familien überwiegend um sogenannte "low-risk"-Familien handelt, d. h. Familien, die der Gruppe C angehören (siehe Tabelle 10.2).

Die Analyse aller im Rahmen der Studie untersuchten Familien führte zu einem weiteren interessanten Ergebnis. Es konnte gezeigt werden, daß bestimmte Polymorphismen des *BRCA1* Gens in einem Cluster auftreten. Dieses Cluster erstreckt sich über den Bereich von Nukleotid 2201 im Exon 11 bis in den Intonbereich 16, und umfaßt damit etwa 22% des gesamten Gens und über 60% des translatierten Bereichs. Tritt dieser Polymorphismus bei einer Patientin homozygot bzw. heterozygot auf, so trifft dies auch für alle anderen Polymorphismen des Clusters zu. Eine Bedeutung dieses Clusters wird im Zusammenhang mit einem prädisponierendem Effekt bei Expression des Allels mit dem Polymorphismus näher erläutert (vgl. Abschnitt 4.2.3). Vier der im Cluster vorkommenden Polymorphismen haben einen Aminosäureaustausch zur Folge. Zwei dieser Polymorphismen liegen im Exon 11, in einem für die Interaktion zu RAD51 (Scully et al., 1997a) verantwortlichen Bereich. Eine Konformationsänderung dieses Bereichs und eine dadurch veränderte Interaktion zu RAD51 könnte die Funktion des *BRCA1* Gens in der DNA Reparatur also durchaus beeinflussen.

4.2. Das sporadische Mamma- und/oder Ovarialkarzinom

Im Gegensatz zu den klaren Genotyp-Phenotyp Korrelationen des *BRCA1* Gens in Familien mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom ist die Bedeutung des Gens bei der Entstehung und Progression des sporadischen Mamma -und/oder Ovarialkarzinoms noch weitgehend ungeklärt. Dabei ist der Anteil der sporadischen Mamma -und/oder Ovarialkarzinome mit 75% wesentlich höher als der der familiären Karzinome.

BRCA1 kodiert für ein Protein, das beteiligt ist an Mechanismen der DNA Reparatur und der homologen Rekombination, (Scully et al, 1997a und b, Thomas et al., 1997), der embryonalen Proliferation, der Transkriptionsregulation (Chapman and Verma, 1996, Scully et al., 1997) und der Ubiquitinierung (Jensen et al., 1998). Bedingt durch seine Multifunktionalität unterliegt es einer sehr komplexen Regulation. *BRCA1* wird am stärksten exprimiert in schnell teilenden, differenzierenden Geweben, wie z.B. während der Proliferation und der Differenzierung des Brustepithels (Rajan et al, 1996).

Als Tumorsuppressorgen wird *BRCA1* entsprechend dem "Zwei-Schritt"-Modell von Knudson (1971) durch eine Mutation des ersten Allels und den Verlust des zweiten Allels inaktiviert. Während dies für die Inaktivierung von *BRCA1* in familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen belegt ist (Niederacher et al., 1998), trifft dieses Modell in sporadischen Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen nicht zu. Durch LOH Analysen konnte in bis zu 43% der untersuchten Mamma- und Ovarialkarzinome ein Allelverlust mittels der drei intragenischen Mikrosatelliten-Marker D17S855, D17S1322 und D17S1323 festgestellt werden (vgl. Abschnitt 3.4.1.1), jedoch sind bis heute nur wenige Mutationen des *BRCA1* Gens in sporadischen Karzinomen beschrieben (Futreal et al., 1994, Merajver et al., 1995, Langston et al., 1996). Möglicherweise ist bei den sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen das "Zwei-Schritt"-Modell von Knudson nicht umfassend genug, um die Inaktivierung von *BRCA1* zu erklären.

Die Inaktivierung des *BRCA1* Gens kann auch die Folge anderer Wirkungsmechanismen sein. Da *BRCA1* einer sehr komplexen Regulation unterliegt, besteht z. B. die Möglichkeit, daß Defekte in cis- und/oder transregulatorischen Elementen eine reduzierte *BRCA1* Expression zur Folge haben.

4.2.1. *BRCA1*-Expressionsanalysen

Es konnte nachgewiesen werden, daß die *BRCA1* Expression in den meisten sporadischen fortgeschrittenen (Grade III) duktalem Mammakarzinomen reduziert ist oder völlig fehlt (Wilson et al., 1999). Auch für sporadische Ovarialkarzinome konnte der Nachweis für eine reduzierte *BRCA1* Expression erbracht werden (Zheng et al., 2000). Epigenetische Mechanismen, wie z. B. aberrante Cytosin-Hypermethylierung der Promotor Region kann zu einer Reduktion der Expression führen. Eine reduzierte Expression des *BRCA1* Gens in Folge von Hypermethylierung des Promotors konnte sowohl für sporadische Mammakarzinome (Mancini et al., 1998; Rice et al., 1998; Bianco et al., 2000) als auch für sporadische Ovarialkarzinome (Catteau et al., 1999) gezeigt werden. Der Schwachpunkt dieser Studien besteht darin, daß meist nur

Zelllinien oder geringe Probenkollektive von Tumoren untersucht wurden. Angaben über die Expression im Normalgewebe fehlen meist ganz oder werden auf die Expression in einer Normal-Zelllinie reduziert (Özcelik et al., 1998).

In dieser Arbeit wird erstmals die *BRCA1* Expression in einem Kollektiv von 98 sporadischen Mammakarzinomen und 52 dazu passenden Normalgeweben sowie 26 sporadischen Ovarialkarzinomen untersucht. Zu den Ovarialkarzinomen stand kein Normalgewebe zu Vergleichszwecken zur Verfügung.

Die Quantifizierung der RNA Transkripte erfolgt mittels quantitativer RT-PCR. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem klassischen Northern-Blot besteht darin, daß nur sehr geringe Mengen RNA benötigt werden. Der Einsatz Cy5-markierter Primer ermöglicht den Nachweis der PCR Produkte auf einem A.L.F. Sequenzer, der auf Grund seiner Sensitivität schon geringste Mengen nachweisen kann. Die quantitative RT-PCR beruht auf der simultanen Koamplifikation eines Zielgens und eines Referenzgens. Im Fall von *BRCA1* und *p21* wurde *GAPDH* als Referenzgen gewählt. Dieses Gen wird ubiquitär in jedem Gewebe gleich stark exprimiert (Wong et al., 1994, Taylor et al., 1994). Ein Problem bei der Verwendung der ausgewählten Primer für die Untersuchung des Referenz Gens *GAPDH* besteht darin, daß im Genom ein *GAPDH*-Pseudogen existiert, das keine Introns enthält. Nach PCR-Amplifikation könnte daher durch DNA Amplifikation eine Bande entstehen, die nicht von der zu untersuchenden cDNA unterscheidbar ist. Um diese Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, werden alle cDNA Proben mit einer β -Actin PCR überprüft. Diese β -Actin Primer sind so gewählt, daß sie in zwei Exonbereichen liegen, die einen Intronbereich umspannen. Bei einer DNA-Kontamination der cDNA enthält man auf diese Weise zusätzlich ein größeres PCR Fragment.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen zeigte sich in den 52 paarweisen Normal- und Tumorgeweben keine signifikant reduzierte *BRCA1* Expression in den Tumoren ($p=0,77$). In 21 Fällen (40%) zeigten Normal- und Tumorgewebe annähernd die gleiche Expression ($\pm 15\%$). In 13 Tumoren (25%) war die Expression höher, in drei Tumoren war die Expression sogar überdurchschnittlich hoch, während in 18 Tumoren (35%) die *BRCA1* Expression niedriger war als in den dazugehörigen Normalgeweben. Man kann die Vermutung äußern, daß in Tumoren mit reduzierter *BRCA1* Expression nur z. T. eine Hypermethylierung des Promotors vorliegt, da eine Hypermethylierung des *BRCA1* Promotors in der Literatur in nur bis zu 16% der untersuchten Karzinome gezeigt wurde (Mancini et

al., 1998; Rice et al., 1998; Bianco et al., 2000). Vergleicht man die absoluten Expressionswerte in Tumor- und Normalgeweben, so erkennt man, daß hohe Expressionswerte (>0.25) häufiger in Normalgeweben (29%) als in Tumorgeweben (18%) auftreten. Eine mögliche Erklärung hierfür besteht darin, daß nicht nur eine Reduktion der *BRCA1* Expression zur Inaktivierung führt, sondern daß ein *BRCA1* Funktionsverlust auch darauf zurückzuführen sein könnte, daß eine Induktion der Expression in Situationen, in denen physiologisch höhere *BRCA1* Konzentrationen benötigt werden, gehemmt wird. Dies spricht allerdings eher für eine *BRCA1* Inaktivierung auf Grund von Defekten in transregulatorischen Faktoren als für eine Inaktivierung von *BRCA1* durch Mutationen oder Hypermethylierung. Für die *BRCA1* Expression in den Ovarialkarzinomen zeigte sich eine annähernd gleiche Verteilung wie bei den Mammakarzinomen. Aufgrund der fehlenden Normalgewebe läßt sich kein direkter Vergleich der *BRCA1* Genexpression in Normal- und Tumorgewebe erstellen.

Um den Einfluß des hemizygoten Allelverlustes des *BRCA1* Gens auf die Expression zu untersuchen, wurden LOH-Analysen mittels der drei intragenischen Mikrosatellitenmarker D17S855, D17S1322 und D17S1323 durchgeführt. Obwohl der Allelverlust sowohl in den Mamma- als auch in den Ovarialkarzinomen ein häufiges Phänomen ist (30-43%), läßt sich in beiden Fällen keine statistisch signifikante Korrelation zwischen LOH *BRCA1* und verringerter *BRCA1* Expression feststellen ($p=0,28$ bzw. $0,87$). LOH *BRCA1* trat häufiger in der Gruppe mit reduzierter *BRCA1* Expression (9 von 14 informativen Fällen) auf als in der Gruppe mit erhöhter *BRCA1* Expression im Tumor (6 von 15 informativen Fällen). Jedoch trat der LOH *BRCA1* auch in Tumoren mit gleicher Expression wie im Normalgewebe auf (7 von 21 informativen Fällen). Diese Ergebnisse deuten nicht darauf hin, daß der Allelverlust eine reduzierte *BRCA1* Expression in sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen zur Folge hat, oder sich durch den LOH cis-regulatorische Mutationen auf das Expressionsniveau auswirken können.

Die reduzierte *BRCA1* Expression kann in sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen nicht auf Mutationen des Gens zurückgeführt werden. Es stellt sich daher die Frage, ob die Ursache für eine verringerte Expression in einer veränderten Aktivität des Promotors liegt. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde ein Teil des *BRCA1* Promotors aus DNA von Tumoren unterschiedlicher Expression (Tumorgewebe 38T und 262T; relative *BRCA1* Expression: 1,26 bzw. 0,02) amplifiziert und in den Expressionsvektor pGL2basic kloniert. Durch den Einsatz dieses Vektorsystems kann man die Aktivität des Promotors in einem Luziferase-Assay bestimmen.

Das *BRCA1* Gen verfügt über zwei Promotoren, α und β . Daraus resultieren zwei verschiedene *BRCA1* Transkripte, die sich in ihrem 1. Exon voneinander unterscheiden. Weder der Promotor α noch der Promotor β enthalten klassische "estrogen responsive elements" (ERE: 5'-GGTCANNNTGACC-3'). Im *BRCA1* Promotor β konnte eine alternative ERE-Sequenz nachgewiesen werden (5'-GGTCA(N)₃TGGTC(N)₉TGACC-3'). Die Sequenzhomologie-Suche mit dem Promotor α offenbarte eine mögliche "AP1 Site", an welche die Proto-Onkogen Produkte c-Fos und c-Jun binden und Östrogeneffekte vermitteln können (Barker et al, 1996).

Die beiden untersuchten Promotoren zeigen keinen Unterschied bzgl. ihrer Aktivität. Die Kotransfektion von ER α bewirkt in beiden Fällen einen leichten Anstieg der Aktivität. Im Tumorgewebe 38T wurde ein LOH in *BRCA1* nachgewiesen. Im Tumorgewebe kann der Verlust des Wildtypallels nachgewiesen werden, während das Allel mit dem Polymorphismus exprimiert wird (siehe Abschnitt 3.4.4.2). Durch diesen Versuch wird somit die Aktivität des Promotors des Allels mit dem Polymorphismus bestimmt. Das Tumormaterial 262T ist bezüglich der beiden Allele (WT und Polymorphismus) heterozygot. Da kein LOH nachweisbar ist, werden die Promotoren beider Allele (der Promotor des Wildtypallels sowie der Promotor des Allels mit dem Polymorphismus) kloniert. Wird im Rahmen dieses Versuchs im Luziferase Assay die Aktivität des Promotors des Allels mit dem Polymorphismus gemessen, so ist dies die Erklärung dafür, daß keine Abweichung zur Aktivität des Promotors 38T besteht. Das Resultat einer Analyse des Promotors des Wildtypallels ist ggf. eine veränderte Promotoraktivität. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, müßte eine Analyse diverser anderer Klone durchgeführt werden.

Ein anderer Erklärungsansatz für dieses Ergebnis besteht darin, daß eine reduzierte *BRCA1* Expression aufgrund veränderter Promotoraktivität nicht als Mechanismus der Inaktivierung des *BRCA1* Gens in Frage kommt.

4.2.2. *p21*-Expressionsanalysen

Auch die Expression des Zellzyklusinhibitors *p21* wurde nach den oben beschriebenen Kriterien (siehe Abschnitt 4.2.1) mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Nach Optimierung der Primer- und Nukleotid-Konzentrationen sowie der Zyklenzahl stellte sich jedoch heraus, daß die Mengen an RNA von *p21* und *GAPDH* so stark variierten, daß eine gleichzeitige Quantifizierung auf dem A.L.F.-Sequencer nicht möglich war. Der Cy5-markierte 5'-Primer von *GAPDH* wurde im Verhältnis 1:8 mit unmarkiertem 5'-Primer gemischt, um die Intensität

des *GAPDH*-Signals an die des *p21* Signals anzupassen. Dabei ist darauf zu achten, daß die PCR noch im linearen Amplifikationsbereich ist.

Die Expression von *p21* wurde in dem gleichen Probenkollektiv von Mamma- und Ovarialkarzinomen bestimmt, um einen Zusammenhang zwischen *BRCA1*- und *p21*-Expression zu überprüfen. Ectopisches *BRCA1* aktiviert Promotoren, die "p53 responsible"-Elemente enthalten (Ouchi et al., 1998). Somasundaram et al. (1997) zeigten durch in vitro Experimente, daß eine 50 bp Region im *p21* Promotor (143-93 bp upstream des Transkriptionsinitiationspunkts) für eine *BRCA1* abhängige Transaktivierung verantwortlich ist. Diese Transkriptionsaktivierung von *p21* durch *BRCA1* ist unabhängig von p53. *BRCA1* kann demnach die Transkription anderer Gene sowohl p53-abhängig als auch p53-unabhängig aktivieren.

Die *p21* Expressionsanalysen in den sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen ergaben eine ähnliche Verteilung in die Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Expression, wobei die relativen Werte jedoch insgesamt höher waren als die der *BRCA1* Expression. In den Mammakarzinomen konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der *p21* und der *BRCA1* Expression in den untersuchten Tumoren gezeigt werden ($p=0,016$). Diese Tatsache spricht für eine direkte, p53 unabhängige Aktivierung der *p21* Transkription durch *BRCA1*. In Abbildung 4.1 ist ein möglicher Einfluß von *BRCA1* Einfluß auf die Zellzykluskontrolle vereinfacht dargestellt. In hohen Konzentrationen bindet *p21* an den Komplex aus Cyclin und CDK4 und inhibiert so die Kinaseaktivität. Dies resultiert in einem G1-S-Arrest der Zelle (LaBaer et al., 1997). Ist die *p21* Konzentration in Folge reduzierter *BRCA1* Expression verringert, so führt dies zu einer Aufhebung des G1-S-Arrests und begünstigt die Zellproliferation. In vivo spielen viele weitere Faktoren eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle und der DNA Reparatur. In Mäuse-Embryonen wurde gezeigt, daß reduzierte *BRCA1* Expression zu einer reduzierten *mdm2* Expression und damit zu einer erhöhten p53- und *p21*-Expression führt (Hakem et al., 1997). Möglicherweise läßt sich dieses widersprüchliche Ergebnis auf Species-spezifische Funktionen von *BRCA1* zurückführen.

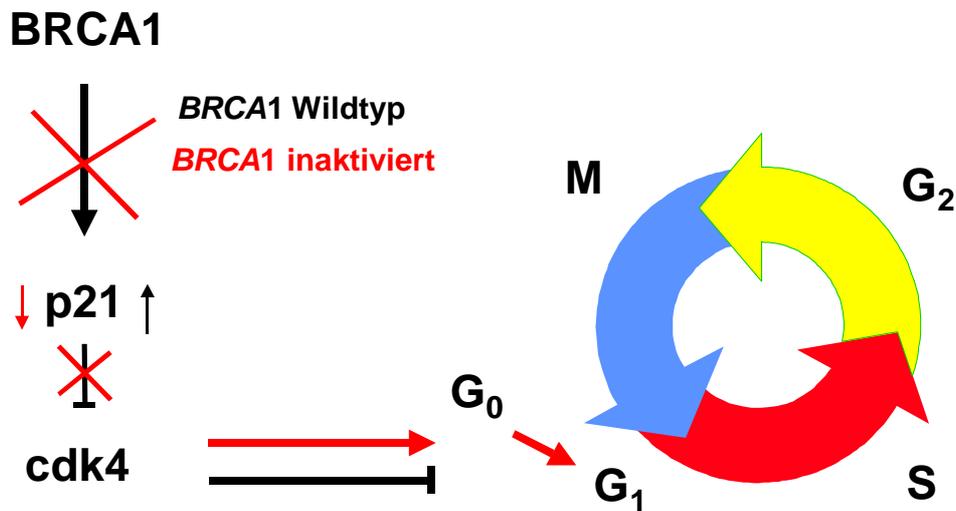


Abb. 4.1: Vereinfachtes Modell der Wirkungsweise von BRCA1 auf p21. Wildtyp BRCA1 aktiviert die Transkription des Zellzyklusinhibitors p21, was durch Hemmung des Komplexes aus Cyclin und CDK4 in einem G1-S-Arrest der Zelle resultiert. Niedrige p21 Konzentrationen infolge von inaktiviertem BRCA1 führen zu einer Aufhebung des G1-S-Arrest der Zelle.

4.2.3. Allelspezifische Expression in Normal- und Tumorgewebe

Durch eine allelspezifische Expression kann die Expression eines Gens ebenfalls kontrolliert werden. Bekannt ist dieser Mechanismus vom sog. Imprinting, bei dem ganz spezifisch die Expression einer Allelkopie des Gens unterdrückt wird. Dabei kann es sich um das mütterliche (maternales Imprinting) oder das väterliche Allel (paternales Imprinting) handeln. Der genaue Funktionsmechanismus ist noch nicht geklärt. Anscheinend spielt die spezifische Methylierung eines Allels beim genetischen Imprinting eine Rolle. Es ist jedoch nicht sicher, ob die Methylierung primär an dem Mechanismus des Imprinting beteiligt ist oder nur eine sekundäre Rolle spielt (Gold and Pedersen, 1994). Fehlerhaftes Imprinting ist oft assoziiert mit Krankheiten, die sich durch Störungen im Zellwachstum, der Entwicklung und des Verhaltens äußern, wie z. B. der familiäre Wilms Tumor (Breslow et al., 1996) oder das Prader-Willi-Syndrom (Saitosh and Wada, 1994).

Für *BRCA1* wurde bereits mit Hilfe der RFLP-Analyse eine allelspezifische Expression nachgewiesen (Özcelik et al., 1998). Untersucht wurde dazu der Polymorphismus C4227T im Exon 13 des *BRCA1* Gens, der in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *EaI* liegt. Die Wildtypsequenz kann von dem Enzym geschnitten werden, nicht jedoch die Sequenz mit dem Polymorphismus. Mit Hilfe dieses Polymorphismus sollten die Allelotypen bei Brustkrebspatientinnen und in einem Kontrollkollektiv gesunder Frauen über 55 Jahren ohne

familiäre Prädisposition für Mamma- und Ovarialkarzinome bestimmt, und bei heterozygoten Patienten die allelspezifische Expression untersucht werden. Die Analyse dieses Polymorphismus ist deshalb sehr aufschlußreich, weil er sich in dem unter Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Polymorphismencluster befindet. Es kann daher eine Aussage bezüglich der exprimierten Allelsequenz von über 60% des translatierten Bereichs getroffen werden.

Zunächst wurde die Verteilung der beiden Allelotypen in der DNA von 98 Brustkrebspatientinnen und dem Kontrollkollektiv untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß das Allel mit dem Polymorphismus (A2) sowohl heterozygot (A1/A2) als auch homozygot (A2/A2) häufiger bei den Brustkrebspatientinnen vorlag als in der Kontrollgruppe, obschon diese Verteilung der Allele A1 und A2 nicht hoch signifikant war ($p=0,07$). Es wurde daher untersucht, ob bei heterozygoten Brustkrebspatientinnen ein bestimmtes Allel bevorzugt exprimiert wird. Es wurden RFLP Analysen mit der cDNA aus Normal- und Tumormaterial durchgeführt um festzustellen, welches Allel tatsächlich in RNA translatiert wird. Die zuvor durchgeführten LOH Analysen stellten sicher, daß potentiell beide Allele exprimiert werden können. Dabei zeigte sich, daß tatsächlich ein Unterschied in der Expression der beiden Allele in Normal- und Tumormaterial existiert. In 7 Fällen konnte eindeutig gezeigt werden, daß im Normalgewebe noch beide Allele bzw. nur das Wildtypallel exprimiert wurden, während im Tumorgewebe nur das Allel mit dem Polymorphismus exprimiert wurde. In 9 Fällen wurde im Tumorgewebe überwiegend das Allel mit dem Polymorphismus (A2) exprimiert. Das schwache Signal des Wildtypallels könnte auf geringe Mengen von Wildtypmaterial im heterogenen Tumormaterial zurückzuführen sein. Bei 6 Patientinnen war die Expression beider Allele im Normal- und Tumorgewebe annähernd gleich. Auch in diesen Fällen könnte das Wildtypsignal auf Normalgewebeanteile im Tumormaterial zurückgeführt werden. Möglicherweise spiegeln diese drei Gruppen wieder, daß es Tumormaterial ohne und mit unterschiedlich hohen Anteilen an Normalgeweben gibt. Eine genaue Auskunft darüber erhielte man bei Verwendung von mikrodissektiertem Tumormaterial. Auffällig war, daß keine Patientin im Normalgewebe nur das Allel A2 exprimiert oder im Tumorgewebe nur das Wildtypallel. Um auszuschließen, daß die Signale des Allels A2 auf einen unvollständigen Restriktionsverdau zurückzuführen sind, wurden Stichproben der cDNA sequenziert. Diese Sequenzierungen bestätigten die Ergebnisse der RFLP Analyse.

In einem zweiten Versuch wurden auch heterozygote Patientinnen mit LOH auf die Allelverteilung in der cDNA untersucht. Dabei stellte es sich heraus, daß bei 6 Patientinnen im Tumormaterial das Allel mit dem Polymorphismus erhalten blieb, während nur eine Patientin

dieses Allel durch LOH verloren hatte. In drei Fällen waren im Tumormaterial noch beide Allele nachweisbar, was aber gleichfalls durch Normalgewebe im Tumormaterial zu erklären ist.

Diese Versuche zeigen eindrucksvoll, daß in Tumorgeweben die Expression des Allels mit Polymorphismus (A2) überwiegt, während in Normalgeweben das Wildtypallel (A1) verstärkt exprimiert wird. Die Anzahl der untersuchten Proben war stark eingeschränkt, da es sehr schwierig ist, aus dem ursprünglichen Probenkollektiv eine große Anzahl aussagekräftiger Proben zu erhalten: Zunächst muß Normal- und Tumorgewebe von der gleichen Patientin vorhanden sein. Nur ca. 50% dieser Patientinnen ist heterozygot für die Polymorphismen. Von diesen wiederum haben nur etwa 60% keinen LOH *BRCA1*. Man kann also nur ca. 30% eines Ausgangsprobenkollektivs auf diese allelspezifische Expression untersuchen.

Trotz der geringen Probenzahl geben diese Ergebnisse einen Hinweis darauf, daß die allelspezifische Expression in Kombination mit der Expression des Allels mit Polymorphismus (A2) im Tumorgewebe möglicherweise einen prädisponierenden Effekt bei der Entstehung sporadischer Mammakarzinome hat. Dieser prädisponierende Effekt wird noch dadurch verstärkt, daß mit der RFLP-Analyse nicht nur ein Polymorphismus, sondern das gesamte Cluster analysiert wurde. Wie bereits dargestellt erstreckt sich dieses Cluster über 60% des translatierten Bereichs des *BRCA1* Gens. Vier dieser Polymorphismen haben einen Aminosäureaustausch zur Folge, wovon zwei in dem Bereich liegen, der für die Interaktion mit RAD51 verantwortlich ist (Scully et al., 1997a). Möglicherweise führt eine Konformationsänderung in diesem Bereich zu einer gestörten Interaktion mit RAD51 und somit zu einer gestörten Funktion von *BRCA1* in der DNA Reparatur. Bei den sporadischen Ovarialkarzinomen konnte diese Analyse auf Grund der kleinen Probenzahl und der fehlenden Normalgewebe nicht durchgeführt werden.

In hereditären Mamma- und Ovarialkarzinomen haben Mutationen des *BRCA1* Gens einen prädisponierenden Effekt. In sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen besteht die Möglichkeit, daß die allelspezifische Expression des Allels mit dem Polymorphismus (A2) mit niedriger Penetranz an der Progression des Karzinoms beteiligt ist. Es ist derzeit noch nicht geklärt, welcher Mechanismus dieser allelspezifischen Expression zu Grunde liegt. Außerdem ist umstritten, daß Polymorphismen einen Einfluß auf die Tumorentstehung haben, da sie auch bei völlig gesunden Personen mit hoher Frequenz vorkommen. Dennoch geben die

hier beobachteten Ergebnisse einen Anstoß, über die Bedeutung der Polymorphismen im Rahmen der Tumorentstehung nachzudenken.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei den Brustkrebsgenen *BRCA1* und *BRCA2* handelt es sich um für Mammakarzinome prädisponierende Gene. Durch genetische Veränderungen dieser beiden Gene können etwa 5-10% der familiär gehäuft auftretenden Brustkrebserkrankungen erklärt werden.

Die direkte DNA-Sequenzierung gilt als die sensitivste Methode in der Gendiagnostik zum Nachweis von Mutationen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Strategie zur Automatisierung der PCR sowie der Sequenzierreaktion zur Analyse des *BRCA2* Gens entwickelt. Die Etablierung *BRCA2*-spezifischer Primer mit einem M13-Tag ermöglicht die parallele Analyse aller Fragmente unter einer einheitlichen Reaktionsbedingung. Durch die Automatisierung gelang es, die Anforderungen einer diagnostischen Methode bzgl. Minimierung manueller Fehlermöglichkeiten, Reproduzierbarkeit und Dokumentationsmöglichkeit bei gleichzeitig hohem Probendurchsatz zu erfüllen.

Um die Dauer der Analyse zu verkürzen, werden Vorscreeningmethoden durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (DHPLC) als Vorscreeningmethode für die Analyse der Gene *BRCA1* und *BRCA2* etabliert. Durch Optimierung der Analysebedingungen (Temperatur und Gradient; Einsatz einer Taq Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität; Einsatz psoralenmodifizierter Primer in „high-melting domains“) und Automatisierung konnte mit Hilfe von über 200 Positivkontrollen eine Sensitivität der Methode von 98% erzielt werden.

Durch Analyse von 54 DNA Proben mittels DHPLC Analyse und direkter DNA-Sequenzierung konnten zwei Mutationen und drei „unclassified variants“ im *BRCA2* Gen, sowie eine Reihe von Sequenzpolymorphismen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* detektiert werden.

Auch beim Einsatz der DHPLC zur Mutationsanalyse in Karzinomgeweben, in denen der Anteil des mutierten Allels auf Grund der Heterogenität des Materials stark reduziert sein kann, konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Optimierung der Analyse des *TP53* Gens eine hohe Sensitivität dieser Methode erzielt werden.

Im Gegensatz zu den klaren Genotyp-Phenotyp Korrelationen des *BRCA1* Gens in Familien mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom ist die Bedeutung des Gens bei der Entstehung und Progression des sporadischen Mamma -und/oder Ovarialkarzinoms noch weitgehend ungeklärt. Durch LOH Analysen konnte in bis zu 43% der untersuchten Mamma- und

Ovarialkarzinome ein Allelverlust mittels der drei intragenischen Mikrosatelliten-Marker D17S855, D17S1322 und D17S1323 festgestellt werden; jedoch sind bis heute nur wenige Mutationen des *BRCA1* Gens in sporadischen Karzinomen beschrieben. Alternative Inaktivierungsmechanismen müssen daher von Bedeutung sein. Die Analyse der *BRCA1* Expression in 52 paarweisen Mammakarzinomen und Normalgeweben zeigte keine signifikant reduzierte *BRCA1* Expression in den Tumoren ($p=0,77$). Eine Inaktivierung des *BRCA1* Gens durch reduzierte Expression (z. B. in Folge der Methylierung des Promotorbereichs) kann nur begrenzt zutreffen. Es konnte jedoch eine allelspezifische Expression der beiden Allele (A1 = Wildtyp, A2 = Polymorphismus) in Mammakarzinomen und Normalgeweben nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit dem für *BRCA1* beschriebenen Polymorphismencluster könnte die Expression des Allels mit dem Polymorphismus (A2) einen prädisponierenden Effekt in der Tumorentstehung haben.

Die Funktion von *BRCA1* in der Zelle ist multifunktional. Das Protein ist an Mechanismen der DNA Reparatur und der homologen Rekombination, der embryonalen Proliferation, der Transkriptionsregulation und der Ubiquitinierung beteiligt. Der hier durchgeführte Nachweis einer statistisch signifikanten Korrelation zwischen *BRCA1* und *p21* Expression in Mammakarzinomen ($p=0.008$) bestätigt eine *BRCA1* abhängige Expression des Zellzyklusinhibitors *p21* und eine Funktion von *BRCA1* in der Zellzyklus-Kontrolle.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Ralf M, Roberts K and Watson JD. Molekularbiologie der Zelle. 2. Auflage, VCH, 1990.

Andersen TI, Gaustad A, Ottestad L, Farrants GW, Nesland JM, Tveit KM and Borresen AL. Genetic alterations of the tumour suppressor gene regions 3p, 11p, 13q, 17p, and 17q in human breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1992, 4(2):113-121.

Aprelikova ON, Fang BS, Meissner EG, Cotter S, Campbell M, Kuthiala A, Bessho M, Jensen RA and Liu ET. BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(21):11866-11871.

Arnold N, Gross E, Schwarz Boeger U, Pfisterer J, Jonat W and Kiechle M. A highly sensitive, fast and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat* 1999; 14(4):333-339.

Backe J, Hofferbert S, Skawran B, Dörk T, Stuhmann M, Karstens JH, Untch M, Meindl A, Burgemeister R, Chang-Claude J and Weber BH. Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 1999, 72:402-406.

Barker DF, Xudong L and Almeida ERA. The BRCA1 and 1A1.3B promoters are parallel elements of a genomic duplication at 17q21. *Genomics* 1996, 38:215-222.

Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG and Bender HG. Die erbB2-Gen-Familie: Bedeutung für die Tumorentwicklung, Prognose und für neue Therapiemodalitäten. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 1993,11:742-753.

Beckmann MW, Niederacher D, Goecke TO, Boddien-Heidrich R, Schnürch HG and Bender HG: Hochrisikofamilien mit Mamma- und Ovarialkarzinomen: Möglichkeiten der Beratung, genetischen Analyse und Früherkennung. *Deutsches Ärzteblatt* 1997a, 94: A161-167.

Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG, Gusterson BA and Bender HG. Multitstep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity. *J Mol Med* 1997, 75: 429-439.

Beckmann MW, Kuschel B, Schmutzler RK: Hereditäre Karzinomsyndrome in der Frauenheilkunde. *Gynäkologe* 1998, (31): 1039-1045.

Bianco T, Chenevix-Trench G, Walsh DC, Cooper JE and Dubrovic A. Tumor specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenic role in breast and ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2000, 21:147-151.

Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991, 64:235-248.

Breslow NE, Olson J, Moksness J, Beckwith JB and Grundy P. Familial Wilms' tumor: a descriptive study. *Med Pediatr Oncol* 1996, 27(5):398-403.

Bryant PJ. Towards the cellular functions of tumor suppressors. *Trends in Cell Biology* 1993, 3:31-35.

Buchanan JA and Cavenee WK. Genetic markers for assessment of retinoblastoma predisposition. *Disease Markers* 1987, 5:41-152.

Catteau A, Harris WH, Xu CF and Solomon E. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 1999, 18: 1957-1965.

Chapman MS and Verma IM. Transcriptional activation by BRCA1. *Nature* 1996, 382:678-679.

Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD and Lee WH. The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin α subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem* 1996, 271: 32863-32868.

Chen J, Birkholtz GG, Lindblom P, Rubio C and Lindblom A. The role of ataxia-telangiectasia heterozygotes in familial breast cancer. *Cancer Res* 1998, 58(7):1376-9.

Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM and Scully R. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 1998, 2(3):317-328.

Easton DF (1999) How many breast cancer predisposition genes are there? <http://breast-cancer-research.com/vol1no1/23aug/editorial/1>

El-Deiry WS, Tokino T, Waldmann T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healey E, Lees JL, Hamilton SR, Kinzler KW and Vogelstein B. Topological control of p21^{WAF1/CIP1} expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995, 55:2910-2919.

Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB and Herman JG. Promoter Hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92 (7): 564-569.

Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990, 61: 759-767.

Florenes VA, Bhattacharya N, Bani MR, Ben-David Y, Kerbel RS and Slingerland JM. TGF β mediate G1arrestin a human melanoma cell line lacking p15INK4B: Evidence for cooperation of p21Cip1/WAF1 and p27KIP1. *Oncogene* 1996, 13:2447-2457.

Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BAJ, Gayther SA, Birch JM, Lindholm A, Stoppa-Lyonnet D, Bignon Y, Borg A, Hamann U, Haites N, Scott RJ, Maugard CM, Vasen H, Seitz S, Cannon-Albright LA, Schofield A, Zelada-Hedman M, and the Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1998, 62: 676-689.

Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, Eddington K, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Ding W, Gholami Z, Söderkvist P, Terry L, Jhanwar S, Berchuck A, Iglehart JD, Marks J, Ballinger DG, Barrett JC, Skolnick MH, Kamb A and Wiseman R. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994, 266:120-122.

Ganten D und Ruckpaul K. Handbuch der Molekularen Medizin, Bd. 2, Tumorerkrankungen. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1998a.

Ganten D und Ruckpaul K. Handbuch der Molekularen Medizin, Bd. 3, Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1998b.

Gayther SA, Warren W, Mazoyer S, Russell PA, Harrington PA, Chiano M, Seal S, Hamoudi R, van Rensburg EJ, Dunning AM, et al. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet* 1995, 11(4):428-433.

Gayther SA, Mangion J, Russell PA, Seal S, Barfoot R, Ponder BAJ, Stratton MR et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet* 1996; 15:103-105.

Gayther SA, Mangion J, Russell P, Seal S, Barfoot R, Ponder BAJ, Stratton MR and Easton D. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet* 1997, 15:103-105.

Gold JD and Pedersen RA. Mechanisms of genomic imprinting in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 1994, 29:227-280.

Goldgar DE, Fields P, Lewis CM, Tran TD, Cannon-Albright LA, Ward JH, Swensen J and Skolnick MH. A large kindred with 17q-linked breast and ovarian cancer: genetic, phenotypic, and genealogical analysis. *J Natl Cancer Inst.* 1994, 86(3):200-209.

Gottlieb TM and Oren M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochem Biophys Acta* 1996, 1287:77-102

Gowen LC, Avrutskava AV, Latour AM, Koller BH and Leadon SA. BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* 1998, 281:1009-1012.

Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U and Kiechle M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 1999, 105:72-78.

Gross E, Arnold N, Pfeiffer K, Bandick K and Kiechle M. Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Hum Mutat* 2000, 16(4): 345-353.

Gualberto A, Aldape K, Kozakiewicz K and Tlsty TD. An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(9):5166-5171.

Gudas JM, Nguyen H, Li T and Cowan KH. Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995, 55(20):4561-4565.

Hakansson S, Johannsson O, Johannsson U, Sellberg G, Loman N, Gerdes AM, Holmberg E, Dahl N, Pandis N, Kristoffersson U, Olsson H and Borg A. Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1068-1078.

Hakem R, de la Pompa JL, Elia A, Potter J and Mak TW. Partial rescue of BRCA1⁵⁻⁶ early embryonic lethality by p53 or p21 null mutation. *Nat Genet* 1997, 16:298-302.

Hartmann LC, Ingle JN, Wold LE, Farr GH, Grill JP, Su JQ, Maihle NJ, Krook JE, Witzig TE and Roche PC. Prognostic value of c-erbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. Results from a randomized adjuvant treatment protocol. *Cancer* 1992, 74:2956-2963.

Hayward-Lester A, Chilton BS, Underhill PA, Oefner PJ and Doris PA. Quantification of specific nucleic acids, regulated RNA processing and genomic polymorphisms using reversed phase HPLC. *Gene Quantification* (F. Ferré, ed.) 1997, 44-77. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW and Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997, 1(1):3-11.

Hiyama H, Lavarione A and Reeves SA. Regulation of the CDK inhibitor p21 gene during cell cycle progression under control of the transcription factor E2F. *Oncogene* 1997, 16:1513-1523.

Hsu LC and White RL. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1998, 95(22):12983-12988.

Huber CG. Micropellicular stationary phase for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. J Chromatography 1998, 806:3-30.

Hui AM, Kanai Y, Sakamoto M, Tsuda H and Hirohashi S. Reduced p21^{WAF1/CIP1} Expression and p53 mutation in hepatocellular carcinomas. Hepatology 1997, 25(3):575-579.

Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, Gardner HP, Ha SI, Chodosh LA, Ishov AM, Tommerup N, Vissing H, Sekido Y, Minna J, Borodovsky A, Schultz DC, Wilkinson KD, Maul GG, Barlev N, Berger SL, Prendergast GC and Rauscher FJ 3rd. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. Oncogene 1998, 16:1097-1112.

Jensen RA, Thompson ME, Jetton TL, Szabo CI, van der Meer R, Helou B, Tronick SR, Page DL, King MC and Holt JT. BRCA1 is secreted and exhibit properties of a granin. Nat Genet 1996, 12:303-308.

Kinzler KW and Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 1997, 386(6627):761-763.

Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971, 68:820-823.

Koonin EV, Altschul SF and Bork P. BRCA1 products: antibody specificity, functional motifs and secreted tumor suppressors. Nat Genet 1996, 13:266-268.

Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ and Risch N. An association between the risk of cancer and mutations in the HRAS1 minisatellite locus N Engl J Med 1993, 329: 517-523.

Kuschel B, Köchli OR, Niederacher D, Müller H, Beckmann MW: Hereditary cancer syndromes in gynecology: what the practitioner needs to know! Schweiz Med Wochenschr 2000,130 (10): 362-375.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A and Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & Dev* 1997, 11:847-862.

Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, Phelan CM, Cochran C, Gumbs C, Seal S, Barfoot R, Collins N, Bignell G, Patel S, Hamoudi R, Larsson C, Wiseman RW, Berchuck A, Iglehard JD, Marks JR, shworth A, Stratton JR and Futreal PA. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancer. *Nat Genet* 1996, 13:238-240.

Langston AA, Malone KE, Thompson JD, Daling JR and Ostrander EA. BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med* 1996, 334:137-142.

Lee H, Trainer AH, Friedman LS, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Ponder BA and Venkitaraman AR. Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, *Brca2*. *Mol Cell* 1999, 4(1):1-10.

Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 1993, 623-651.

Lidereau R, Callahan R, Dickson C, Peters G, Escot C and Ali IU. Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogen Res* 1988, 2:285-291.

Lohmann D und Hosthemke B. Genetik des Retinoblastoms. *Medgen* 1998, 10:278-282.

Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S and Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2) dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:11364-11369.

Mancini DN, Rodenhiser DI, Aisnworth PJ, O'Malley FP, Singh SM, Xing W and Archer TK. CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene* 1998, 16:1161-1169.

McAllister KA, Haugen-Strano A, Hagevik S, Brownlee HA, Collins NK, Futreal PA, Bennett LM and Wiseman RW. Characterization of the rat and mouse homologues of the BRCA2 breast cancer susceptibility gene. *Cancer Res.* 1997, 57(15):3121-3125.

McAllister KA, Ramachandran S, Haugen-Strano A, Fiedorek FT Jr and Wiseman RW. Genetic mapping of the Brca2 breast cancer susceptibility gene on mouse chromosome 5. *Mamm Genome* 1997, 8(7):540-541.

McGuire WL and Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992, 326:1756-1761.

Medina D, Stephens LC, Bonilla PJ, Hollmann CA, Schwahn D, Kuperwasser C, Jerry DJ, Butel JS and Meyn RE. Radiation-induced tumorigenesis in preneoplastic mouse mammary glands in vivo: significance of p53 status and apoptosis. *Mol Carcinog* 1998, 22(3):199-207.

Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney KA, Weber BL, Collins FS, Johnston C and Frank T. Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumors. *Nat Genet* 1995, 9:439-443.

Miki Y, Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto T and Nakamura Y. Mutation in BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nat Genet* 1996, 13:245-247.

Miki Y, Swenson J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A and Skolnick MH. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994, 266:66-71.

Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltmann M and Kouzarides T. Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 1997, 772-773.

Monteiro ANA, August A and Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 c-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:13595-13599.

Monteiro ANA, August A and Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 c-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:13595-13599.

Niederacher D und Beckmann MW. Bedeutung der LOH Analyse für die Identifizierung von Tumorgenen. *Medgen* 1998, 10: 256-258.

Niederacher D, Kiechle M and Arnold N. Molekular- und zytogenetische Techniken in der Onkologie. *Gynäkologe* 1999, 31:1019-1032.

Oefner PJ and Underhill PA. DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). "Current Protocols in Human Genetics" 1998, Suppl 19:7.10.1-7.10.12, Wiley, New York.

Ouchi T, Monteiro ANA, August A, Aaronson SA and Hanafusa H. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:2302-2306.

Özcelik H, To MD, Couture J, Bull SB and Andrulis IL. Preferential allelic expression can lead to reduced expression of BRCA1 in sporadic breast cancers. *Int J Cancer* 1998, 77:1-6.

Peelen T, van Vliet M, Bosch A, Bignell G, Vasen HF, Klijn JG, Meijers-Heijboer H, Stratton M, van Ommen GJ, Cornelisse CJ and Devilee P. Screening for BRCA2 mutations in 81 Dutch breast-ovarian cancer families. *Br J Cancer* 2000,82:151-156.

Peelen T, van Vliet M, Petrij-Bosch A, Mieremet R, Szabo C, van den Ouweland AM, Hogervorst F, Brohet R, Ligtenberg MJ, Teugels E, van der Luijt R, van der Hout AH, Gille JJ, Pals G, Jedema I, Olmer R, van Leeuwen I, Newman B, Plandsoen M, van der Est M, Brink G, Hageman S, Arts PJ, Bakker MM, Devilee P, et al. A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Human Genet* 1997, 60:1041-1049.

Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drüsedau M, Hogervorst FBL, Hageman S, Arts PJW, Ligtenberg MJL, Meijers-Heijboer H, Klijn JGM, Vasen HFA, Cornelisse CJ, van't Veer LJ, Bakker E, van Ommen GJB and Devilee P. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 1997, 17:341-3445.

Picard F. Molekularbiologische Analyse genetischer Veränderungen des Chromosoms 17 beim Mammakarzinom. Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf 1997.

Prescott DM und Flexer AS. Krebs, Fehlsteuerung von Zellen. Ursachen und Konsequenzen. Spektrum der Wissenschaften, 1990.

Puget N, Stoppa-Lyonnet GM and Mazoyer S. Screening for germline rearrangements and regulatory mutations in BRCA1 led to identification of four new deletions. *Cancer Res* 1999, 59:455-461.

Rajan JV, Wang M, Marquis St and Chodosh LA. BRCA2 is coordinately regulated with BRCA1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:13078-13083.

Rajan JV, Wang M, Marquis ST and Chodosh LA. Developmental expression of BRCA2 colocalizes with BRCA1 and is associated with proliferation and differentiation in multiple tissues. *Dev Biol* 1996, 184:385-401.

Rhei E, Bogomolny F, Federici MG, Maresco DL, Offit K, Robson ME, Saigo PE and Boyd J. Molecular genetic characterization of BRCA1 and BRCA2-linked hereditary ovarian cancers. *Cancer Res* 1998, 58:3193-3196.

Rice JC, Massey-Brown KS and Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 1998, 17:1807-1812.

Ruggeri BA, Huang L, Berger D, Chang H, Klein-Szanto AJ, Goodrow T, Wood M, Obera T, Heath CW and Lynch H. Molecular pathology of primary and metastatic pancreatic lesions: analysis of mutations and expression of the p53, mdm2, and p21/WAF-1 genes in sporadic and familial lesions. *Cancer* 1997, 79(4):700-716.

Saitoh S and Wada T. Parent-of-Origin Specific Histone Acetylation and Reactivation of a Key Imprinted Gene Locus in Prader-Willi Syndrome. *Am J Hum Genet* 2000, 66(6):1958-1962.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS and Shiloh Y. A single Ataxia Telangiectasia gene with a product similar to PI-3 Kinase. *Science* 1995, 268:1749-1753.

Schnürch HG, Lopens A and Diedrich K. Mehrschrittkarzinogenese als Modell der Tumorentwicklung. *Gynäkologe* 1998, 31:1033-1038.

Scully R, Anderson SF, Chao DM, Wie W, Ye L, Young RA, Livingston DM and Parvin JD. BRCA1 is a component of RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997b, 94:5605-5610.

Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J and Livingston DM. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear localisation and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 1997b, 90:425-435.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T and Livingston DM. Association of BRCA1 with RAD51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997a, 88:265-275.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T and Livingston DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997, 88(2):265-275.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T and Livingston DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997a, 88:265-275.

Serova-Sinilnikova OM, Boutrand L, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Pailherets, Dubois V, Lasset C, Janin N, Bignon YJ, Longy M, Maugard C, Lidereau R, Leroux D, Frebourg T, Mazoyer S and Lenoir GM. BRCA2 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in France. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1236-1239.

Shao N, Chai YL, Shyam E, Reddy P and Rao VN. Induction of apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1. *Oncogene* 1996, 13:1-7.

Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P and Bradley A. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by RAD51 in mice lacking BRCA2. *Nature* 1997, 386:804-810.

Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod SA, Couch F and Hoskink K. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. *JAMA* 1995, 273:535-541.

Sherr CJ and Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev* 1995, 9:1149-1163.

Shiohara M, El-Deiry WS, Wada M, Nakamaki, T, Takeuchi S, Yang R and Chen DL. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994, 11: 3781-3784.

Sinicrope FA, Roddey G, Lemoine M, Stephens LC, Frazier ML, Shen Y and Zhang W. Loss of p21 Waf1/Cip1 protein expression accompanies progression of sporadic colorectal neoplasms but not hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Clin Cancers* 1998, 4(5): 1251-1261.

Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L and King MC. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* 1996, 6:1029-1049.

Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Wu GS, Licht JD, Weber BL and El-Deiry WS. Arrest of cell cycle by the tumor suppressor BRCA1 requires the CDK inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. *Nature* 1997, 389:1189-190.

Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A, Bottega S, Wong B, Mendelsohn J and Koff A. Formation of p27-cdk-complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ* 1996, 7: 135-146.

Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essioux L, Pages S, Ithier G, Ligot L, Fourquet A, Salmon RJ, Clough KB, Pouillart P, Bonaiti-Pellie C and Thomas G. BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1021-1030.

Taylor I, Sorrooshian M, Wangoo A, Haynes AR, Kotecha D, Mitchell and Shaw RJ. Platelet-derived growth factor- β mRNA in human alveolar macrophages in vivo in asthma. *Eur Respir J* 1994, 7:1966-1972.

Thakur S, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T, Yao J, Farid LM, Couch FJ, Wilson RB and Weber BL. Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 1997, 17:444-452.

The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group. The exon 13 duplication in the BRCA1 gene is a founder mutation present in geographically diverse populations. *Am J Hum Genet* 2000, 67:207-212.

Theillet C, Roy X, De Lapeyriere O, Grosgeorges J, Adnane J, Raynaud S, Simony-Lafontaine J, Goldfarb M, Escot C, Birnbaum D and Gaudrauy P. Amplification of FGF-related genes in human tumors: possible involvement of HST in breast carcinomas. *Oncogene* 1989, 4:915-922.

Thomas JE, Smith M, Tonkinson JL, Rubinfeld B and Polakis P. Induction of phosphorylation on BRCA1 during the cell cycle and after DNA damage. *Cell Growth Diff* 1997, 8:801-809.

Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Yamamoto H, Toyoshima K, Yamamoto T, Yokata J, Yoshida T, Sakamoto H, Terada M, Sugimura T, Van de Vijver M and Nusse R. The molecular biology of breast cancer. *Biochem Biophys Acta* 1989, 1072:33-50.

Varley JM, Evans DG and Birch JM. Li-Fraumeni syndrome – a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 1997, 76: 1-14.

Vaughn JP, Cirisano FD, Huper G, Berchuck A, Futreal PA, Marks JR and Iglehart JD. Cell cycle control of BRCA2. *Cancer Res* 1996, 56(20):4590-4594.

Vidal MJ, Loganzo F Jr, de Oliveira AR, Hayward NK and Albino AP. Mutations and defective expression of the WAF1 p21 tumour suppressor gene in malignant melanomas. *Melanoma Res* 1995, 5 (4):243-250.

Vehmanan P, Friedman LS, Eerola H, McClure M, Ward B, Sarantaus L and Kainu T. Low proportion of BRCA1 and BRCA2 mutations in Finnish breast cancer families: evidence for additional susceptibility genes. *Hum Mol Genet* 1997, 6: 2309-2315.

Vogelstein B and Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992, 70:523-526.

Wagener C. Einführung in die molekulare Onkologie : Veränderung und Wirkung von Tumorgenen und Tumorproteinen. Thieme-Verlag, 1996.

Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg T, Caux V, Moeslinger R, Langbauer G, Borg A and Oefner P. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics* 1999, 62:1-8.

Wagner TM, Hirtenlehner K, Shen P, Moeslinger R, Muhr D, Fleischmann E, Concin H, Doeller W, Haid A, Lang AH, Mayer P, Petru E, Ropp E, Langbauer G, Kubista E, Scheiner O, Underhill P, Mountain J, Stierer M, Zielinski C and Oefner P. Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. *Hum Mol Genet* 1999, 8: 413-423.

Wang SC, Lin SH, Su LK and Hung MC. Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 234(1):247-251.

Welch PL, Owens KN and King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *TIG* 2000, 16:69-74.

Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR, Ander KH, Press MF, Clarke K, Karlan B, Chen JJ, Scully R, Livingston DM, Zuch RH, Kanter MH, Cohen S, Calzone FJ and Slamon DJ. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet* 1999, 21:236-240.

Wolf G. Genetische Beratung. In: *Handbuch der Molekularen Medizin*. Bd. 7, Monogene Erbkrankheiten 2. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2000.

Wong H, Anderson D, Cheng T and Riabowol KT. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method. *Anal Biochem* 1994, 223:251-258.

Wooster R, Mangion J, Eeles R, Smith S, Dowsett M, Averill D, Barrett-Lee P, Easton DF, Ponder BA and Stratton MR. A germline mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifenshtein syndrome. *Nat Genet* 1992, 2(2):132-134.

Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM and Baer R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 1996, 14:430-440.

Xu CF, Brown MA, Chamber JA, Griffiths B, Nicolai H and Solomon E. Distinct transcription start sites generate two forms of BRCA1 mRNA. *Hum Mol Genet* 1995, 4:2259-2264.

Xu CF, Chambers JA and Solomon E. Complex regulation of the BRCA1 gene. *Am Soc Biochem Mol Biol* 1997, 272(34): 20994-20997.

Xu X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T and Deng CX. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* 1999, 3(3):389-395.

Zeng YX, Somasundaram K and El-Deiry WS. AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21^{WAF1/CIP1} expression. *Nat Genet* 1997, 15:78-82.

Zhang H, Hannon GJ and Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes & Dev* 1994, 8:1750-1758.

Zheng W, Luo F, Lu JJ, Baltayan A, Press MF, Zhang ZF and Pike MC. Reduction of BRCA1 expression in sporadic ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000, 76:294-300.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A.L.F.	„Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer“
Abb.	Abbildung
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BIC	„Breast Cancer Information Core“
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
BRCA	„breast cancer gene“
C	Cytosin
ca.	circa
Cd	Codon
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
dATP	desoxyadenintriphosphat
dCTP	desoxycytosintriphosphat
del	Deletion
dGTP	desoxyguanintriphosphat
d. h.	das heißt
DHPLC	„denaturing high performance liquid chromatography“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
dTTP	desoxythymintriphosphat
Dupl.	Duplikation
E	Östrogen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMD	„enzymatic mutation detection“
ER	Östrogenrezeptor
et al.	und andere
evtl.	eventuell
FCS	fötale Kälberserum
G	Guanin

ggf.	gegebenenfalls
i. a.	im allgemeinen
kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
LOH	„loss of heterozygosity“
MaCa	Mammacarcinom
max.	maximal
min.	Minute
ml	Milliliter
mt	mutant
µm	Micrometer
n	Anzahl
nm	Nanometer
NT	Nukleotid
o. g.	obengenannt
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“
PgR	Progesteronrezeptor
PIC	„percentage of informative cases“
PTT	„protein truncation test“
Q	Allelverhältnis
RAL	Raloxifen
RFLP	„restriction fragment length polymorphism“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
SNP	„single nucleotid polymorphism“
ss	Einzelstrang
SSCP	„single strand conformation polymorphism“
Std	Stunde
T	Thymin
Taq	Taq-Polymerase
TAM	Tamoxifen

TBE	Tris/Borat/EDTA
TEAA	Tetraethylamoniumacetat
TSG	Tumorsuppressorben
U	Unit
u. a.	unter anderem; und andere
UV	ultraviolett
UV	„unclassified variant“
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H.G. Bender danke ich für die Möglichkeit, im molekulargenetischen Labor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf wissenschaftlich arbeiten zu können.

Herrn PD Dr. Matthias W. Beckmann danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die engagierte Förderung meines weiteren beruflichen Werdegangs.

Herrn Prof. Dr. C.H. Hollenberg danke ich für die Übernahme des Koreferates und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Dr. Dieter Niederacher danke ich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben. Ich danke ihm auch für das Vertrauen, das er in meine Arbeit setzte und für die Verantwortung, die er mir übertrug.

Besonders danke ich Frau Dorothee Larbig, Frau Dr. Bettina Kuschel und Frau Heide Niesalla für die hervorragende Teamarbeit, ihre Unterstützung und die Freundschaft, die sich im Laufe unserer Zusammenarbeit entwickelt hat.

Ich danke meinen Laborkolleginnen und -kollegen, sowie unseren Medizindoktoranden für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Vor allem danke ich Frau Bettina Durst, Herrn Gernot Röder, Frau Judith Mertens und Frau Tessa Stender.

Herrn Dipl.-Phys. M. Wulfert (Klinik für Hämatologie/Onkologie) danke ich für die Überlassung der TGGE-Abbildungen.

Ich danke allen Mitarbeitern des BMFZ für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Susanne, Stefan und Annika für ihre Unterstützung und ihre Geduld, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9. ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, daß ich diese Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht habe.

10. ANHANG

10.1. Patientendaten

Tab.10.1: Klinische Daten der Patienten mit einem sporadischen Mammakarzinom

(T: Tumorgroße; N: Nodalstatus; M: Metastasen; ER: Östrogenrezeptor; PgR: Progesteronrezeptor)

lfd. Nr.	Erkrankungsalter	T	N	M	Grading	Histologie	ER	PgR
		0=unkn. 1=<2cm 2=2-5cm 3=>5cm	0=unkn. 1=neg. 2=pos.	0=unkn. 1=neg 2=pos	0=unkn 1=1 2=2 3=3		0=unkn. 1=neg 2=pos	0=unkn. 1=neg 2=pos
1	42	1	1	1	2	ductal, dcis	2	2
2	69	3	2	1	0	lobular	2	1
3	48	3	2	2	2	ductal	0	0
4	53	1	1	1	2	ductal, tubul.	2	2
5	48	2	2	2	3	ductal	1	1
8	61	2	2	1	2	ductal	0	0
14	56	2	1	1	3	ductal	1	1
15	43	2	2	2	2	lobular	1	2
16	42	2	1	1	3	ductal	1	1
17	41	1	1	1	2	ductal	2	2
18	54	2	2	2	3	ductal	1	1
19	74	2	0	0	2	mucinous	2	2
20	83	1	2	0	2	ductal	2	2
21	49	1	1	1	2	ductal	1	2
23	41	1	1	1	3	ductal	2	2
24	82	2	2	1	0	lobular	2	2
25	69	2	2	1	3	lobular	2	2
26	47	1	2	1	2	ductal	2	2
30	80	1	1	1	2	ductal	2	1
31	44	3	2	2	3	ductal	2	2
34	73	2	2	1	2	ductal	2	1
37	45	2	2	1	3	ductal	1	2
38	53	2	1	1	2	ductal	1	1
39		2	2	0	2	ductal	2	2
45	55	1	1	1	2	ductal	2	2
47	52	2	2	1	3	lobular	2	2
48	45	1	1	1	2	ductal	2	2
49	83	3	2	1	2	ductal	0	0
70	55	3	2	1	2	ductal	1	1
71	62	2	1	1	2	lobular	2	2
72		1	2	0	3	ductal	1	1
74	53	2	1	1	2	ductal	2	2
75	81	1	1	1	1	lobular	1	1
81	68	1	2	1	3	ductal	2	2
82	76	2	2	2	3	ductal	1	2
218	63	1	1	1	1	ductal	2	2
219	52	1	1	1	1	ductal	2	1
220	54	2	1	1	0	lobular	2	2
222	50	2	1	1	1	tubular	1	1
223	59	1	2	1	2	ductal	2	2
229	37	2	2	2	2	ductal	1	1
236	40	3	0	2	3	ductal	0	0
244	40	2	1	1	3	ductal	1	2

lfd. Nr.	Erkrankungsalter	T	N	M	Grading	Histologie	ER	PgR
248	46	2	2	1	3	medullar	1	1
251	37	2	0	2	2	ductal	1	1
252	49	1	2	1	3	ductal	2	2
253	77	2	2	0	0	lobular	2	2
254	57	3	2	0	3		0	0
255	?	3	0	0	3	0	0	0
256	85	1	1	1	2	lobular	0	0
258	72	1	2	1	1	ductal	2	2
259	81	2	1	1	2	duct./lobul.	2	2
260	40					M. Paget		
261	68	1	1	1	2	lobular	2	2
262	67	1	1	1	1	ductal	2	1
263	75	3	2	0	0	ductal	2	2
264	?	0	0	0	0		0	0
266	53	0	2	1	0	lobular	2	2
267	48	2	2	1	0	lobular	2	1
268	57	2	2	0	2	ductal	2	2
269	38	2	2	1	3	ductal	1	1
271	55	1	1	0	2+3	ductal	1	1
277	60	1	1	1	2	ductal	1	1
281	63	2	1	0	2	lobular	1	1
286	?	0	0	0	0		0	0
287	40	2	1	1	2	duct, tubul.	2	2
317	81	3	1	1	3	ductal	1	1
322	57	0	0	0	0		0	0
329	47	2	1	1	2	ductal	2	2
331	56	2	2	1	2	ductal	2	2
333	56	1	1	1	3	medullar	1	1
335	?	0	0	0	0		0	0
336	?	0	0	0	0		0	0
340	39	2	1	1	3	adenom.	1	1
343	55	2	1	0	1	duc.,lob,tub.	2	2
344	57	2	1	1	2	ductal, sclero.Aden.	2	2
345	62	2	1	1	3	lobular	2	0
347	75	2	2	1	0	lobular	2	2
351	49	2	2	1	3	ductal	2	2
352	47	2	1	1	2	ductal	2	2
353	68	1	1	1	3	lobular	1	2
354	60	2	2	1	2	tubular	2	2
355	58	2	2	0	3	microcellul.	2	2
357	53	2	1	1	2	lobular	2	2
359	51	2	1	1	0	lobular	2	2
360	72	1	1	0	2	0	2	2
361						fibrozyst.Mastop		
364	70	2	1	1	2	ductal	2	2
365	39					fibrozyst, papilloma		
366	61	2	1	1	2	ductal	2	2
368	51	3	2	2	3	lobular	1	1
372	55	1	1	1	0	mucinous	2	2
374	49	2	1	1	2	ductal	0	0
375	42	2	0	1	0	lobular	2	2
377	68	2	1	1	2	ductal	2	1
381	63	2	1	0	2	ductal	1	2
382	58	2	1	1	2+3	ductal	1	2
385	49	2	1	1	2	ductal	2	2
387	61	2	2	1	3	ductal	1	1

Tab. 10.2: Übersicht über die Karzinomerkrankungen in den untersuchten Familien
(angegeben ist das Lebensalter zum Zeitpunkt der Erkrankung)

Familie	Mammakarzinome	Ovarialkarzinome	Kategorie
23	35 J., 47 J., 50 J., 57 J.		A1
33	58 J., 37 J., 66 J., ? J.		C1
37	47 J., 50 J., 47 J. beidseits		A1
45	71 J., 42 J., 50 J., 52 J.		C1
51	27 J., 43 J.		A1
57	77 J., 27 J., 62 J.		C1
71	35 J., 27 J., 27 J.		A1
76	7 MaCas, 3 unter 50 J.		A1
83	33 J., 35 J.		A1
91	59 J., 62 J., 35 J., 36 J.	59 J., 64 J., 43 J.	B
110	49 J., 53 J., 41 J. beidseits	57 J.	B
176	45 J., 46 J., 50 J.		A1
40	55 J., 54 J., 81 J., 35 J.		C1
55	52 J., 47 J.		C1
56	29 J., 51 J.		C1
60	53 J., 46 J., 59 J., 54 J.		C1
67	50 J., 49 J.		C1
73	59 J., 51 J.		C3
75	32 J., 43 J.		A1
85	39 J., 37 J.		A1
88	48 J., 51 J.		C1
41	54 J., 57 J., 70 J.		C3
43	59 J., 57 J., 53 J.		C3
49	45 J., 49 J., 75 J., 75 J., 59 J., 68 J., 43 J., ? J.		A1
84	42 J., 44 J., 52 J.		A1
89	39 J., ? J.	61 J.	B
93	48 J., 50 J.		C1
94	44 J., ? J.		C1
100	31 J., 48 J., 51 J.		A1
149	37 J., 46 J., 51 J., 66 J.	62 J.	B
3		51 J., 56 J., 45 J., 67 J.	B
8	66 J., 70 J.		C3
18	37 J., 78 J.		C1
27	41 J., 45 J.		A1
31	57 J., 45 J.		C1
38	42 J., 48 J.		A1
44	52 J., 42 J.	61 J.	B
52	47 J., 50 J.		C1
63	51 J., 62 J.		C3
64	57 J., 46 J.		C1
66	54 J., 48 J.		C1
70	63 J., 38 J.		C1
77	40 J.	42 J.	B
78	49 J., 54 J.		C1
82	44 J., 55 J.		C1
95	43 J., 50 J.		C1
96	52 J., 61 J., 82 J.		C3
98	47 J., 53 J., 29 J.		A1
99	2 x männl. MaCa 50 J., 45 J.		A2
102	35 J., 37 J.		A1

10.2. Positivkontrollen für *BRCA1* und *BRCA2*

Tab 10.3: *BRCA1* Positivkontrollen

Fragment	Kontrolle	Fragment	Kontrolle
2	184 insA	11L	A 3667 G
	185 delAG		3741 insA
3	243delA		G 3780 T
5	T 300 G		3819 delGTAAA
	314 delG		3823 delA
	G 331+1 T		3875 delGT
	IVS5+3 A->G: 309 del22		3875 delGT
6	T 388 C	11M	A 4071 G
	IVS5-12 A->G		A 4158 G
7	442 insA		4184 delTCAA
8	Exon8 -34 C->T	12	4274 ins10
	613 insT		4284 delAG
	G 628 A		C 4302 T
9	Exon9 -63 delT		G 4304 A
10	IVS10 +16 C->T	13	C 4341 T
11A	794 delT		T 4427 C
	A 835 G	14	4512 delA
	962 del4bp		Cd 1465
11B	962 del4bp	15	4650 delCA
	A 1186 G		G 4654 T
	1246 delA	16	C 4808 G
11C	1459 insG		A 4956 G
	T 1540 G		T 5074 C
11D	C 1605 T		G 5075 A
	C 1653 T	17	5136 delCAC
	C 1740 T		5149 delCTAA
	C 1806 T		A 5172 G
11E	1996 Dupl (TAGT)	18	G 5199 T
11F	G 2196 A		C 5214 T
	C 2201 T		5256 delG
11G	T 2430 C		IVS17-52 C->T
	C 2457 T	19	5296 del4bp
	2520 delGT		A 5298 T
	G 2531 C	20	5382 insC
	C 2596 A		IVS20+60 ins12
11H	C 2731 T		IVS20+78 G->A
	G 2841 T	21	5433 delT
11I	3222 insT	22	IVS21-6 T->G: delEx22
	3228 insT	23	T 5548 G
	A 3232 G		IVS22-20 T->C
11J	A 3310 G	24	C 5622 T
11K	3600 del11bp		G 5623 C
	3604 delA		T 5628 C

Tab 10.4: *BRCA2* Positivkontrollen

Fragment	Kontrolle	Fragment	Kontrolle
2	G 203 A	11J	5547 del24bp
3	A 353 G		C 5683 T
	G 451 C	11K	C 5683 T
4	A 653+67 C		5797 del5bp
5 + 6	G 744 T		T 5824 C
	T 654-74 C		C 5873 A
	744+IVS6+1delG		C 5910 G
7	G 810 A		5946/50 delCT
9	928 delT		C 5972 T
	IVS9+65 delT	11L	5946/50 delCT
10.1	A 1093 C		C 5972 T
	C 1206 A		G 6085 T
	C 1239 G		C 6092 A
10.2	C 1342 A		6174delT
	C 1430 G		A 6265 T
	1529 del4bp		C 6293 G
	C 1570 T		C 6328 T
	A 1593 G	11M	C 6328 T
	A 1613 G		G 6397 T
10.3	1725 delG		6498 delTA
	G 1917 A	11N	6980 insT
	2041 delA	13	C 7180 T
	IVS10+12 delT	14.2	A 7470 G
11A	C 2192 G		A 7470 G; +53 C->T
	IVS2138-51 G->T	15	G 7709 A
	IVS2138-74 T->C		C 7786 T
11B	T 2457 C	16	IVS15-116 delTAG
11C	A 2719 G		Pos. 7986 G->A
	C 2765 G	17	IVS16-14 T->C
	3034 del4		A 8034 -2G
	3036 delACAA		C 8034 C
11D	A 3058 T		8074 delT
	3034 del4		8168 delT
	3036 delACAA	18	G 8395 C
	A 3058 T		A 8396 T
	A 3199 G		G 8410 A
11E	3243 ins2	20	T 8731 C
	A 3624 G		8774 delA
	C 3743 T		A 8795 C
11F	G 3744 A		C 8800 T
11G	C 4035 T	21	IVS21+16 G->A
	G 4186 T	22	IVS21-66 C->T
	T 4229 A		G9079 A
11H	G 4486 T	23	9200 del126
	G 4486 T		9237 delTC
	4677 delA		9326 insA
	4706 del4bp	24	9481 insA
	4782 delA	25	A 9599 T
11J	4821 insA	27.1	A 10204 T
	C 5427 T	27.2	T 10479 C
	5445 del5bp		C 10590 A

10.3. Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2*

Tab. 10.5: Übersicht über die innerhalb des deutschen Konsortiums gefundenen *BRCA1* Mutationen (*eingereicht von Zentren des Deutschen Konsortiums)

Ex	Nukleotid	Effekt	Typ	BIC	Z	# der Allele	ID	Kategorie
2	120A->G	M1V	MS	j	K	1	K0268	B
2	185insA	40X	FS	j	W	1	G95457	B
2	185delAG	39X	FS	j	B	2	MDC30,B287	A1,B
					H	1	B958B	A1
					K	2	K0311,A0024	B,C1
5	300T->G	C61G	MS	j	BN	3	BN1,BN18, BN248	A1,B, C2
					B	1	B233	B
					K	3	K0001,K0155; K0307	A1,A1, A1
					M	1	186	B
					U	1	UL5	A1
					D	1	86	A1
5	310G->A	C64J	MS	j	BN	1	BN157	C1
5	314delG	68X	FS	j*	L	1	107/99	A1
5	IVS5+1G->T	64X	Sp	j	U	1	UL136	D
5	IVS5+3A->G	64X	Sp	j	W	1	G95581	B
					BN	1	BN260	B
6	IVS5-12A->G	87X	Sp	j	W	1	G95654	B
6	339C->T	Q74X	NS	j*	K	1	A0013	A1
7	448insA	113X	FS	j	W	1	G961205	A1
					M	1	251	A1
8	613insT	181X	FS	j*	U	1	UL71	A1
8	624C->T	169X	NS	j	K	1	K03018	A1
11	817-847dupl31bp	247X	FS	n	K	1	K0222	C1
11	962del4	297X	FS	j	K	1	K108	B
					M	1	M256	B
11	969ins7bp	288X	FS	j*	U	1	UL132	B
					M	1	M290	B
11	1158delCT	348X	FS	n	MS	1	MS248	B
11	1246delA	393X	FS	j	BN	1	BN9	B
11	1458insG	455X	FS	j*	D	1	25	A1
11	1540T->G	L474X	NS	n	M	1	129	B
11	1740C->T	Q541X	NS	j*	D	1	120	B
					MS	1	MS107	A1
					H	1	WB	B
					K	1	K0317	A1
11	1806C->T	Q563X	NS	j	K	2	K0095,A0030	B,B
					F	1	F1920	A1
					B	1	B119	B
11	1996ins4bp	627X	FS	j	D	1	28	B
11	2072delGAAA	699X	FS	j	BN	1	BN199	D
11	2457C->T	Q780X	NS	j	B	1	B7	B
					K	2	K0004,K0298	A1,B
					MS	3	MS095,271, 187	C2,B, B
11	2524delITG	808X	FS	j*	U	2	UL180, UL200	A1,B
11	2530delAG	808X	FS	j	U	1	UL154	B
11	2795del4bp	998X	FS	j	K	1	A0022	B
11	2804delAA	901X	FS	j	H	1	GB(1)	B
					MS	1	MS275	A1
11	2841G->T	E908X	NS	j	U	1	UL135	B
11	3135del4	1022X	FS	j	M	1	208	A1
11	3222insT	1037X	FS	n	MS	1	MS074	B
					D	1	72	B
11	3600del11bp	1163X	FS	j	K	2	A003,A005	B,B
					W	2	G97211, G98426	B, B
					M	1	161	B

Ex	Nukleotid	Effekt	Typ	BIC	Z	# der Allele	ID	Kategorie
11	3604delA	1209X	FS	j	D MS W K	1 2 1 1	17 MS222, MS268 G981281 K237	A1 B,B B A1
11	3726C->T	R1203X	NS	j	W	1	G99091	B
11	3731delA	1209X	FS	j	K	1	A0029	B
11	3743insA	1218X	FS	j*	BN	1	BN5	B
11	3780G->T	E1221X	NS	j	H	1	B1669A	B
11	3819del5bp	1242X	FS	j	M L BN K D	1 1 1 2 1	145 27/99 BN150 A0002, K0143 42	B B B B,C2 A1
11	3823delA	1263X	FS	n	W	1	G981304	A1
11	3875del4	1262X	FS	j	K	1	K0135	B
11	3875delGT	1253X	FS	n	B	1	B250	A1
11	4020delAG	1301X	FS	j	B	1	B193	B
11	4184del4bp	1364X	FS	j	M U W B D	1 2 1 2 1	60 UL56,UL156 G971079 B205,B36 61	B A2,B B A1,A1 B
12	4274ins10bp	1393X	FS	n	W	1	G970415	B
12	4284delAG	1389X	FS	j	B	1	MDC29	B
12	4302C->T	Q1395X	NS	j	K B	1 1	A0001 B100/MDC42	A1 B
					H U	1 1	B2090 UL139	A1 B
12	4304G->A	??	Sp	j	K M W	1 1 1	K0119 53 G95-234	B C1 C3
13	4341C->T	Q1408X	NS	j	W U	1 2	G971065 UL207,UL179	A1 A1,A1
13	4419insA	1435X	FS	j	K	1	K0196	A1
15	4652delCA	1519X	FS	n	M MS	3 1	3,141, 209 MS064	A1,B, A1 A1
16	4808C->G	J1563X	NS	j	H W	1 1	B1380A G971012	A1 B
17	5149del4bp	1678X	FS	j	BN	1	BN91	B
18	5199G->T	E1694X	NS	j	M	1	132	A1
18	5256delG	1713X	FS	j	D	1	50	A1
19	IVS18-2delA	??	Sp	n	K	1	K0220	B
19	5296del4bp	1728X	FS	j	B	1	B52	B
19	5298A->T	K1727X	NS	j	BN K	1 1	BN26 A0026	C2 A1
20	5370C->T	R1751X	NS	j	U	1	UL245	C1
20	5382insC (5385insC)	1829X	FS	j	W M B U K MS F H	7 8 8 4 6 3 2 3	G95349,G97285,G956 50,G95780,G96982,G9 745,G970689 16,75,77,89,136,169, 245,386 B15,B357,B63,B341,B 74,B127,B200,B380 UL24,UL125, UL228, UL255 A0028,K0081,K0102,K 0124,A0025,A0031 MS076,MS315,MS177 F2049,F1843 B1536A,B1661A,B173 4A	5B,2A1 4B,4A1 B,6A1,C1 3B,A1 4B,2A1 B,A1,A1 B,B 1B,2A1
20	IVS20+1G>A	??	Sp	j*	MS	1	MS176	A1
21	5434delT	1792X	FS	n	K	1	K0089	A1

Ex	Nukleotid	Effekt	Typ	BIC	Z	# der Allele	ID	Kategorie
22	IVS21-36del510	1804X	FS	j	D	1	119	B
22	IVS21-6T->G	1804X	Sp	n	W	1	G970866	B
24	5611delC	1833X	FS	j*	K	1	K003	C1
24	5622C->T	R1835X	NS	j	B M L	4 1 1	B3,B59,B101,B29 205 L303	2A1,2B B A1

Tab. 10.6: Übersicht über die innerhalb des deutschen Konsortiums gefundenen *BRCA2* Mutationen (*eingereicht von Zentren des Deutschen Konsortiums)

Ex	Nukleotid	Effekt	Typ	BIC	Z	# der Allele	ID	Kategorie
2	232delC	24X	FS	n	M	1	215	B
3	399insA	63X	FS	n	K	1	K0284	A1
5	690delAA	157X	FS	j	BN	1	BN196	B
6	744delGG->T	see text	Sp	n	BN	1	BN97	C1
6	IVS6+2T->A	see text	Sp	n	W/M	1	M296	A1
8	862delAG	213X	FS	j	M	1	286	A1
9	928delT	240X	FS	j	W	1	G96788	A2
10	1529del4bp	458X	FS	j	MS L M	2 1 1	114,281 183/99 242	B,A2 A1 B
10	1633delGA	470X	FS	n	MS	1	MS250	A1
10	1727delG	508X	FS	n	W	2	G97918, G970621	A1, A1
10	2041insA	615X	FS	j	B K BN	2 1 1	MDC31,B231 A0011 BN309	A1,A2 B B
10	2041delA	613X	FS	j	W	1	GF011/001	B
11	2996insT	935X	FS	n	K	1	K0352	A2
11	3034del4bp	958X	FS	j	W M B H	2 1 1 1	GF057/3,G97256 180 B299 B2792A	A1,A1 A1 A1 B
11	3243insTT	1043X	FS	n	W	1	G970390	B
11	3670C->T	Q1148X	NS	n	U	1	UL221	B
11	4077del4bp	1283X	FS	n	BN	1	BN262	A1
11	4093del4bp	1289X	FS	j	BN	1	166	A1
11	4677delA	1485X	FS	j	MS	1	127	C1
11	4706del4bp	1502X	FS	j	L BN K	1 1 1	176/99 BN98 K0301	C2 A1 B
11	4782delA	1542X	FS	j*	BN	1	BN59	A1
11	4815insA	1533X	FS	n	F	1	F1357	B
11	5343del5bp	1715X	FS	n	B	1	B222	A1
11	5445del5bp	1739X	FS	j	U	1	UL126	B
11	5445del8bp	1739X	FS	j	D	1	176	A1
11	5466insT	1747X	FS	j	U	1	UL107	A1
11	5797del5bp	1858X	FS	j	W	1	????	A1
11	5873C->A	S1882X	NS	j	F M	1 1	F1965 M195	A1 A1
11	5910C->G	J1894X	NS	j	W U	2 1	G95653,GF033 UL169	B,B A1
11	5950delCT	1909X	FS	j	BN U K	1 1 1	BN35 UL40 K0311	A1 B A1
11	6092C->A	S1955X	NS	j	F	1	F1715	A1
11	6174delT	2003X	FS	j	H	1	B1809A	C3
11	6265A->T	K2013X	NS	n	W	1	GF053/003	A1
11	6495delGCA->C	2090X	FS	n	K	1	K0223	A1
11	6498delTA	2098X	FS	j	F	2	F1433,2866	A2,C1

Ex	Nukleotid	Effekt	Typ	BIC	Z	# der Allele	ID	Kategorie
11	6601insA	2128X	FS	n	W	1	G99685	C3
11	6633delCTTAA	2137X	FS	j	D	1	110	B
11	6676insTA	2168X	FS	n	F	1	F2844	A1
					M	1	M223	B
11	6982insT	2260X	FS	n	M	1	M45	A1
14	7489C->T	Q2421X	NS	n	K	1	K0218	C1
16	7986G->A	W2586X	NS	n	MS	1	078	A1
17	IVS16-2A->G	tp	Sp	j	F	1	F1156	A1
					K	1	K0333	B
17	8074delT	2647X	FS	n	BN	1	BN21	B
17	8141del5bp	2638X	FS	j	H	1	B1908A	A2
20	8774delA	2862X	FS	n	BN	1	BN100	A1
21	8923C->T	Q2899X	NS	n	B	1	B328	A2
22	IVS21-1G->A	??	Sp	n	M	1	M210	C1
23	9200del126	3044X	FS	j	W	1	G971047	A2
23	9326insA	3043X	FS	j	U	1	UL201	A1
					K	1	K0083	A1
					MS	1	146	A2
					M	1	165	A1
23	9327delTC	3042X	FS	j*	BN	1	BN51	A1
23	9345G->A	??	Sp	j	BN	1	BN317	A1
24	9481insA	3110X	FS	j	F	1	F2188	C1
27	9894delT	3248X	FS	j	W	1	G99678	A1

Tab. 10.7: Übersicht über die innerhalb des deutschen Konsortiums gefundenen „Unclassified Variants“ (UVs) im *BRCA1* Gen (*eingereicht von Zentren des Deutschen Konsortiums)

Ex.	Nukleotid	Effekt	BIC	Zentrum	# der Allele	ID	Kategorie
2	129 T->C	S4P	0x	WÜ	1	G99349	A1
6	388 T->C	I90T	1x*	WÜ	1	G950309	B
8	628 G->A	R170Q	1x	B	1	B235	B
11	835 A->G	H239R	0x	B	1	B55	A1
11	1605 C->T	R496C	9x*	B	1	B46	A1
11	1653 C->T	L512F	0x	MS	1	MS37	C3
11	2531 G->C	Q804H	2x	K	1	O157	A1
11	2596 C->A	T826K	4x	BN	1	124	C1
11	2683G->A	Q855P	0x	L	1	130	C2
11	4071 A->G	I1318V	0x	MÜ	1	M100	B
16	5074 T->C	M1652T	2x	HD	1	B1419A	B
17	5136delCAC	H1673del	1x	B	1	B219	B
17	5172 A->G	T1685A	0x	MÜ	1	M222	A1
18	5214 C->T	R1699W	5x*	BN	3	BN78.2	B
				B/L		B88/506	A1/C1
23	5548 T->G	V1810G	1x*	B	1	MDC81	A2
24	5623 G->C	R1835P	0x	MS	1	MS140	B
24	5628 T->C	W1837R	2x*	K	1	K0282	A1

10.4. LOH Daten

Tab 10.8: LOH BRCA1/2 und TP53 in sporadischen Mammakarzinomen

(n.i.: nicht informativ; O: kein LOH)

ifd. Nr.	p53- <i>Alu</i> (TP53)	TP53 (TP53)	D17S855 (BRCA1)	D17S1322 (BRCA1)	D17S1323 (BRCA1)	D13S1695 (BRCA2)	D13S1699 (BRCA2)	D13S1701 (BRCA2)
1	n.i.		O					
2	O		O	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	O
3	O	O	O	-	O	O	n.i.	O
4	n.i.		O	n.i.	O	O	O	LOH
5	n.i.	LOH	LOH	n.i.	-	n.i.	LOH	O
6	O	O	n.i.	O	n.i.	O	n.i.	LOH
8	O	O	O	n.i.	O	O	O	O
9	n.i.		n.i.	O	n.i.	O	n.i.	O
10	n.i.		O	O	O	O	O	O
11	O	n.i.	O	-	n.i.	O	O	O
13	LOH	O	n.i.	n.i.	O	n.i.	LOH	O
14	LOH	n.i.	LOH	LOH		LOH	LOH	LOH
15	LOH		LOH		n.i.	O	LOH	n.i.
16	LOH	LOH	n.i.	O	n.i.	O	O	O
17	O	O	O	n.i.	n.i.	O	O	n.i.
18	O	O	O	O				
19	LOH		O					
20	-	-	LOH	-				
21	O	O	O	O	O	O	O	O
22	LOH	O	O	-	n.i.	O	O	O
23	n.i.		O		LOH	O	n.i.	O
24	n.i.		O	n.i.	n.i.	O	n.i.	LOH
25	LOH		LOH			O	O	O
26	LOH	LOH	LOH	-		O	O	O
28	n.i.		O	O	O	O	O	O
29	n.i.	LOH	LOH	LOH		n.i.	O	n.i.
30	LOH	LOH	LOH	LOH		n.i.	n.i.	n.i.
31	LOH	LOH	n.i.	n.i.	O	n.i.	LOH	O
33	O	O	O	O	n.i.	O	n.i.	O
34	n.i.	O	O	O	n.i.	O	n.i.	n.i.
36	n.i.	O	O	O	O	O	n.i.	O
37	O	O	LOH	n.i.		O	n.i.	n.i.
38	n.i.	LOH	O	O	LOH	n.i.	O	O
39	LOH	LOH	n.i.	O	O	O	n.i.	n.i.
41	n.i.	O	n.i.	O				
45	n.i.		O	O	n.i.	O	n.i.	O
46	n.i.	O	n.i.	O	O	O	n.i.	O
47	n.i.	LOH	LOH	-		n.i.	O	n.i.
48	n.i.	LOH	LOH	-		LOH	O	LOH
49	n.i.	O	O	O	O	O	O	O
50	LOH	LOH	O	O		O	n.i.	O
54	LOH	LOH	LOH	LOH		O	O	O
55	O	O	O	O	O	O	n.i.	O
56	n.i.	LOH	n.i.	n.i.	LOH	n.i.	n.i.	n.i.
57	n.i.	n.i.	O	O				
59	n.i.	n.i.	LOH	-		O	n.i.	LOH

lfd. Nr.	p53-Alt (TP53)	TP53 (TP53)	D17S865 (BRCA1)	D17S1322 (BRCA1)	D17S1323 (BRCA1)	D13S1695 (BRCA2)	D13S1699 (BRCA2)	D13S1701 (BRCA2)
60	LOH	O	O	O	O	n.i.	LOH	LOH
61	O		O	O	O	O	n.i.	O
62	n.i.	n.i.	O	O	O	O	n.i.	O
66	n.i.	LOH	n.i.	LOH		n.i.	LOH	LOH
67	-	-	O	O	O	O	n.i.	O
69	n.i.	O	O	O	O	O	O	O
70	n.i.	LOH	LOH	LOH		O	LOH	O
71			O	O	O	O	LOH	n.i.
72	n.i.	O	n.i.	-	O	n.i.	n.i.	O
74	n.i.	n.i.	O	O	O	O	LOH	O
77	n.i.	n.i.	-	-	O	n.i.	LOH	
80	-	-	LOH	-	n.i.	LOH	n.i.	O
81	n.i.	LOH	O	LOH				
82	n.i.	LOH	LOH	LOH		LOH	n.i.	n.i.
83	n.i.	LOH	O	O				
84	-	-	O	O	LOH	O	O	O
85	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	O	O	O
86	-	-	LOH	LOH		O	n.i.	LOH
88			O					
89			O					
90			O					
91			LOH					
92			O					
93			O					
95			n.i.					
96			n.i.					
100	n.i.		LOH					
101	n.i.	O	O	O				
102	n.i.		n.i.					
103	O	O	n.i.	O				
104	n.i.	O	O	O				
106	LOH	O	O	n.i.				
107	O	LOH	O	O				
108	LOH	LOH	LOH	n.i.				
110	LOH	LOH	LOH	LOH				
111	n.i.	LOH	LOH	LOH				
113	O		O					
115	n.i.	O	O	O				
116	LOH	LOH	O	O				
118	LOH	LOH	O	O				
119	n.i.	O	O	n.i.				
120	LOH	LOH	O	O				
124	LOH	n.i.	LOH	LOH				
125	LOH		LOH					
127	n.i.	O	O	-				
128	O	O	LOH	n.i.				
130	n.i.		LOH					
131	n.i.	O	O	O				
132	LOH	LOH	LOH	LOH				
138	O	n.i.	O	O				
139	n.i.	O	n.i.	n.i.				
140	n.i.	LOH	O	O				
141	LOH	O	O	O				
142	LOH		O					
143	O		O					
146	LOH	LOH	LOH	O				

lfd. Nr.	p53-Alu (7P53)	TP53 (7P53)	D17S865 (BRCA1)	D17S1322 (BRCA1)	D17S1323 (BRCA1)	D13S1695 (BRCA2)	D13S1699 (BRCA2)	D13S1701 (BRCA2)
262	O	O	O	O	n.i.	O	O	O
263								
264	O		O	O				
265	n.i.		O	n.i.				
266	O	O	n.i.	n.i.	n.i.	LOH	LOH	LOH
267	n.i.	LOH	O	n.i.	n.i.	n.i.	LOH	n.i.
268			LOH	LOH		LOH	O	O
269			O	O	O	O	LOH	LOH
271			n.i.	LOH	LOH			
273			O	n.i.	n.i.			
277								
281			n.i.	n.i.	n.i.			
286			LOH	O	O			
287			O	n.i.	LOH			
301			n.i.	O	O			
317			O	O	O			
322			LOH	LOH	LOH			
325			n.i.	n.i.	n.i.			
327			O	n.i.	n.i.			
329			O	O	O			
331			n.i.		LOH			
332			O	n.i.	O			
333			LOH	LOH	LOH			
335			O	n.i.	n.i.			
336			O	n.i.	n.i.			
340			LOH	n.i.	n.i.			
343			O	O	O			
344			O	n.i.	n.i.			
345			LOH	LOH	n.i.			
347			O	O	O			
349			O	n.i.	O			
351			O	n.i.	n.i.			
352			O	O	O			
353				n.i.				
354			O	O	O			
355			LOH	O	n.i.			
357			O	O	O			
359			O	O	O			
360			O	n.i.	O			
361			O	O	n.i.			
364			n.i.	O	O			
365			O	n.i.	O			
366			LOH	n.i.	LOH			
368			LOH	n.i.	n.i.			
370			n.i.	n.i.	O			
372			O	O	n.i.			
373			O	n.i.	O			
374				n.i.	LOH			
375			O	n.i.	n.i.			
376			O	O	O			
377			n.i.	LOH	n.i.			
380					n.i.			
381								
382			LOH	LOH	LOH			
385			O	n.i.	O			
387				LOH				

lfd. Nr.	p53-Alu (7P53)	TP53 (7P53)	D17S865 (BRCA1)	D17S1322 (BRCA1)	D17S1323 (BRCA1)	D13S1695 (BRCA2)	D13S1699 (BRCA2)	D13S1701 (BRCA2)
388			O	n.i.	n.i.			
399			LOH	LOH	LOH			
402			O	n.i.	n.i.			

Tab 10.9: LOH *BRCA1* in sporadischen Ovarialkarzinomen

lfd. Nr.	LOH <i>BRCA1</i>
8	O
9	LOH
10	
11	O
12	LOH
13	LOH
14	O
15	O
17	
18	O
19	O
20	LOH
21	O
22	O
23	LOH
24	LOH
25	O
26	O
31	LOH
32	O
35	LOH
36	

10.5. Bestimmung der relativen Expression von *BRCA1* und *p21*

Tab. 10.10: *BRCA1*- und *p21*-Expression in sporadischen Mammakarzinomen

lfd. Nr.	<i>BRCA1</i> Expression im Normalgewebe	<i>BRCA1</i> Expression im Tumorgewebe	<i>p21</i> Expression im Normalgewebe	<i>p21</i> Expression im Tumorgewebe
1		0,68		0,29
2		0,11		0,15
3		0,3		1,5
4		0,07		0,03
5		0,03		0,04
8		0,28		0,58
14		0,11		0,14
15		0,09		0,01
16		0,03		0,28
17		0,25		0,06
18		0,01		0,1
19		1,84		0,62
20		0,03		0,15
21				0,57
23		0,11		0,17
24		0,1		0,4
25		0,07		0,17
26		0,12		
30		0,68		0,73
31		0,1		0,02
34				0
36				
37		0,32		
38		1,26		0,08
39		0,28		0,58
40		0,03		0,04
45				0,07
47		0,06		0,35
48		0,16		0,3
49		0,12		0,06
70		0,1		0,7
71		0,27		
72		0,04		0,84
74		0,34		0,88
75		0,25		0,15
81		0,09		0,51
82		0,09		0,88
218		0,16		0,11
219		0,07		0,17
220		0,14		0,27
222		0,06		2,29
223		0,05		0,35
229		0,04		0,3
236		0,05		0,06
244		0,2		0,11
248		0,18		0,18
251	0,13	0,67	1,65	0,35
252	0,035	0,55	0,07	3,84
253	0,19	0,18	1,8	0,77

lfd. Nr.	BRCA1 Expression im Normalgewebe	BRCA1 Expression im Tumorgewebe	p21 Expression im Normalgewebe	p21 Expression im Tumorgewebe
254	0,13	0,14	0,28	0,13
255	0,014	0,2	0,56	
256	0,064	0,12	0,58	0,57
258	0,14	0,14	0,45	1,66
259	0,83	0,28	1,59	2,9
260	0,28	0,2	0,87	0,65
261	0,23	0,41	0,6	3,18
262		0,02	1,14	0,09
263	0,32	0,103	2,27	0,04
264	0,11	0,08	1,15	0,2
265	0,11	0,099	2,2	0,88
266		0,075	3,79	1,58
267	0,12	0,18	0,62	0,42
268	0,081	0,029	1,43	0,06
269			0,54	0,65
271	0,12	0,22		
273				
277	0,12	0,2		
281	0,18	0,07		
286	0,2	0,25		
287	0,2	0,15		
301				
317	0,14	0,23		
322	0,36	0,11		
325	0,22	0,85		
327	0,28	0,11		
329	0,05	0,21		
331	0,07	0,17		
332				
333	0,28	0,1		
335	0,13	0,12		
336	0,17	0,18		
340	0,15	0,06		
343	0,29	0,18		
344	0,26	0,09		
345	0,3	0,07		
347	0,36	0,2		
349				
351	0,22	0,21		
352	0,03	0,22		
353				
354a	0,15	0,09		
355	0,04	0,25		
357				
359	0,17	1,64		
360	0,06	0,12		
361	0,71	0,11		
364	0,06	0,15		
365	0,07	0,04		
366	0,17	0,13		
368	0,37	0,32		
370				
372	0,16			
373				

lfd. Nr.	BRCA1 Expression im Normalgewebe	BRCA1 Expression im Tumorgewebe	p21 Expression im Normalgewebe	p21 Expression im Tumorgewebe
374	0,22	0,08		
375	0,33	0,32		
376				
377				
380				
381	0,15	0,13		
382	0,1	0,02		
385	0,34	0,09		
387	0,04	0,16		
388	0,11	0,16		
399	0,3	0,01		
402				

Tab. 10.11: BRCA1- und p21-Expression in sporadischen Ovarialkarzinomen

lfd. Nr.	BRCA1 Expression im Tumorgewebe	p21 Expression im Tumorgewebe
8	0,08	0,27
9	0,36	0,29
10	0,12	0,59
11	0,09	0,9
12	0,07	0,16
13	0,02	0,1
14	0,05	0,02
15	0,04	0,07
17	0,47	0,04
18	0,22	0,23
19	0,04	0,51
20	0,05	0,09
21	0,2	0,48
22	0,03	0,05
23	0,06	0,31
24	0,11	0,29
25	0,12	0,82
26	0,03	0,33
31	0,16	0,2
32	0,15	0,38
35	0,05	0,48
36		0,02

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Betz
Vorname: Beate
Geburtsdatum: 03. Dezember 1968
Geburtsort: Hilden
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1975 - 09/1975 Kath. Grundschule, Monheim-Hitdorf
10/1975 - 07/1979 Städt. Gemeinschaftsgrundschule, Kempen/Ndrh.
1979 - 1988 Luise-von-Duesberg Gymnasium, Kempen/Ndrh.
13. Juni 1988 Abitur

Hochschulausbildung:

1988-1996 Biologiestudium
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
19.04.1991 Diplomvorprüfung
1996/97 Diplomarbeit ("Subzelluläre Lokalisierung und funktionelle
Charakterisierung von möglichen Transportproteinen in der Hefe
Saccharomyces cerevisiae."
Institut für Mikrobiologie (Leiter: Prof. Dr. C. P. Hollenberg)
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
19.03.1997 Diplomprüfung

Promotion:

06/1997-12/2000 Promotionsarbeit
Thema: " Molekulare Untersuchung der Tumorsuppressorgene *BRCA1*
und *BRCA2* bei familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen."
Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf