Aus dem Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Hartmut Hengel

# Beurteilung von unklassifizierten Varianten von BRCA1- und BRCA2-Spleißmutationen mittels *in silico*-Methoden und deren prognostischer Nutzen

## DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Sebastian Vogt

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schaal Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Markus Fleisch

meiner Familie

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	IV
	. Abbildungsverzeichnis	VII
١V	7. Tabellenverzeichnis	IX
1	Einleitung	1
	1.1 Brustkrebs und die Bedeutung von BRCA-Mutationen	1
	1.2 Genarchitektur und Funktion von BRCA1 und BRCA2	4
	1.3 Prädiktive genetische Diagnostik	8
	1.4 Biochemie des Spleißens	10
	1.5 Exon/Intron-definierende Sequenzelemente der prä-mRNA	12
	1.6 Das Spleißosom	13
	1.7 Regulierende Elemente des Spleißens	15
	1.7.1 Die SR- und hnRNP-Proteinfamilie	17
	1.8 Alternatives Spleißen	19
	1.9 Pathologische Bedeutung des alternativen Spleißens	20
	1.10 Maschinelles Erlernen des alternativen Spleißens	21
	1.11 Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	25
	2.1 Erfassung der Mutationen	25
	2.2 Algorithmen zur Bewertung der intrinsischen Spleißstellenstärken	25
	2.2.1 Shapiro&Senapathy-Matrix	26
	2.2.2 MaxEntScan	26 27
	2.2.4 SD-Score	28
	2.3 ESRsearch	30
3	Ergebnisse	32
	3.1 Verteilung der Mutationen auf den BRCA1- und BRCA2-Genen	32
	3.2 Mit 39,83% im BRCA1-Gen und 45,91% im BRCA2-Gen stellen Missense- Mutationen den größten Anteil der auftretenden Mutationstypen dar	35
	3.3 Registrierte 5'ss Mutationen häufen sich in den hochkonservierten Positionen	37
	3.4 An der 3' Spleißstelle ist ein Maximum an Mutationen für BRCA1 und BRCA2	im

	Bereich IVS-1 und IVS-2 zu finden	- 39
	3.5 Beurteilung von BRCA1- und BRCA2-Mutationen der 5'- und 3' Spleißstelle anha ausgewählter Algorithmen	and - 40
	3.6 Ermittlung von Grenzwerten für ausgewählte Algorithmen zur Vorhersage aberranter Spleißprozesse	- 43
	3.7 Anwendung der Algorithmen und ihrer ermittelten Grenzwerte auf die BRCA1 und BRCA2 5' Spleißstellenmutationen unbekannter klinischer Relevanz	d - 45
	3.8 Zwei registrierte 5' Spleißstellen-Mutationen an Position +7 und +8 werden vom HBond-Score als pathogen bewertet	- 47
	3.9 Flussdiagramm zur Einschätzung von 5' Spleißstellenmutationen unbekannter Bedeutung mithilfe des HBond-Scores, des MaxEnt-Scans, des SD-Scores und der S&S-Matrix	- 49
	3.10 Die Bewertung der 3' Spleißstellen-Mutationen mittels MaxEnt-Scan, MM und WMM bleibt aufgrund fehlender Grenzwertangaben der Algorithmen und mangels funktioneller Analysen von Mutationen ungenau	- 51
	3.11 ESRs – Bewertung stiller BRCA1- und BRCA2-Mutationen mittels ESRsearch-	- 52
	3.12 Vergleich des Fairbrother-Algorithmus mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus hinsichtlich gefundener ESEs/ESSs	- 58
4	Diskussion	- 62
	4.1 Uneinheitliche Bezeichnungen in der BIC-Datenbank bezüglich der Spleißstellenmutationen	- 62
	4.2 Verteilung und Häufigkeiten von BRCA1 und BRCA2 Spleißstellenmutationen in den untersuchten Datenbanken	- 63
	4.3 Bestimmung von Grenzwerten bei ausgewählten in silico-Methoden, die als prädiktives Maß für die Wahrscheinlichkeit aberranten Spleißens dienen	- 64
	4.4 Beurteilung von unklassifizierten Varianten von BRCA1- und BRCA2- Spleißmutationen mittels in silico-Methoden	- 66
	4.5 Kopplung der Algorithmen nach HBond, MaxEnt, SDS und S&S zur verbesserter Einschätzung von Spleißstellenmutationen unbekannter Bedeutung und deren vereinfachte Nutzung mittels Flussdiagramm	ו - 68
	4.6 Die Bewertung stiller BRCA1/2-Mutationen mittels ESRsearch	- 69
5	Zusammenfassung	- 71
6	Literaturverzeichnis	- 72
7	Anhang	- 84
	7.1 Unklassifizierte IVS- und Synonymous-Mutationen der 5' Spleißstelle der <i>BIC</i> - Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs	- 84
	7.2 Unklassifizierte IVS- und Synonymous-Mutationen der 3' Spleißstelle der <i>BIC</i> - Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs	- 87
		<b>U</b> 1

||

7 k	7.3 Synonymous-Mutationen der BIC-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs	- 92
8	Ciriculum Vitae	103
9	Erklärung	104
10	Danksagung	105

# II. Abkürzungsverzeichnis

#	Anzahl		
3'ss	3' Spleißstelle		
3'UTR	3-prime Untranslated Region		
5'ss	5' Spleißstelle		
5'UTR	5-prime Untranslated Region		
A	Adenin		
ATP	Adenosintriphosphat		
AA	Aminosäure		
Abb.	Abbildung		
RS-Domäne	Arginin- und Serin-reiche Domäne		
RGG	Arginine/Glycine rich box		
bp	Basenpaare		
bzw.	beziehungsweise		
BPS branch point sequence			
BBP	branch point-bindendes Protein		
BAP1	BRCA1 associated protein		
BARD1	BRCA1-associated RING domain 1 protein		
BRC BRC-Domäne, acht Motive mit einer			
	Sequenzhomologie des Genproduktes BRCA2, codiert im		
	BRCA2-Gen Exon11		
BRCA1	Breast Cancer 1 susceptibility protein		
BRCA2	Breast Cancer 2 susceptibility protein		
BIC	Breast Cancer Information Core		
BRCT	C-terminale Domäne von BRCA1		
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor		
Cys	Cystein		
С	Cytosin		
d.h.	das heißt		
evtl.	eventuell		
ESE	exonic splicing enhancer		
ESS	exonic splicing silencer		
ESRs	exonic splicing regulatory sequence		
ER	Östrogen-Rezeptor		

EJC	exon-junction-complex		
MM	first-order-Markov-Model		
F	Frameshift-Mutationen		
G	Guanin		
GCHBOC	German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian		
	Cancer		
hnRNP	Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine		
His	Histidin		
Her2neu	<i>human epidermal growth factor receptor</i> , Synonym c-erbB2		
IFD	In Frame Deletions		
IFI	In Frame Insertion		
IVS intervening sequence, zwischen zwei Exons lokal			
	DNA-Sequenz		
ISE	intronic splicing enhancer		
ISS	intronic splicing silencer		
КН	K homology domain		
Kb	Kilobasen, Größenangabe für 1000 Basen DNA oder RNA		
kDa	Kilodalton, Massenangabe für Proteine		
KI	künstliche Intelligenz		
Ki-67	Ki67- Antikörper, Proliferationsmarker		
LOH	Loss of heterozygosity		
MammaCa	Mammakarzinom		
mBBP	mammalian branch point binding protein		
SF1	mammalian splicing factor 1		
männl.	männlich		
ME	maximale Entropie		
MDD	maximum dependence decomposition model		
Μ	Missense-Mutationen		
mt	Mutation		
neg	negativ		
Ν	Nonsense-Mutation		
NLS	nuclear localization sequence, Kernlokalisierungs-Domäne		
nt	Nukleotid		
OVCA	Ovarialkarzinom		
PPT	Polypyrimidin-Trakt		
РТВ	Polypyrimidintrakt bindendes Protein		

PSWM	position specific weight matrix
PESE	putative exonic splicing enhancer
PESS	putative exonic splicing silencer
PESRs	putative exonic splicing regulatory sequence
PR	Progesteron-Rezeptor
prä-mRNA	Präkursor-mRNA
q	q-Arm – langer Arm des Chromosoms
RING	really interesting new gene
RRM	RNA recognition motif, RNA-Bindedomänen
RBD	RNA-binding-domain
Seq	Sequenz
SR-Proteine	Ser-Arg-Proteine
S&S	Shapiro und Senapathy
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
Syn	Synonymous
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
Т	Thymin
Tab.	Tabelle
р53	Tumorprotein 53
u.a.	unter anderem
U2AF	U2 auxiliary factor
UV	unklassifizierte Variante
U	Uracil
v.a.	vor allem
weibl.	weiblich
WMM	weight-matrix-model

# III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Risikomodifikation durch Brustkrebsgene	2
Abb. 2: Die Lage des BRCA1-Gens auf Chromosom 17 und des BRCA2-Gens auf	
Chromosom 13	4
Abb. 3: Schematische Darstellung von BRCA1 und BRCA2	5
Abb. 4: BRCA1 und BRCA2 in der DNA-Reparatur	7
Abb. 5: Schematische Darstellung des RNA-Spleißens	11
Abb. 6: Konsensussequenz der Exon/Intron-Grenzen	12
Abb. 7: Die Assemblierung des Spleißosoms	14
Abb. 8: Schematische Darstellung einer Intron-Exon-Grenze eines eukaryotischen Gens	16
Abb. 9: Der regulierende Einfluss von SR-Proteinen, hnRNPs und SR-ähnliche Proteiner	ו auf
die Erkennung von Spleißstellen	18
Abb. 10: Übersicht über die verschiedenen Formen des alternativen Spleißens	20
Abb. 11: Ein SR-Protein rekrutiert das U1 snRNP an die 5' Spleißstelle	28
Abb. 12: SD-Score Algorithmus	29
Abb. 13: Wild-Typ Sequenz der Synonymous BRCA1 Exon 3, 233G/A	31
Abb. 14: Sequenz der Synonymous Punktmutation BRCA1 Exon 3, 233G/A	31
Abb. 15: Verteilung der Mutationen auf die BRCA1- und BRCA2-Exons nach Normierung	J 32
Abb. 16: Darstellung der Exons des BRCA1-Gens	33
Abb. 17: Darstellung der Exons des BRCA2-Gens	33
Abb. 18: Prozentuale Verteilung der Mutationstypen im BRCA1- und BRCA2-Gen	36
Abb. 19: Prozentuale Verteilung der Mutationen an der 5' Spleißstelle in BRCA1 und BR	CA2
	38
Abb. 20: Prozentuale Verteilung der Mutationen an der 3' Spleißstelle in BRCA1 und BR	CA2.
	39
Abb. 21: Flussdiagramm zur Einschätzung von 5' Spleißstellenmutationen unbekannter	
Bedeutung mithilfe des HBond-Scores, des MaxEnt-Scans, des SD-Scores und der S&S-	-
Matrix	50
Abb. 22: Veränderungen der ESRs durch stille Mutationen in den BRCA-Genen bei	
Anwendung des Goren-Algorithmus	54
Abb. 23: Veränderungen der ESEs/ESSs durch stille Mutationen in den BRCA-Genen be	ei
Anwendung des Fairbrother-Algorithmus	55
Abb. 24: Veränderungen der ESEs/ESSs durch stille Mutationen in den BRCA-Genen be	ei
Anwendung des Zhang/Chasin-Algorithmus	56

Abb. 25: Vergleich des Fairbrother-Algorithmus mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus		
hinsichtlich gefundener ESEs in den Wild-Typ-Sequenzen stiller Mutationen der BRCA-Gene		
58		
Abb. 26: Vergleich des Fairbrother-Algorithmus mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus		
hinsichtlich gefundener ESEs in den Mutationssequenzen stiller Mutationen der BRCA-Gene		
59		
Abb. 27: Vergleich des Fairbrother-Algorithmus mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus		
hinsichtlich gefundener ESSs in den Wild-Typ-Sequenzen stiller Mutationen der BRCA-Gene		
60		
Abb. 28: Vergleich des Fairbrother- Algorithmus mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus		
hinsichtlich gefundener ESSs in den Mutationssequenzen stiller Mutationen der BRCA-Gene		
60		

# IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Charakteristika BRCA 1 und BRCA 2 8
Tab. 2: Intensiviertes Früherkennungsprogramm10
<b>Tab. 3:</b> Mutationen, die >100mal in der <i>BIC</i> registriert wurden34
Tab. 4: IVS und Synonymous 5' Spleißstellenmutationen der BIC mit Angabe "clinically
<i>important".</i> 41
Tab. 5: Widersprüchliche Aussagen der vier Algorithmen hinsichtlich des BIC-Kriteriums
"clinically important"43
Tab. 6: Ermittlung des Grenzwertes für den HBond-Score in Anlehnung an das BIC-Kriterium
"clinically important"44
Tab. 7: Ermittlung des Grenzwertes für den MaxEnt-Scan in Anlehnung an das BIC-Kriterium
"clinically important"44
Tab. 8: Ermittlung des Grenzwertes für die S&S-Matrix in Anlehnung an das BIC-Kriterium
"Clinically Important"44
Tab. 9: Grenzwerte für die Bestimmung aberranten Spleißens bei ausgewählten Algorithmen
45
Tab. 10: Widersprüchliche Ergebnisse der S&S-Matrix zu den Aussagen der übrigen
Algorithmen hinsichtlich der Bewertung von UVs der 5'Spleißstelle46
Tab. 11: Widersprüchliche Ergebnisse des MaxEnt-Scans zu den Aussagen der übrigen
Algorithmen hinsichtlich der Bewertung von UVs der 5'Spleißstelle46
Tab. 12: Widersprüchliche Ergebnisse des HBond-Scores zu den Aussagen der übrigen
Algorithmen hinsichtlich der Bewertung von UVs der 5'Spleißstelle46
Tab. 13: Widersprüchliche Ergebnisse des SD-Scores zu den Aussagen der übrigen
Algorithmen hinsichtlich der Bewertung von UVs der 5'Spleißstelle47
Tab. 14: Spleißmutationen in den Nukleotidpositionen +7 und +848
Tab. 15: IVS-Mutationen der 3' Spleißstelle der BIC mit Angabe "Clinically Important"51
Tab. 16: Literaturangaben zu einzelnen Punktmutationen der 3' Spleißstelle 52
Tab. 17: Zusätzliche RNA-binding-site-motifs (http://esrsearch.tau.ac.il/)    53
Tab. 18: Bewertung unklassifizierter BRCA1/2 IVS- und Synonymous-Mutationen der 5'
Spleißstelle der BIC-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären
Brust- und Eierstockkrebs86
Tab. 19: Bewertung unklassifizierter BRCA1/2 IVS- und Synonymous-Mutationen der 3'
Spleißstelle der BIC-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären
Brust- und Eierstockkrebs91

**Tab. 20:** Stille Mutationen der *BIC*-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiumsfür familiären Brust- und Eierstockkrebs (Stand Februar 2009) Beurteilung von stillen BRCA1und BRCA2 Mutationen des NCBI und des Deutschen Konsortiums mittels Goren- undFairbrother-Algorithmus95

**Tab. 22:** Stille Mutationen der *BIC*-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiumsfür familiären Brust- und Eierstockkrebs (Stand Februar 2009) Beurteilung von stillen BRCA1-und BRCA2 Mutationen des NCBI und des Deutschen Konsortiums anhand von Additional*RNA binding sites* (Nova, hnRNP-B, hnRNP-I (PTB), Srp55)\_\_\_\_\_\_\_102

# 1 Einleitung

#### 1.1 Brustkrebs und die Bedeutung von BRCA-Mutationen

Brustkrebs ist mit 27,8 Prozent die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Jede 8.-10. Frau ist im Laufe ihres Lebens von der Erkrankung betroffen. In Deutschland erkranken jährlich ca. 57.000 Frauen. Die Inzidenz beträgt 104/100.000 in Deutschland, die Mortalität liegt über alle Stadien gemittelt bei ca. 30% (Gesundheitsberichterstattung des Bundes).

Etwa 10–15% aller und 25-40% der Mammakarzinome vor dem 35. Lebensjahr werden mit einer genetischen Prädisposition in Verbindung gebracht. Mutationen in einem der beiden Brustkrebssuszeptibilitätsgene BRCA1 oder BRCA2, zwei autosomal dominant vererbte 3-8% Tumorsuppressorgene sind für ca. aller und für 15-20% der familiären Mutationen Mammakarzinome verantwortlich. Zudem in gehen den Brustkrebssuszeptibilitätsgenen mit einem deutlich erhöhten Ovarialkarzinom-Risiko einher (Beckmann et al., 2003).

Eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation steigert das Risiko im Laufe des Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken auf 80-90% (Schmutzler *et al.* 2011). Eine unterschiedliche Anfälligkeit für die Entwicklung eines Mammakarzinoms wird durch den individuellen genetischen Hintergrund einzelner Personen begründet (Nathanson *et al.*, 2001).

Durch Kopplungsanalysen konnten zwei Brustkrebssuszeptibilitätsgene gefunden werden. Die Chromosomenregion 17q21 gingen mit einer erhöhten familiären Häufung von Brustkrebs einher (Hall *et al.*, 1990), woraufhin das dort lokalisierte BRCA1-Gen kloniert werden konnte (Miki *et al.*, 1994). Auf der Chromosomenregion 13q12 wurde das BRCA2-Gen entdeckt (Wooster *et al.*, 1994; 1995). Anfang 2010 konnte das Tumorsuppressorgen RAD51C als drittes Brustkrebssuszeptibilitätsgen bestätigt werden (Meindl *et al.*, 2010). Weitere Gene, denen eine Rolle für die Entstehung familiärer Brustkrebserkrankungen zugeschrieben werden, sind in der Abb. 1 dargestellt. Diese werden entsprechend ihrer Penetranz in Risikogene eingeteilt, wobei hochpenetrante Gene ein 5-20fach erhöhtes Risiko auf das 1,5-5fache. Niedrigrisikogene steigern das Brustkrebsrisiko um 0,7-1,5fach.

Risikogene	Risikomo- difikation	Gene/Syndrome
hoch penetrante Gene	5- bis 20-fach	BRCA1/BRCA2/RAD51C: hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom TP53: Li-Fraumeni-Syndrom STK11/LKB1: Peutz-Jeghers- Syndrom PTEN: Cowden-Syndrom
moderat penetrante Gene	1,5- bis 5- fach	CHEK2, PALB2, BRIP1, ATM
Niedrigrisikogene	0,7- bis 1,5-fach	FGFR2, TOX3, MAP3K1, CAMK1D, SNRPB, FAM84B/c-MYC, COX11, LSP1, CASP8, ESR1, ANKLE1, MERIT40 etc.

#### Abb. 1: Risikomodifikation durch Brustkrebsgene (Meindl, 2011)

Suszeptibilitätsgene sind Gene, die die Empfänglichkeit für eine genetische Schädigung und somit auch für Tumoren erhöhen. Einen hohen Stellenwert erlangen Suszeptibilitätsgene daher für die Tumorgenese und die Steuerung der Tumorentwicklung.

Eine Mutation im BRCA1-Gen geht zusätzlich mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms, Pankreaskarzinoms, Astrozytoms, Sarkoms und einer Leukämie einher. Bei Betroffenen männlichen Geschlechts wurde eine vermehrte Bildung von Prostatakarzinomen beobachtet. Liegt eine heterozygote BRCA2-Mutation vor, entwickeln sich gehäuft Brustkrebs und Ovarialkrebs sowie mehrere andere Tumoren (Rahman, 1998; Nathanson *et al.*, 1999).

Besteht bei einer Indexperson aufgrund einer familiären Risikokonstellation der Verdacht auf eine pathogene Mutation in den Brustkrebssuszibilitätsgenen BRCA1 und BRCA2 kann eine Genanlyse durchgeführt werden.

In der Anamneseerhebung werden die Familiengeschichte, das Alter bei der Diagnose von Brustkrebs und die Ethnizität berücksichtigt. Insbesondere Mammakarzinom- oder Ovarialkarzinomerkrankungen in der Familiengeschichte, werden als beste prädiktive Parameter angesehen. Bei folgenden familiären Risikokonstellationen wird in mindestens 10% eine pathogene Mutation in den Genen BRCA1 oder BRCA 2 nachgewiesen (S3-Leitlinie, 2008):

- Familien mit mindestens zwei an Mamma- und/ oder Ovarialkarzinom Erkrankten, davon eine vor dem 51. Lebensjahr
- Familien mit drei an Brust- oder Ovarialkarzinom Erkrankten, unabhängig vom Alter
- Familien mit zwei in der gleichen Linie an Ovarialkarzinom Erkrankten
- Familien mit einer an beidseitigem Mammakarzinom Erkrankten, wobei das erste Mammakarzinom vor dem 41. Lebensjahr aufgetreten sein muss
- Familien mit einer an Mamma- und Ovarialkarzinom Erkrankten
- Familien mit einer Betroffenen vor dem 36. Lebensjahr
- Familien mit einem männlichen Betroffenen und einer weiblichen Betroffenen (Mammaoder Ovarialkarzinom)

Bestätigt sich ein erhöhtes genetisches Risiko für hereditären Brustkrebs können Maßnahmen zur Früherkennung eingeleitet werden (s.u.).

In mehreren Studien (*Breast Cancer Linkage Consortium*, 1997; Marcus et al., 1996; Chappuis et al., 2000; Eerola et al., 2005; Robson et al., 1998; Lakhani et al., 2002; Foulkes et al., 2000) konnte gezeigt werden, dass sich hereditärer Brustkrebs morphologisch von sporadischem Brustkrebs unterscheidet. In BRCA1-assoziiertem Brustkrebs konnten beispielsweise gehäuft duktal-invasive-G3 Karzinome mit glattem Rand und weitgehend fehlender Tubulusbildung, einem sehr hohen Ki67 Markierungsindex und einem pathohistologischen Bild vergleichbar mit "triple-negativen" Mammakarzinomen nachgewiesen werden.

Das Ki67-Antigen ist ein Proliferationsmarker, der über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors Auskunft gibt. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Zellen in der G0-Phase exprimieren das Ki67-Antigen nicht.

Unter einer Triple-Negativität wird die Abwesenheit von Progesteron-Rezeptoren (PR), Östrogen-Rezeptoren (ER) und des Onkogens Her2neu in den Tumorzellen verstanden.

Auf einer BRCA2-Mutation basierende Karzinome der Brust besitzen dagegen eher morphologische Ähnlichkeiten zu sporadischen Karzinomen mit Ausnahme der fehlenden Her2-neu Überexpression. Durch charakteristische histologische und zytologische Befunde des Mammakarzinoms können dementsprechend Rückschlüsse auf eine zugrundeliegende Keimbahnmutation eines der BRCA-Gens gezogen werden (Lakhani *et al.*, 2002; Osin *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2000).

## 1.2 Genarchitektur und Funktion von BRCA1 und BRCA2

BRCA1 ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q21) lokalisiert (Abb. 2) und setzt sich aus 24 Exons zusammen, die auf etwa 100kb genomischer DNA organisiert sind.



Abb. 2: Die Lage des BRCA1-Gens auf Chromosom 17 und des BRCA2-Gens auf Chromosom 13. (http://www.breast-cancer-blog.com)

BRCA1 wird in zahlreichen Geweben als 7,8kb großes Transkript exprimiert und kodiert für ein 1863 Aminosäuren langes Protein von 220kDa. Im Exon 2 befindet sich das ATG-Startcodon. Mit 3427bp liegt das Exon 11 um mehr als das 10-fache über der durchschnittlichen Länge humaner Exons. Es umfasst mehr als die Hälfte der kodierenden Abschnitte des BRCA1-Gens (Smith *et al.,* 1996). Alle Funktionen von BRCA1 konnten noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Aufgrund struktureller Eigenschaften und Interaktionen zu anderen Genen kann auf einige Funktionen geschlossen werden. In der Zelle übernimmt BRCA1 vermutlich multifunktionelle Aufgaben.

BRCA1 besitzt verschiedene Proteindomänen (Abb. 3), die für die Funktion des Genprodukts eine wichtige Rolle spielen. Eine Zn<sup>2+</sup>-bindende *RING (Really Interesting New Gene)-finger* Domäne ist nahe des NH<sub>2</sub>-Terminus gelegen. Sie erstreckt sich von Codon 1-112 (Miki *et al.*, 1994). Die *RING-finger* Domäne wird durch acht konservierte *Cys* und *His* Aminosäuren charakterisiert, die zwei Zn<sup>2+</sup>-Bindestellen bilden. RING-Domänen vermitteln Protein-Protein bzw. Protein-DNA Interaktionen, und häufig kommt es zu einer E2-abhängigen Ubiquitinierung (Lorick *et al.*, 1999).



**Abb. 3: Schematische Darstellung von BRCA1 und BRCA2.** In BRCA1 (oben) ist die Zn<sup>2+</sup>-bindende *RING (Really Interesting New Gene)-finger*—Domäne in BRCA1 nahe des NH<sub>2</sub>-Terminus dargestellt, die sich von Codon 1-112 erstreckt. Zudem finden sich zwei *C-terminal-domains* (BRCT) bestehend aus ~110 Aminosäureresten in Codon 1529–1863 und *nuclear localization signals* (NLSs). BRCA2 besitzt acht BRC *motifs*. Sechs dieser BRC *motifs* binden direkt an das RAD51 (Perrin-Vidoz, 2002).Schematische Darstellung des BRCA2-Transkripts (unten) mit den Grenzen der ovarian cancer cluster region (OCCR). Zudem sind mit den *BRC repeats* 1–8, den *oligonucleotide-binding* (OB) *domains* 1–3, der *helical domain* (HD) und der *nuclear localization sequences* (NLS) weitere funktionelle Domänen dargestellt (Ware, 2006).

Mithilfe von Ubiquitin-konjugierender Enzyme wird die *RING-finger* Domäne des BRCA1-Gens *in vitro* ubiquitiniert. Eine Funktion von BRCA1 als Ubiquitin-Protein Ligase für die Kennzeichnung von Proteinen steht zur Diskussion. Somit könnte ein Funktionsverlust von BRCA1 eine hohe Konzentration an proliferationsfördernden Proteinen zur Folge haben (Welcsh *et al.*, 2000). Die BRCA1 *RING-finger*-Region ist darüber hinaus die Bindungsstelle für BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1 protein) (Wu *et al.*, 1996) und BAP1 (BRCA1 *associated protein*) (Jensen *et al.*, 1998). BAP1 ist ein de-ubiquitinierendes Enzym. Eine RAD51-Bindungsdomäne liegt auf Exon 11 und erstreckt sich von Codon 758–1064. RAD51 bindet an verschiedene Tumorsuppressoren, z.B. BRCA1 und BRCA2 und p53 (Scully *et al.*, 1997). Während für BRCA2 mehrere RAD51-Bindungsstellen beschrieben wurden, ist die Co-Lokalisation von RAD51 und BRCA1 in Immunfluoreszenzfärbungen wahrscheinlich indirekt bedingt (Scully *et al.*, 1997).

Die BRCA1 C-terminal-domain (BRCT) spielt vermutlich eine Funktion in der DNA damage response, DNA repair und Transkriptionsaktivierung (Scully et al., 1997). Die Transkription von

p21, einem Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor wird durch ein intaktes BRCA1 aktiviert, wodurch ein Zellzyklusarrest bewirkt werden kann (Somasundaram *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu hereditären Mamma- und Ovarialkarzinomen bestätigte sich in sporadischen Erkrankungen nur selten der Verdacht auf Mutationen des BRCA1-Gens (Futeral *et al.*, 1994; Merajver *et al.*, 1995).

Das BRCA2-Gen besteht aus 27 Exons und erstreckt sich über 70kb. BRCA2 liegt auf dem langen Arm (q) von Chromosom13 an der Position 12.3 (13q12.3) und wurde 1994 von Michael Stratton und Richard Wooster (*Institute of Cancer Research UK*) entdeckt (Wooster, R. *et al.*, 1994). Im BRCA2-Gen finden sich zwei außergewöhnlich große, kodierende Exons. Im Vergleich zur durchschnittlichen humanen Exongröße (123nt) besitzt das Exon 10 eine Länge von 1116bp und Exon 11 eine Länge von 4933bp. BRCA2 wird in zahlreichen Geweben als 10,4kb großes Transkript exprimiert und kodiert für ein 3.418 Aminosäuren langes Protein von 384kDa.

Trotz struktureller Unterschiede im Aufbau, weisen BRCA1 und BRCA2 ähnliche Funktionen in der Zelle auf (Abb. 4). Rückschlüsse auf die noch nicht völlig geklärte Funktion von BRCA2 lassen sich von der Struktur und den Interaktionen des Genprodukts mit anderen Proteinen ableiten. Wie BRCA1 ist die Expression von BRCA2 zellzyklusabhängig mit der höchsten Expression in der G1- und in der S-Phase. Sie korreliert mit der Proliferation und der Differenzierung der Brustepithelzellen (Vaughn *et al.*, 1996; Rajan *et al.*, 1996).

Die *BRC-Repeats* in Exon 11 umfassen acht Kopien einer 30-80 Aminosäuren langen Sequenz und sind für die Interaktion des BRCA2-Gens mit RAD51 verantwortlich (Wong *et al.*, 1997). Die BRCA2-Expression inhibiert die Transkription von p53 in Tumorzellen. Dieser Effekt wird durch die Co-Expression von RAD51 verstärkt (Marmorstein *et al.*, 1998). Im Zusammenspiel mit p53 und BRCA1 bzw. BRCA2 leistet RAD51 eine bedeutende Rolle bei der Unterdrückung von malignem Wachstum. Eine Beeinträchtigung der RAD51-Bindungsstelle kann somit zu einer Störung der Funktion von BRCA1 und BRCA2 führen (Abb. 4).



The roles of BRCA1 and BRCA2 in DNA repair Expert Reviews in Molecular Medicine ©2001 Cambridge University Press

#### Abb. 4: BRCA1 und BRCA2 in der DNA-Reparatur (Welcsh et al., 2000).

(a) Um Funktionen in der DNA-Reparatur zu übernehmen, formt sich ein makromolekularer Komplex bestehend aus BRCA1, BRCA2, BARD1 und RAD51. Der Komplexbildung geht die Phosphorylierung von BRCA1 durch die Kinase ATM voraus. Durch den vom *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) markierten DNA-Schaden, kommt es zu der Anlagerung des Komplexes an die entsprechende Region der DNA-Replikation mit der Einleitung geeigneter Reparaturmaßnahmen.

(b) Der Funktionsverlust der Gene BRCA1 und/ oder BRCA2 (angedeutet durch die gestrichelte Umrisse) führt zu Unfähigkeit, beschädigte DNA zu reparieren. Treten Schäden in kritischen Regionen der Gene auf, wie beispielsweise in p53 (gepunktet), bleibt die Aktivierung von p21 aus und folglich kommt es zur Proliferation.

Am Protein N-Terminus befinden sich mögliche Transkriptions-Aktivierungsdomänen; daneben interagiert BRCA2 ebenfalls mit verschiedenen Transkriptionsregulatoren (Milner *et al.*, 1997). Am C-Terminus von BRCA2 befindet sich ein Kernlokalisationssignal (*nuclear localization sequence*, NLS) (McAllister *et al.*, 1997). Die Charakteristika der BRCA1- und 2-Gene sind in Tab. 1 zusammengefasst. Mutationen im BRCA2-Gen sind bei der Entstehung des hereditären Mamma- und/oder Ovarialkarzinom von großer Bedeutung. In sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen konnten dagegen nur in wenigen Fällen Mutationen des BRCA2-Gens nachgewiesen werden (Lancaster *et al.*, 1996).

	BRCA 1	BRCA 2
Gen-Lokus	17q21	13q12-13
Gen-Größe	100kB, 24 Exons	70kB, 27 Exons
RNA-Größe	7,8kB	11,3kB
Proteingröße	1.863 AS	3.418 AS
Gen-Typ	Tumorsuppressorgen	Tumorsuppressorgen
Erkrankungen	"early-onset" weibl. MammaCA, OVCA	"early-onset" weibl. / männl. MammaCA, OVCA

Tab. 1: Charakteristika BRCA 1 und BRCA 2 (breast cancer information core, 2002).

## 1.3 Prädiktive genetische Diagnostik

Richtlinien der Bundesärztekammer Deutschland sprechen mammakarzinombelasteten Familien, bei erfüllen entsprechender Kriterien, eine klinische und genetische Beratung und Untersuchung zu (Richtlinien-Kommission der Bundesärztekammer, 1998). Hierbei handelt es sich um einen interdisziplinären Beratungsansatz in dem Ärzte der Fachgebiete Gynäkologie, Chirurgie, Humangenetik, Molekulargenetik und Psychotherapie involviert sind. Eine umfassende Beratung über die Erkrankung, präventive Untersuchungen, alternative Behandlungsoptionen und langfristige Betreuung gehören zum Konzept bei hereditärem Mammakarzinom (Beckmann *et al.* 1997; Schmutzler *et al.*, 1999).

Ist das Vorliegen einer vererblichen Form des Brust- oder Eierstockkrebses wahrscheinlich, kann dies unter Umständen zusätzlich durch eine Genanalyse bestätigt oder widerlegt werden.

Schwierigkeiten bestehen bei der Befundinterpretation des genetischen Analyseergebnisses durch die ungeklärten Fragestellungen hinsichtlich der Genpenetranz, der Varianz, der phänotypischen Ausprägung und dem Einfluss von zusätzlichen endogenen Faktoren oder Suszeptibilitätsgenen (Beckmann et al., 2001). Vor der Durchführung der molekulargenetischen Diagnostik erhält die Ratsuchende und ihre Familienangehörigen eine ausführliche Aufklärung und Beratung über den prädiktiven Charakter der Untersuchung, die damit verbundenen Probleme und die möglichen klinisch diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen. Wird die Durchführung der molekulargenetischen Diagnostik gewünscht, erfolgt eine gründliche Datensicherung von Informationen über Krankengeschichte und Krankheitsverlauf betroffener Familienmitglieder (Beckmann et al., 1997; Schmutzler et al., 1999, 2002).

Der Goldstandard in der prädiktiven genetischen Diagnostik für Mamma- und Ovarialkarzinome ist die genomische DNA-Sequenzierung. In der Analysestrategie zur

Detektion von BRCA-Mutationen werden in der Routine-Diagnostik verschiedene hochsensitive Prä-Screeningverfahren, mit anschließender Sequenzierung des Bereiches der vermuteten Mutation verwendet (Niederacher *et al.,* 1998).

Neben der prädiktiven genetischen Diagnostik können auch statistische Modelle Grundlage für die Mutationsträger-Risikos und damit zur Berechnungen des Definition von Hochrisikogruppen sein (Armstrong et al., 2000; Kuschel et al., 2000). Diese Modelle berücksichtigen verschiedene Risikofaktoren und Stammbaumdaten der Patienten und errechnen ein Erkrankungsrisiko (Kuschel et al., 2000). Die Berechnungsmodelle können sowohl als Grundlage zur Definition der Einschlusskriterien zur prädiktiven genetischen Diagnostik dienen als auch für die Art und das Intervall der Früherkennungsuntersuchungen entscheidend sein (Beckmann et al., 2000).

Nach Auswertung der molekulargenetischen Analyse werden in einer interdisziplinären Besprechung die individuellen Empfehlungen für den/die Betroffene/n und die Familienmitglieder festgelegt. Dies sollte durch den primär Beratenden in Anwesenheit eines Psychotherapeuten oder mindestens einer vertrauten Person erfolgen, um eine direkte Unterstützung zu ermöglichen (Beckmann *et al.,* 2001).

Das gegenwärtige Konzept zur Früherkennung wird in Deutschland von Zentren des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs erarbeitet und regelmäßig aktualisiert. Berücksichtigt wird, dass das familiäre Mammakarzinom oft in einem Alter auftritt, in dem regelmäßige Mammographien im Allgemeinen nicht empfohlen werden. Insbesondere bei Frauen unter 40 Jahren, mit mammographisch schlecht beurteilbarer Brust, stellt die zusätzliche Ultraschalluntersuchung und insbesondere die Magnetresonanztomographie eine vielversprechende ergänzende Möglichkeit dar. Aufgrund des hohen (Zweit)-Karzinomrisikos werden diese Optionen sowohl für gesunde als auch für bereits erkrankte Frauen empfohlen (Tab. 2). Derzeit eingesetzte Früherkennungsuntersuchungen (Brustpalpation, Mammographie, Ultraschall und Magnetresonanztomographie bzw. Ovarialultraschall) weisen idealerweise prämaligne Karzinome nach (Bick et al., 1997; Schulz et al., 1997). Präventive medikamentöse und gegebenenfalls chirurgische Maßnahmen stellen Therapieoptionen vor der Entstehung eines Mamma- und/oder Ovarialkarzinoms für Hochrisikopatienten/-innen dar (Meindl et al., 2011).

#### Intensiviertes Früherkennungsprogramm

- Tastuntersuchung der Brust durch den Arzt alle sechs Monate<sup>11</sup>
- Sonographie der Brust alle sechs Monate<sup>11</sup>
- Mammographie der Brust alle zwölf Monate\*2
- MRT der Brust alle zwölf Monate (zyklusabhängig bei prämenopausalen Frauen!)\*1 und \*3

1 ab dem 25. Lebensjahr oder fünf Jahre vor dem frühesten Erkran-

- kungsalter in der Familie <sup>12</sup> ab dem 30. Lebensjahr, bei hoher Brustdrüsendichte ab dem 35. Le-
- bensjahr <sup>13</sup> MRT-Empfehlung in der Regel nur bis zum 55. Lebensjahr oder bis zur Involution des Drüsenparenchyms (ACRI-II)



Für Frauen mit einer nachgewiesenen BRCA1- oder BRCA2-Mutation wird eine intensive Prävention notwendig (Schmutzler 2002). für erachtet et al., Das statistische Erkrankungsrisiko von Frauen aus belasteten Familien, deren Stammbaum auf einen autosomal-dominanten Erbgang hinweist, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören das Erkrankungsalter in der Familie, die Organmanifestation (Brust- oder Eierstockkrebs) und der Verwandtschaftsgrad zu den erkrankten Familienmitgliedern. Es kann für einzelne Familienmitglieder daher unterschiedlich groß sein.

Das individuelle Risiko für das Vorliegen einer BRCA-Mutation kann mithilfe computerassistierter mathematischer Modelle berechnet werden (Couch *et al.*, 1996; Parmigiani *et al.*, 1998; Shattuck-Eidens *et al.*, 1995). Diese basieren auf umfangreichen Daten aus Familien mit einer erblichen Belastung für Brust- und Eierstockkrebs. Die Festlegung eines Schwellenwertes für die Empfehlung präventiver Maßnahmen kann gegenwärtig nur arbiträr erfolgen. In den meisten derzeit laufenden Präventionsprogrammen werden bei einer Verdopplung des Lebenszeitrisikos auf 20 Prozent spezielle präventive Maßnahmen empfohlen (Schmutzler *et al.*, 2002).

#### 1.4 Biochemie des Spleißens

Nur etwa 5% der humanen chromosomalen DNA enthält eine proteinkodierende Information. Die allermeisten dieser proteinkodierenden Gene werden durch intronische Sequenzen unterbrochen. Im Spleißprozess werden diese intronischen Sequenzen entfernt.

Intervenierende Sequenzen und die Verwendung alternativ kodierender Bereiche ermöglichen eine erhöhte Variabilität des Proteoms (bis zu 250.000 Proteine (Harrison *et al.,* 2002) im Vergleich zum Genom (ca. 23.000 - 40.000 Gene (Lander *et al.,* 2001; Venter *et. al.,* 2001)).

Das Spleißen ist ein wichtiger Mechanismus für die Prozessierung der RNA (Abb. 5). Aus der prä-mRNA wird im Zellkern von Eukaryoten in zwei Reaktionsschritten die reife mRNA gebildet.



#### Abb. 5: Schematische Darstellung des RNA-Spleißens

(http://www.nature.com/nature/journal/v413/n6857/images/413695aa.2.jpg). Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-Hydroxy-Gruppe des Adenosins in der Verzweigungssequenz (BPS) auf die 3'-5'-Phosphodiesterbindung des Guanosins am 5'-Ende des Introns. Dabei wird das 5'-terminale Nukleotid des Introns über eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung kovalent mit dem Verzweigungsnukleotid verknüpft. Als Zwischenprodukte entstehen eine Lariatstruktur aus Intron und 3'-Exon (Lariat-Intermediat) sowie das freie 5'-Exon. Die freie 3'-Hydroxy-Gruppe am Ende des 5'-Exons reagiert im zweiten Schritt nukleophil mit der 3'-5'-Phosphodiesterbindung der 3' Spleißstelle. Dabei werden die beiden Exons zum fertigen Spleißprodukt verbunden und das verzweigte Intron (Lariat) freigesetzt.

Auf Grundlage der DNA wird in der Transkription die prä-mRNA gebildet. Diese enthält Introns und Exons. Während des Spleißprozesses werden die Introns herausgeschnitten, die Exons werden zum fertigen Spleißprodukt verbunden. Chemisch basiert das Spleißen auf zwei Trans-Ester-Reaktionen, welche durch das Spleißosom katalysiert werden. Im ersten Schritt kommt es zu einer Trennung der 5' Exon-Intron Verbindung. Dies geschieht durch einen nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxy-Gruppe eines konservierten Adenosins des Introns, der sogenannten Verzweigungsstelle (*branch-site*) auf die 3'-5'-Phosphodiesterbindung des Guanosins am 5'-Ende des Introns (Krämer *et al.*, 1996).

Dabei entsteht am 5'-Exon Ende eine freie 3'OH Gruppe. Das 5'-terminale Nukleotid des Introns wird über eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung kovalent mit dem Verzweigungsnukleotid verknüpft, was die Bildung einer Lassostruktur zur Folge hat. Als Zwischenprodukte entstehen die Lariatstruktur aus Intron und 3'-Exon sowie das freie 5'-Exon (Grabowski *et al.*, 1984; Padgett *et al.*, 1984).

Im zweiten Schritt reagiert die freie 3'-Hydroxy-Gruppe des 5'-Exons nukleophil mit der 3'-5'-Phosphodiesterbindung des 3'-Exons. Das fertige Spleißprodukt entsteht nach einer zweiten Transesterifizierungsreaktion, in der die beiden Exons miteinander verknüpft werden und das Intron freigesetzt wird (Valadkhan, 2001). Energetisch benötigt die Spleißreaktion nicht zwingend Energie in Form von Nukleosidtriphosphathydrolyse, da die Gesamtzahl der Phosphodiesterbindungen erhalten bleibt. Schwer *et al.* konnten 1992 herausstellen, dass jedoch für die Konformationsänderungen des Spleißosoms die ATP-Hydrolyse unabdingbar ist.

#### 1.5 Exon/Intron-definierende Sequenzelemente der prä-mRNA

Auf der Ebene der prä-mRNA charakterisieren vier Sequenzabschnitte die Exon/Intron-Grenzen. Hierzu zählen die 5' Spleißstelle, die auch als Spleißdonor (SD) bezeichnet wird, die 3' Spleißstelle, auch als Spleißakzeptor (SA) bezeichnet, ein Polypyrimidin-Trakt (PPT), der der 3' Spleißstelle meist 10-20 Nukleotide vorgelagert ist, sowie eine ca. 15-40 Nukleotide 5'wärts des Spleißakzeptors lokalisierte Verzweigungssequenz (*branch-point sequence*, BPS) (Abb. 6).



**Abb. 6: Konsensussequenz der Exon/Intron-Grenzen (www.geneinfinity.org/images/splicing.jpg).** Dargestellt ist die Konsensussequenz des U2-abhängigen Introns von Metazoen. Exons sind als Boxen, das Intron als Linie dargestellt. Die Sequenz der konservierten Nukleotide ist angegeben: Das Verzweigungs-Adenosin ist hervorgehoben, N steht für ein beliebiges Nukleotid.

Die Sequenzen der 5' Spleißstellen humaner Gene sind heterogen. Die Konsensussequenz kanonischer Spleißstellen ist AG/GTRAGT (R=A oder G). Die kanonischen Spleißstellen sind durch das GT-Dinukleotid definiert. Die Verzweigungssequenz lässt sich durch eine degenerierte Konsensussequenz YNYURAY (Y = Pyrimidin, R = Purin, N = beliebig) beschreiben. Die 3' Spleißstelle eines Introns ist bei allen Eukaryoten durch die Sequenz

YAG/ und eine Präferenz der vorangehenden Nukleotide für Pyrimidine gekennzeichnet (Burge *et al.*, 1999). Neben diesen kanonischen Introns, die aufgrund der intronbegrenzenden Nukleotide auch als GT-AG-Introns bezeichnet werden, wurden in seltenen Fällen auch andere Sequenzen gefunden (Farrer *et al.*, 2002).

#### 1.6 Das Spleißosom

Das Spleißosom ist ein makromolekularer RNA/Protein-Enzymkomplex, der den Spleißprozess im Zellkern auf der Ebene der *precursor messenger* RNA (Prä-mRNA) katalysiert. Für jeden Spleißprozess setzt sich das Spleißosom de novo zusammen, um nichtkodierende Introns aus der prä-mRNA zu entfernen und die kodierenden Exons zu der mRNA zu verknüpfen.

Das Spleißosom besteht aus 5 Ribonukleoprotein-Untereinheiten, die sogenannten uridinreichen, *small nuclear ribonucleoprotein particles* (snRNPs) (Guthrie *et al.*, 1994-1995), die während des Spleißprozesses mit zahlreichen non-snRNPs Spleißfaktoren interagieren (Jurica *et al.*, 2002; Makarov *et al.*, 2002; Mougin *et al.*, 2002; Rappsilber *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). Sie spielen eine zentrale Rolle im Spleißzyklus. Neben der Erkennung der 5' Spleißstelle und der *branch point* Sequenz, katalysieren die snRNPs die Spaltungs- und Verknüpfungsreaktion der RNA im Spleißprozess.

SnRNPs bestehen aus einer phylogenetisch konservierten *small nuclear* RNA (snRNA) und einem Aggregat von sieben Sm oder Sm-like Proteinen (Lsm) und einer Reihe von snRNP spezifischen Proteinen.

Das Hauptspleißosom (*major spliceosome*), bestehend aus den snRNPs U1, U2, U4, U5 und U6 ist für das Spleißen der sogenannten U2-Introns verantwortlich, die die große Mehrheit der prä-mRNA-Spleißprozesse darstellen. Weniger häufig konnten prä-mRNA Introns vom U12-Typ gefunden werden, die vom Nebenspleißosom (*minor spliceosome*) bestehend aus den snRNPs U11, U12, U4atac, U6atac und U5 gespleißt werden (Schneider *et al.* 2002).

U2- und U12-Typ-Introns lassen sich hauptsächlich durch ihre 5' Spleißstelle und der *branch point* Sequenz unterscheiden. Introns vom U2-Typ zeigen die Sequenz GT-AG an der 5'- und 3' Spleißstelle, während das Intron vom U12-Typ durch die beiden AT-AC Dinukleotide an der Exon-Intron-Grenze der 5'- und 3' Spleißstelle gekennzeichnet sind (Sharp *et al.*, 2000).

Der Spleißvorgang vollzieht sich in einem komplexen Zusammenspiel wechselnder Interaktionen der snRNPs untereinander und mit der prä-mRNA in einer definierten Reihenfolge. Diese Interaktionen werden meist in Form von Basenpaarungen der RNAs oder durch Protein-RNA Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Komponenten realisiert.

Die Spleißosomenausbildung beginnt mit der Erkennung der 5' Spleißstelle durch das U1 snRNP. Es folgt die Bindung der *branch point* Sequenz durch das *branch point*-bindene

Protein (BBP) und das, an den Polypyrimidintrakt gebundene Helferprotein U2AF (Berglund *et al.*, 1997). Die Bindung von U2 snRNP erfolgt ebenfalls über Basenpaarungen an die *branch point sequence*. Allerdings ist das U2 snRNP im E Komplex nur lose assoziiert. Das U2 snRNP ersetzt dann das BBP am *branch point* innerhalb des Introns. Die "feste" Bindung des U2 snRNPs an die *branch point* Sequenz benötigt ATP und es entsteht der A-Komplex.

Die anschließenden Schritte führen zur Anlagerung des, bereits zuvor assembliertem trisnRNPs U4/U5/U6 an das Spleißosom, wodurch der Komplex B entsteht (Raghunathan, 1998). Durch die Umlagerungen von RNA-RNA-Interaktionen, die durch die ATP-Hydrolyse ermöglicht werden, entsteht das aktive katalytische Zentrum (Komplex B\*), bestehend aus U2/U5/U6 und der prä-mRNA (Pikielny *et al.*, 1986; Konarska *et al.*, 1987; Cheng *et al.*, 1987). Das aktive Spleißosom, welches sich aus den snRNPs U2/U5/U6 und der prä-mRNA zusammensetzt, katalysiert nun die erste Umesterung (Madhani *et al.*, 1992; Brow, 2002). Im ersten Schritt der Spleißreaktion findet eine weitere Umordnung des Spleißosoms statt, wodurch der Komplex C generiert wird (Staley *et al.*, 1998) (Abb. 7).



Abb. 7: Die Assemblierung des Spleißosoms (Will, 2008). Die Assemblierung des Spleißosoms beginnt mit der Bildung des E-Komplexes. SR-Proteine und Proteine des U1 snRNP-Komplexes vermitteln die Bindung der U1 snRNA an den Spleißdonor. Zur Erkennung der 3' Spleißstelle bindet der Spleißfaktor SF1/mBBP an die Verzweigungssequenz. Das Heterodimer U2AF65/35 (U2 *auxiliary factor*) bindet an die Polypyrimidinsequenz und an das AG-Dinukleotid der 3'-Spleißstelle. Bereits in diesem frühen Stadium etabliert sich über U2AF und U1-70K eine Verbindung zwischen der 5'- und der 3'-Spleißstelle. Das U2 snRNP assoziiert wahrscheinlich bereits lose mit dem E-Komplex. Die Verdrängung von mBBP durch das U2 snRNP kennzeichnet die Umwandlung zum A-Komplex. Mit dem Eintritt des tri-snRNP U4/U5/U6 entsteht der Komplex B. Er enthält alle für das Spleißen nötigen Komponenten, ist aber inaktiv. Die Umlagerungen der RNA/RNA-Interaktionen führt zur Verdrängung der U1 snRNA an der 5'-Spleißstelle durch die U6 snRNA. U1 und U4 snRNA verlassen das Spleißosom. Zwei Trans-Ester-Reaktionen verknüpfen die Exons miteinander. Das Intron-Lariat wird degradiert und die freigewordenen U snRNPs stehen für den nächsten Spleißzyklus zur Verfügung.

Dieser enthält das freie Exon 1 und das Intronlariat, das noch mit dem Exon 2 verknüpft ist. Der Zusammenhalt der beiden Intron-Enden erfolgt dabei vermutlich über die gleichzeitige Interaktion mit einer Schleife der U5 snRNA (Stevens *et al.*, 2002). Nach dieser Umlagerung wird die zweite Umesterung katalysiert, wobei das Intron herausgeschnitten wird und das 3' Ende des *upstream* Exon mit dem 5'-Ende des *downstream* Exons verknüpft wird. Der sogenannte *exon-junction-complex* (EJC) wird nach dem zweiten Spleißschritt 5'-wärts der neuen Exon-Verknüpfung auf der mRNA "abgelegt". Er besteht aus Proteinen, die der Zelle eine korrekte Durchführung des mRNA Spleißprozesses "signalisieren" (Will et al. 2008). Abschließend wird der Spleißosom-Komplex aufgelöst und die einzelnen U snRNPs werden für weitere Spleißosom abgelöst (Arenas *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2002) und der Komplex zerfällt in die U snRNPs, die in einen neuen Zyklus eintreten können. Das Lariat wird anschließend abgebaut. Die reife mRNA wird dann aus dem Zellkern transportiert und kann an den Ribosomen translatiert werden (Jurica *et al.*, 2003).

#### 1.7 Regulierende Elemente des Spleißens

Die Erkennung von Spleißstellen kann durch zahlreiche aktivierende bzw. supprimierende Proteine reguliert werden, die an sogenannten cis-regulatorische Seguenzen, meist in der Nähe von Spleißstellen, binden (Blencowe et al., 2000) (Abb. 8). Es kann zwischen spleißfördernden ESEs oder ISEs (exonic/intronic splicing enhancers) und spleißinhibierenden ESSs oder ISSs (exonic/intronic splicing silencers) unterschieden werden (Wang et al. 2005), wobei die Anzahl der Enhancer- bzw. Silencer-Sequenzen die Wirkung beeinflusst (Chou et al., 2000; McCullough, 2000). Cis-regulatorische Elemente sind kurze redundante Seguenzen, die von Proteinen erkannt werden und zu einer Rekrutierung des Spleißosoms führen. Im Rahmen der Untersuchungen des alternativen Spleißens wurden exonic splicing enhancers (ESEs) intensiv untersucht (Maniatis, 2002, Black et al., 2003). In einigen Fällen stellte sich ein Einfluss der ESEs auf das konstitutive Spleißen heraus (Mayeda et al., 1999, Schaal, 1999a). Viele ESEs wurden durch die Auswahl von RNA Sequenzen aus einer großen Anzahl von randomisierten Oligomeren gefunden, die zu einer Stimulation und anschließender Benutzung schwacher Spleißstellen führten (Liu et al., 1998, 2000; Schaal et al., 1999b) und insbesondere mit SR-Proteinen interagierten (Tacke und Manley, 1999; Bilodeau et al., 2001, Chabot et al., 1997; Gilbert et al., 1993; Kanopka et al., 1996).

*ESEs* werden in zwei Hauptgruppen klassifiziert, wobei die erste Gruppe reich an Purinen, die andere Gruppe durch Cytosin/Adenin (C/A)-reiche Elemente charakterisiert ist (Oers *et al.,* 1994; Coulter *et al.,* 1997).

*ESSs* werden bevorzugt von hnRNPs und weiteren negativen Regulatoren gebunden (Wang *et al.*, 2004). Bei den *intronic regulatory elements* konnten erst wenige Sequenzen definiert werden (Hui, 2005).

Zudem können 5'-Spleißstellen schwache stromaufwärts liegende 3'-Spleißstellen stimulieren und so die Exon-Definition beeinflussen (Robberson *et al.,* 1990; Berget *et al.,* 1995; Asang et al., 2008).



Abb. 8: Schematische Darstellung einer Intron-Exon-Grenze eines eukaryotischen Gens (Hartmann et al., 2008). Ein spleißbares Gen besteht aus Exons (orange) und aus wenigstens einem Intron (grün), welches durch den Spleißprozess aus der prä-mRNA entfernt wird. Die Exon-Intron-Grenze wird als Donor-Spleißstelle oder 5' Spleißstelle (5'ss) bezeichnet, während die Intron-Exon-Grenze Akzeptor-Spleißstelle oder 3' Spleißstelle (3'ss) genannt wird. Die 5'-Spleißstelle der prä-mRNA wird vom freien 5'-Ende der U1 snRNA über Basenpaarungen erkannt. Die Bindung des U1 snRNPs (U1) an die 5'ss kann unter anderem durch die RS-Domäne von SR-Proteine (SR) oder Mitglieder der hnRNP-Familie (hnRNP) beeinflusst werden. Die spleißregulatorischen Faktoren können an bestimmte Stellen des Exons oder Introns binden (Mitte). Entsprechend ihrer Zielsequenz und ihrer Funktion können die jeweiligen *cis*-regulierenden Sequenzen als *exonic* (E) oder *intronic* (I) *splicing* (S)-*enhancer* (E) oder *silencer* (S) bezeichnet werden, z.B. *ESE* für *exonic splicing enhancer*. Die große Untereinheit des *auxiliary-factors* U2AF (U2AF65) erkennt den Polypyrimidintrakt und bindet das U2 snRNP an die *branch site*. Die kleinere Untereinheit U2AF35 (35) bindet an das AG Dinukleotid im 3'-Bereich des Introns. Sequenzmotive typischer *cis-acting splicing regulatory sequences* sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

Bei den *trans*-wirkenden Faktoren handelt es sich häufig um nicht-snRNP Spleißfaktoren aus den Familien der SR- oder hnRNP-Proteinen (Smith *et al.*, 2000). Dabei zeigen SR-Proteine bevorzugt eine spleißfördernde Wirkung (Blencowe *et al.*, 2000; Graveley, *et al.*, 2000, 2002; Tacke *et al.*, 1999), während die Bindung von hnRNPs meistens zu einer Inhibition des Spleißens führt (Bilodeau *et al.*, 2003; Caputi *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001). Innerhalb beider Proteinfamilien gibt es jedoch auch Ausnahmen (Caputi *et al.*, 2002; Graveley *et al.*, 1999; Kanopka *et al.*, 1996; Krecic *et al.*, 1999; Nasim *et al.*, 2003). *Trans*-

wirkende Faktoren erkennen und binden *cis*-regulatorische Elemente und beeinflussen somit die Auswahl der Spleißstellen (Black 2003).

SR-Proteine sind sowohl essentielle Spleißfaktoren als auch Regulatoren alternativen Spleißens (Krainer *et al.* 1990; Zahler und Roth, 1995). Ihre Wirkung ist abhängig von der Konzentration, der Struktur (Phosphorylierung der RS-Domäne) und der Lokalisation sowie von ihrer Interaktion mit weiteren *trans*-wirkenden Elementen (wie U2AF, U1 snRNP oder Mitgliedern der SR-Protein-Familie) (Smith *et al.*, 2000).

## 1.7.1 Die SR- und hnRNP-Proteinfamilie

SR-Proteine sind Serin- und Arginin-reiche Proteine, welche in der Regulation und Selektion von Spleißstellen eukaryotischer mRNA beteiligt sind. SR-Proteine sind sowohl für das konstitutive- als auch für das alternative Spleißen unabdingbar.

SR-Proteine stellen eine Familie hochkonservierter Proteine dar, die N-terminal ein oder zwei RNA-Bindedomänen (RRM) und C-terminal die namensgebende Arginin- und Serin-reiche Domäne, die sogenannte RS-Domäne, besitzen. Über die Phosphorylierung der RS-Domäne wird die Aktivität der SR-Proteine beeinflusst. Dementsprechend erfolgt über die Phosphorylierung der RS-Domäne die zelltyp- oder zellzyklusspezifische Modulation der Menge an aktiven SR-Proteinen (Ge *et al.,* 1990; Misteli *et al.,* 2000).

Die RS-Domänen der SR-Proteine können sich gegenseitig binden wodurch die Interaktion zwischen den einzelnen Komponenten des Spleißosoms gefördert wird (Cogan *et al.*, 1997; Graveley *et al.*, 2000). Darüberhinaus wird durch die Bindung der RS-Domäne an die RNA der labile, komplementäre RNA-Strang während der zahlreichen Umlagerungen bei der Spleißosomenbildung und bei der Katalyse stabilisiert (Fu *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2006). Die Bindung der SR-Proteine an die prä-mRNA erfolgt sequenzspezifisch durch die RNA-Bindedomänen (RRM). In einigen Fällen können beschriebene Bindungsstellen von mehreren SR-Proteinen erkannt werden (Tacke *et al.*, 1995).

Zu den Funktionen der SR-Proteine gehören die Erkennung von Spleißstellen und die Rekrutierung von Spleißfaktoren an die prä-mRNA (Graveley *et al.*, 2000). SR-Proteine können die Bindung der U1 snRNA an die 5' Spleißstelle stabilisieren (Caputi *et al.*, 2004; Jamison *et al.*, 1995; Kohtz *et al.*, 1994; Puig *et al.*, 1999). Die starke Erhöhung der Konzentration von SR-Proteinen führte in *in vitro*-Experimenten sogar zu einer U1 snRNP-Unabhängigkeit des Spleißens (Crispino *et al.*, 1994; Lund *et al.*, 2002). Folglich könnte es über die direkte Bindung des SR-Proteins mit dem U1-spezifischen Protein U1-70K zu einer Aktivierung der 5' Spleißstelle kommen (Cao *et al.*, 1998; Kohtz *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung ist die direkte Rekrutierung des U6 snRNP unter Umgehung der U1 snRNP-Bindung (Tarn *et al.*, 1995). Die Erkennung der 3' Spleißstelle

durch *ESE*-gebundene SR-Proteine erfolgt entweder durch die Rekrutierung von U2AF65/35 (Graveley *et al.,* 2001; Wang *et al.,* 1995) oder durch eine direkte Interaktion mit dem *branch point* (Graveley *et al.,* 2004; Shen *et al.,* 2004).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation bieten antagonisierende Proteine, wie hnRNPs, die der positiven Regulation durch SR-Proteine entgegengewirken (Eperon *et al.*, 2000; Hanamura *et al.*, 1998; Mayeda *et al.*, 1993, 1992; Zahler *et al.*, 2004) (Abb. 9).



# Abb. 9: Der regulierende Einfluss von SR-Proteinen, hnRNPs und SR-ähnliche Proteinen auf die Erkennung von Spleißstellen (modifiziert nach Otte, 2006).

Die Erkennung von Spleißstellen sowie die Definition von Intron-/Exongrenzen erfolgt über die in [1]-[8] dargestellten Protein-Protein-Interaktionen.

In [1] ist die Bindung von U1 snRNP an die 5' Spleißstelle abgebildet, die durch die Interaktion der SR-Domäne von U1-70k an das SR-Protein unterstützt wird. Die SR-Proteine fördern über Interaktionen mit U2AF35 bzw. 65 indirekt auch die Anlagerung des U2 snRNPs an die *branch point sequence* [2]. In [3] ist eine exonübergreifende Interaktion abgebildet, die nach dem Exon-Definitions-Modell (Berget *et al.*, 1995) die Definition einer Spleißstelle über die Kommunikation der 3' Spleißstelle mit der 5' Spleißstelle des stromabwärts gelegenen Introns ermöglicht. SR-Proteine am 3'-Ende und am 5'-Ende zweier benachbarter Exons können über die Bindung des SR-ähnlichem Proteins Sm160/300 zu einer Überbrückung von Introns führen [4]. Die Interaktion zwischen hnRNPs und *intronic splicing silencers* (ISS) stellt einen negativen Einfluss auf die Spleißstellenerkennung dar [5]. Zudem verhindert die Interaktion zwischen hnRNP Proteinen und dem Polypyrimidin-Trakt (PPT) die Bindung von U2AF65 (Tange *et al.*, 2001). Die *exonic splicing silencer* (*ESSs*) verhindern die Rekrutierung des U2AF-Komplexes [6] (Domsic *et al.*, 2003; Si *et al.*, 1998) bzw. der U2 snRNPs [7] und wirken negativ regulierend auf die U1 snRNP [8] (Damgaard *et al.*, 2002; Eperon *et al.*, 2000).

Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs) gehören zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen im Zellkern. hnRNPs binden bereits kotranskriptional an naszierende Transkripte und verpacken diese, in Analogie zu den Nukleosomen der DNA, in ca. 700 Nukleotide umfassende Protein/RNA-Komplexe (Bennett *et al.*, 1992; Dreyfuss *et al.*, 1993). Bisher konnte einigen hnRNPs eine Funktion in alternativen Spleißprozessen zugeordnet werden. Eine Bindung der hnRNPs an *ESSs* führte zu einer Spleißinhibition bzw.

zum *exon-skipping* (Blanchette *et al.,* 1999; Caputi *et al.,* 1999; Chen *et al.,* 1999; Gatto-Konczak *et al.,* 1999; Kashima *et al.,* 2003; Nasim *et al.,* 2003; Wagner *et al.,* 2001).

### 1.8 Alternatives Spleißen

Alternatives Spleißen von RNA ist ein grundlegender Mechanismus der Genregulation. Auf diesem Mechanismus beruht die Bildung der enormen Vielfalt des Proteoms auf der Basis vergleichsweise weniger Gene. Den etwa 25.000 Genen des Menschen steht eine ungleich größere Zahl von etwa 250.000 Proteinen gegenüber (Harrison *et al.*, 2002).

Das alternative Spleißen eukaryotischer Gene macht die Expression strukturell ähnlicher Proteine möglich. Diese unterscheiden sich in einigen Domänen und können dementsprechend eine andere Funktion ausüben. Da im humanen Genom viele Gene mindestens zwei durch alternatives Spleißen entstandene Proteinisoformen exprimieren, lässt sich das kodierende Potential eines Organismus vervielfachen (Black, 2000). Neben dem konstitutiven Spleißen kommt dem alternativen Spleißen der prä-mRNA eine zunehmende Bedeutung zu (Horowitz et al., 1994; Smith et al., 1989). Beim alternativen Spleißen werden andere als die üblichen Spleißstellen verwendet. Die durch alternatives Spleißen entstandene heterogene reife mRNA kann qualitativ und quantitativ andere Funktionen aufweisen.

Ein konstitutives Exon wird immer gespleißt oder in die reife mRNA eingebaut. Daneben gibt es Exons, die durch alternatives Spleißen reguliert werden (Black, 2003). Abb. 10 zeigt eine Übersicht fünf möglicher Formen des alternativen Spleißens. Ein Exon kann entweder eingeschlossen oder übersprungen (*exon-skipping*) werden (siehe A). Durch die Modifikation der 5' oder 3' Spleißstelle kann das Exon verlängert oder gekürzt werden (B, C). In einigen Fällen, kommt es zum gegenseitigen Ausschluss von Exons, dabei wird nur eines der verschiedenen Exons in die reife mRNA eingebaut (D). Schließlich können Introns durch den Einfluss des alternativen Spleißens entfernt oder in der mRNA genutzt werden (E).



Abb. 10: Übersicht über die verschiedenen Formen des alternativen Spleißens (modifiziert nach Ast, 2004). Dabei können unterschiedliche Formen des alternativen Spleißens unterschieden werden: A) das Überspringen (*exon-skipping*)/ Einschließen von Exons; B) und C) das Benutzen unterschiedlicher 5' oder 3' *splice sites* (*alternative 5'/3' splice site*); D) das gegenseitige Ausschließen (*mutually exclusive exons*); E) das Beibehalten von Introns (*intron retention*)

### 1.9 Pathologische Bedeutung des alternativen Spleißens

15% aller krankheitsassoziierten Man geht heute davon aus, dass mindestens Punktmutationen in Spleißdefekten resultieren (Krawczak et al., 1992; Ars et al., 2000). Die Mehrzahl davon betrifft die 3'- oder 5' Spleißstellen selbst. Es kommt zu einem Funktionsverlust und folglich zu einem exon-skipping, einer Intronretention oder der Nutzung einer nahe gelegenen kryptischen Spleißstelle. Bislang weniger beschrieben sind durch eine Mutation inaktivierte bzw. neu entstandene Silencer- oder Enhancer-Elemente (Faustino et al. 2003). Oftmals werden die sehr variablen Enhancer und Silencer überhaupt erst dadurch identifiziert, dass eine Mutation in einem bestimmten Genbereich zu Spleißfehlern führt. Durch Spleißfehler kann es zu einem vorzeitigen Stopkodon kommen, welches bei der nachfolgenden Translation zum Abbruch der Aminosäurenkette-Synthese und folglich zu einem funktionslosen Protein führt. Andererseits kann auch eine Schädigung der Spleißmaschinerie selbst zu veränderten mRNAs führen. Wird die Spleißregulation durch einen Nukleotidaustausch, Mutationen oder fehlerhaftes Spleißen gestört, können über veränderte Genprodukte Krankheiten entstehen, sowie der Verlauf von Krankheiten beeinflusst werden. Eine veränderte Selektion der Spleißstelle kann durch Mutationen der regulierenden Elemente bedingt sein.

Pathologisches alternatives Spleißen kann Einfluss auf die Entstehung und Progression des

Mammakarzinoms haben. Dabei spielt das veränderte Spleißen von Genen tumorbiologisch relevanter Proteine eine Rolle, wozu u.a. das CD44-Glykoprotein und Hormonrezeptoren (Ferro *et al.*, 2003; Orban *et al.*, 2003) gehören. Modifizierte Expressionsmuster von Spleißfaktoren (u.a. SR-Proteine) sowie die daraus resultierenden Veränderungen der Selektion von Spleißstellen scheinen Erklärungsansätze für die Ausbildung eines malignen Phänotyps zu sein (Grosso *et al.*, 2008). Die genauen Regulationsmechanismen stehen derzeit im Fokus der Wissenschaft und könnten Ansatzpunkte für moderne Therapiestrategien liefern (Nissim-Rafinia *et al.*, 2000; Sierakowska *et al.*, 2000; Pilch *et al.*, 2001; Mercatante *et al.*, 2002).

### 1.10 Maschinelles Erlernen des alternativen Spleißens

In den letzten Jahren sammelten sich aufgrund von Forschungsprojekten im Rahmen der Gensequenzierung gewaltige Datenmengen an. Die Analyse auf Grundlage der gesammelten Daten ist von großem Interesse, um zusätzliche Informationen über pathogene Mechanismen und Prozesse auf genetischer Ebene zu erhalten. Unlängst konnte sich das "maschinelle Lernen", ein Verfahren aus dem Bereich der Bioinformatik, in verschiedenen Fachbereichen der Medizin und der Biologie etablieren. Die Methoden des maschinellen Lernens basieren auf verschiedenen Aspekten aus den Bereichen der Statistik, der mathematischen Optimierung und der künstlichen Intelligenz (KI). Zur Extraktion bestimmter Informationen aus den vorhandenen Datensätzen wurden verschiedene computergestützte Methoden entwickelt. Der Einsatz leistungsfähiger algorithmischer Verfahren zur Analyse, Modellierung und Simulation biologischer Prozesse und Systeme ist zu einem wichtigen Bestandteil für die Entwicklung der biologischen Grundlagenforschung, der Medizin und der Biotechnologie geworden (Rätsch, 2006).

Dazu werden empirische Beobachtungen, die so genannte Lernstichprobe, analysiert, um daraufhin präzise Vorhersagen zu bestimmten Fragestellungen treffen zu können. So konnten Methoden des maschinellen Lernens in den Bereichen der Gensequenzierung, der Funktionsbestimmung von Proteinen und Ribonukleinsäuren sowie der Modellierung komplexer Genregulations- und Stoffwechselprozesse und der Beurteilung der intrinsischen Stärke von Spleißstellen entwickelt werden.

Bislang wurden verschiedene computergestützte Methoden für die Analyse bzw. die Bewertung und die Beurteilung von Spleißstellen entwickelt. Mit solchen Methoden können die unmittelbaren Umgebungen der Spleißstellen analysiert werden. Die ermittelten Daten über untersuchte Spleißstellen können u.a. als Informationen zur Vorhersage aberranter Spleißprozesse genutzt werden. Sobald eine genügend große Anzahl von Beobachtungen als Lernstichprobe vorliegt, lassen sich anhand dieser Techniken genaue Aussagen über das aberrante Spleißen vornehmen.

Die korrekte Vorhersage der verschiedenen Spleißformen und das genauere Verständnis der Regulationsmechanismen des Spleißens ist ein Ziel der derzeitigen Forschung. Ein wichtiger Ansatz besteht darin, die komplexen Hintergründe der Vorhersage genauer zu untersuchen und auf einfache allgemein verständliche Informationen zu reduzieren. Unter anderem kann die Position oder sogar die Länge von relevanten, degenerierten Sequenzmotiven relativ zu den Spleißstellen bestimmt werden. Die so bestimmten Regionen können dann mit anderen informatischen oder biochemischen Methoden genauer untersucht werden, um auf diese Weise einen tieferen Einblick in die vielschichtigen Spleißmechanismen zu erlangen (Rätsch *et al.*, 2005)

#### 1.11 Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung

Seit 1997 fördert die Deutsche Krebshilfe 12 universitäre Zentren für Familiären Brust- und Eierstockkrebs. Im Rahmen dieses überregionalen Verbundprojektes wurde für Frauen mit einer erblichen Belastung für das Mamma- und Ovarialkarzinom ein strukturiertes Beratungsund Betreuungsangebot flächendeckend etabliert und evaluiert. In den Zentren werden Familien auf Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 untersucht. Hierbei werden Familien mit pathogenen Mutationen identifiziert und identifizierte Risikopersonen in einem intensivierten Früherkennungsprogramm betreut. Gesunden Frauen kann bei konkreten Verdachtspunkten eine prädiktive Testung angeboten werden, die eine evtl. Mutation ausschließt und damit die Frauen entlastet oder die pathogene Mutation der Familie und damit das individuelle Erkrankungsrisiko bestätigt. Neben pathogenen Mutationen werden in beiden Genen Veränderungen unklarer Bedeutung (unklassifizierte Varianten = UV) nachgewiesen. Diese machen 22% aller bislang bekannten verschiedenen Seguenzabweichungen im BRCA1-Gen und 52% aller Sequenzabweichungen im BRCA2-Gen aus (Chenevix-Trench et al., 2006). In der Regel handelt es sich um einzelne Basenaustausche oder fragliche Spleißmutationen. Eine solche Sequenzvariante kann bis zur Klärung der funktionellen Bedeutung hinsichtlich ihres pathogenen Effekts nicht beurteilt werden. Die prädiktive Gentestung muss folglich als nicht-informativ eingestuft werden. Mittels Segregationsanalysen in Familien mit mehreren lebenden Erkrankten sowie LOH (Loss of heterozygosity)-Analysen in archiviertem Tumormaterial wird versucht eine Aussage über die funktionelle Bedeutung der entsprechenden Mutationen treffen zu können (Niederacher, 1998). Potentielle Spleißmutationen werden auf RNA-Ebene abgeklärt. Auf diese Weise konnte in letzter Zeit die pathogene Bedeutung mehrerer Mutationen geklärt werden (Schmutzler et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit zur Abklärung derartiger Mutationen ist die Anwendung von *in silico*-Methoden, unter denen in der Systembiologie die Auswertung und grafische Darstellung von experimentell gewonnenen Informationen am Computer verstanden wird. Es konnten eine Reihe von Programmen entwickelt werden, die dem Anwender als *Webtools* zur Bewertung von Spleißmutationen zur Verfügung stehen.

Das NHGRI (*National Human Research Genome Institute*) entwickelte eine Datenbank auf der analysierte Mutationen eingetragen und gespeichert werden können. Mittlerweile wurden Informationen zu 1368 Mutationen bezüglich des BRCA1-Gens und 1847 Mutationen bezüglich des BRCA2-Gens in der Datenbank des *BIC* (*Breast Cancer Information Core*) hinterlegt. In der Datenbank des bundesweiten Konsortiums zum hereditären Brust- und Eierstockkrebs wurden insgesamt 959 Mutationen registriert.

Bezugnehmend auf die BIC-Datenbank und die Datenbank des deutschen Konsortiums sollen
sämtliche 5'ss-Mutationen sowie 3'ss- Mutationen erfasst werden. Anhand der Mastersequenz von BRCA1 und BRCA2 lassen sich entsprechende Mutationen mithilfe ausgewählter *in silico*-Methoden bewerten und ihre fragliche Pathogenität einschätzen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Zusammenfassung sämtlicher, in den Datenbanken aktuell registrierter Mutationen. Mittels ausgewählter *in silico*-Methoden soll versucht werden, sämtliche Spleißstellenmutationen von BRCA1- und BRCA2 zu bewerten und deren klinische Relevanz einzuschätzen.

Außerdem soll die Rolle sämtlicher stiller Mutationen, mithilfe des Webtool ESRsearch, hinsichtlich ihres Einflusses auf exonic splicing regulatory sequences (ESRs) untersucht werden.

In diesem Zug müssen zudem Rückschlüsse über die Reliabilität und den prognostischen Nutzen der ausgewählten *in silico*-Methoden getroffen werden.

## 2 Material und Methoden

#### 2.1 Erfassung der Mutationen

Zur Erfassung von Mutationen im BRCA1 und BRCA2-Gen konnte auf die Datenbanken des *Breast Cancer Information Core (BIC)* und die Daten des bundesweiten Konsortiums zum hereditären Brust- und Eierstockkrebs, "*German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer*" (GCHBOC) zugegriffen werden.

Die zentrale Datenbank des *BIC* wurde vom *National Human Genome Research Institut* (NHGRI) eingerichtet und verwaltet Informationen über identifizierte Mutationen und Polymorphismen der BRCA-Gene.

Im *Breast Cancer Information Core* sind Informationen zu 3215 Mutationen gespeichert. In der Datenbank des deutschen BRCA-Konsortiums wurden 959 Mutationen hinterlegt. In den Datenbanken werden Informationen zu den Mutationen bzw. Polymorphismen unter zusätzlicher Angabe von Exon, Art der Mutation, Basen- bzw. Aminosäureaustausch und klinischer Relevanz gespeichert.

Bevor die intrinsischen Spleißstellenstärken mit den verschiedenen Algorithmen bewertet werden können, müssen zunächst sämtliche Mutationen in den Datenbanken entsprechend der potentiellen 5'-, 3' Spleißstellen oder *ESE/ISE* und *ESS/ISS* zusammengestellt und kategorisiert werden.

Für die Anwendung der Algorithmen für die Bewertung einer bestimmten Spleißstellenmutation ist es notwendig, sämtliche Speißstellenmutationen des NHGRI und des deutschen Konsortiums, die auf den Datenbanken mittels humangenetischer Nomenklatur (z.B. IVS5+3A>G) hinterlegt wurden, mithilfe der BRCA1- bzw. BRCA2-Mastersequenz in die entsprechenden Sequenzen (z.B. AAGGTGTATAA) zu übersetzen.

#### 2.2 Algorithmen zur Bewertung der intrinsischen Spleißstellenstärken

Der Entwicklung der *in silico*-Methoden lagen sowohl experimentelle als auch statistische Ansätze zugrunde. In der Arbeit werden verschiedene Algorithmen verwendet, die zur Berechnung der intrinsischen Spleißstellenstärke genutzt werden und im Internet als *Webtools* zur Verfügung stehen. Anhand des Datensatzes der *BIC* und des Deutschen Konsortiums soll mithilfe der ausgewählten *in-silico*-Methoden die klinische Bedeutung unklassifizierter 5' Spleißstellen bzw. 3' Spleißstellen eingeschätzt werden.

Bei den vier ausgewählten *in silico*-Methoden zur Bewertung von 5'-Spleißstellen handelt es sich um den HBond-Score (HBS) (Asang *et al.*, 2008; Freund *et al.*, 2003, 2005; Caputi *et al.*,

2004; Kammler *et al.*, 2001), den MaxEnt-Score (Salzberg *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1993; Yeo *et al.*, 2004), den SD-Score (Sahashi *et al.*, 2007) und die Shapiro und Senapathy-Matrix (S&S) (Shapiro *et al.*, 1987; Senapathy *et al.*, 1990). Die Ermittlung der Ergebnisse basiert bei dem jeweiligen Algorithmus auf unterschiedlichen Theorien, auf welche in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden soll. Ein Vergleich der verschiedenen Algorithmen ermöglicht eine gegenseitige Kontrolle der ermittelten Ergebnisse und eine Beurteilung der Aussagekraft des jeweiligen Algorithmus.

Besonders Mutationen nahe der Intron-Exon-Grenze haben einen bedeutenden Einfluss auf den Spleißvorgang. An der 5' Spleißstelle beinhaltet dies die Nukleotidpositionen -3 bis +6 bzw. +8. Zur Beurteilung der 3' Spleißstelle beziehen sich die drei zur Verfügung stehenden Algorithmen MaxEnt-Score, *weight-matrix-model* (WMM), *first-order-Markov-model* (MM) (Staden, 1984) auf die Nukleotidpositionen -20 bis +3.

#### 2.2.1 Shapiro&Senapathy-Matrix

Die Shapiro und Senapathy (S&S)-Matrix ist eine Positions-spezifisch-gewichtete-Matrix (*Position-specific weight matrix* (PSWM)), die auch zur Berechnung der intrinsischen Stärke einer 5' Spleißstelle herangezogen werden kann. Die Matrix basiert auf der Berücksichtigung der Sequenzkonservierung der 5' Spleißstelle in den Positionen -3 (das dritte Nukleotid vom 3' Ende des vorgelagerten Exons) bis +6 (das sechste Nukleotid im Intron) (Shapiro *et al.*, 1987; Senapathy *et al.*, 1990). Hieraus resultiert der S&S-Score der auf einer Zahlenskala im Bereich 0-100 liegt. Der Wert 100 repräsentiert eine komplette Kongruenz mit der Konsensussequenz. Der Wert 0 tritt auf, wenn in allen Positionen der Spleißstelle das am wenigsten wahrscheinlichste Nukleotid auftritt. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich jedes Nukleotid in seiner individuellen Position unabhängig von den anderen Positionen der 9nt-langen Konsensussequenz verhält. Entsprechende Mutationen lassen sich mithilfe des *Webtools* http://ast.bioinfo.tau.ac.il/SpliceSiteFrame.htm berechnen. Es können sowohl 5'ss-Mutationen als auch 3'ss Mutationen analysiert werden. Entscheidend für eine vergleichbare Bewertung ist, dass der PSWM ein vergleichbarer bzw. der gleiche Datensatz von annotierten Spleißstellen zugrunde gelegt wird.

#### 2.2.2 MaxEntScan

Der MaxEntScan berücksichtigt Abhängigkeiten zwischen unmittelbar benachbarten und nicht benachbarten Positionen der 5'ss Konsensussequenz. Der Algorithmus basiert auf dem *first-order-Markov-model* (MM) und dem Modell der maximalen Entropie (ME) (Nagai *et al.,* 1990).

Die erste Methode ist für die Erkennung von Abhängigkeiten zwischen benachbarten Positionen verantwortlich, während das Modell der maximalen Entropie die Verteilung der kurzen Sequenzmotive schätzt, wobei es Abhängigkeiten zwischen nicht-benachbarten sowie angrenzende Positionen einbezieht.

Das *maximum dependence decomposition model* (MDD) entspricht im Ansatz einem Entscheidungsbaum, der die Abhängigkeiten in den frühen Zweigen des Baumes (Moore *et al.,* 2000) verstärkt gewichtet. Die Methoden *first-order-Markov-model* (MM), Modell der maximalen Entropie (ME), *maximum dependence decomposition model* (MDD) und w*eight-matrix-model* (WMM), berechnen die Wahrscheinlichkeiten einzelner Nukleotide für jede Position aus einer Trainingsmenge (Gooding *et al.,* 2006). Mithilfe des *Webtools* http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\_scoreseq\_acc.html konnten Aussagen über die relevanten Sequenzen getroffen werden (Salzberg *et al.,* 1997; Zhang *et al.,* 1993; Yeo *et al.,* 2004).

#### 2.2.3 HBond-Score

Der HBond-Algorithmus analysiert Wasserstoffbrückenmuster zwischen der U1 snRNA und der 5'ss, unabhängig von Nukleotidhäufigkeiten in bestimmten Positionen. Zur Ermittlung wurde die als *Webtool* zur Verfügung stehende Anwendung http://www.uni-duesseldorf.de/rna/html/hbond\_score.php verwendet.

Der HBond-Score basiert auf Mutationsanalysen der HIV-1-Spleißstelle D4. Er bezieht Wasserstoffbindungen zwischen der 5' Spleißstelle und allen 11 Nukleotiden des freien 5' Endes der U1 snRNA mit ein. Der HBond-Score errechnet sich aus der Formation der Wasserstoffbindungen zwischen den einzelnen Nukleotidpositionen, wobei er zusätzlich Nachbarschaftsbeziehungen der nächstgelegenen Nukleotide berücksichtigt. Ein stabiler RNA Duplex zwischen der U1 snRNA mit der 5' Spleißstelle schützt zudem die prä-mRNA des verwendeten Spleißreporters und initiiert die Bildung des Spleißosoms (Kammler *et al.,* 2001) (Abb. 11). In Kombination mit Mutationsanalysen der Test-Spleißstelle wurde dieser Schutzmechanismus genutzt, um Informationen über die Doppelstrang-Stabilität zu erhalten. Die experimentellen Informationen wurden mit dem *computational hydrogen bond weight model* ergänzt, welcher anhand des Musters der U1 snRNA einen numerischen Score errechnet, den HBond-Score (http://www.uni-duesseldorf.de/rna/html/hbond\_score.php). Das Modell postuliert, dass unterschiedliche Bindungsmuster von SR-Proteinen für unterschiedliche Schwellenwerte der U1 snRNP Bindung verantwortlich sind (Abb. 11)



Abb. 11: Ein SR-Protein rekrutiert das U1 snRNP an die 5' Spleißstelle (http://www.uniduesseldorf.de/rna/html/background.php). Die Anzahl der komplementären Nukleotide, die für die U1 snRNA-Bindung benötigt wird, kann hinsichtlich verschiedener SR-Proteine variieren. Das SR-Protein in (A) fördert über Interaktionen mit der U1 70K die Bindung von U1 snRNA. Im Vergleich zu (B) benötigt die U1 snRNA in (A) aufgrund des SR-Proteins eine geringere Anzahl an komplementären Nukleotiden um an die 5' Spleißstelle binden zu können. Demnach ist der Schwellenwert zur Bindung der U1 snRNA an die 5' Spleißstelle in (A) niedriger als in (B).

Neben der Erkennung der Wasserstoffbindung zwischen den einzelnen Positionen, werden im HBond-Algorithmus auch die Interdependenz der nicht direkt benachbarten Nukleotide berücksichtigt. Im Gegensatz zu rein statistischen Ansätzen, die die Nukleotidpositionen jenseits der Position sechs ignorieren, schließt der HBond-Algorithmus die Positionen +7 oder +8 zur Berechnung der Spleißstellenstärke vollständig mit ein (Hartmann *et al.*, 2008; Asang *et al.*, 2008; Freund *et al.*, 2003, 2005; Caputi *et al.*, 2004; Kammler *et al.*, 2001). Experimente bestätigten die Relevanz der Positionen +7 und +8 für die Bindung der U1 snRNA-Duplex an die Spleißstelle in Abhängigkeit der Spleißstellensequenz. Diese Beobachtung steht im Einklang mit *in vitro* Experimenten, bei denen die funktionelle 5' Spleißstelle von zufälligen Sequenzen isoliert wurde. Dabei wurden die 5'ss mit der besten Komplementarität zu U1 snRNA als am effizientesten gewertet (Lund *et al.*, 2002).

#### 2.2.4 SD-Score

Mittels SD-Score ließen sich mit einer Sensitivität von 97,1% und einer Spezifität von 94,7%, Vorhersagen über die Folgen einer Spleißmutation ermitteln (Sahashi *et al.*, 2007). Der  $\Delta$ SD-Score errechnet sich aus der Subtraktion der SD-Score Ergebnisse der Wild-Typ- und der Mutationssequenz. Lag der  $\Delta$ SD-Score >-0,34 wirkte sich die Mutation in 13 von 13 Fällen nicht auf den prä-mRNA Spleißprozess aus, wohingegen ein  $\Delta$ SD-Score <-0,34 und ein SD-Score von <2,9 in 9 von 10 Fällen ein aberrantes Spleißen vorhersagte. Ergibt sich aus der Berechnung einer 5' Spleißstelle ein  $\Delta$ SD-Score von <0,34 und ein Wert für den SD-Score von >-2,9 muss zur endgültigen Bestimmung über den Spleißprozess  $\Delta$ Ri als ein weiterer Wert ermittelt werden.  $\Delta$ Ri errechnet sich aus der Subtraktion von Ri der Wild-Typ-Sequenz von Ri der Mutation. Ergibt sich  $\Delta$ Ri >-1,45 konnte keine Veränderung für den Spleißprozess beobachtet werden. Hingegen zeigte ein Wert  $\Delta$ Ri <-1,45 in fünf von fünf Fällen einen aberranten Spleißprozess an (Abb. 12)



**Abb. 12: SD-Score Algorithmus** (Sahashi, 2007). Die Abbildung zeigt den SD-Score Algorithmus, der Spleißmutationen der 5' Spleißstelle beurteilt. Der Algorithmus basiert auf einem Trainingsdatensatz von 31 Minigenen und wurde mit einem weiteren Datensatz von 32 Minigenen und 179 natürlich auftretenden Spleißmutationen überprüft.

Ähnlich wie bei der S&S-Matrix, bewertet der SD-Score neun Nukleotide der 5' Spleißstelle unabhängig voneinander mit einer *position specific weight matrix,* welche aus einem großen Datensatz von 189.249 U2-abhängigen 5' Spleißstellen abgeleitet wurde. Im SD-Algorithmus werden jedoch mögliche Interaktionen benachbarter Nukleotide nicht berücksichtigt. Mithilfe des SD-Scores, scheinen sich effiziente Aussagen über die Konsequenzen von

spezifischen 5' Spleißstellenmutationen ableiten zu lassen.

Sahashi *et al.* ermittelten für den SD-Score-Algorithmus in ihren Untersuchungen eine Sensitivität von 97,1% und eine Spezifität von 94,7% für die Vorhersage aberranten Spleißens. Damit stellt der SD-Score-Algorithmus ein praktisches Instrument zur Beurteilung möglicher Folgen von 5' Spleißstellenmutationen dar (Sahashi *et al.*, 2007).

#### 2.3 ESRsearch

Die Rolle der *splicing regulatory elements* und ihrer interagierenden Proteine hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Es stellte sich eine wachsende Anzahl, der mit ihnen assoziierten Pathologien heraus (Stoilov *et al.,* 2002; Faustino *et al.,* 2003; Heinrich *et al.,* 2005; Licatalosi *et al.,* 2006; Novoyatleva *et al.,* 2006).

Die Vorhersage-*Tools* nach Goren *et al.*, Fairbrother/Wang und Zhang/Chasin basieren auf Informationen zellbasierter Assays, die systematisch auf die Identifikation von *ESRs* (*exonic splicing regulatory sequences*) ausgelegt sind (Goren *et al.*, 2006; Fairbrother *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Exemplarisch ist in den Abbildungen 13 und 14 die Maske der Ergebnisseite der *ESRsearch* für die willkürlich ausgewählte Synonymous BRCA1 Exon 3, 233G/A dargestellt. Zur Analyse werden die entsprechenden Bereiche der beiden BRCA1- und BRCA2-Mastersequenzen sowie im Vergleich dazu die entsprechende Sequenz, mit der jeweiligen stillen Mutation, in die Maske des *ESRsearch-Tools* eingetragen. Aufgrund der Länge der *PESRs*, die je nach Algorithmus aus vier bis acht Nukleotiden bestehen, muss eine Sequenz mit einer Größe von  $\geq$ 22 Nukleotiden eingefügt werden.

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Codon	Base Change	AA Change	Designation	Mutation Type
BRCA1	17	3	233	38	G to A	Lys to Lys	233G/A	Syn

Т	TGA					
		AGGAACCTG	Т	GTGACCA		
	GATCA	AGGAAC	ACAAAG			
TCTGGAG	ATCA.	AGGAACCTG	Т	GTGAC	ATATTT	GCA
TCTGGAGT	TGATCA	AGGAACCTGTC	TCCACAAAGT	GTGACCA	CATATTT	GCAA
1		<mark>. ] .</mark>			]	
1	10	20	30	40	5	0 54

Goren et	t al. PE	SRs	Fairbrothe	er and W	ang I	PESRs	Zhang & Chasin PESE/PESS				Known ESRs		
MOTIF	START	END	MOTIF	START	END	TYPE	MOTIF	START	END	TYPE	MOTIF START END TYPE		
<b>TCTGGA</b>	1	6	GATCAA	10	15	PESE	AGGAACCT	15	22	PESE	TTGA 8 11 hnRNP-B		
CTGGAG	2	7	ATCAAG	11	16	PESE	GGAACCTG	16	23	PESE			
ATCAAG	11	16	AAGGAA	14	19	PESE	TGTGACCA	35	42	PESE			
CAAGGA	13	18	AGGAAC	15	20	PESE					•		
AACCTG	18	23	ACAAAG	29	34	PESE							
TGTGAC	35	40					•						
<b>ATATTT</b>	44	49											
TTTGCA	48	53											

Abb. 13: Wild-Typ Sequenz der Synonymous BRCA1 Exon 3, 233G/A. Über der Wild-Typ-Sequenz von BRCA1 sind *PESRs* (rot) nach Goren *et al.*, *PESEs/PESSs* (blau) nach Fairbrother/Wang und *PESEs/PESSs* (grün) nach Zhang/Chasin dargestellt. Bekannte *ESRs*-Sequenzen werden in orange dargestellt.

T	ſG <b>A</b>					
	AGGA.	ACCTG	ACAAAAT	GTGACCA		
	GATCAAGGA	<b>≜C</b>				
TCTGGAG	<b>ATCAAGGA</b>	ACCTG	T	GTGAC	ATATTTTGC	A
TCTGGAGT	IGATCAAGGA.	ACCTGTC	TCCACAAAAT	GTGACCAC	ATATTTTGC	A A
1						- 1
1	10	20	30	40	50	54

Goren et	Goren et al. PESRs Fairbrother and Wang PESRs					Zhang & Chasin PESE/PESS				Known ESRs				
MOTIF	START	END	MOTIF	START	END	TYPE	MOTIF	START	END	TYPE	MOTIF	START	END	TYPE
TCTGGA	1	6	GATCAA	10	15	PESE	AGGAACCT	15	22	PESE	TTGA	8	11	hnRNP-B
CTGGAG	2	7	ATCAAG	11	16	PESE	GGAACCTG	16	23	PESE				
ATCAAG	11	16	AAGGAA	14	19	PESE	ACAAAATG	29	36	PESS				
CAAGGA	13	18	AGGAAC	15	20	PESE	<b>ATGTGACC</b>	34	41	PESE				
AACCTG	18	23					TGTGACCA	35	42	PESE				
TGTGAC	35	40												
ATATT	44	49												
TTTGCA	48	53												

Abb. 14: Sequenz der Synonymous Punktmutation BRCA1 Exon 3, 233G/A. Nach dem Basenaustausch von Guanin zu Adenin stellt sich die Sequenz verändert dar. Unveränderte Anzahl und Position der *PESRs* (rot) nach Goren *et al.*, Durch die Mutation geht eine Bindungsstelle eines *PESE* verloren (blau) nach Fairbrother/Wang, der Algorithmus nach Zhang/Chasin (grün) berechnet nach der Punktmutation einen zusätzlichen *PESE* und einen *PESS*. Bekannte *ESRs*-Sequenzen (orange) bleiben unverändert.

# 3 Ergebnisse

### 3.1 Verteilung der Mutationen auf den BRCA1- und BRCA2-Genen

Aus der Datenbank des *Breast Cancer Information Core* lassen sich 1368 verschiedene Mutationen sämtlicher Mutationstypen bezüglich des BRCA1-Gens abrufen. 1847 Angaben des *BIC* betreffen Mutationen des BRCA2-Gens.

Durch die Normierung der Exons auf eine vergleichbare Länge erfolgt die Berechnung des relativen Anteils an verschiedenen Mutationen im jeweiligen Exon auf eine Länge von 100bp Nukleotiden. Unberücksichtigt bleiben hierbei die Frequenzen der einzelnen Mutationen (Abb. 15). Hieraus ergibt sich für das BRCA1-Gen eine durchschnittliche Anzahl an Mutationen von 41,29 je Exon. Besonders in Exon 3 kristallisierte sich mit einer relativen Häufigkeit von 79,63 eine hohe Anzahl an Mutationen heraus. Zudem finden sich mit 75,61 (Exon 19) und 65,38 (Exon 18) überdurchschnittlich viele Mutationen.



Abb. 15: Verteilung der Mutationen auf die BRCA1- und BRCA2-Exons nach Normierung auf eine Länge von 100 Nukleotiden. Nach Normierung ergibt sich für das BRCA1-Gen eine durchschnittliche Anzahl an Mutationen von 41,29 je Exon. In Exon 3 kristallisiert sich mit einer relativen Häufigkeit von 79,63 die höchste Anzahl an Mutationen heraus. In Exon 19 finden sich mit 75,61 und in Exon 18 mit 65,38 die zweit- und dritthäufigsten Mutationen. Eine im Verhältnis zur Exonlänge geringe Anzahl an Mutationen findet sich im Exon 11 mit 17,0, im Exon 10 mit 19,48, im Exon 14 mit 20,47 und im Exon 15 mit 21,99. Die relative Häufigkeit von Mutationen liegt im BRCA2-Gen durchschnittlich pro Exon bei 23,53 Mutationen. Eine überdurchschnittliche Häufigkeiten an Mutationen finden sich in Exon 5 (46) und Exon 2 (38,68). In Relation zur Exonlänge ergibt sich für das Exon 27 des BRCA2-Gens eine auffällig geringe relative Häufigkeit für Mutationen von 11,17, gefolgt von Exon 4 mit 14,68.

Exon 1 und Exon 4 des BRCA1-Gens sind nicht kodierend. Das Exon1 des BRCA2-Gens gehört zum Teil zum nicht tranlatierten 5' Ende. Hier waren auf den Datenbanken keine Mutationen zu verzeichnen.

Eine im Verhältnis zur Exonlänge geringe Anzahl an Mutationen findet sich im Exon 11 mit 17,0, im Exon 10 mit 19,48, im Exon 14 mit 20,47 und im Exon 15 mit 21,99. Hinsichtlich des BRCA2-Gens ergibt sich im Durchschnitt eine relative Häufigkeit pro Exon von 23,53. Eine überdurchschnittliche Häufigkeit an Mutationen lässt sich v.a. in Exon 5 mit 46 und Exon 2 mit einer relativen Häufigkeit von 38,68 beobachten. In Relation zur Exonlänge ergibt sich für das Exon 27 des BRCA2-Gens eine auffällig geringe relative Häufigkeit für Mutationen von nur 11,17, gefolgt von Exon 4 mit 14,68.

Das Exon 11 des BRCA1-Gens wurde aus Gründen seiner Größe von 3425 Nukleotiden willkürlich in 4 Untereinheiten A-D unterteilt (Abb. 16).



\*Exon 11 was arbitrarily divided due to its large size.

Abb. 16: Darstellung der Exons des BRCA1-Gens (*BIC* Database). BRCA1 besteht aus 24 Exons, wobei das Exon 1 und Exon 4 nicht kodeierend sind. Sie erstrecken sich über eine Länge von ca. 100 kb auf der genomischen DNA. Die Zahlen geben die Exons wieder. Das Exon 11 ist aufgrund seiner Größe in die Abschnitte 11 A-D unterteilt.

Gleiches gilt für das große Exon 11 des BRCA2-Gens, welches in Abb. 17 schematisch dargestellt ist. Aufgrund der Größe von 4932 Basenpaaren (bp) (Hofmann, W. *et al.,* 1998) wurde das Exon 11 in der Datenbank des *Breast Cancer Information Core* willkürlich in Exon 11A-11F unterteilt.



\*Exon 11 was arbitrarily divided due to its large size.

Abb. 17: Darstellung der Exons des BRCA2-Gens (*BIC* Database). Seine 27 kodierenden Exons erstrecken sich über eine Länge von ca. 70 kb auf der genomischen DNA. Die mittlere Genregion mit dem 4932 bp großen Exon 11 und dem knapp 1000 bp großen Exon 10 bildet, ähnlich wie bei BRCA 1, den größten Teil (60 %) der kodierenden Region des BRCA 2-Gens.

Bei der Betrachtung der *BIC*-Einträge hinsichtlich der Frequenz einzelner Mutationen findet sich für die *Frameshift*-Mutation BRCA1 185delAG im Exon 2 mit 1979 Einträgen eine besonders hohe Anzahl an Registrierungen. Die *Frameshift*-Mutation führt im Nukleotid 185 zu einer Deletion der Nukleotide Adenin und Guanin, die als Folge zu einem Stopcodon führt. Darüber hinaus finden sich im BRCA1-Gen weitere häufige Registrierungen für die Mutationen

5382insC in Exon 20 mit 1063 Einträgen, C61G in Exon 5 mit 222 Einträgen. Im Exon 11 finden sich u.a. für die Mutationen R1347G mit 154 Einträgen, M1008I mit 138 Einträgen, 4184del4 mit 132 Einträgen häufige Registrierungen.

Hohe Frequenzen einzelner BRCA2-Mutationen können für die Mutationen 6174delT Exon 11 (1087 Einträge), K3326X Exon 27 (293 Einträge), I2490T Exon 15 (238 Einträge) nachgewiesen werden. In der Tab. 3 sind sämtliche BRCA1- und 2-Mutationen aufgelistet, die ≥100-mal in der *BIC*-Datenbank registriert wurden.

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Codon	Base Change	AA Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important
BRCA2	105	10	1206	326	C to A	Ser to Arg	S326R	М	no
BRCA2	105	11	3036	936	del ACAA	Stop 959	3036del4	F	yes
BRCA2	105	11	3031	935	G to A	Asp to Asn	D935N	М	no
BRCA1	106	6	332-11	-	T to G	Stop 75	IVS5-11T>G	IVS	yes
BRCA1	108	13	-	-	ins 6kb	-	exon13ins6kb	F	yes
BRCA2	110	18	8377	2717	G to T	Ala to Ser	A2717S	М	no
BRCA2	110	27	10462	3412	A to G	lle to Val	I3412V	М	unknown
BRCA2	111	22	9078	2950	G to T	Lys to Asn	K2950N	М	unknown
BRCA1	114	11	2640	841	C to T	Arg to Trp	R841W	М	unknown
BRCA2	115	22	9058	2944	A to T	lle to Phe	I2944F	М	unknown
BRCA1	121	11	3875	1252	del GTCT	Stop 1262	3875del4	F	yes
BRCA2	125	11	6551	2108	G to A	Arg to His	R2108H	М	unknown
BRCA1	126	13	4446	1443	C to T	Arg to Stop	R1443X	Ν	yes
BRCA2	128	10	1742	505	T to C	lle to Thr	1505T	М	no
BRCA1	132	11	4184	1355	del TCAA	Stop 1364	4184del4	F	yes
BRCA1	138	11	3143	1008	G to A	Met to Ile	M1008I	М	unknown
BRCA2	141	3	353	42	A to G	Tyr to Cys	Y42C	М	unknown
BRCA2	141	10	1379	384	C to T	Ser to Phe	S384F	М	no
BRCA2	141	11	2192	655	C to G	Pro to Arg	P655R	М	unknown
BRCA1	154	11	4158	1347	A to G	Arg to Gly	R1347G	М	unknown
BRCA2	185	20	8795	2856	A to C	Glu to Ala	E2856A	М	no
BRCA2	191	11	4486	1420	G to T	Asp to Tyr	D1420Y	М	no
BRCA1	222	5	300	61	T to G	Cys to Gly	C61G	М	yes
BRCA2	238	15	7697	2490	T to C	lle to Thr	I2490T	М	unknown
BRCA2	293	27	10204	3326	A to T	Lys to Stop	K3326X	Ν	no
BRCA1	1063	20	5382	1755	ins C	Stop 1829	5382insC	F	yes
BRCA2	1087	11	6174	1982	del T	Stop 2003	6174delT	F	yes
BRCA1	1979	2	185	23	del AG	Stop 39	185delAG	F	yes

Tab. 3: Mutationen, die >100mal in der BIC registriert wurden

Das *BIC*-Kriterium "Number of times recorded", in der die Frequenz einzelner Mutationen registriert werden soll, muss vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass die Daten auf keiner systematischen Erfassung beruhen. Festgestellte Mutationen werden von Instituten, Kliniken und Praxen auf Freiwilligenbasis in der Datenbank registriert. Dementsprechend können die Frequenzen insbesondere von häufigen Mutationen falsch-niedrig sein.

Bei einzelnen Mutationen könnten die hohen Frequenzen in der Datenbank in Zusammenhang mit *founder*-Mutationen in verschiedenen Populationen gesehen werden.

Zudem könnte die hohe Anzahl der Registrierungen einzelner Mutationen durch eine entsprechende Relevanz der Mutation in der Klinik zu erklären sein. Dagegen sprechen jedoch acht Mutationen (siehe Tab.3), die im *BIC*-Kriterium *"Clinically Important"* als unbedeutend befunden wurden.

#### 3.2 Mit 39,83% im BRCA1-Gen und 45,91% im BRCA2-Gen stellen Missense-Mutationen den größten Anteil der auftretenden Mutationstypen dar

Werden die verschiedenen Mutationen der Datenbanken hinsichtlich der Mutationstypen betrachtet, ist insbesondere die hohe Anzahl der *Missense*-Mutationen auffallend. *Missense*-Mutationen stellen mit einer Häufigkeit von 39,83% den größten Anteil der im BRCA1-Gen vorkommenden Mutationen dar. Einen weiteren großen Teil der Mutationen werden laut *BIC*-Daten durch einen *Frameshift* verursacht (25,83%). 28,77% Mutationen sind in der *Intervening Sequence*, d.h. sich im entsprechenden Intron befindende Mutationen, zu beobachten. Hierzu werden auch Mutationen in der Nähe der Intron/Exon-Grenze gezählt, wodurch möglicherweise die intrinsische Stärke einer Spleißstelle verändert wird und es in der Folge zu einem fehlerhaften Spleißprozess kommt.

Ein weiterer Teil der Mutationen sind *Nonsense*-Mutationen (9,03%). Einen weitaus geringeren Anteil der Mutationen stellen *Synonymous* (2,24%) oder *In Frame Deletions* (1,19%) dar. Mutationen in der *5-prime Untranslated Region* (0,28%) und in der *3-prime Untranslated Region* (0,13%) sind eher selten, ebenso *In Frame Insertions* (0,07%) (Abb. 18).



**Abb. 18: Prozentuale Verteilung der Mutationstypen im BRCA1- und BRCA2-Gen**. In BRCA1 und BRCA2 stellen die Missense-Mutationen (M) mit einer Häufigkeit von 39,83%/45,06% erwartungsgemäß den größten Anteil des im BRCA1-Gen vorkommenden Mutationstypen dar. 25,83% der BRCA1-Mutationen und 28,99% der BRCA2-Mutationen sind Frameshift-Mutationen (F). 28,77% BRCA1-Mutationen und 9,3% der BRCA2-Mutationen sind in der *Intervening Sequence* (IVS) zu finden. Nonsense-Mutationen (N) stellen einen Anteil von 9,03% (BRCA1) und 9,96% (BRCA2) dar. Synonymous (Syn) (2,24% BRCA1/ 3,31% BRCA2), In Frame Deletions (IFD) (1,19% BRCA1/1,24% BRCA2) und 5'-prime Untranslated Region (5' UTR) (0,28% BRCA1/0,54% BRCA2) und In Frame Insertion (IFI) (0,07% BRCA1/0,21% BRCA2) machen nur einen geringen Anteil der registrierten Mutationen aus. Mutationen in der *3-prime Untranslated Region* (3'UTR) wurden in der *BIC* für das BRCA1-Gen in 0,13% der Fälle registriert. Daten zu 3'UTR-Mutationen bezüglich des BRCA2-Gens existieren nicht.

Wie auch auf dem BRCA1-Gen stellen sich bei der Ermittlung der Mutationstypen die *Missense*-Mutationen mit einem Anteil von 45,06% als häufigster Mutationstyp im BRCA2-Gen heraus. *Frameshift*-Mutationen stellen einen Anteil von 28,99% dar. Weiterhin wurden *Nonsense*-Mutationen (9,96%), Mutationen in der *Intervening* Sequenz (9,3%) und *Synonymous* (3,41%) registriert. Spleißstellenmutationen machen im BRCA2-Gen lediglich 2,66% aus. Eine untergeordnete Rolle spielen *In Frame Deletions* (IFD) (1,25%), Mutationen in der *5-prime Untranslated Region* (5'UTR) (0,54%) und *In Frame Insertions* (IFI) (0,22%). In der *3-prime Untranslated Region* (3'UTR) wurden in der *BIC* für das BRCA2-Gen nicht registriert.

Offensichtlich stellen Missense-, Frameshift-, IVS- und Nonsense-Mutationen die Mutationstypen dar, die zu folgenschwereren Defekten auf Proteinebene führen und so im klinischen Zusammenhang gehäuft in Erscheinung treten.

Insbesondere für Missense-Mutationen könnte die erhöhte Anzahl registrierter Mutationen in den beschriebenen Exons, aufgrund einer erhöhten klinischen Relevanz der durch diese Mutationen getroffenen Proteindomänen des Gens verursacht werden. Nonsense- und Frameshift-Mutationen führen in der Regel zu instabilen Genprodukten. Es enstehen hierbei allenfalls Genprodukte mit Fehl- bzw. Teilfunktionen.

In der *BIC*-Datenbank traten hinsichtlich der Unterscheidung zwischen IVS- und Spleißstellenmutationen Missverständnisse auf. Mutationen, die die Nukleotidpositionen der 5' Spleißstelle betrafen, wurden teilweise in der Kategorie "*Mutationtype*" als "*Splice*" aufgeführt, ein anderer Teil wurde als "*Intervening sequence*" registriert. In dieser Arbeit werden sämtliche Mutationen, die das Intron betreffen als "*Intervening* sequence" behandelt.

#### 3.3 Registrierte 5'ss Mutationen häufen sich in den hochkonservierten Positionen IVS+1 und IVS+2

In den Datenbanken wurden insgesamt 445 BRCA1 und BRCA2 Mutationen registriert, bei denen die Mutation die intrinsische Stärke der Spleißstelle beeinflussen könnte.

254 der relevanten Mutationen sind dabei auf dem BRCA1-Gen lokalisiert, weitere 191 Mutationen mit möglichem Einfluss auf die intrinsische Stärke der Spleißstelle liegen auf dem BRCA2-Gen. Unter Berücksichtigung der oben genannten Informationen wurde ein besonderes Interesse darauf gelegt, die Abschnitte des BRCA1- und BRCA2-Gens zu beurteilen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Beeinflussung des Spleißmusters führen. Dementsprechend konnte die Suche nach Mutationen der Donor-Seite auf die Positionen der letzten Nukleotide des Exons und der ersten acht Nukleotide des Introns (-3 bis +8) beschränkt werden. Auf der Akzeptor-Seite definieren, gemäß den Algorithmen zur Bewertung, die letzten 20 Nukleotide des Introns, sowie die ersten drei Nukleotide des Exons die intrinsische Stärke der 3' Spleißstelle.

Auf den Datenbanken des *BIC* und des deutschen Konsortiums für hereditären Brust- und Ovarialkrebs konnten insgesamt 113 BRCA1 und 80 BRCA2 Informationen zu 5'-Spleißstellenmutationen, sowie 141 BRCA1 und 111 BRCA2 Informationen zu 3' Spleißstellenmutationen gefunden werden.

Sowohl im BRCA1-Gen, als auch im BRCA2-Gen findet sich auf der Donor-Seite an den Positionen IVS+1, IVS+2 und im letzten Nukleotid des Exons eine große Anzahl an Mutationen (Abb. 19). An der 3' Spleißstelle liegt diese Akkumulation von registrierten Mutationen für BRCA1 und BRCA2 in Position IVS-1 und IVS-2. Sowohl an der 3' Spleißstelle, als auch an der 5' Spleißstelle liegen die genannten Positionen direkt an der Intron/Exon-Grenze. An der 5' Spleißstelle wurden 41 Mutationen an der Nukleotidposition IVS+1 oder IVS+2 registriert. An der 3' Spleißstelle konnten an IVS-1/-2 eine Anzahl von insgesamt 59 Mutationen gefunden werden. Eine Mutation in der Nukleotidposition IVS+1/+2 bzw. IVS-1/-2 führt im Allgemeinen zu einem aberranten Spleißprozess. Für die Erkennung der 5'- bzw. 3' Spleißstelle sind die hochkonservierten und invariablen Dinukleotide der 5' Spleißstelle (GT) und der 3' Spleißstelle (AG) an der Exon/Intron bzw. Intron/Exon Grenze essentiell. Ein, durch

eine Mutation verursachter, Basenaustausch in den Dinukleotiden kann ein *exon-skippin*g oder andere aberrante Spleißprozesse auslösen. Beim *exon-skipping* wird aufgrund einer Mutation der Donor (5'ss)-Spleißstelle (GT) oder Akzeptor (3'ss)-Spleißstelle (AG) das ganze Exon nicht mehr erkannt. Folglich wird die nächste Spleißstelle genutzt, wobei schließlich zwei Introns einschließlich des nicht erkannten Exons entfernt werden. Mehr als die Hälfte (52,22%) der registrierten Mutationen der 5'ss Spleißstelle des BRCA1-Gens sind am letzten Nukleotid des Exons (13,28%), IVS+1 (25,67%) und IVS+2 (13,28%) lokalisiert.



**Abb. 19: Prozentuale Verteilung der Mutationen an der 5' Spleißstelle in BRCA1 und BRCA2**. 52,22% der registrierten Mutationen der 5' Spleißstelle des BRCA1-Gens sind am letzten Nukleotid des Exons nt-1 (13,28%), IVS+1 (25,67%) und IVS+2 (13,28%) lokalisiert. Auf den restlichen Positionen ist die Verteilung der registrierten Mutationen ausgewogen. Die Anteile an den Mutationen liegen hier für BRCA1 bei 5,31% (IVS+7). An der Position IVS+8 sind 2,5% der Mutationen registriert.

Die Verteilung der Mutationen im BRCA2-Gen an der 5' Spleißstelle stellt sich im Bereich des letzten Nukleotids des Exons (Exons nt-1) mit 18,75%, in IVS+1 23,75% dar. Auf den restlichen Positionen liegt eine ausgewogene Verteilung registrierter Mutationen vor. Die Anteile an den Mutationen liegen hier für BRCA2 bei 8,85%. Auf den Positionen IVS+7 und IVS+8 liegt der Anteil registrierter Mutationen zwischen 2,5-5%.

Im Gegensatz zum BRCA1-Gen, liegen die Mutationen an der 5' Spleißstelle des BRCA2-Gens vor allem im Bereich des letzten Nukleotids des Exons (Exons nt-1) (18,75%) und IVS+1 (23,75%) (Abb. 19). Auf den restlichen Positionen ist eine ausgewogene Verteilung registrierter Mutationen festzustellen. Die Anteile an den Mutationen liegen hier für BRCA1 und BRCA2 bei 5,31%-8,85%. Eine Ausnahme stellen die Positionen IVS+7 und IVS+8 dar. Hier sind mit 2,5%-5% weniger Einträge von Mutationen in den Datenbanken zu finden.

Mutationen in den hochkonservierten Nukleotiden IVS+1 und IVS+2 führen zu einer starken Beeinflussung der Spleißstellenerkennung, die folglich zu einem aberrantem Spleißen und im weiteren Verlauf zu Proteindefekten führen können.

### 3.4 An der 3' Spleißstelle ist ein Maximum an Mutationen für BRCA1 und BRCA2 im Bereich IVS-1 und IVS-2 zu finden

Am Akzeptor, oder der 3' Spleißstelle konnte ein Maximum an Mutationen für BRCA1 und BRCA2 im Bereich IVS-1 und IVS-2 festgestellt werden (Abb. 20). Der Anteil der Mutationen an diesen Positionen in BRCA1 liegt insgesamt bei 32,49%, in BRCA2 bei insgesamt 21,09%. Eine niedrigere Anzahl registrierter Mutationen stellt sich in den Nukleotidpositionen IVS-4, IVS-15 und IVS-17 in BRCA1 und BRCA2 dar. Besonders gering liegt der Anteil der Mutationen in BRCA1 Position IVS-5 und BRCA2 Position IVS-3. Hier liegen die Mutationsraten bei <1%. Wie auch an der 5' Spleißstelle findet sich bei einer Mutation in den hochkonservierten Nukleotidpositionen IVS-1 und IVS-2 das höchste Risiko für eine pathogene Beeinflussung der Proteinfunktion.



**Abb. 20:** Prozentuale Verteilung der Mutationen an der 3' Spleißstelle in BRCA1 und BRCA2. Es existiert ein Maximum an Mutationen für BRCA1 im Bereich IVS-1 und IVS-2. Der Anteil der Mutationen in BRCA1 liegt an diesen Positionen bei 32,49%, in BRCA2 bei 21,09%. In BRCA1 tritt in den Positionen IVS-4, IVS-15 und IVS-17 eine verminderte Anzahl an Mutationen auf. Besonders niedrig (<1%) liegt der Anteil der Mutationen in BRCA1 an Position IVS-5. In BRCA2 liegt in den Positionen IVS-8, IVS-15 und IVS-18 tritt eine verminderte Anzahl an Mutationen vor. Besonders niedrig (<1%) liegt der Anteil der Mutationen in BRCA2 an Position IVS-3.

#### 3.5 Beurteilung von BRCA1- und BRCA2-Mutationen der 5'- und 3' Spleißstelle anhand ausgewählter Algorithmen

Das Auftreten von *unclassified variants* (UVs) in der Genanalyse, bei Personen mit dem Verdacht auf eine Veranlagung für hereditären Brust- und Eierstockkrebs, führt häufig zu Beurteilungsproblemen. Die Wahrscheinlichkeit für ein erhöhtes Krebsrisiko, kann in diesen Fällen meistens nicht abschließend bewertet werden.

Algorithmen, die für die Evaluation von nicht beurteilbaren UVs entwickelt wurden, bieten die Möglichkeit entsprechende Mutationen zu bewerten und Informationen für die Beurteilung zu liefern. Wird der Verdacht auf eine pathogene Mutation durch entsprechende Algorithmen bekräftigt, ist gegebenenfalls die Durchführung eines funktionellen Assays erforderlich, um eine abschließende Beurteilung der Mutation zu ermöglichen.

Für die Bewertung von Spleißstellenmutationen stehen verschiedene Algorithmen zur Verfügung. Hinsichtlich der 5' Spleißstellen-Bewertung wurden in dieser Arbeit der HBond-Score, der MaxEnt-Scan, der SD-Score und die S&S-Matrix verwendet.

Die ausgewählten Algorithmen benötigen zur Bewertung der intrinsischen Stärke der 5' Spleißstelle Angaben zu den Nukleotidpositionen -3 bis +6 der Exon/Intron-Grenze. Lediglich der HBond-Score bezieht zur Beurteilung der Spleißstellenstärke die Nukleotidpositionen -3 bis +8 ein.

Zur Bewertung der 3' Spleißstellenstärke stehen der MaxEnt-Scan, das *first-order-Markov-Model* (MM) und das *weight-matrix-model* (WMM) zur Verfügung, die sich auf die Nukleotidpositionen -20 bis +3 beziehen.

Bei der S&S-Matrix, dem HBond-Score wie auch dem MaxEnt-Score werden jeweils die Wild-Typ-Sequenz mit der Sequenz der Mutation verglichen. Durch den Austausch eines Nukleotids bzw. einer Punktmutation kann sich die intrinsische Spleißstellenstärke derartig verändern, dass die mRNA fehlerhaft prozessiert wird. Die verwendeten Algorithmen beurteilen, basierend auf ihren unterschiedlichen Ansätzen (s. Material & Methoden), die intrinsische Stärke einer Spleißstelle unterschiedlich. Durch die Differenzbildung der ermittelten Werte der intrinsischen Stärke der Wild-Typ-Sequenz und der Mutationssequenz resultiert das Ergebnis, wobei zur Beurteilung des Ergebnisses eine Zahlenskala genutzt wird. Grundsätzlich gilt, je größer die Differenz der Wild-Typ-Sequenz im Vergleich zu der Sequenz der Mutation, desto sicherer spricht das Ergebnis für einen aberranten Spleißprozess infolge der Mutation. Zur Bewertung der Ergebnisse liegen jedoch bei den Algorithmen – mit Ausnahme des SD-Scores – keine spezifischen Grenzwerte vor, die ein prädiktives Maß für die Wahrscheinlichkeit aberranten Spleißens darstellen. Folglich kann keine Auskunft über die Relevanz einer Mutation für einen aberranten Spleißprozess gegeben werden. In der *BIC*-Datenbank wird jeder registrierten Mutation mit dem Kriterium *"clinically important"* eine möglicherweise klinisch relevante Information beigefügt. Eine Mutation wird im *BIC*-Kriterium *"clinically important"* vom *BIC steering committee* mit *"yes"* bewertet, wenn die Sequenzänderung bezugnehmend auf die aktuelle Datenlage eine Störung der Genfunktion bewirkt und folglich ein erhöhtes Krebsrisiko besteht. Findet sich in den verfügbaren Daten kein Anhalt für eine Störung der Genfunktion wird die Mutationen in der Kategorie *"clinically important"* mit "no" bewertet. Kann aufgrund fehlender Daten keine Beurteilung der klinischen oder funktionellen Auswirkungen stattfinden wird die Sequenzveränderung in dem Kriterium *"clinically important"* als "unknown" eingestuft.

Anhand des Kriteriums *"clinically Important"* kann die Pathogenität einzelner Spleißstellenmutationen eingeschätzt werden und dient als wertvolle Information bezüglich der Bewertung der Algorithmen.

Spleißstellenmutationen, die in der Kategorie *"clinically important"* mit *"yes"* und *"no"* bewertet wurden, können als Referenz zur Überprüfung der Ergebnisse der ausgewählten Algorithmen dienen. Zudem können sie als Grundlage für eine Grenzwertbestimmung der Algorithmen nach S&S, MaxEnt und HBond genutzt werden, die ein prädiktives Maß für die Wahrscheinlichkeit aberranten Spleißens darstellen können (Tab. 4).

BRCA	# of times Recorded	Exon	Base Change	Designation	Mutation Type	Additional Info	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA1	1	6	ins T	IVS6+2insT	IVS	no	yes	13,2	28,01	27,33	aberrant
BRCA1	31	9	C to T	710C/T	Syn	no	no	1,7	1,84	4,5	aberrant
BRCA1	6	12	G to A	Q1395Q	Syn	no	yes	4,7	6,7	11,93	aberrant
BRCA1	1	15	A to T	IVS15+3A>T	IVS	no	yes	3,9	8,38	8,47	aberrant
BRCA1	11	16	G to C	IVS16+3G>C	IVS	no	yes	5,15	8,28	6,61	aberrant
BRCA1	7	16	T to G	IVS16+6T>G	IVS	no	yes	3,1	4,35	4,16	aberrant
BRCA1	14	16	T to C	IVS16+6T>C	IVS	no	yes	3,1	3,57	5,06	aberrant
BRCA1	3	16	A to T	IVS16+4A>T	IVS	no	yes	5,25	7,53	10,25	aberrant
BRCA1	3	16	A to C	IVS16+4A>C	IVS	no	yes	5,25	4,89	10,51	aberrant
BRCA1	1	17	A to G	IVS17+3A>G	IVS	*yes	yes	2,2	4,89	1,79	aberrant
BRCA1	1	18	A to C	IVS18+3A>C	IVS	no	yes	7,1	9,11	8,4	aberrant
BRCA1	1	19	del 13	IVS19+3del13	IVS	no	yes	10,6	14,2	27,45	aberrant
BRCA1	1	20	G to A	K1759K	Syn	no	yes	4,7	7,46	11,93	aberrant
BRCA1	14	22	T to C	IVS22+8T/C	IVS	no	no	1,3	0	-0,43	normal
BRCA2	1	21	G to A	E2918E	Syn	no	yes	5,2	4,44	11,93	aberrant
BRCA2	14	23	G to A	P3039P	Syn	no	yes	3,2	9,22	11,93	aberrant
BRCA1	1	21	5451+4	IVS21+4A>G	IVS	**yes	yes	3,1	0,98	9,72	aberrant

Tab. 4: IVS und Synonymous 5' Spleißstellenmutationen der BIC mit Angabe "clinically important".

\* BRCA1 c.5074+3A>G (IVS17+3A>G) is a clinically relevant splice site mutation (ashg.org)

\*\* RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations (Bonatti, F. et al., 2006)

#### Ergebnisse

In der *BIC*-Datenbank finden sich 72 Mutationen der IVS und Synonymous, die die 5' Spleißstelle betreffen. Darunter befinden sich 15 Mutationen, die als klinisch bedeutsam bewertet werden. Bei zwei Mutationen wird keine klinische Relevanz angenommen. Bei weiteren 55 registrierten Mutationen ist die klinische Relevanz der Mutation unbekannt.

Zur Beurteilung der verschiedenen Algorithmen kann die klinische Bedeutung der registrierten Mutationen als Referenz für einen aberranten Spleißprozess bzw. für die Tolerierung eines Nukleotidaustausches genutzt werden. Unterstellt wird dabei, dass die entsprechende Mutation als einzige Veränderung im Brustkrebssuszeptibilitätsgen bei der betroffenen Person nachgewiesen wurde.

Anhand der *"clinical importance"* der einzelnen Mutationen ist die Grundlage zur Beurteilung des SD-Scores, des HBond-Scores, des MaxEnt-Scans und der S&S-Matrix geschaffen.

Für die 15 klinisch bedeutsamen Mutationen können mithilfe des HBond-Scores Differenz-Werte zwischen 2,2 und 13,2 generiert werden. Die Mutationen BRCA1 710C/T und BRCA1 IVS22+8T/C werden in der *BIC*-Datenbank als klinisch unbedeutend angesehen, das Deutsche Konsortium beschreibt die Mutation BRCA1 710C/T als eine *"unclassified variant"* und hält sich damit bei der abschließenden Beurteilung zurück. Die Mutation IVS22+8T/C betrifft die Nukleotidposition +8 der Spleißstelle, die ausschließlich der HBond-Score in die Berechnung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle mit einbezieht. Beim MaxEnt-Scan und dem SD-Score werden diese Positionen bei der Berechnung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle vernachlässigt. Der HBond-Score führt mit einem Ergebnis von 1,3 im HBond-Score zu einer Schwächung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle. Die HBond-Score-Differenz der Mutation BRCA1 710C/T beträgt 1,7.

Der MaxEnt-Scan berechnet für die klinisch bedeutsamen Mutationen Ergebnisse zwischen 3,57 und 28,01. Die Mutation BRCA1 710C/T wird mit 1,84 bewertet.

Der SD-Score bewertet die Spleißstellenmutationen als "aberrant" oder "normal". Unter dem Ergebnis "aberrant" wird eine veränderte Spleißstellenerkennung durch die Spleißstellenmutation verstanden. Wird die Mutation als "normal" gewertet, stellt sich keine relevante Beeinflussung der Spleißstelle durch die Spleißstellenmutation heraus. Der SD-Score bewertet alle klinisch bedeutsamen Mutationen als Mutationen, die zu aberrantem Spleißen führen. Als Folge der Synonymous BRCA1 710C/T wird ein aberranter Spleißprozess vorhergesagt.

Die S&S-Matrix bewertet die klinisch bedeutsamen Mutationen mit Ergebnissen zwischen 1,79 und 27,45. Für die Mutation 710C/T wird das Ergebnis 4,5 ermittelt.

Zusammenfassend wird von allen Algorithmen bei sämtlichen mit *"clinically Important"* bewerteten IVS- und Synonymous der 5' Spleißstelle eine Schwächung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle berechnet. Widersprüchliche Aussagen finden sich für die, in der *BIC*-

Datenbank als klinisch unbedeutend ausgewiesene Synonymous BRCA1 710C/T, die im SD-Score mit der Vorhersage eines aberranten Spleißprozesses gewertet wird. Zudem berechnet die S&S-Matrix für die Mutation eine Schwächung der Spleißstellenstärke von 4,5. Hingegen werden für die klinisch bedeutsamen Mutationen IVS17+3A>G und IVS16+6T>G mit 1,79 und 4,16 Ergebnisse berechnet, die zu einer geringeren Schwächung der Speißstellenstärke führen. Auch im MaxEnt-Scan steht die Bewertung der klinisch unbedeutenden Mutation BRCA1 710C/T mit einem Ergebnis von 1,84 mit dem Ergebnis der klinisch bedeutenden Mutation IVS21+4A>G von 0,98 in Konflikt (Tab. 5). Die geringe klinische Bedeutsamkeit der Mutation BRCA1 710C/T könnte damit zusammenhängen, dass diese trotz eines aberrranten Spleißprozesses zu keiner bzw. nur einer geringen Beeinträchtigung der Proteinfunktion führt.

BRCA	# of times Recorded	Exon	Designation	Mutation Type	Additional Info	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA1	31	9	710C/T	Syn	no	no	1,7	1,84	4,5	aberrant
BRCA1	7	16	IVS16+6T>G	IVS	no	yes	3,1	4,35	4,16	aberrant
BRCA1	1	17	IVS17+3A>G	IVS	*yes	yes	2,2	4,89	1,79	aberrant
BRCA1	1	21	IVS21+4A>G	IVS	*yes	yes	3,1	0,98	9,72	aberrant

Tab. 5: Widersprüchliche Aussagen der vier Algorithmen hinsichtlich des *BIC*-Kriteriums *"clinically important"* 

\* BRCA1 c.5074+3A>G (IVS17+3A>G) is a clinically relevant splice site mutation (ashg.org)

\*\* RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations (Bonatti, F. et al., 2006)

#### 3.6 Ermittlung von Grenzwerten für ausgewählte Algorithmen zur Vorhersage aberranter Spleißprozesse

Bezugnehmend auf die Ergebnisse der Algorithmen, anhand der Referenz *"clinically important"* können Grenzwerte der einzelnen Algorithmen zur Vorhersage aberranter Spleißprozesse durch Schwächung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle abgeleitet werden. Unter dem Grenzwert ist der Wert zu verstehen, ab welchem es bei Mutationen der Spleißstelle mit hoher Wahrscheinlichkeit zu aberrantem Spleißen kommt. Dieser Wert wird anhand des verwendeten Datensatzes der *BIC* in Anlehnung an das Kriterium *"clinically important"* gebildet.

Bei Betrachtung der klinisch bedeutsamen IVS-Mutationen und Synonymous ergeben sich im HBond-Score Differenzen zwischen 2,2 und 13,2. Die kleinste HBond-Score Differenz, 2,2, wird vom HBond-Score für die klinisch bedeutsame Mutation BRCA1 IVS17+3A>G berechnet. Somit wird basierend auf diesem Datensatz bei einer HBond-Score Differenz von ≥2,2 aberrantes Spleißen wahrscheinlich. Die Schwächung der intrinsischen Spleißstärke von 1,7 führt, laut der klinisch unbedeutenden Synonymous BRCA1 710C/T, hingegen zu keiner Veränderung im Spleißverhalten (Tab. 6). Aufgrund fehlender Daten kann über einen möglichen Grenzwert bei einem Ergebnis zwischen 1,7 und 2,2 keine Angabe gemacht werden. Die Erweiterung des Datensatzes von IVS-Mutationen und Synonymous der 5' Spleißstelle wäre für die genauere Abschätzung des Grenzwertes erforderlich.

BRC	A # of times Recorded	Exon	Base Change	Designation	Mutation Type	Additional Info	Clinically Important	Hbond- difference
BRCA	1 31	9	C to T	710C/T	Syn	no	no	1,7
BRCA	1 1	17	A to G	IVS17+3A>G	IVS	*yes	yes	2,2
BRCA	1 14	22	T to C	IVS22+8T/C	IVS	no	no	1,3

# Tab. 6: Ermittlung des Grenzwertes für den HBond-Score in Anlehnung an das *BIC*-Kriterium "*clinically important"*

\* BRCA1 c.5074+3A>G (IVS17+3A>G) is a clinically relevant splice site mutation (ashg.org)

Die als "*clinically important"* eingestufte Spleißstellenmutation BRCA1 IVS21+4A>G weist mit einer MaxEnt-Score-Differenz von 0,98 den niedrigsten Wert dar, ab welchem ein aberranter Spleißprozess vorhergesagt wird. Dagegen wird die Synonymous BRCA1 710C/T mit einer Differenz von 1,84 im MaxEnt-Scan mit *not clinically important* bewertet (Tab. 7). Damit lässt sich kein widerspruchsfreier Grenzwert bestimmen.

BRCA	# of times Recorded	Exon	Base Change	Designation	Mutation Type	Additional Info	Clinically Important	Maxent- difference
BRCA1	31	9	C to T	710C/T	Syn	no	no	1,84
BRCA1	1	21	5451+4	IVS21+4A>G	IVS	**yes	yes	0,98

#### Tab. 7: Ermittlung des Grenzwertes für den MaxEnt-Scan in Anlehnung an das *BIC*-Kriterium *"clinically important"*

\*\* RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations (Bonatti et al., 2006)

Die Grenzwerte der S&S-Matrix lassen sich im Bereich zwischen 1,79 und 5,06 ansiedeln, wobei auch hier die Synonymous BRCA1 710C/T mit einer Differenz von 4,5 die ermittelten Grenzwerte unsicher erscheinen lässt (Tab. 8).

BRCA	# of times Recorded	Exon	Base Change	Designation	Mutation Type	Additional Info	Clinically Important	S&S- difference
BRCA1	31	9	C to T	710C/T	Syn	no	no	4,5
BRCA1	7	16	T to G	IVS16+6T>G	IVS	no	yes	4,16
BRCA1	14	16	T to C	IVS16+6T>C	IVS	no	yes	5,06
BRCA1	1	17	A to G	IVS17+3A>G	IVS	*yes	yes	1,79

Tab. 8: Ermittlung des Grenzwertes für die S&S-Matrix in Anlehnung an das *BIC*-Kriterium *"Clinically Important"* 

Aufgrund der Diskrepanzen der Ergebnisse in der S&S-Matrix hinsichtlich der klinischen Relevanz, sind zur Präzision des Grenzwertes funktionelle Spleißanalysen der Mutationen IVS17+3A>G, IVS16+6T>G und IVS16+6T>C angezeigt. Um falsch-negative Bewertungen von Mutationen zu minimieren, werden zunächst die niedrigeren Grenzwerte gewählt, die möglicherweise zu einem falsch-positiven Ergebnis führen. Eine Überprüfung der Ergebnisse unbekannter 5' Spleißstellenmutationen, die unweit des Grenzwertes liegen, ist daher zu empfehlen.

Die Grenzwerte der Algorithmen werden anhand des Kriteriums *"clinically important"* auf folgende Werte festgelegt (Tab. 9).

Grenzwerte für die Bestimmung aberranten Spleißens bei ausgewählten Algorithmen						
Hbond- Score	≥2,2					
MaxEnt-Score	≥0,98					
S&S-Score	≥1,79					

Tab. 9: Grenzwerte für die Bestimmung aberranten Spleißens bei ausgewählten Algorithmen

#### 3.7 Anwendung der Algorithmen und ihrer ermittelten Grenzwerte auf die BRCA1 und BRCA2 5' Spleißstellenmutationen unbekannter klinischer Relevanz

Anhand der festgelegten Grenzwerte kann mithilfe der ausgewählten Algorithmen die Relevanz der übrigen 55 5' Spleißstellenmutationen für einen aberranten Spleißprozess abgeschätzt werden (s. Tab. 18 im Anhang). Für die 55 Mutationen mit einer unbekannten klinischen Bedeutung können in 31 Fällen Differenzen ermittelt werden, die oberhalb der Grenzwerte liegen, so dass auf aberrantes Spleißen geschlossen werden kann. In 18 Fällen findet sich eine einheitliche Vorhersage für keine relevante Beeinflussung der Spleißstelle durch die Mutation. Dies entspricht einer Übereinstimmung der vier Algorithmen in 89,1%. Die Ergebnisse von sechs Mutationen (10,9%) führen zu unterschiedlichen Bewertungen. Hinsichtlich der festgelegten Grenzwerte zur Beurteilung eines möglichen aberranten Spleißprozesses trifft die S&S-Matrix in zwei Fällen ein abweichendes Ergebnis im Vergleich zu den anderen Algorithmen (Tab. 10).

BRCA	# of times Recorded	Exon	Designation	Mutation Type	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA2	1	26	L3216L	Syn	unknown	0,2	0,18	4,5	normal
BRCA2	1	11	IVS11+7del GT	IVS	unknown	1,1	0	2	normal

Tab. 10: Widersprüchliche Ergebnisse der S&S-Matrix zu den Aussagen der übrigen Algorithmen hinsichtlich der Bewertung von UVs der 5'Spleißstelle

Die Festlegung des Grenzwertes des MaxEnt-Scores bei dem Wert ≥0,98 führt im Vergleich zu den restlichen Algorithmen zu zwei abweichenden Ergebnissen (Tab. 11). Die Mutationen IVS13+6T>C und IVS3+6T>C werden nach der Grenzwertbestimmung der verschiedenen Algorithmen vom HBond-Score, der S&S-Matrix und dem SD-Score mit aberrantem Spleißen bewertet. Der MaxEnt-Scan beurteilt die Mutationen mit einer Schwächung der intrinsischen Spleißstellenstärke von 0,34 und 0,77, was bei dem ermittelten Grenzwert von 0,98 für einen unveränderten Spleißprozess sprechen würde. Abweichend wird die Synonymous 710C/T mit einer MaxEnt-Differenz von 1,84 als klinisch unbedeutend gewertet.

BRCA	# of times Recorded	Exon	Designation	Mutation Type	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA1	1	13	IVS13+6T> C	IVS	unknown	3,5	0,34	5,06	aberrant
BRCA2	4	3	IVS3+6T>C	IVS	unknown	3,5	0,77	5,06	aberrant

# Tab. 11: Widersprüchliche Ergebnisse des MaxEnt-Scans zu den Aussagen der übrigen Algorithmen hinsichtlich der Bewertung von UVs der 5'Spleißstelle

Der HBond-Score gibt ausschließlich bei der BRCA2-Mutation IVS5+4delT ein abweichendes Ergebnis zum MaxEnt-Scan, dem SD-Score und der S&S-Matrix an. Unberücksichtigt bleiben bei dem Grenzwert von 2,2, die Mutationen BRCA1 IVS18+7A>G und BRCA2 IVS6+7A>G, die die Nukleotidpositionen +7 und +8 der Spleißstelle betreffen. Ausschließlich der HBond-Score bezieht die Nukleotidpositionen +7 und +8 der 5' Spleißstelle in die Berechnung der intrinsischen Spleißstellenstärke mit ein. Beim MaxEnt-Scan und dem SD-Score werden diese Positionen bei der Berechnung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle vernachlässigt (Tab. 12).

BRCA	# of times Recorded	Exon	Designation	Mutation Type	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA2	2 2	5	IVS5+4delT	IVS	unknown	1,5	2,21	7,55	aberrant
BRCA1	I 1	18	IVS18+7A>G	IVS	unknown	1,9		night howart	ot
BRCA2	2 17	6	IVS6+7A>G	IVS	unknown	1,9		nicht bewent	el

Tab. 12: Widersprüchliche Ergebnisse des HBond-Scores zu den Aussagen der übrigen Algorithmen hinsichtlich der Bewertung von UVs der 5'Spleißstelle

Mit der Bewertung "aberrantes Spleißen" steht die Aussage des SD-Scores zur Mutation IVS19+4T>C in Konflikt mit den Ergebnissen der übrigen Algorithmen (Tab. 13). Der HBond-Score sagt mit einer unveränderten intrinsischen Stärke der Spleißstelle keine Veränderungen im Spleißprozess voraus. Der MaxEnt-Scan berechnet sogar eine Erhöhung der intrinsischen Spleißstellenstärke. Auch in der S&S-Matrix wird der Grenzwert zum aberranten Spleißen nicht überschritten.

BRCA	# of times Recorded	Exon	Designation	Mutation Type	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA2	1	19	IVS19+4T>C	IVS	unknown	0	-0,57	0,27	aberrant

# Tab. 13: Widersprüchliche Ergebnisse des SD-Scores zu den Aussagen der übrigen Algorithmen hinsichtlich der Bewertung von UVs der 5'Spleißstelle

Die ermittelten Grenzwerte führen zu einer großen Anzahl übereinstimmender Ergebnisse. Insbesondere bei einheitlich hohen Score-Differenzen der Algorithmen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von Mutationen ausgegangen werden, die zu aberrantem Spleißen führen. Diese können als wertvolle Information für die Einschätzung unbekannter Spleißstellenmutationen der 5' Spleißstelle genutzt werden. Infolge der geringen Anzahl an Angaben für das *BIC*-Kriterium *"clinically important"* müssen

die ermittelten Grenzwerte jedoch kritisch hinterfragt werden. Speziell bei niedrigen Score-Differenzen müssen weitere IVS-Mutationen und Synonymous für präzisere Grenzwertbestimmungen analysiert werden.

# 3.8 Zwei registrierte 5' Spleißstellen-Mutationen an Position +7 und +8 werden vom HBond-Score als pathogen bewertet

Etwa 10% der 121 registrierten 5'ss-Mutationen in BRCA1 und BRCA2 finden sich in den Nukleotidpositionen +7 und +8. Sechs Mutationen betreffen die Nukleotidposition +7, insgesamt sieben Mutationen sind in der Position +8 lokalisiert (Tab. 14).

Eine Bewertung dieser Mutationen in Bezug auf mögliche Spleißstellennutzungsänderungen lässt sich nur durch den HBond-Score realisieren. Der SD-Score bezieht lediglich die Nukleotidpositionen bis einschließlich +6 in die Berechnung der Mutationen mit ein. Dementsprechend ist mittels SD-Score eine Bewertung von Spleißstellen-Mutationen in den Nukleotidpositionen +7 und +8 nicht möglich und gibt ein mögliches falsch-negatives Ergebnis bezüglich der Pathogenität entsprechender Mutationen zurück.

BRCA	# of times Recorded	Exon	Designation	HBond- difference	MaxEnt-difference	SDS- Prediction
BRCA1	12	6	IVS6+7G>A	-1,9		
BRCA1	1	10	IVS10+7G>A	0		
BRCA1	1	18	IVS18+7A>G	1,9		
BRCA2	17	6	IVS6+7A>G	1,9		
BRCA2	1	11F	IVS11+7delGT	1,1		
BRCA2	2	16	IVS16+7T>A	0	Die Nukleotid-	Die Nukleotid-
BRCA1	7	6	IVS6+8T>C	1,1	werden bei der	werden bei der
BRCA1	1	10	IVS10+8C>T	0	intrinsischen Spleißstellenstärke	intrinsischen Spleißstellenstärke
BRCA1	1	10	IVS10+8C>G	0	nicht berück-sichtigt	nicht berück-sichtigt
BRCA1	14	22	IVS22+8T>C	1,3		
BRCA1	2	23	IVS23+8G>A	0		
BRCA2	1	16	IVS16+8A>G	0		
BRCA2	1	19	IVS19+8G>A	0		

#### Tab. 14: Spleißmutationen in den Nukleotidpositionen +7 und +8

Bei Anwendung des Algorithmus auf die entsprechenden Mutationen lassen sich zwei, möglicherweise pathogene, Veränderungen vorhersagen. Dies betreffen die Mutationen IVS18+7A>G und IVS6+7A>G mit einer HBond-Differenz von jeweils 1,9. In sieben Fällen wurde keine Änderung der intrinsischen Spleißstellenstärke ermittelt. Mit einem Ergebnis von 1,3 für die Mutation IVS22+8T>C und einer HBond-Score Differenz von 1,1 in zwei weiteren Mutationen, wird die intrinsische Stärke der Spleißstelle zwar geschwächt, führt laut der abgeleiteten Grenzwerte aber vermutlich zu keinem aberranten Spleißvorgang. Für die Mutation IVS22+8T>C wird dies mit einer negativen *"clinical importance"* bestätigt. Zu einer Stärkung der intrinsischen Spleißstellenstärke und damit vermutlich nicht zu aberrantem Spleißen, führt die Mutation IVS6+7G>A mit einer Differenz von -1,9.

Zu den Mutationen IVS18+7A>G und IVS6+7A>G können weder in den Datenbanken noch bei PubMed Informationen über eine mögliche Beeinflussung der Expression von BRCA1 oder Veränderung im kodierten Protein gefunden werden. Mit dem HBond-Score werden sie jedoch mit einer Differenz von jeweils 1,9 bewertet, was für eine Beeinflussung der intrinsischen Spleißstellenstärke spricht. Eine Überprüfung der Mutationen in einem funktionellen Assay könnte möglicherweise eine erhebliche Relevanz der Nukleotidpositionen +7 und +8 auf den Spleißprozess belegen.

#### 3.9 Flussdiagramm zur Einschätzung von 5' Spleißstellenmutationen unbekannter Bedeutung mithilfe des HBond-Scores, des MaxEnt-Scans, des SD-Scores und der S&S-Matrix

Das Flussdiagramm (Abb. 21) ermöglicht dem Diagnostiker die Einschätzung von 5' Spleißstellenmutationen unbekannter Bedeutung mithilfe der ausgewählten Algorithmen. Außerdem kann es der Entscheidungsfindung für einen eventuellen Nutzen eines funktionellen Assays dienen. Die fragwürdige 5' Spleißstellenmutation wird abhängig von der Lokalisation der Mutation von den Algorithmen bewertet. Liegt die Mutation in den Nukleotidpositionen +7 oder +8 wird ausschließlich der HBond-Score zur Bewertung der Mutation angewendet, da dieser als einziger diese Positionen berücksichtigt. Bei Spleißstellenmutationen in den Nukleotidpositionen -3 bis +6 finden sämtliche Algorithmen Anwendung. Die von den ermittelten Ergebnisse geben Auskunft über die Beeinflussung Algorithmen des Spleißprozesses durch die Mutation. Führt die Mutation zu einer relevanten Schwächung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle kann ein aberranter Spleißprozess eine Beeinträchtigung der Gen- oder Proteinfunktion zur Folge haben.

Resultieren aus den Ergebnissen der Algorithmen übereinstimmende Ergebnisse, die für einen aberranten Spleißprozess sprechen, erhärtet sich der Verdacht einer klinisch relevanten Mutation. Sprechen die Ergebnisse der Algorithmen gegen einen aberranten Spleißprozess, ist eine klinische Relevanz der Mutation unwahrscheinlich. Weicht das Ergebnis eines Scores von der Bewertung der übrigen Algorithmen ab, muss die bewertete Mutation bezüglich möglicher Besonderheiten betrachtet werden und eventuell mittels funktioneller Analyse auf einen aberranten Spleißprozess überprüft werden. Zudem müssen die einzelnen Algorithmen kritisch hinterfragt werden und ihnen, falls nötig, eine unterschiedliche Gewichtung in der Bewertung der Mutationen zugeschrieben werden.



Abb. 21: Flussdiagramm zur Einschätzung von 5' Spleißstellenmutationen unbekannter Bedeutung mithilfe des HBond-Scores, des MaxEnt-Scans, des SD-Scores und der S&S-Matrix. Bei den, in der Abbildung angegebenen Werten, handelt es sich um die Differenz der jeweiligen Scores zwischen Wild-Typ-Sequenz und der Sequenz der Mutation.

## 3.10 Die Bewertung der 3' Spleißstellen-Mutationen mittels MaxEnt-Scan, MM und WMM bleibt aufgrund fehlender Grenzwertangaben der Algorithmen und mangels funktioneller Analysen von Mutationen ungenau

In den Datenbanken wurden 252 3' Spleißstellen-Muationen registriert, wovon 141 Mutationen BRCA1 und 111 Mutationen BRCA2 betreffen. Hiervon betreffen wiederum 41 BRCA1-Mutationen und 23 BRCA2-Mutationen die Nukleotidpositionen -1 und -2.

Zur Beurteilung der 3' Spleißstellen-Mutationen wurde das gleiche Verfahren, wie zur Ermittlung der Grenzwerte der 5' Spleißstelle verwendet. In der *BIC*-Datenbank konnten 14 Mutationen mit der *BIC*-Angabe *"clinically important"* gefunden werden (Tab. 15). Darunter stellten sich neun IVS-Mutationen als klinisch wichtig dar, fünf Mutationen sind nach Angaben des *BIC steering committee* klinisch unbedeutend. Zur Bewertung der 3' Spleißstelle stehen die Algorithmen nach MaxEnt, MM und WMM zur Verfügung. Im MaxEnt-Score lagen die Ergebnisse der klinisch bedeutsamen Mutationen zwischen -2,91 und 10,14. Die Differenz zwischen Wild-Typ- und Mutationssequenz im MM-Score konnte zwischen -0,27 und 11,06 berechnet werden. Für das WMM ergaben sich Werte zwischen -0,55 und 8,91. Hinsichtlich der Algorithmen liegen keine Grenzwertangaben vor, die auf einen aberranten Spleißprozess schließen lassen könnten. In Hinblick auf die große Streuung der Ergebnisse in allen verwendeten Algorithmen, ist die nähere Eingrenzung eines Wertes zur Vorhersage aberranter Spleißprozesse durch Spleißstellenmutationen nicht möglich.

BRCA	# of times Recorded	Exon	Base Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important	Additional Info	maxent- difference	MM- difference	WMM- difference
BRCA1	13	2	T to C	IVS1- 10T>C	IVS	no	no	1,12	1,28	0,34
BRCA2	15	17	T to C	IVS16- 14T/C	IVS	no	no	0,39	0,32	0,37
BRCA1	25	14	C to T	IVS13- 10C>T	IVS	no	yes	0,25	-0,27	-0,33
BRCA2	2	26	T to G	IVS25- 12T/G	IVS	no	no	1,63	1,26	1,98
BRCA2	4	27	G to A	IVS26- 19G/A	IVS	no	no	0,38	0,29	0,16
BRCA1	1	6	C to G	IVS5-3C>G	IVS	yes	no	3,79	7,73	8,9
BRCA1	6	6	T to G ins 59	IVS5- 1T>Gins59	IVS	yes	no	0	0	0
BRCA1	100	6	T to G	IVS5- 11T>G	IVS	yes	no	3,34	5,9	2,19
BRCA1	24	6	A to G	IVS5- 12A>G	IVS	yes	no	3,6	3,52	-0,55
BRCA1	3	7	C to G	IVS6-3C>G	IVS	yes	no	10,14	11,06	8,91
BRCA1	2	17	A to G	IVS16- 1A>G	IVS	yes	no	0	0	0
BRCA1	3	21	G to A	IVS20- 1G>A	IVS	yes	no	0	0	0
BRCA2	5	17	A to G	IVS16- 2A>G	IVS	yes	no	0	0	0
BRCA2	1	23	C to G	IVS22- 3C>G	IVS	yes	no	-2,91	3,59	8,37

Tab. 15: IVS-Mutationen der 3' Spleißstelle der BIC mit Angabe "Clinically Important"

Literaturangaben zu experimentellen Daten liegen zu folgenden Mutationen vor (Tab. 16). Die Literaturangaben können lediglich zu einer groben Einschätzung der Ergebnisse der Scores führen. So konnte für die 3'ss-Mutation IVS1-10T>C experimentell kein Hinweis auf aberrantes mRNA-Spleißen oder die Abwesenheit der BRCA1-mRNA gefunden werden (Fetzer *et al.,* 1999). Anhand dieser Information spräche eine MaxEnt-Differenz von 1,12, eine MM-Differenz von 1,28 und eine WMM-Differenz von 0,34 gegen einen aberanten Spleißprozess.

Die 3'ss-Mutationen IVS22-2A>G, IVS20-4del3 und IVS10-2A>C stellten sich in experimentellen Analysen als pathogen heraus, was auf einen aberranten Spleißprozess bei einem MaxEnt-Score von  $\geq$ 4,86 schließen ließe (Campos *et al.*, 2003; Keaton *et al.*, 2003).

BRCA	Mutationen	MaxEnt	MM- Difference	WMM- Difference	PMID	Prediction	experimentell verifiziert
BRCA2	IVS24-16T>C	-0,14	0,16	0,28	12759930	normal	Ja
BRCA1	IVS1-10T>C	1,12	1,28	0,34	10459348	normal	Ja
BRCA1	IVS2-14C>T	-0,21	-0,31	-0,36	12759930	normal	Ja
BRCA1	IVS22-2A>G	4,86	nicht duro	chgeführt	12955719	aberrant	Ja
BRCA1	IVS20-4del3	13,07	nicht duro	chgeführt	12955719	aberrant	Ja
BRCA1	IVS10-2A>C	8,86	nicht dure	chgeführt	14513821	aberrant	Ja

Tab. 16: Literaturangaben zu einzelnen Punktmutationen der 3' Spleißstelle

Um präzisere Aussagen über Grenzwerte bzw. Aussagekraft der jeweiligen Scores tätigen zu können, sind weitere funktionelle Analysen bezüglich 3' Spleißstellenmutationen unabdingbar.

#### 3.11ESRs – Bewertung stiller BRCA1- und BRCA2-Mutationen mittels ESRsearch

Bei einer "stillen Mutation" handelt es sich um eine DNA-Mutation im Bereich der kodierenden Region. Trotz des Basenaustauschs resultiert aus der veränderten Aminosäuresequenz keine Veränderung des Proteins. Das ist möglich, da aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für die meisten Aminosäuren mehrere Kodierungsmöglichkeiten existieren. Stumme Mutationen wurden lange als "neutral" bewertet, da keine Veränderung in der Funktion der Proteine ersichtlich wurde.

In der Datenbank des *Breast Cancer Information Core* (*BIC*) lassen sich Informationen zu 76 stillen Mutationen finden. Für das BRCA1-Gen lagen insgesamt 32 registrierte stille Mutationen vor, wobei 12 der 24 Exons betroffen sind.

Für die Beurteilung von spleißregulatorischen Sequenzen, die trotz stiller Mutation verändert sein können, stehen *in silico*-Methoden zur Verfügung. Das *ESRsearch-Tool* 

(http://esrsearch.tau.ac.il/) vergleicht Wild-Typ-Sequenzen mit den entsprechenden Sequenzen der Mutationen. Zur Bewertung spleißregulatorischer Sequenzen verwendet *ESRsearch* drei verschiedene Algorithmen. Mit jeweils verschiedenen Strategien entwickelten Goren, Fairbrother und Zhang/Chasin computergestütze Methoden, die der Identifizierung vermeintlicher c*is*-regulierender Sequenzen dienen. Darüber hinaus werden zusätzliche RNA-Bindungsstellen vorhergesagt, die Einfluss auf *cis*-regulierende Sequenzen haben könnten (Tab. 17) und im *ESRsearch-Tool* berücksichtigt werden.

Zusätzliche RNA Binding Site Motifs:
hnRNP A : UAGGGU or UAGGGA or UAUGAUAGGGACUUAGGGUG
hnRNP B : ATTTA or GTTTG or TTGA
hnRNP C : TTTTT
<ul> <li>hnRNP D : ATTTA<sup>7</sup> or TTGA</li> </ul>
hnRNP E : TTGA
hnRNP F : GGGGGCUG or GGGA
<ul> <li>hnRNP H : TTGGGT or GGGGGC or TGTGG or GGGA or GGGGGCUG o UGCAUG</li> </ul>
hnRNP I(PTB) : TTCTCT or CTCTCT or TCTTC
hnRNP A0 : ATTTA
Fox1/2 : UGCAUG
SRp55 : URCRUC (R steht für A or G) & USCGKM (S:G or C; K:U or G; M:A or C)
<ul> <li>SRp40 : UGCGUC or ACDGS (D:A,G or T; S:G or C) o TGGGAGCRGTYRGCTCGY</li> </ul>
Nova : UCAY
TRA2 alpha/beta : GAA

#### Tab. 17: Zusätzliche RNA-binding-site-motifs (http://esrsearch.tau.ac.il/)

Zur Analyse wird die Sequenz einer stillen BRCA1- bzw. BRCA2-Mutation in die Maske des *ESRsearch-Tools* eingetragen. Nach der Auswertung werden sämtliche *cis*-regulierenden Elemente angezeigt, die anhand der angewendeten Algorithmen ermittelt wurden. Zum Vergleich muss die entsprechende Wild-Typ-Sequenz von *ESRsearch* überprüft und nach Veränderungen der *cis*-regulierenden Elemente untersucht werden. Aufgrund der Länge der *PESRs*, die je nach Algorithmus aus vier bis acht Nukleotiden bestehen, muss eine Sequenz mit einer Länge von  $\geq$ 22 Nukleotiden in die Maske des *ESRsearch-Tools* eingetragen werden. Die Ergebnisse des Goren-Scores geben Auskunft über die vorhandenen *exonic splicing regulatory sequences* (*ESRs*). Es werden regulierende Sequenzen gesucht, aber nicht zwischen *ESE* und *ESS* unterschieden. Bei der Analyse der stillen Mutationen ergaben sich im Goren-Algorithmus bei 36 Mutationen im Vergleich zur Wild-Typ-Sequenz keine Veränderungen in Anzahl und Position der *ESRs*. In 17 Fällen resultierte aufgrund der Mutation ein Verlust eines *ESRs* im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz. In drei weiteren Sequenzveränderungen gingen infolge der Mutation zwei *ESRs* verloren, wodurch abschließend keine regulierenden Sequenzen mehr vorhanden waren (Abb. 23).



Abb. 22: Veränderungen der *ESRs* durch stille Mutationen in den BRCA-Genen bei Anwendung des Goren-Algorithmus. Durch die stillen Mutationen kommt es in 26,3% der Fälle zu einem Verlust eines oder mehrerer *ESRs*. In 18,4% entsteht ein oder mehr *ESR(s)*. Zu keinen Veränderungen kommt es in 47,37% der Mutationen. In 7,9% wird ein Verlust und eine Entstehung von *ESRs* ermittelt.

Eine neue *ESR* konnte in 13 Mutationen festgestellt werden. Zwei neue regulierende Sequenzen ermittelte der Goren-Algorithmus für die Mutation 1239C/T auf dem BRCA2-Gen. Für sechs Mutationen blieb die Anzahl der *ESRs* unverändert, jedoch war eine veränderte Lokalisation der *ESRs* feststellbar. In der Tab. 18 sind willkürlich ausgewählte Ergebnisse des Goren-Algorithmus zu stillen Mutationen dargestellt.

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Designation	Goren Wild-Typ	Goren mt	Ergeb
BRCA1	17	3	233	G to A	Lys to Lys	233G/A	neg	neg	0
BRCA1	31	9	710	C to T	Cys to Cys	710C/T	neg	706-711	+
BRCA1	1	11	3545	A to G	Ala to Ala	A1142A	3540-3545	neg	-
BRCA1	35	13	4427	T to C	Ser to Ser	4427T/C	4424-4429, 4427- 4432	neg	
BRCA2	1	10	1239	C to T	Asn to Asn	1239C/T	neg	1234-1239, 1237-1242	++
BRCA2	1	11	2565	G to T	Leu to Leu	L799L	2562-2567	2560-2565	+-

**Tab. 18: Goren-Algorithmus - Ausgewählte Ergebnisse.** Es ist die Anwesenheit von *ESRs* in der Wild-Typ-Sequenz (Goren Wild-Typ) bzw. in der Mutation (mt) nach Basenaustausch gezeigt. Durch die BRCA1 Mutation 233A/G entstehen keine *ESRs*. Durch den Basenaustausch der BRCA1-Mutation 4427T/C gehen zwei *ESRs* an den Positionen 4424-4429 und 4427-4432 verloren.

Im Fairbrother-Algorithmus werden die *exonic splicing regulatory sequences* (*ESRs*) in Bezug auf ihre Eigenschaften als *exonic splicing enhancer* (*ESE*) oder *exonic splicing silencer* (*ESS*) beurteilt (Tab. 24).

In 60,53% der Sequenzen führt die stille Mutation zu keinen Veränderungen der Anzahl *ESEs*. Hinsichtlich der *ESSs*, findet sich in 78,95% keine Änderung durch die Mutationen. Ein Verlust von *ESEs* und *ESSs* durch stille Muationen findet sich in 25% bzw. 9,21%. In 11,84% berechnet der Fairbrother-Algorithmus die Entstehung neuer *ESEs/ESSs* durch die Mutationen.



Abb. 23: Veränderungen der *ESEs/ESSs* durch stille Mutationen in den BRCA-Genen bei Anwendung des Fairbrother-Algorithmus. Veränderungen in der Sequenz durch einen Basenaustausch führen in 25% zu einem Verlust von *ESE(s)*, in 11,84% der Fälle wird durch die veränderte Base eine/mehrere neue *ESE(s)* gebildet. In 60,53% hat die stille Mutation keinen Einfluss auf die *ESEs*. In 2,63% verliert die Sequenz die Funktion einer/mehrerer *ESE(s)*, im gleichen Zug entstehen aber auch *ESE(s)* an einer anderen Stelle der Sequenz.

Hinsichtlich der *ESSs* wird ein Verlust an *ESSs* in 9,21% der Fälle errechnet. In 11,84% der Mutationen kommt es zur Entstehung neuer *ESSs*. Unverändert bleiben 78,95% der Mutationen.

In zwölf Fällen wird ein Verlust einer *ESE* vorhergesagt. Infolge von fünf stillen Mutationen kommt es zu einem Verlust von 2 *ESEs*.

Bei den stillen Mutationen T533T und 2016T/C (beide BRCA2) ermittelt der Fairbrother-Algorithmus einen Verlust con drei *ESEs* im Vergleich zur Wild-Typ-Sequenz. In vier registrierten Mutationen aus der *BIC* kommt es zu einer Neubildung einer *ESE*, in fünf weiteren Fällen treten zwei neue *ESEs* auf. In zwei weiteren Fällen führt eine stille Mutation zum Verlust eines *ESEs*. Bezüglich der Mutation BRCA2 10152C/T bilden sich zwei neue *ESEs* im Vergleich zu der Ursprungssequenz, die Mutation BRCA1 4193G/A führt zur Entstehung vier neuer *ESEs*. Eine starke Verminderung der Anzahl an *ESSs* werden für Mutationen des BRCA2-Gens T533T (-6) und V2211V (-5) vorhergesagt. Nennenswert sind darüberhinaus die stillen Mutationen 2166C/T G2140G und 9642A/G des BRCA2-Gens, durch die drei bzw. zwei *ESSs* gebildet werden und so Einfluss auf den Spleißmechanismus nehmen könnten.

Der Algorithmus nach Zhang/Chasin unterscheidet, wie auch Fairbrother in *ESEs* und *ESSs*. Es existieren 67,11% registrierte Mutationen, in denen keine Veränderung der Anzahl der *ESEs* bestimmt wird. In 77,63% der Mutationen ermittelt der Algorithmus die gleiche Anzahl von *ESSs* wie in der Wild-Typ-Sequenz (Tab. 25).



Abb. 24: Veränderungen der *ESEs/ESSs* durch stille Mutationen in den BRCA-Genen bei Anwendung des Zhang/Chasin-Algorithmus. Die Anwendung des Zhang/Chasin-Algorithmus sagt einen Verlust von *ESEs* in 14,47% der Mutationen vorher. Eine Neuentstehung von *ESEs* durch die stillen Mutationen wird in 17,11% vorausgesagt. Eine unveränderte Anzahl an *ESEs* wird trotz der Mutation in 67,11% der Fälle beobachtet. Ein Verlust und eine Neubildung von *ESEs* wird in in 1,32% registriert. Der Zhang/Chasin-Algorithmus berechnet bezüglich stiller Mutationen einen Verlust von *ESSs* in 11,84%, eine Entstehung neuer *ESSs* in 9,21%, eine unveränderte Anzahl an *ESSs* in 77,63% und einen Verlust sowie eine Entstehung neuer *ESSs* in 1,32% der registrierten stillen Mutationen.

Die Berechnungen im Zhang/Chasin-Algorithmus ergeben für die Mutation 3878T/G des BRCA1-Gens eine Neubildung von vier *ESEs*, für T533T auf dem BRCA2-Gen werden drei neue *ESEs* ermittelt. Durch die Mutation BRCA1 5232C/T entwickeln sich drei zusätzliche

*ESSs.* Ein Verlust von jeweils drei *ESSs* geht aus den Mutationen BRCA1 1100A/G und BRCA2 9465T/C hervor. Bei der stillen Mutation im Nukleotid 1155, bei der es zum Basenaustausch eines Adenins zu Guanin im BRCA2-Gen kommt, bildet sich eine neue *ESS*. Zudem kommt es durch den Basenaustausch zu einer Reduktion von drei anderen *ESSs* der Sequenz.

Anhand der registrierten Mutationen lassen sich 13 zusätzliche RNA-Bindungsstellen beschreiben, die eine weiterführende Bewertung ermöglichen. In den Wild-Typ-Sequenzen lassen sich drei Nova-RNA-Bindungsstellen in den Mutationen V14V des BRCA1-, sowie S309S und 7470A/G des BRCA2-Gens finden. Eine neue Nova-RNA-Bindungsstelle entsteht durch die stille Mutation an V2820V in BRCA2.

Die Nukleotide 4933-4936 auf Exon 16 des BRCA1-Gens, ermöglichen die Bindung des hnRNP-B Proteins. Die Mutation 4932T/C führt zum Verlust der Bindungsstelle. Gleiches gilt für die Mutationen V2211V und I2664I des BRCA2-Gens. Eine hnRNP-B-Bindungsstelle entsteht hingegen durch die Mutation 9642A/G des BRCA2-Gens.

Die Mutationen in BRCA1 4077T/C und 4427T/C führen zu einem Verlust der Bindungsstellen für hnRNP-I(PTB). Die Entstehung einer hnRNP-I(PTB)-Bindungsstelle wurde durch die stille Mutation in L799L BRCA2 beobachtet.

Eine zusätzliche RNA-Bindungsstelle, die trotz Basenaustausch von Adenin zu Guanin im Nukleotid 3545 des 11. Exons im BRCA1-Gen nicht beeinträchtigt wird, bindet Srp55. Die Mutation 10479T/C im BRCA2-Gen führt hingegen zu der Entstehung einer Srp55-bindenden Sequenz.

## 3.12 Vergleich des Fairbrother-Algorithmus mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus hinsichtlich gefundener ESEs/ESSs

Im Vergleich der Ergebnisse der Wild-Typ-Sequenzen des Fairbrother (dunkelblau)- mit dem Zhang/Chasin (hellblau)-Algorithmus in Hinblick auf *ESEs* stellen sich folgende Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede heraus (Abb. 26).



Fairbrother Zhang/Chasin Gemeinsam

Abb. 25: Vergleich des Fairbrother-Algorithmus (dunkelblau) mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus (mittelblau) hinsichtlich gefundener *ESEs* in den Wild-Typ-Sequenzen stiller Mutationen der BRCA-Gene. Im Fairbrother-Algorithmus konnten bei 51 von 76 analysierten stillen Mutationen keine *ESEs* gefunden werden. Im Vergleich dazu sagt der Zhang/Chasin-Algorithmus bei 58 stillen Mutationen keine *ESEs* voraus. Bei 41 Mutationen stimmen beide Algorithmen miteinander überein.  $\geq 1 ESEs$  konnte der Fairbrother-Algorithmus bei 25 Mutationen feststellen, während Zhang/Chasin in 18 Sequenzen  $\geq 1 ESEs$ -Bindungsstellen registriert. Übereinstimmungen mit  $\geq 1 ESEs$  finden sich in 8 analysierten Sequenzen.

Im Fairbrother-Algorithmus konnten bei 51 von 76 analysierten stillen Mutationen keine *ESEs* gefunden werden. Im Vergleich dazu sagt der Zhang/Chasin-Algorithmus bei 58 stillen Mutationen kein *ESE* voraus. Bei 41 Mutationen stimmen beide Algorithmen miteinander überein. Bei 25 Mutationen stellt der Fairbrother-Algorithmus  $\geq 1$  *ESEs* fest, während der Zhang/Chasin-Algorithmus in 18 Sequenzen  $\geq 1$ *ESEs*-Bindungsstellen registriert. Übereinstimmungen mit  $\geq 1$ *ESEs* finden sich in 8 analysierten Sequenzen.

Abb. 27 stellt den Vergleich zwischen dem Fairbrother-Algorithmus (dunkelblau) und dem Zhang/Chasin-Algorithmus (mittelblau) dar, wobei für 47 Mutationen übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich der Angabe zu Sequenzen ohne *ESEs* ermittelt werden. Bei 8 Mutationen stellen die Algorithmen übereinstimmend  $\geq 1$  *ESEs* fest. Betrachtet man den Fairbrother-Algorithmus separat, so werden bei 57 von 76 analysierten stillen Mutationen keine *ESEs* gefunden. Im Vergleich dazu erkennt der Zhang/Chasin-Algorithmus  $\geq 1$  *ESEs* fest, während der Zhang/Chasin-Algorithmus in 18 Sequenzen  $\geq 1$  *ESEs*-Bindungsstellen registriert.



Abb. 26: Vergleich des Fairbrother-Algorithmus (dunkelblau) mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus (mittelblau) hinsichtlich gefundener *ESEs* in den Mutationssequenzen stiller Mutationen der BRCA-Gene. Im Fairbrother-Algorithmus wurden in 57 von 76 analysierten stillen Mutationen keine *ESEs* gefunden. Im Vergleich dazu sagt der Zhang/Chasin-Algorithmus bei 58 stillen Mutationen kein *ESE* voraus. Übereinstimmungen beider Algorithmen können in 47 Mutationen ermittelt werden. Bei 19 Mutationen stellt der Fairbrother-Algorithmus  $\geq 1$  *ESEs* fest, während Zhang/Chasin in 18 Sequenzen  $\geq 1$  *ESEs*. Bindungsstellen registriert. Übereinstimmungen mit  $\geq 1ESEs$  finden sich in 8 analysierten Sequenzen.

Werden die beiden Algorithmen hinsichtlich ihrer Ergebnisse der *ESSs* in der Wild-Typ-Sequenzen verglichen, stimmen die Ergebnisse des Fairbrother-Algorithmus und des Zhang/Chasin-Algorithmus zu stillen Mutationen ohne *ESSs* in 57 Fälllen überein. Separat betrachtet ermittelt der Fairbrother-Algorithmus in 64 von 76 analysierten Sequenzen keine *ESSs*. Im Vergleich dazu erkennt der Zhang/Chasin-Algorithmus in 66 Fällen stille Mutationen ohne *ESSs*. Bei 12 Mutationen stellt der Fairbrother-Algorithmus  $\geq 1$  *ESSs* fest, während der Zhang/Chasin-Algorithmus in 10 Sequenzen  $\geq 1$  *ESSs*-Bindungsstellen registriert. Übereinstimmungen mit  $\geq 1$  *ESSs* finden sich in 3 analysierten Sequenzen (Abb. 28)


Abb. 27: Vergleich des Fairbrother-Algorithmus (dunkelblau) mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus (mittelblau) hinsichtlich gefundener *ESSs* in den Wild-Typ-Sequenzen stiller Mutationen der BRCA-Gene. Im Fairbrother Algorithmus werden bei 64 von 76 analysierten stillen Mutationen keine *ESSs* gefunden. Im Vergleich dazu sagt der Zhang/Chasin-Algorithmus bei 66 stillen Mutationen keine *ESSs* voraus. Bei 57 Mutationen stimmen beide Algorithmen miteinander überein. Bei 12 Mutationen stellt der Fairbrother-Algorithmus  $\geq 1$  *ESSs* fest, während der Zhang/Chasin-Algorithmus in 10 Sequenzen  $\geq 1$  *ESSs*-Bindungsstellen registriert. Übereinstimmungen mit  $\geq 1$  *ESSs* finden sich in 3 analysierten Sequenzen.

Schließlich stellen sich im Vergleich der Mutationssequenzen des Fairbrother(dunkelblau)- mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus (hellblau) in Hinblick auf *ESS* folgende Ergebnisse heraus (Abb. 29). Im Fairbrother-Algorithmus werden bei 67 von 76 analysierten stillen Mutationen keine *ESSs* gefunden. Im Vergleich dazu sagt der Zhang/Chasin-Algorithmus bei 63 stillen Mutationen kein *ESS* voraus. Bei 55 Mutationen stimmen beide Algorithmen miteinander in ihrer Aussage zu nicht vorhandenen *ESSs* überein. Bei 9 Mutationen stellt der Fairbrother-Algorithmus  $\geq 1$  *ESSs* fest, während der Zhang/Chasin-Algorithmus in 13 Sequenzen  $\geq 1$  *ESSs*-Bindungsstellen registriert. Übereinstimmungen bei Sequenzen mit  $\geq 1$  *ESSs* finden sich in einer analysierten Sequenze.



Abb. 28: Vergleich des Fairbrother- (dunkelblau) mit dem Zhang/Chasin-Algorithmus (mittelblau) hinsichtlich gefundener ESSs in den Mutationssequenzen stiller Mutationen der BRCA-Gene. Der Fairbrother-Algorithmus stellt bei 67 von 76 analysierten stillen Mutationen keine ESSs heraus. Im Vergleich dazu sagt der Zhang/Chasin-Algorithmus bei 63 stillen Mutationen kein ESS voraus. Übereinstimmungen zu fehlenden ESSs finden sich bei 55 Mutationen. Bei 9 Mutationen stellt der Fairbrother-Algorithmus  $\geq 1 ESSs$  fest, während Zhang/Chasin in 13 Sequenzen  $\geq 1 ESSs$ -Bindungsstellen registriert. Übereinstimmungen mit  $\geq 1 ESSs$  finden sich in einer Sequenz.

Bezüglich der 76, in der Datenbank des *BIC* registrierten stillen Mutationen, konnte das *Webtool ESRsearch* Veränderungen *cis*-regulatorischer Elemente feststellen. Stille Mutationen des BRCA1/2-Gens können laut der Ergebnisse der Algorithmen nach Goren, Fairbrother, Zhang/Chasin zu Verlusten und/oder zu Neuentstehungen von spleißfördernden oder – unterdrückenden *exonic splicing regulatory sequences* (*ESRs*) führen. Aufgrund ihres Einflusses auf *exonic splicing regulatory sequences*, darf die Wichtigkeit stiller Mutationen nicht unterschätzt werden. Werden in der prädiktiven Gentestung stille Mutationen unklarer Bedeutung festgestellt, kann auch hier mittels *in silico*-Methoden eine Wertung der Mutation auf dessen klinische Relevanz vorgenommen werden. Die Entwicklung von *in silico*-Methoden, ist bis heute nicht gelungen.

### 4 Diskussion

Im Rahmen interdisziplinärer Tumorrisikosprechstunden steht Frauen mit einer erblichen Belastung für das Mamma- und Ovarialkarzinom ein intensiviertes Früherkennungsprogramm zur Verfügung. Bei dem Verdacht eines erhöhten familiären Risikos kann, bei der Erfüllung bestimmter Kriterien, eine genetische Analyse zur Abklärung möglicher BRCA1/2-Genmutationen durchgeführt werden.

Neben pathogenen Mutationen werden in der prädiktiven Gentestung häufig Mutationen unklarer Bedeutung nachgewiesen, die als nicht-informativ gewertet werden. Um die Folgen unklassifizierter Mutationen einschätzen zu können, bieten *in silico*-Methoden eine Bewertungsmöglichkeit dieser Mutationen.

Durch die Identifizierung von krankheitsrelevanten Genen unterstützen Gentests heutzutage weite Bereiche der klinischen Diagnostik und gewinnen bezüglich der diagnostischen Entscheidungsfindung bei zahlreichen Erkrankungen und neoplastischen Syndromen zunehmend an Bedeutung.

Basierend auf verschiedenen Prinzipien berechnen *in silico*-Methoden die intrinsische Stärke von Spleißstellen. Andere *in silico*-Methoden beurteilen durch Mutationen verursachte Veränderungen von *exonic* oder *intronic splice enhancer* oder *-silencer* und daraus resultierende Folgen für die Erkennung der betroffenen Spleißstelle und des Spleißprozesses. Bei der Untersuchung der *BIC*-Datenbanken und der Datenbank des deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs wurden unklassifizierte Mutationen der 5' und 3' Spleißstellen mithilfe der *in silico*-Methoden HBond, MaxEnt, SDS und S&S bewertet. Zudem wurde der Einfluss stiller Mutationen auf *cis*-regulierende Elemente des korrekten physiologischen Spleißens mittels *ESRsearch* untersucht.

#### 4.1 Uneinheitliche Bezeichnungen in der BIC-Datenbank bezüglich der Spleißstellenmutationen

BIC-Datenbank Bezeichnungen Bei der Analyse der fielen uneinheitliche der Spleißstellenmutationen auf. Spleißstellenmutationen, die sich in den Nukleotidpositionen -3 bis +6(+8) und -20 bis +3 befinden sind sowohl in der Kategorie "Splice" als auch in der Kategorie "Intervening Sequence" registriert. Daher ist zur Vermeidung von Missverständnissen im Umgang mit der Datenbank eine Vereinheitlichung der Daten von Spleißstellenmutationen zu empfehlen. Eine exakte Definition der Spleißstelle wäre Voraussetzung für eine Untergliederung der Spleißstellenmutationen in der Kategorie "Splicesite mutation". In dieser Arbeit wurden sämtliche Mutationen, die die intronische Sequenz betreffen, in der Kategorie "Intervening Sequence" aufgeführt. Hierunter fallen u.a. die Mutationen der Intron-Sequenz, die mit Veränderungen der Nukleotidpositionen +1 bis +8 der 5' Spleißstelle oder -1 bis -20 der 3' Spleißstelle zu den Spleißstellenmutationen gehören.

#### 4.2 Verteilung und Häufigkeiten von BRCA1 und BRCA2 Spleißstellenmutationen in den untersuchten Datenbanken

Bei der Untersuchung der *BIC*-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs wurde eine relative Häufigkeit von verschiedenen Punktmutationen im BRCA1-Gen in Exon 3 (79,63mt), in Exon 19 (75,61mt) und Exon 18 (65,38mt) ermittelt. Im BRCA2-Gen liegen relative Häufigkeiten von Punktmutationen in Exon 5 (46mt) und Exon 2 (38,68mt) vor.

Der erhöhten Anzahl an Mutationen in den beschriebenen Exons kann möglicherweise die Wichtigkeit dieser Exons im Hinblick auf ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung klinischer Erscheinungsbilder zugrunde liegen. Eine mögliche Erklärung für die Häufung von Punktmutationen im Exon 3, Exon 18 und Exon 19 kann die Beeinflussung von Proteindomänen darstellen. Durch Mutationen in Exon 3 könnte die RING-Finger-Domäne, in Exon 18 und Exon 19 die *C-terminal-domains* (BRCT) des BRCA1-Gens beeinflusst werden (Perrin-Vidoz, 2002), durch die gravierendere Effekte auf die Funktionstüchtigkeit des Proteins möglich wären. Mit der Beeinträchtigung von Proteindomänen durch Mutationen in den genannten Regionen ließe sich eine erhöhte Anzahl von Krankheitsfällen erklären, die wiederum eine Häufung von Genanalysen nach sich ziehen würde. Im Widerspruch dazu stehen die Mutationshäufungen in Exon 5 und Exon 2 des BRCA2-Gens, denen bislang keine Proteindomänen zugeordnet wurden (Ware *et al.*, 2006).

Eine Konsequenz einer Missense-Mutation ist die Translation eines veränderten Proteins mit möglicher Beeinträchtigung seiner Funktion. Kann die genetische Information aufgrund einer Frameshift-Mutation nicht mehr sinnvoll abgelesen werden, ist dies mit einer Funktionsstörung bzw. einem Funktionsverlust des Proteins einhergehend. In den Datenbanken konnten Missense-Mutationen (BRCA1 39,83%/ BRCA2 45,91%) als häufigste Mutationsart nachgewiesen werden. Nachfolgend wurden Frameshift-Mutationen (BRCA1 25,83% / BRCA2 29,11%), *intervening sequences* (BRCA1 18,41% / BRCA2 6,78%), Nonsense-Mutationen (BRCA1 9,03% / BRCA2 10,19%) und Spleißmutationen (BRCA1 10,36% / BRCA2 2,66%) registriert. Ein Grund für die ungleiche Verteilung der Mutationstypen könnte die unterschiedliche Effizienz der DNA-Reparatur-Mechanismen bezüglich der Mutationstypen darstellen (Greene *et al., 2001*). Eine Verzerrung der Häufigkeiten der Mutationstypen erscheint jedoch als sehr wahrscheinlich, da es sich bei den Datenbanken des *BIC* und des Deutschen Konsortiums um keine systematische Erfassung von BRCA-Mutationen handelt. Bei näherer Betrachtung der 5' Spleißstelle fallen sowohl bei BRCA1, als auch bei BRCA2

eine ähnliche Verteilung bezüglich der Nukleotidpositionen der registrierten Mutationen auf. Ein Großteil der Mutationen tritt an den Positionen IVS+1 (BRCA1 25,67% / BRCA2 23,75%) und an der letzten Position des Exons (Exon nt -1) auf (BRCA1 13,28% / BRCA2 18,75%). Zusätzlich liegen 13,28% Mutationen im BRCA1-Gen an der Position IVS+2. Sämtliche anderen Positionen weisen <9% der Mutationen an der jeweiligen Position auf. Hinsichtlich der 3' Spleißstelle liegt das Maximum der registrierten Mutationen für BRCA1 und BRCA2 im Bereich IVS-1 und IVS-2 bei insgesamt 32,49% (BRCA1) und 21,09% (BRCA2).

Beim Spleißprozess kommt es zu Interaktionen des U1 snRNPs mit der 5' Spleißstelle. Dabei spielen die Nukleotidpositionen -3 bis +8 der 5' Spleißstelle eine unterschiedliche Bedeutung für die Erkennung durch das U1 snRNP (Hartmann *et al.,* 2008). Eine Punktmutation in Nukleotidposition IVS+1 und IVS+2 führt zu einem Verlust der Spleißfunktion, ist aber nicht essenziell für die Stabilisierung der RNA (Kammler, 2003). Vermutlich ist die Häufung der Mutationen in den Nukleotidpositionen IVS+1, IVS+2 der 5' Spleißstelle bzw. IVS-1 und -2 der 3' Spleißstelle auf die Bedeutung dieser Nukleotide für die Spleißfunktion zurückzuführen. Eine Mutation in der terminalen Exon-Position -1 der Spleißdonorsequenz führt zu einer herabgesetzten Stabilität der Bindung zwischen U1 snRNA und der prä-mRNA (Kammler, 2003). Punktmutationen in den oben erwähnten Positionen, würden demzufolge durch aberrantes Spleißen vermehrt zu klinisch relevanten Veränderungen führen.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Punktmutationen in den terminalen Exon-Positionen der 5'- und 3' Spleißstelle aufgrund ihrer möglichen Auswirkung auf den Spleißprozess einerseits und ihre evtl. Veränderung der Aminosäuresequenz andererseits falsch klassifiziert werden können. Mutationen können durch einen Aminosäureaustausch als Missense-Mutation klassifiziert werden, obwohl der von ihnen verursachte Spleißdefekt zu weitaus bedeutsameren Auswirkungen führt (Ozcelik, 1999).

#### 4.3 Bestimmung von Grenzwerten bei ausgewählten in silico-Methoden, die als prädiktives Maß für die Wahrscheinlichkeit aberranten Spleißens dienen

Bezüglich der 5' Spleißstellenmutationen konnten, in Anlehnung an das Kriterium *"clinically important"* der *BIC*-Datenbank, Grenzwerte für den HBond-Score, MaxEnt-Score und die S&S-Matrix abgeleitet werden. Die Grenzwerte können zur Beurteilung möglicher Veränderungen des Spleißprozesses durch die Mutationen herangezogen werden und als ein prädiktives Maß für die Wahrscheinlichkeit aberranten Spleißens dienen.

Bei der Anwendung der Algorithmen nach HBond, MaxEnt und S&S wird die intrinsische Stärke der 5'-Spleißstelle mit der der mutierten 5'-Spleißstelle verglichen. Präzise Aussagen zu Grenzwerten, die für oder gegen die Pathogenität einer Spleißmutation sprechen, werden

nicht getroffen (Hartmann et al., 2008).

Der SD-Score trifft mittels eines allgemeinen Logarithmus effiziente Aussagen über die Konsequenzen der 5' Spleißstellenmutation. Für den SD-Score-Algorithmus ermittelten Sahashi *et al.*, basierend auf ihrem Datensatz von humanen Spleißstellenmutationen, eine Sensitivität von 97,1% und eine Spezifität von 94,7% für die Vorhersagen aberranter genutzter Spleißstellen.

In der *BIC*-Datenbank finden sich insgesamt 17 IVS- und Synonymous-Mutationen mit Angaben im *BIC*-Kriterium *"clinically important"*. 15 dieser 17 Mutationen werden als klinisch bedeutsam gewertet. Die Mutationen BRCA1 710C/T und BRCA1 IVS22+8T/C werden als nicht *"clinically important"* ausgewiesen.

Anhand dieser Daten konnten für die ausgewählten Algorithmen Grenzwerte abgeleitet werden, bei denen ein aberranter Spleißprozess wahrscheinlich wird.

Anhand verfügbarer Daten bewertet das *BIC steering committee* im *BIC*-Kriterium *"clinically important"* den Einfluss von Sequenzveränderungen auf die Genfunktion, welches in der vorliegenden Arbeit als Referenz für die Grenzwertermittlung der Algorithmen dient.

Hinsichtlich des HBond-Scores (HBS) lässt sich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für einen aberranten Spleißprozess ab einer HBS Differenz von  $\geq$ 2,2 ermitteln. Der Grenzwert des MaxEnt-Scores liegt bei einer Differenz zwischen Wild-Typ- und Mutationssequenz von  $\geq$ 0,98. Für die S&S-Matrix wurde ein aberranter Spleißprozess bei einer S&S-Differenz von  $\geq$ 1,79 ermittelt. Bei Anwendung der ausgewählten Algorithmen auf die 5' Spleißstellenmutationen unbekannter klinischer Bedeutung kommt es mithilfe der Grenzwerte in 89,1% der Fälle zu übereinstimmenden Bewertungen der Algorithmen, hinsichtlich eines aberranten Spleißprozesses.

Differenzen in der Grenzwertbestimmung stellten sich bei den Ergebnissen der Synonymous BRCA1 710C/T, die im *BIC*-Kriterium *"clinically important"* als klinisch unbedeutend beschrieben wird, heraus. Die Bewertung durch die Algorithmen hingegen lieferten mit 1,84 im MaxEnt-Score, 4,5 in S&S-Matrix und "aberrant" im SD-Score, Ergebnisse, die für eine relevante Schwächung der intrinsischen Spleißstärke mit nachfolgendem aberranten Spleißprozess vermuten lassen. Der HBond-Score berechnet mit einer HBS Differenz von 1,7 eine Schwächung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle. Aufgrund des bestimmten Grenzwertes wäre ein aberrantes Spleißen jedoch nicht zu erwarten.

Widersprüchlich stehen hierzu die Ergebnisse der S&S-Matrix zu den klinisch bedeutsamen Mutationen IVS16+6T>G mit dem Ergebnis 4,16, sowie die Mutation IVS17+3A>G mit dem Ergebnis 1,79. Zudem bewertete der MaxEnt-Score die klinisch bedeutsame Mutation IVS21+4A>G (Bonatti *et al.,* 2006) mit dem Ergebnis 0,98.

Die Ergebnisse der Algorithmen zur Schwächung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle

stehen im Konflikt zu den Aussagen der klinischen Bedeutung der genannten Mutationen. Einerseits könnte die berrechnete Schwächung der intrinsische Spleißstellenstärke der Synonymous 710C/T von der S&S-Matrix, dem SD-Score und dem MaxEnt-Score zu hoch ausfallen, andererseits besteht die Möglichkeit einer Berechnung falsch-niedriger Ergebnisse hinsichtlich der intrinsischen Stärke der Spleißstelle bezüglich der Mutationen IVS16+6T>G, IVS17+3A>G und IVS21+4A>G. Diese Möglichkeiten würden für Ungenauigkeiten der Algorithmen in der Berechnung der jeweiligen Mutationen sprechen.

Die geringe klinische Bedeutsamkeit der Mutation BRCA1 710C/T könnte trotz eines aberranten Spleißprozesses damit zusammenhängen, dass die Proteinfunktion nach dem fehlerhaften Spleißprozess nicht beeinträchtigt sei und zu keiner klinischen Relevanz führe. In diesem Fall könnten die Ergebnisse der ausgewählten Algorithmen als korrekt eingestuft werden. Hinsichtlich der bestehenden Möglichkeiten wäre, zur abschließenden Klärung der Fagestellung, die Durchführung funktioneller Analysen der jeweiligen Mutationen notwendig.

Für die Bewertung der 5' Spleißstellenmutationen unbekannter Bedeutung wurde aufgrund der Differenzen innerhalb eines Algorithmus, zunächst der niedrigere Grenzwert gewählt, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden.

# 4.4 Beurteilung von unklassifizierten Varianten von BRCA1- und BRCA2-Spleißmutationen mittels in silico-Methoden

Bei der Bewertung der 5' Spleißstellenmutationen unbekannter Bedeutung kam es in 6 Fällen zu Differenzen in den Aussagen der einzelnen Algorithmen, wobei in den entsprechenden Mutationen lediglich ein Algorithmus von den Aussagen der restlichen drei Algorithmen abweicht.

Die Mutation IVS5+4delT weicht im HBond-Score, der mit einem Ergebnis von 1,5 einen unveränderten Spleißprozess vorhersagt, von den Aussagen der übrigen Algorithmen ab.

Im MaxEnt-Scan stellen sich die Mutationen IVS13+6T>C, IVS3+6T>C abweichend von den anderen Algorithmen mit dem Ergebnis 0,34 und 0,77 ohne Einfluss auf den Spleißvorgang dar.

Die Spleißstellenmutation IVS19+4T>C wird vom SD-Score mit einem aberranten Spleißprozess bewertet. Die S&S-Matrix widerspricht in den Mutationen L3216L, IVS11+7delGT mit den S&S-Differenzen von 4,5 und 2 den Ergebnissen der restlichen Algorithmen, die trotz der Mutation mit ihren Ergebnissen einen unveränderten Spleißprozess vermuten lassen.

Für eine abschließende Beurteilung der widersprüchlichen Ergebnisse bleibt die Durchführung einer funktionellen Analyse der betroffenen Mutationen unumgänglich. Dies würde der

#### Diskussion

Überprüfung und Bestätigung der ermittelten Grenzwerte, sowie der Herausstellung von Informationen über Schwächen bzw. Stärken einzelner Algorithmen dienen. Außerdem bestehe die Möglichkeit einer besseren Einschätzung von Mutationen, bei denen sich die Ergebnisse einzelner Algorithmen widersprechen.

Die Möglichkeit abweichender Bewertungen von Mutationen entsteht zudem für die Mutationen an der Position +7 und +8 der 5' Spleißstelle, da nur der HBond-Score diese Positionen in die Berechnung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle mit einbezieht. Im SD-Score, dem MaxEnt-Scan und der S&S-Matrix bleiben die Positionen +7/+8 unberücksichtigt und ein möglicher Einfluss der Mutation auf die 5' Spleißstelle wird nicht bewertet. Insgesamt finden sich sechs Mutationen an der Position +7 und sieben Mutationen in der Position +8 der 5' Spleißstelle, wovon es in 5 Fällen zu Differenzen zwischen Wild-Typ-Sequenz und der Mutation kommt. Für die Mutationen IVS18+7A>G und IVS6+7A>G werden mit einem HBond-Score von jeweils Ergebnis im 1,9 eine intrinsische Schwächung der Spleißstellenstärke berechnet. Aufgrund fehlender Informationen ist hier eine funktionelle Analyse der Mutation notwendig, um die jeweiligen Mutationen beurteilen zu können, und um einen möglichen Einfluss der Nukleotidpositionen +7 und +8 auf den Spleißprozess zu bestätigen.

Die ermittelten Grenzwerte führen zu einer großen Anzahl übereinstimmender Ergebnisse. Insbesondere bei einheitlich hohen Score-Differenzen der Algorithmen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von Mutationen ausgegangen werden, die zu einem aberranten Spleißprozess führen. Diese können als wertvolle Information für die Einschätzung unklassifizierter Varianten von 5' Spleißstellenmutationen genutzt werden.

Das BIC-Kriterium "clinically important" dient in der vorliegenden Arbeit als Referenz für die Grenzwertbestimmung der Algorithmen. Die Genauigkeit der ermittelten Grenzwerte stützt sich dementsprechend auf die Richtigkeit der Abgaben des BIC steering committee in diesem Kriterium. Auch wenn es sich bei den Angaben des BIC steering committee um respektable Expertenmeinungen handelt, sind diese in einigen Fällen kritisch zu hinterfragen und experimentell zu verifizieren. Zudem muss die geringe Anzahl im BIC-Kriterium "clinically *important*" bewerteter Mutationen weiter entwickelt werden, um die Grenzwerte zu präzisieren. Speziell bei niedrigen Score-Differenzen müssen, bezüglich präziserer Grenzwertbestimmungen, weitere IVS- und Synonymous-Mutationen analysiert werden. Die oben erwähnten Widersprüche in den Ergebnissen der Algorithmen zu einzelnen IVS- und Synonymous-Mutationen sollten durch funktionelle Assays überprüft und analysiert werden, um mögliche Fehlerguellen in der Bewertung der Spleißstellenmutation aufzudecken. Indem die einzelnen Scores korrigiert und eventuelle Verbesserungsvorschläge in die Berechnung integriert werden, könnte die Bewertung von Mutationen durch Algorithmen deutlich effizienter werden.

Bei fortschreitender Entwicklung könnte die *in silico*-Diagnostik in Zukunft ein integraler Bestandteil der klinischen Diagnostik werden. Um Schwächen der einzelnen Algorithmen zu minimieren, ist eine Kombination verschiedener Algorithmen sinnvoll. Diesbezüglich wäre eine Kombination des MaxEnt-Scans, des SD-Scores und der S&S-Matrix mit dem HBond-Score zu empfehlen, der eine adäquate Erweiterung der Algorithmen auf die Nukleotidpositionen +7 und +8 darstellt. Zudem ermöglichte die Bewertung einer Mutation durch mehrere Algorithmen eine gegenseitige Kontrolle hinsichtlich der Ergebnisse.

#### 4.5 Kopplung der Algorithmen nach HBond, MaxEnt, SDS und S&S zur verbesserten Einschätzung von Spleißstellenmutationen unbekannter Bedeutung und deren vereinfachte Nutzung mittels Flussdiagramm

Ein *Webtool* basierend auf dem, in Abbildung 21 dargestellten Flussdiagramm, könnte in der Praxis aufgrund der Kopplung verschiedener Algorithmen, eine verbesserte Einschätzung unklassifizierter 5' Spleißmutationen liefern. So kann durch den Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Algorithmen eine hilfreiche Information zur Einschätzung von 5' Spleißstellenmutation unbekannter Bedeutung getroffen werden. Die Kombination mit dem HBond-Score ermöglicht darüberhinaus eine wertvolle Erweiterung der Bewertung von 5' Spleißstellenmutationen auf die Nukleotidpositionen +7 und +8.

Betrifft die IVS- oder Synonymous-Mutation unbekannter Bedeutung die 5' Spleißstelle in den Nukleotidpositionen -3 bis +6 werden HBond-Score, MaxEnt-Scan, SD-Score und die S&S-Matrix für die Bewertung der fraglichen Mutation angewendet. Übereinstimmende Bewertungen der Mutation geben dem Anwender wichtige Informationen für die Einschätzung der UVs. Liegt die Mutation im Nukleotid +7 oder +8 der 5' Spleißstelle, würde sie basierend auf dem HBond-Score bewertet.

Hinsichtlich der 126 IVS- und Synonymous-Mutationen der 3' Spleißstelle, die mit den Algorithmen nach MaxEnt, MM und WMM bewertet wurden, stellten sich 29 Mutationen mit einer Bewertung im BIC-Kriterium "clinically important" heraus. Davon werden 24 als klinisch bedeutsam angesehen, fünf 3' Spleißstellenmutationen wurden als klinsch unbedeutend klassifiziert. Die Ableitung von Grenzwerten für die angewendeten Algorithmen, anhand der Referenzdaten des BIC Kriteriums "clinically important" konnte aufgrund der großen Streuung verwendeten der Ergebnisse in allen Algorithmen zu keiner befriedigenden Grenzwertbestimmung führen. Die Bewertung von 3' Spleißstellenmutationen und die Vorhersage aberranter Spleißprozesse durch die zur Verfügung stehenden in silico-Methoden, stellt sich problematisch dar. Die 3' Spleißstelle besitzt im Vergleich zur 5' Spleißstelle eine weit weniger konservierte Sequenz und ist aufgrund der variablen Distanz zwischen den 3' Spleißsignalen schwieriger einzugrenzen (Hartmann *et al.,* 2008). Die Entwicklung eines aussagekräftigeren Algorithmus zur Einschätzung von 3' Spleißstellemutationen bleibt abzuwarten.

#### 4.6 Die Bewertung stiller BRCA1/2-Mutationen mittels ESRsearch

Punktmutationen aufgrund von Sequenzänderungen durch stille Mutationen können zu einer relevanten Stärkung oder Schwächung bzw. einer Neuentstehung bzw. Zerstörung von *cis*-regulatorischen Elementen führen, was wiederum einen Einfluss auf die korrekte Prozessierung der prä-mRNA zur Folge hat.

Eine exakte Erkennung von Spleißstellen hängt u.a. von *cis*-regulatorischen Elementen in der prä-mRNA ab, die die Auswahl der Spleißstellen modulieren und die Unterscheidung zwischen einer echten und einer pseudo-Spleißstelle ermöglichen (Sironi *et al.,* 2004; Sun *et al.,* 2003). Bei stillen Mutationen, die lange als "neutral" bewertet wurden, besteht aufgrund des Basenaustauschs die Möglichkeit der Beeinflussung *cis*-regulatorischer Elemente (Czech *et al.,* 2010). Zur Ermittlung eventueller Veränderungen in den *cis*-regulatorischen-Elementen bei stillen Mutationen kann das *Webtool ESRsearch* angewendet werden.

Bezüglich der 76, auf der Datenbank des *BIC* registrierten stillen Mutationen, konnte das *Webtool ESRsearch* Veränderungen *cis*-regulatorischer Elemente feststellen. Stille Mutationen des BRCA1/2-Gens führen laut den Algorithmen nach Goren, Fairbrother, Zhang/Chasin zu Verlusten und/oder zu Neuentstehungen von spleißfördernden oder –unterdrückenden *exonic splicing regulatory sequences* (*ESRs*). Aufgrund ihres möglichen Einflusses auf *exonic splicing regulatory sequences*, muss der Wichtigkeit stiller Mutationen Beachtung geschenkt werden. Durch den Verlust und/oder die Neuentstehung von *ESRs* kann die Spleißstellenerkennung fördernd oder supprimierend beeinflusst werden. Stille Mutationen können dementsprechend zu Spleißdefekten führen (Chao *et al.*, 2001). Werden in der prädiktiven Gentestung stille Mutationen unklarer Bedeutung nachgewiesen, kann auch hier mittels *in silico*-Methoden eine Wertung der Mutation auf dessen klinische Relevanz vorgenommen werden. Die Entwicklung von *in silico*-Methoden, die die Spleißstelle unter Berücksichtigung der *cis*-regulierenden Elemente bewerten, ist bis heute allerdings noch nicht gelungen.

Bislang wird die Bewertung der Spleißstellenstärke unabhängig von *cis*-regulierenden Elementen analysiert, was die Bewertung der Spleißmutation verfälschen könnte (Wang *et al.,* 2004). Trotzdem wird den Algorithmen, die Donor- oder Akzeptor-Spleißstellen, *ESE/ISE* oder *ESS/ISS* bewerten, ein beträchtlicher Erfolg zugesprochen. Allerdings wurde erkannt, dass *splicing regulatory elements* sich untereinander beeinflussen und ihre Interaktionen und

Abhängigkeiten eine wichtige Rolle für die Funktionalität der Spleißstelle haben können. Das komplexe Zusammenspiel sämtlicher *splicing regulatory elements* konnte noch nicht in einem einzelnen Algorithmus überführt werden. Die Entwicklung enstprechender *in silico*-Methoden ist Gegenstand aktueller Forschung.

#### 5 Zusammenfassung

Brustkrebs ist mit 27,8 Prozent aller Krebserkrankungen die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Ätiologisch entfallen etwa 10-15 % aller Mammakarzinome auf einen familiären Ursprung. Eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation steigert das Risiko im Laufe des Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken auf 80-90%.

Im Rahmen interdisziplinärer Tumorrisikosprechstunden steht Frauen mit einer erblichen Belastung für das Mamma- und Ovarialkarzinom ein intensiviertes Früherkennungsprogramm zur Verfügung. Frauen mit dem Verdacht auf ein erhöhtes familiäres Risiko können sich bei der Erfüllung der Einschlusskriterien einer genetischen Analyse unterziehen. Neben pathogenen Mutationen werden in der prädiktiven Gentestung häufig Mutationen unklarer Bedeutung nachgewiesen, die als nicht-informativ gewertet werden. Neben Segregationsanalysen und LOH-Analysen bieten *in silico*-Methoden die Möglichkeit, die Bedeutung unbekannter Mutationen einzuschätzen.

In dieser Arbeit wurden zur Bewertung von pathogenen 5' und 3' Spleißstellenmutationen die *in silico*-Methoden HBond, MaxEnt, SDS und S&S angewendet. Zudem wurde der Einfluss stiller Mutationen auf *cis*-regulierende Elemente mittels *ESRsearch* untersucht.

Bezugnehmend auf Datensammlungen des NCBI und des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs wurden in dieser Arbeit sämtliche BRCA1 und BRCA2-Mutationen erfasst. Anhand von Referenzdaten der NCBI zu klinisch bedeutsamen Mutationen konnten für die *in silico*-Methoden Grenzwerte ermittelt werden, welche ein prädiktives Maß für die Wahrscheinlichkeit aberranten Spleißens darstellen. Die Werte der Algorithmen, die einen aberranten Spleißprozess wahrscheinlich machen, konnten für den HBond-Score auf  $\geq$ 2,2, für den MaxEnt-Scan auf  $\geq$ 0,98 und für die S&S-Matrix auf  $\geq$ 1,79 festgelegt werden. Die Anwendung der Algorithmen auf sämtliche IVS-Mutationen und Synonymous unbekannter Bedeutung der 5' Spleißstelle, ergab übereinstimmende Score-Beurteilungen in 89,1% der Fälle. Die Bewertung von 3' Spleißstellenmutationen konnte aufgrund widersprüchlicher Aussagen des MaxEnt-Scores, des MM und des WMM nicht präzisiert werden. Durch das Webtool *ESRsearch* stellten sich zahlreiche Veränderungen der *cis*-regulierenden Elemente nach stillen Mutationen heraus.

Die Ergebnisse zeigen, dass mithilfe der ausgewählten *in-silico* Methoden wertvolle Informationen zur Einschätzung der klinischen Relevanz unklassifizierter 5' Spleißstellenmutationen zu generieren sind. Aufgrund der geringen Größe des verwendeten Datensatzes müssen die ermittelten Grenzwerte jedoch kritisch hinterfragt werden. Speziell bei niedrigen Score-Differenzen müssen weitere IVS-Mutationen und Synonymous für präzisere Grenzwertbestimmungen analysiert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Arenas JE, Abelson JN (1997) "Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 11798-802.

Armstrong K, Eisen A, Weber B (2000) "Assessing the risk of breast cancer." N Engl J Med, 342: 564-71.

Ars E, Serra E, Garcia J, Kruyer H, Gaona A, Lazaro C and Estivill X. (2000) "Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1." Hum Mol Genet 9: 237-47.

Asang C, Hauber, I, Schaal, H (2008) "Insights into the selective activation of alternatively used splice acceptors by the human immunodeficiency virus type-1 bidirectional splicing enhancer." Nucleic Acids Res., 1-14.

Ast, G (2004). "How did alternative splicing evolve?" Nat Rev Genet 5, 773-82.

Beckmann MW, Fasching PA, Lux MP, Klemt D, Schroer B, Bodden-Heidrich R, Goecke TO, Niederacher D, Nestle-Krämling C (2001) "Das familiäre Mammakarzinom-Syndrom - Prädiktive genetische Testung, Beratung und Betreuung." Med Welt, 52: 385-90.

Beckmann MW, Fasching PA, Gall C, Bani M, Brumm C, Krämer S (2002) "Genetische Risikofaktoren des Mammakarzinoms." Gynäkologe Published online.

Beckmann MW, Jap D, Kuschel B, Dall P, Lux MP, Hanstein B, Bender HG (2000) "Ovarielle Steroidhormone und Anti-Östrogene: Risiken zur Prävention in der Karzinogenese der Mamma und des Endometriums in der Postmenopause." Geburtshilfe Frauenheilkunde, 60: 77-85.

Beckmann MW, Niederacher D, Goecke TO, Bodden-Heidrich R, Schnürch HG, Bender HG (1997) "Hochrisikofamilien mit Mamma- und Ovarialkarzinomen: Möglichkeiten der Beratung, genetischen Analyse und Früherkennung." Deutsches Ärzteblatt, 94: A161-67.

Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG, Gusterson BA, Bender HG (1997) "Multistepcarcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity." J Molecular Med, 75: 429-39

Beckmann MW, Werner Y, Renner SP, Fasching PA, Jap D, Kuschel B. (2000) "Krebsfrüherkennung in der Frauenärztlichen Praxis – aktuelle Aspekte der wissenschaftlichen Diskussion." Gynäkologie, 33: 474-82.

Beckmann MW, Lux MP (2003) "Hereditäres Mammakarzinom: Prädiktive Diagnostik und präventive Maßnahmen." Der Onkologe, 10-1: 20-28.

Bennett MS, Pinol-Roma S, Staknis D, Dreyfuss G, Reed R (1992) "Differential binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins to mRNA precursors prior to Spleißosom assembly in vitro." Mol.Cell Biol. 12:3165-75.

Berget, SM (1995). "Exon recognition in vertebrate splicing." J.Biol.Chem. 270:2411-14.

Berglund JA, Chua K, Abovich N, Reed R, Rosbash, M (1997) "The splicing factor BBP interacts specifically with the premRNA branch point sequence UACUAAC." Cell *89*, 781–87.

Bick U *et al.* (1997) "An integrated early detection concept in women with a genetic predisposition for breast cancer." Radiologe, 37: 591-96.

Bilodeau PS, Domsic JK, Mayeda A, Krainer AR, Stoltzfus CM (2001) "RNA Splicing at Human Immunodeficiency Virus Type 1 3' Splice Site A2 Is Regulated by Binding of hnRNP A/B Proteins to an Exonic Splicing Silencer Element." J.Virol. 75:8487-97.

Black DL *et al.* (2000) "Protein Diversity from Alternative Splicing: A Challenge for Bioinformatics and Post-Genome Biology." Cell, Vol. 103, 367–70,

Black DL et al. (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." Annu. Rev. Biochem. 72: 291–336.

Blanchette M, Chabot B (1999) "Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization." EMBO J. 18:1939- 52.

Blencowe BJ (2000) "Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases." Trends Biochem.Sci. 25:106-10.

Breast cancer information core (2002) "BRCA1 & BRCA2 Mutation Summaries." www.nhgri.nih.gov

Brow DA et al. (2002): "Allosteric cascade of spliceosome activation." Annu. Rev. Genet. 36: 333-360.

Burge CB, Tuschl T, Sharp PA (1999) "Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes." *RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 525-60.

Campos B, Díez O, Domènech M, Baena M, Balmaña J, Sanz J, Ramírez A, Alonso C, Baiget M (2003) "RNA analysis of eight BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in breast/ovarian cancer families from Spain." Hum Mutat. 2003 Oct; 22(4): 337.

Cao W, Garcia-Blanco MA (1998) "A serine/arginine-rich domain in the human U1 70k protein is necessary and sufficient for ASF/SF2 binding." J.Biol.Chem. 273:20629-35.

Caputi M, Freund M, Kammler S, Asang C, Schaal H (2004) "A bidirectional SF2/ASF- and SRp40dependent splicing enhancer regulates human immunodeficiency virus type 1 rev, env, vpu, and nef gene expression." J Virol. 78: 6517-26.

Caputi M, Zahler AM (2002) "SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D." EMBO J. 21:845-55.

Caputi M, Mayeda A, Krainer AR, Zahler AM (1999) "hnRNP A/B proteins are re-quired for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing." EMBO J. 18:4060-67.

Chabot B, Blanchette M, Lapierre I, LaBranche H (1997) "An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1." Mol.Cell.Biol. 17:1776-86.

Chappuis PO, Nethercot V, Foulkes WD (2000) "Clinico–Pathological Characteristics of BRCA1- and BRCA2-Related Breast Cancer." Seminars in Surgical Oncology 18: 287–95.

Chen CD, Kobayashi R, Helfman DM (1999) "Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene." Genes Dev. 13: 593-606.

Cheng SC, Abelson J (1987) "Spliceosome assembly in yeast." Genes Dev, 1: 1014–27.

Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S (2006) "Genetic and Histopathologic Evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA Sequence Variants of Unknown Clinical Significance." Cancer Res 66: (4). 66(4): 2019-27.

Chou MY, Underwood JG, Nikolic J, Luu MH, Black DL (2000) "Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing." Mol Cell. 6: 949-57.

Cogan JD, Prince MA, Lekhakula S (1997) "A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans." Hum Mol Genet.;6(6): 909-12.

Couch FJ, Weber BL, Breast Cancer Information Core (1996) "Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene." Human Mutation 8: 8-18

Coulter LR, Landree MA, Cooper TA (1997) "Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection." Mol.Cell.Biol. 17: 2143-50.

Crispino JD, Blencowe BJ, Sharp PA (1994) "Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP." Science 265:1866-69.

Damgaard CK, Tange TO, Kjems J (2002) "hnRNP A1 controls HIV-1 mRNA splic-ing through cooperative binding to intron and exon splicing silencers in the context of a con-served secondary structure." RNA 8:1401-15.

Das R, Zhou Z, Reed R (2000): "Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex." E. *Mol. Cell.* 5: 779-87.

Dogan RI, Islamaj R, Getoor L, Wilbur WJ, Mount SM (2007) "Features generated for computational splicesite prediction correspond to functional elements." BMC Bioinformatics. 8: 410.

Domsic JK, Wang Y, Mayeda A, Krainer AR, Stoltzfus CM (2003) "Human Im-munodeficiency Virus Type 1 hnRNP A/B-Dependent Exonic Splicing Silencer ESSV Antago-nizes Binding of U2AF65 to Viral Polypyrimidine Tracts." Mol.Cell Biol. 23: 8762-72.

Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG (1993) "hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA." Annu.Rev.Biochem. 62:289-321.

Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, Aittomäki K, Blomqvist C, Nevanlinna H. (2005) "Histopathological Features of Breast Tumours in BRCA1, BRCA2 and Mutation -Negative Breast Cancer Families." Breast Cancer Res. 7: R93-R100.

Eperon IC, Makarova OV, Mayeda A, Munroe SH, Caceres JF, Hayward DG, Krainer AR (2000) "Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1." Mol.Cell Biol. 20:8303-18.

Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. (2002) "Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes." Science, 297:1007-13.

Fairbrother WG, Yeo GW, Yeh R, Goldstein P, Mawson M, Sharp PA, Burge CB (2004) "RESCUE-ESE identifies candidate exonic splicing enhancers in vertebrate exons." Nucleic Acids Res 32, W187-W190

Farrer T, Roller AB, Kent WJ, Zahler AM (2002) "Analysis of the role of Caenorhabditis elegans GC-AG introns in regulated splicing." Nucleic Acids Res. 30:3360-67.

Faustino NA, Cooper TA (2003). "Pre-mRNA splicing and human disease." Genes Dev 17(4): 419-37.

Ferro P, Forlani A, Muselli M, Pfeffer U (2003) "Alternative splicing of the human estrogen receptor alpha primary transcript: mechanisms of exon skipping." Int J Mol Med. 3: 355-63.

Fetzer S, Tworek HA, Piver MS, DiCioccio RA (1999) "Classification of IVS1-10T-->C as a polymorphism of BRCA1." Cancer Genet Cytogenet. Aug; 113(1): 58-64.

Foulkes WD, Chappuis PO, Wong N, Brunet JS, Vesprini D, Rozen F, Yuan ZQ, Pollak MN, Kuperstein G, Narod SA, Bégin LR (2000) "Primary node negative breast cancer in BRCA1 mutation carriers has a poor outcome." Annals of Oncology; 11: 307-13.

Freund M, Hicks MJ, Konermann C, Otte M, Hertel K.J., Schaal H (2005) "Extended base pair complementarity between U1 snRNA and the 5' splice site does not inhibit splicing in higher eukaryotes, but rather increases 5' splice site recognition." Nucleic Acids Res., 33 (16): 5112-19.

Freund M, Asang C, Kammler S, Konermann C, Krummheuer J, Hipp M, Meyer I, Gierling W, Theiss S, Preuss T, Schindler D, Kjems J, Schaal H (2003) "A novel approach to describe a U1 snRNA binding site." Nucleic Acids Res., 31: 6963-75.

Fu, XD, Maniatis T (1992) "The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89: 1725-29.

Futeral PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A,

Swensen J, Miki Y, Eddington K. *et al.* (1994) "BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas." Science, 266: 120-22.

Gatto-Konczak F, Olive M, Gesnel MC, Breathnach R (1999) "hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer." Mol. Cell Biol. 19:251-60.

Ge H, Manley JL (1990) "A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early premRNA in vitro." Cell 62:25-34.

German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer (2002) "Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population." Int J Cancer, 97: 472-80

Gesundheitsberichterstattung des Bundes, http://www.gbe-bund.de/

Gilbert E, Delgatto F, Championarnaud P, Gesnel MC, Breathnach R (1993) "Control of Bek and K-Sam Splice Sites in Alternative Splicing of the Fibroblast Growth-Factor Receptor-2." Premessenger Rna. Mol.Cell.Biol. 13: 5461-68.

Gooding C, Clark F, Wollerton MC, Grellscheid SN, Groom H, SmithCW (2006) "A class of human exons with predicted distant branch points revealed by analysis of AG dinucleotide exclusion zones." Genome Biol 7, R1.

Goren A, Ram O, Amit M, Keren H, Lev-Maor G, Vig I, Pupko T, Ast G (2006) "Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences - the complex definition of enhancers and silencers." Mol cell. In press.

Grabowski PJ, Padgett RA, Sharp PA (1984) "Messenger RNA splicing in vitro: an excised intervening sequence and a potential intermediate." Cell. Jun;37(2): 415-27.

Graveley BR (2000) "Sorting out the complexity of SR protein functions." RNA 6, 1197-211

Graveley BR (2002) "Sex, agility, and the regulation of alternative splicing." Cell 109:409-12.

Graveley BR (2004) "A protein interaction domain contacts RNA in the prespliceosome. Molecular." Cell 13: 302-4.

Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T (1999) "SR proteins are 'locators' of the RNA splicing machinery." Curr.Biol. 9: R6-R7.

Graveley, BR, Hertel KJ, Maniatis T (2001) "The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing." RNA 7: 806-18.

Greene CN, Jinks-Robertson S (2001) "Spontaneous Frameshift Mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: Accumulation uring DNA Replication and Removal by Proofreading and Mismatch Repair Activities" Genetics Society of America

Grosso, MC et al. (2008). "The emerging role of splicing factors in cancer." EMBO reports 1087-93.

Guthrie C (1994-1995) "The spliceosome is a dynamic ribonucleoprotein machine." Harvey Lect. 90: 59-80.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990) "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." Science 250: 1684-89.

Hanamura, AJ, Caceres F, Mayeda A, Franza BR, Krainer AR (1998) "Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors." RNA 4: 430-44.

Harrison, PM, Kumar A, Lang N, Snyder M, Gerstein M (2002) "A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it." Nucleic Acids Res., 30: 1083-90.

Hartmann L, Theiss S, Niederacher D, Schaal H (2008) "Diagnostics of pathogenic splicing mutations: does bioinformatics cover all bases?" Front Biosci. 1,13: 3252-72.

Heinrich B, Zhang Z, Novoyatleva T, Stamm S (2005). "Aberrant Pre-mRNA Splicing as a Cause of Human Disease." Journal of Clinical Ligand Assay 28(2): 68-74.

Hofmann, W, Schlag PM, Scherneck S (1998) "Genetische Prädisposition beim Mammakarzinom." Der Onkologe, Volume 4, Number 10: 868-77.

Horowitz D, Krainer AR (1994) "Mechanism for selecting 5'splice sites in mammalian pre-mRNA splicing." Trends Genet, 10: 100–6.

Hui J, Hung LH, Heiner M, Schreiner S, Neumüller N, Reither G (2005) "Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing." EMBO J. 24: 1988-98.

Jamison SF, Pasman Z, Wang J, Will C, Luhrmann R, Manley JL, Garcia-Blanco MA (1995) "U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characteriza-tion of required elements." Nucleic Acids Res. 23:3260-67.

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 (1998) "BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression." Oncogene, 16:1097-112.

Jurica MS, Moore MJ (2002) "Capturing splicing complexes to study structure & mechanism." *Methods* 28: 336-45.

Jurica MS, Moore MJ (2003) "Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins." Mol. Cell. 12: 5-14.

Kammler S, Leurs C, Freund M, Krummheuer J, Seidel K, Tange TO, Kjems MK, Scheid J, Schaal H (2001) "The sequence complementarity between HIV-1 5' splice site SD4 and U1 snRNA determines the steadystate level of an unstable env pre-mRNA." RNA 7: 421-34.

Kanopka A, Muhlemann O, Akusjarvi G (1996) "Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA." Nature 381: 535-38.

Kashima T, Manley JL (2003) "A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy." Nat. Genet.

Keaton JC, Nielsen DR, Hendrickson BC, Pyne MT, Scheuer L, Ward BE, Brothman AR, Scholl T (2003) "A biochemical analysis demonstrates that the BRCA1 intronic variant IVS10-2A--> C is a mutation." J Hum Genet.; 48(8):399-403.

Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Luhrmann R, Garcia-Blanco MA, Manley JL (1994) "Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors." Nature 368: 119-24.

Konarska MM, Sharp PA (1987) "Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes." Cell, 49: 763–74.

Krainer AR, Mayeda A, Kozak D (1990) "Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells." *Genes Dev.*, 4: 1158–71.

Krämer A. (1996) "The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing." Annu. Rev. Biochem. 65: 367-409.

Krawczak M, Reiss J and Cooper D (1992) "The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences." Hum Genet 90: 41-54.

Krecic AM, Swanson MS (1999) "hnRNP complexes: composition, structure, and function." Curr.Opin.Cell Biol. 11: 363-71.

Kuschel B, Aba F, Lux M, Jap D, Bender HG, Beckmann MW (2000) "Mammakarzinom: Ermittlung des individuellen Erkrankungsrisikos und der Möglichkeiten zur Prävention." Zeitschrift für ärztliche Fortbildung und Qualitätssicherung (ZaeFQ)

Kuschel B, Köchli OR, Niederacher D, Müller H, Beckmann MW (2000) "Hereditäre Karzinomsyndrome in der Frauenheilkunde: Was der Praktiker wissen sollte!" Schweiz Med Wochenschr, 130: 362-75

Lakhani SR, van de Vijver MJ, Jacqemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, Easton DF. (2002) "The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunhistochemical Markers EstrogenReceptor, Progesterone Receptor, Her-2, and p53 in Patients with Mutations in BRCA1 and BRCA2." Journal of Clinical Oncology 20 (9): 2310-18.

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, Stratton JR, Futreal PA (1996) "BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancer." Nat Genet 1996, 13:238-40.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C (2001) "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature, 409: 860-921.

Lee CG, Zamore, PD, Green MR, Hurwitz J (1993) "RNA annealing activity is intrinsically associated with U2AF." J Biol Chem 268: 13472-78.

Licatalosi DD, Darnell RB (2006). "Splicing Regulation in Neurologic Disease." Neuron 52(1): 93-101.

Liu HX, Zhang M, Krainer AR (1998) "Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins." Genes Dev. 12: 1998-2012.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J (1995) Molecular. Cell Biology, 3rd ed. Scientific American Press, N.Y.

Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM.(1999) "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2) dependent ubiquitination." Proc Natl Acad Sci USA, 96: 11364-69.

Lund M, Kjems J (2002) "Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end." RNA. 8:166-79.

Madhani HD, Guthrie C (1992) "A novel baseppairing interaction between U2 & U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome." *Cell* 71: 803-17.

Maniatis T, Tasic B (2002) "Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans." Nature. 6894: 236-43.

Marcus JN, Watson P, Page DL, Narod SA, Lenoir GM, Tonin P, Linder-Stephenson L, Salerno G, Conway TA, Lynch HT. (1996) "Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage." Cancer; 77: 697-709.

Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA (1998) "The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13869–874.

Martin A, Schneider S, Schwer B (2002) "Prp43 in an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome." *J. Biol. Chem.* 277: 17743-50.

Mayeda A, Krainer AR (1992) "Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2." Cell 68: 365-75.

Mayeda A, Helfman DM, Krainer AR (1993) "Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF." Mol.Cell Biol. 13: 2993-3001.

Mayeda A, Screaton GR, Chandler SD, Fu XD, Krainer AR (1999) "Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements." Mol. Cell Biol. 19: 1853–63.

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

McCullough AJ, Berget SM (2000) "An intronic splicing enhancer binds U1 snRNPs to enhance splicing and select 5' splice sites." Mol Cell Biol. 24: 9225-35.

Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, Freund M Lichtner P, Hartmann L, Schaal H *et al.* (2010) "Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish *RAD51C* as a human cancer susceptibility gene." Nature Genetics 42: 410–14

Meindl A, Ditsch N, Kast K, Rhiem K, Schmutzler RK (2011) "Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom: Neue Gene, neue Therapien, neue Konzepte." Dtsch Arztebl Int, 108(19): 323-30

Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney KA, Weber BL, Collins FS, Johnston C and Frank T. (1995) "Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumors." Nat Genet, 9:439-43.

Mercatante DR, Kole R (2002) "Control of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy: effects on gene expression." Biochim Biophys Acta. 2-3: 126-32.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W (1994) "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science 266: 66-71.

Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltmann M, Kouzarides T (1997) "Transcriptional activation functions in BRCA2.." Nature. Apr 24;386(6627): 772-3.

Misteli T *et al.* (2000) "Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function." Journal of Cell Science 113:1841-49.

Moore MJ (2000) "Intron recognition comes of Age." Nat Struct Biol 7: 14-16.

Mougin A, Gottschalk A, Fabrizio P, Lührmann R, Branlant C. (2002) "Direct probing of RNA structure & RNA-protein interactions in purified HeLa cell's & yeast spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP particles." *J. Mol. Biol.* 317: 631-49.

Nagai K, Oubridge C, Jessen TH, Li J, Evans PR (1990) "Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A." Nature 348: 515- 20.

Nasim MT, Chernova TK, Chowdhury HM, Yue BG, Eperon IC (2003) "HnRNP G and Tra2beta: opposite effects on splicing matched by antagonism in RNA binding." Hum.Mol.Genet. 12: 1337-48.

Nathanson KL, Antin-Ozerkis D, Couch FJ, Weber BL (1999) "I1307K APC variant in non- Ashkenazi Jewish women affected with breast cancer." Am J Med Genet 85:189-190.

Nathanson KL, Wooster R, Weber BL, Nathanson KN (2001) "Breast cancer genetics: what we know and what we need." Nat Med 7: 552-56.

Niederacher D, Kiechle M, Arnold N (1998) "Molekular- und zytogenetische Techniken in der Onkologie." Gynäkologie, 31: 1019-32.

Nissim-Rafinia M, Chiba-Falek O, Sharon G, Boss A, Kerem B (2000) "Cellular and viral splicing factors can modify the splicing pattern of CFTR transcripts carrying splicing mutations." Hum Mol Genet: 1771-78.

Novoyatleva T, Tang Y, Rafalska I, Stamm S (2006) "Pre-mRNA missplicing as a cause of human disease." Prog Mol Subcell Biol. 44: 27-46.

Oers, V. *et al.* (1994) "Two different sequence elements within exon 4 are necessary for cacitoninspecific splicing of the human calcitonin/calcitonin-related peptide I pre-mRNA." Mol Cell Biol: 951-60.

Orban TI, Olah E (2003) "Emerging roles of BRCA1 alternative splicing." Mol Pathol. 4: 191-7.

Osin PP, Lakhani SR. "The pathology of familial breast cancer: immunohistochemistry and molecular analysis." http://breastcancer-research.com/vol1no1/27oct99/review/3

Otte M (2006) "Identifizierung von *cis*-wirkenden Sequenzen in den alternativen HIV-1 Leaderexons und ihre funktionelle Bedeutung für die Spleißregulation." Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ozcelik H, Nedelcu R, Chan VWY, Shi XH, Murphy J, Rosen B, Andrulis IL (1999) "Mutation in the Coding Region of the BRCA1 Gene Leads to Aberrant Splicing of the Transcript." Human Mutation 14:540.541.

Padgett RA, Konarska MM, Grabowski PJ, Hardy SF, Sharp PA. (1984) "Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors." Science. Aug 31;225(4665): 898-903.

Parmigiani G, Berry D, Aguilar O (1998) "Determining carrier probabilities for breast cancersusceptibility genes BRCA1 and BRCA2." Am J Hum Genet, 62: 145-58

Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S (2002) "The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons." Human Molecular GeneticsVol. 11, No. 23: 2805–14

Pharoah AA., Narod S *et al.* (2003) "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." Am J Hum Genet. 72: 1117–30

Philips AV, Cooper TA (2000) "RNA processing and human disease." Cell Mol Life Sci. 2: 235-49.

Pikielny CW, Rymond BC and Rosbash M (1986) "Electrophoresis of ribonucleoproteins reveals an ordered assembly of yeast splicing complexes." Nature, 324: 341–5.

Pilch B, Allemand E, Facompre M, Bailly C, Riou JF, Soret J, Tazi J (2001) "Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, Spleißosom assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506." Cancer Res. 18: 6876- 84.

Puig O, Gottschalk A, Fabrizio P, Seraphin B (1999) "Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection." Genes Dev. 13: 569-80.

Raghunathan PL, Guthrie C (1998) "A Spleißosom Recycling Factor That Reanneals U4 and U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles." Science 279: 857-60.

Rahman N; Stratton MR (1998) "The genetics of breast cancer susceptibility." Annu.Rev. Genet. 32: 95-121.

Rajan JV, Wang M, Marquis ST. Chodosh LA (1996) "BRCA2 is coordinately regulated with BRCA1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells." Proc Natl Acad Sci USA, 93: 13078-83.

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

Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002) "Large-scale proteomic analyses of the human spliceosome." *Genome Res.* 12: 1231-45.

Rätsch G, Sonnenburg S, Schölkopf B (2005) "Recognition of alternatively spliced exons in C. Elegans." Bioinfomatics 21: i369–i77.

Rätsch G (2006) "Intelligente Algorithmen zur Analyse zellulärer Spleißmechanismen." Forschungsbericht, Friedrich-Miescher-Laboratorium für biologische Arbeitsgruppen in der Max-Planck-Gesellschaft

Rätsch G, Bohnert R (2010) "Moderne Methoden zur Rekonstruktion von Transkriptomen." Forschungsbericht, Friedrich-Miescher-Laboratorium für biologische Arbeitsgruppen in der Max-Planck-Gesellschaft

Richtlinien-Kommission der Bundesärztekammer (1998) "Richtlinien zur Diagnostik der genetischen Disposition für Krebserkrankungen." Deutsches Ärzteblatt, 95: B1120-B27

Robberson BL, Cote GJ, Berget SM (1990) "Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons." Mol Cell Biol. 1: 84-94.

Robson M, Gilewski T, Haas B, Levin D, Borgen P, Rajan P, Hirschaut Y, Pressman P, Rosen PP, Lesser ML, Norton L, Offit K. (1998) "BRCA-Associated Breast Cancer in Young Women." J Clin. Oncol. 16: 1642-9.

Sahashi K, Masuda A, Matsuura T, Shinmi J, Zhang Z, Takeshima Y, Matsuo M, Sobue G, Ohno K (2007) "In vitro and in silico analysis reveals an efficient algorithm to predict the splicing consequences of mutations at the 5' splice sites." Nucleic Acids Res

Salzberg SL (1997) "A method for identifying splice sites and translational start sites in eukaryotic mRNA." ComputAppl Biosci 13: 365-76.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. (1997) "Association of BRCA1 with RAD51 in mitotic and meiotic cells." Cell, 88(2): 265-75.

Schaal TD, Maniatis T (1999a) "Multiple distinct splicing enhancers in the protein- coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA." Mol. Cell. Biol. 19: 261-73.

Schaal TD, Maniatis T (1999b) "Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences." Mol. Cell. Biol. 19: 1705-19.

Schmutzler RK, Beckmann MW, Kiechle M: Prävention (2002) "Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom." Dtsch Ärzteblatt 99: C1071-6

Schmutzler RK, Kempe A, Kiechle M, Beckmann MW (1999) "Gegenwärtiger Stand der klinischen Beratung und Betreuung von Frauen mit einer erblichen Disposition für das Mamma- und Ovariallkarzinom." Deutsch Med Wochenschr, 124: 563-6.

Schmutzler RK, Schlegelberger B, Meindl A et al.: (2008) "Hereditäre Brustkrebserkrankung. Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland." Herausgeberin U.-S. Albert für die Mitglieder der Planungsgruppe und Leiter der Arbeitsgruppen Konzertierte Aktion Brustkrebs- Früherkennung in Deutschland. Zuckerschwerdt Verlag: München, Wien, New York, 2008: 56-9.

Schneider C, Will CL, Makarova OV, Makarov EM, Lührmann R (2002) "Human U4/U6.U5 and U4atac/U6atac.U5 tri-snRNPs exhibit similar protein compositions." Mol Cell Biol. May;22(10):3219-29.

Schulz KD, Duda V, Schreer I, Heiwang-Köhbrunner FH (1997) "Möglichkeiten der Brustkrebsfrüherkennung." Gynäkologe, 30: 631-36.

Schwer B, Guthrie C (1992) "A conformational rearrangement in the spliceosome is dependent on PRP16 and ATP hydrolysis." EMBO J. Dec 11(13): 5033-9.

Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL (1990) "Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project." Methods Enzymol 183: 252-78.

Shapiro MB, Senapathy P(1987) "RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression." Nucleic Acids Res 15: 7155-74.

Sharp PA, Burge CB (2000) "Classification of Introns: U2-Type or U12-Type." Cell, Volume 91: 875-879

Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S, Couch F, Hoskins K, Weber B, Castilla L, Erdos M, Brody L (1995) "A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene." JAMA, 273: 535-541.

Shen SX, Weaver Z, Xu X, Li C, Weinstein M, Chen L, Guan XY, Ried T, Deng CX (1998) "A targeted disruption of the murine *Brca1* gene causes Gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability." Oncogene Volume 17, Pages: 3115-24.

Shen, H, Green MR (2006) "RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans." Genes Dev 20: 1755-65

Shen HH, Kan JLC,. Green MR (2004) "Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branch point to promote prespliceosome assembly." Molecular Cell 13: 367-76.

Si ZH, Rauch D, Stoltzfus CM (1998) "The exon splicing silencer in human immunodeficiency virus type 1 Tat exon 3 is bipartite and acts early in Spleißosom assembly." Mol.Cell Biol. 18: 5404-13.

Sierakowska H, Gorman L, Kang SH, Kole R (2000) "Antisense oligonucleotides and RNAs as modulators of pre-mRNA splicing." Methods Enzymol: 506-21.

Sironi M, Menozzi G, Riva L, Cagliani R, Comi GP, Bresolin N, Giorda R, Pozzoli U (2004) "Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing." Nucleic Acids Res 32: 1783-91.

Smith C, Patton JG , Nadal-Ginard B (1989) "Alternative splicing in the control of gene expression." Annu Rev Genet, 23: 527–577.

Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L, King MC. (1996) "Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1." Genome Res, 6:1029-49.

Smith CW , Valcarcel J (2000) "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." Trends Biochem Sci, 25: 381–8.

Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS (1997) "Arrest of cell cycle by the tumor suppressor BRCA1 requires the CDK inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup>." Nature, 389: 1189-90.

Staden R (1984) "Computer methods to locate signals in nucleic acid sequences." *Nucl Acids Res*, 12:505-19.

Staley JP, Guthrie C (1998) "Mechanical Devices of the Spliceosome. Motors, Clocks, Springs, & Things." *Cell*, 92: 315-26.

Stevens SW, Ryan DE, Ge HY, Moore RE, Young MK, Lee TD, Abelson JA (2002): "Composition & functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP." *Mol. Cell* 9: 31-44.

Stoilov P, Meshorer E, Gencheva M, Glick D *et al.* (2002). "Defects in Pre-mRNA Processing as Causes of and Predisposition to Diseases." DNA and Cell Biology 21(11): 803-18.

Sun H, Chasin LA (2000) "Multiple splicing defects in an intronic false exon." Mol Cell Biol 20: 6414-25.

Tacke R, Manley JL (1999) "Determinants of SR protein specificity." Curr Opin Cell Biol, 11: 358–62.

Tacke R, Manley JL (1995) "The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities." EMBO J. 14:3540-51.

Tacke R, Manley JL (1999) "Functions of SR and Tra2 proteins in pre-mRNA splicing regulation." Proc Soc Exp Biol Med. 2: 59-63.

Tange TO, Damgaard CK, Guth S, Valcarcel J, Kjems J (2001) "The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element." EMBO J. 20:5748-58.

Tarn WY, Steitz JA (1995) "Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 92: 2504-8.

Valadkhan S, Manley JL (2001) "Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs." Nature 413, 701-7.

Vaughn JP, Cirisano FD, Huper G, Berchuck A, Futreal PA, Marks JR, Iglehart JD (1996) "Cell cycle control of BRCA2." Cancer Res, 56(20): 4590-4.

Venkitaraman AR (2001) "Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage." J Cell Sci 114: 3591-8.

Venkitaraman AR. (2002) "Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2." Cell 108: 171-182.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ (2001) "The sequence of the human genome." Science, 291: 1304-51.

Wagner EJ, Garcia-Blanco AE (2001) "Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition." Mol. Cell Biol. 21:3281-8.

Wang J, Smith PJ, Krainer AR, Zhang MQ (2005) "Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes." Nucleic Acids Res. 16: 5053-62.

Wang Z, Hoffmann HM, Grabowski PJ (1995) "Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity." RNA. 1: 21-35.

Wang Z, Rolish ME, Yeo G, Tung V, Mawson M, Burge CB (2004) "Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers." Cell 119, 831-45.

Wang Z, Xiao X, Van NE, Burge CB (2006) "General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control." Mol Cell 23, 61-70.

Ware MD, DeSilva D, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Tavtigian SV, Mazoyer S (2006) "Does nonsensemediated mRNA decay explain the ovarian cancer cluster region of the BRCA2 gene?" Oncogene 25: 323–8

Welcsh PL, Owens KN and King MC. (2000) "Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2." TIG2000, 16:69-74.

Will CL, Bessonov S, Herold N, Wolf E *et al.* (2008) "Compositional dynamics of the metazoan spliceosome and elucidation of its catalytically active RNP core." MPIbpc News Dec (14).

Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL (1997) "RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2." J Biol Chem 272(51): 31941-4.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G (1995) "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature 378: 789-92.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D. (1994) "Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13." Science: 265:2088-90.

Xiao SH, Manley JL (1997) "Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing." Genes Dev. 11:334-44.

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

Yeo G, Burge CB (2004) "Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals." J Comput Biol 11: 377-94.

Zahler AM, Roth MB (1995) "Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 2642–6.

Zahler AM, Damgaard CK, Kjems J, Caputi M (2004) "SC35 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B proteins bind to a juxtaposed exonic splicing enhancer/exonic splicing silencer element to regulate HIV-1 tat exon 2 splicing." J Biol.Chem. 279: 10077-84.

Zhang XH, Chasin LA (2004) "Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing.Genes." Dev. Jun 1;18(11): 1241-50

Zhang MQ, Marr TG (1993) "A weight array method for splicing signal analysis." Comput Appl Biosci 9, 499-509.

Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R (2002) "Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome." *Nature* 419: 182-5.

Zhu J, Mayeda A, Krainer AR (2001). "Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR pro-teins." Mol.Cell 8:1351-61.

### 7 Anhang

# 7.1 Unklassifizierte IVS- und Synonymous-Mutationen der 5' Spleißstelle der BIC-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA1	1	2	199+4	A to T	IVS2+4A>T	IVS	unknown	3,3	2,51	10,25	aberrant
BRCA1	1	2	199+5	G to A	IVS2+5G>A	IVS	unknown	5	4,59	12,36	aberrant
BRCA1	1	3	253+3	A to C	IVS3+3A>C	IVS	unknown	7,1	7,34	8,4	aberrant
BRCA1	1	3	253+5	G to A	IVS3+5G>A	IVS	unknown	5,3	5,64	12,36	aberrant
BRCA1	13	5	331+3	A to G	IVS5+3A>G	IVS	unknown	2,2	5,13	1,79	aberrant
BRCA1	7	6	420+8	T to C	IVS6+8T>C	IVS	unknown	1,1	0	-0,43	normal
BRCA1	12	6	420+7	G to A	IVS6+7G>A	IVS	unknown	-1,9	0	0,99	normal
BRCA1	1	6	420+5	G to A	IVS6+5G>A	IVS	unknown	5,3	8,77	12,36	aberrant
BRCA1	2	7	560+3	A to G	IVS7+3A>G	IVS	unknown	3,4	4,54	1,79	aberrant
BRCA1	1	9	712+3	G to A	IVS9+3G>A	IVS	unknown	-1,45	-0,19	-1,79	normal
BRCA1	3	9	712+4	A to G	IVS9+4A>G	IVS	unknown	3,55	2,11	9,72	aberrant
BRCA1	1	10	789+8	C to T	IVS10+8C>T	IVS	unknown	0	0	0,43	normal
BRCA1	1	10	789+7	G to A	IVS10+7G>A	IVS	unknown	0	0	0,99	normal
BRCA1	1	10	789+8	C to G	IVS10+8C>G	IVS	unknown	0	0	0,33	normal
BRCA1	5	11	4215+3	A to G	IVS11+3A>G	IVS	unknown	2,2	6,71	1,79	aberrant
BRCA1	1	12	4304+5	del AAA	IVS12+5delAAA	IVS	unknown	-3	-1,29	-13,3	normal
BRCA1	1	13	4476+6	T to C	IVS13+6T>C	IVS	unknown	3,5	0,34	5,06	aberrant
BRCA1	1	17	5193+3	A to G	IVS17+3A>G	IVS	unknown	2,2	4,89	1,79	aberrant
BRCA1	2	17	5193+6	C to G	IVS17+6C>G	IVS	unknown	0	-1,25	-0,9	normal
BRCA1	2	17	5192	A to G	T1691T	Syn	unknown	3,4	4,15	8,16	aberrant
BRCA1	1	18	5271+7	A to G	IVS18+7A>G	IVS	unknown	1,9	0	-0,99	normal
BRCA1	4	18	5271+6	T to G	IVS18+6T>G	IVS	unknown	3,5	3,26	4,16	aberrant

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA1	1	18	5271+6	T to C	IVS18+6T>C	IVS	unknown	3,5	3,63	5,06	aberrant
BRCA1	1	18	5271+5	G to A	IVS18+5G>A	IVS	unknown	5,3	9,11	12,36	aberrant
BRCA1	1	21	5451+4	A to G	IVS21+4A>G	IVS	unknown	3,1	0,98	9,72	aberrant
BRCA1	2	22	5525+5	G to A	IVS22+5G>A	IVS	unknown	5,3	7,58	12,36	aberrant
BRCA1	3	22	5525+5	G to T	IVS22+5G>T	IVS	unknown	5,3	8,41	12,57	aberrant
BRCA1	2	23	5586+8	G to A	IVS23+8G>A	IVS	unknown	0	0	0,91	normal
BRCA2	4	3	544+6	T to C	IVS3+6T>C	IVS	unknown	3,5	0,77	5,06	aberrant
BRCA2	1	3	544+5	G to A	IVS3+5G>A	IVS	unknown	5,3	3,04	12,36	aberrant
BRCA2	2	5	703+3	A to T	IVS5+3A>T	IVS	unknown	3,7	4,35	8,47	aberrant
BRCA2	2	5	703+4	del T	IVS5+4delT	IVS	unknown	1,5	2,21	7,55	aberrant
BRCA2	17	6	744+7	A to G	IVS6+7A>G	IVS	unknown	1,9	0	-0,99	normal
BRCA2	7	6	744	G to A	K172K	Syn	unknown	4,7	4,82	11,93	aberrant
BRCA2	1	11F	7069+7	del GT	IVS11+7delGT	IVS	unknown	1,1	0	2	normal
BRCA2	1	11F	7069+3	A to T	IVS11+3A>T	IVS	unknown	3,9	7,14	8,47	aberrant
BRCA2	1	13	7235+5	G to A	IVS13+5G>A	IVS	unknown	3	5,05	12,36	aberrant
BRCA2	1	13	7235+5	G to C	IVS13+5G>C	IVS	unknown	3	5,18	12,64	aberrant
BRCA2	14	14	7663+6	G to A	IVS14+6G>A	IVS	unknown	0	0,93	0,94	normal
BRCA2	1	15	7829+4	T to C	IVS15+4T>C	IVS	unknown	0	0	0	normal
BRCA2	1	16	8033+3	A to C	IVS16+3A>C	IVS	unknown	2,2	8,54	8,4	aberrant
BRCA2	19	16	8033+6	C to G	IVS16+6C>G	IVS	unknown	0	-1,22	-0,9	normal
BRCA2	2	16	8033+7	T to A	IVS16+7T>A	IVS	unknown	0	0	-1,44	normal
BRCA2	1	16	8033+8	A to G	IVS16+8A>G	IVS	unknown	0	0	-0,91	normal
BRCA2	1	18	8559	G to A	8559G/A	Syn	unknown	4,7	4,82	11,93	aberrant
BRCA2	1	19	8715+4	T to C	IVS19+4T>C	IVS	unknown	0	-0,57	0,27	aberrant
BRCA2	1	19	8715+3	A to G	IVS19+3A>G	IVS	unknown	3,4	4,17	1,79	aberrant
BRCA2	1	19	8715+8	G to A	IVS19+8G>A	IVS	unknown	0	0	0,91	normal
BRCA2	1	20	8860+6	A to G	IVS20+6A>G	IVS	unknown	0	-0,68	-0,94	normal
BRCA2	7	21	8982+4	A to G	IVS21+4A>G	IVS	unknown	4,45	3,36	9,72	aberrant
BRCA2	1	21	8982+5	G to T	IVS21+5G>T	IVS	unknown	4,95	4,53	12,57	aberrant

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important	Hbond- difference	Maxent- difference	S&S- difference	SDS- Prediction
BRCA2	1	21	8982+5	G to A	IVS21+5G>A	IVS	unknown	4,95	4,75	12,36	aberrant
BRCA2	15	25	9729+3	A to T	IVS25+3A>T	IVS	unknown	3,9	5,92	8,47	aberrant
BRCA2	2	25	9729+4	A to G	IVS25+4A>G	IVS	unknown	3,1	2,47	9,72	aberrant
BRCA2	1	26	9874	C to T	L3216L	Syn	unknown	0,2	0,18	4,5	normal

Tab. 18: Bewertung unklassifizierter BRCA1/2 IVS- und Synonymous-Mutationen der 5' Spleißstelle der *BIC*-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs (Stand Februar 2009). Die IVS- und Synonymous-Mutationen mit unbekannter klinischer Bedeutung werden mittels mittels HBond-Score, MaxEnt-Scan, SD-Score und S&S-Matrix bewertet. Grenzwerte, die einen aberranten Spleißprozess wahrscheinlich machen wurden auf  $\geq$ 2,2 HBond-Score,  $\geq$  0,98 MaxENT-Scan,  $\geq$ 1,79 S&S-Matrix festgelegt.

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important	maxent- difference	MM- difference	WMM- difference
BRCA1	1	2	101-10	T to C	IVS1-10T>C	IVS	unknown	1,12	1,28	0,34
BRCA1	1	2	101-5	T to C	IVS1-5T>C	IVS	unknown	1,17	0,6	0,63
BRCA1	1	2	101-3	ins AG	IVS1-3insAG	IVS	unknown	-11,28	11,97	8,63
BRCA1	1	3	200-13	C to A	IVS2-13C>A	IVS	unknown	1,79	1,47	1,96
BRCA1	1	3	200-12	ins C	IVS2-12insC	IVS	unknown	1,46	12,24	12,16
BRCA1	5	3	200-6	T to C	IVS2-6T>C	IVS	unknown	0,19	-0,19	0,11
BRCA1	9	3	200-12	C to G	IVS2-12C>G	IVS	unknown	1,68	0,68	1,35
BRCA1	1	3	200-20	C to T	IVS2-20C>T	IVS	unknown	0	-0,36	-0,28
BRCA1	1	3	200-12	del C	IVS2-12delC	IVS	unknown	-0,23	-0,22	-0,3
BRCA1	10	3	200-13	C to G	IVS2-13C>G	IVS	unknown	1,01	1,27	1,55
BRCA1	52	3	200-14	C to T	IVS2-14C>T	IVS	unknown	-0,21	-0,31	-0,36
BRCA1	6	3	200-11	del T	IVS2-11delT	IVS	unknown	-7,7	22,11	19,18
BRCA1	1	3	200-9	C to G	IVS2-9C>G	IVS	unknown	5,93	6,49	1,82
BRCA1	1	5	254-20	T to G	IVS4-20T>G	IVS	unknown	0,8	1,05	1,19
BRCA1	1	5	254-19	C to A	IVS4-19C/A	IVS	unknown	1,24	0,51	1,13
BRCA1	2	5	254-18	T to G	IVS4-18T>G	IVS	unknown	1,23	0,95	1,37
BRCA1	1	6	332-16	A to G	IVS5-16A>G	IVS	unknown	0,67	1,64	-0,48
BRCA1	1	6	332-8	A to C	IVS5-8A>C	IVS	unknown	-1,12	-1,34	-2,29
BRCA1	2	8	561-3	del T	IVS7-3delT	IVS	unknown	1,6	0,9	1,18
BRCA1	31	9	667-17	G to T	IVS8-17G>T	IVS	unknown	-0,94	-1,07	-1,32
BRCA1	1	9	667-13	G to T	IVS8-13G>T	IVS	unknown	-2,16	-2,72	-1,96
BRCA1	1	9	667-12	G to A	IVS8-12G>A	IVS	unknown	-0,8	-0,26	0,54
BRCA1	1	9	667-16	G to A	IVS8-16G>A	IVS	unknown	1,5	1,88	0,47
BRCA1	2	9	667-9	del A	IVS8-9delA	IVS	unknown	-0,67	-0,5	-2,01
BRCA1	1	9	667-9	A to G	IVS8-9A>G	IVS	unknown	0,79	5,18	-0,41

### 7.2 Unklassifizierte IVS- und Synonymous-Mutationen der 3' Spleißstelle der BIC-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important	maxent- difference	MM- difference	WMM- difference
BRCA1	2	9	667-3	del T	IVS8-3delT	IVS	unknown	1,12	0,88	0,35
BRCA1	1	10	713-20	A to G	IVS9-20A>G	IVS	unknown	0,55	0,72	0,17
BRCA1	2	10	713-4	A to G	IVS9-4A>G	IVS	unknown	-0,15	-0,36	-0,01
BRCA1	1	10	713-15	G to C	IVS9-15G>C	IVS	unknown	-0,2	-0,35	-1,29
BRCA1	1	11	790-12	del G	IVS10-12delG	IVS	unknown	1,2	0,68	-0,72
BRCA1	1	11	790-15	T to A	IVS10-15T>A	IVS	unknown	0,45	0,98	2,08
BRCA1	3	11	790-8	A to G	IVS10-8A>G	IVS	unknown	-0,72	-0,75	-0,35
BRCA1	1	11	790-18	del 3	IVS10-18del3	IVS	unknown	-0,06	-0,45	-0,07
BRCA1	1	12	4216-20	C to T	IVS11-20C>T	IVS	unknown	0,22	-0,35	-0,29
BRCA1	1	12	4216-10	G to A	IVS11-10G>A	IVS	unknown	-0,54	0,65	0,55
BRCA1	2	12	4216-11	T to C	IVS11-11T>C	IVS	unknown	-0,71	0,35	0,67
BRCA1	1	12	4216-7	A to G	IVS11-7A>G	IVS	unknown	-1,13	-0,21	0,15
BRCA1	1	13	4305-11	C to T	IVS12-11C>T	IVS	unknown	0,53	-0,35	-0,67
BRCA1	2	13	4305-19	C to T	IVS12-19C>T	IVS	unknown	-0,01	-0,11	-0,19
BRCA1	2	13	4305-10	G to A	IVS12-10G>A	IVS	unknown	0,81	0,89	0,55
BRCA1	1	15	4604-18	T to A	IVS14-18T>A	IVS	unknown	1,07	1,02	1,43
BRCA1	1	16	4795-10	T to A	IVS15-10T>A	IVS	unknown	1,28	1,51	2,74
BRCA1	2	16	4795-7	C to T	IVS15-7C>T	IVS	unknown	0,27	0	0,05
BRCA1	2	16	4795-11	A to G	IVS15-11A>G	IVS	unknown	-0,57	-0,95	-0,69
BRCA1	1	16	4795-16	C to G	IVS15-16C>G	IVS	unknown	0,81	0,47	1,25
BRCA1	1	16	4795-8	C to G	IVS15-8C>G	IVS	unknown	1,63	1,32	1,94
BRCA1	1	17	5106-11	T to C	IVS16-11T>C	IVS	unknown	0,56	1,08	0,67
BRCA1	26	17	5106-20	A to G	IVS16-20A>G	IVS	unknown	0,19	-0,07	0,16
BRCA1	1	17	5106-19	del T ins 4	IVS16-19delTins4	IVS	unknown	0	0	0
BRCA1	2	18	5194-9	A to T	IVS17-9A>T	IVS	unknown	-1,21	-1,68	-2,5
BRCA1	3	19	5272-13	A to G	IVS18-13A>G	IVS	unknown	-1,89	-0,84	-0,41
BRCA1	1	19	5272-6	C to A	IVS18-6C>A	IVS	unknown	1,05	1,53	2,64
BRCA1	1	19	5312+4	del T	IVS19+4delT	IVS	unknown	0	0	0
BRCA1	5	20	5313-12	G to A	IVS19-12G>A	IVS	unknown	5,02	5	0,54

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important	maxent- difference	MM- difference	WMM- difference
BRCA1	2	20	5313-18	G to T	IVS19-18G>T	IVS	unknown	-0,42	-0,43	-1,37
BRCA1	4	21	5397-14	C to G	IVS20-14C>G	IVS	unknown	0,64	0,32	1,35
BRCA1	3	22	5452-8	C to T	IVS21-8C>T	IVS	unknown	-0,79	-0,39	-0,06
BRCA1	1	24	5587-17	G to A	IVS23-17G>A	IVS	unknown	0,7	0,78	0,2
BRCA1	2	24	5587-10	del CT	IVS23-10delCT	IVS	unknown	0,75	0,09	1,09
BRCA1	15	24	5587-10	C to A	IVS23-10C>A	IVS	unknown	1,4	1,74	2,4
BRCA1	2	24	5587-18	T to A	IVS23-18T>A	IVS	unknown	1,89	1,96	1,44
BRCA2	4	2	190-7	T to C	IVS1-7T>C	IVS	unknown	-1,00	-0,05	-0,04
BRCA2	1	2	190-13	A to G	IVS1-13A/G	IVS	unknown	0,00	0	0
BRCA2	1	2	190-5	del T	IVS1-5delT	IVS	unknown	-0,22	-0,84	-0,03
BRCA2	3	2	190-16	G to A	IVS1-16G>A	IVS	unknown	0,30	0,48	0,47
BRCA2	1	2	190-12	del TCT	IVS1-12delTCT	IVS	unknown	0,82	0,84	2,07
BRCA2	1	3	296-7	T to A	IVS2-7T>A	IVS	unknown	1,46	1,15	2,3
BRCA2	2	3	296-7	del T	IVS2-7delT	IVS	unknown	-0,47	-0,13	0,62
BRCA2	4	4	545-12	G to A	IVS3-12G>A	IVS	unknown	0,26	0,9	0,55
BRCA2	1	4	545-10	A to G	IVS3-10A>G	IVS	unknown	-0,47	-0,28	-0,55
BRCA2	8	5	654-17	G to A	IVS4-17G>A	IVS	unknown	-0,11	0,36	0,19
BRCA2	4	5	654-12	del 5	IVS4-12del5	IVS	unknown	3,87	6,75	5,93
BRCA2	2	5	654-12	G to A	IVS4-12G>A	IVS	unknown	1,05	0,9	0,54
BRCA2	11	6	704-9	del T	IVS5-9delT	IVS	unknown	0,15	0,37	0,18
BRCA2	1	6	704-9	ins T	IVS5-9ins T	IVS	unknown	0,24	0,3	0
BRCA2	1	7	745-16	T to C	IVS6-16T>C	IVS	unknown	-0,53	0,04	0,28
BRCA2	1	7	745-11	T to C	IVS6-11T>C	IVS	unknown	0,12	0,61	0,67
BRCA2	2	7	745-4	C to G	IVS6-4C>G	IVS	unknown	-1,08	-1,25	0,73
BRCA2	15	7	745-19	C to T	IVS6-19C>T	IVS	unknown	0,18	0,15	-0,19
BRCA2	1	8	860-9	A to G	IVS7-9A>G	IVS	unknown	-0,06	-0,44	-0,41
BRCA2	1	8	860-18	del TA	IVS7-18delTA	IVS	unknown	0,18	0,26	0,21
BRCA2	1	8	860-16	A to C	IVS7-16A>C	IVS	unknown	-1,04	-0,74	-1,71
BRCA2	2	9	910-12	del TA	IVS8-12delTA	IVS	unknown	0,44	-0,23	-0,92

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	Designation	Mutation Type	Clinically Important	maxent- difference	MM- difference	WMM- difference
BRCA2	1	9	910-13	A to G	IVS8-13A>G	IVS	unknown	-1,30	-0,84	-0,41
BRCA2	6	10	1022-11	T to C	IVS9-11T>C	IVS	unknown	0,35	1,22	0,67
BRCA2	1	11	2138-17	T to C	IVS10-17T>C	IVS	unknown	0,77	0,26	0,27
BRCA2	1	11	2139	T to G	G637G	Syn	unknown	0,43	0,64	0,75
BRCA2	1	12	7070-19	del AT	IVS11-19delAT	IVS	unknown	0,00	0	0
BRCA2	1	12	7070-14	A to G	IVS11-14A>G	IVS	unknown	2,11	1,72	-0,55
BRCA2	1	12	7070-11	T to A	IVS11-11T>A	IVS	unknown	2,06	1,5	2,89
BRCA2	1	12	7070-20	T to A	IVS11-20T>A	IVS	unknown	0,79	0,68	1,03
BRCA2	5	12	7070-19	A to G	IVS11-19A>G	IVS	unknown	0,03	-0,55	-0,16
BRCA2	1	14	7236-20	del 4	IVS13-20del4	IVS	unknown	-0,62	-0,84	-1,02
BRCA2	1	14	7236-20	A to G	IVS13-20A>G	IVS	unknown	0,07	0,04	0,17
BRCA2	1	14	7236-13	C to T	IVS13-13C>T	IVS	unknown	0,35	-0,03	-0,4
BRCA2	4	15	7664-14	T to G	IVS14-14T>G	IVS	unknown	-0,42	0,34	1,72
BRCA2	2	15	7664-4	A to G	IVS14-4A>G	IVS	unknown	0,62	0,15	-0,01
BRCA2	1	15	7664-17	T to G	IVS14-17T>G	IVS	unknown	0,67	1,81	1,32
BRCA2	1	16	7830-15	T to G	IVS15-15T>G	IVS	unknown	0,00	0	0
BRCA2	2	16	7830-16	T to G	IVS15-16T>G	IVS	unknown	1,43	2,05	1,52
BRCA2	1	17	8034-12	T to C	IVS16-12T>C	IVS	unknown	0,52	0,37	0,64
BRCA2	7	21	8861-16	C to G	IVS20-16C>G	IVS	unknown	0,00	0,26	1,24
BRCA2	1	24	9346-6	C to T	IVS23-6C>T	IVS	unknown	0,44	-0,61	-0,1
BRCA2	1	24	9346-14	T to C	IVS23-14T>C	IVS	unknown	0,20	0,17	0,37
BRCA2	1	25	9485-18	C to A	IVS24-18C>A	IVS	unknown	0,15	0,49	1,22
BRCA2	1	25	9485-19	del 3 ins CC	IVS24-19del3insCC	IVS	unknown	0,13	0,1	0,26
BRCA2	1	25	9485-10	del T	IVS24-10delT	IVS	unknown	-0,28	-0,13	0,06
BRCA2	6	25	9485-16	T to C	IVS24-16T>C	IVS	unknown	-0,14	0,16	0,28
BRCA2	2	25	9485-10	ins T	IVS24-10insT	IVS	unknown	-0,26	-0,03	-0,02
BRCA2	1	27	9877-6	ins T	IVS26-6insT	IVS	unknown	-1,06	0,33	-0,34
BRCA2	16	27	9877-20	C to T	IVS26-20C>T	IVS	unknown	-0,26	-0,47	-0,29
BRCA2	1	27	9877-8	T to C	IVS26-8T>C	IVS	unknown	-0,38	-0,4	0,06

Tab. 19: Bewertung unklassifizierter BRCA1/2 IVS- und Synonymous-Mutationen der 3' Spleißstelle der *BIC*-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs (Stand Februar 2009). Die IVS- und Synonymous-Mutationen mit unbekannter klinischer Bedeutung werden mittels mittels MaxEnt-Scan, MM und WMM bewertet. Grenzwerte konnten aufgrund einer breiten Streuung der Score-Ergebnisse nicht bestimmt werden.

# 7.3 Synonymous-Mutationen der BIC-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-SeqT Goren	Wild-Typ-SeqT Fairbrother	Wild-Typ-Seq Fairbrother	Mutation-Seq Goren	Mutation-Seq Fairbrother	Mutation-Seq Fairbrother
BRCA1	1	2	161	C to A	Val to Val	V14V	nea	nea	nea	156-161	nea	nea
BRCA1	1	2	194	C to T	Pro to Pro	194C/T	192-197	neg	neg	neg	neg	neg
BROAT	1	2	104	0101	110 101 10	1040/1	102-107	neg	ncg	neg	neg	neg
BRCA1	17	3	233	G to A	Lys to Lys	233G/A	neg	228-233	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	6	350	G to T	Thr to Thr	350G/T	neg	neg	neg	349-354	neg	347-352
BRCA1	1	9	686	T to C	Asp to Asp	D189D	680-686	680-686	neg	neg	neg	neg
BRCA1	31	9	710	C to T	Cys to Cys	710C/T	neg	neg	neg	706-711	neg	neg
BRCA1	1	11A	1100	A to G	Thr to Thr	1100A/G	1097-1102	1095-1100, 1097- 1102	neg	neg	1095-1100	neg
BRCA1	1	11A	1115	G to T	Arg to Arg	R332R	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	11A	1184	G to A	Lys to Lys	1184G/A	1184-1189	1182-1187, 1183- 1188, 1184-1189	neg	1184-1189	1182-1187, 1183-1188, 1184-1189	neg
BRCA1	1	11D	3545	A to G	Ala to Ala	A1142A	3540-3545	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11D	3722	T to G	Gly to Gly	G1201G	neg	neg	3718-3723, 3719- 3724	neg	neg	3718-3723, 3719- 3724
BRCA1	1	11D	3878	T to G	Ser to Ser	3878T/G	neg	neg	neg	3878-3883	3877-3882, 3878-3883	neg
BRCA1	1	11D	3902	A to G	Leu to Leu	3902A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	11D	4077	T to C	Leu to Leu	4077T/C	4072-4077, 4075- 4080	neg	neg	4076-4081	neg	neg
BRCA1	1	11D	4145	A to G	Ser to Ser	4145A/G	4143-4148	4142-4147, 4145- 4150	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	11D	4193	G to A	Glu to Glu	4193G/A	4192-4197	4188-4193, 4192- 4197	neg	4188-4193	4188-4193, 4189-4194, 4190-4195, 4191-4196, 4193-4198	neg

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-SeqT Goren	Wild-Typ-SeqT Fairbrother	Wild-Typ-Seq Fairbrother	Mutation-Seq Goren	Mutation-Seq Fairbrother	Mutation-Seq Fairbrother
								PESE	PESS		PESE	PESS
BRCA1	6	12	4304	G to A	GIn to GIn	Q1395Q	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	3	13	4364	A to G	Glu to Glu	E1415E	4359-4364	4361-4366	neg	4364-4371	neg	neg
BRCA1	35	13	4427	T to C	Ser to Ser	4427T/C	4424-4429, 4427- 4432	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	13	4433	C to G	Ala to Ala	A1438A	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	13	4466	A to G	Thr to Thr	4466A/G	neg	4465-4470, 4466- 4471	neg	neg	neg	neg
BRCA1	3	16	4931	A to G	GIn to GIn	Q1604Q	4931-4936	neg	neg	4927-4932	neg	neg
BRCA1	2	16	4932	T to C	Leu to Leu	4932T/C	4932-4936	neg	neg	4927-4932	4931-4936, 4932-4937	neg
BRCA1	1	16	4952	C to T	Ala to Ala	4952C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	16	5012	T to C	Ser to Ser	S1631S	5012-5017	neg	neg	neg	5007-5012	neg
BRCA1	2	17	5192	A to G	Thr to Thr	T1691T	neg	5188-5193	neg	neg	neg	neg
BRCA1	3	18	5232	C to T	Leu to Leu	5232C/T	neg	neg	5229-5234, 5230- 5235, 5231-5236	neg	neg	5230-5235, 5231- 5236
BRCA1	1	20	5375	A to C	Ala to Ala	A1752A	5372-5377, 5373- 5378	5373-5378, 5375- 5380	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	20	5396	G to A	Lys to Lys	K1759K	neg	5391-5396	neg	neg	5391-5396	neg
BRCA1	1	24	5651	C to T	Leu to Leu	5651C/T	neg	neg	neg	neg	neg	5650-5655
BRCA1	1	24	5657	G or A	GIn to GIn	5657G/A	5652-5657, 5656- 5661	neg	neg	5656-5671	neg	neg
BRCA1	1	24	5675	C to G	Thr to Thr	T1852T	5673-5678	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	3	5	669	A to G	GIn to GIn	Q147Q	668-673	neg	neg	neg	neg	668-673
BRCA2	1	6	744	G to A	Lys to Lys	K172K	739-744	739-744	neg	neg	neg	neg
BRCA2	2	10	1155	A to G	Ser to Ser	S309S	neg	neg	neg	neg	neg	1152-1157
BRCA2	1	10	1239	C to T	Asn to Asn	1239C/T	neg	neg	neg	1234-1239, 1237- 1242	neg	neg
BRCA2	1	10	1377	C to A	lle to lle	13831	neg	neg	neg	neg	1377-1382	neg
BRCA2	1	10	1416	T to G	Ser to Ser	S396S	1415-1420	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1515	A to G	Leu to Leu	1515A/G	neg	neg	neg	1512-1517	1512-1517	neg

#### Anhang

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-SeqT Goren	Wild-Typ-SeqT Fairbrother	Wild-Typ-Seq Fairbrother	Mutation-Seq Goren	Mutation-Seq Fairbrother	Mutation-Seq Fairbrother
								PESE	PESS		PESE	PESS
BRCA2	7	10	1593	A to G	Ser to Ser	1593A/G	1593-1598	1589-1594, 1590- 1595, 1593-1598	neg	1593-1598	1593-1598	neg
BRCA2	1	10	1623	A to C	Val to Val	V465V	1623-1628	1623-1628	neg	1623-1628	1621-1626, 1622-1627, 1623-1628	neg
BRCA2	1	10	1827	T to C	Thr to Thr	T533T	1826-1831	1822-1827, 1825- 1830, 1826-1831, 1827-1832	1820-1827, 1821- 1828, 1822-1829, 1823-1830, 1824- 1831, 1825-1832	neg	1822-1827	neg
BRCA2	1	10	2016	T to C	Asp to Asp	2016T/C	2014-2019	2012-2017, 2013- 2018, 2014-2019, 2015-2020, 2016- 2021	neg	neg	2014-2019, 2015-2020	neg
BRCA2	1	11A	2139	T to G	Gly to Gly	G637G	neg	neg	neg	neg	neg	2138-2143
BRCA2	2	11A	2166	C to T	Ser to Ser	2166C/T	2165-2170	2161-2166	neg	2162-2167, 2165- 2170	2161-2166, 2162-2167	2164-2169, 2165- 2170, 2166-2171
BRCA2	7	11A	2457	T to C	His to His	H743H	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11A	2565	G to T	Leu to Leu	L799L	2562-2567	neg	2560-2565, 2561- 2566	2560-2565	neg	neg
BRCA2	1	11A	2778	A to G	GIn to GIn	2778A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11F	6648	T to G	Gly to Gly	G2140G	neg	neg	6645-6650; 6647- 6652	neg	neg	6644-6649, 6645- 6650, 6646-6651, 6647-6652
BRCA2	1	11F	6741	C to G	Val to Val	6741C/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11F	6861	T to C	Val to Val	V2211V	6856-6861, 6860- 6865	6856-6861	6857-6862, 6858- 6863, 6859-6864, 6860-6865, 6861- 6866	6860-6865	neg	neg
BRCA2	1	14	7380	A to G	GIn to GIn	7380A/G	7376-7381, 7378- 7383	7376-7381	7379-7384, 7380- 7385	neg	neg	7379-7384
BRCA2	1	14	7410	A to G	Arg to Arg	R2394R	neg	7405-7410	neg	neg	neg	neg
BRCA2	10	14	7470	A to G	Ser to Ser	7470A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	16	7992	A to T	lle to lle	7992A/T	neg	7987-7992, 7988- 7993	neg	neg	7987-7992	7990-7995
BRCA2	1	17	8175	A to G	Pro to Pro	P2649P	8173-8178	8174-8179, 8175- 8180	neg	neg	neg	neg

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-SeqT Goren	Wild-Typ-SeqT Fairbrother PESE	Wild-Typ-Seq Fairbrother PESS	Mutation-Seq Goren	Mutation-Seq Fairbrother PESE	Mutation-Seq Fairbrother PESS
BRCA2	1	18	8220	T to C	lle to lle	126641	8218-8223	neg	neg	8217-8222	8217-8222, 8218-8223	neg
BRCA2	1	18	8331	T to G	Ser to Ser	8331T/G	neg	8330-8335, 8331- 8336	neg	neg	8331-8336	neg
BRCA2	1	18	8415	G to A	Lys to Lys	K2729K	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	18	8559	G to A	Lys to Lys	8559G/A	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	19	8688	A to C	Val to Val	V2820V	neg	neg	neg	8683-8688	neg	neg
BRCA2	2	19	8715	A to G	GIn to GIn	Q2829Q	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	21	8982	G to A	Glu to Glu	E2918E	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	23	9225	G to A	Leu to Leu	L2999L	9222-9227	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	14	23	9345	G to A	Pro to Pro	P3039P	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	24	9465	T to C	Val to Val	9465T/C	neg	9465-9470	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	25	9642	A to G	Leu to Leu	9642A/G	neg	neg	neg	9639-9644	neg	9639-9644, 9640- 9645
BRCA2	1	25	9729	G to A	Glu to Glu	E3167E	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	26	9874	C to T	Leu to Leu	L3216L	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	5	27	9948	T to C	Val to Val	V3240V	9943-9948	neg	9945-9950, 9946- 9951	9943-9948	neg	neg
BRCA2	1	27	9966	C to T	Ala to Ala	A3246A	neg	neg	neg	9966-9971	neg	neg
BRCA2	2	27	10071	A to G	Pro to Pro	10071A>G	neg	neg	neg	10070-10075	neg	neg
BRCA2	1	27	10071	A to C	Pro to Pro	10071A>C	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	27	10152	C to T	Tyr to Tyr	10152C/T	neg	10148-10153, 10151-10156	neg	10150-10155	10150-10155, 10151-10156, 10152-10157	neg
BRCA2	5	27	10338	G to A	Arg to Arg	R3370R	neg	neg	10333-10338	10334-10339	10336-10341, 10337-10342	neg
BRCA2	1	27	10479	T to C	Tyr to Tyr	10479T/C	neg	neg	neg	10477-10482	neg	neg

 Tab. 20: Stille Mutationen der BIC-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums f
 ür famili
 ären Brust- und Eierstockkrebs (Stand Februar 2009)

 Beurteilung von stillen BRCA1 und BRCA2 Mutationen des NCBI und des Deutschen Konsortiums mittels Goren- und Fairbrother-Algorithmus
BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-Seq Chasin	Wild-Typ-Seq Zhang/Chasin	Mutation-Seq Zhang/Chasin	Mutation-Seq Zhang/Chasin
							PESE	PESS	PESE	PESS
BRCA1	1	2	161	C to A	Val to Val	V14V	neg	155-162, 157-164	neg	154-161, 155-162, 157-164
BRCA1	1	2	194	C to T	Pro to Pro	194C/T	neg	neg	neg	neg
BRCA1	17	3	233	G to A	Lys to Lys	233G/A	neg	neg	233-240	228-235
BRCA1	1	6	350	G to T	Thr to Thr	350G/T	344-351	neg	neg	neg
BRCA1	1	9	686	T to C	Asp to Asp	D189D	679-686, 680-687, 681-688	685-692	679-686, 680-687, 681- 688, 682-689	neg
BRCA1	31	9	710	C to T	Cys to Cys	710C/T	neg	neg	neg	704-711, 705-712
BRCA1	1	11A	1100	A to G	Thr to Thr	1100A/G	neg	1096-1103, 1099-1106, 1100-1107	neg	neg
BRCA1	1	11A	1115	G to T	Arg to Arg	R332R	1111-1118, 1114-1121	neg	neg	neg
BRCA1	2	11A	1184	G to A	Lys to Lys	1184G/A	1182-1189, 1183-1190	neg	1183-1190	neg
BRCA1	1	11D	3545	A to G	Ala to Ala	A1142A	neg	3539-3546	neg	neg
BRCA1	1	11D	3722	T to G	Gly to Gly	G1201G	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11D	3878	T to G	Ser to Ser	3878T/G	neg	neg	3875-3882, 3876-3883, 3877-3884, 3878-3885	neg
BRCA1	1	11D	3902	A to G	Leu to Leu	3902A/G	neg	3895-3902, 3896-3903	neg	3896-3903
BRCA1	2	11D	4077	T to C	Leu to Leu	4077T/C	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11D	4145	A to G	Ser to Ser	4145A/G	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	11D	4193	G to A	Glu to Glu	4193G/A	4186-4193, 4187-4194, 4188- 4195	neg	4186-4193, 4187-4194, 4188-4195, 4191-4198	neg
BRCA1	6	12	4304	G to A	GIn to GIn	Q1395Q	neg	neg	neg	neg
BRCA1	3	13	4364	A to G	Glu to Glu	E1415E	4357-4364, 4362-4369	neg	neg	neg
BRCA1	35	13	4427	T to C	Ser to Ser	4427T/C	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	13	4433	C to G	Ala to Ala	A1438A	4431-4438, 4433-4441	neg	4431-4438, 4432-4439	neg
BRCA1	1	13	4466	A to G	Thr to Thr	4466A/G	neg	neg	4465-4472	neg
BRCA1	3	16	4931	A to G	GIn to GIn	Q1604Q	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	16	4932	T to C	Leu to Leu	4932T/C	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	16	4952	C to T	Ala to Ala	4952C/T	neg	neg	4948-4953, 4950-4955	neg
BRCA1	1	16	5012	T to C	Ser to Ser	S1631S	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	17	5192	A to G	Thr to Thr	T1691T	neg	neg	neg	neg

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-Seq Chasin	Wild-Typ-Seq Zhang/Chasin	Mutation-Seq Zhang/Chasin	Mutation-Seq Zhang/Chasin
							PESE	PESS	PESE	PESS
BRCA1	3	18	5232	C to T	Leu to Leu	5232C/T	neg	5226-5233	neg	5225-5232, 5226- 5233, 5227-5234, 5228-5235
BRCA1	1	20	5375	A to C	Ala to Ala	A1752A	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	20	5396	G to A	Lys to Lys	K1759K	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	24	5651	C to T	Leu to Leu	5651C/T	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	24	5657	G or A	GIn to GIn	5657G/A	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	24	5675	C to G	Thr to Thr	T1852T	neg	neg	5675-5682	neg
BRCA2	3	5	669	A to G	GIn to GIn	Q147Q	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	6	744	G to A	Lys to Lys	K172K	neg	neg	neg	neg
BRCA2	2	10	1155	A to G	Ser to Ser	S309S	neg	1149-1156, 1150-1157, 1151-1158, 1152-1159	neg	1149-1156, 1155- 1162
BRCA2	1	10	1239	C to T	Asn to Asn	1239C/T	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1377	C to A	lle to lle	13831	1375-1382	neg	neg	1372-1379
BRCA2	1	10	1416	T to G	Ser to Ser	S396S	neg	1410-1417	neg	neg
BRCA2	1	10	1515	A to G	Leu to Leu	1515A/G	neg	neg	1513-1520	neg
BRCA2	7	10	1593	A to G	Ser to Ser	1593A/G	1592-1599, 1593-1600	neg	1592-1599, 1593-1600	neg
BRCA2	1	10	1623	A to C	Val to Val	V465V	1623-1630	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1827	T to C	Thr to Thr	T533T	neg	neg	1821-1828, 1822-1829, 1824-1831	neg
BRCA2	1	10	2016	T to C	Asp to Asp	2016T/C	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11A	2139	T to G	Gly to Gly	G637G	neg	neg	neg	neg
BRCA2	2	11A	2166	C to T	Ser to Ser	2166C/T	2161-2169	neg	2161-2168	neg
BRCA2	7	11A	2457	T to C	His to His	H743H	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11A	2565	G to T	Leu to Leu	L799L	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11A	2778	A to G	GIn to GIn	2778A/G	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11F	6648	T to G	Gly to Gly	G2140G	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11F	6741	C to G	Val to Val	6741C/G	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11F	6861	T to C	Val to Val	V2211V	neg	neg	6855-6862	neg
BRCA2	1	14	7380	A to G	GIn to GIn	7380A/G	neg	neg	neg	neg

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-Seq Chasin	Wild-Typ-Seq Zhang/Chasin	Mutation-Seq Zhang/Chasin	Mutation-Seq Zhang/Chasin
							PESE	PESS	PESE	PESS
BRCA2	1	14	7410	A to G	Arg to Arg	R2394R	neg	neg	7406-7413	neg
BRCA2	10	14	7470	A to G	Ser to Ser	7470A/G	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	16	7992	A to T	lle to lle	7992A/T	7988-7995	7985-7992	neg	neg
BRCA2	1	17	8175	A to G	Pro to Pro	P2649P	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	18	8220	T to C	lle to lle	126641	8215-8222	neg	neg	neg
BRCA2	1	18	8331	T to G	Ser to Ser	8331T/G	neg	neg	8329-8334, 8331-8338	neg
BRCA2	1	18	8415	G to A	Lys to Lys	K2729K	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	18	8559	G to A	Lys to Lys	8559G/A	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	19	8688	A to C	Val to Val	V2820V	neg	8684-8691, 8686-8693	neg	8684-8691
BRCA2	2	19	8715	A to G	GIn to GIn	Q2829Q	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	21	8982	G to A	Glu to Glu	E2918E	8975-8982	neg	8975-8982	neg
BRCA2	1	23	9225	G to A	Leu to Leu	L2999L	neg	neg	neg	9220-9227, 9221- 9228
BRCA2	14	23	9345	G to A	Pro to Pro	P3039P	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	24	9465	T to C	Val to Val	9465T/C	neg	9458-9465, 9459-9466, 9460-9467	neg	neg
BRCA2	1	25	9642	A to G	Leu to Leu	9642A/G	neg	9639-9646	neg	9638-9645, 9639- 9646, 9641-9648
BRCA2	1	25	9729	G to A	Glu to Glu	E3167E	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	26	9874	C to T	Leu to Leu	L3216L	neg	neg	neg	neg
BRCA2	5	27	9948	T to C	Val to Val	V3240V	9948-9953	neg	neg	neg
BRCA2	1	27	9966	C to T	Ala to Ala	A3246A	neg	neg	neg	neg
BRCA2	2	27	10071	A to G	Pro to Pro	10071A>G	10068-10075, 10069-10076	neg	10068-10075, 10069- 10076, 10070-10077	neg
BRCA2	1	27	10071	A to C	Pro to Pro	10071A>C	10068-10075, 10069-10076	neg	neg	neg
BRCA2	1	27	10152	C to T	Tyr to Tyr	10152C/T	neg	neg	neg	neg
BRCA2	5	27	10338	G to A	Arg to Arg	R3370R	10336-10343	neg	neg	neg
BRCA2	1	27	10479	T to C	Tyr to Tyr	10479T/C	neg	10474-10481, 10477- 10484	neg	neg

 Tab. 21: Stille Mutationen der BIC-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums f
 ür famili
 ären Brust- und Eierstockkrebs (Stand Februar 2009)

 Beurteilung von stillen BRCA1 und BRCA2 Mutationen des NCBI und des Deutschen Konsortiums mittels Zhang/Chasin-Algorithmus

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites
							Nova	hnRNP-B	hnRNP-I(PTB)	Srp55	Nova	hnRNP-B	hnRNP- I(PTB)	Srp55
BRCA1	1	2	161	C to A	Val to Val	V14V	160-163	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	2	194	C to T	Pro to Pro	194C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	17	3	233	G to A	Lys to Lys	233G/A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	6	350	G to T	Thr to Thr	350G/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	9	686	T to C	Asp to Asp	D189D	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	31	9	710	C to T	Cys to Cys	710C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11A	1100	A to G	Thr to Thr	1100A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11A	1115	G to T	Arg to Arg	R332R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	11A	1184	G to A	Lys to Lys	1184G/A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11D	3545	A to G	Ala to Ala	A1142A	neg	neg	neg	3542-3547	neg	neg	neg	3542-3547
BRCA1	1	11D	3722	T to G	Gly to Gly	G1201G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11D	3878	T to G	Ser to Ser	3878T/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11D	3902	A to G	Leu to Leu	3902A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	11D	4077	T to C	Leu to Leu	4077T/C	neg	neg	4077-4081	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	11D	4145	A to G	Ser to Ser	4145A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	11D	4193	G to A	Glu to Glu	4193G/A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	6	12	4304	G to A	GIn to GIn	Q1395Q	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	3	13	4364	A to G	Glu to Glu	E1415E	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	35	13	4427	T to C	Ser to Ser	4427T/C	neg	neg	4425-4429	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	13	4433	C to G	Ala to Ala	A1438A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	13	4466	A to G	Thr to Thr	4466A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	3	16	4931	A to G	GIn to GIn	Q1604Q	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	16	4932	T to C	Leu to Leu	4932T/C	neg	4933-4936	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	16	4952	C to T	Ala to Ala	4952C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites
							Nova	hnRNP-B	hnRNP-I(PTB)	Srp55	Nova	hnRNP-B	hnRNP- I(PTB)	Srp55
BRCA1	1	16	5012	T to C	Ser to Ser	S1631S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	2	17	5192	A to G	Thr to Thr	T1691T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	3	18	5232	C to T	Leu to Leu	5232C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	20	5375	A to C	Ala to Ala	A1752A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	20	5396	G to A	Lys to Lys	K1759K	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	24	5651	C to T	Leu to Leu	5651C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	24	5657	G or A	GIn to GIn	5657G/A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA1	1	24	5675	C to G	Thr to Thr	T1852T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	3	5	669	A to G	GIn to GIn	Q147Q	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	6	744	G to A	Lys to Lys	K172K	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	2	10	1155	A to G	Ser to Ser	S309S	1153-1156	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1239	C to T	Asn to Asn	1239C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1377	C to A	lle to lle	13831	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1416	T to G	Ser to Ser	S396S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1515	A to G	Leu to Leu	1515A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	7	10	1593	A to G	Ser to Ser	1593A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1623	A to C	Val to Val	V465V	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	1827	T to C	Thr to Thr	T533T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	10	2016	T to C	Asp to Asp	2016T/C	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11A	2139	T to G	Gly to Gly	G637G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	2	11A	2166	C to T	Ser to Ser	2166C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	7	11A	2457	T to C	His to His	H743H	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11A	2565	G to T	Leu to Leu	L799L	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2562-2565	neg
BRCA2	1	11A	2778	A to G	GIn to GIn	2778A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites
							Nova	hnRNP-B	hnRNP-I(PTB)	Srp55	Nova	hnRNP-B	hnRNP- I(PTB)	Srp55
BRCA2	1	11F	6648	T to G	Gly to Gly	G2140G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11F	6741	C to G	Val to Val	6741C/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	11F	6861	T to C	Val to Val	V2211V	neg	6859-6863	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	14	7380	A to G	GIn to GIn	7380A/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	14	7410	A to G	Arg to Arg	R2394R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	10	14	7470	A to G	Ser to Ser	7470A/G	7468-7471	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	16	7992	A to T	lle to lle	7992A/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	17	8175	A to G	Pro to Pro	P2649P	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	18	8220	T to C	lle to lle	126641	neg	8219-8222	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	18	8331	T to G	Ser to Ser	8331T/G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	18	8415	G to A	Lys to Lys	K2729K	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	18	8559	G to A	Lys to Lys	8559G/A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	19	8688	A to C	Val to Val	V2820V	neg	neg	neg	neg	8687-8690	neg	neg	neg
BRCA2	2	19	8715	A to G	GIn to GIn	Q2829Q	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	21	8982	G to A	Glu to Glu	E2918E	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	23	9225	G to A	Leu to Leu	L2999L	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	14	23	9345	G to A	Pro to Pro	P3039P	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	24	9465	T to C	Val to Val	9465T/C	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	25	9642	A to G	Leu to Leu	9642A/G	neg	neg	neg	neg	neg	9642-9646	neg	neg
BRCA2	1	25	9729	G to A	Glu to Glu	E3167E	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	26	9874	C to T	Leu to Leu	L3216L	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	5	27	9948	T to C	Val to Val	V3240V	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	27	9966	C to T	Ala to Ala	A3246A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	2	27	10071	A to G	Pro to Pro	10071A>G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

BRCA	# of times Recorded	Exon	NT	Base Change	AA Change	Desig- nation	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Wild-Typ-Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites	Mutation- Seq Additional RNA binding sites
							Nova	hnRNP-B	hnRNP-I(PTB)	Srp55	Nova	hnRNP-B	hnRNP- I(PTB)	Srp55
BRCA2	1	27	10071	A to C	Pro to Pro	10071A>C	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	27	10152	C to T	Tyr to Tyr	10152C/T	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	5	27	10338	G to A	Arg to Arg	R3370R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BRCA2	1	27	10479	T to C	Tyr to Tyr	10479T/C	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	10477-10482

Tab. 22: Stille Mutationen der *BIC*-Datenbank und der Datenbank des deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs (Stand Februar 2009) Beurteilung von stillen BRCA1- und BRCA2 Mutationen des NCBI und des Deutschen Konsortiums anhand von *Additional RNA binding sites* (Nova, hnRNP-B, hnRNP-I(PTB), Srp55)

## 8 Ciriculum Vitae

## Persönliche Angaben

Name Geburtsort	Thomas Sebastian Vogt Bad Oeynhausen
Schulbildung	
07/92 – 06/01	Besselgymnasium, Minden Leistungskurse: Englisch, Sport
08/98 - 01/99	Austauschschuljahr, Roswell (GA, USA)
Ausbildung	
12/10	Approbation als Arzt
10/04 – 12/10	Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit dem Studienabschluss: Staatsexamen Medizin
10/03 - 04/04	Medizinstudium an der Universität Ulm
10/02 – 05/03	Vorsemester Medizin in Köln

## 9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keinem anderen Institut eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 16.11.2011

Thomas Vogt

## 10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. rer. nat. H. Schaal** und Herrn **Dr. rer. nat. D. Niederacher** für die Auswahl und Überlassung des Themas, die kompetente Betreuung meiner Arbeit sowie die aufgebrachte Geduld und stete Hilfsbereitschaft.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner **Freundin Nadine** für ihre Unterstützung, Motivation und Fröhlichkeit, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit erheblich geholfen hat.

Ein großer Dank gebührt **meiner Familie**, die meine Ausbildung ermöglicht hat und die mich zu jeder Zeit bedingungslos unterstützt.