

**Aus der
Klinik für Frauenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. H.G. Bender

**Molekulare Analyse des BRCA1-Gens
in familiären und sporadischen Mammakarzinomen**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Tessa Schiffer

2002

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

**gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.,
Dekan
Referent: Prof. Dr. Beckmann
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Klein**

Meinen Eltern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Inzidenz von Genital- und Mammakarzinomen	1
1.2	Gynäkologische Karzinome	3
1.3	Das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom	4
1.4	Das Tumorsuppressorgen BRCA1	5
1.5	Prädiktive genetische Diagnostik	7
1.6	Deutsches Mutationsprofil	11
1.7	Aufgabenstellung	11
2.	Material und Methoden	13
2.1	Beschreibung der Untersuchungskollektive 1+2	13
2.2	Proben	15
2.2.1	Blutproben für die BRCA1-Mutationsanalyse	15
2.2.2	Proben von sporadischen Tumoren für die Polymorphismenanalyse	15
2.3	Methoden	15
2.3.1	DNA-/RNA-Isolierung	15
2.3.1.1	Allgemeines Material für die DNA-Isolierung	15
2.3.1.2	DNA-Isolierung aus Blut (mit QIAamp Blood-Kit) und Lymphozyten für die Mutationsanalyse (Kollektiv 1)	16
2.3.1.3	DNA-Isolierung aus Gefriergewebeproben sporadischer Tumoren und Normalgewebe für die Polymorphismenanalyse (Kollektiv 2)	16
2.3.1.4	RNA-Isolierung aus sporadischen Tumoren und Normalgewebe	17
2.3.1.4.1	Material für die RNA-Isolierung	17
2.3.1.4.2	RNA-Isolierung mit Trizol	17
2.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	18
2.3.2.1	Allgemeines Material für die PCR	18
2.3.2.2	PCR für die BRCA1-Genanalyse (DNA-Analyse im Kollektiv 1)	18
2.3.3	cDNA-Synthese aus sporadischen Tumoren und Normalgewebe	21
2.3.3.1	Material für die Synthese	21
2.3.3.2	cDNA-Synthese	21
2.3.3.3	β-Actin-PCR	21
2.3.3.4	Exon 13 PCR	22
2.3.4	Gelelektrophorese	23
2.3.4.1	Allgemeines Material für die Elektrophorese	23
2.3.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.3.4.3	Fragment-Analyse mittels automatischem DNA-Sequenzierer	24
2.3.5	Sequenzierung von PCR-Produkten für die BRCA1-Mutationsanalyse (Kollektiv 1)	25
2.3.5.1	Material für die Sequenzierung	25
2.3.5.2	Sequenzierung mit der Thermo-Sequenase	25
2.3.6	LOH-Analyse auf dem Chromosom 17q21 bei sporadischen Tumoren und Normalgewebe (Kollektiv 2)	26
2.3.7	Restriktion mit Ear1, zum Nachweis des Polymorphismus 4427 T/C im Exon 13 und somit des Vorhandenseins des Clusters (Kollektiv 2)	28

3.	Ergebnisse	29
3.1	Mutationsanalyse des BRCA1-Gens in Hochrisikofamilien (Kollektiv 1)	29
3.1.1	Analysendifferenzierung mit Stammbaumdarstellungen	29
3.1.2	Sequenzpolymorphismen und Sequenziererergebnisse	30
3.2	LOH-Analyse des BRCA1-Gens in sporadischen Mammakarzinomen (Kollektiv 2)	34
3.2.1	LOH-Analyse	34
3.2.2	RFLP-Analyse von cDNA von Normalgewebe und sporadischen Mammakarzinomen (Kollektiv 2)	37
4.	Diskussion	39
4.1	Prädiktive genetische Diagnostik des Tumorsuppressorgens BRCA1	39
4.2	Expressionsanalyse in sporadischen Mammakarzinomen	42
5.	Zusammenfassung	47
6.	Literatur	48
7.	Anhang	59

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Inzidenz von Genital – und Mammakarzinomen

Das Mammakarzinom ist die häufigste Karzinomerkrankung (geschätzte Neuerkrankungsrate 2001: 50.000 Frauen) und die absolut häufigste Karzinomtodesursache der Frau (Todesfälle 2001: 16.600 Frauen). Risikofaktoren für die Mammakarzinom-Entstehung sind vielfältig und werden in zwei Gruppen unterteilt: Risikodeterminanten und Risikomodulatoren (Beckmann et al., 2002; Beckmann et al., 2000, Kuschel et al., 2000). Risikodeterminanten sind individuell nicht beeinflussbare Faktoren. Das Alter ist der Hauptrisikofaktor für die Mammakarzinomentstehung. Dieser Faktor wird aber insbesondere von Frauen, die älter als 60 Jahre sind, nicht als Risikofaktor wahrgenommen (Beckmann et al., 2000). Dies kann mitverantwortlich dafür sein, dass die Teilnehmerate am gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogramm mit zunehmendem Alter abnimmt und die Karzinome häufig in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden (Beckmann et al., 2000). Ein Großteil der Risikofaktoren korreliert direkt oder indirekt mit Veränderungen des hormonellen Milieus: das Alter bei Menarche, bei der Menopause, bei der 1. Schwangerschaft, sowie die Fettleibigkeit (Beckmann et al., 2000). Risikomodulatoren sind Faktoren, die zum Größtenteil individuelle Lebensstilformen umfassen. Wie für die Risikodeterminanten korreliert ein Teil der Faktoren mit der Variation des hormonellen Milieus, wobei dieses nicht nur Steroidhormone, sondern auch Variationen bei Wachstumsfaktoren und anderen zellulären Regulationssystemen beinhaltet.

Genitalkarzinome wie Endometrium-, Ovarial- und Cervixkarzinom stehen in der Karzinominzidenz an 4., 5. bzw. 6. Stelle (Tabelle 1.1).

Tab. 1.1: Geschätzte Inzidenz von Genital- und Mammakarzinomen in der BRD 2000

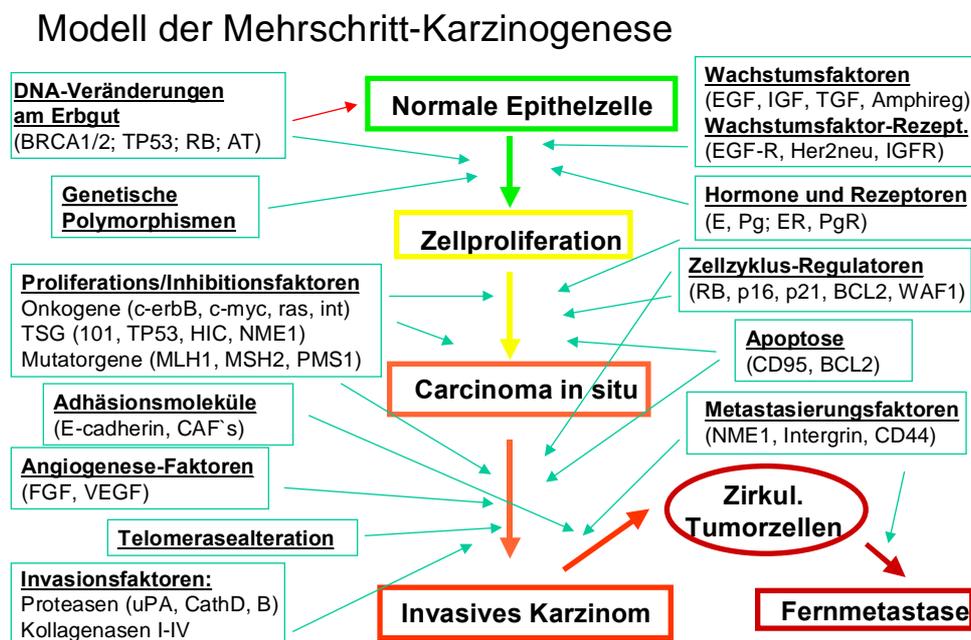
Carcinom-Inzidenz und -Mortalität

pro Jahr in BRD (2000):

	Inzidenz		Gesamtmortalität		
	absolut	pro 100.000	absolut	pro 100.000	%
MCa	50.000	- 125	17.500	- 44	(35%)
ECa	10.500	- 26	2.650	- 8	(22%)
OCa	7.700	- 19	5.200	- 13	(64%)
CxCa	6.200	- 12	2.600	- 8	(25%)

Die Mortalitätsrate des Ovarialkarzinoms steht jedoch nach dem Bronchialkarzinom an 2. Stelle. Die Altersgipfel der Karzinomerkrankungen sind unterschiedlich, wobei das Mamma- und Zervixkarzinom in den letzten 5 Jahren eine signifikante Zunahme der Inzidenz bei jüngeren Frauen (<50 Jahre) zeigt (Beckmann et al., 2000). Für das Endometriumkarzinom hat sich die Inzidenz seit 1992 verdoppelt, der Altersgipfel der Erkrankung liegt wie beim Ovarialkarzinom postmenopausal (Beckmann et al., 1997; Kuschel et al., 2000).

Abb.1.1: Modell der Mehrschrittkarzinogenese des Mammakarzinoms (Beckmann et al., 2000)



Die Entstehung der verschiedenen Karzinomtypen ist multifaktoriell. Unterschiedlichste Risikofaktoren und -determinanten einschließlich exogener Noxen (Viren, Hormone, Umweltfaktoren) beeinflussen die Tumorentstehung. Auf zellulärer Ebene zeigt sich, dass die Karzinogenese der unterschiedlichen Gewebe im Rahmen eines Mehrschrittprozesses abläuft (Abbildung 1.1). Aktivierten Onkogenen und defekten Tumorsuppressor- (TSG) bzw. Mutatorgenen kommen hier Schlüsselrollen zu. Proto-Onkogene sind Gene, die die physiologische Zellvermehrung positiv regulieren. Bei Veränderung der Genkopienzahl (Amplifikation) kommt es zur vermehrten Expression der korrespondierenden Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren mit entsprechender unphysiologischer Wachstumsstimulation (Beckmann et al., 1997). Tumor-suppressorgene wirken inhibierend auf die Zellproliferation. Sie besitzen in der normalen Zelle verschiedene Funktionen, wie z.B. in der DNA-Reparatur (BRCA1). Bei Wegfall der Inhibition kommt es zur unphysiologischen Proliferation. Das klassische Zweischritt-Modell zur Inaktivierung eines

Tumorsuppressorgens wurde zuerst von Knudson (1971) für das Retinoblastom beschrieben. Die meisten erblichen Tumoren werden durch meist rezessive Tumorsuppressorgene hervorgerufen. Die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens erfordert somit die Mutation beider Allele. Bei einer genetischen Prädisposition liegt ein Allel, durch eine Keimbahnmutation verursacht, bereits mutiert vor. Statistisch gesehen haben solche Genträger ein hohes Risiko, dass auch das zweite Allel durch eine somatische Mutation seine Funktion verliert und es damit zur Ausprägung des malignen Phänotyps kommt (Knudson, 1971; Beckmann et al., 1998). Dieser Verlust des zuvor intakten Wildtypallels lässt sich diagnostisch durch LOH-Analysen im Karzinom im direkten Vergleich mit Normalgewebe [Verlust der Heterozygotie ("loss of heterozygosity", LOH)] nachweisen (Niederacher et al., 1998). Somatische Mutationen auf beiden Allelen führen zur Entstehung von sporadischen Karzinomen.

1.2. Gynäkologische Karzinome

Tab. 1.2: Hereditäre Karzinomsyndrome mit gehäuftem Auftreten von Genital- und Mamma-karzinomen

TUMOR	Syndrom/Vererbung	CHROMOSOM/GEN	Andere Tumoren
Mamma-CA	Cowden Syndrom <i>autosomal dominant</i>	10q23 PTEN	Fibroadenome Intest. Hamartöse Polypen Hautläsionen Endometrium-CA Follikuläres Schilddrüsen-CA
Mamma-Ca (heterozygot)	Ataxia Telangiectasia (ATM) <i>Autosomal rezessiv</i>	11q22 ATM	Lymphome Cerebellare Ataxie Immundefizienz Medulloblastom Gliome
Mamma-CA (Ovarial-CA)	Familiäres Mamma- /Ovarial Syndrom <i>Autosomal dominant</i>	13q12 BRCA2	männliches Mamma-CA Prostata-CA Uterus-CA Oropharynx-CA Pankreas-CA
Mamma-CA	Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) <i>autosomal dominant</i>	17p13 TP53	Sarcome Gehirntumoren Leukämie Nebennierenrinde
Mamma-CA Ovarial-CA	Familiäres Mamma- /Ovarial Syndrom <i>autosomal dominant</i>	17q21 BRCA1	Colon-CA Prostata-CA
Endometrium-CA Ovarial-CA	Hereditäres non- polyposis Colon-CA (HNPCC) <i>autosomal dominant</i>	2p15 MSH2 3p21 MLH1 2q32 PMS1 7p22 PMS2 5q11 MSH3 2p22 MSH6	Kolorektal-CA Hepatobiliäre-CA Urogenital-CA Glioblastoma (Turcot)

BRCA1: breast cancer gene 1; BRCA2: breast cancer gene 2; TP53: tumour protein 53;
ATM: Ataxia teleangiectatica mutated; PTEN: phosphatase and tensin homolog;
hMSH2: human mutS homologue 2 gene; hMSH3: human mutS homologue 3 gene;
hMSH6: human mutS homologue 6 gene; hMLH1: human mutL homologue 1 gene;
hPMS1: human postmeiotic segregation 1; hPMS2: human postmeiotic segregation 2

Das Mammakarzinom ist die häufigste Karzinomerkrankung der Frau, die absolut häufigste Karzinomtodesursache der Frau in der westlichen Welt und in der Altersgruppe zwischen 35 und 55 Jahren sogar die häufigste Todesursache überhaupt (Beckmann et al., 1997). 5-25 % aller und ungefähr 25-40 % der Patientinnen mit einer Mammakarzinomerkrankung vor dem 35. Lebensjahr sowie 2-5 % aller Patientinnen mit einer Ovarialkarzinomerkrankung werden mit einer genetischen Prädisposition in Verbindung gebracht. In die Gruppe der prädisponierenden Gene werden für die Entwicklung von familiären Mamma-, Ovarial- und Endometrium-karzinomen derzeit mehrere Gene mit unterschiedlicher Penetranz eingeordnet: BRCA1, BRCA2, TP53, Ataxia Telangiectasia-Gen (AT), PTEN, HRAS1 und <mismatch-repair>-Gene, wie MLH1, MSH2, 3 und 6, PMS1 und PMS2 (Tabelle 1.2).

1.3 Das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom (BRCA1 und BRCA2)

Bezogen auf die Mammakarzinominzidenz ist derzeit noch unklar, welchen prozentualen Anteil die genetische Prädisposition am Gesamtkollektiv der Karzinompatientinnen hat. Daten aus amerikanischen und europäischen Studien zeigen, dass etwa 75 % aller Mammakarzinome sporadische Ereignisse sind. In 25 % kann man einen familiären Hintergrund beobachten. Etwa 5-10 % aller Mammakarzinome lassen sich ursächlich auf eine Keimbahnmutation in einem der beiden bekannten Brustkrebsgene BRCA1 oder 2 zurückführen (Futreal et al., 1994; FitzGerald et al., 1996; Shattuck-Eidens et al., 1995; Langston, et al., 1996). In vier der in Tabelle 1.2 aufgeführten hereditären Karzinomsyndrome treten Mamma- und/oder Ovarialkarziome als Primärkarzinome auf. Das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom ist haupt-sächlich auf Keimbahnmutation in den Brustkrebsgenen BRCA1 (17q21) und BRCA2 (13q12) zurückzuführen. Genetische Prädisposition wird autosomal dominant, d.h. in 50 %, an die Nach-kommen vererbt. Nach Kopplungsuntersuchungen ist in 45 % aller Familien mit early-onset-Mammakarzinomen und in mindestens 75 % aller Familien mit gehäuften Auftreten von Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen eine Inaktivierung eines dieser beiden Dispositionsgene für die Tumorentstehung verantwortlich (Beckmann et al., 1997; Holinski-Feder et al., 1998; Kuschel et al., 2000). Nicht in allen Risiko-Familien wurde eine Kopplung

mit dem BRCA1- oder BRCA2-Lokus gefunden, was für das Vorhandensein von mindestens einem weiteren Suszeptibilitätsgen - BRCAx - spricht (BIC-Datenbank; Ford et al., 1998).

Nach Statistiken des Breast Cancer Linkage Consortiums liegt das kumulative Risiko für Trägerinnen mit einem BRCA1-Gendefekt, bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken, bei 82 %, für Trägerinnen mit einem BRCA2-Gendefekt bei 84 % (Frauen-Allgemeinpopulation: 9 % bis zum 70. Lebensjahr). Hiervon erkrankten mehr als 60 % der Patientinnen vor dem 50. Lebensjahr. Das Risiko der BRCA1-Mutationsträgerinnen, bis zum 70. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, liegt bei 44 %, für BRCA2-Trägerinnen bei 27 % (Frauen-Allgemeinpopulation: 0,63 % bis zum 70. Lebensjahr) (Ford et al., 1998).

Weitere signifikante Ko-Inzidenzen sind bei BRCA1-Familien für Kolon- (4x) und Prostatakarzinom (3x), bei BRCA2-Familien für männliches Mamma- (15x), Prostata- (4x), Pankreas- (3x), Oropharynx- (3x) und Uteruskarzinom (4x) (bekannt Beckmann et al., 1998; Ford et al., 1998).

1.4 Das Tumorsuppressorgen BRCA1

Das BRCA1-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (q21) lokalisiert und kodiert für ein Protein mit 1863 Aminosäuren (Miki et al., 1994). Das Gen umfaßt 24 Exons und erstreckt sich über 81 kb genomischer DNA, die überdurchschnittlich viele ALU-Elemente enthält (Smith et al., 1996). Der Promotor besitzt keine TATA-Box, jedoch Initiatorelemente und eine GC-reiche Region. BRCA1 beinhaltet keine vollständige Östrogen-, jedoch eine Progesteron-rezeptorbindungssequenz (Smith et al., 1996). Das Protein beinhaltet eine n-terminale Zinkfingerdomäne und eine Häufung von sauren Aminosäuren am C-Terminus (Miki et al., 1994). Die Expression des 7,8 kb Transkripts konnte in verschiedenen Geweben, wie Brust, Ovar, Hoden und Thymus nachgewiesen werden (Miki et al., 1994). Zusätzlich wird ein 4,4 kb großes Transkript exprimiert, daß durch alternatives Splicing entsteht (Wilson et al., 1997). BRCA1 wird in stark proliferierenden und sich differenzierenden Geweben exprimiert. Die Expression ist zellzyklusabhängig, wobei die stärkste Expression in der späten G1 und S-Phase zu beobachten ist (Rajan et al., 1996).

Für BRCA1 sind Informationen über mehr als 460 DNA-Sequenzvarianten in der BIC-Datenbank zusammengefaßt. Es scheint eine Genotyp-/Phänotyp-Korrelation zu bestehen. In Abhängigkeit von der Lokalisation der Mutation im BRCA1-Gen ist eine Häufung von Mamma- (BRCA1: Exon 11-24) oder Ovarialkarzinomen (BRCA1: Exon 1-11) nachzuweisen (Holinski-Feder et al., 1998). In den Tumoren der BRCA1/2-Mutationsträgerinnen zeigten sich in allen untersuchten Tumoren ein Verlust der Heterozygotie (LOH) in der BRCA1/2-Region (Niederacher et al., 1998). Für beide Gene sind in spezifischen Bevölkerungsgruppen spezifische Mutationsloci, sogenannte Founder-Mutationen,

beschrieben, z.B. Ashkenazi-Jüdinnen (BRCA1-185delAG oder BRCA2-6174delT). Die individuelle Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Vorliegen einer dieser sogenannten Gründer ("founder")-Mutationen ist geringer als bei den übrigen Mutationen (Beckmann et al., 1998). Dies könnte durch einen Selektionsartefakt der Risikofamilien bedingt sein oder eine echte Genotyp-/Phänotyp-Korrelation darstellen.

Mutationen in BRCA1/2 führen zu spezifischen pathologischen Tumor-Charakteristika, die sich von sporadischen Karzinomen unterscheiden (Breast Cancer Linkage Consortium, 1997; Verhoog et al., 1998). In sporadischen Karzinomen sind nicht-invasive Mammakarzinome wie LCIS (lobuläres Carcinoma in situ) mit 6 % (familiär 3 %; $p=0,013$), und DCIS (duktales Carcinoma in situ) mit 55 % (familiär 45 %; $p= 0,0015$) häufiger vorhanden. Bei BRCA1-Tumoren sind DCIS seltener (38 %) als bei BRCA2-Tumoren (53 % , $p=0,01$). Bei invasiven Mammakarzinomen ist für BRCA1-Mutationen der nicht-lobuläre Typ häufiger ($p=0,06$) mit einem gehäuftem Auftreten von medullären Karzinomen ($p <0,0001$). Im Vergleich zu sporadischen Karzinomen ist das Grading 3 signifikant häufiger ($p <0,0001$) (Breast Cancer Linkage Consortium, 1997; Verhoog et al., 1998).

Die genauen zellulären Funktionen beider Proteine sind derzeit noch nicht geklärt (Bertwistle et al., 1998). BRCA1 hat mehrere Domänen, wie ein RING-Finger Motiv für DNA-Bindung, die für die nukleäre Lokalisation, die für die Rad51 Interaktion, das Granin-Motiv, die BRCT-Domäne für DNA-Repair oder für Metabolismus, sowie eine Transkriptions-Domäne. Das Protein wird in Epitelzellen der Brust exprimiert. Die Expression wird durch Pubertät und Schwangerschaft induziert, was auf eine Östrogen-Abhängigkeit oder Verbindung zur Zell-Proliferation bzw. Zyklusregulation hinweist.

In spontanen Mammakarzinomen sind bis dato bei 80 Frauen, alle jünger als 35 Jahre, in nur 6 Fällen BRCA1-Mutationen gefunden worden (7,5 %). Mittels LOH-Analysen ergaben sich u.a. Hinweise auf die chromosomale Lokalisation des BRCA1-Gens durch die Suche nach gehäuft auftretenden Allelverlusten in der DNA sporadischer Karzinome. Hierzu wurden polymorphe Marker zum spezifischen Nachweis homologer Allele eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Mikrosatelliten-Marker mit variabler Anzahl von kurzen Di-, Tri- oder Tetra-Nukleotid Wiederholungen. Durch die verschiedene Anzahl von Repeat-Einheiten innerhalb dieser Mikrosatellitensequenzen, ergeben sich nach PCR-Amplifikation mittels flankierender Primer in Normal-DNA informativer Individuen zwei in der Größe verschiedene DNA-Fragmente, die sich elektrophoretisch auftrennen lassen (Niederacher et al., 1998). Fehlen hingegen polymorphe Marker auf einem oder beiden Allelen oder sind sie auf beiden Allelen gleich, dann bezeichnet man sie als "nicht informativ" (Wagener, 1999). Bei familiären BRCA1-Trägerinnen zeigten sich in allen untersuchten Tumoren jeweils ein LOH in der BRCA1-Region. Doch auch in sporadischen Mammakarzinomen zeigt sich eine signifikante Häufung von Allelverlusten (LOH zwischen 30 und 70 % der untersuchten Fälle) im Bereich

17q21 (BRCA1) bzw. 13q12 (BRCA2) (Beckmann et al., 1997). Dies läßt die Vermutung zu, daß das BRCA1-Gen doch eine Rolle bei der Entstehung des spontanen Brustkrebses spielt. In diesem Zusammenhang wird auch das Auftreten von Polymorphismen neu betrachtet. Ein DNA-Polymorphismus ist das Auftreten unterschiedlicher Basensequenzen homologer Allele mit einer größeren Häufigkeit als in einem Normalkollektiv. In praxi gilt ein genetischer Locus als polymorph, wenn das seltenste Allel in einer Häufigkeit von mindestens 1 % vorkommt (Anteil der heterozygoten Träger: 2 %). Der Einsatz von Polymorphismen im Rahmen von Haplotyp-Analysen ist nur dann praktikabel, wenn die Polymorphismen in einem hinreichend großen Teil der Bevölkerung vertreten sind. Praktisch verwertbar sind Polymorphismen noch bis zu einer Häufigkeit von 5 %. Unterhalb von 5 % ist die Wahrscheinlichkeit, den Polymorphismus in einem Patientengut nachweisen zu können, zu gering (Wagner, 1999). Polymorphismen selbst sind ohne Funktion und dienen zur Identifikation von definierten Haplotypen. Eine Assoziation von Polymorphismen oder auch einem „Cluster“ von gekoppelten Polymorphismen mit einem Phänotyp (z.B. Cancer) gibt einen Hinweis, daß dieses Allel, das durch die Polymorphismen beschrieben bzw. identifiziert werden kann, ursächlich mit dem Phänotyp verknüpft ist.

1.5 Prädiktive genetische Diagnostik

Die Bundesärztekammer in Deutschland hat Richtlinien für die klinische und genetische Beratung und Untersuchung verabschiedet (Richtlinien-Kommission der Bundesärztekammer, 1998). Im interdisziplinären Beratungsansatz für Karzinom-belastete Familien werden Familienmitglieder von onkologisch-versierten, mit der Problematik vertrauten FachärztInnen (Gynäkologie, Chirurgie), HumangenetikerInnen, MolekulargenetikerInnen und PsychotherapeutInnen umfassend zu den alternativen Behandlungsoptionen informiert und langfristig betreut (Beckmann et al., 1997; Schmutzler et al., 1999). Beratung und Betreuung sind nicht an die Einwilligung zur molekulargenetischen Diagnostik gebunden. Zu testende Ratsuchende müssen entscheiden, ob die Erleichterung durch ein negatives Ergebnis die Erhöhung ihrer Angst nach positivem Testergebnis aufwiegen wird. Im Falle eines positiven Ergebnisses wird aus der unbestimmten Furcht eine konkrete Angst, ob das Auftreten eines Karzinoms verhindert werden kann oder, falls dies nicht möglich ist, wann oder an welcher Lokalisation der Tumor auftritt. Die Sorge, ob die (nicht getesteten) Nachkommen die Veranlagung geerbt haben, kann zu Schuldgefühlen führen. Auf sozialer Ebene besteht potentiell die Gefahr einer Diskriminierung durch ein positives Ergebnis, z. B. im Berufsleben mit Einstellungsverweigerung oder durch Ablehnung einer Versicherungsleistung. Schwierigkeiten bestehen bei der Befundinterpretation des genetischen Analyseergebnisses durch die ungeklärten Fragestellungen nach der Genpenetranz, der Varianz, der

phänotypischen Ausprägung, dem Einfluß von zusätzlichen endogenen Faktoren oder Suszeptibilitätsgenen (Beckmann et al., 2001). Wünschen Ratsuchende und ihre Familienangehörigen nach eingehender Aufklärung und Beratung über den prädiktiven Charakter der Untersuchung, die damit verbundenen Probleme und möglichen klinisch-diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen die Durchführung der molekulargenetischen Diagnostik, so erfolgt eine gründliche Datensicherung durch Einholen der Krankenunterlagen betroffener Familienmitglieder. Sowohl die Ratsuchende, als auch die übrigen Familienmitglieder, sollten über die aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse und die damit verbundenen Einschränkungen einer genetischen Analyse aufgeklärt werden, bevor die Testung beginnt (Beckmann et al., 1997; Schmutzler et al., 1999; Schmutzler et al., 2002).

Der Goldstandard in der prädiktiven genetischen Diagnostik für Mamma- und Ovarialkarzinome ist zur Zeit die genomische DNA-Sequenzierung, da sie die sicherste Technik mit der höchsten Sensitivität darstellt. Da diese Analysemethode sehr kostenintensiv und zeitaufwendig ist, werden z.B. in der Analysestrategie zur Detektion von BRCA-Mutationen verschiedene Präscreeningverfahren, wie beispielsweise Single-Strand-Comformation Polymorphismus (SSCP) Analyse, Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE), Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE), Conformations-Sensitive-Gelelektrophorese (CSGE), sowie Protein-Truncation-Tests (PTT) mit anschließender Sequenzierung des Bereiches der vermuteten Mutation evaluiert (Niederacher et al., 1998). Im Gegensatz zur Sequenzierung ist bei diesen Präscreeningverfahren die Sensitivität der Mutationsdetektionsrate nicht nur von der Methode abhängig, sondern auch von der Erfahrung der Untersucher. Neben der Durchführung oder bei Ablehnung einer prädiktiven genetischen Diagnostik können auch statistische Modelle Grundlage für die Berechnungen zum Mammakarzinomerkrankungs- oder Mutations-trägerrisikos und damit zur Definition von Hochrisikogruppen sein (Armstrong et al., 2000; Kuschel et al., 2000). Diese Modelle integrieren verschiedene Risikofaktoren und Stammbaumdaten und werten sie in Erkrankungsrisiko (z. B. Modelle nach Gail, Claus und MLINK (Cyrillic 2.1.3; 3.0)) oder das Vorliegen einer prädisponierten Mutation in BRCA1 und BRCA2 (z. B. Modelle nach MLINK (Cyrillic 2.1.3; 3.0), Couch, Shattuck-Eidens I und II, Frank) (Kuschel et al., 2000). Die Berechnungsmodelle können auch Grundlage zur Definition der Einschlußkriterien zur prädiktiven genetischen Diagnostik und für die Art und das Intervall der Früherkennungsuntersuchungen sein (Beckmann et al., 2000). Die Hoffnung auf sogenannte, derzeit in der Routine nur eingeschränkt erhältliche, „Gentests“ hat zur Verunsicherung der Familien beigetragen. Die Entwicklung allgemein einsetzbarer Untersuchungen wird derzeit von mehreren amerikanischen Firmen betrieben. Diagnostisch sichere Tests sind auch in den USA noch nicht erhältlich und bezüglich ihres Einsatzes und

der Möglichkeit des kommerziellen Mißbrauchs sehr umstritten. Dies betrifft insbesondere den monopolistischen Einsatz bedingt durch Genpatentrechte. Mit dem Ausbau von Schwerpunktzentren sollen Fragestellungen der klinischen Betreuung und molekulargenetischen Testung unter wissenschaftlichen Aspekten bearbeitet und evaluiert werden. Der vorzeitige „Routine“-Einsatz der Gentestung wird so vermieden (Beckmann et al., 2000). Nach Auswertung der molekulargenetischen Analyse werden in einer interdisziplinären Besprechung zwischen allen beteiligten Arbeitsgruppen (onkologisch erfahrene Kliniker, Humangenetik, Psychosomatik/Ethik, Molekulargenetik) 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 den Zentren der Deutschen Krebshilfe erarbeitet und regelmäßig von Gynäkologen, Onkologen und Radiologen überarbeitet. Berücksichtigt wird, dass das familiäre Mammakarzinom oft in einem Alter auftritt, in welchem 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 (Tabelle 1.3) (Beckmann et al., 1997; Schmutzler et al., 1999). Derzeit eingesetzte Früherkennungsuntersuchungen (Brustpalpation, Mammographie, Ultraschall und Magnet-resonanztomographie bzw. Ovarialultraschall) weisen idealerweise prämaligne, In-situ bzw. okkulte Karzinome nach (Bick, 1997; Schulz et al., 1997). Präventive medikamentöse und gegebenenfalls chirurgische Maßnahmen stellen deshalb wünschenswerte Optionen vor der Entstehung eines Mamma- und/oder Ovarialkarzinoms für HochrisikopatientInnen dar (Beckmann et al., 1997; Beckmann et al., 1999; Beckmann et al., 2000; Schmutzler et al., 2002).

Tab. 1.3: Optionen zur Früherkennung bei erhöhtem Karzinomrisiko

1. Einweisung in regelmäßige (monatliche) Selbstuntersuchung ab 25. Lebensjahr	
2. Alle 6 Monate:	Ultraschall-Mamma ab 25. Lebensjahr
	Ultraschall-Ovar ab 30. Lebensjahr
	Bestimmung von CA125 ab 30. Lebensjahr
3. Alle 6-12 Monate:	Gynäkologische Untersuchung und Exfoliativzytologie durch Frauenarzt/Frauenärztin ab dem 20. Lebensjahr
	Kernspintomogramm ab 25. Lebensjahr und/oder Mammographie ab 30. Lebensjahr

Zur Zeit sind unterschiedliche Substanzklassen als potentielle chemo-präventive Agenzien für das Mammakarzinom in der vorklinischen und klinischen Testung. Die Ergebnisse der drei derzeit publizierten Chemo-Präventionsstudien (Fisher et al., 1998; Powles et al., 1998; Veronesi et al., 1998) sind sehr unterschiedlich. Statistische Variablen in den Studien (z. B. Altersunterschiede der Studiengruppen, Compliance, Dauer des Nachbeobachtungszeitraums, zusätzliche Einnahme von Hormonersatztherapie) und die zugrunde liegenden Ein-schlusskriterien bzw. die unterschiedliche Risikoklassifizierung können für die Diskrepanz in den Studienresultaten verantwortlich sein (Beckmann et al., 1999). Die drei publizierten Präventionsstudien deuten auf einen theoretisch richtigen Ansatz zur Chemoprävention des Mammakarzinoms hin.

Retrospektive Untersuchungen weisen darauf hin, dass bei Frauen mit einer familiären Belastung das Erkrankungsrisiko durch beidseitige Mastektomie vermindert werden kann (Hartmann et al., 1999; Hughes et al., 1999). Bestätigt wurde dies in einer ersten prospektiven Studie mit Trägerinnen einer BRCA1- oder 2-Mutation (Meijers-Heijboer et al., 2000). Von 139 Mutationsträgerinnen entschieden sich 76 Frauen für die prophylaktische Mastektomie. Nach einem mittleren Beobachtungszeitraum von drei Jahren waren acht Frauen aus der Gruppe, die sich gegen eine Brustdrüsenentfernung entschieden hatten, erkrankt. Hingegen trat kein Fall von Brustkrebs in der Gruppe von Frauen auf, die sich einer beidseitigen Mastektomie unterzogen hatten (Schmutzler et al., 2002). Der größte präventive Effekt wird durch die Reduktion des Drüsengewebes um 99 % mittels einfacher Mastektomie mit Entfernung der Brustdrüse, des Lobus axillaris, der Brustwarze, der Pektoralisfaszie und einem Teil der Haut erzielt (Evans et al., 1999; Temple et al., 1991). Bei der subkutanen Mastektomie werden nur 90 bis 95 Prozent des Drüsenkörpers entfernt. Somit bleibt ein bisher nicht definiertes Restrisiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms bestehen (Schmutzler et al., 2002). Als alternative Methode kommt die medikamentöse Prävention in Form von Hormonpräparaten mit wachstumshemmendem Effekt zum Einsatz. Zur primären Prävention des Ovarialkarzinoms kommt die prophylaktische beidseitige Ovarektomie in Betracht. Auch das Risiko für Brustkrebs wird nach einer ersten Untersuchung bei Frauen mit einer BRCA1-Mutation reduziert (Rebbeck et al., 1999). In einer Fallkontrollstudie konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch durch eine Tubenligatur das Risiko eines Ovarialkarzinoms bei Trägerinnen einer BRCA1-Mutation vermindert werden kann (Narod et al., 2001). Pathophysiologisch kann dies am ehesten auf eine Reduktion der ovariellen Funktion durch eine verminderte Blutzufuhr zurückgeführt werden (Schmutzler et al., 2002). Die Operation sollte durch Laparoskopie und unter Mitentfernung der Eileiter erfolgen. Aufgrund des Risikos einer extraovariellen Peritonealkarzinose soll der gesamte

Peritonealraum gründlich inspiziert werden mit Durchführung einer Spülzytologie und Entnahme von Biopsien (Berchuck et al., 1999).

Für Frauen mit einer nachgewiesenen BRCA1- oder BRCA2-Mutation wird eine intensive Prävention für notwendig erachtet (Schmutzler et al., 2002). Das statistische Erkrankungsrisiko von Frauen aus belasteten Familien, deren Stammbaum auf einen autosomal dominanten Erbgang hinweist bei negativer Mutationsanalyse, 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 die einzelnen Familienmitglieder daher unterschiedlich groß sein. Das individuelle Risiko für das Vorliegen einer BRCA-Mutation kann mit Hilfe 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).

1.6 Deutsches Mutationsprofil

Um bevölkerungsspezifische Mutationsprofile für BRCA1 und 2 zu erstellen, wurden bei 989 Patienten deutscher Brust- und Ovarialkarzinomfamilien (DKH-Studie) Analysen in der gesamten kodierenden Sequenz der Brustkrebsgene BRCA1 und 2 durchgeführt. 77 BRCA1 und 63 BRCA2 Mutationen wurden in 302 Patienten gefunden. Mehr als 1/3 dieser Mutationen waren neu und könnten spezifisch für die deutsche Bevölkerung sein. Analysen des Haplotyps gaben Hinweise darauf, dass 14 von 20 rekurrierenden Mutationen wahrscheinlich aus einer gewöhnlichen Founder-Mutation hervorgegangen sind. Zusätzlich wurden 50 unterschiedliche Sequenzvarianten in 72 Familien mit unbekannter Relevanz für die Tumorentstehung gefunden. Vergleiche der BRCA1/BRCA2 Detektionsraten mit der Familiengeschichte ergaben, dass Familien mit Brust- und Ovarialkarzinom das höchste Risiko für eine BRCA1/BRCA2-Mutation besitzen (43% und 10%), gefolgt von Familien mit 2 prämenopausalen Fällen von Brustkrebs (24% BRCA1 und 13% BRCA2). Diese Daten liefern einen Hinweis auf weitere prädisponierende Gene in der deutschen Bevölkerung. In Brustkrebsfamilien mit 2 oder 3 betroffenen Frauen, wobei nur ein einzelner oder kein prämenopausaler Fall vorlag, wurden Mutationen mit niedrigerer Frequenz (um die 10% oder weniger für beide Gene) gefunden. Die Entscheidung für oder gegen eine molekulare Diagnostik muß nach diesen Erkenntnissen die Familiengeschichte und –struktur miteinbeziehen (Geman Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer, 2002).

1.7 Aufgabenstellung

Das Mammakarzinom wird in etwa 75% auf einen sporadischen und in 25% auf einen familiären Ursprung zurückgeführt. Von den Karzinomen mit familiärem Hintergrund wird für die Tumor-entstehung in ca. 5-10% eine Keimbahnmutation auf den Brustkrebsgenen BRCA1 und BRCA2 verantwortlich gemacht. Zur Verbesserung der Sequenzierung wurden im ersten Teil der Arbeit mit Hilfe des Programms <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3wwwresults.cgi> für die Exons 7, 15 und 16 im BRCA1-Gen neue Primer designed und anschließend bei 10 Hochrisikofamilien (siehe Tab. 2.1) die komplette Gen-Sequenzierung unter Berücksichtigung dieser Primer etabliert. Beim Nachweis einer familiären Prädisposition ist es so möglich präventive Maßnahmen zu ergreifen.

In sporadischen Mammakarzinomen spielen Mutationen der Gene BRCA1 und BRCA2 keine Rolle bei der Inaktivierung. Dennoch deuten die LOH-Analysen auf eine Funktion dieser Gene bei der Entstehung der sporadischen Karzinome hin. Es wurden im zweiten Teil der Arbeit RFLP-Analysen des BRCA1-Gens durchgeführt, um alternative Inaktivierungsmechanismen, wie z. B. reduzierte bzw. allelspezifische Expression, nachzuweisen.

2. Untersuchungskollektive, Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Untersuchungskollektive 1+2

Die Indikationen für eine Analyse der Gene BRCA1 und BRCA2 sind festgelegt. Für eine genetische Untersuchung kommen folgende Familien in Betracht (Schmutzler et al., 2002):

-Familien mit mindestens zwei an Mamma- und/oder Ovarialkarzinom Erkrankten, davon eine unter 50 Jahren.

-Familien mit einer an einseitigem Mammakarzinom im Alter von 30 Jahren oder früher Erkrankten.

-Familien mit einer an beidseitigem Mammakarzinom im Alter von 40 Jahren oder früher Erkrankten.

-Familien mit einer an Ovarialkarzinom im Alter von 40 Jahren oder früher Erkrankten.

-Familien mit einer an Mamma- und Ovarialkarzinom unabhängig vom Alter Erkrankten.

Familien mit einem männlichen an Mammakarzinom Erkrankten.

Tab. 2.1: Kollektiv 1:

Nummer	Art	Mammakarzinom		Ovarialkarzinom		Andere Karzinome in der Familie
		<50 J.	>50 J.	<50 J.	>50 J.	
Familiennummer	Alter					
57C	65	1	2	-	-	Unterleibskrebs (2x)
70.8	43	1	1	-	-	DarmCa, HautCa, MagenCa, OesophCa, LungenCa
72.3	59	2	-	-	1	DarmCa (2x)
82.10	51	1	1	-	-	
83.12	38	2	-	-	-	UterusCa
95.9	46	2	-	-	-	ColonCa
96.3	67	-	3	-	-	LymphdrüsenCa, ProstataCa
98.1	33	2	1	-	-	MagenCa, PankreasCa, HautCa (2x)
99.15	42	2	1	-	-	ProstataCa (3x), ThyroideaCa, ColonCa(3x), NierenCa, CervixCa (2x)
102.3	61	2	-	-	-	LeberCa, Gehirntumor

Es erfolgte eine Aufteilung der untersuchten Patientinnen in 2 Kollektive. Im Kollektiv 1 (Tab. 2.1) sind die Daten der Patientinnen aus 10 Hochrisikofamilien, bei denen eine genetische Analyse durchgeführt wurde, dargestellt. Im Kollektiv 2 (Tab. 2.2) sind die Daten von 53 Patientinnen mit sporadischen Mammakarzinomen zusammengefasst.

Tab.2.2: Beschreibung des Untersuchungskollektives 2 mit sporadischen Mammakarzinomen (siehe Anhang Tabelle 7.1):

		n=53	%
Alter	≤50	17	32,1
	>50	35	66
	unbestimmt	1	1,9
TumorgroÙe	1	11	20,8
	2	30	56,6
	3	6	11,3
	unbestimmt	6	11,3
Nodalstatus	negativ	34	64,2
	positiv	15	28,3
	unbestimmt	4	7,5
Metastasen	negativ	31	58,5
	positiv	2	3,8
	unbestimmt	20	37,7
Grading	1	5	9,4
	2	24	45,3
	3	13	24,5
	unbestimmt	11	20,8
ER (Östrogenrezeptor)	negativ	13	24,5
	positiv	36	68
	unbestimmt	4	7,5
PgR (Progesteronrezeptor)	negativ	12	22,6
	positiv	36	68
	unbestimmt	5	9,4

2.2 Proben

2.2.1 Blutproben für die BRCA1 Mutationsanalyse

Für die BRCA1-Mutationsanalyse wurde Vollblut von Index-Personen aus 10 Hochrisikofamilien (Kollektiv 1; siehe Tab. 2.1) verwendet, die in der Tumorrisikosprechstunde der Universitätsfrauenklinik im Zeitraum 1999/2000 vorstellig waren und prädiktiv genetisch untersucht werden sollen.

2.2.2 Proben von sporadischen Tumoren für die Polymorphismenanalyse

Die Analysen wurden jeweils an Tumor- und dem entsprechenden Normalgewebe von 53 Patientinnen (Kollektiv 2; siehe Tab 2.2) durchgeführt. Die Gewebe stammten von Operationen (mit Einwilligungserklärung), die im Zeitraum von 1997/1998 in der Universitätsfrauenklinik vorgenommen worden sind. Die Proben wurden bei -80°C gefroren. Die Einteilung der Mammakarzinome erfolgte nach der TNM-Klassifikation, einschließlich des Grading und Steroidhormonrezeptorexpression.

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-/RNA-Isolierung

2.3.1.1 Allgemeines Material für die DNA-Isolierung:

- Verdaupuffer für Gewebe (bei -80°C gelagert)
 - 100 mM NaCl
 - 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 - 25mM EDTA, pH 8,0
 - 0,5% SDS
- Erythrozytenlysis-Puffer
 - 155 mM NH_4Cl
 - 10 mM KHCO_3
 - 0,1 mM EDTA, pH 7,4
- Proteinase K in Aqua dest. gelöst
- 1% SDS
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)
- Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)
- absoluter Ethanol (-20°C gekühlt)
- 70% Ethanol (-20°C gekühlt)
- 7,5 M Ammoniumacetat
- QIAamp Blood-Kit

2.3.1.2 DNA-Isolierung aus Blut (mit QIAamp Blood-Kit) und Lymphozyten für die Mutationsanalyse (Kollektiv 1)

Zunächst wurden 2 ml Blut, das mit EDTA versetzt wurde, mit 200 µl QIAGEN Protease und 2,4 ml AL (Lysispuffer) Puffer gemischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml absolutem Ethanol wurde 3,3 ml Lysat auf die QIAamp Midi Säule gegeben und diese zentrifugiert (3 min, 3100 rpm). Der Durchbruch wurde verworfen, das restliche Lysat auf die Säule pipettiert und erneut zentrifugiert (3 min, 3100 rpm). Anschließend wurde die DNA mittels je 2 ml AW1 (Waschpuffer 1) und AW2 (Waschpuffer 2) sowie Zentrifugation (1 min, 4000 rpm und 15 min, 4000 rpm) gewaschen. Die Säule wurde in ein neues Röhrchen gesetzt, 300 µl AE (Elutionspuffer) auf die Membran pipettiert und nach Inkubation bei Raumtemperatur (5 min) mit 40000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut auf die Membran gegeben, inkubiert (5 min, bei Raumtemperatur), abzentrifugiert und dann die Konzentration photometrisch bestimmt.

3 ml EDTA-Vollblut wurden in ein Falcon-Röhrchen gefüllt. Das Blut wurde mit 9 ml Erythrozytenlysis-Puffer versetzt, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C, 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes, der die lysierten Erythrozyten enthielt, wurde das verbleibende Lymphozytenpellet mit 1 ml PBS gewaschen, in ein Eppendorf-Cup überführt und zentrifugiert (4°C, 10 min, 10000 rpm). Der Überstand wurde erneut verworfen. Die verbliebenen isolierten Lymphozyten mit PBS auf 3 ml aufgefüllt und anschließend erfolgte die DNA-Isolierung wie oben beschrieben, wobei Lymphozyten+PBS anstelle der 2 ml EDTA-Blut verwendet wurden.

2.3.1.3 DNA-Isolierung aus Gefriergewebeproben sporadischer Tumoren und Normalgewebe für die Polymorphismenanalyse (Kollektiv 2)

Die Proben wurden direkt nach der Entnahme aus der -80°C Truhe mit einem Skapell in grobe Stücke zerteilt. In einer Teflon-Kapsel mit Wolframkugel wurden die Stücke in flüssigem Stickstoff abgekühlt und anschließend in einem Dismembrator (Mikrodismembrator S, Fa. Braun Biotech Int.) bei 2000 rpm für 1 min zermahlen. Die Gewebetrümmer wurden in 0,5-1 ml Verdaupuffer aufgenommen, mit Proteinase K (0,1 mg Proteinase K/ml Verdaupuffer) versetzt und über Nacht bei 50°C inkubiert (12-18 Std). Anschließend wurden alle Proben mit Verdaupuffer auf ein gemeinsames Volumen aufgefüllt und eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurden die Proben nach Zugabe des gleichen Volumens einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) gut gemischt und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Der wässrige DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und das restliche Phenol durch Extraktion mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) entfernt. Nach der Zentrifugation (10 min, 2000 rpm) erfolgte die Fällung der DNA aus dem nochmals

überführten Überstand durch Zugabe von 0,5 Volumen Ammoniumacetat und 2,5 Volumen absolutem Ethanol (-20°C gekühlt). Die DNA wurde nach einer Inkubation von mindestens 2 Stunden bei -20°C durch Zentrifugation (30 min, 4000 rpm) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol (-20°C gekühlt) gewaschen und gleichzeitig in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, Centrifuge 5417R, Eppendorf) wurde erneut der Überstand verworfen und das Pellet bei 37°C für 5–10 min getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl Aqua dest. gelöst und die Konzentration mittels photometrischer Messung (Lambda Bio UV/VIS Spektrometer. Perkin Elmer) bei 260 und 280 nm (1E260nm entspricht 50 µg/ml DNA) bestimmt.

2.3.1.4 RNA-Isolierung aus sporadischen Tumoren und Normalgewebe

2.3.1.4.1 Material für die RNA-Isolierung:

- Trizol (Gibco BRL, Eggenstein)
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% Ethanol (mit DEPC (Diethyl-Pyrocbonat, Sigma) behandeltem Wasser angesetzt), bei -20°C gelagert
- Aqua dest. (DEPC behandelt)
- sterile Eppendorf-Cups (1,5 ml)
- sterile Spitzen

2.3.1.4.2 RNA-Isolierung mit Trizol

Das Gewebe wurde, wie unter Punkt 2.3.1.3 beschrieben, zerbröseln, sofort mit 1 ml Trizol versetzt, mehrmals mit der Pipette hochgezogen und in ein steriles Eppendorf-Cup überführt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden 200 µl Chloroform zugegeben, die Proben 15 Sekunden geschüttelt, erneut bei Raumtemperatur 2-3 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (4°C, 15 min, 12000 rpm). Die farblose Oberphase wurde in ein steriles Eppendorf-Cup überführt, 500 µl Isopropanol zugegeben, vorsichtig gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4°C mit 12000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, 75% Ethanol (-20°C) zum Pellet gegeben, die Probe vorsichtig umgedreht, ohne das Pellet abzulösen, und bei 4°C mit 9500 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde vollständig entfernt und die RNA im Thermoblock mit offenem Deckel für 5-10 min bei 55°C getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 30 µl Aqua dest. (DEPC behandelt) gelöst, 10 min bei 55°C mit geschlossenem Deckel inkubiert und mehrmals mit der Pipette hochgezogen, bis die RNA vollständig gelöst war. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch eine photometrische Messung bei 260 und 280 nm.

2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.2.1 Allgemeines Material für die PCR

- 10 x PCR-Reaktionspuffer (Fa. Pharmacia)
 - 500 mM KCl
 - 15 mM MgCl₂
 - 100 mM Tris/HCl, pH 9,0
- dNTP-Mix:
 - dATP 10 mM (Boehringer Mannheim)
 - dCTP 10 mM (Boehringer Mannheim)
 - dGTP 10 mM (Boehringer Mannheim)
 - dTTP 10 mM (Boehringer Mannheim)
 - im Verhältnis 1:1:1:1 gemischt
- Taq-Polymerase (5U/μl, Fa. Pharmacia) in Aufbewahrungspuffer:
 - 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
 - 0,1 mM EDTA
 - 5 mM DTT
 - 50% Glycerin
- Mineralöl (Sigma)
- PCR-Cups
- PCR-Thermocycler: Hybaid Omnigene
 - Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480
- MWG PTC 200

2.3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für die BRCA1-Genanalyse (DNA-Analyse im Kollektiv 1)

Die PCR wurde in zwei verschiedenen Cycler-Systemen durchgeführt. Für die manuell pipettierten Ansätze wurden Hybaid Omnigene PCR-Cycler verwendet, für die automatisierte BRCA1-PCR wurde ein MJ Research PTC 200 mit beheizbarem Motordeckel eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in 50 μl Ansätzen durchgeführt. Da sogenannte Hot-Start-PCRs durchgeführt wurden, wurden – mit Ausnahme der BRCA1-PCR mit dem Pipettier-Roboter – zwei Mastermixe angesetzt. Ein Mastermix mit 50 ng DNA, 10x PCR-Reaktionspuffer, jeweils 125 μM dNTPs, 5` und 3` Primer und Aqua dest. und ein Polymerase-Mastermix bestehend aus Taq, 10x PCR-Reaktionspuffer und Aqua dest. Die Sequenzen sind der Tabelle 2.3 zu entnehmen. Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Ansätze bei den Hybaid-Cyclern mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Der Polymerase-Mastermix zum Start der Reaktion wurde erst gegen Ende der Denaturierungsphase zugegeben (Hot-Start). Für die PCR-Reaktionen zur Analyse des BRCA1-Gens wurden die Primer so gewählt, dass

für die Amplifikation der einzelnen Exons nur zwei verschiedene Annealing-Temperaturen benötigt wurden (Friedman et al., 1994; Hogervorst et al., 1995; Simard et al., 1994; Castilla et al., 1994). Exon 11 wurde aufgrund seiner Länge in 15 überlappende Fragmente unterteilt, Exon 15 und 16 in je zwei Fragmente. Allen Primern wurde 5`-seitig die M13 (Universal/Reversal)-Sequenz angehängt. Dadurch wurde es ermöglicht, Cy-5-fluoreszenzmarkierte M13-Primersequenzen für alle Exons des BRCA1-Gens zu verwenden.

In einen 50 µl-Ansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

Mastermix:		Taq-Mastermix:	
Aqua dest.	28,0 µl	Aqua dest.	4,1 µl
10 x Puffer	4,5 µl	10 x Puffer	0,5 µl
dNTP	2,5 µl 125 µM	Taq (Amplitaq™ Gold)	0,4 µl. 2 U
5`Primer	2,5 µl 25 pMol		
3`Primer	2,5 µl 25 pMol		
+DNA	5,0 µl 50 ng		

Die PCR-Bedingungen für Exon 1-10, 12-22 und 24 wurden wie folgt gewählt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	10 min	1
94°C	30 sek	35
55°C	30 sek	
72°C	1 min	
72°C	8 min	1

Die PCR-Bedingungen für Exon 11 und 23 wurden wie folgt gewählt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	10 min	1
94°C	30 sek	35
60°C	30 sek	
72°C	1 min	
72°C	8 min	1

Tab. 2.3 : Primer für die Amplifikation von BRCA1

Exon	5' Primer	Länge (bp)	3' Primer	Länge (bp)
1	TAGCCCCTTGTTTTCCGTG	19	TCACAACGCCTTACGCCTC	19
2	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	24	TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT	22
3	CTCAGTTCCTGACACAGCAGAC	22	GGAGTTGGATTTTCGTTCTCACTTA	25
4	GTCAAAGAGATAGAATGTGAGC	22	CCCGTCTCTACAGAAAACAC	20
5	GGCTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	22	CTTTTCCTACTGTGGTTGCTTCC	23
6	AAGGTTGATAATCACTTGCTG	21	GTAATGTGCAAACCTTCTG	19
7	GCATACATAGGGTTTTCTCTTGG	22	CGAAGAAGAAGAAAACAAATGGT	23
8	CATGTTAGCTGACTGATGATGG	22	GGAATCCAGCAATTATTATTAAATAC	26
9	TACCTGCCACAGTAGATGCTCAG	23	AATAGGAAAATACCAGCTTCATAGA	25
10	TAAGATTGGTCAGCTTTCTGTAATC	25	ACAGTACTGTATCTACCCACTCTC	24
12	CCAGTCCTGCCAATGAGAAGAAA	23	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT	21
13	CATTTAATGGAAAGCTTCTCAAAG	24	AAATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC	23
14	ATTCTAACCTGAATTATCACTATCA	25	AAAGTGATAAATGCCTGTATGCAAA	26
15	TGGCTGCCCAGCAAGTAGT	19	AACCAGAATATCTTTATGTAGGA	23
16.1	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	22	ATTGCATTATACCCAGCAGT	20
16.2	AAAGTTCCCAATTGAAAGT	20	AAAACCTTTCCAGAATGTTGT	22
17	GTGTAGAACGTGCAGGATTG	20	TCGCCTCATGTGGTTTTA	18
18	GAGGCTCTTTAGCTTCTTAGG	21	AAAGAGACCCATTTTCCCAGCA	22
19	CTGTCATTCTTCTGTGCTC	20	CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC	21
20	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	20	GGGAATCCAAATTACACAGC	20
21	AAGCTCTTCTTTTGAAAGTC	22	GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT	22
22	TCCCATTGAGAGGTCTTGCT	20	GAGAAGACTTCTGAGGCTAC	20
23	CAGAGCAAGACCCTGTCTC	19	ACTGTGCTACTCAAGCACCA	20
24	ATGAATTGACACTAATCTCTGC	22	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA	22
11.1	GATTTCCACCTCCAAGGTGTATGA	24	GGGAGTCCGCCTATCATTACAT	22
11.2	ACAGCCTGGCTTAGCAAGGAG	21	ATGAGGATCACTGGCCAGTAAGTC	24
11.3	TGTATTGGACGTTCTAAATGAGGT	24	TGTGGCTCAGTAACAAATGCTCC	23
11.4	AGAGTTCACCTCAAATCAGTAGAGAG	26	TCTATTGGGTTAGGATTTTCTCA	24
11.5	CAAACGGAGCAGAATGGTCA	20	GCCTGGTAGAAGACTTCCTCCTC	23
11.6	ACAATTCAAAAGCACCTAAAAAG	23	CTCTGGGAAAGTATCGCTGTCAT	23
11.7	GCAACTGGAGCCAAGAAGAGTAAC	24	TTTTGCCTTCCCTAGAGTGCTAAC	24
11.8	TATGGCACTCAGGAAAGTATCTCG	24	GCGCTTTGAAACCTTGAATGTAT	23
11.9	ACAGTCGGGAAACAAGCATAGAA	23	TTTGGCATTATCAACTGGCTTATC	24
11.10	AGGCTTTCCTGTGGTTGGT	19	ACTGGAGCCCACTTCATTAGTAC	23
11.11	CCAAGTACAGTGAGCACAATTA	22	AGATGCATGACTACTTCCCATAGG	24
11.12	TCCTGGAAGTAATTGTAAGCATCC	24	GGCCCCTCTTCGGTAACC	18
11.13.1	TCCTAGCCCTTTCACCCATACA	22	AGATGCCTTTGCCAATATTACCTG	24
11.13.2	TGCTACCGAGTGTCTGTCTAA	21	AGAAAGGATCCTGGGTGTTTGTAT	24
11.14	GCTAGCTTGTTTTCTTCACAGTGC	24	AAATGTGCTCCAAAAGCATAAA	23

Mit Hilfe des Programms http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3 WWW_RESULTS.cgi wurden für Exon 7, 15 und 16 neue Primer designed, die PCR etabliert und mit dem Kollektiv 1 durchgeführt, um die Fragmentlängen zu optimieren.

2.3.3 cDNA-Synthese aus sporadischen Tumoren und Normalgewebe

2.3.3.1 Material für die Synthese

- 10 x PCR-Reaktionspuffer (Fa. Pharmacia)
 - 500 mM KCl
 - 15 mM MgCl₂
 - 100 mM Tris/HCl, pH 9,0
- 125 mM MgCl₂
- je 20 mM Nukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 0,4 M DTT
- Random-Primer
- 2,91 mg/ml BSA
- RNAsin (Promega)
- Reverse Transkriptase (Pharmacia, Biotech)

2.3.3.2 cDNA-Synthese

5 µg RNA wurden in sterile Eppendorfcups gegeben, 5 min bei 90°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Im Anschluß wurden die Reagenzien in einem 20 µl-Ansatz pipettiert, fehlendes Volumen durch Aqua dest. (DEPC behandelt) ersetzt und die Reaktionsansätze in einem Thermo-Cycler (Hybaid, MWG Biotech) 10 min bei 27°C und 45 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 5 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

Die synthetisierte cDNA wurde mittels einer β -Actin-PCR (siehe 2.3.3.3) auf Kontamination mit genomischer DNA hin untersucht. Die Primer wurden so gewählt, dass genomische DNA aufgrund der zusätzlichen Intronsequenzen mit 652 bp ein größeres Fragment bei der Synthese ergab, als das c-DNA-Fragment (446 bp).

2.3.3.3 β -Actin-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Auch hier wurden zwei Mastermixe verwendet, die Ansätze mit je 2 Tropfen Mineralöl überschichtet und der Polymerase-Mastermix erst am Ende der Denaturierungsphase zugegeben.

In einen 50 µl-Ansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

Mastermix:		TAQ-Mastermix:	
Aqua dest.	28,5 µl	Aqua dest	4,1 µl
10 x Puffer	4,5 µl	10 x Puffer	0,5 µl
dNTP	3,0 µl	Taq	0,4 µl
5`Primer	4,0 µl		
3`Primer	4,0 µl		
+c-DNA	1,0 µl		

Tab.2.4: Primer und Bedingungen für die β -Actin-PCR

Sequenzierprimer	Sequenz	Sequenzierbedingungen
β -Actin, universal	5`-AGAGATGGCCACGGCTGCTT	94°C - 10 min - 1 Zyklus
		94°C - 1 min - 35 Zyklen
β -Actin, reversal	3`-ATTTGCGGTGGACGATGGAG	62°C - 1 min - 35 Zyklen
		72°C - 1 min - 35 Zyklen
		72°C - 8 min - 1 Zyklus

2.3.3.4 Exon 13 PCR

Diese spezielle PCR wurde durchgeführt, da im Exon 13 der Polymorphismus 4427 T/C liegt, welcher zum Cluster bei familiären Tumoren (siehe Punkt 1.4) gehört.

Die Durchführung erfolgte analog zu Punkt 2.3.2.2.

Mastermix:		TAQ-Mastermix:	
Aqua dest.	29,0 µl	Aqua dest.	4,1 µl
10 x Puffer	4,5 µl	10 x Puffer	0,5 µl
dNTP	2,5 µl	Taq	0,4 µl
5`Primer	4,0 µl		
3`Primer	4,0 µl		
+c-DNA	1,0 µl		

Tab. 2.5: Primer für die Exon 13 PCR

Sequenzierprimer	Sequenz
Exon 13 (DNA)	5`CATTTAATGGAAAGCTTCTCAAAG
	3`AAATGTTGGAGCTA
Exon 13 (cDNA)	5`GCATCTGGGTGTGAGAGTGA
	3`CTTCCACTCCTGGTTCTTT

Die PCR-Bedingungen für die Exon 13 PCR wurden wie folgt gewählt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	10 min	1
94°C	30 sek	35
57°C	30 sek	
72°C	1 min	
72°C	8 min	1

2.3.4 Gelelektrophorese

2.3.4.1 Allgemeines Material für die Elektrophorese:

- 1 x TBE
 - 0,2 M Tris
 - 0,17 M Borsäure
 - 2 mM EDTA, pH 8,0
- Bindsilan
 - 4 ml Ethanol absolut
 - 15 µl Bindsilan (Pharmacia)
 - 1 ml 10% Essigsäure
- Gellösung für ALF-Gele:
 - 25,2 g Harnstoff
 - 9 ml Monomerenlösung (40%)
 - 25,5 ml Aqua dest.
 - 1 Löffel Amberlite
 - 6 ml 6 x TBE
 - 0,2 ml 10% APS
 - 40 µl Temed
- Monomerenlösung (19:1)
 - 19% Acrylamid
 - 1% N,N-Methylen-bisacrylamid
- Monomerenlösung (29:1)
 - 29% Acrylamid
 - 1% N,N-Methylen-bisacrylamid
- Agarose, Gibco
- 1 Kb DNA-Leiter (Gibco)
- Ethidiumbromid (10 µg/ml)
- Amberlite (Pharmacia)
- Temed (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin)

- 10% APS (Ammoniumpersulfat) in Aqua dest.
- Agarose-Gelkammern (Horizon 11.14 Gibco)
- Transluminator (Fa. Faust)

2.3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 1,5% ige Agarose-Gele verwendet. Hierzu wurde die Agarose mit TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war und nach Abkühlung auf ca. 50°C in die abgedichtete Apparatur gegossen. Anschließend wurde nach Erstarren des Gels die Elektrophoresekammer mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer aufgefüllt und jeweils 5,5 µl Probe, die vermischt wurde mit 5,5 µl Probenauftragspuffer, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V und mit der 1 kb-DNA-Leiter bzw. der Smart Ladder (EURO GENTEK) als Längenstandard durchgeführt. Zur Detektion der PCR-Produkte wurde das Gel 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert, auf einen Transiluminator (Anregungswellenlänge 302 nm) gelegt und photographiert.

2.3.4.3 Fragment-Analyse mittels automatischem DNA-Sequencer

Für die Sequenzierung des BRCA1-Gens wurde der DNA-Sequencer A.L.F.-Express (Pharmacia) eingesetzt. Die Technik basiert auf der elektrophoretischen Auftrennung fluoreszenzmarkierter (Cy5-Markierung) PCR- oder Sequenzier-Produkte in einem Polyacrylamid-Gel. Ein Laserstrahl (Helium-Neon-Laser, $\lambda=632,8$ nm) im unteren Drittel der Gelkammer regt die markierten Fragmente zur Fluoreszenz an, deren Intensität dann durch Photodioden gemessen wird. Streulicht und Hintergrundstrahlung wurden mit den den Detektoren vorgelagerten Filtern eliminiert. Das Meßergebnis wurde durch spezielle Software (ALFWIN, Fragment Analyser) entweder in Form eines Bandenmusters oder als Kurvendiagramm dargestellt. Dabei wurde auf der Ordinate die gemessene Intensität, die der Produktmenge eines Fragmentes proportional ist, und auf der Abszisse die Laufzeit dargestellt.

Für die Monomerenlösung wurden 25,2 g Harnstoff, 25,5 ml Aqua dest., 9 ml Acrylamid/bis-Acrylamid (19:1 für Sequenzanalysen, 29:1 für Fragmentanalysen) und ein Löffel Amberlite 5 min gemischt. Durch Filtration wurde das Amberlite abgetrennt und die Gellösung zusammen mit 6 ml 6 x TBE für 5 min entgast. Nach Zugabe von 200 µl APS (10%ig) und 40 µl TEMED wurde die Lösung sofort zwischen zwei Glasplatten, davon eine Thermoplatte, über die das Gel temperiert wird, gegossen. Die Platten wurden zuvor mit Leitungswasser und Aqua dest. gereinigt und anschließend mit absolutem Ethanol entfettet. Zur Stabilisierung der Gelmatrix im Bereich der Gelauftragstaschen wurden die Glasplatten in diesem Bereich mit Bindsilan behandelt und dann, durch 0,5 mm dicke Spacer getrennt, zusammengesetzt.

Die Proben wurden vor dem Gelauftrag 5 min bei 95°C denaturiert und 3 min auf Eis abgekühlt.

Laufbedingung:	Sequenzieranalysen:	Fragmentanalysen:
Max. Spannung:	1500 Volt	1500 Volt
Max. Strom:	34 mA	34 mA
Max. Leistung:	30 W	38 W
Temperatur:	50°C	40°C
Laufpuffer:	0,6 x TBE	0,6 x TBE
Laufzeit:	max. 400 min	max. 250 min

2.3.5 Sequenzierung von PCR-Produkten für die BRCA1-Mutationsanalyse (Kollektiv 1)

2.3.5.1 Material für die Sequenzierung

- Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Fa. Amersham, Braunschweig)
- Sequenzierprimer (Sequenzen siehe Tabelle 2.6)
- MicroSpin S-400 (für PCR-Fragmente >200 bp)
- Mineralöl

2.3.5.2 Sequenzierung mit der Thermo-Sequenase

Zunächst wurden die PCR-Produkte mit Hilfe von MikroSpin-Säulen aufgereinigt. Hierzu wurden die MikroSpin-Säulen abzentrifugiert (1 min, 3000 rpm), das PCR-Produkt auf die Säule aufgetragen und erneut zentrifugiert (3 min, 3000 rpm).

Die Sequenzierreaktion erfolgte in 4 PCR-Cups pro Probe (je ein Cup für die Base Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) und war wie folgt zusammengesetzt:

- 5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- + 1 µl Sequenzierprimer (1 pMol/µl)
- + 2 µl Reaktionsmix (ddATP, ddCTP, ddGTP, oder ddTTP)

8 µl Gesamtvolumen

Da die Sequenzierreaktion mit Hilfe des A.L.F.-Express-Sequenzers detektiert wurde, wurde ein Cy5 markierter Sequenzierprimer verwendet. Die Reaktion wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, für 5 min bei 95°C denaturiert und, wie in Tabelle 2.6 angegeben, sequenziert.

Tab. 2.6: Primer und Bedingungen für die Sequenzierung mit der Thermosequenzase

Sequenzierprimer	Sequenz in 5'-3-Richtung	Sequenzierbedingungen
BRCA1 universal	*CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	95°C – 5 min 60°C – 30 sek 30 Zyklen 95°C – 30 sek 30 Zyklen
BRCA1 reversal	*CAGGAAACAGCTATGAC	95°C – 5 min 55°C – 30 sek 30 Zyklen 95°C – 30 sek 30 Zyklen

Die mit einem „*“ gekennzeichneten Primer waren mit CY5 markiert.

Die Sequenzierreaktion wurde durch die Zugabe von 5 µl Stopplösung abgebrochen und anschließend sorgfältig vom Mineralöl abgetrennt. Die Auftragung und Detektion mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers erfolgte wie unter 2.3.4.3 beschrieben.

2.3.6 LOH-Analyse auf dem Chromosom 17q21 bei sporadischen Tumoren und Normalgewebe (Kollektiv 2) (Anderson et al., 1993; Goldgar, 1994)

Für die LOH-Analyse wurden jeweils Tumor- und das entsprechende Normalgewebe von 53 Patientinnen mit insgesamt 3 intragenischen, polymorphen Mikrosatellitenmarkern, die im Bereich des BRCA1-Gens liegen, untersucht.

Es handelt sich hierbei um kurze, repetitive Sequenzen, wie z.B. Dinucleotid- (-CA-) oder Hexanucleotid- (-AAAAT-) Wiederholungen, die in unterschiedlich großen Wiederholungseinheiten überall im Genom verteilt, vorliegen. Mit den in Tabelle 2.7 beschriebenen Primern wurden die Mikrosatellitenpolymorphismen amplifiziert. Die PCR-Bedingungen sind in der Tabelle 2.8 aufgeführt. Die Detektion der PCR-Produkte und die quantitative Bestimmung der Produktmengen erfolgte mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers und der Fragment Manager Software (Fa.Pharmacia).

Die Analyse des Normalgewebes zeigte, ob eine Probe bezüglich des untersuchten Mikrosatellitenpolymorphismus informativ (heterozygot) oder nicht informativ (homozygot) ist. DNA-Proben mit der gleichen Zahl von Wiederholungseinheiten auf beiden Chromosomen sind homozygot bezüglich des untersuchten Markers, sie zeigen nur ein PCR-Fragment. Ein möglicher Allelverlust kann nicht nachgewiesen werden. In Proben, die heterozygot bezüglich des Mikrosatellitenpolymorphismus sind, entstehen dagegen in der PCR zwei Fragmente, da die unterschiedlichen Wiederholungseinheiten auf den beiden Allelen in der PCR Fragmente unterschiedlicher Länge ergeben. Bei den heterozygoten Fällen wurde eine mögliche Signalreduktion durch den Vergleich der Tumor-DNA mit der Normal-DNA ermittelt.

Das Verhältnis der Peakflächen der beiden Allele wurde sowohl für das Normal- als auch für das Tumorgewebe ((Ratio (normal) und Ratio (Tumor)) bestimmt. Das Allelverhältnis Q wurde aus dem Verhältnis von Ratio (Tumor) zu Ratio (normal) errechnet.

$$Q_N = N_1/N_2$$

N1: Peakfläche der Allelprodukte kleinerer Fragmentlänge der Normal-DNA

N2: Peakfläche der Allelprodukte größerer Fragmentlänge der Normal-DNA

$$Q_T = T_1/T_2$$

T₁: Peakfläche der Allelprodukte kleinerer Fragmentlänge der Tumor-DNA

T₂: Peakfläche der Allelprodukte größerer Fragmentlänge der Tumor-DNA

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

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

Tab. 2.7 : Primer für die LOH-Analyse

Primer	Sequenz	Fragmentlänge	Referenz
D17S855 Intron 20	5`-GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG-3`* 5`-ACACAGACTTGTCCCTACTGCC-3`	139-155	Andersen et al., 1993
D17S1322 Intron 19	5`-CTAGCCTGGGCAACAAACGA-3`* 5`-GCAGGAAGCAGGAATGGAAC-3`	ab 130	Goldgar et al., 1994
D17S1323 Intron 12	5`-TAGGAGATGGATTATTGGTG-3`* 5`-AAGCAACTTTGCAATGAGTG-3`	ab 155	Goldgar et al., 1994

Die mit einem „*“ gekennzeichneten Primer waren am 5`-Ende CY5 markiert, um die PCR-Produkte in der Analyse mittels des automatischen A.L.F.-Sequenzers detektieren zu können.

Tab.2.8 : PCR-Bedingungen für die LOH-Analyse

Primer	Reagenzien	Reaktionsansatz (Endkonzentration)	PCR-Bedingungen
D17S855	Aqua dest. 10 x Puffer dNTP 5`Primer 3`Primer DNA	25,0 µl 4,5 µl (1 x) 2,5 µl (125 µM) 4,0 µl (40 pmol) 4,0 µl (40pmol) 5 µl (50 ng)	94°C – 10 min 94°C – 1min 30 Zyklen 55°C – 1 min 30 Zyklen 72°C – 1 min 30 Zyklen 72°C – 8 min
D17S1322	Aqua dest. 10 x Puffer dNTP 5`Primer 3`Primer DNA	25,0 µl 4,5 µl (1 x) 2,5 µl (125 µM) 4,0 µl (40 pmol) 4,0 µl (40pmol) 5 µl (50 ng)	94°C – 10 min 94°C – 1 min 27 Zyklen 58°C – 1 min 27 Zyklen 72°C – 1 min 27 Zyklen 72°C – 8 min
D17S1323	Aqua dest. 10 x Puffer dNTP 5`Primer 3`Primer DNA	25,0 µl 4,5 µl (1 x) 2,5 µl (125 µM) 4,0 µl (40 pmol) 4,0 µl (40pmol) 5 µl (50 ng)	94°C – 10 min 94°C – 1min 30 Zyklen 55°C – 1 min 30 Zyklen 72°C – 1 min 30 Zyklen 72°C – 8 min

Alle Ansätze wurden durch Zugabe von 5 µl Taq-Mastermix (0,4 µl Taq, 0,5 µl 10 x Puffer, 4,1 µl Aqua dest.) gegen Ende der Denaturierungsphase gestartet.

2.3.7 Restriktion mit Ear1, zum Nachweis des Polymorphismus 4427 T/C im Exon 13 und somit des Vorhandenseins des Clusters (Kollektiv 2)

Die Restriktion wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt. Hierzu wurden 0,25 µl entspricht 2,5 U/Ansatz (10 U/µl) Ear1 (Bio Labs), 2,0 µl Puffer (NEBuffer1, Bio Labs) und 17,75 µl DNA (bzw. DNA+Aqua dest.) in ein Eppendorf-Cup gegeben, abzentrifugiert und 2-3 Stunden im Thermoblock bei 37°C verdaut. Beim anschließenden Auftrag auf das Agarose-Gel zeigten sich folgende Bandenmuster: wird nur der Wildtyp exprimiert entstehen zwei Banden von 250 und 150 bp Länge, wird nur der Polymorphismus exprimiert entsteht eine Bande von 400 bp Länge und wird beides exprimiert, entstehen sowohl die zwei Banden des Wildtyps als auch die des Polymorphismus.

3. Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse des BRCA1-Gens in Hochrisikofamilien (Kollektiv 1)

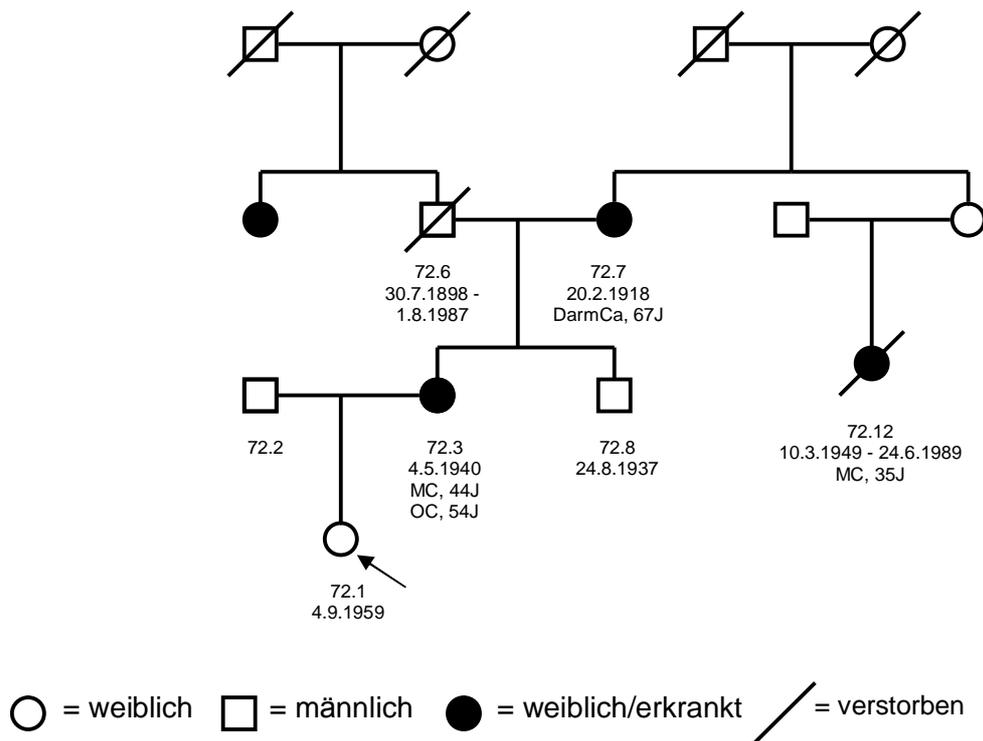
3.1.1 Analysendifferenzierung mit Stammbaumdarstellungen

Eine genetische Analyse wurde bei 10 Hochrisikofamilien durchgeführt, die die Einschlußkriterien der deutschen Krebshilfe erfüllten (siehe Punkt 2.1). Eine Übersicht über die Erkrankungen in den untersuchten Familien ist in der Tabelle 2.1 dargestellt.

Unterschieden wird zwischen einer prädiktiven Analyse und einer Analyse der Betroffenen. Unter einer prädiktiven Analyse versteht man den Mutationsnachweis in der Familie, d. h. untersucht wird zunächst ein Familienmitglied, das gemäß des Stammbaumes bei einer BRCA1-Keimbahnmutation Mutationsträger sein müsste. Zeigt sich bei der sogenannten Indexpatientin eine Mutation, erfolgt die genetische Analyse bei der ratsuchenden Person.

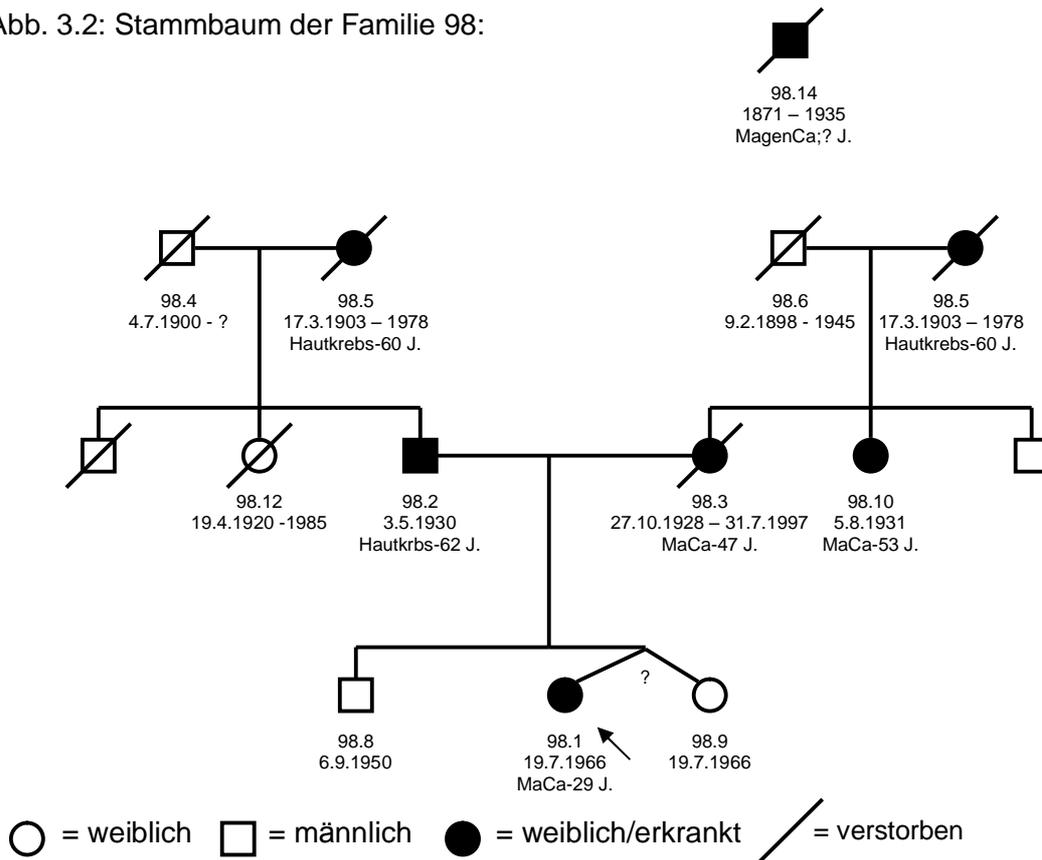
Die Abbildung 3.1 zeigt anhand des Stammbaums der Familie 72 hierfür ein Beispiel. Die Ratsuchende ist nicht erkrankt und die Analyse wurde daher bei ihrer Mutter durchgeführt, die im Alter von 44 Jahren an einem Mamma- und im Alter von 54 Jahren an einem Ovarialkarzinom erkrankt ist. Auch die Cousine ihrer Mutter ist mit 35 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankt. Weiterhin sind Darmkarzinome in der Familie vorgekommen. Die Mutationsanalyse der Mutter (72.3) der Ratsuchenden ergab eine Frameshift Mutation. Die Karzinomerkrankungen der Familie 72 sind hochwahrscheinlich BRCA1 assoziiert.

Abb. 3.1: Stammbaum der Familie 72:



Hingegen wurde bei der Familie 98 die Analyse direkt bei der Ratsuchenden 98.1 durchgeführt, die selbst im Alter von 29 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankt war (Abbildung 3.2). Es wurde keine Mutation nachgewiesen.

Abb. 3.2: Stammbaum der Familie 98:



Bei einem Mutationsnachweis werden zum einen zur Bestätigung des Ergebnisses weitere Familienmitglieder untersucht, zum anderen wird von der Betroffenen erneut eine Blutprobe angefordert, um das Ergebnis zu sichern.

3.1.2 Sequenzpolymorphismen und Sequenzierergebnisse

Die direkte DNA-Sequenzierung des BRCA1-Gens gilt als der Gold-Standard der genetischen Analyse-Methoden mit der höchsten Sensitivität. Beispiele hierfür sind in den Abbildungen 3.3 und 3.4 dargestellt. Die obere Kurve zeigt jeweils eine Wildtyp-Sequenz. In der Abbildung 3.3 sind in der unteren Sequenz an den Markierungen 43 und 48 heterozygote Polymorphismen (entsprechende Markierungen im Wildtyp: 25 und 30) der Familie 98.1 dargestellt. Die Abbildung 3.4 zeigt eine Frameshift-Mutation an der Markierung 45 (entsprechende Markierung im Wildtyp: 45) der Familie 72. Die Keimbahnmutation ist lokalisiert im Exon 11 an Position 3228. Das weitere Ablesen der Sequenz ist nicht mehr möglich und es resultiert ein verkürztes Protein. Die Karzinomerkrankungen in der Familie 72 sind also hochwahrscheinlich BRCA1 assoziiert.

Abb. 3.3: Dargestellt ist im Vergleich ein Wildtyp (obere Sequenz) und ein heterozygoter Polymorphismus (untere Sequenz)

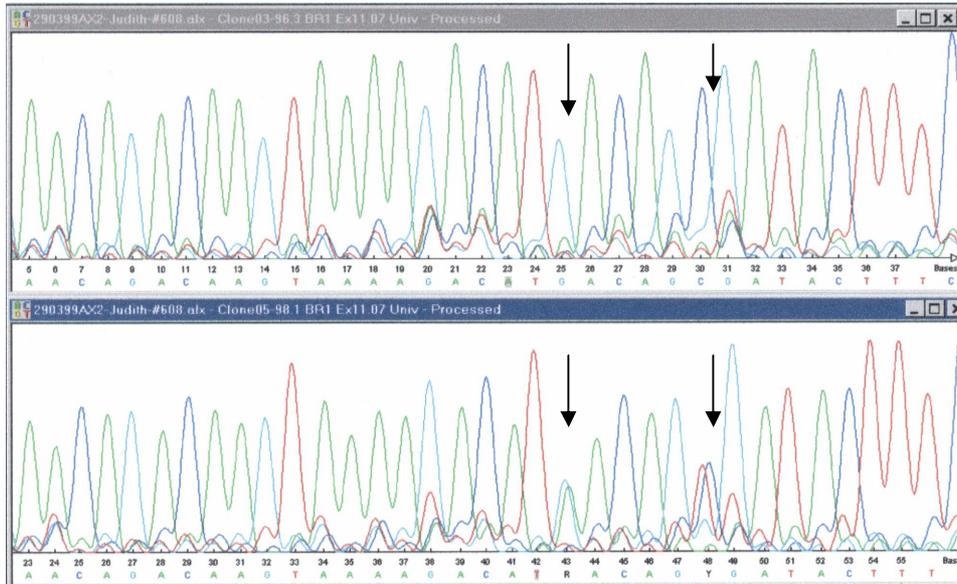


Abb. 3.4: Dargestellt ist im Vergleich ein Wildtyp (obere Sequenz) und eine Frameshift Mutation (untere Sequenz)

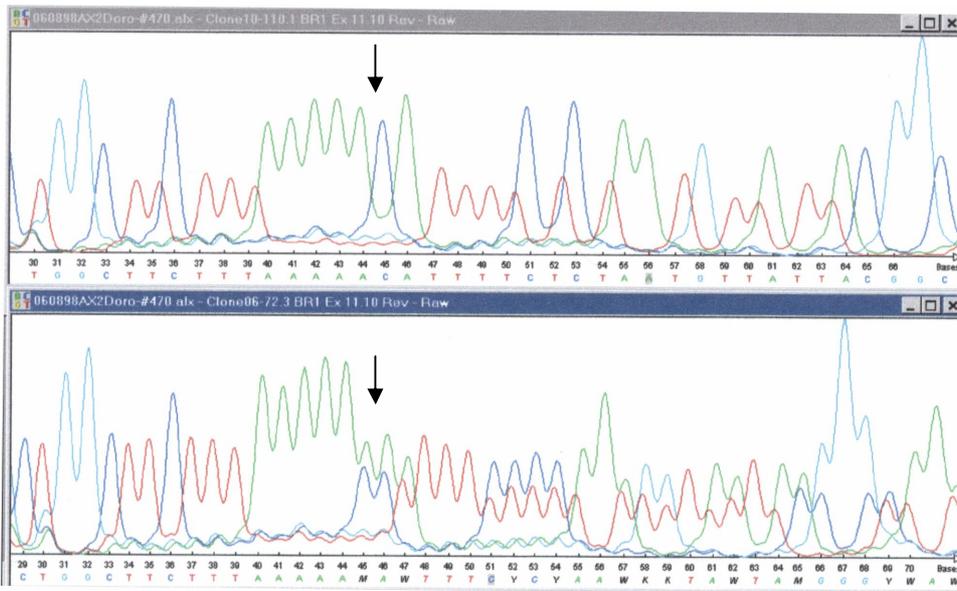
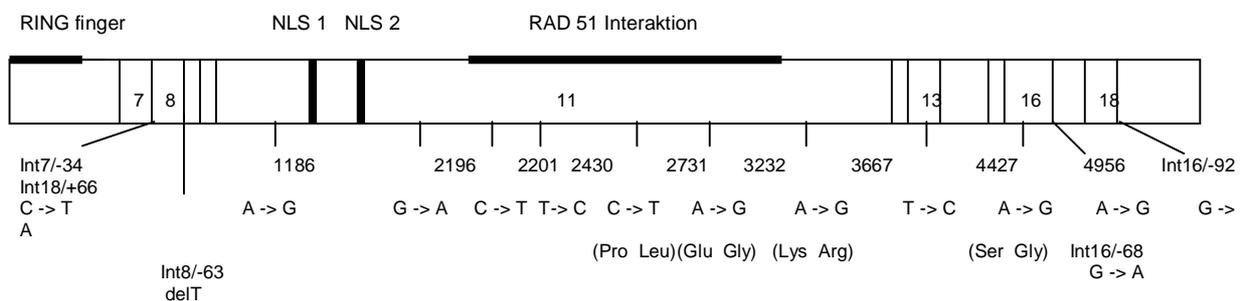


Abb. 3.5: Polymorphismencluster des BRCA1-Gens



Bei 6 der 10 untersuchten Familien wurden Polymorphismen gefunden, denen bis heute noch keine Funktion zugesprochen wird, obwohl sie z. T. einen Aminosäureaustausch bewirken. Es zeigte sich jedoch als Besonderheit, dass bestimmte Polymorphismen in einem Cluster auftreten. Dieses umfasst die Polymorphismen von C2201T in Exon 11 bis Intron 16 –68 G/A (Abb. 3.5). Diese 9 Polymorphismen zeigen das gleiche Verteilungsmuster. Ist eine Patientin für einen dieser Polymorphismen homozygot WT bzw. heterozygot, so ist sie es auch für jeden anderen Polymorphismus dieses Clusters (siehe Punkt 1.4). Vier dieser Polymorphismen haben einen Aminosäureaustausch zur Folge: C2731T (Pro→Leu), A3232G (Glu→Gly), A3667G (Lys→Arg) und A4956G (Ser→Gly). Zwei dieser Polymorphismen, C2731T und A3232G liegen in dem Bereich von Exon 11, in dem sich die Interaktionsstelle zu RAD51 (AS 758-1064) befindet. Nicht unmittelbar betroffen sind die ebenfalls im Exon 11 lokalisierten Kernlokalisierungssignale NLS1 (AS 501-507) und NLS2 (AS 607-614).

Tab. 3.1: Sequenzpolymorphismen im BRCA1-Gen (Polymorphismencluster grau schattiert)

Exon/Intron	Lokalisation in bp	Codon	Art	Allele	AS	Anzahl (Kollektiv 1)
Intron 7	-34	-	C->T	WT	-	2
Intron 8	-63	-	delT	WT	-	3
Exon 11	1186	356	A->G	WT	Gln/Arg	0
Exon 11	2196	693	G->A	WT	Asp/Asn	1
Exon 11	2201	694	C->T	WT	Ser/Ser	4
Exon 11	2430	771	T->C	WT	Leu/Leu	4
Exon 11	2731	871	C->T	WT	Pro/Leu	4
Exon 11	3232	1038	A->G	WT	Glu/Gly	4
Exon 11	3667	1183	A->G	WT	Lys/Arg	4
Exon 13	4427	1436	T->C	WT	Ser/Ser	4
Exon 16	4956	1613	A->G	WT	Ser/Gly	4
Intron 16	-92	-	A->G	WT	-	4
Intron 16	-68	-	A->G	WT	-	3
Exon 11	3238	1040	G->A	WT	Ser/Asn	0
Intron 12	+20	-	delGT	WT	-	0
Intron 12	-25	-	T->C	WT	-	1
Exon 18	+66	-	G->A	WT	-	3

Unspezifische Varianten

Exon/Intron	Lokalisation	Codon	Art	Allele	AS	Anzahl (Kollektiv 1)
Exon 16	5075	1652	G->A	WT	Met/Ile	0

Tab. 3.2: Ergebnisse der Sequenzierung bei den 10 Hochrisikofamilien (Polymorphismen-cluster grau schattiert)

Familie	57C	70.8	72.3	82.10	83.12	95.9	96.3	98.1	99.15	102.3
Mutation	-	-	Ex11/ 3228	-	-	-	-	-	-	-
Int7/-34 C/T	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T
Int8/-63 delT	WT	WT	WT	delT	WT	WT	WT	delT	delT	WT
Ex11/1186 A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Ex11/2196 G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G
Ex11/2201 C/T	C/C	C/C	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C	C/T	C/T	C/C
Ex11/2430 T/C	T/T	T/T	T/T	T/C	C/C	T/T	T/T	T/C	T/C	T/T
Ex11/2731 C/T	C/C	C/C	C/C	C/T	T/T	C/C	C/C	C/T	C/T	C/C
Ex11/3232 A/G	A/A	A/A	A/A	A/G	G/G	A/A	A/A	A/G	A/G	A/A
Ex11/3667 A/G	A/A	A/A	A/A	A/G	G/G	A/A	A/A	A/G	A/G	A/A
Ex13/4427 T/C	T/T	T/T	T/T	T/C	C/C	T/T	T/T	T/C	T/C	T/T
Ex16/4956 A/G	A/A	A/A	A/A	A/G	G/G	A/A	A/A	A/G	A/G	A/A
Int16/-92 A/G	A/A	A/A	G/G	A/A	G/G	A/A	A/A	A/G	A/G	n.b.
Int16/-68 A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	A/A	A/A	A/G	A/G	n.b.
Ex11/3238 G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
Int12/+20 delGT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Int12/-25 T/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
Ex16/5075 G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
Ex18/+66 G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	G/A	G/A	G/G

Ein homozygoter WT fand sich in den Familien 57C, 70.8, 95.9 und 96.3. Heterozygote Polymorphismen ließen sich in den Familien 82.10, 98.1 und 99.15 und ein homozygoter Polymorphismus in Familie 83.12 nachweisen. Nur jeweils 1 Polymorphismus wurde in den Familien 72.3 (homozygot) und 102.3 (heterozygot) nachgewiesen (Tabellen 3.1 und 3.2).

In der Tabelle 3.1 sind die Sequenzierpolymorphismen im BRCA1-Gen beschrieben und die Häufigkeit des Vorkommens in den untersuchten Familien ist aufgeführt. Eine genaue Auflistung der gefundenen Mutation und Polymorphismen zeigen die Sequenziererergebnisse der Tabelle 3.2.

3.2 LOH-Analyse des BRCA1-Gens in sporadischen Mammakarzinomen (Kollektiv 2)

3.2.1 LOH-Analyse

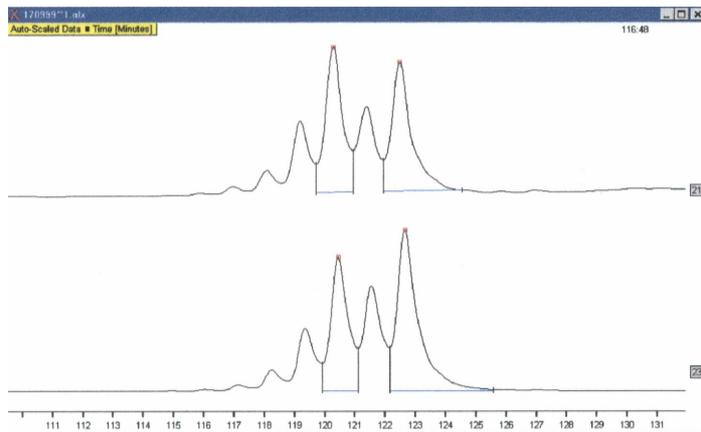
Polymorphe Markersequenzen treten in homologen Chromosomen des humanen Genoms auf und liegen bei einem Großteil der Individuen heterozygot vor. Ein LOH bedeutet den Verlust eines der beiden Allele des polymorphen Markers. Für die LOH-Analyse des BRCA1-Gens wurden jeweils Normal- und Tumorgewebe mit den 3 intragenischen, polymorphen Markern (D17S855, D17S1322, D17S1323) untersucht.

Hierzu wurde die DNA mittels PCR amplifiziert und anschließend mit dem A.L.F.-Sequencer elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe der Fragment Manager Software erhält man eine graphische Darstellung in Form von Fluorogrammen. Auf der Abzisse wird die Laufzeit der PCR-Fragmente pro Minute bzw. die Fragmentgröße in Basenpaaren angegeben. Die Ordinate zeigt die Fluoreszenzintensität, die von der Menge des PCR-Produktes abhängig ist und die Peakfläche bestimmt. Dabei ist das Integral der Peakfläche direkt proportional zu der Menge des gebildeten PCR-Produktes. Die Banden mit der größten Signalintensität stellen die Allele des Gens dar, während die vorhergehenden, um ein Dinukleotid-(CA-)Repeat verkürzten Banden geringerer Signalintensität, sogenannte Stotterpeaks sind. Sie entstehen als Artefakte bei der PCR durch die Taq-Polymerase und können vernachlässigt werden.

Abb. 3.6, 3.7 und 3.8 zeigen Beispiele für eine homozygote, d. h. nicht informative Probe, sowie zwei informative Proben mit und ohne Allelverlust am Beispiel des Markers D17S855. Das Probenkollektiv wurde mit Hilfe dreier intragenischer Mikrosatellitenmarker untersucht, deren Bedingungen und Cut-off-Werte bereits etabliert wurden. Die Marker D17S855, D17S1322 und D17S1323 liegen im BRCA1-Gen in den Intronbereichen 20, 19 und 12. Die LOH-Daten sind in den Tabellen 3.4 und 7.2 zusammengefasst. Ein Allelverlust konnte in 16 der 53 untersuchten sporadischen Mammakarzinome nachgewiesen werden, wobei ein LOH als eine Reduktion der Signalintensität eines der beiden Allele um mehr als 40 % gegenüber dem anderen Allelfragment definiert wurde. Das heißt, dass die Ratio (QT:QN siehe Punkt 2.3.6) kleiner als 0,6 sein muß, um als LOH gewertet werden zu können. In Fällen, in denen die Ratio größer als 1 ist, wird der reziproke Wert berechnet, um Werte zwischen 0 und 1 zu erhalten (Niederacher et al., 1997).

In der Abbildung 3.6 sind sowohl in der Normal- als auch in der Tumor-DNA zwei große Signalbandenintensitäten zu erkennen. Sie entsprechen den beiden verschiedenen langen Allelen des polymorphen Markers. Aufgrund der nahezu identischen Fluorogramme der Normal- und Tumor-DNA liegt hier ein heterozygoter (informativer) Fall vor.

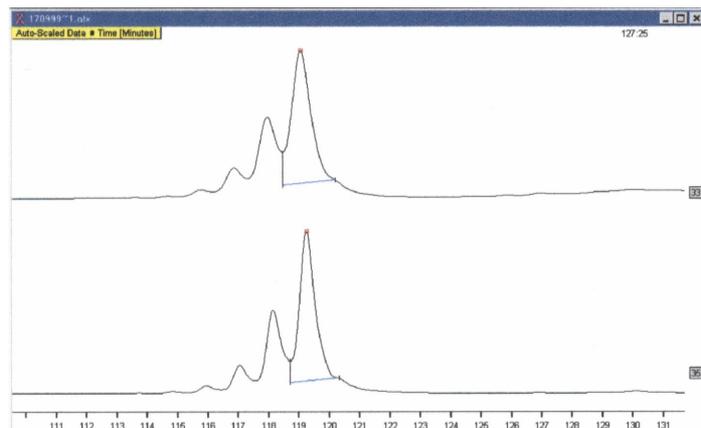
Abb. 3.6: Fluorogramm eines heterozygoten (informativen) Falles für D17S855
(A.L.F.-Ausdruck)



(Spur 21: DNA des Normalgewebes (354N); Spur 23: DNA des Tumorgewebes (354T);
Abzisse: Laufzeit des PCR-Fragmentes pro Minute)

Bei Homozygotie einer Patientin zeigt sich sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe nur ein Peak, da in diesem Fall identische Allele vorliegen. Die Probe ist nicht informativ, da nach der PCR-Amplifikation nur ein PCR-Produkt aufgrund der gleichen Anzahl von Mikrosatellitenwiederholungen auf beiden Chromosomen entsteht

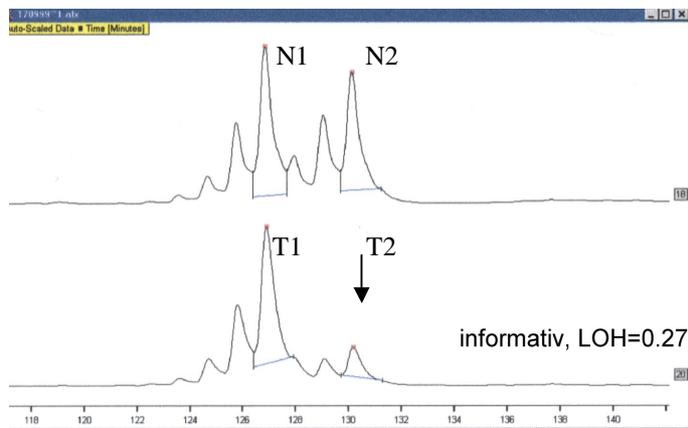
Abb. 3.7: Fluorogramm eines homozygoten (nicht informativen) Falles für D17S855
(A.L.F.-Ausdruck)



(Spur 33: DNA des Normalgewebes (377N); Spur 35: DNA des Tumorgewebes (377T);
Abzisse: Laufzeit des PCR-Fragmentes pro Minute)

Zeigen sich in der DNA des Normalgewebes zwei Banden mit hoher Signalintensität, während in der entsprechenden Tumor-DNA das Signal an einer Stelle weitgehend reduziert ist, so liegt ein LOH vor. Bei der Normalgewebprobe werden zwei Allele dargestellt, wohingegen in der Tumorprobe ein Allel verlorengegangen ist.

Abb. 3.8: Fluorogramm eines LOH für D17S855 (A.L.F.-Ausdruck)



(Spur 18: DNA des Normalgewebes (382N); Spur 20: DNA des Tumorgewebes (382T);
Abzisse: Laufzeit des PCR-Fragmentes pro Minute)

Tab 3.3: Auswertung LOH des Tumors 382

Allelbezeichnung	Run Time	Peak Height	Peak Area
N1	126,50	29,8	1060
N2	130,06	23,5	803
T1	126,52	28,7	1001
T2	130,10	6,2	208

$$QN = 1060:803=1,32$$

$$QT = 1001:208=4,8$$

$$\text{Ratio QT:QN} = 4,8:1,32=3,64$$

$$1/\text{Ratio} = 0,275$$

Der Tabelle 3.3, sowie der Rechnung, ist zu entnehmen, dass die Signalintensität des zweiten Allels der Tumor-DNA bei 130 Minuten lediglich zu 0,275 % erhalten war. Somit beträgt der Allelverlust 99,725 %. Das heißt, es handelt sich bei der Tumor-DNA 382 um ein LOH.

Die Anzahl der untersuchten Proben war stark eingeschränkt, da es sehr schwierig war, aus dem ursprünglichen Untersuchungskollektiv 2 eine große Anzahl aussagekräftiger Proben zu erhalten. Zunächst mussten Normal- und Tumorgewebe von der gleichen Patientin vorhanden sein. Weiterhin sollten die Patientinnen heterozygot für die Polymorphismen sein und keinen LOH BRCA1 haben. Es verblieben daher nur ca. 20 % des Ausgangsuntersuchungs-kollektives 2 für die Untersuchung der allelspezifischen Expression.

Tab. 3.4: Ergebnisse der LOH-Analysen mit dem Mikrosatellitenprimern D17S855, D17S1322 und D17S1323 (N.i. =nicht informativ; K.I. = Keine Information)

Kriterien		D17S855			D17S1322			D17S1323		
		N.i.	Kein LOH	LOH	N.i.	Kein LOH	LOH	N.i.	Kein LOH	LOH
Alter	<50 J.	1	13	1	12	3	0	6	7	2
	>50 J.	12	14	8	14	12	8	15	13	6
	K.I.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tumorgroße	1	3	5	2	5	2	3	7	1	2
	2	8	17	4	15	10	4	10	14	5
	3	1	2	1	2	2	1	3	1	0
	K.I.	1	3	2	4	1	1	4	1	1
Nodalstatus	Negativ	9	16	6	16	9	6	15	11	6
	Positiv	4	8	2	7	6	1	5	7	1
	K.I.	0	3	1	3	0	1	3	0	1
Metastasen	Negativ	9	15	5	13	10	6	11	11	7
	Positiv	0	1	1	2	0	0	1	1	0
	K.I.	4	11	3	11	5	2	10	7	1
Grading	1	0	4	0	2	2	0	2	2	0
	2	9	12	1	15	6	1	8	10	4
	3	3	4	5	4	3	5	6	3	3
	K.I.	1	7	3	5	4	2	5	5	1
ER (Östrogen- rezeptor)	Negativ	6	2	5	7	1	5	7	3	3
	Positiv	7	22	3	16	14	2	12	16	4
	K.I.	0	3	1	3	0	1	3	0	1
PgR (Progesteron- rezeptor)	Negativ	6	2	4	6	1	5	6	3	3
	Positiv	7	22	3	17	14	1	11	17	4
	K.I.	0	3	2	3	0	2	4	0	1

3.2.2 RFLP-Analyse von cDNA von Normalgewebe und sporadischen Mammakarzinomen (Kollektiv 2)

Bei heterozygoten Patientinnen ohne LOH wurde die allelspezifische Expression von A1 (Wildtypallel) und A2 (Allel mit Polymorphismus) untersucht. Bei heterozygoten Patientinnen mit LOH wurde untersucht, ob ein bestimmtes Allel A1 oder A2 häufiger vom LOH betroffen ist. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 3.5 und 3.6 zusammengefasst. Die Zahl der analysierten Proben ist stark reduziert, weil nicht von allen Patientinnen cDNA von Normal- und Tumorgewebe zur Verfügung stand. Es zeigte sich, dass von 10 heterozygoten Patientinnen ohne LOH 4 Patientinnen im Normalgewebe das Wildtypallel oder beide Allele exprimierten, im Tumorgewebe aber nur noch das Allel mit dem Polymorphismus. 4

Patientinnen exprimierten im Normalgewebe das Wildtypallel oder beide Allele und zeigten im Tumorgewebe das heterozygote Expressionsmuster, wobei das Signal des Allels A2 deutlich stärker war, als die Signale des Wildtypallels A1. Zwei Patientinnen zeigten sowohl im Normal-, als auch im Tumorgewebe ein heterozygotes Expressionsmuster. Um auszuschließen, dass das Signal von Allel 2 im Tumormaterial auf unvollständige Restriktion zurückzuführen ist, wurde dieses Ergebnis durch Sequenzierung einiger cDNA-Proben exemplarisch bestätigt. Bei dem Tumormaterial handelte es sich nicht um mikrodissiziertes Material, d. h. es enthält unterschiedlich große Mengen an Normalgewebe. So kann erklärt werden, warum im Tumormaterial neben dem Signal des Allels A2 auch das Signal des Wildtypallels A1 mehr oder weniger stark nachgewiesen wurde. Auffallend war, dass keine Patientin im Normalgewebe nur das Allel mit dem Polymorphismus bzw. im Tumorgewebe nur das Wildtypallel exprimierte (siehe Tab. 3.5).

Die Untersuchung der heterozygoten Patientinnen mit LOH zeigte in 2 Fällen den Verlust des Wildtypallels im Tumorgewebe und in keinem Fall den Verlust des Allels mit dem Polymorphismus. In 3 Fällen war im Tumorgewebe trotz LOH die Expression beider Allele nachweisbar (siehe Tab. 3.6). Dies kann ebenfalls auf einen Anteil von Normalgewebe im Tumormaterial zurückzuführen sein.

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

Tab. 3.5: RFLP-Analyse von cDNA (Normalgewebe und Mammakarzinom) von heterozygoten Patientinnen ohne LOH

Karzinome ohne LOH BRCA1 (n=10)	Expression in normaler cDNA	Expression in Tumor cDNA
4	Nur A1 oder A1/A2	Nur A2
4	Nur A1 oder A1/A2	Überwiegend A2
2	A1/A2	A1/A2

Tab. 3.6: RFLP-Analyse von cDNA (Normalgewebe und Mammakarzinom) von heterozygoten Patientinnen mit LOH

Karzinome mit LOH BRCA1 (n=5)	Expression in normaler cDNA	Expression in Tumor cDNA
2	A1/A2	A2
0	A1/A2	A1
3	A1/A2	A1/A2

Diskussion

Das Risiko für eine Frau in Deutschland an Brustkrebs zu erkranken, liegt bei 10-12 %. Durch molekulargenetische Untersuchungen in den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die Tumorentstehung bzw. -entwicklung auf eine Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen zurückzuführen ist (Beckmann et al., 1998). Genetische Veränderungen im Chromosom 17, auf dem u. a. das Tumorsuppressorgen BRCA1 lokalisiert ist, sind bei der Entstehung von Mammakarzinomen mitbeteiligt. In ungefähr 25 % der Erkrankungsfälle in Deutschland lässt sich ein solcher familiärer Hintergrund nachweisen. Bei den verbleibenden 75 % handelt es sich um sporadische Karzinome, deren Entstehungsätiologie noch unklar ist (Futreal et al., 1994; Fitzgerald et al., 1996; Shattuck-Eidens et al., 1995; Langston et al., 1996).

4.1 Prädiktive genetische Diagnostik des Tumorsuppressorgens BRCA1

Die Möglichkeit der Gentestung der prädisponierenden Gene BRCA1 und 2 ermöglicht es, Hochrisikopatienten/-innen zu identifizieren, die für ein strukturiertes Früherkennungsprogramm in Frage kommen.

Die Verwirklichung von informativen BRCA1 und 2 Programmen, zur Berechnung der Mutationsträgerwahrscheinlichkeit, wurde ermöglicht durch den Erwerb von populations-spezifischen genetischen Daten.

In Europa wurde eine solche umfassende Studie (> 400 Personen) nur für das BRCA 1-Gen in der niederländischen Bevölkerung durchgeführt (Peelen et al., 1997). In anderen Populationen, wie der französischen (Stoppa-Lyonnet et al., 1997), schwedischen (Hakansson et al., 1997) und finnischen (Vehmanen et al., 1997) sind 100 – 200 Familien auf Veränderungen im BRCA1-Gen untersucht worden. In jeder dieser Bevölkerungsgruppen wurden weniger als 150 Familien auf das Vorhandensein einer Mutation im BRCA2-Gen untersucht (Hakansson et al., 1997; Vehmanen et al., 1997; Peelen et al., 2000; Serova-Sinilnikova et al., 1997). Das Verhältnis von Fällen, die dem BRCA1-Gen zugeschrieben werden können, reicht von 10 % in Finnland und den Niederlanden zu annähernd 25 % in Frankreich und Schweden. Die Aufdeckungsrate von BRCA2-Mutationen lag generell um 10 % mit Ausnahme von Italien, wo Keimbahnmutationen in 25 % der 49 analysierten Familien gefunden wurden (Santarosa et al., 1999). Es gab bis heute keine umfassenden Studien in der deutschen Bevölkerung, da die meisten Studien limitiert waren auf die Analyse von BRCA1 oder verhältnismäßig zu kleine Untersuchungsgruppen gewählt wurden (Jandrig et al., 1996; Hamann et al., 1997; Dong et al., 1998; Spitzer et al., 2000).

Seit 1996 unterstützt die Deutsche Krebshilfe die Bildung einer Forschungsgemeinschaft, das „Deutsches Konsortium für hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom“, um ein nationales Netzwerk für die Erfassung und Behandlung von Frauen mit einer familiären

Prädisposition für Brust- und Ovarialkarzinom zu gründen. Dieses Langzeitprojekt ist vielschichtig und beinhaltet die Zusammenarbeit von Genetikern, Gynäkologen und Psychologen bei einer BRCA1 und 2 Testung.

Innerhalb von vier Jahren hat das Konsortium eine multidisziplinäre Beratung von annähernd 3000 Personen von 2000 deutschen Brust- und Ovarialkarzinomfamilien durchgeführt. Eine BRCA1 Testung erfolgte bei 989 und eine BRCA2 Testung bei 777 BRCA1 negativen Personen (German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer, 2002).

In dieser Arbeit wurde die BRCA1-Genrestung bei 10 Hochrisikofamilien in einer analogen Weise nach einem ausgearbeiteten Protokoll durchgeführt. In einer der 10 Familien (10 %) konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Bei der Mutation handelt es sich um eine Frameshift Mutation, wobei die Verschiebung des Leserahmens zu einem verfrühten Abbruch der Translation und zu einem verkürzten Protein führt. Da ein verkürztes Protein zumeist einen Funktionsverlust aufweist, sollte die Mutation phänotypisch zum Ausdruck kommen. Frameshift Mutationen stellen mit 61 % den am häufigsten nachgewiesenen Mutationstyp im BRCA1-Gen dar (Shattuck-Eidens et al., 1995). Die Mutation befindet sich im Exon 11. Da sich das Exon 11 über 60 % der kodierenden Sequenz erstreckt, entspricht die Lokalisation der Mutation im Exon 11 den Erwartungen (Shattuck-Eidens et al., 1995).

Die BRCA1 und 2 Daten, die in der deutschen Bevölkerung erlangt wurden, stimmen überein mit Studien anderer Populationen, wie der amerikanischen (Frank et al., 1998; Ford et al., 1998), französischen (Stoppa-Lyonnet et al., 1997, Serova-Sinilnikova et al., 1997), niederländischen (Peelen et al., 1997; Peelen et al., 2000), finnischen (Vehmanen et al., 1997), skandinavischen (Hakansson et al., 1997) und italienischen (Santarosa et al., 1999). Die höchste Mutationsfrequenz wurde in allen Studien in Familien mit Vorliegen von Brust- und Ovarialkarzinomen und in Familien mit zwei oder mehr Fällen von Brustkrebs (zwei davon unter dem 50. Lebensjahr diagnostiziert) bzw. Familien mit diagnostiziertem Brustkrebs beim Mann nachgewiesen. Für beide Familiengruppen wurden höhere Mutationsraten im BRCA1-Gen entdeckt. Niedriger Frequenzen wurden für das BRCA2-Gen in den österreichischen, belgischen und schwedischen Populationen beschrieben, obwohl diese Zahlen auch durch die kleinere Anzahl von Patienten, die in diesen Studien untersucht wurden, ungünstig beeinflusst sein könnten.

Auch in dieser Arbeit erfolgte der Mutationsnachweis in einer Familie mit zwei Fällen von Mammakarzinom und einem Ovarialkarzinom.

Zusätzlich zu der Mutation wurden bei 6 der 10 untersuchten Familien Polymorphismen nachgewiesen, die in der Datenbank des Breast cancer information core beschrieben sind. Von den 9 in Exonbereichen lokalisierten Polymorphismen führen 4 zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz. Da die Polymorphismen phänotypisch nicht zum Ausdruck

kommen, scheinen die betroffenen Aminosäuren keine essentielle Bedeutung für die Proteinfunktion zu besitzen.

Die Mutationsraten von nur 53 % bzw. 37 % in den beiden oben genannten Hochrisikofamiliengruppen unterstützt die Hypothese der Existenz von weiteren prädisponierenden Genen (German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer, 2002). BRCA1/BRCA2 negative Personen aus diesen Hochrisikofamilien können genutzt werden, um mögliche prädisponierenden Gene mittels Transkriptionsanalysen oder anderer Screeningverfahren zu identifizieren.

Für die Patientin mit der nachgewiesenen BRCA1 Frameshift Mutation im Exon 11, sowie für die ratsuchende Tochter wird eine intensive Prävention erforderlich. Dabei sollten die unterschiedlichen Möglichkeiten der Prävention interdisziplinär mit der Patientin und der Ratsuchenden besprochen werden, da es erste Hinweise darauf gibt, dass spezifische Maßnahmen zur Verhütung oder Früherkennung des familiären Brust- und Eierstockkrebses zu einer Reduktion der Morbidität und Mortalität führen (Schmutzler et al., 1999). Die primäre Prävention hat dabei zum Ziel, den Ausbruch der Erkrankung durch die prophylaktische beidseitige Mastektomie und Ovarektomie zu verhindern. Alternativ kann die medikamentöse Prävention mit Hormonpräparaten zum Einsatz kommen. Dabei sollte allerdings bedacht werden, dass der Einsatz kombinierter oraler Kontrazeptiva bei Frauen mit einer Mutation im BRCA1-Gen zwar zu einer Reduktion der Inzidenz des Ovarialkarzinoms führt (Narod et al., 1998), aber auch Hinweise auf eine Erhöhung des Brustkrebsrisikos vorliegen (Ursin et al., 1997). Im Rahmen der sekundären Prävention sollten besondere Früherkennungsprogramme vorgeschlagen werden (siehe Tab. 1.3), um die Mortalität zu vermindern. Der Patientin, die bereits am Brust- und Ovarialkarzinom erkrankt ist und eine BRCA1-Mutation besitzt, hat ein deutlich erhöhtes Risiko für ein Zweitkarzinom der Brust (Easton et al., 1995; Ford et al., 1994). Ihr sollten daher die gleichen Maßnahmen zur primären und sekundären Prävention empfohlen werden, wie der nichterkrankten Ratsuchenden. Auch sollte der gesunden Tochter, die ein erhöhtes Risiko für erblichen Brust-/Eierstockkrebs hat, eine prädiktive genetische Diagnostik ermöglicht werden. Eine umfassende klinische und psychoonkologische Betreuung, sowie die präventiven Möglichkeiten sollten auch angeboten werden, wenn sich die Tochter gegen eine prädiktive genetische Analyse entscheidet. Wird die in der Familie vorhandene Mutation bei der Ratsuchenden ausgeschlossen, sind spezielle präventive Maßnahmen nicht mehr erforderlich und es gelten die allgemeinen Empfehlungen zur Krebsfrüherkennung (Beckmann et al., 2001; Schmutzler et al., 2002).

In 9 der 10 untersuchten Hochrisikofamilien konnte keine Mutation nachgewiesen werden, obwohl teilweise in deren Stammbäumen sich Hinweise auf einen autosomal dominanten Erbgang finden lassen. Die negative Mutationsanalyse des BRCA1- und 2-Gens kann ein erhöhtes Risiko jedoch nicht ausschließen, da es Hinweise auf Mutationen in mindestens

einem weiteren Brustkrebsgen gibt, das für den größten Teil der BRCA1/2 negativen Familien mit mehreren Betroffenen verantwortlich ist (Seitz et al., 1997). Auch diesen Ratsuchenden bzw. Betroffenen sollten die Möglichkeiten der primären und sekundären Prävention aufgezeigt werden. So scheinen beispielsweise besonders Frauen mit anderen Risikofaktoren als BRCA1/2-Mutationen von einer Therapie mit Antiöstrogenen zu profitieren (Fisher et al., 1998; Powels et al., 1998; Veronesi et al., 1998). Allerdings haben Antiöstrogene einen stimulierenden Effekt auf die Ovarien, so dass ihr Einsatz bei einer möglicherweise familiär bedingten Mamma-/Ovarialkarzinomdisposition kritisch beurteilt werden sollte.

Eine standardisierte Prävention für Frauen aus Risikofamilien einschließlich einer intensiven interdisziplinären Betreuung sollte Zielsetzung der weiteren Bemühungen in der prädiktiven genetischen Diagnostik sein (Schmutzler et al., 2002).

Die Mutationsanalyse der 10 Hochrisikopatientinnen führte zu einem weiteren interessanten Ergebnis. Neben der Mutation konnten in 6 der untersuchten Familien Polymorphismen nachgewiesen werden, die nach heutiger Definition keine Funktion besitzen. Es zeigte sich jedoch, dass bestimmte Polymorphismen in einem Cluster auftreten, welches sich über den Bereich von Nukleotid 2201 im Exon 11 bis in den Intronbereich 16 erstreckt und somit etwa 22 % des gesamten Gens und über 60 % des translatierten Bereichs umfasst. Tritt einer der Polymorphismen bei einer Patientin homozygot bzw. heterozygot auf, so trifft dies auch für alle anderen Polymorphismen des Clusters zu. Da vier dieser Polymorphismen einen Aminosäureaustausch zur Folge haben und zwei sich in der Interaktionsstelle zu RAD51 befinden, könnte die Funktion des BRCA1-Gens in der DNA Reparatur durch Veränderung der Proteinsekundärstruktur durchaus beeinflusst sein. Inwiefern das durch die Polymorphismen beschriebene Allel ursächlich mit der Entstehung des Mamma- und Ovarialkarzinoms in diesen Familien verknüpft ist, lässt sich zur Zeit noch nicht sagen. Größere Studien sind zur Klärung dieses Zusammenhanges erforderlich.

4.2 Expressionsanalyse in sporadischen Mammakarzinomen

Im Gegensatz zum klaren Nachweis einer Genotyp-/Phänotyp-Korrelation des BRCA1-Gens in familiären Mammakarzinomen ist die Rolle von BRCA1 in sporadischen Tumoren unklar geblieben. Das BRCA1-Gen kodiert für ein Protein, welches involviert ist in DNA-Reparaturmechanismen, homologe Rekombination (Scully et al., 1997; Thomas et al., 1997), embryonale Proliferation, Transkriptionsregulation (Chapman and Verma, 1996, Scully et al., 1997) und Ubiquitinierung (Jensen et al., 1998). Diese multifunktionale Natur begründet eine komplexe Regulation der BRCA1-Funktion. BRCA1 wird am stärksten exprimiert in sich schnell teilenden, differenzierenden Geweben, wie z.B. während der Proliferation und Differenzierung vom Brustepithel (Rajan et al., 1996). BRCA1-mRNA wird vorzugsweise

während der späten G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus exprimiert (Gudas et al., 1995). Gemäß des klassischen Zwei-Phasen-Modells zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Knudson et al., 1971) verursacht die Mutation in einer Genkopie und der Verlust der zweiten Kopie die Inaktivierung der Tumorsuppressorfunktion. Dieses Zwei-Phasen-Modell ist geeignet für die Analyse der BRCA1-Genaktivierung in hereditären Mammakarzinomen (Niederacher et al., 1998), nicht jedoch in sporadischen Mammakarzinomen, in denen bis heute nur wenige Mutationen im BRCA1-Gen nachgewiesen wurden (Futreal et al., 1994; Merajver et al., 1995; Langston et al., 1996). So bleibt die molekulare Basis der BRCA1-Geninaktivierung in sporadischen Mammakarzinomen unklar. Möglicherweise sind andere Mechanismen als Mutationen für den Verlust der BRCA1-Aktivität in sporadischen Mammakarzinomen verantwortlich.

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die BRCA1-Expression reduziert oder fehlend in den meisten sporadischen fortgeschrittenen (Grad 3) duktaalen Mammakarzinomen ist (Wilson et al., 1999). Epigenetische Mechanismen wie aberrante Hypermethylierung von Cytosin auf der Promotorregion kann zu reduzierter Genexpression führen. Eine Reduktion oder ein Fehlen der BRCA1-Expression bei Hypermethylierung des BRCA1-Promotors wurde in mehreren Studien für Mammakarzinome gezeigt (Mancini et al., 1998; Rice et al., 1998; Bianco et al., 2000). Allerdings wurden im Rahmen dieser Studien meist nur Zelllinien oder geringe Probenkollektive von Tumoren verwendet (Özcelik et al., 1998; Rice et al., 1998) und Angaben über die Expression in normalem Brustgewebe fehlen vollständig (Özcelik et al., 1998).

Es wurden paarweise 53 Normal- und Tumorgewebe untersucht. Dabei zeigte sich keine signifikant reduzierte BRCA1-Expression in den Tumoren. In 21 Fällen (40%) zeigten Normal- und Tumorgewebe annähernd die gleiche BRCA1-Expression, in 13 Tumoren (25%) war die BRCA1-Expression höher, in 18 Tumoren (35%) geringer als in den gematchten Normalgeweben. Vermutlich lag in den Tumoren mit reduzierter BRCA1-Expression nur zum Teil eine Hypermethylierung des Promotors vor, da dies in der Literatur nur in bis zu 16 % der untersuchten Karzinome gezeigt wurde (Mancini et al., 1998; Rice et al., 1998; Bianco et al., 2000). In einem Vergleich der Variation der BRCA1-Expression in Normal- und Tumorgeweben, wurden höhere Expressionswerte häufiger in Normalgeweben als in Tumorgeweben festgestellt. Eine mögliche Erklärung kann darin liegen, dass nicht nur eine Reduktion der BRCA1-Expression zur Inaktivierung führt. Ein BRCA1-Funktionsverlust könnte auch zurückzuführen sein auf eine gehemmte Induktion der Expression in Situationen, in denen physiologisch höhere BRCA1-Konzentrationen benötigt werden. Dies spricht allerdings eher für eine BRCA1-Inaktivierung aufgrund von Defekten in transregulatorischen Faktoren als für eine Inaktivierung von BRCA1 durch Mutationen oder Hypermethylierung (pub Inaugural-Dissertation Beate Betz, 2000).

Ein weiterer, hier untersuchter möglicher Erklärungsansatz, ist der Einfluß eines hemizygoten Allelverlustes einer BRCA1-Genkopie (Niederacher et al., 1998; Beckmann et al., 1996). Hierzu wurden LOH-Analysen des BRCA1-Gens mit Hilfe dreier unterschiedlicher intragenischer Mikrosatellitenmarker (D17S855, D17S1322, D17S1323) in Tumoren durchgeführt. Bei fehlendem LOH und Heterozygotie wurde sichergestellt, dass potentiell beide Allele exprimiert werden konnten. Die allelspezifische Expression wurde in Normal- und Tumorgewebe untersucht. Die Expression eines Gens kann so ebenfalls kontrolliert werden. Dieser Mechanismus ist auch im sogenannten Imprinting bekannt, bei dem spezifisch die Expression einer Allelkopie eines Genes unterdrückt wird (Gold and Petersen, 1994). Es kann sich dabei um das mütterliche (maternales Imprinting) oder das väterliche Allel (paternales Imprinting) handeln. Der genaue Funktionsmechanismus ist noch nicht geklärt. Vermutlich ist die spezifische Methylierung eines Allels beim genetischen Imprinting von Bedeutung (Gold and Pedersen, 1994).

Für BRCA1 wurde bereits mit Hilfe der RFLP-Analyse eine allelspezifische Expression nachgewiesen (Özcelik et al., 1998). Dazu wurde der Polymorphismus C4227T im Exon 13 des BRCA1-Gens, der in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym Ear1 liegt, untersucht. Das Enzym ist nur in der Lage die Wildtypsequenz zu schneiden und nicht die Sequenz mit dem Polymorphismus. Dieser Polymorphismus war in dieser Untersuchung von besonderer Bedeutung, da er zu dem unter Punkt 3.1.2 beschriebenen Polymorphismencluster gehört. Es konnte gezeigt werden, dass an dieser Stelle ein Ungleichgewicht der Expression von BRCA1-Allelen A1 und A2 in heterozygoten Tumoren vorhanden ist. Während das Wildtypallel A1 hauptsächlich in Normalgeweben exprimiert wurde, wurde im Tumorgewebe überwiegend das Allel mit dem Polymorphismus A2 exprimiert. Das schwache Signal des Wildtypallels, welches sich in manchen Tumorgeweben zeigte, weist möglicherweise auf die Heterogenität des Tumormaterials durch die Verwendung ausgewählten Schnellschnittmaterials hin. Ein genauer Nachweis läßt sich bei der Verwendung von mikrodisektiertem Tumormaterial erbringen. Auffällig war, dass keine Patientin im Normalgewebe nur das Allel A2 exprimierte oder in Tumorgewebe nur das Wildtypallel. Es wurden zusätzlich Stichproben der cDNA sequenziert, so dass ein unvollständiger Restriktionsverdau als Ursache für die Signale des Allels A2 ausgeschlossen werden konnten.

In einem weiteren Versuch wurden auch heterozygote Patientinnen mit LOH auf die Allelverteilung untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass bei 2 Patientinnen im Tumormaterial das Allel mit dem Polymorphismus erhalten blieb und in 3 Fällen im Tumormaterial noch beide Allele nachweisbar waren. Die Ergebnisse weisen trotz der geringen Probenanzahl auf einen alternativen Mechanismus der Geninaktivierung hin. Weder ein LOH noch die reduzierte Expression von BRCA1 allein sind anscheinend

bedeutende Mechanismen für die BRCA1-Geninaktivierung in sporadischen Mammakarzinomen.

Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass die Anzahl von BRCA1-Mutationen, die mit hoher Penetranz einhergehen, in der Bevölkerung zwischen 1 auf 500 und 1 auf 2000 Personen liegt (Ford et al., 1995). Das bedeutet, dass nur 2 % aller vor dem 70. Lebensjahr diagnostizierten Mammakarzinome auf diese Mutationen zurückgeführt werden können. Der Anteil durch BRCA2-Mutationen verursachten Mammakarzinomen beläuft sich wahrscheinlich auf einen ähnlich hohen Anteil (Ford et al., 1995). Eine größere Anzahl von Mammakarzinomfällen könnte daher durch vergleichbare, aber mit niedrigerer Penetranz vorhandene, prädisponierende Gene erklärt werden.

Bis ein funktioneller Test verfügbar ist, sind Analysen von Sequenzvarianten in der BRCA1 kodierenden Region in der Normalbevölkerung nützlich, um die vermeintliche Rolle der Missense Mutationen zu klären. Außerdem sind Polymorphismenanalysen in der BRCA1 kodierenden Sequenz nützlich, um regulierende Mutationen zu entdecken (Miki et al., 1994; Friedman et al., 1994), den allgemeinen Ursprung von häufigen Mutationen zu bestimmen (Durocher et al., 1995) und allelspezifische Expression in sporadischen Mammakarzinomen zu studieren (Thompson et al., 1995). Die Abgrenzung zwischen Missense-Mutationen und Polymorphismen ist häufig schwierig. Eine Variante könnte als Missense-Mutation betrachtet werden, wenn die Variation mit der Erkrankung in einer betroffenen Familie einher geht und in weniger als 200 Proben der allgemeinen Bevölkerung gefunden worden ist. Polymorphismen hingegen könnten als solche klassifiziert werden, wenn sie von der Erkrankung in einer Familie getrennt auftreten, keine Veränderung der Aminosäuren hervorrufen und die Variante in einer oder mehreren Beispielen der allgemeinen Bevölkerung detektiert wird (Couch et al., 1996). Ein Beispiel für die Schwierigkeit in der Definition Missense-Mutation und Polymorphismus ist die S1040 N Variante. Diese war ursprünglich als Polymorphismus beschrieben worden (Castilla et al., 1994). Diese Variante ging nicht einher mit der Erkrankung in der Familie, in welcher sie identifiziert wurde und wurde auch in 3 von 232 Kontrollchromosomen entdeckt. Friedman et al. (1994) hingegen fand heraus, dass diese Veränderung mit der Erkrankung korreliert ist und in 120 Kontrollchromosomen abwesend war und klassifizierte sehr wahrscheinlich fälschlicherweise die Variante als eine Missense-Mutation. Eine andere Missense-Variante, K1347G, wurde in einem Patienten detektiert, der ebenfalls eine Frameshift-Mutation in einem anderen Teil des Gens hatte (Friedman et al., 1994). Somit ist die funktionelle Bedeutung dieser Variation fraglich. Das deutsche Konsortium für hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom definiert unklassifizierte Varianten im BRCA1-Gen anders. Die Abgrenzung zwischen Missense-Mutationen und Polymorphismen wird über die Häufigkeit der genetischen Veränderung in einem

Kontrollkollektiv definiert. Liegt die Frequenz über 1 % , so werden die Missense-Mutationen als Polymorphismen klassifiziert.

In sporadischen Mammakarzinomen könnten für die Karzinomentstehung Polymorphismen mit allelspezifischer Expression unterstützend wirken und so mit niedriger Penetranz an der Entstehung beteiligt sein. Dieser mögliche prädisponierende Effekt wird noch dadurch verstärkt, dass in der RFLP-Analyse Polymorphismencluster, in dem 4 der dazugehörigen Polymorphismen einen Aminosäureaustausch zur Folge haben, von denen wiederum 2 für die Interaktion mit RAD51 verantwortlich sind, analysiert wurden. Eventuell könnte eine Konformationsänderung zu einer gestörten Interaktion mit RAD51 und somit zu einer veränderten oder aufgehobenen Funktion des BRCA1-Gens in der DNA-Reparatur führen. Ob ein solcher Mechanismus der allelspezifischen Expression jedoch zugrunde liegt, ist weiterhin unklar.

Polymorphismen besitzen definitionsgemäß keine Funktion und sind auch bei vielen gesunden Personen zu finden. Dennoch weisen die Untersuchungsergebnisse zumindest auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Polymorphismen und dem Auftreten von sporadischen Mammakarzinomen hin. Vermutlich beeinflussen diese häufig in der Bevölkerung vorkommenden genetischen Varianten die Prädisposition für sporadische Mammakarzinome ursächlich. Aufgrund der nur geringen Probenanzahl in dieser Arbeit lässt sich jedoch lediglich eine Tendenz erkennen, so dass es gerechtfertigt scheint, weitere Untersuchung zur Erweiterung und besseren Aussagefähigkeit dieses Zusammenhanges durchzuführen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mehrzahl der Mammakarzinomerkrankungen sporadisch auftreten und nicht familiär vererbt werden. Etwa 5–10 % der Erkrankungsfälle lassen sich auf eine Mutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen zurückführen. Unklar ist zur Zeit noch, ob ein positiver Mutationsnachweis die Therapieentscheidung bezüglich chirurgischer oder adjuvanter Therapie beeinflussen sollte (Beckmann et al., 2002). Ob sich durch eine Steigerung der chirurgischen Radikalität, z. B. bei nodal negativen Frühkarzinomen im Sinne einer prophylaktischen Chirurgie, die Prognose weiter verbessern lässt, ist derzeit ungeklärt (Beckmann et al., 2002).

Sporadische Mammakarzinome zeigen sehr selten BRCA1-Mutationen, so dass vermutlich andere Mechanismen für die Entstehung des Karzinoms ursächlich sind. Hier kommen im Gegensatz zu Genen mit hoher Penetranz, wie BRCA1 und BRCA2, niedrig penetrante Gene oder Polymorphismen in Frage. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der hier gezeigten allelspezifischen Expression von Polymorphismen, was auf einen Zusammenhang mit der Entstehung von sporadischen Mammakarzinomen hinweist. Ob und wie das durch die Polymorphismen beschriebene Allel bei der Karzinomentstehung eine Rolle spielt, muß sich in größeren Studien zeigen.

5. Zusammenfassung

Rund 5 % der Mamma- und Ovarialkarzinome sind erblich bedingt und folgen einem autosomal dominantem Erbgang. Sie treten familiär gehäuft auf und sind durch ein frühes Erkrankungsalter gekennzeichnet. Ungefähr 50 % der Erkrankungsfälle sind durch Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und 2 verursacht. Zum Nachweis einer Mutation gilt als sensitivste Methode die direkte DNA-Sequenzierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Analyse bei 10 Patientinnen aus Hochrisikofamilien durchgeführt. Um die Fragmentlängen zu optimieren und so eine Automatisierung für die Routine-Sequenzierung mit dem Pipettier-Roboter Biomek 2000 zu gewährleisten, wurden für Exon 7, 15 und 16 neue Primer designed und die vollständige Gen-Sequenzierung unter Berücksichtigung dieser Primer durchgeführt. Es ließen sich eine Frameshift Mutation und in 6 Familien Polymorphismen nachweisen. Da die Mutationsträgerin ein hohes Erkrankungsrisiko hat, ist ein standardisiertes Früherkennungsprogramm zu empfehlen und die Möglichkeiten der medikamentösen und operativen Möglichkeiten sollten erläutert werden.

In sporadischen Mammakarzinomen sind bis heute nur wenige Mutationen im BRCA1-Gen nachgewiesen worden, so dass möglicherweise andere Mechanismen hier für den Verlust der BRCA1-Aktivität vorliegen. In diesem Zusammenhang wird seit einiger Zeit vermutet, dass neben den Genen mit hoher Penetranz, wie z. B. BRCA1, niedrig penetrante Gene oder Polymorphismen, ursächlich an der Entstehung sporadischer Mammakarzinome beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit LOH-Analysen mit 3 intragenischen Mikrosatellitenmarkern (D17S855, D17S1322, D17S1323) mit 53 sporadischen Tumorgeweben und entsprechenden Normalgeweben durchgeführt. 10 heterozygote Patientinnen ohne BRCA1 LOH und 5 heterozygote Patientinnen mit BRCA1 LOH in mindestens einem der 3 Marker wurden dann mittels allelspezifischer Expression untersucht. Dabei konnte eine allelspezifische Expression der Allele (A1 = Wildtyp, A2 = Polymorphismus) in Normal- und Tumorgewebe nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit dem für BRCA1 beschriebenen Polymorphismencluster könnte die Expression des Allels mit dem Polymorphismus (A2) einen prädisponierenden Effekt in der Tumorentstehung haben.

Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse, die trotz der Definition von Polymorphismen als funktionslos, auf einen Zusammenhang zwischen ihrem Vorkommen und dem Auftreten von sporadischen Mammakarzinomen hinweisen, sollten größerer Studien, in denen die allelspezifische Expression näher untersucht wird, Gegenstand weiterer Studien sein.

6. Literaturverzeichnis

-Anderson LA, Friedman L, Osborne-Laurence S, Lynch E, Weissenbach J, Bowcock A, King MC: High-density genetic map of the BRCA1 region of chromosome 17q12-q21. *Genomics* 1993, 17:618-623

-Armstrong K, Eisen A, Weber B: Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2000, 342: 564-571

-Beckmann MW, Picard F, An HX, van Royen CRC, Dominik SI, Mosny DS, Schnürch HG, Bender HG, Niederacher D: Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1996, 73: 1220-1226

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

-Beckmann MW, Niederacher D, Goecke TO, Bodden-Heidrich R, Schnürch HG, Bender HG: Hochrisikofamilien mit Mamma- und Ovarialkarzinomen: Möglichkeiten der Beratung, genetischen Analyse und Früherkennung. *Deutsches Ärzteblatt* 1997, 94: A161-A167

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

-Beckmann MW, Untch M, Rabe T, Schulz KD, Bender HG: (Chemo-)Prävention des Mammakarzinoms. *Gynäkologe* 1999, 32: 150-157

-Beckmann MW, Kuschel B, Bender HG: BRCA1/2 mutation carriers and women at high risk for breast and ovarian cancer: preventive and therapeutic implications. Gomez F.G., Palacios S., eds. *Perspectives in Gynaecology and Obstetrics*. New York: Parthenon Publishing 1999. p. 123-141

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

- Beckmann MW, Werner Y, Renner SP, Fasching PA, Jap D, Kuschel B: Krebsfrüherkennung in der Frauenärztlichen Praxis – aktuelle Aspekte der wissenschaftlichen Diskussion. Gynäkologie 2000, 33: 474-482

- Beckmann MW, Fasching PA, Lux MP, Klemm D, Schroer B, Bodden-Heidrich R, Goecke TO, Niederacher D, Nestle-Krämling C: Das familiäre Mammakarzinom-Syndrom. Med Welt 2001, 52: 385-390

- Beckmann MW, Fasching PA, Gall C, Bani M, Brumm C, Krämer S: Genetische Risikofaktoren des Mammakarzinoms. Gynäkologie Published online 17.05.2002

- Berchuck A, Carney ME, Futreal PA: Genetic susceptibility testing and prophylactic oophorectomy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1999, 82: 59-64

- Bertwistle D and Ashworth A: Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. Curr Op Genet Develop 1998, 8: 14-20

- Betz B: Molekulare Untersuchung der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 bei familiären und sporadischen Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen. Pub Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf; (2000)

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

- BIC Datenbank: Internet <http://www.nchhgr.nih.gov/dir/lab-transfer/bic>

- Bick U: An integrated early detection concept in women with a genetic predisposition for breast cancer. Radiologe 1997, 37: 591-596

- Breast Cancer Linkage Consortium: Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations and sporadic cases. Lancet 1997, 349: 1505-1510

- Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskin KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J, Lubin MB, Deshano ML, Brody LC, Collins FS & Weber BL: Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. Nat Genet 1994, 8, 387-391

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

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

-Dong J, Chang-Claude J, Wu Y, Schumaker V, Debatin I, Tonin P and Royer-Pokora B: A high proportion of mutations in the BRCA1 gene in German breast/ovarian cancer families with clustering of mutations in the 3' third of the gene. Hum Genet 1998, 103: 154-161

-Durocher F, Belanger C, Lafrie F, Tonin PN, Morgan K, Narod SA, Shattuck-Eidens D, Neuhausen CL, Goldgar DE and Simard J: Detection, haplotype and phenotype analyses for two common BRCA1 mutations. 2nd Joint Clinical Genetics Meeting 1995, page 108, Los Angeles, CA, USA.

-Easton DF, Ford D, Bishop DT: Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium: Am J Hum Genet 1995, 56: 265-271

-Evans GR, Anderson E, Lalloo F et al.: Utilisation of prophylactic mastectomy in 10 European centres. Disease Markers 1999, 15: 148-151

-Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, and other National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study- J Natl Cancer Inst 1998, 90: 1371-1388

-FitzGerald MG, MacDonald DJ, Krainer M, Hoover I, O'Neil E, Unsal H, Silva-Arrieto S, Finkelstein DM, Beer-Romero P, Englert C, Sgroi DC, Smith BL, Younger JW, Garber JW, Duda RB, Mayzel KA, Isselbacher KJ, Friend SH, Haber DA: Germ-line BRCA1 mutations in jewish and non-jewish women with early-onset breast cancer. N Eng J Med 1996, 334, 143-149

-Ford D, Easton DJ, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE: Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium Lancet 1994, 343: 692-695

- Ford D, Easton DF and Peto J: Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to cancer incidence. *Am J Hum Genet* 1995, 58: 1457-1462
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BAJ, Gayther SA, Birch JM, Lindholm A, Stoppa-Lyonnet D, Bignon Y, Borg A, Hamann U, Haites N, Scott RJ, Maugard CM, Vasen H, Seitz S, Cannon-Albright LA, Schofield A, Zelada-Hedman M, and the Breast Cancer Linkage Consortium.: Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in Breast Cancer Families. *Am J Hum Genet* 1998, 62:676-689
- Frank TS, Manley SA, Olopade OI, et al.: Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol* 1998, 16: 2417-2425
- Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE & King MC: Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 1994, 8, 399-404
- Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, Eddington K, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Ding W, Gholami Z, Söderquist P, Terry L, Jhanwar S, Berchuck A, Iglehart JD, Marks J, Ballinger DG, Barrett JC, Skolnick MH, Kamb AA & Wiseman R: BRCA1 mutations in primary breast cancer and ovarian carcinomas. *Science*, 1994, 266, 120-122
- German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer: 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* 2002, 97: 472-480
- Gold JD and Pedersen RA: Mechanisms of genomic imprinting in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 1994, 29: 227-280
- Goldgar D: 9 PCR and the polymorphisms they identify from 17q21. Personal Communication 1994

- Gudas JM, Nguyen H, Li T and Cowan KH: Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995, 55: 4561-4565
- Hakansson S, Johannsson O, Johannsson U, Sellberg G, Loman N, Gerdes AM, Holmberg E, Dahl N, Pandis N, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A: Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 1997, 60: 1068-1078
- Hamann U, Brauch H, Garvin AM, Bastert G, Scott RJ: German family study on hereditary breast and ovarian cancer: germline mutation analysis of the BRCA1 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 18: 126-132
- Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, Petty PM, Sellers TA, Johnson JL, McDonnell SK, Frost MH, Jenkins RB: Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer: *N Engl J Med* 1999, 340: 77-84
- Hogervorst FBL, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B, Klijn JGM, Vasen HFA, Meijers-Heijboer H, Menko FH, Cornelisse CJ, den Dunnen JT, Devilee O & Ommen G-J: Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 1995, 10, 208-212
- Holinski-Feder E, Brandau O, Nestle-Krämling C, Derakhshaneh-Peykar P, Murken J, Untch M, Meindl A: Genetik des erblichen Mammakarzinoms: Grundlagen-Forschung-Diagnostik. *Deutsches Ärzteblatt* 1998, 95: B494-B499
- Hughes KS, Papa MZ, Whitney T, Mc Lellan R: Prophylactic mastectomy and inherited predisposition to breast carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 2502-2516
- Jandrig B, Grade K, Seitz S, Waindzoeh B, Müller M, Bender E, Nothnagel A, Rohde K, Schlag PM, Kath R, Höffken K and Scherneck S: BRCA1 mutations in German breast-cancer families. *Int J Cancer* 1996, 68: 188-192
- Knudson AG: Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 1971, USA 68,820-823
- Kuschel B, Köchli OR, Niederacher D, Müller Hj., Beckmann MW: Hereditäre Karzinomsyndrome in der Frauenheilkunde: Was der Praktiker wissen sollte! *Schweiz Med Wochenschr* 2000, 130: 362-375

-Kuschel B, Aba F, Lux MP, Jap D, Bender HG, Beckmann MW: Mammakarzinom: Ermittlung des individuellen Erkrankungsrisikos und der Möglichkeit zur Prävention. Zeitschrift für ärztliche Fortbildung und Qualitätssicherung (ZaeFQ) 2000, 94: 231-237

-Kuschel B, Lux MP, Goecke TO, Beckmann MW: Prevention and therapy for BRCA1/2 mutation carriers and women at high risk for breast and ovarian cancer. Eur J Cancer Prevent 2000, 9: 139-150

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

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

-Meijers-Heijboer EJ, Verhoog LC, Brekelmans CT et al.: Presymptomatic DNA testing and prophylactic surgery in families with a BRCA1 or BRCA2 mutation: Lancet 2000, 356: 1687

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

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

-Narod SA, Risch H, Moslehi R et al.: Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. N Engl J Med 1998, 339: 424-428

-Narod SA, Sun P, Ghadirian P, Lynch H, Isaacs C, Garber J, and et al.: Tubal ligation and risk of ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study. Lancet 2001, 357: 1467-1470

-Niederacher D, Picard F, van Royen CRC, An HX, Bender HG, Beckmann MW: Patterns of allelic loss on chromosome 17 in sporadic breast cancer detected by fluorescent labelled microsattelite analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 8: 181-192

-Niederacher D., Kiechle M., Arnold N.: Molekular- und zytogenetische Techniken in der Onkologie. *Gynäkologie* 1998, 31: 1019-1032

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

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

-Parmigiani G, Berry D, Aguilar O: Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1998, 62: 145-158

-Peelen T, van Vliet M, Petrij-Bosch A, Mieremet R, Szabo C, Van den Ouweland AMW, Hogervorst F, Brohet R, Ligtenberg MJL, Teugels E, Van der Luijt R, Van der Hout AH, Gille JJP, Pals G, Jedema I, Olmer R, Van Leeuwen I, Newman B, Plandsoen M, Van der Est M, Brink G, Hageman S, Arts PJW, Bakker MM, Wil lems HW, Van der Looij E, Neyns B, Bonduelle M, Jansen R, Oosterwijk JC, Sijmons R, Smeets HJM, Van Asperen CJ, Meijers-Heijboer H, Klijn JGM, De Greve J, King MC, Menko FH, Brunner HG, Halley D, Van Ommen G-JB, Vasen HFA, Cornelisse CJ, Van 't Veer LJ, De Knijff P, Bakker E, Devilee P: A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1997, 60: 1041-1049

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

-Powles T, Eeles R, Ashley S, Easton O, Chang J, Dowsett M: Interim analysis of the incidence of breast cancer in the Royal Marsden Hospital tamoxifen randomised chemoprevention. *Trial Lancet* 1998, 352: 98-101

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

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

-Rebbeck TR, Levin AM, Eisen A, Snyder C, Watson P, Cannon-Albright L, Isaacs C, Olopade O, Garber JE, Godwin AK, Daly MB, Narod SA, Neuhausen SL, Lynch HT, Weber BL: Breast cancer risk after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 mutation carriers. J Natl Cancer Inst 1999, 91: 1475-1479

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

-Richtlinien-Kommission der Bundesärztekammer: Richtlinien zur Diagnostik der genetischen Disposition für Krebserkrankungen. Deutsches Ärzteblatt 1998, 95: B1120-B1127

-Santarosa M, Dolcetti R, Magri MD, Crivellari D, Tibiletti MG, Gallo A et al: BRCA1 and BRCA2 genes: role in hereditary breast and ovarian cancer in Italy. Int J Cancer 1999, 83; 5-9

-Schmutzler RK, Kempe A, Kiechle M, Beckmann MW: Gegenwärtiger Stand der klinischen Beratung und Betreuung von Frauen mit einer erblichen Disposition für das Mamma- und Ovarialkarzinom: Deutsch Med Wochenschr 1999, 124: 563-566

-Schmutzler RK, Beckmann MW, Kiechle M: Prävention: Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom. Dtsch Ärzteblatt 2002, 99: C1071-1076

-Schulz KD, Duda V, Schreer I, Heiwang-Köhbrunner FH: Möglichkeiten der Brustkrebsfrüherkennung. Gynäkologe 1997, 30: 631-636

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

- Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM: Dynamic changes of BRCA1 subnuclear localisation and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 1997b, 90: 425-435
- Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM: Association of BRCA1 with RAD51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997a, 88: 265-275
- Seitz S, Rohde K, Bender E, Nothnagel A, Kölbl K, Schlag PM, Scherneck S: Strong indication for a breast cancer susceptibility gene on chromosome 8p12-p22: Linkage analysis in German breast cancer families. *Oncogene* 1997, 14: 741-743
- Serova-Sinilnikova OM, Boutrand L, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Paillerets, Dubois V, Lasset C, Janin N, Bignon YJ, Longy M, Maugard C, Lidereau R, Leroux D, Frebourg T, Mazoyer S and Lenoir GM: BRCA2 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in France. *Am J Hum Genet* 1997, 60: 1236-1239
- Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S, Couch F, Hoskins K, Weber B, Castilla L, Erdos M, Brody L, Friedman L, Ostermeyer E, Szabo C, King MC, Jhanwar S, Offit K, Norton L, Golewski T, Lubin M, Osborne M, Black D, Boyd M, Steel M, Ingles S, Haile R, Lindblom A, Olsson H, Borg A, Bishop T, Solomon E, Radice P, Spatti G, Gayther S, Ponder B, Warren W, Statton M, Liu Q, Fujimura F, Lewis C, Skolnick MH & Goldgar DE: A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. *JAMA* 1995, 273, 535-541
- Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, Samson C, Leblanc J-F, Belanger C, Dion F, Liu Q, Skolnick M, Goldgar D, Shattuck-Eidens D, Labrie F & Narod SA: Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet* 1994, 8, 392-398
- Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L, King MC: Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Research* 1996, 6: 1029-1049
- Spitzer E, Abbaszadegan MR, Schmidt F, Hauser A, Buwitt U, Lauter F-R, Pötschick K, Krock J, Elling D, Grosse R: Detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families by a comprehensive 2-stage screening procedure. *Int J Cancer* 2000, 85: 474-481

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

-Temple WJ, Lindsay RL, Magi E, Urbanski SJ: Technical considerations for prophylactic mastectomy in patients at high risk for breast cancer. *The American Journal of Surgery* 1991, 161; 413-415

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

-Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL and Holt JT: Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nature Genet* 1995, 9: 444-450

-Ursin G, Henderson BE, Haile RW, Zhou N, Diep A, Bernstein L: Does oral contraceptive use increase the risk of breast cancer in women with BRCA1/BRCA2 mutations more than in other women? *Cancer Res* 1997, 57: 3678-3681

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

-Verhoog LC, Brekelmans CTM, Seynaeve C, van den Bosch LMC, Dahmen G, van Geel AN, Tilanus-Linthorst MMA, Bartels CCM, Wagner A, van den Ouweland A, Devilee P, Meijers-Heijboer EJ, Klijn JGM: Survival and tumour characteristics of breast-cancer patients with germline mutations of BRCA1. *Lancet* 1998, 351: 316-321

-Veronesi U, Maisonneuve P, Costa A, Sacchini V, Maltoni C, Robertson C: Prevention of breast cancer with tamoxifen: preliminary findings from the Italian randomised trial among hysterectomised women. *Lancet* 1998, 352: 93-97

-Wagener C: *Molekulare Onkologie*. Thieme Verlag (1999)

-Wilson CA, Payton MN, Elliot GS, Buas FW, Cajulis EE, Grosshans D, Ramos L, Reese DM, Slamon DJ, Calzone FJ: Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1 and the splice variant BRCA1- Δ 11b.

Oncogene 1997, 14: 1-16

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

Nat Genet 1999, 21: 236-240

7. Anhang

7.1 Patientendaten (Kollektiv 2)

Tab.7.1: Klinische Daten der Patienten mit einem sporadischen Mammakarzinom

(T: Tumorgröße; N: Nodalstatus; M: Metastasen; ER: Östrogenrezeptor; PgR:

Progesteronrezeptor)

lfd.Nr.	Erkrankungs- alter	T	N	M	Grading	Histologie	ER	PgR
		0=unkn. 1=<2cm 2=2- 5cm 3=>5cm	0=unkn. 1=neg. 2=pos.	0=unkn. 1=neg. 2=pos.	0=unkn. 1=1 2=2 3=3		0=unkn. 1=neg. 2=pos.	0=unkn. 1=neg. 2=pos.
271	55	1	1	1	2+3	Ductal	1	1
273	>50	2	2	1	2	Inv., kleinzellig	2	2
277	60	1	1	1	2	Ductal	1	1
281	63	2	1	0	2	Lobular	1	1
286	>50	0	2	0	0		2	2
287	40	2	1	1	2	Duct., tubul.	2	2
301	66	3	2	0	2	Ductal	2	2
307	>50	2	1	0	1	Ductal	2	2
317	81	3	1	1	3	Ductal	1	1
322	57	1	1	0	0	Ductal	1	1
325	>50	0	2	0	0		2	2
327	>50	0	0	0	0		0	0
329	47	2	1	1	2	Ductal	2	2
331	56	2	2	1	2	Ductal	2	2
332	<50	3	2	2	0	Inflammat.	1	1
333	56	1	1	1	3	Medullar	1	1
334	<50	1	1	1	2	Ductal	2	2
335	<50	1	1	0	1		2	2
336	<50	1	2	0	2		2	2
340	39	2	1	1	3	Adenom.	1	1
343	55	2	1	0	1	Duc., lob., tub.	2	2
344	57	2	1	1	2	Ductal, sclero.Aden.	2	2
345	62	2	1	1	3	Lobular	2	0
346	?	3	1	0	3	Ductal	2	2
347	56	2	2	1	0	Lobular	2	2
349	<50	3	2	1	2	Ductal	2	2
351	49	2	2	1	3	Ductal	2	2
352	47	2	1	1	2	Ductal	2	2
353	68	1	1	1	3	Lobular	1	2
354	60	2	2	1	3	Tubular	2	2
355	58	2	2	0	3	Microcellul.	2	2
357	53	2	1	1	2	Lobular	2	2
359	51	2	1	1	0	Lobular	2	2
360	72	1	1	0	2		2	2
361	58	1	1	0	2	Ductal	2	2
364	70	2	1	1	2	Ductal	2	2

lfd. Nr.	Erkrankungsalter	T	N	M	Grading	Histologie	ER	PgR
365	39	2	1	0	2	Fibrozyst., papilloma	2	2
366	61	2	1	1	2	Ductal	2	2
368	51	3	2	2	3	Lobular	1	1
370	58	2	1	1	2	Lobular	2	2
372	55	1	1	1	0	Mucinous	2	2
373	45	2	1	0	2	Lobular	2	2
374	49	2	1	1	2	Ductal	2	1
375	42	2	1	1	1	Lobular	2	2
376	<50	2	2	1	1	Lobular	2	2
377	68	2	1	1	2	Ductal	2	1
381	63	2	1	0	2	Ductal	1	2
382	58	2	1	1	2+3	Ductal	1	2
385	49	2	1	1	2	Ductal	2	2
387	61	2	2	1	3	Ductal	1	1
388	>50	0	0	0	0		0	0
399	>50	0	0	0	0		0	0
402	<50	0	0	0	0		0	0

Tab. 7.2: Ergebnisse der LOH-Analysen mit dem Mikrosatellitenprimern D17S855, D17S1322 und D17S1323 (0=kein LOH, 1=LOH, 9=nicht informativ)

Patientin	S855	S1322	S1323
271	9	1	1
273	0	9	9
277	9	9	9
281	9	9	9
286	1	0	0
287	0	9	1
301	9	0	0
317	0	0	0
322	1	1	0
325	9	9	9
327	0	9	9
329	0	0	0
331	9	9	1
332	0	9	0
333	1	1	1
335	0	9	9
336	0	9	9
340	1	9	9
343	0	0	0
344	0	9	9
345	1	1	9
347	0	0	0
351	0	9	9
352	0	0	0
353	9	9	9
354	0	0	0
355	1	0	9
357	0	0	0

Patientin	S855	S1322	S1323
359	0	0	0
360	0	9	0
361	0	0	9
364	9	0	0
365	0	9	0
366	1	9	1
368	1	9	9
370	9	9	0
372	0	0	9
373	0	9	0
374	9	9	1
375	0	9	9
376	0	0	0
377	9	1	9
381	9	9	9
382	1	1	1
385	0	9	0
387	9	1	9
388	0	9	9
399	1	1	1
402	0	9	9

Lebenslauf

Name: Tessa Schiffer, geb. Stender

Geburtsdatum: 14.12.1975

Geburtsort: Neumünster

Familienstand: Verheiratet

Konfession: Evangelisch

Eltern: Hans-Heinrich Stender, Bankkaufmann
Ulla Kiilsgaard, geb. Panse, Rechtsanwalts- und Notariatsgehilfin

Ausbildung: 1982-1986: Grundschule, Neumünster

1986-1991: Holstenschule (Gymnasium), Neumünster
1991-1995: Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Ratingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1995–2002: Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

seit 08/2002: Tätigkeit als Ärztin im Praktikum, KÖ-Klinik GmbH Düsseldorf

Examina: 09/1997: Ärztliche Vorprüfung in Neuss und Düsseldorf

09/1998: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Neuss
04/2001: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Düsseldorf
05/2002: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Krefeld

Famulaturen: 02/1998: Innere Medizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

02/1999: Gynäkologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

02/2000: Gynäkologie, Diakoniewerk Düsseldorf Kaiserswerth

02/2000: Chirurgie, Diakoniewerk Düsseldorf Kaiserswerth

08/2000: Gynäkologie, M.D. Anderson Cancer Center, Universität Houston/Texas

Promotion: 03/1999-10/1999: Wissenschaftliche Tätigkeit bei Prof. Dr. M. W. Beckmann, Molekulargenetisches Labor, Universitätsfrauenklinik Düsseldorf
Thema: „Molekulare Analyse des BRCA1-Gens in familiären und sporadischen Mammakarzinomen“

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Matthias W. Beckmann danke ich für die Überlassung des Promotions-themas, die schnellen und konstruktiven Korrekturvorschläge, sowie seine Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit

Herrn Dr. Dieter Niederacher, Frau Dr. Beate Betz, sowie Frau Dorothee Larbig danke ich für die gute Einarbeitung in die Analysemethoden und die stets freundliche Mithilfe bei meiner Arbeit

Ich danke allen Mitarbeiter des Molekulargenetischen Labors für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Kommilitonin Judith Schröder-Brandt und meinem Mann Frank Schiffer für die moralische Unterstützung und Geduld, die die Erstellung meiner Arbeit erst möglich gemacht hat

Molekulare Analyse des BRCA1-Gens in familiären und sporadischen Mammakarzinomen

Vorgelegt von Tessa Schiffer

Die Mehrzahl aller Mammakarzinomerkrankungen wird nicht familiär vererbt, sondern tritt sporadisch auf. Bei etwa 5 % bis maximal 10 % aller Fälle liegt der Erkrankung jedoch eine genetische Prädisposition zugrunde. Hierbei spielen vor allem das BRCA1- und das BRCA2-Gen eine besondere Rolle. Bis zu 82 % der Trägerinnen mit einem BRCA1-Gendefekt erkranken bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom (Allgemeinpopulation Frauen: 9 % bis zum 70. Lebensjahr). Mehr als 60 % der Patientinnen bekommen das Mammakarzinom vor dem 50. Lebensjahr. Als sensitivste Methode zum Nachweis einer Mutation gilt die direkte DNA-Sequenzierung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Programms <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3wwwresults.cgi> für die Exons 7, 15 und 16 im BRCA1-Gen neue Primer designed und anschließend bei 10 Hochrisikofamilien die vollständige Gen-Sequenzierung unter Berücksichtigung dieser Primer etabliert. Dadurch konnten die Fragmentlängen optimiert und eine Automatisierung für die Routine-Sequenzierung mit dem Pipettier-Roboter Biomek 2000 gewährleistet werden. Es wurden eine Frameshift-Mutation und in 6 Familien Polymorphismen nachgewiesen. Da die Mutationsträgerin ein hohes Erkrankungsrisiko besitzt, ist ein standardisiertes Früherkennungsprogramm zu empfehlen und die Möglichkeiten der medikamentösen und operativen Prävention sind zu erwägen.

Sporadische Mammakarzinome zeigen sehr selten BRCA1-Mutationen. In diesem Zusammenhang wird seit einiger Zeit vermutet, dass neben den Genen mit hoher Penetranz, wie z. B. BRCA1, niedrig penetrante Gene oder Polymorphismen von Genen aus unterschiedlichen zellulären Regulationswegen, ursächlich an der Entstehung sporadischer Mammakarzinome beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden zur näheren Untersuchung eines solchen Zusammenhanges LOH-Analysen mit 3 intragenischen Mikrosatellitenmarkern (D17S855, D17S1322, D17S1323) an 53 sporadischen Tumorgeweben und entsprechenden Normalgeweben durchgeführt. 10 heterozygote Patientinnen ohne BRCA1 LOH in den 3 Markern und 5 heterozygote Patientinnen, die in mindestens einem der 3 Marker ein BRCA1 LOH aufwiesen, wurden dann mittels allelspezifischer Expression untersucht. Dabei konnte eine allelspezifische Expression der Allele (A1 = Wildtyp, A2 = Polymorphismus) in Normal- und Tumorgewebe nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit dem für BRCA1 beschriebenen Polymorphismencluster könnte die Expression des Allels mit dem Polymorphismus (A2) einen prädisponierenden Effekt in der Tumorentstehung haben. Inwiefern die Polymorphismen eine Rolle spielen, wird Gegenstand weiterer Forschung sein müssen.