Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Schipper

Analyse von Keimbahnmutationen des DNA-Reparaturproteins RAD51D bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen

Dissertation

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

vorgelegt von
Daniel Herrmann
2019

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

gez.:
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachterin: Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Scheckenbach
Zweitgutacher: Prof. Dr. med. Guido Kobbe

„If I have seen further it is by standing on ye shoulders of giants"

Isaac Newton

Gewidmet meinem Vater Ralf Herrmann.

Auf seinen Schultern stehe ich bis zum heutigen Tage.

Zusammenfassung

Analyse von Keimbahnmutationen des DNA-Reparaturproteins RAD51D bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen

Der Fanconi-Anämie-Signalweg ist involviert in die Reparatur von Doppelstrangbrüchen und Keimbahnmutationen dieser DNA-Reparaturgene prädisponieren zur Entwicklung solider Tumore. Für Mutationen im DNA-Reparaturprotein *RAD51D*, einem mit dem Fanconi-Signalweg assoziierten Protein, konnte eine Prädisposition bei der Entstehung von Mamma-, Prostata- und Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden. Patienten mit Fanconi-Anämie zeigen weiterhin erhöhte Inzidenzen von Kopf-Hals-Karzinomen im Vergleich zur Normalbevölkerung. Die vorliegende Arbeit untersucht den Beitrag von Keimbahnmutationen in *RAD51D* bei der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen.

Von 127 Patienten mit histologisch gesichertem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region wurden Blutproben gesammelt, Lymphozyten isoliert und DNA extrahiert, gefolgt von einer vollständigen Sanger-Sequenzierung der Exons des RAD51D-Gens.

Bei 28,3% der Patienten fanden sich insgesamt sechs verschiedene *missense*-Sequenzvarianten von denen drei einen möglichen Einfluss bei der Tumorgenese von Kopf-Hals-Karzinomen ausüben: p.Ser46Cys, p.Ala210Glu und p.Glu233Gly. Die Variante p.Ser46Cys in Exon 2 zeigte ein Patient, ebenso ein Patient p.Ala210Glu in Exon 7, sowie zwei Patienten p.Glu233Gly in Exon 8. Ohne Einfluss auf die Proteinfunktion war eine stille Mutation in Exon 3 (p.Ser78=) bei zwölf Patienten, die Sequenzvariante p.Val132Ile in Exon 5 bei einem Patienten und die Variante p.Arg165Gln bei 29 Patienten. In den Exons 1, 4, 9 und 10 wurden keine Sequenzvarianten gefunden. Der funktionelle Einfluss auf die Proteinfunktion der gefundenen Sequenzvarianten wurde durch Vergleich der Sekundär- und Tertiärstruktur, Analyse der evolutionären Konservierung im Speziesvergleich und *in-silico*-Prädiktion durch PROVEAN und PolyPhen-2 untersucht.

Das DNA-Reparatur-Protein *RAD51D* ist ein vielversprechender Kandidat bei der Tumorgenese von Kopf-Hals-Karzinomen. Funktionelle Untersuchungen, die Analyse lokaler Mutationen im Tumor und die Validierung an größeren Patientenkohorten sind notwendig, um den Beitrag von Keimbahnmutationen in *RAD51D* zur Tumorgenese und Implikationen für Diagnostik und Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen weiter zu untersuchen.

Abstract

Analysis of germline mutations of the DNA-repair-protein RAD51D in patients with head and neck squamous cell carcinoma

The Fanconi anemia pathway is required for double strand break repair and germline mutations in DNA repair genes can cause predisposition to the development of solid tumors. Mutations in Fanconi anemia associated proteins such as DNA repair protein *RAD51D* contribute to the tumorigenesis of breast-, ovarian- and prostate cancer. Furthermore, patients suffering from Fanconi anemia show a higher incidence of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) compared with that observed in healthy population. This study analyzes the germline mutation variants in *RAD51D* gene which may contribute to the development of HNSCC.

In this project, peripheral blood samples from 127 patients with histologically confirmed HNSCC were collected, lymphocytes isolated and DNA extracted, followed by Sanger sequencing of the entire exons in *RAD51D* gene.

Six different missense mutations were found in 28,3% of the patients. Three mutations were identified to play a potential role in the tumorigenesis of HNSCC, including p.Ser46Cys, p.Ala210Glu and p.Glu233Gly. The variant p.Ser46Cys in exon 2 was found in one patient, p.Ala210Glu in exon 7 in another patient and the variant p.Glu233Gly in exon 8 was detected in two patients. Sequence variants without deleterious impact on protein function were silent mutations in exon 3 (p.Ser78=) found in 12 patients, p.Val132Ile located in exon 5 in one patient and the variant p.Arg165Gln in exon 6 detected in 29 patients. No sequence variants were observed in exons 1, 4, 9 and 10. The functional impact of the sequence variants was specified by analysis of evolutionary conservation, change in secondary and tertiary protein structure and in-silico-prediction using PolyPhen-2 and PROVEAN.

We propose the DNA repair protein *RAD51D* as a promising candidate to contribute to the development of HNSCC. Functional studies, analysis of local mutations in tumor tissue and validation in larger cohorts are needed to further investigate the role of germline mutations in *RAD51D* in the tumorigenesis and their implications for diagnostic and therapy of HNSCC.

Abkürzungsverzeichnis

ACMG	*American College of Medical Genetics and Genomics*
AKT	AKT Serin/Threonin Kinase 1
ATG	Startcodon
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRCA1	*breast cancer 1*
BRCA2	*breast cancer 2*
BRIP1	*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*
CASP8	Caspase 8
CCND1	Cyclin D1
CDD	*conserved domain database*
CDK-1	*cyclin-dependent-kinase 1*
CDKN2A	*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
cDNA	*complementary DNA*
CI	Konfidenzintervall
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTX	Chemotherapie
CUP	*cancer of unknown primary*
d	Tag
DKC1	*dyskerin pseudouridine synthase 1*
DNA	*deoxyribonucleic acid*
DSBR	*double-strand-break-repair*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	*epidermal-growth-factor-receptor*
FADD	*Fas-associated protein with death domain*
FANCF	*Fanconi anemia group F protein*
FANCG	*Fanconi anemia group G protein*
FAT1	*FAT atypical cadherin 1*
FGF-1	*fibroblast-growth-factor-1*
g	Gramm
het	heterozygot
HER2	*human epidermal growth factor receptor 2*
HGVS	*Human Genome Variation Society*
HLA-1	Humanes-Leukozyten-Antigen-1
HNSCC	*head and neck squamous cell carcinoma*
hom	homozygot
HPV	humane Papillomaviren
ICL	*DNA-interstrand-crosslinks*
IL8	Interleukin 8
Max	Maximum
MDM2	*mouse double minute 2 homolog*
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
Min	Minimum
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	*messenger*-Ribonukleinsäure
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
MW	molecular weight
NFE2L2	*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*
NHEJ	*non-homologous-end-joining*
OR	*odds ratio*
p53	TP53-Tumorsuppressor-Gen
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PCR	*polymerase chain reaction*
PD-1	*programmed-cell-death-protein-1*
pdb	*protein-data-bank*-Format
PDGF	*platelet-derived-growth-factor*
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
pmol	Picomol
pRb	Retinoblastom-Protein
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RAR-β	*retinoic-acid-receptor-β*
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	*rounds per minute*
SDSA	*synthesis-dependent-strand-annealing*
SPARC	*secreted protein acidic and rich in cysteine*
ssDNA	*single-strand-DNA*
TAP1	*transporter associated with antigen processing 1*
TAP2	*transporter associated with antigen processing 2*
TINF2	*TERF1-interacting nuclear factor 2*
TGF-α	*transforming-growth-factor-α*
TGF-β	*transforming-growth-factor-β*
TLR	*toll-like-receptor*
Tm	Schmelztemperatur
TP63	Tumorprotein p63
TRAF3	*tumor-necrosis-factor-receptor-associated-factor 3*
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolette Strahlung
VEGF	*vascular-endothelial-growth-factor*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Kopf-Hals-Karzinome 1

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren 1

1.1.2 Hereditäre Kopf-Hals-Karzinome 2

1.1.3 Diagnose und Therapie 3

1.1.4 Tumorgenese 4

1.2 DNA-Reparatur 7

1.2.1 Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur 7

1.2.2 Fotoreaktivierung 8

1.2.3 Reparatur von Doppelstrangbrüchen 8

1.2.4 Reparatur von DNA-Quervernetzungen 10

1.3 Tumorprädisposition durch Keimbahnmutationen 11

1.3.1 DNA-Reparatur im Fanconi-Signalweg und Onkogenese 11

1.3.2 Fanconi-Anämie und Kopf-Hals-Karzinome 11

1.3.3 RAD51C und Kopf-Hals-Karzinome 12

1.4 Das DNA-Reparaturprotein RAD51D 12

1.5 Ziele der Arbeit 15

2 Material und Methoden 16

2.1 Patienten 16

2.2 DNA-Extraktion 16

2.2.1 QIAamp DNA Mini Kit 16

2.2.2 QIAamp 96 DNA Blood-Kit 16

2.3 Primer 17

2.4 Polymerasekettenreaktion 18

2.5 Gelelektrophorese 19

2.6 PCR-Aufreinigung 19

2.6.1 ExoSAP-IT ® 19

2.6.2 QIAquick PCR Purification Kit 19

2.7 Sequenzierungs-PCR 20

2.8 Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion 20

2.9 Sequenzierung Seqlab/BMFZ 20

2.10 Sequenzanalyse 21

2.10.1 Referenzsequenzen 21

2.10.2 Software 22

3 Ergebnisse 24

3.1 Patienten 24

3.2 Zusammenfassung der gefundenen Sequenzvarianten 26

3.3 Sequenzanalysen des RAD51D-Gens bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren 28

3.3.1 Sequenzvariante Exon 2 – g.752C>G - c.137c>g – p.Ser46Cys 28

3.3.2 Sequenzvariante Exon 3 – g.1340C>T - c.234c>t - p.Ser78= 31

3.3.3 Sequenzvariante Exon 5 – g.12796G>A - c.394g>a – p.Val132Ile 31

3.3.4 Sequenzvariante Exon 6 – g.13402G>A - c.494g>a – p.Arg165Gln 35

3.3.5 Sequenzvariante Exon 7 – g.16378C>A - c.629c>a – p.Ala210Glu 38

3.3.6 Sequenzvariante Exon 8 – g.16576A>G - c.698a>g – p.Glu233Gly 42

4 Diskussion 46

5 Schlussfolgerungen 61

6 Literatur- und Quellenverzeichnis 62

7 Anhang 68

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis 72

1 Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Karzinome

Der Begriff Kopf-Hals-Karzinome fasst eine heterogene Gruppe maligner Tumore zusammen, die sich von der Schleimhaut des oberen aerodigestiven Traktes ableiten. Hierunter fallen Karzinome der Mundhöhle, des Nasopharynx, Oropharynx und Hypopharynx, des Larynx, sowie im weiteren Sinne der Befall von Lymphknoten der Kopf-Hals-Region ohne bekannten Primarius (*cancer of unknown primary*, CUP-Syndrom) [1].

Histologisch dominieren Plattenepithelkarzinome mit einem Anteil von über 90%, deshalb werden Kopf-Hals-Karzinome im englischen Sprachraum oft als *HNSCC* (*head and neck squamous cell carcinoma*) abgekürzt [2]. Seltenere histologische Subtypen sind Adenokarzinome, Azinuszellkarzinome, Lymphome, Weichteilsarkome, adenoid-zystische Karzinome, Mukoepidermoidkarzinome, lymphoepitheliale Karzinome und Mischtumore [3].

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Nach Zahlen des Robert-Koch-Institutes traten in Deutschland im Jahr 2012 16.540 Fälle von Kopf-Hals-Karzinomen auf. Dies entspricht 3,5% aller Tumorneuerkrankungen. Männer waren deutlich häufiger betroffen mit 12.400 Neuerkrankungen im Vergleich zu 4.140 bei Frauen. Kopf-Hals-Karzinome stellen die sechsthäufigste Tumorentität in Deutschland gemessen an der Inzidenz dar [4].

Statistisch zusammengefasst werden Karzinome der Mundhöhle, des Nasopharynx, Oropharynx und des Hypopharynx (ICD10-Klassifikation: C00-C14). Die Inzidenzraten sind seit 2000 annähernd konstant. 2012 kam es zu 9.290 Neuerkrankungen bei Männern und 3.650 Neuerkrankungen bei Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter lag für Frauen bei 66 Jahren und für Männer bei 62 Jahren. Der Anteil der frühen Tumorstadien (T1) bei Erstdiagnose lag für Frauen mit 35% deutlich höher als für Männer mit 27%. Bei den relativen 5-Jahres-Überlebensraten zeigt sich ebenfalls ein Vorteil der Frauen (61%) im Vergleich zu den Männern (48%) [4].

Separat erfasst werden Karzinome des Larynx (ICD10-Klassifikation: C32). Hier zeigt sich seit 30 Jahren ein Rückgang der Erkrankungsraten bei Männern, während die Rate bei Frauen nach Anstiegen in den 80er- und 90er-Jahren auf einem konstanten Niveau blieb. 2012 traten

3.110 Neuerkrankungen bei Männern und 490 bei Frauen auf. Das mittlere Erkrankungsalter betrug bei Männern 66 Jahre und bei Frauen 64 Jahre. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten sind mit 62% (Männer) und 65% (Frauen) ebenfalls sehr ähnlich [4].

In Europa sind Nikotinabusus und Alkoholkonsum die Hauptrisikofaktoren und tragen kumulativ zur Entstehung von 75% der Kopf-Hals-Karzinome bei [1]. Besonders die Kombination beider Noxen führt über Multiplikationseffekte zu einer 35fachen Erhöhung des Tumorrisikos [5].

Prognostisch relevant ist die Infektion mit Humanen-Papilloma-Viren, vor allem mit den Hochrisikotypen HPV16 und HPV18. Veränderte Sexualpraktiken und zunehmende Infektionsraten mit HPV führen kontinuierlich zu einem Anstieg von Oropharynxkarzinomen. Schätzungen zufolge sind weltweit 25,6% der Oropharynxkarzinome assoziiert mit HPV. In Amerika gelingt in 56% der Tumore der Nachweis von HPV-DNA, in Westeuropa in 39% [6]. Die tumorfördernde Wirkung wird von den viralen Onkoproteinen E6 und E7 vermittelt. Diese inaktivieren die natürliche Funktion der Tumorsuppressorgene TP53-Tumorsuppressor-Gen (p53) und Retinoblastom-Protein (pRb) [7]. HPV-positive Tumore unterscheiden sich in der Genexpression von HPV-negativen Entitäten (siehe Tabelle 1). Die Ansprechraten auf Chemotherapie und Bestrahlung oder eine Kombination beider Therapieformen sind bei Nachweis von HPV-DNA im Tumor signifikant besser [8]. Ang et al. konnten in einer Studie mit 743 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zeigen, dass die 3-Jahres-Überlebensraten bei Patienten mit HPV-positiven Tumoren 82,4% und bei HPV-negativen Entitäten 57,1% betragen [9]. Aufgrund der besonderen prognostischen Bedeutung werden in der aktuellen TNM8-Klassifikation HPV-positive Kopf-Hals-Tumore als eigene Subgruppen aufgeführt [10].

1.1.2 Hereditäre Kopf-Hals-Karzinome

Bei einer Subgruppe der Patienten finden sich keine klassischen Risikofaktoren, wie Nikotin, Alkohol oder eine HPV-Infektion in der Anamnese. Das Erkrankungsalter ist deutlich niedriger als bei den klassischen Kopf-Hals-Karzinomen. Ein Teil dieser Erkrankungen ist durch hereditäre Tumorprädispositionssyndrome verursacht [11]. Angeborene Störungen der DNA-Reparatur, wie beispielsweise Fanconi-Anämie, das LiFraumeni-Syndrom, das Lynch-Syndrom, Ataxia telangiektasia, das Bloom's-Syndrom, das Zinsser-Engman-Cole-Syndrom

oder Xeroderma pigmentosum, erhöhen das Risiko bereits in jungen Jahren ein Kopf-Hals-Karzinom zu entwickeln [11-14].

Einzelmutationen und Polymorphismen in Genen der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Telomererhaltung und weiterer Zellfunktionen erhöhen ebenfalls das Risiko für Kopf-Hals-Karzinome. In der Literatur beschrieben wurden beispielsweise Keimbahnmutationen von *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A), Mouse double minute 2 homolog (MDM2), p53, Dyskerin pseudouridine synthase 1 (DKC1), TERF1-interacting nuclear factor 2 (TINF2), Fanconi anemia group G protein (FANCG), Fanconi anemia group F protein (FANCF), BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 (BRIP1)* und *RAD51C* [11, 12, 15-18]. Der Einfluss dieser Mutationen auf die Tumorgenese ist subtiler im Vergleich zu den Tumorprädispositionssyndromen, rückt aber zunehmend aufgrund diagnostischer und therapeutischer Implikationen in den Fokus.

1.1.3 Diagnose und Therapie

Die Grundlage der Diagnostik ist die histologische Aufarbeitung von Biopsien verdächtiger Läsionen. Die weitergehende Untersuchung fokussiert auf Bestimmung der Tumorausdehnung, Fernmetastasen und eventuell vorliegender Zweitneoplasien. Radiologische Untersuchungen mittels Computer- und Magnetresonanztomografie, sowie Positronenemissionstomografien zum Nachweis befallener Lymphknoten und Fernmetastasen ergänzen die klinische Diagnostik [1, 19]. Die abschliessende Stadieneinteilung erfolgt nach TNM8-Klassifikation [10].

Die therapeutischen Konzepte unterscheiden sich je nach Lokalisation und Stadium des Tumors, sowie in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand des Patienten. In frühen Tumorstadien ist die alleinige operative Therapie oder Bestrahlung Therapie der Wahl. In fortgeschrittenen Tumorstadien kommen multimodale Therapieansätze zur Anwendung. Diese beinhalten verschiedene Kombinationen von chirurgischer Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie [20]. Zuletzt gab es große Fortschritte in der Immuntherapie mit *Epidermal-Growth-Factor-Receptor*(*EGFR*)-Inhibitoren und Checkpointinhibitoren [21].

Ziel der operativen Therapie ist ein weitgehender Erhalt der Organfunktion bei gutem onkologischem Ergebnis. Durch moderne Operationstechniken und Fortschritte im Bereich der mikrochirurgischen Gewebetransplantation sind auch bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Befund gute funktionelle Ergebnisse möglich [1]. Bei gesichertem oder vermutetem Befall der

Halslymphknoten wird die chirurgische Therapie ergänzt durch eine Entfernung der Halslymphknoten und des umgebenden Gewebes (*neck dissection*) [22].

Die Bestrahlungsdosis von Kopf-Hals-Tumoren liegt meist im Bereich zwischen 60 und 70 Gray. Durch Fraktionierung der Dosis können die Nebenwirkungen reduziert und spezifische Unterschiede in der DNA-Reparatur zwischen Tumorzellen und gesundem Gewebe genutzt werden. Fortschritte in der Modulation der Bestrahlungsfelder und Strategien für ausgewählte Patientengruppen die Bestrahlungsdosis zu minimieren reduzieren weiter das Risiko für Bestrahlungsschäden [20].

Der Goldstandard in der Chemotherapie von *HNSCC* sind Platinverbindungen. Diese entfalten ihre Wirkung durch Quervernetzung der DNA [23]. Auffällig bei Cisplatinverbindungen ist die Abhängigkeit zu DNA-Reparatursignalwegen: Durch Ausfall von DNA-Reparaturgenen reduziert sich das Auftreten von Therapieresistenzen [24]. Andere Wirkstoffgruppen, die häufig zur Anwendung kommen sind Antimetabolite, wie 5-Fluoruracil und Taxane [23].

Zunehmende Bedeutung erlangte in den letzten Jahren die Immuntherapie als gezielte Beeinflussung von Stoffwechselwegen und Zellfunktionen des Tumors. Bereits Eingang in die klinische Praxis hat hier die Verwendung von Cetuximab, einem chimären monoklonalen Antikörper gegen *EGFR*, gefunden [25]. Jüngster Fortschritt in der Therapie von Patienten mit fortgeschrittenen und metastasierten Kopf-Hals-Karzinomen ist die Zulassung der Checkpointinhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab. Immunmodulatorische Signalstoffe der Kopf-Hals-Karzinome blockieren über die Bindung des *Programmed-Cell-Death*-Proteins-1 (PD-1) die Immunantwort des Körpers und verhindern so die Elimination der Tumorzellen. Die Checkpointinhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab verhindern die Bindung und Aktivierung von PD-1 und ermöglichen so wieder eine adäquate Antwort des Immunsystems auf maligne Zellen [21].

Die Beeinflussung weiterer Signalwege der Tumorzellen, beispielsweise HER2, NOTCH1 oder MET-PIK3CA-MTOR, ist Gegenstand aktueller Forschung [26-28].

1.1.4 Tumorgenese

Die Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren wird beeinflusst von einem breiten Spektrum an Chromosomenaberrationen, Mutationen und Hoch- bzw. Herunterregulierung von unterschiedlichen Genen der Zellzykluskontrolle, Zelltod, Differenzierung und weiteren Zellfunktionen.

Hanahan und Weinberg beschreiben acht allgemeine Kennzeichen eines Tumors, die bei der Tumorgenese jedweder Entität in unterschiedlichem Maße eine Rolle spielen: Verhinderung des Zelltods (1), Förderung der Angiogenese (2), Aufrechterhaltung von Wachstumssignalen (3), Blockade von Signalen, die Zellwachstum verhindern (4), Gewebeinvasion und Fernmetastasierung (5), replikative Immortalität (6), Beeinflussung des zellulären Energiestoffwechsels (7) und Abwehr des körpereigenen Immunsystems (8) [29]. Zwei weitere Charakteristika von Tumorzellen tragen zur Erreichung dieser acht Ziele bei: Die Entzündungsreaktion des Immunsystems im Bereich von Krebsvorstufen fördert über verschiedene Wege die Tumorprogression und insbesondere genetische Instabilität und hohe Mutationsraten tragen zur Tumorgenese maßgeblich bei [29].

Im Kontext der Arbeit von Hanahan und Weinberg haben Bernstein et al. die molekularen Mechanismen der Tumorgenese für Kopf-Hals-Tumore zusammengefasst [30]. Abbildung 1 zeigt eine Auswahl der betroffenen Gene und Signalwege.

Abb. 1: **Tumorgenese von Kopf-Hals-Karzinomen**



Schlüsselmutationen und Beeinflussung ausgewählter Signalwege, die bei der Karzinogenese von *HNSCC* eine besondere Rolle spielen, im Kontext der Kennzeichen der Tumorgenese nach Hanahan und Weinberg [29]. verändert nach Bernstein et al. [30]

Wichtiges Merkmal ist die genetische Instabilität der *HNSCC*, die die weitere Karzinogenese forciert. Eine zentrale Rolle nehmen hier Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* ein [30]. Funktionsverluste in diesem, auch „Wächter des Genoms“ genannten Gen, erhöhen die Rate an Mutationen die eine Zelle toleriert, bevor die Apoptose induziert wird [30].

In bis zu 90% der Tumore kann die Überexpression von *Epidermal Growth Factor Receptor* (*EGFR*) als einem der wichtigsten Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden [30].

Weitere Schlüsselmutationen finden sich in Genen intrazellulärer Signalwege, wie *KRAS*, *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase* (*PI3K)*, *Humanes-Leukozyten-Antigen-1* (*HLA-1)*, *Mouse double minute 2 homolog (MDM2)* und *NOTCH1* [30].

Daten aus dem Cancer Genome Network zeigen die molekulargenetischen Unterschiede von 279 Kopf-Hals-Karzinomen [28]. Ein Subset aus 19 Genen zeigt häufige Veränderungen: *CDKN2A, FAT1, TP53, CASP8, AJUBA, PIK3CA, NOTCH1, KMT2D, NSD1, HLA-A, TGFBR2, HRAS, FBXW7, RB1, PIK3R1, TRAF3, NFE2L2, CUL3* und *PTEN* [28]. Zwei große Subgruppen können durch die Analyse unterschieden werden: Nicht nur molekulargenetisch, sondern auch therapeutisch und prognostisch unterscheiden sich HPV-positive von HPV-negativen Tumoren. Bei Tumoren, die mit HPV assoziiert sind, häufen sich Mutationen in *PIK3CA, TRAF3* und *E2F1* [28]. HPV-negative Tumore, assoziiert mit den klassischen Risikofaktoren zeigen Mutationen in *TP53* und *CDKN2A*, sowie vermehrt Chromosomenaberrationen, wie Amplifizierungen von 3q26/28 und 11q13/22 [28]. Eine Übersicht der betroffenen Gene und Signalwege im Vergleich von HPV-negativen und HPV-positiven Tumoren zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: **Nachweis betroffener Tumorgene in Kopf-Hals-Tumoren in Abhängigkeit vom HPV-Status**

Signalweg	HPV – (%)	HPV + (%)
Zellzyklus		
TP53	84	3
CDKN2A	58	0
Let-7c	40	17
PIK3CA	34	56
CCND1	31	3
EGFR	15	6
MYC	14	3
PTEN	12	6
FGFR1	10	0
HPV E6/E7	9	100
MET	2	0
E2F1	2	19
Differenzierung		
FAT1	32	3
TP63	28	19
NOTCH1	26	17
AJUBA	7	0
Zelltod		
FADD	32	6
CASP8	11	3
TRAF3	1	22
Oxidativer Stress		
NFE2L2	14	0

Die Tabelle zeigt den prozentualen Nachweis von Mutationen ausgewählter Tumorgene in Gewebe von Kopf-Hals-Tumoren. HPV- bezeichnet Tumore ohne, HPV+ Tumore mit Nachweis von Humanen-Papilloma-Viren. nach [20]

1.2 DNA-Reparatur

Durch Hitze, Strahlung, die Einwirkung von Stoffwechselprodukten oder exogenen Noxen und im Rahmen der Replikation entstehen täglich in jeder Zelle tausende Schäden an der DNA. Mutationen sind eine Triebfeder der Evolution, doch eine zu hohe Anzahl von DNA-Schäden hätte für die Zelle katastrophale Folgen. Deswegen hat sie eine Reihe von Reparaturmechanismen entwickelt, um diese Schäden zu beheben. Die Reparatur dieser Schäden ist für die Zelle von zentraler Bedeutung. Aus diesem Grunde sind bei Bakterien und Hefen große Teile des Genoms belegt durch Gene, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind [31]. Die Bedeutung für den Menschen zeigt sich in Krankheiten, die bei Ausfall der DNA-Reparatursysteme entstehen, wie hereditären Mamma- und Ovarialkarzinomen oder der Fanconi-Anämie. Bei diesen führen Mutationen in DNA-Reparaturgenen zu einer erhöhten Empfindlichkeit für UV-Strahlung und zur Entwicklung solider Tumore bereits in jungen Jahren [31].

Die häufigsten Schädigungsmechanismen sind Desaminierungen und Depurinierungen der Basen. Die Desaminierung von Cytosin führt zu Uracil. Bei der nächsten Replikation wird nun Adenin anstelle von Guanin in den Nachbarstrang eingebaut. Die Depurinierung von Adenin kann zu Deletionen des Basenpaares führen, wenn die fehlende Stelle bei der nächsten Replikation übersprungen wird. Durch UV-Strahlung bilden sich an benachbarten Pyrimidinbasen Dimere aus, welche die Replikation behindern können [32]. Weitere Schäden an den Basen entstehen durch Hydrolyse, oxidativen Stress und Methylierungen. Seltenere, für die Zelle aber gefährlichere Schäden sind Doppelstrangbrüche der DNA oder Quervernetzungen benachbarter Doppelstränge [32].

1.2.1 Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur

Die Mehrzahl der Reparaturmechanismen nutzt die Tatsache, dass durch die Doppelstrangstruktur der DNA bei Schäden an einem Strang die ursprünglichen Informationen auf dem Nachbarstrang erhalten bleiben. Dieser dient bei der Reparatur als Matrize um die korrekten Nukleotide einzufügen [32].

Bei der Basenexzisionsreparatur wird zuerst die veränderte Base aus dem Strang entfernt, danach das Phosphatrückgrat. Die Lücke wird durch eine DNA-Polymerase mit der korrekten Base aufgefüllt und der Strangbruch mittels einer DNA Ligase verschlossen [32].

Die Nukleotidexzisionsreparatur kommt bei größeren Läsionen zum Einsatz. Der Strang wird einige Basen oberhalb und unterhalb der betroffenen Stelle eingeschnitten. Die veränderten Basen werden mitsamt eines 25 bis 30 Basen umfassenden Oligonukleotids im Ganzen entfernt. Im Anschluss wird die entstehende Lücke durch DNA-Polymerase aufgefüllt und durch DNA-Ligase verschlossen [32].

1.2.2 Fotoreaktivierung

Durch UV-Einwirkung kommt es zu Dimerisierung benachbarter Pyrimidine. Für diese Schäden gibt es neben der Nukleotidexzisionsreparatur noch einen direkten Weg der Wiederherstellung. Bei der Fotoreaktivierung werden durch das Enzym Fotolyase in einer lichtabhängigen Reaktion die Dimere direkt wieder getrennt [33].

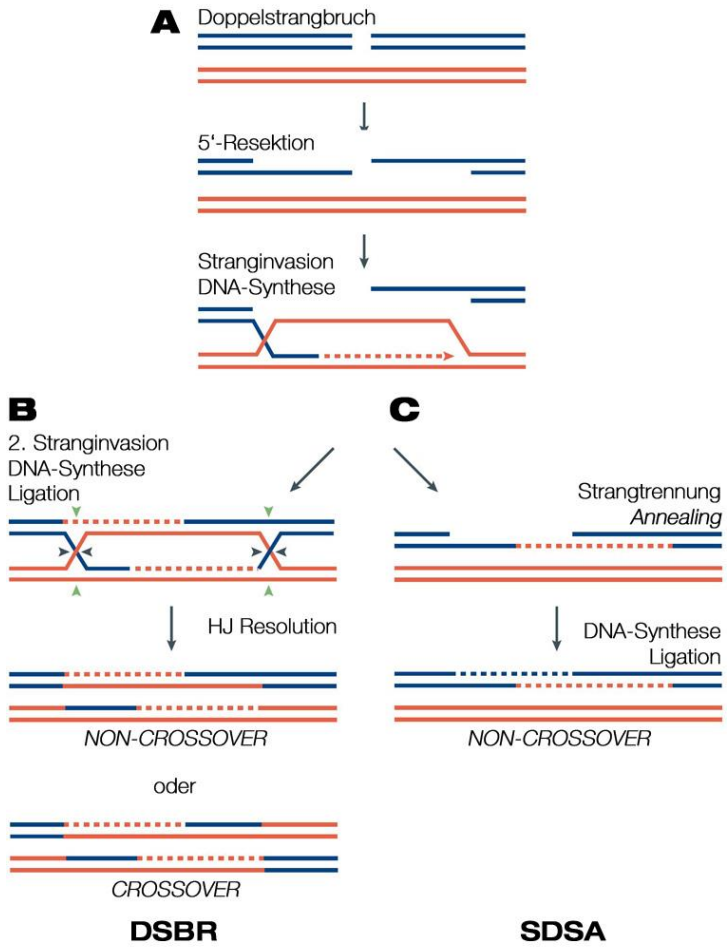
1.2.3 Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Deutlich gefährlicher und aufwendiger zu reparieren sind Doppelstrangbrüche der DNA. Diese werden durch ionisierende Strahlung ausgelöst, treten aber vor allem spontan im Rahmen der Replikation mit ungefähr 50 Doppelstrangbrüchen in der Zelle auf [34].
Bei der Reparatur kann nicht auf den Nachbarstrang zurückgegriffen werden, deshalb haben sich zwei spezialisierte Mechanismen gebildet, um Doppelstrangbrüche zu reparieren.
Der einfachere, von der Zelle hauptsächlich beschrittene Weg ist das *non-homologous-end-joining* (*NHEJ*). Hierbei werden die Enden der beiden Fragmente einfach wieder verknüpft. Durch den unvermeidlichen Verlust von Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen kommt es zwangsläufig zu Mutationen. Da jedoch nur ein kleiner Teil des Genoms aus proteinkodierender Sequenz besteht, überwiegt für die Zelle der Vorteil ihre Chromosomen auf diese Weise davor zu bewahren in kleine Fragmente zu zerfallen [32]. Die Telomere, die Enden doppelsträngiger DNA darstellen, werden durch spezielle Proteine vor der Veränderung durch *NEHJ* geschützt [35].
Deutlich aufwendiger aber effektiver ist das *homologous-end-joining*, auch homologe Rekombinationsreparatur genannt. Diese ist eng verknüpft mit der homologen Rekombination bei der Zellteilung. Dieser Mechanismus macht aus einem Doppelstrangbruch ein Paar aus zwei Einzelstrangbrüchen. Hierzu wird auf das Schwesterchromosom zugegriffen und die betreffende Region mit dem homologen Bereich auf diesem verknüpft [36].

Hier gibt es zwei unterschiedliche Wege, die *double-strand break repair* (*DSBR*) und *synthesis-dependent strand annealing* (*SDSA*), deren initialer Ablauf jedoch identisch ist [36]. Abbildung 2 zeigt einen schematischen Überblick über *DSBR* und *SDSA* und ihren gemeinsamen Beginn.

Zunächst werden mithilfe des MRN-Komplex, bestehend aus RAD50, MRE11 und NBS1, die 5‘-Enden an der Stelle des Doppelstrangbruches gekürzt. Zusätzlich besitzt der MRN-Komplex weitere regulatorische Funktionen [38]. An das freie 3‘-Ende bindet nun RAD51 unter Zuhilfenahme von RPA, einem Komplex der RAD51-Paraloge (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) und weiterer Proteine, wie BRCA2, RAD52 und RAD54. Mithilfe dieses Proteinkomplexes werden nun die homologen Sequenzen des Schwesterchromosoms erkannt und gebunden. Durch Ausbildung einer *D-Loop*-Struktur werden nun die homologen Sequenzen gepaart und die fehlende Sequenz anhand des homologen Stranges als Matrize synthetisiert. An dieser Stelle trennen sich die beiden Wege [36].

Abb. 2: **Schematische Darstellung der Reparatur von Doppelstrangbrüchen**



Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kann mithilfe der homologen Rekombination als *double-strand-break-repair* (*DSBR*) oder *synthesis-dependent-strand-annealing* (*SDSA*) erfolgen. **Figur A)** Beiden Varianten gemeinsam ist die initiale Resektion der 5‘-Enden und die Stranginvasion durch homologe Sequenzen, sowie DNA-Synthese des invadierenden Stranges. **Figur B)** Bei der *DSBR* kommt es nun zur erneuten Stranginvasion mit DNA-Synthese und Ausbildung einer Holliday-Struktur. Diese kann dann mit oder ohne *Crossover* aufgelöst werden**. Figur C)** Im *SDSA* trennen sich die homologen Bereiche nach der DNA-Synthese wieder und die noch bestehenden Lücken werden durch Synthese und Ligation aufgefüllt. Das Ergebnis hierbei ist immer ein *Non-Crossover*. modifiziert nach Sung und Klein [37]

***Double-strand break repair* (*DSBR*)**

Durch Einführung einer weiteren Kreuzungsstelle entsteht eine Holliday-Struktur. Noch fehlende Lücken des Strangs werden aufgefüllt. Die Auflösung der Holliday-Struktur führt nun je nach Schnittstellen zur einfachen Rekombinationsreparatur mit kleinen Bereichen die getauscht werden oder, was häufiger der Fall ist, zum *Crossover* der homologen Chromosomenabschnitte [39].

***Synthesis-dependent strand-annealing* (*SDSA*)**

Bei der *SDSA*-Reparatur wird der neu-synthetisierte Strang zurückverlagert, die Verbindung zum homologen Bereich gelöst und die verbleibende Lücke im Einzelstrangbruch des Nachbarstrangs geschlossen. Die homologen Bereiche des Schwesterchromosoms bleiben hierbei unverändert zurück [39].

1.2.4 Reparatur von DNA-Quervernetzungen

DNA-interstrand-crosslinks (*ICL*), also Quervernetzungen zweier benachbarter DNA-Stränge, entstehen durch natürliche Stoffwechselprodukte und verschiedene Chemotherapeutika, wie z.B. Platinverbindungen oder Alkylantien. Sie behindern die Replikation und Transkription, führen zu Chromosomenbrüchen und zum Zelltod [40].

Die Reparaturmechanismen unterscheiden sich je nachdem ob der Fehler in genomischer DNA, bei der Transkription oder bei der Replikation erkannt wird. Die Reparatur von *ICL* ist komplex. Daran beteiligt sind die Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur, die Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche, sowie zahlreiche weitere Proteinkomplexe, wie BRCA1, BRCA2, FANC-Proteine und RAD51-Paraloge [41].

1.3 Tumorprädisposition durch Keimbahnmutationen

1.3.1 DNA-Reparatur im Fanconi-Signalweg und Onkogenese

Der Fanconi-Anämie-Signalweg und seine assoziierten Gene sind Teil der homologen Rekombinationsreparatur von Doppelstrangbrüchen und weiterer DNA-Reparaturmechanismen [36, 41]. Mutationen in den beteiligten Genen erhöhen die genomische Instabilität der Zelle und befördern die Entwicklung einer Vielzahl von Tumoren. Ein prominentes Beispiel ist die zentrale Rolle von Mutationen in *BRCA1* und *BRCA2* in der Onkogenese von Brust- und Ovarialkarzinomen, sowie Pankreaskarzinomen [42, 43]. Mutationen in *FANCD1*, *FANCJ*, *FANCC* und *FANCE* sind an der Entstehung von kolorektalen Karzinomen beteiligt [44]. Mutationen in *RAD51C* werden mit Kopf-Hals-Karzinomen und Brustkrebs in Verbindung gebracht [18, 45]. Für *RAD51D* sind Assoziationen zu Tumoren der Brust, der Ovarien, des Uterus und der Prostata beschrieben [46-50].

1.3.2 Fanconi-Anämie und Kopf-Hals-Karzinome

Die Fanconi-Anämie ist ein Syndrom der chromosomalen Instabilität durch Keimbahnmutationen in Genen, die Teil der DNA-Reparatursignalwege sind. Es sind eine Vielzahl von Genen bekannt, die zur Ausprägung der Erkrankung führen (bspw. *FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, BRCA2, RAD51C)* [51, 52]. Klinisch ist die Fanconi-Anämie charakterisiert durch kongenitale Fehlbildungen, fortschreitende aplastische Anämie, endokrine Auffälligkeiten und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNA-quervernetzenden Agentien [53].

Eine Besonderheit bei Patienten, die von Fanconi-Anämie betroffen sind, ist das im Vergleich zur Normalbevölkerung 50fach erhöhte Risiko solide Tumore zu entwickeln [54]. Neben Tumoren der Leber, des Ösophagus, des Uterus und der Vulva ist insbesondere das Risiko für Kopf-Hals-Karzinome deutlich erhöht. Im Vergleich zu Betroffenen mit sporadischen *HNSCC* sind Patienten mit Fanconi-Anämie bei der Erstdiagnose des Kopf-Hals-Tumors deutlich jünger (in der Regel vor dem 50. Lebensjahr) und weisen selten die typischen Risikofaktoren, wie Nikotin- und Alkoholabusus auf [54]. Chandrasekharappa et al. konnten in einem Kollektiv aus 417 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen erhöhte Mutationsraten in drei Genen des Fanconi-Signalwegs nachweisen: FANCE, FANCD2 und FANCL [52].

1.3.3 *RAD51C* und Kopf-Hals-Karzinome

RAD51C ist eines von fünf Paralogen (*RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3*) im DNA-Reparaturweg der homologen Rekombination und involviert in die Pathogenese der Fanconi-Anämie [45]. Ausgehend von der Beobachtung, dass Fanconi-Patienten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung solider Tumore aufweisen, konnten Scheckenbach et al. in einem Kollektiv aus 121 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren bei einer Patientin eine Keimbahnmutation (pV236del44) mit deletärem Einfluss auf die Proteinfunktion nachweisen [18]. Hierdurch rücken *RAD51C* und assoziierte Gene aus dem DNA-Reparatursignalweg in den Fokus der Tumorgenese bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen.

1.4 Das DNA-Reparaturprotein RAD51D

RAD51D ist ein Protein aus der Gruppe der DNA-Reparaturproteine. Im Signalweg der homologen Rekombinationsreparatur, die Doppelstrangbrüche behebt, ist es Teil des BCDX2-Komplexes, bestehend aus RAD51B/RAD51C/RAD51D und XRCC2. Dieser Komplex ist involviert in die Paarung einzelsträngiger DNA mit ihren homologen Sequenzen des Tochterchromosoms. Ebenso ist es an der Rekrutierung von RAD51A, einem initialen Schritt der Doppelstrangbruchreparatur, beteiligt [55]. Weitere Funktionen übt RAD51D bei der Erhaltung der Telomere aus [56].

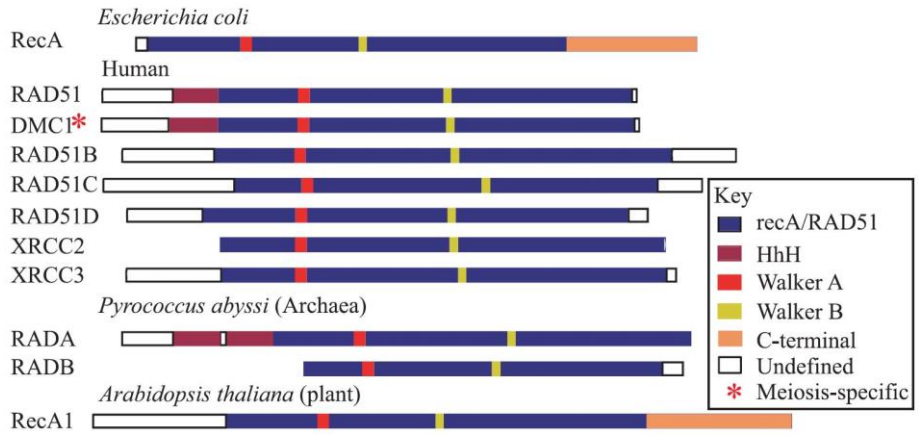
Der offizielle Name lautet RAD51 paralog D. Verschiedene Synonyme sind in Verwendung. Dazu gehören RAD51D, TRAD, RAD51L3, BROVCA4, R51H3 und Rad51-like Protein 3 (nach *Human Gene Nomenclature Committee*).

Der Name RAD steht für "*radiation sensitive*" und entstand aus der Beobachtung von mutierten Hefen. Auf der *IVth International Yeast Genetic Conference* (1970) wurde festgelegt Genloci, deren Mutation die Empfindlichkeit für Röntgenstrahlung erhöhen, mit der Bezeichung RAD zu versehen und von 50 aufwärts zu beziffern [57].

RAD51D und seine Homologe sind evolutionär hochkonserviert. Die zentrale Domäne, ein Bereich namens RecA von ungefähr 230 Aminosäuren, lässt sich in phylogenetischen Studien bei einer Vielzahl von Organismen bis hin zu Archaebakterien nachweisen. Möglicherweise entspringen die *RecA*-Gene früher Eukaryoten einem Endosymbiontentransfer aus Mitochondrien und Chloroplasten. Basierend auf diesen gemeinsamen frühen Vorfahrengenen haben sich im Laufe der Evolution weite Teile des Gens über Bakterien, Hefen, Pflanzen und Tiere erhalten. Dies weist auf die essenzielle Funktion für den Organismus hin [58].

Abbildung 3 zeigt einen schematischen Vergleich der Bereiche der verschiedenen Homologe beim Menschen und im Vergleich mit anderen Spezies.

Abb. 3: **Strukturvergleich verschiedener RecA/RAD51-like Proteine**



Dargestellt ist der Vergleich der Domänenstruktur von RecA/RAD51-like Proteinen verschiedener Spezies. Beispielhaft wurden Escherichia coli, Pyrococcus abyssi, Arabidopsis thaliana und mehrere Paraloge der RAD51-Familie beim Menschen gewählt. Die Domänennamen werden im Kasten erläutert. Nach Lin et al. [58]

Beim Menschen sind fünf Paraloge des *RAD51* bekannt (*RAD51B / RAD51C / RAD51D / XRCC2 / XRCC3*). Paraloge sind Varianten eines Gens, die innerhalb eines Genoms durch Duplikation und weitere Veränderungen aus einem Vorläufer entstanden sind. Die Paraloge des *RAD51* liegen auf verschiedenen Chromosomen und ähneln sich stark in ihrer Struktur, besitzen aber durchaus unterschiedliche Funktionen. Allen gemeinsam ist ihre Schlüsselposition in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen [59].

In schwacher Ausprägung wird *RAD51D* in allen Geweben exprimiert, auffällig ist eine 5-10fache Überexpression im Hoden [60]. In Kolon, Dünndarm, Milz, Ovarien, Hoden, Prostata und Thymus wurden auch alternative Transkripte nachgewiesen [61].
Die subzelluläre Lokalisation des exprimierten Proteins befindet sich im Nucleus [62].

Das codierende Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 17q12. Es reicht von Position 35,092,208 bis 35,121,522 (GRCh38:CM000679.2) und enthält insgesamt 11 Exons (NCBI-Referenzsequenz NG_031858.1). Die Translation der Isoform 1 ergibt ein Protein mit einer Gesamtlänge von 328 Aminosäuren (NCBI Referenzsequenz NP_002869.3).

Abbildung 4 zeigt eine Darstellung des RAD51D-Proteins und seiner Domänen.

Die Aminosäuren 1 bis 83 bilden eine Untereinheit zur Bindung von einzelsträngiger DNA. Diese Untereinheit bildet vier kurze Helixstrukturen aus und die Aminosäuren 1 bis 13 sind mittels hydrophober Wechselwirkungen in ihrer Position fixiert. Mithilfe positiv geladener Seitenketten und hydrophober Wechselwirkungen bindet die Domäne vorwiegend Einzelstrang-DNA anstelle von Doppelstrang-DNA oder Holliday-*Junctions* [63].

Die N-terminale Domäne mit den Aminosäuren 4 bis 77 ist involviert in die Bindung an XRCC2 und damit die Ausbildung des BCDX2-Komplexes. Die C-terminale Domäne mit den Aminosäuren 77 bis 328 bindet RAD51C und ist beteiligt an der Ausbildung des CX3-Komplexes im Rahmen der homologen Rekombination [64].

Die Aminosäuren 82 bis 317 bilden die Domäne der „RecA-like_NTPases“. Diese Bereiche sind hochkonserviert und ähneln bakteriellen und weiteren RecA-Domänen, die über Speziesgrenzen hinweg große Analogien aufweisen und in der homologen Rekombination involviert sind (CDD 333705) [65].

Abb. 4: **Domänenstruktur des DNA Reparaturproteins RAD51 Homolog 4 Isoform 1**



Maßstabsgetreue Darstellung der Domänenstruktur des 328 Aminosäuren umfassenden Proteins. **XRCC2-binding:** Die Aminosäuren 4 bis 77 sind beteiligt an der Bindung von XRCC2 und Ausbildung des BCDX2-Komplexes. **RAD51C-binding:** Die Region der Aminosäuren 77 bis 328 interagiert mit RAD51C und bildet somit den CX3-Complex aus. **ssDNA-binding:** Die Region der Aminosäuren 1 bis 83 bindet einzelsträngige DNA. **RecA-like_NTPases:** Evolutionär hochkonservierter Bereich der Aminosäuren 82 bis 317 mit Analogien zu bakteriellen RecA-Domänen.

ATP-Bindungsstelle, Walker-A-Motiv

Die Aminosäuren 107 und 108, sowie 112 bis 114 bilden zusammen ein Walker-A-Motiv aus. Dies ist ein *P-Loop* mit folgender universeller Aminosäuresequenz: (G/A)XXXXGK(T/S). Walker-A-Motive sind wichtige Strukturen für die Bindung von Triphosphaten (CDD 238540) [65]. An den Aminosäuren 108, 112 bis 114, 134, 136 bis 137 und 197 befinden sich ATP-Bindungsstellen (CDD 238540) [65].

1.5 Ziele der Arbeit

Keimbahnmutationen in DNA-Reparaturgenen sind an der Entstehung einer Vielzahl von Tumoren beteiligt, darunter auch Karzinome epithelialen Ursprungs. Patienten mit Fanconi-Anämie entwickeln im Vergleich zur Normalbevölkerung vermehrt Kopf-Hals-Karzinome. Defekte der DNA-Reparatur im Bereich des Fanconi-Signalweges tragen insofern zur genetischen Prädisposition für solide Tumoren bei. Scheckenbach et al. konnten für eine Keimbahnmutation in *RAD51C*, einem der Gene des Fanconi-Anämie-Signalweges, eine prädisponierende Rolle bei der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen nachweisen. Mutationen in *RAD51D*, einem Paralog von *RAD51C*, spielen bei der Entwicklung von Prostata-, Brust- und Ovarialkarzinomen eine Rolle. Bisher nicht etabliert ist die Verknüpfung mit Kopf-Hals-Karzinomen.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Beitrag von Keimbahnmutationen in *RAD51D* bei der Onkogenese von *HNSCC* im Rahmen eines Mutationsscreening innerhalb einer Population von 127 Patienten mit histologisch gesicherten Kopf-Hals-Karzinomen und anschließender „*in silico*“-Analyse der gefundenen Sequenzvarianten.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Für die vorliegende Arbeit wurde DNA aus Lymphozyten des peripheren Bluts von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen untersucht.

Einschlusskriterium war die gesicherte histologische Diagnose eines anteiligen oder vollständigen Plattenepithelkarzinoms im Bereich der Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Nasopharynx, Larynx oder eines CUP-Syndroms im Kopf-Hals-Bereich mit histologisch gesichertem Plattenepithelkarzinom oder Anteilen eines Plattenepithelkarzinoms.

Die untersuchten Blutproben wurden von Patienten im Rahmen stationärer Aufenthalte zur Diagnostik und Therapie oder im Rahmen der Tumornachsorge in der Ambulanz in EDTA-Röhrchen abgenommen.

Alle Patienten wurden vor der Teilnahme an der Studie mündlich und schriftlich aufgeklärt. Nach der Abnahme erfolgte eine Pseudonymisierung der Proben vor der Weiterverwertung. Die Voten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sind unter den Studiennummern 2661, 3515 und 4698R einzusehen.

2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion der Patientenproben erfolgte mit dem QIAamp 96 DNA Blood Kit. Einzelne Proben wurden mit dem QIAamp DNA Mini Kit verarbeitet. Die DNA-Konzentration im Eluat wurde im Nanodrop™-Photometer (Fa. Thermo Fisher Scientific, Wilmington USA) bestimmt.

2.2.1 QIAamp DNA Mini Kit

Die Extraktion der DNA aus Vollblut mithilfe des QIAamp Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden Deutschland, Cat. No. 51306) erfolgte gemäß Protokoll.

Im ersten Lyseschritt wurde RNAse hinzugefügt. Die aufgereinigte DNA wurde in 100µl destilliertem Wasser eluiert.

2.2.2 QIAamp 96 DNA Blood-Kit

Die Extraktion der DNA aus Vollblut erfolgte mithilfe des QIAamp 96 DNA Blood Kit (Fa. Qiagen, Hilden Deutschland, Cat. No. 51161).

Bei vier Zentrifugationsschritten fordert das Protokoll 6000rpm. Aufgrund technischer Limitationen der verwendeten Zentrifuge reduzierten wir in Rücksprache mit der Firma Qiagen auf 3360rpm und verlängerten die jeweiligen Zentrifugationszeiten von zwei auf vier Minuten, von vier auf acht Minuten und von 15 auf 25 Minuten. Im Anschluss wurde die DNA in 100µl Puffer AE eluiert.

2.3 Primer

Passende Primersequenzen wurden ausgewählt mithilfe von Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3/; Untergasser, Cutcutache [66]). Tabelle 2 zeigt die verwendeten Primer.

Tabelle 2: **Primersequenzen zur Amplifizierung von RAD51D**

	Sequenz (5'->3')	**Tm [°C]**	**MW**	**GC-Gehalt**
Exon 1 und 2 F	gatgacccccagccctacccttggtgccgcctcctcctc	>75	1171	69,2%
Exon 1 und 2 R	cccagactgctcagcaacaaattgcccgtagaagctggcatc	>75	1283	54,8%
Exon 3 F	aacaaaagtccatcccaagccaaagg	63,2	7935	46,2%
Exon 3 R	gacccctttccttcccatccattattggtt	66,8	9009	46,7%
Exon 4 F	acagaaccagtgcttgaaag	55,3	6159	45%
Exon 4 R	ccattagtacgctgaagctc	57,3	6076	50%
Exon 5 F	gactcagcccatttgtgttg	57,3	6098	50%
Exon 5 R	caacccaaattcttacaatg	51,2	6028	35%
Exon 6 F	caggtgcctcttccttctca	59,4	5994	55%
Exon 6 R	gtctgtagtaggacacctgc	59,4	6132	55%
Exon 7 F	gatagaaaagcaagcttgtc	53,2	6174	40%
Exon 7 R	gctggccagagaccagactc	63,5	6111	65%
Exon 8 F	cgcctcccagctctggagtc	65,5	6029	70%
Exon 8 R	ttcagaagctgacatttaag	51,2	6140	35%
Exon 9 F	gtgctaggcctctgttttcc	59,4	6065	55%
Exon 9 R	cttctcgaagacatctgtgg	57,3	6107	50%
Exon 10 F	cagatgtcttcgagaagaac	55,3	6150	45%
Exon 10 R	tagtcaccagtgccaggtggcagta	66,3	7707	56%

Dargestellt sind jeweils die Sequenzen und Eigenschaften der verwendeten Primer zur DNA-Amplifizierung. Die Exone 1 und 2 wurden mit einem Primerpaar gemeinsam amplifiziert.
F: Forward-Primer **R:** Reverse-Primer. **Tm:** Schmelztemperatur, **MW:** Molekulargewicht in gramm/mol, **GC-Gehalt:** Prozentualer Anteil der Guanin-Cytosin-Brücken

Die Spezifität der Primersequenzen wurde vorab mittels *In-Silico-PCR* (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr; [67]) kontrolliert. Die Amplifikation von Exon 1 und 2 gelang mit einem gemeinsamen Primerpaar. Die Primer wurden auf eine Konzentration von 10pmol/µl aliquotiert.

2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die DNA-Amplifizierung wurde das PCR Master Mix Kit (Fa. Qiagen, Hilden Deutschland, Cat. No. 201445) verwendet.

Das Gesamtvolumen je Probe betrug 25µl. Hierin enthalten waren 12,5µl Mastermix, 1µl Vorwärtsprimer (10pmol/µl), 1µl Rückwärtsprimer (10pmol/µl) und 130ng DNA-*Template*.

Für die PCR wurde der Thermocycler T3 (Fa. Biometra, Göttingen Deutschland) verwendet. Einen Überblick über die weiteren Parameter der Amplifizierungsreaktionen gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: **PCR-Bedingungen zur Amplifikation von RAD51D**

Exon	Fragmentlänge	Denat	Anneal	Elongation	Cycles	LastEx
1 und 2	1157bp	94°C 30"	68°C 30"	72°C 60"	35	72°C 10'
3	380bp	94°C 30"	55°C 30"	72°C 45"	35	72°C 10'
4	278bp	94°C 30"	57°C 30"	72°C 45"	35	72°C 10'
5	321bp	94°C 30"	57°C 30"	72°C 45"	35	72°C 10'
6	261bp	94°C 30"	57°C 30"	72°C 45"	35	72°C 10'
7	245bp	94°C 30"	59°C 30"	72°C 45"	35	72°C 10'
8	238bp	94°C 30"	55°C 30"	72°C 45"	35	72°C 10'
9	340bp	94°C 30"	57°C 30"	72°C 45"	35	72°C 10'
10	287bp	94°C 30"	57°C 30"	72°C 45"	35	72°C 10'

Die Annealing-Temperaturen wurden für jedes Exon optimiert. Im Anschluss an 35 Amplifizierungszyklen wurde bei jeder PCR noch eine zehnminütige Extensionsphase zum Abschluss durchgeführt.
bp: Basenpaare, **Denat:** Denaturierung, **Anneal:** Annealing, **LastEx:** Extension zum Abschluss der Amplifizierung, **":** Sekunden, **':** Minuten

2.5 Gelelektrophorese

Die PCR-Ergebnisse wurden mittels Gelelektrophorese in 1% Agarosegel (LE Agarose, Biozym) auf Tris-Acetat-EDTA-Basis (TAE) mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid kontrolliert. Jeweils 5µl Probe und 1µl 10x-Ladepuffer wurden auf das Gel aufgetragen.

Der TAE-Puffer enthielt 242g TRIS-Base, 57,1ml Essigsäure und 100ml 0,5M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in einem Zielvolumen von einem Liter destilliertem Wasser. Zur Herstellung des 10fach-Ladepuffers wurden 250mg Bromphenolblau, 250mg Xylene Cyanol, 33ml 150mM Tris (pH 7,6) und 60ml Glycerin in 100ml destilliertem Wasser gelöst.

Als Größenreferenz diente der Marker DNA Ladder 100bp (Fa. Invitrogen, Carlsbad USA, Cat. No. 15628-050).

2.6 PCR-Aufreinigung

2.6.1 ExoSAP-IT®

Die Entfernung der überschüssigen Primer und Nukleotide aus der PCR-Reaktion erfolgte für den Großteil der Proben mithilfe von ExoSAP-IT® (Fa. Affymetrix, Santa Clara USA, Cat. No. 78200) nach Protokoll. 4µl PCR-Produkt wurden mit 1µl ExoSAP-IT®–Reagens vermischt. Im ersten Schritt wurde die Probe bei 37°C für fünfzehn Minuten inkubiert, um Primer und einzelsträngige DNA zu lysieren. Anschließend folgte eine Inkubation über fünfzehn Minuten bei 80°C, um die im ExoSAP-IT® enthaltene Exonuklease I und die Shrimp Alkaline Phosphatase zu inaktivieren.

2.6.2 QIAquick PCR Purification Kit

Die Entfernung von Primern und Nukleotiden aus den PCR-Produkten der restlichen Proben wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden Deutschland, Cat. No. 28106) gemäß Protokoll durchgeführt. Nach Bindung der DNA an eine Kieselgelmatrix wurden zwei Waschschritte mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt.

Im Anschluss daran wurde die aufgereinigte DNA in 30µl destilliertem Wasser eluiert.

2.7 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit (Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham USA, Cat. No. 4337455). Initial wurde die Temperatur für eine Minute auf 96°C eingestellt. Es folgten 25 Zyklen mit 96°C für zehn Sekunden, 55°C für 50 Sekunden und 60°C für vier Minuten. Abschließend wurde die Temperatur für sieben Minuten auf 60°C gehalten, bevor zum Ende des Programms auf 4°C heruntergekühlt wurde.

2.8 Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion

Im Anschluss an die Sequenzierungs-PCR erfolgte die Aufreinigung der Proben mithilfe des DyeEx 2.0 Spin Kit (Fa. Qiagen, Hilden Deutschland, Cat. No. 63206) gemäß Protokoll. Zunächst wurde eine Gelmatrix aufgebaut. Im Anschluss daran wurden über diese Matrix die Proben aus der Sequenzierungs-PCR zentrifugiert, um überschüssige Didesoxynukleosidtriphosphate zu entfernen.
Die aufgereinigten Proben wurden jeweils in 15µl Hi-Di™-Formamid (Applied Biosystems™, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) eluiert.

2.9 Sequenzierung Seqlab/BMFZ

Die Mehrheit der Patientenproben wurde mithilfe der Firma Seqlab (Seqlab Sequence Laboratories, Göttingen Deutschland) sequenziert. Einzelproben, Testläufe und die Sequenzierung der Komplementärsequenz zur Bestätigung von Mutationen wurden im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.
Proben für die Firma Seqlab wurden nach der Amplifikations-PCR mit ExoSAP-IT® (siehe Kapitel 2.6.1) aufgereinigt, die erforderliche DNA-Konzentration eingestellt und mit Primern für die Sequenzierungsreaktion versetzt. Die weiteren Schritte erfolgten im Labor von Seqlab. Zur Sequenzierung-PCR wurde dort das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham USA, Cat. No. 4337455) verwendet. Die verwendete Sequenziermaschine zur Sanger-Sequenzierung war der ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems™, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham USA).
Die Proben für das BMFZ wurden nach der Amplifizierungs-PCR mit dem QIAquick PCR Purification Kit (siehe Kapitel 2.6.2) aufgereinigt. Anschließend wurde die Sequenzierungs-

PCR zur Sequenzierung nach Sanger (siehe Kapitel 2.7) durchgeführt und zur Optimierung der Resultate mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (siehe Kapitel 2.8) behandelt. Im BMFZ wurden diese Proben dann im Sequenziergerät ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) analysiert.

2.10 Sequenzanalyse

2.10.1 Referenzsequenzen

Untersucht wurde das Gen für das DNA Reparaturprotein RAD51D Homolog 4. Die NCBI Referenzsequenz auf genomischer Ebene lautet NG_031858.1.

Die Beschreibung der Veränderungen auf Genom-, RNA- und Proteinebene folgt der Nomenklatur der *Human Genome Variation Society* in der Version 15.11 (http://varnomen.hgvs.org, den Dunnen [68]). Im Einklang hiermit wurden Änderungen der Nukleotidsequenz, deren klinische Bedeutung noch nicht nachgewiesen wurde, als „Sequenzvarianten“ oder „Varianten“ beschrieben, um die pathologische Konnotation des Begriffes „Mutation“ zu vermeiden.

Als Referenzsequenz der mRNA von RAD51D wurde die Isoform 1 (NM_002878.3) gewählt, diese wird als die vollständige und kanonische Form beschrieben. Bei der Nummerierung der Basensequenz wurde ATG=1 gesetzt. Die Domänen der dazugehörigen Proteinsequenz (NP_002869.3) folgen der Nummerierung gemäß *Conserved Domain Database* (CDD) von Marchler-Bauer [65].

Die vergleichenden Proteinalignments wurden mit folgenden Spezies durchgeführt:

Schimpanse	(Pan troglodytes XP_001174459.1)
Haushund	(Canis lupus familiaris XP_548263.2)
Rind	(Bos taurus NP_001039769.1)
Hausmaus	(Mus musculus NP_035365.1)
Wanderratte	(Rattus norvegicus NP_001100499.1)
Huhn	(Gallus gallus NP_001185575.1)
Krallenfrosch	(Xenopus tropicalis NP_001005687.1)
Zebrabärbling	(Danio rerio NP_996959.2)

Eine vollständige Auflistung der Proteinsequenzen aller Spezies zeigt Tabelle 7 im Anhang.

2.10.2 Software

Die Vergleiche von Referenz- und Patientensequenzen wurden mit CodonCode Aligner 4.2.5 (Fa. CodonCode Corporation, Centerville USA) durchgeführt.

Zur Generierung der Aminosäuresequenz der mutierten Proteine aus den sequenzierten Patientendaten wurde die Software DNAman 4.11 (Fa. Lynnon, Quebec Canada) verwendet.

Für die grafische Darstellung der Chromatogramme wurde Chromas 2.6 verwendet (Fa. Technelysium Pty Ltd, South Brisbane Australia).
Die Proteinalignments wurden mit Clustal Omega durchgeführt (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/; EMBL-EBI European Bioinformatics Institute; Cambridgeshire United Kingdom; Sievers, Wilm [69]).

Die funktionelle Relevanz der gefundenen Sequenzvariationen wurde mit PolyPhen-2 v2.1.0 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/, [70]) und PROVEAN v1.1.3 (http://provean.jcvi.org/index.php, Choi, Sims [71]) untersucht.
PolyPhen-2 vergleicht bekannte Sequenzen aus mehreren Datenbanken und setzt diese in Relation zu Informationen über Struktur, Phylogenetik und bekannten Mutationen des untersuchten Proteins. Die Vorhersage wird in die Kategorien „*benign*“, „*possibly damaging*“ und „*probably damaging*“ eingeteilt. Unterschieden werden zwei Angaben: „HumVar“ eignet sich besonders für die Unterscheidung von Mutationen mit drastischen Effekten im Rahmen von klar definierten Erbkrankheiten zur Abgrenzung von harmlosen Sequenzvarianten. Das „HumDiv“-Modell evaluiert seltene Allele in Genloci, die in komplexe Phänotypen und Sequenzdaten, bei denen selbst geringe Auswirkungen auf die Proteinfunktion deletäre Effekte haben können, involviert sind. Für die Wahrscheinlichkeit der Annahme einer schädigenden Mutation bei reell unschädlicher Mutation liegt dem HumVar-Modell eine Falsch-Positiv-Rate von 10% und dem HumDiv-Modell eine Rate von 5% zugrunde.
PROVEAN errechnet einen Punktwert durch Clusteranalyse bekannter Sequenzen aus der NCBI NR Protein Datenbank. Bei einem definierten Schwellenwert von -2,5 werden Punktwerte über diesem Wert als „neutral“ und kleiner als -2,5 als „schädlich“ bezeichnet.

Ergänzende Informationen zur Bewertung der klinischen Relevanz gefundener Sequenzvarianten wurden aus der ClinVar-Datenbank entnommen. Dort werden die Varianten in fünf Kategorien eingeteilt: „*benign*“, „*likely benign*“, „*uncertain significance*“, „*likely pathogenic*“ und „*pathogenic*“ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ [72]).

Die Proteinmodelle, Sekundärstrukturen und Dateien im *Protein-Data-Bank-Format* (.pdb) zur weiteren Analyse wurden mit Phyre 2 Protein Fold Recognition Server generiert (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index; [73]).

Die Erstellung der Proteinbilder und Analysen der dreidimensionalen Struktur des Wildtyp-Proteins und der durch die jeweiligen Mutationen entstehenden Proteine wurden mit UCSF Chimera 1.10.2 durchgeführt (http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera, Pettersen, Goddard [74]). Chimera wurde entwickelt von der Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics der Universität Kalifornien, San Francisco (unterstützt von NIGMS P41-GM103311).

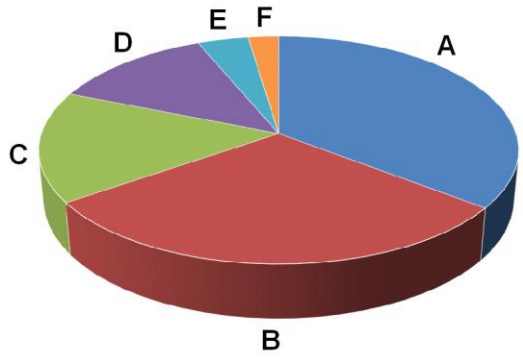
3 Ergebnisse

3.1 Patienten

Von 154 Blutproben wurden 27 ausgeschlossen aufgrund unpassender Tumorentitäten oder unzureichender Qualität der Blutproben für die weitere Aufarbeitung.

In die Auswertung gingen die Ergebnisse von 127 Patienten ein. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose betrug 59,16 Jahre (Median 60,00 Jahre) mit einer deutlichen Mehrheit an Männern (n=106, 83,5%). Der jüngste Patient war 31 Jahre alt, der älteste 82 Jahre. Die häufigste Tumorlokalisation in der untersuchten Patientenpopulation war das Oropharynxkarzinom (n=45, 35,4%), gefolgt vom Larynxkarzinom (n=38, 29,9%). Etwas seltener trat ein Mundhöhlen- und Hypopharynxkarzinom auf. Mit nur jeweils fünf beziehungsweise drei Patienten waren das Nasopharynxkarzinom und Metastasen bei unbekanntem Primarius am seltensten vertreten. Abbildung 5 zeigt die Verteilung der Tumorentitäten in der Studienpopulation. Die häufigste Tumorausbreitung bei Erstdiagnose war das T2-Stadium (34,6%), in einem frühen T1-Stadium befanden sich 22% der Patienten. Etwas weniger als die Hälfte der Patienten hatte keinen initialen Lymphknotenbefall. Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose wurden lediglich bei 4 Patienten (3,1%) festgestellt.

Abb. 5: **Verteilung der Tumorentitäten in der Studienpopulation**



Gesamtzahl Patienten n=127

A Oropharynxkarzinom	35,4 % (n=45)
B Larynxkarzinom	29,9% (n=38)
C Mundhöhlenkarzinom	15,7% (n=20)
D Hypopharynxkarzinom	12,6% (n=16)
E Nasopharynxkarzinom	3,9% (n=5)
F CUP-Syndrom	2,4% (n=3)

Weitere Merkmale der untersuchten Patientengruppe zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: **Epidemiologische Details der Studienpopulation**				
TNM-Stadium bei Diagnose				
T Tumorausdehnung	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**
	28 (22,0%)	44 (34,6%)	27 (21,3%)	25 (19,7%)
N Lymphknotenstatus	**N0**	**N1**	**N2**	**N3**
	56 (44,1%)	20 (15,7%)	48 (37,8%)	3 (2,4%)
M Fernmetastasen	**M0**	**M1**	**Mx**	
	122 (96,1%)	4 (3,1%)	1 (0,8%)	
R Residualtumor nach OP	**R0**	**R1**	**R2**	**Rx**
	83 (65,4%)	16 (12,6%)	1 (0,8%)	27 (21,3%)
G Grading	**G1**	**G2**	**G3**	**G4**
	3 (2,4%)	102 (80,3%)	21 (16,5%)	1 (0,8%)
Therapie	**CTX**	**Radiatio**	**Operation**	
	70 (55,1%)	99 (78%)	108 (85%)	
Weitere HNO-Tumore	15 (11,8%)			
Weitere Tumore (außer HNO)	29 (22,8%)			
Geschlecht	**männlich**	**weiblich**		
	106 (83,5%)	21 (16,5%)		
Alter bei Diagnose [Jahre]	**Mean**	**Median**	**Min.**	**Max.**
	59,16	60	31	82
HPV-Status	**positiv**	**negativ**	**unbekannt**	
	19 (15%)	22 (17,3%)	86 (67,7%)	
Alkoholkonsum	**niedrig**	**mittel**	**hoch**	
	51 (40,2%)	28 (22%)	48 (37,8%)	
Nikotinkonsum [packyears]	**Mean**	**Median**	**Min.**	**Max.**
	38,91	35	0	160

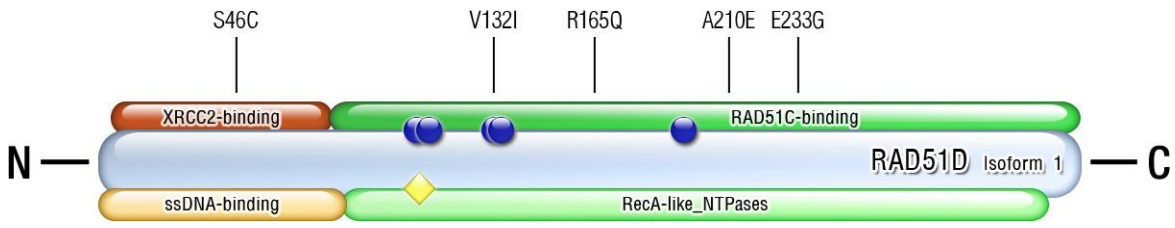
Die Tabelle zeigt die epidemiologischen Daten der Studienpopulation in absoluten Zahlen und prozentual. Die Ergebnisse von 127 Patienten gingen in die Untersuchung ein. **CTX:** Chemotherapie **HPV-Status:** Nachweis von p16-Expression im Tumorgewebe als Marker für die Infektion mit Humanen-Papilloma-Viren **Mean:** Mittelwert **Min.:** Niedrigster Wert **Max.:** Höchster Wert **Alkoholkonsum:** Die Einstufung des Alkoholkonsums in den Kategorien niedrig (<12,5g/d reinen Alkohol), mittel (>12,5g/d bis <50g/d) und hoch (>50g/d) folgt der Einteilung von Islami et al. (Islami, Fedirko [75])

3.2 Zusammenfassung der gefundenen Sequenzvarianten

In der Analyse von 127 Patienten wurden insgesamt 46 Sequenzvarianten bei 36 Patienten gefunden. Diese lassen sich in sechs unterschiedliche Nukleotidaustausche unterteilen. Mit Ausnahme von einer Mutation bei zwei Patienten waren alle Sequenzvarianten in heterozygoter Form nachzuweisen. Bei einem Patienten wurde die Sequenzvariante S46C in Exon 2 nachgewiesen. In Exon 3 konnte bei 12 Patienten eine stille Mutation ohne Änderung der Aminosäuresequenz an Position 137 (ATG=1) gezeigt werden. Ein Patient besaß die Sequenzvariante V132I in Exon 5. Insgesamt 29 Patienten trugen die Sequenzvariante R165Q in Exon 6, davon 2 Patienten in homozygoter Form. Weiter konnte bei einem Patienten in Exon 7 die Variante A210E und bei zwei Patienten in Exon 8 die Variante E233G gefunden werden. In den Exons 1, 4, 9 und 10 wurden keine Sequenzvarianten gefunden.
Zehn der 127 Patienten trugen 2 Sequenzvarianten gleichzeitig. Dies war in allen Fällen eine Kombination der stillen Mutation in Exon 3 und der Sequenzvariante R165Q in Exon 6.

Abbildung 6 zeigt einen maßstabsgetreuen Überblick über die Lokalisation der gefundenen Sequenzvarianten in Bezug auf ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz des fertigen Proteins und der darin enthaltenen Domänen und ATP-Bindungsstellen. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der Merkmale der gefundenen Varianten.

Abb. 6: **Lokalisation der gefundenen Sequenzvarianten im DNA-Reparaturprotein RAD51D Isoform 1**



Maßstabsgetreue Darstellung der Domänenstruktur des 328 Aminosäuren umfassenden Proteins. Gezeigt ist die Lokalisation der fünf gefundenen *Missense*-Sequenzvarianten **XRCC2-binding:** Die Aminosäuren 4 bis 77 sind beteiligt an der Bindung von XRCC2 und Ausbildung des BCDX2-Komplexes. **RAD51C-binding:** Die Region der Aminosäuren 77 bis 328 interagiert mit RAD51C und bildet somit den CX3-Complex aus. **ssDNA-binding:** Die Region der Aminosäuren 1 bis 83 bindet einzelsträngige DNA. **RecA-like_NTPases:** Evolutionär hochkonservierter Bereich der Aminosäuren 82 bis 317 mit Analogien zu bakteriellen RecA-Domänen.
ATP-Bindungsstelle, Walker-A-Motiv

Tabelle 5: **Übersicht der gefundenen Sequenzvarianten RAD51D**

Exon	Allele	Genomisch	cDNA	Protein	n (%)	ClinVar	dbSNP
2	het	g.752C>G	c.137c>g	S46C	1 (0,79%)	*uncertain significance*	rs587780102
3	het	g.1340C>T	c.234c>t	S78=	12 (9,45%)	*benign/ likely benign*	rs9901455
5	het	g.12796G>A	c.394g>a	V132I	1 (0,79%)	*uncertain significance*	rs201141245
6	hom	g.13402G>A	c.494g>a	R165Q	2 (1,58%)	*benign/ likely benign*	rs4796033
6	het	g.13402G>A	c.494g>a	R165Q	27 (21,26%)	*benign/ likely benign*	rs4796033
7	het	g.16378C>A	c.629c>a	A210E	1 (0,79%)	*uncertain significance*	rs376855484
8	het	g.16576A>G	c.698a>g	E233G	2 (1,58%)	*benign/ likely benign*	rs28363284

Bei 36 von insgesamt 127 Patienten wurden insgesamt 46 Sequenzvarianten in RAD51D gefunden. Diese traten teils heterozygot (**het**) oder homozygot (**hom**) auf. Tabellarisch dargestellt sind die Veränderungen auf DNA-, cDNA- und Proteinebene. **n:** Anzahl betroffener Patienten (**%:** Prozentsatz an der Gesamtpopulation), **ClinVar:** Einstufung der klinischen Relevanz der Sequenzvariante in der ClinVar-Datenbank, **dbSNP:** Identifikationsnummer der Sequenzvariante für die Datenbanken dbSNP und ClinVar.
Die Nummerierung der DNA-Sequenz bezieht sich auf NM_002878.3 (ATG=1), die Nummerierung der Aminosäuren auf NP_002869.3.

Im analysierten Patientengut wurden ausschliesslich Sequenzvarianten vom *missense*-Typ gefunden. Veränderungen des Leserasters, wie beispielsweise Deletionen, Insertionen oder Translokationen, sowie Veränderungen der Start- oder Stoppcodons vom *nonsense*-Typ wurden nicht beobachtet. Die intronischen Sequenzen, mit Ausnahme der direkt an die Exone angrenzenden Bereiche, wurden nicht untersucht. In diesen Bereichen wurden keine Sequenzvarianten, die zu einer Alteration der *splice-site* führen, gefunden.

3.3 Sequenzanalysen des RAD51D-Gens bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren

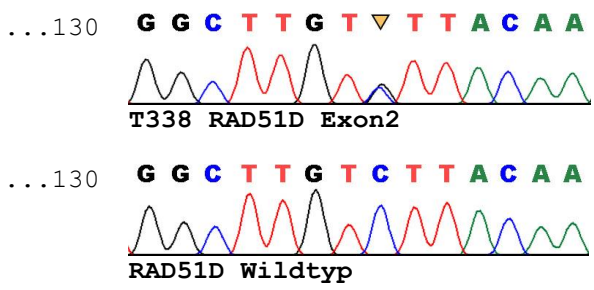
3.3.1 Sequenzvariante Exon 2 – g.752C>G - c.137c>g – p.Ser46Cys

Die Sequenzierung von Exon 2 zeigte bei einem Patienten an Position 752 (NG_031858.1) einen heterozygoten Austausch von Cytosin zu Guanin. Auf RNA-Ebene liegt der Austausch an Position 137 (NM_002878.3, ATG=1). Dies führt im Protein zu einer Änderung der Aminosäuresequenz an Aminosäure 46 von Serin zu Cystein. Abbildung 7, Figur A zeigt das Chromatogramm des Patienten im Vergleich zur Wildtypsequenz, Figur B zeigt die Nukleinsäuresequenz und die entsprechende Aminosäuresequenz.

Lokalisiert ist diese Sequenzvariante in der Region von Aminosäure 1 bis 83, welche Einzelstrang-DNA bindet. Abbildung 6 zeigt die Position der Sequenzvariante im Protein in Bezug zu seinen Domänen und ATP-Bindungsstellen.

Abb. 7: **Sequenzvergleich von Patient T338 RAD51D Exon 2 und Wildtyp**

A



B

```
                          *
T338      ...130 GGCTTGTGTTACAAG 144...
Exon 2    ... 44   G   L   C   Y   K   48 ...

RAD51D    ...130 GGCTTGTCTTACAAG 144...
Wildtyp   ... 44   G   L   S   Y   K   48 ...
```

Figur A) Vergleich der Chromatogramme.
Figur B) Effekt auf die Aminosäuresequenz
Die Nummerierung der DNA-Sequenz bezieht sich auf NM_002878.3 (ATG=1), die Nummerierung der Aminosäuren auf NP_002869.3

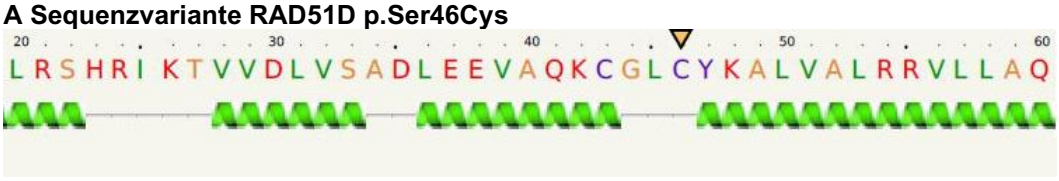
Molekülveränderungen in der Sekundärstruktur

In der Analyse der Sekundärstruktur mithilfe von Phyre2 zeigen sich diskrete Unterschiede zwischen der Sequenzvariante in Exon 2 an Aminosäure 46 und dem Wildtyp-Protein.

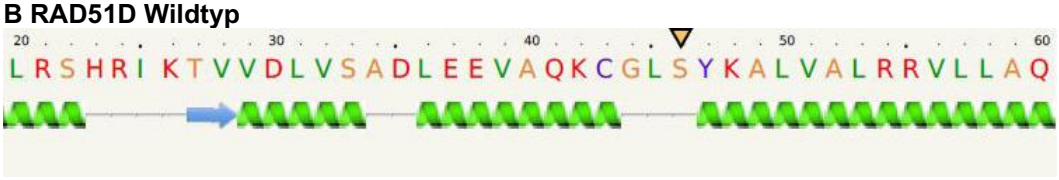
Das Serin an Position 46 wird zu beiden Seiten flankiert von einer Alphahelix. Nach Austausch des Serins durch ein Cystein sind beide Alphahelices unverändert. An den beiden Aminosäuren 27 und 28 kommt es jedoch zum Verlust der Beta-Faltblatt-Struktur. Abbildung 8 zeigt die Veränderungen der Sekundärstruktur bei Austausch von Serin durch Cystein an Position 46 im Protein von RAD51D Isoform 1.

Abb. 8: **Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Ser46Cys**

A Sequenzvariante RAD51D p.Ser46Cys



B RAD51D Wildtyp



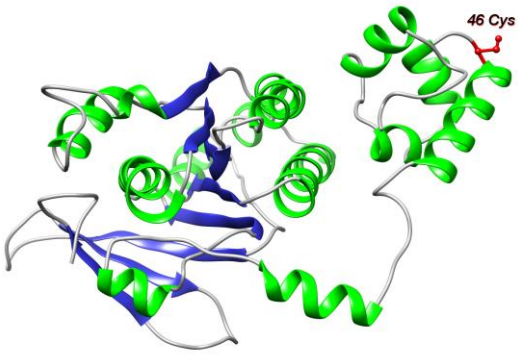
Figur A) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869.3:p.Ser46Cys
Figur B) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869.3
alphaHelix, beta-Faltblatt

Dreidimensionale Modellierung der Molekülstruktur

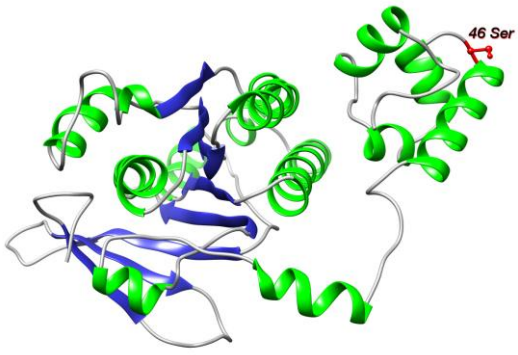
Der Austausch von Serin zu Cystein an Position 46 führt zu keiner Änderung der Faltung des Moleküls im Raum in der Modellierung mit Chimera. Die Lage der Alpha-Helices und Beta-Faltblätter zueinander ist unverändert. Abbildung 9 zeigt den Vergleich der Molekülstruktur zwischen Sequenzvariante p.Ser46Cys und dem Wildtyp des Proteins.

Abb. 9: **Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Ser46Cys**

A Sequenzvariante RAD51D p.Ser46Cys



B RAD51D Wildtyp



Figur A) Modellierung der Proteinstruktur der Sequenzvariante bei Austausch von Serin zu Cystein an Position 46 **Figur B)** Modellierung der Proteinstruktur der ursprünglichen Aminosäuresequenz. Die rote Markierung illustriert die betroffene Aminosäure und stellt ihre Seitenketten grafisch dar.
alphaHelix, beta-Faltblatt

Vergleich der Aminosäuresequenz unterschiedlicher Spezies

Im Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Spezies zeigt sich die Aminosäure Serin an Position 46 und die angrenzenden Aminosäuren evolutionär hochkonserviert. Abbildung 10 vergleicht die Sequenzen in Exon 2 des Patienten mit den entsprechenden Abschnitten des Proteins anderer Spezies und dem Wildtyp (H. sapiens). Einzig beim Krallenfrosch kommt es zum Austausch einzelner Aminosäuren der flankierenden Bereiche, aber auch hier wird an Position 46 ein Serin translatiert.

Abb. 10: **Die Aminosäuresequenz RAD51D p.Ser46Cys im Speziesvergleich**

```
                                        *
T338 p.Ser46Cys     ...30 DLVSADLEEVAQKCGLCYKALVALRRVLLAQFS 62...
H.sapiens           ...30 DLVSADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFS 62...
P.troglodytes       ...30 DLVSADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFS 62...
C.lupus             ...30 DLASADLEAVAQTCGLSYKALVALRRVLLAQFS 62...
B.taurus            ...30 DLVCADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFS 62...
M.musculus          ...30 DLAAADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFS 62...
R.norvegicus        ...30 DLAAADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFS 62...
G.gallus            ...30 DFVSSDLEDVAQSCSLSYKALVAVRRVLLAQFS 62...
X.tropicalis        ...30 DLVASDLEELARKCSLSYKTLMAVRRVLLAQYS 62...
D.rerio             ...30 DFVSWNPEELAQKCSLSYKALVAVRRVLLAQYT 62...
```

Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf NP_002869.3

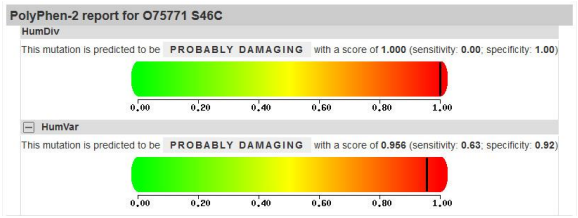
Vorhersage der Pathogenität in Computermodellen

Die Vorhersage der Auswirkung des Austausches der Aminosäure zeigt in der Analyse mit PolyPhen-2 eine hohe Wahrscheinlichkeit einer schädigenden Wirkung auf die Funktionsfähigkeit des Proteins. Die Variante wird als „*probably damaging*“ kategorisiert.

Der berechnete PROVEAN-Score für die vorliegende Sequenzvariante liegt bei -3,748 und damit deutlich unter dem Schwellenwert (kleiner -2,5). Im Einklang zur Klassifikation durch PolyPhen-2 wertet auch PROVEAN die vorliegende Sequenzvariante als schädigend für die Proteinfunktion. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung mit PolyPhen-2 und PROVEAN für NP_002869.3:p.Ser46Cys.

Abb. 11: **Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 und PROVEAN für RAD51D p.Ser46Cys**

A



B

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
S46C	-3.748	Deleterious

Figur A) Ergebnis der Analyse mit Polyphen-2 für NP_002869.3:p.Ser46Cys **Figur B)** PROVEAN-Score für NP_002869.3:p.Ser46Cys

3.3.2 Sequenzvariante Exon 3 – g.1340C>T - c.234c>t - p.Ser78=

Die Sequenzierung von Exon 3 zeigt einen Austausch von Cytosin zu Thymin an der Position 1340 (NG_031858.1). Auf Proteinebene führt dies zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz. Betroffen von dieser stillen Mutation waren 12 Patienten, alle davon heterozygot. Die Einstufung dieser Sequenzvariante (rs9901455) in der ClinVar-Datenbank lautet „*benign/likely benign*“.

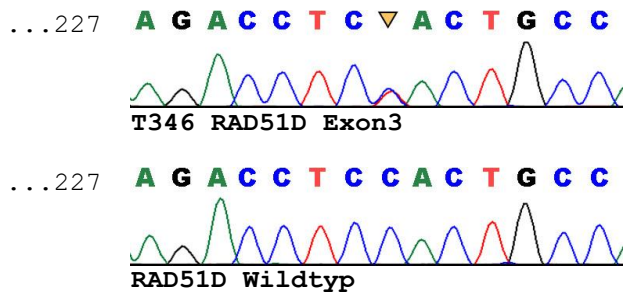


Abb. 12: **Chromatogramme von Patient T346 RAD51D Exon 3 und Wildtyp**

Die Nummerierung der DNA-Sequenz bezieht sich auf NM_002878.3 (ATG=1)

Abbildung 12 zeigt beispielhaft das Chromatogramm eines Patienten im Vergleich zur Wildtypsequenz.

3.3.3 Sequenzvariante Exon 5 – g.12796G>A - c.394g>a – p.Val132Ile

Bei einem Patienten findet sich in der Sequenzierung von Exon 5 ein heterozygoter Austausch von Guanin zu Adenin an Position 12796 (NG_031858.1). Auf der Ebene der RNA findet sich dies an Nukleotid 394 (NM_002878.3, ATG=1) wieder. Der Austausch von Guanin zu Adenin führt zu einem Austausch von Valin zu Isoleucin an Position 132 in der Aminosäuresequenz. Abbildung 13, Figur A zeigt das Chromatogramm des Patienten im Vergleich zur Wildtypsequenz, Figur B zeigt die Nuklein- und Aminosäuresequenz.

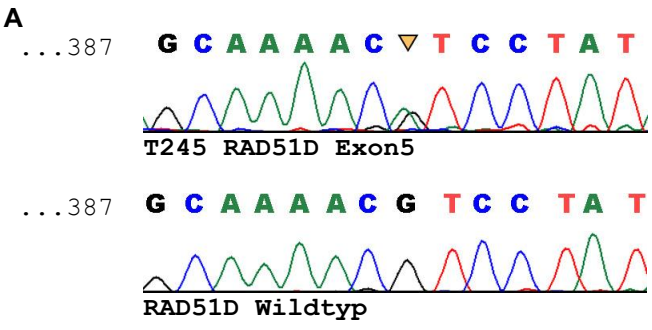
Lokalisiert ist die Sequenzvariante im Bereich der Domäne der RecA-like_NTPases (CDD 333705) welche sich von Aminosäure 82 bis 317 erstreckt. In unmittelbarer Nähe zur betroffenen Aminosäure befinden sich zwei ATP-Bindungsstellen an den Positionen 134 und 136 bis 137. Abbildung 6 zeigt die Position der Sequenzvariante des Patienten im Protein unter Berücksichtigung der verschiedenen Domänen und ATP-Bindungsstellen.

Molekülveränderungen in der Sekundärstruktur

Die Analyse mit Phyre2 zeigt keine Unterschiede in der Sekundärstruktur zwischen dem Wildtyp von RAD51D Isoform 1 und der Sequenzvariante an Aminosäure 132.

Beide Proteine bilden von Asparagin an Position 131 bis Aspartat an Position 136 ein Beta-Faltblatt aus. Durch den Austausch von Valin zu Isoleucin an Aminosäure 132 bleibt das Beta-Faltblatt erhalten. In direkter Nachbarschaft finden sich ATP-Bindungsstellen an den Positionen 134, 136 und 137. Diese werden durch die Sequenzvariante ebenfalls nicht beeinflusst. Abbildung 14 zeigt die Resultate der Analyse mit Phyre2 für die beschriebene Sequenzvariante an Aminosäure 132.

Abb. 13: **Sequenzvergleich von Patient T245 RAD51D Exon 5 und Wildtyp**



B

```
                                   *
T245 Exon5          ...388 CAAAACATCCTA 399...
                           ...130  Q  N  I  L  136...

RAD51D Wildtyp      ...388 CAAAACGTCCTA 399...
                           ...130  Q  N  V  L  136...
```

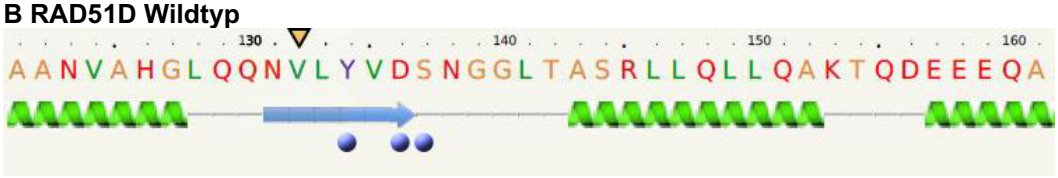
Figur A) Vergleich der Chromatogramme.
Figur B) Effekt auf die Aminosäuresequenz
Die Nummerierung der DNA-Sequenz bezieht sich auf NM_002878.3 (ATG=1), die Nummerierung der Aminosäuren auf NP_002869.3

Abb. 14: **Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Val132Ile**

A Sequenzvariante RAD51D p.Val132Ile



B RAD51D Wildtyp



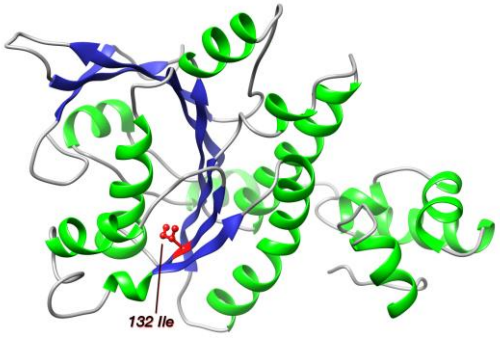
Figur A) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869.3:p.Val132Ile
Figur B) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869
alphaHelix, beta-Faltblatt, ATP-Bindungsstelle

Dreidimensionale Modellierung der Molekülstruktur

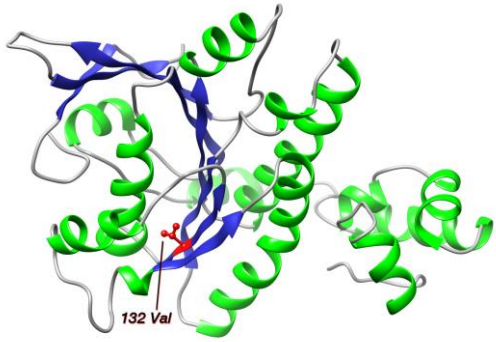
Die Sequenzvariante an Position 132 führt in der dreidimensionalen Analyse mit Chimera zu keiner signifikanten Konformationsänderung des Proteins. Die räumliche Anordnung der Faltblätter und Helices ist identisch im Vergleich zum Wildtyp. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Strukturberechnung mit Chimera für die Sequenzvariante p.Val132Ile.

Abb. 15: **Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Val132Ile**

A Sequenzvariante RAD51D p.Val132Ile



B RAD51D Wildtyp



Figur A) Modellierung der Proteinstruktur der Sequenzvariante bei Austausch von Valin zu Isoleucin an Position 132 **Figur B)** Modellierung der Proteinstruktur der ursprünglichen Aminosäuresequenz.
Die rote Markierung illustriert die betroffene Aminosäure und stellt ihre Seitenketten grafisch dar.
alphaHelix, beta-Faltblatt

Konformationsänderungen der Aminosäuren 155 bis 162, in der Abbildung jeweils am linken unteren Bildrand zu finden, basieren am ehesten auf Variationen des Berechnungsalgorithmus.

Vergleich der Aminosäuresequenz unterschiedlicher Spezies

Die Aminosäure Valin an Position 132 zeigt sich im Vergleich der Proteine über die verschiedenen Spezies hoch konserviert. Abbildung 16 vergleicht die Sequenzen in Exon 2 des Patienten mit den entsprechenden Abschnitten des Aminosäuresequenz anderer Spezies und dem Wildtyp (H. sapiens). Über Speziesgrenzen hinweg findet sich an Position 132 die Aminosäure Valin. Beim Huhn, Krallenfrosch und Zebrabärbling zeigt sich Varianz in den flankierenden Aminsäuren, in allen anderen untersuchten Spezies ist auch der Bereich um die Aminosäure 132 evolutionär stark konserviert.

Abb. 16: **Die Aminosäuresequenz RAD51D p.Val132Ile im Speziesvergleich**

```
                                                *
T245 Exon5          ...114 TQVCLCMAANVAHGLQQNILYVDSNGGLTASRL 146...
H.sapiens           ...114 TQVCLCMAANVAHGLQQNVLYVDSNGGLTASRL 146...
P.troglodytes       ...114 TQVCLCMAANVAHGLQQNVLYVDSNGGLTASRL 146...
C.lupus             ...114 TQVCLCVAANVAYGLQQNVVYIDSNGGLTASRI 146...
B.taurus            ...114 TQVCLCVAAHVAHGLQQNVLYIDSNGGLTASRI 146...
M.musculus          ...114 TQVCLCVAANVAHSLQQNVLYVDSNGGMTASRL 146...
R.norvegicus        ...114 TQVCLCVAANVAHSLQQNVLYVDSNGGMTASRL 146...
G.gallus            ...114 TQVCLSIAASVSLGLRQHVFFLDSTGGFTASRL 146...
X.tropicalis        ...114 TQTCQSIAVNVAYNLKQTVLYVDTTGGLTASRL 146...
D.rerio             ...114 TQVCFSVAVNISHQLKQTVVYIDTKGGMCANRL 146...
```

Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf NP_002869.3.

Vorhersage der Pathogenität in Computermodellen

Sowohl Polyphen-2 als auch PROVEAN prognostizieren für den Austausch von Valin zu Isoleucin an Position 132 keine Auswirkungen auf die Funktion des Proteins. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung mit PolyPhen-2 und PROVEAN für NP_002869.3:p.Val132Ile.

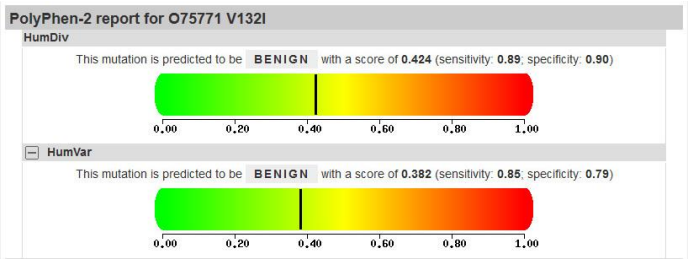
PolyPhen-2 errechnet in seinem HumDiv-Modell einen Score von 0,424 und kategorisiert die Variante als « *benign* » mit einer Sensitivität von 89% und einer Spezifität von 90%.

Übereinstimmend damit gelangt die Auswertung mithilfe des HumVar-Modells zu der gleichen Bewertung und stuft die Variante ebenfalls als « *benign* » ein. PROVEAN errechnet einen Score von -0,827.

Bei einem *cutoff* unter -2,5 ergibt sich auch hier kein Hinweis auf einen Einfluss der Sequenzvariante auf die Proteinfunktion und die Einstufung in die Kategorie « *neutral* ».

Abb. 17: **Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 und PROVEAN für RAD51D p.Val132Ile**

A



B

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
V132I	-0.827	Neutral

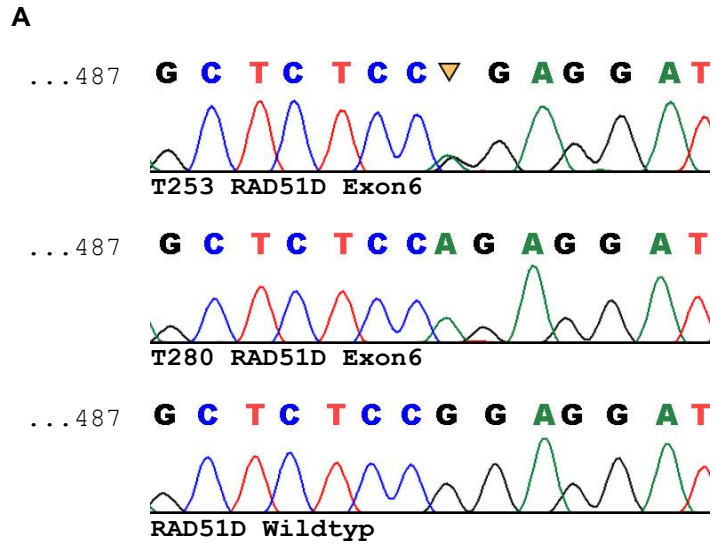
Figur A) Ergebnis der Analyse mit Polyphen-2 für NP_002869.3:p.Val132Ile
Figur B) PROVEAN-Score für NP_002869.3:p.Val132Ile

3.3.4 Sequenzvariante Exon 6 – g.13402G>A - c.494g>a – p.Arg165Gln

Die Sequenzierung von Exon 6 ergab an der Position 13402 (NG_031858.1) einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin.

Hiervon betroffen waren insgesamt 29 Patienten, 27 zeigten eine heterozygote Ausprägung der Sequenzvariante, 2 Patienten (T280, T323) wiesen das Merkmal in beiden Allelen auf. Auf RNA-Ebene findet sich der Basenaustausch an Nukleotid 494 (NM_002878.3, ATG=1). Dieser führt auf der Proteinebene zu einer Translation von Glutamin anstelle von Arginin an Position 165 der Aminosäuresequenz. Dies fällt in die Domäne der RecA-like_NTPases (CDD 333705), die sich von Aminosäure 82 bis 317 erstreckt.

Abb. 18: **Sequenzvergleich der Patienten T253/T280 RAD51D Exon 6 mit dem Wildtyp**



B

```
                                  *
T280 Exon6          ...487 GCTCTCCAGAGGATC 501...
                    ...163  A  L  Q  R  I  167...

RAD51D Wildtyp      ...487 GCTCTCCGGAGGATC 501...
                    ...163  A  L  R  R  I  167...
```

Figur A) Vergleich der Chromatogramme.
Figur B) Effekt auf die Aminosäuresequenz
Die Nummerierung der DNA-Sequenz bezieht sich auf NM_002878.3 (ATG=1), die Nummerierung der Aminosäuren auf NP_002869.3

Abbildung 18, Figur A zeigt beispielhaft die Chromatogramme des heterozygot betroffenen Patienten T253, des homozygot betroffenen Patienten T280 und im Vergleich den Wildtyp. In Abbildung 18, Figur B wird die Nukleinsäuresequenz und die korrespondierende Abfolge der Aminosäuren der Sequenzvariante in Exon 6 im Vergleich mit dem Wildtyp dargestellt. Abbildung 6 zeigt die Lokalisation der gefundenen Sequenzvariante im Protein in Abhängigkeit der Domänen und ATP-Bindungsstellen.

Molekülveränderungen in der Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur bleibt durch den Aminosäureaustausch unverändert. Die Modellierung der Molekülstruktur mithilfe von Phyre2 zeigt eine Alphahelix von Aminosäure 157 bis 164, sowie ein Beta-Faltblatt von Aminosäure 167 bis 170. ATP-Bindungsstellen sind in diesem Bereich nicht vorhanden. Durch den Austausch von Glutamin anstelle von Arginin an Position 165 kommt es nicht zu einer Änderung der Sekundärstruktur des Proteins. Abbildung 19 zeigt die Sekundärstruktur des Wildtyps im Vergleich mit der Sequenzvariante in Exon 6 an Aminosäure 165.

Abb. 19: **Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Arg165Gln**



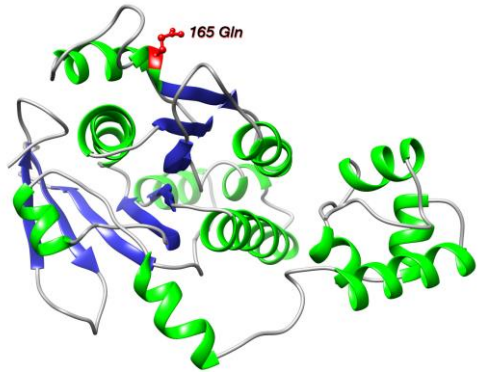
Figur A) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869.3:p.Arg165Gln
Figur B) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869
alpha-Helix, beta-Faltblatt

Dreidimensionale Modellierung der Molekülstruktur

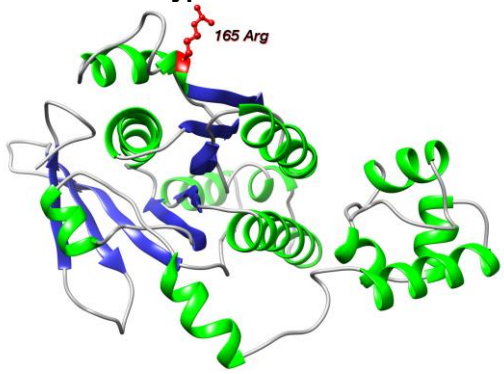
Die Untersuchung der räumlichen Struktur des Moleküls mithilfe von Chimera zeigt keine relevanten Konformationsänderungen durch den Einbau von Glutamin anstelle von Arginin an Position 165 der Aminosäuresequenz. Die Faltung der Kette und die Position der Faltblätter, sowie der Helices wird durch die Sequenzvariante nicht beeinflusst. Abbildung 20 zeigt vergleichend die räumliche Ansicht des Proteins bei Wildtyp und durch Änderung der Sequenz an Position 165.

Abb. 20: **Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Arg165Gln**

A Sequenzvariante RAD51D p.Arg165Gln



B RAD51D Wildtyp



Figur A) Modellierung der Proteinstruktur der Sequenzvariante bei Austausch von Arginin zu Glutamin an Position 165 **Figur B)** Modellierung der Proteinstruktur der ursprünglichen Aminosäuresequenz.
Die rote Markierung illustriert die betroffene Aminosäure und stellt ihre Seitenketten grafisch dar.
alphaHelix, beta-Faltblatt

Vergleich der Aminosäuresequenz unterschiedlicher Spezies

Der Speziesvergleich der Variante p.Arg165Gln zeigt eine Übereinstimmung der veränderten Sequenz mit den untersuchten Spezies mit Ausnahme vom Wildtyp im Menschen und bei Schimpansen. Abbildung 21 vergleicht die Aminosäuresequenz der untersuchten Spezies mit einer beispielhaften Patientensequenz und dem Wildtyp (H. sapiens) für NP_002869.3:p.Arg165Gln.

Abb. 21: **Die Proteinsequenz RAD51D p.Arg165Gln im Speziesvergleich**

```
                                        *
T280 Exon6          ...150 LQAKTQDEEEQAEALQRIQVVHAFDIFQMLDVL 182...
H.sapiens           ...150 LQAKTQDEEEQAEALRRIQVVHAFDIFQMLDVL 182...
P.troglodytes       ...150 LQAKTQDEEEQAEALRRIQVVHAFDIFQMLDVL 182...
C.lupus             ...150 LQARTPDEEVQAGALQRIQVVRAFDIFQMLDVL 182...
B.taurus            ...150 LQARTPDEEEQAGALQRIQVVRAFDIFQMLDVL 182...
M.musculus          ...150 LQARTQDEEKQASALQRIQVVRSFDIFRMLDML 182...
R.norvegicus        ...150 LQARTQDEEKQASALQRIQVVHSFDIFQMLDML 182...
G.gallus            ...150 LQARVEDKEEQLEALQRVQVVRMFDIYEMLRAL 182...
X.tropicalis        ...150 VQSRTKSEDEQVASLQRIEVIRVFDIYKLFDAF 182...
D.rerio             ...150 LQTKTSNEQEQMEALQKIKVFRVFDVFSLLACL 182...
```

Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf NP_002869.3.

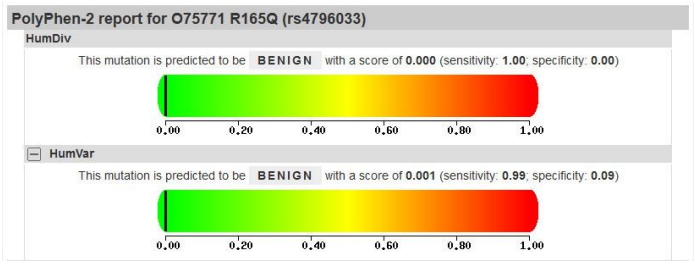
Beim Wildtyp und Schimpansen findet sich an Position 165 die Aminosäure Arginin. Im Gegensatz dazu zeigen die von der Sequenzvariante betroffenen Patienten und alle weiteren untersuchten Spezies die Aminosäure Glutamin. Die Aminosäuresequenz der flankierenden Region ist im Speziesvergleich evolutionär nicht ausgeprägt konserviert.

Vorhersage der Pathogenität in Computermodellen

Polyphen-2 und PROVEAN stimmen in ihrer Vorhersage überein, dass der Austausch von Glutamin anstelle von Arginin an Position 165 zu keiner Einschränkung der Proteinfunktion führt. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung mit PolyPhen-2 und PROVEAN für NP_002869.3:p.Arg165Gln.

Abb. 22: **Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 und PROVEAN für RAD51D p.Arg165Gln**

A



B

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
R165Q	1.621	Neutral

Figur A) Ergebnis der Analyse mit Polyphen-2 für NP_002869.3:p.Arg165Gln
Figur B) PROVEAN-Score für NP_002869.3:p.Arg165Gln

Mit einem Punktwert von 0,00 im HumDiv-Modell und einer Sensitivität von 1,00, sowie einer Spezifität von 0,00 wertet Polyphen-2 die Variante als höchstwahrscheinlich benigne. Die Analyse im HumVar-Modell kommt mit einem Punktwert von 0,01, einer Sensitivität von 0,99 und einer Spezifität von 0,01 zu demselben Ergebnis.

Die Auswertung von PROVEAN ordnet die Sequenzvariante NP_002869.3:p.Arg165Gln mit einem Punktwert von 1,621 (*cutoff* kleiner -2,5) ebenfalls als neutral in Bezug auf die Funktion des translatierten Proteins ein.

3.3.5 Sequenzvariante Exon 7 – g.16378C>A - c.629c>a – p.Ala210Glu

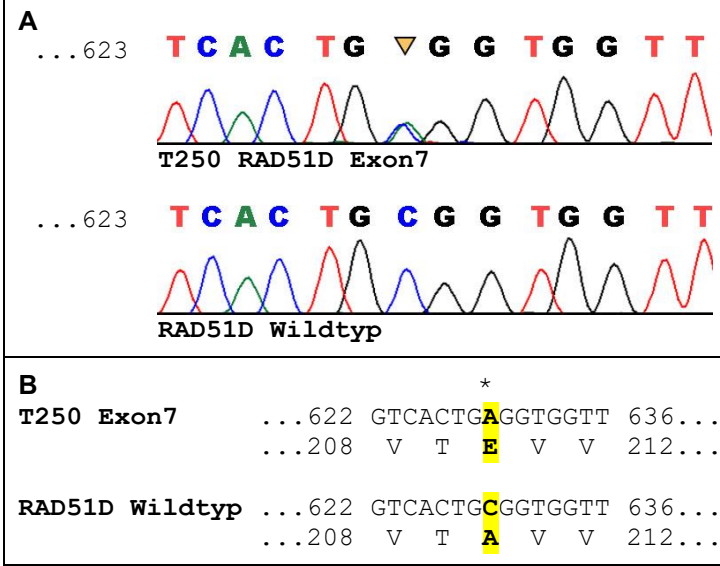
Bei Patient T250 fand sich in der Sequenzierung von Exon 7 ein Basenaustausch von Cytosin zu Adenin an Nukleotid 16378 (NG_031858.1).

Diese Sequenzvariante liegt heterozygot vor und findet sich auf Ebene der RNA an Position 629 (NM_002878.3, ATG=1) wieder. Auf Proteinebene führt sie zum Austausch von Alanin an Position 210 zu Glutamat. Sie betrifft die Domäne der RecA-like_NTPases (CDD 333705),

die sich von Aminosäure 82 bis 317 erstreckt und ist in weiterer Nachbarschaft zu einer ATP-Bindungsstelle an Aminosäure 197 (CDD:238540).

Abbildung 23, Figur A zeigt die Chromatogramme der betreffenden Sequenz von Patient T250 und Wildtyp, Figur B skizziert die Nukleotidsequenz mit den entsprechenden Aminosäuren. Abbildung 6 zeigt die Lokalisation der Sequenzvariante im Protein in Relation zu seinen Domänen und ATP-Bindungsstellen.

Abb. 23: **Sequenzvergleich von Patient T250 RAD51D Exon 7 und Wildtyp**



Figur A) Vergleich der Chromatogramme.
Figur B) Effekt auf die Aminosäuresequenz
Die Nummerierung der DNA-Sequenz bezieht sich auf NM_002878.3 (ATG=1), die Nummerierung der Aminosäuren auf NP_002869.3

Molekülveränderungen in der Sekundärstruktur

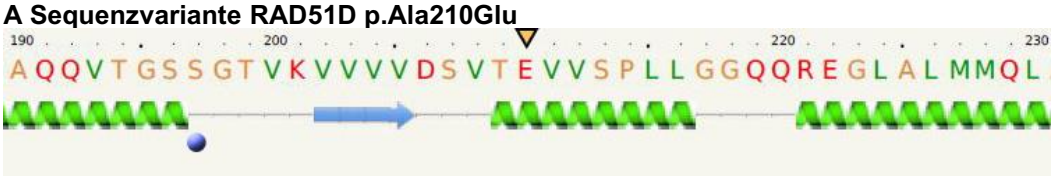
Die untersuchte Sequenzvariante führt zu Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins.

Mithilfe von Phyre2 wurde die Sekundärstruktur des Proteins modelliert. Die Sequenzvariante liegt an Position 210. Im Wildtyp bilden die Aminosäuren 209 bis 215 eine Alphahelix aus. Die nächste Alphahelix beginnt bei Aminosäure 223 und erstreckt sich bis 240. Die Aminosäuren 202 bis 206 bilden ein Beta-Faltblatt aus. Ersetzt man an Position 210 Alanin durch Glutamat so verkürzt sich das Beta-Faltblatt auf den Bereich von Aminosäure 202 bis 205. Die Alphahelix im Bereich des Austausches verlängert sich auf die Aminosäuren 209 bis 216 und auch die folgende Alphahelix beginnt bereits an Position 221 und endet bei 240. Die ATP-Bindungsstelle an Aminosäure 197 bleibt durch die Sequenzvariante unverändert.

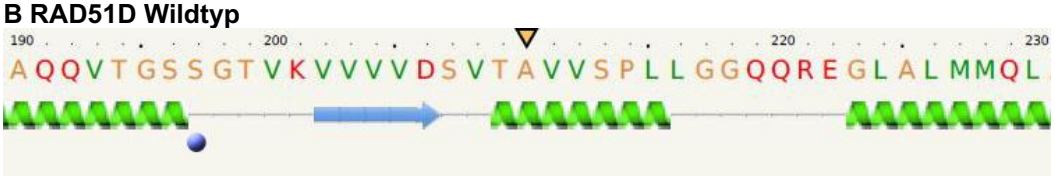
Abbildung 24 zeigt die Sekundärstruktur nach Modellierung durch Phyre2 im Bereich des Aminosäureaustausches an Position 210 im Vergleich zum Wildtyp.

Abb. 24: **Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Ala210Glu**

A Sequenzvariante RAD51D p.Ala210Glu



B RAD51D Wildtyp



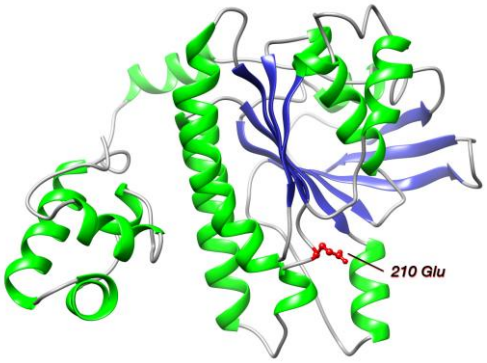
Figur A) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869.3:p.Ala210Glu
Figur B) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869
alphaHelix, beta-Faltblatt, ATP-Bindungsstelle

Dreidimensionale Modellierung der Molekülstruktur

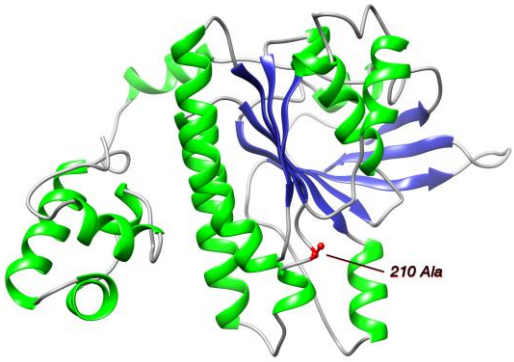
Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der dreidimensionalen Struktur der ursprünglichen Aminosäuresequenz im Vergleich zur Sequenzvariante p.Ala210Glu.

Abb. 25: **Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Ala210Glu**

A Sequenzvariante RAD51D p.Ala210Glu



B RAD51D Wildtyp



Figur A) Modellierung der Proteinstruktur der Sequenzvariante bei Austausch von Alanin zu Glutamat an Position 210
Figur B) Modellierung der Proteinstruktur der ursprünglichen Aminosäuresequenz.
Die rote Markierung illustriert die betroffene Aminosäure und stellt ihre Seitenketten grafisch dar.
alphaHelix beta-Faltblatt

Man erkennt durch den Austausch von Alanin zu Glutamat keine Änderung der Molekülkonformation im Raum. Die Ausbreitung und Positionierung der Faltblätter und

Helices ist jeweils identisch. Lediglich im Bereich der Aminosäuren 281 bis 290 kommt es zu einer geringen Konformationsänderung der Kette. Im Bild ist dies jeweils am rechten Rand zu erkennen.

Vergleich der Aminosäuresequenz unterschiedlicher Spezies

Die Aminosäure Alanin an Position 210 ist im Vergleich über Speziesgrenzen hinweg stark konserviert. Abbildung 26 zeigt das Alignment der Aminosäuresequenz der verschiedenen Spezies mit der Sequenzvariante von Patient T250 in Exon 7.

Findet sich im Bereich der angrenzenden Aminosäuren im *Multialignment* noch eine geringe Varianz der Aminosäuren, zeigt sich vom Zebrabärbling bis zum Menschen ausnahmslos Alanin an Position 201.

Abb. 26: **Die Aminosäuresequenz RAD51D p.Ala210Glu im Speziesvergleich**

```
                                        *
T250 Exon7          ...195 GSSGTVKVVVVDSVTEVVSPLLGGQQREGLALM 227...
H.sapiens           ...195 GSSGTVKVVVVDSVTAVVSPLLGGQQREGLALM 227...
P.troglodytes       ...195 GSSGTVKVVVVDSVTAVVSPLLGGQQREGLALM 227...
C.lupus             ...195 SASGTVKVVIVDSVTAVVSPLLGGQQREGLALM 227...
B.taurus            ...195 SSSGTLKVVVVDSVAAVVAPLLGGQQREGLALM 227...
M.musculus          ...195 TSSGAVKVVIVDSVTAVVAPLLGGQQREGLALM 227...
R.norvegicus        ...195 ASSGTVKVVIVDSVTAVVAPLLGGQQREGLALM 227...
G.gallus            ...195 SSAGPLKAVLIDSVSAVLSPLLGGRQSEGLAIM 227...
X.tropicalis        ...195 RSGEPLRLVIVDSVCAVIYPMLGGKHTEGMAIM 227...
D.rerio             ...195 VGGGSVKALMVDSVSAVLSPILGGKQNEGMSLL 227...
```

Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf NP_002869.3

Vorhersage der Pathogenität in Computermodellen

Sowohl PolyPhen-2 als auch PROVEAN werten den Austausch von Glutamat anstelle von Alanin an Position 210 als wahrscheinlich deletär für die Proteinfunktion. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung mit PolyPhen-2 und PROVEAN für NP_002869.3:p.Ala210Glu.

Mit einem Punktwert von 1,000 einer Sensitivität von 0,00 und einer Spezifität von 1,00 erhält die Variante den Höchstwert im HumDiv-Modell von PolyPhen-2 und wird in die Kategorie „*probably damaging*“ eingestuft. Ähnlich hohe Werte finden sich für das HumVar-Modell von

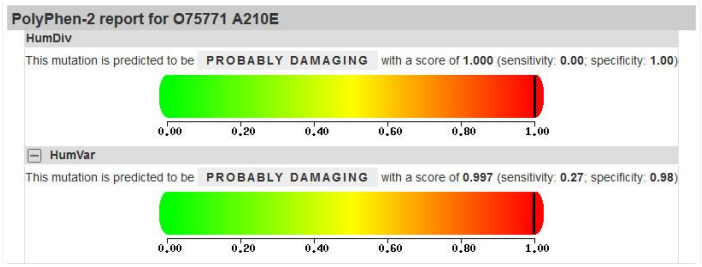
PolyPhen-2 mit einem Punktwert von 0,997, einer Sensitivität von 0,27 und einer Spezifität von 0,98.

PROVEAN errechnet einen Punktwert von -3,368. Dieser liegt deutlich unter dem Schwellenwert von -2,5 und wird damit als „*deleterious*“ gewertet.

Zusammenfassend führt der Austausch der Aminosäure Alanin an Position 210 zu Glutamat mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Einschränkung der Funktion des translatierten Proteins.

Abb. 27: **Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 und PROVEAN für RAD51D p.Ala210Glu**

A



B

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
A210E	-3.368	Deleterious

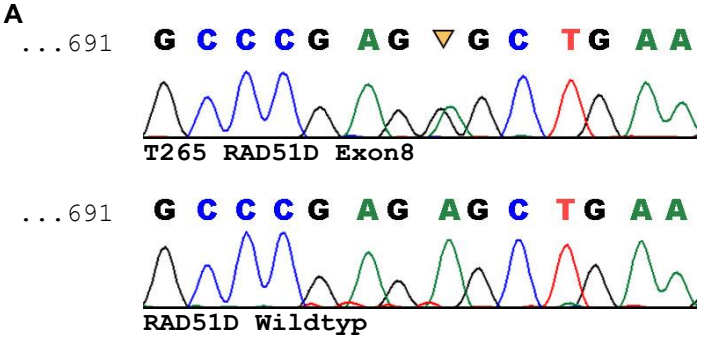
Figur A) Ergebnis der Analyse mit Polyphen-2 für NP_002869.3:p.Ala210Glu
Figur B) PROVEAN-Score für NP_002869.3:p.Ala210Glu

3.3.6 Sequenzvariante Exon 8 – g.16576A>G - c.698a>g – p.Glu233Gly

Die Sequenzierung von Exon 8 zeigte bei zwei Patienten einen Nukleotidaustausch an Position 16576 (NG_031858.1) von Adenin zu Guanin. Auf RNA-Ebene lokalisiert sich diese Variante an Nukleotid 698 (NM_002878.3, ATG=1). Die Patienten T234 und T265 sind beide heterozygot betroffen. Auf Proteinebene führt der Nukleotidaustausch zu einem Einbau der Aminosäure Glycin anstelle von Glutamat an Position 233. Die betroffene Domäne ist die RecA-like_NTPases (CDD 333705),

Abb. 28: **Sequenzvergleich von Patient T265 RAD51D Exon 8 und Wildtyp**

A



B

```
                                  *
T265 Exon8          ...691 GCCCGAGGGCTGAAG 705...
                           ...231  A  R  G  L  K  235...
RAD51D Wildtyp      ...691 GCCCGAGAGCTGAAG 705...
                           ...231  A  R  E  L  K  235...
```

Figur A) Vergleich der Chromatogramme
Figur B) Effekt auf die Aminosäuresequenz
Die Nummerierung der DNA-Sequenz bezieht sich auf NM_002878.3 (ATG=1), die Nummerierung der Aminosäuren auf NP_002869.3

die sich von Aminosäure 82 bis 317 erstreckt. ATP-Bindungsstellen finden sich nicht in Nachbarschaft der Sequenzvariante.

Abbildung 28, Figur A zeigt stellvertretend das Chromatogramm von Patient T265 im betroffenen Bereich von Exon 8, sowie den entsprechenden Wildtyp. Figur B vergleicht die Nukleotidsequenz des betroffenen Abschnittes mit dem Wildtyp und korreliert die entstehende Aminosäuresequenz. Abbildung 6 zeigt die Lokalisation der Sequenzvariante im Protein in Relation zu seinen Domänen und ATP-Bindungsstellen.

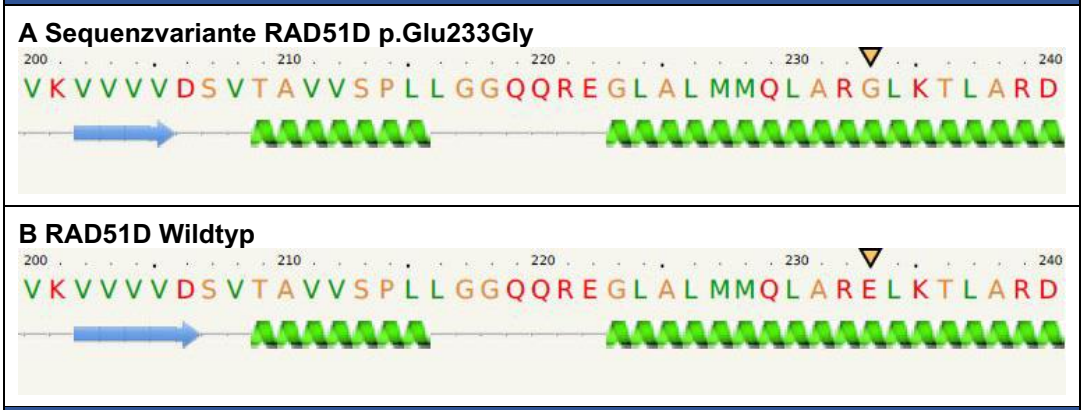
Molekülveränderungen in der Sekundärstruktur

Die Änderungen in der Sekundärstruktur sind für die beschriebene Variante diskret.

Die Sekundärstruktur der Proteine wurde mithilfe von Phyre2 konstruiert. Die Aminosäure an Position 233 ist Teil einer Alphahelix, die sich von Aminosäure 223 bis 240 erstreckt.

Weiter vorne liegt eine Alphahelix von Position 209 bis 216 und ein Beta-Faltblatt von 202 bis 206. Abbildung 29 zeigt die Resultate der Modellierung der Sekundärstruktur mit Phyre2 für die Sequenzvariante der beiden Patienten in Exon 8, bei der es zum Austausch von Glutamat zu Glycin an Position 233 kommt, im Vergleich mit dem Wildtyp des Proteins.

Abb. 29: **Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Glu233Gly**



Figur A) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869.3:p.Glu233Gly
Figur B) Sekundärstruktur von Phyre2 berechnet für NP_002869
alphaHelix beta-Faltblatt

Die beiden Alphahelices bleiben durch den Austausch von Glutamat zu Glycin an Position 233 unverändert in ihrer Struktur. Lediglich das Beta-Faltblatt endet eine Aminosäure früher

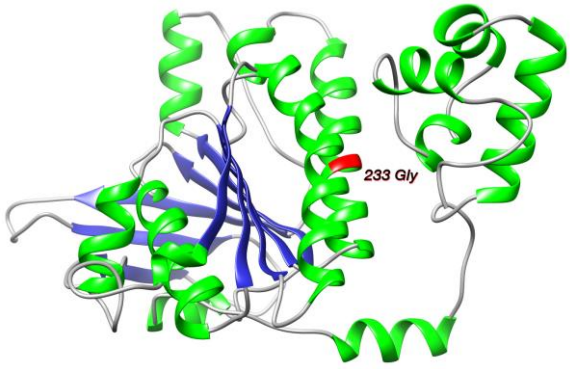
und deckt dann noch den Bereich von Aminosäure 202 bis 205 ab. ATP-Bindungsstellen liegen nicht in unmittelbarer Nachbarschaft der Sequenzvariante.

Dreidimensionale Modellierung der Molekülstruktur

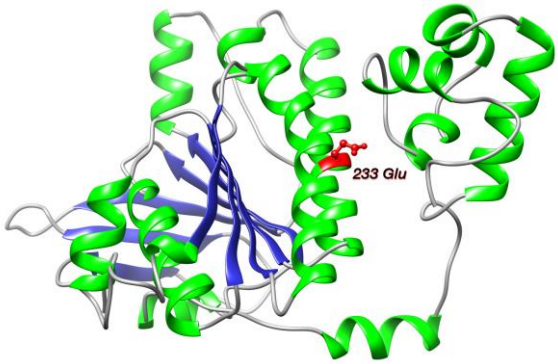
Der Austausch von Glutamat durch Glycin führt zu keiner Konformationsänderung des Proteins. Wie die Untersuchung mit Chimera zeigt, verändert sich die Position der Betafaltblätter und Alphahelices durch den Einbau der neuen Aminosäure nicht. Die dreidimensionale Faltung im Raum bleibt erhalten. Abbildung 30 illustriert die Ergebnisse der Analyse mit Chimera für die Sequenzvariante p.Glu233Gly im Vergleich zum Wildtyp des Proteins.

Abb. 30: **Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Glu233Gly**

A Sequenzvariante RAD51D p.Glu233Gly



B RAD51D Wildtyp



Figur A) Modellierung der Proteinstruktur der Sequenzvariante bei Austausch von Glutamat zu Glycin an Position 233
Figur B) Modellierung der Proteinstruktur der ursprünglichen Aminosäuresequenz.
Die rote Markierung illustriert die betroffene Aminosäure und stellt ihre Seitenketten grafisch dar.
alphaHelix, beta-Faltblatt

Vergleich der Aminosäuresequenz unterschiedlicher Spezies

Über Speziesgrenzen hinweg ist die Aminosäure Glutamat an Position 233 evolutionär stark konserviert. Abbildung 31 illustriert den Vergleich der Proteine der verschiedenen Spezies mit der Aminosäuresequenz von Patient T265 im Bereich der Sequenzvariante in Exon 8.

Bei allen untersuchten Spezies findet sich hier an Position 233 Glutamat. Die flankierenden Sequenzen beim Krallenfrosch und beim Zebrabärbling zeigen deutliche Varianz. In allen weiteren untersuchten Spezies sind auch die angrenzenden Aminosäuren hoch konserviert.

Abb. 31: **Die Aminosäuresequenz RAD51D p.Glu233Gly im Speziesvergleich**

```
                                        *
T265 Exon8          ...217 GGQQREGLALMMQLARGLKTLARDLGMAVVVTN 249...
H.sapiens           ...217 GGQQREGLALMMQLARELKTLARDLGMAVVVTN 249...
P.troglodytes       ...217 GGQQREGLALMMQLARELKTLARDLGMAVVVTN 249...
C.lupus             ...217 GGQQREGLALMMQLARELKTLARDLGMAVVVTN 249...
B.taurus            ...217 GGQQREGLALMMQLARELKTLARDLSVAVLVTN 249...
M.musculus          ...217 GGQQREGLALMMQLARELKILARDLGVAVVVTN 249...
R.norvegicus        ...217 GGQQREGLALMMQLARELKILARDLGVAVVVTN 249...
G.gallus            ...217 GGRQSEGLAIMMQLARELKTLAKEFSVAVVVTN 249...
X.tropicalis        ...217 GGKHTEGMAIMMQLARELQTLAHDYHLAILISN 249...
D.rerio             ...217 GGKQNEGMSLLMQVAGELKMIAKDFNIAVLVTN 249...
```

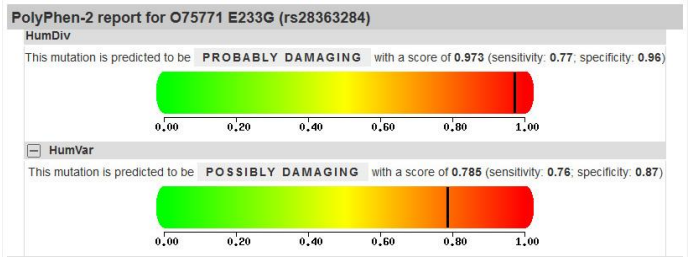
Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf NP_002869.3.

Vorhersage der Pathogenität in Computermodellen

PolyPhen-2 und PROVEAN prognostizieren beide deutliche Einschränkungen der Proteinfunktion für den Austausch der Aminosäure an Position 233. Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Analyse mit PolyPhen-2 und PROVEAN.

Abb. 32: **Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 und PROVEAN für RAD51D p.Glu233Gly**

A



B

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
E233G	-3.368	Deleterious

Figur A) Ergebnis der Analyse mit Polyphen-2 für NP_002869.3:p.Glu233Gly **Figur B)** PROVEAN-Score für NP_002869.3:p.Glu233Gly

Das HumDiv-Modell klassifiziert die Variante als „*probably damaging*“ mit einem Punktwert von 0,973, welcher eine Sensitivität von 0,77 und eine Spezifität von 0,96 besitzt. Weniger deutlich, aber in derselben Klassifikation ordnet das HumVar-Modell mit einem Punktwert von 0,785, einer Sensivität von 0,76 und einer Spezifität von 0,87 die Variante ein. Dies führt zur Klassifikation „*possibly damaging*“.

Diese Ergebnisse werden unterstützt durch den PROVEAN-Score von -3,368, welcher deutlich unter dem *cutoff* von -2,5 liegt und als „*deleterious*“ eingestuft wird.

4 Diskussion

Keimbahnmutationen in Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, können zur Entstehung von Tumoren beitragen. In den letzten Jahren sind die Proteine der *RAD51*-Familie vermehrt in den wissenschaftlichen Fokus gerückt. Für *RAD51D*, beteiligt an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und der Telomerfunktion, konnte eine Mitwirkung bei der Tumorentstehung unterschiedlicher Entitäten, wie Brust-, Ovarial- und Prostatakarzinomen nachgewiesen werden. Eine Rolle in der Tumorgenese von Kopf-Hals-Tumoren wurde bisher nicht etabliert. In unserer Studienpopulation von 127 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren konnten wir bei 36 Patienten insgesamt sechs verschiedene Sequenzvarianten in *RAD51D* nachweisen, von denen drei einen Beitrag zur Tumorgenese leisten könnten: p.Ser46Cys, p.Ala210Glu und p.Glu233Gly.

Die Studienpopulation besteht aus Patienten mit histologisch nachgewiesenen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen. Sie ist repräsentativ in Bezug auf die Tumorlokalisationen, die Altersverteilung bei Erstdiagnose und das Geschlecht (siehe Tabelle 4).

Es wurde DNA aus Lymphozyten des peripheren Bluts der Patienten analysiert, um die Rolle von Keimbahnmutationen in *RAD51D* als genetische Disposition für die Tumorentstehung zu untersuchen. Nach Isolierung und Aufreinigung der DNA wurden von jedem Patienten alle Exons und die angrenzenden Bereiche der Introns mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Sämtliche gefundenen Sequenzvarianten wurden durch anschliessende Sequenzierung des komplementären Stranges bestätigt. Dies garantiert eine hohe interne Validität der erhobenen Daten. Weiter wurden die klassischen, unmittelbar an das Exon angrenzenden, Donor- und Akzeptorspleißstellen untersucht. Weit im Intron liegende Bereiche wurden nicht sequenziert. Hier ist es möglich, dass eventuelle Mutationen an sich dort befindenden Spleißstellen nicht erfasst wurden. In dieser Arbeit wurden keine funktionellen Untersuchungen der gefundenen Sequenzvarianten durchgeführt. Ebenso wurde keine Mutationsanalyse in Gewebeproben der Tumore durchgeführt. Hier findet sich ein Ansatz um die Relevanz von *RAD51D*-Mutationen in folgenden Forschungsarbeiten detaillierter zu evaluieren.

Die Literaturrecherche ergab 80 publizierte Sequenzvarianten in 18 Publikationen aus einem Zeitraum von 2011 bis 2017. Die Patientenkollektive der untersuchten Arbeiten betrafen Patienten mit Ovarialkarzinom, Brustkrebs, Prostatakarzinom und Uteruskarzinom. Bisher wurden in keiner Publikation Sequenzvarianten des *RAD51D* bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren beschrieben. Eine detaillierte Übersicht der publizierten Varianten findet sich im Anhang in Tabelle 6.

In der vorliegenden Arbeit, aber auch in einer Vielzahl vorangegangener Publikationen wurden die gefundenen Sequenzvarianten mithilfe von computerbasierten Prädiktionsalgorithmen untersucht. Trotz zunehmender Fortschritte ist es wichtig die Limitationen dieser Programme zu kennen. Allgemein kann von einer Genauigkeit von 65 bis 80% bei der Vorhersage des pathologischen Effektes einer bekannten Variante ausgegangen werden [76]. Durch Kombination mehrerer Programme kann die Vorhersagegenauigkeit erhöht werden. Trotz ähnlicher Grundlagen der verwendeten Analyse unterscheiden sich die Prädiktionsalgorithmen und haben unterschiedliche Stärken und Schwächen [77]. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse der beiden Varianten von PolyPhen2 und ergänzend der PROVEAN-*Score* verwendet. In Kombination mit Untersuchungen der zwei- und dreidimensionalen Proteinstruktur und Analysen der evolutionären Konservierung betroffener Aminosäuren ermöglicht die theoretische Prognose eine starke Annäherung an die wahrscheinliche Pathogenität einer Variante. Zur weiterführenden Bestätigung sind funktionelle „in vitro“-Analysen der untersuchten Varianten erforderlich.

Es sind fünf unterschiedliche Transkripte des *RAD51 Paralog D* beim Menschen bekannt. Als kanonisch wurde die Isoform 1 definiert. Insgesamt zehn Exons kodieren für ein aus 328 Aminosäuren bestehendes Protein (NM_002878.3, NP_002869.3). Der Isoform 4 fehlen drei alternative Exone. Sie codiert für ein 216 Aminosäuren langes Protein (NM_133629.2, NP_598332.1). Die Sequenzierung der zehn Exons von Isoform 1 deckt vollständig die codierenden Bereiche der Isoform 4 ab. Im Gegensatz dazu besitzt die Isoform 6 ein durch alternatives Spleißen entstandenes zusätzliches Exon. Dieses wird durch die Sequenzierung der Exons der Isoform 1 nicht miterfasst. Desweiteren fehlt ein Exon im Vergleich zur Isoform 1. Das Protein der translatierten Isoform 6 umfasst 348 Aminosäuren (NM_001142571.1, NP_001136043.1).

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die Sequenzierung der Isoform 1. Diese wurde als kanonische Variante festgelegt und bildet die Referenz für bereits publizierte Sequenzvarianten. Die ebenfalls bekannten Isoformen 2 (NR_037711.1) und 5 (NR_037712.1) kodieren jeweils nicht für ein Protein und sind nicht Gegenstand der aktuellen Untersuchung.

Wiese et al. beschreiben die Notwendigkeit eines funktionierenden Walker-B-Motivs zur Bindung an XRCC2 und RAD51C [78]. In der NCBI-Referenz (NP_002869.3) ist diese Domäne aber im Gegensatz zum Walker-A-Motiv zwischen den Aminosäuren 107 bis 114 kein Teil des entstehenden Proteins. Aus diesem Grunde wird in dieser Arbeit auf die Darstellung des Walker-B-Motivs verzichtet.

Typischerweise wird *missense*-Sequenzvarianten eine geringere Bedeutung beigemessen als *nonsense*-Mutationen. Deletionen, Insertionen, Duplikationen oder Verschiebungen des Leserasters führen zu strukturell deutlich veränderten Proteinen und haben nachvollziehbar deletäre Auswirkungen auf die Funktion des Proteins. Der Nachweis einer Funktionsänderung bei Austausch einzelner Aminosäuren ist hingegen deutlich schwieriger zu führen. Es kann beispielsweise eine wichtige Bindungsstelle in einer essenziellen Domäne betroffen sein, die dreidimensionale Faltung des Proteins kann gestört sein oder der Austausch einer Aminosäure führt zu einer veränderten Interaktion mit wichtigen Liganden. Der Nachweis dieser Veränderungen ist schwierig zu führen und stützt sich auf statistische Erhebungen, Prädiktion mithilfe von Computeralgorithmen und funktionellen Testungen, sowie dem Abgleich der evolutionären Konservierung der betroffenenen Bereiche und bereits bekannten pathologischen Varianten [77]. Der Nachweis seltener Sequenzvarianten im untersuchten Patientenkollektiv im Vergleich zu gesunden Populationen dient hier als erster Hinweis. Weiterführende Funktionsuntersuchungen sind notwendig, um den Einfluss der gefundenen Varianten auf die Funktion von *RAD51D* zu bestätigen.

Für *RAD51D* konnten Rivera et al. erstmals nachweisen, dass eine *missense*-Mutation zur Tumorgenese beiträgt. Die Variante p.S207L erhöht das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Das Risiko für Tumore der Brust, des Endometriums, des Pankreas, des Kolons und des Rektums blieb unbeeinflusst. In funktionellen Untersuchungen konnten sie zeigen, dass der einzelne Austausch einer Aminosäure die Interaktion zwischen RAD51D und

XRCC2 stört und zu einer veränderten Empfindlichkeit von PARP-Inhibitoren führt. Hiermit wird deutlich, dass im Gegensatz zu der Mehrzahl der Publikationen, die den Fokus auf Mutationen legen, die eindrücklich zu Kettenabbrüchen und strukturell massiv aberrierten Proteinen führen, diskrete Änderungen der Aminosäuresequenz, hervorgerufen durch den Austausch einer einzelnen Base in der DNA, ebenfalls tiefgreifende Störungen der Proteinfunktion zur Folge haben können [79].

Das *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) hat Leitlinien für die klinische Bewertung von Sequenzvarianten bei monogenetisch vererbten Erkrankungen erstellt. Aufgrund der Entwicklung von Verfahren des *next-generation-sequencing* und rasanter Fortschritte im Bereich der Sequenzierung einzelner Gene, Genpanele, Exome und ganzer Genome, stellt die Interpretation der generierten Daten eine große Herausforderung dar.

Jede Sequenzvariante soll anhand der verfügbaren Informationen aus unterschiedlichen Bereichen bewertet werden. Hierzu gehören beispielsweise Populationsdaten zu Häufigkeiten der Allelverteilung und evolutionärer Konservierung, Ergebnisse von Computermodellen zur Vorhersage von Funktionsänderungen, der Vergleich mit bereits bekannten pathologischen Varianten, Ergebnisse von Familienuntersuchungen und Laborergebnisse funktioneller Testungen [77].

Die Informationen werden zusammengeführt und münden in die Einteilung jeder Sequenzvariante in fünf Kategorien: "*pathogenic*," "*likely pathogenic*", "*uncertain significance*", "*likely benign*", "*benign*". Diese Kategorien sind deckungsgleich mit der Einteilung der Datenbank ClinVar und beziehen sich jeweils auf eine spezifische Erkrankung. Der Terminus „*likely*" wird definiert über eine mindestens 90 prozentige Sicherheit jeweils in Richtung der Kategorie pathogen oder nicht pathogen [77].

Die Beurteilung des Einflusses von Sequenzvarianten auf die Pathogenese von multifaktoriellen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes, Bluthochdruck oder Tumorerkrankungen ist ungleich komplexer. Die ACMG-Leitlinien konnten hier kein einheitliches Vorgehen definieren. Die verwendeten Attribute „*pathogenic*" und „*likely pathogenic*" werden der komplexen Einbindung in die Krankheitsentstehung mit unterschiedlicher Penetranz, Risikoverteilung und Wechselwirkungen mit anderen Genen

nicht gerecht. Deshalb wird empfohlen Sequenzvarianten im Rahmen dieser multifaktoriellen Erkrankungen zunächst in die Kategorien „*established risk allele*“, „*likely risk allele*“ und „*uncertain risk allele*“ einzuteilen. Weitere Forschung ist notwendig, um die Bewertung zu vereinheitlichen und zu präzisieren [77].

Die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren folgt keinem monogenetischen Erbgang. Keimbahnmutationen in DNA-Reparaturgenen können zu einer erhöhten Prädisposition für die Entstehung von Tumoren führen, doch zahlreiche weitere Gene und Umwelteinflüsse sind in einem komplexen Zusammenspiel an der Tumorgenese beteiligt. Die Untersuchung einer kleinen Patientengruppe mit Kopf-Hals-Tumoren konnte mehrere aussichtsreiche Kandidaten für Sequenzvarianten des *RAD51D* mit Beteiligung an der Tumorgenese identifizieren. Zur qualitativen Bestätigung und gegebenenfalls quantitativen Abschätzung des Risikobeitrags sind Untersuchungen großer Patientenkollektive notwendig. Diese bilden auch die Basis zur Identifizierung von Subgruppen anhand genetischer Marker, die sich in Therapie und Prognose unterscheiden.

Im untersuchten Patientenkollektiv führte bei einem Patienten in Exon 2 der Austausch von Cytosin zu Guanin an Position 137 zu einem Austausch von Serin durch Cystein an Aminosäure 46 im translatierten Protein. Mithilfe von Computeralgorithmen haben wir versucht den Einfluss dieser Variante auf die Proteinfunktion vorherzusagen. Beide verwendeten Programme, Polyphen-2 und PROVEAN, postulieren mit hoher Wahrscheinlichkeit einen deletären Effekt auf das entstehende Protein.
Die betroffene Aminosäure liegt im Bereich der N-terminalen Domäne der Aminosäuren 1 bis 83. Diese bindet Einzelstrang-DNA und XRCC2 und ist damit für wichtige Interaktionen des Proteins verantwortlich. Kim et al. konnten zeigen, dass die Aminosäure Serin an Position 46 zusammen mit sechs weiteren (Leucin 4, Histidin 23, Valin 29, Aspartat 35, Glutamin 60, Alanin 63) die Schlüsselposition zur Fixierung der Domänenstruktur über hydrophobe Wechselwirkungen ist [63]. Eigene Modellierungen der Sekundär- und Tertiärstruktur mithilfe von Phyre2 und Chimera zeigen diskrete Veränderungen der Sekundärstruktur, aber keine Änderungen der Konformation im Raum.
Der Vergleich homologer Bereiche über Speziesgrenzen hinweg zeigt eine hohe evolutionäre Konservierung der betroffenen Aminosäure inklusive der flankierenden Sequenzen. Dies ist

ein Hinweis für die Bedeutung des Bereichs für die Proteinfunktion. Änderungen der Aminosäuresequenz können hier deletäre Folgen für die Funktion haben.

Loveday et al. beschreiben acht inaktivierende Keimbahnmutationen in *RAD51D* in einem Kollektiv aus 911 nicht verwandten Frauen mit Brust- und Ovarialkarzinomen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aus 1060 Gesunden. Sie berechnen ein relatives Risiko von 6,3 (95%CI: 2.86-13.85; P=4.8×10−6) für Träger einer Mutation ein Ovarialkarzinom zu entwickeln. Eine Korrelation zu Brustkrebs können sie nicht nachweisen. Die Sequenzvariante p.S46C wird bei einer Patientin mit Ovarialkarzinom gefunden, aber nicht in der Kontrollgruppe. Sie bewerten die Variante in der Zusammenschau aber als neutral [80].

Wickramanayake et al. untersuchten 360 Patienten mit Ovarialkarzinomen und 459 Patienten mit Brustkrebs. In der Gruppe der Ovarialkarzinompatientinnen zeigten sich 3 inaktivierende Keimbahnmutationen in *RAD51D* und 5 seltene *missense*-Varianten, von denen drei als deletär für die Proteinfunktion gewertet wurden, darunter auch p.S46C. Unter den Proben der Brustkrebspatienten fanden sich keine Mutationen. Sie kommen zu der Schlussfolgerung, dass Mutationen in *RAD51D* die Rate an Ovarialkarzinomen erhöhen, aber ohne Einfluss auf die Brustkrebsentstehung sind [81].

Die ClinVar-Datenbank bewertet die vorliegende Sequenzvariante mit „*uncertain significance*“. Die Allelhäufigkeiten werden in der Datenbank des *Exome Aggregation Consortium* mit 0,0074% für die Variante und 99,9926% für den Wildtyp angegeben. Gemäß ACMG-Leitlinien sind Allelfrequenzen über 5% eher als Polymorphismus zu werten, Allelfrequenzen unter 1% deuten auf pathologische Mutationen hin. Sowohl die datenbankbasierten Häufigkeiten, als auch die Frequenz in der untersuchten Studienpopulation sind unter 1%.

Zusammenfassend werten wir die gefundene Sequenzvariante NP_002869.3:p.Ser46Cys in Anlehnung an die ACMG-Leitlinien als „*likely risk allele*“.

Bei zwölf Patienten konnten wir an Position 234 auf RNA-Ebene einen Austausch von Cytosin zu Thymin nachweisen. Auf Proteinebene führt dies nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Stille Mutationen werden üblicherweise als Varianten ohne Einfluss auf die Funktion des Proteins eingestuft. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass Änderungen der Basensequenz zu Alterationen bei der Translation, Änderungen der Konformation des Proteins und zur Beeinflussung oder Neuentstehung von Spleißstellen beitragen können. Der

funktionelle Nachweis der Effekte ist jedoch aufwendig und nicht trivial [82]. Beispielhaft sei der Casereport von Yamaguchi et al. erwähnt, in dem eine stille Mutation im *MLH1*-Gen durch eine neue Spleißstelle ein Lynch-Syndrom verursacht [83].
Die ClinVar-Datenbank wertet die vorliegende Sequanzvariante als „*likely benign/benign*“. Die Allelfrequenzen betragen 11,84% für die Variante Cytosin und 88,16% für den Wildtyp Thymin gemäß *Exome Aggregation Consortium.* In unserer Patientengruppe betrug die Allelfrequenz für die Variante 9,45%. Allelhäufigkeiten von mehr als 5% in der Bevölkerung werden als häufige Varianten betrachtet mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit für pathologische Effekte.
In der Zusammenschau aller bisher bekannten Informationen wird die Variante NM_002878.3:c.234c>t als „*likely benign*“ betrachtet.

Ein Patient zeigte an Position 394 auf RNA-Ebene einen heterozygoten Austausch von Guanin zu Adenin. Hieraus resultiert eine Änderung der Aminosäuresequenz an Position 132 mit einem Wechsel von Valin zu Isoleucin. Die betroffene Aminosäure liegt in der Domäne, die für die Bindung an RAD51C zuständig ist. In unmittelbarer Nähe liegen zwei funktionell wichtige ATP-Bindungstellen (Aminosäure 134 und 136/137). Dies ist ein Indiz für einen möglichen Einfluss der Änderung der Sequenz auf die Proteinfunktion.
Im Gegensatz dazu postulieren die Analyse mit Polyphen-2 und PROVEAN keine Änderung der Funktion und klassifizieren die Variante als „*benign*“. Die Modellierung der zweidimensionalen Struktur mit Phyre2 und der räumlichen Konfiguration der Proteine mithilfe von Chimera zeigen keine Unterschiede zwischen Wildtyp und durch die Variante verändertem Protein. Der Vergleich unterschiedlicher Spezies zeigt an Position 132 hochkonserviert über alle Speziesgrenzen die Aminosäure Valin des Wildtyps. Die flankierenden Aminosäuren zeigen zwischen den Spezies eine Varianz. Die Datenbank ClinVar schätzt die Variante mit „*uncertain significance*“ ein. Aus der Datenbank des *Exome Aggregation Consortium* lassen sich die Allelhäufigkeiten in der Gesamtpopulation entnehmen. Die Häufigkeit der Variante wird dort mit 0,007% angegeben. Diese liegt deutlich unter dem *Cutoff* von 1% und ist damit ein Hinweis auf eine pathologische Relevanz. In unserer untersuchten Patientengruppe betrug die Häufigkeit der Sequenzvariante 0,79%.
Song et al. führten eine Fall-Kontrollstudie mit Blutproben von 3429 Patienten mit Ovarialkarzinom und 4775 gesunden Kontrollen durch. Der Ausgangspunkt der Studie war die

Frage welchen Beitrag deletäre Keimbahnmutationen von *RAD51B*, *RAD51C* und *RAD51D* zur Entwicklung von Ovarialkarzinomen leisten. Sie fanden 28 deletäre Mutationen vor allem in *RAD51C* und *RAD51D*. Im Vergleich dazu zeigten sich nur drei Mutationen in der Kontrollgruppe. Für *RAD51D* berechneten sie eine Odds Ratio von 12 (95% CI, 1.5 to 90; P= .019). In dieser Studie wurde ebenfalls bei zwei Patienten die Variante p.Val132Ile gefunden, die nicht in Gesundkontrollen nachgewiesen wurde. Mithilfe von Prädiktionsalgorithmen wurde diese aber als wahrscheinlich benigne eingestuft [84].

Thompson et al. untersuchten 1050 *BRCA1/2*-negative Indexfälle mit familiären Ovarial- und oder Mammakarzinomen. Darunter waren 741 Patienten, die ausschliesslich Brustkrebs aufwiesen. Des Weiteren wurden 245 Patienten mit Ovarialkarzinom untersucht. Hierbei wurden zwei deletäre Mutationen bei Patienten mit Ovarialkarzinom und eine deletäre Mutation in einer gesunden Kontrollgruppe bestehend aus 466 Probanden gefunden. Patienten mit Brustkrebs zeigten keine Mutationen. Hieraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Mutationen in *RAD51D* zur Entstehung von Ovarialkarzinomen, aber nicht zu Brustkrebs beitragen. Die Variante p.Val132Ile wird in dieser Untersuchung in der Gruppe der Indexfälle entdeckt, aber als „*benign*“ eingestuft [85].

Zusammenfassend wird die Sequenzvariante p.Val132Ile gemäß der ACMG-Klassifikation als „*likely benign*“ eingestuft.

An Position 494 auf RNA-Ebene konnte der Austausch von Guanin zu Adenin nachgewiesen werden. Dies führt bei der Translation zum Einbau von Glutamin anstelle von Arginin an Position 165. In der untersuchten Patientenpopulation zeigten 27 Patienten diese Variante in heterozygoter Ausprägung, bei zwei Patienten waren beide Allele verändert. In unmittelbarer Nähe der betroffenen Aminosäure befinden sich keine funktionell bedeutenden Proteinbereiche oder ATP-Bindungstellen. Die Computeranalyse wertet sowohl bei PROVEAN als auch Polyphen-2 übereinstimmend die Variante als „*benign*“. Bei der Betrachtung der evolutionären Konservierung des betroffenen Abschnittes fällt auf, dass beim Menschen und bei Schimpansen an dieser Stelle ein Arginin translatiert wird. Bei allen anderen untersuchten Spezies findet sich dort, in Übereinstimmung mit den Patientenproben, die Aminosäure Glutamin. Die Modellierung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine des Wildtyps und der Sequenzvariante zeigt keine Unterschiede auf. Diese Beobachtungen

legen den Verdacht nahe, dass es sich bei der Sequenzvariante um einen Polymorphismus ohne pathologische Relevanz handelt.

Dies wird unterstützt durch die Allelhäufigkeiten in der Datenbank des *Exome Aggregation Consortium.* Für die Sequenzvariante wird dort eine Häufigkeit von 15,93% angegeben. In der Kohorte des *NHLBI Exome Sequencing Project* wird für die homozygote Ausprägung der Variante eine Häufigkeit von 1,32% beschrieben. In der ClinVar-Datenbank wird die Variante als „*benign/likely benign*“ bewertet.

In ihrer Fallkontrollstudie mit 3429 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen und 4779 gesunden Kontrollen fanden Song et al. die Variante p.Arg165Gln bei 780 Patientinnen und 536 Kontrollen. Sie bewerteten die Variante als „*benign*“. Interessant ist, dass in der gleichen Publikation ebenfalls an Position 165 der Aminosäuresequenz eine Variante beschrieben wird, die zum Einbau von Tryptophan führt und als „likely pathogenic“ eingeordnet wird. Diese findet sich jedoch nur bei einer Kontrolle und bei keinem Patienten aus der Studienpopulation [84].

Gutiérrez-Enríquez et al. untersuchten Keimbahnmutationen von *RAD51D* von 842 Indexpatienten aus spanischen Familien mit *BRCA1/2*-negativen Brust- und Ovarialkarzinomen. Sie konnten drei pathologische Mutationen identifizieren: p.Met1?, c.66712_667123del und p.Arg232*. Insgesamt fanden sich in Ihrem Patientenkollektiv mit familiären Tumorerkrankungen bei einem Prozent Mutationen in *RAD51D*. In der untersuchten Patientengruppe fand sich ebenfalls die Variante p.Arg165Gln. Diese wurde als nicht pathogener Polymorphismus eingeschätzt [48].

In den Publikationen von Loveday, Wickramanayake und Pelttari wird die Variante ebenfalls als Polymorphismus mit hoher Allelfrequenz aufgeführt [47, 80, 81].

Gemäß ACMG-Leitlinie wird nach der vorliegenden Datenlage für die Sequenzvariante NP_002869.3:p.Arg165Gln eine Beteiligung an der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren ausgeschlossen („*benign*“).

Ein Patient zeigte an Position 629 einen Austausch von Cytosin zu Adenin. Dies führt zum Austausch von Alanin zu Glutamat an Aminosäure 210. In direkter Nachbarschaft befindet sich eine ATP-Bindungsstelle (Aminosäure 197). Die Vorhersage mittels Computeralgorithmen wertet diese übereinstimmend in Polyphen-2 und PROVEAN als mit hoher Wahrscheinlichkeit pathologisch. Die Modellierung der Sekundärstruktur zeigt durch

die Variante bedingt an mehreren Stellen Veränderungen. Im Speziesvergleich zeigt sich eine evolutionäre Konservierung der betroffenen Aminosäure einschliesslich der flankierenden Bereiche. Ausnahmslos trugen alle untersuchten Spezies an Position 210 die Aminosäure Alanin. Dies ist als Hinweis auf die besondere funktionelle Bedeutung dieses Abschnitts zu werten. Gestützt wird dies durch eine niedrige Allelfrequenz von 0,002% für die Sequenzvariante in der Analyse des *Exome Aggregation Consortium.*

Ich konnte vier Publikationen identifizieren, in denen die Variante p.Ala210Val gefunden wurde. An der gleichen Aminosäure führt dort die Änderung der Basensequenz zum Austausch von Valin statt Alanin. Alle diese Publikationen werteten den Aminosäureaustausch als deletär oder wahrscheinlich deletär. Song et al. konnten die Variante in ihrer Fall-Kontrollstudie mit Ovarialkarzinompatientinnen bei zwei von 3429 Patientinnen, aber bei keinem der 4775 Probanden der Kontrollgruppe nachweisen [84]. Gutiérrez-Enríquez et al. konnten in ihrer Untersuchung von *BRCA1/2*-negativen spanischen Brust- und Ovarialkrebspatienten ebenfalls die Variante p.Ala210Val nachweisen und sie als wahrscheinlich pathogen klassifizieren [48].

Janatova et el. untersuchten 871 tschechische Patienten mit *BRCA1/2*-negativen Hochrisikoovarialkarzinomen und verglichen diese mit 1226 Kontrollen. Gegenstand der Untersuchung waren Keimbahnmutationen in *RAD51C* und *RAD51D*. Sie fanden zwei Mutationen in *RAD51C* und drei Mutationen in *RAD51D*. Angesichts der niedrigen Frequenz im Vergleich mit *BRCA1/2*-Mutationen errechneten sie, dass bei 3% der Patienten mit Hochrisikoovarialkarzinomen Mutationen von *RAD51C* und *RAD51D* an der Tumorentstehung beteiligt sind. Ebenfalls in der Patienten- aber nicht in der Kontrollgruppe fanden sie die Variante p.Ala210Val und werteten sie als potentiell deletär [86].

Couch et al. untersuchten Keimbahnmutationen in 17 Genen bei 1824 Patienten mit triple-negativem Brustkrebs. Dies sind Tumore, die keine oder nur eine schwache Expression von Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren aufweisen. Die untersuchten Gene beinhalteten unter anderem *BRCA1/2, RAD50, RAD51C, XRCC2* und *RAD51D*. Bei 14,6% der Patienten wurden in 14 von 17 Genen Mutationen gefunden. Bei sieben Patienten aus diesem Kollektiv wurden *RAD51D*-Mutationen entdeckt. Einer davon trug die Variante p.Ala210Val. Diese wurde als potentiell deletär angesehen [87].

Mehrere Publikationen, die an der untersuchten Aminosäure den Austausch zu einer anderen Aminosäure als deletär betrachten, konsistente Ergebnisse der Prädiktionsalgorithmen und

eine hohe evolutionäre Konservierung des betroffenen Proteinabschnitts machen die Sequenzvariante p.Ala210Glu zu einem interessanten Kandidaten für eine deletäre Mutation. Zusammenfassend wird die Sequenzvariante NP_002869.3:p.Ala210Glu in Anlehnung an die ACMG-Leitlinien als „*likely risk allele*“ gewertet.

Zwei Patienten der Studienpopulation wiesen einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin an Position 698 auf. Dies führt zum Austausch der Aminosäure 233 von Glutamat zu Glycin. Im betroffenen Abschnitt finden sich keine ATP-Bindungsstellen. Der Austausch bewirkt nur diskrete Veränderungen der Sekundärstruktur, die Tertiärstruktur ist unverändert. In der computerbasierten Vorhersage werten Polyphen-2 und PROVEAN die Variante übereinstimmend als wahrscheinlich deletär. Die Häufigkeit wird in der Datenbank des *Exome Aggregation Consortium* mit 1,14% angegeben. Dies deckt sich mit einer Prävalenz in der untersuchten Population mit 1,58%. Im Speziesvergleich zeigt sich die Aminosäure Glutamat evolutionär hochkonserviert. Die ClinVar-Datenbank listet sie als „*benign/likely benign*“.
Die Literaturrecherche ergibt widersprüchliche Angaben in den einzelnen Publikationen. Frimer et al. analysierten in einer Kohorte aus 7 Patientinnen mit Uteruskarzinomen Keimbahnmutationen aus 43 Genen, vor allem DNA-Reparaturmechanismen betreffend. Ein Patient zeigte ebenfalls die Variante p.Glu233Gly in *RAD51D*. Im Prädiktionsalgorithmus wurde jedoch kein Effekt auf die Proteinfunktion postuliert [49]. In einer Fall-Kontroll-Studie mit Ovarialkarzinompatientinnen konnten Song et al. bei 124 von 3429 Tumorpatienten und 90 von 4775 Kontrollen die Variante nachweisen und beschrieben sie als häufigen Polymorphismus ohne pathologische Relevanz [84]. Übereinstimmend hiermit werten Loveday et al. in ihrer Untersuchung von Keimbahnmutationen in *RAD51D* von 911 Patienten mit Brust- und Ovarialkarzinomen und 1060 gesunden Kontrollen die Variante als nicht deletär. Sie fanden sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe Allelfrequenzen von 2% [80]. Jara et al. untersuchten den Effekt von unterschiedlichen Polymorphismen in *RAD50*, *XRCC3* und *RAD51D* auch in Kombination miteinander. Hierzu identifizierten sie Keimbahnmutationen in einer Fall-Kontroll-Studie mit 267 Fällen mit *BRCA1/2*-negativen Brustkrebspatienten einer chilenischen Population im Vergleich zu 500 gesunden Kontrollen. Interessant ist, dass in dieser Studie die Variante p.Glu233Gly in *RAD51D* separat betrachtet das Brustkrebsrisiko nicht erhöht. In Kombination mit dem Polymorphismus p.Thr241Met im

XRCC3-Gen erhöhte sich das Risiko hingegen signifikant (OR 10.5, 95%-Konfidenzintervall: 1.16-94.5, p=0,037) [88].

Im Unterschied dazu sehen Rodríguez-Lopéz et al. die Variante p.Glu233Gly als potentiell pathologisch für bestimmte Subgruppen von Brustkrebspatienten an [89]. Sie untersuchten sechs verschiedene Polymorphismen in *RAD51C* und *RAD51D* bei Hochrisiko-Patienten mit familiärem Brustkrebs. In der Kontrollgruppe mit 567 gesunden Kontrollen einer spanischen Population fand sich eine Allelfrequenz von 2.29%. In der Subgruppenanalyse zeigten sich mit einer Ausnahme keine Unterschiede. Für die Gruppe der *BRCA1/2*-negativen Patienten aus Familien mit einer seitenspezifischen Brustkrebsanamnese ist die Häufigkeit für p.Glu233Gly signifikant erhöht (OR 2.60, 95%-Konfidenzintervall: 1.12–6.03, p=0.021). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Variante mit niedriger Penetranz zur Brustkrebsentstehung bei Hochrisikopatienten beitragen kann. Zur Unterstützung dieser These wurde die potenzielle Funktionseinschränkung des entstehenden Proteins untersucht. Zwei Mechanismen können dazu beitragen: Der Aminosäureaustausch schwächt die Ausbildung der Alphahelix in dessen Mitte die Aminosäure 233 liegt. Ferner könnte die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Arginin an Position 186 durch den Austausch mit Glycin beeinträchtigt werden und somit Einfluss auf die Konformation des Proteins nehmen [89].

Darauf aufbauend haben Nadkarni et al. die funktionellen Auswirkungen der Variante p.Glu233Gly näher untersucht [90]. Im Mausfibroblasten-Modell beschrieben sie überraschenderweise eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin, Taxol, Mitomycin C, Methylmethansulfonat und UV-Strahlung. Des Weiteren wurde eine veränderte Funktion der Telomererhaltung mit erhöhter Zellproliferation beobachtet. Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurde ein Hefemodell entwickelt und Proteinstrukturanalysen durchgeführt. Hier zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte Interaktion mit RAD51C. Die Interaktion mit XRCC2 bleibt unverändert. Die vormals postulierte Interaktion der Aminosäure 233 mit Arginin 186 konnte nicht nachvollzogen werden. Als wahrscheinlicher Kandidat für elektrostatische Wechselwirkungen zur Ausbildung der Tertiärstruktur wird Lysin an Position 23 identifiziert [90].

Nadkarni et al. wiesen in der Zellkultur von Brustkrebszellen nach, dass der Effekt auf die Cisplatinresistenz der Variante p.Glu233Gly an eine eingeschränkte p53-Funktion gebunden ist. In Zelllinien mit normaler p53-Funktion trat die erhöhte Resistenz nicht auf [91].

Die Untersuchungsergebnisse der Variante p.Glu233Gly sind widersprüchlich. Zumindest für einige Tumorsubgruppen scheint es einen pathologischen Effekt zu geben. Funktionelle Untersuchungen konnten multiple Effekte auf die Proteininteraktionen, Chemoresistenz und Zellproliferation nachweisen. Für die Relevanz bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen ist die Variante ein aussichtsreicher Kandidat.
Zusammenfassend wird die Variante NP_002869.3:p.Glu233Gly als „*likely risk allele*“ gewertet.

Die Variante NP_002869.3:p.Arg165Gln liegt bei 27 Patienten in heterozygoter und bei zwei Patienten in homozygoter Ausprägung vor. Abseits der Frage ob diese spezielle Variante einen Einfluss auf die Funktion des RAD51D hat, ist die allgemeine Einschätzung ob rezessive oder dominante Vererbungsmechanismen zum Tragen kommen nicht trivial. Für viele monogenetische Erkrankungen sind mittlerweile dominante, rezessive oder X-chromosomale Erbgänge dokumentiert. Bei multigenetischen und multifaktoriellen Erkrankungen wirken komplexere Mechanismen. In Bezug auf Tumorerkrankungen wird davon ausgegangen, dass Onkogene, also Gene, die durch einen Funktionsgewinn zur Tumorentstehung beitragen können, bereits durch Mutation eines Allels pathologische Auswirkungen haben. Für Tumorsuppressorgene, also jene bei denen ein Funktionsverlust zum Wegfall einer tumorhemmenden Wirkung führt, wird angenommen, dass beide Allele geschädigt sein müssen, um einen Effekt zu zeigen [92].
Dieses Modell der 2-Hit-Hypothese prägte lange Zeit das Verständnis der Tumorgenese. Infrage gestellt wird es durch die Entdeckung unterschiedlicher Mechanismen, die nachweislich einen Einfluss von Mutationen eines Allels von Tumorsuppressorgenen auf die Entstehung von Tumoren haben. Santarosa et al. fassen vier Mechanismen zusammen: *loss-of-heterozygosity*, *gain-of-function*, dominant-negative Mutationen und Haploinsuffizienz [93].
Loss-of-heterozygosity bezeichnet eine vorbestehende inaktivierende Mutation eines Allels. Kommt es in Folge zum kompletten Verlust des intakten Wildtypallels, verbleibt kein funktionierendes Allel zur Kompensation der vorher geschädigten Variante [93].
Bei der *gain-of-function*-Mutation erhält das Genprodukt eine unnatürlich hohe Aktivierung und verdrängt damit das funktionierende Protein. Dominant-negative Mutationen blockieren die Funktion des verbleibenden funktionierenden Proteins. Bei der Haploinsuffizienz führt die Schädigung eines Allels zu einer Dosisreduktion des exprimierten funktionsfähigen Proteins

[93]. Für einige Tumorsuppressorgene sind solche dosisabhängigen Einflüsse auf die Tumorentstehung bereits nachgewiesen, wie z.B. für *p53*-Mutationen. Hier erhöht eine heterozygote Mutation signifikant das Tumorrisiko, aber mit geringerer Penetranz und späterem Erkrankungsalter im Vergleich zur homozygoten Schädigung [93]. Mithilfe dieser Modelle liesse sich der Einfluss der bei den untersuchten Patienten gefundenen Sequenzvarianten auf die Tumorgenese untermauern, die in der Mehrzahl in heterozygoter Form auftraten.

Eine mögliche Fehlerquelle für die Untersuchung pathogener Varianten ist die Annahme, dass Einflüsse auf die Proteinfunktion notwendigerweise die kausale Ursache für die Krankheitsentstehung sind. Für einige monogenetisch verursachten Krankheiten, wie z.B. Mukoviszidose, führt der Funktionsausfall eines einzigen Gens nachweislich zur Ausprägung der Krankheit. Dies gilt aber nicht für multigenetisch und multifaktoriell bedingte Erkrankungen. Hier beeinflussen Phänomene, wie unterschiedliche Allelexpression und die variable Penetranz von Merkmalen entscheidend die Pathogenese. Um Fehler zu vermeiden ist es wichtig Sequenzvarianten nicht ausschließlich auf Basis von Untersuchungen der Proteinfunktion zu kategorisieren, sondern möglichst viele verschiedene Daten in die Bewertung einfliessen zu lassen [77].
Die Übertragung der gefundenen Varianten in ein hefebasiertes Labormodell zur funktionellen Analyse könnte ein wichtiger Baustein zur Beurteilung der Varianten sein. CRIMEtoYHU ist ein neuentwickeltes Online-Tool zur Vorhersage der Übertragbarkeit spezifischer Sequenzvarianten in ein Hefemodell. Von diesem Algorithmus wird bei den beiden Varianten p.Ser46Cys und p.Arg165Gln eine hohe Übertragbarkeit ins Modell angenommen [94].

Die Identifizierung relevanter Mutationen hilft Diagnostik und Vorsorge zu optimieren, indem beispielsweise Patientengruppen mit erhöhtem Risiko frühzeitig identifiziert und geeigneten Screeningprogrammen zugeführt werden. Der Nachweis von *RAD51D*-Mutationen bei der Entstehung unterschiedlicher Tumorentitäten eröffnet auch die Möglichkeit therapeutischer Ansatzpunkte.
MicroRNAs sind kurze, nichtcodierende RNA-Abschnitte die posttranskriptionell in die Genexpression durch Bindung an mRNA eingreifen. Huang et al. konnten zwei microRNAs identifizieren, miR-103 und miR-107, deren Einsatz zur Reduzierung von RAD51D-Foci

führte [95]. Infolge wiesen die Zellen eine erhöhte Sensitivität für Cisplatin und einen PARP-Inhibitor auf. Verschiedene Tumorentitäten zeigten eine Regulierung von RAD51D im Tumorgewebe durch miR-103 und miR-107 [95]. Hiermit übereinstimmend konnten auch Loveday et al. zeigen, dass die verminderte Expression von RAD51D die Sensitivität gegenüber einem PARP-Inhibitor erhöht [80]. Budke et al. beschreiben unterschiedliche kleine Moleküle, die die biologische Aktivität von RAD51D beeinflussen können. Hierzu zählt die Hemmung der Bindung von doppelsträngiger DNA, die Blockade der Polymerisation mehrerer RAD51-Moleküle und Einfluss auf die Ausbildung des *D-Loops*. Im Tiermodell zeigten diese Moleküle eine Wirkung auf die Chemosensitivität und auf den Erfolg einer Bestrahlung der Tumorzellen [96]. Hier ergeben sich interessante Ansätze zur therapeutischen Beeinflussung von RAD51D. Möglicherweise könnte es auch einen Einfluss von fraktionierter Bestrahlung in Abhängigkeit vom RAD51D-Status geben.

Bemerkenswert ist die unterschiedliche Wirkung von RAD51D je nach Gewebe und Ausmaß der Genexpression. In somatischen Zellen sind Keimbahnmutationen und eine reduzierte *RAD51D*-Expression an der Entstehung von Tumoren beteiligt. Im Gegensatz dazu scheint eine Überexpression im Tumorgewebe den Tumorzellen einen Überlebensvorteil zu sichern. Sie können Schäden durch Bestrahlung und Chemotherapeutika effizienter korrigieren. Steigt die Genexpression im Tumorgewebe weiter an verliert sich der genomstabilisierende Effekt von RAD51D und es treten genotoxische Effekte durch Akkumulation von RAD51D-Komplexen auf [97].

RAD51D ist ein vielversprechendes Ziel zur Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. Unterschiedliche Ansätze in der Grundlagenforschung und in Tiermodellen zeigen einen Effekt auf das Tumorwachstum. Weitere Forschung ist jedoch notwendig bevor die Anwendung am Menschen erfolgen kann.

5 Schlussfolgerungen

Kopf-Hals-Karzinome sind durch eine hohe genetische Instabilität gekennzeichnet. Patienten, die an hereditären Defekten der DNA-Reparatur leiden, wie beispielsweise Fanconi-Anämie, zeigen ein erhöhtes Risiko Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich zu entwickeln, verglichen mit der Normalbevölkerung. In diesem Kontext konnte bereits gezeigt werden, dass Keimbahnmutationen in *RAD51D*, einem Gen des Fanconi-Signalwegs, zur Entstehung von soliden Tumoren der Ovarien, der Brust, der Prostata und des Uterus beitragen. Davon ausgehend identifizierte diese Arbeit in einem repräsentativen Kollektiv aus Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren insgesamt sechs verschiedene Sequenzvarianten im *RAD51D*-Gen, von denen drei mithilfe unterschiedlicher „*in-silico*"-Analysen als funktionell defizient klassifiziert wurden: p.Ser46Cys, p.Ala210Glu und p.Glu233Gly.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit erhöhen diese die Prädisposition für Kopf-Hals-Tumore. In einem zweiten Schritt wäre es erstrebenswert diese Ergebnisse an einem größeren Patientenkollektiv und durch funktionelle „*in-vitro*"-Analysen zu validieren. Darauf aufbauend könnte die Analyse von Mutationen des *RAD51D* im lokalen Tumorgewebe von Kopf-Hals-Karzinomen zukünftig zur Entwicklung neuer Optionen in Diagnostik und Therapie beitragen.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer.* Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-709.
2. Marur, S. and A.A. Forastiere, *Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment.* Mayo Clin Proc, 2008. **83**(4): p. 489-501.
3. Greene, F.L., American Joint Committee on Cancer., and American Cancer Society., *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. 2002, New York: Springer-Verlag. xiv, 421 p.
4. *Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe.* 2015: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
5. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer.* Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 3282-7.
6. Gillison, M.L., et al., *Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix.* Int J Cancer, 2014. **134**(3): p. 497-507.
7. Munger, K. and P.M. Howley, *Human papillomavirus immortalization and transformation functions.* Virus Res, 2002. **89**(2): p. 213-28.
8. Mallen-St Clair, J., et al., *Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1866**(2): p. 141-150.
9. Ang, K.K., et al., *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer.* N Engl J Med, 2010. **363**(1): p. 24-35.
10. Lydiatt, W.M., et al., *Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual.* CA Cancer J Clin, 2017. **67**(2): p. 122-137.
11. van Monsjou, H.S., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma in young patients.* Oral Oncol, 2013. **49**(12): p. 1097-102.
12. Venugopal, R., et al., *Familial Cancers of Head and Neck Region.* J Clin Diagn Res, 2017. **11**(6): p. ZE01-ZE06.
13. Suarez, C., et al., *Tumours of familial origin in the head and neck.* Oral Oncol, 2006. **42**(10): p. 965-78.
14. Trizna, Z. and S.P. Schantz, *Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer.* Otolaryngol Clin North Am, 1992. **25**(5): p. 1089-103.
15. Cabanillas, R., et al., *Novel germline CDKN2A mutation associated with head and neck squamous cell carcinomas and melanomas.* Head Neck, 2013. **35**(3): p. E80-4.
16. Turke, C., et al., *Loss of heterozygosity in FANCG, FANCF and BRIP1 from head and neck squamous cell carcinoma of the oral cavity.* Int J Oncol, 2017. **50**(6): p. 2207-2220.
17. Nakashima, M., et al., *Impact of MDM2 single nucleotide polymorphism on tumor onset in head and neck squamous cell carcinoma.* Acta Otolaryngol, 2008. **128**(7): p. 808-13.
18. Scheckenbach, K., et al., *RAD51C--a new human cancer susceptibility gene for sporadic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC).* Oral Oncol, 2014. **50**(3): p. 196-9.
19. Branstetter, B.F.t., et al., *Head and neck malignancy: is PET/CT more accurate than PET or CT alone?* Radiology, 2005. **235**(2): p. 580-6.

20. Marur, S. and A.A. Forastiere, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment.* Mayo Clin Proc, 2016. **91**(3): p. 386-96.
21. Forster, M.D. and M.J. Devlin, *Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer.* Front Oncol, 2018. **8**: p. 310.
22. Greenberg, J.S., et al., *Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making.* Cancer, 2003. **98**(3): p. 508-15.
23. Colevas, A.D., *Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck.* J Clin Oncol, 2006. **24**(17): p. 2644-52.
24. Manic, S., et al., *Mechanisms controlling sensitivity to platinum complexes: role of p53 and DNA mismatch repair.* Curr Cancer Drug Targets, 2003. **3**(1): p. 21-9.
25. Karamouzis, M.V., J.R. Grandis, and A. Argiris, *Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas.* JAMA, 2007. **298**(1): p. 70-82.
26. Lechner, M., et al., *Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors.* Genome Med, 2013. **5**(5): p. 49.
27. Burtness, B., J.E. Bauman, and T. Galloway, *Novel targets in HPV-negative head and neck cancer: overcoming resistance to EGFR inhibition.* Lancet Oncol, 2013. **14**(8): p. e302-9.
28. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas.* Nature, 2015. **517**(7536): p. 576-82.
29. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
30. Bernstein, J.M., et al., *Molecular and cellular processes underlying the hallmarks of head and neck cancer.* Eur Arch Otorhinolaryngol, 2013. **270**(10): p. 2585-93.
31. Katsuki, Y. and M. Takata, *Defects in homologous recombination repair behind the human diseases: FA and HBOC.* Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(10): p. T19-37.
32. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. xxxiv, 1548 p.
33. Liu, Z., L. Wang, and D. Zhong, *Dynamics and mechanisms of DNA repair by photolyase.* Phys Chem Chem Phys, 2015. **17**(18): p. 11933-49.
34. Vilenchik, M.M. and A.G. Knudson, *Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12871-6.
35. Fell, V.L. and C. Schild-Poulter, *The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond.* Mutat Res Rev Mutat Res, 2015. **763**: p. 15-29.
36. Helleday, T., et al., *DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment.* DNA Repair (Amst), 2007. **6**(7): p. 923-35.
37. Sung, P. and H. Klein, *Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 739-50.
38. Lafrance-Vanasse, J., G.J. Williams, and J.A. Tainer, *Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair.* Prog Biophys Mol Biol, 2015. **117**(2-3): p. 182-93.
39. Kanehisa, M., et al., *KEGG as a reference resource for gene and protein annotation.* Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D457-62.
40. Muniandy, P.A., et al., *DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. **45**(1): p. 23-49.

41. Dronkert, M.L. and R. Kanaar, *Repair of DNA interstrand cross-links.* Mutat Res, 2001. **486**(4): p. 217-47.
42. Sheikh, A., et al., *The spectrum of genetic mutations in breast cancer.* Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(6): p. 2177-85.
43. Luo, G., et al., *Pancreatic cancer: BRCA mutation and personalized treatment.* Expert Rev Anticancer Ther, 2015. **15**(10): p. 1223-31.
44. Esteban-Jurado, C., et al., *The Fanconi anemia DNA damage repair pathway in the spotlight for germline predisposition to colorectal cancer.* Eur J Hum Genet, 2016. **24**(10): p. 1501-5.
45. Somyajit, K., S. Subramanya, and G. Nagaraju, *RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer.* Carcinogenesis, 2010. **31**(12): p. 2031-8.
46. Loveday, C., et al., *Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer.* Nat Genet, 2011. **43**(9): p. 879-882.
47. Pelttari, L.M., et al., *A Finnish founder mutation in RAD51D: analysis in breast, ovarian, prostate, and colorectal cancer.* J Med Genet, 2012. **49**(7): p. 429-32.
48. Gutierrez-Enriquez, S., et al., *About 1% of the breast and ovarian Spanish families testing negative for BRCA1 and BRCA2 are carriers of RAD51D pathogenic variants.* Int J Cancer, 2014. **134**(9): p. 2088-97.
49. Frimer, M., et al., *Germline mutations of the DNA repair pathways in uterine serous carcinoma.* Gynecol Oncol, 2016. **141**(1): p. 101-7.
50. Pritchard, C.C., et al., *Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer.* N Engl J Med, 2016. **375**(5): p. 443-53.
51. Kitao, H. and M. Takata, *Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response.* Int J Hematol, 2011. **93**(4): p. 417-424.
52. Chandrasekharappa, S.C., et al., *Assessing the spectrum of germline variation in Fanconi anemia genes among patients with head and neck carcinoma before age 50.* Cancer, 2017. **123**(20): p. 3943-3954.
53. Scheckenbach, K., et al., *Squamous cell carcinomas of the head and neck in Fanconi anemia: risk, prevention, therapy, and the need for guidelines.* Klin Padiatr, 2012. **224**(3): p. 132-8.
54. Rosenberg, P.S., M.H. Greene, and B.P. Alter, *Cancer incidence in persons with Fanconi anemia.* Blood, 2003. **101**(3): p. 822-6.
55. Chun, J., E.S. Buechelmaier, and S.N. Powell, *Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway.* Mol Cell Biol, 2013. **33**(2): p. 387-95.
56. Tarsounas, M., et al., *Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein.* Cell, 2004. **117**(3): p. 337-47.
57. Game, J.C. and R.K. Mortimer, *A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast.* Mutat Res, 1974. **24**(3): p. 281-92.
58. Lin, Z., et al., *Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10328-33.
59. Suwaki, N., K. Klare, and M. Tarsounas, *RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis.* Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(8): p. 898-905.
60. Cartwright, R., et al., *Isolation of novel human and mouse genes of the recA/RAD51 recombination-repair gene family.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(7): p. 1653-9.

61. Kawabata, M. and K. Saeki, *Multiple alternative transcripts of the human homologue of the mouse TRAD/R51H3/RAD51D gene, a member of the rec A/RAD51 gene family.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 156-62.
62. Tarsounas, M., A.A. Davies, and S.C. West, *RAD51 localization and activation following DNA damage.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004. **359**(1441): p. 87-93.
63. Kim, Y.M. and B.S. Choi, *Structural and functional characterization of the N-terminal domain of human Rad51D.* Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(3): p. 416-22.
64. Miller, K.A., et al., *Domain mapping of the Rad51 paralog protein complexes.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(1): p. 169-78.
65. Marchler-Bauer, A., et al., *CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.* Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D200-D203.
66. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e115.
67. Kent, W.J., et al., *The human genome browser at UCSC.* Genome Res, 2002. **12**(6): p. 996-1006.
68. den Dunnen, J.T., *Sequence Variant Descriptions: HGVS Nomenclature and Mutalyzer.* Curr Protoc Hum Genet, 2016. **90**: p. 7 13 1-7 13 19.
69. Sievers, F., et al., *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.* Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 539.
70. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations.* Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 248-9.
71. Choi, Y., et al., *Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46688.
72. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants.* Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D862-8.
73. Kelley, L.A., et al., *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.* Nat Protoc, 2015. **10**(6): p. 845-58.
74. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.* J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
75. Islami, F., et al., *Alcohol drinking and esophageal squamous cell carcinoma with focus on light-drinkers and never-smokers: a systematic review and meta-analysis.* Int J Cancer, 2011. **129**(10): p. 2473-84.
76. Thusberg, J., A. Olatubosun, and M. Vihinen, *Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants.* Hum Mutat, 2011. **32**(4): p. 358-68.
77. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.* Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
78. Wiese, C., et al., *Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination.* Nucleic Acids Res, 2006. **34**(9): p. 2833-43.
79. Rivera, B., et al., *Functionally Null RAD51D Missense Mutation Associates Strongly with Ovarian Carcinoma.* Cancer Res, 2017. **77**(16): p. 4517-4529.
80. Loveday, C., et al., *Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer.* Nat Genet, 2011. **43**(9): p. 879-82.
81. Wickramanayake, A., et al., *Loss of function germline mutations in RAD51D in women with ovarian carcinoma.* Gynecol Oncol, 2012. **127**(3): p. 552-5.

82. Czech, A., et al., *Silent mutations in sight: co-variations in tRNA abundance as a key to unravel consequences of silent mutations.* Mol Biosyst, 2010. **6**(10): p. 1767-72.
83. Yamaguchi, T., et al., *The silent mutation MLH1 c.543C>T resulting in aberrant splicing can cause Lynch syndrome: a case report.* Jpn J Clin Oncol, 2017. **47**(6): p. 576-580.
84. Song, H., et al., *Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population.* J Clin Oncol, 2015. **33**(26): p. 2901-7.
85. Thompson, E.R., et al., *Analysis of RAD51D in ovarian cancer patients and families with a history of ovarian or breast cancer.* PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54772.
86. Janatova, M., et al., *Mutation Analysis of the RAD51C and RAD51D Genes in High-Risk Ovarian Cancer Patients and Families from the Czech Republic.* PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0127711.
87. Couch, F.J., et al., *Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer.* J Clin Oncol, 2015. **33**(4): p. 304-11.
88. Jara, L., et al., *Variants in DNA double-strand break repair genes and risk of familial breast cancer in a South American population.* Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(3): p. 813-22.
89. Rodriguez-Lopez, R., et al., *The variant E233G of the RAD51D gene could be a low-penetrance allele in high-risk breast cancer families without BRCA1/2 mutations.* Int J Cancer, 2004. **110**(6): p. 845-9.
90. Nadkarni, A., et al., *Functional characterization of the RAD51D E233G genetic variant.* Pharmacogenet Genomics, 2009. **19**(2): p. 153-60.
91. Nadkarni, A., et al., *Cisplatin resistance conferred by the RAD51D (E233G) genetic variant is dependent upon p53 status in human breast carcinoma cell lines.* Mol Carcinog, 2009. **48**(7): p. 586-91.
92. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer.* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 157-62.
93. Santarosa, M. and A. Ashworth, *Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1654**(2): p. 105-22.
94. Mercatanti, A., et al., *CRIMEtoYHU: a new web tool to develop yeast-based functional assays for characterizing cancer-associated missense variants.* FEMS Yeast Res, 2017. **17**(8).
95. Huang, J.W., et al., *Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity.* Mol Cancer Res, 2013. **11**(12): p. 1564-73.
96. Budke, B., et al., *Recent Developments Using Small Molecules to Target RAD51: How to Best Modulate RAD51 for Anticancer Therapy?* ChemMedChem, 2016. **11**(22): p. 2468-2473.
97. Mason, J.M., et al., *RAD54 family translocases counter genotoxic effects of RAD51 in human tumor cells.* Nucleic Acids Res, 2015. **43**(6): p. 3180-96.
98. Norquist, B.M., et al., *Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma.* JAMA Oncol, 2016. **2**(4): p. 482-90.
99. Osher, D.J., et al., *Mutation analysis of RAD51D in non-BRCA1/2 ovarian and breast cancer families.* Br J Cancer, 2012. **106**(8): p. 1460-3.

100. Stafford, J.L., et al., *Reanalysis of BRCA1/2 negative high risk ovarian cancer patients reveals novel germline risk loci and insights into missing heritability.* PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0178450.
101. Gonzalez-Rivera, M., et al., *Frequency of germline DNA genetic findings in an unselected prospective cohort of triple-negative breast cancer patients participating in a platinum-based neoadjuvant chemotherapy trial.* Breast Cancer Res Treat, 2016. **156**(3): p. 507-515.
102. Ollier, M., et al., *DNA repair genes implicated in triple negative familial non-BRCA1/2 breast cancer predisposition.* Am J Cancer Res, 2015. **5**(7): p. 2113-26.

7 Anhang

Tabelle 6: **Auswahl publizierter Sequenzvarianten RAD51D**

Protein	HGVS Nomenklatur	*prediction*	Phänotyp	dbSNP	Publikation
p.Met1?	c.1A>T	*damaging*	B/O-CA	rs561425038	[48]
p.Cys9Ser	c.26G>C	*prob.*	OvarialCA	rs140825795	[80, 84]
p.Cys9Ser	c.26G>C	*prob.*	B/O-CA	rs140825795	[48]
p.Cys9Ser	c.26G>C	*neutral*	OvarialCA	rs140825795	[81]
p.Glu14Lys	c.40G>A	*neutral*	OvarialCA	-	[80]
p.Met16Thr	c.47T>C	*neutral*	OvarialCA	rs797044943	[85]
p.His23Tyr	c.67C>T	*neutral*	OvarialCA	-	[84]
p.Thr27fs	c.81delA	*damaging*	OvarialCA	rs1064793952	[98]
p.Val28Glyfs	c.131_144ins24del38	*damaging*	OvarialCA	rs1064795716	[81, 98]
p.Gly44Asp	c.131G>A	*neutral*	OvarialCA	rs374730714	[84]
p.Gly44Ala	c.131G>C	*neutral*	OvarialCA	rs374730714	[84]
p.Ser46Cys	c.137C>G	*prob.*	OvarialCA	rs587780102	[80, 81]
p.Ser62Leu	c.185C>T	*prob.*	OvarialCA	rs374357106	[80, 84]
p.Gly68Ser	c.202G>A	*prob.*	OvarialCA	rs775045445	[80, 84]
p.Asp70Asn	c.208G>A	*neutral*	OvarialCA	rs142189122	[84]
p.Trp72*	c.216G>A	*damaging*	ProstataCA	-	[50]
p.Ser78Phe	c.233C>T	*prob.*	OvarialCA	-	[80]
p.Lys91Ilefs*13	c.270_271dupTA	*damaging*	OvarialCA	rs753862052	[85]
p.Gly96Cys	c.286G>T	*prob.*	OvarialCA	rs762951311	[85]
p.Gly110Argfs*2	c.326dupC	*damaging*	ProstataCA	rs730882119	[50]
p.Cys117Ser	c.349T>A	*prob.*	OvarialCA	rs786201358	[84]
p.Cys119Arg	c.355T>C	*neutral*	OvarialCA	rs201313861	[84]
p.Cys119Arg	c.355T>C	*neutral*	B/O-CA	rs201313861	[48]
p.Cys119Arg	c.355T>C	*neutral*	OvarialCA	rs201313861	[99]
p.Glu121Gly	c.362A>G	*damaging*	UterusCA	-	[49]
p.Val132Ile	c.394G>A	*neutral*	OvarialCA	rs201141245	[84, 85]
p.Asp136His	c.406G>C	*prob.*	OvarialCA	-	[84]
p.Gln151*	c.451C>T	*damaging*	OvarialCA	rs587781756	[98]
p.Gln160*	c.478C>T	*damaging*	OvarialCA	rs1057521922	[84]
p.Gln160*	c.478C>T	*damaging*	TNBC	rs1057521922	[87]
p.Leu164Pro	c.491T>C	*prob.*	OvarialCA	rs769287847	[84]
p.Arg165Gln	c.494G>A	*neutral*	OvarialCA	rs4796033	[80, 84]
p.Arg165Gln	c.494G>A	*neutral*	B/O-CA	rs4796033	[48]
p.Arg165Trp	c.493C>T	*prob.*	OvarialCA	rs544654228	[80, 84]
p.Gln171*	c.511C>T	*damaging*	OvarialCA	-	[100]
p.Gln177Arg	c.530A>G	*neutral*	OvarialCA	-	[84]
p.Met178Arg	c.533T>G	*prob.*	OvarialCA	-	[84]
p.Met178Ile	c.534G>C	*neutral*	OvarialCA	-	[84]
p.Leu179Val	c.535C>G	*neutral*	OvarialCA	-	[84]
p.Arg186*	c.556C>T	*damaging*	OvarialCA	rs387906843	[85, 99]

Protein	HGVS Nomenklatur	*prediction*	Phänotyp	dbSNP	Publikation
p.Val189fs	c.564delT	*damaging*	OvarialCA	rs786202750	[84]
p.Val189fs	c.564delT	*damaging*	TNBC	rs786202750	[87]
p.Ala190Thr	c.568G>A	*neutral*	OvarialCA	rs80116829	[84]
p.Val193Alafs*4	c.66712_667+23del	*damaging*	B/O-CA	-	[48]
p.Thr194Leufs	c.580delA	*damaging*	OvarialCA	-	[81, 98]
p.Arg206*	c.616C>T	*damaging*	OvarialCA	-	[100]
p.Ser207Leu	c.620C>T	*damaging*	OvarialCA	rs370228071	[79]
p.Ser207Leu	c.620C>T	*prob.*	OvarialCA	rs370228071	[80, 81]
p.Ser207*	c.620C>A	*damaging*	OvarialCA	-	[84]
p.Ser207Val	g.33430520 G>A	*damaging*	TNBC	-	[87]
p.Val208fs	c.623dupT	*damaging*	OvarialCA	-	[84]
p.Thr209fs	c.623dupT	*damaging*	TNBC	-	[87]
p.Ala210Val	c.629C>T	*damaging*	OvarialCA	rs376855484	[86]
p.Ala210Val	c.629C>T	*prob.*	OvarialCA	rs376855484	[84]
p.Ala210Val	g.33430511 G>A	*damaging*	TNBC	rs376855484	[87]
p.Ala210Val	c.629C>T	*prob.*	B/O-CA	rs376855484	[48]
p.Gly217*	c.655C>T	*damaging*	OvarialCA	-	[84]
p.Gly218Asp	c.653G>A	*prob.*	OvarialCA	-	[84]
p.Gln219*	c.649G>T	*damaging*	OvarialCA	-	[84]
p.Arg232*	c.694C>T	*damaging*	TNBC	rs587780104	[101]
p.Arg232*	c.694C>T	*damaging*	OvarialCA	rs587780104	[81, 86, 98]
p.Arg232*	c.694C>T	*damaging*	B/O-CA	rs587780104	[48]
p.Arg232Gln	c.695G>A	*neutral*	B/O-CA	rs28363283	[48]
p.Arg232Gln	c.695G>A	*prob.*	OvarialCA	rs28363283	[80]
p.Glu233Gly	c.698A>G	*neutral*	UterusCA	rs28363284	[49]
p.Glu233Gly	c.698A>G	*neutral*	OvarialCA	rs28363284	[80, 84]
p.Glu233Gly	c.698A>G	*neutral*	B/O-CA	rs28363284	[48, 88]
p.Glu233Gly	c.698A>G	*damaging*	B/O-CA	rs28363284	[89]
p.Arg239Trp	c.715C>T	*prob.*	OvarialCA	rs770250516	[84]
p.Arg239Trp	c.715C>T	*prob.*	B/O-CA	rs770250516	[48]
p.Arg239Trp	c.715C>T	*neutral*	OvarialCA	rs770250516	[81]
p.Thr248_Asn249delins*	c.741_742insTG	*damaging*	OvarialCA	-	[84]
p.His250Thrfs	c.748delC	*damaging*	OvarialCA	rs587780105	[84]
p.His250Thrfs	c.748delC	*damaging*	TNBC	rs587780105	[87]
p.Ile251Met	c.753A>G	*neutral*	OvarialCA	-	[80, 84]
p.Arg253*	c.757C>T	*damaging*	OvarialCA	rs137886232	[98]
p.Pro262Leu	c.785C>T	*prob.*	OvarialCA	rs730881950	[84]
p.Gly265Arg	c.793G>A	*prob.*	OvarialCA	rs140285068	[80, 84]
p.Gly265Arg	c.793G>A	*neutral*	OvarialCA	rs140285068	[85]
p.Arg266Cys	c.796C>T	*prob.*	OvarialCA	rs587781813	[85]
p.Trp268*	c.803G>A	*damaging*	OvarialCA	rs750219200	[85]
p.Pro272Lfs*58	c.814del	*damaging*	ProstataCA	-	[50]
p.Pro272Ser	c.814C>T	*prob.*	OvarialCA	-	[84]
p.Arg275Trp	c.823C>T	*prob.*	OvarialCA	rs752780416	[84]

Protein	HGVS Nomenklatur	*prediction*	Phänotyp	dbSNP	Publikation
p.Glu282Lys	c.844G>A	*neutral*	OvarialCA	-	[84]
p.Gly285Arg	c.853G>A	*damaging*	TNBC	-	[102]
p.Gly288Arg	c.862G>C	*neutral*	OvarialCA	-	[84]
p.Arg291His	c.872G>A	*neutral*	OvarialCA	rs150134822	[80, 84]
p.Ala293Val	c.878C>T	*neutral*	OvarialCA	rs769732230	[84]
p.Cys294Valfs*16	c.879delG+	*damaging*	OvarialCA	-	[86]
p.Arg300*	c.898C>T	*damaging*	OvarialCA	rs750621215	[84]
p.Arg300*	c.898C>T	*damaging*	TNBC	rs750621215	[87]
p.Gly304Asp	c.911G>A	*neutral*	OvarialCA	rs200615280	[80]
p.Met308Val	c.922A>G	*neutral*	OvarialCA	rs786201961	[84]
p.Ile311Asn	c.932T>A	*prob.*	OvarialCA	rs145309168	[81]
p.Thr313Ala	c.937A>G	*neutral*	OvarialCA	-	[84]
p.Gly315Glu	c.944G>A	*prob.*	OvarialCA	rs786203144	[84]
splice site	c.264-1G>A	*prob.*	ProstataCA	-	[50]
splice site	c.144+1G>T	*damaging*	TNBC	-	[87]
splice site	c.576+1G>A	*damaging*	OvarialCA	rs781161543	[47, 84]
intronic variant	c.83-26A>G	*neutral*	OvarialCA	-	[99]

Protein: Effekt der Variante auf die Proteinsequenz, HGVS Nomenklatur: Lokalisation der Schädigung auf Ebene der komplementären DNA bzw. des Genoms (Referenz NM_002878.3 und NG_031858.1). P*rediction* gibt die Einschätzung der pathologischen Relevanz innerhalb der Publikation an (prob. *probably damaging*). Phänotyp: Untersuchte Tumorentität (TNBC *triple-negative-breast-cancer*, B/O-CA Brust- und Ovarialkarzinom), dbSNP: Korrespondierender Eintrag in der ClinVar- und SNP-Datenbank

Tabelle 7: **Referenzsequenzen Speziesvergleich RAD51D**

Lateinische Bezeichnung	Deutscher Name	Aminosäuren	NCBI Reference
Homo sapiens	Mensch	328	NP_002869.3
MGVLRVGLCPGLTEEMIQLLRSHRIKTVVDLVSADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGA DLYEELKTSTAILSTGIGSLDKLLDAGLYTGEVTEIVGGPGSGKTQVCLCMAANVAHGLQQNVLYVDSN GGLTASRLLQLLQAKTQDEEEQAEALRRIQVVHAFDIFQMLDVLQELRGTVAQQVTGSSGTVKVVVVD SVTAVVSPLLGGQQREGLALMMQLARELKTLARDLGMAVVVTNHITRDRDSGRLKPALGRSWSFVPS TRILLDTIEGAGASGGRRMACLAKSSRQPTGFQEMVDIGTWGTSEQSATLQGDQT			
Pan troglodytes	Schimpanse	328	XP_001174459.1
MGVLRVGLCPGLTQEMIQLLRSHRIKTVVDLVSADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNG ADLYEELKTSTAILSTGIGSLDKLLDAGLYTGEVTEIVGGPGSGKTQVCLCMAANVAHGLQQNVLYVDS NGGLTASRLLQLLQAKTQDEEEQAEALRRIQVVHAFDIFQMLDVLQELRGTVAQQVTGSSGTVKVVVV DSVTAVVSPLLGGQQREGLALMMQLARELKTLARDLGMAVVVTNHITRDRDSGRLKPALGRSWSFVP STRILLDTIEGAGASGGRRMACLAKSSRQPTGFQEMVDIGTWGTSEHSATLQGDQT			
Canis lupus familiaris	Haushund	328	XP_548263.2
MGVLRAGLCPGLTQDTVLQLRSRGVRTVVDLASADLEAVAQTCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPSN GADLYEELKTSTAILSTGIGSLDKLLDAGLYTGEVTEIVGGPGSGKTQVCLCVAANVAYGLQQNVVYID SNGGLTASRILQLLQARTPDEEVQAGALQRIQVVRAFDIFQMLDVLQDCRGTLSQQVSSASGTVKVVIV DSVTAVVSPLLGGQQREGLALMMQLARELKTLARDLGMAVVVTNHMTRDRDSGELKPALGRSWSFV PSTRILLDIDEGARASGSWRRACLTKSPRLPTGFQEMVDIGTWGPPEQSPASQGDQI			

Lateinische Bezeichnung	Deutscher Name	Aminosäuren	NCBI Reference
Bos taurus	Rind	326	NP_001039769.1
MGVLRAGLCPGLTQDMVQLLQSRGIKTVVDLVCADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPFNG ADLYEELKTSTAILSTGIGSLDKLLDAGLYTGEVTEIVGAPGSGKTQVCLCVAAHVAHGLQQNVLYIDSN GGLTASRILQLLQARTPDEEEQAGALQRIQVVRAFDIFQMLDVLQDLRGAVSQQVSSSSGTLKVVVVD SVAAVVAPLLGGQQREGLALMMQLARELKTLARDLSVAVLVTNHMTRDRDSGQLKPALGRSWSFVP STRLLLDSTQSSGSLGSWRVVCLTKSPRLPTGCQETVDLGSLGTPAFQGDHKGH			
Mus musculus	Hausmaus	329	NP_035365.1
MGMLRAGLCPGLTEETVQLLRGRKIKTVADLAAADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPLNG ADLYEELKTSTAILSTGIGSLDKLLDAGLYTGEVTEIVGGPGSGKTQVCLCVAANVAHSLQQNVLYVDS NGGMTASRLLQLLQARTQDEEKQASALQRIQVVRSFDIFRMLDMLQDLRGTIAQQEATSSGAVKVVIV DSVTAVVAPLLGGQQREGLALMMQLARELKILARDLGVAVVVTNHLTRDWDGRRFKPALGRSWSFVP STRILLDVTEGAGTLGSSQRTVCLTKSPRQPTGLQEMIDIGTLGTEEQSPELPGKQT			
Rattus norvegicus	Wanderratte	329	NP_001100499.1
MGMLRAGLCPGLTEEIVQLLRGRKIKTVADLAAADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPLNGA DLYEELKTSTAILSTGIGSLDKLLDAGLYTGELTEIVGGPGSGKTQVCLCVAANVAHSLQQNVLYVDSN GGMTASRLLQLLQARTQDEEKQASALQRIQVVHSFDIFQMLDMLQDLRGTMAQQATASSGTVKVVIV DSVTAVVAPLLGGQQREGLALMMQLARELKILARDLGVAVVVTNHLTRDRDSRRFKPALGRSWSFVP STRILLEVFEGAGTLGRSQRTVRLIKSPRQPTGLQEVIDIGTLGTEEQSPELPGKQT			
Gallus gallus	Huhn	327	NP_001185575.1
MVVLRAGLCPGLTEEMIQLLRANNIRTVVDFVSSDLEDVAQSCSLSYKALVAVRRVLLAQFSAFPTNGA DLYEELKSSTAILPTGNPSLDQLLDAGLYTGEVTELAGAPGSGKTQVCLSIAASVSLGLRQHVFFLDST GGFTASRLYQMLQARVEDKEEQLEALQRVQVVRMFDIYEMLRALHEVRDCLSQQVESSAGPLKAVLI DSVSAVLSPLLGGRQSEGLAIMMQLARELKTLAKEFSVAVVVTNQVTRDSSTGALKSALGRSWSFVPS TRVLLQGRAVPWEEGAAPHTACLAKSPRQPTGMQVQLDIGSDAVQEQRPVTPTP			
Xenopus tropicalis	Krallenfrosch	320	NP_001005687.1
MVILREGLCPGLSAGIVAVLKANNVKTVIDLVASDLEELARKCSLSYKTLMAVRRVLLAQYSAFPSSGA DVYEELKSSTAILPTGNRKLDILLDSGLYTGEVTEIAGAAGSGKTQTCQSIAVNVAYNLKQTVLYVDTTG GLTASRLLQLVQSRTKSEDEQVASLQRIEVIRVFDIYKLFDAFQDLRHQISQQLLRSGEPLRLVIVDSVC AVIYPMLGGKHTEGMAIMMQLARELQTLAHDYHLAILISNSITKDGATGNRPALGRSWSFVPSTRILLTP TELNCGHSIVSLVKSPRQPTNLQLDMEIGICGTLEENNLSS			
Danio rerio	Zebrabärbling	327	NP_996959.2
MVVLREGICPGINEDFIKALQTEDIRTVEDFVSWNPEELAQKCSLSYKALVAVRRVLLAQYTAYPISGAD LYEELLSSTAILSTGSPSLDKLLDSGLYTGEITELTGSPGSGKTQVCFSVAVNISHQLKQTVVYIDTKGG MCANRLLQMLQTKTSNEQEQMEALQKIKVFRVFDVFSLLACLQNLRSTGLQKTSVGGGSVKALMVDS VSAVLSPILGGKQNEGMSLLMQVAGELKMIAKDFNIAVLVTNHVTKDGNGQLKAGLGLSWSHVPRTRV LLQRVENEETSSLRTATLTKSSRQACHMTKVFDLCHWSEERTTSISGKRKLD			

Vollständige Auflistung der für den Vergleich der Proteinsequenz von RAD51D über Speziesgrenzen hinweg verwendeten Referenzsequenzen.

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

	Titel	Seite
Abb. 1	Tumorgenese von Kopf-Hals-Karzinomen	5
Tabelle 1	Nachweis betroffener Tumorgene in Kopf-Hals-Tumoren in Abhängigkeit vom HPV-Status	6
Abb. 2	Schematische Darstellung der Reparatur von Doppelstrangbrüchen	9
Abb. 3	Strukturvergleich verschiedener RecA/RAD51-like Proteine	13
Abb. 4	Domänenstruktur des DNA-Reparaturproteins RAD51 Homolog 4 Isoform 1	14
Tabelle 2	Primersequenzen zur Amplifizierung von RAD51D	17
Tabelle 3	PCR-Bedingungen zur Amplifikation von RAD51D	18
Abb. 5	Verteilung der Tumorentitäten in der Studienpopulation	24
Tabelle 4	Epidemiologische Details der Studienpopulation	25
Abb. 6	Lokalisation der gefundenen Sequenzvarianten im DNA-Reparaturprotein RAD51D Isoform 1	26
Tabelle 5	Übersicht der gefundenen Sequenzvarianten RAD51D	27
Abb. 7	Sequenzvergleich von Patient T338 RAD51D Exon 2 und Wildtyp	28
Abb. 8	Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Ser46Cys	29
Abb. 9	Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Ser46Cys	29
Abb. 10	Die Aminosäuresequenz RAD51D p.Ser46Cys im Speziesvergleich	30
Abb. 11	Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 u. PROVEAN für RAD51D p.Ser46Cys	30
Abb. 12	Chromatogramme von Patient T346 RAD51D Exon 3 und Wildtyp	31
Abb. 13	Sequenzvergleich von Patient T245 RAD51D Exon 5 und Wildtyp	32
Abb. 14	Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Val132Ile	32
Abb. 15	Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Val132Ile	33
Abb. 16	Die Aminosäuresequenz RAD51D p.Val132Ile im Speziesvergleich	34
Abb. 17	Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 und PROVEAN für RAD51D p.Val132Ile	34
Abb. 18	Sequenzvergleich der Patienten T253/T280 RAD51D Exon 6 mit dem Wildtyp	35
Abb. 19	Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Arg165Gln	36
Abb. 20	Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Arg165Gln	37
Abb. 21	Die Proteinsequenz RAD51D p.Arg165Gln im Speziesvergleich	37
Abb. 22	Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 u. PROVEAN für RAD51D p.Arg165Gln	38
Abb. 23	Sequenzvergleich von Patient T250 RAD51D Exon 7 und Wildtyp	39
Abb. 24	Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Ala210Glu	40
Abb. 25	Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Ala210Glu	40
Abb. 26	Die Aminosäuresequenz RAD51D p.Ala210Glu im Speziesvergleich	41
Abb. 27	Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 u. PROVEAN für RAD51D p.Ala210Glu	42
Abb. 28	Sequenzvergleich von Patient T265 RAD51D Exon 8 und Wildtyp	42
Abb. 29	Sekundärstruktur Sequenzvariante RAD51D p.Glu233Gly	43
Abb. 30	Dreidimensionale Proteinstruktur RAD51D p.Glu233Gly	44
Abb. 31	Die Aminosäuresequenz RAD51D p.Glu233Gly im Speziesvergleich	45
Abb. 32	Pathogenitätsvorhersage mit Polyphen-2 u. PROVEAN für RAD51D p.Glu233Gly	45
Tabelle 6	Auswahl publizierter Sequenzvarianten RAD51D	68
Tabelle 7	Referenzsequenzen Speziesvergleich RAD51D	70