

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

**Charakterisierung von Spleißstellenvarianten bei
Patientinnen mit genetischer Prädisposition für hereditäre
Mamma- und Ovarialkarzinome**

Dissertation

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

vorgelegt von

Arezoo Fabritius, geb. Fattahi Mehr

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Torsten Lowin

Für meine Eltern Hourieh und Hamid

Zusammenfassung

Das korrekte Spleißen der prä-mRNA ist ein essenzieller und hochregulierter Prozess für die Bildung funktioneller Proteine. Bereits geringfügige Veränderungen in den letzten Nukleotiden eines Exons sowie den ersten Positionen eines Introns können die Erkennung von Spleißstellen beeinträchtigen und zu aberranten Transkripten führen. Dies ist insbesondere für Hochrisikogene des familiären Brust- und Eierstockkrebses wie *BRCA1*, *BRCA2* und anderen *Core*-Genen von hoher klinischer Relevanz, da Spleißdefekte häufig mit einem Funktionsverlust der Proteine und damit einem erhöhten Tumorrisiko einhergehen. Obwohl verschiedene *in-silico*-Algorithmen mit unterschiedlichen Bewertungen zur Vorhersage solcher Effekte verfügbar sind, bleibt ihre Genauigkeit begrenzt. Besonders intronische Varianten außerhalb der stark konservierten Positionen weisen eine hohe Unsicherheit auf und werden häufig als „Variante unklarer Signifikanz“ (VUS) eingestuft. Ziel dieser Arbeit war es daher, ausgewählte Varianten mithilfe bioinformatischer Spleißvorhersagen zu analysieren und die Ergebnisse durch funktionelle cDNA-Analysen experimentell zu überprüfen, um die Aussagekraft dieser *prediction tools* zu bewerten und deren Bedeutung für die klinische Klassifikation einzuordnen. Die Ergebnisse zeigten für Varianten an den kanonischen Positionen übereinstimmende Zusammenhänge zwischen den Bewertungen der Algorithmen und den cDNA-Befunden. Bei intronischen Varianten jenseits dieser Positionen traten heterogene Effekte wie partielle Intron-Insertionen auf, die von den Algorithmen nicht zuverlässig erkannt wurden. Besonders Varianten im Bereich der Akzeptorspleißstelle zeigten eine erhöhte funktionelle Unsicherheit. Der Vergleich mit Datenbanken bestätigte viele experimentelle Ergebnisse, offenbarte jedoch auch Varianten, die trotz funktioneller Hinweise weiterhin als VUS eingestuft bleiben. Die Analysen verdeutlichen, dass *in-silico*-Algorithmen zwar wertvolle Hinweise liefern, aber insbesondere bei nicht kanonischen intronischen Positionen und im Bereich der Akzeptorspleißstelle limitiert sind. Funktionelle RNA-Analysen sind daher entscheidend, um die tatsächlichen Spleißeffekte zu erfassen und Varianten korrekt einzustufen. Die Kombination beider Ansätze erhöht die diagnostische Sicherheit und unterstützt die präzisere klinische Klassifikation, insbesondere für VUS.

Abstract

The correct splicing of pre-mRNA is an essential and highly regulated process for the formation of functional proteins. Even minor changes in the last nucleotides of an exon and the first positions of an intron can impair the recognition of splice sites and lead to aberrant transcripts. This is particularly relevant for high-risk genes associated with familial breast and ovarian cancer, such as BRCA1, BRCA2, and other core genes, as splicing defects are often associated with a loss of protein function and thus an increased risk of tumor development. Although various in silico algorithms with different scores are available to predict such effects, their accuracy remains limited. Intronic variants outside the highly conserved positions are highly uncertain and are often classified as “variants of uncertain significance” (VUS).

The aim of this study was therefore to analyze selected variants using bioinformatic splicing predictions and to experimentally verify the results through functional cDNA analyses in order to evaluate the predictive power of these prediction tools and classify their significance for clinical classification.

The results showed consistent correlations between the algorithm evaluations and cDNA findings for variants at canonical positions.

For intronic variants beyond these positions, heterogeneous effects such as partial intron insertions occurred, which were not reliably detected by the algorithms.

Variants in the acceptor splice site region showed increased functional uncertainty. Comparison with databases confirmed many experimental results but also revealed variants that remain classified as VUS despite functional evidence.

The analyses illustrate that although in silico algorithms provide valuable information, they are limited, especially for non-canonical intronic positions and in the acceptor splice site region. Functional RNA analyses are therefore crucial for capturing the actual splicing effects and correctly classifying variants.

The combination of both approaches increases diagnostic certainty and supports more precise clinical classification, especially for VUS.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	mut	Mutiert
BBP	Branch Point Binding Protein	NLS	Nuclear Localization Signal
bp	Basenpaar	nt	Nukleotide
BRCA1	Breast Cancer Gene 1	RNA	Ribonucleic Acid
BRCA2B	Breast Cancer Gene 2	RING	Really Interesting New Gene
C	Cytosin	SA	Spliceacceptor
cDNA	Complementary DNA	SD	Splicedonor
ddH₂O	destilliertes Wasser	snRNAs	small nuclear RNAs
del	Deletion	snRNPs	small nuclear ribonucleoproteins
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	SR-Proteine	Serine/Arginine-reiche Proteine
DNA	Deoxyribonucleic Acid	ssDNA	single stranded DNA, DNA Einzelstrang
dNTPS	Deoxynucleotid Triphosphate	T	Thymin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TAE	Tris-Acetate-EDTA
ESEs	Exonic Splicing Enhancers	UV	Unclassified Variant
ESSs	Exonic SplicingSilencers	VUS	Variants of uncertain Significance
Ex	Exon	wt	Wildtyp
G	Guanin		
hnRNPs	Heterogene nucleäre Ribonukleoproteine		
HGVS	Human Genome Variation Society Nomenclature		
Ins	Insertion		
In	Intron		
ISEs	Intronic Splicing Enhancers		
ISSs	Intronic Splicing Silencers		
mRNA	Messenger RNA		

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das hereditäre Mammakarzinom	1
1.2 Mutationen beim hereditären Mammakarzinom	3
1.3 BRCA1 und BRCA2	5
1.4 Genetische Diagnostik	7
1.5 Möglichkeiten der Gendiagnostik	9
1.6 Spleißen	9
1.6.1 Exon-Intron Grenzen der prä-mRNA	10
1.6.2 Spleißosom	11
1.6.3 Regulationselemente	12
1.7 Alternatives Spleißen	14
1.8 Mutationen im Spleißmechanismus	15
1.9 Spleißvorhersageprogramme	16
1.9.1 MaxEntScan	17
1.9.2 Splice Site Finder	17
1.9.3 HBond-Score	18
1.10 Zielsetzung der Arbeit	18
2 MATERIAL & METHODEN	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Puffer	20
2.1.3 Kits	21
2.1.4 Software	21
2.1.5 Primer	22
2.2 Methoden	24
2.2.1 Datenbank Mutation und Selektion	24
2.2.2 Selektion der Proben und RNA-Extraktion	25
2.2.3 cDNA-Synthese	25
2.2.4 Beta-Actin PCR	26
2.2.5 Primer Design	28

2.2.6	Exonspezifische PCR	28
2.2.7	Agarose Gelelektrophorese	31
2.2.8	Aufreinigung PCR-Produkte und Sanger-Sequenzierung	31
2.2.9	Auswertung Softwareprogramm	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Mutationsanalysen	33
3.2	Klinische Interpretation der Ergebnisse	39
3.3	Mutationsanalysen im Spleißdonor	41
3.3.1	Mutationen im Exon	41
3.3.2	Mutationen an +1 und +2 Position	43
3.3.3	Mutationen an +3, +5, +6 Position	46
3.4	Mutationsanalysen im Spleißakzeptor	49
3.4.1	Mutation an -1, -10, -12 Position	49
4	DISKUSSION	51
4.1	Klinische Klassifikation	55
4.2	Schlussfolgerung	57
5	LITERATURVERZEICHNIS	59
	ANHANG	64

1 Einleitung

1.1 Das hereditäre Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in Deutschland weiterhin die häufigste Krebserkrankung der Frau und die häufigste Krebstodesursache. Von den betroffenen Frauen sind drei von zehn bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren (Frauen) und 72 Jahren (Männer) [1]. Das Lebenszeitrisko beträgt 12,8 % bei Frauen und 0,1% bei Männern [2]. Laut Krebsregister des Robert-Koch-Instituts von 2019 beträgt die Inzidenz bei Frauen 71.375 und bei Männern 760. Somit erkrankt etwa eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Die Mortalität liegt bei 18.519 (Frauen) und 193 (Männer). Zu den Früherkennungsuntersuchungen, die von der gesetzlichen Krankenkasse übernommen werden, gehört bei Frauen ab 30 Jahren die jährliche Tastuntersuchung der Brust sowie lokaler Lymphknoten bei der Gynäkologin oder dem Gynäkologen. Bei auffälligen Tastbefunden kann eine Abklärung mittels bildgebender Diagnostik wie Mammographie und Sonographie erfolgen und ggf. Biopsien entnommen werden, die dann histopathologisch untersucht werden können. Für Frauen ab 50 Jahren wird zusätzlich alle zwei Jahre eine Mammographie angeboten [3]. Hierbei handelt es sich um eine Röntgenuntersuchung beider Mammae, welche in zwei Ebenen (Cranio-caudal, Medio-lateral-oblique) durchgeführt wird [4]. Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind endokrine Faktoren, ein höheres Lebensalter sowie eine genetische Disposition. Zu den endokrinen Faktoren gehören eine frühe Menarche, Adipositas, Nulliparität, späte erste Geburt, kurze Stillzeit, sowie möglicherweise hormonelle Kontrazeptiva und Hormonersatztherapien in der Menopause [5]. 30% aller Frauen mit einem Mammakarzinom in Deutschland weisen eine hereditäre Disposition für Brustkrebs auf und erfüllen die Einschlusskriterien für eine genetische Untersuchung, die vom Deutschen Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs (DK-FBREK) etabliert und validiert wurden [6].

In einer Linie der Familie mindestens

- Drei Frauen an Mammakarzinom erkrankt sind unabhängig vom Alter
- Zwei Frauen mit Mammakarzinom, wobei mind. eine Frau vor dem 51. Lebensjahr erkrankt sein muss
- Zwei Frauen mit Ovarialkarzinom
- Eine Frau mit Mamma- und Ovarialkarzinom
- Eine Frau mit Mammakarzinom und eine Frau mit Ovarialkarzinom
- Eine Frau ≤ 35 Jahre mit Mammakarzinom
- Eine Frau ≤ 50 Jahre mit bilateralem Mammakarzinom
- Eine Frau mit Mamma- und Ovarialkarzinom und ein Mann mit Mammakarzinom
- Prädiktive Testung bei bekannter Mutation eines Risikogens für Mamma- oder Ovarialkarzinom in der Familie
- Eine Frau mit Ovarialkarzinom ≤ 79 Jahre
- Eine Frau mit triple-negativem Mammakarzinom ≤ 59 Jahre

Tabelle 1: Einschlusskriterien für die genetische Beratung und Testung nach [7]

Trifft eines (oder mehrere) der in Tabelle 1 aufgelisteten Einschlusskriterien zu, besteht ein hohes Erkrankungsrisiko mit einer Mutationsnachweiswahrscheinlichkeit von mindestens 10%. Eine genetische Testung mit ggf. Anbindung an ein Zentrum für hereditären Brust- und Eierstockkrebs sollte erfolgen. Bei der Testung handelt es sich um eine molekulargenetische Blutuntersuchung, die zunächst bei der Indexpatientin durchgeführt wird. Die Indexpatientin ist eine an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankte Person, welche mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit Trägerin, der gegebenenfalls in der Familie vorliegenden Genmutation ist. Analysiert wird die aus Blutlymphozyten isolierte DNA der Patientin. Liegt ein positiver Gentest vor, wird die Patientin in ein intensiviertes Früherkennungsprogramm eingebunden und ggf. bezüglich weiterer prophylaktischer Maßnahmen beraten [2]. Sollte der Gentest unauffällig sein, erfolgt eine Evaluation des persönlichen Risikos, um zu ermitteln, ob intensivierte Früherkennungsmaßnahmen indiziert sind. Je nach Risikosituation werden den Ratsuchenden unterschiedliche Früherkennungsprogramme angeboten. Unterschieden werden hierbei Trägerinnen einer *BRCA1* oder *BRCA2* Mutation, Trägerinnen von Mutationen in moderaten Risikogenen, sowie Frauen mit

negativem Genbefund, aber statistisch erhöhtem Brustkrebsrisiko. Diagnostisch gehört zu der intensivierten Betreuung die Palpation der Brust, Sonographie der Brust, Mammographie und Magnetresonanztomographie [8].

Angebot der intensivierten Früherkennung für

- **gesunde Ratsuchende mit statistischem 10-Jahres Lebenszeitrisiko >5% (CanRisk)**
oder
- **erkrankte Patientinnen mit Erkrankungsalter ≤ 45. LJ (vor dem 46. Geburtstag)**
 - Jährliche klinische und sonographische Untersuchung der Brust
 - Jährliche Kernspintomographie (MRT) bis zum 50. Lebensjahr
 - 1–2 jährliche Mammographie ab dem 40. Lebensjahr bzw. im Rahmen der Nachsorge

Angebot der intensivierten Früherkennung/Nachsorge für Mutationsträgerinnen

- Klinische Untersuchung und Ultraschall der Brust
 - Halbjährliche bei *BRCA1/2*, *TP53*, *PALB2*
 - Jährlich alle weiteren **core Gene**
- Jährliche Kernspintomografie (MRT) bis zum max. 70. Lebensjahr
- 1–2 jährliche Mammografie ab dem 40. Lebensjahr

Abb. 1: Einschlusskriterien und Ablauf der intensivierten Früherkennung und Nachsorge für Brustkrebs [9]

1.2 Mutationen beim hereditären Mammakarzinom

In etwa 5-10% der Fälle sind Mammakarzinome hereditär bedingt [10]. Zu den bekanntesten prädisponierenden Hochrisikogenen zählen die Brustkrebs-suszeptibilitätsgene *BRCA1* oder *BRCA2*. Mutationen in diesen autosomal-vererbten Genen finden sich bei rund 25% aller hereditären Mammakarzinome [11]. Patientinnen mit einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation erkranken rund 20 Jahre früher als Frauen ohne familiäres Risiko. Zudem haben sie ein lebenslanges Risiko von durchschnittlich 60 % an einem Mammakarzinom und von durchschnittlich 40 % an einem kontralateralen Mammakarzinom bzw. 16-55 % an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [12]. Aufgrund ihrer hohen Penetranz gelten *BRCA1* und *BRCA2* als Suszeptibilitätsgene. Keimbahnmutationen im *BRCA2*-Gen stellen für Männer ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs dar [13]. Sowohl *BRCA1*- als auch *BRCA2*-Mutationen sind mit einem erhöhten Risiko für Prostatakrebs verbunden, wobei das Risiko bei *BRCA2* Mutationen höher ist [14]. Eine moderate

Risikoerhöhung wurde ebenfalls für Pankreaskarzinome sowie Karzinomen des Gastrointestinaltraktes beobachtet [15].

Krebsart	Normalbevölkerung	<i>BRCA1</i> Mutation bis zu	<i>BRCA2</i> Mutation bis zu
Mamma -Frauen -Männer	12,5% <1%	80% -	70% 6%
Ovar	1-2%	40-65%	20-30%
Prostata	4-6%	15%	20%
Pankreas	0,6%	0,6%	7%

Tabelle 2: Krebserkrankungsrisiken in der Normalbevölkerung und bei *BRCA*-Mutation modifiziert nach [10]

Hohe Penetranz	<i>BRCA1, BRCA2, RAD51C, PTEN, TP53, CDH1</i>
Moderate/niedrige Penetranz	<i>CHEK2, BRIP1, PALB2, ATM, NBN, RAD51D, TP53</i>

Tabelle 3: Suszeptibilitätsgene mit hoher und moderater/niedriger Penetranz

Unterschieden werden Gene mit hoher Penetranz sowie Gene mit moderater und niedriger Penetranz. Zu den Genen mit hoher Penetranz zählen neben *BRCA1* und *BRCA2* auch *RAD51C*, welches primär mit einem erhöhten Risiko für Ovarialkarzinom assoziiert ist [16] [17]. Als Gene mit mäßiger und niedriger Penetranz werden *CHEK2*, *BRIP1*, *PALB2* und *ATM* beschrieben [18].

<i>TruRisk® Genpanel</i>	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53</i>
	<i>BARD1, NBN, FANCM, XRCC2, RECQL</i>

Tabelle 4: *TruRisk® Genpanel*

In der *TruRisk® Genpanel*-Analyse werden alle bekannten Risikogene für hereditären Brust- und Eierstockkrebs berücksichtigt, welche als *core genes* bezeichnet werden. Dazu zählen: *ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11* und *TP53* sowie zusätzliche Gene (*BARD1, NBN, FANCM, XRCC2, RECQL*), die noch Gegenstand weiterer Forschung sind. Die Multi-Gen-Analyse ist in den letzten

Jahren vor allem beim hereditären Brustkrebs ein wichtiger Bestandteil der prädiktiven sowie diagnostisch genetischen Untersuchung und wird jährlich mit dem Stand der aktuellen Forschung angepasst [19].

1.3 BRCA1 und BRCA2

BRCA1- und *BRCA2*-Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Erhaltung der Genomstabilität unter anderem durch Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination. Zudem kontrollieren sie die Zentrosomendynamik, Chromosomensegregation und Zytokinese während der Mitose sowie Meiose und gewährleisten damit eine zeitliche und räumliche Stabilisation des Genoms [20]. Funktionell werden sie zu der Gruppe der Tumorsuppressorgene gezählt. Tumorsuppressorgene hemmen das Wachstum von Zellen mit chromosomalen sowie DNA-Aberrationen. Bei irreparablen Schäden initiieren sie den Vorgang der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Ein Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens liegt vor, wenn beide Allele im Genom mutiert vorliegen [21].

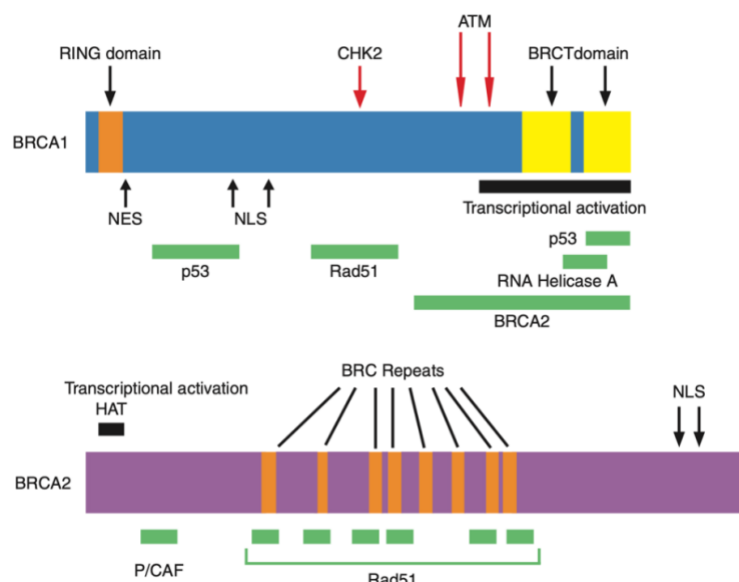


Abb. 2: Schematische Darstellung der *BRCA*-Proteine

Reproduced from Yoshida & Miki, Cancer Science © 2005 Japanese Cancer Association. Reproduced with permission of John Wiley & Sons [22]

Die schwarzen Pfeile stellen die verschiedenen Domänen dar. Die roten Pfeile deuten auf Stellen, die phosphoryliert werden können. Die grünen Balken verdeutlichen die Bindungsdomänen für die jeweiligen Proteine

BRCA1 befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q21) und besteht aus 24 Exons. Mit 3.426 bp ist Exon11 eines der größten menschlichen Exons und beinhaltet etwa 60% der codierenden Sequenzen [23, 24]. Das *BRCA1*-Protein, wie in Abb. 2 dargestellt, besteht aus 1.863 Aminosäuren und setzt sich zusammen aus einer zentralen N-terminalen *RING*-Finger-Domäne und einem C-Terminus (BRCT). Die N-terminale *RING*-Finger-Domäne bindet an das *BRCA1*-assoziierte *RING*-Domänen-Protein 1 (BARD1) und vermittelt damit die Ubiquitinligasefunktion [20]. Bei der Ubiquitinierung wird ein kleines ubiquitär exprimiertes Protein namens Ubiquitin an Lysinreste des Zielproteins angefügt. Die Verknüpfung erfolgt über drei Enzyme, dem Ubiquitin-aktivierenden-Enzym (E1), dem Ubiquitin-konjugierenden-Enzym (E2) und abschließend der Ubiquitinligase (E3). Die Modifikation mit Ubiquitin verändert die Oberflächenstruktur eines Proteins und somit dessen Interaktion mit anderen Proteinen. Ubiquitinierungen können reversibel, durch deubiquitinierende Enzyme, oder irreversibel sein. Sie regulieren Prozesse wie dem Zellzyklus, der Endozytose, der Proteinlokalisierung wie bspw. Transporte und dem Proteinabbau durch Proteasomen [21]. C-terminal folgend, befindet sich die *nuclear localization signal* (NLS)-Region mit Bindungsstelle für *p53*, einem Tumorsuppressorprotein. Es erkennt DNA-Schäden und hält den Zellzyklus an, damit sich die geschädigte Zelle nicht teilen kann. Es wird angenommen, dass *BRCA1* als Co-aktivator für *p53* dient und somit die *p53*-Signalwege stimulieren kann [25]. Im Anschluss reiht sich die DNA-Bindungsdomäne ein, über die auch die Proteine des *BRCA1-associated surveillance complex* (BASC) gebunden werden und das *chromatin-remodelling*, der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, reguliert wird. Proteine wie *RAD51*, *ATM* und *CHEK2* können in dieser Region binden. *RAD51* ist eine DNA-Rekombinase, welche bei Doppelstrangbrüchen die DNA-Reparatur mittels homologer Rekombination koordiniert [26]. Es wird jedoch angenommen, dass *BRCA1* und *RAD51* nicht direkt reguliert und die Wechselwirkung indirekt bedingt ist [27]. Am C-Terminus befinden sich zwei proteinbindende Domänen, über die Proteine aus DNA-Reparatursignalwegen (u.a. RNA-Polymerase II, *p53*) indirekt über *RAD51* mit *BRCA2* interagieren [20]. Da *BRCA1* nur bei 45% der familiären Brustkrebsfälle nachgewiesen werden konnte, wurde die Suche nach einem weiteren Gen fortgesetzt [22]. Dies gelang 1995 durch Wooster und Kollegen mit der Beschreibung von *BRCA2*, durch die Analyse von *BRCA1*-Mutations-negativen Brustkrebsfamilien, einschließlich männlichen Patienten [28]. *BRCA2* befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 13

(13q12), setzt sich aus 27 Exons zusammen und kodiert für ein Protein mit 3.418 Aminosäuren [20]. Verglichen mit *BRCA1*, besteht *BRCA2* aus mehr Aminosäuren und ist somit größer, besitzt jedoch nur zwei funktionelle Domänen. Die mittlere Region des Proteins enthält acht *BRC-repeats* in Exon 11, an denen *RAD51* direkt binden kann. Als Cofaktor dient ein kleines Protein *DSS1*, welches an den C-Terminus von *BRCA2* bindet, der auch die *NLS* beinhaltet [29]. *BRCA2* reguliert die intrazelluläre Lokalisation und Funktion von *RAD51* und spielt so eine wesentliche Rolle in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, wie in Abb. 3 dargestellt [22].

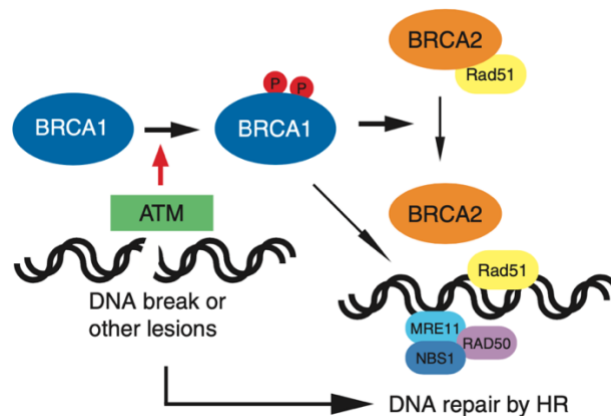


Abb. 3: Schematische Darstellung der Relevanz von *BRCA*-Proteinen bei dem Prozess der DNA-Reparatur

Reproduced from Yoshida & Miki, Cancer Science © 2005 Japanese Cancer Association.

Reproduced with permission of John Wiley & Sons [22]

Im Rahmen eines Doppelstrangbruchs wird *BRCA1* durch *ATM* phosphoryliert.

Phosphoryliertes *BRCA1* rekrutiert weitere Proteine und repariert gemeinsam mit dem *BRCA2/Rad51* Komplex die DNA durch homologe Rekombination

1.4 Genetische Diagnostik

Durch das erweiterte Wissen über das menschliche Genom im Rahmen der Forschung nimmt die medizinische Genetik einen wichtigen Stellenwert im klinischen Alltag ein. Besonders im Hinblick auf Prävention, Diagnostik und Therapie von genetisch beeinflussten oder bedingten Erkrankungen. Unterschieden werden diagnostisch genetische Untersuchungen und prädiktive genetische Untersuchungen, deren Definitionen im Gendiagnostikgesetz verankert sind. Bei der diagnostisch genetischen Untersuchung besteht das Patientenkollektiv aus bereits an Krebs erkrankten Personen bzw. Personen mit Hinweisen auf eine

genetische Krebsprädisposition. Hier kann eine genetische Untersuchung durch jede Ärztin/ jedem Arzt ohne fachärztlicher Ausbildung nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung vorgenommen werden (§ 7 Abs. 1, 1. Alternative GenDG). In der prädiktiv genetischen Untersuchung handelt es sich bei den Patienten um gesunde Personen, bei denen das Erkrankungsrisiko durch Anlageträgerschaft für eine Erkrankung analysiert wird. Dies darf nur von Fachärztinnen oder Fachärzten für Humangenetik bzw. Ärzten mit Zusatzbezeichnung für genetische Untersuchungen durchgeführt werden (§ 7 Abs. 1, 2. Alternative GenDG). Entscheidend ist zunächst die Differenzierung von sporadisch auftretenden Tumorerkrankungen und solchen, die auf genetischer Basis entstanden sind. Dies erfolgt durch Beratungsgespräche, angeboten in spezialisierten Krebszentren. Durch das Gendiagnostikgesetz werden die formalen Anforderungen für die Beratung sowie die genetische Untersuchung definiert. Neben der Aufklärung über die Validität genetischer Tests muss über die individuelle Tragweite der, unter Umständen schwerwiegenden familiären und psychosozialen Auswirkungen, auch hinsichtlich reproduktiver Entscheidungen, beraten werden [30]. Im weiteren Gespräch werden durch differenzierte Eigen- und Familienanamnese sowie gegebenenfalls klinischen Merkmalen erste Einschätzungen getroffen. Zudem kann bei auffälliger Familienanamnese eine Stammbaumanalyse über mindestens drei Generationen unter Angabe aller Krebserkrankungen inklusive Diagnosealter hinweisgebend sein [31]. Besonders, da eine große Mehrzahl der hereditären Tumorerkrankungen einem autosomal-dominanten Erbgang folgt [13]. Insgesamt machen hereditäre Tumorrisikosyndrome ca. 10% aller Krebserkrankungen aus, werden aber häufig nicht ausreichend diagnostiziert [32]. Hinweise auf ein erbliches Tumorsyndrom können habituell, anamnestisch und diagnostisch vorliegen. Habituell kann sich dies beim Betroffenen oder der Betroffenen in Form vom Auftreten mehrerer Tumore, sei es synchron oder sequenziell, oder in bestimmten phänotypischen Merkmalen widerspiegeln. Anamnestisch hinweisend ist das Vorliegen eines ungewöhnlich frühen Erkrankungsalters oder Erkrankungen weiterer Familienmitglieder. Hier ist es ebenfalls ratsam auch die Familienangehörigen in eine humangenetische Beratung zur weiterführenden Diagnostik einzubinden hinsichtlich Empfehlungen für Vorsorge- beziehungsweise Früherkennungsuntersuchungen. Diagnostisch können histopathologische und immunphänotypische Untersuchungsergebnisse des Tumors hinweisgebend sein ebenso weitere Untersuchungsmethoden wie der Endoskopie mit typisch

vorliegenden Befunden beispielsweise bei der familiären adenomatösen Polyposis [13].

1.5 Möglichkeiten der Gendiagnostik

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Rahmen des Humangenomprojekts im Jahr 2003 legte den Grundstein der medizinischen Gendiagnostik. Ausgehend vom Humangenomprojekt folgten weitere Forschungsprojekte mit dem Ziel, weitere funktionelle Elemente des humanen Genoms zu entschlüsseln und die bestehende Methodik zu verbessern [33]. Im Mittelpunkt der medizinisch genetischen Diagnostik liegt vor allem die hohe diagnostischer Sensitivität, schnelle Verfügbarkeit und gleichzeitig kostengünstige Bearbeitung. Ein modernes diagnostisches Hochdurchsatz-Verfahren ist das *Next-Generation-Sequencing* (NGS). Es erlaubt die parallele Sequenzierung mehrerer Millionen *DNA-Templates* und eignet sich zur erweiterten *Multi-Gen-Panel* Diagnostik bei deutlicher Zeit- und Kostenreduktion. Ein *Multi-Gen-Panel* beschreibt hier eine Analyse aller möglichen Gene, die für das jeweilige Krankheitsbild ursächlich sein können [34]. Bei der primären Sanger-Sequenzierung, entwickelt 1977 von Fred Sanger, basierend auf der Kettenabbruch-Synthese und anschließender Analyse, kann nur gezielt nach krankheitsverursachenden Veränderungen in der DNA-Sequenz gesucht werden. Gerade in der prädiktiven genetischen Testung ist eine Multi-Gen-Analyse zur sicheren Identifizierung möglicher Keimbahnmutationen fundamental. Für die Durchführung der NGS-basierten Diagnostik werden Leukozyten-DNA benötigt, welche über eine Blutentnahme mittels EDTA-Röhrchen gewonnen werden [35].

1.6 Spleißen

Die Genexpression beschreibt die Umsetzung der genetischen Information in ein Genprodukt. Zentraler Prozess ist die Proteinbiosynthese bestehend aus Transkription, Translation und den jeweiligen Modifikationen. Im Prozess der

Transkription wird ein kleiner Teil der DNA mittels RNA-Polymerasen in RNA umgeschrieben. Die unreife RNA besteht abwechselnd aus Exons, den kodierenden Sequenzen der DNA, und Introns, den nicht-kodierenden Sequenzen. Durch posttranskriptionelle Modifikationen, wozu u.a. das Spleißen gehört, entsteht die reife mRNA. Durch das Spleißen werden die intronischen Sequenzen aus der prä-mRNA ausgeschnitten und die exonischen Sequenzen miteinander verbunden. Die reife RNA wird nach den Modifikationen translatiert. Bei der Translation werden Basensequenzen der RNA in die Aminosäuresequenz eines Polypeptids übersetzt. An dem Vorläuferprotein finden erneute Modifikationen statt und es entsteht das reife Protein [21]. Lediglich 1,5% der 3,2 Milliarden Basenpaare der DNA werden transkribiert. Die prä-mRNA besteht im Schnitt aus 30.000 Nukleotiden. Die durchschnittliche Größe der reifen mRNA, die ein Protein kodiert, beträgt in der Regel weniger als 2.000 Nukleotide. Biochemisch verläuft der Vorgang des Spleißens durch zwei Umesterungsreaktionen, welche durch das Spleißosom katalysiert werden [21].

1.6.1 Exon-Intron Grenzen der prä-mRNA

Die Exon-Intron-Grenzen sind durch spezifische Basensequenzen, sog. Konsensussequenzen charakterisiert. Die 5'-Spleißstelle kennzeichnet den Beginn eines Introns und wird als Spleißdonor (SD) bezeichnet. In 98% der Fälle lautet die Konsensussequenz XAG/GTRAGT von den Positionen -3 (die letzten 3 Nukleotide des stromaufwärts gelegenen Exons) bis +6 (die ersten 6 Nukleotide des Introns). Das R steht für eine Purin-Base und das X für eine Base aus Adenosin oder Cytosin. Der Schrägstrich kennzeichnet die Exon-Intron-Grenze. Die 3'-Spleißstelle markiert das Ende des Introns und wird als Spleißakzeptor (SA) bezeichnet. Die Spleißstelle ist durch die Konsensussequenz YAG/ mit einer vorgelagerten Präferenz für Pyrimidine (=Y) definiert [36]. Neben der kanonischen Spleißstelle befindet sich zwischen 18-40 Nukleotiden stromaufwärts (5'-Richtung) die Verzweigungspunktsequenz (Branch Point Sequence), an dem sich die lassoähnliche Struktur bei der ersten Umesterungsreaktion im Rahmen des Spleißens bildet. Darüber hinaus findet sich zwischen der 3'-Spleißstelle und der Verzweigungspunktsequenz ein Polypyrimidintrakt in variabler Länge, welche als Erkennungssequenz für das Spleißosom dient [21].

1.6.2 Spleißosom

Das Spleißosom besteht aus einem Komplex aus Proteinen und RNA. Diese lagern sich bei jeder Spleißreaktion *de novo* zum Spleißosom zusammen und über zwei Umesterungsreaktionen wird das Intron, durch Bildung einer Lasso-Struktur entfernt und die zwei Exons verknüpft. Die kleinen RNA-Moleküle, snRNAs (small nuclear RNAs), werden im Komplex mit Proteinen als snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) bezeichnet. Insgesamt sechs snRNPs sind in einer definierten Reihenfolge an dem Spleißprozess beteiligt.

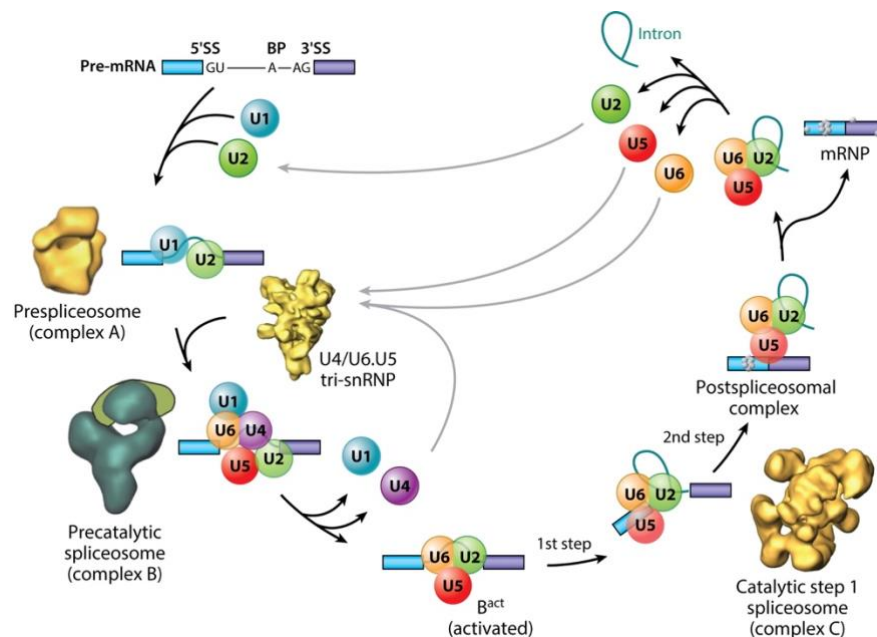


Abb. 4: Der Zyklus des Auf- und Abbaus des Spleißosoms [37]

Adapted from Will & Lührmann, © 2011 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Used with permission. [38]

Links oben beginnend mit der prä-mRNA binden die snRNPs (U1, U2, U4, U6 und U5) nacheinander, nach Erkennen der Spleißstellen an und katalysieren in zwei Reaktionen das Entfernen des Introns sowie die Verknüpfung des Exons.

Die Spleißosomausbildung beginnt mit der Anlagerung des U1-snRNP an das 5'-Ende des Introns durch Basenwechselwirkung zwischen der Konsensus-Sequenz der prä-mRNA und dem RNA-Anteil von U1 sowie zusätzliche Wechselwirkungen von Proteinkomponenten mit der prä-mRNA. Es folgt die Bindung des BBP (branch point binding protein, kein snRNP) an die Verzweigungsstelle sowie die Anlagerung des U2AF Proteins (U2 auxiliary factor, kein snRNP) an den Polypyrimidintrakt am 3'-Ende des Introns. Hierdurch kann das U2-snRNP das BBP verdrängen und an der Verzweigungsstelle anknüpfen. Es entsteht der A-Komplex. Durch die

Anlagerung lösen sich BBR und U2AF als non-snRNPs RNA-frei [21]. An den A-Komplex lagern sich die vorher assemblierten U4-, U5- und U6-snRNPs an, wodurch der B-Komplex entsteht. U1 wird an der 5'-Spleißstelle abgespalten und durch U6 ersetzt. Durch das Ablösen von U4 ist eine Interaktion von U6 und U2 möglich, welche das katalytische Zentrum des Spleißosoms bilden [36]. Es erfolgt die erste Umesterungsreaktion und somit eine weitere Umordnung des Spleißosoms, wodurch der C-Komplex generiert wird. Durch die nun unmittelbare Nachbarschaft der beiden Exone, wird durch U5-snRNP die zweite Umesterung katalysiert. Infolge der Umesterungsreaktionen wird das Intron als Lasso-Struktur entfernt und dissoziiert mit den Spleißfaktoren ab. Die zwei benachbarten Exone liegen nun verknüpft vor und es entsteht die reife mRNA [21].

1.6.3 Regulationselemente

Das Erkennen von Spleißstellen und die Regulierung des Spleißvorgangs wird durch bestimmte Sequenzmerkmale bestimmt, die sich gegenseitig beeinflussen. Diese werden als cis- und trans-wirkende-Elemente bezeichnet.

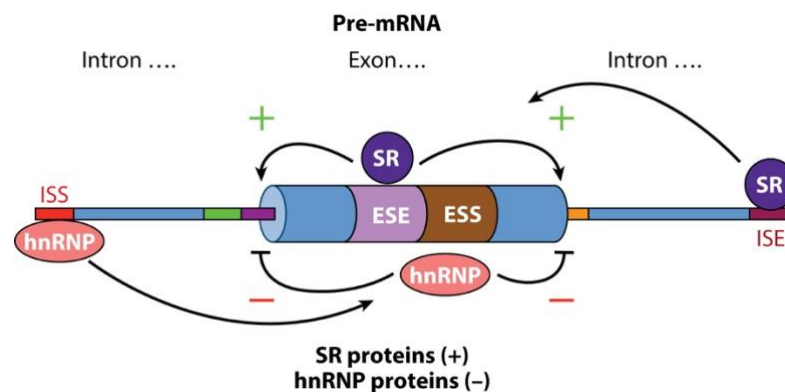


Abb. 5: Spleißregulierende Elemente der prä-mRNA

Reproduced, with permission, from Lee & Rio, copyright © 2015 by Annual Reviews. [37]
 Interaktion von cis-wirkenden Sequenzelementen mit trans-wirkenden Proteinen. SR-Proteine binden an *Enhancer*-Sequenzen und fördern die Exon-Inklusion, während hnRNP-Proteine an *Silencer*-Sequenzen binden und das Exon-Skipping (Überspringen) begünstigen.

Zu den cis-wirkenden Elementen gehören Nukleotidsequenzen auf der prä-mRNA. Dazu zählen die 5'-Spleißstelle, die 3'-Spleißstelle, die Verzweigungsstelle sowie exonische/intronische Spleißverstärker (*exonic/intronic splicing enhancers, ESEs*

und *ISEs*) und exonische/intronische Spleißinhibitoren (*exonic/intronic splicing silencers*, *ESSs* und *ISSs*). Als trans-wirkende Elemente werden Proteine bezeichnet, welche an die cis-wirkenden-Elemente binden können. Hierzu gehören das Spleißosom, Serin/Arginin-reiche (SR) Proteine und die heterogenen nuklearen Ribonukleoproteinen (hnRNPs), die rekrutiert werden können [39]. Darüber hinaus kann die 5'-Spleißstelle schwache 3'-Spleißstellen stromaufwärts stimulieren und somit ebenfalls regulatorisch auf den Spleißmechanismus wirken [40]. Die Spleißverstärker und Spleißinhibitoren fördern bzw. hemmen die Erkennung der Spleißstellen durch das Spleißosom. Die *ESEs* und *ISEs* fungieren zudem als Bindungsstellen für spleißregulierende Proteine, wie den Serin/Arginin-reichen Proteinen (SR-Proteine). Hierdurch werden Interaktionen mit nahegelegenen Spleißstellen gefördert, entweder durch die direkte Rekrutierung der Spleißmaschinerie oder durch Unterdrückung nebeneinander gelegenen Silencer-Elementen [41]. Im Gegensatz dazu führen *ESS*- und *ISS*-Elemente durch Wechselwirkungen mit Spleißrepressoren, wie den Mitgliedern der Familie der heterogenen nuklearen Ribo-nukleoproteine (hnRNP) zu einer Hemmung benachbarter Spleißstellen. Daraus resultierend kann das Spleißosom nicht an die Spleißstelle binden [42]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die spleißregulierenden Eigenschaften der SR-Proteine und hnRNP von ihrer Bindungsposition zur regulierten 5'-Spleißstelle bedingt sind. SR-Proteine verstärken das Spleißen nur dann, wenn sie an das Exon rekrutiert werden. Erfolgt eine Bindung an die gegenüberliegende intronische Seite der Spleißstelle, stören sie jedoch das Spleißen. HnRNP-Spleißfaktoren zeigen vergleichbare gegensätzliche Aktivitäten, jedoch in umgekehrter Positionsabhängigkeit [43]. Neben dem konstitutiven Spleißen, indem jedes Exon in exakter Reihenfolge zusammengefügt wird, ergeben sich durch das Zusammenspiel dieser antagonistischen Spleißfaktoren und Spleißregulatoren viele alternative Spleißvorgänge, durch die das physiologische Kodierungspotential eukaryotischer Genome erheblich gesteigert werden kann [41].

1.7 Alternatives Spleißen

Im Rahmen der gewebespezifischen Genexpression können durch den Prozess des alternativen Spleißens aus einem Gen mehrere Protein-Isoformen entstehen. Dadurch können reife mRNAs und die daraus translatierten Proteine sich untereinander sowohl qualitativ als auch quantitativ unterscheiden. Dies trägt zur Gewebeidentität und den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Zelle bei. Schätzungsweise mehr als 95% aller multiexonischen humanen prä-mRNAs werden alternativ gespleißt [44].

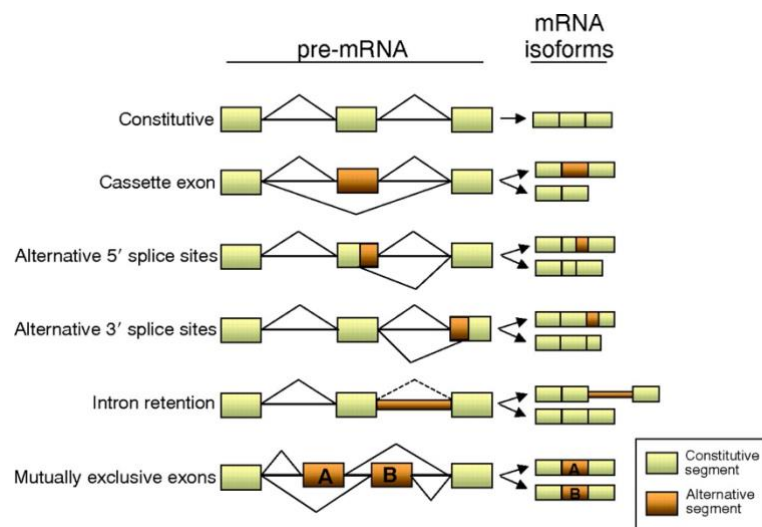


Abb. 6: Formen des alternativen Spleißens

Reproduced, with permission, from Srebrow&Kornblihtt, Journal of Cell Science 2006 [45]
Farbliche Darstellung der möglichen mRNA-Isoformen nach dem alternativen Spleißen der prä-mRNA.

Beim alternativen Spleißen werden andere Spleißstellen als beim konstitutiven Spleißen verwendet. Abb. 6 zeigt eine Übersicht möglicher Formen des alternativen Spleißens. Es kann beispielsweise ein Exon (Kassettenexon) übersprungen werden (*Exon-skipping*), oder durch Aktivierung alternativer 5'- und 3'-Spleißstellen kann ein Exon verkürzt oder verlängert werden. Zudem können auch Introns als Ganzes oder in Teilen in die reife mRNA eingebaut werden (*Intron-Retention*). Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass sich Exons durch Wechselwirkungen gegenseitig ausschließen können [45]. Alternatives Spleißen ist ein Prozess, der physiologischerweise vorkommt und keinen Krankheitswert besitzt. Es gibt eine Vielzahl von alternativen Transkripten, die in verschiedenen Mengen und verschiedenen Gewebetypen vorhanden sind. Beim aberranten Spleißen liegt ein nicht-physiologischer Hintergrund vor. Durch eine Mutation wird ein aberranter

Spleißvorgang initiiert, der vom Prinzip her dem des alternativen Spleißens entspricht. Hierbei entstehen jedoch Transkripte, die nicht bekannt sind. Die Interpretation dieser Transkripte ist sehr komplex und schwierig hinsichtlich Aussagen zur Pathogenität und weiteren, vor allem klinischen Auswirkungen.

1.8 Mutationen im Spleißmechanismus

In etwa 15% der genetisch determinierten Erkrankungen liegen Mutationen vor, die den Spleißmechanismus betreffen und somit das Protein verändern. Sequenzvariationen in der Proteincodierungsregion werden entweder als *Frame-Shift*, *Nonsense*, *Missense* oder Synonym klassifiziert. *Frame-Shift*- oder *Nonsense*-Mutationen führen zu verkürzten Protein-Isoformen, während *Missense*-Mutationen Aminosäuren betreffen, die für die Struktur und Funktion eines Proteins wichtig sein können. Translatorisch synonyme Mutationen auch allelische Polymorphismen oder Nukleotidvariationen genannt, werden als neutral angesehen, können jedoch auch Spleißelemente beeinflussen. Mutationen an den kanonischen Spleißstellen und auch in den regulatorischen Spleißelementen führen zu aberranten Spleißen, häufig ausgelöst durch Exon-Skipping oder Aktivierung kryptischer Spleißstellen und damit Änderung des Leserahmens [36]. Aktuell sind 8,3% (42.559) aller in der Human Gene Mutation Database (HGMD) gemeldeten Mutationen (510.804) Spleißmutationen (HGMD-Datenbank, abgerufen am 04. Januar 2026). Da die meisten gemeldeten Mutationen nur durch genomische DNA-Sequenzierung identifiziert werden, wird jedoch vermutet, dass die Zahl der pathogenen Spleißmutationen deutlich höher ist [46]. RNA-basierte Assays zur Identifizierung von Spleißdefekten sind bisher aufgrund der praktischen Schwierigkeiten bei der RNA-Extraktion, der RNA-Verfügbarkeit sowie Stabilität nicht in der Routinediagnostik etabliert. Das Spleißen ist ein grundlegend komplizierter Mechanismus, der bislang nur in Teilen erfasst ist. Dementsprechend ist besonders die klinische Interpretation von Spleißmutationen sehr schwierig. Klinisch bewertet werden können diese Sequenzvarianten (I) als Polymorphismen, von denen angenommen wird, dass sie in Bezug auf das Krankheitsrisiko neutral sind, (II) als pathogene Mutationen, die fehlerhaft gespleißte mRNA-Moleküle und dementsprechend funktionsveränderte bzw. funktionslose Proteine zur Folge haben

oder (III) auch als „Varianten unklarer Signifikanz“ (VUS) [45], d.h. genetische Veränderungen, deren Zusammenhang mit einer Erkrankung nicht eindeutig nachweisbar ist. Letztere können weder als pathogen bzw. krankheitsverursachend noch als gutartig oder neutral bewertet werden. Eine klare klinische Bewertung ist hier nicht möglich, was sowohl für den Kliniker, der keine eindeutige Handlungsempfehlung geben kann, als auch für den Patienten, bei dem die Unsicherheit Angst und Stress auslöst, eine Herausforderung darstellt. Durch die Verwendung von *in-silico*-Vorhersage-Algorithmen zur Bewertung der Pathogenität von Spleißstellenmutationen kann die Effizienz von Mutationsnachweiseverfahren erhöhen und die diagnostische Bewertung unterstützen [36]. Insbesondere hinsichtlich der genetischen Beratung des Patienten können die verschiedenen webbasierten Software-Tools helfen, die Auswirkungen von Änderungen in den Spleißstellen auf das aberrante Spleißen zu beurteilen [47].

1.9 Spleißvorhersageprogramme

In-silico Methoden sind web-basierte Software-Tools, welche die Auswirkungen von Änderungen der Spleiß-Donor- oder -Akzeptor-Sequenzen auf das aberrante Spleißen beurteilen können [36]. Ursprünglich wurden diese Programme basierend auf bioinformatischen Daten, durch maschinelles Lernen für Forschungszwecke konzipiert und entwickelt [39]. Jedoch werden diese auch zunehmend in der Routinediagnostik integriert und sind mittlerweile fester Bestandteil in der Klassifizierung von Keimbahn-Sequenzvarianten in den Risikogenen für Brust- und Eierstockkrebs [19]. Die meisten *in-silico*-Tools konzentrieren sich auf die Analyse der Konsensus-Sequenzen und somit primär auf Auswirkungen von Mutationen innerhalb der 5'- und 3'-Spleißstelle, da diese auch besser verstanden sind als trans-wirkende Spleißregulatoren [39]. Dazu zählen an der 5'-Spleißstelle das Nukleotid an Position -3 (dem dritten Nukleotid vom 3'-Ende des stromaufwärts liegenden Exons) bis Position +6 (das sechste Nukleotid im Intron). An der 3'-Spleißstelle werden je nach Algorithmus eine unterschiedliche Anzahl an Nukleotiden der Konsensussequenz berücksichtigt. Diese reichen von -20 (dem zwanzigsten Nukleotid des stromaufwärts liegenden Introns) bis +3 (dem dritten Nukleotid des folgenden Exons). Für jeden Algorithmus sind unterschiedliche

Scores definiert [36]. Eine Ausnahme, für die keine Vorhersage gestellt werden kann, sind tiefe intronische Mutationen. Ob sie das Spleißen beeinflussen, kann nur experimentell untersucht werden [47]. In den folgenden Abschnitten wird auf die zugrundeliegende Theorie der jeweiligen Algorithmen näher eingegangen. Grundsätzlich haben Mutationen nahe der Intron-Exon-Grenze einen starken Einfluss auf den Spleißvorgang [48]. Für die 5'-Spleißstelle wurde als Konsensussequenz der aus 11 Nukleotiden bestehende Sequenzabschnitt von Nukleotidposition -3 bis +8 definiert [49]. Zur Beurteilung der 3'-Spleißstelle werden die Nukleotidpositionen -20 bis +3 einbezogen [36]. Um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Vorhersagen zu erhöhen, bietet es sich an, verschiedene Spleißstellen-Vorhersage-Algorithmen in Kombination miteinander zu verwenden und die Ergebnisse zu vergleichen.

1.9.1 MaxEntScan

Der Algorithmus beruht auf dem Modell der maximalen Entropie (MEM) und dem *First-order-Markov-model* und bezieht die 5'-Spleißstelle als auch die 3'-Spleißstelle mit ein [50]. Das Modell der maximalen Entropie ist ein statistischer Ansatz, basierend auf kurzen Sequenzmotiven mit Bezug auf lokalen Abhängigkeiten von benachbarten und nicht-benachbarten Positionen. Das *First-order-Markov-model* erkennt Abhängigkeiten zwischen zwei benachbarten Positionen [36]. MaxEntScan ist besonders nützlich bei der Identifizierung von Donor- und Akzeptorspleißstellen und liefert Vorhersagen darüber, wie wahrscheinlich es ist, dass bestimmte Stellen als Donor- oder Akzeptorspleißstellen fungieren. Im Vergleich zu anderen Modellen, die nur die Konsensussequenzen verwenden, können durch den Algorithmus präzisere Vorhersagen hinsichtlich des Spleißvorgangs getroffen werden.

1.9.2 Splice Site Finder

Der SpliceSiteFinder basiert auf einer positionsspezifisch-gewichteten Matrix (*Position-specific weight matrix* (PSWM)) von Shapiro und Senapathy und berücksichtigt die Sequenzkonservierung der 5'-Spleißstelle von Position -3 des

vorgelagerten Exons bis +6, dem sechsten Nukleotid im Intron, um die Wahrscheinlichkeit von Spleißstellen vorherzusagen [51]. SSF kann jedoch auch Mutationen in der 3'-Spleißstelle analysieren, wobei ein vergleichbarer Datensatz entscheidend ist. Die PSWM gibt jeder Position in der Sequenz einen Gewichtungswert basierend auf der Häufigkeit der entsprechenden Nukleotide in bekannten Spleißstellen. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Sequenz als Spleißstelle bewertet. Der numerische Score von SSF liegt im Bereich 0 bis 100. Bezogen auf die Konsensussequenz bildet der Wert 100 eine komplette Übereinstimmung ab, während ein Score von 0 darauf hinweist, dass alle Nukleotidpositionen von der Konsensussequenz abweichen. Der Score hilft zu beurteilen, wie stark eine bestimmte Sequenz als Spleißstelle fungieren kann [36].

1.9.3 HBond-Score

Der HBond-Score ist ein Algorithmus zur Vorhersage von RNA-Struktur und RNA-RNA-Wechselwirkungen. Er wird verwendet, um das Wasserstoffbrückenbindungsmuster der 11 Nukleotide der 5'-Spleißstelle und dem U1 snRNA, einem kleinen Ribonukleoprotein, das Teil des Spleißosoms ist, zu bewerten. Es ist bekannt, dass eine stabile U1 snRNA-Duplexbildung mit der 5'-Spleißstelle die prä-mRNA vor dem Abbau schützt und die Bildung des Spleißosoms initiiert, welches den Vorgang des Spleißens katalysiert [52]. Im Gegensatz zu rein statistischen Ansätzen, die derzeit Nukleotide jenseits der Position +6 ignorieren, berücksichtigt der HBond-Algorithmus die Positionen +7 oder +8 vollständig. Die Relevanz dieser Positionen für die Bindung des U1-snRNA-Duplexes an die Spleißstelle wurde in experimentellen Arbeiten belegt [53].

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Aussagekraft und Grenzen bioinformatischer Spleißvorhersagen systematisch zu untersuchen und deren Ergebnisse mit funktionellen RNA-Analysen zu vergleichen. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage,

ob Sequenzvarianten in Hochrisikogenen für familiären Brust- und Eierstockkrebs zu aberranten Spleißereignissen führen. Durch die Kombination von *in-silico-Tools* (MaxEntScan, SpliceSiteFinder und HBondScore) und experimentellen cDNA-Analysen sollen sowohl übereinstimmende als auch abweichende Befunde identifiziert werden, um die Stärken und Schwächen der einzelnen Vorhersageverfahren sichtbar zu machen. Ein weiteres Ziel ist es, die Ergebnisse im Kontext klinischer Varianteneinstufungen, insbesondere der in *ClinVar* hinterlegten Bewertungen und der Klassifikationskriterien des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs, einzuordnen. Dadurch soll aufgezeigt werden, inwiefern funktionelle Daten zur Präzisierung bestehender Klassifikationen beitragen können und welche Bedeutung sie insbesondere für Varianten unklarer Signifikanz (VUS) haben. Insgesamt verfolgt die Arbeit das übergeordnete Ziel, die Interpretation von Spleißvarianten zu verbessern und damit langfristig klinische Entscheidungsfindung bei Patient:innen mit familiären Brust- und Eierstockkrebs zu unterstützen.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Thermocycler OmniGene TR3 CM220	Hybaid Limited, Heidelberg
Thermocycler T3000 & T3	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Mini Star Silverline	VWR, Darmstadt
Transilluminator Quantum-ST4 1000/26MX	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
Analysewaage PM480 DeltaRange	Mettler, Greifensee
Power-Pac 300	BioRad Technologies, USA
Elektrophoresekammer Mini-Sub Cell GT	BioRad Technologies, USA
Elektrophoresekammer Sub-Cell Model 96	BioRad Technologies, USA
Mikrowelle	Bosch
Vortex-Mixer Reax 2000	Heidolph, Schwallbach
Nanodrop 2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Puffer

Primer Random	Roche, Mannheim
LiChrosolv-Wasser (Aqua dest.)	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma Life Science, USA
Ampli Taq Gold	Applied Biosystems, USA
100 mM dNTP Mix (5190-7750)	Agilent, Waldbronn
GelRed	Biotium, USA

ExoSAP-IT Express	Applied Biosystems, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma Life Science, USA
Trisbase	Sigma Life Science, USA
6x TriTrack DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, USA
1 kB Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, USA
	242 g Trisbase
50x Tris-Acetate-EDTA (TAE) Puffer pH 8	57 ml Essigsäure
	36,6 g EDTA
	Mit VE-Wasser auf 1L auffüllen
1x Tris-Acetate-EDTA (TAE) Puffer pH 8	40 ml 50x TAE Puffer
	mit VE-Wasser auf 2L auffüllen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Life Science, USA

2.1.3 Kits

Omniscript RT Kit (200)	QIAGEN, Hilden
LightCycler 480 High resolution Melting Master	Roche, Mannheim

2.1.4 Software

Alamut Visual Plus	Sophia Genetics
Batch Primer 3	Genomics & Gene Discovery USDA-ARS, Canada
SNP Check	Genetools.org, United Kingdom
Chromas Lite	Technelysium Pty Ltd, Australia

2.1.5 Primer

Exon	Primer	Sequenz	Annealing
Beta-Actin	5 F	TT CGT CGG GAC CGG TAG AGA	60°C
	6 R	ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG	
BRCA2 Exon23	23-24 F	GTCACAACCGTGTGGAAGTT	55°C
	23-24 R	TGCCAGTAAATTGTAACATTCTG	
BRCA2 Exon6	2 F	CAAGCATTGGAGGAATATCG	54°C
	2-6 R	AGGATCCACCTCAGCTCCTA	
BRCA2 Exon15	c14 F	GATGGACATGGCTCTGATGA	55°C
	c17 R	AGCTGCCAGTTTCCATATGA	
BRCA2 Exon21	c20-22 F	GAGGAAATGTTGGTTGTGTTG	55°C
	c20-22 R	GATGGACGCCAAATACTCAG	
BRCA2 Exon25	c25-26 F	GGATTTGTCGTTTCTGTTGTG	58-54°C
	c25-26 R	CTTCCTTTTGGCCATACAAA	
BRCA1 Exon14	13-15 F	TGCTCAGGGCTATCCTCTC	57°C
	13-15 R	GATTCCAGATTCCAGGTAAGG	
BRCA1 Exon3-6	c2-7 F	TCGCGTTGAAGAAGTACAAA	55°C
	c2-7 R	TAGAAGTCTTTTGGCACGGT	
BRCA1 Exon16	c16-18 F	ACGATTTGACGGAAA	55°C
	c16-18 R	TTCTTTCTTTAATAGACTGGGTCA	
BRCA1 Exon23	19-24 F	CTAGGAATTGCGGGAGGA	55°C
	19-24R	GTCCTGTGGCTCTGTACCTG	

BRIP1 Exon5	c3 F	AGCCTTACTTTGTTCTGCTT	10x 60°C
	c7 R	ACAACAGCACCTAGAACAGT	30x 55°C
ATM Exon28	c26 F	ATGAGGTGAAGTCCATTGCT	55°C
	c30 R	TCACAACAAAGGGAGAAGCT	
CHEK2 Exon4	c2 F	ATATCCAGCTCCTCTACCAG	55°C
	c5 R	TGCCTTAGGATAAACTGACTG	
RAD51D Exon2	c1 F	CTCTCTAGGAAGGGGTAGGG	10x 60°C
	c6 R	TCACAGTTCCTGAAGAACCA	30x 55°C
RINT1 Exon13	11 F	CGATTAACACAAGTGATGAAAGA	10x 60°C
	15 R	TTCATTTAATGCTGCTGTGG	30x 55°C
RAD51C Exon8	c4 F	TCCAGATTTCTTTTCAGAACAC	55°C
	c9 R	TGCAATGAACATGCAGAAGT	

2.2 Methoden

2.2.1 Datenbank Mutation und Selektion

Am Zentrum für familiären Brust- und Eierstockkrebs Düsseldorf wird Patient:innen in der Tumorrisikosprechstunde bei Erfüllung definierter klinischer Einschlusskriterien, wie in Tabelle 1 dargestellt, eine genetische Beratung sowie weiterführende molekulargenetische Diagnostik angeboten. Im Rahmen der Multi-Genanalyse mittels des *NGS-TruRisk®-Panel* werden insgesamt 34 Gene hinsichtlich ihrer Mutationsfrequenzen sowie ihrer bislang bekannten klinischen Relevanz untersucht. Die hierbei generierten Befunde werden systematisch in einer Datenbank dokumentiert [54]. Die Datenbanken aller universitären Zentren, die dem „Deutschen Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs“ (GC-HBOC) angehören, werden in einer zentralen Datenbank in Leipzig zusammengeführt. Diese enthält sämtliche bislang erfasste Varianten, einschließlich der zugehörigen Annotationen, und ist für die beteiligten Zentren zur Abfrage und Auswertung zugänglich. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Referenzdatenbank des Düsseldorfer Zentrums für familiären Brust- und Eierstockkrebs diente als Grundlage für die Anwendung und Evaluation der eingesetzten bioinformatischen Algorithmen. Die Datenbank basiert auf Proben von Patient:innen aus der Tumorrisikosprechstunde, bei denen im Zuge der ersten Mutationsanalyse ein auffälliger Befund festgestellt wurde. Im Rahmen einer zweiten Probenabnahme (sogenannten B-Probe) wurden zusätzlich RNA-Proben gewonnen und bei -80°C konserviert. Die analysierten Proben stammen von Patient:innen, die am genannten Zentrum betreut wurden. Für die Nutzung der Daten liegt ein positives Ethikvotum vor (Referenznummer 3260). Die zugrundeliegende Datenbank wird seit 1997 geführt und erfasst jede Patientenprobe mittels einer eindeutigen Proben-ID. Darüber hinaus werden das jeweils betroffene Gen sowie die identifizierte Variante unter Angabe der cDNA-Position und der genomischen Position annotiert. Ergänzend werden die codierende Konsequenz, der Variantentyp sowie das betroffene Protein dokumentiert.

2.2.2 Selektion der Proben und RNA-Extraktion

Zunächst erfolgte eine systematische Sortierung der Variantendatenbank des Molekulargenetischen Labors der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe. Sortiert wurden die Sequenzvarianten anhand ihrer Position innerhalb der jeweiligen Gene. Auf dieser Grundlage wurden die Varianten mithilfe verschiedener *in-silico*-Algorithmen bewertet. Zu den *in-silico-tools* gehörten unter anderem der MaxEntScan sowie der von Prof. Schaal und Kollegen aus dem Institut für Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf entwickelte Algorithmus HBondScore. Beide Verfahren ermöglichen eine Einschätzung der intrinsischen Spleißstellenstärken und deren Veränderungen durch die jeweilige Mutation. Ein besonderer Fokus lag auf Varianten in den *Core*-Genen, da hier eine ausreichende Datenbasis für vergleichende Analysen vorlag. Soweit möglich, wurden pro Position, angefangen mit dem letzten Nukleotid im Exon, dann der ersten Position im Intron usw., drei Proben in der jeweiligen Gruppe untersucht. Dabei wurden auch Varianten an identischen Positionen in unterschiedlichen Introns desselben Gens gegenübergestellt, um den Einfluss des genomischen Kontexts zu evaluieren. Ziel der Auswahl war die Zusammenstellung eines möglichst repräsentativen Probenkollektivs. Die Analyse war jedoch durch methodische und praktische Einschränkungen limitiert. Hierzu zählten die teilweise eingeschränkte Verfügbarkeit geeigneter RNA-Proben sowie die primerbasierte Amplifizierbarkeit bestimmter Zielregionen im Rahmen der Sanger-Sequenzierung. Für jede ausgewählten Probe wurde eine passende Wildtyp-Kontrolle mitgeführt. Sofern möglich, stammten diese Kontrollen aus derselben Familie, typischerweise von Angehörigen, bei denen im Rahmen der genetischen Diagnostik keine pathogene Variante im jeweils untersuchten Gen nachgewiesen wurde.

2.2.3 cDNA-Synthese

Mithilfe des *Omniscript-RT Kits* erfolgte die Synthese der cDNA aus RNA. Eingesetzt wurde eine Konzentration von 500ng RNA in einem Gesamtvolumen aus 12,75 µl RNase-freiem Wasser in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die entsprechende Menge an benötigter RNA wurde für jede Probe einzeln berechnet. Die Negativkontrolle bildete eine Probe mit dem gleichen Gesamtvolumen bestehend aus RNase-freiem Wasser. Zur Linearisierung der RNA erfolgte eine

Inkubation der Proben für 5 min bei 65°C im *Thermocycler Omnigene*, mit anschließender Kühlung auf Eis sowie kurzer Zentrifugation. Zu jeder Probe wurde 7,25 µl *Mastermix* (Tabelle 5) pipettiert, sodass ein Endvolumen von 20 µl vorlag. Nach kurzer Mischung und Abzentrifugation des Reaktionsansatzes erfolgte die Inkubation für 60 min bei 37°C sowie abschließend 5 min bei 93°C. In diesem Schritt entsteht über die Reverse Transkriptase die cDNA. Die synthetisierte cDNA konnte nun auf Eis abgekühlt und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Reagenzien	Volumen (µl)
10x Puffer	2,0
dNTP-Mix (10 mM)	2,0
Omni/Sensiscript RT	1,0
Random Primer	2,0
RNAsin	0,25
Gesamtvolumen	7,25

Tabelle 5: cDNA Mastermix

2.2.4 Beta-Actin PCR

Die Kontrolle der Reinheit der cDNA-Synthese erfolgte über die Beta-Actin PCR. Beta-Actin ist ein ubiquitär exprimiertes Gen. Liegt bei der cDNA-Synthese eine Kontamination mit genomischer DNA vor, wird dies über unterschiedlich große Banden im Agarose-Gel sichtbar. Über die Beta-Actin PCR kann somit eine Aussage über die Qualität der cDNA-Synthese gestellt werden. Bei reiner cDNA liegt eine Bande vor (Abb. 7). Sollte eine Kontamination mit genomischer DNA vorliegen, stellt sich eine zusätzliche Bande bei ca. 800bp dar. Eine Kontamination sollte vermieden werden, da ansonsten über die anschließende Sanger-Sequenzierung keine valide Aussage getroffen werden kann. Die PCR wurde in einem 25 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Die cDNA wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit einem Gesamtvolumen von 0,5 µl eingesetzt. Es wurde sowohl die cDNA-Negativkontrolle mit Aqua dest. sowie eine Negativkontrolle bestehend aus dem Beta-Actin *Mastermix* mit Aqua dest. mitgeführt (Tabelle 6). Das Temperaturprofil ist in Tabelle 7 dargestellt.

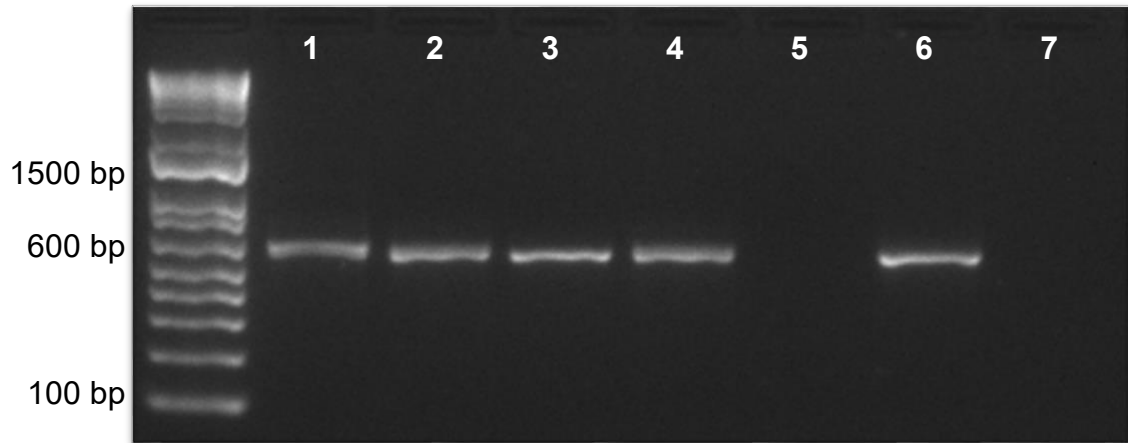


Abb. 7: Agarosegel einer Beta-Actin PCR

Nr. 1-4: Probe, Nr. 5: Negativkontrolle mit Aqua dest., Nr. 6: Kontrollprobe, Nr. 7: Beta-Actin *Mastermix* mit Aqua dest. DNA Ladder zum Vergleich

1x Mastermix	Volumen (µl)
10x Puffer	2,5
Beta-Actin F-Primer (10 µM)	1,25
Beta-Actin R-Primer (10 µM)	1,25
dNTPs (10 mM)	2,0
Ampli Taq Gold-Polymerase	0,25
Aqua dest.	17,25
Gesamtvolumen	24,5

Tabelle 6: Mastermix Beta-Actin PCR

Programmablauf	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Initialisierung	95	900	35 Zyklen
Denaturierung	95	60	
Annealing	60	60	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	480	

Tabelle 7: Temperaturprofil Beta-Actin PCR

2.2.5 Primer Design

Für die PCR/DNA-Amplifikation zur Mutationsanalyse mussten Primer erstellt werden. Zur Erstellung von Primern müssen viele Faktoren wie Primergrößen, der Guanin-/Cytosin-Anteil, die Länge des zu amplifizierenden Bereiches sowie das korrekte Temperaturoptimum, in dem das Primer Paar an die cDNA Vorlage binden kann, berücksichtigt werden [55]. Zunächst wurde die Nukleotidabfolge, je nach Transkriptgröße, ein bis zwei Exons vor und nach dem Abschnitt in der die Sequenzveränderung vorliegt, mithilfe von der Software Alamut Visual Plus ermittelt. Um alle Faktoren für das ideale Primer Paar anzuwenden, wurde das online öffentlich verfügbare und häufig verwendete Primer-Design-Programm „BatchPrimer3“ (<https://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>) verwendet. Um eine korrekte Bindung der Primer an die cDNA zu gewährleisten, wurde für die Temperatureinstellungen als Minimum 55°C, Optimum 57°C und Maximum 60°C gewählt mit einer maximalen Temperaturdifferenz von 2°C. Über *Genetools SNP Check* (<https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm>) wurden die Primer Sequenzen kontrolliert, um mögliche SNPs in den komplementären Primer-Sequenzen auszuschließen. Die fertigen Primer wurden bei *metabion international* AG bestellt.

2.2.6 Exonspezifische PCR

Die Amplifizierung des gewünschten Abschnittes der cDNA erfolgt über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), einer Methode DNA in-vitro zu vervielfältigen [56]. Für die Reaktion werden hierbei die cDNA als *template*, passende Primer, Puffer, Nukleotide und DNA-Polymerase als Schlüsselenzym benötigt. Mithilfe eines *Thermocyclers*, welcher ein voreingestelltes Temperaturprofil durchläuft, wird die cDNA zunächst bei 95°C denaturiert, d.h. die zwei komplementären DNA-Stränge trennen sich voneinander in Einzelstränge. Nach der Denaturierung wird die Temperatur auf das Optimum der Primer gesenkt, welche meist im Bereich von 54°C bis 60°C liegt und als *Annealing* bezeichnet wird. Die Primer binden komplementär an das entsprechende Segment der Einzelstrang-DNA. Es folgt der Schritt der Elongation bei 72°C, indem die DNA-Polymerase an die Primer bindet und durch Addition von Nukleotiden einen komplementären DNA-Strang bildet. Mit jedem

Zyklus wird die Anzahl der kopierten DNA-Stränge verdoppelt [57]. Je nach *Annealing* Temperatur der Primer wurden die entsprechenden Temperaturprofile, wie in Tabelle 8, 9, 10, 11 aufgeführt, verwendet. Haben die Primer ein definiertes Temperaturoptimum, wurde die entsprechende Temperatur als *Annealing* Temperatur eingestellt. Eine Besonderheit bildeten Primer, die entweder zwei unterschiedliche *Annealing* Temperaturen benötigten (Tabelle 9) oder ein abfallender Temperaturgradient eingestellt werden musste, um unspezifische Amplifikation zu vermeiden (Tabelle 11). Für die *RAD51D* PCR wurde aufgrund des hohen Guanin-/Cytosin-Gehaltes eine längere Denaturierung programmiert (Tabelle 10).

Programmablauf	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Initialisierung	95	900	
Denaturierung	95	60	40 Zyklen
Annealing	X	60	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	480	

Tabelle 8: PCR-Temperaturprofil mit einer *Annealing* Temperatur

Programmablauf	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Initialisierung	95	900	
Denaturierung	95	30	10 Zyklen
Annealing	60	30	
Elongation	72	30	
Denaturierung	95	30	30 Zyklen
Annealing	55	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	480	

Tabelle 9: PCR-Temperaturprofil mit unterschiedlichen *Annealing* Temperaturen

Programmablauf	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Initialisierung	95	900	
Denaturierung	95	60	10 Zyklen
Annealing	60	30	
Elongation	72	30	
Denaturierung	95	30	30 Zyklen
Annealing	55	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	480	

Tabelle 10: PCR-Temperaturprofil mit unterschiedlichen *Annealing* Temperaturen für Guanin-/Cytosin- reiche Proben

Programmablauf	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Initialisierung	95	900	
Denaturierung	95	30	Je 5 Zyklen, Wiederholung mit 58-1°C bis 54°C erreicht, final 20 Zyklen
Annealing	58	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	480	

Tabelle 11: PCR-Temperaturprofil mit abfallendem Temperaturprofil

Der Mastermix wurde, wie in Tabelle 12 dargestellt, pipettiert. Für die *RAD51D* PCR war, bei einem hohen Anteil an Guanin und Cytosin, die Zugabe von DMSO in einer finalen Konzentration von 10% erforderlich. Die Primer sowie die cDNA wurden 1:10 verdünnt mit Aqua dest. eingesetzt. Für den PCR-Reaktionsansatz wurden 18µl Mastermix und 2µl cDNA zusammen pipettiert. Zusätzlich wurde eine Wildtyp Kontrolle, eine für die Mutation bereits negativ getestete Person aus der Familie, sowie eine Negativkontrolle (Aqua dest.), mitgeführt. Nach der PCR erfolgte die Lagerung bei 4°C bis zur weiteren Verwendung.

1x Mastermix	Volumen (µl)	1x Mastermix	Volumen (µl)
10x Puffer	2,0	10x Puffer	2,0
F-Primer (10 µM)	1,0	c1F (10 µM)	1,0
R-Primer (10 µM)	1,0	c6R (10 µM)	1,0
dNTPs (10 mM)	1,6	dNTPs (10 mM)	1,6
Ampli Taq Gold-Polymerase	0,2	Ampli Taq Gold-Polymerase	0,2
Aqua dest.	12,2	Aqua dest.	10,2
Gesamtvolumen	18,0	DMSO	2
		Gesamtvolumen	18,0

Tabelle 12: Mastermix exonspezifische PCR jeweils ohne und mit DMSO

2.2.7 Agarose Gelelektrophorese

Zur Darstellung der Nukleinsäure-Fragmente erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung nach unterschiedlicher Größe im Agarosegel. Hierfür wurde 1,5%iges Agarosegel verwendet, hergestellt aus 1,2 g Agarose und 85 ml 1x TAE-Puffer. Die Mischung wurde ca. 3 min bei 900 Watt in der Mikrowelle erhitzt, bis zur vollständigen Lösung aller Gelpartikel. Zur Darstellung der DNA-Fragmente wurde in die homogene Lösung 8 µl *Gel/Red* (1µl Farbstoff/10 ml Gel) hinzugefügt und geschwenkt. Die Agaroselösung wurde in den Gel-Schlitten, welcher mit verstärktem Klebefilm abgedichtet ist, gegossen. In das flüssige Agarosegel wurden zwei Gel-Kämme gesteckt, bestehend aus jeweils 14 oder 10 Taschen. Eventuelle Luftblasen konnten mit einer Pipettenspitze entfernt werden. Nach einer Abkühlungszeit von ca. 30 Minuten, in der das Gel auspolymerisierte, konnten die Kämme entfernt werden und das Agarosegel in die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer eingelegt. Zur korrekten Durchführung musste sichergestellt werden, dass das Gel von der Pufferlösung bedeckt war. In jeder Kammreihe war es zwingend erforderlich mindestens einen Größen-Standard mitzuführen. Als Größen-Standard wurde der 1 kB Plus DNA *Ladder* verwendet. Dieser und alle weiteren Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit 2x Ladepuffer (6x TriTrack DNA *Loading Dye* 1:3 verdünnt) eingesetzt. Für den Größenstandard ergab sich eine Gesamtmenge von 4µl in der Geltasche und für die Proben 12µl (6µl Probe plus 6µl TriTrack) pro Tasche. Die Trennung der DNA-Fragment erfolgte bei 105 Volt für ca. 40 Minuten. Anschließend konnten die Banden unter UV-Licht im Transilluminator dargestellt werden. Über den Vergleich mit dem Größen-Standard erfolgte die Auswertung der PCR-Produkte.

2.2.8 Aufreinigung PCR-Produkte und Sanger-Sequenzierung

Vor der Sequenzierung wurden die amplifizierten PCR-Produkte mit einer enzymatischen Reinigung modifiziert, um PCR-Komponenten wie Primer, Nukleotide und Puffer Bestandteile enzymatisch abzutrennen. Hierzu wurden 2µl ExoSAP-IT zu 5µl PCR-Produkt pipettiert. Es erfolgte eine anschließende Inkubation für 15 Minuten bei 37°C sowie 15 Minuten bei 80°C im *Thermocycler* zur Hitzeinaktivierung des Enzyms. Zur Konzentrationseinstellung auf 10-15 ng/µl

wurden die Proben photometrisch mittels *NanoDrop* quantifiziert und mit Aqua dest. entsprechend eingestellt. Die Sequenzierung der Proben erfolgte nach Sangermethode durch *Cycle sequencing* mit den exonspezifischen Primern (10 μ M) und wurde im Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die digitalen Ergebnisse wurden mittels *Chromas Lite* visualisiert. Verglichen wurden die Mutationssequenzen mit den zugehörigen Wildtyp-Kontrollen. Aberrante Transkripte in den Sequenzierungen wurden durch den Vergleich der mutierten Proben mit den zugehörigen Wildtyp-Kontrollen erfasst.

2.2.9 Auswertung Softwareprogramm

Um die Auswirkungen von Mutationen, die den Spleißprozess beeinflussen, zu bewerten, werden mehrere Spleißvorhersage-Algorithmen wie MaxEntScan (MES), Splice Site Finder (SSF) und Human Splicing Finder (HSF) verwendet. Die Tools helfen dabei vorherzusagen, ob eine genetische Variante den normalen Spleißvorgang stören könnte, was zu Veränderungen im resultierenden Protein führen kann. Die verschiedenen Algorithmen haben unterschiedliche Stärken in Bezug auf Spezifität und Sensitivität. Hierbei werden Schwellenwerte verwendet, die vom GC-HBOC definiert wurden, um eine Richtung für die weitere Analyse vorzugeben [19]. Mit der Auswertungs- Software Alamut Visual Plus von SOPHiA GENETICS, in der diese Spleißvorhersageprogramme integriert sind, wurden die Ergebnisse der jeweiligen Algorithmen ermittelt. Zusätzlich wurden die HBond-Scores durch die Arbeitsgruppe von Prof. Schaal berechnet, um zusätzliche Informationen zur molekularen Bindungsstärke zu haben und so funktionelle Konsequenzen bei Mutationen der Donor-Splicesite zu bewerten.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsanalysen

Das Ziel der Arbeit war die funktionelle Charakterisierung potenziell aberranter Spleißeffekte von ausgewählten Sequenzveränderungen, welche laut bioinformatischen Berechnungen der Spleißvorhersageprogramme mögliche Auswirkungen auf das Spleißen haben sollten. Für die gezielte Auswahl von repräsentativen potenziellen Spleißmutationen stand eine umfassende RNA-Probenbank des Molekulargenetischen Labors der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe zur Verfügung, die im Rahmen der genetischen Diagnostik im FBREK-Zentrum des Universitätsklinikums Düsseldorf aufgebaut wurde. Im Zeitraum 2015-2020 wurden insgesamt 2.100 Patient:innen/Indexpersonen im Molekulargenetischen Labor mittels *TruRisk-Genpanel*-Analysen getestet und in den analysierten *Core*-Genen des *TruRisk® Genpanels* (siehe Tabelle 4) insgesamt 800 Genmutationen der *Class 3* (UVS, *unspecified variants*), *Class 4* (*likely pathogenic*) und *Class 5* (*pathogenic*) identifiziert (siehe Tabelle 17). Die RNA-Probenbank umfasst RNA-Proben von allen 800 positiv getesteten Indexpersonen, sowie Proben von weiteren Familienangehörigen, die hinsichtlich der in der Familie vorliegenden Mutation gezielt getestet wurden. Alle Sequenzvarianten (gesamt 62.000) sind in einer Variantendatenbank erfasst, aus der in einer ersten systematischen Sortierung anhand der cDNA-Position dieser Sequenzvarianten innerhalb der jeweiligen Gene, Varianten außerhalb des für die Fragestellung relevanten Sequenzbereichs ausgeschlossen werden konnten. Nach dieser Vorselektion verblieben 1.500 Varianten, die im Bereich der letzten drei Nukleotide der jeweiligen Exons sowie den ersten acht Nukleotiden eines Introns lagen – Bereiche, die laut Literatur aufgrund ihrer hohen funktionellen Relevanz innerhalb der Konsensussequenzen signifikante Auswirkungen auf den Spleißvorgang haben würden. Von besonderem Interesse waren außerdem Mutationen im Bereich der Spleißakzeptorstellen, da diese Region bislang vergleichsweise unzureichend funktionell charakterisiert ist, insbesondere im Hinblick auf Algorithmen basierte Vorhersagemodelle. Nach einer erneuten Sortierung der Daten, diesmal hinsichtlich der Positionen sowie den dazugehörigen algorithmischen Vorhersagen, wurde das Probenkollektiv ausgewählt. Für die Analyse wurden gezielt sogenannte *Core*-Gene ausgewählt, die im Zusammenhang mit familiären Brust- und Eierstockkrebs eine

zentrale Rolle spielen. Die *Core*-Gene umfassen unter anderem *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51C* und *RAD51D* (siehe Tabelle 4). Sie spielen eine zentrale Rolle in der DNA-Reparatur, insbesondere im homologen Rekombinationsweg. Trotz ihrer gemeinsamen Assoziation mit hereditären Tumorsyndromen unterscheiden sich diese Gene deutlich in ihrer biologischen Funktion. Bei der Einteilung der Analyse wurde darauf geachtet, die wichtigsten Nukleotidpositionen gemäß der Konsensussequenzen der 5'- und 3'-Spleißstelle einzubeziehen. Die 5'-Spleißstelle umfasst die Nukleotide von Position -3 (das dritte Nukleotid vom 3'-Ende des stromaufwärts liegenden Exons), bis Position +6 (dem sechsten Nukleotid im folgenden Intron). An der 3'-Spleißstelle wurden aufgrund der Proben-Verfügbarkeit nur Proben mit Sequenzvarianten im stromaufwärts liegenden Intron analysiert. In Tabelle 13 sind alle untersuchten Sequenzvarianten aufgeführt. Die Proben sind nach der Position der jeweiligen Mutation sortiert. Zuerst wurden Gene untersucht, die jeweils eine Mutation am letzten Nukleotid im Exon (Position -1) aufweisen. Systematisch wurden dann die Untersuchungen von Mutationen an Position +1, also dem ersten Nukleotid der darauffolgenden Introns, fortgeführt. Nach diesem Prinzip wurden auch weitere Proben analysiert. Für die 3'-Spleißstelle konnte die Untersuchung aufgrund der Verfügbarkeit der Proben nicht systematisch erfolgen, sondern es wurden nur Mutationen an drei unterschiedlichen Positionen im Intron betrachtet. Eine ausführliche Tabelle mit der Transkript ID sowie den Nukleotidsequenzen findet sich im Anhang dieser Arbeit. Bei allen Proben handelt es sich um Punktmutationen (*Single Nucleotide Polymorphism* „SNP“).

Gen	cDNA	Exon/Intron	Konsequenz
BRCA2	c.9117G>A	Exon 23	Del Ex23
BRIP1	c.507G>A	Exon 5	Del Ex5
BRCA1	c.4484G>T	Exon 14	Del Ex14
BRCA2	c.516+1G>T	Intron 6	Del Ex5&6
BRCA1	c.212+1G>C	Intron 5	Del Ex5 Del 22nt Ex5 (c.190)
BRCA1	c.4484+1G>A	Intron 14	Del Ex14
ATM	c.4236+2T>C	Intron 28	Del Ex28
BRCA2	c.7617+2T>G	Intron 15	Del Ex15
BRCA1	c.134+2T>G	Intron 3	Del Ex3
BRCA2	c.8754+3G>C	Intron 21	Ins In21 SD +46nt
CHEK2	c.592+3A>T	Intron 4	Del Ex4
BRCA2	c.9501+3A>T	Intron 25	Del Ex25
RAD51D	c.144+5G>A	Intron 2	Del Ex2&3
BRCA1	c.4986+6T>G	Intron 16	Ins In16 SD +65nt
RINT1	c.2067+6T>A	Intron 13	Del Ex13
RAD51C	c.966-1G>A	Intron 7	Del Ex7&8
BRCA1	c.5407-10G>A	Intron 22	Ins In22 SA +8nt
BRCA1	c.213-12A>G	Intron 5	Ins In5 SA +11nt

Tabelle 13: Selektierte Proben

Die Tabelle stellt die genetischen Varianten eingeteilt nach der Position der Mutation, beginnend im Exon dar. Die erste Spalte führt das Gen auf, in dem sich die Mutation befindet, rechts daneben die spezifische HGVS-Nomenklatur auf cDNA-Basis. In der dritten Spalte wird die Position der Mutation angegeben. Die letzte Spalte beschreibt die über Sanger-Sequenzierung ermittelte Auswirkung der Mutation.

Die verschiedenen Spleißvorhersage-Algorithmen beurteilen die Stärke einer Spleißstelle basierend auf ihrem Grundprinzip, welches in Material und Methoden beschrieben wurde, unterschiedlich. Grundsätzlich erfolgt eine Differenzbildung der intrinsischen Stärke zwischen Wildtyp-Sequenz und mutierter Sequenz in Form relativer numerischer Werte. Diese Werte werden als Scores bezeichnet und sind in Tabelle 14 für jede Probe aufgeführt. Die prozentuale Abweichung der einzelnen Scores ist für jede Probe in Tabelle 15 dargestellt. Je größer die relative/prozentuale Abweichung (Delta Δ) der intrinsischen Stärke einer Spleißstelle mit Mutation im

Vergleich zur entsprechenden Wildtyp-Sequenz, desto eher kann von einem aberranten Spleiß-Effekt aufgrund der Sequenzänderung ausgegangen werden [58]. Für die Mutationsanalysen zur Bewertung von 5'-Spleißstellen wurden die Spleißvorhersageprogramme MaxEntScan (MES), Splice Site Finder (SSF) sowie der HBond-Score (HBS) ausgewählt. Ein Vergleich der verschiedenen Algorithmen unter Berücksichtigung der definierten Schwellenwerte von MES >3, SSF >60 [19] sowie HBS $\geq 2,2$ [58] ermöglicht eine Gegenüberstellung der Algorithmen. In Bezug auf die Differenzen gilt beim MaxEntScan eine Abweichung von Delta ≥ 15 % und Splice Site Finder ab einer Abweichung von Delta $\geq 5\%$ als auffällig [19]. Für den HBond-Score ist hingegen kein spezifischer Wert definiert. Zur Bewertung der 3'-Spleißstelle mittels der Algorithmen werden die letzten 20 Nukleotide des Introns sowie die ersten drei Nukleotide des Exons einbezogen. Die Nukleotide Adenin und Guanin an den hochkonservierten Positionen -1 und -2 definieren die Konsensussequenz [37]. Mutationen an diesen Positionen stellen das höchste Risiko für eine pathogene Beeinflussung der Proteinfunktion dar [58]. Da der HBS auf der Analyse von Wasserstoffbindungen zwischen den Nukleotiden und der U1 snRNA an der 5'-Spleißstelle beruht, wird er bei Mutationsanalysen im Spleißakzeptor nicht angewandt.

Gen	cDNA	MaxEnt WT	MaxEnt MUT	SSF WT	SSF MUT	HBS WT	HBS MUT
BRCA2	c.9117G>A	4,3	0	62,8	50,7	10,4	7,2
BRIP1	c.507G>A	7,8	1,9	82,1	69,9	15,8	11,1
BRCA1	c.4484G>T	10,6	5,6	94,4	81,7	17,3	12,6
BRCA2	c.516+1G>T	8,9	0	87,5	0	16,8	0
BRCA1	c.212+1G>C	7,8	0	77,4	0	12,2	0
BRCA1	c.4484+1G>A	10,6	0	94,4	0	17,3	0
ATM	c.4236+2T>C	7,5	0	78,5	75,4	17,0	0
BRCA2	c.7617+2T>G	9,8	0	89,9	0	18,6	0
BRCA1	c.134+2T>G	10,1	0	87,9	0	16,6	0
BRCA2	c.8754+3G>C	7,7	5,2	87,3	81,7	15,7	13,2
CHEK2	c.592+3A>T	8,5	1,8	82	72,1	14,1	10,2
BRCA2	c.9501+3A>T	10,3	4,4	91,9	82,1	17,1	13,2
RAD51D	c.144+5G>A	9,6	5,5	89,6	77,4	15,7	10,7
BRCA1	c.4986+6T>G	5,9	1,6	70,4	0	13,2	10,1
RINT1	c.2067+6T>A	9,8	6,4	84,8	79,5	16,1	12,6
RAD51C	c.966-1G>A	7,25	0	0	0		
BRCA1	c.5407-10G>A	4,9	0	76,4	0		
BRCA1	c.213-12A>G	4,8	1,2	85,5	0		

Tabelle 14: Spleißvorhersage-Algorithmen Scores der selektierten Proben

Dargestellt sind die einzelnen Scores der Spleißvorhersage-Algorithmen MaxEntScan (MaxEnt), Splice-Site-Finder (SSF) und HBond-Score (HBS) für den Wildtyp (WT) und die mutierte Sequenz (MUT). Für den HBS sind im Bereich des Spleißdonors keine Scores angegeben, da dieser nur im Bereich des Spleißakzeptors angewandt wird.

Gen	cDNA	Δ MaxEnt	Δ SSF	Δ HBS
BRCA2	c.9117G>A	-100%	-19,3%	3,2
BRIP1	c.507G>A	-76,1%	-14,8%	4,7
BRCA1	c.4484G>T	-47,4%	-13,4%	4,7
BRCA2	c.516+1G>T	-100%	-100%	Kein GT
BRCA1	c.212+1G>C	-100%	-100%	Kein GT
BRCA1	c.4484+1G>A	-100%	-100%	Kein GT
ATM	c.4236+2T>C	-100%	-3,9%	Kein GT
BRCA2	c.7617+2T>G	-100%	-100%	Kein GT
BRCA1	c.134+2T>G	-100%	-100%	Kein GT
BRCA2	c.8754+3G>C	-31,5%	-6,3%	2,5
CHEK2	c.592+3A>T	-78,6%	-12%	3,9
BRCA2	c.9501+3A>T	-57,6%	-10,7%	3,9
RAD51D	c.144+5G>A	-42,3%	-13,6%	5,0
BRCA1	c.4986+6T>G	-73,6%	-7,1%	3,1
RINT1	c.2067+6T>A	-34,6%	-6,3%	3,5
RAD51C	c.966-1G>A	-100%	0	
BRCA1	c.5407-10G>A	-100%	-100%	
BRCA1	c.213-12A>G	-74,4%	-100%	

Tabelle 15: Prozentuale Änderung der Spleißvorhersage-Algorithmen Scores der selektierten Proben

Aufgelistet sind die prozentualen Abweichungen (Delta Δ) der intrinsischen Stärke einer Spleißstelle mit Mutation im Vergleich zur entsprechenden Wildtyp-Sequenz berechnet aus den einzelnen Scores aus Tabelle 14

3.2 Klinische Interpretation der Ergebnisse

Um die molekulargenetischen Ergebnisse in einen klinischen Kontext zu überführen, ist eine Bewertung der Varianten hinsichtlich ihrer krankheitsrelevanten Bedeutung notwendig. Hierzu erfolgte ein Abgleich mit *ClinVar*, einem öffentlich zugänglichen, internationalem Archiv, das genetische Varianten im Zusammenhang mit klinischen Phänotypen dokumentiert. Die dort hinterlegten Interpretationen zur klinischen Bedeutung der Varianten stammen aus unterschiedlichen Quellen, darunter Forschungslabore, Datenbanken, Expertengremien sowie medizinischen Fachgesellschaften und Leitlinienempfehlungen. Die dort gelisteten Varianten werden je nach Daten- und Evidenzlage in fünf unterschiedliche klinische Kategorien wie *pathogen*, *likely pathogenic*, *uncertain significance*, *likely benign* oder *benign* eingeordnet. Zur Bewertung der zeitlichen Entwicklung der klinischen Interpretation der genetischen Varianten wurde ein Vergleich der *ClinVar*-Einträge aus den Jahren 2022 und 2025 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass für einige Varianten eine Neubewertung vorgenommen wurde – einerseits auf Grundlage neuer funktioneller Daten, andererseits durch zusätzliche Einreichungen aus Forschungslaboren. Beispielsweise wurden Varianten, die 2022 noch als *uncertain significance* klassifiziert waren, in der aktuellen Version von 2025 teilweise in *likely pathogenic* überführt. Diese Re-Klassifikationen unterstreichen die dynamische Natur der Varianteneinstufung in *ClinVar* und verdeutlichen die Bedeutung kontinuierlicher wissenschaftlicher Validierung. Es zeigt sich zudem, dass für einige Varianten bisher keine oder keine eindeutige Bewertung vorliegt. Die Ergebnisse dieser Bewertung sind in Tabelle 16 zusammengefasst. In der Tabelle sind auch die durch aberrante Spleißereignisse bedingten Translationseffekte aufgeführt. Exonverluste, Insertionen intronischer Sequenzen oder Kombinationen beider Mechanismen führen häufig zu einer Verschiebung des Leserasters (*Frameshift*) oder zur Einführung eines vorzeitigen Stopcodons (*Nonsense*-Mutationen), was typischerweise in einem verkürzten oder funktionslosen Protein resultiert. In einzelnen Fällen bleibt das Leseraster erhalten (*In-Frame*), wobei der Verlust oder Zugewinn von Aminosäuren, abhängig von der betroffenen funktionellen Domäne, ebenfalls erhebliche Auswirkungen auf die Proteinstruktur und -funktion haben kann.

Gen	cDNA	Translation Effekt	ClinVar 2022	ClinVar 2025
BRCA2	c.9117G>A	Frameshift	Pathogenic	Pathogenic
BRIP1	c.507G>A	Nonsense	Uncertain Significance	Likely Pathogenic
BRCA1	c.4484G>T	Frameshift	Pathogenic	Pathogenic
BRCA2	c.516+1G>T	Frameshift	Pathogenic	Pathogenic
BRCA1	c.212+1G>C	In-Frame Frameshift	Pathogenic	Pathogenic
BRCA1	c.4484+1G>A	Frameshift	Pathogenic	Pathogenic
ATM	c.4236+2T>C	In-Frame	No information	Likely Pathogenic
BRCA2	c.7617+2T>G	Frameshift	Pathogenic	Pathogenic
BRCA1	c.134+2T>G	Nonsense	Pathogenic	Pathogenic
BRCA2	c.8754+3G>C	-	Likely Pathogenic	(Likely) Pathogenic
CHEK2	c.592+3A>T	In-Frame	Uncertain significance	Likely Pathogenic
BRCA2	c.9501+3A>T	Frameshift	Uncertain/benign	Uncertain/benign
RAD51D	c.144+5G>A	Frameshift	Uncertain significance	Uncertain significance
BRCA1	c.4986+6T>G	-	Pathogenic	Pathogenic
RINT1	c.2067+6T>A	Nonsense	Benign	Benign
RAD51C	c.966-1G>A	Frameshift	Uncertain significance	Uncertain significance
BRCA1	c.5407-10G>A	-	Uncertain significance	Conflicting
BRCA1	c.213-12A>G	-	Pathogenic	Pathogenic

Tabelle 16: Klinische Bewertungen der selektierten Proben

In der ersten Spalte ist das jeweilige Gen aufgeführt. Die Anordnung der Zeilen orientiert sich an der Position der Mutation, beginnend mit dem letzten Nukleotid im Exon. Für jede Mutationsposition wurden drei unterschiedliche Proben analysiert, die jeweils als Gruppe dargestellt und durch eine stärkere horizontale Linie voneinander abgegrenzt werden. Die cDNA-Spalte beschreibt die exakte Lage der Mutation in HGVS-Nomenklatur. Der darauffolgende Abschnitt „Translationseffekt“ fasst die funktionellen Konsequenzen der Mutation auf Ebene der Proteinbiosynthese zusammen. Abschließend werden die klinischen Bewertungen der Varianten aus der Datenbank *ClinVar* sowohl für das Jahr 2022 als auch für 2025 gegenübergestellt, um mögliche Neubewertungen oder Klassifikationsänderungen nachvollziehen zu können.

3.3 Mutationsanalysen im Spleißdonor

3.3.1 Mutationen im Exon

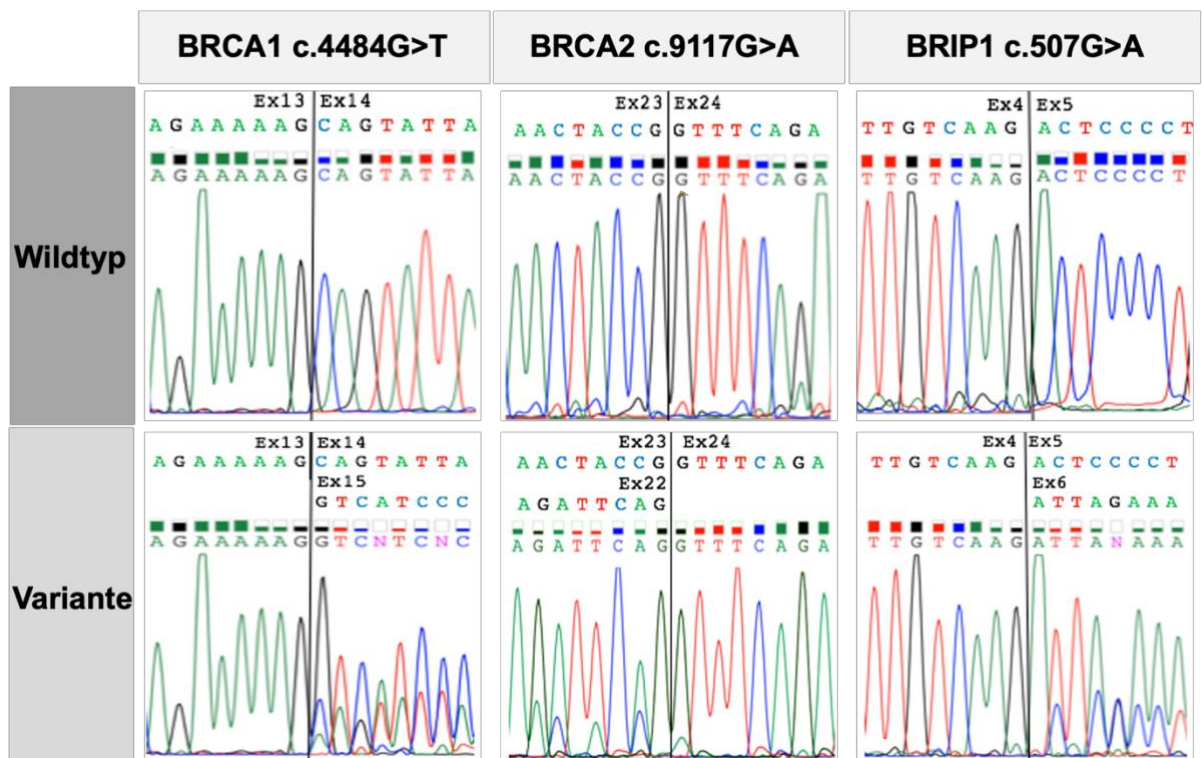


Abb. 8: Sanger-Sequenzierungsanalysen von cDNA zum Nachweis der Spleiß-Effekte. Es sind drei Spalten mit den Varianten *BRCA1* c.4484G>T, *BRCA2* c.9117G>A und *BRIP1* c.507G>A dargestellt. Jede Spalte enthält zwei Sequenzdiagramme, oben die Wildtyp-Sequenz und darunter im direkten Vergleich die mutierte Sequenz. Die Sequenzen sind farblich kodiert, die Exon- und Intron-Grenzen durch schwarze vertikale Linien markiert. *BRCA1* c.4484G>T führt zu einer Deletion von Exon14, stattdessen folgt Exon15 direkt auf Exon13. Bei *BRCA2* c.9117G>A verursacht die Variante einen Verlust von Exon23. In der Variante *BRIP* c.507G>A wird Exon5 deletiert.

Die hier untersuchten Sequenzveränderungen betreffen das letzte Nukleotid des Exons, eine kritische Stelle am Übergang zur 5'-Spleißstelle. Alle getesteten Spleißvorhersageprogramme zeigen eine deutliche Reduktion der Spleißstellenstärke, was sich in den berechneten Scores und prozentualen Differenzen widerspiegelt. Besonders auffällig ist die Bewertung des MaxEntScan, das für *BRCA2* c.9117G>A eine maximale Differenz von $\Delta 100\%$ ermittelt, während *BRCA1* c.4484G>T mit einer Differenz von $\Delta 47,7\%$ bewertet wird, trotz gleicher Nukleotidposition. Die Analysen mit SSF und HBS zeigen insgesamt vergleichbare Trends ohne große Unterschiede in den einzelnen prozentualen Abweichungen (siehe Tabelle 15). Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Bewertungsmethoden der Algorithmen. Auf funktioneller Ebene zeigen die cDNA-

Analysen gleiche Ergebnisse: In allen Fällen kommt es zu einem vollständigen Verlust des betroffenen Exons, was auf ein *Exon-Skipping* als direkte Folge der Mutation belegt. Diese Exon-Deletionen führen bei *BRCA1* und *BRCA2* zu einem *Frameshift*, was bedeutet, dass der Leserahmen verschoben wird und die Translation nach wenigen Aminosäuren abgebrochen wird.

ClinVar klassifiziert die Mutationen als „pathogen“, was bedeutet, dass sie krankheitsverursachend sind. Bei *BRIP1* liegt eine *Nonsense*-Mutation vor, bei der infolge der Deletion von Exon 5 die Translation bereits nach der ersten Aminosäure terminiert wird. In der *ClinVar*-Datenbank wurde die Sequenzvariante im Jahr 2022 noch als „*Uncertain Significance*“ eingestuft, was auf eine damals unklare klinische Bedeutung hinweist. Die Neubewertung „*pathogenic*“ im Jahr 2025 unterstreicht die dynamische Natur solcher Bewertungen, die sich mit zunehmender Evidenz verändern können. Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Analysen, dass die identifizierten Sequenzveränderungen in den Exons potenziell schwerwiegende Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese haben können. Diese Befunde werden sowohl durch die bioinformatischen Analysen als auch durch die aktuelle Einstufung der Varianten in *ClinVar* gestützt.

3.3.2 Mutationen an +1 und +2 Position

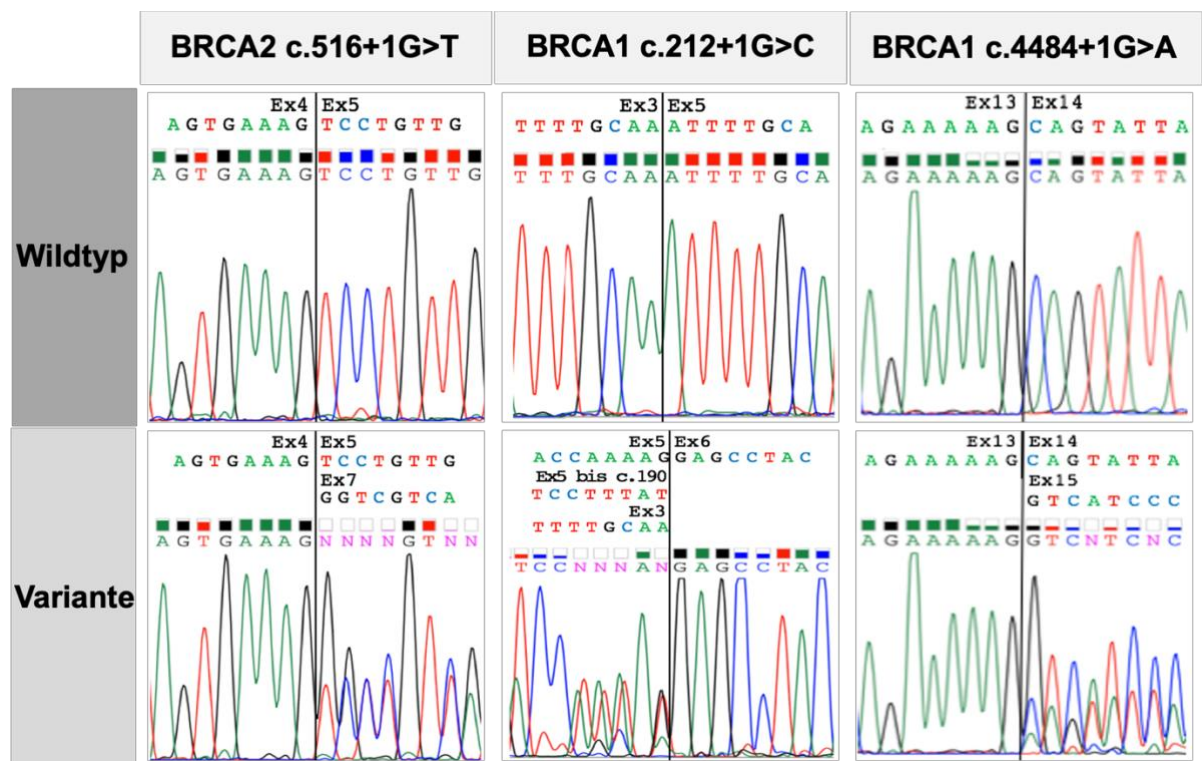


Abb. 9: Sanger-Sequenzierungsanalysen von Mutationen des ersten Nukleotids eines Introns

Die Mutation an der ersten Position des Introns im Spleißdonor führt bei *BRCA2* c.516+1G>T und *BRCA2* c.4484+1G>A zum Exon-Skipping des nach dem Intron folgenden Exon (Exon 6 und Exon 14). Für *BRCA1* c.212+1G>C dargestellt ist die wt-cDNA Sequenz (oben) bei der auf Exon 3- die Exon 5-Sequenz folgt (Exon4 fehlt in der Referenzsequenz von *BRCA1*). Für die Probe mit der *BRCA1* Mutation im ersten Nukleotid des Intron 3 (c.212+1G>C) zeigen sich insgesamt drei alternative Transkripte hier dargestellt (oben) der Exon5/Exon6 –Übergang (wt-cDNA) bzw. (unten) der Exon3/Exon6-Übergang (delExon5 cDNA) Eine dritte Variante zeigt die teilweise Deletion des Exon 5, d.h. Exon 5 ist enthalten, jedoch nur bis zum 190. Nukleotid und die letzten 22 Nukleotide des Exon 5 fehlen.

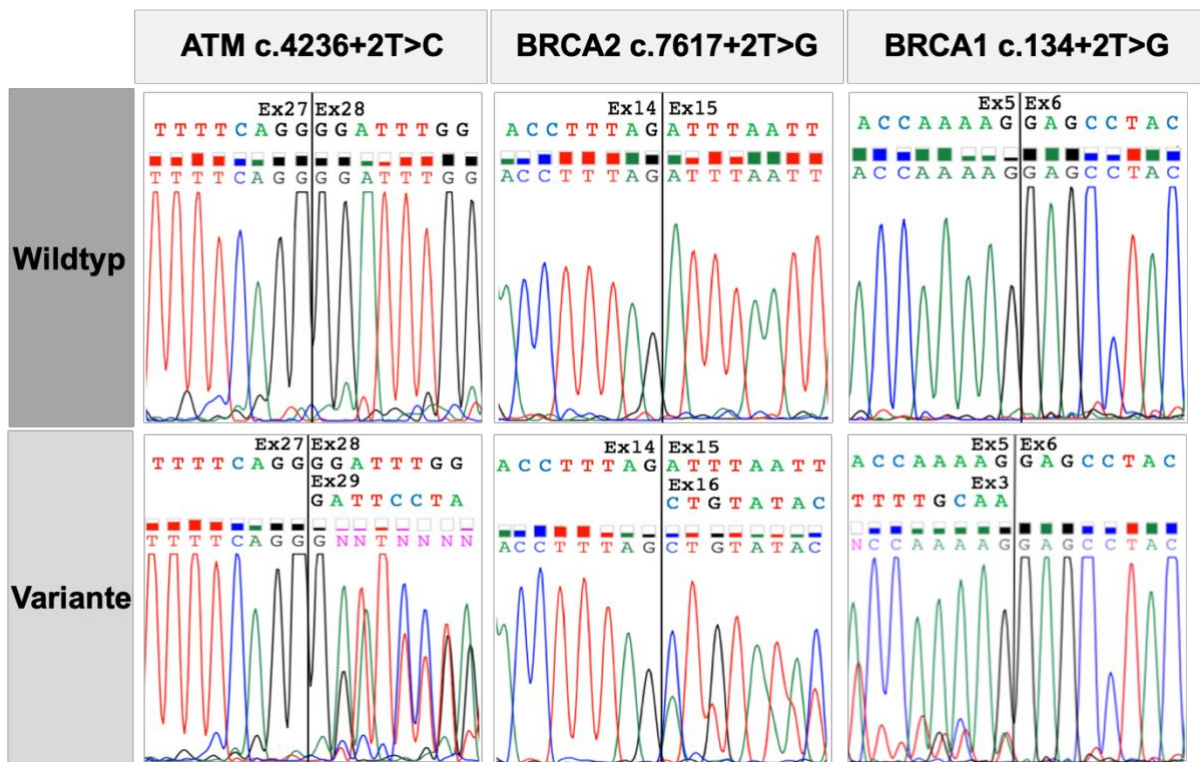


Abb. 10: Sanger-Sequenzierungsanalysen von Mutationen am zweiten Nukleotid des Introns

Mutationen an der zweiten Position im Intron des Spleißdonors führen in allen dargestellten Genen zu einer Deletion des darauffolgenden Exons (*Exon-skipping*).

Mutationen an den ersten beiden Nukleotiden des Introns im Donor-Bereich stören die hochkonservierte Konsensussequenz und führen dadurch zum aberranten Spleißen [46]. Dies wurde durch die angewandten Spleißvorhersageprogramme bestätigt, deren Werte in den meisten Fällen deutlich über den definierten Schwellen lagen, mit einer einzigen Ausnahme: Die Mutation *ATM* c.4236+2T>C weist mit dem SSF-Algorithmus berechnet eine Score-Differenz von nur $\Delta 3,9\%$ auf und damit lediglich eine geringfügige Abweichung von dem Wildtyp-Score. Im Gegensatz dazu signalisiert der MaxEntScan-Algorithmus mit einer Differenz von $\Delta 100\%$ eine vollständige Disruption der Spleißstelle und deutet klar auf ein aberrantes Spleißen hin. Eine isolierte Bewertung anhand des SSF-Algorithmus könnte somit irreführend sein und das tatsächliche Ausmaß der Spleißalteration unterschätzen. Die funktionelle Relevanz dieser Mutation wurde durch mRNA-Analysen untermauert, die in fast allen Fällen zu einer Deletion des entsprechenden Exons führten. Eine bemerkenswerte Ausnahme stellt die Variante *BRCA1* c.212+1G>C dar: Neben dem Wildtyp-Transkript konnten zwei aberrante Transkripte identifiziert werden – eines mit vollständigem Verlust von Exon 5 und eines mit einer Deletion von 22 Nukleotiden am 5'-Ende dieses Exons. Letzteres resultiert aus der Aktivierung einer

kryptischen Donor-Spleißstelle innerhalb von Exon 5 infolge des Ausfalls der kanonischen +1-GT-Stelle [59]. Diese komplexe Spleißmodifikation unterstreicht die funktionelle Relevanz konservierter Spleißsignale und zeigt die potenzielle Vielfalt pathogener Transkriptvarianten bei Spleißstellenmutationen. Die Deletion eines Exons führt zu einem *Frameshift* mit vorzeitigem Translationsstopp bei den Mutationen *BRCA2* c.516+1G>T, *BRCA2* c.7617+2T>G und *BRCA1* c.212+1G>C (c.192_212del, Deletion von 22 Nukleotiden aus Exon 5). Analog zu *BRCA1* c.4484G>T führt auch die Mutation im Intron bei *BRCA1* c.4484+1G>A durch die Deletion von Exon 14 zu einem *Frameshift*. Die Mutation im Intron 3 bei *BRCA1* c.134+2T>G und das damit einhergehende Überspringen (*Exon-skipping*) von Exon 3 erzeugt ein neues Stopp-Codon (*Nonsense*), was zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsequenz p.(Cys27*) führt. Die vollständige Deletion von Exon 5 (*BRCA1* c.212+1G>C) und Exon 28 (*ATM* c.4236+2T>C) führt jedoch zu einer *In-frame* Deletion. Da die Anzahl der Nukleotide von Exon 5 und Exon 28 ein Vielfaches von drei ist, kommt es zu keiner Rasterverschiebung bei der Translation. Dennoch kann das Protein aufgrund der fehlenden Aminosäuren p.(Phe46_Arg71del) bei *BRCA1* und p.(Leu1372_Asp1413del) bei *ATM* seine ursprüngliche Funktion nicht erfüllen. Mutationen an der ersten und zweiten Position im Intron führen zu einer Störung der kanonischen Spleißstelle. Dies resultiert in einem Funktionsverlust oder vollständigem Fehlen des Gens [60]. Dementsprechend werden Mutationen mit positiver Spleißvorhersage und einer Abweichung der ersten sechs Basen im Intron von GTRRGT ohne mRNA-Analyse kategorisch in Klasse 4 eingeteilt. Liegen mRNA-Analysen vor, die zeigen, dass das neue Exon *In-Frame* gespleißt und/oder keine bekannte funktionelle Domäne betroffen ist bzw. alternativ gespleißt wird, kann eine Einordnung in *Class 3* erfolgen [19]. Laut *ClinVar* wird die Pathogenität für Sequenzveränderungen an Position 1 und 2 im Intron als pathogen bewertet. Für die Variante *ATM* c.4236+2T>C lag im Jahr 2022 in der ClinVar-Datenbank keine klinische Bewertung vor. Seit 2025 ist sie jedoch durch das GC-HBOC als „*Likely Pathogenic/Pathogenic*“ klassifiziert.

3.3.3 Mutationen an +3, +5, +6 Position

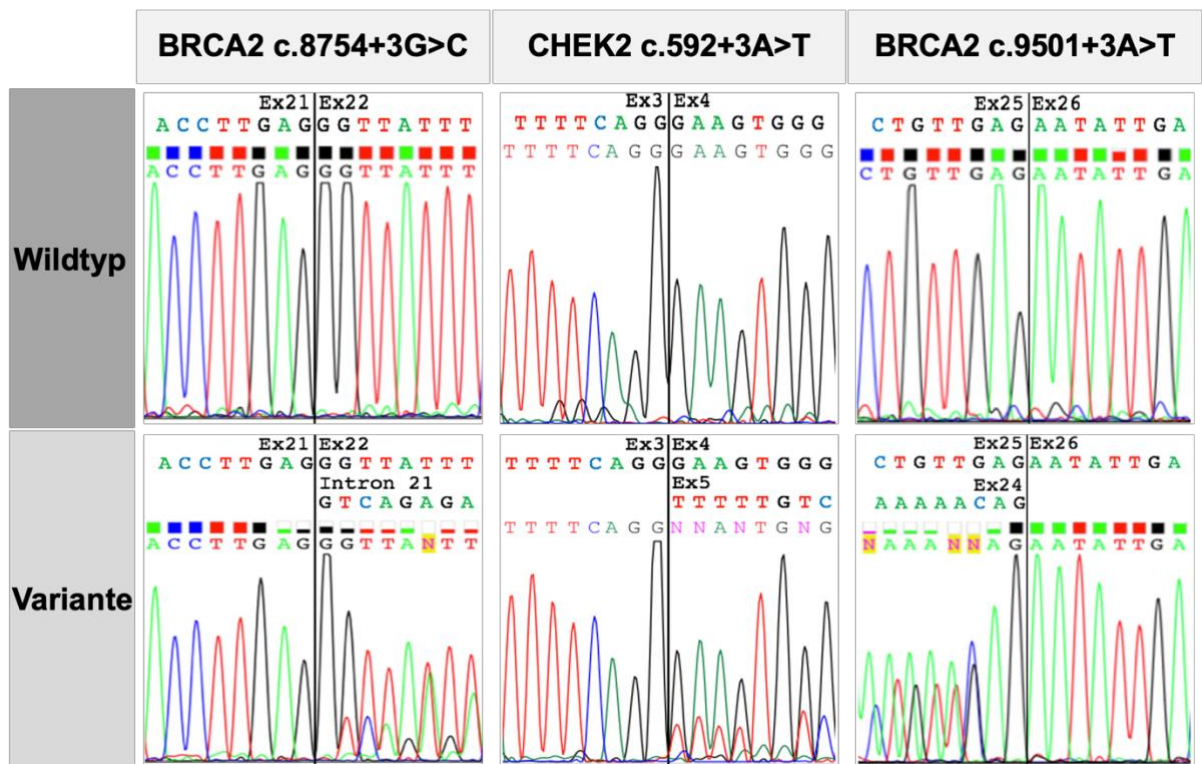


Abb. 11: Sanger-Sequenzierungsanalysen von Mutationen am dritten Nukleotid des Introns

Eine Mutation an der dritten Position im Intron 21 führt bei *BRCA2* c.8754+3G>C zu einer Teil-Insertion der ersten 46 Nukleotiden des Introns 21. In der alternativen Sequenz kann in der Sanger-Sequenzierung zudem der Basenaustausch Guanin zu Cytosin an der dritten Position im Intron 21 dargestellt werden. Bei *CHEK2* c.592+3A>T sowie *BRCA2* c.9501+3A>T kommt es zu einer Deletion des vorausgehenden Exons, vor dem jeweiligen Intron, in dem sich die Mutation befindet.

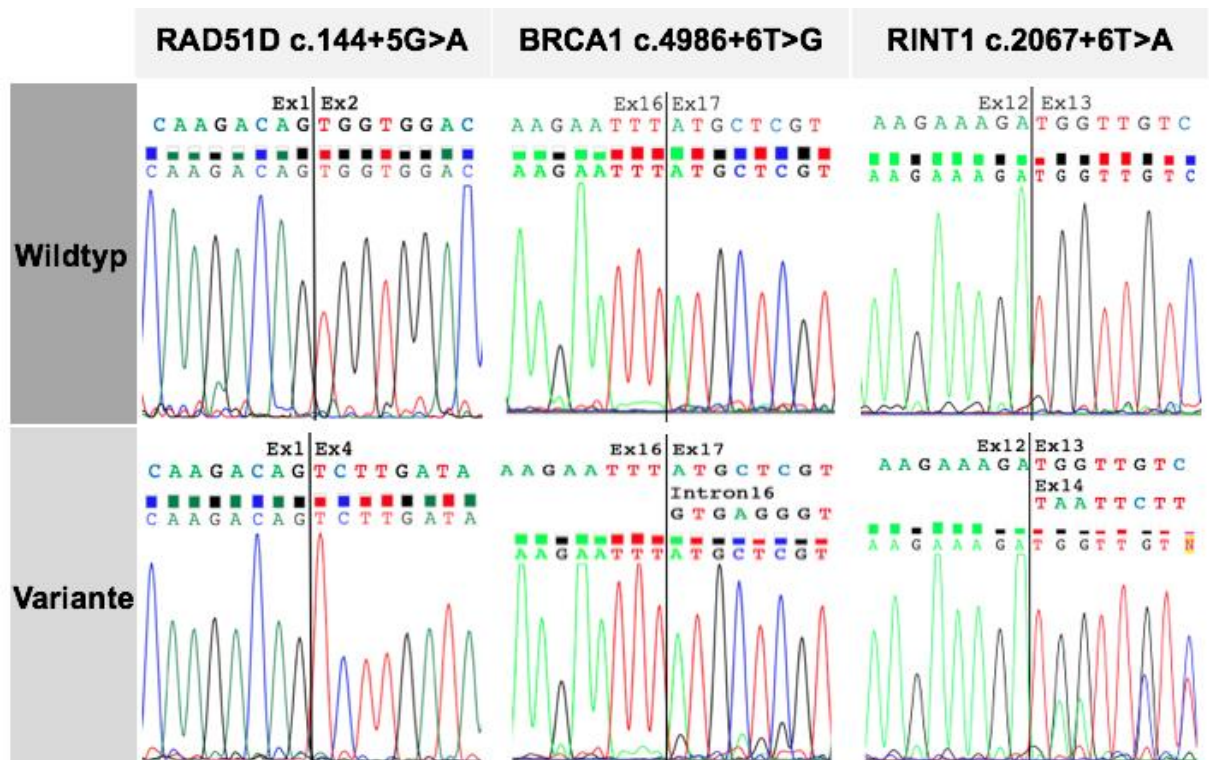


Abb. 12: Sanger-Sequenzierungsanalysen von Mutationen an Position +5 und +6 im Intron

Die Mutation *RAD51D* c.144+5G>A an der +5 Position von Intron 1 führt zu einer Deletion des nachfolgenden Exons 2 und Exons 3 bei. Bei *BRCA1* c.4986+6T>G entsteht zusätzlich ein Transkript mit einer Insertion von 65 Nukleotiden vom Beginn von Intron 16. Für *RINT1* c.2067+6T>A lässt sich ein *Exon-skipping* von Exon 13 nachweisen.

Besonders starke Abweichungen zeigen sich bei den Differenzen einzelner Proben. Die größte Veränderung tritt bei *CHEK2* c.592+3A>T mit einer MaxEntScan-Differenz von $\Delta 78,6\%$ auf, was sich in der Sequenzierung als *Exon-skipping* von Exon 4 widerspiegelt. Ebenso führt die Mutation *RINT1* c.2067+6T>A zur Deletion von Exon 13. Bei SSF und HBS weist *RAD51D* c.144+5G>A mit SSF $\Delta 13,6\%$ und HBS $\Delta 31,8\%$ die höchsten Differenzen auf, was sich in der cDNA-Analyse als Deletion von Exon 2 und Exon 3 manifestiert. Die geringste Abweichung weist *BRCA2* c.8754+3G>C mit einer MaxEntScan-Differenz $\Delta 31,5\%$ auf. Auffällig ist zudem, dass die Varianten *BRCA1* c.4986+6T>G und *BRCA2* c.8754+3G>C durch eine Beeinträchtigung der natürlichen Donor-Spleißstelle zu aberranten Spleißen führen, bei denen jeweils intronische Sequenzen in das reife mRNA-Transkript inseriert werden. Im Fall von *BRCA1* c.4986+6T>G resultiert dies in der Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle, wodurch 65 Nukleotide aus dem Intron in das Transkript übernommen werden, was zu einem Frameshift mit vorzeitigem Stoppcodon führt [61]. Auch die Variante *BRCA1* c.8754+3G>C liegt in unmittelbarer Nähe zur kanonischen 5'-Spleißstelle und kann durch die Störung der

Spleißosom-Erkennung eine Inklusion intronischer Sequenzanteile hervorrufen [62]. Diese Insertionen führen zur Verschiebung des Leserasters (*Frameshift*) und begünstigen somit die Entstehung verkürzter oder funktionsloser Proteine. Die Nukleotide GT in den Positionen +1 und +2 in der 5'-Spleißstelle sind hoch konserviert und essenziell für den Spleißprozess, da sie zur Stabilisierung der RNA beitragen [52]. Für die Stabilisierung und das Spleißen sind die distalen Positionen -3 bis +8 von Bedeutung, insbesondere die Positionen +4, +5 und +6, die an der Bindung der U6 snRNP des Spleißosoms beteiligt sind [63]. Disruptionen in der Interaktion der Spleißosom-Komponenten können zu fehlerhaftem Spleißen führen [47]. Liegt eine Insertion eines Intronabschnitts vor, lässt sich über Alamut Visual kein *Coding-Effect* vorhersagen, da die Insertion oft *premature termination codons* (PTCs) enthalten, die den *nonsense-mediated-decay* (NMD) *pathway* aktivieren und zum Abbau der entstehenden Isoformen führen [64]. Eine erhöhte Intron-Retention ist mit vielen Karzinomen assoziiert, da der Spleißprozess in kanzerogenen Zellen oft ungeordneter verläuft. Allerdings wurde beobachtet, dass Brustkrebs eine Ausnahme bildet und die Intron-Retention auch in normalem Brustgewebe häufig vorkommt [65]. Ein *Frameshift*-Effekt wurde beispielsweise bei der Deletion von Exon 25 in *BRCA2* c.9051+3A>T sowie der Deletion von Exon 2 und Exon 3 bei *RAD51D* c.9051+3A>T beobachtet, was jeweils zu einem vorzeitigen Translationsstopp führt. Beide Varianten sind sowohl zum jetzigen Stand als auch 2022 in *ClinVar* als „*Uncertain significance*“ gelistet. Im Gegensatz dazu bleibt bei der *In-frame*-Deletion von Exon 4 in *CHEK2* c.592+3A>T der Leserahmen erhalten, was zu einer Deletion von 49 Aminosäuren (p.(Glu149_Lys197del)) führt, ohne jedoch die Translation abubrechen. Im Jahr 2022 wurde diese Variante bei *ClinVar* als „*Uncertain significance*“ bewertet. Aktuell wird sie jedoch als „*Likely Pathogenic*“ eingestuft. Ein klarer *Nonsense*-Effekt zeigt sich bei der Deletion von Exon 13 in *RINT1* c.2067+6T>A, die zur Bildung eines vorzeitigen Stoppcodons (p.(Trp630*)) führt. Dennoch wird diese Mutation bei *ClinVar* als „*Benign*“ eingestuft. Gemäß den aktuellen Empfehlungen des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs sollten Varianten in der Region zwischen +3 bis +10, sofern sie eine auffällige Spleißvorhersage aufweisen, mittels RNA-Analysen weiter untersucht werden [19].

3.4 Mutationsanalysen im Spleißakzeptor

3.4.1 Mutation an -1, -10, -12 Position

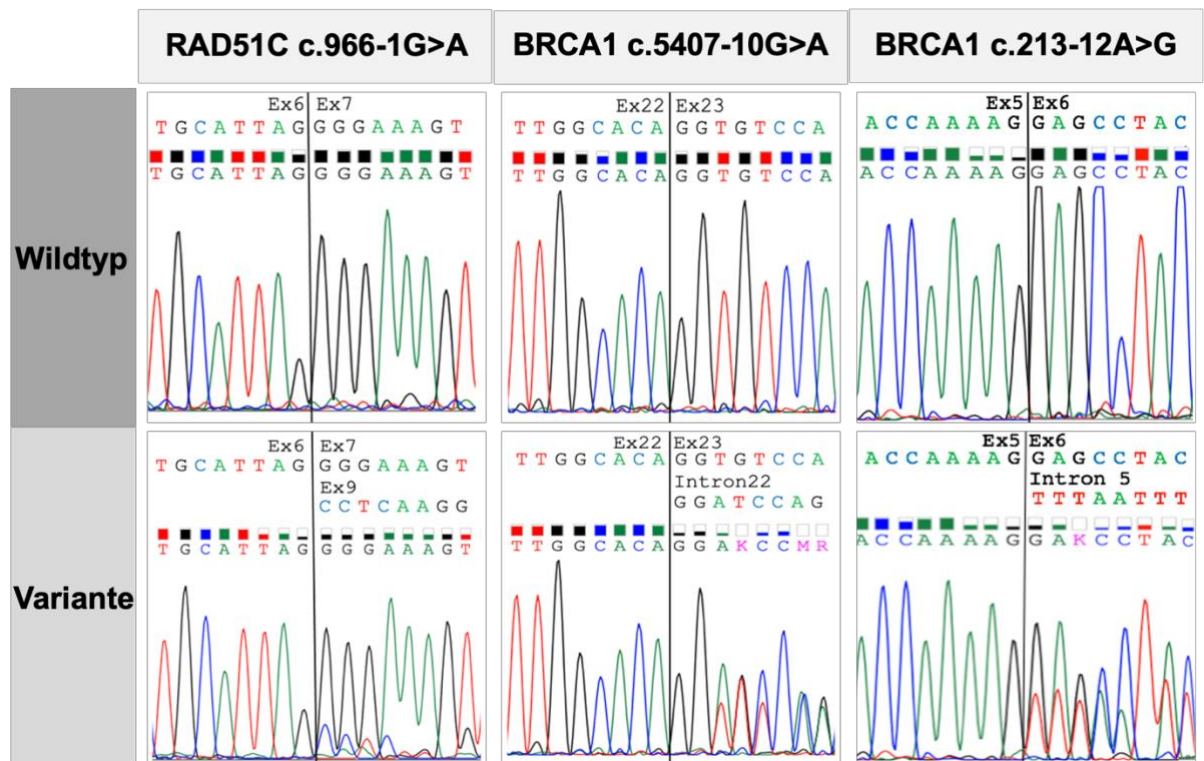


Abb. 13: Sanger-Sequenzierungsanalysen bei Mutationen im Bereich des Akzeptors

Ein Basenaustausch an der ersten Position der 3'-Spleißstelle von Intron 7 des *RAD51C* Gens führt zur Deletion von Exon 7 und Exon 8. *BRCA1* c.5407-10G>A zeigt eine Intron-Retention von 8 Nukleotiden aus Intron 22. An der Position -12 führt die Mutation bei *BRCA1* c.213-12A>G zu einer Retention von 10 Nukleotiden aus dem Intron 5.

Spleißakzeptor-Mutationen im Intron können die präzise Erkennung der Exon-Intron-Grenzen erheblich beeinträchtigen und damit die korrekte Prozessierung der prä-mRNA stören. Besonders die letzten 10-15 Nukleotide des Introns sind zum Teil hoch konserviert, wobei die AG-Dinukleotide an den Positionen -1 und -2 eine essenzielle Rolle für die Spleißstellen-Erkennung spielen. Der MaxEntScan-Score für die Wildtyp-Sequenz von *RAD51C* c.966-1G>A liegt bei 7,25, fällt durch die Mutation jedoch auf 0, wodurch eine Differenz von $\Delta 100\%$ resultiert. Der SSF-Algorithmus kann keine Bewertung vornehmen, da durch den Verlust des konservierten AG-Dinukleotids die Erkennung der Spleißstelle vollständig entfällt. Auch bei *BRCA1* c.5407-10G>A ergibt sich in beiden Algorithmen (MES und SSF) eine einheitliche Differenz von $\Delta 100\%$, was auf eine vollständige Inaktivierung der Spleißstelle hindeutet. Ein ähnliches Muster zeigt sich bei *BRCA1* c.213-12A>G, wobei der MaxEntScan-Score um $\Delta 74,4\%$ sinkt, während der SSF-Score

auch hier einen vollständigen Verlust ($\Delta 100\%$) angibt. Die funktionellen Konsequenzen dieser Spleißveränderungen zeigen sich auch auf RNA-Ebene: Während die Mutation *RAD51C* c.966-1G>A zu einer Deletion von zwei Exons führt, wurde bei den anderen Varianten Insertionen intronischer Sequenzen in unterschiedlicher Länge nachgewiesen. Die durch die Deletion bei *RAD51C* verursachte Leserasterverschiebung führt nach nur 21 Aminosäuren zu einem vorzeitigen (p.(Gluc303Leufs*21)). Hinsichtlich der klinischen Bedeutung zeigen die *ClinVar*-Bewertungen Unterschiede: Während *RAD51C* c.966-1G>A und *BRCA1* c.5407-10G>A als „*Uncertain significance*“ sowohl damals als auch heute bewertet sind, wird *BRCA1* c.213-12A>G als „*Pathogenic*“ eingestuft. Auch hier wird wie bei Varianten in den Regionen +3 bis +10 vom Deutschen Konsortium für Familiären Brust- und Eierstockkrebs bei auffälliger Spleißvorhersage empfohlen eine RNA-Analyse durchzuführen, um die funktionellen Konsequenzen der Mutationen zu validieren [19]. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die alleinige Nutzung einzelner Spleißvorhersage-Algorithmen für die Einschätzung der funktionellen Konsequenzen von Mutationen unzureichend ist. Gerade aufgrund der unterschiedlichen bioinformatischen Grundlagen der Algorithmen kann erst durch den vergleichenden Einsatz mehrerer *in silico-Tools* ein differenziertes Bild potenzieller Spleißveränderungen gewonnen werden. Dennoch ist eine alleinige bioinformatische Vorhersage nicht ausreichend, um verlässliche Aussagen über tatsächliche Effekte auf Transkriptebene zu treffen. Eine ergänzende Validierung durch cDNA-basierte Sanger-Sequenzierung ist essenziell, um aberrante Spleißergebnisse direkt nachzuweisen. Erst die kombinierte Analyse aus Spleißvorhersagealgorithmen und experimenteller Validierung ermöglicht eine umfassende Bewertung der funktionellen Relevanz genomischer Varianten.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die funktionellen Konsequenzen von Mutationen in Spleißstellen in verschiedenen Genen analysiert, die mit hereditärem Brust- und Eierstockkrebs assoziiert sind. Im Fokus standen dabei insbesondere Mutationen, die den präzisen Prozess des prä-mRNA-Spleißens beeinflussen können. Es ist bekannt, dass die Mehrheit der krankheitsassoziierten Spleißmutationen die hochkonservierten GT- und AG-Dinukleotide an der 5'- und 3'-Spleißstelle betrifft. Diese Dinukleotide sind für die korrekte Exon-Erkennung und ein korrektes Spleißen unerlässlich. Dennoch zeigen auch Nukleotidveränderungen in den angrenzenden Positionen der 5'- oder 3'-Spleißstelle ein erhebliches Potential, den Spleißvorgang zu stören. Solche Mutationen führen typischerweise zu aberranten Transkripten und Spleißmustern wie *Exon-Skipping* (Verlust eines oder mehrerer Exons), die Aktivierung kryptischer Spleißstellen oder zur Retention intronischer Sequenzen [66]. Der Spleißvorgang folgt hochkomplexen und bislang nur teilweise verstandenen Mechanismen. Zwar gibt es verschiedene bioinformatische und experimentelle Ansätze zur Aufklärung dieser Mechanismen, doch die dabei wirksamen Effekte sind vielfältig und daher nur schwer eindeutig zu interpretieren. Zur funktionellen Einschätzung einer potenziellen Spleißmutation wurden Spleißvorhersage-Algorithmen herangezogen und miteinander verglichen. MaxEntScan bewertet die Stärke von Spleißstellen auf Basis eines Maximum-Entropie-Modells, das charakteristische Sequenzmuster bekannter Spleißstellen berücksichtigt. Splice Site Finder nutzt eine gewichtete Matrix zur Erkennung konservierter Nukleotidpositionen und der HBond Score schätzt die Stabilität der Bindung zwischen prä-mRNA und Komponenten des Spleißosomenkomplexes ein. Die Algorithmen basieren auf den bislang verstandenen Mechanismen der Spleißvorgänge, interpretieren allerdings nur bestimmte und jeweils verschiedene Aspekte des Spleißens. Während Nukleotidvarianten, die die Referenzsequenzen der 3'- und 5'-Spleißstellen betreffen, relativ leicht computergestützt durch einzelne Algorithmen oder deren Kombinationen zu erkennen und zu interpretieren sind, sind diejenigen, die Spleißregulierungselemente (SREs) verändern, besonders schwierig vorherzusagen [67]. Neben den Spleißvorhersage-Algorithmen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der Sequenzanalyse-Software „Alamut“ die Effekte der DNA-Sequenzvarianten auf Translationsebene und auf die resultierende Proteinsequenz bewertet. Die experimentelle Validierung der vorhergesagten Spleißeffekte auf der

Ebene der Transkription, d.h. die Identifizierung und Charakterisierung der aberranten Spleißprodukte, erfolgte mittels cDNA-basierter Sanger-Sequenzierung. Ein Vergleich der eingesetzten Algorithmen zeigt insgesamt weitgehende Übereinstimmungen mit nur wenigen Ausnahmen. Besonders an den hochkonservierten Positionen +1 und +2 im Spleißdonor weisen sowohl MES als auch SSF einheitlich mit $\Delta 100\%$ Differenz auf einen aberranten Spleißeffekt hin. Die Differenz stellt die prozentuale Abweichung der intrinsischen Stärke der mutierten gegenüber der wildtypischen Spleißstelle, d.h. zwischen dem über den jeweiligen Algorithmus berechneten Score der mutierten Sequenz gegenüber der Wildtyp-Sequenz. Eine Ausnahme stellt die Variante *ATM* c.4236+2T>C dar: Während SSF hier lediglich eine Score Differenz von $\Delta 3,9\%$ berechnet und damit unterhalb des definierten Schwellenwert von 5% liegt, wird durch MES ein eindeutiger aberranter Spleißeffekt vorhergesagt. Insgesamt werden durch einige Unterschiede zwischen der MES- und SSF-Bewertung deutlich, dass die jeweils zugrundeliegenden Bewertungsalgorithmen auf verschiedenen Berechnungsmodellen zur Ableitung der Stärke einer Spleißstelle aus der vorliegenden DNA-Sequenz beruhen. So wird die *BRCA2* Mutation c.9117G>A von MES mit einer Score-Differenz von $\Delta 100\%$ und damit weit über dem Cut-off von 15% liegend bewertet, während SSF für dieselbe Variante lediglich eine Score-Differenz von $\Delta 19,3\%$ ermittelt (Cut-off 5%). Ein ähnliches Muster zeigt sich bei der *BRCA1* Mutation c.4986+6G>T: MES berechnet hier eine deutliche Score-Differenz von $\Delta 73,6\%$, während SSF eine Score-Differenz von nur $\Delta 7,1\%$ angibt und damit knapp über dem Schwellenwert (5%) liegt. Die Bewertungen des HBS liegen insgesamt klar oberhalb des definierten Grenzwerts von $\geq 2,2$, mit Ausnahme des Wertes der *BRCA2* Mutation c.8754+3G>C, die lediglich bei 2,5 liegt, obwohl sich in der cDNA-Analyse zeigt, dass eine kryptische Spleißstelle aktiviert wird, die zu einem aberranten Transkript mit einer Insertion von 46 Nukleotiden des folgenden Introns 21 führt. Diese Beispiele verdeutlichen, dass zur Bewertung einer Spleißstellen-Mutation ein einzelner Algorithmus allein nicht ausreichend ist, sondern mehrere Verfahren parallel angewendet und ihre Ergebnisse kritisch verglichen werden müssen. Die funktionelle Analyse auf cDNA-Ebene bestätigt, dass die untersuchten Varianten sehr unterschiedliche Konsequenzen nach sich ziehen. Während Exon-Deletionen am häufigsten nachgewiesen wurden, ließen sich auch komplexere Spleißmuster identifizieren. So führt eine Mutation bei *BRCA2* c.516+1G>T zu einer Deletion von Exon 5 und Exon 6, wohingegen bei *BRCA1* c.212+1G>C neben der

Deletion von Exon 5 ein zusätzliches aberrantes Transkript mit einer partiellen Deletion von 22 Nukleotiden innerhalb dieses Exons nachweisbar ist. Neben den häufig beobachteten Exon-Deletionen traten bei Varianten an den intronischen Positionen +3 und +6 zusätzlich partielle Insertionen von intronischen Sequenzen auf. So zeigt die Variante *BRCA2* c.8754+3G>C eine partielle Insertion von 46 Nukleotiden, des von der Mutation betroffenen Introns 21. Bei der Variante *BRCA1* c.4986+6T>G konnte eine Insertion von 65 Nukleotiden von Intron 16 nachgewiesen werden. Solche Ereignisse lassen sich anhand der verwendeten *in-silico*-Algorithmen nicht sicher vorhersagen, weder durch den HBS noch durch MES und SSF konnte ein Hinweis auf die jeweiligen Insertionen bei diesen Varianten abgeleitet werden. Im Bereich der Spleißakzeptorstelle zeigte sich ein ähnliches Muster: Zwei der drei untersuchten Varianten führten ebenfalls zu Insertionen intronischer Sequenzen. Für die Mutationen an Position -10 und -12 ergab die Bewertung durch den SSF jeweils eine Differenz von 100%, was eine vollständige Inaktivierung der natürlichen Akzeptorstelle nahelegt. Der MaxEnt-Score erreichte bei der Variante *BRCA1* c.213-12A>G zwar „nur“ den Wert von 74,4%, lag jedoch ebenfalls klar oberhalb des definierten Schwellenwerts, sodass auch hier ein signifikanter Spleißeffekt zu erwarten war. Ob eine Mutation zu einer vollständigen oder partiellen Exon-Deletion führt, oder aber eine kryptische Spleißstelle aktiviert und dadurch Intronabschnitte in das Transkript eingefügt werden, lässt sich letztendlich nur durch funktionelle RNA-Analysen klären. Die Ergebnisse zeigen, dass *in-silico*-Vorhersagen ohne RNA-Analysen unvollständig bleiben. Für klinische Bewertungen von Spleißmutationen im Rahmen der Patient:innenversorgung ist deren Integration in die genetische Diagnostik unverzichtbar [68]. Eine einheitliche Leitlinie zur Auswahl geeigneter *in-silico* Vorhersagealgorithmen existiert nicht; vom GC-HBOC werden derzeit jedoch, wie auch in dieser Arbeit verwendet, MaxEntScan, Splice Site Finder sowie der Human Splicing Finder (HSF) empfohlen [19]. Wie relevant funktionelle Daten für die klinische Einordnung sind, zeigt sich auch in den dynamischen Bewertungen von Varianten in Datenbanken wie *ClinVar*. Die offene Datenbank gibt einen globalen Überblick, wie die klinische Bedeutung einer Mutation von internationalen Forschungsgruppen bewertet wird. Allerdings unterscheiden sich Qualität und Verlässlichkeit der eingereichten Bewertungen, sodass *ClinVar* vor allem als Orientierungshilfe dienen sollte. Eine endgültige Bewertung muss stets kritisch hinterfragt und in den klinischen Kontext eingeordnet werden. Besonders wichtig ist dabei die Rolle spezialisierter Gremien wie das

ENIGMA Expert Panel, das auf Basis strenger Kriterien Klassifikationen erarbeitet und diesen Varianten zuordnet. In einem Großteil der untersuchten Varianten stimmen die Ergebnisse der *in-silico*-Analysen und experimentellen cDNA-Analysen mit den in *ClinVar* hinterlegten Bewertungen überein. Dies verdeutlicht, dass die Vorhersageverfahren der etablierten Expert-Panels eine hohe Aussagekraft besitzen und eine Grundlage für die klinische Einordnung darstellen können. Ein Vergleich der *ClinVar*-Bewertungen zwischen 2022 und 2025 zeigt zudem, dass sich für einige Varianten inzwischen eindeutigere Einschätzungen abzeichnen. So wurde beispielsweise die Variante *BRIP1* c.507G>A, die 2022 noch mit „*Uncertain significance*“ bewertet wurde, im Jahr 2025 als „*Likely Pathogenic*“ eingestuft. Solche Fälle machen deutlich, dass die Bewertungen von Varianten dynamisch sind und sich mit zunehmender Datenlage verändern können. Besonders bei Varianten, die von der Spleißstelle weiter entfernt im Intron liegen, gibt es weniger eindeutige Bewertungen in der *ClinVar* Datenbank. Ein Beispiel hierfür ist die Variante *RAD51D* c.144+5G>A, die trotz Hinweise auf einen möglichen Spleißeffekt in den hier verwendeten Vorhersagealgorithmen MES, SSF und HBS weiterhin mit „*Uncertain significance*“ bewertet ist. Die Score-Differenzen dieser Variante liegen jeweils oberhalb der definierten Schwellenwerte, insbesondere der HBS zeigt für diese Mutation eine Differenz von 5% und damit den höchsten Wert aller analysierten Varianten. In einer umfassenden funktionellen Analyse wurden ausgewählte intronische und exonnahe *RAD51D* Varianten mithilfe eines Minigen-Ansatzes im Rahmen des BRIDGES-Projekt untersucht. Hier zeigte sich, dass klinisch unklare *RAD51D* Varianten (VUS) Spleißdefekte aufweisen können. Mithilfe dieser funktionellen Assays konnten mehrere zuvor unklassifizierte Varianten erstmals als „*likely pathogenic*“ eingestuft werden [69]. Noch ausgeprägter zeigt sich diese Unsicherheit bei Varianten im Bereich der *Acceptor-Site*, wo häufig eine „*Uncertain significance*“-Bewertung vergeben wird. Dies liegt vor allem an der hohen Sequenzvielfalt im Polypyrimidintrakt außerhalb der essenziellen hochkonservierten AG-Dinukleotide an der 3'-Spleißstelle [70]. Neben Mutationen in bzw. in unmittelbarer Nähe von Spleißstellen können auch weiter entfernt liegende DNA-Sequenzvarianten aberrante Transkripte verursachen, indem sie z.B. Spleiß-regulatorische *cis*-Elemente wie Verzweigungspunkte, Polypyrimidin-Trakt sowie intronische und exonische Spleiß-*Silencer* und *Enhancer* betreffen, kryptische Spleißstellen aktivieren oder neue Spleißstellen generieren [68]. Eine mangelnde Sensitivität von *in-silico*-Tools bei der Identifizierung von pathogenen

Varianten wurde ab Position -4 im Akzeptorbereich sowie Position +7 im Donorbereich beschrieben, was auf die geringe Sequenzkonservierung an diesen Stellen zurückgeführt wird [71].

4.1 Klinische Klassifikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass nicht nur Mutationen in den kanonischen Spleißstellen, sondern auch Varianten in intronischen Bereichen außerhalb der hochkonservierten Nukleotid-Positionen erhebliche funktionelle Konsequenzen haben können. Die Einordnung solcher Varianten stellt in der klinischen Varianten-Interpretation eine zentrale Herausforderung dar. Für die Überführung der Ergebnisse einer Spleißanalyse und der Varianteninterpretation in einen klinischen Kontext, beispielsweise im Rahmen einer genetischen Beratung, ist die Verwendung eines etablierten Klassifikations-Systems notwendig. Die im Rahmen der genetischen Diagnostik ermittelten Sequenzvarianten der getesteten Gene werden nach einem vorgegebenen Klassifikationssystem hinsichtlich ihrer Pathogenität eingeteilt und damit bezüglich ihrer klinischen Relevanz bewertet. Die Grundlage des Klassifikationssystems bildet das von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) etablierte 5-Klassen-Modell, das die Bedeutung einer Sequenzvariante in Bezug auf einen möglichen Funktionsverlust des codierten Proteins bewertet (Tabelle 17) [72]. Sie gilt für Hochrisikogene (*BRCA1/2*), wird jedoch auch für die *Core-Gene* des *True-Risk-Panels* des Deutschen Konsortiums verwendet. Im Deutschen Konsortium für Familiären Brust- und Eierstockkrebs (DK-FBREK) hat sich eine Expertengruppe konstituiert, die Sequenzvarianten basierend auf den Richtlinien des *ENIGMA*-Konsortiums sowie den Richtlinien des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) und der *Association for Clinical Genomic Science* (ACGS) nach aktueller Datenlage klinisch interpretiert und klassifiziert. Die aktuelle Klassifikation, der im DK-FBREK identifizierten Sequenzvarianten wird in der zentralen Datenbank des DK-FBREK dokumentiert und kann von allen teilnehmenden Zentren eingesehen und somit eine einheitliche Bewertung innerhalb der verschiedenen Zentren gewährleistet werden. Sollten Neubewertungen von bereits klassifizierten Varianten vorliegen, sorgt ein

etabliertes *Recall*-System dafür, dass die betroffenen Familien informiert werden [19].

Klasse	Wahrscheinlichkeit für Pathogenität
5: Pathogen/relevanter Funktionsverlust	> 0.99
4: Wahrscheinlich pathogen/relevanter Funktionsverlust	0.95 – 0.99
3: Unklare Datenlage/keine sichere Bewertung	0.05 – 0.949
2: Wahrscheinlich nicht pathogen/wenig klinische Signifikanz	0.001 – 0.049
1: Nicht pathogen/keine klinische Signifikanz	< 0.001

Tabelle 17: IARC 5-Klassensystem für Sequenzvarianten bei *High-risk* Genen nach ENIGMA basierend auf [72]

Zu dem Klassifikationssystem des *ENIGMA* Konsortiums existiert, entsprechend jeder *Class* (Klasse), eine begleitende Empfehlung hinsichtlich des weiteren klinischen Vorgehens für die betroffenen familiären Angehörigen (Tabelle 18).

Class	Prädiktives Testen von Risikoverwandten	Überwachung von Risikoverwandten	Gentestung von Verwandten
5	Ja	Leitliniengerecht nach hohem Risiko für Träger	Nicht indiziert
4	Ja	Leitliniengerecht nach hohem Risiko für Träger	Ja
3	Nein	Individuell basierend auf Familienanamnese und Risikofaktoren	Ja
2	Nein	Wie Klasse 3 – Behandlung als "keine pathogene BRCA1/2-Variante"	Ja
1	Nein	Wie Klasse 3 – Behandlung als "keine pathogene BRCA1/2-Variante"	Nicht indiziert

Tabelle 18: Empfehlungen über familiäres Mitbetreuungskonzept bei *High-risk* Genen [19]

Als "pathogen" (*Class* 5) wird eine Sequenzvariante eingestuft, wenn ein oder mehrere aberrante Transkripte des varianten Allels nachgewiesen werden, die beispielsweise aufgrund einer *In-Frame*-Deletion oder eines Stopp-Codons zu einem Verlust von bekannten funktionellen Domänen führen. Als „wahrscheinlich pathogen“ (*Class* 4) beurteilt werden Varianten, welche einen frühzeitigen Stopp der Proteinbiosynthese codieren (*Nonsense*- oder *Frame-Shift*-Varianten), jedoch nicht den Verlust bekannter, klinisch relevanter funktioneller Proteindomänen bedingen. Eine der Kriterien für eine Klassifizierung in *Class* 2 sind beispielsweise

Intronvarianten, die mehr als -20bp oder +10bp von der Exongrenze entfernt sind und nach Ergebnissen bioinformatischer Vorhersageprogramme höchstwahrscheinlich nicht den Spleißmechanismus verändern. Varianten, die ein Transkriptmuster analog mit dem Mittelwert der Kontrollen zeigen, werden als neutral/nicht pathogen bewertet. Dazu zählen z.B. Varianten, die sich bei $\geq 1\%$ in Großpopulationen (Kaukasier, Afrikaner, Asiaten) wiederfinden [19]. Wesentlich problematischer sind aberrante Transkripte, zu denen eine unklare Datenlage vorliegt und somit keine genaue Bewertung hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz erfolgen kann. Diese Sequenzvarianten werden der Klasse 3 zugeordnet und als „*Variants of uncertain significance*“ (VUS) bezeichnet. Laut „*BRCA Exchange*“, einer internationalen Datenbank für die Gene *BRCA1* und *BRCA2*, sind über 64.000 unbewertete Sequenzvarianten registriert [73]. Häufig handelt es sich hierbei um Varianten im Bereich der Exon/Intron-Übergänge, welche mögliche Auswirkungen auf den Spleißmechanismus haben [74]. Hier können Spleißalgorithmen zwar angeben, ob ein aberrantes Spleißen wahrscheinlich ist, ermöglichen jedoch keine sichere Aussage über die tatsächliche Pathogenität.

4.2 Schlussfolgerung

Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass *in-silico-Tools* (besonders der Vergleich von mehreren) Hinweise auf mögliche Transkriptveränderungen liefern, diese jedoch nicht zwangsläufig mit einem Funktionsverlust des Proteins gleichzusetzen sind. An dieser Schnittstelle setzt die Arbeit der *VUS-Task-Force* des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs an: Sie hat einheitliche Kriterien zur Bewertung von Varianten definiert, die auch den Umgang mit spleiß-relevanten Veränderungen berücksichtigen. Dabei wird betont, dass bei widersprüchlichen oder grenzwertigen Vorhersagen funktionelle Analysen, insbesondere RNA-Analysen, unverzichtbar sind, um eine valide Klassifizierung zu ermöglichen [19]. Im klinischen Kontext ist die differenzierte Einordnung solcher Varianten von hoher Relevanz für die genetische Beratung, da sie unmittelbar Auswirkungen auf die Risikoeinschätzung und das therapeutische Vorgehen hat. Je mehr experimentell validierte Daten, insbesondere zu bislang unklaren Varianten generiert werden, desto besser lässt sich ihre Bedeutung in die bestehenden

Klassifikationssysteme einordnen und desto präziser können Patient:innen beraten werden.

Damit unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur die Notwendigkeit einer engen Verzahnung von *in-silico*-Analysen und funktionellen Untersuchungen, sondern auch die zentrale Rolle standardisierter Kriterien für eine einheitliche Klassifikation und damit für eine verbesserte Patient:innenversorgung, Prävention und Therapie.

5 Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut. *Zentrum für Krebsregisterdaten Mammakarzinom ICD-10 C50*. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html , Zugriffen: 01.09.2023 2019 [cited 2023 01.September].
2. Leitlinienprogramm Onkologie, *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. AWMF, 2021.
3. Anne Starker, K.K., Ronny Kuhnert, *Früherkennung von Brustkrebs: Inanspruchnahme der Mammografie in Deutschland*. Journal of Health Monitoring, 2017.
4. Gemeinsame Bundesausschuss, *Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krebserkrankungen*. 2020.
5. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, R.K.I., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. Zentrum für Krebsregisterdaten, 2015(10).
6. Harter, P., et al., *Incidence of germline mutations in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer (OC) patients (AGO TR-1)*. Journal of Clinical Oncology, 2016. **34**(15_suppl): p. 5538-5538.
7. Düsseldorf, U. *Einschlusskriterien für die genetische Beratung und Testung*. <https://www.uniklinik-duesseldorf.de/patienten-besucher/klinikeninstitutezentren/klinik-fuer-frauenheilkunde-und-geburtshilfe/unsere-zentren-spezialabteilungen/zentrum-familiaerer-brust-und-eierstockkrebs> , Zugriffen: 20. April 2026 2026 [cited 2026 20. April].
8. Deutsches Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs. *Betreuungskonzept Intensivierte Früherkennung*. <https://www.konsortium-familiaerer-brustkrebs.de/betreuungskonzept/praevention/intensivierte-frueherkennung/> , Zugriffen: 01.09.2023 2023 [cited 2023 01.September].
9. Düsseldorf, U. *Früherkennung*. <https://www.uniklinik-duesseldorf.de/patienten-besucher/klinikeninstitutezentren/klinik-fuer-frauenheilkunde-und-geburtshilfe/unsere-zentren-spezialabteilungen/zentrum-familiaerer-brust-und-eierstockkrebs/intensiviertes-frueherkennungs-und-nachsorgeprogramm-fbrek> , Zugriffen: 20. April 2026 2026 [cited 2026 20. April].
10. Kiechle, M., *Hereditäres Mammakarzinom: BRCA1, BRCA2 und BRCA3*. Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie, 2011. **8**(02): p. 103-103.
11. Kast, K., et al., *Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer*. J Med Genet, 2016. **53**(7): p. 465-71.
12. Mavaddat, N., et al., *Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms*. Breast Cancer Research, 2010. **12**(3): p. R28.
13. Rahner, N. and V. Steinke, *Hereditary cancer syndromes*. Dtsch Arztebl Int, 2008. **105**(41): p. 706-14.
14. Carroll, P.R., J.S. Witte, and J.K. Parsons, *Germline testing in those at risk of prostate cancer*. Can J Urol, 2019. **26**(5 Suppl 2): p. 31-33.

15. Moran, A., et al., *Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations*. Familial Cancer, 2012. **11**(2): p. 235-242.
16. Meindl, A., et al., *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. Nature Genetics, 2010. **42**(5): p. 410-414.
17. Antoniou, A.C., et al., *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. N Engl J Med, 2014. **371**(6): p. 497-506.
18. Thomssen, C. and D. Wand, *Hereditärer Brustkrebs*. Der Onkologe, 2012. **18**(3): p. 216-223.
19. Wappenschmidt, B., et al., *Criteria of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer for the Classification of Germline Sequence Variants in Risk Genes for Hereditary Breast and Ovarian Cancer*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2020. **80**(4): p. 410-429.
20. Yoshida, R., *Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis*. Breast Cancer, 2021. **28**(6): p. 1167-1180.
21. Heinrich, Müller, and Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2019: Springer Berlin Heidelberg.
22. Yoshida, K. and Y. Miki, *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage*. Cancer Sci, 2004. **95**(11): p. 866-71.
23. Raponi, M., et al., *BRCA1 exon 11 a model of long exon splicing regulation*. RNA Biol, 2014. **11**(4): p. 351-9.
24. El Khachibi, M., et al., *Screening of exon 11 of BRCA1 gene using the high resolution melting approach for diagnosis in Moroccan breast cancer patients*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 81.
25. Zhang, H., et al., *BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity*. Oncogene, 1998. **16**(13): p. 1713-1721.
26. Da Silva, L. and S.R. Lakhani, *Pathology of hereditary breast cancer*. Mod Pathol, 2010. **23 Suppl 2**: p. S46-51.
27. Venkitaraman, A.R., *Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage*. Journal of Cell Science, 2001. **114**(20): p. 3591-3598.
28. Wooster, R., et al., *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 789-792.
29. Narod, S.A. and W.D. Foulkes, *BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 665-76.
30. Deutsche Gesellschaft für Humangenetik, *S2k-Leitlinie Humangenetische Diagnostik und Genetische Beratung*. Medizinische Genetik, 2019. **30**(4): p. 469-522.
31. Gendiagnostik Kommission, *Richtlinie der Gendiagnostik-Kommission (GEKO) über die Anforderungen an die Qualifikation zur und Inhalte der genetischen Beratung gemäss 23 Abs. 2 Nr. 2a und 23 Abs. 2 Nr. 3 GenDG. In der Fassung vom 01.07.2011, veröffentlicht und in Kraft getreten am 11.07.2011*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2011. **54**(11): p. 1248-56.
32. Garutti, M., et al., *Hereditary Cancer Syndromes: A Comprehensive Review with a Visual Tool*. Genes (Basel), 2023. **14**(5).
33. Nationales Genomforschungsnetz (NGFN). *Das Humangenomprojekt Wenn die Welt an einem Strang zieht: Das Humangenomprojekt (HGP)*.

- http://www.ngfn.de/de/verstehen_der_menschlichen_erbsubstanz.html ,
Zugegriffen: 24. August 2023 2014 [cited 2023 24.August].
34. Rath, L., et al., *Etablierung der Next Generation Sequenziertechnologie (NGS) in der genetischen Prädispositionsdiagnostik des hereditären Mamma- und Ovarialkarzinoms*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2014. **74**(S 01): p. PO_Onko02_17.
 35. Schaflinger, E. and D. Enko, *Die Bedeutung der Hochdurchsatz-Sequenzierung in der medizinisch genetischen Diagnostik und Beratung*. Dtsch Med Wochenschr, 2022. **147**(20): p. 1336-1341.
 36. Hartmann, L., et al., *Diagnostics of pathogenic splicing mutations: does bioinformatics cover all bases?* Front Biosci, 2008. **13**: p. 3252-72.
 37. Lee, Y. and D.C. Rio, *Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing*. Annu Rev Biochem, 2015. **84**: p. 291-323.
 38. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosome structure and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
 39. Jian, X., E. Boerwinkle, and X. Liu, *In silico tools for splicing defect prediction: a survey from the viewpoint of end users*. Genet Med, 2014. **16**(7): p. 497-503.
 40. Asang, C., I. Hauber, and H. Schaal, *Insights into the selective activation of alternatively used splice acceptors by the human immunodeficiency virus type-1 bidirectional splicing enhancer*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(5): p. 1450-63.
 41. Pitolli, C., et al., *Non-Canonical Splicing and Its Implications in Brain Physiology and Cancer*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(5).
 42. Wang, Z., et al., *Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers*. Cell, 2004. **119**(6): p. 831-45.
 43. Erkelenz, S., et al., *Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms*. RNA, 2013. **19**(1): p. 96-102.
 44. Baralle, M. and F.E. Baralle, *The splicing code*. Biosystems, 2018. **164**: p. 39-48.
 45. Srebrow, A. and A.R. Kornblihtt, *The connection between splicing and cancer* <https://doi.org/10.1242/jcs.03053>. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 13): p. 2635-41.
 46. Abramowicz, A. and M. Gos, *Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation*. J Appl Genet, 2018. **59**(3): p. 253-268.
 47. Baralle, D. and M. Baralle, *Splicing in action: assessing disease causing sequence changes*. J Med Genet, 2005. **42**(10): p. 737-48.
 48. Gooding, C., et al., *A class of human exons with predicted distant branch points revealed by analysis of AG dinucleotide exclusion zones*. Genome Biol, 2006. **7**(1): p. R1.
 49. Leman, R., et al., *Novel diagnostic tool for prediction of variant spliceogenicity derived from a set of 395 combined in silico/in vitro studies: an international collaborative effort*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(15): p. 7913-7923.
 50. Yeo, G. and C.B. Burge, *Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals*. J Comput Biol, 2004. **11**(2-3): p. 377-94.
 51. Shapiro, M.B. and P. Senapathy, *RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(17): p. 7155-74.

52. Kammler, S., et al., *The sequence complementarity between HIV-1 5' splice site SD4 and U1 snRNA determines the steady-state level of an unstable env pre-mRNA*. RNA, 2001. **7**(3): p. 421-34.
53. Lund, M. and J. Kjems, *Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end*. RNA, 2002. **8**(2): p. 166-79.
54. Deutsches Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs. *Betreuungskonzept Molekulare Diagnostik*. <https://www.konsortium-familiaerer-brustkrebs.de/betreuungskonzept/molekulare-diagnostik/truriskrgenpanel-analyse/> , Zugriffen: 15.04.2024 2024 [cited 2024 15.April].
55. Chuang, L.Y., Y.H. Cheng, and C.H. Yang, *Specific primer design for the polymerase chain reaction*. Biotechnol Lett, 2013. **35**(10): p. 1541-9.
56. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, [21] *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, in *Methods in Enzymology*. 1987, Academic Press. p. 335-350.
57. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.
58. Vogt, T.S., *Beurteilung von unklassifizierten Varianten von BRCA1- und BRCA2- Spleißmutationen mittels in silico-Methoden und deren prognostischer Nutzen*. 2011.
59. Wappenschmidt, B., et al., *Analysis of 30 putative BRCA1 splicing mutations in hereditary breast and ovarian cancer families identifies exonic splice site mutations that escape in silico prediction*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50800.
60. 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.
61. Steffensen, A.Y., et al., *Functional characterization of BRCA1 gene variants by mini-gene splicing assay*. Eur J Hum Genet, 2014. **22**(12): p. 1362-8.
62. Wangenstein, T., et al., *Diagnostic mRNA splicing assay for variants in BRCA1 and BRCA2 identified two novel pathogenic splicing aberrations*. Hered Cancer Clin Pract, 2019. **17**: p. 14.
63. Crispino, J.D. and P.A. Sharp, *A U6 snRNA:pre-mRNA interaction can be rate-limiting for U1-independent splicing*. Genes Dev, 1995. **9**(18): p. 2314-23.
64. Zheng, J.T., et al., *Intron Retention as a Mode for RNA-Seq Data Analysis*. Front Genet, 2020. **11**: p. 586.
65. Dvinge, H. and R.K. Bradley, *Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes*. Genome Med, 2015. **7**(1): p. 45.
66. Ward, A.J. and T.A. Cooper, *The pathobiology of splicing*. J Pathol, 2010. **220**(2): p. 152-63.
67. Tubeuf, H., et al., *Large-scale comparative evaluation of user-friendly tools for predicting variant-induced alterations of splicing regulatory elements*. Hum Mutat, 2020. **41**(10): p. 1811-1829.
68. Moles-Fernandez, A., et al., *Computational Tools for Splicing Defect Prediction in Breast/Ovarian Cancer Genes: How Efficient Are They at Predicting RNA Alterations?* Front Genet, 2018. **9**: p. 366.
69. Bueno-Martinez, E., et al., *RAD51D Aberrant Splicing in Breast Cancer: Identification of Splicing Regulatory Elements and Minigene-Based Evaluation of 53 DNA Variants*. Cancers (Basel), 2021. **13**(11).

70. Bryen, S.J., et al., *Prevalence, parameters, and pathogenic mechanisms for splice-altering acceptor variants that disrupt the AG exclusion zone*. HGG Adv, 2022. **3**(4): p. 100125.
71. Tang, R., D.O. Prosser, and D.R. Love, *Evaluation of Bioinformatic Programmes for the Analysis of Variants within Splice Site Consensus Regions*. Adv Bioinformatics, 2016. **2016**: p. 5614058.
72. Plon, S.E., et al., *Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results*. Hum Mutat, 2008. **29**(11): p. 1282-91.
73. ENIGMA Consortium. *BRCA Exchange*.
https://brcaexchange.org/variants?filter%5B%5D=Pathogenicity_expert&filterValue%5B%5D=Not%20Yet%20Reviewed , Zugriffen: 15. Oktober 2023 2023 [cited 2023 15. Oktober].
74. Honisch, E., et al., *Bewertung putativer BRCA1/BRCA2-Spleißmutationen hinsichtlich einer genetische Prädisposition für Brust- und Eierstockkrebs*. Zentralblatt Gynäkologie, 2006. **128**(03): p. P1_4.

Anhang

Transkript ID	Gen	Genom	cDNA	Exon/Intron	Sequenz WT	Sequenz MUT	Kategorie	Typ	Konsequenz
NM_000059.4	BRCA2	GRCh37 (hg19)	c.9117G>A	Exon 23	CCGGTACAAAC	CCAGTACAAAC	D	SNP	Del Ex23
NM_032043.3	BRIP1	GRCh37 (hg19)	c.507G>A	Exon 5	CAGGTAAACAG	CAAGTAAACAG	C	SNP	Del Ex5
NM_007294.4	BRCA1	GRCh37 (hg19)	c.4484G>T	Exon 14	AAGGTAAGAAA	AATGTAAGAAA	A	SNP	Del Ex14
NM_000059.4	BRCA2	GRCh37 (hg19)	c.516+1G>T	Intron 6	AAGGTAATAT	AAGTTAAATAT	A	SNP	Del Ex5&6
NM_007294.4	BRCA1	GRCh37 (hg19)	c.212+1G>C	Intron 5	AAGGTATATA	AAGCTATATA	B	SNP	Del Ex5 Del 22nt Ex5 (c.190)
NM_007294.4	BRCA1	GRCh37 (hg19)	c.4484+1G>A	Intron 14	AAGGTAAGAAA	AAGATAAGAAA	A	SNP	Del Ex14
NM_000051.4	ATM	GRCh37 (hg19)	c.4236+2T>C	Intron 28	CCTGTAAGTAT	CCTGCAAGTAT	C	SNP	Del Ex28
NM_000059.4	BRCA2	GRCh37 (hg19)	c.7617+2T>G	Intron 15	CAGGTATGTGT	CAGGGATGTGT	A	SNP	Del Ex15
NM_007294.4	BRCA1	GRCh37 (hg19)	c.134+2T>G	Intron 3	CAAGTAAGTTT	CAAGGAAGTTT	A	SNP	Del Ex3
NM_000059.4	BRCA2	GRCh37 (hg19)	c.8754+3G>C	Intron 21	GAGGTGAGAGA	GAGGTCAGAGA	B	SNP	Ins In21 SD +46nt
NM_007194.4	CHEK2	GRCh37 (hg19)	c.592+3A>T	Intron 4	AAGGTAATATT	AAGGTTATATT	C	SNP	Del Ex4
NM_000059.4	BRCA2	GRCh37 (hg19)	c.9501+3A>T	Intron 25	GAGGTAAGGTT	GAGGTTAGGTT			Del Ex25
NM_002878.4	RAD51D	GRCh37 (hg19)	c.144+5G>A	Intron 2	AAGGTGAGCTC	AAGGTGAAGCTC	C	SNP	Del Ex2&3
NM_007294.4	BRCA1	GRCh37 (hg19)	c.4986+6T>G	Intron 16	TTTGTGAGTGT	TTTGTGAGGGT	B	SNP	Ins In16 SD +65nt
NM_021930.6	RINT1	GRCh37 (hg19)	c.2067+6T>A	Intron 13	GAAGTAAGTAA	GAAGTAAGAAA	D	SNP	Del Ex13
NM_058216.3	RAD51C	GRCh37 (hg19)	c.966-1G>A	Intron 7	TATCTTTTCTTTAAGCAGGTT	TATCTTTTCTTTAAGCAAAGTT	B	SNP	Del Ex7&8
NM_007294.4	BRCA1	GRCh37 (hg19)	c.5407-10G>A	Intron 22	TTTCCTCTCGGGATCCAGGGT	TTTCCTCTCTAGGGATCCAGGGT	C	SNP	Ins In22 SA +8nt
NM_007294.4	BRCA1	GRCh37 (hg19)	c.213-12A>G	Intron 5	CTCAACAATTTAATTCAGGAG	CTCAAACAGTTTAAATTCAGGAG	A	SNP	Ins In5 SA +11nt

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Fehm. Ich danke Ihnen für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Begutachtung der Arbeit sowie für Ihr Feedback und Ihre Unterstützung während des gesamten Projektes.

Ein großer Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Dieter Niederacher für seine langjährige Begleitung und Unterstützung. Vielen Dank für Deine hilfreichen Ratschläge sowie für Deine Zeit und Geduld in den letzten Jahren.

Bei Herrn PD Dr. rer. nat. Torsten Lowin bedanke ich mich für die Übernahme der Zweitbetreuung.

Ein herzliches Dankeschön geht an das Team des Forschungslabors der Frauenklinik. Für die Unterstützung im Labor danke ich Dagmar, Nora und Ursula.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, meinen Schwiegereltern und meiner Freundin Paula, die immer an mich glauben und jeden noch so kleinen Erfolg wertschätzen und mit mir feiern.

Und meinem Mann Philipp: Vielen Dank für Deine Geduld, Unterstützung und Wertschätzung über die letzten Jahre. Ich freue mich auf das nächste Abenteuer.