

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Humangenetik

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Horst -

**Untersuchungen zur Verteilung der unterschiedlichen
BRCA1-Haplotypen in Brustkrebspatientinnen und
Kontrollpersonen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Acar, Nurgül

aus Ordu / Türkei

2007

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. J. Horst
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. A. Schumacher

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Humangenetik

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Horst -

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Horst

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. A. Schumacher

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Verteilung der unterschiedlichen BRCA1-Haplotypen in
Brustkrebspatientinnen und Kontrollpersonen

Acar, Nurgül

Im Rahmen der von der deutschen Krebshilfe geförderten Studie „Familiärer Brust- und Eierstockkrebs“ wurden Komplettanalysen der BRCA1- und BRCA2-Gene durchgeführt. In den Münsteraner Untersuchungen zeigte sich ein Vorherrschen von zwei BRCA1-Haplotypen, die in unterschiedlicher Häufigkeit bei Brustkrebspatientinnen und Kontrollpersonen vorkommt.

Durch Amplifikation und Heteroduplexanalyse von Exonabschnitt 11.12 im BRCA1-Gen wurde die Allelhäufigkeit und Verteilung für das Nukleotid 3667 bestimmt. Durch eine Änderung des Nukleotid 3667 von Adenin nach Guanin entstehen zwei Protein-Isoformen, 1183-Lys und 1183-Arg. Das Vorliegen dieser zwei BRCA1-Haplotypen wurde durch die Restriktionsanalyse der homozygot getesteten Personen bestätigt.

Die Häufigkeit und Verteilung der beiden BRCA1-Haplotypen in der Gruppe familiärer Brustkrebs (n= 153) und in der Gruppe sporadischer Brustkrebs (n= 29) wurde mit der Kontrollgruppe (n= 386) verglichen. Die Allelverteilung in der Gruppe sporadischer Brustkrebs zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($X^2=0,12$). Die seltenere BRCA1-Isoform kam jedoch in der Gruppe der Risikofamilien signifikant häufiger vor ($X^2=12,37$). Demnach korreliert die seltenere Isoform mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko. Dies könnte auf einen funktionellen Unterschied der Protein-Isoformen, z. B. eine protektive oder tumoraggressive Wirkung in der Entwicklung oder im Verlauf der Erkrankung hinweisen und müsste genauer in weiteren Studien untersucht werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2007

1. Einleitung

1.1.	Häufigkeit und Epidemiologie des Brustkrebses	3
1.2.	Entstehung von Brustkrebs	5
1.3.	Familiäre und sporadische Form von Brustkrebs	7
1.4.	Die Entdeckung der BRCA-Gene	8
1.5.	Die BRCA-Studie	9
1.6.	Das BRCA1-Gen und sein Genprodukt	11
1.6.1.	Die Struktur des BRCA1-Gens	11
1.6.2.	Das BRCA1-Protein und dessen Funktion	12
1.6.3.	BRCA1 und familiärer Brustkrebs	14
1.6.4.	BRCA1 und sporadischer Brustkrebs	15
1.6.5.	Mutationen und Polymorphismen im BRCA1-Gen	16
1.7.	Hintergrund der Arbeit, Arbeitsprogramm und Ziele	18

2. Material und Methoden

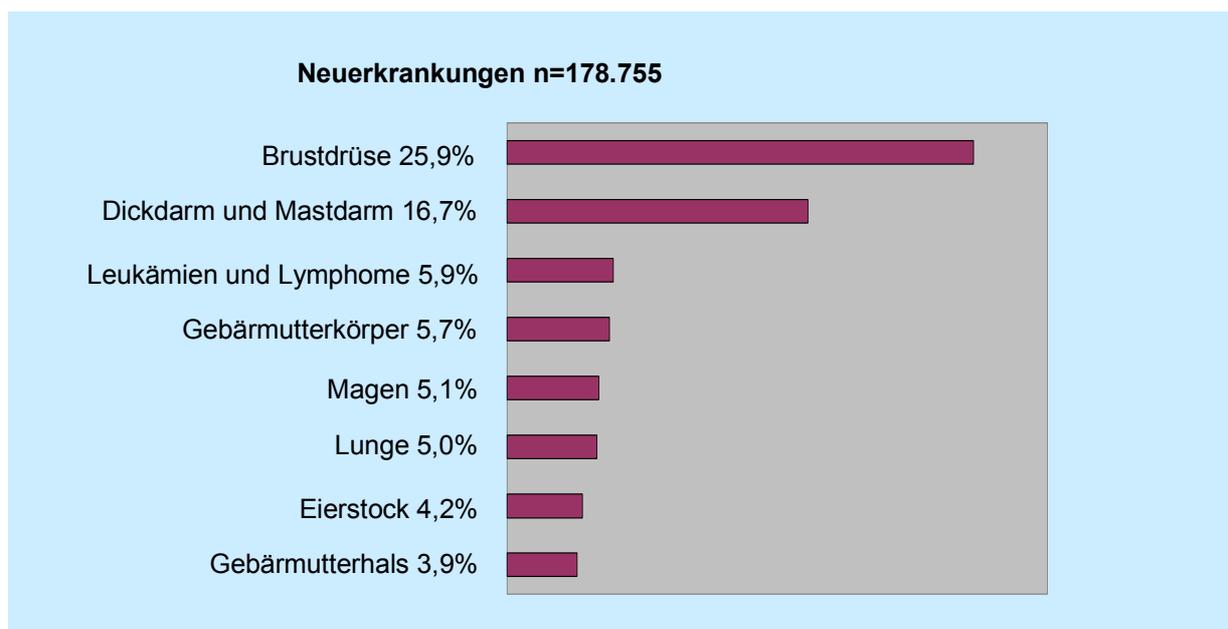
2.1.	Patientenproben	20
2.1.1.	Phenolisierung von DNA-Lösungen	20
2.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.1.	BRCA1-spezifische Oligonukleotide	23
2.3.	Elektrophorese	24
2.3.1.	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.3.1.1.	Ethidiumbromid-Färbung	26
2.3.1.2.	Eluierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen	27
2.3.2.	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)	27
2.3.2.1.	Heteroduplexanalyse mittels PAGE	27
2.3.2.2.	Silberfärbung	29

2.4.	Restriktionsanalyse	29
2.5.	DNA-Sequenzierung	30
2.5.1.	Aufreinigung von PCR-Produkten zur Direktsequenzierung	31
2.5.1.1.	Enzymatische Aufreinigung	32
2.5.1.2.	Aufreinigung aus Agarosegelen	32
2.5.2.	Sequenzreaktion	33
2.5.3.	Sequenzanalyse	34
2.6.	Puffer und Lösungen	34
2.7.	Bezugsquellen der Chemikalien und Enzyme	36
2.8.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	37
2.9.	Chi-Quadrat-Test	38
3.	Ergebnisse	
3.1.	Test auf häufige BRCA1-Mutationen in Proben von Frauen mit sporadischem Brustkrebs	40
3.2.	Nachweis von LOH in sporadischem Brustkrebs	43
3.3.	Nachweis und Häufigkeit der beiden BRCA1-Haplotypen	44
3.4.	Verifizierung der beiden BRCA1-Haplotypen	48
3.5.	Statistische Auswertung	49
4.	Diskussion	50
5.	Zusammenfassung	53
6.	Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

1.1. Häufigkeit und Epidemiologie von Brustkrebs

Nach der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister (32) erkranken in Deutschland jährlich über 46.000 Frauen an Brustkrebs, davon etwa 19.000 im Alter unter 60 Jahren. Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Sie ist für 26% aller Krebsneuerkrankungen und 36% der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren verantwortlich. Brustkrebs verursacht 17,1% aller Krebstodesfälle bei Frauen (siehe Abb.1). Eine von zehn Frauen wird im Laufe ihres Lebens an dieser Krebsform erkranken (7). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren, mehr als drei Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter an Krebs gesamt (siehe Abb.2).



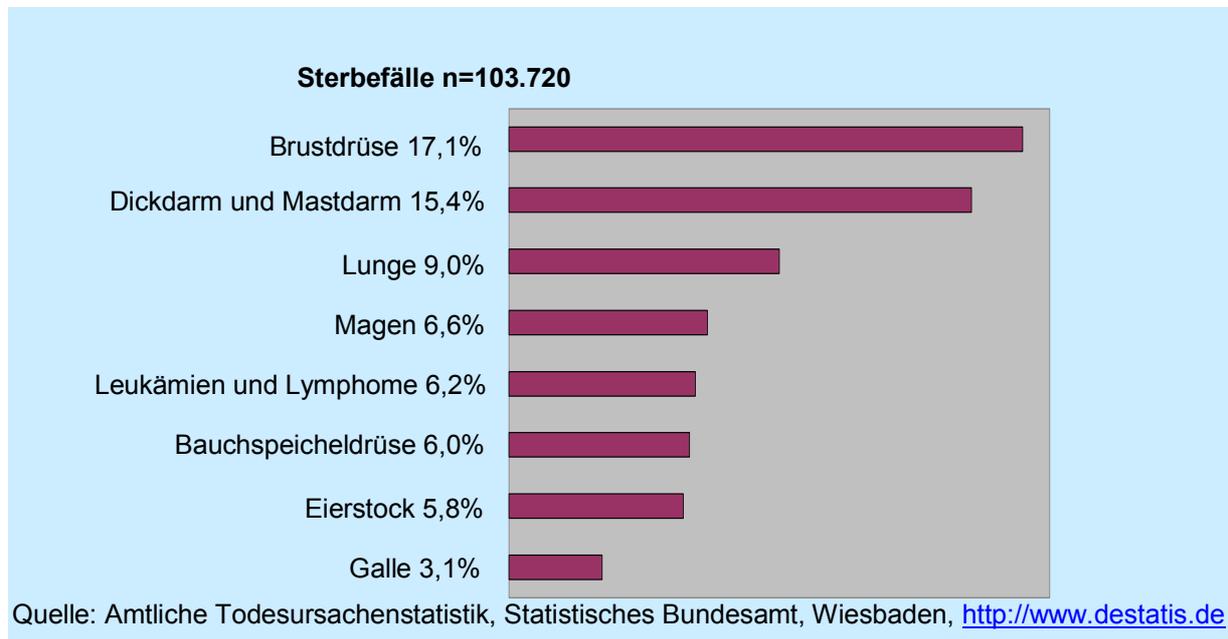


Abb. 1:

Prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen der Frau an der Gesamtzahl 1998 in Deutschland (nach Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002 (32))

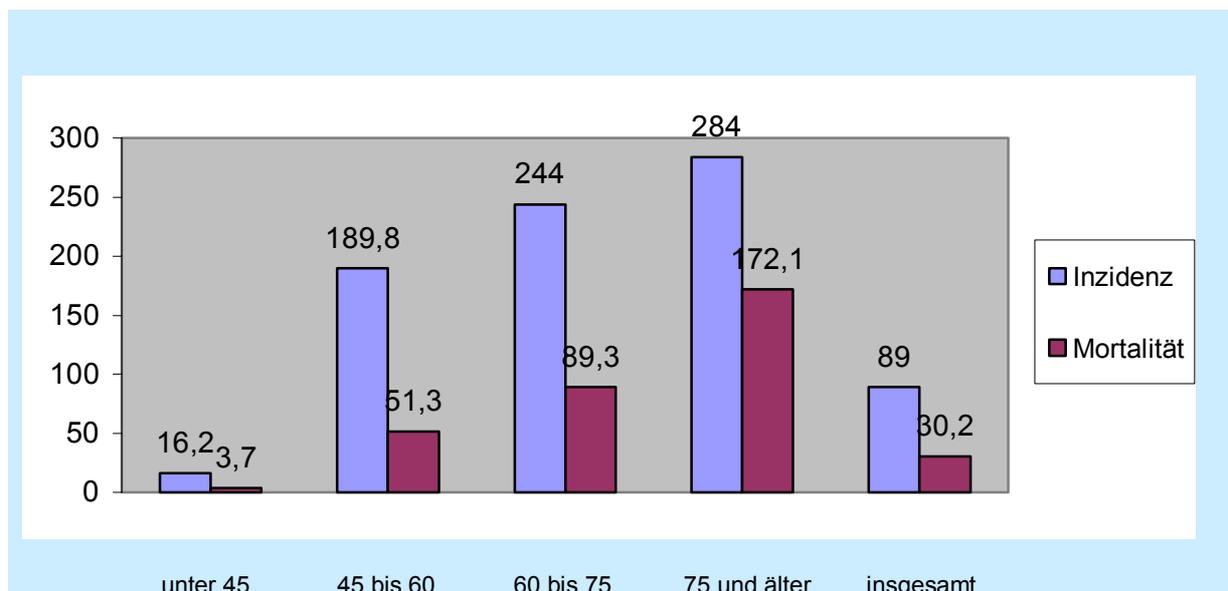


Abb. 2:

Brustkrebs: Mortalität und geschätzte Inzidenz 1996 bis 1998 in Deutschland nach Altersgruppen, Fälle pro 100.000 (nach Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002 (32))

Die Erkrankungsdaten für Deutschland liegen im europäischen Vergleich im unteren Drittel. In den Niederlanden, Dänemark, Schweden und Finnland ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit deutlich höher, in südeuropäischen Ländern wie Spanien, Griechenland und Portugal deutlich niedriger. Frauen, in deren naher Verwandtschaft Brustkrebserkrankungen aufgetreten sind, tragen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko. Eine frühe Menarche, Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt, späte Menopause, Hormonersatztherapie um und nach der Menopause sowie ionisierende Strahlung sind ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert. In verschiedenen Studien wurden auch Zusammenhänge zu Ernährungsgewohnheiten (fettreiche Nahrung) und regelmäßigem Alkoholkonsum beobachtet. Die Brustkrebsinzidenz und in geringem Maße die Sterblichkeit zeigt in Deutschland wie in allen anderen europäischen Ländern in den letzten 20 Jahren eine steigende Tendenz. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt heute im Mittel 73%. Einer an Brustkrebs erkrankten Frau gehen durchschnittlich sechs Jahre ihrer Lebenserwartung verloren. (32)

1.2. Entstehung von Brustkrebs

Durch moderne molekularbiologische Techniken sind neue Theorien zu den molekularen Mechanismen der Karzinogenese entwickelt worden. Das Modell der so genannten Mehrschrittkarzinogenese geht von der normalen Epithelzelle über physiologische und unphysiologische Zellproliferation hin zum Carcinoma in situ, welches dann zu einem invasiven Karzinom mit zirkulierenden Tumorzellen und Fernmetastasen führt, deren zeitliches Auftreten und ihre Interaktionen jedoch noch

überwiegend unbekannt sind. Beckmann und Kollegen aus Düsseldorf haben 1997 ein hypothetisches Arbeitsmodell erstellt (siehe Abb. 3).

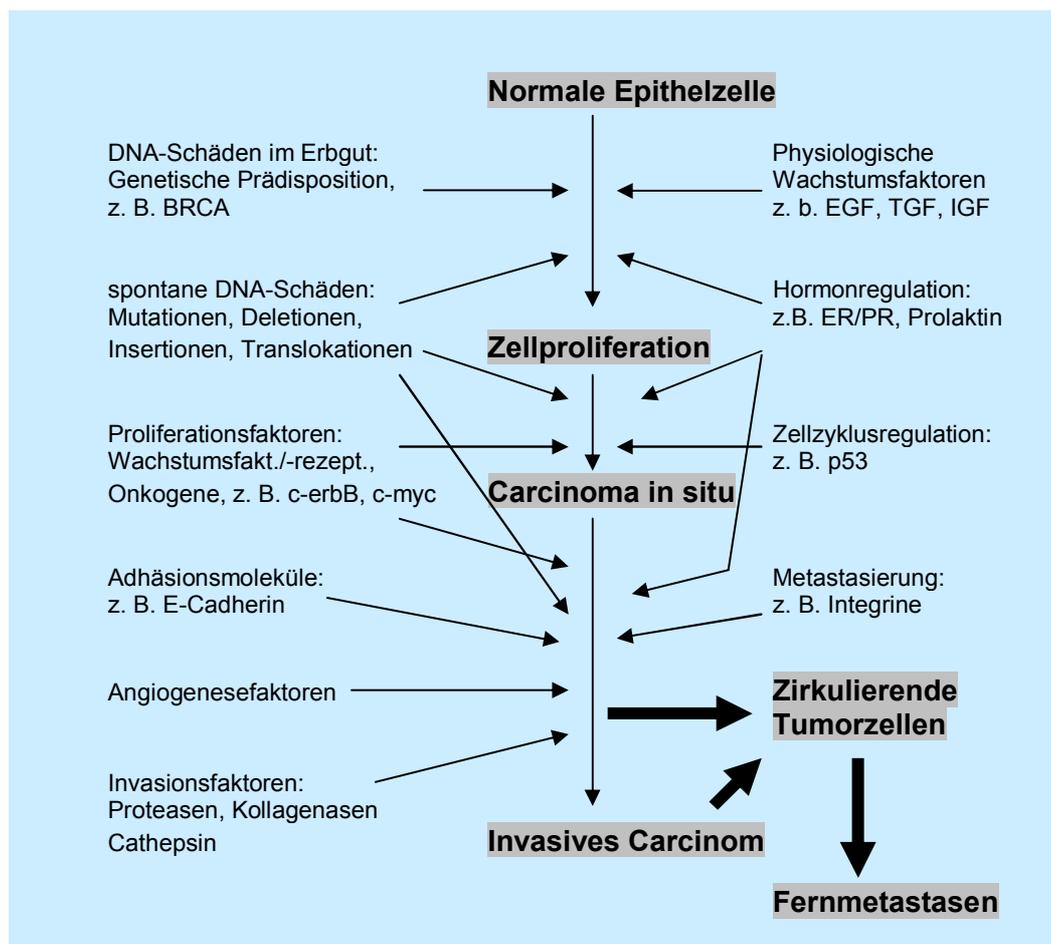


Abb. 3:
Modell der Mehrschrittkarzinogenese des Mammakarzinoms
 (nach Beckmann, Dt Ärztebl 1997 (2))

Zwei Gengruppen – aktivierte Onkogene und defekte Tumorsuppressorgene – sind an der Mehrschrittkarzinogenese beteiligt. Protoonkogene sind nicht mutierte, konstitutive Gene, die die physiologische Zellvermehrung und damit verbundene Zellabläufe positiv regulieren. Bei Veränderung der Genkopienzahl (Amplifikation) kommt es

zur vermehrten Expression der korrespondierenden Wachstumsproteine mit einer unphysiologischen Wachstumsstimulation, eines der Hauptkriterien für malignes Wachstum. Tumorsuppressorgene wirken zumeist inhibierend auf die Zellproliferation. Bei Wegfall der Inhibition kommt es zur unphysiologischen Proliferation und somit zu malignem Wachstum der Zelle. Das Zweischnitt-Modell zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens wurde zuerst von Knudsen formuliert (31). Ein Schlüsselschritt der somatischen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist der Verlust einer Genkopie in der Tumor-DNA, wobei die noch vorhandene Kopie infolge einer vererbten Keimbahnmutation oder einer somatischen Mutation bereits inaktiviert ist.

1.3. Familiäre und sporadische Form von Brustkrebs

Brustkrebs kann in eine familiäre und eine sporadische Form unterschieden werden. Somatische Mutationen verursachen den größten Anteil der Mammakarzinome. Ein geringer Anteil (5%) kann jedoch auf eine erbliche Prädisposition zurückgeführt werden (36). Brustkrebs in der Familienanamnese ist nachweislich einer der wichtigsten epidemiologischen Risikofaktoren für die Entstehung der Erkrankung. Die familiäre Häufung wird durch die Segregation autosomal dominanter Gendefekte bedingt, die ursächlich für die erbliche Prädisposition für die Entwicklung eines Mammakarzinoms sind. Die Hauptmerkmale der familiären gegenüber der sporadischen Brustkrebserkrankung sind das junge Alter der Patientinnen bei der Erstdiagnose, häufige bilaterale Erkrankungen der Brust und das Vorkommen der Erkrankung bei Männern (22).

1.4. Die Entdeckung der BRCA-Gene

Brustkrebs ist ätiologisch, histopathologisch und genetisch heterogen. Durch Untersuchungen in Hochrisiko-Familien mit gehäuftem Auftreten von Brustkrebs sowie bilateralen Erkrankungen der Brust konnten wichtige genetische Faktoren nachgewiesen werden. Mary-Claire King und Kollegen zeigten 1990, dass ein „breast cancer susceptibility“ Gen („BRCA1“) auf dem langen Arm von Chromosom 17 existiert. Sie hatten genetische Kopplungsanalysen in sieben Hochrisikofamilien durchgeführt, in denen die Frauen im frühen Lebensalter (jünger als 45 Jahre) von Brustkrebs betroffen waren (22). Etwa ein halbes Jahr später wurden von Steven Nord und Kollegen die Ergebnisse einer Studie mit fünf Hochrisikofamilien mit Brust- und Ovarialkarzinomen veröffentlicht, deren genetische Kopplung auf dem selben Genort 17q21 lokalisiert war (41). Die eigentliche Klonierung und Charakterisierung des BRCA1-Gens erfolgte 1994 (39). Im gleichen Jahr wurde, wiederum durch Kopplungsanalysen, ein weiterer Genort für Brust- und Ovarialkarzinom („BRCA2“) auf Chromosom 13q12-13 nachgewiesen (61). Mutationen in den beiden BRCA-Genen konnten für einen großen Teil der Hochrisikofamilien nachgewiesen werden (47). Die genetische Prädisposition wird bei Vorliegen einer Keimbahn-Mutation autosomal dominant vererbt, wobei das prädisponierende Allel wie ein rezessives Allel in einer somatischen Zelle fungiert. Die vererbte Kopie des mutierten Allels ist verantwortlich für die Prädisposition, der Verlust beziehungsweise die Inaktivierung des Wildtypallels in der somatischen Zelle führt zur Ausprägung des malignen Phänotyps (2). Frauen mit einer „loss-of-function“-Mutation in einem der BRCA-Gene haben ein deutlich erhöhtes Lebenszeitrisiko, ein Mammakarzinom und/oder ein Ovarialkarzinom zu entwickeln. Die Schätzung für das Lebenszeitrisiko bei Vorliegen einer BRCA-Mutation variiert je nach der untersuchten

Studienpopulation von 30% bis 80% für Brustkrebs und von 15% bis 60% für Eierstockkrebs (7, 14). Frauen ohne erbliche Prädisposition haben demgegenüber ein Lebenszeitrisiko von etwa 10%, Brustkrebs zu entwickeln (7). Anders als BRCA1-Mutationen sind Mutationen im BRCA2-Gen auch bei Männern mit einem erhöhten Risiko (6%) für die Entstehung von Brustkrebs verbunden (56). Weitere signifikante Koinzidenzen in Familien mit BRCA-Mutationen sind für Endometrium-, Tuben-, Prostata-, Kolon- und Pankreaskarzinome beschrieben worden (1, 16).

1.5. Die BRCA-Studie

An den Universitäten in Berlin, Bonn, Düsseldorf, Frankfurt, Heidelberg, Kiel, München, Münster, Ulm und Würzburg wurden im Rahmen eines überregionalen Projektes der Deutschen Krebshilfe Zentren für familiären Brustkrebs etabliert. In diesen Zentren arbeiten entsprechend den interdisziplinären Erfordernissen Gynäkologen, Humangenetiker, Molekulargenetiker und Psychologen eng zusammen. Diese betreuen die Ratsuchenden klinisch, humangenetisch und psychologisch. Des Weiteren sollen Standards zur Diagnostik, Prävention und Therapie des erblichen Brustkrebses erarbeitet werden. Eine molekulargenetische Untersuchung der Gene BRCA1 und BRCA2 wird angeboten, wenn eines der folgenden Kriterien erfüllt ist (9):

1. Mindestens zwei Frauen der Familie mit Brust- und/oder Eierstockkrebs, wobei mindestens eine Frau bei Diagnose unter 50 Jahre alt gewesen ist.

2. Eine Frau der Familie mit einseitigem Brustkrebs, wobei die Erkrankung im Alter von ≤ 30 Jahren aufgetreten ist.
3. Eine Frau der Familie mit beidseitigem Brustkrebs, wobei die Erkrankung im Alter von ≤ 40 Jahren aufgetreten ist.
4. Eine Frau der Familie mit Eierstockkrebs, wobei die Erkrankung im Alter von ≤ 40 Jahren aufgetreten ist.
5. Eine Frau der Familie, bei der Brust- und Eierstockkrebs aufgetreten sind.
6. Ein männlicher Verwandter mit Brustkrebs.

Zur Klärung des Erkrankungsrisikos finden eine humangenetische Beratung mit Erstellung eines Stammbaumes, eine klinisch/gynäkologische Beratung hinsichtlich der präventiven und therapeutischen Möglichkeiten, eine psychologische Beratung sowie ggf. eine molekulargenetische Analyse des BRCA1- und BRCA2-Gens statt. Bei Nachweis einer BRCA-Mutation wird den Frauen ein intensiviertes Früherkennungsprogramm angeboten. Dazu zählen auch Ultraschall- und Röntgenuntersuchungen. Es gibt Hinweise darauf, dass die prophylaktische Entfernung der Brüste (Mastektomie) und/oder Eierstöcke (Ovarektomie) das Risiko zu erkranken im Sinne einer Primärprävention verringern kann. In zwei klinischen Studien im Jahr 2000 wurden bei Risikofrauen prophylaktische beidseitige Ovarektomien durchgeführt; dies führte zur Reduktion des Brustkrebsrisikos um 76% und des Ovarialkarzinomrisikos um 98% (12, 59). Eine retrospektive Studie über 639 Frauen mit Brustkrebsrisiko zeigte im Jahr 2001, dass eine prophylaktische beidseitige Mastektomie das Risiko an Brustkrebs zu erkranken um 90% senkt (23). Dies bestätigte 2004 auch die amerikanische PROSE Study Group, die 483 Frauen mit prophylaktischer beidseitiger Mastektomie über sechs Jahre nachbeobachtet hatte (48).

1.6. Das BRCA1-Gen und sein Genprodukt

1.6.1. Die Struktur des BRCA1-Gens

Das BRCA1-Gen ist auf Chromosomen 17q21 lokalisiert und erstreckt sich über 100 kb der genomischen DNA. Es enthält 24 Exons, von denen 22 Exons für ein Transkript von 7,1 kb kodieren (22). Das zentrale Exon 11 beinhaltet etwa 62% der zu kodierenden Sequenz; die restlichen Exons sind relativ klein (siehe Abb. 5).

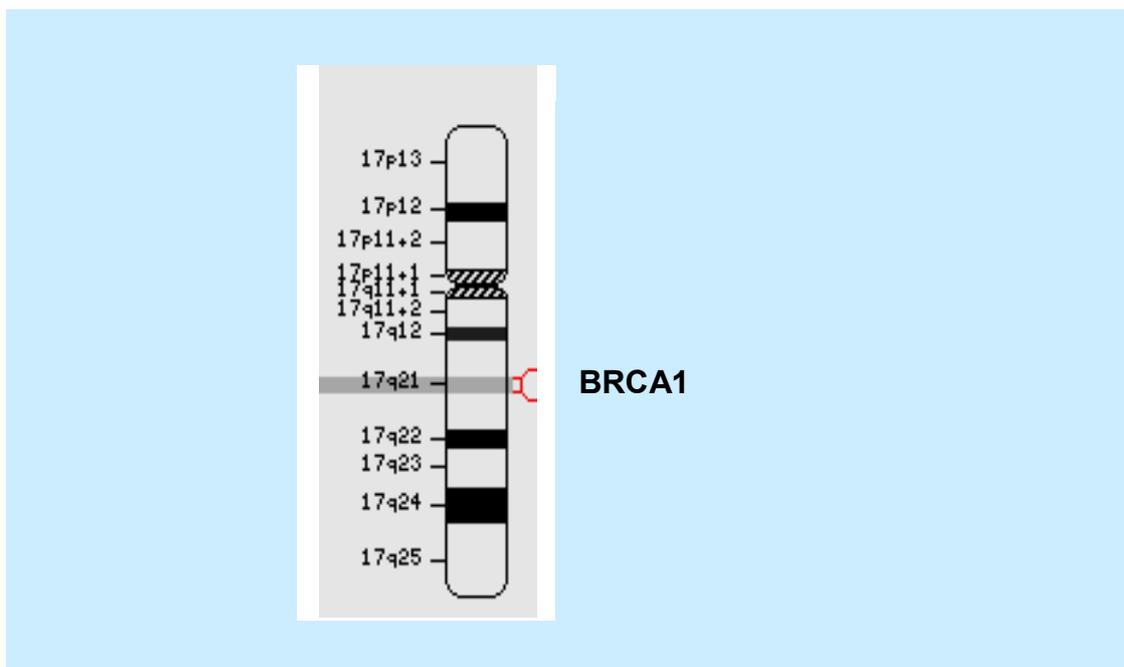
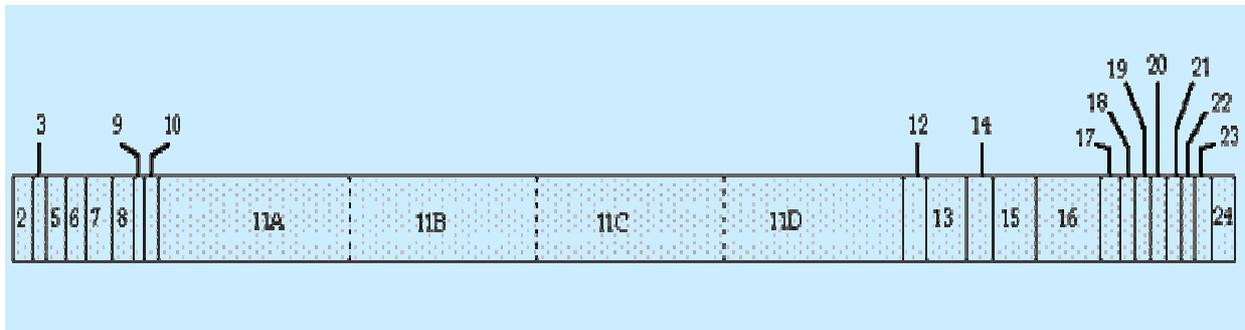


Abb. 4:

Chromosom 17 mit der Lokalisation des BRCA1-Gens (nach OMIM Gene map (43))

**Abb. 5:**

BRCA1 Transkript mit Verteilung der Exone (nach Breast Cancer Information Core (42))

1.6.2. Das BRCA1 Protein und dessen Funktion

Seit es den Forschern im Jahre 1994 erstmals gelang das BRCA1-Genprodukt zu isolieren, werden ihm im zellulären Geschehen vielfältige Aufgaben zugeschrieben. Auch wenn seine genauen Funktionen noch nicht vollständig verstanden sind, ist es offensichtlich, dass BRCA1 wichtige Aufgaben bei DNA-Reparaturvorgängen, der Regulierung von Transkriptionsabläufen, der Kontrolle der Zellteilung und der Ubiquitylierung hat (40).

Das BRCA1-Genprodukt ist ein glycosyliertes und phosphoryliertes Protein von 1863 Aminosäuren, das sich zu einer komplexen dreidimensionalen Struktur mit verschiedenen funktionellen Domänen zusammenfaltet. Die beiden Endregionen des Proteins sind durch charakteristische Sequenzmotive geprägt. Nahe dem NH₂-Terminus liegt ein Zn²⁺ bindendes RING-Finger-Motiv, bestehend aus 50 bis 60 Aminosäuren (39). Dieses RING-Finger-Motiv, dessen endgültige Funktion noch nicht gesichert ist, findet sich in mehreren Virusproteinen, Protoonkoproteinen und in Regulations- und Transkriptionsfaktoren (35). Es scheint eine tumorsuppressive Wirkung durch direkte Bindung an DNA oder indirekt durch Interaktion auf Proteinebene zu vermitteln (3).

Das COOH-Ende weist eine BRCT (*BRCA1 carboxyl terminal*)-Domäne auf, die sich in Verbindung mit der DNA-Bindungsdomäne GAL4 *in vitro* als starker Transkriptionsaktivator zeigt (5). Des Weiteren kann das BRCA1-Genprodukt als p53-Koaktivator die p53 vermittelte Genexpression steigern und wirkt in Interaktion mit dem RNA-Polymerase-II-Holoenzym transkriptionsregulierend (43, 50). Ein weiteres Protein, für das in Verbindung und Interaktion mit BRCA1 eine tumorsuppressive Wirkung nachgewiesen wurde, ist BARD1 („BRCA1-associated RING domain 1“), ein Kernprotein, das wie BRCA1 eine RING-Domäne und zwei BRCT-Motive enthält (29, 30). Über die RING-Domäne beider Proteine kommt es zur Heterodimerisierung. Der resultierende Protein-Komplex ist als Ubiquitin-Ligase an DNA-Reparaturvorgängen beteiligt (53). Mit Ubiquitin markierte Eiweißstoffe signalisieren ihrer Umgebung, dass sie zum Abbau freigegeben sind - ein wichtiger Prozess im Kampf des Körpers gegen entartete Zellen. Mutationen in diesem Bereich können fatale Konsequenzen nach sich ziehen, denn sie zerstören entweder jenes Molekül-Bündnis oder den Ubiquitin-Anheftungsmechanismus (4). Auch die BRCT-Wiederholungen am C-terminalen Ende spielen eine Schlüsselrolle bei der Verhinderung von Tumoren, indem sie an der Reparatur von DNA-Schäden mitwirken. Wie röntgenkristallographische Aufnahmen enthüllten, sind die BRCT-Wiederholungen hier auf sehr engem Raum zusammengeschnürt. Veränderungen, welche diese Motive verändern, zerstören die dichte Verpackungsform und verändern so die gesamte Proteinstruktur. Gehen die letzten elf Aminosäuren des C-terminalen Endes verloren, so resultiert daraus ein aggressiver, frühzeitiger Brustkrebs (60).

Es gibt noch eine Vielzahl von Proteinen, die an BRCA1 binden und in Interaktion mit BRCA1 Funktionen in der DNA-Reparatur, der Transkription und der Regulation des Zellzyklus haben. Die weitere

Untersuchung dieser Proteine und ihrer Funktionen wird auch die Kenntnis über die Funktionen von BRCA1 erweitern (62).

1.6.3. BRCA1 und familiärer Brustkrebs

In Familien mit Brustkrebs zeigte sich in Tumoren von betroffenen Frauen ein Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH) auf Chromosom 17q21 mit Erhalt des prädisponierenden Allels (54). Dieser Heterozygotieverlust im Genom der Tumorzellen entspricht der Zweischrithypothese der Tumorgenese von Knudson (31). Eine Mutation in einem Allel des Gens, hereditär oder somatisch, beeinträchtigt noch nicht die Zellfunktion. Erst bei Verlust des Wildtypallels, dem zweiten Schritt, entsteht eine Homozygotie für Defektallele. Der Anteil von Mutationen in den beiden BRCA-Genen liegt in bundesdeutschen Familien mit familiär gehäuften Brust- und/oder Eierstockkrebs bei durchschnittlich 25% für BRCA1 und 10% für BRCA2 (38). Damit kann in etwa einem Drittel der familiären Fälle die genetische Ursache der Tumor-Prädisposition nachgewiesen werden. Etwa 55% der nachgewiesenen Mutationen im BRCA1-Gen sind in dem zentralen Exon 11 lokalisiert, das 62% der kodierenden Sequenz enthält; die häufigsten Mutationen in der deutschen Population liegen in Exon 5 (300T>G) und Exon 20 (5382insC). Es gibt epidemiologische Unterschiede in der Verteilung der Mutationen. Zum Beispiel sind in japanischen Familien mit Brustkrebs der Anteil der BRCA1 Mutationen geringer, wohingegen in einigen ost-europäischen Ländern der Anteil erhöht ist (11, 27). In Ashkenazi-jüdischen Frauen kommen bestimmte Mutationen, wie zum Beispiel 185delAG, mit einer Häufigkeit von 1:100 gehäuft vor (11). Die Vielzahl der bisher identifizierten Mutationen und die Komplexität der

Genstruktur erschwerte die sichere Identifikation von Genträgern, und das nahezu vollständige Fehlen von Mutationen in sporadischen Mammakarzinomen zerschlug sehr schnell die Hoffnung, das Mammakarzinom-Gen gefunden zu haben. Es ist jedoch zweifelsfrei, dass bei Keimbahnmutationen im BRCA1-Gen das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs oder Eierstockkrebs zu erkranken bis 80% erhöht ist (7, 14). Die Häufigkeit der Mutationen in der Gesamtpopulation ist als 0,0006% angegeben, wobei die Verteilung wahrscheinlich von 1:2000 bis 1:500 variiert. In 5,3% der Brustkrebspatientinnen unter 40 Jahren sind BRCA1 Mutationen ursächlich. Mit zunehmendem Alter sinkt dieser Anteil bis 1,1% bei 50 bis 70jährigen (15).

1.6.4. BRCA1 und sporadischer Brustkrebs

Mutationen im BRCA1- oder BRCA2-Gen werden in sporadischen Brusttumoren nur relativ selten nachgewiesen (33). Trotzdem besteht die Annahme, dass die BRCA-Gene auch in der Tumorgenese des sporadischen Brustkrebs involviert sind, da häufig „loss of heterozygosity“-Veränderungen an den BRCA-Genorten nachgewiesen werden (58). Der Anteil an zellulärer BRCA1-mRNA ist in sporadischen Formen erniedrigt und korreliert mit der Aggressivität eines Tumors (55). Auch beim sporadischen Brustkrebs fungiert BRCA1 als Tumorsuppressorgen. Eine Hemmung der BRCA1 Expression führte in Versuchen zur Steigerung des Wachstums von normalen und bösartigen Brustepithelzellen (55). Und auch die Steigerung der BRCA1 Expression durch Transfektion zeigte in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen eine Wachstumshemmung für Brustkrebszellen und Ovarialkrebszellen (26). Das Vorkommen der BRCA1-mRNA und der -Proteine in multiplen

Isoformen und deren Nachweis in verschiedenen subzellulären Lokalisationen in Tumorzellen ist ein wichtiger Hinweis auf regulierende Funktionen von BRCA1 (6). BRCA1 scheint im sporadischen Brustkrebs durch verschiedene Mechanismen wie Regulation der Genexpression, differenzielles Spleißen und unterschiedliche zelluläre Lokalisationen eine wichtige Rolle zu übernehmen.

1.6.5. Mutationen und Polymorphismen im BRCA1-Gen

Anhand von molekulargenetischen Methoden zur Mutationsanalyse konnten seit der Entdeckung des BRCA1-Gens eine Vielzahl von Mutationen und Polymorphismen entdeckt werden. Zu den Nachweismethoden zählen beispielsweise die DNA-Sequenzierung, SSCP-Analyse (single stranded conformational polymorphism analysis) (44), CSGE (constant denaturing gel electrophoresis) (20), PTT (protein truncation test) (46) und die Heteroduplexanalysen (37). Für BRCA1 sind Informationen über mehr als 1500 DNA-Sequenzvarianten, Mutationen und Polymorphismen, in der „Breast Cancer Information Core“ (BIC) Datenbank des National Human Genome Research Institute zusammengefasst (42). Etwa 85% aller pathogenen Veränderungen sind Leseraster- (*frame-shift*-) oder Stopp- (*nonsense*-) Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese, also zu einem verkürzten Proteinprodukt, führen. Bei den restlichen 15% der Mutationen handelt es sich um Aminosäure-Austausch- (*missense*-) Mutationen, die funktionelle Domänen wie das RING-Finger-Motiv betreffen; z. B. verhindert die häufige Mutation C61G in dieser Domäne die Bildung des Heterodimers BRCA1/BARD1 und dessen Funktion als Ubiquitin-Ligase und korreliert eindeutig mit der Entwicklung von

Brustkrebs (23). Es gibt einige Nukleotidsubstitutionen im BRCA1-Gen, die zu einem Aminosäure-Austausch führen und die aufgrund ihres Auftretens in der Normalbevölkerung als benigne Polymorphismen klassifiziert werden. Die Unterscheidung zwischen *missense*-Mutationen und Polymorphismen ist oft nicht einfach. Sequenzvariationen werden als *missense*-Mutation eingestuft, wenn sich Assoziationen zu einer Erkrankung zeigen und die Variation in mehr als 200 Proben der Gesamtbevölkerung nicht nachzuweisen ist (8). Polymorphismen sind folglich nicht mit der Erkrankung assoziiert, sie führen nicht zur einer offensichtlichen funktionellen Veränderung des Proteins und sind in der Gesamtbevölkerung zu einem gewissen Prozentsatz ($\geq 1\%$) nachweisbar (8). Die bekannten Aminosäure-Austausch-Polymorphismen im BRCA1-Gen erhöhen demnach nicht das Risiko, an Brust- oder Eierstockkrebs zu erkranken. Bereits beschrieben wurde, dass sich vier dieser Polymorphismen – Q356R, L871P, E1038G, S1613G – in starkem Kopplungsungleichgewicht befinden und nur drei Haplotypen mit einer Häufigkeit $>1,3\%$ bilden. Etwa 90% aller Allele weisen dabei einen von zwei Haplotypen auf. Diese beiden Haplotypen kommen in der Bevölkerung mit einer Verteilung von etwa 1/3 zu 2/3 vor und einer englischen Studie zufolge bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung zwischen Brustkrebspatientinnen und Normalpersonen (10). Die Ergebnisse, die im Rahmen der bundesweiten Brustkrebsstudie im Zentrum Münster erhoben wurden, bestätigen das überwiegende Vorliegen von zwei BRCA1-Allelen, die neben stillen Nukleotidaustauschen vier Aminosäure-Variationen beinhalten („häufig“: P871, E1038, K1183, S1613, bzw. „selten“: L871, G1038, R1183, G1613, die seltene Variante R356 ist stets mit dem häufigen Allel assoziiert). Allerdings ergeben die Münsteraner Daten Hinweise darauf, dass der prozentuale Anteil der beiden Allele zwischen Brustkrebspatientinnen und Normalpersonen unterschiedlich ist. Dies

wirft erneut die Frage nach möglichen funktionellen Unterschieden der beiden Protein-Isoformen auf, einer Frage, die sich ja bereits aus dem Vorliegen eines „häufigen“ (~2/3) und eines „seltenen“ (~1/3) BRCA1-Allels ergibt.

1.7. Hintergrund der Arbeit, Arbeitsprogramm und Ziele

Etwa fünf Prozent aller Brustkrebserkrankungen können auf eine erbliche Prädisposition zurück geführt werden. Seitdem Mitte der neunziger Jahre die sogenannten Brustkrebs-Gene BRCA1 und 2 entdeckt wurden, wurden weltweit Untersuchungen zum Mutationsnachweis in Familien mit erblichem Brustkrebs durchgeführt. Durchschnittlich kann in etwa einem Viertel der familiären Fälle eine Mutation in einem der beiden Genen nachgewiesen werden – davon etwa zwei Drittel im BRCA1-Gen – während diese in sporadischen Fällen so gut wie nicht vorkommen. Dennoch scheinen auch bei einer Vielzahl der sporadischen Tumoren die beiden bekannten Brustkrebsgene involviert zu sein, was z. B. „Loss of Heterozygosity“- und Expressionsstudien nahe legen. Im Rahmen der von der Deutschen Krebshilfe geförderten Studie „Familiärer Brust- und Eierstockkrebs“ wurden in Münster, einem von zwölf universitären Zentren, Komplettanalysen der Gene BRCA1 und BRCA2 durchgeführt. Ein Nebenbefund der Mutationsanalyse war die Beobachtung, dass im BRCA1-Gen zwei Haplotypen („H“, für häufig, und „S“, für selten) vorherrschen, die etwa zwei Drittel („H“) bzw. ein Drittel („S“) aller Allele ausmachen. Diese Haplotypen führen auf Proteinebene zu zwei Isoformen, die sich an vier Aminosäurepositionen unterscheiden (L871P, E1038G, K1183R, S1613G). Die Ungleichverteilung der beiden

Isoformen legt einen Selektionsvorteil des häufigen bzw. einen Selektionsnachteil des seltenen Allels und somit einen funktionellen Unterschied der beiden Isoformen nahe. In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die seltene BRCA1-Isoform mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert ist. In diesem Fall wäre bei Brustkrebspatientinnen ein höherer Anteil des seltenen Allels zu erwarten als bei gesunden Kontrollpersonen. Grundlage der vorliegenden Arbeit ist somit die Ermittlung der Häufigkeit der beiden BRCA1-Haplotypen in Brustkrebspatientinnen (familiär oder sporadisch) im Vergleich zu nicht erkrankten Normalpersonen. Die familiären Fälle waren bereits negativ auf eindeutig pathogene Mutationen in den beiden BRCA-Genen getestet. Da ein Allel mit einer solchen Mutation auf jeden Fall ein prädisponierendes Allel darstellt und somit von der statistischen Analyse auszuschließen wäre, sollte auch in der Gruppe der sporadischen Fälle eine Untersuchung zum Nachweis/Ausschluss von Mutationen im BRCA1-Gen erfolgen. Diese Untersuchung wurde auf zehn Mutationen beschränkt, die in der bundesdeutschen Bevölkerung am häufigsten nachgewiesen werden und etwa 50% der BRCA1 Defektallele ausmachen.

Die Ermittlung der vorliegenden BRCA1-Isoformen sollte zunächst durch Untersuchung einer der vier Nukleotidpositionen im BRCA1-Gen erfolgen, die zu den Aminosäure-Polymorphismen führen. Daran anschließend sollte das Kopplungsungleichgewicht der vier Polymorphismen, also das Vorliegen von zwei distinkten Haplotypen, durch eine Analyse der homozygot getesteten Personen noch einmal bestätigt werden. Abschließend wurde durch eine statistische Berechnung die Signifikanz möglicher Unterschiede ermittelt.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenproben

Die Universität Münster gehört zu den von der Deutschen Krebshilfe im Rahmen der Studie „Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom“ geförderten Zentren. Im Institut für Humangenetik erfolgt neben der genetischen Beratung der Frauen aus Risikofamilien die molekulargenetische Diagnostik des BRCA-Gens. Hierdurch standen für die vorliegende Arbeit 153 DNA-Proben von Frauen mit Brustkrebs aus Risikofamilien zur Verfügung, also mit einer familiären Form der Erkrankung. Weitere 32 Proben von Frauen mit Brustkrebs erhielten wir vom Institut für Pathologie in Münster. Diese Proben bildeten die Gruppe der „sporadischen“ Brustkrebsfälle; bei einem Anteil von 5% familiärer Fälle an der Gesamtzahl der Erkrankungen sollten die sporadischen Fälle in dieser Gruppe $\geq 90\%$ betragen. Von diesen Patientinnen lagen jeweils zwei DNA-Proben vor, zum einen aus Tumorgewebe und zum anderen aus Normalgewebe. Als Kontrollgruppe wurden zufällig ausgewählte Proben von Frauen und Mädchen aus Familien mit dem Fragilen-X-Syndrom gewählt. Die 386 DNA-Proben sind aus dem Archiv des humangenetischen Institutes. Es handelt sich um nichtverwandte Frauen und Mädchen ohne bekanntes Brustkrebsrisiko.

2.1.1 Phenolisierung von DNA-Lösungen

Die zu untersuchenden Proben lagen als DNA-Lösung vor. Die DNA-Präparationen waren zuvor aus Vollblut (Proben aus der Humangenetik; Aussalzungsmethode nach Miller et al., 1988) bzw. aus Paraffinschnitten

(Proben aus der Pathologie) erfolgt. In einigen Fällen der Tumor-DNAs wurde zur Verbesserung der DNA-Qualität eine erneute Deproteinisierung der DNA-Lösung mit Phenol/Chloroform-Lösung durchgeführt.

60 µl DNA-Lösung
140 µl TE
+ 200 µl Phenol/CHCl₃

Nach 5 min bei 13000 rpm Zentrifugieren wurde dem Überstand

200 µl CHCl₃/ISA

hinzugefügt und nochmals 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zusetzen von

18 µl 3 M NaAC und
500 µl EtOH (abs.)

in den Überstand und 15 min Zentrifugieren. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen. Dem Pellet wurden

500 µl 80% EtOH

zugegeben. Nach 10 min Zentrifugieren wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen und das Pellet in der Speedvac 15 min getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 20 µl TE gelöst.

2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen Amplifizierung von DNA-Sequenzen *in vitro*. Die Spezifität der PCR basiert auf dem Einsatz von 2 Oligonukleotiden (Startermoleküle für die Taq-DNA-Polymerase = *Primer*), die zu den Enden der zu vermehrenden Zielsequenz auf der Ursprungs-DNA komplementär sind. In einem Vermehrungszyklus werden die beiden Stränge der zu amplifizierenden DNA zunächst durch Erhitzen getrennt, so dass die Startermoleküle an beide DNA-Stränge binden können. Jeder der DNA-Einzelstränge wird dann mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase - beginnend am 3'-OH-Ende des Startermoleküls - kopiert. Die DNA-Denaturierung erfolgt bei 94°C, die DNA-Polymerase-Reaktion bei 72°C. Der Vermehrungszyklus wird mehrfach, durchschnittlich 25- bis 35-mal, wiederholt. Startermoleküle und die für die Synthese notwendigen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) werden zu Beginn der Reaktion im Überschuss zugegeben. Ihre Konzentration nimmt mit jedem Vermehrungszyklus ab. Da in jedem Reaktionszyklus die Anzahl der Ziel-DNA-Moleküle – auch der neu synthetisierten – verdoppelt wird, nimmt die Zahl der DNA-Moleküle im Gesamtverlauf einer PCR exponentiell zu.

PCR-Ansatz (25 µl Volumen):

- 1 µl DNA (~ 100 ng)
- 1 µl Primer-Mix
(10 pmol 5'-Oligonukleotid, 10 pmol 3'-Oligonukleotid)
- 2,5 µl 10x PCR-Puffer
- 2,5 µl dNTPs (10 mM)
- 0,75 µl MgCl₂ (50 mM)

0,15 µl Taq-Polymerase (Fa. Eurogentec)
 17,1 µl H₂O

In der Regel wurden Master-Mixe hergestellt, weil 0,15 µl nicht zu pipettieren sind, insgesamt Pipettierschritte gespart werden und die resultierenden Einzelansätze genauer sind. Einzeln pipettiert wurden die verschiedenen DNAs.

Zyklus einer PCR:

	T (°C)	t (min)
1. Denaturierung	94°C	4
2. Denaturierung	94°C	0,5
3. Anhybridisierung	55°C	1
4. Elongation	72°C	1
5. Finale Elongation	72°C	5
6. Kühlung	10°C	

Schritt zwei bis vier wurde 35mal wiederholt.

2.2.1 BRCA1-spezifische Oligonukleotide (Startermoleküle)

Sequenzrichtung: 5' → 3'; F: „forward“, R: „reverse“

Exon 5-F: GCT TGT AAT TCA CCT GCC AT

Exon 5-R: TTC CTA CTG TGG TTG CTT CC

Exonabschnitt 11.04-F: GTCAAAGAGATAGAATGTGAGC

Exonabschnitt 11.04-R: CCCGTCTCTACAGAAAACAC

Exonabschnitt 11.07-F: CACAACAAAGAGCATACATAGGG
Exonabschnitt 11.07-R: TCGGGTTCACTCTGTAGAAG
Exonabschnitt 11.12-F: TCCTGGAAGTAATTGTAAGCATCC
Exonabschnitt 11.12-R: GCCCCTCTTCGGTAACC
Exonabschnitt 11.13-F: GCAAAGCGTCCAGAAAGGA
Exonabschnitt 11.13-R: TATTTGCAGTCAAGTCTTCCAA
Exonabschnitt 11.14-F: GCTAGCTTGTTTTCTTCACAGTGC
Exonabschnitt 11.14-R: AAATGTGCTCCCAAAGCATAAA
Exon 12-F: GTCCTGCCAATGAGAAGAAA
Exon 12-R: TGTCAGCAAACCTAAGAATGT
Exon 20-F: ATATGACGTGTCTGCTCCAC
Exon 20-R: GGGAATCCAAATTACACAGC
Exon 24-F: ATGAATTGACACTAATCTCTGC
Exon 24-R: GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA

2.3. Elektrophorese

Die Elektrophorese beruht auf der Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld zum Pluspol. Die Wanderung kann nicht nur in einer Pufferlösung als freie Elektrophorese, sondern auch in einem geeigneten Trägermaterial, zum Beispiel in Pufferlösung angesetztes Polyacrylamidgel oder Agarose-Gel, erfolgen. In solchen Gelen wandern Nukleinsäuren abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell zum Pluspol und können so voneinander getrennt werden. Abhängig von der Größe der zu trennenden Moleküle und der gewünschten Auflösung

werden unterschiedliche Vernetzungsgrade (Polyacrylamid) oder Konzentrationen (Agarose) eingesetzt. Nach der Wanderung können die getrennten Nukleinsäuren durch Anfärben sichtbar gemacht, dokumentiert und ggf. eluiert und für weitere Anwendungen eingesetzt werden.

2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte zur Kontrolle der Amplifikationsreaktion erfolgte in einem Agarose-Gel. Agarose ist ein neutrales gelbildendes Polysaccharid aus Seetang, das in Lösung unter Erhitzung doppelhelikale Abschnitte ausbildet, wodurch nach Abkühlung der Lösung ein Netzwerk durch Wasserstoffbrückenbildung entsteht. Die DNA-Fragmente trennen sich abhängig von der Porengröße des Agarosegels aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts. Dabei muss die Agarosekonzentration so festgelegt werden, dass die DNA-Moleküle optimal aufgetrennt werden können.

Ansatz für ein 1,5 %iges Agarosegel:

3g Agarose und
200 ml Tris-Borat-Puffer (TBE)

wurden in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgekocht und dann 20min unter Rühren abgekühlt. Für das Sichtbarmachen der DNA unter UV-Licht wurde der Lösung Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt.

200 µl EtBr-Lösung [0,5 mg/ml]

Die Gellösung wurde in einen Gelträger mit eingesetztem Probenkamm blasenfrei eingegossen. Nach circa 20min war das Gel erstarrt und wurde in eine horizontale Gel-Elektrophoresekammer gelegt, in der es mit dem entsprechenden Laufpuffer vollständig überdeckt war, Laufpuffer sowie Gelpuffer bestehend aus Tris Borat EDTA (TBE).

5 µl PCR-Produkt und 5 µl Ladepuffer

wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard und Längenmarker wurde die 100 bp-Leiter verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei

120 Volt in ca. 45min

bis eine optimale Auftrennung der zu testenden Nukleinsäuren erreicht war. Die DNA-Banden werden unter UV-Licht (260 nm) durch das fluoreszierende Ethidiumbromid sichtbar. Es erfolgte eine Photodokumentation unter UV-Licht.

2.3.1.1 Ethidiumbromid-Färbung

Wird dem Agarose-Gel zur Elektrophorese Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml beigemischt, so lassen sich Nukleinsäuren mit einer Nachweisgrenze von circa 50-100 ng durch Bildung eines DNA-Ethidiumbromid-Komplexes nachweisen. Durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 250 nm bis 360 nm werden diese Komplexe zur Fluoreszenz angeregt und die DNA-Banden sichtbar.

2.3.1.2. Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Gewinnung von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte nach Beendigung der Elektrophorese und Photodokumentation. Die unter UV-Licht ausgeschnittenen DNA-Banden wurden in Eppendorfgefäße auf Watteträger gelegt und ca. 1min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA befand sich nach Entfernen des Watteträgers im Eppendorfgefäß. Es wurden 100 µl TE dazugegeben.

2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Eine Elektrophorese durch Polyacrylamid-Gele wird immer dann eingesetzt, wenn eine hohe Auflösung erforderlich ist. Je nach Anwendung, zum Beispiel Sequenzierung oder Heteroduplexanalyse, gibt es unterschiedliche Zusammensetzungen. Parameter sind die Konzentration an Acrylamid sowie der Vernetzungsgrad bedingt durch den Anteil an Bisacrylamid. Die vorgefertigte Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung wird zum Gebrauch mit Puffer und Wasser gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von Ammoniumpersulfat, Radikalbildner, und TEMED, Katalysator, gestartet. Aus der Lösung wird ein festes Gel.

2.3.2.1 Heteroduplexanalyse mittels PAGE

Bei der PCR genomischer DNA werden beide Allele eines Gens (beide Chromosomen) parallel amplifiziert. Wenn sich die beiden Allele in dem amplifizierten Abschnitt in einer Base unterscheiden (Mutation oder

Polymorphismus), die Person also heterozygot für die Mutation oder den Polymorphismus ist, dann entstehen zwei unterschiedliche PCR-Produkte (A und B). Wird im Anschluss an die PCR-Reaktion ein Denaturierungs- und Renaturierungsschritt durchgeführt, dann entstehen vier verschiedene doppelsträngige PCR-Produkte (AA, BB, AB, BA). Trennt man das Produkt-Gemisch in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel auf, dann zeigen die beiden Heteroduplexmoleküle aufgrund ihrer instabileren Basenpaarung ein anderes Laufverhalten und können im Idealfall von den beiden Homoduplexmolekülen unterschieden werden.

Gel-Ansatz:

- 15 ml Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (99:1, 40%)
- 12 ml Tris-Sulfat-Puffer
- 33 ml H₂O
- 400 µl APS (10%)
- 40 µl TEMED

Die Lösung wurde auf einen Gelträger mit eingelassenen Geltaschen gegossen und eine Stunde zur Polymerisation belassen. Zur Probenvorbereitung wurden die PCR-Produkte 5min bei 94°C denaturiert und 30min bei Raumtemperatur renaturiert. Nachdem das Polyacrylamidgel in die Elektrophoresekammer gelegt worden war, konnten

- 1,5 µl PCR-Produkt und
- 10 µl Ladepuffer

gemischt und in die Geltaschen pipettiert werden. Der Gellauf erfolgte drei Stunden bei 10°C und 5 Watt. Zum Anfärben der DNA-Banden wurde die Silberfärbung durchgeführt.

2.3.2.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung (Budowle et al., 1991) ermöglicht den Nachweis von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel

- 10 min in 10% Ethanol (250 ml EtOH / 2,5 l H₂O) fixiert,
- 3 min in 1% Salpetersäure oxidiert,
- in H₂O kurz gewaschen,
- 20 min in Silbernitrat-Lösung gefärbt,
- mit Natriumcarbonat-Paraformaldehyd-Lösung (Entwickler) entwickelt,
- mit 5% Essigsäure gestoppt,
- auf Whatman-Papier gelegt und mit Folie abgedeckt,
- eine Stunde bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.4. Restriktionsanalyse

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen eine bestimmte Basenabfolge in doppelsträngiger DNA und schneiden die DNA in der Regel an dieser Stelle. Ist eine Schnittstelle vorhanden, erhält man zwei

verkürzte DNA-Fragmente, wenn nicht, hat man das Ausgangsfragment vorliegend. Unterscheiden sich die beiden Allele bezüglich einer Schnittstelle (heterozygoter Zustand), so wird nur ein Allel gespalten. Die Analyse der Spaltprodukte ergibt dann neben dem Ausgangsprodukt auch die beiden Spaltprodukte.

Reaktionsansatz:

5 µl PCR-Produkt
1,5 µl 10x Puffer (enzymabhängig)
0,3 µl Enzym
5,2 µl H₂O

Nach einer Stunde bei 37°C (Nla IV, Mnl I) oder 60°C (BstN I) erfolgte die Analyse der Spaltprodukte nach Auftrennen in einem 2 %igen Agarose-Gel.

2.5. DNA-Sequenzierung

Zur direkten Sequenzierung eines bestimmten DNA-Bereiches wird dieser Abschnitt zunächst mittels PCR mit genomischer DNA als Vorlage spezifisch vermehrt. Als Startermoleküle der Amplifikation dienen in der Regel intronspezifische Oligonukleotide, die das Exon flankieren. Das resultierende PCR-Produkt wird von überschüssigen Startermolekülen und Nukleosidphosphaten abgetrennt und mit der Didesoxy-(Kettenabbruch-)Methode nach F. Sanger (1977) sequenziert. Zur Ermittlung der Sequenz wird eine Reaktion angesetzt, die neben einer hitzestabilen DNA-Polymerase, einem Sequenzierungs-Primer und den

vier 2'-Desoxynukleosid-Triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) auch geringe Mengen der vier 2'3'-Desoxynukleosid-Triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) enthält, und die wie eine PCR-Reaktion zur Anreicherung der Produkte zyklisch wiederholt wird. Den ddNTPs fehlt in der 3'-Position die Hydroxylgruppe, so dass sie zwar in den wachsenden Strang eingebaut werden, jedoch keine weitere Phosphodiesterbrücken mit nachfolgenden dNTPs ausbilden können. Es kommt somit zum Abbruch der DNA-Synthese. Da der Einbau dieser ddNTPs rein zufällig und damit statistisch verteilt erfolgt, entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die auf einem hoch auflösenden Gel aufgetrennt werden können. Da außerdem die vier ddNTPs mit vier verschiedenen Fluorophoren markiert und somit unterscheidbar sind, können auch alle neu-synthetisierten DNA-Stränge nach den vier Basen unterschieden werden. Der Nachweis der DNA erfolgt mittels Laser-Anregung; die dabei entstehenden Fluoreszenz-Signale werden detektiert und anschließend analysiert.

2.5.1. Aufreinigung von PCR-Produkten zur Direktsequenzierung

Startermoleküle (Oligonukleotide) und dNTPs aus der PCR-Reaktion stören die nachfolgende Sequenzreaktion und müssen daher vom PCR-Produkt abgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Aufreinigung eingesetzt:

2.5.1.1. Enzymatische Aufreinigung

Der „PCR Product Purification Kit“ von Amersham enthält zwei Enzyme: Exonuklease I zum Abbau der einzelsträngigen Startermoleküle und Alkalische Phosphatase zur Dephosphorylierung und somit Inaktivierung der dNTPs.

5 µl PCR-Produkt werden mit
1,5 µl Enzym-Mix für
15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Durch eine anschließende 15-minütige Inkubation bei 80°C werden die Enzyme hitzeinaktiviert.

2.5.1.2. Aufreinigung aus Agarosegelen

Im Falle, dass neben dem gewünschten PCR-Produkt Nebenbanden auftraten, wurden die Produkte nach der elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein mit Watte gefülltes 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Boden dieses Reaktionsgefäßes wurde durch Abschneiden der Spitze geöffnet und in ein zweites größeres Reaktionsgefäß (1,5 ml) gesetzt. Bei der anschließenden Zentrifugation (1min bei 13000 rpm) verbleibt die Agarose größtenteils in der Watte; die abgetrennte Lösung im 1,5 ml-Reaktionsgefäß enthält das PCR-Produkt. Zur weiteren Aufreinigung der DNA-Lösung wird diese auf ein Filterplättchen mit 0,2 µm – Poren (Millipore) aufgetropft und 30 Minuten gegen H₂O dialysiert.

2.5.2. Sequenzreaktion

Die Direktsequenzierung wurde nach der oben genannten Kettenabbruch-Methode mit dem „Big Dye V2.0“-Sequenzierkit der Firma Applied Bio Systems durchgeführt.

Reaktionsansatz:

- 1,5 – 5,0 µl gereinigtes PCR-Produkt *
- 2,0 µl 5xSequenzierpuffer
- 0,5 µl Big Dye
- H₂O ad 10 µl

* Die Menge wurde in Abhängigkeit von der Konzentration des ursprünglichen PCR-Produkts, der Größe des Produkts und der Art der Aufreinigung variiert.

Sequenzierprogramm:

	T (°C)	t (sec)
1. Denaturierung	96	120
3. Anhybridisierung	50	5
4. Elongation	60	120
5. Denaturierung	94	10
6. Kühlung	10	

Schritt drei bis fünf wurde 25mal wiederholt.

2.5.3. Sequenzanalyse

Die Analyse der Sequenzprodukte erfolgte im vollautomatischen Kapillar-Sequenzierer „ABI 310“ der Firma Applied Biosystems. Die Auswertung der Produkte erfolgte mittels des Computerprogramms CHROMAS (ABIView by David H. Klatt, Version 1.43), welches die Dateien vom automatischem Sequenzierer in die offizielle CF-Nummerierung formatiert (siehe Abb.6).

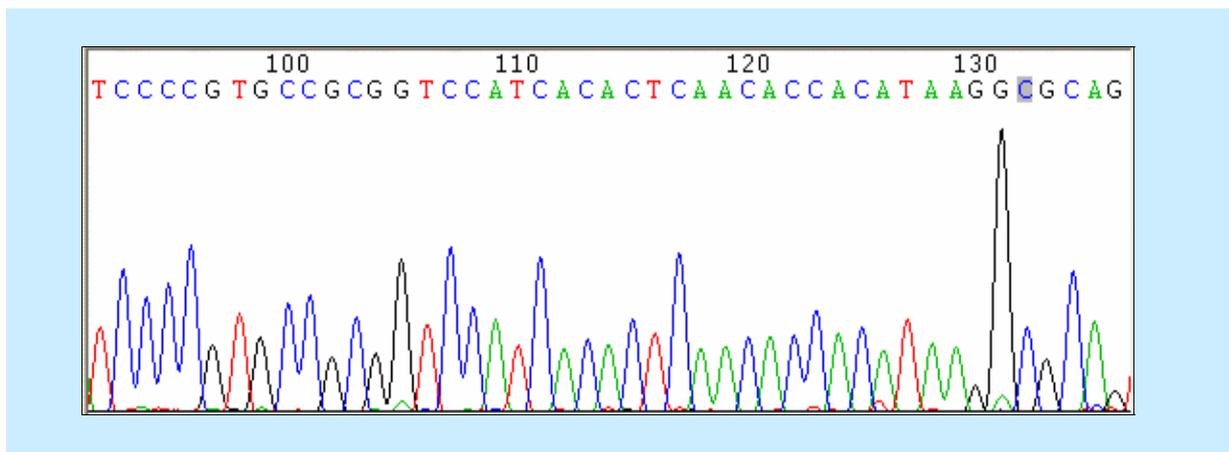


Abb. 6:

Chromas 1.43, Sequenzbild

2.6. Puffer und Lösungen (alphabetisch geordnet)

Acrylamid-Lösung, 40%, 99:1	99 g Acrylamid
	1 g Bisacrylamid
	ad 100 ml H ₂ O

APS, 10%	1g Ammoniumperoxidisulfat ad 10 ml H ₂ O
dNTPs, je 2,5 mM	12,5 µl dATP 100 mM 12,5 µl dCTP 100 mM 12,5 µl dGTP 10 mM 12,5 µl dTTP 100 mM H ₂ O ad 500 µl
Essigsäure, 5%	125 ml konz. CH ₃ COOH (Essigsäure) ad 2,5 l H ₂ O
EtBr-Lösung	0,5 mg Ethidiumbromid / ml H ₂ O
Ladepuffer (Agarosegel)	1x TE 30% Formamid 20% Ethylen-Glykol 0,025% Bromphenolblau
Natriumcarbonat- Paraformaldehyd-Lösung	148 g Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat) 0,925 g Paraformaldehyd ad 5 l H ₂ O
PCR-Puffer, 10x	500 mM KCl 100 mM Tris 15 mM MgCl ₂ 0,1% Gelatine 1% Triton X
Salpetersäure, 1%	38,5 ml HNO ₃ (Salpetersäure) ad 2,5 l H ₂ O

Silbernitrat-Lösung	5,05 g AgNO ₃ (Silbernitrat) ad 2,5 l H ₂ O
TBE-Puffer, 10x	1 M Tris-Borat 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCL 1 mM EDTA
Tris-Sulfat-Puffer	2,15 ml H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure) 45,4 g Tris-Base ad 1 l H ₂ O

2.7. Bezugsquellen der Chemikalien und Enzyme (alphabetisch)

Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat	Fluka
Bis-Acrylamid	BioRad
Bromphenolblau	Serva
Borsäure	Merck
dNTPs	Pharmacia
EDTA	Serva
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	Serva
Ethylenglykol	Sigma
Formamid	Sigma
Fragmentlängen-Standard (100bp)	MBI Fermentas

Gelatine	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Sigma
Oligonukleotide	Metabion
Paraformaldehyd	Merck
Phenol-Chloroform	Roth
Polyacrylamid	BioRad
Restriktionsenzyme (BSt NI, Mnl I, Nla IV)	NewEngland Biolabs
Salpetersäure	Merck
Schwefelsäure	Roth
Sequenzierkit (Big Dye V2.0)	Applied- Biosystems
Silbernitrat	Merck
Taq-DNA-Polymerase	BRL
TEMED (N,N,N'N'-Tetramethylethyldiamin)	BioRad
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck

2.8. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Elektrophorese-Kammern:

GNA200 (Agarose-Gel)

PharmaciaBiotech

Multiphor II (PAA-Gel)

PharmaciaBiotech

Netzgerät

EPS 3500

PharmaciaBiotech

Pipettierhilfen:

Pipetman P1000, P200, P20	Abimed
Reference	Eppendorf

Reaktionsgefäße:

0,2 ml	Eppendorf
0,5 ml	Eppendorf
1,5 ml	Sarstedt

Sequenziergerät:

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	AppliedBiosystems
--------------------------------	-------------------

Thermocycler:

Autogene II	Grant
GeneAmp PCR-System 9700	Perkin Elmer

2.9. Chi-Quadrat-Test (X^2 -Test)

	Spalte 1	Spalte 2	Zeilen- nummer
Zeile 1	n_{11}	n_{12}	$n_{1.}$
Zeile 2	n_{21}	n_{22}	$n_{2.}$
Spalten- summe	$n_{.1}$	$n_{.2}$	n

Abb. 7:

Allgemeine Vierfeldertafel

Für die statistische Auswertung der Allelhäufigkeiten und Allelverteilungen wurde der χ^2 -Test auf Unabhängigkeit zweier Merkmale, hier Allel H zu Allel S, angewendet. Es wurde geprüft, ob die Allelverteilung in den jeweils zwei zu vergleichenden Gruppen unterschiedlich ist. Die Statistik folgt einer χ^2 -Verteilung mit einem Freiheitsgrad. Für die allgemeine Vierfeldertafel (siehe Abb. 7) lautet die Prüfgröße des Tests:

$$\chi^2 = \frac{(n_{11} \times n_{22} - n_{12} \times n_{21})^2 \times n}{n_{1.} \times n_{2.} \times n_{.1} \times n_{.2}}$$

Null- und Alternativhypothese für den χ^2 -Test lauten:

H_0 : Beide Gruppen haben eine gleiche Verteilung ($p_1 = p_2$)

H_1 : Beide Gruppen haben eine ungleiche Verteilung ($p_1 \neq p_2$)

Als Signifikanzniveau, d. h. die obere Grenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler erster Art, wird $\alpha = 0.05$ festgelegt. Die Statistik folgt einer χ^2 -Verteilung mit $k = 1$ Freiheitsgrad. Daher wurden die Prüfgrößen mit dem Quantil $\chi^2_{(1;0,95)} = 3.84$ aus einer Tabelle des Institut für Biomathematik der Universität Münster verglichen (28). Ist die Prüfgröße nicht größer als das Quantil, kann die Nullhypothese nicht verworfen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Test auf häufige BRCA1-Mutationen in Proben von Frauen mit sporadischem Brustkrebs

Die Tumorproben von 32 Frauen aus der Gruppe „sporadischer Brustkrebs“ sollten durch Sequenzierung auf die zehn häufigsten Keimbahn-Mutationen im BRCA1-Gen getestet werden (8). Da solche Mutationen in sporadischen Fällen so gut wie auszuschließen sind, wäre ein positiver Nachweis zum einen ein Hinweis auf eine erbliche Form der Erkrankung. Zum anderen ist der Mutationsnachweis an sich ein Ausschlusskriterium für die Untersuchung, da ein Allel mit einer eindeutig pathogenen Mutation in jedem Fall ein prädisponierendes Allel darstellt.

Die 10 untersuchten Mutationen des BRCA1-Gens sind in Tabelle 1 zusammengefasst (die Beschreibung der Mutationen entspricht der in der BIC-Datenbank).

Tabelle 1:

Mutationen im BRCA1-Gen

Exon/ Exon- abschnitt	Nukleotid- Austausch	Effekt	Typ
5	c.300T>G	C61G	MS
11.04	c.1806C>T	Q318X	NS
11.07	c.2457C>T	Q780X	NS
11.12	c.3600del11	E1161fsX1163	FS
11.12	c.3604delA	D1162fsX1163	FS

Fortsetzung Tabelle 1:

11.13	c.3819del5	V1234fsX1241	FS
11.14	c.4184del4	N1355fsX1364	FS
12	c.4302C>T	Q1395X	NS
20	c.5382insC	Q1756fsX1829	FS
24	c.5622C>T	R1835X	NS

Abkürzungen: MS: „missense“ = Aminosäureaustausch-Mutation; FS: „frame shift“ = Mutation durch Leserasterverschiebung; NS: „nonsense“ = Stopp-Mutation. Die Aminosäuren sind im Einbasencode (IUPAC) angegeben, X steht für ein Stopp-Codon.

Der Mutationsnachweis erfolgte über PCR und direkte Sequenzierung des relevanten BRCA1-Genabschnitts. Nicht alle Tumor-DNA-Proben waren gleichermaßen gut analysierbar, so dass nicht alle Proben auf alle Mutationen hin untersucht werden konnten. Eine entsprechende Auflistung zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2:

Mutationsanalyse, sporadischer Brustkrebs

Mut. Pat.	c.300 T>G	c.1806 C>T	c.2457 C>T	c.3600 Δ11	c.3604 Δ4	c.3819 Δ5	c.4184 Δ4	c.4302 C>T	c.5382 insC	c.5622 C>T
305	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
306	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
307	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
309	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
773	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
1817	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
1825	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
1845	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2307	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2319	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2543	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Fortsetzung Tabelle 2:

2369	neg.									
1907	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
1911	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
1912	neg.									
1914	n.a.	neg.								
1918	n.a.	neg.								
1927	neg.									
2048	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	n.a.	n.a.	neg.
2049	n.a.	neg.	n.a.	neg.						
2050	neg.	n.a.	neg.							
2052	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
2053	n.a.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	neg.	n.a.	neg.
2064	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
2066	neg.									
2067	neg.									
2068	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
2069	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
2070	neg.									
2071	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2072	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.
2136	neg.									

Abkürzungen: neg.: Mutation ausgeschlossen; pos. : Mutation nachgewiesen; n.a.: nicht analysierbar

Eine der 32 Tumor-Proben – Nr. 2071 – war heterozygot für die häufige BRCA1-Mutation c.3604delA und wurde von den weiteren Analysen ausgeschlossen (siehe Abb. 8). Die Proben 1918 und 2049 ließen sich nicht erfolgreich amplifizieren und wurden von den weiteren Untersuchungen ebenfalls ausgeschlossen.

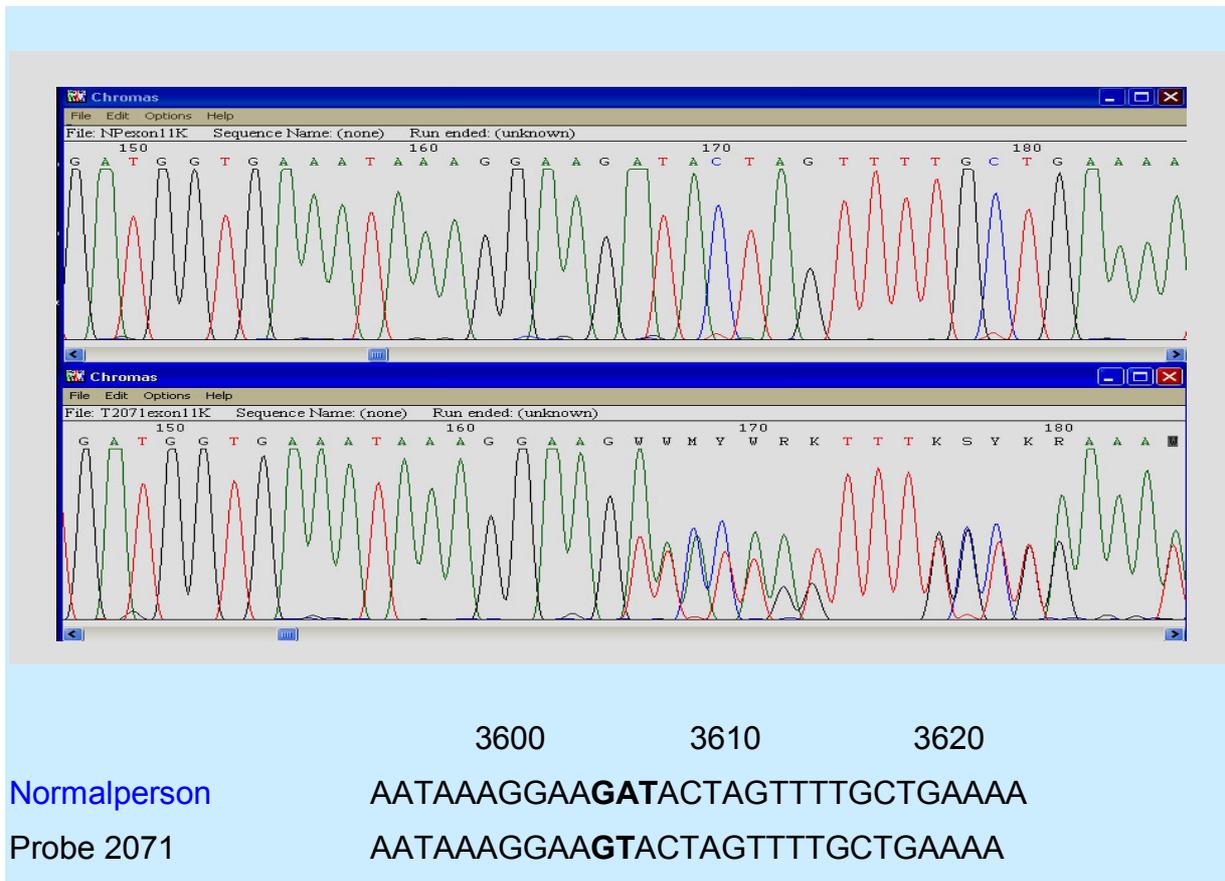


Abb. 8:
Sequenzabschnitt des Exonbereichs 11.12 (Normalperson und Probe 2071)

3.2. Nachweis von LOH in sporadischem Brustkrebs

Für die sporadischen Brustkrebsfälle standen jeweils Tumor- und Normalgewebe (z. B. aus Lymphknoten) zur Verfügung, was eine Untersuchung zum Nachweis/Ausschluss eines Allel-Verlusts ermöglichte. Dies erfolgte durch einen einfachen Test - die Haplotypanalyse zum Nachweis der Allel-Kombination an Nukleotid c.3667 – an den Proben, die im Normalgewebe heterozygot für diesen Polymorphismus waren. Von den zwölf Fällen, die im Normalgewebe heterozygot waren, zeigten sieben (~ 60%) im korrespondierenden

Tumorgewebe eine Homozygotie für den untersuchten Polymorphismus, so dass in diesen Fällen von einem Allelverlust ausgegangen werden kann, siehe Tabelle 3.

Tabelle 3:

LOH in sporadischem Brustkrebs

Heterozygot (H/S) getestetes Normalgewebe	Allele im Tumorgewebe
307	H/S
309	H
773	H/S
1825	S
1907	H
1912	H
2050	S
2052	H
2053	H/S
2066	H/S
2069	H
2136	H/S

3.3. Nachweis und Häufigkeit der beiden BRCA1-Haplotypen

Anhand von Amplifikation und Heteroduplexanalyse des Exonabschnitts 11.12 zum Nachweis der polymorphen Nukleotidposition c.3667 des BRCA1-Gens soll stellvertretend der vorliegende Haplotyp ermittelt werden. Eine Änderung an Nukleotid 3667 von Adenin nach Guanin bedingt den Aminosäuresaustausch Lysin nach Arginin in Codon 1183. Der Exonabschnitt 11.12 erstreckt sich von Nukleotid 3413 bis 3737 und wurde deshalb für diese Untersuchung ausgewählt, weil durch eine

einfache Heteroduplexanalyse (siehe Abb. 9) die drei möglichen Allel-Kombinationen an Nukleotid 3667 (homozygot H/H, homozygot S/S und heterozygot H/S) voneinander unterschieden werden können. Allel „H“ ist das häufigere 1183-Lysin und Allel „S“ das seltenere 1183-Arginin.



Abb. 9:

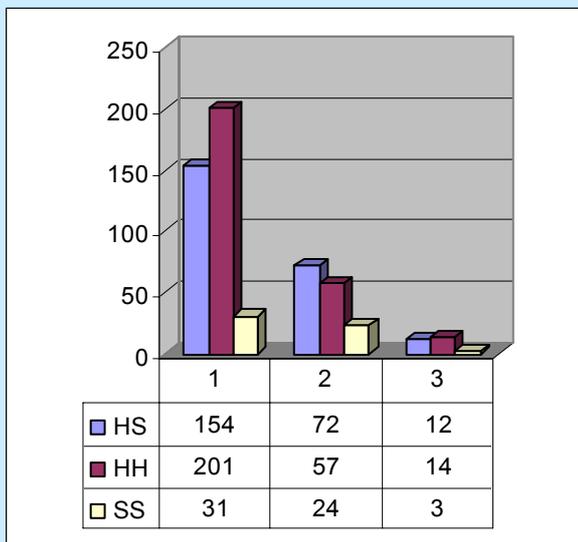
Heteroduplexbild, Exon 11.12

386 DNA-Proben von weiblichen Normalpersonen (Kontrollgruppe),
153 DNA-Proben von Frauen mit Brustkrebs aus BRCA-Risikofamilien
und 29 DNA-Proben von Frauen mit sporadischem Brustkrebs

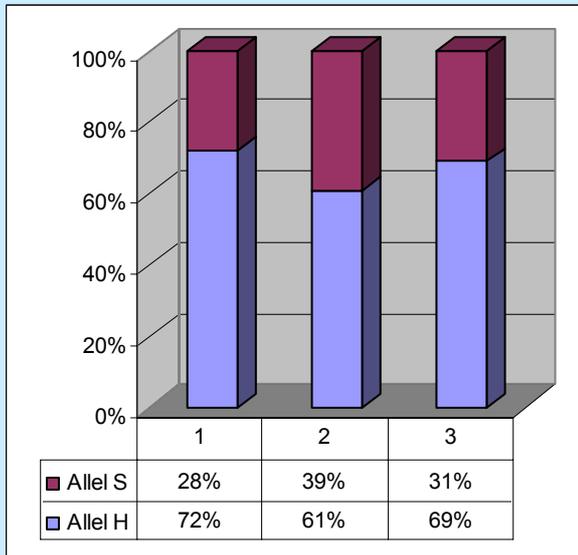
wurden auf das Vorliegen von Allel „H“ und „S“ hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Abbildung 10 zusammengefasst. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse enthält Kapitel 3.5.

Tabelle 4:
Allelverteilung

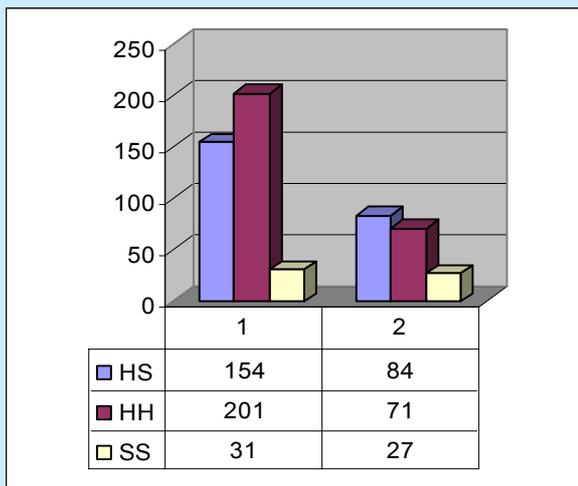
Patienten- gruppe	Anzahl (Allele)	Homozygot „H“	Homozygot „S“	Heterozygot „H/S“	H-Allele Gesamt (%)	S-Allele Gesamt (%)
Kontroll- patienten	386 (772)	201	31	154	556 (72 %)	216 (28 %)
Familiärer Brustkrebs	153 (306)	57	24	72	186 (61 %)	120 (39 %)
Sporadischer Brustkrebs	29 (58)	14	3	12	40 (69 %)	18 (31 %)
Brustkrebs- patienten (gesamt)	182 (364)	71	27	84	226 (62 %)	138 (38 %)



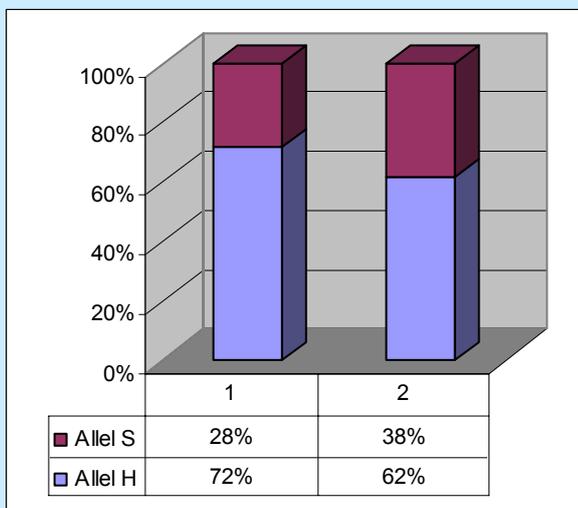
1: Kontrollgruppe
2: familiärer
Brustkrebs
3: sporadischer
Brustkrebs



1: Kontrollgruppe
 2: familiärer Brustkrebs
 3: sporadischer Brustkrebs



1: Kontrollgruppe
 2: Brustkrebsgruppe gesamt



1: Kontrollgruppe
 2: Brustkrebsgruppe gesamt

Abb. 10:

Allelverteilung und Allelhäufigkeit in den untersuchten Gruppen

3.4. Verifizierung der beiden BRCA1-Haplotypen

Um (rückwirkend) die Annahme von zwei Haupt-BRCA1-Haplotypen zu bestätigen, sollte die Kopplung an vier polymorphen Nukleotidpositionen verifiziert werden. Hierzu wurden im Anschluss an die Analyse von Polymorphismus c.3667 A/G die jeweils homozygot getesteten Personen auf die Polymorphismen c.3232 A>G, c.4410 T>C und c.4956 A>G hin untersucht. Hierfür standen insgesamt 147 Personen zur Verfügung, die an Position c.3667 homozygot für das häufigere Nukleotid Adenin waren (110 aus der Kontrollgruppe und 37 aus der Brustkrebsstudie) und 30 Personen, die an Position c.3667 homozygot für das seltenere Nukleotid Guanin waren (10 aus der Kontrollgruppe und 20 aus der Brustkrebsstudie).

Die relevanten Bereiche wurden mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und die Polymorphismen durch Restriktionsanalyse nachgewiesen. In allen drei untersuchten Fällen erfolgt eine Spaltung nur bei Vorliegen des selteneren Nukleotids.

Dabei zeigte sich in keiner der Proben eine Entkopplung bezüglich der oben genannten Polymorphismen. Die Annahme von zwei distinkten Haplotypen konnte somit bestätigt werden.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen (Enzyme):

Nla IV (GGNNCC) für Exonabschnitt 11.10:

Schnittstelle für Nukleotid 3232 A→G

Mnl I (CCTC>NNNNNN) für Exon 13:

Schnittstelle für Nukleotid 4410 T→C

BstN I (CCWGG) für Exon 16:

Schnittstelle für Nukleotid 4956 A→G

3.5. Statistische Auswertung

Anhand des χ^2 -Testes (siehe Kapitel 2.9.) wurden die Verteilungen statistisch berechnet. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Allele „H“ und „S“. In der Gruppe aller Brustkrebspatientinnen liegt im Vergleich zu der Kontrollgruppe das seltenere Allel „S“ signifikant häufiger vor: $\chi^2= 10,91$, $p= 0.00095$ (siehe Abb. 11). Wird die Gruppe des familiären und sporadischen Brustkrebs separat betrachtet, so ist Allel „S“ in der Gruppe des familiären Brustkrebs signifikant höher, $\chi^2= 12,37$, $p= 0,00043$, als in der Kontrollgruppe. Die Allelverteilung in der Gruppe der sporadischen Karzinome zeigt keinen Unterschied zu der Allelverteilung in der Kontrollgruppe, $\chi^2= 0,12$, $p= 0,72$. Allerdings ist hierbei die Fallzahl von $n= 29$ zu gering, um eine statistisch signifikante Aussage machen zu können.

*	Zielereignis - nein	Zielereignis - ja	Summe
Risiko Faktor - ja bzw. Test positiv	216	138	354
Risikofaktor - nein bzw. Test negativ	556	226	782
Summe	772	364	1136

Chi-Quadrat ohne Yates-Korrektur	FG	p-Wert
11.37710	1	0.00074
Chi-Quadrat mit Yates-Korrektur	FG	p-Wert
10.91877	1	0.00095

Exakter Fisher-Test	p-Wert
0.00097	

Statistik	Wert	95% KI unten	95% KI oben
Odds Ratio	1.57178	1.19695	2.06385
Relatives Risiko	1.34888	1.12848	1.60373
Pos. präd. Wert	0.38983	0.33872	0.44280
Neg. präd. Wert	0.71100	0.67783	0.74256
Sensitivität	0.37912	0.32907	0.43116
Spezifität	0.72021	0.68709	0.75163

Abb. 11:

Vierfeldertafel-Analyse nach JUMBO (28)

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 153 Proben von Frauen mit Brustkrebs aus Risikofamilien, 32 Proben von Frauen mit sporadischem Brustkrebs und 386 Proben von Frauen einer Kontrollgruppe molekulargenetisch untersucht.

In einer der 30 Proben von Frauen mit sporadischem Brustkrebs, die auf zehn häufige Mutationen im BRCA1-Gen getestet wurden, wurde die Leseraster-Mutation c.3604delA im Exonabschnitt 11.12, Codon 1162, ermittelt. Sie führt durch Deletion eines Adenins zu einem Stopp-Codon in Position 1209, also zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese und somit zu einem verkürzten Proteinprodukt. Da hereditäre Formen etwa 5% der Brustkrebsfälle ausmachen (34),

entspricht der Nachweis von einer Keimbahnmutation im BRCA1-Gen bei 30 untersuchten Tumoren den rechnerischen Erwartungen. Ohne Kenntnis über die Familiengeschichte dieser Patientin, die möglicherweise eine eindeutig hereditäre Form der Erkrankung erkennen lässt, muss aber auch bedacht werden, dass aufgrund des unterschiedlichen Erkrankungsalters, unvollständiger Penetranz und der Vererbung über die väterliche Linie eine hereditäre Form nicht immer klar erkennbar ist. Die sporadischen Brustkrebsfälle wurden des Weiteren auf Allel-Verlust, Loss of Heterozygosity (LOH), an Nukleotid 3667 untersucht. Von den 12 Fällen, die im Normalgewebe heterozygot waren, zeigten sieben (~60%) im korrespondierenden Tumorgewebe eine Homozygotie für den untersuchten Polymorphismus. Der häufige LOH-Nachweis von ~60% ist mit den Zahlen aus der Literatur vergleichbar. Ein LOH im BRCA1 und BRCA2-Gen wird in der Literatur für 20% bis 70% der sporadischen Brustkrebsfälle beschrieben (19, 49, 57). Dies bestärkt die Annahme, dass die BRCA-Gene auch in der Tumorgenese des sporadischen Brustkrebses involviert sind.

In der Gruppe der Frauen mit Brustkrebs aus der BRCA-Studie zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der beiden BRCA1-Allele im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Änderung des Nukleotid 3667 von Adenin nach Guanin bedingt einen Aminosäureaustausch von Lysin (AAA) nach Arginin (AGA) im Codon 1183. Das Allel Lysin (K) 1183 ist stets mit den Aminosäuren Prolin (P) 871, Glutaminsäure (E) 1038 und Serin (S) 1613 gekoppelt, während das Allel Arginin (R) 1183 mit den Aminosäuren Leucin (C) 871, Glycin (G) 1038 und Glycin (G) 1613 den zweiten Haplotyp bildet. Somit entstehen zwei Protein-Isoformen, die als „H“ und „S“ bezeichnet wurden. Durch die Restriktionsanalyse wurde das Vorliegen dieser zwei Haplotypen bestätigt. Die Isoform „H“ kommt in der Gruppe der Risikofamilien signifikant seltener vor. Somit korreliert die seltenere Isoform „S“ mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko. Dieser Effekt

könnte zum einen darauf beruhen, dass die beiden Isoformen aufgrund der Aminosäurevariationen funktionelle Unterschiede aufweisen. Zum anderen könnten die Unterschiede in der DNA-Sequenz auch einen Einfluss auf die Expression haben, der Effekt also durch eine schwächere Expression des selteneren Allels bedingt sein. Der Einfluss von seltenen Aminosäurevariationen auf die Expression verschiedener Krebs-Prädispositionsgene wie BRCA1 und MLH1 wurde durch Sharp et al. 2004 beschrieben („RNA analysis Reveals Splicing Mutations and Loss of Expression Defects in MLH1 and BRCA1“ Human Mutation, Mutation in Brief#738). Eine Untersuchung zur Bestätigung einer verminderten Expression kann zum Beispiel durch eine vergleichende quantitative Analyse der BRCA1-mRNA erfolgen. Derzeit werden weitergehende Untersuchungen zur Haplotypverteilung und Expressivität an einem größeren Patienten- und Kontrollkollektiv durchgeführt. Sollte sich bestätigen, dass die seltenere Isoform – möglicherweise aufgrund verminderter Expression – mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko korreliert, so wäre dies in Bezug auf klinische Vorsorge und genetische Beratung von Frauen von erheblicher Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der von der deutschen Krebshilfe geförderten multizentrischen Studie „Familiärer Brust- und Eierstockkrebs“ wurden Kompletanalysen der BRCA1 und BRCA2-Gene durchgeführt. In den Untersuchungen zeigte sich ein Vorherrschen von zwei BRCA1-Allelen, wobei eines häufiger (~2/3, Allel „H“) und eines seltener (~1/3, Allel „S“) vorlag. Diese beiden Haplotypen kommen in der Bevölkerung in ähnlichen Verteilungsmustern vor. Allerdings ergaben die Münsteraner Daten Hinweise darauf, dass der prozentuale Anteil der beiden Allele zwischen Brustkrebspatientinnen und Kontrollpersonen Unterschiede aufweist, eine Beobachtung, die durch die hier durchgeführten Untersuchungen verifiziert werden sollte.

Die Ermittlung der vorliegenden BRCA1-Haplotypen erfolgte durch Untersuchung einer der vier Nukleotidpositionen im BRCA1-Gen, die zu den Aminosäure-Polymorphismen führen. Durch Amplifikation und Heteroduplexanalyse von Exonabschnitt 11.12 wurde die Allelhäufigkeit und Verteilung für das Nukleotid 3667 bestimmt. Dafür wurden 153 Proben von Frauen mit familiärem Brustkrebs, 30 Proben von Frauen mit sporadischem Brustkrebs und 386 Proben von Frauen einer Vergleichsgruppe untersucht. Eine Änderung des Nukleotid 3667 von Adenin nach Guanin bedingt den Aminosäureaustausch von Lysin nach Arginin im Codon 1183. Somit entstehen zwei Protein-Isoformen, die als Allel H (1183-Lys) und Allel S (1183-Arg) bezeichnet wurden. Das Vorliegen dieser zwei BRCA1-Haplotypen wurde durch die Restriktionsanalyse der homozygot getesteten Personen bestätigt.

Die 30 Proben von Frauen mit sporadischem Brustkrebs wurden auf zehn häufige BRCA1-Mutationen getestet, die häufig als Keimbahnmutationen nachgewiesen werden. Durch DNA-Sequenzierung

wurde in einer Probe die Leseraster-Mutation c.3604delA in Exon 11.12, Codon 1162, nachgewiesen. Da ein Allel mit einer solchen Mutation auf jeden Fall ein prädisponierendes Allel darstellt, wurde diese Probe von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Die 153 Proben von Frauen mit Brustkrebsrisiko waren bereits negativ auf das Vorliegen von Mutationen im BRCA1-Gen hin untersucht worden.

Die Häufigkeit und Verteilung der beiden BRCA1-Haplotypen in der Gruppe familiärer Brustkrebs und in der Gruppe sporadischer Brustkrebs wurde mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Allelverteilung in der Gruppe von Frauen mit sporadischem Brustkrebs zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($X^2=0,12$); allerdings ist die Fallzahl von 29 Proben für eine statistische Auswertung eigentlich zu klein. In der Gruppe der Risikofamilien zeigte sich dagegen ein signifikanter Unterschied in der Haplotypverteilung im Vergleich zu der Kontrollgruppe: die seltenere BRCA1-Isoform kommt in der Gruppe der Risikofamilien signifikant häufiger vor ($X^2=12,37$). Demnach korreliert die seltenere Isoform mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko, was tatsächlich auf einen funktionellen Unterschied der beiden Protein-Isoformen, zum Beispiel hinsichtlich der Effektivität der Reparatur von DNA-Schäden, beruhen könnte.

6. Literaturverzeichnis

alphabetisch geordnet

- 1 Aziz, S. et al., A genetic epidemiological study of carcinoma of the fallopian tube, *Gynecol Oncol* 80: 339, 2001
- 2 Beckmann MW et al., Hochrisikofamilien mit Mamma- und Ovarialcarcinomen, *Dt Ärztebl* 1997; 94: A-161-167, Heft 4
- 3 Bienstock, R. J. et al., Molecular modeling of the amino-terminal zinc ring domain of BRCA1. *Cancer Res.* 56: 2539-2545, 1996
- 4 Brzovic PS et al., Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 May 13; 100 (10). 5646-51. Epub 2003 May 5
- 5 Chapman, M. S. et al., Transcriptional activation by BRCA1, *Nature* 382: 678-967, 1996
- 6 Chen, Y. et al., BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner, *Cancer Res.* 56: 3168-3172, 1996
- 7 Claus, E. B. et al., Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study, *Am. J. Hum. Genet.* 48: 232-242, 1991
- 8 Couch FJ, et al., Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene, *Human Mutation* 8: 8-18, 1996
- 9 Deutsche Krebshilfe, "Familiärer Brust- und Eierstockkrebs", Bonn
- 10 Dunning, A. M. et al., Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population, *Hum. Molec. Genet.* 6: 285-289, 1997
- 11 Egan, K.M. et al., Jewish religion and risk of breast cancer, *Lancet* 347: 1645-1646, 1996
- 12 Eisen A et al., Reduction in breast cancer risk following bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers, *Am. J. Hum. Genet.* 67: 58, 2000

- 13 Fitzgerald, M. G. et al., Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer, *New Eng. J. Med.* 334: 143-149, 1996
- 14 Ford, D. et al., Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families, *Am. J. Hum. Genet.* 62: 676-689, 1998
- 15 Ford, D. et al., Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast cancer incidence. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 1457-1462, 1995
- 16 Ford, D. et al., Risks of cancer in BRCA1 mutation carriers, *Breast Cancer Linkage Consortium, Lancet* 343: 692-695, 1994
- 17 Friedmann, L. S. et al., Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families, *Nature Genet.* 8:399-404, 1994
- 18 Friedmann, L. S. et al., Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish families, *Am. J. Hum. Genet.* 57: 1284-1297, 1995
- 19 Futreal PA et al., BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 266: 120-122, 1994
- 20 Ganguly A et al., Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double stranded PCR products and DNA fragments, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10325-10329, 1993
- 21 Gayther, S. A. et al., Rapid detection of regionally clustered germ-line BRCA1 mutations by multiplex heteroduplex analysis, *Am. J. Hum. Genet.* 58: 451-456, 1996
- 22 Hall, J. M. et al., Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21, *Science* 250: 1684-1689, 1990
- 23 Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1633-7

- 24 Hashizume et al. 2001. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. J Biol Chem. 2001 May 4;276(18):14537-40. Epub 2001 Mar 6.
- 25 Hogervorst, F. B. L. et al., Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test, Nature Genet. 10: 208-212, 1995
- 26 Holt, J. T. et al., Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1, Nature Genet. 12: 298-302, 1996
- 27 Inoue, R. et al., Germline mutation of BRCA1 in Japanese breast cancer families, Cancer Res. 55: 3521-3524, 1995
- 28 Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik (IMIB) der WWU Münster, Prof. W. Köpcke, Übungen zur medizinischen Biometrie, 8. Spezielle Testverfahren, Tabelle 8.8: Quantile $X^2_{f;1-\alpha}$ der X^2_f -Verteilung mit f Freiheitsgraden, WS 1997/98;
Java-unterstützte Münsteraner Biometrie-Oberfläche (JUMBO),
<http://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skripte/biomathe/bio/vierf.html>;
- 29 Jensen, D. E. et al., A novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1 mediated cell growth suppression, Oncogene 16: 1097-1112, 1998
- 30 Jin, Y. et al., Cell cycle dependent colocalization of BARD1 and BRCA1 proteins in discrete nuclear domains, Proc. Nat. Acad. Sci USA 94: 12075-12080, 1997
- 31 Knudson, A. G. et al., Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 820-823, 1971
- 32 Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Auflage, Saarbrücken, 2002
- 33 Lancaster, J. M. et al., BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. Nat. Genet. 13: 238-240, 1996

- 34 Langston, A. A. et al., BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer, *New Eng. J. Med.* 334: 137-142, 1996
- 35 Lovering, R. et al., Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 2112-2116, 1993
- 36 Lynch, H. T. et al., Genetic predisposition to breast cancer, *Cancer* 53, 1984
- 37 Mashal RD et al., Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases, *Nature Genet* 9: 177-183, 1995
- 38 Meindl A and the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer: Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. *Int J Cancer* 97: 472-480, 2002
- 39 Miki, Y. et al., A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, *Science* 266: 66-71, 1994
- 40 Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*. 2006 Sep 25; 25 (43): 5854-63.
- 41 Narod, S. A. et al., Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23, *Lancet* 338: 82-83, 1991
- 42 National Human Genome Research Institute, Breast Cancer Information Core, BRCA1 Mutation Database, last modified 14-Aug-2002, http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/
- 43 Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM Gene map, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 44 Orita et al., Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the PCR, *Genomics* 5: 874-879, 1989
- 45 Ouchi, T. et al., BRCA1 regulates p53 dependent gene expression, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 2302-2306, 1998

- 46 Plummer SJ et al., Detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test, *Hum Mol Genet* 4:1989-1992, 1995
- 47 Rebbeck, T. R. et al., Genetic heterogeneity in hereditary breast cancer: role of BRCA-1 and BRCA-2. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 547-553, 1996
- 48 Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT et al., Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA3 mutation carriers: the PROSE Study Group. *J Clin Oncol.* 2004 Mar 15; 22 (6): 1055-62. Epub 2004 Feb 23.
- 49 Rio PG et al., Loss of heterozygosity of BRCA1, BRCA2 and ATM genes in sporadic invasive ductal breast carcinoma. *Int J Oncol* 13: 849-853, 1998
- 50 Scully, R. et al., BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94: 5605-5610, 1997
- 51 Serova, O. et al., A high incidence of BRCA1 mutations in 20 breast-ovarian cancer families, *Am. J. Hum. Genet.* 58: 42-51, 1996
- 52 Simard, J. et al., Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families, *Nature Genet.* 8: 392-398, 1994
- 53 Simons AM et al., BRCA1 DNA-binding activity is stimulated by BARD1. *Cancer Res.* 2006 Feb 15; 66(4): 2012-8
- 54 Smith, S.A. et al., Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome, *Nature Genet.* 2: 128-131, 1992
- 55 Thompson, M.E. et al., Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast progression, *Nature Genet.* 9: 444-450, 1995
- 56 Thorlacius S, Tryggvadottir L, Olafsdottir GH, et al.: Linkage to BRCA2 region in hereditary male breast cancer. *Lancet* 346 (8974): 544-5, 1995
- 57 Tong D et al., Loss of heterozygosity (LOH) at p53 is correlated with LOH at BRCA1 and BRCA2 in various human malignant tumors. *Int J Cancer* 88: 319-322, 2000

- 58 Weber, B.H.F. et al., A somatic truncating mutation in BRCA2 in a sporadic breast tumor, *Am. J. Hum. Genet.* 59: 962-964, 1996
- 59 Weber, B. L. et al., Ovarian cancer risk reduction after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers, *Am. J. Hum. Genet.* 67: 59, 2000
- 60 Williams RS et al., Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Jun; 11(6): 519-25. Epub 2004 May 9.
- 61 Wooster, R. et al., Localisation of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13, *Science* 265: 2088-2090, 1994
- 62 Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004 Nov; 95(11): 866-71.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Horst danke ich für die Bereitstellung des Laborplatzes und für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. S. Preisler-Adams gilt mein ganz besonderer Dank für die Betreuung dieser Arbeit. Nur durch Ihre motivierenden Anregungen, hilfreichen fachlichen Diskussionen und Ihrer ständigen Bereitschaft und Geduld war diese Arbeit zu realisieren. Dankeschön Sabine.

Bei allen Mitarbeitern aus dem DNA-Labor am Institut für Humangenetik der Universität Münster bedanke ich mich für die nette Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich jederzeit unterstützt und ermutigt haben, möchte ich ganz herzlich danken.