

# **Analyse der Promotorregulation und des Effekts humaner genetischer Varianten auf die Expression der DNA-Glykosylase MUTYH**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie und Chemie (FB 08)  
der Justus-Liebig-Universität  
Giessen

vorgelegt von  
Nicole Köger

Frankfurt am Main, 2017

Die vorliegende Arbeit wurde am Biomedizinischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik 1 am Universitätsklinikum der Goethe-Universität in Frankfurt am Main in der Zeit von Oktober 2013 bis Dezember 2017 unter Leitung von PD Dr. Guido Plotz angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann  
Institut für Botanik  
Justus-Liebig-Universität Giessen  
Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Giessen

Erstgutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann  
Institut für Genetik  
Justus-Liebig-Universität Giessen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen

Zweitgutachter: PD Dr. Guido Plotz  
Medizinische Klinik 1  
Universitätsklinikum der Goethe-Universität Frankfurt  
Theodor-Stern-Kai 7, 60596 Frankfurt am Main

Datum der Dissertation:

**„Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.“**

Franz Kafka

## INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis und Tabellen .....	vii
Abkürzungsverzeichnis.....	ix
ZUSAMMENFASSUNG.....	xiii
SUMMARY .....	xv
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DNA-Reparatur .....	1
1.2 Basenexzisionsreparatur (BER) .....	2
1.3 Die Adenin-DNA-Glykosylase MUTYH und deren Rolle bei oxidativen DNA-Schäden .	5
1.4 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von MutY und MUTYH .....	9
1.5 MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP) und die Entstehung von kolorektalen Karzinomen 12	
1.6 Problemstellung und Zielsetzung des Projekts.....	15
1.6.1 Transkriptionsregulation von <i>MUTYH</i> .....	15
1.6.2 Einordnung unklarer genetischer Varianten von <i>MUTYH</i> .....	16
2 MATERIAL UND METHODEN .....	18
2.1 Material .....	18
2.1.1 Bakterienstämme .....	18
2.1.2 Humane Zelllinien.....	18
2.1.3 Zugriffsnummern der verwendeten MUTYH-Isoform-Sequenzen (NCBI) .....	19
2.1.4 Geräte und Materialien .....	19
2.1.5 Lösungen, Substanzen und Puffer.....	20
2.1.6 Antikörper und Enzyme .....	21
2.1.7 Längenstandards.....	23
2.1.8 Oligonukleotide.....	23
2.1.9 Plasmide.....	27
2.1.10 Software und Programme .....	30
2.1.11 Datenbanken .....	31
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Zellkultur .....	32
2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	32
2.2.3 Transiente Transfektion mit PEI (Polyethylenimin) .....	33
2.2.4 5-Aza-2'-Desoxycytidin-Behandlung .....	33

2.2.5	Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) .....	34
2.2.6	Fluoreszenzmikroskopie .....	34
2.2.7	DNA-Isolation aus kultivierten PBMC und Zelllinien .....	34
2.2.8	<i>In vitro</i> DNA-Methylierung .....	34
2.2.9	Bisulfit-Behandlung der DNA.....	35
2.2.10	Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )-Behandlung von Zellen .....	36
2.2.11	RNA-Isolation .....	36
2.2.12	DNase-Behandlung der RNA .....	37
2.2.13	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.14	Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	38
2.2.15	PCR für die Konstruktion des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigens .....	38
2.2.16	Test-PCR auf Transkription/Spleißen des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigens .....	39
2.2.17	Mutagenese-PCR .....	40
2.2.18	Ethanolpräzipitation zur Aufkonzentrierung von PCR-Produkten .....	41
2.2.19	Reverse Transkription (RT) .....	41
2.2.20	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR).....	42
2.2.21	Sequenz-PCR und Sequenzierung .....	43
2.2.22	Agarose-Gelelektrophorese .....	44
2.2.23	Isolation von nativem Gesamtproteinextrakt aus Zelllinien .....	45
2.2.24	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	46
2.2.25	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen .....	46
2.2.26	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	46
2.2.27	Proteindetektion: Western Blot.....	47
2.2.28	Transformation in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	49
2.2.29	Animpfen von Übernachtskulturen .....	49
2.2.30	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	49
2.2.31	Anfertigung von <i>E. coli</i> Glycerolstocks .....	49
2.2.32	Klonierungsstrategie zur Konstruktion des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigens .....	50
2.2.33	Klenow <i>blunting</i> und Ligation .....	52
2.2.34	Oligoduplexherstellung .....	52
2.2.35	TOPO-Vektor Ligation und Transformation in kompetente TOP10 <i>E. coli</i> .....	53
2.2.36	Kontrollrestriktion und präparative Restriktion .....	53
2.2.37	Gelextraktion .....	54
2.2.38	Ligation .....	54
2.2.39	Einfügen einer Markierung in das <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigen.....	55
2.2.40	Erweitertes <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigen mit <i>TOE1</i> .....	55
2.2.41	Zusammenfassung des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigen-Assays .....	56
2.2.42	<i>In silico</i> Analysen.....	57
2.2.43	Erstellung eines Homologiemodells von <i>MUTYH</i> .....	58

2.2.44	Statistik: Prüfung auf Signifikanz.....	59
3	ERGEBNISSE.....	60
3.1	Generierung des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigenmodells.....	60
3.2	Überprüfung epigenetischer DNA-Methylierungen und deren Rolle bei der <i>MUTYH</i> - Transkription.....	64
3.3	Untersuchung der Auswirkungen von genetischen Promotor-veränderungen auf die <i>MUTYH</i> -Transkription.....	69
3.4	Ermittlung der Effekte des Transkriptionsfaktors Sp1 auf die <i>MUTYH</i> -Transkription...73	
3.5	Analyse des Einflusses des Transkriptionsfaktors p53 auf die <i>MUTYH</i> -Transkription .76	
3.6	Auswirkung oxidativer Zellschäden auf die <i>MUTYH</i> -Expression und -Transkription....78	
3.7	Analyse der Proteinstabilität von <i>MUTYH</i> -Patientenvarianten .....	82
3.7.1	Homologiemodell von <i>MUTYH</i> und Klassifizierung der untersuchten Patientenvarianten .....	85
4	DISKUSSION.....	91
4.1	Transkriptionsregulation von <i>MUTYH</i> .....	91
4.1.1	Die CpG-Insel von <i>MUTYH</i> im ersten Exon ist nicht methyliert .....	91
4.1.2	Das <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigen als Modell für die Analyse von genetischen Veränderungen.....	93
4.1.3	Ein M4-Motiv, ein BRE-Element und eine GC-Box beeinflussen die <i>MUTYH</i> - Transkription.....	94
4.1.4	Der Transkriptionsfaktor Sp1 beeinflusst die <i>MUTYH</i> -Transkription nicht über die GC- Box .....	97
4.1.5	Keine direkte Regulation von <i>MUTYH</i> durch das Tumorsuppressor-protein p53.....	98
4.1.6	<i>MUTYH</i> nicht direkt durch oxidativen Stress induzierbar.....	100
4.2	Klassifizierung unklarer genetischer Varianten von <i>MUTYH</i> .....	101
4.2.1	Korrelation der klassifizierten Varianten mit dem klinischen Phänotyp.....	102
4.3	Ausblick.....	111
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
6	ANHANG.....	132
	Erklärung.....	135
	Publikationen.....	136
	Posterpräsentationen auf Fachkonferenzen .....	137
	Danksagung .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abbildungsverzeichnis und Tabellen

Abbildung 1.1: DNA-Schäden, Reparaturmechanismen und deren Konsequenzen.....	2
Abbildung 1.2: Mechanismus der Basenexzisionsreparatur.....	4
Abbildung 1.3: Struktur von 8-oxoG und mögliche Basenpaarung.....	6
Abbildung 1.4: Anordnung der Gene <i>MUTYH</i> und <i>TOE1</i> .....	7
Abbildung 1.5: Basenexzisionsreparaturweg von 8-oxoG.....	8
Abbildung 1.6: <i>Bacillus stearothermophilus</i> MutY-DNA-Komplex. ....	10
Abbildung 1.7: Struktur des <i>MUTYH</i> -Gens und die Verwendung der drei alternativen ersten Exons. ....	16
Abbildung 2.1: Chemischer Ablauf der Bisulfit-Reaktion.....	36
Abbildung 2.2: Der Invitrogen-Vektor pcDNA3.....	50
Abbildung 2.3: Experimenteller Ablauf des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigen-Assays.....	57
Abbildung 3.1: Annotierte maßstabgerechte Darstellung der drei in das Minigen klonierten genetischen Fragmente von <i>MUTYH</i> und überlappenden <i>TOE1</i> .....	61
Abbildung 3.2: Das <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigen unterstützt sowohl Transkription als auch Spleißen aller drei alternativen ersten Exons.....	62
Abbildung 3.3: Erhöhte Expression des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigens im Vergleich zum endogenen <i>MUTYH</i> -Gen. ....	62
Abbildung 3.4: Verifikation der Funktionalität des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigens mittels Sequenzierung.....	63
Abbildung 3.5: Konsequenz der <i>in vitro</i> DNA-Methylierung des <i>MUTYH</i> -Promotor-Minigens auf die <i>MUTYH</i> -Transkription.....	65
Abbildung 3.6: Effekt der Aza-Behandlung verschiedener Zelllinien auf die <i>MUTYH</i> -Expression.....	66
Abbildung 3.7: Wirkung der Aza-Behandlung unterschiedlicher Zelllinien auf die <i>MUTYH</i> - und <i>MLH1</i> -Transkription. ....	67
Abbildung 3.8: Konservierung des Promotorbereichs und der ersten Exons von <i>MUTYH</i> sowie Position der untersuchten Varianten. ....	69
Abbildung 3.9: Auswirkungen der Inaktivierung konservierter DNA-Elemente auf die <i>MUTYH</i> -AFE-Transkription.....	71
Abbildung 3.10: Effekt von Patientenvarianten auf die <i>MUTYH</i> -AFE-Transkription.....	72
Abbildung 3.11: <i>MUTYH</i> -Promotorsequenz.....	73
Abbildung 3.12: Effekt der Sp1-Überexpression auf die <i>MUTYH</i> -Transkription. ....	74
Abbildung 3.13: Einfluss des Transkriptionsfaktors Sp1 auf die Minigenvariante 10a. ....	75
Abbildung 3.14: Auswirkung von Sp1 auf die <i>TOE1</i> -Transkription.....	76
Abbildung 3.15: Konsequenz der p53-Überexpression auf die (A, B) <i>MUTYH</i> -, (C) <i>TOE1</i> - und (D) <i>p21</i> -Transkription sowie (E) <i>MUTYH</i> -Expression. ....	77

Abbildung 3.16: Effekt der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Behandlung von HEK293-Zellen auf die (A) MUTYH, p53 und (B) OGG1 Expression. ....	79
Abbildung 3.17: Auswirkung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Behandlung von HEK293-Zellen auf die (A) <i>MUTYH</i> - und (B) <i>p21</i> -Transkription. ....	80
Abbildung 3.18: Einfluss der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Behandlung von HeLa-Zellen auf die (A) <i>MUTYH</i> -, p53- und OGG1-Expression sowie (B) <i>p21</i> - und (C) <i>MUTYH</i> -Transkription. ....	81
Abbildung 3.19: Verteilung der analysierten Varianten über das <i>MUTYH</i> -Protein. ....	82
Abbildung 3.20: <i>MUTYH</i> -Expression der untersuchten Patientenvarianten. ....	84
Abbildung 3.21: <i>MUTYH</i> -Transkription ausgewählter Patientenvarianten. ....	85
Abbildung 3.22: Struktur des <i>MUTYH</i> -Proteins gebunden an DNA-Doppelhelix mit ausgeklappter Adenin-Base und gekennzeichneten Varianten. ....	86
Tabelle 3.1: Zusammenfassung der DNA-Methylierung von <i>MUTYH</i> in unterschiedlichen Zelllinien und Kontroll-Lymphozyten. ....	68
Tabelle 3.2: Einordnung der Pathogenität der <i>MUTYH</i> -Varianten. ....	88

---

## Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

8-oxoG, OG	7,8-Dihydro-8-Oxoguanin
A	Adenin
AAG	Alkyladenin-DNA-Glykosylase
ADP	Adenosindiphosphat
AFAP	Attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis
AFE	Alternative erste Exons ( <i>alternative first exons</i> )
AP	apurinisch/apyrimidinisch
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APE1	AP-Endonuklease 1
Aqua dest.	Destilliertes Wasser ( <i>aqua destillata</i> )
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Aza	5-Aza-2'-desoxycytidin
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar
BRE	Transkriptionsfaktor-IIIB-Erkennungselement ( <i>TFIIB recognition element</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
BS-DNA	Bisulfit behandelte DNA
C	Cytosin
Cas9	<i>CRISPR-associated-protein 9</i>
CDKN1A/p21	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
CMV	Cytomegalovirus
CRC	Kolorektales Karzinom ( <i>colorectal cancer</i> )
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
ddNTPs	2', 3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dGMP	Desoxyguanosinmonophosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

DPE	<i>downstream promoter element</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EJ	<i>end joining</i>
f	Faktor
FAM	6-Carboxyfluorescein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FEN1	<i>flap structure-specific endonuclease 1</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G1	<i>gap 1</i> Phase des Zellzyklus
G2	<i>gap 2</i> Phase des Zellzyklus
gDNA	Genomische DNA
GsP	Gen-spezifische Primer
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HhH	<i>helix-hairpin-helix</i>
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom ( <i>hereditary nonpolyposis colon cancer</i> )
HR	Homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung ( <i>international agency for research on cancer</i> )
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
ivm	<i>in vitro</i> methyliert
kDa	Kilo Dalton
MAP	MUTYH-assoziierte Polyposis
MLH1	Humanes mutL Homolog 1
MMR	<i>mismatch</i> Reparatur
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTH1	Humanes MutT Homolog 1
MutM/Fpg	Bakterielle 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase
MUTYH	Humanes MutY Homolog
NER	Nukleotidexzisionsreparatur

---

N-terminal	Amino-terminal
NTPs	Ribonukleosidtriphosphate
OD	Optische Dichte
OGG1	8-Oxoguanin DNA-Glykosylase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PolyPhen-2	<i>polymorphism phenotyping v2</i>
PPAP	Polymerase <i>proofreading</i> -assoziierte Polyposis
qPCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
rH	<i>random</i> Hexamer-Primer
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Reverse Transkription
S	Synthesephase des Zellzyklus
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SIFT	<i>sorting intolerant from tolerant</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
SSB	Einzelstrangbruch ( <i>single strand break</i> )
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOE1	<i>target of EGR1</i>
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase

---

VUS	Nicht-klassifizierte Varianten ( <i>variants of uncertain significance</i> )
v/v	Volumen pro Volumen
WCE	Nativer Gesamtproteinextrakt ( <i>whole cell extract</i> )
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
XGal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-Galactopyranosid
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>

Für Aminosäuren wurde der Einbuchstaben- bzw. Dreibuchstabencode verwendet:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Adenin-DNA-Glykosylase MUTYH (humanes MutY Homolog) ist an der Korrektur von fehlgepaartem Adenin (A) gegenüber der oxidativ geschädigten Base 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-oxoG) beteiligt. Wird Adenin aus einer 8-oxoG:A-Basenpaarung vor einer nachfolgenden Replikationsrunde nicht entfernt, so entstehen somatische G:C>T:A Transversionsmutationen. Inaktivierende Keimbahnmutationen des *MUTYH*-Gens können zu kolorektalen Polypen und der Entwicklung von Darmkrebs führen. Dieses autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsbild wird als MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP) bezeichnet und ist für etwa 1% aller Darmkrebserkrankungen ursächlich.

Die Diagnose der MAP kann nur durch den Nachweis biallelisch inaktivierender Mutationen erfolgen. Das Problem hierbei ist, dass etwa drei Viertel der gefundenen Veränderungen in *MUTYH* als *variants of uncertain significance* (VUS) gelten. Bei diesen VUS ist nicht geklärt, ob sie das Gen inaktivieren und somit pathogen sind oder nicht. Dadurch können Träger solcher Mutationen keine eindeutige Diagnose und somit keinen Zugang zu Vorsorgeprogrammen erhalten.

Das *MUTYH*-Gen ist durch drei alternative erste Exons (AFE) 1 $\alpha$ , 1 $\beta$  und 1 $\gamma$  sowie starkes alternatives Spleißen gekennzeichnet. Die unterschiedlichen Transkripte führen zu verschiedenen Proteinisoformen, welche gewebeabhängig in die Mitochondrien oder den Nukleus transportiert werden. Wie dieser Vorgang durch den Promoter reguliert wird, ist bisher unklar. Des Weiteren ist der Einfluss einzelner, veränderter Nukleotide im *MUTYH*-Promoter von Polyposis-Patienten auf die Transkription des Gens unbekannt. Um dies zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein *MUTYH*-Promotor-Minigenmodell entwickelt, welches neben dem putativen Promotorbereich die alternativen ersten Exons sowie Exons 2-4 enthält. Um regulative Sequenzmotive zu finden, wurde die Konservierung der Promotorregion ermittelt und konservierte Bereiche im Minigen inaktiviert. Zudem wurden sechs Patientenmutationen in das Minigen eingefügt, um nach transienter Transfektion deren Effekte auf die Transkription zu untersuchen. Dabei konnten drei regulatorische Sequenzmotive ausfindig gemacht werden, die für die korrekte Transkription der alternativen Isoformen von Bedeutung sind: das M4-Motiv, das Transkriptionsfaktor TFIIB Erkennungselement (BRE) und die GC-Box. Zusätzlich wurde der Einfluss der Transkriptionsfaktoren Sp1 und p53 auf die Transkription von *MUTYH* analysiert. Für keinen der Faktoren konnte jedoch ein Effekt in Bezug auf die Transkription der AFEs nachgewiesen werden. Für drei Patientenvarianten wurde keine Pathogenität ermittelt, während sich für drei weitere Varianten eine Einschränkung des Transkriptionslevels zeigte. Somit konnte in dieser Arbeit das *MUTYH*-Promotor-Minigen als humangenetisches, diagnostisches Werkzeug etabliert werden, welches auch in Zukunft für die Untersuchung von Patientenvarianten im Promotorbereich eingesetzt werden kann.

In einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit wurden 29 unklare Varianten des *missense* Typs anhand der Proteinexpression, der Konservierung der ausgetauschten Aminosäure und mit Hilfe eines erstellten Homologiemodells des MUTYH-Proteins klassifiziert. 17 Varianten stellten sich dabei als „wahrscheinlich pathogen“ heraus. Bei acht Varianten blieb die „Pathogenität unklar“, währenddessen vier der untersuchten VUS als „wahrscheinlich nicht pathogen“ eingeordnet wurden. Diese Klassifizierungsdaten können Humangenetikern bei der Beurteilung von unklaren Varianten und der Entscheidung helfen, ob Betroffene regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen erhalten sollten oder nicht.

## SUMMARY

The adenine DNA glycosylase *MUTYH* (human homolog of MutY) corrects mispaired adenine (A) bases opposite the oxidatively damaged base 7,8-dihydro-8-oxo-guanine (8-oxoG). If the mispaired adenine is not removed from 8-oxoG:A prior to replication, somatic G:C>T:A transversion mutations will arise. Inactivating germline mutations of the *MUTYH* gene can lead to colorectal polyposis and cancer. This autosomal recessive inheritable disease is called *MUTYH*-associated polyposis (MAP) which is causative for up to 1% of all colorectal cancers. MAP can only be diagnosed after the confirmation of biallelic inactivating mutations in the gene. The problem is that approximately three quarters of genetic variants found in polyposis patients are of uncertain significance (VUS). It is not clear whether these VUS inactivate the gene and are pathogenic or not. Thus, carriers of such mutations can neither get a final diagnosis nor have the opportunity for preventive medical checkups.

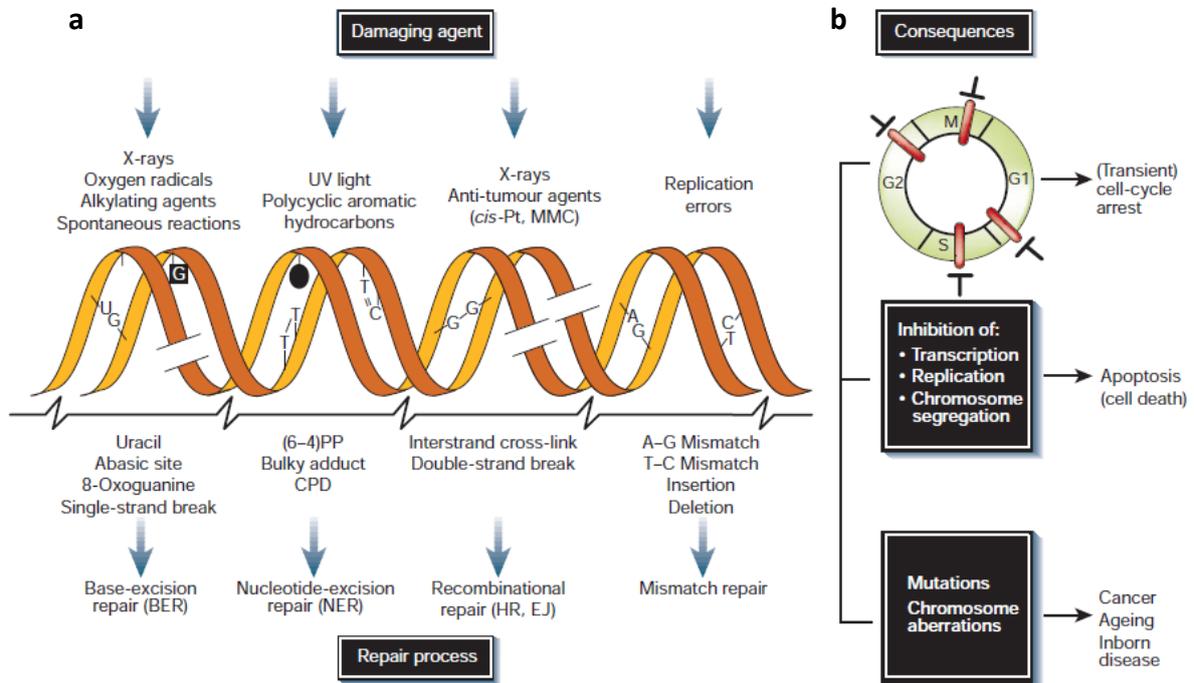
The *MUTYH* gene contains three alternative first exons (AFE) 1 $\alpha$ , 1 $\beta$  and 1 $\gamma$  and shows strong alternative splicing, generating multiple transcript variants encoding different protein isoforms which are either targeted to the mitochondria or to the cell nucleus depending on the tissue. So far, it is not known how this differential expression is regulated by the promoter. Moreover, the potential influence of single nucleotide alterations located in the *MUTYH* promoter from polyposis patients is not yet investigated. To analyze this, a minigene model consisting of the putative *MUTYH* promoter region, the three AFEs and exons 2-4 was generated. To be able to find important functional sequences, the conservation of the *MUTYH* promoter region was assessed and highly conserved areas of the *MUTYH* promoter were then inactivated in the minigene. In addition, to study the effect of patient mutations on *MUTYH* AFE transcription, human variants were introduced into the minigene. Overall, three regulatory motifs in the *MUTYH* promoter sequence were identified that are important for the correct transcription of the AFEs: the M4 motif, the transcription factor IIB recognition element (BRE) and the GC box. In this context, the impact of the transcription factors Sp1 and p53 was also examined, but there was no effect concerning the AFE transcription. For three of the studied patient variants no pathogenicity could be detected, whereas the other half of variants showed a reduction in their transcriptional level. In this work, a *MUTYH* minigene model was established that can be used as a genetic and diagnostic tool to analyze patient VUS in the *MUTYH* promoter region. Another part of this dissertation comprised the classification of 29 unclear missense variants. Patient variants were classified on the basis of protein expression analyses, conservation analyses of the amino acid substitutions and with the help of a homology model of the *MUTYH* protein. 17 variants were categorized "likely pathogenic". Four tested patient variants were classified "likely non-pathogenic" and for eight variants the pathogenicity remained "unclear". Taken together, these classification data can help human geneticists to decide whether a patient should receive regular medical checkups or not.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DNA-Reparatur

Für die Aufrechterhaltung der DNA-Integrität sind Reparaturmechanismen unabdingbar. Mit der Zeit akkumulieren Fehler in der DNA, die Protoonkogene aktivieren und Tumorsuppressorgene inaktivieren. Dies führt zur Karzinogenese – der Entstehung von Krebs. Um die Tumorbildung zu verhindern, steht somit der Schutz der DNA an oberster Stelle. Auslöser für DNA-Schäden sind sowohl äußere Einflüsse unserer Umwelt als auch normale Produkte unseres zelleigenen Metabolismus. So können Röntgenstrahlen und UV-Licht die DNA genauso schädigen wie Sauerstoffradikale oder Fehler der körpereigenen Transkriptionsmaschinerie (Abbildung 1.1 a). Die Folgen sind sehr unterschiedlich und reichen von Zellzyklusarrest über Apoptose bis hin zu langfristigen Effekten wie der Manifestation von irreversiblen Mutationen (Abbildung 1.1 b) [1]. Um diesen Folgen entgegenzuwirken haben sich im Laufe der Evolution verschiedene, hochkonservierte DNA-Reparatursysteme entwickelt, die teils eng miteinander agieren. Vererbte Defekte dieser Reparaturwege prädisponieren für bösartige Tumore. Zu den wichtigsten Systemen zählen Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Basenexzisionsreparatur (BER), Doppelstrangbruchreparatur und *mismatch* Reparatur (MMR) [2, 3]. Bei NER und BER liegen Läsionen ausschließlich in einem der zwei DNA-Stränge vor. Hierbei werden die DNA-Schäden, teilweise auch angrenzende Bereiche, ausgeschnitten und anhand des intakten komplementären Strangs aufgefüllt und somit repariert. Bei Doppelstrangbrüchen, die im Gegensatz dazu beide Stränge betreffen, kommen die Systeme der homologen Rekombination (HR) und des *end joinings* (EJ) zum Einsatz. Die Schwierigkeit hierbei besteht in der Unterscheidung der offenen DNA-Enden – welche Enden gehören zusammen? Die HR dominiert in der *gap 2* (G2)- und Synthesephase (S) des Zellzyklus, nachdem die DNA repliziert ist und ein Schwesterchromatid zum Abgleich vorliegt. In der *gap 1* (G1)-Phase ist hingegen EJ relevant, welches ohne zweite Kopie der Chromatide weniger präzise funktioniert [4]. Die MMR sorgt postreplikativ für Fehlerbehebungen, welche durch die DNA-Polymerase während der Replikation entstanden sind. Dabei handelt es sich um Basenfehlpaarungen sowie Insertionen und Deletionen weniger Basen. Letzteres geschieht aufgrund des Verrutschens (*slippage*) der Polymerase innerhalb repetitiver Sequenzen während der Replikation oder durch Rekombination [5]. Defekte des MMR-Systems führen zu Mikrosatelliteninstabilität (MSI) beim Lynch-Syndrom, früher auch als hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) bezeichnet und einer Vielfalt sporadisch auftretender Tumore [6]. Bei MSI handelt es sich um die

Verlängerung oder Verkürzung von Mikrosatelliten (repetitive Sequenzen bestehend aus Mono- bzw. Dinukleotid-Wiederholungen) [7].



**Abbildung 1.1: DNA-Schäden, Reparaturmechanismen und deren Konsequenzen.** (a) oben: allgemeine DNA-schädigende Substanzen; mitte: Beispiele für DNA-Schäden induziert durch diese Substanzen; unten: relevante DNA-Reparatursysteme zur Behebung der Fehler. (b) Akute Auswirkungen der DNA-Schäden auf den Zellzyklus (oben) und DNA-Metabolismus (mitte). Langfristige Effekte der DNA-Fehler (unten) wie permanente Veränderungen der DNA-Sequenz und deren biologische Folgen. Photoproduct ((6-4)PP), Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD), Cisplatin (*cis*-Pt), Mitomycin C (MMC). Entnommen aus Hoeijmakers (Nature, 2001) [1].

## 1.2 Basenexzisionsreparatur (BER)

Die BER ist das wichtigste System in Zusammenhang mit DNA-Schäden, die aufgrund des zellulären Metabolismus entstehen. Sie ist verantwortlich für die Behebung von Fehlern, die durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), Methylierung, Deaminierung, Alkylierung und Hydroxylierung entstehen (zusammengefasst von David und Williams [8]). Pro Tag treten allein  $10^4$  oxidative DNA-Schäden pro Zelle auf, die durch endogene, zelluläre Prozesse entstehen [9, 10]. Für die Erkennung dieser Schäden sind im ersten Schritt der BER DNA-Glykosylasen zuständig. Diese schnippen („flip“), mit Hilfe der Komprimierung des DNA-Rückgrats, die fehlgepaarte Base aus der Helix heraus und nehmen sie in der internen Vertiefung des Enzyms auf (Abbildung 1.2-1) [1]. Aufgrund der katalytischen Mechanismen im Inneren des Proteins lassen sich DNA-Glykosylasen in zwei Kategorien einteilen: monofunktionelle und bifunktionelle Glykosylasen. Monofunktionelle Glykosylasen

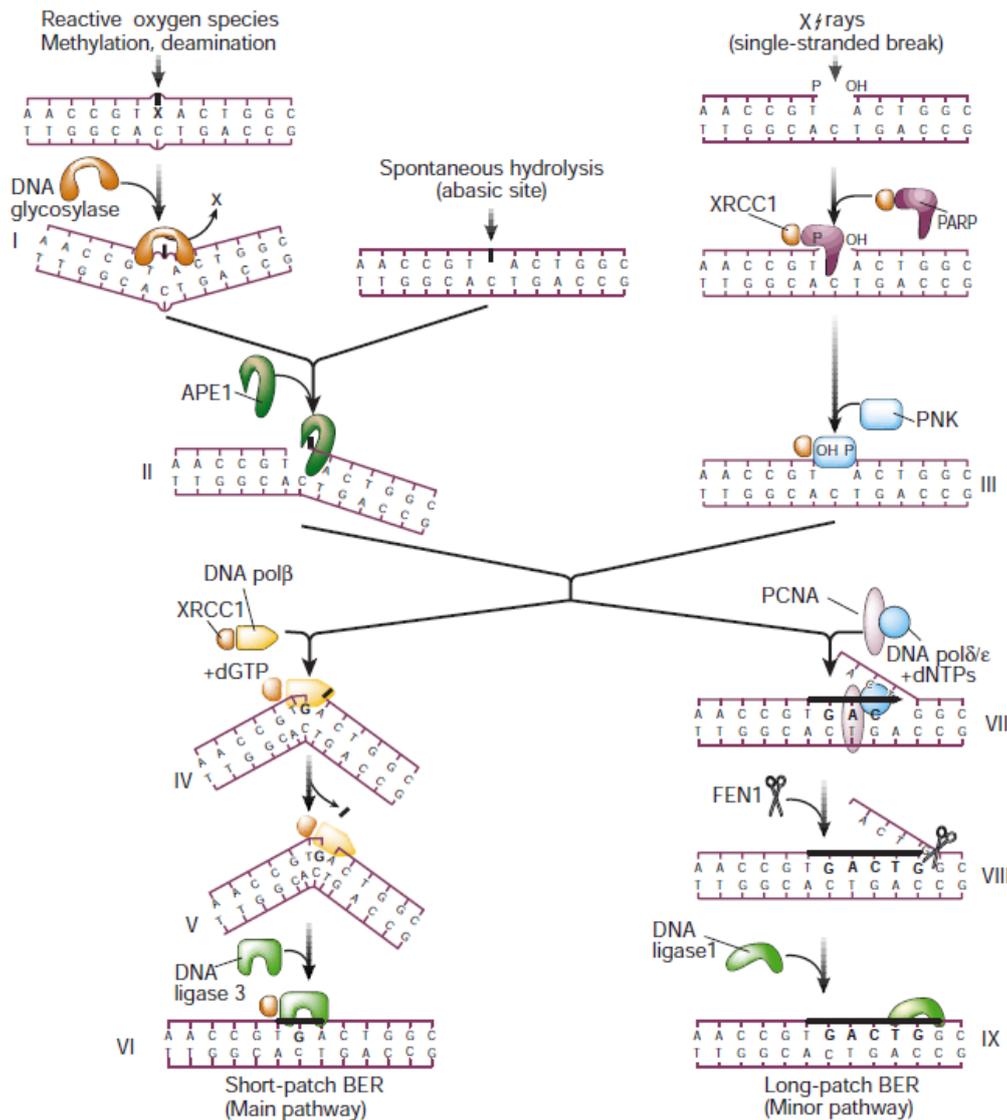
haben ausschließlich eine Glykosylaseaktivität, wohingegen bifunktionelle Glykosylasen zusätzlich eine apurinische/apyrimidinische (AP)-Lyaseaktivität besitzen [11].

Nach Erkennung der Basenfehlpaarung spalten monofunktionelle Glykosylasen N-glykosidische Bindungen unter Verwendung eines aktiven Wassermoleküls, welches die C1'-Position des Zuckersubstrats attackiert. Daraus resultiert eine abasische Stelle (*abasic site*), welche auch spontan durch Hydrolyse entstehen kann. Diese Stelle bildet das Substrat für die AP-Endonuklease 1 (APE1), welche einen Strangsnitt (3'-OH) ausführt (Abbildung 1.2-II), wodurch weitere Komponenten des BER-Kernkomplexes rekrutiert werden [11].

Bifunktionelle Glykosylasen nutzen hingegen einen Amin-Rest als Nukleophil, um den gleichen C1'-Kohlenstoff anzugreifen und die fehlgepaarte Base zu entfernen. Dadurch entsteht eine Schiff-Base als Zwischenschritt. Eine multiple Reaktionskaskade hat zur Folge, dass der kovalent gebundene Enzym-Substrat-Komplex eine Trennung des DNA-Rückgrats herbeiführt. Durch die zusätzliche AP-Lyaseaktivität sind bifunktionelle Glykosylasen in der Lage, Phosphodiesterbindungen zu schneiden, was ohne Einsatz von zusätzlichen AP-Endonukleasen zu Einzelstrangbrüchen der DNA führt [11, 12].

Außerdem wird die BER-Reaktion auch durch Einzelstrangbrüche (*single strand breaks*, SSB), ausgelöst durch Röntgenstrahlung, initiiert. Nach dem Auftreten von SSB wird Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) aktiviert und bindet zur weiteren Prozessierung zusammen mit *X-ray repair cross-complementing protein 1* (XRCC1) [13] und anderen Hilfsproteinen an den entsprechenden DNA-Abschnitt [14]. Letztlich wird durch den Einsatz der Polynukleotidkinase (PNK) [15] ein 3'-OH und 5'-Phosphat Ende generiert, dass DNA-Polymerasen als Substrat dient (Abbildung 1.2-III) [1].

Zur Schließung der offenen DNA-Enden gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen wird der 3'-OH Terminus von der DNA-Polymerase  $\beta$  erkannt. Zusammen mit XRCC1 als Kofaktor entfernt diese den basenlosen Zuckerrest durch ihre Lyaseaktivität und füllt die Lücke mit einem Nukleotid wieder auf (Abbildung 1.2-IV-V). Folglich wird der verbleibende Bruch mit Hilfe des XRCC1-Ligase-3-Komplexes ligiert (Abbildung 1.2-VI). Dieser vorwiegend genutzte Reparaturweg wird als *short-patch* BER bezeichnet. Zum anderen gibt es den *long-patch* BER-Weg. Dieser kommt zum Einsatz, wenn die entstandene AP-Stelle weiter oxidiert oder reduziert und somit resistent gegenüber der Lyaseaktivität der Polymerase  $\beta$  ist. In diesem Fall finden die replikativen DNA-Polymerasen  $\delta/\epsilon$  [16] und Polymerase  $\lambda$  [17] zusammen mit *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) Verwendung, indem sie ein längeres DNA-Strangstück von 2-15 Nukleotiden entfernen und ersetzen (Abbildung 1.2-VII). Daraufhin entfernt die *flap structure-specific* Endonuklease 1 (FEN1) den Nukleotid-Überhang (Abbildung 1.2-VIII), ehe die DNA-Ligase 1 die DNA-Enden verschließt [1, 18, 19].



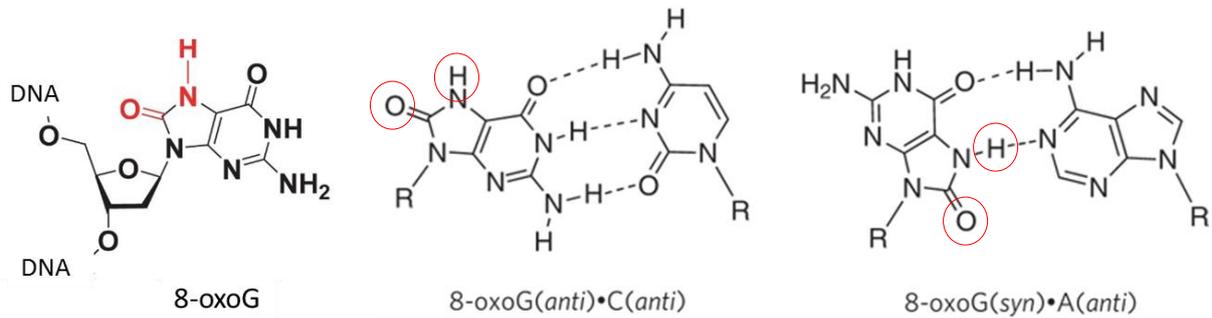
**Abbildung 1.2: Mechanismus der Basenexzisionsreparatur.** Die Schädigung von Basen durch z. B. ROS (oben links) und die Entstehung von Einzelstrangbrüchen (oben rechts) leiten den Reparaturweg der BER über den gebräuchlicheren *short-patch* BER (unten links) oder den selteneren *long-patch* BER-Weg (unten rechts) ein. Ausführliche Erklärung siehe Text. Entnommen aus Hoeijmakers (Nature, 2001) [1].

Aufgrund bisheriger Erkenntnisse über Kristallstrukturen der Glykosylasen wurden diese anhand struktureller Gemeinsamkeiten in vier Familien eingeteilt. Die ersten drei Familien sind nach ihrer Ähnlichkeit zur Uracil-DNA-Glykosylase (UDG), Alkyladenin-DNA-Glykosylase (AAG) und bakterieller 8-oxoG-DNA-Glykosylase (MutM/Fpg) benannt. Der Name der vierten Familie richtet sich nach dem charakteristischen aktiven Zentrum der zugehörigen Enzyme. Diese beinhalten eine *helix-hairpin-helix* (HhH)-Struktur gefolgt von einer Glycin/Prolin (GP)-reichen Schlaufe („loop“) und einem katalytischen Asparaginsäure (D)-Rest (HhH-GPD-Familie) [20–25]. Die Mitglieder der UDG- und AAG-Familien bestehen aus kompakten Einzeldomänen-Enzymen, wohingegen die MutM/Fpg- und HhH-GPD-Familien größere

Enzyme mit mehreren Domänen enthalten. Enzyme der UDG- und AAG-Familien sind kompakte Proteine, die relativ kleine DNA-Interaktionsoberflächen ausbilden. Mitglieder der MutM/Fpg- und HhH-GPD-Familien bestehen aus multiplen Domänen, deren aktives Zentrum an Gabelungen („*junctions*“) von Interdomänen lokalisiert ist. Jede zusätzliche Domäne ist auf eine bestimmte biologische Aufgabe spezialisiert. Einige MutM/Fpg- und HhH-GPD-Familienmitglieder besitzen zudem strukturelle Metallionen. Obwohl sich die allgemeinen Strukturen aller Familien und deren Mitglieder unterscheiden, so haben sie eines gemeinsam: alle binden primär an den Schaden enthaltenden DNA-Strang und nehmen die fehlgepaarte Base aus der Duplex in ihre extrahelikale Erkennungstasche zur weiteren Prozessierung auf [11]. Dabei besitzen einige DNA-Glykosylasen ein breites Spektrum an Substraten, die sie erkennen, während andere sehr spezifisch sind [26].

### **1.3 Die Adenin-DNA-Glykosylase MUTYH und deren Rolle bei oxidativen DNA-Schäden**

Guanin (G) ist die Base, die am anfälligsten für oxidative Schäden durch ROS ist. Dies liegt an dem niedrigen Redoxpotential von Guanin und führt zu Unmengen oxidiertes Guaninprodukte [27]. Das am sorgfältigsten studierte Guanin-Oxidationsprodukt ist 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-oxoG, OG) [28], welches häufig als Indikator von oxidativem Stress in Zellen genutzt wird [29]. 8-oxoG ist vor allem deshalb schädlich, weil es durch eine Addition der Oxo-Gruppe an die Kohlenstoffposition 8 (C8), eines Wasserstoffatoms an die Stickstoffposition 7 (N7) und zusätzliche Konformationsänderung von *anti*- in *syn*-Richtung die Base Thymin (T) funktionell imitieren kann (Abbildung 1.3). Dies führt dazu, dass es zu einer stabilen Basenpaarung zwischen 8-oxoG und Adenin (A) kommen kann [30], die den problemlosen Bypass von replikativen DNA-Polymerasen ermöglicht [31]. Wird 8-oxoG nicht vor der Replikation entfernt, so können daraus G zu T Transversionsmutationen resultieren [27]. Um das mutagene Potential von 8-oxoG abzuschwächen, haben alle Organismen Reparaturwege dagegen entwickelt. In Bakterien handelt es sich dabei um die Enzyme MutT, MutM (auch bekannt als Fpg) und MutY [32]. Zu den entsprechenden humanen Proteinen gehören das MutT Homolog 1 (MTH1; auch NUDT1 genannt), die 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase (OGG1) und das MutY Homolog (MUTYH) [33], die am 8-oxoG-Reparaturweg beteiligt sind.

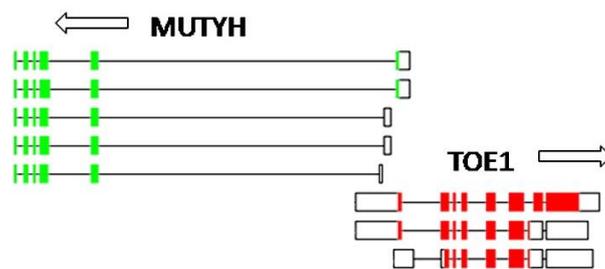


**Abbildung 1.3: Struktur von 8-oxoG und mögliche Basenpaarung.** 8-oxoG unterscheidet sich von G durch die Addition einer Oxo-Gruppe an Position C8 und eines Wasserstoffatoms an Position N7 (rot bzw. rote Kreise). Diese Veränderung ermöglicht 8-oxoG sowohl mit Cytosin (C) als auch mit Adenin (A) Basenpaarungen einzugehen, indem es seine Konformation ändert (*anti* → *syn* Orientierung). Links: Entnommen aus Lee & Verdine (PNAS, 2009) [34]. Mitte, rechts: Entnommen aus David *et al.* (Nature, 2007) [30].

Entdeckt wurde der Reparaturweg in Bakterien (zusammengefasst von Brinkmeyer [35]). Miller *et al.* zeigte, dass in Abwesenheit von MutY die mutagene G:C zu T:A Transversionsrate in einem Lac<sup>+</sup> Reversionsassay gering ist [36]. Die Gruppe benutzte für dieses Assay einen *E. coli* Stamm mit einem veränderten *lacZ*-Gen, welches nur durch eine bestimmte Transversion zum Wildtyp (WT) reversiert werden kann und blaue Kolonien bildet. Die geringe Mutationsrate trotz Abwesenheit von MutY lag an dem Vorhandensein von MutM, einer Glykosylase/apurinischen Endonuklease, welche die geschädigte Base 8-oxoG gepaart mit Cytosin entfernt [37]. Weitere Untersuchungen Millers illustrierten, dass die Mutationsrate bedeutend höher ausfiel, wenn beide – MutM und MutY – abwesend waren. Lediglich die Plasmidexpression des *mutY*-Wildtyps führte zu einer Verringerung der G:C zu T:A Transversionsmutationen. Somit konnte demonstriert werden, dass beide Proteine in demselben Reparaturweg tätig sind, um Mutationen durch oxidative Schäden der Base Guanin in der DNA zu verhindern [38].

1988 fanden erste Analysen zum Genprodukt von *mutY* statt. Diese zeigten, dass es keine Endonukleaseaktivität, sondern vielmehr eine Glykosylaseaktivität besitzt. Zudem ist MutY im methylunabhängigen Reparaturweg von *E. coli* involviert, der A:G Fehlpaarungen zu C:G Basenpaaren korrigiert [38, 39]. Aufgrund der bis dato bekannten Fakten, dass die Inaktivierung von *mutM* und *mutY* zu G:C nach T:A Transversionen führt und die DNA-Synthese über 8-oxoG hinaus zum Fehleinbau von Adeninen gegenüber 8-oxoG führt [31], testeten Miller *et al.* OG:A als Substrat für MutY. Dabei fanden sie heraus, dass im Gegensatz zu anderen Abwehrmechanismen, welche die geschädigte Base angreifen, MutY die unbeschädigte Base Adenin sowohl aus G:A als auch aus OG:A Substraten entfernte [32, 38]. Im Zusammenhang mit nachfolgenden Arbeiten konnte verdeutlicht werden, dass OG:A Fehlpaarungen *in vitro* und *in vivo* das bevorzugte Substrat für MutY darstellen [35, 40–42].

Da die Gensequenz der bakteriellen MutY-Glykosylase bekannt war, suchte man nach homologen Genen in anderen Organismen. Dabei durchsuchte Slupska *et al.* eine cDNA-Sequenzdatenbank (*Human Genome Sciences*) nach Fragmenten, welche für die homologe Proteinsequenz von *E. coli* MutY kodierte. In einer humanen Gehirn-cDNA-Datenbank entdeckten sie einen Klon mit gleichen Eigenschaften: das humane Gen *MUTYH* (MutY Homolog, damals *hMYH* bezeichnet). Es enthält 16 Exons, 15 Introns, ist 11,2 kb lang [43] und befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 zwischen p32.1 and p34.3 [44]. Die 16 Exons kodieren über mehrere Transkriptvarianten verschiedene Proteinisoformen, wobei die bisher längste aus 549 Aminosäuren besteht. Das Besondere an der Position von *MUTYH* auf Chromosom 1 ist, dass es mit einem zweiten proteinkodierenden Gen namens *target of EGR1* (*TOE1*) im 5'-Bereich von Exon 1 überlappt. *TOE1* wird dabei in entgegengesetzter Richtung abgelesen. Sich überschneidende Gene weisen meist mehr Spleißvarianten auf als ihre nicht überlappenden Orthologe (Abbildung 1.4) [45].

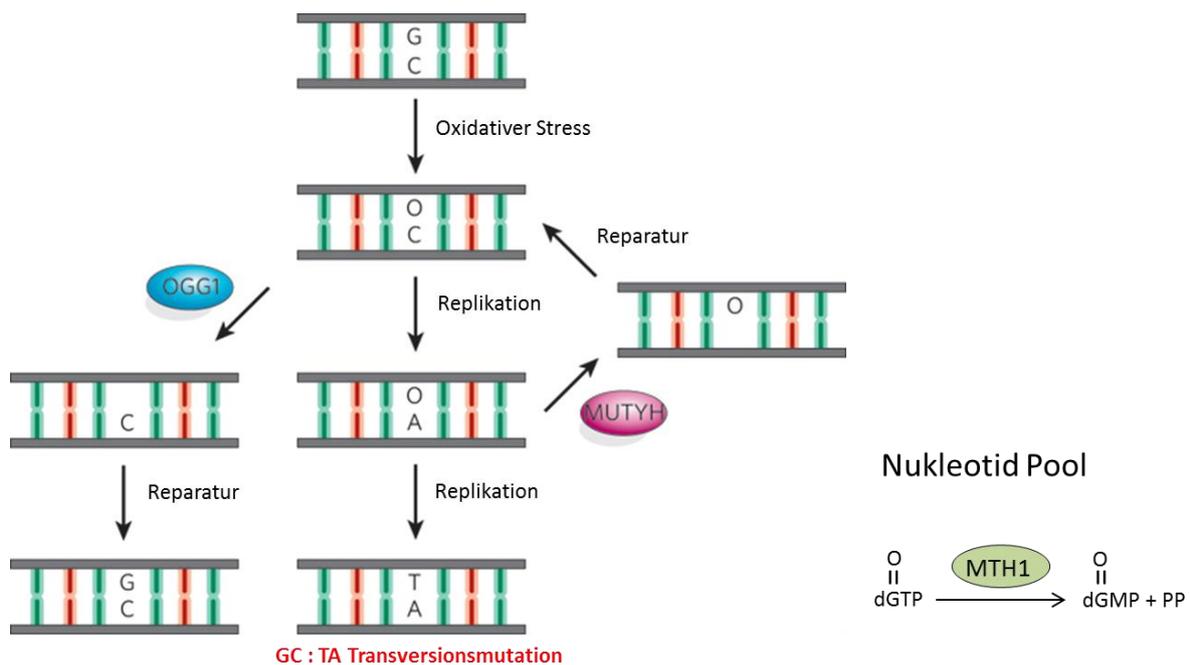


**Abbildung 1.4: Anordnung der Gene *MUTYH* und *TOE1*.** Transkribierte Regionen sind als Vierecke verzeichnet und stellen Exons dar. Die farbigen Abschnitte weisen auf Protein-kodierende Bereiche hin. Es sind mehrere Transkriptvarianten beider Gene abgebildet. Das erste *TOE1*-Exon überlappt alle ersten *MUTYH*-Exons, wird aber in entgegengesetzter Richtung abgelesen. Die oberen Transkriptvarianten von *MUTYH* und *TOE1* teilen sich ein CATG Tetranukleotid, welches als Startcodon für die Translation beider Gene fungiert. Entnommen aus Makalowska (Gene, 2008) [45].

*MUTYH* weist eine 41%ige Übereinstimmung zum *E. coli* Protein MutY auf [44]. In darauffolgenden Studien wurden zudem Homologe in weiteren Arten wie *Schizosaccharomyces pombe* [46] oder *Mus musculus* [47] identifiziert. Funktionelle *in vitro* Studien des humanen *MUTYH*-Enzyms offenbarten, dass es Adenine sowohl von OG:A Fehlpaarungen als auch in einem geringeren Maße von G:A Fehlpaarungen entfernt [48]. Somit handelt es sich bei *MUTYH* um das wahrhaftige Homolog der bakteriellen MutY-Glykosylase [35].

Die humane, bifunktionelle 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 (*OGG1*) bildet die erste Schutzbarriere vor dem mutagenen Basenprodukt 8-oxoG (OG) nach Kontakt mit reaktivem Sauerstoff. *OGG1* erkennt die geschädigte Base und entfernt die Läsion aus der OG:C Basenpaarung [23]. Mit Hilfe des nachfolgenden *short-patch* BER-Wegs [49] wird schließlich wieder eine normale G:C Basenpaarung hergestellt (Abbildung 1.5). Ist *OGG1* nicht in der

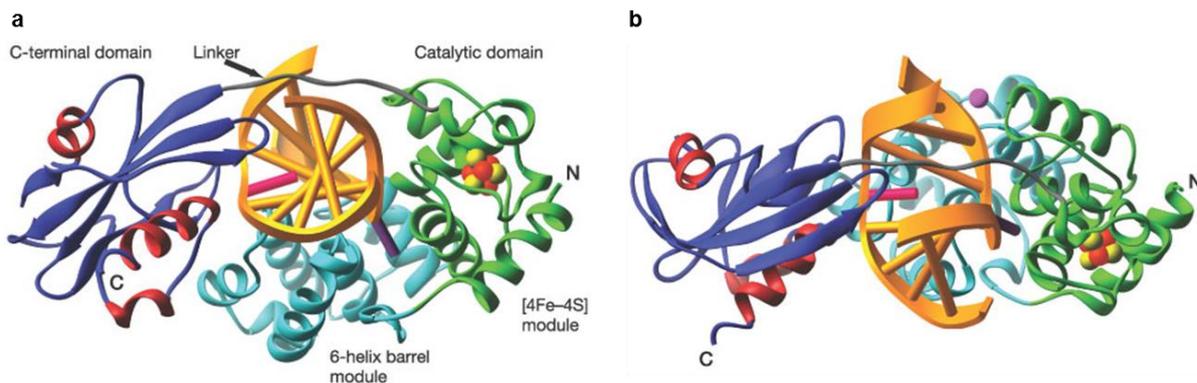
Lage 8-oxoG rechtzeitig vor der nächsten Replikationsrunde zu entfernen, kommt es neben Cytosin auch zum Einbau von Adenin gegenüber 8-oxoG durch Replikationspolymerasen. Diese OG:A Basenfehlpaarung dient wiederum als Substrat für MUTYH, eine monofunktionelle Glykosylase, die ausschließlich an der Reparatur von 8-oxoG beteiligt ist [32, 50]. Nach Beseitigung der unbeschädigten Base Adenin aus dem DNA-Rückgrat wird über den *long-patch* BER [51] wieder ein Cytosin gegenüber 8-oxoG eingebaut. Dadurch bekommt OGG1 zum zweiten Mal die Chance, die oxidative Läsion zu entfernen. Findet ohne die Reparatur durch MUTYH jedoch eine zweite Replikationsrunde statt, so resultiert aus der OG:A Fehlpaarung eine T:A Transversionsmutation. Gemeinsam verhindern OGG1 und MUTYH somit die Mutagenese nach oxidativen DNA-Schäden. Unterstützt werden sie außerdem durch das humane MTH1-Enzym. MTH1 verhindert den Einbau von 8-oxoG in die DNA durch Hydrolyse von 8-oxo-Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) zu 8-oxo-Desoxyguanosinmonophosphat (dGMP), wodurch es der Polymerase nicht mehr als Substrat während der Replikation zur Verfügung steht [52].



**Abbildung 1.5: Basenexzisionsreparaturweg von 8-oxoG.** Zentrum: Die Entstehung von 8-oxoG (O) durch oxidativen Stress verursacht GC:TA Transversionsmutationen. Die humanen DNA-Glykosylasen OGG1 und MUTYH sind bei der Exzision von Basen aus der DNA beteiligt. OGG1 entfernt O aus O:C Basenpaarungen, während MUTYH A aus O:A Basenpaarungen beseitigt. Dabei entsteht eine AP-Stelle in der DNA. Die darauffolgenden Schritte der BER sind unter „Reparatur“ zusammengefasst. Das humane MTH1-Protein spielt hingegen eine wichtige Rolle in der Beseitigung von freiem 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGMP und Pyrophosphat (PP). Verändert nach David *et al.* (Nature, 2007) [30].

## 1.4 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von MutY und MUTYH

MutY- und MUTYH-Proteine bestehen aus zwei Hauptdomänen, welche über eine Linkerregion miteinander verbunden sind [53, 54]. Die katalytische N-terminale Domäne beinhaltet eine aus sechs Helices bestehende Gebinde-Domäne (*barrel domain*), die das typische *helix-hairpin-helix* Motiv enthält. Auf dieses folgt eine Glycin/Prolin-reiche Schlaufe (*loop*) und ein katalytisch essentieller Asparaginsäurerest. Bezeichnet wird dieser gesamte Teil des Proteins darum als HhH-GPD-Motiv. Weitere Mitglieder dieser Familie von DNA-Glykosylasen sind OGG1, *E. coli* Endonuklease III und dessen humanes Homolog NTH1 [20–25]. Das HhH-GPD-Motiv von *E. coli* MutY ist sowohl an der Erkennung als auch der Entfernung von Adenin gegenüber 8-oxoG beteiligt [55] und besitzt zudem ein Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S), wodurch es zur Untergruppe Nth gehört [56, 57]. Das Eisen-Schwefel-Cluster wird durch vier Cysteine koordiniert und beinhaltet eine exponierte Schlaufe, die als *Fe-S cluster loop* (FCL)-Domäne bezeichnet wird [24, 58]. MutY-Proteine, denen das Eisen-Schwefel-Cluster fehlt, sind *in vitro* vollkommen inaktiv. Die positiv geladenen Aminosäurereste des FCL sind außerdem zur Substraterkennung der negativ geladenen DNA essentiell [24, 59, 60]. MutY ist insofern einzigartig unter den Mitgliedern der HhH-GPD Familie, dass es als einziges Enzym eine Carboxydomäne enthält, welche verantwortlich für die Identifizierung von 8-oxoG ist. Durch die Deletion des C-Terminus sinkt die Erkennung von 8-oxoG:A [42]. Der C-Terminus ist strukturell sehr ähnlich zum MutT-Protein, welches 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGMP hydrolysiert [54, 61]. Hochauflösende Strukturen der isolierten, katalytischen N-terminalen [53] und C-terminalen Domäne [54] von *E. coli* MutY waren bereits im Jahr 2000 bekannt, doch Fromme *et al.* ist es 2004 erstmals gelungen die Kristallstruktur von *Bacillus stearothermophilus* MutY im Komplex mit DNA inklusive enthaltener 8-oxoG:A-Fehlpaarung über Disulfid *cross-linking* in voller Länge darzustellen (Abbildung 1.6). Das Enzym erkennt 8-oxoG über Wasserstoffbrückenbindungen und umgibt den 8-oxoG enthaltenden DNA-Strang wie ein Sandwich mit der N- und C-terminalen Domäne. Der 8-oxoG-Rest verbleibt intrahelikel, ist allerdings in der *anti*-glykosidischen Konformation gebunden im Gegensatz zur *syn* Konformation, wenn es mit Adenin gepaart vorliegt [55]. Eine weitere Kristallstruktur bestätigte, dass MutY sein Adeninsubstrat tief ins aktive Zentrum aufnimmt und über multiple Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen Kontakt zum Substrat hat [34, 35].



**Abbildung 1.6: *Bacillus stearothermophilus* MutY-DNA-Komplex.** (a) Die katalytische N-terminale Domäne, bestehend aus dem Eisen-Schwefel-Modul (grün) und der sechs-Helix Gebinde-Domäne (hellblau), interagiert hauptsächlich mit dem DNA-Strang, der das Adenin-Substrat enthält. Die C-terminale Domäne ( $\beta$ -Stränge blau, Helices rot) bildet weitreichende Kontakte mit dem 8-oxoG-Strang aus. (b) Gleiche Struktur wie links nur um  $90^\circ$  nach vorne in Richtung des Betrachters gedreht. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion (violetter Kreis) ist sichtbar, das in (a) verdeckt war. DNA (gold), 8-oxoG (magenta), Adenin (lila), Schwefel- und Eisenatome (gelb und orange). Entnommen aus Fromme *et al.* (Nature, 2004) [55].

2010 zeigten Luncsford *et al.* die erste Kristallstruktur eines Fragments von MUTYH (AS 65-350), dass aus der katalytischen Domäne und der Linkerregion besteht, welche N- und C-Termini verbindet [62]. Diese Struktur verrät, dass sich die katalytischen N-terminalen Domänen von *E. coli* MutY und humanem MUTYH sehr ähneln. Die Aminosäuresequenzen des HhH-GPD-Motivs und der Cystein-Liganden, welche das Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren, sind hochkonserviert zwischen Bakterien und Eukaryoten [53, 55, 62]. Allerdings unterscheiden sich die Linkerregionen deutlich. Die Linkerregion von MUTYH ist involviert in die Interaktion mit einer Reihe anderer, für die DNA-Reparatur essentieller Enzyme. Dazu gehören Proteine der DNA-Replikation (*replication protein A*, RPA und PCNA), *mismatch* Reparaturenzyme (MSH6) und DNA-Schadensreparaturproteine wie der Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1) Komplex (zusammengefasst von [63]). Letzterer spielt beispielsweise bei den Zellzyklus Checkpoints eine Rolle, indem der Komplex den Zellzyklus mit anhaltender DNA-Reparatur koordiniert. Somit ist der Linker zwischen katalytischer und 8-oxoG Erkennungsdomäne von MUTYH ein kritisches Element zur Minimierung des mutagenen Potenzials oxidativer DNA-Schäden [35, 47, 51, 62].

Neben 8-oxoG vermittelt MutY außerdem die Entfernung von Adenin gegenüber anderen Basen wie Guanin, Formamidopyrimidin-Guanin (FapyG) oder Cytosin [8, 64, 65]. Insgesamt zeigen zahlreiche Experimente jedoch, dass OG:A Fehlpaarungen das biologisch relevantere Substrat von MutY darstellen [66]. Studien, die mit einem C-terminal trunkierten MutY Protein ( $\Delta 226-350$ ) durchgeführt wurden, zeigten, dass die C-terminale Domäne verantwortlich für die enge Assoziation von MutY mit OG:A ist. *In vitro* Experimente zur Substratbindungsaffinität von MutY $\Delta 226-350$  machten eine 750-fache Reduktion im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich [67, 68]. Die Deletion des C-Terminus resultierte in einem Verlust der OG-spezifischen

Bindungsaffinität, was der C-terminalen Domäne eine wichtige Rolle bei der Erkennung von OG-Schäden zuspricht [35].

Um die *mismatch* Erkennung und die Adeninbeseitigung bei OG:A Fehlpaarungen in *E. coli* genauer zu evaluieren, ersetzten Livingston *et al.* den OG-Schaden durch normales Guanin und Adenin durch das Analog 3-Deaza-2'-deoxyadenosin (Z3). MutY wies dabei *in vitro* eine höhere Affinität zu OG:Z3 als G:A auf. Zudem war MutY dazu in der Lage, OG:Z3 mit gleicher Affinität zu binden wie OG:A. Dies macht deutlich, dass das modifizierte Adenin-Analog keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Proteins hat, sein Substrat zu erkennen und zu binden. Des Weiteren demonstrierte die Gruppe *in vivo* ein signifikantes Fehlen der Reparatur von G:A-Fehlpaarungen durch MutY, während die Reparatur des OG:Z3 *mismatch* an die des WT-Levels heranreichte [69]. Zusammenfassend lässt sich zu diesen Experimenten festhalten, dass MutY hauptsächlich auf die Identifizierung des OG-Schadens spezialisiert ist [66] und eine deutliche Präferenz gegenüber OG:A-Fehlpaarungen im Vergleich zu G:A-Substraten aufweist. Dies ist übereinstimmend mit der Entdeckung, dass MutY eine 30-fach höhere Bindungsaffinität zu einem OG:F (2'-Deoxyformycinadenin)-Analog aufweist verglichen mit der entsprechenden G:F-Duplex [70]. MutY präferiert also deutlich die Erkennung des 8-oxoG-Schadens anstatt der fehlgepaarten Adenin-Base (zusammengefasst von Brinkmeyer [35]).

Um den katalytischen Mechanismus von MutY-Proteinen zu verstehen, wurden eine Reihe von Untersuchungen zu den kinetischen Eigenschaften von *E. coli* MutY bezüglich OG:A und G:A Duplexbindungs-fähigkeit durchgeführt. Mit Hilfe von *single-turnover* (STO)-Experimenten wurde demonstriert, dass es einen Unterschied bei der Verarbeitung von OG:A-Substraten im Vergleich zu G:A Substraten durch *E. coli* MutY gibt. Die Beseitigungsrate von Adenin gegenüber 8-oxoG war 6-fach höher als die des entsprechenden G:A Substrats. Außerdem wurde belegt, dass MutY langsamer vom OG:A als vom G:A *mismatch* dissoziierte [71]. Die Stabilität des MutY-OG:A-Komplexes bedeutet, dass MutY spezifische Kontakte zum OG-Schaden aufgebaut hat, der über die Adenin-Entfernung hinaus zeitlich anhielt. Dieser feste Kontakt herrschte nicht zu normalem Guanin, wodurch dieses eher dissoziierte. Dieses Verweilen von MutY an der Stelle des OG:A Schadens hat einen biologisch wichtigen Hintergrund. Dadurch kann MutM nicht gleichzeitig den oxidativen Schaden an der Guanin Base reparieren, da 8-oxoG durch die Bindung von MutY unzugänglich ist. Könnten beide Enzyme gleichzeitig aktiv sein, wäre dies insofern schädlich für die Zelle, da ein Doppelstrangbruch entstehen würde. Die hohe Affinität von MutY zum OG:A Substrat blockiert somit die Erreichbarkeit der oxidativen Läsion für MutM bis weitere Enzyme des BER-Reparaturwegs übernehmen [71]. Tatsächlich haben mehrere Studien bereits bewiesen, dass BER-Enzyme aufeinander abgestimmt sind, um die instabilen Intermediate während der Entfernungs- und Syntheseschritte des BER-Prozesses zu schützen [35, 72–74]. Sequenzabgleiche zwischen MutY und MUTYH offenbarten obendrein, dass die Aminosäuren,

die den Kontakt zum Substrat herstellen, konserviert sind. Daraus lässt sich ableiten, dass MUTYH die Substrat enthaltende DNA in gleicher Weise bindet und prozessiert wie *E. coli* MutY [34, 55].

## 1.5 MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP) und die Entstehung von kolorektalen Karzinomen

Der Schutz vor Mutationen der DNA generell und in Zusammenhang mit 8-oxoG ist von enormer Wichtigkeit. Dies wurde deutlich, als ein Zusammenhang zwischen kolorektalen Karzinomen und Mutationen des für MUTYH kodierenden Gens entdeckt wurde. Al-Tassan stellte mit seiner Arbeit 2002 den ersten Zusammenhang zwischen vererbaren Defekten der Basenexzisionsreparatur und Krebs her. In der Publikation wird eine britische Familie (bezeichnet als Familie N) vorgestellt, in der einige Geschwister typische Symptome zeigen, die charakteristisch für die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) sind [75]. Die FAP stellt eine bekannte vererbare Darmerkrankung dar, bei der Betroffene übersät sind mit adenomatösen Polypen des Dickdarms, welche aufgrund von Mutationen des Gens *APC* (*adenomatous polyposis coli*) entstehen. Das APC-Protein nimmt als Tumorsuppressor eine wichtige Rolle u. a. bei der Kontrolle der Proliferation und Differenzierung kolorektaler Epithelzellen im Wnt-Signalweg ein [76]. In den meisten kolorektalen Tumoren ist es deshalb mutiert. Obwohl der familiäre Hintergrund der FAP auf vererbte Keimbahnmutationen im *APC* Gen zurückzuführen ist, war dies nicht zutreffend für Familie N. Einhergehend mit dem Polyposis-Phänotyp der Familie (drei der sieben Geschwister wiesen mehrere kolorektale Adenome auf) fanden sich in der DNA der Tumore der betroffenen Familienmitglieder inaktivierende somatische Mutationen des *APC*-Gens. Bei der Untersuchung war vor allem die Art der Mutationen sehr aufschlussreich, da es sich um GC zu TA Transversionen handelte. Diese Art von Mutation ist assoziiert mit 8-oxoG und führte dazu, dass diejenigen Gene sequenziert wurden, die für Enzyme des humanen 8-oxoG-Reparaturwegs kodieren. Es stellte sich heraus, dass biallelische *missense* Keimbahnmutationen in *MUTYH* vorhanden waren. Diese Mutationen resultierten in zwei *MUTYH*-Proteinvarianten, von denen jede durch einen Aminosäureaustausch gekennzeichnet war: Y179C und G396D (NP\_001121897.1 – früher als Y165C und G382D bezeichnet nach NP\_001041636.1). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von *MUTYH* zu *E. coli* MutY wurde die Proteinaktivität beider Varianten an *E. coli* MutY analysiert. Beide Varianten zeigten eine eingeschränkte Aktivität bei der Entfernung von fehlgepaarten Adeninen im Vergleich zum WT [75, 77]. Dieses Erkenntnis unterstützte die Hypothese, dass *MUTYH*-Varianten in ihrer Kapazität limitiert sind, die Reparatur von 8-oxoG:A Fehlpaarungen zu initiieren. Dies wiederum führt zu einem erhöhten Vorkommen von somatischen G>T Transversionen in *APC* und somit wahrscheinlich zur Inaktivierung des zugehörigen

Tumorsuppressorproteins und der Entstehung von Adenokarzinomen. Somit entdeckte Altassan einen neuartigen Mechanismus, bei dem vererbte Gendefekte eines BER-Enzyms (MUTYH) Mutationen in weiteren Genen (*APC*) zur Konsequenz haben, welche mit der Prädisposition für Krebs assoziiert sind. Mittlerweile wird dieser Zusammenhang als MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP) bezeichnet [78].

Kolorektale Karzinome (*colorectal cancer*, CRC) stellen den dritthäufigsten Krebs bei Männern und den zweithäufigsten Krebs bei Frauen weltweit dar [79]. Diese Zahlen ergaben sich bei einer weltweiten Auswertung von Daten im Jahr 2012 (GLOBOCAN) durch die „Internationale Agentur für Krebsforschung“, kurz IARC (*international agency for research on cancer*), welche eine Einrichtung der Weltgesundheitsorganisation ist. In Deutschland ist Darmkrebs der am zweithäufigsten diagnostizierte Krebs bei Männern und Frauen nach Prostata- bzw. Brustkrebs [80]. Laut Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut in Berlin lagen die Zahlen für Darmkrebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 für Männer bei 33.740 und für Frauen bei 28.490, wobei die relative 5-Jahres-Überlebensrate 63% für beide Geschlechter betrug [81]. Etwa 70% aller CRCs sind sporadischen Ursprungs und das Lebenszeitrisiko, daran zu erkranken, liegt bei ca. 5% [6]. 30% aller CRC-Fälle stellen hingegen vererbte Formen dieser Krankheit dar [82, 83], von denen etwa 5% einen etablierten Mendelschen Vererbungshintergrund aufweisen. Die restlichen ~25% vererbbarer CRCs sind bisher nicht vollständig erforscht. Beispiele hierfür sind verbreitete Polymorphismen in Genen, welche die Regulation des Metabolismus betreffen, oder Gene, die durch Umweltfaktoren oder andere genetische Faktoren beeinflusst sind [6].

Zu den gut untersuchten vererbten CRC Syndromen gehören u. a. das Lynch-Syndrom (früher hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom, HNPCC), die FAP und die attenuierte Form AFAP, die MAP und die Polymerase *proofreading*-assoziierte Polyposis (PPAP). Das Lynch-Syndrom basiert auf Gendefekten, deren Produkte an der MMR beteiligt sind. Hierbei sind hauptsächlich Mutationen im humanen MutS Homolog 2 (MSH2) und MutL Homolog 1 (MLH1) ursächlich [84]. Das Lynch-Syndrom macht circa 2-4% aller CRCs aus, wobei das Erkrankungsrisiko bei 75% liegt [6]. Die DNA-Polymerasen POLE und POLD1 übernehmen funktionell das kontrollierte Ablesen (*proofreading*) der DNA während der Synthese und nehmen gegebenenfalls Korrekturen vor. Mutationen der Polymerasen können sowohl auf Keimbahnebene als auch somatisch auftreten und führen wiederum zu Fehlern in neu synthetisierten Genen. Die zugehörige Erkrankung wird als PPAP bezeichnet [85]. Die familiäre adenomatöse Polyposis und deren abgemilderte Form der attenuierten familiären adenomatösen Polyposis werden beide durch Keimbahnmutationen im *APC*-Gen hervorgerufen. Die klassische FAP zeichnet sich durch das Auftreten von 100-1000 adenomatösen Polypen im Kolon bereits im Teenageralter aus. Fast alle Betroffenen haben bis zu einem Alter von 35 Jahren Adenome entwickelt, welche unbehandelt zu CRC bei einem

Durchschnittsalter von nur 39 Jahren führen. Im Alter von 50 Jahren haben 95% der Patienten CRC entwickelt [86]. Bei Patienten mit AFAP besteht hingegen ein geringeres Erkrankungsrisiko von 69%. Die Krankheit entwickelt sich mit höherem Alter und es treten im Schnitt weniger als 100 Polypen auf. Welche Form der FAP vorkommt, hängt vom Ort der Mutation im *APC*-Gen ab. Bei FAP haben die meisten über das *APC*-Gen verteilten Mutationen ein trunkiertes Protein zur Folge, während sich die Mutationen bei AFAP eher auf die distalen 5'- und 3'-Regionen des Gens zu konzentrieren scheinen [76, 87–89].

Circa 7-20% der klassischen FAP-Fälle ohne *APC*-Mutation und 15-30% der AFAP-Fälle sind das Ergebnis von Mutationen in *MUTYH* [90, 91]. Die *MUTYH*-assoziierte Polyposis wird autosomal-rezessiv vererbt [92] im Gegensatz zu den vorherig genannten polypösen Erkrankungen, welche einem autosomal-dominanten Erbgang folgen [6]. Das bedeutet, dass inaktivierende Mutationen in beiden Allelen zur Auslösung der Krankheit notwendig sind. Dadurch lässt sich die Erkrankung vermehrt unter Geschwistern nachweisen und weniger über Generationen hinweg [93]. Verwandte von MAP-Patienten mit einer heterozygoten *MUTYH* Mutation haben ein Darmkrebsrisiko, welches vergleichbar ist mit Verwandten ersten Grades von Patienten mit sporadischem CRC [94]. Zudem wurden bei Analysen von Plotz *et al.* Expressionsdaten von gesunden Kontrollpatienten (ohne Polypen, Kolonkarzinomen und wissentlichen *MUTYH* Mutationen) und Polyposis-Patienten verglichen. Dabei wurde ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) entdeckt, welcher zur Reduktion einer Transkriptvariante von *MUTYH* führte, wodurch ein erhöhtes Krebsrisiko auch für heterozygote Mutationsträger möglich ist [95]. Die MAP macht derzeit <1% aller CRC-Erkrankungen aus. Diese Zahl könnte allerdings zunehmen, wenn man bedenkt, dass immer mehr Patienten genetisch auf Mutationen in *MUTYH* getestet werden, deren Krankheitsursache noch unklar ist [6, 30, 96]. Der kolorektale Phänotyp der MAP imitiert den der attenuierten FAP inklusive der Neigung zur Ausbildung proximaler kolorektaler Tumore [97]. Zusätzlich zu Darmpolypen und Darmkrebs treten Magen- und Zwölffingerdarmpolypen bei 11-17% der MAP-Patienten auf. Das Erkrankungsrisiko von Zwölffingerdarmkarzinomen beträgt rund 4%. Für ein erhöhtes Magenkrebsrisiko wurde nur ein statistisch nicht-signifikanter Trend berichtet. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung besitzen MAP-Betroffene ein doppelt so hohes Risiko für extraintestinale Malignitäten. Dazu gehören Eierstock-, Blasen-, Haut- und wahrscheinlich Brustkrebs [98, 99]. Das lebenslange Risiko an CRC zu erkranken beträgt für MAP-Patienten 80% [6] und das Durchschnittsalter bei einer Kolonkarzinomdiagnose liegt bei 48 Jahren. Darmpolypen treten typischerweise bis zum vierzigsten Lebensjahr auf. Patienten können dennoch schon in weit früherem Alter von Polypen und Krebs betroffen sein. In jungen Darmkrebspatienten wurden sogar biallelische Mutationen in *MUTYH* ohne das Auftreten von Polypen gefunden [100]. Des Weiteren wurden in den Tumoren einer großen Anzahl MAP-Patienten somatische GC:TA

Transversionsmutationen im Onkogen *KRAS* entdeckt, welches eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt [101]. Dies deutet darauf hin, dass neben dem *APC*-Gen alle Zielgene von *MUTYH* von Mutationen betroffen sein können, insofern bei *MUTYH* eine Fehlfunktion vorliegt. Die genauen Auswirkungen dieser Fehlfunktion sind Gegenstand aktueller Forschung.

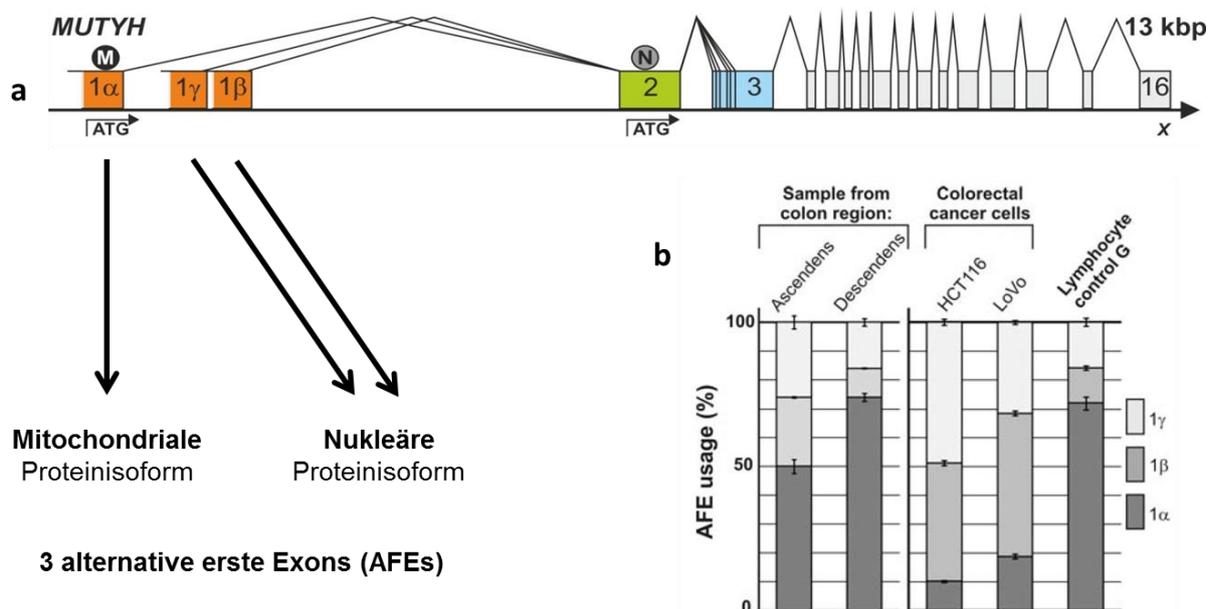
## 1.6 Problemstellung und Zielsetzung des Projekts

### 1.6.1 Transkriptionsregulation von *MUTYH*

Zur Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion werden bestimmte *housekeeping* Gene ständig und andere durch die Beteiligung bestimmter (Transkriptions-)Faktoren bei Bedarf hoch- oder runterreguliert. Nicht bekannt ist jedoch, worüber die Transkription von *MUTYH* reguliert ist. Das humane *MUTYH*-Gen zeigt starkes alternatives Spleißen, wodurch verschiedene Genprodukte entstehen, von denen die biologisch relevanten bekannt sind. So wurden bereits drei alternative erste Exons (Exon 1 $\alpha$ , 1 $\beta$  und 1 $\gamma$ ) identifiziert, die für Proteine mit unterschiedlicher subzellulärer Kompartimentierung kodieren [102–104]. *MUTYH* besteht insgesamt aus 16 regulären Exons, von denen insbesondere zwei Hotspots für alternatives Spleißen darstellen: Exon 1 und Exon 3 (Abbildung 1.7 a). Die drei alternativen ersten Exons (*alternative first exons*, AFEs) kommen von 5' nach 3' in der Reihenfolge  $\alpha$ ,  $\gamma$  und  $\beta$  vor. Das 1 $\alpha$ -Exon enthält eine mitochondriale Lokalisationssequenz [103, 104], während die 1 $\gamma$ - und 1 $\beta$ -AFEs ab Exon 2 translatiert und anhand ihrer Sequenz zielgerichtet in den Nukleus transportiert werden [102, 104]. Exon 3 weist ebenso mehrere Stellen für alternative Spleißvorgänge auf, wodurch bereits mehrere Spleißvarianten von *MUTYH* in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben entdeckt wurden, die zu verschiedenen Proteinisoformen führen [43, 105]. Plotz *et al.* konnten 2012 schließlich einen Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter Transkripte und deren Vorkommen nachweisen.

Demnach ist die *MUTYH*-Expression organabhängig und korreliert mit der Proliferationsaktivität des jeweiligen Gewebes. Die AFEs wurden gewebespezifisch abgelesen: Transkripte der mitochondrialen Proteinisoformen dominierten in Muskelgewebe und Lymphozyten, währenddessen im absteigenden Teil des Kolons, den Hoden und Krebszelllinien die Menge an nukleären Transkripten am höchsten war (Abbildung 1.7 b) [95]. Obwohl eine organspezifische Expression der *MUTYH*-Transkripte nachgewiesen wurde, ist die transkriptionelle Regulation von *MUTYH* vor allem im Hinblick auf die unterschiedliche Isoformenregulation bisher nicht geklärt. Darum sollte der erste Teil des Projekts dazu dienen, mögliche regulative genetische Elemente im *MUTYH*-Promotor und dem Bereich des ersten Exons durch *in silico* Analysen zu identifizieren und mit Hilfe eines eigens dafür entworfenen

*MUTYH*-Promotor-Minigenmodells zu untersuchen. Darüber hinaus sollten ebenso andere Regulationsmechanismen der Transkription, wie epigenetische DNA-Methylierungen, in Betracht gezogen und überprüft werden.



**Abbildung 1.7: Struktur des *MUTYH*-Gens und die Verwendung der drei alternativen ersten Exons.** (a) *MUTYH* besteht insgesamt aus 16 Exons (Vierecke) mit einer Länge von ~13 kb (inklusive ~2 kb Promotorlänge). Alternatives Spleißen tritt vor allem im ersten Exon (orange), welches aus drei alternativen ersten Exons  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  besteht, und Exon 3 (blau) auf. Die Startcodons der Translation (ATG) für die mitochondriale (M) und nukleäre (N) Lokalisationssequenz sind angegeben. (b) *MUTYH* AFE-Nutzung im Kolon und kolorektalen Krebszellen. Die Nutzung der AFEs wurde mittels qPCR in Kolonproben und humanen Kolonkrebszelllinien im Vergleich zu Lymphozyten RNA bestimmt. Verändert nach Plotz *et al.* (Human Mutation, 2012) [95].

### 1.6.2 Einordnung unklarer genetischer Varianten von *MUTYH*

Bei Krebserkrankungen allgemein sowie insbesondere beim Kolonkarzinom kommt der Prävention die höchste Bedeutung zu. Bei der *MUTYH*-assoziierten Polyposis sind biallelisch inaktivierende Keimbahnmutationen im *MUTYH*-Gen zur Auslösung der Krankheit notwendig [92]. Während die klinische Diagnose der familiären adenomatösen Polyposis recht eindeutig ist, reichen klinische Kriterien für eine Diagnose der MAP nicht aus. Da sie in ihrer klinischen Ausprägung sehr der AFAP ähnelt, ist ein Nachweis zweier inaktivierender Mutationen für *MUTYH* als Diagnosestellung unabdingbar [95]. Eine eindeutige Diagnose ist insofern wichtig, als dass Angehörige der Patienten, bei MAP insbesondere die Geschwister, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% betroffen sind, auf entsprechende Keimbahnmutationen getestet werden können [6]. Dadurch können Nicht-Mutationsträger entlastet werden, wohingegen Trägern inaktivierender Mutationen der Zugang zu engmaschigen Vorsorgeuntersuchungen

ermöglicht wird. Dieses Vorgehen senkt das Auftreten von Darmkrebs und verlängert somit die Lebenszeit [106].

Allerdings ergibt sich aus den genetischen Sequenzanalysen beim Test auf Mutationen in *MUTYH* das Problem, dass bei drei Viertel [107] der gefundenen Veränderungen nicht klar ist, ob sie das Gen inaktivieren und somit pathogen sind oder nicht. Diese unklaren genetischen Varianten (*variants of uncertain significance*, VUS) verhindern eine eindeutige Diagnose für die Betroffenen und prädiktive Untersuchungen der Angehörigen. Aus diesem Grund wurde eine interaktive *MUTYH*-Gensequenz-Datenbank ([www.lovd.nl/MUTYH](http://www.lovd.nl/MUTYH)) ins Leben gerufen mit dem Ziel, VUS-Genotyp- und VUS-Phänotypdaten von Patienten weltweit zu sammeln und zu teilen. Somit lassen sich potentielle Konsequenzen analysierter VUS schnell kommunizieren, was für die Klassifizierung und bei der genetischen Beratung von Bedeutung ist [43]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten eine Reihe von *MUTYH*-Varianten auf Proteinebene experimentell untersucht und mit zusammengetragenen *in silico* Daten validiert werden, um eine Beurteilung der Pathogenität zu ermöglichen. Für die Auswahl der Varianten sollte die LOVD-Datenbank und die vorangegangene *in silico* Analyse zur Konservierung des *MUTYH*-Gens genutzt werden. Die zu charakterisierenden Varianten sollten so gewählt werden, dass sie einerseits bereits in vielen Patienten berichtet wurden und sich andererseits in konservierten Regionen des Gens befinden.

Etwas mehr als die Hälfte der unklaren genetischen Varianten liegen außerhalb proteinkodierender Bereiche des Gens [107]. Doch da *MUTYH* starken alternativen Spleißvorgängen unterliegt, deren Regulationsmechanismen noch nicht geklärt sind, sollen Auswirkungen bestimmter ausgewählter VUS außerhalb dieser Bereiche charakterisiert werden, indem ihre Auswirkungen auf die Transkription verschieden gespleißter Produkte des Gens ermittelt werden. Daher sollte zunächst das bereits erwähnte *MUTYH*-Promotor-Minigenmodell zum Einsatz kommen, um bestimmte Patientenvarianten nachzubilden.

Bei der anderen knappen Hälfte [107] der Veränderungen in VUS handelt es sich um *missense* Veränderungen, die einen Austausch einer Aminosäure (AS) zur Folge haben und über das gesamte *MUTYH*-Protein verteilt sind [43]. Die Auswirkungen dieser AS-Austausche auf die Genexpression und Proteinstabilität sind nicht abschätzbar. Für die Beurteilung der Proteinstabilität verschiedener VUS sollte deswegen ein weiterer Vektor, der die komplette *MUTYH*-Sequenz enthält, Verwendung finden und bestimmte *missense* Patientenvarianten nachgebildet werden, um deren Eigenschaften mit dem unveränderten Wildtyp-Protein zu vergleichen. Als weitere Hilfestellung zur Beurteilung und Pathogenitätsklärung der Varianten sollte außerdem ein Strukturmodell des *MUTYH*-Proteins generiert werden, um wichtige, zusätzliche Hinweise zu erhalten. Ziel der Klassifizierung von Patientenmutationen ist es, die Diagnostik der MAP zu verbessern und zielgerichtete Präventionsmaßnahmen für Betroffene und Verwandte zu ermöglichen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

Übliche Laborgeräte, Materialien und Chemikalien sind nicht aufgeführt. Spezielle Geräte sind, neben dem Text zur jeweiligen Methode, mit ausführlicher Gerätebezeichnung in der Übersichtsliste angegeben. Das Firmenverzeichnis befindet sich im Anhang.

#### 2.1.1 Bakterienstämme

*Escherichia coli* One Shot® TOP10 kompetente Zellen (Invitrogen)

Genotyp: F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr<sup>-</sup> hsdRMS<sup>-</sup> mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

*Escherichia coli* XL1-Blue kompetente Zellen (Agilent Technologies)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]

#### 2.1.2 Humane Zelllinien

Zelllinie	#ACC*	Ursprung	Bemerkung
HEK293	305	humane embryonale Nierenzellen	mit Teilen des humanen Adenovirus 5 transfiziert [108]
HEK293T	635	humane embryonale Nierenzellen	exprimiert zusätzlich das SV 40 large T-Antigen [109]; exprimiert kein MLH1 aufgrund von Promotorhypermethylierung [110]
HeLa	57	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	erste, permanent etablierte, humane Zelllinie aus der Patientin Henrietta Lacks [111]
HCT116-MLH0-1	581	humanes Kolonkarzinom	MLH1-defizient; stabil transfiziert mit dem leeren pcDNA3.1-Vektor [112]
HCT116-Chr.2	581	humanes Kolonkarzinom	MLH1-defizient; enthalten zusätzlich Chromosom 2 [113]
LoVo	350	humanes Adenokarzinom des Kolons	
SW480	313	humane Adenokarzinom-Zellen des Kolons	
SW620	ICLC HTL 99015	humane Adenokarzinom-Zellen des Kolons	

\* accession number gemäß CABRI (*Common Access to Biological Resources and Information*)

### 2.1.3 Zugriffsnummern der verwendeten MUTYH-Isoform-Sequenzen (NCBI)

Transkriptvariante	Nukleotid-Zugriffsnummer	Protein-Isoform	Protein Zugriffsnummer	Protein-Größe [AS]
(genomische Sequenz)	NG_008189.1	–	–	–
α5	NM_001128425.1	5	NP_001121897.1	549
β3	NM_001048174.1	4	NP_001041639.1	521

Bei der Benennung von Varianten wird sich auf die bisher längste bekannte Transkriptvariante α5 (NM\_001128425.1) bezogen und nicht mehr auf die früher gebräuchliche, kürzere Transkriptvariante α3 (NM\_001048171.1; 535 AS).

### 2.1.4 Geräte und Materialien

Amersham Protran 0,2 µm Nitrocellulose Membran	GE Healthcare
Cellstar Zellkulturflaschen	groß 175 cm <sup>2</sup> mittel 75 cm <sup>2</sup> klein 25 cm <sup>2</sup> Greiner Bio-One
Detektionsgerät: Molecular Imager GelDoc XR+	Bio Rad
Detektionsgerät: Fusion FX	Vilber Lourmat
Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 200M	Zeiss
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Große Gelkammer: Double Wide	C.B.S.
Kleine Gelkammer: Minigel-Twin (Biometra)	Analytik Jena
LAS-4000 mini Luminescent Image Analyzer	Fuji
Munktell Filterpapier	GE Healthcare
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Photometer DU800	Beckmann Coulter
Sequencer: 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Transblot semidry transfer cell	Bio Rad
Ultraschallgerät: Sonopuls HD 2070	Bandelin
Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems
<b><u>Kits</u></b>	
DNase RQ1 Kit	Promega
DyeEx <sup>®</sup> 2.0 Spin Kit	Qiagen
EpiTect <sup>®</sup> Bisulfite Kit	Qiagen

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
innuCONVERT Bisulfite Basic Kit	Analytik Jena
JETstar 2.0 Plasmid Purification MAXI Kit	Genomed
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen
Venor®GeM Kit	Minerva Biolabs

### 2.1.5 Lösungen, Substanzen und Puffer

#### Gebrauchsfertige Lösungen und Substanzen

5-Aza-2'-desoxycytidin (A3656)	Sigma
DMEM	Gibco
dNTPs (dTTP, dCTP, dGTP, dATP) je 100 mM	Promega
Ethidiumbromid-Lösung	Roth
FBS	Sigma
Immobilon Western Chemiluminescent	
HRP Substrate	Millipore
M-MLV RT 5x Buffer	Promega
PBS	Gibco
PEI (Polyethylenimin, 1 mg/ml)	Polysciences
Penicillin-Streptomycin (100x)	Sigma
peqGreen DNA/RNA Dye	Peqlab
<i>random</i> Hexamer-Primer	Promega
RPMI	Gibco
S-adenosylmethionin (SAM)	New England Biolabs
Trypsin EDTA	Lonza
Trizol (peqGOLD TriFast)	Peqlab

#### Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind bei den entsprechenden Methoden beschrieben. Hier sind nur die häufig verwendeten Puffer aufgeführt:

### **TBS 10x**

NaCl	1 M
Tris	0,1 M
pH	7,5

### **TBS-T**

TBS 10x	10% (v/v)
Tween 20	0,025% (v/v)

### **TE-Puffer**

Tris	100 mM
EDTA	10 mM
pH	8,0

<b>PCR-Puffer</b>	<b>blau A</b>	<b>blau D</b>
Tris	11 mM	11 mM
Ammoniumsulfat	0,75 mM	0,75 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	3,5 mM
pH	8,3	8,3

### **Triton-Lysis-Puffer**

HEPES KOH, pH 7,6	50 mM	
Saccharose	0,27 M	
Triton X-100	1% (v/v)	
EDTA	1 mM	
PMSF	0,8 mM	erst vor Gebrauch hinzufügen
DTT	0,8 mM	erst vor Gebrauch hinzufügen

### Nährmedien für *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die Anzucht von *E. coli* wurde LB-Medium (Roth) verwendet. Zur Herstellung der Agar-Platten wurde LB-Agar (Roth) eingesetzt. Vor Verwendung fand ein Autoklavierschritt statt. Zur Selektion von Transformanten diente Carbenicillin (AppliChem).

### **2.1.6 Antikörper und Enzyme**

Im Folgenden sind alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt.

Name/ Spezifität	Ursprung	Bezeichnung/ Markierung	Firma	Verdünnung	Größe [kDa]
MUTYH (LB-9)	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	1:666	57,5
anti-MYH	Maus	monoklonal (ab55551)	Abcam	1:1000	60
anti-hMLH1	Maus	monoklonal (554073)	BD Biosciences	1:1000	80-85
β-Aktin (I-19)	Ziege	polyklonal (sc-1616)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	42
anti-OGG1	Kaninchen	monoklonal (ab124741)	Abcam	1:10.000	39
anti-SP1	Kaninchen	polyklonal (ab13405)	Abcam	1:10.000	90
anti-TOE1	Kaninchen	monoklonal (ab137056)	Abcam	1:5000	56
GAPDH (6C5)	Maus	monoklonal (sc-32233)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	37
p53 (DO-1)	Maus	monoklonal (sc-126)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	53
anti-Kaninchen	Ziege	HRP (sc-2004)	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	
anti-Maus	Ziege	HRP (sc-2005)	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	
anti-Ziege	Esel	HRP (sc-2020)	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	

\* HRP (*horseradish peroxidase*) – Meerrettichperoxidase

### Restriktionsendonukleasen

BamHI	New England Biolabs
DpnI	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs
HindIII	New England Biolabs
KpnI	New England Biolabs
NruI	New England Biolabs
SpeI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs

### Weitere Enzyme

AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing	Applied Biosystems
CpG MTase (M.SssI)	New England Biolabs
DNase RQ1	Promega
DNA Polymerase I, Large (Klenow)	New England Biolabs
M-MLV RT, RNase H(-) Point Mutant	Promega
Pfu Ultra DNA Polymerase AD	Agilent Technologies
T4 Ligase	New England Biolabs

## 2.1.7 Längenstandards

### DNA-Größenstandards

GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific

### Protein-Größenstandard

Prestained SDS-PAGE Standard, broad range, 8 Banden: 7,1 - 209 kDa	Bio Rad
---	---------

## 2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich bezogen.

### Oligonukleotide für die Konstruktion des *MUTYH*-Promotor-Minigens (siehe 2.2.15):

Restriktionsschnittstellen sind blau, veränderte Basen rot dargestellt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'–3')</b>	<b>Bemerkung</b>
MUTYH-p1-BamHI-F	agt <b>ggatcc</b> acatccactacgggaacctg	BamHI-Schnittstelle
MUTYH-p1-F	acatccactacgggaacctg	
MUTYH-p1-R	<b>ggatcc</b> ataactactgttctc	BamHI-Schnittstelle
MUTYH-p2-F	cttaatatcccacag <b>ggatcc</b>	BamHI-Schnittstelle
MUTYH-p2-R	<b>actagt</b> ccctccgtaaact	SpeI-Schnittstelle
MUTYH-e1-4-F	ttgctcagctat <b>actagttg</b>	SpeI-Schnittstelle
MUTYH-e1-4-R	<b>ctcgag</b> gcccttgggtctgg	XhoI-Schnittstelle
pcDNA3-pAddSpeI	P-gatccggcgctacc <b>actagt</b> ctgcagg	SpeI-Schnittstelle
pcDNA3-pAddSpeI-r	P-aattcctgcag <b>actagt</b> ggtacgccg	SpeI-Schnittstelle
MUTYHExon2-MutF-long	acaacagtcaggccaagcct <b>agcgc</b> ttgtgatg gtaaggaactagg	Einfügen stiller Mutation in Exon 2

MUTYHExon2-MutR-long	cctagttccttaccatcacaagcgctaggcttg gcctgactggttg	Einfügen stiller Mutation in Exon 2
TOE1-ex2fragincl-F	agtagtggtaccgcaaagcaacaacttcaag	Einfügen TOE1; KpnI
TOE1-ex2fragincl-R	actactggtaccaagggagagttgtgacaggc	Einfügen TOE1; KpnI

Oligonukleotide für die Sequenzierung des MUTYH-Promotor-Minigen:

Bezeichnung	*	Sequenz (5'–3')	Sequenzierter Bereich
MUTYH-p1-R	S	aaaagctaccaatggaaacta	vor Beginn Minigen (Plasmidbereich)
MUTYH-p1-F	S	acatccactacgggaacctg	1. Abschnitt ab Beginn Minigen
MYHcDNAalpha-F	E	ctcctcgtggctagttcagg	2. Abschnitt Minigen
MYHcDNA-2-R	O	tgctcgtggcttcctcat	3. Abschnitt Minigen
MUTYH-e2-F	S	ctattggagactagttgtatc	4. Abschnitt Minigen
pcDNA3-BGH-R	Q	tagaaggcacagtcgagg	Letzter Abschnitt Minigen

\*bezogen von (E) Eurofins, (O) Operon, (Q) Qiagen, (S) Sigma

Oligonukleotide für PCR-Schnelltest auf Transkription/Spleißen des Minigen (siehe 2.2.16):

Zur Überprüfung des Spleißens decken die Primer Exon-Exon-Grenzen ab.

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')	Bemerkung
MUTYH 1a-2F	gtcgtctgtgggccaatca	Exon 1α-Exon 2
MUTYH 1g-2F	gctcgcgggaggccaatca	Exon 1γ-Exon 2
MUTYH 1b-2F	gtgggcccgggccaatca	Exon 1β-Exon 2
MUTYH 2R	catcacaggcagaaggc	Exon 2 reverse
MUTYH 4-3R	cttctgcccgtcttctcc	Exon 4-3 reverse
MUTYH 2-3R-Mut	caggccatcacaagcgct	Exon 2-3 reverse inklusive Markierung
MUTYH 2-3R-Mut-a	caggccatcacaagcgc	Exon 2-3 reverse inklusive Markierung -a
MUTYH 2-3R-wt	caggccatcacaggcaga	Exon 2-3 reverse ohne Markierung
MUTYH 2-3R-wt-t	caggccatcacaggcag	Exon 2-3 reverse ohne Markierung -t

Oligonukleotide für das Einführen von Mutationen in die Minigen-Sequenz (siehe 2.2.17):

Die Bezeichnungen der Oligonukleotide entsprechen den Nummerierungen der Varianten. Die veränderten Basen sind rot dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')	Bemerkung
MUTYH-Minigen-0	tgagctccagactatgtatgatgccaatgcctccatc	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-01	ctcccaacgctccataccgctacagccggagccgc	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-1	tgcagccggagcctatggataacaacggaactt	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-2	tacaacggaacttcagtaactcctcgtggct	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-3	cctcgtggctagtttaggcggaaggag	Patienten Variante 165 C>T
MUTYH-Minigen-4	ggctagttcaggcatgaggagcagtcctct	Transkriptionsstart
MUTYH-Minigen-5	gaactatgagccctcttaacttcccctctccc	hochkonserviert

## Material und Methoden

---

MUTYH-Minigen-6	ccagagcgcagaagctttgaaggctacc	Patienten Variante G>A
MUTYH-Minigen-7	agagcgcagaggctgcataggctacctctggg	CHR Motiv
MUTYH-Minigen-8	acctctgggaagccctcaccgctcggaag	Patienten Variante G>C
MUTYH-Minigen-9	tgggtacgctggaattgCGgtccgtctc	Patienten Variante C>T
MUTYH-Minigen-9a	gggtacgctggaagcgtatgctccgtctcctggc	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-10	cagtcggggatgagcgggggtctcgccg	Patienten Variante G>A
MUTYH-Minigen-10a	aggcagtcggggatcggctaaggctctcgccgtcgg	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-11	ctcgccgctcgggtgcccgatgggtcgaa	Patienten Variante C>G
MUTYH-Minigen-11a	gtcgccgatgggtcgatgattagttcagacgtcccgg	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-11b	cggggaaggcagcctggtatctagtaattgcctattggc	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-12	cgggtggaccgagttaaccacctggagtgcgc	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-13	gccgggCGcgtactgctcgCGggaggta	hochkonserviert
MUTYH-Minigen-14	agagctcgCGgtcgtaattctttctctc	Transkription 1β Start

### Oligonukleotide für die Sequenzierung zur Überprüfung der ins Minigen eingeführten Mutationen:

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')	Bemerkung
pcDNA3-MYH-SeqFor	caactattactactaacc	liegt 18 bp vor Variante 0
pcDNA3-MYH-SeqFor2	cagtgcacccacaccagag	liegt 99 bp vor Variante 0

Oligonukleotide für das Einführen von Mutationen in das MUTYHbeta3-Plasmid (siehe 2.2.17):  
Die Bezeichnungen der Oligonukleotide entsprechen den resultierenden Aminosäureaustauschen. Das Codon mit den veränderten Basen ist rot dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')
MUTYH-Val22Met	cacgagcagccatgggaagtgggtca
MUTYH-Trp103Arg	gagcctgctaagccggtacgaccaagag
MUTYH-Arg109Trp	gaccaagagaaaaggacctaccatg
MUTYH-Trp131Arg	gcatatgctgtgagggtctcagaggtc
MUTYH-Pro157Leu	atgcagaagtggcttacactgcaggac
MUTYH-Tyr179Cys	ggctggcctgggtgctattctcgtggcc
MUTYH-Arg182His	gggtactattctcatggccggcggtg
MUTYH-Arg185Trp	tctcgtggccggtggctgcaggaggag
MUTYH-Val215Met	ctcctgctggcatggggcgtacacag
MUTYH-Ile223Val	gcgtacacagctggggcgttcctctatcgcccttggc
MUTYH-Asp236Asn	accggtgtggtgaatggcaacgtagca

MUTYH-Arg241Gln	ggcaacgtagcaggtgctgtgccgtgt
MUTYH-Arg245His	cgggtgctgtgcatgtccgagccatt
MUTYH-Gly250Asp	gtccgagccattgatgctgatcccagca
MUTYH-Ala266Gly	agcagctctggggtctaggccagcagctggtggaccc
MUTYH-Arg274Trp	tgggtgaccagcctggccaggagatttca
MUTYH-Met283Val	aaccaagcagccgtggagctagggcca
MUTYH-Pro295Leu	acccacagcgcctactgtgcagccagt
MUTYH-Arg309Cys	ctgtgccgggcatggccagagagtggag
MUTYH-Gln338His	tcccaactggaactgtgccacctgtgcc
MUTYH-Pro359Leu	agtggccaacttctcagaaaggccagc
MUTYH-Arg364Cys	agaaaggccagctgcaagccccccagg
MUTYH-Ala373Val	ggaggagagctctgtcacctgtgttctgg
MUTYH-Gly396Asp	gaggcccaactcagatctgctggcagga
MUTYH-Pro405Leu	ctgtgggagttctgtccgtgacctggg
MUTYH-Arg426Cys	gcaggaactacagtgttgggctgggccc
MUTYH-Arg474Pro	gtaccaccaggtgctcctggctgacgcaggag
MUTYH-Ala489Thr	cagctgtttccaccaccatgaaaaaggtt
MUTYH-Val493Phe	ccgcatgaaaaagtgtttccgtgtgtatc
MUTYH-Ser515Phe	tcccaggtgtccttccgtgcagtcgga
MUTYH-Leu529Met	ggccagcaagtcattggataatttctttcg

Oligonukleotide für die Sequenzierung zur Überprüfung der eingeführten Mutationen in die MUTYH-Sequenz:

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')	Bemerkung
pcDNA3-T7-For	taatacgactcactataggg	
pcDNA3-BGH-R	tagaaggcacagtcgagg	Qiagen

Oligonukleotide für die Sequenzierung zur Überprüfung der eingefügten PCR-Produkte in den TOPO-Vektor:

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')	Bemerkung
M13 Forward	gtaaaacgacggccag	Invitrogen
M13 Reverse	caggaaacagctatgac	Invitrogen

Oligonukleotide und Sonden für die quantitative *real-time* PCR (siehe 2.2.20):

Oligonukleotide und Sonden wurden von *Applied Biosystems* als Sonden-TaqMan-Assay in einem Mix geliefert. Der Fluoreszenzfarbstoff FAM der Sonden befindet sich 5', Quencher 3'.

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')
MLH1	agagaggacctacttccagcaa (F) atcttccaccatttccacatcagaa (R)

	cccagaaagagacatc (Sonde)
MYHalpha-1a2 (NM_001128425.1)	ctcgtctcccgcctgag (F) gctgctcgtggcttct (R) tcgtctgtgggcatca (Sonde)
MYHbeta-1bw2 (NM_001048174.1)	cgtgttctgctgtcttcatcag (F) gctgctcgtggcttct (R) ccgcgggcatcat (Sonde)
MYHgamma1g2a (NM_001048173.1)	ccgggcgcgctagag (F)* cctgcttctgtgaccacttc (R) ccatcatgaggaagccac (Sonde)
MYH-ALL-1516	cgtgtgtatcaggccaaca (F) cggagaggacacctggga (R) ttttggaaccatacaggtcc (Sonde)
Human GAPDH (NM_002046.3)	Assay ID: Hs99999905_m1
CDKN1A (p21)	Assay ID: Hs00355782_m1
TOE1GP	Assay ID: AJGJQPL

\*gamma forward Primer liegt auf Variante 13

Oligonukleotide für die methylierungsspezifische PCR nach Bisulfit-Behandlung (2.2.14):

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')	Bemerkung
MUTYHmeth-A345-F	tgaagtttgaggagtttttaga	enthält 36 mögliche CpG-Methylierungsstellen
MUTYHmeth-A345-R	acaacacaaaccaataaacaat	
MUTYHmeth-B348-F	taattgtttattggtttgtgttg	enthält 26 mögliche CpG-Methylierungsstellen
MUTYHmeth-B348-R	aaaatcactaaactctccatcc	

**2.1.9 Plasmide**

Name	Charakteristika	Referenz
MUTYH-Promotor-Minigen	Ausgangsvektor: pcDNA3; CMV-Promotor entfernt; enthält putative Promotorregion von <i>MUTYH</i> und Exons 1-4; Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz	diese Arbeit
pcDNA3-MUTYH $\beta$ 3	Kodierende Sequenz der <i>MUTYH</i> $\beta$ 3-Isoform im Expressionsvektor pcDNA3; <i>MUTYH</i> steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors; Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz	Dr. Guido Plotz [95]
pCR2.1-TOPO	Einklonierung von PCR-Produkten unter der Kontrolle des <i>T7</i> -Promotors; enthaltenes <i>LacZ</i> $\alpha$ -Fragment ermöglicht blau/weiß-Selektion der Bakterienkolonien; Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz	Invitrogen
pGEX-4T-1-MUTYH $\alpha$ 3	Kodierende Sequenz der $\alpha$ 3-Isoform von <i>MUTYH</i> in bakteriellem Expressionsvektor pGEX-4T-1;	Ali <i>et al.</i> [114]

	Ampicillin/ Carbenicillin-Resistenz; addiert einen N-terminalen GST-tag	
pCMV-p53	Enthält kodierende <i>p53</i> Wildtyp Sequenz unter Kontrolle des CMV-Promotors; Kanamycin-Resistenz	Clontech, [115]
pCMV-p53mt135	Wie oben, aber enthält eine dominant-negative Mutation in <i>p53</i> , welche die normale <i>p53</i> Aktivität blockiert; Kanamycin-Resistenz	Clontech, [115, 116]
pCMV-SP1	Kodierende Sequenz von <i>SP1</i> in modifiziertem Expressionsvektor pBluescript unter Kontrolle des CMV-Promotors; AS 1-87 deletiert; Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz	Robert Tjian; Addgene Plasmid #12097
pEBGN-SP1	Kodierende Sequenz von <i>SP1</i> (AS 592-758) im Expressionsvektor pEBG-NLS; Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz	Prof. Dr. Gerald Thiel [117]
pEBG-NLS	Eukaryotischer GST-Expressionsvektor; kodiert <i>S. japonicum</i> GST unter der Kontrolle des Elongationsfaktors (EF-1 $\alpha$ ) Promotors; enthält eine Kernlokalisationssequenz (NLS) abgeleitet aus dem <i>SV40 large T antigen</i> ; Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz	Prof. Dr. Gerald Thiel [117]

#### Plasmide für die Expression von MUTYH *missense* Varianten:

Alle diese Plasmide basieren auf dem Plasmid pcDNA3-MUTYH $\beta$ 3. Der Basenaustausch, der zur Veränderung der Aminosäure führt, ist aufgelistet.

Name	AS-Austausch (NP_001121897.1)	Basenaustausch	Referenz
MUTYH-SDM-22	Val22Met	c.64G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-103	Trp103Arg	c.307T>C	diese Arbeit
MUTYH-SDM-109	Arg109Trp	c.325C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-131	Trp131Arg	c.391T>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-157	Pro157Leu	c.470C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-179	Tyr179Cys	c.536A>G	diese Arbeit
MUTYH-SDM-182	Arg182His	c.545G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-185	Arg185Trp	c.553C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-215	Val215Met	c.643G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-223	Ile223Val	c.667A>G	diese Arbeit
MUTYH-SDM-236	Asp236Asn	c.706G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-241	Arg241Gln	c.722G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-245	Arg245His	c.734G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-250	Gly250Asp	c.749G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-266	Ala266Gly	c.797C>G	diese Arbeit
MUTYH-SDM-274	Arg274Trp	c.820C>T	diese Arbeit

MUTYH-SDM-283	Met283Val	c.847A>G	diese Arbeit
MUTYH-SDM-295	Pro295Leu	c.884C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-309	Arg309Cys	c.925C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-338	Gln338His	c.1014G>C	diese Arbeit
MUTYH-SDM-359	Pro359Leu	c.1076C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-364	Arg364Cys	c.1090C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-373	Ala373Val	c.1118C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-396	Gly396Asp	c.1187G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-405	Pro405Leu	c.1214C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-426	Arg426Cys	c.1276C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-474	Arg474Pro	c.1421G>C	diese Arbeit
MUTYH-SDM-489	Ala489Thr	c.1465G>A	diese Arbeit
MUTYH-SDM-493	Val493Phe	c.1477G>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-515	Ser515Phe	c.1544C>T	diese Arbeit
MUTYH-SDM-529	Leu529Met	c.1585C>A	diese Arbeit

Plasmide für die Expression der *MUTYH*-Promotor-Minigen Varianten:

Die nachfolgenden Plasmide basieren auf dem *MUTYH*-Promotor-Minigen. Die veränderten Basen sind im Vergleich zur Originalsequenz grün dargestellt.

#	Name	Variante Beschreibung (NG_008189.1)	Quelle	Originalsequenz/ Basenaustausch	Referenz
0	MUTYH- Minigen- SDM-0	g.4948_4955delinsTGTA TGAT	Konserviertes Motiv (CAnCtCCC)	catctccc tgtatgat	diese Arbeit
01	MUTYH- Minigen- SDM-01	g.4993_5000delinsTACC GCTA	Konserviertes Motiv (GgnTttnG)	ggcttttg taccgcta	diese Arbeit
1	MUTYH- Minigen- SDM-1	g.5012_5017delinsTATG GA	Konserviertes Motiv (GCGnTG)	gcggtg tatgga	diese Arbeit
2	MUTYH- Minigen- SDM-2	g.5031_5035delinsCAGT A	Konserviertes Motiv (GTAGT)	gtagt cagta	diese Arbeit
3	MUTYH- Minigen- SDM-3	g.5052C>T; c.-165C>T LOVD-ID MUTYH_00083	Humane Variante einer CRC Familie [118]	tca tta	diese Arbeit
4	MUTYH- Minigen- SDM-4	g.5057_5060delinsATGC	Konserviertes Motiv (GgaA)  Translationsstart Exon 1α	ggaa atgc	diese Arbeit
5	MUTYH- Minigen- SDM-5	g.5106_5110delinsTCTTA	Konserviertes Motiv (GAGGC)	gaggc tctta	diese Arbeit

6	MUTYH- Minigen- SDM-6	g.5134G>A, c.-83G>A dbSNP-rs28372898 LOVD-ID MUTYH_00229	Humane Variante	ggc agc	diese Arbeit
7	MUTYH- Minigen- SDM-7	g.5138_5141delinsGCAT	Konserviertes Motiv (TtnA)	tttgaa tgcata	diese Arbeit
8	MUTYH- Minigen- SDM-8	g.5161G>C; c.-56G>C LOVD-ID MUTYH_00011	Humane Variante einer Familie mit kolorektaler Polyposis [119]	gct cct	diese Arbeit
9	MUTYH- Minigen- SDM-9	g.5263C>T, c.36+11C>T dbSNP-rs2275602 MUTYH_00003	Humane Variante [121, 122]	ctt ttt	diese Arbeit
9a	MUTYH- Minigen- SDM-9a	g.5263_5268delinsAGCG TA	Konserviertes Motiv (CTTgcG)	cttgcg agcgta	diese Arbeit
10	MUTYH- Minigen- SDM-10	g.5306G>A, c.36+54G>A dbSNP-rs17838009 LOVD-ID MUTYH_00230	Humane Variante	ggc agc	diese Arbeit
10a	MUTYH- Minigen- SDM-10a	g.5304_5310delinsCGGC TAA	Konserviertes Motiv (GggGCGG)	ggggcgg cggctaa	diese Arbeit
11	MUTYH- Minigen- SDM-11	g.5327C>G, c.36+75C>G dbSNP-rs3219467 LOVD-ID MUTYH_00020	Humane Variante	tcg tgg	diese Arbeit
11a	MUTYH- Minigen- SDM-11a	g.5341_5346delinsTGAT TA	Konserviertes Motiv	aacttcc atgatta	diese Arbeit
11b	MUTYH- Minigen- SDM-11b	g.5387_5393delinsTATCT AG	Konserviertes Motiv	gcgcgcgct gtatctagt	diese Arbeit
12	MUTYH- Minigen- SDM-12	g.5444_5450delinsTTAA CCA	Konserviertes Motiv (CcaCGcC)	ccacgcc ttaacca	diese Arbeit
13	MUTYH- Minigen- SDM-13	g.5483_5484delinsCT	Konserviertes Motiv (taGA)	ga ct	diese Arbeit
14	MUTYH- Minigen- SDM-14	g.5494_5495delinsTC	Konserviertes Motiv (AGGTAA)	ag tc	diese Arbeit

### 2.1.10 Software und Programme

Standardprogramme und Software der einzelnen Geräte, soweit sie nicht der Auswertung dienen, sind nicht aufgeführt.

BiAS v10.12	Epsilon
BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5	Tom Hall
FinchTV v1.4.0	Geospiza Inc.
Fusion Capt Advance Solo 4 16.07	Vilber Lourmat
GraphPad Prism v5.04 for Windows	GraphPad Software
Image Lab Software	Bio Rad
Multi Gauge v3.2	Fuji
PyMOL Molecular Graphics System v1.4.1	Schrodinger LLC
StepOne Software v2.0	Applied Biosystems
NEBcutter v2.0 ( <a href="http://nc2.neb.com/NEBcutter2/">http://nc2.neb.com/NEBcutter2/</a> )	
Reverse Complement ( <a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a> )	

### 2.1.11 Datenbanken

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)  
Clustal Omega Sequence Alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)  
ConSeq Server (<https://conseq.tau.ac.il/index.html>)  
LASAGNA-Search 2.0: Searching for transcription factor binding sites ([http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna\\_search/](http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/))  
Leiden Open Variation Database (<http://www.LOVD.nl>)  
National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)  
PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)  
PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)  
RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)  
SIFT ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html))  
The UMD-MUTYH mutations database (<http://www.umd.be/MUTYH/>)

## 2.2 Methoden

Alle in dieser Arbeit beschriebenen gentechnischen Arbeiten sind nach der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) des Gentechnikgesetzes und der Gentechnik-sicherheitsverordnung vom 01.07.1990 durchgeführt worden.

## 2.2.1 Zellkultur

### Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Diese besteht aus 3 x 3 Großquadraten, wobei jedes Quadrat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> besitzt. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt dies ein Volumen von 0,1 µl. Für die Zellzahl-Bestimmung wurden vier der großen Eckquadrate ausgezählt und gemittelt. Anhand des definierten Volumens lässt sich so die Konzentration der Zellsuspension bestimmen.

### Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien HCT116-Chr2, HCT116-MLH0-1, HEK293, HEK293T, LoVo, SW480 und SW620 wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco), wohingegen HeLa-Zellen in RPMI 1640 (Gibco) Medium kultiviert wurden. Zusätzlich waren die Medien mit Penicillin und Streptomycin (100x, Sigma) und 10% FCS (*fetal calf serum*, fötales Kälberserum, Sigma) versetzt. Bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt wuchsen die verschiedenen Krebszelllinien adhärent in Schalen und Flaschen von Greiner und Sarstedt heran. Nach Erreichen von etwa 90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Das Kulturmedium wurde von den Zellen abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1-3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma) bei 37°C ca. 5 min im Zellkulturschrank inkubiert. Wenn sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurden sie im entsprechenden Medium mit Zusätzen resuspendiert. Die Zugabe des Mediums stoppt die Reaktion des Trypsins. Durch anschließende Zentrifugation (1 min, 1000 g) wurden die Zellen pelletiert, in frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

Unter Verwendung des Venor®GeM Kit (Minerva Biolabs) wurden die Zellen alle vier Wochen mittels PCR auf den Befall mit Mycoplasmen untersucht.

## 2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für eine große Kulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) wurden 9 ml Einfriermedium hergestellt. Dazu wurden 7,2 ml Normalmedium mit 1,8 ml DMSO (20% Volumenanteil) vermischt. In zehn verschraubbare 1,8 ml Kryotubes (Nunc™) wurden jeweils 0,9 ml Einfriermedium vorgelegt. Die einzufrierenden Zellen wurden mit PBS gewaschen, 5 min mit Trypsin bei 37°C inkubiert, anschließend in entsprechendem Medium aufgenommen und in 15 ml Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (1 min, 1000 g) wurde das Medium entfernt und die Zellen in 9 ml Normalmedium resuspendiert. Je 0,9 ml der Zellsuspension wurden zu jedem Kryotube zugefügt und direkt auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Ansätze für 24 h bei -80°C eingefroren bevor sie zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad erwärmt und danach in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium in einem 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (2 min, 500 g), der Überstand abgenommen, in 10 ml Medium aufgenommen und in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) gegeben.

### 2.2.3 Transiente Transfektion mit PEI (Polyethylenimin)

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in humane Zellen wurden diese etwa 3 h vor der Transfektion in Zellkulturschalen ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 50-60%. Die Transfektionsansätze waren wie folgt:

- 10 cm Schalen: 9 ml Kulturmedium + 1 ml Transfektionsmix (5 µg Plasmid-DNA, 20 µl PEI, x µl Medium ohne Zusätze)
- 6 cm Schalen: 4,5 ml Kulturmedium + 0,5 ml Transfektionsmix (2,5 µg Plasmid-DNA, 10 µl PEI, x µl Medium ohne Zusätze)
- Sixwells: 2 ml Kulturmedium + 220 µl Transfektionsmix (1 µg Plasmid-DNA, 5 µl PEI, x µl Medium ohne Zusätze)

Nach Ansetzen des Transfektionsmix wurde dieser gevortext und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde er tröpfchenweise zu den ausgesäten Zellen gegeben. Bei der Transfektion mit zwei unterschiedlichen Plasmiden wurde jeweils die halbe Menge Plasmid-DNA eingesetzt, sodass die Gesamtkonzentration der Plasmid-DNA gleich blieb. Nach 24 oder 48 h wurden die Zellen schließlich für Protein- oder RNA-Isolation geerntet.

### 2.2.4 5-Aza-2'-Desoxycytidin-Behandlung

5-Aza-2'-desoxycytidin (Aza) ist ein Methyltransferase-Inhibitor, der nach der Zellteilung eine *de novo* Methylierung der DNA verhindert [120]. Deshalb können durch Promotor-Hypermethylierung zuvor inaktivierte Gene aufgrund der fehlenden Methylierung reaktiviert werden.

Für die Behandlung mit Aza wurden die in Kultur gehaltenen Zellen der Linien HCT116-Chr2, HCT116-MLH0-1, HEK293, HEK293T, HeLa, LoVo, SW480 und SW620 eingesetzt. Zu Beginn wurden die Zellen in 10 cm Schalen auf etwa 20% Plattenbewuchs gesplittet und anschließend über einen Zeitraum von 4 Tagen täglich mit 0 µM, 10 µM oder 15 µM Aza behandelt. Da Aza in DMSO gelöst ist, wurde zur Negativkontrolle (0 µM) DMSO gegeben. Die erste Aza-Behandlung fand vier Stunden nach dem Auslegen der Zellen statt. Alle 24 Stunden wurde Aza fortan erneut zu den Zellen gegeben, wobei auch das Medium gewechselt wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und eine RNA- sowie Proteinisolation durchgeführt.

### **2.2.5 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)**

Unter Einsatz von Standard-Phlebotomie-Techniken wurde Blut direkt in ein Ficoll-Röhrchen (BD Vacutainer® CPT™, BD Biosciences) abgenommen. Dies ist ein geschlossenes System zur Separation mononukleärer Zellen aus dem Blut. Während der Dichtegradientenzentrifugation (20 min, 1500 g) bildet das Ficoll-Gel eine physikalische Barriere zwischen den mononukleären Zellen des Blutplasmas und den Erythrozyten und Granulozyten. Der Überstand, bestehend aus der separierten, aufkonzentrierten, mononukleären Zellsuspension, wurde dann in ein 15 ml Röhrchen überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 1000 g) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Kultur genommen oder weiter zur DNA-Isolation verwendet.

Zur Aufnahme der mononukleären Zellen des peripheren Blutes in Kultur wurde das Zellpellet zweifach mit PBS gewaschen und zwischendurch für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Mit Hilfe einer Pipette wurden die Zellen in 7 ml RPMI-1640 (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin enthaltend) in eine kleine Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt. Die Inkubation fand wie bei den Krebszelllinien bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% statt.

### **2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie**

Die GFP-Fluoreszenz der Transfektionen wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss) mit zugehöriger Kamera und Software (AxioVision 3.1) beobachtet. Die Anregung erfolgte durch eine UV-Lampe.

### **2.2.7 DNA-Isolation aus kultivierten PBMC und Zelllinien**

Für die Aufreinigung von DNA aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und kultivierten Zellen wurde das *QIAamp® DNA Mini Kit* (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben verwendet. Die Konzentrationsbestimmung fand am *NanoDrop* ( $A_{260/280}$ : 1,8 - 2,0) statt.

### **2.2.8 *In vitro* DNA-Methylierung**

Die *in vitro* DNA-Methylierung wurde mit DNA des *MUTYH*-Promotor-Minigen durchgeführt. Unter Einsatz der Sssl-Methyltransferase wird bei dieser Methode die Methylierung der Cytosin-Basen an der C5-Position des Pyrimidinrings katalysiert, sofern sich die Cytosine innerhalb der doppelsträngigen Dinukleotidkennungssequenz 5'-CpG-3' befinden. Die *in vitro* methylierte *MUTYH*-Promotor-Minigen-DNA kam als Positivkontrolle für die Methylierungsanalysen mittels Sequenzierung zum Einsatz. Ein Ansatz ohne Sssl-Methyltransferase wurde zusätzlich mitgeführt.

### **Reaktionsansatz**

Aqua dest.	x µl
Puffer 2 10x	2 µl
SAM (1600 µM; Methyl donor)	2 µl
SssI Methylase (4 U/µl)	1 µl
DNA	1 µg
<hr/>	
Gesamtvolumen	200 µl

Der Ansatz wurde gevortext und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 20 min gestoppt. Es erfolgte die Zugabe von 10 µl TE-Puffer.

### Phenol/Chloroform-Extraktion

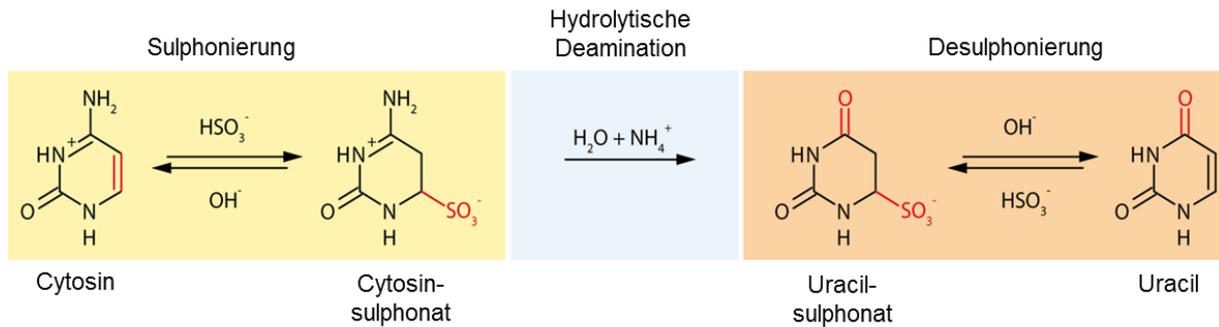
Nach Zugabe von 30 µl Phenol (Verhältnis 1:1) wurden die Proben für 2-3 min invertiert und gevortext. Die Phasenauffrennung fand nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei 20.000 g statt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 30 µl Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt und wiederum für 2-3 min invertiert und gevortext. Nach dem nächsten Zentrifugationsschritt (3 min, 20.000 g) wurde die obere, wässrige Phase nochmals in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

### DNA-Fällung

Durch die Zugabe von 3 M Natriumacetat (pH 5,2; 1/10 des bisherigen Gesamtvolumens) und 100% Ethanol (2,5x des bisherigen Gesamtvolumens) wurde die DNA nach kurzem vortexen bei -20°C für 10-30 min gefällt. Die darauffolgende Zentrifugation (10 min, 20.000 g) fand bei 4°C statt. Der Überstand wurde anschließend entfernt und das DNA-Pellet in 100 µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde abermals für 3 min bei 20.000 g (4°C) zentrifugiert und das Ethanol verworfen. Schließlich erfolgte die Lufttrocknung des Pellets und Aufnahme in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O. Zum Lösen des DNA-Pellets wurden die Proben schüttelnd bei 37°C für 10 min inkubiert, ehe die Konzentration am *NanoDrop* bestimmt wurde.

## **2.2.9 Bisulfit-Behandlung der DNA**

Die Behandlung der DNA mit Bisulfit diente der Methylierungsanalyse. Hierbei werden die Stränge der zuvor isolierten DNA denaturiert, sodass einzelsträngige Cytosine durch die katalytische Wirkung von Bisulfit (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) hydrolytisch zu Uracilen deaminiert werden (Abbildung 2.1). 5-Methylcytosine werden hingegen nicht umgewandelt und bleiben erhalten. Auf diese Weise kann man unmethylierte, jetzt zu Uracil umgewandelte und methylierte Cytosine anhand der Sequenzabfolge unterscheiden. Führt man daraufhin zusätzlich eine PCR durch, so erhält man an der früheren Stelle eines unmethylierten Cytosins ein Thymin, während aus methylierten Cytosinen herkömmliche, unmethylierte Cytosine werden [123].



**Abbildung 2.1: Chemischer Ablauf der Bisulfitreaktion.** Wie von Shapiro *et al.* 1973 [124] beschrieben, erfolgt im ersten Schritt die Sulphonierung des Cytosins zu Cytosinsulphonat. Im zweiten Schritt wird Cytosinsulphonat hydrolytisch zu Uracilsulphonat deaminiert. Im letzten Schritt entsteht durch eine Desulphonierung schließlich Uracil. (Verändert nach Tollefsbol [125].)

Die Bisulfitkonversion und anschließende Aufreinigung der DNA wurde mit Hilfe des *EpiTect® Bisulfite Kit* von Qiagen durchgeführt.

### 2.2.10 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Behandlung von Zellen

Um oxidativen Stress in Zellen auszulösen wurden HEK293- und HeLa-Zellen mit Wasserstoffperoxid behandelt. Dazu erfolgte die Inkubation der in Kultur bei 37°C gehaltenen Zellen für 40 min mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen wieder in Normalmedium aufgenommen. Nach entweder 5 h oder 18 h fand die Zellernte für RNA- oder Proteinisolierung statt.

### 2.2.11 RNA-Isolation

Die als *monolayer* wachsenden Zellen wurden aus einer 6 cm Schale (~20 cm<sup>2</sup>) wie folgt geerntet. Bei größeren Schalen wurden die Volumina entsprechend angepasst.

#### Zellernte

Zu Beginn wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml frischem PBS mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst oder mit der Pipette abgespült und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (1000 g, 1 min) wurden die Zellen pelletiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Trizol resuspendiert. Eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min fand statt.

#### RNA-Fällung

Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben für 15 s gevortext. Anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert (12.000 g, 15 min, 4°C) und der klare Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 500 µl 100%

Isopropanol zu jeder Probe gegeben, kurz gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 12.000 g, 4°C) wurde der Überstand komplett abgenommen und das Pellet in 150 µl 75% Ethanol gewaschen (kurz vortexen). Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin für 5 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert, das Ethanol vollständig abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur 2-5 min getrocknet.

### Elution

Die isolierte RNA wurde schließlich in 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und schüttelnd bei 55°C für 10 min gelöst. Danach wurde die RNA-Konzentration ( $A_{260/280}$ : 1,6 - 2,0) am *NanoDrop* bestimmt und die RNA bei -80°C gelagert.

### **2.2.12 DNase-Behandlung der RNA**

Um DNA-Verunreinigungen in den RNA-Proben auszuschließen, erfolgte eine DNase-Behandlung. Hierfür wurden 2 µg RNA verwendet. Im Folgenden ist der Ansatz für den DNase-Verdau aufgeführt:

#### **DNase-Verdau**

RNA	2 µg
Aqua dest.	x µl
DNase RQ1 Puffer 10x	1 µl
DNase RQ1	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Der 10 µl Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 1 µl *stop solution* und die Inaktivierung der DNase bei 65°C für 10 min. Der Erfolg der DNase-Behandlung wurde mittels PCR überprüft.

### **2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Messung der RNA- und DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm mit dem *NanoDrop 2000* Spektrophotometer (PeqLab). Zudem geben die Zahlenverhältnisse 260/280 nm und 260/230 nm Auskunft über die Reinheit der Proben. Ein  $A_{260/280}$  Verhältniswert von 1,8 für DNA und 2,0 für RNA gilt generell als rein. Falls der Verhältniswert geringer ausfällt, ist dies ein Zeichen für Protein-, Phenol- oder andere Verunreinigungen, die nahe 280 nm absorbieren. Der  $A_{260/230}$  Verhältniswert liegt meist höher in einem Bereich von 2,0 - 2,2. Falls dieser Wert niedriger ist, ist das ein Hinweis für Kontaminanten, die bei 230 nm absorbieren.

### 2.2.14 Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der methylierungsspezifischen PCR handelt es sich um die PCR, welche mit der Bisulfit-behandelten DNA (BS-DNA) vor der Einklonierung in den Topo-Vektor mit anschließender Sequenzierung zur Bestimmung des Methylierungsgrades durchgeführt wurde. Die eingesetzten methylierungsspezifischen Primer sind unter 2.1.8 aufgelistet. Nach der PCR-Reaktion wurden 5 µl des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel (siehe 2.2.22) aufgetragen, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Die PCR-Produkte wurden anschließend für die Topo-Klonierung oder direkte Sequenzierung mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* von Roche aufgereinigt.

#### Reaktionsansatz

Aqua dest.	x µl
BS-DNA	200 - 400 ng
AmpliTaq Gold (hot start)	0,25 µl
PCR-Puffer schwarz D	5,0 µl
dNTP Mix (je 2,5 mM)	2,5 µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

#### Programm

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	7 min	1 (Taq-Aktivierung)
95°C	30 sek	} 60
60°C	30 sek	
72°C	2 min	
72°C	5 min	1

### 2.2.15 PCR für die Konstruktion des *MUTYH*-Promotor-Minigens

Um das Minigen mit dem Promotorbereich von *MUTYH* herzustellen, wurde eine PCR zur Amplifikation der einzuklonierenden Promotorbereiche, sowie der ersten vier Exons durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.8 zu finden. Die eingesetzte genomische DNA (gDNA) wurde aus Lymphozyten einer gesunden Person isoliert.

**Reaktionsansatz**

Aqua dest.	11 µl
gDNA	1,0 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
PCR-Puffer blau A	5,0 µl
dNTP Mix (je 2,5 mM)	2,5 µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

**Programm**

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	1 min	1
95°C	15 sek	} 50
55°C	15 sek	
72°C	5 min	
72°C	6 min	1

**2.2.16 Test-PCR auf Transkription/Spleißen des *MUTYH*-Promotor-Minigens**

Zur Prüfung der Primerspezifität für die gespleißten Minigentranskripte wurde eine Test-PCR mit den gewonnenen cDNAs für jedes der AFEs durchgeführt. Die Primer (siehe 2.1.8) wurden so gewählt, dass sie jeweils Exon-Exon-Grenzen abdecken, um die Funktionalität des Spleißens sicherzustellen. Der *reverse* Primer enthält zusätzlich die in das Minigen eingefügte Markierung.

**Reaktionsansatz**

Aqua dest.	8,6 µl	
cDNA	1,0 µl	
Taq-Polymerase	0,4 µl	
PCR-Puffer blau B	4,0 µl	
dNTP Mix (je 2,5 mM)	2,0 µl	
<i>forward</i> Primer (10 µM)	2,0 µl	MUTYH 1a-2F, 1g-2F, 1b-2F
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	2,0 µl	MUTYH 2-3R-Mut-a
Gesamtvolumen	20 µl	

**Programm**

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	2 min	1
95°C	30 sek	} 45
55°C	30 sek	
72°C	1:30 min	
72°C	5 min	1

**2.2.17 Mutagenese-PCR**

Für die Herstellung der unklaren Varianten von *MUTYH* wurden Punktmutationen bzw. im Minigen auch mehrere veränderte Basen über eine PCR in die entsprechenden Plasmide eingefügt. Nach einem anschließenden Restriktionsverdau des Template-Vektors mit DpnI erfolgte die Transformation in *E. coli XL1 Blue* Bakterien. Die verwendeten Mutagenese-Primer sind unter 2.1.8 aufgeführt.

**Reaktionsansatz**

Aqua dest.	x µl
Plasmid-DNA	25 ng
Pfu Ultra DNA Polymerase AD	0,5 µl
Pfu Ultra Puffer AD 10x	2,5 µl
dNTP Mix (je 2,5 mM)	1,0 µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	1,0 µl
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	1,0 µl
Gesamtvolumen	25 µl

**Programm für *MUTYH*beta3-Plasmid**

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	2 min	1
95°C	30 sek	} 18
55°C	1 min	
68°C	8 min	
4°C	unendlich	

**Programm für *MUTYH*-Promotor-Minigen**

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	2 min	1
95°C	30 sek	} 24
55°C	1 min	
68°C	9 min	
4°C	unendlich	

Danach wurde den Ansätzen jeweils 1 µl DpnI hinzugefügt und diese bei 37°C für 30 min inkubiert. DpnI ist eine Endonuklease, die nur bakteriell methylierte DNA abbaut und dafür sorgt, dass ausschließlich die neu synthetisierten DNA-Stränge mit der Mutation erhalten bleiben. Anschließend wurden 2,5 µl des verdauten PCR-Produkts in *E. coli* transformiert (siehe 2.2.28).

### 2.2.18 Ethanolpräzipitation zur Aufkonzentrierung von PCR-Produkten

Für die Aufkonzentrierung von PCR-Produkten, bspw. vor einer Transformation, fand eine Ethanolpräzipitation statt. Dafür wurde der DNA-Lösung 10% 3 M Natriumacetat zugesetzt. Diesem Gemisch wurde die 2,5-fache Menge 100% Ethanol zugefügt und die DNA für 10 min bei -20°C gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (12.500 g, 4°C, 15 min) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 50 µl 70% Ethanol versetzt. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (12.500 g, 4°C, 5 min) und die Abnahme des Überstands. Das Pellet wurde schließlich etwa 5 min luftgetrocknet und in 5 µl Aqua dest. gelöst.

### 2.2.19 Reverse Transkription (RT)

Durch die reverse Transkription wurde die zuvor isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, die dann als Template für die Amplifikation des *MUTYH*-Gens diente. Die verwendete reverse Transkriptase besitzt keine RNase H Aktivität, wodurch die cDNA Synthese ausgehend von langen mRNA *templates* (>5 kb) unproblematisch ist. Zum einen wurde die RNA mit Hilfe von *random* Primern (Promega) umgeschrieben, um die Werte auf das *housekeeping* Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) zu normalisieren. Zum anderen wurden Gen-spezifische Primer (GsP) verwendet (*MUTYH* 2-3R-Mut-a).

Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

RT mit <i>random</i> Primern		RT mit GsP	
DNase verdaute RNA	1 µg	DNase verdaute RNA	1 µg
<i>Random</i> Primer (10 µM)	0,5 µl	GsP 2-3R-mut-a (10 µM)	2,5 µl
Aqua dest.	x µl	Aqua dest.	x µl
Gesamtvolumen	14,5 µl	Gesamtvolumen	14,5 µl
70°C 5 min auf Eis 5 min		70°C 5 min auf Eis 5 min	
M-MLV Reaktionspuffer 5x	5 µl	M-MLV Reaktionspuffer 5x	5 µl
dNTP Mix (je 2,5 mM)	5µl	dNTP Mix (je 2,5 mM)	5µl
M-MLV reverse Transkriptase	0,5 µl	M-MLV reverse Transkriptase	0,5 µl
Gesamtvolumen	25 µl	Gesamtvolumen	25 µl
Raumtemperatur 10 min 50°C 50 min		50°C 60 min	

Die cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2.20 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Die quantitative *real-time* PCR wurde verwendet, um die Benutzung der drei alternativen ersten Exons ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) von *MUTYH* zu bestimmen. Eine Variante der *real-time* PCR ist die TaqMan-PCR. Sie zeichnet sich durch hohe Geschwindigkeit, Sensitivität und Spezifität aus. Für diese Untersuchung wurde eine TaqMan-Sonde verwendet, die auf dem 5'-Nuklease-PCR Test von Holland *et al.* [126] beruht. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht in der 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase. Diese baut während der Synthese des Gegenstranges eine Sonde am 5'-Ende ab. Diese Sonde ist so designet, dass sie zwischen den beiden PCR-Primern an die einzelsträngige, komplementäre Zielsequenz hybridisiert. Außerdem ist sie am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM), dem sogenannten Reporter, und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Letzterer verhindert die Emission von Energie des Reporters nach Anregung einer Lichtquelle durch das PCR-Gerät. Dieses Prinzip nennt sich Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Durch den Abbau der Sonde während der PCR werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt, wodurch das emittierende Fluoreszenzsignal des Reporters nicht länger durch den Quencher inhibiert wird und durch das Gerät detektiert werden kann. Die Detektion des Fluoreszenzsignals findet nach jedem Zyklus im StepOnePlus *real-time* PCR-Gerät (Applied Biosystems) statt. Für den Reaktionsansatz wurde die in der reversen Transkription gewonnene cDNA verwendet und stets Duplikate eingesetzt.

#### Reaktionsansatz

Aqua dest.	4,2 $\mu$ l
TaqMan-PCR Mastermix 2x	5,0 $\mu$ l
TaqMan-Sonden/Primer Mix	0,5 $\mu$ l
cDNA	0,3 $\mu$ l
Gesamtvolumen	10 $\mu$ l

#### Programm

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15 sek	} 55
60°C	1 min	

#### Relative Quantifizierung

Für die relative Quantifizierung wird eine interne Kontrolle benötigt, auf die die Expression des Zielgens normalisiert werden kann. In diesem Fall wurde eine Standard-Sonde des

*housekeeping* Gens *GAPDH* verwendet (Hs99999905\_m1, Applied Biosystems), um Fehler auszugleichen, die durch das Einsetzen unterschiedlicher cDNA-Mengen entstehen können. Um die Expressionsraten der verschiedenen Proben zu errechnen, wurde die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode genutzt. Der *Ct*-Wert (*cycle threshold*) gibt hierbei den Zeitpunkt während der exponentiellen Phase der PCR an, bei dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Für die Auswertung werden zuerst die *Ct*-Werte der Kontrolle von denen der zu analysierenden Proben subtrahiert:  $Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{GAPDH}} = \Delta Ct$ . Von diesem Differenz-Wert wird dann die Differenz des Wildtyps abgezogen, woraus der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert resultiert:  $\Delta Ct_{\text{Variante}} - \Delta Ct_{\text{WT}} = \Delta\Delta Ct$ . Schließlich ergibt sich die n-fache Expression der Variante im Vergleich zum Wildtyp indem man den  $\Delta\Delta Ct$ -Wert wie folgt potenziert:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 2.2.21 Sequenz-PCR und Sequenzierung

Nach der Synthese des *MUTYH*-Promotor-Minigens, der Einführung von Mutationen in dieses sowie in das pcDNA3-MUTYH $\beta$ 3-Plasmid und der Konvertierung von DNA mit Bisulfit, wurden die Sequenzen dieser Proben mit Hilfe der Sequenzierung überprüft. Die Sequenzanalyse erfolgte dabei nach der Kettenabbruch-Synthese-Methode von Sanger [127] in einem 16-Kapillar Sequenziergerät (*3130xl Genetic Analyzer*, Applied Biosystems). Als erstes musste dafür eine Sequenz-PCR durchgeführt werden. Die jeweiligen Ansätze enthielten neben herkömmlichen dNTPs auch artifizielle ddNTPs (2', 3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate), welche am 3'-Kohlenstoffatom keine Hydroxygruppe mehr besitzen. Diese ist jedoch für die Polymerisation des DNA-Strangs notwendig, da an dieser Gruppe das nächste Nukleotid angehängt wird. Infolgedessen führt der Einbau eines ddNTPs zu einem willkürlichen Strangabbruch. Da die vier ddNTPs zusätzlich mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, lassen sie sich durch einen Laser zu einem Fluoreszenzsignal anregen. Nach Längenauftrennung der abgebrochenen DNA-Fragmente in der Kapillarelektrophorese kann mit Hilfe eines Detektors, der die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale an den bestimmten Positionen erkennt, die Sequenz abgeleitet werden.

#### Reaktionsansatz

---

Aqua dest.	x $\mu$ l
Primer (1 $\mu$ M)	3,2 $\mu$ l
DNA	100 ng
<i>BigDye</i>	2,0 $\mu$ l
Gesamtvolumen	10 $\mu$ l

**Programm**

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
96°C	1 min	1
96°C	10 sek	} 38
50°C	5 sek	
60°C	4 min	

Nach der Sequenz-PCR wurden die Ansätze jeweils mit 1 µl SDS (2,2%) bei 98°C für 5 min aufgeköcht. Darauf folgte die Aufreinigung der Proben mit dem *DyeEx<sup>®</sup> 2.0 Spin Kit* (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers. Wurde eine größere Anzahl Proben sequenziert, so fand die Nutzung einer 96-well Filterplatte (MHVN45, Millipore) statt, die mit Sephadex G-50 (Amersham) befüllt und mit 300 µl Aqua dest. pro Vertiefung aufgequollen wurde. Drei Stunden danach wurde überschüssiges Wasser von den Gelsäulen durch Zentrifugation (5 min, 910 g) entfernt. Anschließend wurden die Proben ebenfalls mit 910 g für 5 min durch die Gelsäulen zentrifugiert. Die Sequenzierprimer sind unter 2.1.8 aufgelistet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm *BioEdit* anhand des Abgleichens (*alignment*) zur Referenzsequenz.

**2.2.22 Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird DNA in einem Spannungsfeld elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Es kamen je nach Länge des Produkts 1-2%ige Agarosegele zum Einsatz (1% Gele bei DNA-Längen >1 kb; 2% Gele bei Produkten <1 kb Länge). Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit Ladepuffer (10% Endvolumen) versetzt und das Gel in 1x TAE-Puffer bei 110 V etwa 30 - 45 min laufen gelassen. Zum Sichtbarmachen der DNA wurde dem Gel 4% peqGreen oder das sensitivere Ethidiumbromid zugefügt, die beide in die DNA interkalieren. Die Ethidiumbromid-Agarosegele wurden schließlich am *Molecular Imager GelDoc XR+* (Bio Rad, Image Lab Software) und die peqGreen-Agarosegele am *Fusion FX* (Vilber, Fusion Capt Advance Software) betrachtet und digitalisiert.

**DNA-Ladepuffer**

H <sub>2</sub> O	3,75 ml
Glycerin	5,0 ml
SDS 0,5%	1,0 ml
TAE 40x	250 µl
Farbstoff sachte zufügen	Bromphenolblau: Xylencyanol

### 2.2.23 Isolation von nativem Gesamtproteinextrakt aus Zelllinien

Aus den Krebszelllinien wurde nach Transfektion oder Aza-Behandlung natives Gesamtprotein (*whole cell extract*, WCE) isoliert. Dazu wurde das Medium aus der Zellschale dekantiert und diese mit PBS versetzt. Nach dem Abkratzen der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen mit einer Pipette resuspendiert und, abhängig von der Größe der Zellschale und dem Volumen an PBS, in ein 15 ml Röhrchen oder 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation (1000 g, 2 min) zur Sedimentation der Zellen. Nach Abgießen des Überstands wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1000 g, 1 min) und die Röhrchen bzw. Reaktionsgefäße anschließend auf Eis gestellt. Restliches PBS wurde mit einer 200 µl Pipette abgenommen. Die Zellen wurden im zweifachen Volumen des Zellpellets in Puffer A (4°C) resuspendiert und nachfolgend 5 min auf Eis inkubiert. Bei Puffer A handelt es sich um einen hypotonen Puffer, der die Zellen anschwellen lässt. Zur Zelllyse wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff gefroren und dann auf Eis aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension im gleichen Volumen (identisch mit Puffer A) mit Puffer C (4°C) vermischt. Dieser ist hyperton und sorgt für die Verminderung der ionischen beziehungsweise polaren Wechselwirkungen, wodurch u. a. DNA-assoziierte Proteine gelöst werden. Darauf folgte die Inkubation der Proben für 30 min bei 4°C rollend. Nach einer weiteren Zentrifugation (20.000 g, 30 min, 4°C) wurde der sich im Überstand befindliche native Gesamtproteinextrakt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die Proteinkonzentration der Probe wurde im Anschluss nach Bradford (siehe 2.2.24) bestimmt. Nachdem der Extrakt in flüssigem Stickstoff gefroren wurde, fand die Lagerung bei -80°C statt.

#### **Puffer A**

---

HEPES KOH, pH 7,6	20 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	0,1 mM

#### **Puffer C**

---

HEPES KOH, pH 7,6	20 mM
NaCl	840 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	0,1 mM
Glycerin	40% (v/v)

Die Puffer wurden bei 4°C aufbewahrt. Vor jeder Nutzung wurden zusätzlich 1 µl/ml PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid; 200 mM) und 2 µl/ml DTT (Dithiothreitol; 200 mM) zu den Puffern

hinzugegeben. DTT ist für die Konservierung der Proteine in funktionaler Form und PMSF als Proteaseinhibitor von Bedeutung.

#### **2.2.24 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Der Proteingehalt wurde nach Marion M. Bradford [128] bestimmt. Der Bradford-Test basiert darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau G-250 bei der Bindung an Proteine von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden stets 800 µl *Quick Start* Bradford-Reagenz (Bio-Rad) eingesetzt und mit 2 µl der zu messenden Proteinlösung vermischt. Die Farbentwicklung ist nach zwei Minuten beendet, woraufhin die Absorption bei 595 nm gegen einen Nullwert (mit H<sub>2</sub>O) im Photometer (DU800 Beckmann Coulter) gemessen wurde. Das zum Photometer gehörige Programm errechnete anhand einer Eichgeraden automatisch die Konzentration in mg/ml.

#### **2.2.25 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen**

Zum Aufkonzentrieren von Proteinlösungen wurden Amicon Ultra Filter (Millipore) verwendet. Die Probe wurde durch einen Filter entsprechender Porengröße (50 K oder 100 K) zentrifugiert und anschließend aus dem umgedrehten Filter zurückgewonnen.

#### **2.2.26 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Die nach Ulrich K. Lämmli [129] leicht abgewandelte diskontinuierliche Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen anhand der Größenauftrennung in Form des Molekulargewichts. Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) als anionisches Tensid bildet mit den Proteinen einen Komplex und sorgt dafür, dass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Die entstandenen SDS-Protein-Komplexe sind negativ geladen und Protein-Protein-Wechselwirkungen werden unterbunden.

Das diskontinuierliche Acrylamidgel bestand aus einem 10%igen Trenngel und einem Sammelgel. Das Trenngel wurde stets zuerst zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, sodass eine klare, scharfe Linie für das darauffolgende Sammelgel entstand. Nach der Auspolymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel zugefügt. Je nach Anzahl der Proben wurden kleine oder große Gele mit entsprechender Anzahl Taschen gegossen. Für kleine Gele wurde die Gelkammer *Minigel-Twin* (Biometra, Analytik Jena) und für große Gele die Kammer *Double Wide* (C.B.S.)

verwendet. Je nach Ausbeute wurde eine Menge von 10 - 50 µg Protein je Probe eingesetzt. Diese wurde mit etwa 20% Roti-Load Ladepuffer (Roth) versetzt und für 1 - 2 min bei 90°C (750 rpm) aufgekocht. Das in Roti-Load enthaltene SDS und β-Mercaptoethanol diente der Denaturierung und Spaltung der Disulfidbrücken durch Reduktion. Ein kleines Gel wurde bei 25 mA, ein großes Gel bei 40 mA für ca. 80 - 90 min in Laufpuffer angeschlossen.

### **SDS-Elektrophoresepuffer**

Tris	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1% (w/v)

### **Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels**

		10% GELE	
<b>Trenngel</b>		<b>klein</b>	<b>groß</b>
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8%	ml	2	4
Tris HCl 1,88 M, pH 8,8	ml	1,2	2,4
SDS 0,5%	ml	1,2	2,4
Wasser	ml	1,6	3,2
TEMED	µl	5	10
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	µl	30	60
<b>Sammelgel</b>		<b>klein</b>	<b>groß</b>
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8%	ml	0,33	0,66
Tris HCl 0,625 M, pH 6,8	ml	0,4	0,8
SDS 0,5%	ml	0,4	0,8
Wasser	ml	0,87	1,74
TEMED	µl	2	4
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	µl	10	20

### **2.2.27 Proteindetektion: Western Blot**

Beim Blotten werden die Proteine des SDS-Gels elektrophoretisch auf eine adsorbierende Membran übertragen. Auf dieser sind sie für die darauffolgende Immunfärbung für Antikörper leicht zugänglich, ohne dass Diffusionsprobleme während mehrerer Wasch- und Färbedurchgänge auftreten.

In dieser Arbeit fand das *Semidry-Blot*-System Verwendung. Dabei wurde das SDS-Gel auf vier Lagen in Blotpuffer getränktem Filterpapier und der Nitrocellulose Membran gebettet. Durch das im Blotpuffer enthaltene Methanol wurden die Proteinbindungsstellen der Membran aktiviert. Abschließend wurden vier weitere in Blotpuffer getränkte Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Der Vorgang des Blottens in der Blotapparatur fand für 1.30 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup> statt. Dies entsprach etwa 50 mA für kleine und 100 mA für große Gele. Nach dem Blotten wurde die Membran zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceaurot 1 - 2 min angefärbt, abgegossen und in TBS-T entfärbt. Zum Blocken der freien Proteinbindungsstellen auf der Membran wurde diese in entfettetem Milchpulver (5% Milchpulver in TBS-T) für 1 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgten Immunfärbung und Detektion.

#### **Blotpuffer**

---

Tris pH 8,2 - 8,4	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)
Methanol	20% (v/v)

#### **Ponceau-Lösung**

---

Ponceau S 10x	10% (v/v)
Essigsäure	2,5% (v/v)

#### **Immunfärbung und Detektion**

Alle Antikörper wurden entsprechend den Angaben der Hersteller 1:666 bis 1:10.000-fach entweder in TBS-T mit 5% Milchpulver oder 5% BSA verdünnt (siehe 2.1.6). Zuerst wurde die Membran für 1 h oder über Nacht in Primärantikörper inkubiert. Darauf folgten drei Waschschritte mit TBS-T für je 5 min. Anschließend wurde der Sekundärantikörper für 1 h hinzugegeben und die Membran erneut dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Als Sekundärantikörper kamen Antikörper zum Einsatz, die mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt sind. HRP katalysiert, nach der Zugabe von Detektionslösung auf die Membran, die Oxidation von Luminol und löst dadurch eine Chemilumineszenz aus. Das entstehende Lumineszenzsignal kann dann detektiert werden. Für diesen letzten Schritt wurde *Immobilon Western* Detektionslösung (Millipore), bestehend aus einer Peroxid- und Luminol-Lösung, 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Detektion und Auswertung fand entweder im *LAS-4000 mini* (Fuji) mit der zugehörigen *MultiGauge v3.2* Software oder im Fusion FX mit der *Fusion Capt Advance Solo 4 16.07* Software statt.

### **2.2.28 Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen**

Unter Transformation versteht man die nicht-virale Aufnahme freier DNA in kompetente Bakterienzellen zu deren Vermehrung. Die Transformation in *E. coli XL1-Blue* erfolgte nach dem Hitzeschockprinzip [130]. Dazu wurde die Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und abzentrifugiert. Zu 25 µl Bakterien wurden 2,5 µl des PCR-Produkts gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 sek. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 100 µl S.O.C. Medium (Invitrogen) zugefügt, 1 h bei 37°C geschüttelt und die Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Mutagenese-PCR Ansätze wurden nach der Zugabe von S.O.C. Medium direkt ausplattiert. Für Retransformationen wurde 1 µl der entsprechenden Plasmid-Lösung zu der Bakteriensuspension gegeben und genauso verfahren. Am nächsten Tag wurden die Agarplatten auf das Wachstum von Einzelkolonien hin überprüft, ehe diese für Übernachtskulturen gepickt wurden.

### **2.2.29 Animpfen von Übernachtskulturen**

Für Übernachtskulturen wurden Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium mit Antibiotika-Zusätzen (Mini-Kultur) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach Überprüfung der isolierten Plasmide auf deren Korrektheit, wurden zumeist Übernachtskulturen mit einem Volumen von 300 ml (Maxi-Kultur) angeimpft. Dafür wurde 1 ml der Mini-Kultur zu 300 ml LB-Medium mit entsprechenden Zusätzen gegeben und über Nacht ebenso bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach einer Retransformation wurden zunächst Einzelkolonien in 2 ml Vorkultur gezogen und nach ca. 5 h direkt Maxi-Kulturen angeimpft.

### **2.2.30 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

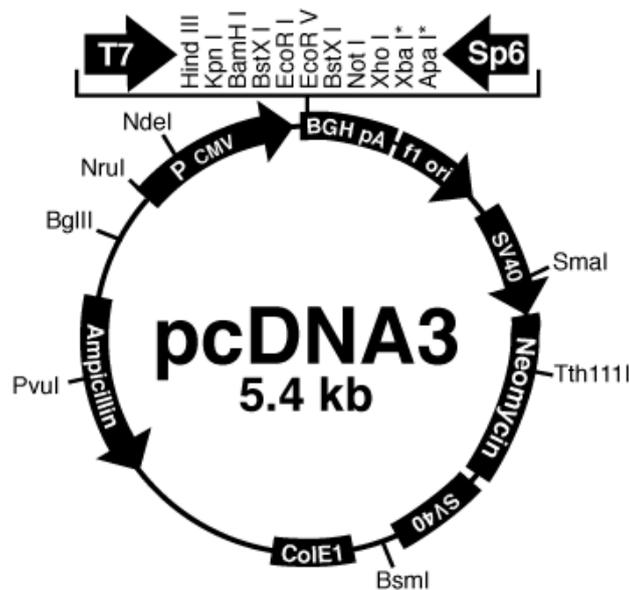
Die Isolation von Plasmid-DNA aus 5 ml Flüssigbakterienkultur erfolgte mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Für die DNA-Isolation aus 300 ml Bakterienkultur wurde das *JETstar 2.0 Plasmid Purification MAXI Kit* (Genomed) verwendet.

### **2.2.31 Anfertigung von *E. coli* Glycerolstocks**

Für die Anfertigung von Glycerolstocks wurden 750 µl der einzufrierenden Bakterienkultur mit 250 µl Glycerin (80%, autoklaviert) vermischt und in ein 1,8 ml Kryoröhrchen (Nunc™) gegeben. Diese wurden schließlich bei -80°C eingefroren und gelagert.

### 2.2.32 Klonierungsstrategie zur Konstruktion des *MUTYH*-Promotor-Minigen

Um die Transkriptionsregulation der alternativen ersten Exons von *MUTYH* und die Auswirkungen von bestimmten Patientenmutationen auf die Transkription zu untersuchen, wurde ein Minigen konstruiert. Dieses enthält den putativen Promotor von *MUTYH* sowie die Exons 1 - 4.



**Abbildung 2.2: Der In vitro-Vektor pcDNA3.** Der Vektor besteht aus 5446 Nukleotiden mit einer Ampicillin-Resistenz. Die Restriktionsschnittstellen innerhalb sowie außerhalb der *multiple-cloning-site* (Vergrößerung) sind angegeben. (Quelle: <http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pcdna3.htm>)

Als Ausgangsvektor diente pcDNA3 (Invitrogen, Abbildung 2.2). Aus dem pcDNA3-Vektor wurde zu Beginn mit den Restriktionsenzymen NruI und HindIII der vektoreigene Cytomegalovirus (CMV)- und T7-Promoter entfernt (siehe 2.2.36 präparative Restriktion). Das Vektor-Rückgrat wurde über eine Gelextraktion (siehe 2.2.37) aufgereinigt. Da durch den NruI-Verdau *blunt ends* und durch den Verdau mit HindIII *sticky ends* entstehen, konnte das pcDNA3-Rückgrat nicht religieren. Die fehlenden Basen wurden mit Hilfe des Klenow-Fragments [131] aufgefüllt und die *blunt ends* im Nachhinein ligiert (siehe 2.2.33). Dies hatte zur Folge, dass HindIII in der *multiple-cloning-site* (MCS) inaktiviert wurde. Zusätzlich wurde zwischen BamHI und EcoRI in der MCS über das Einfügen einer Oligoduplex (siehe Primerliste 2.1.8 und Herstellung 2.2.34) eine SpeI-Schnittstelle eingefügt.

Insgesamt wurden in den leeren pcDNA3-Vektor (-pCMV/T7, +SpeI) in folgender Reihenfolge drei Teile einkloniert: Die Promotorregion 2 inklusive Exon 1 (p2+e1), die Promotorregion 1 (p1) und zuletzt die Exons 2 - 4 (e2-4). Zuerst wurden dafür die einzuklonierenden Fragmente in einer PCR amplifiziert (siehe 2.2.15), wobei alle Primer die entsprechenden Schnittstellen zur Einklonierung in den pcDNA3-Vektor enthielten. Nachfolgend wurden die PCR-Produkte

mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) aufgereinigt und über Amicon Ultra 50K Filtersäulen auf etwa 10 µl aufkonzentriert. Danach wurden die PCR-Produkte für die Einklonierung in den TOPO-Vektor verwendet (siehe 2.2.35). Mit je einem positiv getesteten Bakterien Klon wurde schließlich eine präparative Restriktion (2,5 µg DNA) mit entsprechenden Restriktionsenzymen durchgeführt. Der Verdauansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, das Fragment aus dem Gel aufgereinigt (siehe 2.2.37) und über Amicon Ultra 50K Filter zusätzlich zweimal mit 500 µl Aqua dest. gewaschen und schließlich zurückgewonnen.

Über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SpeI wurde die Promotorregion 2 inklusive Exon 1 (1512 bp ohne Enzymschnittstellen) in den pcDNA3-pCMV+SpeI-Leervektor seitenrichtig einkloniert. Hierfür wurden 5 µg der Leervektor-DNA präparativ verdaut (siehe 2.2.36). Erst wurde SpeI dem Verdauansatz für 1 h bei 37°C zugefügt, dann folgte BamHI für eine weitere Stunde. Danach wurden 8 µl Antarktischer-Phosphatase-Puffer und 1 µl Antarktische Phosphatase (NEB) für 30 min bei 37°C zugegeben und die Enzyme für 20 min bei 80°C inaktiviert. Die Dephosphorylierung des Vektors soll ein Religieren ohne Insert verhindern. Da BamHI nicht durch Hitze inaktivierbar ist, wurde der Ansatz zusätzlich über einen Amicon Ultra 50K Filter durch zweimalige Zugabe von 500 µl Aqua dest. aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. Anschließend fand die Ligation (siehe 2.2.38) und Transformation des aufgereinigten Promotorbereichs (p2+e1) und des pcDNA3-pCMV+SpeI-Vektors statt. Aus einem positiven Klon wurde letztlich eine Maxi-Kultur angefertigt.

In das pcDNA3-pCMV+p2+e1-Konstrukt wurde als nächstes über BamHI der putative, erste Promotorbereich (p1, 425 bp ohne Enzymschnittstellen) inseriert. Dies durfte nicht erst nach der Einklonierung des nachfolgenden Fragments (e2-4) geschehen, da dieses eine BamHI-Schnittstelle besitzt. Anfangs wurden 10 µg des *MUTYH*-Minigen-Konstrukts mit 10 µl BamHI für 2 h bei 37°C verdaut. Die vollständige Linearisierung des Vektors wurde auf einem Agarosegel überprüft. Zur Dephosphorylierung kamen 20 µl Antarktischer-Phosphatase-Puffer und 5 µl Antarktische Phosphatase für 2 h hinzu. Die Hitzeinaktivierung fand wiederum bei 80°C für 5 min statt. Danach wurde der Vektor erst mit 100 µl Phenol, dann mit 100 µl Chloroform extrahiert und eine Ethanolpräzipitation (siehe 2.2.18) durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde schließlich in 100 µl Aqua dest. aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt. Nachfolgend fand die Ligation mit dem aus dem TOPO-Vektor verdauten und aufgereinigten p1-Fragment statt (siehe 2.2.38). Um herauszufinden, ob das p1-Fragment über BamHI seitenrichtig in den Vektor einkloniert wurde, wurde eine Sequenzierung mit dem *MUTYH*-p1-F Primer (ohne BamHI-Schnittstelle) durchgeführt. Aus dem korrekten Ansatz wurde erneut eine Maxi-Kultur angefertigt.

Der letzte einzuklonierende Bereich (Exons 2-4) in das *MUTYH*-Minigen-Konstrukt fand über die Restriktionsschnittstellen SpeI und XhoI statt. Wie zuvor beschrieben wurden 10 µg Vektor

mit den entsprechenden Enzymen verdaut, dephosphoryliert und eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation durchgeführt. Darauf folgend wurde das ebenso zuvor verdaute und aufgereinigte e2-4-Fragment (1436 bp) in den Vektor ligiert und der Ansatz transformiert. Aus einem positiven Ansatz wurde schließlich eine Maxi-Kultur hergestellt. Das fertige *MUTYH*-Promotor-Minigen-Konstrukt wurde zur Überprüfung komplett sequenziert (Primer siehe 2.1.8).

### 2.2.33 Klenow *blunting* und Ligation

Das Klenow-Fragment [131] ist Teil der DNA-Polymerase I von *E. coli*. Es besitzt neben der 5' - 3' Polymeraseaktivität nur die 3' - 5' Exonukleaseaktivität, welche für das *proof reading* notwendig ist. Die 5' - 3' Exonukleaseaktivität fehlt jedoch. Dadurch ist das Fragment dazu geeignet, einzelsträngige 5'-Überhänge von DNA-Sequenzen nach einer Restriktion wieder aufzufüllen, sodass ein *blunt end* entsteht. Der Ansatz wurde für 15 min bei 25°C inkubiert und die Reaktion danach bei 75°C für 10 min gestoppt. Die nachfolgende *blunt end* Ligation fand für 2 h bei Raumtemperatur statt. Für die Transformation (siehe 2.2.28) des ligierten Vektors wurden 4 µl des Ligationsansatzes auf 15 µl Bakteriensuspension und zur Kontrolle 3,5 µl des unligierten Ansatzes auf 15 µl Bakteriensuspension gegeben.

#### Reaktionsansatz

Aqua dest.	x µl
Puffer 2 10x	5 µl
dNTPs (je 33 µM)	1 µl
Vektor-DNA	5 µg
DNA-Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

#### *Blunt end* Ligation

Reaktionsansatz	8 µl
T4 DNA Ligase Puffer 10x	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

### 2.2.34 Oligoduplexherstellung

Für die Einklonierung der *SpeI*-Schnittstelle in den pcDNA3-pCMV-Vektor musste aus den einzelsträngigen Oligonukleotiden (siehe 2.1.8) durch ein *annealing* eine doppelsträngige Duplex hergestellt werden. Der Reaktionsansatz wurde dafür 5 min bei 85°C inkubiert und

danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach einem präparativen Verdau (siehe 2.2.36) von pcDNA-pCMV mit den Enzymen BamHI und EcoRI und der Aufreinigung über einen Filter (Amicon Ultra 50K) wurde das doppelsträngige Oligonukleotid schließlich einligiert (siehe 2.2.38) und transformiert (siehe 2.2.28).

### **Reaktionsansatz**

---

Aqua dest.	90 µl
pcDNA3-pAddSpeI (100 µM)	5 µl
pcDNA3-pAddSpeI-r (100 µM)	5 µl

### **2.2.35 TOPO-Vektor Ligation und Transformation in kompetente TOP10 *E. coli***

Die Klonierung von aufgereinigten PCR-Fragmenten in den pCR2.1-TOPO-Vektor und die anschließende Transformation in kompetente *One Shot TOP10 E.coli*-Zellen wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit dem *TOPO® TA Cloning® Kit* (Invitrogen) durchgeführt. Das im TOPO-Vektor enthaltene *LacZα*-Gen ermöglicht eine blau/weiß-Selektion der Bakterienkolonien nach Transformation. Da das PCR-Produkt in das *LacZα*-Gen inseriert, wurden nur die positiven, weißen Kolonien für das Animpfen von Übernachtskulturen (siehe 2.2.29) gepickt und danach eine Kontrollrestriktion (siehe 2.2.36) auf das enthaltene Insert durchgeführt. Zudem kann mit den im TOPO-Kit enthaltenen M13-Primern eine Sequenzierung durchgeführt werden. Für die blau/weiß-Selektion wurden die Ampicillin-Agarplatten vor dem Ausstreichen der Bakterien mit 40 µl x-Gal (20 mg/ml in DMF) und 40 µl IPTG (40 mg/ml in H<sub>2</sub>O) benetzt.

### **2.2.36 Kontrollrestriktion und präparative Restriktion**

Die einzelnen Verdauansätze wurden mit bestimmten Restriktionsendonukleasen inkubiert, die spezifische DNA-Erkennungssequenzen schneiden. Für die Klonierung wurden Vektor und Insert mit den gleichen oder kompatiblen Enzymen in einem präparativen Verdau geschnitten, um diese nach einer Aufreinigung ligieren zu können. Ein Kontrollverdau wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob das klonierte Insert im Vektor vorhanden ist. Die Kontrollrestriktion ist somit für eine generelle Überprüfung der Vektorkonstrukte notwendig. Je nach Enzym wurde den Ansätzen gemäß der Angabe des Herstellers bei Bedarf BSA zugefügt.

<b>Kontrollrestriktion</b>		<b>Präparative Restriktion</b>			
Aqua dest.	x $\mu$ l	Aqua dest.	x $\mu$ l	x $\mu$ l	x $\mu$ l
Puffer 10x	1 $\mu$ l	Puffer 10x	20 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Vektor-DNA	200-500 ng	Vektor-DNA	10 $\mu$ g	5 $\mu$ g	2,5 $\mu$ g
Restriktionsenzym 1	0,5 $\mu$ l	Restriktionsenzym 1	7,5	5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
Restriktionsenzym 2	0,5 $\mu$ l	Restriktionsenzym 2	7,5	5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
Gesamtvolumen	10 $\mu$ l	Gesamtvolumen	200 $\mu$ l	75 $\mu$ l	50 $\mu$ l

### 2.2.37 Gelextraktion

Die Gelextraktion diente der Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel. Dazu wurde der Verdauansatz mit 10-20% Ladepuffer versehen und auf einem entsprechenden Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte DNA-Fragment (z. B. Vektor oder Vektor-Insert) wurde mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers zur Isolation benutzt. Die isolierte DNA konnte im Nachhinein weiter über einen Amicon Ultra Filter mit 500  $\mu$ l Aqua dest. aufgereinigt und aufkonzentriert werden, ehe die Konzentration bestimmt wurde.

### 2.2.38 Ligation

Eine Ligation wurde durchgeführt, um einen linearisierten Vektor mit dem entsprechenden Insert anhand der kompatiblen Restriktionsenden zu verknüpfen. Die gewünschte Orientierung des Inserts ist durch den Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen gewährleistet. Das seitenrichtige Einfügen eines Inserts über nur eine Restriktionsschnittstelle wurde über eine Ansequenzierung des Vektors in das Insert hinein überprüft. Für den Ligationsansatz wurden etwa 3 Teile Fragment und 1 Teil Vektor benutzt, sodass das molekulare Verhältnis Fragment/Vektor ca. 2-4 betrug. Zudem wurde ein Kontrollansatz ohne Fragment angesetzt. Die Inkubation fand für 30 min bei Raumtemperatur statt. 2,5  $\mu$ l der Ansätze wurden für die Transformation in 25  $\mu$ l kompetente Bakterien verwendet.

**Ligationsansatz**

Aqua dest.	x µl
Ligasepuffer 10x	1 µl
Vektor	x µl (~1 Teil)
Fragment	x µl (~3 Teile)
T4 DNA Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

**2.2.39 Einfügen einer Markierung in das *MUTYH*-Promotor-Minigen**

Nach der vollständigen Konstruktion des *MUTYH*-Promotor-Minigen wurde eine stille Mutation am Ende von Exon 2 (Serin-Alanin: tctgcc > agcgct) als Markierung eingefügt, um zwischen endogenem und transfiziertem Minigen unterscheiden zu können. Hierfür wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt (Primer siehe 2.1.8). Die Überprüfung der Mutation fand mittels Sequenzierung unter Verwendung des *MUTYH*-e2-F (siehe 2.2.21) Primers statt.

**Reaktionsansatz**

Aqua dest.	x µl
<i>MUTYH</i> -Promotor-Minigen	30 ng
Pfu Ultra DNA Polymerase AD	1,5 µl
Pfu Ultra Puffer AD 10x	5,0 µl
dNTP Mix (je 2,5 mM)	2,0 µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	1,0 µl
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	1,0 µl
Gesamtvolumen	50 µl

**Programm**

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	1 min	1
95°C	50 sek	} 18
60°C	1 min	
68°C	12 min	
4°C	unendlich	

**2.2.40 Erweitertes *MUTYH*-Promotor-Minigen mit *TOE1***

Um sich die Auswirkungen der Mutagenese-PCRs auch auf das zu *MUTYH* entgegen gerichtete Gen *TOE1* anzuschauen, wurde die Exon 2 Region von *TOE1* zusätzlich in das *MUTYH*-Promotor-Minigen integriert. Der einzuklonierende *TOE1*-Bereich wurde über die

einzigste im Minigen vorkommende KpnI-Schnittstelle einkloniert. Diese liegt 894 bp *upstream* des ATGs von *MUTYH* 1 $\alpha$ . Zuerst wurde ein PCR-Produkt des einzuklonierenden *TOE1*-Bereichs synthetisiert (Primer siehe 2.1.8). Dieses wurde über das *High Pure PCR Purification Kit* (Roche) aufgereinigt, in den TOPO-Vektor kloniert (siehe 2.2.35) und in *XL1 Blue E. coli*-Zellen transformiert. Von einem durch Kontrollverdau und Sequenzierung überprüften positiven Klon wurde eine Maxi-Präparation angefertigt. Darauf folgte eine präparative Restriktion des TOPO-*TOE1*-Vektors (5  $\mu$ g DNA) und des *MUTYH*-Promotor-Minigens (10  $\mu$ g DNA) mit dem Enzym KpnI für 1 h bei 37°C. Der linearisierte Minigen-Vektor wurde darauffolgend für 2 h bei 37°C dephosphoryliert (7,5  $\mu$ l Antarktischer-Phosphatase-Puffer + 5  $\mu$ l Antarktische Phosphatase) und die Reaktion hitzeinaktiviert (80°C, 5 min). Sowohl das *TOE1*-Insert (159 bp) als auch der linearisierte Vektor wurden anschließend über eine Gelextraktion aufgereinigt, ligiert und in *XL1 Blue E. coli* transformiert. Mit Hilfe einer Sequenzierung (*MUTYH*-p1-R Primer, siehe 2.1.8) wurde die Richtigkeit der einklonierten Sequenz bestätigt.

#### Reaktionsansatz

Aqua dest.	23 $\mu$ l
cDNA rH des pcDNA3- <i>MUTYH</i> $\beta$ 3-Plasmids	1,0 $\mu$ l
Taq-Polymerase	1,0 $\mu$ l
PCR Puffer blau D	10 $\mu$ l
dNTP Mix (je 2,5 mM)	5,0 $\mu$ l
<i>forward</i> Primer (10 $\mu$ M)	5,0 $\mu$ l
<i>reverse</i> Primer (10 $\mu$ M)	5,0 $\mu$ l
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l

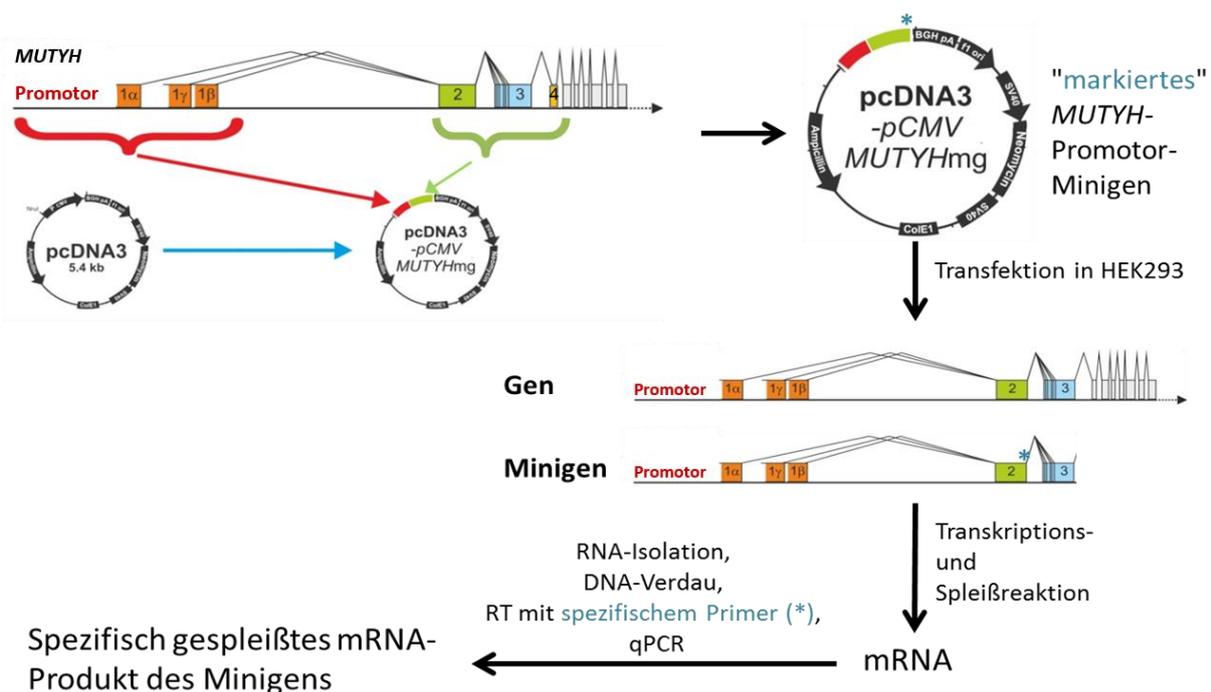
#### Programm

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	4 min	1
95°C	15 sek	} 50
55°C	15 sek	
72°C	1 min	
72°C	6 min	1

#### 2.2.41 Zusammenfassung des *MUTYH*-Promotor-Minigen-Assays

Nach abgeschlossener Konstruktion des *MUTYH*-Promotor-Minigens (Sequenz: siehe Anhang) enthielt dieses den Promotorbereich (beginnend ~900 bp *upstream* von ATG in Exon 1 $\alpha$ ) und die ersten vier Exons (~3,4 kb) inklusive Markierung (Abbildung 2.3). Das WT-Minigen oder die durch Mutagenese-PCR (siehe 2.2.17) veränderten Varianten wurden anschließend

in HEK293-Zellen transfiziert (siehe 2.2.3). Nach 48 h, in denen sowohl die Transkription des endogenen *MUTYH*-Gens als auch des *MUTYH*-Promotor-Minigen stattgefunden hatte, wurden die Zellen in Trizol geerntet, die RNA isoliert (siehe 2.2.11), ein DNase-Verdau durchgeführt (siehe 2.2.12) und die RNA abschließend revers transkribiert (siehe 2.2.19). Der Einsatz von spezifischen Primern, welche die Markierung enthielten, ermöglichte, dass ausschließlich die Minigen-Transkripte umgeschrieben wurden. Zusätzlich deckten die RT-Primer Exon-Exon-Grenzen ab, um sicherzustellen, dass nur gespleißte Produkte umgeschrieben wurden. Die so erhaltene cDNA diente zur weiteren Analyse durch PCR, Sequenzierung und qPCR.



**Abbildung 2.3: Experimenteller Ablauf des *MUTYH*-Promotor-Minigen-Assays.** Nach Klonierung des Promotorbereichs und der ersten vier Exons (Vierecke) von *MUTYH* in den pcDNA3-Ausgangsvektor ohne CMV/T7-Promotor, wurde dieser mit einer Markierung (stille Mutation) versehen und in HEK293-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die isolierte RNA mit spezifischen Primern, die die Markierung (\*) enthalten und über Exon-Exon-Grenzen hinweggehen, in cDNA umgeschrieben. Diese kam für weitere Analysen zum Einsatz.

## 2.2.42 *In silico* Analysen

### Konservierungsanalyse des *MUTYH*-Promotors

Da automatische Alignment-Werkzeuge im teilweise sehr gering konservierten Promotorbereich von *MUTYH* unzulängliche Ergebnisse erzielten, wurde aus 22 *MUTYH*-Sequenzen dieses Bereichs halbautomatisch ein Alignment generiert. Hierzu wurden die genomischen Sequenzen von Wirbeltieren verwendet, da bei diesen am ehesten davon

auszugehen ist, dass Transkriptionsregulation und Spleißvorgänge gleich verlaufen und daher auch die relevanten DNA-Sequenzmotive als konservierte Bereiche erkennbar sind. Insbesondere Sequenzen von Affen wurden aus diesem Grund mit eingeschlossen.

Das Alignment wurde aus den betreffenden Sequenzen von Mensch (*Homo sapiens*), Schimpanse (*Pan troglodytes*), Gorilla (*G. gorilla*), Totenkopffaffe (*Saimiri boliviensis*), Anubispavian (*Papio anubis*), Bonobo (*Pan paniscus*), Gibbon (*Nomascus leucogenys*), Orang-Utan (*Pongo abelii*), Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) sowie Hamster (*Mesocricetus auratus*), Iltis (*Mustela putorius*), Hauskatze (*Felis catus*), Hausschaf (*Ovis aries*), Trampeltier (*Camelus ferus*), Hausziege (*Capra hircus*), Rind (*Bos taurus*), Hauspferd (*Equus ferus caballus*), Haushund (*Canis lupus familiaris*), Wolf (*Canis lupus*), Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*), Ratte (*Rattus norvegicus*) und Maus (*Mus musculus*) generiert.

Das automatisch erstellte und manuell kurierte Alignment wurde mit dem ConSeq-Algorithmus analysiert, der jeder Nukleotidposition einen Konservierungsscore von 1-9 zuordnete. Die ConSeq-Analysedaten wurden in einer Excel-Tabelle ausgewertet, um konservierte Sequenzmotive zu identifizieren. Wie erwartet, konnten an funktionell relevant zu betrachtenden Stellen (Exons, Spleißstellen, Startcodons) entsprechend starke Konservierungs-Peaks verzeichnet werden. Zur besseren graphischen Auswertung wurden die ConSeq-Konservierungsscores sowie deren gleitender 10-Durchschnitt gegen die Nukleotidpositionen im Promotor aufgetragen (siehe Abbildung 3.8 im Ergebnisteil).

#### Konservierungsanalyse des MUTYH-Proteins

Die humane MUTYH-Sequenz wurde zur Datenbankabfrage homologer Sequenzen verwendet (NCBI-Blast). Etwa 100 Treffer aus verschiedensten Organismen wurden heruntergeladen und mit *Clustal Omega* ein Alignment generiert. Die Konservierung der Proteinpositionen wurde mit Hilfe des ConSeq-Servers ermittelt, der jeder Position einen Konservierungsscore von 1-9 zuordnete.

#### **2.2.43 Erstellung eines Homologiemodells von MUTYH**

Zur weiteren Klassifizierung unklarer genetischer Varianten und deren Auswirkungen auf das MUTYH-Protein wurde neben der Untersuchung der Proteinstabilität in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Kosinski vom EMBL Heidelberg ein vorläufiges Homologiemodell des humanen MUTYH-Proteins entworfen. Dazu wurden bereits bekannte Kristallstrukturen aus der *RCSB Protein Data Bank* herangezogen:

3N5N – Kristallstruktur der katalytischen Domäne und der Linkerregion von MUTYH [62]

1X51 – Lösliche Struktur der NUDIX Domäne der humanen A/G-spezifischen Adenin-DNA-Glykosylase alpha-3 Spleiß-Isoform [132]

3G0Q – Kristallstruktur von MutY gebunden an Inhibitor-DNA [34]

3FSP – MutY Adenin-Glykosylase gebunden an ein *transition state* Analog (1N) gepaart mit dG in Duplex-DNA [133]

Das auf diesen Strukturen basierende Homologiemodell wurde im *PyMOL Viewer* in 3D Ansicht angezeigt und für die genaue Analyse der Varianten im Protein herangezogen. Das Modell bezieht sich auf die alpha-5 Proteinisoform von MUTYH, wobei nur die Aminosäuren 82-506 von insgesamt 549 AS enthalten sind, da Bereiche der N- und C-Termini bezüglich ihrer Struktur unklar sind. Unter Verwendung der *PyMOL* Software wurden die entsprechenden Varianten in das Protein eingefügt, um deren genaue Position im 3D Modell darzustellen und die Auswirkungen des Aminosäureaustauschs zu studieren und zu interpretieren. Außerdem wurden bestimmte funktionelle Domänen farblich markiert.

#### **2.2.44 Statistik: Prüfung auf Signifikanz**

In allen Balkendiagrammen sind die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimentreihen gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen die zugehörige Standardabweichung. Je nachdem ob die gemessenen Werte Gauß-verteilt waren oder nicht, wurden unterschiedliche Tests zur Prüfung der Signifikanz angewandt. Verglichen wurden dabei stets die gemessenen Mittelwerte einer Variante zum Wildtyp bzw. der Kontrolle. Bei vorliegender Gauß-Verteilung wurde der parametrische Einstichproben-t-Test für gepaarte Werte benutzt. War eine Normalverteilung nicht gegeben, so kam der nicht-parametrische *Wilcoxon-matched-pairs*-Test zum Einsatz. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet. Für die Berechnung wurde das Statistikprogramm BiAS verwendet.

### 3 ERGEBNISSE

Für die Diagnose der *MUTYH*-assoziierten Polyposis ist der Nachweis biallelisch inaktivierender Mutationen im *MUTYH*-Gen notwendig, da der klinische Phänotyp für eine eindeutige Diagnose nicht ausreicht. Das Problem nach der Bestimmung des Genotyps besteht darin, dass eine Vielzahl von genetischen Veränderungen in Polyposis-Patienten gefunden wird, deren Pathogenität unklar ist. Zu diesen unklaren genetischen Veränderungen gehören vor allem Mutationen des *missense* Typs, bei denen Einzelbasenaustausche zum Austausch einer Aminosäure im Protein führen. Auch Mutationen in Introns spielen hier eine Rolle, da diese Fehler beim Spleißen bewirken können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *MUTYH*-Varianten auf deren Transkriptions- und Spleißverhalten mit Hilfe eines *MUTYH*-Promotor-Minigen-Assays geprüft. Zusätzlich wurden weitere, über das gesamte *MUTYH*-Protein verteilte *missense* Varianten ausgewählt und deren Expression auf Proteinebene untersucht.

Bisher ist zudem unklar, wie die Nutzung der ersten alternativen Exons von *MUTYH* reguliert wird. Zur Analyse der Genregulation und des Spleißens von *MUTYH* wurde ebenso das *MUTYH*-Promotor-Minigen benutzt. Dabei wurden stark konservierte Motive des Promotorbereichs im Minigen inaktiviert und deren Einfluss auf die Transkription der *MUTYH*-Transkripte  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  überprüft. Zudem wurde der DNA-Methylierungsstatus überprüft.

#### 3.1 Generierung des *MUTYH*-Promotor-Minigenmodells

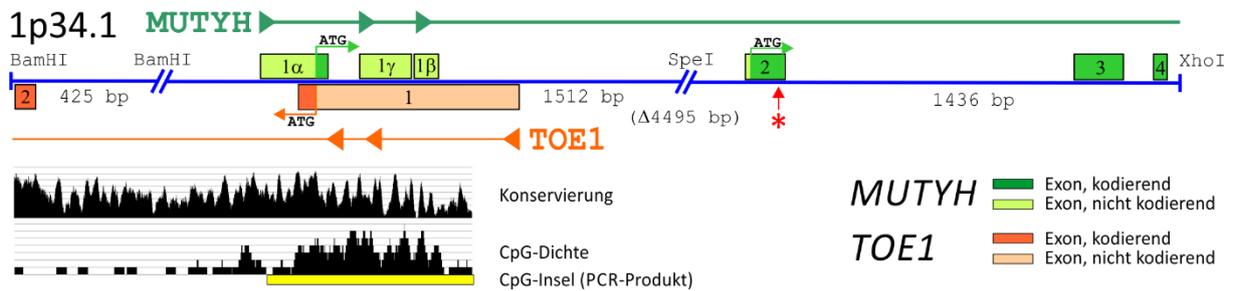
Für die Konstruktion des *MUTYH*-Promotor-Minigens wurden drei genetische Fragmente in den pcDNA3-Ausgangsvektor kloniert. Diese Teile umfassten den Promotorbereich, beginnend 888 bp *upstream* des Translationsstarts (ATG) von Exon 1 $\alpha$ , die drei alternativen ersten Exons und Exons 2 - 4. Die vektoreigenen CMV- und T7-Promotoren wurden zuvor entfernt. Insgesamt wurden 3,4 kb (3397 bp) der genetischen *MUTYH*-Sequenz in den Vektor eingefügt und das Minigen zur Überprüfung anschließend sequenziert. Des Weiteren enthält das Minigen Exon 1 und etwa die Hälfte von Exon 2 des gegenläufig transkribierten Gens *TOE1* (Abbildung 3.1).

Um das *MUTYH*-Promotor-Minigen als funktionierendes Modell für nachfolgende Analysen einzusetzen, musste es folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Transkription der alternativen ersten Exons.
2. Korrektes Spleißen der darauffolgenden Exons.

Um die Produkte des Minigens gegenüber endogen vorkommenden *MUTYH* spezifisch zu detektieren, wurde außerdem ein Basenaustausch am Ende von Exon 2 (Abbildung 3.1 und 3.4) vorgenommen. Bei dieser Markierung handelte es sich um einen stillen Austausch von

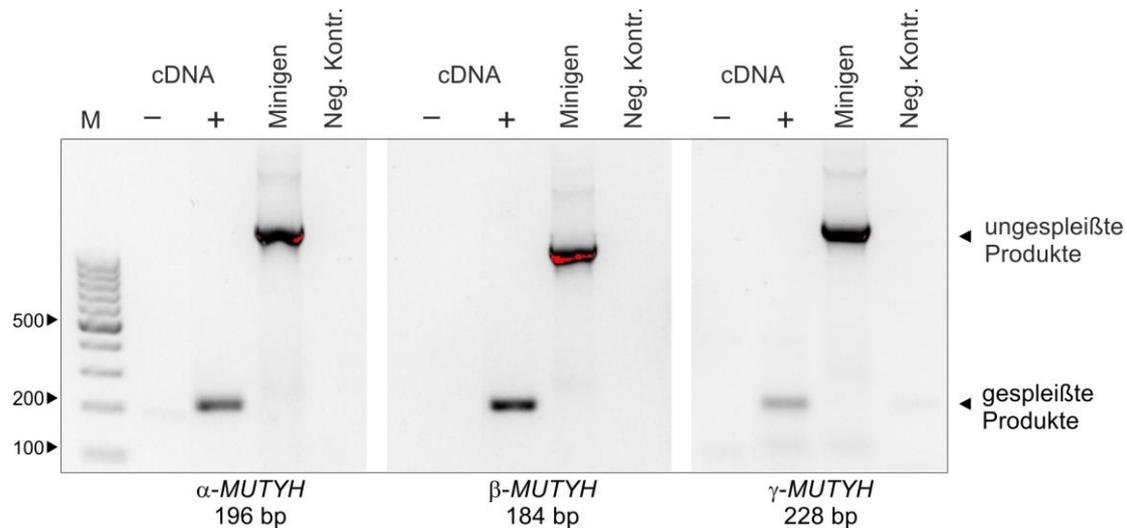
vier Basen am nicht konservierten 3'-Ende von Exon 2, wobei nach der Translation die entsprechenden Aminosäuren erhalten blieben.



**Abbildung 3.1: Annotierte maßstabgerechte Darstellung der drei in das Minigen klonierten genetischen Fragmente (blau) von *MUTYH* (grün) und überlappenden *TOE1* (orange).** Die Restriktionsenzyme, über welche die genetischen Fragmente in das Minigen eingefügt wurden, sind vermerkt. Die Exons (kodierend und nicht kodierend) sind als Vierecke mit entsprechender Farbe und Nummerierung dargestellt. Die (alternativen) Startcodons sind angegeben (ATG). Die Dreiecke stehen für die transkriptionellen Startpositionen und zeigen die Ableserichtung. Der rote Stern gibt die Stelle an, an der die Minigen-spezifische Markierung in Form einer stillen Mutation eingefügt wurde. Im Bereich des *MUTYH*-Promotors sind Konservierung und CpG-Dinukleotid-Dichte dargestellt. Der gelb markierte Bereich wurde mit Hilfe einer vorangegangenen PCR sequenziert, um den Methylierungszustand zu erfassen (siehe Kapitel 3.2 und Tabelle 3.1).

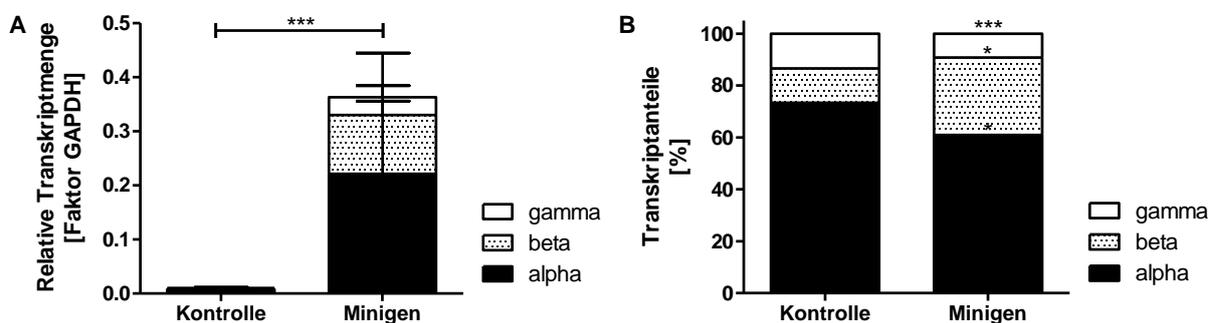
Um sicherzustellen, dass alle im *MUTYH*-Promotor-Minigen enthaltenen alternativen ersten Exons aktiv sind, wurden die aus transfizierten HEK293-Zellen gewonnenen Transkripte über eine PCR amplifiziert und auf einem Agarosegel detektiert. Die isolierte mRNA wurde dabei nach einem DNA-Verdau mit *random* Hexameren (rH) in cDNA umgeschrieben und eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt, die Exon-Exon-Grenzen abdecken. Zudem waren die *forward* Primer individuell spezifisch für jedes der AFEs und der *reverse* Primer enthielt die Minigen-spezifische Markierung. Die Agarosegelanalyse bestätigte, dass alle drei alternativen ersten Exons exprimiert und gespleißt wurden (Abbildung 3.2). In der untransfizierten Kontrolle hingegen ergab sich keine Bande. Dies bedeutet, dass die Minigentranskripte spezifisch amplifiziert und kein endogenes *MUTYH* detektiert wurde. Der Einsatz von untranskribierter Minigenplasmid-DNA in der PCR führte zu einem nicht gespleißten, hochmolekularen Produkt, was für die Amplifizierung der gesamten genetischen Region, inklusive Intron, spricht. Somit konnten insgesamt minigenspezifische, transkribierte und gespleißte Produkte nachgewiesen werden.

Neben der PCR sollte die gewonnene cDNA auch in einem qPCR-Assay zum Einsatz kommen, um die Effizienz der Minigen-Transkription sowie die Transkriptzusammensetzung zu analysieren. Dazu wurden alle *MUTYH*-Transkripte sowohl vom Minigen als auch die endogene Expression quantifiziert.



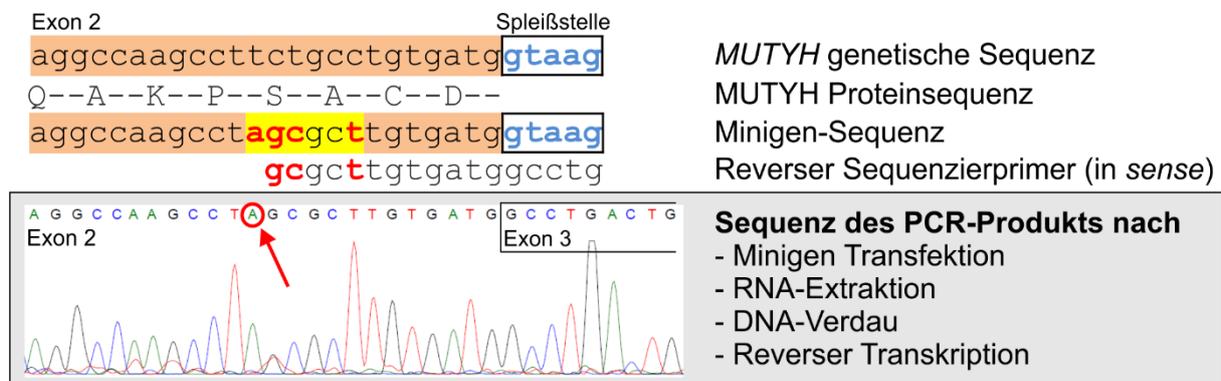
**Abbildung 3.2: Das *MUTYH*-Promotor-Minigen unterstützt sowohl Transkription als auch Spleißen aller drei alternativen ersten Exons.** Aus HEK293-Zellen, die entweder untransfiziert (–) oder Minigen-transfiziert (+) waren, wurde mRNA gewonnen. Diese wurde nach einem DNA-Verdau mit rH-Primern umgeschrieben und zusammen mit dem Minigen-Plasmid mit Hilfe von Transkript-spezifischen Primern in einer PCR amplifiziert. (M) 100 bp Marker.

Die für die Detektion gewählten TaqMan-Sonden waren erneut spleißspezifisch, da sie Exon-übergreifend (1 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  - Exon 2) konstruiert wurden [95], was zugleich die Detektion von gDNA verhinderte. Der Vergleich der Expression von untransfizierten zu Minigen-transfizierten Zellen zeigte eine signifikant stärkere Transkription des Minigens im Vergleich zum endogenen *MUTYH*-Gen um den Faktor 35 (Abbildung 3.3 A). Dies spiegelt die deutlich höhere Verfügbarkeit von Minigenmatrizen pro Zelle gegenüber den zwei chromosomalen Kopien der endogenen Matrizen wieder. Auf Ebene der Transkriptzusammensetzung ist zu sehen, dass das  $\beta$ -Transkript einen erhöhten Anteil ( $p < 0,05$ ) an der Gesamtmenge einnimmt (Abbildung 3.3 B).



**Abbildung 3.3: Erhöhte Expression des *MUTYH*-Promotor-Minigens im Vergleich zum endogenen *MUTYH*-Gen.** Die *MUTYH* Transkription (Gesamtmenge, A) und deren anteilige Zusammensetzung (B) wurden per qPCR bestimmt. Die dafür verwendete cDNA wurde mit rH-Primern umgeschrieben, nachdem die RNA 48 h nach Transfektion des Minigens bzw. einem untransfizierten Kontrollansatz aus HEK293-Zellen isoliert und DNase-verdaut wurde. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Wilcoxon-*matched-pairs*-Test.

Um sicherzugehen, dass es sich bei den gespleißten PCR-Produkten aus Abbildung 3.2 tatsächlich um transkribierte Produkte des Minigens handelt, wurden diese nachfolgend zusätzlich sequenziert. Hierbei kam ein reverser Sequenzierprimer zum Einsatz, der drei der vier veränderten Basen der in das Minigen eingefügten Markierung enthielt (Abbildung 3.4). Das erste auf den Sequenzierprimer folgende Nukleotid wäre bei endogenen Transkripten ein Thymin, wohingegen die Minigentranskripte ein Adenin enthalten würden. PCR und Sequenzierung demonstrierten, dass ausschließlich das transkriptionelle Produkt des Minigens detektiert wurde (Pfeil in Abbildung 3.4). Außerdem ist ersichtlich, dass die Spleißvorgänge funktioniert haben, da Exon 2 und 3 korrekt miteinander verbunden sind. Somit wurde mit Hilfe der Sequenzierung die Minigen- und spleißspezifische Quantifizierung der *MUTYH*-Transkripte verifiziert.



**Abbildung 3.4: Verifikation der Funktionalität des *MUTYH*-Promotor-Minigens mittels Sequenzierung.** Die genomische *MUTYH*-Sequenz wurde im Minigen durch vier stille Mutationen in Form von Basenaustauschen (rote Buchstaben) am Ende von Exon 2 ersetzt. Dies hat keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des Proteins. Die in Abbildung 3.2 mit Minigen cDNA generierten PCR-Produkte wurden zusätzlich sequenziert. Hierbei kam der abgebildete reverse Sequenzierprimer zum Einsatz, der die in das Minigen eingebrachte Markierung enthält, wobei die letzte veränderte Base fehlte. Das sequenzierte PCR-Produkt wurde korrekt gespleißt und enthält das veränderte Adenin (Pfeil) des Minigens und nicht das in der gDNA enthaltene Thymin.

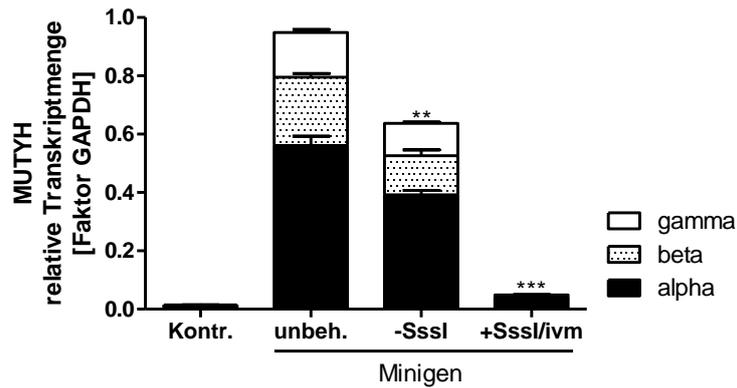
Insgesamt demonstrieren diese Experimente, dass das künstlich generierte *MUTYH*-Promotor-Minigenmodell funktioniert. Das Minigen wurde ausreichend transkribiert und zusätzlich effizient gespleißt. Die *MUTYH*-Transkriptanteile entsprachen dabei ungefähr dem endogenen *MUTYH*-Gen. Dies spricht für die Eignung dieses Modells zur weiteren Untersuchung der Promotorregulation.

### 3.2 Überprüfung epigenetischer DNA-Methylierungen und deren Rolle bei der *MUTYH*-Transkription

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der epigenetische Methylierungsstatus des *MUTYH*-Gens untersucht. Die Regulation von Genen über Transkriptionsfaktoren ist nicht die einzige Option, denn epigenetische Einflüsse können genauso zur Genregulation beitragen. In normalen Zellen gewährleisten DNA-Methylierungen die korrekte Regulation der Genexpression oder führen zur dauerhaften Genstilllegung. Die Addition von Methylgruppen geschieht dabei immer im Kontext mit CpG-Dinukleotiden. Diese kommen in bestimmten Bereichen des Genoms, z. B. Promotorbereichen, in hoher Dichte vor und werden als CpG-Inseln bezeichnet. In zahlreichen Studien wurde bereits belegt, dass Tumorsuppressorgene in verschiedenen Krebsentitäten durch DNA-Methylierungen stillgelegt sind (zusammengefasst von Kulis und Esteller 2010, [134]). Aus Abbildung 3.1 geht hervor, dass im *MUTYH*-Gen ein Cluster von konzentrierten CpG-Dinukleotiden im Exon 1-Bereich vorliegt. Ob in diesem Zusammenhang ein Einfluss von DNA-Methylierungen auf die *MUTYH*-Expression bzw. die Regulation der alternativen ersten Exons vorliegt, sollte wie nachstehend beschrieben untersucht werden.

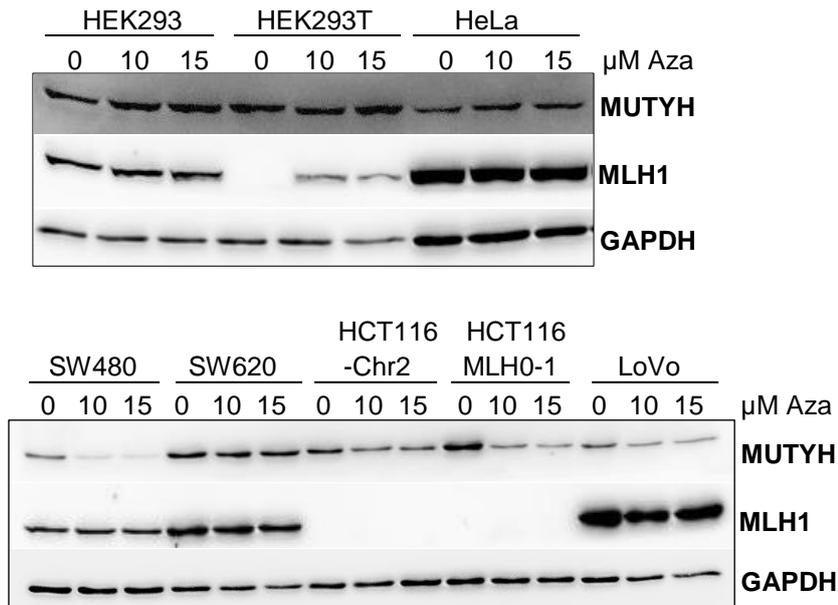
Es wurden insgesamt drei unterschiedliche Versuchsansätze parallel verfolgt. Zum einen sollte der Methylierungsstatus von *MUTYH* im Bereich der CpG-Insel analysiert werden. Zum anderen sollte das *MUTYH*-Promotor-Minigen *in vitro* methyliert werden und die Auswirkungen nach Transfektion in HEK-Zellen im Vergleich zum unmethylierten Minigen dargestellt werden. Außerdem sollte eine Aza-Behandlung zur Demethylierung der DNA in HEK-Zellen stattfinden und die Wirkung dessen auf die *MUTYH*-Transkription ermittelt werden.

Für die Analyse der Effekte der Methylierung des Minigens und dessen Transkription, wurde das *MUTYH*-Promotor-Minigen mit Hilfe der SssI-Methyltransferase *in vitro* methyliert (ivm). Ein weiterer Ansatz mit allen Zusätzen außer dem SssI-Enzym wurde ebenso mitgeführt. Im Anschluss an die Behandlung und vor der weiteren Verwendung wurde der Erfolg der *in vitro* Methylierung anhand einer Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung überprüft. Die so behandelten zwei Ansätze des Minigens wurden dann zusammen mit dem unbehandelten Minigen in HEK293-Zellen transient transfiziert. 48 h danach wurde RNA aus den Zellen isoliert und in einer qPCR eingesetzt. Nach Transfektion des unbehandelten Minigens war die *MUTYH*-Gesamttranskription wie erwartet stark erhöht, etwa um das 67-fache. Die Transkription des behandelten, aber nicht *in vitro* methylierten Ansatzes war um  $\frac{1}{3}$  verringert, währenddessen das ivm-Minigen kaum mehr transkribiert wurde (Abbildung 3.5). Die Methylierung von Cytosinen im CpG-Dinukleotidkontext führte folglich zu einer Repression der Transkription von *MUTYH*.



**Abbildung 3.5: Konsequenz der *in vitro* DNA-Methylierung des *MUTYH*-Promotor-Minigen auf die *MUTYH*-Transkription.** Das Minigen wurde mit Hilfe der Sssl-Methyltransferase in einem Ansatz *in vitro* methyliert (Minigen +Sssl/ivm). Außerdem wurde ein weiterer Ansatz mit dem Minigen und den gleichen Puffern etc., jedoch ohne das Sssl-Enzym inkubiert (Minigen –Sssl). Das unbehandelte Minigen, Minigen -Sssl und das methylierte Minigen +Sssl/ivm wurden im Vergleich zu einem untransfizierten Kontrollansatz (Kontr.) in HEK293-Zellen eingebracht. Nach 48 h fand die Zellernte statt. Die isolierte RNA wurde mit *random* Hexamer-Primern in cDNA konvertiert und kam für das TaqMan-qPCR-Assay zum Einsatz. Alle qPCR-Werte wurden auf *GAPDH* normalisiert. Signifikanz der Gesamttranskriptmenge (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Einstichproben-t-Test für gepaarte Werte im Vergleich zum unbehandelten Minigen.

Als nächstes fand eine Behandlung von Zellen mit dem Reagenz 5-Aza-2'-desoxycytidin (Aza) statt. Aza dient der Demethylierung der DNA, da es ein Methyltransferase-Inhibitor ist. Für diesen Versuch wurden die Zellen wie unter 2.2.4 beschrieben mit 0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  oder 15  $\mu\text{M}$  Aza behandelt. Die geernteten Zellen wurden sowohl für eine RNA- als auch eine Proteinextraktion benutzt, um die Auswirkungen der Aza-Behandlung auf Transkriptions- sowie Expressionsebene zu analysieren. Neben HEK- und HeLa-Zellen kamen ebenso verschiedene Kolonkrebzelllinien zum Einsatz. Als Kontrolle für den Erfolg der Aza-Behandlung diente die Überprüfung der Reexpression von *MLH1* in HEK293T-Zellen. In dieser Zelllinie ist das *MLH1*-Gen durch Promotor-Hypermethylierung stillgelegt [110] und sollte nach Demethylierung durch Aza eine Reaktivierung aufweisen. Anhand der Expressions- und Transkriptionsergebnisse (Abbildung 3.6 und 3.7 B, D) wurde eine erfolgreiche Aza-Behandlung bestätigt, da *MLH1* reexprimiert wurde. Auf mRNA-Ebene war *MLH1* im Schnitt 8-fach (10  $\mu\text{M}$  Aza) bzw. 13-fach erhöht (15  $\mu\text{M}$  Aza) im Vergleich zum Kontrollansatz mit 0  $\mu\text{M}$  Aza. In den restlichen Zelllinien war für *MLH1* auf Proteinebene entweder kein Unterschied im Proteinlevel abhängig von Aza sichtbar oder es wurde nicht detektiert, wie in den HCT116-Zelllinien, die *MLH1*-negativ sind. Die *MUTYH*-Level der Zelllinien HEK293, HEK293T, HeLa, SW620 und LoVo blieben abhängig der Aza-Behandlung relativ unverändert. Lediglich die SW480- und HCT116-Zellen wiesen einen leichten Rückgang der *MUTYH*-Expression nach der Behandlung mit Aza auf (Abbildung 3.6).

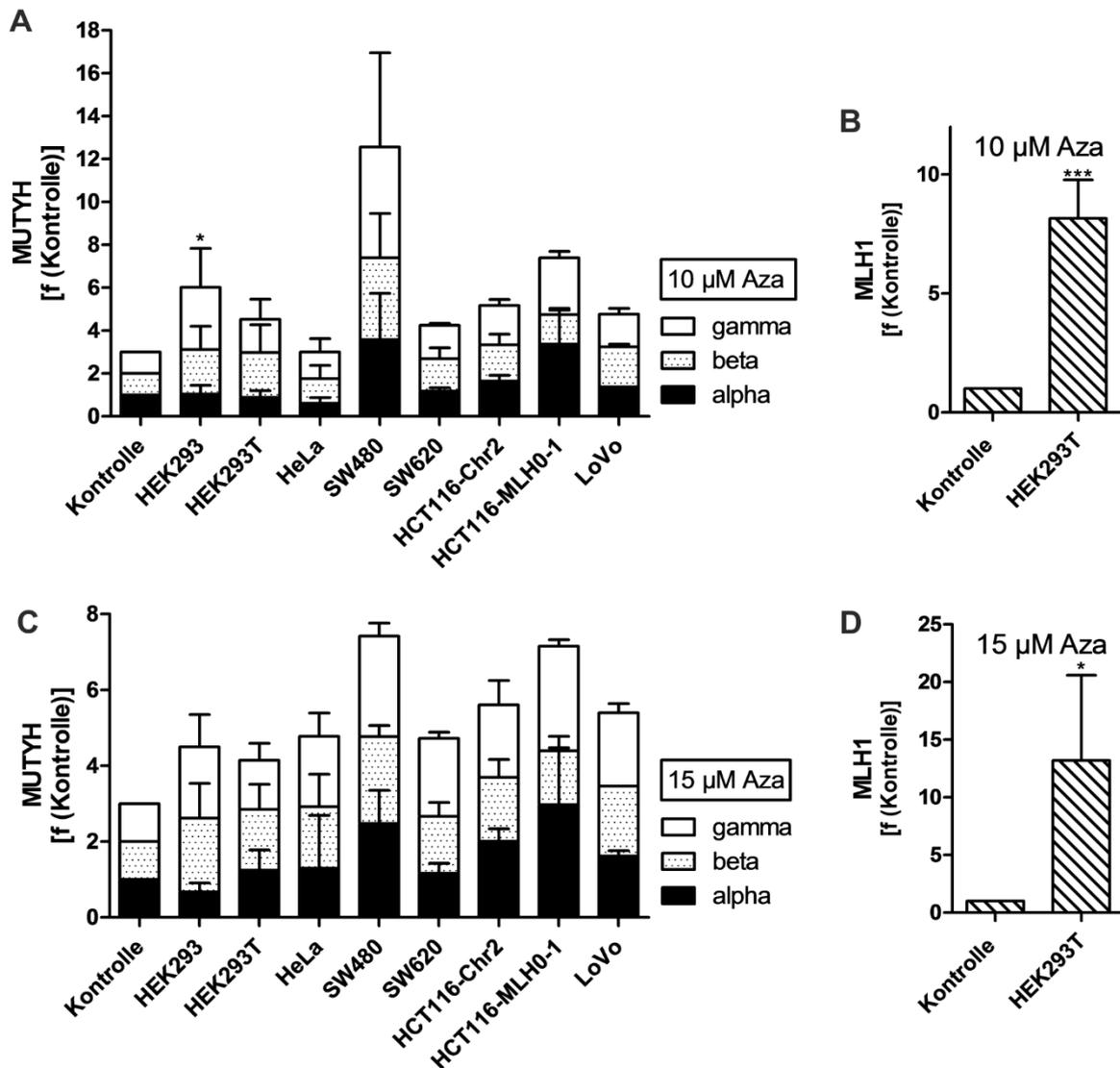


**Abbildung 3.6: Effekt der Aza-Behandlung verschiedener Zelllinien auf die MUTYH-Expression.** Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurden die entsprechenden Zelllinien täglich mit 0 µM, 10 µM oder 15 µM Aza-Reagenz behandelt. Am letzten Tag fand eine Proteinextraktion statt. Die Extrakte (50 µg) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine nach einem Western Blot mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

Auf *MUTYH*-Transkriptebene zeigte sich im Vergleich der Gesamttranskriptmenge zur Kontrolle aller Zelllinien (außer HEK293 10 µM Aza) kein signifikanter Unterschied unabhängig davon, ob 10 µM oder 15 µM Aza verwendet wurden (Abbildung 3.7 A, C). Lediglich in HEK293-Zellen war bei der Behandlung mit 10 µM eine signifikante Erhöhung des Transkriptlevels erkennbar, dies traf jedoch nicht nach Behandlung mit 15 µM Aza zu. Zudem war für die SW480- und HCT116-Zellen kein Rückgang der Transkriptmenge von *MUTYH* nach Aza-Behandlung im Vergleich zum Proteinlevel zu sehen.

Insgesamt lassen die Demethylierungsversuche mit Aza den Schluss zu, dass trotz erfolgreicher Aza-Behandlung (siehe MLH1) der verschiedenen Zelllinien kein Effekt auf die *MUTYH*-Expression oder Transkription besteht, was auf eine reguläre Unmethylierung des *MUTYH*-Gens im CpG-Dinukleotidkontext hindeutet oder darauf, dass eine eventuell vorhandene Methylierung die Expression nicht beeinflusst.

Als letztes Telexperiment zur Bestimmung der DNA-Methylierung des *MUTYH*-Gens wurde aus den vorherig verwendeten Zelllinien DNA isoliert. Diese wurde mit Bisulfit behandelt und anschließend in einer Sequenzierung eingesetzt, um den Methylierungsstatus zu ermitteln. Als Kontrolle zu den Zelllinien kamen aus Blut isolierte Lymphozyten von zwei gesunden Personen zum Einsatz. Im Gegensatz zu stark proliferierenden Tumorzellen sind im Blut zirkulierende Lymphozyten nicht teilungsaktiv, weswegen sie die nukleären *MUTYH*-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  nur geringfügig transkribieren (siehe Abbildung 1.7 b, [95]).



**Abbildung 3.7: Wirkung der Aza-Behandlung unterschiedlicher Zelllinien auf die *MUTYH*- und *MLH1*-Transkription.** Die angegebenen Zelllinien wurden nach dem Aussäen jeden Tag mit 10 μM (A, B) oder 15 μM (C, D) Aza-Reagenz behandelt. 96 h nach Aussaat wurden die Zellen für eine RNA-Isolation geerntet. Die Konvertierung in cDNA fand mit *random* Hexamer-Primern statt. Die Werte des TaqMan-qPCR-Assay wurden auf *GAPDH* normalisiert und als Faktor (f) der Kontrolle (Behandlung mit 0 μM Aza) dargestellt. Neben der *MUTYH*-Transkription (A, C) sind ebenso die Auswirkungen auf die *MLH1*-Transkription (B, D) zur Überprüfung der Aza-Behandlung in HEK293T-Zellen gezeigt. Signifikanz der Gesamttranskriptmenge (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Wilcoxon-*matched-pairs*-Test im Vergleich zur Kontrolle (A, C) bzw. gemäß Einstichproben-t-Test für gepaarte Werte im Vergleich zur Kontrolle (B, D).

Die Verwendung von Bisulfit führt dazu, dass unmethylierte Cytosine zu Uracil umgewandelt werden. Nach einer PCR sind somit nur die ursprünglich methylierten Cytosine in der DNA enthalten. Die methylierungsspezifischen PCR-Primer (siehe 2.1.8) decken insgesamt 62 zu analysierende CpGs der CpG-Insel im *MUTYH* AFE 1β- und 1γ-Bereich ab (siehe Abbildung 3.1; Originalsequenz mit Markierung der analysierten Cytosine: siehe Anhang). Die darauffolgende Sequenzierung hat gezeigt, dass die in Kultur gehaltenen Zellen zwischen 0% und 3,4% Methylierung aufwiesen. Der niedrigste Wert war in HEK293T-Zellen vorzufinden im

Vergleich zum höchsten Wert in HEK293-Zellen. Die Lymphozyten-DNA zeigte keinen großen Unterschied bezüglich des Methylierungsanteils, welcher 1% und 1,7% betrug (Tabelle 3.1). Insgesamt waren die Lymphozyten in der Exon 1-Region von *MUTYH* um einen Prozentpunkt weniger stark methyliert als die DNA aus Kolonzelllinien (1,4% vs. 2,4%). Somit bestätigte die Methylierungsanalyse die aus der Aza-Behandlung erwartete fehlende Methylierung der CpG-Insel der Exon 1-Region von *MUTYH* in Zelllinien. Außerdem konnte eine Beeinflussung der AFE-Transkription durch DNA-Methylierungen ausgeschlossen werden, da die Lymphozyten im analysierten *MUTYH* AFE 1 $\beta$ - und 1 $\gamma$ -Bereich nicht stärker methyliert waren als die Kolonzelllinien, obwohl Blut-Lymphozyten nur ein geringes Level von 1 $\beta$ - und 1 $\gamma$ -Transkripten aufweisen [95].

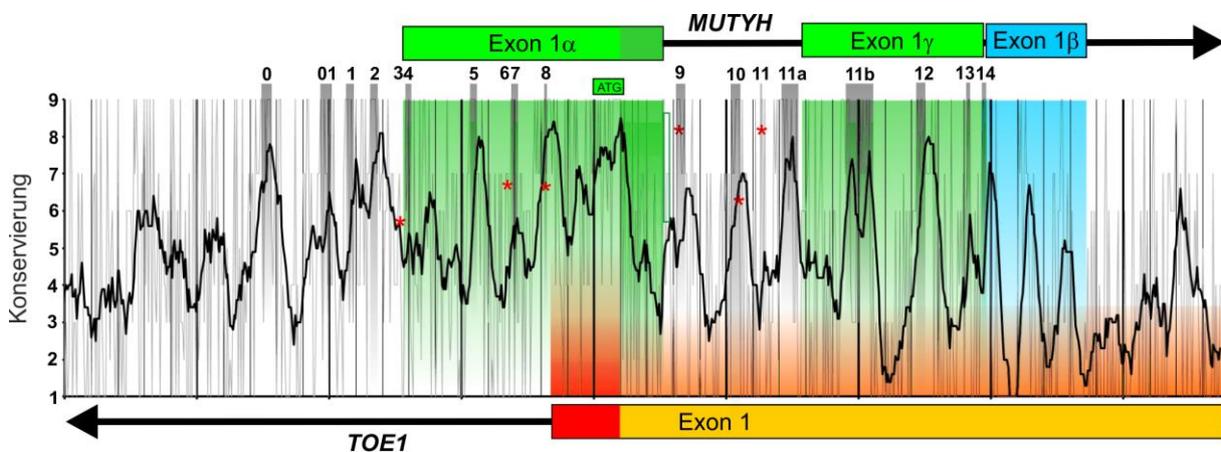
Zusammenfassend haben DNA-Methylierungen keinen regulierenden Einfluss auf die Transkription der AFEs von *MUTYH*. Zudem liegt in den Kolonkrebszelllinien keine Repression des *MUTYH*-Gens durch DNA-Methylierungen vor.

**Tabelle 3.1: Zusammenfassung der DNA-Methylierung von *MUTYH* in unterschiedlichen Zelllinien und Kontroll-Lymphozyten.** Nach der DNA-Isolation aus angegebenen Zelllinien bzw. aus dem Blut stammenden Lymphozyten zweier gesunder Personen wurde diese mit Bisulfit behandelt und in einer methylierungsspezifischen PCR amplifiziert. Die zu analysierende *MUTYH*-Sequenz enthielt insgesamt 62 mögliche Methylierungsstellen (siehe Anhang) und wurde via Sequenzierung (je nach Auflösung der Sequenz) einzeln ausgewertet. Die Kolonkrebszelllinien sind durch (°) markiert.

Zelllinie	Analysierte CpGs	davon methyliert	davon unmethyliert	Anteil methyliert
HEK293	88	3	85	3,4%
HEK293T	72	-	72	0%
HeLa	124	2	122	1,6%
SW480°	98	3	95	3,1%
SW620°	98	1	97	1,0%
HCT116-Chr2°	98	3	95	3,1%
HCT116-MLH0-1°	62	1	61	1,6%
LoVo°	692	17	675	2,5%
Lymphozyten 1	653	11	642	1,7%
Lymphozyten 2	412	4	408	1,0%
Gesamt Lymphozyten	1065	15	1050	1,4%
Gesamt Kolonzelllinien	1048	25	1023	2,4%

### 3.3 Untersuchung der Auswirkungen von genetischen Promotorveränderungen auf die *MUTYH*-Transkription

Da DNA-Methylierungen keinen regulierenden Einfluss auf die *MUTYH*-Transkription haben, sollte nach Fertigstellung des *MUTYH*-Promotor-Minigens dieses dazu verwendet werden, funktionelle DNA-Elemente der Promotorregion zu identifizieren und die Auswirkungen von genetischen Varianten, die in Krebspatienten gefunden wurden, zu studieren. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit 20 Veränderungen in der *MUTYH*-Promotorregion analysiert. Bei 14 dieser Veränderungen handelte es sich um künstlich erzeugte Varianten, die sich in konservierten Bereichen des Promotors befanden. Die restlichen sechs Varianten waren Patientenvarianten (Abbildung 3.8). Die abgebildete Konservierung des genetischen Codes von *MUTYH* ist eine *in silico* Zusammenfassung der Konservierung von *MUTYH* bei Wirbeltieren. Mit Hilfe dieser *in silico* Analysen wurden hochkonservierte Bereiche in der Promotorregion anhand der Peaks ausgewählt, die sich in der Nähe der Transkriptionsstarts der alternativen ersten Exons befanden (graue Balken in Abbildung 3.8) und somit einen Einfluss auf deren Transkription haben könnten. Mit Hilfe der LOVD-Datenbank wurden die humanen Varianten (rote Sterne in Abbildung 3.8) in diesem Bereich ausgewählt.

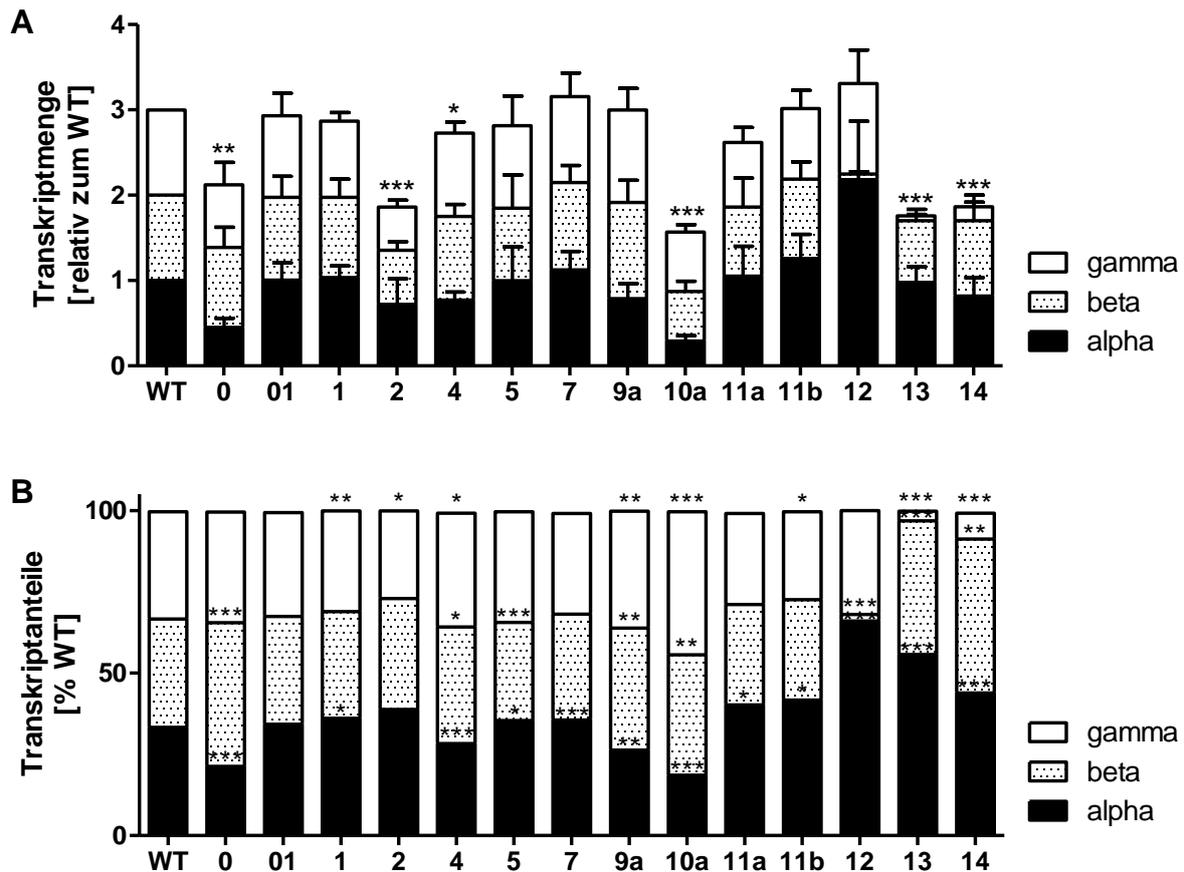


**Abbildung 3.8: Konservierung des Promotorbereichs und der ersten Exons von *MUTYH* sowie Position der untersuchten Varianten.** Die genomische *MUTYH*-Konservierung ist in Form der schwarzen Peaks dargestellt. Die schwarzen senkrechten Linien markieren 100 bp Abstände. Die graue Linie stellt die Konservierung auf Einzelbasenlevel dar, wohingegen die schwarze Linie den gleitenden Durchschnitt von je 10 bp anzeigt. Die nummerierten grauen Balken repräsentieren die ausgewählten Varianten, wobei humane Varianten zusätzlich durch rote Sterne markiert sind. Die drei AFEs von *MUTYH* sowie Exon 1 von *TOE1* sind angegeben und der Translationsstart durch eine farbliche Veränderung sowie durch ATG gekennzeichnet.

Die 20 zu analysierenden Varianten wurden mittels Mutagenese-PCR in das *MUTYH*-Promotor-Minigen eingefügt. 48 h nach Transfektion der Minigenvarianten in HEK293-Zellen wurde die RNA isoliert, mit DNase verdaut und mit rH-Primern in cDNA konvertiert. Die

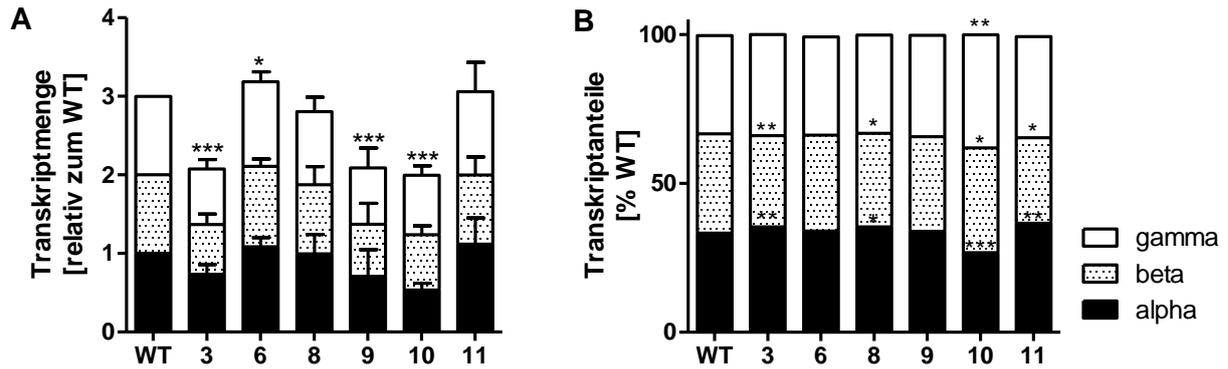
erhaltene cDNA wurde schließlich in einer TaqMan-qPCR amplifiziert, um die Effekte auf Transkription und Spleißen der alternativen ersten Exons von *MUTYH* im Vergleich zum unveränderten Minigen zu erforschen.

Die in hochkonservierten Bereichen liegenden genetischen Elemente der vorangegangenen *in silico* Analysen wurden im Minigen durch Mutagenesen inaktiviert. Hinsichtlich der *MUTYH*-Gesamttranskription waren die Varianten 0, 2, 13 und 14 signifikant um etwa  $\frac{1}{3}$  (Transkriptionsrate zwischen 59% und 70%) in ihrer Transkription im Vergleich zum WT reprimiert (Abbildung 3.9 A). Eine noch stärkere Verringerung der Gesamttranskription zeigte die Variante 10a, bei welcher die Transkription nur noch etwa die Hälfte des Wildtyps einnahm (53%). Dies war hauptsächlich auf die Reduktion des 1 $\alpha$ -Transkripts zurückzuführen (Abbildung 3.9 B), was ebenso bei Variante 0 der Fall war. Die Variante 12 zeichnete sich im Gegensatz dazu durch eine zweifach erhöhte 1 $\alpha$ -Transkription bei gleichzeitigem Rückgang des 1 $\beta$ -Transkripts aus, während die Expression von 1 $\gamma$  dem WT entsprach. Für Variante 13 und 14 ergaben sich keine Veränderungen der 1 $\alpha$ - und 1 $\beta$ -Transkription, jedoch konnte keine 1 $\gamma$ -Transkription mehr detektiert werden. Hierbei handelte es sich jedoch nur um ein experimentelles Artefakt, da sich die genetischen Veränderungen dieser Varianten im Minigen an der Stelle der TaqMan-Sonde für das 1 $\gamma$ -Transkript befanden.



**Abbildung 3.9: Auswirkungen der Inaktivierung konservierter DNA-Elemente auf die *MUTYH*-AFE-Transkription.** Die *MUTYH*-Promotor-Minigene, die entweder die *MUTYH* Wildtyp (WT)-Sequenz bzw. die veränderten konservierten Motive (siehe 2.1.8) enthielten, wurden 48 h vor Isolation der RNA in HEK293-Zellen transfiziert. Die mit rH-Primern in cDNA umgeschriebenen Transkripte wurden in einer TaqMan-qPCR quantifiziert und auf GAPDH normalisiert. Dargestellt ist (A) die relative Transkriptmenge bezogen auf den WT und (B) die Transkriptanteile in Prozent im Vergleich zum WT. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Wilcoxon-*matched-pairs*-Test im Vergleich zum WT.

Die zu untersuchenden Patientenvarianten im Promotorbereich von *MUTYH* wurden ebenfalls durch Mutagenesen im Minigen nachgebildet, um deren Effekte auf die Transkriptzusammensetzung und mögliche Veränderungen zum Wildtyp zu detektieren. Bei drei der Patientenvarianten wurde ein signifikanter Rückgang der Gesamttranskription um  $\frac{1}{3}$  in Bezug auf den WT ermittelt. Hierbei handelte es sich um die Varianten 3, 9 und 10 (Abbildung 3.10 A). Bei keiner der letzteren Varianten sowie bei den restlichen Patientenvarianten wurde eine drastische Veränderung der Transkriptzusammensetzung festgestellt (Abbildung 3.10 B). Lediglich Variante 10 zeigte eine leichte Verringerung des  $1\alpha$ -Transkripts um 6 Prozentpunkte im Vergleich zum WT. Da die Transkription bei keiner der Varianten völlig vermindert war, ist diesbezüglich keine Variante als sicher pathogen einzustufen. Die Varianten 6, 8 und 11 entsprachen dem WT-Level und können auf Transkriptionsebene als wahrscheinlich nicht pathogen bewertet werden.



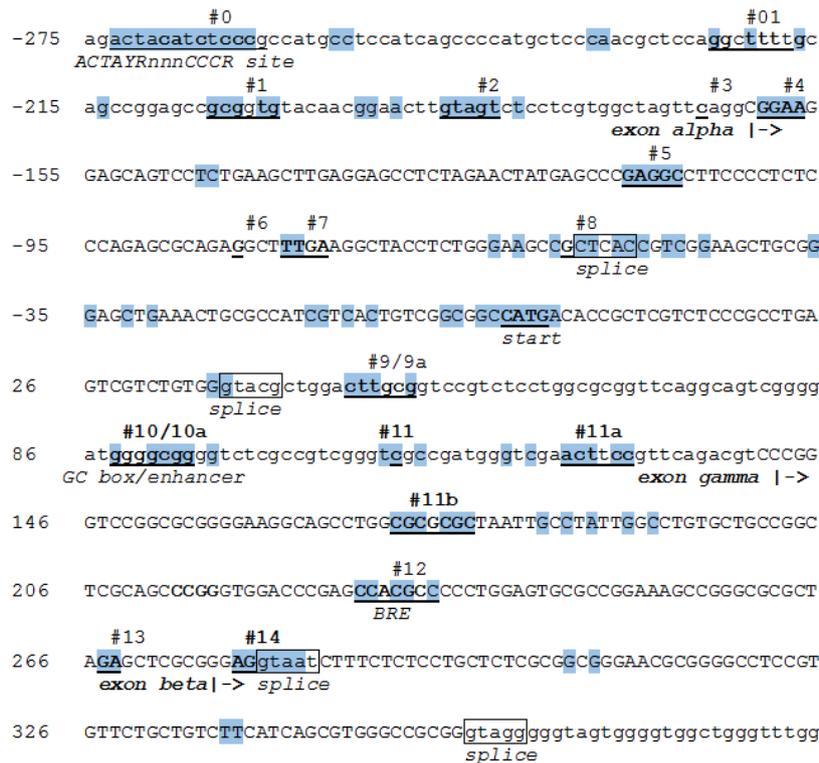
**Abbildung 3.10: Effekt von Patientenvarianten auf die *MUTYH*-AFE-Transkription.** Die verschiedenen *MUTYH*-Promotor-Minigene beinhalten entweder die *MUTYH* WT-Sequenz oder die entsprechenden Patientenvarianten (siehe 2.1.8). Nach Transfektion der Minigene in HEK293-Zellen wurden die *MUTYH*-Transkripte mittels TaqMan-qPCR amplifiziert, auf GAPDH normalisiert und (A) die relativen Transkriptmengen bezogen auf den WT und (B) die Transkriptanteile in Prozent im Vergleich zum WT abgebildet. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Wilcoxon-*matched-pairs*-Test im Vergleich zum WT.

Nach der Analyse der Varianten schloss sich der Versuch einer Identifizierung der regulatorischen Elemente in der *MUTYH*-Promotor-/Exon 1-Sequenz an. Dadurch konnten bestimmte regulatorische DNA-Elemente zugeordnet werden (Abbildung 3.11). Die Variante 0 befand sich in dem sogenannten M4-Motiv mit der Konsensussequenz ACTAYRnnnCCCR [135]. Im *MUTYH*-Promotor beginnt das M4-Motiv 113 bp *upstream* des Exons 1 $\alpha$ , einer geeigneten Distanz, um die Transkription des 1 $\alpha$ -Exons zu regulieren.

Die Varianten 10 und 10a waren innerhalb einer hochkonservierten GC-Box (Konsensussequenz GGGCGGR) lokalisiert [135], welche in einem angemessenen Abstand von 54 bp zum Exon 1 $\gamma$  liegt, um dessen Transkription zu beeinflussen. Die Inaktivierung des Motivs (Variante 10a) und die Patientenvariante 10 führten allerdings zu einer Gesamtrepression aller drei Isoformtranskripte, wobei die 1 $\alpha$ -Transkription in Variante 10a am stärksten zurückging.

Eine weitere Variante, bei der ein signifikanter Rückgang in einer der Isoformen detektiert werden konnte, war Variante 12. Hier war keine Expression der 1 $\beta$ -Isoform messbar. Die Variante 12 inaktiviert in diesem Zusammenhang ein hochkonserviertes DNA-Element, das sogenannte Transkriptionsfaktor-IIB-Erkennungselement (BRE) mit der Konsensussequenz CCACGCC [136]. Das Element befindet sich 49 bp aufwärts des Transkriptionsstarts von Exon 1 $\beta$  und könnte dieses regulieren.

Insgesamt wurden drei konservierte Sequenzmotive *upstream* der jeweiligen Transkriptionsstartseiten der alternativen ersten Exons von *MUTYH* identifiziert, die für die korrekte Transkription der alternativen Isoformen von Notwendigkeit sind.

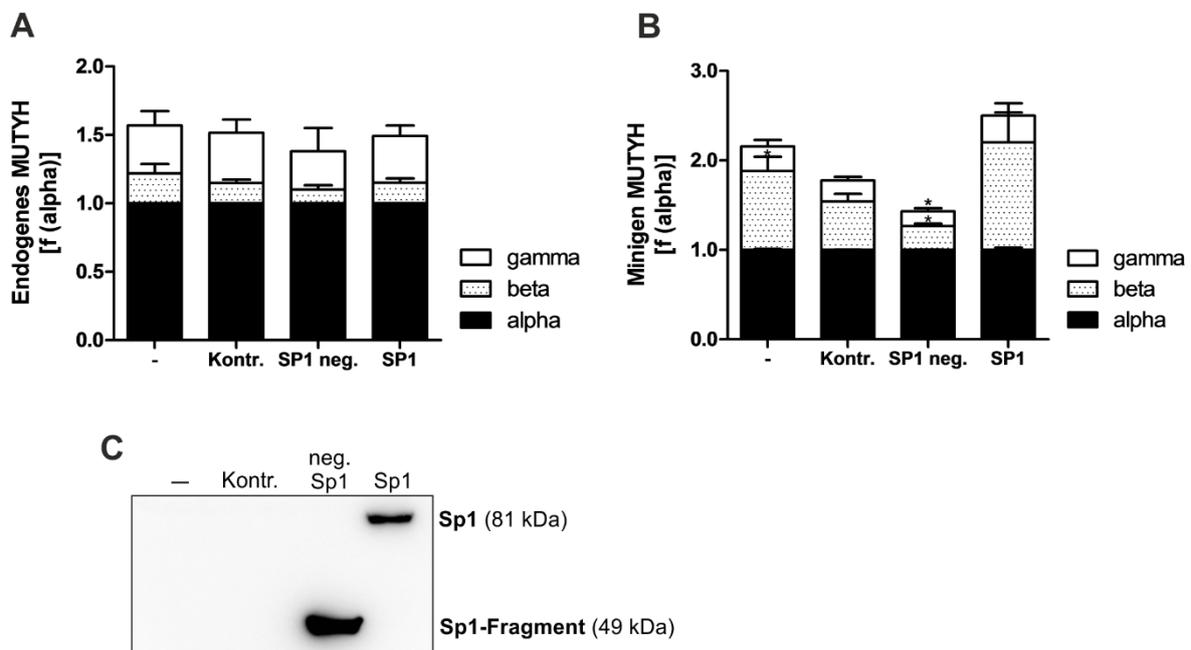


**Abbildung 3.11: MUTYH-Promotorsequenz.** Sequenz des *MUTYH*-Promotors und der alternativen ersten Exons 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$  (nach *NCBI Reference Sequence*: NG\_008189.1). Die Zahlen stehen für die Basenpaaranzahl beginnend mit 0 beim Translationsstart (ATG) von Exon 1 $\alpha$ . Hochkonservierte Basen sind blau hinterlegt. Spleißstellen sind eingerahmt. Die Positionen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Varianten sind vermerkt (#) und die veränderten Basen fett gedruckt und unterstrichen. Darüber hinaus sind die funktionell relevanten DNA-Elemente dargestellt, die mit dieser Arbeit identifiziert werden konnten. Die Exons sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet, währenddessen Kleinbuchstaben Introns widerspiegeln.

### 3.4 Ermittlung der Effekte des Transkriptionsfaktors Sp1 auf die *MUTYH*-Transkription

Um die Funktion der GC-Box und deren Einfluss auf die *MUTYH*-Expression genauer zu untersuchen, kam das *specificity protein 1* (Sp1) zum Einsatz. Sp1 ist der bekannteste Transkriptionsfaktor, der an die GC-Box bindet und ubiquitär exprimiert wird [135] (siehe auch Diskussion). Ob dieser ebenso in Zusammenhang mit der Regulation von *MUTYH* steht, sollte folglich geklärt werden. Dafür wurden HEK293-Zellen mit einem Kontrollplasmid (pEBGN [117]), einem dominant-negativen Sp1-Fragment (pEBGN-Sp1 [117]) und dem funktionellen Sp1-Protein (*Addgene* Plasmid #12097) mit oder ohne *MUTYH*-Promotor-Minigen transfiziert. Das für ein dominant-negatives Sp1-Protein kodierende Plasmid enthält die Aminosäuren 592-758 des humanen Sp1-Proteins und somit die DNA-Bindungsdomäne, ihm fehlt jedoch die Transaktivierungsdomäne, weshalb es keine transkriptionsfördernde Funktion hat.

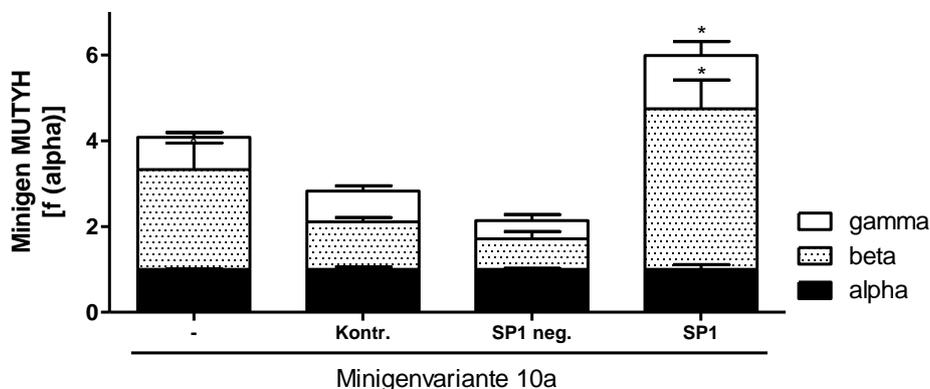
Die qPCR-Messung ergab, dass weder die Transfektion der Kontrollplasmide noch der Sp1-Vektoren eine Auswirkung auf die Transkriptzusammensetzung des endogenen *MUTYH* hatte (Abbildung 3.12 A), obwohl das Sp1-Fragment und das funktionelle Sp1-Protein in den Zellen exprimiert wurden (Abbildung 3.12 C). Wurden die Plasmide mit dem *MUTYH*-Promotor-Minigen kotransfiziert (Abbildung 3.12 B), zeigte sich beim dominant-negativen Sp1-Fragment ein leichter Rückgang der  $\beta$ -/ $\gamma$ -Transkripte, da das inaktive Fragment zwar an den Promotor bindet und es mit endogenem Sp1 konkurriert, jedoch keinen Effekt hervorruft. Im Vergleich zur Kontrolltransfektion wurde für das funktionelle Sp1 jedoch kein signifikanter Unterschied der Transkriptzusammensetzung detektiert. Zusammengefasst weist die Überexpression von Sp1 nicht auf eine zentrale Rolle von Sp1 bei der Expressionsregulation des *MUTYH*-Gens hin. Insbesondere kann eine Regulation des  $1\gamma$ -Exons über die GC-Box ausgeschlossen werden, denn obwohl diese in angemessenem Abstand vor Exon  $1\gamma$  liegt, hat Sp1 keine Auswirkungen auf die  $1\gamma$ -Transkription.



**Abbildung 3.12: Effekt der Sp1-Überexpression auf die *MUTYH*-Transkription.** Das Kontrollplasmid (Kontr.), das dominant-negative Sp1-Fragment (Sp1 neg.) und das funktionelle Sp1-Protein (Sp1) wurden im Vergleich zu einem untransfizierten Ansatz (–) mit (B) oder ohne (A) Minigen in HEK293-Zellen transfiziert. 48 h danach wurden RNA und Proteine aus den Zellen isoliert. Die RNA wurde mittels *random* Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Anschließend folgte ein TaqMan-qPCR-Assay. Um die Auswirkungen von Sp1 auf die  $1\beta$ - und  $1\gamma$ -Transkription deutlich zu machen, wurden diese als Faktor (f) des  $\alpha$ -Transkripts dargestellt. (C) Überprüfung der Sp1-Expression anhand SDS-PAGE und Western Blot der aus den transfizierten Zellen isolierten Proteine. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Wilcoxon-*matched-pairs*-Test im Vergleich zur Kontrolltransfektion.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Sp1-Überexpression auf die Minigenvariante 10a überprüft, deren GC-Box mutiert vorlag und Sp1 somit nicht in der Lage sein sollte, an das Motiv zu binden. Dafür wurden erneut neben dem funktionellen Sp1-Plasmid, das Sp1-

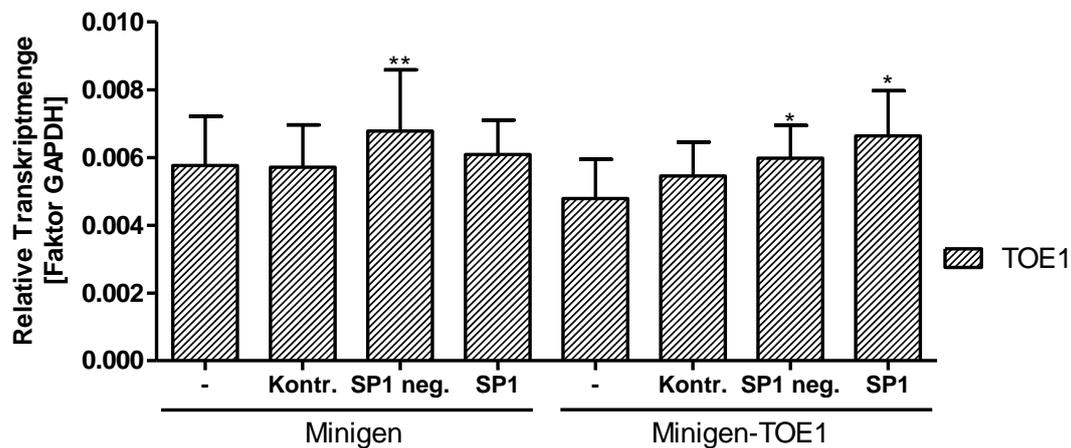
Fragment und der Kontrollvektor mit der Minigenvariante 10a kotransfiziert. Die Effekte des Sp1-Transkriptionsfaktors auf die *MUTYH*-Minigen-Transkription demonstrierten vergleichbare Reaktionen zwischen dem WT-Minigen (Abbildung 3.12 B) und der Minigenvariante 10a (Abbildung 3.13). Bei beiden zeigte sich ein Rückgang der  $\beta$ -/ $\gamma$ -Transkription in Bezug auf das dominant-negative Sp1, währenddessen unter Kotransfektion des Transkriptionsfaktors Sp1 ein Anstieg der Transkripte zu verzeichnen war. Dies verdeutlicht, dass Sp1 zwar die Transkription des Gens moderat modulieren kann, aber dass diese Effekte nicht spezifisch über die GC-Box vermittelt wurden. Somit ist Sp1 nicht der Transkriptionsfaktor, der über die GC-Box die *MUTYH*-Transkription spezifisch kontrolliert und reguliert.



**Abbildung 3.13: Einfluss des Transkriptionsfaktors Sp1 auf die Minigenvariante 10a.** HEK293-Zellen wurden mit der *MUTYH*-Promotor-Minigenvariante 10a (inaktivierte GC-Box) sowie zusätzlich dem Kontrollvektor (Kontr.), dem dominant-negativen Sp1-Fragment (Sp1 neg.) und dem funktionellen Sp1 (Sp1) im Vergleich zu einem untransfizierten Ansatz (-) kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion fand die RNA-Isolation und Umschreibung in cDNA mittels *random* Hexamer-Primern statt, worauf ein TaqMan-Assay für *MUTYH* folgte. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Transkripte wurden zum besseren Vergleich auf das  $\alpha$ -Transkript bezogen dargestellt ( $f$  (alpha) = Faktor von alpha). (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß *Wilcoxon-matched-pairs*-Test im Vergleich zur Kontrolltransfektion.

Da unter Überexpression von Sp1 kein Einfluss auf die *MUTYH*-AFE-Expression nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor Sp1 Auswirkungen auf die Expression des in entgegengesetzter Richtung von *MUTYH* transkribierten Gens *TOE1* haben könnte. Die GC-Box liegt hier am Ende von Exon 1 *upstream* des Translationsstarts von *TOE1* (vergleiche Abbildung 3.8). Dazu wurden die gleichen Sp1-Vektoren wie zuvor verwendet und zusammen mit dem *MUTYH*-Promotor-Minigen bzw. dem mit *TOE1* erweiterten Minigen in HEK293-Zellen kotransfiziert. Der Sp1-Transkriptionsfaktor wies keine Beeinflussung der *TOE1*-Transkription auf, da nach Überexpression von Sp1 kein signifikanter Anstieg von *TOE1* im Vergleich zum Kontrollvektor zu sehen war (Abbildung 3.14). Das erweiterte Minigen-*TOE1* enthält neben der Promotorregion und Exon 1 zusätzlich den gesamten Exon 2-Bereich von *TOE1*. Hier war

zwar ein signifikanter Zuwachs der *TOE1*-Transkriptexpression zum Kontrollvektor zu verzeichnen, jedoch ist dieser aufgrund des Vergleichs zum Minigen nicht biologisch relevant. Übereinstimmend damit zeigte die alleinige Transfektion der Sp1-Plasmide und des Kontrollplasmids in HEK293-Zellen keine Effekte auf die endogene *TOE1*-Transkription (eine exemplarische Experimentreihe; nicht gezeigt).



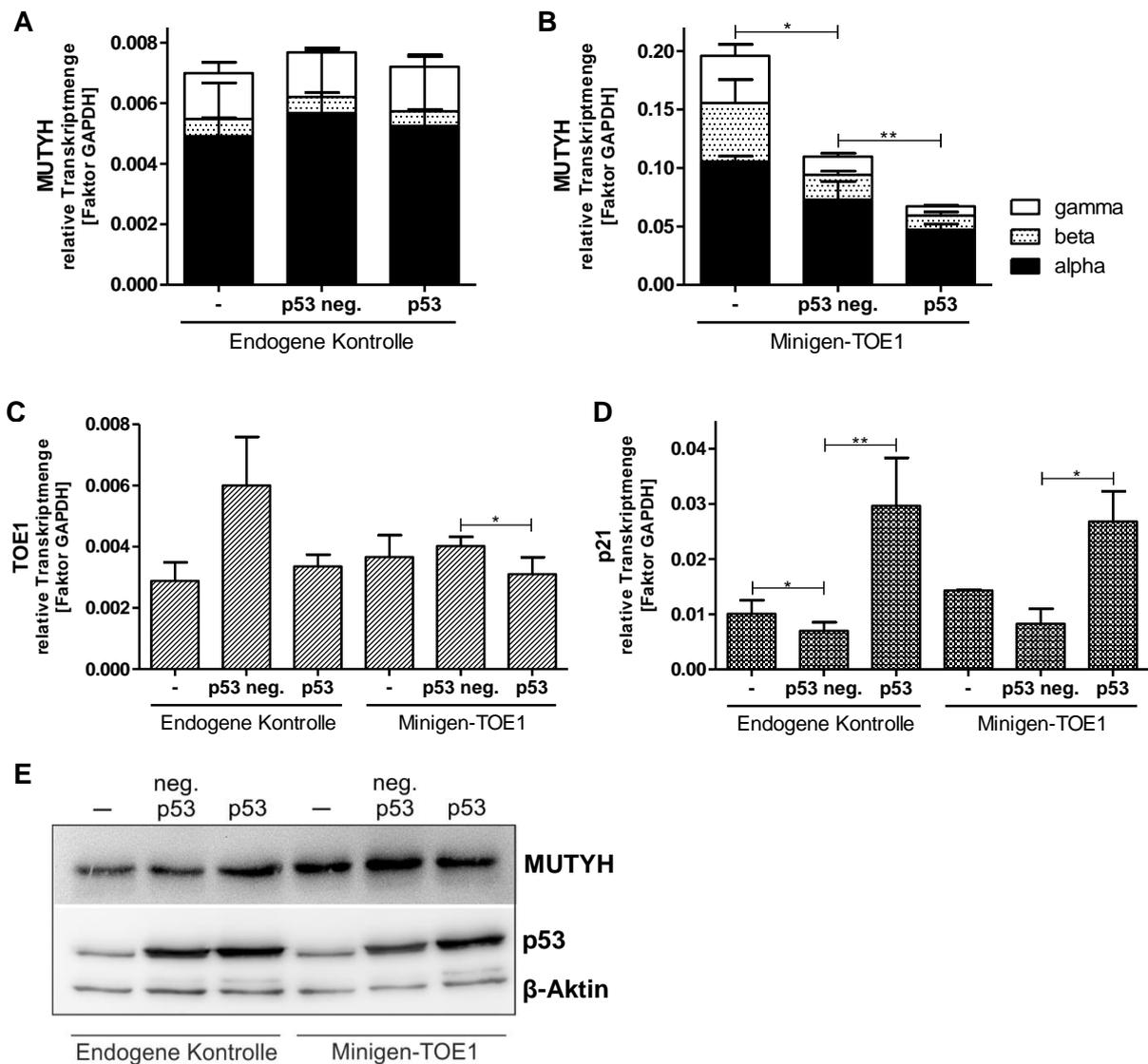
**Abbildung 3.14: Auswirkung von Sp1 auf die TOE1-Transkription.** HEK293-Zellen wurden einerseits mit dem *MUTYH*-Promotor-Minigen sowie andererseits mit dem TOE1 erweiterten *MUTYH*-Promotor-Minigen (Minigen-TOE1) transfiziert und gleichzeitig mit den entsprechenden Sp1-Plasmiden kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und RNA isoliert, die mit *random* Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben wurden. Die cDNA wurde mit Hilfe der TaqMan-qPCR für *TOE1* amplifiziert und auf *GAPDH* normalisiert. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Wilcoxon-*matched-pairs*-Test im Vergleich zur Kontrolltransfektion.

### 3.5 Analyse des Einflusses des Transkriptionsfaktors p53 auf die *MUTYH*-Transkription

Eines der bekanntesten und meist studierten Transkriptionsfaktoren ist das Tumorsuppressorprotein p53, welches auch als Antwort auf DNA-Schäden induziert wird [137]. Vor kurzem wurde über Ergebnisse berichtet, denen zufolge auch das DNA-Reparaturenzym *MUTYH* von p53 in Zusammenhang mit dem PARP-abhängigen Zelltod transkriptionell reguliert wird [115]. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob p53 auch einen Einfluss auf die Expression bzw. Regulation der alternativen ersten Exons  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  hat.

Zur Überprüfung dieser Frage wurden zwei p53-Konstrukte genutzt: zum einen der p53-Wildtypvektor (pCMV-p53) und zum anderen ein dominant-negatives p53-Kontrollplasmid (pCMV-p53mt135), welches aufgrund eines Basenaustauschs eine Konformationsänderung aufweist und nicht mehr in der Lage ist, mit p53-Bindestellen zu interagieren [115]. Jedes der beiden Plasmide wurde im Vergleich zu einem untransfizierten Ansatz in HEK293-Zellen

transfiziert oder zusammen mit dem Minigen-TOE1 kotransfiziert. Beide p53-Plasmide wurden erfolgreich in den (ko)transfizierten Zellen überexprimiert (Abbildung 3.15 E).



**Abbildung 3.15: Konsequenz der p53-Überexpression auf die (A, B) *MUTYH*-, (C) *TOE1*- und (D) *p21*-Transkription sowie (E) *MUTYH*-Expression.** HEK293-Zellen wurden ohne (endogene Kontrolle) oder mit dem TOE1 erweiterten *MUTYH*-Promotor-Minigen (Minigen-TOE1) transfiziert und simultan mit dem funktionellen p53-Plasmid (p53) oder dem dominant-negativen p53-Vektor (p53 neg.) kotransfiziert. Zudem gab es jeweils einen Ansatz ohne Transfektion der p53-Plasmide (-). 48 h danach wurden die Zellen geerntet und cDNA (mit *random* Hexamer-Primern) bzw. native Gesamtproteinextrakte aus den gleichen Zellansätzen generiert. Die Amplifikation fand mittels TaqMan-qPCR für *MUTYH* (A, B), *TOE1* (C) und *p21* (D) statt. Da die Transkription des Minigens viel stärker ist als die endogene, wurden die Ergebnisse in zwei getrennten Graphen dargestellt. Alle qPCR-Werte wurden auf *GAPDH* normalisiert. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  gemäß Einstichproben-t-Test für gepaarte Werte im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit dem dominant-negativen p53-Plasmid. (E) Western Blot der nativen Gesamtproteinextrakte nach Immunfärbung mit entsprechenden Antikörpern (jeweils 50 µg Proteinextrakt).

Das Gen *p21* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*, auch *CDKN1A*), welches unter direkter transkriptioneller Kontrolle von p53 steht [138], zeigte in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors p53 einen signifikanten Anstieg der Transkriptmenge, während das dominant-negative p53-Protein im Vergleich zum untransfizierten Ansatz zu einem Rückgang der Transkriptmenge führte (Abbildung 3.15 D). Dieser biologische Effekt bestätigte die erfolgreiche und funktionelle Expression von p53 in den kultivierten Zellen. Nichtsdestotrotz konnte ein solcher Effekt nicht für die *MUTYH*-Transkription gezeigt werden. Die endogenen *MUTYH*-Level veränderten sich nach Transfektion nicht und auch die Transkriptvarianten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  blieben anteilig gleich (Abbildung 3.15 A). Die Kotransfektion von p53 mit dem Minigen-TOE1 führte im Vergleich zum inaktiven p53 zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptmenge. Eine Änderung der Anteile der Transkriptvarianten wurde nicht beobachtet (Abbildung 3.15 B). Auf Proteinebene, wo aufgrund des Antikörpers nur endogenes *MUTYH* detektiert wurde, konnte ebenso keine erhöhte *MUTYH*-Expression nach Transfektion von p53 festgestellt werden (Abbildung 3.15 E). Aufgrund der Verwendung des Minigens-TOE1 wurde auch die Reaktion der *TOE1*-Level auf p53 überprüft. Im Zusammenhang mit dem endogenen *TOE1*-Level zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach p53-Expression. Lediglich nach Kotransfektion von p53 mit dem Minigen war eine leichte Abnahme der *TOE1*-Transkriptmenge im Vergleich zum inaktiven p53 zu sehen (Abbildung 3.15 C). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit weder ein positiver Einfluss von p53 auf die *MUTYH*-Transkriptmenge noch auf die *TOE1*-Transkription nachgewiesen wurde. Darum besteht keine direkte transkriptionelle Regulation von *MUTYH* durch den Transkriptionsfaktor p53.

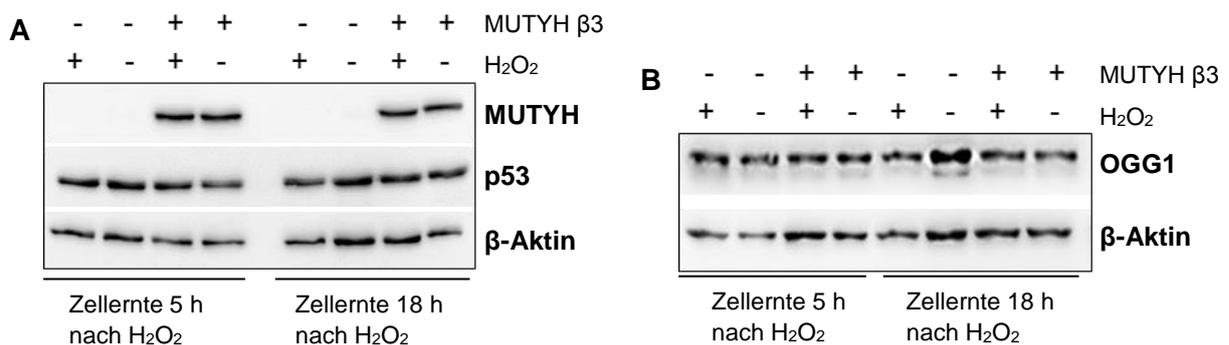
### **3.6 Auswirkung oxidativer Zellschäden auf die *MUTYH*-Expression und -Transkription**

Die Expression von DNA-Reparaturenzymen wird häufig als Antwort auf DNA-Schäden induziert. Aus diesem Grund sollte der Einfluss von oxidativem Stress in Zellen auf die Expression der DNA-Reparaturproteine *MUTYH* und *OGG1* sowie das Tumorsuppressorprotein p53 getestet werden. Um die Antwort auf einen oxidativen Schaden hervorzurufen, wurden HEK293-Zellen mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) behandelt.

Für den Versuch wurden HEK293-Zellen verwendet und zuerst mit oder ohne pcDNA3-*MUTYH* $\beta$ 3-Plasmid transient transfiziert. Dieser Vektor exprimiert die gesamte *MUTYH*  $\beta$ 3-Isoform und kann somit im Western Blot mit entsprechendem Antikörper, im Gegensatz zum *MUTYH*-Promotor-Minigen, detektiert werden. 24 h danach wurden die Ansätze mit 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 40 min behandelt und die lebenden Zellen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (5 h bzw. 18 h) nach der Behandlung geerntet, um native Gesamtproteinextrakte zu gewinnen. Bei

der Ernte war ein deutlicher Zellverlust in den mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -behandelten Ansätzen im Vergleich zu den unbehandelten Ansätzen zu sehen. Das Verhältnis von adhären/lebenden Zellen zu kugelig-schwimmenden/toten Zellen betrug in den behandelten Ansätzen nach 5 h etwa 1:1 und nach 18 h ca. 2:1. Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid hatte somit einen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität und führte bei der Hälfte bzw. bei  $\frac{1}{3}$  der Zellen zum Zelltod.

Anhand des mit Antikörpern gefärbten Blots ist zu erkennen, dass sich die MUTYH-Expressionslevel nach Transfektion mit dem pcDNA3-MUTYH $\beta$ 3-Plasmid abhängig von der Wasserstoffperoxid-Behandlung nicht unterschieden (Abbildung 3.16 A). Dies war auch auf endogenem Level für MUTYH der Fall (nicht sichtbar). OGG1, die dem MUTYH funktionell vorgeschaltete Glykosylase, welche direkt den oxidativen Schaden von 8-oxo-Guanin entfernt, zeigte ebenso gleiche Expressionslevel vor und nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung (Abbildung 3.16 B). Der Transkriptionsfaktor p53 wies ebenfalls keine eindeutige Verstärkung der Expression nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid auf. Der Zeitpunkt der Zellernte (5 h oder 18 h nach Behandlung) machte insgesamt keinen Unterschied in Bezug auf das Ergebnis der Expressionsdaten.

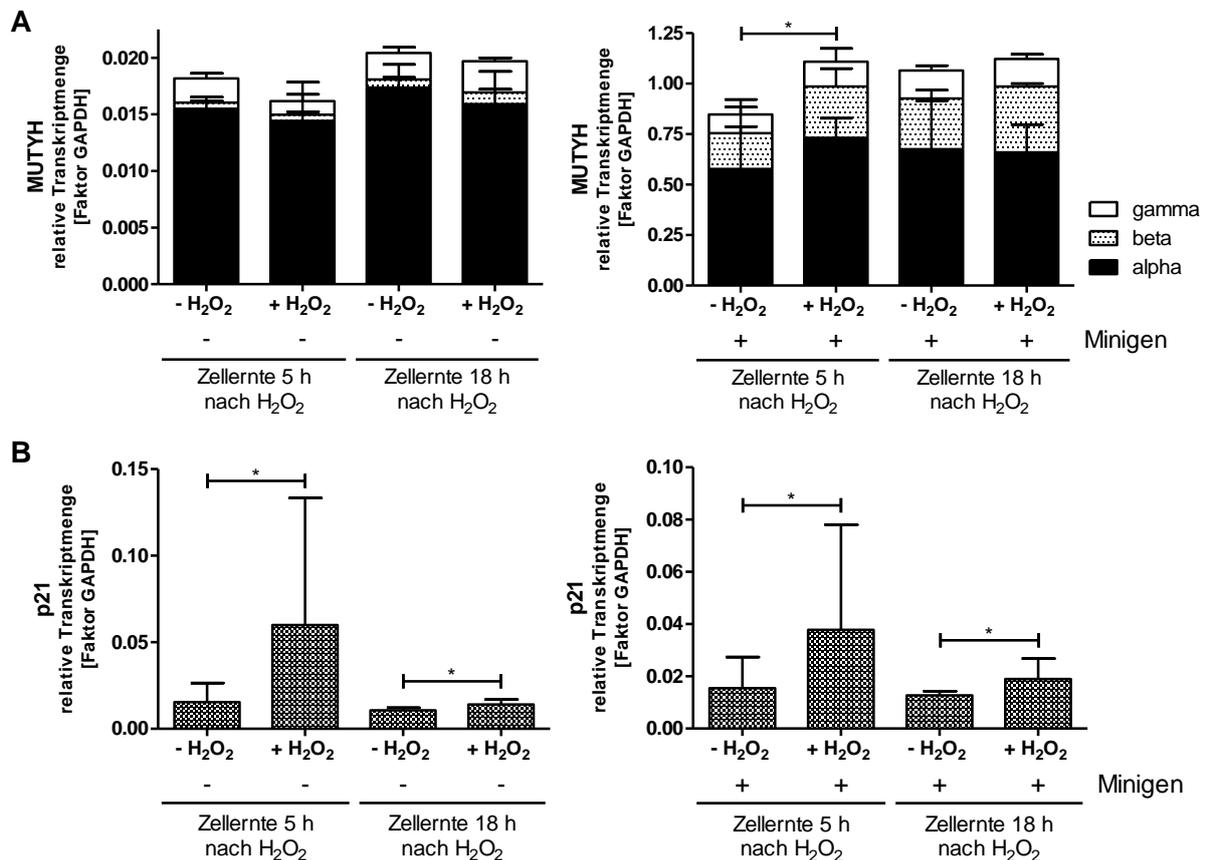


**Abbildung 3.16: Effekt der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung von HEK293-Zellen auf die (A) MUTYH-, p53- und (B) OGG1-Expression.** HEK293-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit oder ohne dem pcDNA3-MUTYH $\beta$ 3-Vektor für 40 min mit 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt, 5 h bzw. 18 h danach geerntet und native Gesamtproteinextrakte gewonnen. 50  $\mu\text{g}$  jedes Proteinextrakts wurden für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunfärbung eingesetzt. Die endogenen MUTYH-Level waren bei längerer Belichtungszeit auch detektierbar, aber da die Banden der Transfektion mit dem pcDNA3-MUTYH $\beta$ 3-Plasmid dann stark überbelichtet waren, wurde diese Darstellung gewählt. Neben der Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin wurden (A) p53 und MUTYH, sowie (B) OGG1 mit Hilfe der jeweiligen Antikörper detektiert.

HEK293-Zellen wurden ebenso mit dem *MUTYH*-Promotor-Minigen transient transfiziert und, wie zuvor bei der Gewinnung von nativen Gesamtproteinextrakten beschrieben, mit Wasserstoffperoxid behandelt und 5 h bzw. 18 h danach für die Isolation von RNA geerntet. Die endogenen *MUTYH*-Level zeigten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Transkriptmenge abhängig von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung (Abbildung 3.17 A). Dies galt ebenso für die *MUTYH*-Transkriptionslevel des Minigens 18 h nach Zellernte. Nur bei dem

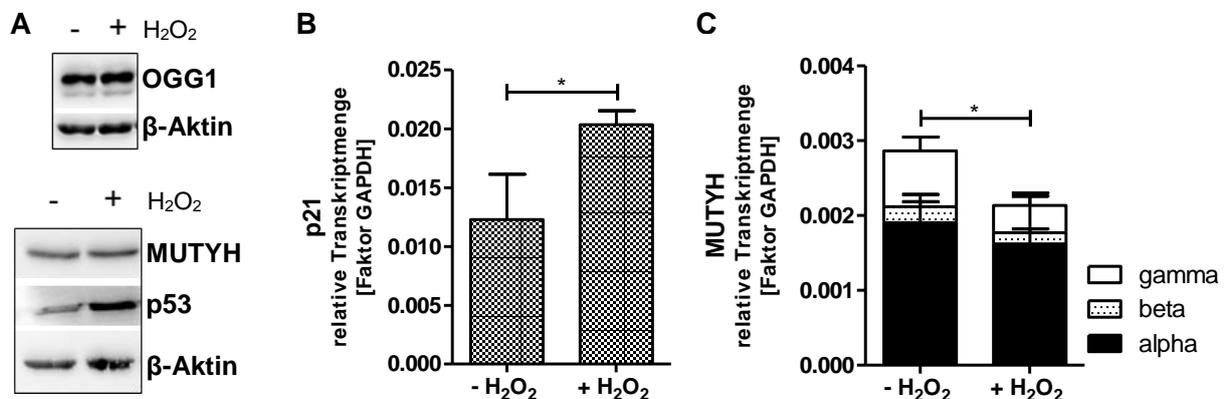
Transfektionsansatz des Minigens 5 h nach Zellernte war bei den  $H_2O_2$ -behandelten Zellen ein signifikanter Anstieg der Transkriptmenge um das 1,3-fache sichtbar. Die *p21*-Transkription ließ im Gegensatz zum Western Blot, der keine Erhöhung der p53-Proteinmenge zeigte, einen deutlichen Effekt der Wasserstoffperoxid-Behandlung vor allem bei den Proben nach 5 h Ernte erkennen, da ein Anstieg um das 3,8- bzw. 2,4-fache verzeichnet wurde (Abbildung 3.17 B). Dieser Effekt verringerte sich in den Ansätzen, welche 18 h nach  $H_2O_2$ -Behandlung geerntet wurden auf das 1,3- bzw. 1,5-fache. Der Anstieg des *p21*-Levels spricht für eine induzierte Schadensantwort in den HEK293-Zellen aufgrund des oxidativen Stresses.

Da auf endogenem und somit biologisch relevantem Level kein Anstieg der *MUTYH*-Transkriptmenge in HEK293-Zellen zu verzeichnen war, konnte insgesamt weder auf Protein- noch auf Transkriptebeine eine Induktion von *MUTYH* durch oxidativen Stress nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.17: Auswirkung der  $H_2O_2$ -Behandlung von HEK293-Zellen auf die (A) *MUTYH*- und (B) *p21*-Transkription.** HEK293-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit oder ohne *MUTYH*-Promotor-Minigen für 40 min mit 5 mM  $H_2O_2$  behandelt und 5 h bzw. 18 h später für die Isolation von RNA geerntet. Die RNA wurde für die TaqMan-qPCR mit *random* Primern umgeschrieben, um die Werte auf *GAPDH* normalisieren zu können. Signifikanz (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  der Gesamttranskriptmenge von *MUTYH* gemäß Einstichproben-t-Test für gepaarte Werte bzw. für *p21* gemäß Wilcoxon-*matched-pairs*-Test im Vergleich zu den unbehandelten  $H_2O_2$ -Proben.

Die  $H_2O_2$ -Behandlung wurde zusätzlich in HeLa-Zellen analysiert, da in HEK293-Zellen kein Effekt auf den induzierten oxidativen Zellstress anhand der Expressionsdaten von MUTYH, OGG1 und dem eigentlich durch DNA-Schäden induzierten Transkriptionsfaktor p53 festgestellt wurde. Van Loon und Hübscher zeigten 2009 nach 40-minütiger 5 mM  $H_2O_2$ -Behandlung von HeLa-Zellen und deren Ernte nach 5 h einen erheblichen Anstieg der MUTYH-Expression in Gesamtproteinextrakten [17]. Die HeLa-Zellen in diesem Experiment wurden darum genauso mit  $H_2O_2$  behandelt und nach der Zellernte wurden native Gesamtproteinextrakte hergestellt. Diese wurden in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunfärbung eingesetzt. Zusätzlich wurde RNA isoliert, um die *MUTYH*-Transkription und den biologischen Einfluss von p53 auf die *p21*-Transkription zu überprüfen. Die Behandlung von HeLa-Zellen mit Wasserstoffperoxid führte im Gegensatz zu HEK293-Zellen zu einer Stabilisierung der p53-Expression. Sowohl MUTYH- als auch OGG1-Level blieben trotz  $H_2O_2$ -Behandlung jedoch gleich (Abbildung 3.18 A). Auf Transkriptionsebene zeigte sich für *MUTYH* sogar ein Rückgang der Transkripte (Abbildung 3.18 C). Einhergehend mit der Stabilisation des p53-Proteins war für das direkt transkriptionell abhängige *p21*-Gen ein Anstieg des Transkriptionslevels um das 1,7-fache zu erkennen (Abbildung 3.18 B). Dies spricht für die Induktion von DNA-Schäden aufgrund des oxidativen Stresses und einhergehender Schadensantwort seitens p53.



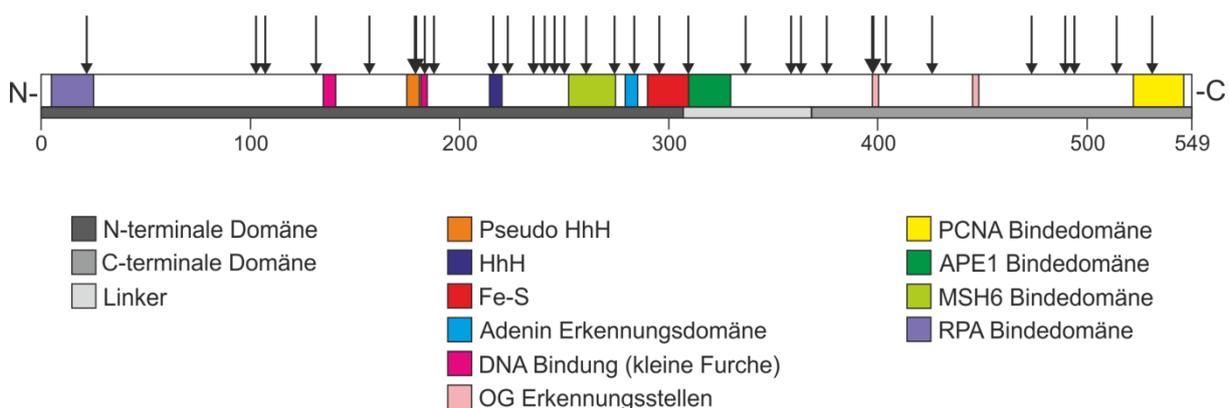
**Abbildung 3.18: Einfluss der  $H_2O_2$ -Behandlung von HeLa-Zellen auf die (A) MUTYH-, p53- und OGG1-Expression sowie (B) *p21*- und (C) *MUTYH*-Transkription.** HeLa-Zellen wurden für 40 min mit 5 mM  $H_2O_2$  behandelt und 5 h später für die Isolation nativer Gesamtproteinextrakte und RNA geerntet. Von jedem Proteinextrakt kamen 50  $\mu$ g in einer SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot und Immunfärbung zum Einsatz. Die RNA wurde für die TaqMan-qPCR mit *random* Primern umgeschrieben, um die Werte auf *GAPDH* normalisieren zu können. Signifikanz der Gesamttranskriptmenge (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Einstichproben-t-Test für gepaarte Werte im Vergleich zu den unbehandelten  $H_2O_2$ -Proben.

Gemäß van Loon und Hübscher war nach der Behandlung von HeLa-Zellen mit Wasserstoffperoxid und folglich ausgelöstem oxidativem Stress eine Verstärkung des MUTYH-Expressionslevels erwartet worden [17]. Dennoch konnte weder in HEK293- noch in

HeLa-Zellen eine Zu- oder Abnahme der Expression der DNA-Glykosylasen MUTYH und OGG1 in Zusammenhang mit  $H_2O_2$  festgestellt werden, obwohl die zelluläre DNA-Schadensantwort aktiviert worden war, wie die Reaktion von *p21* zeigte.

### 3.7 Analyse der Proteinstabilität von MUTYH-Patientenvarianten

Die MUTYH-assoziierte Polyposis ist eine Krankheit, die durch biallelische, inaktivierende Keimbahnmutationen im *MUTYH*-Gen hervorgerufen wird und sich in etwa 78% der Fälle weiter zu kolorektalem Krebs entwickelt [6]. Das Problem bei der Diagnosestellung für Patienten liegt darin, dass der Großteil der gefundenen Mutationen des *missense* Typs nicht klar eingeordnet werden kann. Für die Einordnung der Pathogenität von Varianten liegen zu wenige klinische Daten vor, sodass diese experimentell erhoben werden müssen. Für die Erforschung der sogenannten *variants of uncertain significance* (VUS) werden weltweit bereits gefundene *MUTYH*-Mutationen in der LOVD-Datenbank zusammengetragen. Aus dieser Datenbank und in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Stefan Aretz von der Abteilung für Humangenetik an der Universität Bonn wurden im Rahmen dieser Arbeit 29 Varianten plus zwei Kontrollvarianten (Hotspot-Mutationen Y179C und G396D) ausgewählt, die über das gesamte MUTYH-Protein verteilt vorliegen (Abbildung 3.19) und hinsichtlich ihrer Proteinexpression untersucht werden sollten. Die Ergebnisse dieser Analysen sollten mit dem Schweregrad des Aminosäureaustausches unter Einbezug der Konservierung und einem humanen Strukturmodell korreliert werden, um eine Einschätzung der Pathogenität zu ermöglichen.



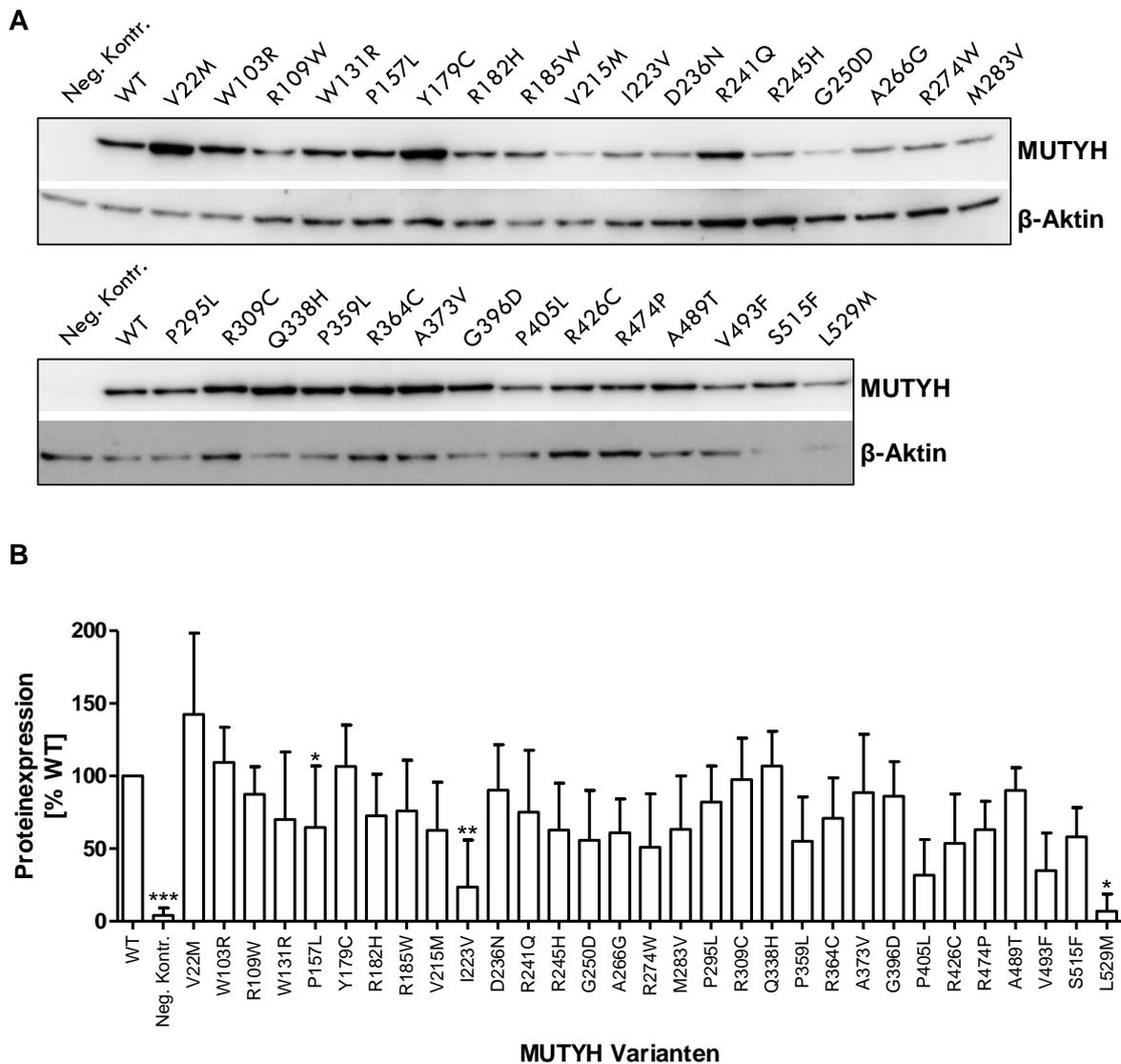
**Abbildung 3.19: Verteilung der analysierten Varianten über das MUTYH-Protein.** Lineare Darstellung der humanen  $\alpha 5$ -Isoform des MUTYH-Proteins inklusive wichtiger Domänen. Die katalytische N-terminale Domäne ist über den Linker mit der C-terminalen Domäne verbunden. Die getesteten Varianten sind als Pfeile dargestellt. Die Hotspot-Mutationen Y179C und G396D sind durch dickere Pfeile hervorgehoben. Wichtige DNA-Bindemotive sind das *helix-hairpin-helix*-Motiv (HhH) und das Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S). 8-oxoG (OG). Abbildung und Domänen adaptiert nach [78], [30], [63] und *NCBI Reference Sequence*: NP\_001121897.1.

Zunächst wurde die Proteinstabilität der 31 ausgewählten Varianten mit Hilfe der Expression überprüft. Da es sich bei diesen ausschließlich um *missense* Mutationen handelt, was einen Austausch einer Aminosäure im Vergleich zum Wildtyp-Protein bedeutet, liegt die Wahrscheinlichkeit der Pathogenität eher auf Protein- als auf Transkriptebene. Dass die Proteinexpression von *missense* Varianten mit der Stabilität korreliert, wurde bereits von Hinrichsen *et al.* [139] belegt, denn die Expressionsunterschiede im Western Blot 48 h nach Transfektion kommen in dem verwendeten experimentellen System durch die Abbaugeschwindigkeit der Proteinvarianten nach Überexpression zustande und nicht durch die Syntheserate.

Nach transienter Transfektion der MUTYH-Varianten (basierend auf dem pcDNA3-Vektor und der MUTYH  $\beta$ 3-cDNA) in HEK293-Zellen wurden Erfolg und Effizienz der Transfektion anhand eines ebenso transfizierten EGFP-Plasmids mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. 48 h nach Inkubation wurden die Zellen für die Herstellung nativer Gesamtproteinextrakte geerntet. Die Proteinextrakte wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die Verfügbarkeit des MUTYH-Proteins nach Immunfärbung detektiert (Abbildung 3.20 A). Es wurden mindestens fünf voneinander unabhängige Experimentreihen durchgeführt und in Abbildung 3.20 B zusammengefasst dargestellt. Neben den konstruierten Varianten wurde stets der Wildtyp mitgeführt und die Expression abhängig davon dargestellt.

Vier der getesteten Varianten wiesen eine Expression von MUTYH über der des Wildtyps (WT) auf. Die Expressionswerte der Varianten W103R, Y179C und Q338H lagen zwischen 107% und 109%, währenddessen die Variante V22M mit 142% eine deutlich erhöhte Expression zum Wildtyp offenbarte. Für acht weitere Varianten (R109W, R185W, D236N, P295L, R309C, A373V, G396D, A489T) war eine stabile MUTYH-Expression vergleichbar mit dem WT über 75% sichtbar. Bei zwei Varianten lag die Expression im Vergleich zum Wildtyp unter 25%. Hierbei handelte es sich um die Varianten I223V und L529M, die mit entsprechend 24% bzw. 7% zum WT nur noch sehr instabil exprimiert wurden. Zudem unterschied sich bei letzteren Varianten der Expressionswert signifikant vom WT (Abbildung 3.20 B). Die Expression der restlichen Varianten bewegte sich im Bereich zwischen 30% und 75% zum Wildtyp. Ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp war in diesem Bereich nur für die Variante P157L mit einem Expressionslevel von 66% erkennbar. Nichtsdestotrotz waren zwei weitere Varianten deutlich reduziert exprimiert im Vergleich zum WT. Die Expressionswerte für die Varianten P405L und V493F betragen nur 32% bzw. 35%.

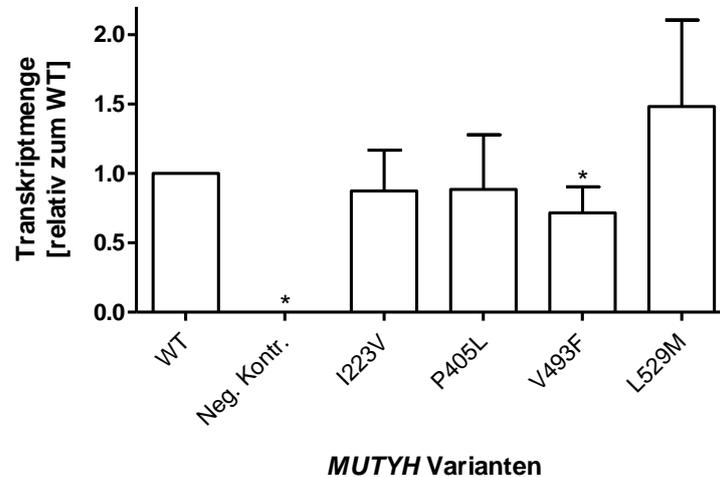
Insgesamt wurden drei Varianten identifiziert, deren Expression sich signifikant vom WT unterschied. Zwölf Varianten wiesen ein dem WT ähnliches Expressionslevel (>75%) auf, wohingegen zwei Varianten nur sehr gering exprimiert vorlagen (<25%) und somit einen ersten Hinweis auf eine vorliegende Pathogenität geben.



**Abbildung 3.20: MUTYH-Expression der untersuchten Patientenvarianten.** MUTYH-Varianten (Benennung bezogen auf die  $\alpha 5$ -Isoform) wurden in HEK293-Zellen transfiziert und anschließend 48 h inkubiert. Nach der Extraktion der Gesamtproteine wurden jeweils 50  $\mu\text{g}$  über eine SDS-PAGE aufgetrennt, woraufhin ein Immunoblotting stattfand. (A) Exemplarischer Western Blot der MUTYH VUS. (B) Zusammenfassung der MUTYH-Expression der analysierten Varianten abhängig vom Wildtyp (WT). Die Negativkontrolle (Neg. Kontr.) war mit einem EGFP-Plasmid transfiziert. Die Quantifizierung wurde mit der Software *MultiGauge v3.2* durchgeführt. Signifikanz der Expression (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß *Wilcoxon-matched-pairs*-Test im Vergleich zum Wildtyp.

Zusätzlich wurde aus den transfizierten Zellen der Varianten, die weniger als 50% MUTYH-Expression aufwiesen, RNA für ein TaqMan-Assay entnommen, um auszuschließen, dass das Plasmid aus experimentellen Gründen (Transfektions- oder Transkriptionsprobleme) nicht abgelesen wurde. Dies betraf vor allem die Varianten L529M und I223V, welche beide auf Proteinebene eine signifikante Reduktion der Proteinmenge erkennen ließen. Die qPCR verdeutlichte jedoch, dass die Varianten I223V, P405L, V493F und L529M ausreichende Transkriptlevel besaßen (Abbildung 3.21) und somit der Aminosäureaustausch ursächlich für

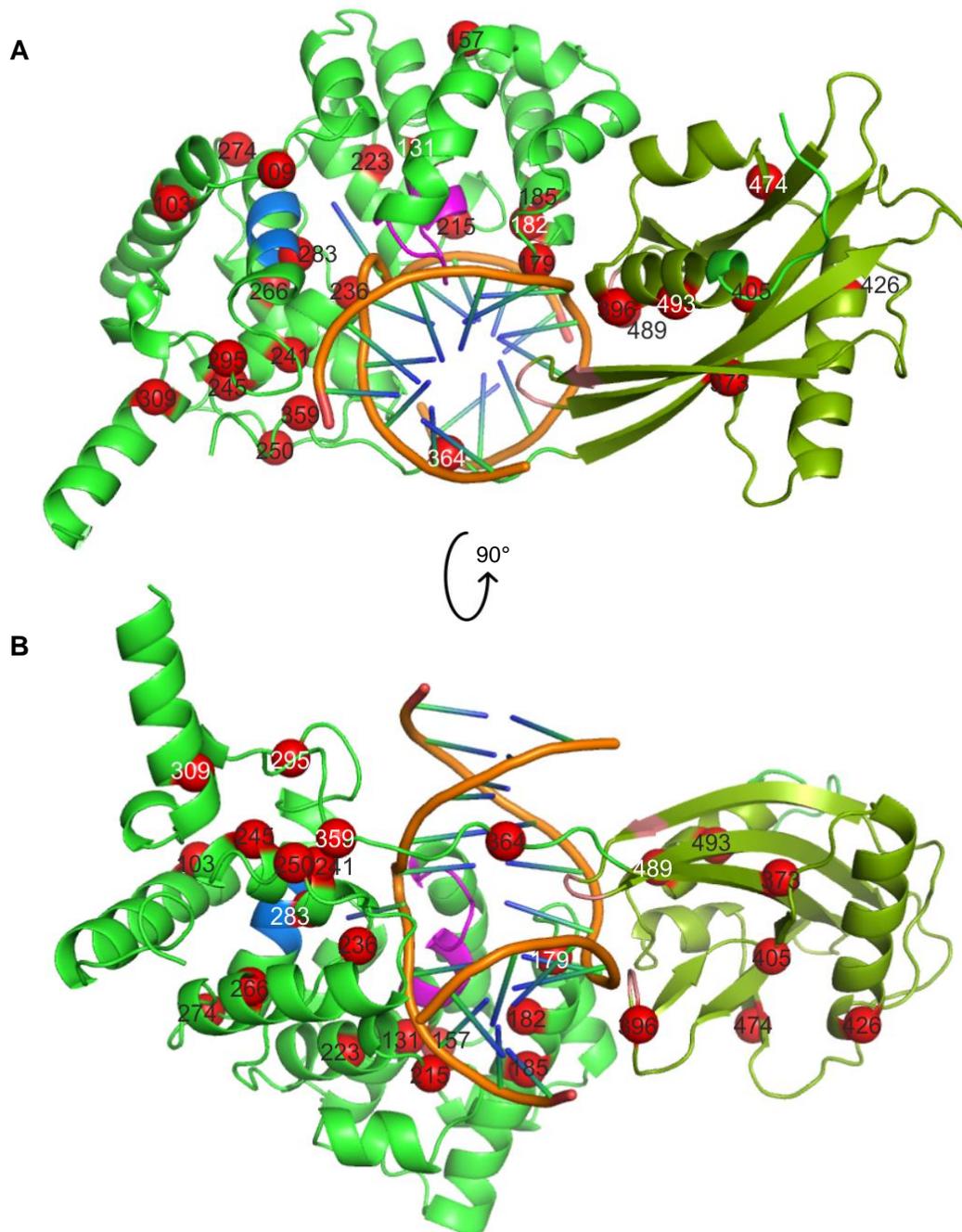
die verringerte Proteininstabilität ist. Insgesamt sind die reduzierten Proteinlevel der analysierten Varianten nicht auf eine zu geringe *MUTYH*-RNA-Syntheserate zurückzuführen.



**Abbildung 3.21: *MUTYH*-Transkription ausgewählter Patientenvarianten.** Die Transfektion der *MUTYH*-Varianten fand wie in Abbildung 3.18 beschrieben statt und es wurde neben Proteinen zusätzlich RNA isoliert. Im Anschluss wurde die RNA mit *random* Hexamer-Primern umgeschrieben, in einer TaqMan-qPCR mit dem Isoformen-unabhängigen *MUTYH*-Primer (MYH-ALL-1516) eingesetzt und die Werte auf *GAPDH* normalisiert. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  gemäß Wilcoxon-*matched-pairs*-Test im Vergleich zum Wildtyp (WT).

### 3.7.1 Homologiemodell von *MUTYH* und Klassifizierung der untersuchten Patientenvarianten

Um die im Kapitel zuvor untersuchten unklaren *MUTYH*-Varianten bezüglich ihrer Pathogenität weiter zu klassifizieren, wurde ein humanes Homologiemodell der Proteinstruktur von *MUTYH* in Kooperation mit Dr. Jan Kosinski vom EMBL Heidelberg erstellt. Dieses Modell beruht auf bereits bekannten *MUTYH* bzw. bakteriellen MutY Strukturen (siehe 2.2.43) der *RCSB Protein Data Base*. Im *PyMOL Viewer* wurde die Proteinstruktur als 3D-Modell dargestellt und die C1-Atome der ausgetauschten Aminosäuren der untersuchten Varianten als rote Kugeln angezeigt (Abbildung 3.22). Somit lässt sich die genaue Position jeder Variante im Protein nachvollziehen, was zu einem besseren Verständnis und Einordnung des Schweregrads eines Aminosäureaustauschs genutzt werden sollte. Mit Hilfe der *PyMOL* Software konnten zudem die Seitenketten jeder Aminosäure (AS) angezeigt werden und somit der Aminosäureaustausch ausgewählter Varianten genau studiert und deren eventuelle Auswirkungen auf die Proteinstruktur anhand der veränderten Eigenschaften der AS interpretiert werden. Da unklare Bereiche der N- und C-Termini (AS 1-81 und 507-549) sowie des Linkerbereichs (AS 521-353) der im Modell abgebildeten  $\alpha 5$ -Isoform fehlen, sind die Varianten V22M, Q338H, S515F und L529M nicht im Modell enthalten.



**Abbildung 3.22: Struktur des MUTYH-Proteins gebunden an DNA-Doppelhelix mit ausgeklappter Adenin-Base und gekennzeichneten Varianten.** (A) MUTYH mit Ansicht auf das ausgeklappte Adenin, welches umgeben ist von der Adenin-Erkennungsdomäne (blau im Protein). (B) Ansicht aus A um 90° in Richtung des Betrachters rotiert. Ansicht auf die DNA-Bindungsdomäne (magenta) und OG-Erkennungsstellen (rosa). N-terminale Domäne (grün im Protein), C-terminale Domäne (limonengrün im Protein), Varianten (rote Kugeln), DNA-Rückgrat (orange). Gezeigt sind 27 Varianten, da Aminosäuren 1-81, 521-353 und 507-549 fehlen, wodurch die Varianten V22M, Q338H, S515F und L529M nicht enthalten sind.

Des Weiteren wurden die *in silico* Daten der Konservierung der Aminosäuren anhand des *conservation score* in die Interpretation der Varianten bezüglich der Pathogenität miteinbezogen (Tabelle 3.2, Spalte 3).

Als zusätzliche Hilfestellung wurden die Algorithmen *sorting intolerant from tolerant* (SIFT) [140, 141] und *polymorphism phenotyping v2* (PolyPhen-2) [142] verwendet, die eine Abschätzung des Schweregrads eines Aminosäureaustauschs ermöglichen sollen. Diese Plattformen bewerten Mutationen ausgewählter Aminosäuresubstitutionen und treffen eine Vorhersage die Pathogenität/Toleranz betreffend. Die Klassifizierung der Varianten wurde wie folgt vorgenommen:

### Kriterien zur Klassifizierung

- 1) Wenn Expression einer Variante vergleichbar mit WT (>75%) und hochkonserviert (8-9):  
AS-Austausch überprüfen → wenn schwerwiegend: wahrscheinlich pathogen  
→ nicht schwerwiegend: wahrscheinlich nicht pathogen
- 2) Wenn Expression einer Variante vergleichbar mit WT (>75%) und nicht konserviert (1-7):  
→ wahrscheinlich nicht pathogen
- 3) Wenn Expression einer Variante reduziert (25-75%) und hochkonserviert (8-9):  
AS-Austausch überprüfen → wenn schwerwiegend: wahrscheinlich pathogen  
→ nicht schwerwiegend: Pathogenität unklar
- 4) Wenn Expression einer Variante reduziert (25-75%) und nicht konserviert (1-7):  
→ Pathogenität unklar
- 5) Wenn Expression einer Variante stark beeinträchtigt (<25%):  
→ wahrscheinlich pathogen (unabhängig der Art des AS-Austausch)

Neben den beiden in der kaukasischen Bevölkerungsgruppe vorkommenden Hotspot-Mutationen Y179C und G396D [143], die anhand zahlreicher klinischer und experimenteller Daten als pathogen einzuordnen sind [75, 77], wurden 17 weitere Varianten als „wahrscheinlich pathogen“ eingestuft (Tabelle 3.2). Vier der 29 VUS wurden als „wahrscheinlich nicht pathogen“ eingeordnet, während bei acht Varianten die „Pathogenität unklar“ blieb. Letzteres betraf vor allem Varianten, die eine konservative Substitution aufwiesen und deren ursprüngliche Aminosäure hochkonserviert war.

**Tabelle 3.2: Einordnung der Pathogenität der MUTYH-Varianten.** Für jede Variante sind die genauen Expressionslevel (#) abhängig vom WT in Prozent, Konservierung (§), Lokalisation im Protein und der Einfluss des Aminosäureaustauschs auf die Proteinstruktur angegeben. Zudem wurden die AS-Austausche mit den Vorhersage-Algorithmen SIFT und PolyPhen-2 (PP-2) für Aminosäureaustausche überprüft, bevor die Varianten endgültig klassifiziert und eingeordnet wurden.

MUTYH Variante	# [%]	§	Lokalisation	Einfluss auf Proteinstruktur	SIFT	PP-2	Klassifizierung
V22M	142	6°	RPA-Bindung	V und M beide ungeladen und unpolar	0	0,185	wahrscheinlich nicht pathogen
W103R	109	8	Helix	W ungeladen, aromatisch; R basisch und positiv; strukturstörend	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
R109W	87	9	Loop; nahe ausgeklapptem Adenin	R basisch und positiv, W ungeladen, aromatisch; strukturstörend	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
W131R	70	9	Helix; neben DNA-Bindung	W ungeladen, R positiv; strukturstörend	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
P157L	65	9	Loop	P enthält strukturgebende Ringstruktur; strukturstörend	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
<b>Y179C</b>	107	9	Loop; Pseudo-HhH	Strukturelle Veränderungen	0	1,00	pathogen eingestuft
R182H	73	9	Helix; DNA-Bindung	R und H positiv geladen; H heterozyklisch	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
R185W	76	8°	Helix; nahe DNA-Bindung	R basisch und positiv, W ungeladen, aromatisch; strukturstörend	0,09	0,96	wahrscheinlich pathogen
V215M	63	8	Loop; HhH-Motiv	V und M beide ungeladen und unpolar	0	1,00	Pathogenität unklar
I223V	24	9°	Helix	I und V gleiche Eigenschaften; V kommt evolutionär vor	0,05	0,976	wahrscheinlich pathogen
D236N	90	9	Loop; nahe ausgeklapptem Adenin	D sauer und negativ, N ungeladen	0,01	1,00	wahrscheinlich pathogen
R241Q	75	9	Seitenkette nahe DNA; Helix	R basisch, positiv geladen, Q ungeladen	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
R245H	63	9	Seitenkette Richtung DNA und zwischen 2 Loops; Helix	R und H basisch, positiv geladen; H aromatisch	0	1,00	wahrscheinlich pathogen

MUTYH Variante	# [%]	§	Lokalisation	Einfluss auf Proteinstruktur	SIFT	PP-2	Klassifizierung
G250D	56	5°	Loop	D kommt evolutionär vor	0,17	0,149	Pathogenität unklar
A266G	61	8°	MSH6-Bindung; Helix	G kommt evolutionär vor; A und G gleiche Eigenschaften	0,03	0,937	Pathogenität unklar
R274W	51	6	Loop; Seitenkette ragt an Helix heran	R basisch und positiv, W ungeladen, aromatisch; strukturstörend	0	0,999	Pathogenität unklar
M283V	63	9	Adenin-Erkennung; Helix	Seitenkette ragt zum ausgeklappten Adenin; M und V gleiche Eigenschaften	0	0,999	Pathogenität unklar
P295L	82	9	Fe-S-Motiv; Loop	P strukturgebend, enthält Ringstruktur; strukturstörend	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
R309C	98	3	Helix	-	0,08	0,012	wahrscheinlich nicht pathogen
Q338H	107	1	-	-	0,18	0,343	wahrscheinlich nicht pathogen
P359L	55	9	Loop; nahe DNA-Helix	P strukturgebend, enthält Ringstruktur; strukturstörend	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
R364C	71	8	Loop; Seitenkette Richtung OG-Erkennung	R basisch und positiv, C ungeladen; Austausch arretiert wahrscheinlich SH-Motiv von OG-Erkennung	0	0,999	wahrscheinlich pathogen
A373V	89	7	Faltblatt (C-terminus)	A und V gleiche Eigenschaften	0,22	0,822	wahrscheinlich nicht pathogen
<b>G396D</b>	86	9	Loop; OG-Erkennung	D negativ geladen > Abstoßung der DNA	0	1,00	pathogen eingestuft
P405L	32	9	Loop	P strukturgebend, enthält Ringstruktur; strukturstörend	0	1,00	wahrscheinlich pathogen
R426C	54	4	Helix	-	0,06	0,00	Pathogenität unklar
R474P	63	6°	Faltblatt	-	0,02	0,997	Pathogenität unklar
A489T	90	8	Helix; nahe DNA und OG Erkennung	A unpolar, T polar	0,02	0,973	wahrscheinlich pathogen
V493F	35	8	Helix	F aromatisch; strukturstörend	0	0,458	wahrscheinlich pathogen

MUTYH Variante	# [%]	§	Lokalisation	Einfluss auf Proteinstruktur	SIFT	PP-2	Klassifizierung
S515F	58	1	-	-	0,02	0,003	Pathogenität unklar
L529M	7	5°	PCNA	M kommt evolutionär vor	0,07	0,915	wahrscheinlich pathogen

# Expressionslevel in Prozent: (weiß) vergleichbar WT, >75%; (grau) reduziert, 75-25%; (schwarz) stark beeinträchtigt, <25%.

§ Konservierung: (1) nicht konserviert bis (9) hochkonserviert.

(°) ausgetauschte Aminosäure kommt evolutionär an dieser Stelle vor (*natural residue variety*).

SIFT Farbencode: (grün) „*tolerated*“, (rot) „*damaging*“.

PolyPhen-2 Farbencode: (grün) „*benign*“, (orange) „*possibly damaging*“, (rot) „*probably damaging*“.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Transkriptionsregulation von *MUTYH*

Das humane *MUTYH*-Gen zeichnet sich durch starkes alternatives Spleißen vor allem in Exon 1 und 3 aus, wodurch je nach Gewebe verschiedene Spleißvarianten entstehen, die zu unterschiedlichen Proteinisoformen führen [102–104]. Die Regulation der Transkription war bislang nicht systematisch untersucht worden. Darum wurde der Einfluss epigenetischer DNA-Methylierungen auf die Expression untersucht. Des Weiteren wurde mit Hilfe eines in dieser Arbeit erfolgreich etablierten *MUTYH*-Promotor-Minigenmodells nach genetischen Motiven im Promotorbereich von *MUTYH* gesucht, welche einen Einfluss auf die Transkription der drei alternativen ersten Exons 1 $\alpha$ , 1 $\beta$  und 1 $\gamma$  haben.

#### 4.1.1 Die CpG-Insel von *MUTYH* im ersten Exon ist nicht methyliert

Da in dieser Arbeit die Regulation der alternativen ersten Exons von *MUTYH* untersucht wurde, wurde in diesem Kontext der Einfluss der epigenetischen Genregulation analysiert. Bei der eukaryotischen Genexpression besteht neben der Regulation in *cis* und *trans* durch unterschiedliche DNA-Motive oder Transkriptionsfaktoren ebenso die Möglichkeit epigenetischer Einflüsse außerhalb der DNA-Sequenz. Zu diesen gehören Chromatinmodifikationen, genomische Prägung (*imprinting*), nicht-kodierende RNAs und DNA-Methylierungen [144].

Bei DNA-Methylierungen handelt es sich i. d. R. um Methylierungen an der 5'-Position des Pyrimidinrings von Cytosinen im CpG-Dinukleotidkontext. Sie werden von DNA-Methyltransferasen vermittelt, indem sie von S-Adenosyl-Methionin (SAM) eine Methylgruppe (-CH<sub>3</sub>) auf die entsprechende Position im Cytosinring übertragen [145]. In etwa der Hälfte aller Vertebraten-Gene sind CpG-reiche Abschnitte von ~1 kb Länge zu finden, die als CpG-Inseln bezeichnet werden [146]. Sie befinden sich hauptsächlich in der Promotorregion von Genen, ragen aber auch in den Transkriptteil hinein [144]. Zudem kommen CpG-Inseln in Introns vor. Methylierungen an dieser Stelle tragen zur Regulation des alternativen Spleißens bei [146]. DNA-Methylierungen verändern die Zugänglichkeit der DNA für bspw. Transkriptionsfaktoren und führen so in Promotorbereichen zur Stilllegung von Genen [145]. Aus diesem Grund sind CpG-Inseln in Promotorbereichen hauptsächlich unmethyliert, währenddessen CpGs außerhalb von Promotorregionen unter normalen physiologischen Bedingungen zu 80% methyliert vorliegen [144].

Krebstumore sind durch aberrante DNA-Methylierungen gekennzeichnet. Hier fallen besonders zwei Unterschiede zu normalen Zellen auf: globale Reduktion der DNA-Methylierungslevel (Hypomethylierung) und lokale Hypermethylierung von CpG-Inseln [145,

147]. DNA-Hypermethylierungen in Promotorbereichen können so zur transkriptionellen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder DNA-Reparaturgenen führen, wohingegen DNA-Hypomethylierungen zu einer erhöhten Expression von Proto-Onkogenen beitragen können. Diese Events führen schließlich zur Karzinogenese [148–150].

Promotormethylierungen können die Expression von BER-Genen beeinträchtigen. Dieser Zusammenhang wurde erst kürzlich in Gehirnen von Alzheimer-Patienten überprüft, wo ein Rückgang der BER-Genexpression beobachtet wurde. In den Lymphozyten von Alzheimer-Patienten waren u. a. *MUTYH* und *OGG1* signifikant runterreguliert im Gegensatz zu gesunden Kontrollprobanden. Allerdings zeigte sich kein Unterschied im Methylierungsstatus der analysierten BER-Gene. Für *MUTYH* wurde ein 173 bp langer Ausschnitt etwa 2000 bp *upstream* der Transkriptionsstartseite des 1 $\alpha$ -Exons untersucht. Der Methylierungsanteil der gesunden Kontrollprobanden in den Lymphozyten betrug in diesem Abschnitt ~33% [151].

Im *MUTYH*-Gen befindet sich in der Promotorregion im direkten 5'-Bereich der Transkriptionsstartseite eine CpG-Insel, die bis in den Exon 1-Bereich hineinragt und ~900 bp lang ist (siehe Abbildung 3.1). Daher ist eine Regulation über DNA-Methylierungen für *MUTYH* möglich.

In dieser Arbeit wurde der Methylierungsstatus der CpG-Insel des Exon 1-Bereichs von *MUTYH* betrachtet (siehe Abbildung 3.1). Es handelte sich um einen Ausschnitt von 693 bp mit 62 möglichen Methylierungsstellen (siehe Anhang). Als Kontrolle zu den Kulturzellen dienten teilungsinaktive Lymphozyten des Bluts, die von gesunden Personen gewonnen wurden. Für die Lymphozyten ergab sich hier ein Methylierungsanteil von 1,4%. Das ist deutlich niedriger im Vergleich zu der zuvor genannten Publikation [151]. Allerdings wurde in dieser ein deutlich kleinerer DNA-Ausschnitt sehr weit entfernt vom *MUTYH* Exon 1 analysiert. Ähnlich war der Anteil methylierter CpGs in den Kolonzelllinien, welcher sich auf 2,4% belief. Auch die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa und die immortalisierte HEK293-Zelllinie zeigten niedrige Methylierungslevel von 1,6% bis 3,4%. Der *MUTYH*-Promotor ist in allen Fällen kaum methyliert, sodass die Transkription von *MUTYH* auf diesem Weg nicht geregelt wird bzw. das *MUTYH*-Reparaturenzym in Kolonzelllinien epigenetisch nicht ausgeschaltet vorliegt. Die Aza-Behandlung der Zellen bestätigte diese Aussage, da weder die Expression noch die Transkription signifikant verändert war. Dies ist in Übereinstimmung mit den zeitgleich in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, dass DNA-Elemente im Promotorbereich gefunden wurden, die für eine Regulation der ersten Exons über *trans* Faktoren sprechen.

Die *in vitro* Methylierung des *MUTYH*-Promotor-Minigens und dessen folglich Repression zeigte die Beeinflussbarkeit der *MUTYH*-Genexpression durch Hypermethylierung der Promotorregion. Über eine funktionelle Bedeutung dieser Beobachtung *in vivo* ist allerdings nichts bekannt.

#### 4.1.2 Das *MUTYH*-Promotor-Minigen als Modell für die Analyse von genetischen Veränderungen

Die ersten Minigenmodelle sind seit 1977 bekannt [152] und gelten als typisches Werkzeug, um vor allem Spleißvorgänge zu evaluieren [153–156]. Eine Gruppe um Mario Tosi nutzte bspw. Minigenmodelle, um die Konsequenzen von unklassifizierten Varianten im Kontext mit Lynch-Syndrom auf das Spleißen zu bestimmen. So wurden zu testende Varianten im Vergleich zum WT mit Exon- und umgebenden Intronsequenzen in ein Spleiß-Reporter-Minigen inseriert. Nach transienter Transfektion in HeLa-Zellen wurden die Effekte der Mutanten auf das Spleißverhalten durch RT-PCR und anschließender Sequenzierung analysiert. Somit konnten pathogene Spleißvarianten identifiziert werden [153, 154]. Des Weiteren wurden Minigene genutzt, um die Regulation alternativer Spleißvorgänge zu ermitteln. Dafür wurde eine Kotransfektion eines Spleiß-Minigens mit Exon- und Intronsequenzen und bestimmten Spleißfaktoren durchgeführt. So kann die Auswirkung *trans* agierender RNA-Bindeproteine getestet werden [156]. Außerdem wurde gezeigt, dass Minigen-Assays eine sehr hohe Übereinstimmung mit der direkten Analyse von Patienten-RNA über RT-PCR haben [157], wodurch sich Minigene als hervorragendes Modell für die Analyse von Patientenvarianten *in vitro* erwiesen haben.

In dieser Arbeit diente das Minigenmodell der Identifikation genomischer Bereiche des Promotorbereichs von *MUTYH*, die Einfluss auf die Transkription der alternativen ersten Exons (AFE) haben. Korrekte Spleißvorgänge in dem hier durchgeführten Assay wurden bei der Analyse vorausgesetzt, da mit den verwendeten qPCR-Primern nur gespleißte Transkripte amplifiziert wurden. Neben hochkonservierten DNA-Regionen wurden ebenso sechs unklare Patientenvarianten in die Analyse mit einbezogen. Drei der Patientenvarianten (Varianten 3, 9 und 10; siehe Abbildung 3.10 A) waren in der Gesamtmenge der Transkripte um  $\frac{1}{3}$  im Vergleich zum Wildtyp verringert. Diese Varianten befinden sich zwar außerhalb der proteinkodierenden Bereiche von *MUTYH*, dennoch sind Auswirkungen auf Proteinebene dadurch nicht genau abzuschätzen. Denn auch Veränderungen auf mRNA-Ebene können dazu führen, dass sich die mRNA anders als gewöhnlich faltet und somit in einem geringeren oder stärkeren Maß translatiert wird [158]. Eine endgültige Aussage über das pathogene Risiko dieser Varianten ist somit nur unter Einbezug des klinischen Phänotyps möglich. Die Variante 3 kam als heterozygote Mutation in einem Probanden aus einer HNPCC-Familie vor [118]. Die Variante 9 ist in der japanischen Bevölkerung als SNP sowohl in CRC- als auch Kontrollprobanden berichtet, wobei jedoch ein erhöhtes CRC-Risiko für Träger dieser Variante besteht [121]. Außerdem wurde die Variante in Schweden bei einem Patienten mit vererbtem CRC gefunden [122]. Somit scheint das geringere Transkriptionslevel der Variante 9 mit einem pathogenen Phänotyp einherzugehen. Für eine eindeutige Risikoabschätzung dieser Varianten ist die klinische Datenmenge jedoch nicht ausreichend.

Für die Variante 10 liegen in der LOVD-Datenbank keine klinischen Daten vor. Des Weiteren wurden die Varianten 6, 8 und 11 als wahrscheinlich nicht pathogen eingestuft, da deren Transkription dem WT-Level entsprach. Während für die Varianten 6 und 11 keine klinischen Daten in der LOVD-Datenbank hinterlegt sind, wurde die Variante 8 hingegen in einem Patienten mit kolorektalen Polypen ohne APC-Mutationen entdeckt [119]. Nur durch weitere klinische Daten ließe sich feststellen, ob die Variante 8 entgegen der erhobenen Transkriptionsergebnisse tatsächlich ursächlich für die Krankheit ist.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Minigenmodell funktioniert. Es wurde sowohl transkribiert als auch gespleißt und wies eine ähnliche Transkriptzusammensetzung wie das endogene *MUTYH* auf, obwohl es nur einen kurzen Genausschnitt enthält. Dadurch ist es für die Analyse von Patientenvarianten im untranslatierten Promotor- sowie Intronbereich geeignet.

Neben der Generierung eines Minigenmodells und dem Einfügen von bestimmten Mutationen zur Erforschung dieser wäre eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von endogenen Genveränderungen das CRISPR/Cas9-System gewesen (*CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas9 - CRISPR-associated-protein 9*). Dieses System kann das humane Genom nicht nur präzise an bestimmten Stellen schneiden, sondern auch gezielt Veränderungen einfügen [159–162]. Da das CRISPR/Cas9-System noch relativ jung ist, ist eine Etablierung dieses Systems recht aufwendig. Des Weiteren ist die endogene *off-target* Schnittrate seitens Cas9 häufig unklar [162]. Der Einsatz von Minigenmodellen ist hingegen seit langer Zeit gebräuchlich. Zudem lassen sie sich mit einfachen Mitteln im Labor gut umsetzen, weswegen diese Analysemethode gewählt wurde.

#### **4.1.3 Ein M4-Motiv, ein BRE-Element und eine GC-Box beeinflussen die *MUTYH*-Transkription**

Bisher ist bekannt, dass die drei alternativen ersten Exons (AFE) *MUTYH* 1 $\alpha$ , 1 $\beta$  und 1 $\gamma$  zelltypspezifisch abgelesen werden. Die Proteinisoformen, die auf der Transkription des 1 $\alpha$ -Exons beruhen, sind in den Mitochondrien und somit vor allem in Muskelgewebe oder Lymphozyten zu finden. Die Proteine, die von den Transkripten der 1 $\beta$ - und 1 $\gamma$ -Exons ausgehen, befinden sich hingegen im Nukleus stark proliferierender Gewebe und zeigen somit hohe Level in Hoden oder in Kultur gehaltenen Krebszelllinien [95, 102–104]. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal genetische Sequenzmotive mit der Regulation der Transkription des 1 $\alpha$ - und 1 $\beta$ -Exons in Zusammenhang gebracht werden.

Insgesamt wurden drei hochkonservierte Sequenzmotive im Promotor-/AFE-Bereich von *MUTYH* ausfindig gemacht, die durch Inaktivierung zu einer drastischen Reduktion in einer der Transkriptvarianten geführt haben.

Die *MUTYH*-Promotor-Minigen Variante 0 schaltete das sogenannte M4-Motiv mit der Konsensussequenz ACTAYRnnnCCCR aus, welches im *MUTYH*-Gen der Sequenz ACTACATCTCCCG entspricht. Dieses Motiv liegt im Schnitt 89 bp *upstream* des zu regulierenden Gens und wurde 2005 innerhalb einer systematischen Suche nach regulatorischen Elementen in humanen Promotoren von Xie *et al.* entdeckt [135]. Die Variante 0 führte zu einer signifikanten Reduktion des 1 $\alpha$ -Transkripts um etwas mehr als die Hälfte im Vergleich zum WT. Da das M4-Motiv im *MUTYH*-Promotor 113 bp *upstream* des Exons 1 $\alpha$  beginnt, liegt es in geeigneter Distanz, die Transkription des 1 $\alpha$ -Exons zu regulieren. Der Rückgang der 1 $\alpha$ -Transkriptvariante spricht somit für die Regulation des 1 $\alpha$ -AFEs durch das M4-Motiv. M4 ist ein Motiv mit einer sehr hohen Konservierungsrate im Vergleich zu längst bekannten regulatorischen DNA-Elementen, die nicht so stark konserviert sind. So taucht das M4-Motiv 520 mal in humanen Promotoren auf, von denen es in 317 Fällen (61%) konserviert ist [135]. Gemäß Xie *et al.* handelt es sich bei M4 um das vierthäufigste regulatorische Motiv in humanen Promotoren, welches zusätzlich in bidirektionalen Promotoren überrepräsentiert ist [163]. Während zum Zeitpunkt der Entdeckung des M4-Motivs noch kein Transkriptionsfaktor für dieses Motiv bekannt war, so haben bisherige genomweite Studien gezeigt, dass M4 u. a. eine Transkriptionsfaktorbindestelle für den nicht-lymphoiden Faktor THAP11 (*THAP domain containing 11*) [164, 165] und den für die Lipidhomöostase in Vertebraten zuständigen Faktor SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) enthält [166]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Gene, welche ein M4-Motiv beinhalten, erhöhte Expressionslevel in hämatopoetischen Zellen, insbesondere B- und T-Zellen des peripheren Bluts, aufweisen [135]. Dies impliziert eine putative Rolle des M4-Motivs im lymphoiden System oder bei hämatopoetischen Malignitäten. 2016 wurde schließlich aufgeklärt, dass mehrere Transkriptionsfaktoren an zwei unterschiedliche Stellen des M4-Motivs binden. Somit handelt es sich bei M4 um ein funktionelles, regulatorisches, zweiteiliges *cis* Element, welches einen THAP11/HCF-1-Komplex involviert, der an das ACTAYR-Modul bindet, währenddessen an die darauffolgende CCCRRNRNC-Sequenz die Faktoren Ikaros und NF $\kappa$ B1 binden [167]. Diese Entdeckungen sprechen ebenso für die Regulation des *MUTYH* 1 $\alpha$ -Exons über das M4-Motiv, da die 1 $\alpha$ -Transkriptionslevel u. a. in Lymphozyten stark repräsentiert sind, wie bereits von Plotz *et al.* gezeigt [95].

Anhand der *MUTYH*-Promotor-Minigen Variante 12 konnte das Transkriptionsfaktor-IIB-Erkennungselement mit der Konsensussequenz CCACGCC bzw. GGGCGCC ausfindig gemacht werden, wobei in der *MUTYH*-Sequenz die erste Form vorkommt. Das Motiv wurde 1998 entdeckt und stellt zusätzlich zur TATA-Box, dem Initiatorelement und dem *downstream promoter element* (DPE) eines der vier Kernpromotorelemente der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription dar [168]. Die Inaktivierung dieses hochkonservierten DNA-Elements führte zu einem kompletten Ausfall der 1 $\beta$ -Transkriptvariante. Im *MUTYH*-Gen

befindet es sich 49 bp aufwärts des Transkriptionsstarts von Exon 1 $\beta$  und scheint dieses somit zu regulieren. Im Schnitt liegt das BRE-Element 32-37 bp aufwärts der Initiatorsequenz, die den Transkriptionsstartpunkt beinhaltet. Dies unterstützt die Annahme der Regulation des 1 $\beta$ -Exons über BRE. Im Gegensatz zur typischen Konstellation der vier Kernpromotorelemente (zusammengefasst von Smale und Kadonaga [169]), wo auf das BRE-Element in 3'-Richtung unmittelbar die TATA-Box folgt, kommt in der *MUTYH*-Sequenz nachfolgend keine solche Box vor. Dies ist nicht außergewöhnlich, da selten alle Kernpromotorelemente in einem einzigen Promotor enthalten sind. Vielmehr finden sich unterschiedliche Kombinationen dieser Elemente, abhängig vom Level der Expression jedes Gens. Das BRE-Element dient, wie die Benennung besagt, der Bindung des Transkriptionsfaktors IIB. Dieser geht einen Komplex mit weiteren Faktoren ein, die an die DNA binden und somit kann schließlich die RNA-Polymerase II andocken und die Transkription starten [136, 169].

Der *MUTYH*-Promotor besitzt keine TATA-Box oder DPE-Elemente. Dies ist typisch für Promotoren, die wie *MUTYH* CpG-Inseln enthalten (siehe Abbildung 3.1) [136]. Dafür enthalten sie GC-Box-Motive. Eine GC-Box besteht aus der Konsensussequenz GGGCGGR. Dieses Motiv kommt häufig zusammen mit einer CAAT-Box (Konsensussequenz RGCCAATNR) in 5'-Richtung des Kernpromotors vor, die nicht in der *MUTYH*-Sequenz enthalten ist. Im Durchschnitt liegt das GC-Box-Element 63 bp aufwärts der Transkriptionsstartseite und steht an sechster Stelle der häufigsten regulatorischen Motive in humanen Promotoren [135]. Im *MUTYH*-Gen ist diese Box 54 bp in 5'-Richtung von Exon 1 $\gamma$  entfernt und könnte somit dessen Transkription kontrollieren. Die *MUTYH*-Promotor-Minigen Variante 10a, bei der das GC-Box-Motiv inaktiviert vorlag, zeigte jedoch keinen Wegfall der 1 $\gamma$ -Transkription, sondern eine starke Verringerung der Gesamttranskription von nur noch 53% im Vergleich zum Wildtyp. Das Motiv ist also für die Erhaltung des Transkriptionslevels von hoher Bedeutung, aber eine direkte Regulation einer der Isoformen liegt nicht vor. Aus diesem Grund wird eine *enhancer* Funktion für dieses Motiv im Zusammenhang mit *MUTYH* postuliert, welches nach Bindung bestimmter Transkriptionsfaktoren durch die Ausbildung von Schlaufen in der DNA in die räumliche Nähe von anderen regulatorischen Promotorelementen gebracht werden kann und somit die Transkription aller Isoformen verstärken könnte. Hiervon scheint vor allem das  $\alpha$ -Transkript zu profitieren, da dessen Transkriptionslevel bei Variante 10a am meisten verringert war. Die Patientenvariante 10 wies außerdem die gleiche Tendenz wie Variante 10a in Bezug auf die Gesamttranskription auf. Die Reduktion der Transkription fiel aber nicht ganz so stark aus, da das Motiv nur partiell ausgeschaltet wurde. Da das *specificity protein 1* (Sp1) die höchste Übereinstimmung von Transkriptionsfaktoren mit dem GC-Box-Motiv aufweist [135], wurde der Einfluss dieses Faktors auf die Transkription von *MUTYH* im Folgenden untersucht.

#### 4.1.4 Der Transkriptionsfaktor Sp1 beeinflusst die *MUTYH*-Transkription nicht über die GC-Box

Das Sp1-Protein ist ein promotorspezifischer Transkriptionsfaktor, der 1983 als erster sequenzspezifischer Aktivator der RNA-Polymerase II-Transkription aus humanen Zellen isoliert wurde [170, 171]. Es ist bekannt, dass Sp1 ubiquitär exprimiert wird und an mehrere verschiedene Sequenzen bindet, die der GC-Box Konsensussequenz ähneln. Mit Hilfe einer aus drei Zinkfingern bestehenden DNA-Bindedomäne bindet Sp1 an GC-Boxen mit der Konsensussequenz 5'-G/T-GGGCGG-G/A-G/A-C/T-3' oder 5'-G/T-G/A-GGCG-G/T-G/A-G/A-C/T-3' [172–179]. Zudem bindet Sp1 an CT- und GT-Boxen, tut dies jedoch mit signifikant geringerer Affinität [180]. Die transkriptionelle Aktivität von Sp1 wird sowohl über posttranslationale Modifikationen als auch Interaktionen mit anderen Proteinen reguliert, worunter sich viele Tumorsuppressor- bzw. Onkogene befinden [176].

Das in der *MUTYH*-Sequenz vorkommende GC-Box-Motiv hat die Basenabfolge 5'-GGGCGGGGT-3' (siehe Abbildung 3.8). Laut *TRANSFAC* Datenbank weist Sp1 die größte Übereinstimmung aller Transkriptionsfaktoren mit diesem Motiv auf [135], weshalb die Auswirkungen von Sp1 auf die *MUTYH*-Transkription getestet wurden. In dieser Arbeit konnte jedoch kein biologischer Effekt der Sp1-Überexpression auf die Transkription von *MUTYH* festgestellt werden. Die endogenen Transkriptionslevel blieben nach erfolgreicher Expression des Sp1-Proteins, wie im Western Blot ersichtlich, unverändert. Wurde Sp1 gemeinsam mit dem *MUTYH*-Promotor-Minigen transfiziert, zeigte sich zwar ein Einfluss von Sp1 auf die Transkription des Minigens in der Form, dass die Gesamttranskriptmenge zunahm, aber dies war ebenso bei der Variante 10a der Fall, wo das GC-Motiv ausgeschaltet vorlag. Die Minigen-Effekte können darum nicht spezifisch über die GC-Box vermittelt worden sein. Somit muss ein anderer GC-Box bindender Faktor die *MUTYH*-Transkription im *upstream* Bereich des 1 $\gamma$ -Exons kontrollieren. Dies ist mit der Tatsache übereinstimmend, dass sich das *MUTYH*-Gen nicht unter den bisher zusammengefassten Zielgenen von Sp1 befindet [176]. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass die Bindungsspezifität des Transkriptionsfaktors Sp1 nicht nur von der perfekten Kompatibilität mit der Konsensussequenz, sondern auch von den flankierenden Sequenzen abhängt [117].

Des Weiteren ist Sp1 nicht der einzige Faktor, der an das GC-Box-Motiv binden kann. Denn aus der Gruppe der Sp-Familie von Transkriptionsfaktoren, zu der Sp1 gehört, binden alle bevorzugt an GC-Boxen [181, 182]. Der Faktor Sp3 zeichnet sich durch eine fast identische DNA-Bindungsspezifität und Affinität im Vergleich zu Sp1 aus. Beide können somit um die gleichen GC-Boxen konkurrieren [176]. Ob Sp3 oder ein anderer zur Sp-Familie gehörender Transkriptionsfaktor die Transkription von *MUTYH* beeinflusst, müsste weiter aufgeklärt werden. Zwar wurde für die Sp- und KLF- (*Krüppel-like factor*) Transkriptionsfaktorfamilie noch kein Zusammenhang in Bezug auf Basenexzisionsreparatur hergestellt, dennoch spielen sie

eine Rolle in der Krebsentwicklung. So werden die Faktoren mit der Wachstumskontrolle/Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese in Verbindung gebracht [181].

Auch das zu *MUTYH* entgegengesetzte *TOE1*-Gen zeigte keine Beeinflussung der Transkription nach Sp1-Expression. Dies ist jedoch nicht überraschend, da sich das GC-Box-Motiv in der *TOE1*-Sequenz nicht, wie üblicherweise ~63 bp aufwärts der Transkriptionsstartseite befindet, sondern am Ende des Exon 1-Bereichs kurz vor dem Translationsstart vorkommt (siehe Abbildung 3.8). Des Weiteren wurde von Makalowska gezeigt, dass die Überschneidung der Gene *TOE1* und *MUTYH* mit keinem spezifischen Muster in Bezug auf die Genexpression assoziiert ist, obwohl überlappende Gene koexprimiert werden können. Denn *MUTYH*- und *TOE1*-Transkripte sind nur in 9 von 79 untersuchten humanen Geweben gemeinsam präsent, während sie in 14 anderen Geweben jeweils fehlten. *MUTYH* wurde insgesamt in deutlich mehr Geweben exprimiert als *TOE1*. So lag *MUTYH* in 65 von 79 humanen Geweben exprimiert vor, währenddessen *TOE1* in nur 10 Geweben detektiert werden konnte [45].

#### **4.1.5 Keine direkte Regulation von *MUTYH* durch das Tumorsuppressorprotein p53**

Der Transkriptionsfaktor p53, auch „Wächter des Genoms“ genannt, ist für die Erhaltung der genomischen Stabilität und Verhinderung der Krebsentstehung essentiell [183]. Liegen DNA-Schäden vor, induziert p53 entweder Zellzyklusarrest, was den Zellen die Möglichkeit zur DNA-Reparatur und Entfernung der eingeführten Läsionen gibt, oder Apoptose, um irreversibel geschädigte Zellen zu eliminieren [184–186]. In Tiermodellen führen Verlust oder Mutationen von p53 zu einer Reihe von spontanen und induzierten Tumoren [187–189]. Das betont die protektive Rolle von p53 in Zusammenhang mit der Onkogenese. In humanen Krebsentitäten ist der Schutz durch p53 in den meisten Fällen während der Pathogenese nicht mehr gegeben, da das *TP53*-Gen mutiert vorliegt oder Veränderungen in den Genen stattgefunden haben, welche die Expression von p53 regulieren [137, 190–192].

Gemäß Oka *et al.* unterdrückt *MUTYH* die Tumorentstehung nicht nur durch Verhinderung von Mutationen durch oxidativen Stress, sondern auch durch Induktion der Apoptose [105]. Die Gruppe zeigte, dass die Akkumulation von 8-oxo-Guanin (8-oxoG) in der DNA von Mitochondrien und des Nukleus zwei verschiedene Wege des Zelltods einleitet, welche unabhängig voneinander sind. Beide Wege werden durch die Anhäufung von Einzelstrangbrüchen in der DNA aufgrund der Aktivität der *MUTYH*-Glykosylase ausgelöst. In mitochondrialer DNA kommt es zur Freilassung von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), wodurch Calpain aktiviert wird, was im Weiteren zur Apoptose führt. Im Nukleus führt die Akkumulation von 8-oxoG in

der DNA hingegen dazu, dass der Apoptose-induzierende-Faktor durch PARP in den Zellkern transloziert wird [193]. Des Weiteren wurde berichtet, dass p53 eine wichtige Rolle im DNA-Reparatursystem spielt, indem es die Transkription von *OGG1* beeinflusst [194]. Somit befassten sich Oka *et al.* mit der Frage, ob p53 auch auf *MUTYH* regulierend wirkt. Sie fanden *in silico* mögliche *response* Elemente für p53, von denen ein Element laut Chromatin-Immunpräzipitation im Bereich vor Exon 2 p53 bindet. Weiterhin demonstrierten sie, dass in Zelllinien, welche MLH1- und p53-profizient sind, erhöhte *MUTYH*  $\beta$ - und  $\alpha$ -mRNA-Level auftraten. In MLH1-defizienten und p53-profizienten Zelllinien war dies nicht der Fall, weswegen sowohl p53 als auch MLH1 notwendig für die Induktion des *MUTYH*-abhängigen Zelltods unter oxidativem Stress sind [115]. Der Einfluss von p53 auf die Gesamttranskription von *MUTYH* und vor allem die alternative Promotornutzung blieb jedoch weiterhin unklar. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Auswirkung von p53 anhand zweier p53-Expressionsvektoren untersucht: einem p53 Wildtypvektor und einem dominant-negativen Kontrollplasmid. Zum Einsatz kamen HEK293-Zellen, die MLH1-profizient sind und in denen p53 erfolgreich überexprimiert wurde (vgl. Western Blots und p21-Level, Abb. 3.15). Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene wurde eine Beeinflussung der Transkription für die alternativen ersten Exons (AFEs) von endogenem *MUTYH* nachgewiesen. Für das *MUTYH*-Promotor-Minigen ging die Gesamttranskriptmenge nach Transfektion von p53 sogar zurück, aber auch hier blieb die Verteilung der Transkriptvarianten gleich. Somit wird die Transkription von *MUTYH* nicht direkt durch den Transkriptionsfaktor p53 kontrolliert und keine der AFEs von p53 spezifisch reguliert.

Da für *MUTYH* kein Zusammenhang zwischen p53 und dessen Transkription gefunden wurde, wurden zudem die Auswirkungen von p53 auf die *TOE1*-Transkription analysiert. Bei *TOE1* handelt es sich um jenes Gen, welches mit *MUTYH* in dessen 5'-Region überlappt (siehe Abbildung 1.4), jedoch in die entgegengesetzte Richtung abgelesen wird [45]. Das *TOE1*-Gen wurde zwar als Ziel des Transkriptionsfaktors *early growth response 1* (EGR1) entdeckt [195], jedoch fanden Oka *et al.* ein p53 *response* Element in der putativen Promotorregion von *TOE1*. Darum könnte p53 eine zusätzliche Rolle bei der Regulation von *TOE1* spielen. Dies konnte anhand dieser Arbeit allerdings ausgeschlossen werden, da keine Beeinflussung der *TOE1*-Transkription durch p53 festgestellt wurde.

Die Expression des *TOE1*-Proteins führt zur Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus, sowie zum Anstieg der Expression des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21 [195] und ist somit für die Regulation des Zellwachstums von Bedeutung. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass *TOE1* in der Lage ist das Tumorsuppressorprotein p53 zu binden, wodurch es die transkriptionelle Aktivität von p53-abhängigen Zielgenen fördern kann [196]. *TOE1* wird also eine Rolle als Koregulator für p53 zugeschrieben und nicht von diesem kontrolliert.

#### 4.1.6 MUTYH ist nicht direkt durch oxidativen Stress induzierbar

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden als Nebenprodukte der mitochondrialen Respiration oder bei der Verteidigung gegen Bakterieninfektionen endogen generiert oder man ist ihnen durch exogene Umwelteinflüsse ausgesetzt [197]. Diese ROS führen zu DNA-Läsionen. Eines der am häufigsten auftretenden Läsionen ist 8-oxoG. Der Dauerzustand des 8-oxoG-Levels wird auf  $\sim 10^3$  pro Zelle/pro Tag in Normalgewebe und auf  $\sim 10^5$  Läsionen pro Zelle/pro Tag in Krebsgewebe geschätzt [198]. Um diesem oxidativen DNA-Schaden, der zu Mutationen in der DNA und folglich zur Tumorgenese führt, entgegenzuwirken, sind Säugetierzellen mit drei spezifischen Enzymen ausgestattet. Zu den humanen Proteinen gehören MTH1, OGG1 und MUTYH [33]. MTH1 sorgt dafür, dass oxidierte Nukleosidtriphosphate aus dem Nukleotidpool entfernt werden. OGG1 und MUTYH sind im 8-oxoG-Reparaturweg, wie in der Einleitung beschrieben, für die Unterbindung der Manifestation von Transversionsmutationen (G:C nach T:A) in der DNA zuständig. Der Verlust dieser Enzyme führt zu einer erhöhten Tumorentwicklung in Lunge und Darmtrakt von Mäusen [197], was die Wichtigkeit dieser Enzyme für die DNA-Integrität verdeutlicht.

In weiteren Mausstudien wurde aufgedeckt, dass die Häufigkeit von GC:TA Transversionen signifikant erhöht ist, sobald eines der beiden Enzyme OGG1 oder MUTYH fehlt bzw. beide Enzyme abwesend sind. In OGG1<sup>-/-</sup> Mäusen war die Transversionsrate 5-fach, in MUTYH<sup>-/-</sup> Mäusen 4-fach höher im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. In Doppelknockout-Mäusen fand hingegen eine Erhöhung der Transversionsrate im Dünndarm um das 41-fache statt [199]. Der Ausfall von MUTYH in Mäusen führt jedoch nicht *per se* zu einem mutierten Phänotyp, da dieser durch OGG1 abgedeckt ist. OGG1 soll 8-oxoG-Läsionen in der DNA entdecken und entfernen, bevor DNA-Polymerasen die Chance haben fehlerhafte Adenine gegenüber der oxidierten Base einzubauen [26]. Nichtsdestotrotz resultiert ein Doppelknockout in einem synergistischen Effekt von G:C>T:A Transversionen und einer altersabhängigen Akkumulation von 8-oxoG in Lunge und Dünndarm [200]. Des Weiteren offenbarte die Inaktivierung der Enzyme OGG1 und MUTYH in Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit für die Bildung von Tumoren vor allem in Lunge, Ovarien und Lymphgewebe [200]. Wurden MUTYH Knockout-Mäuse zusätzlich dem Oxidationsmittel Kaliumbromat (KBrO<sub>3</sub>) ausgesetzt, stieg das Auftreten von kleinen Darmpolypen und Tumoren [201].

Für MUTYH wurde nach der Behandlung von HeLa-Zellen mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 40 min und nachfolgender Zellernte 5 h später ein deutlicher Anstieg im Expressionslevel berichtet (vgl. Abbildung 1 aus [17]). Aus diesem Grund wurde dasselbe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsprotokoll der genannten Publikation in dieser Arbeit angewandt, um diesen Effekt nachzustellen und anschließend zu untersuchen, welche Auswirkung der Einfluss des oxidativen Stresses auf die Isoformtranskription hat. Doch neben dem Rückgang der Zellviabilität, wie er bereits in anderen Publikationen gezeigt wurde [115, 202], konnte kein Anstieg des MUTYH-Protein-

oder Transkriptionslevels nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung weder in HEK293-Zellen noch in HeLa-Zellen gezeigt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit Hwang *et al.*, dessen Gruppe ebenso keine deutliche Erhöhung des MUTYH-Levels zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachweisen konnte (vgl. Abbildung 4 aus [202]). Ein Unterschied des Experiments dieser Arbeit und Hwangs Publikation gegenüber der ursprünglichen Veröffentlichung [17] ist, dass die HeLa-Zellen nicht synchronisiert vorlagen. In der Publikation von van Loon und Hübscher wurden die HeLa-Zellen in der Zellzyklusphase an der Grenze von G1- zur S-Phase synchronisiert und 5 h nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geerntet [17]. Der Zeitpunkt der Ernte läge somit am Ende der S-Phase, wenn man davon ausgeht, dass sich in Kultur gehaltene, humane Tumorzellen etwa 6 h in der S-Phase befinden [203]. Dadurch könnten die unterschiedlichen Beobachtungen zu erklären sein. Eventuell sind die Effekte ebenso zelltypabhängig. Diesbezüglich wäre es interessant, die Expression von MUTYH abhängig vom Zellzyklus und in unterschiedlichen Zelllinien zu analysieren. Bisher wurde keine zellzyklusabhängige Expression von MUTYH nachgewiesen. Da es jedoch während der Replikation von hoher Bedeutung ist, wäre zu erwarten, dass OGG1 und MUTYH vor allem in der Synthesephase am stärksten exprimiert werden, wodurch die oxidativen Effekte in dieser Arbeit evtl. nicht zu sehen waren. Andererseits müsste MUTYH nicht direkt durch oxidative Schäden induziert werden. Schließlich ist das Enzym nur indirekt an der Schadensbegrenzung beteiligt, da es den oxidativen Schaden selbst nicht entfernt, sondern die mit 8-oxoG fehlgepaarte Base [204]. Ob also ein generelles Basislevel in der Synthesephase oder eine zusätzliche Induktion über oxidativen Stress vorliegt, wäre in Zukunft mit der zellzyklusabhängigen Expression zu überprüfen.

Des Weiteren wurde überprüft, ob das OGG1-Level durch die ROS induzierten Schäden beeinflusst wird. OGG1, welches für die direkte Entfernung der oxidativen 8-oxoG-Läsion zuständig ist [205], wird gemäß den Ergebnissen in dieser Arbeit jedoch unabhängig von oxidativem Stress reguliert. Kim *et al.* berichteten sogar von einem Rückgang des mRNA- und Proteinlevels nach 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung in chinesischen Hamster-Lungenfibroblasten, trotz gleichzeitigen Anstiegs von 8-oxoG-Läsionen [206]. Aus diesem Grund wird weder für MUTYH noch OGG1 eine direkte Regulation durch oxidativen Stress angenommen, sondern vielmehr ein vorliegendes Basislevel beider Proteine in der Synthesephase des Zellzyklus postuliert, das evtl. zelltypspezifisch ist, je nachdem wie hoch die generelle Belastung des jeweiligen Gewebes mit ROS ist. Diese These bedarf allerdings einer genaueren Überprüfung.

## 4.2 Klassifizierung unklarer genetischer Varianten von *MUTYH*

Die Adenin-spezifische DNA-Glykosylase, die während der Basenexzisionsreparatur tätig ist, wird von dem Gen *MUTYH* kodiert und beschützt die DNA vor Mutationen, die durch oxidativen

Stress hervorgerufen werden [30, 44]. Biallelisch vorkommende Mutationen des *MUTYH*-Gens, die das Gen in der Keimbahn inaktivieren, werden mit der Prädisposition für kolorektale Polypen und Krebs assoziiert [75, 94]. Träger von pathogenen *MUTYH*-Varianten sind somit nicht nur einem hohen Risiko für das Auftreten von kolorektalen Tumoren ausgesetzt [6], sondern können die sogenannte *MUTYH*-assoziierte Polyposis rezessiv weitervererben, wodurch Familien mit einem Darmkrebsrisiko belastet sind. Zwar treten Darmpolypen von Betroffenen früher auf [94, 100] als sporadische Polypen und Darmkrebs der Gesamtbevölkerung [207, 208], jedoch sind auch Fälle bekannt, bei denen Darmtumore ohne Polyposisphänotyp auftraten [209]. Die Diagnose kann also nicht allein vom klinischen Phänotyp abhängig gemacht werden, sondern wird erst durch den Nachweis biallelisch vorkommender, pathogener Mutationen gestellt. Das Problem hierbei liegt darin, dass bei vielen gefundenen Varianten unklar ist, welchen Einfluss sie auf die Aktivität des *MUTYH*-Gens bzw. Proteins haben und somit, trotz Feststellung des Genotyps, keine eindeutige Diagnose gestellt werden kann. Dadurch bleibt den Familienangehörigen der Zugang zu genetischen Untersuchungen und Beratungen, sowie Vorsorgemaßnahmen verwehrt.

#### **4.2.1 Korrelation der klassifizierten Varianten mit dem klinischen Phänotyp**

Um genetische Diagnostik für Patienten mit einem klinischen MAP-Phänotyp zu ermöglichen, wurden unklare genetische Varianten bezüglich der Proteinexpression und der Bewertung des Aminosäureaustauschs (AS-Austauschs) klassifiziert. Von Goldgar *et al.* und Mitgliedern der IARC wurde vorgeschlagen, für die Bewertung von Varianten generell alle vorliegenden Informationen einzubeziehen. Dafür sollen gleichermaßen *in vitro* Daten, bioinformatische Daten und klinische Daten miteinander korreliert werden [210], um das genaue Risiko von Varianten so exakt wie möglich zu bestimmen, da Einzeldaten für eine Evaluierung häufig nicht ausreichen. Somit sind erste Einschätzungen der Pathogenität anhand der in dieser Arbeit gewählten Parameter möglich, dennoch ist deren Aussagekraft ohne die Einbeziehung weiterer Parameter nicht endgültig.

Die kaukasischen Hotspot-Mutationen Y179C und G396D, die bereits 70% aller mutierten Allele in der Bevölkerung ausmachen [93] und als pathogen gelten, würden anhand der in dieser Arbeit gewählten Parameter auch als „wahrscheinlich pathogen“ eingestuft. Es ist bekannt, dass der Austausch von aromatischem Tyrosin gegen Cystein an der Position 179 im Pseudo-HhH-Motiv zu drastischen Strukturveränderungen führt. Dadurch weist diese Variante eine 10-fach reduzierte DNA-Bindungsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Substitution der Aminosäure der Variante G396D verändert hingegen die Struktur des C-Terminus, wodurch DNA-Bindung und Glykosylaseaktivität eingeschränkt sind (zusammengefasst von Mazzei *et al.*; [204]). Diese experimentellen Analysen stimmen mit

dem klinischen Phänotyp überein, denn das Durchschnittsalter bei der Diagnose von kolorektalen Karzinomen für homozygote Träger der Variante Y179C liegt bei 46 Jahren im Gegensatz zu homozygoten Trägern der Variante G396D mit 58 Jahren [97, 211]. Somit besteht für Patienten mit Y179C Mutationen ein höheres Krebsrisiko als für Träger von G396D Mutationen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Varianten werden nachfolgend basierend auf den hier gewonnenen Daten und anhand der Einträge in der LOVD-Datenbank (Stand: 22.09.2017) und der dort hinterlegten Literatur evaluiert.

**V22M:** Diese Variante befindet sich in der RPA-Bindungsdomäne. Sie ist gemäß dieser Arbeit stabil exprimiert (142%), der Konservierungsscore beträgt 6 und der AS-Austausch ist übereinstimmend mit der Plattform PolyPhen-2 nicht pathogen. Funktionelle Assays (DNA-Glykosylaseaktivität/DNA-Bindung) unterstützen ebenso eine wildtypähnliche Funktion [114]. Zudem ist die Variante bisher als nicht ursächlich für einen klinischen Phänotyp eingestuft, sondern als Polymorphismus eingeordnet, da sie in gesunden Kontrollpatienten genauso vorkommt wie in Patienten mit CRC oder anderen Krebsentitäten (Lunge, Prostata) [75, 212–214].

**W103R:** Diese Variante zeigt ein normales Expressionslevel (109%), genauso wie bei Komine *et al.* [215]. Sie liegt in einer hochkonservierten (Konservierungsscore 8) Helix-Struktur und da der AS-Austausch gemäß Homologiemodell strukturstörend ist, wurde die Variante übereinstimmend mit SIFT und PolyPhen-2 als pathogen eingestuft. Allerdings fehlen ausreichende Daten zum klinischen Phänotyp. In der LOVD-Datenbank liegen nur 3 Einträge vor. Unter anderem wurde diese Variante als somatische Mutation in Patienten mit hepatozellulären Karzinomen gefunden [216]. Für eine eindeutige Klassifizierung werden mehr Patientendaten benötigt.

**R109W:** Die Expression dieser Variante ist mit 87% vergleichbar mit dem WT-Level. Der Konservierungsscore beträgt 9. Der AS-Austausch in der Loop-Struktur des Proteins, nahe des ausgeklappten Adenins, ist jedoch strukturstörend und somit in Übereinstimmung mit SIFT und PolyPhen-2 als pathogen eingeordnet worden. Gemäß Vogt *et al.* wurde die Variante in der LOVD-Datenbank ebenso als wahrscheinlich pathogen eingestuft, da sie in der Keimbahn als biallelisch, heterozygote Variante mit der Hotspot Mutation G396D bei einem Patienten auftrat, bei welchem mit 52 Jahren CRC diagnostiziert wurde, woran er mit 53 Jahren verstarb [98].

**W131R:** Diese Variante ist hochkonserviert (Konservierungsscore 9) und weist eine reduzierte Expression von 70% bei strukturstörendem AS-Austausch im Helix-Bereich neben der DNA-Bindungsdomäne auf und wurde entsprechend den Plattformen SIFT und PolyPhen-2 als wahrscheinlich pathogen eingeordnet. Da die Variante bislang nur zusammen mit der Mutation Y179C in einem Patienten auftrat, der mit 31 Jahren >100 Polypen, aber (noch) keinen CRC

aufwies [92], ist eine Pathogenität auch aus klinischer Sicht wahrscheinlich, aber aufgrund unzureichender klinischer Daten nicht endgültig sicher.

**P157L:** Die Variante P157L zeichnet sich durch ein reduziertes Expressionslevel (65%) und einen Konservierungsscore von 9 aus. Einhergehend mit SIFT und PolyPhen-2 wurde der AS-Austausch in einer Loop-Struktur als destabilisierend und somit pathogen eingestuft. Die klinischen Daten beschränken sich auf einen Patienten mit dem heterozygotem Genotyp P157L/G396D, bei welchem mit 36 Jahren <100 Polypen auftraten und welcher 10 Jahre später mit CRC diagnostiziert wurde [90, 98]. Für eine sichere Klassifizierung werden mehr klinische Daten benötigt, aber die bisherige Datenlage weist auf eine wahrscheinliche Pathogenität hin.

**R182H:** Der Austausch von Arginin zu heterozyklischem Histidin in der hochkonservierten (Konservierungsscore 9) DNA-Bindungsdomäne dieser Variante geht mit einer verminderten Expression (73%) einher. Übereinstimmend damit sagen SIFT und PolyPhen-2 eine wahrscheinliche Pathogenität bezüglich des AS-Austauschs voraus. Dies ist einhergehend mit den Einträgen der LOVD-Datenbank, in der der klinische Phänotyp mit dem Auftreten von Polypen und CRC einhergeht [90, 217, 218]. Zudem konnten Goto *et al.* bei einem funktionellen *in vitro* Glykosylase-Test für die Variante R182H schwerwiegende Defekte nachweisen [219].

**R185W:** Die Variante R185W kennzeichnet sich zwar durch ein normales Expressionslevel (76%) aus, aber aufgrund eines strukturstörenden AS-Austauschs im Helix-Bereich nahe der DNA-Bindungsdomäne bei hoher Konservierung (Konservierungsscore 8) wurde die Variante folglich als wahrscheinlich pathogen eingeordnet. Dies ging mit der Bewertung von PolyPhen-2 einher, wonach diese Variante ebenfalls so eingeordnet wurde, im Gegensatz zur Plattform SIFT, die den AS-Austausch als „tolerated“ einstuft. *In vitro* wurde von D'Agostino *et al.* eine schwerwiegende Reduktion der Bindungsaffinität dieser Variante zum Substrat nachgewiesen [220], sowie eine eingeschränkte Glykosylaseaktivität [220, 221]. Klinisch wurde bislang eine heterozygote Keimbahnmutation für diese Variante berichtet, die bei einem Patienten mit 90-100 Polypen und dem Auftreten von CRC im Alter von 49 Jahren einherging [222]. Diese zusätzlichen Daten sprechen weiterhin für eine pathogene Einstufung.

**V215M:** Diese Variante ist stark konserviert (Konservierungsscore 8) und besitzt ein reduziertes Expressionslevel (63%) mit einem AS-Austausch in einer Loop-Struktur im HhH-Motiv von unsicherer Bedeutung, wodurch sie als unklar eingeordnet wurde. Im klinischen Bild trat diese Variante als zusammengesetzt heterozygote Keimbahnmutation zusammen mit P295L bei einem Patienten mit multiplen Polypen des Dickdarms und Zwölffingerdarms auf. Zudem wurde im Alter von 30 Jahren CRC diagnostiziert [98]. In der LOVD-Datenbank ist die Pathogenität von den Autoren auch als unklar hinterlegt, da weitere klinische Daten, v. a. homozygote Mutationen nicht vorhanden sind.

**I223V:** Die Variante liegt in einer Helix-Struktur von MUTYH und ist hochkonserviert (Konservierungsscore 9). Die Expression dieser Variante war stark beeinträchtigt (24%) und wurde als wahrscheinlich pathogen eingestuft, unabhängig des Schweregrads des AS-Austauschs. Dies ist in Übereinstimmung mit SIFT und PolyPhen-2 sowie den partiell eingeschränkten *in vitro* Effekten der Glykosylaseaktivität nach Goto *et al.* [219]. Die Variante wurde vom MGZ München (gemäß LOVD) sowohl in einem Patienten gefunden, der im Alter von 36 Jahren mit Darmkrebs diagnostiziert wurde, aber auch in einem gesunden Kontrollprobanden im Rahmen prädiktiver Maßnahmen. Gemäß Olschwang *et al.* [223] und Sieber *et al.* [224] bleibt die genaue Klassifizierung anhand klinischer Daten weiterhin unklar, da sie in Patienten mit multiplen Polypen, aber nur monoallelisch vorkam.

**D236N:** Diese Variante wurde aufgrund des schwerwiegenden AS-Austauschs in einem Loop nahe des fehlgepaarten, ausgeklappten Adenins und hoher Konservierung (Konservierungsscore 9) trotz stabiler Expression, wie sie auch von Wooden *et al.* [225] gezeigt wurde, als wahrscheinlich pathogen klassifiziert (übereinstimmend mit SIFT und PolyPhen-2). In der LOVD-Datenbank liegen keine klinischen Daten zu dieser Variante vor. Die Einträge beschränken sich ausschließlich auf funktionelle *in vitro* Tests, bei denen keine Glykosylaseaktivität für diese Variante messbar war [114, 219, 226, 227], weshalb sie als pathogen eingestuft wurde.

**R241Q:** Die Expression dieser Variante ist mit 75% im Vergleich zum Wildtyp leicht eingeschränkt. Wegen der hohen Konservierung (Konservierungsscore 9) und der Lage in einer Seitenkette nahe der DNA, wurde sie als wahrscheinlich pathogen eingeordnet, aufgrund des AS-Austauschs. Der klinische Phänotyp ist bisher nicht eindeutig (Clinical Genetics, LUMC, Leiden, NL; Medical Genetics, UZ Gent, Gent, BE) weswegen die Variante anhand des klinischen Bildes in der LOVD-Datenbank als unklar eingeordnet ist. Vogt *et al.* wiesen die heterozygote Variante R241Q/G396D in einer Patientin nach, bei der mit 45 Jahren CRC in Zusammenhang mit multiplen Polypen festgestellt wurde [98]. Homozygote Daten zu dieser Variante sind nicht vorhanden, weshalb kein klarer klinischer Phänotyp abzuschätzen ist.

**R245H:** Das Expressionslevel dieser Variante ist reduziert (63%) und aufgrund des folgenschweren AS-Austauschs in einer stark konservierten Region (Konservierungsscore 9) nahe der DNA wurde diese Variante in dieser Arbeit für wahrscheinlich pathogen erklärt. Vorliegende *in vitro* Daten zeigen schwere Defekte dieser Variante bezüglich der Glykosylaseaktivität und Substrat-Bindung [114]. In Zusammenhang mit dem klinischen Phänotyp wurde die Variante zusammengesetzt heterozygot mit einer der Hotspot-Mutationen oder Deletionsvarianten berichtet [98, 228]. Der Phänotyp ging dabei in jeweils 80% der Fälle mit dem Auftreten von CRC im Alter von 41 bis 68 Jahren und Polypen einher. Olschwang *et al.* listet diese Variante als Polymorphismus auf [223]. Liegt die Variante zusammengesetzt heterozygot mit einer bekannten pathogenen Mutation vor, sollte somit von einem erhöhten

CRC Risiko ausgegangen werden. Die Auswirkungen homozygoter Mutationen dieser Variante bleiben weiterhin unklar.

**G250D:** Die Expression dieser Variante ist im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduziert (56%). Da der AS-Austausch in einer Loop-Struktur nicht sehr gravierend ist (Konservierungsscore 5), wurde sie als unklare Variante eingeordnet. Die klinischen Daten der LOVD-Datenbank ergeben keinen klaren Phänotyp. Berichtet wurde die Variante zweimal als biallelisch heterozygote Variante mit einer Deletionsvariante, wovon nur bei einem Patienten multiple Polypen und CRC auftraten [98].

**A266G:** Die Pathogenität dieser Variante wurde anhand der Arbeit als unklar bewertet, da die Expression um etwa  $\frac{1}{3}$  eingeschränkt (61%) und der AS-Austausch trotz hoher Konservierung (Konservierungsscore 8) in der MSH6-Bindungsdomäne nicht bedeutsam war. Die Plattform SIFT bewertet den AS-Austausch als „schädlich“, während PolyPhen-2 eine „gutartige“ Veränderung angibt. Publierte klinische Daten zu dieser Variante sind gemäß LOVD nicht vorhanden. Lediglich ein Eintrag [Spier und Aretz (unpubliziert)] deutet daraufhin, dass die Mutation bei einem Patienten mit attenuierter familiärer adenomatöser Polyposis (AFAP) gefunden wurde. Funktionelle *in vitro* Daten und weitere klinische Daten sind hier für eine Klassifizierung notwendig.

**R274W:** Die Expression dieser Variante entspricht der Hälfte des WT-Levels (51%) bei strukturstörendem AS-Austausch. Einen nicht tolerierbaren Austausch sagen auch die Plattformen SIFT und PolyPhen-2 voraus. Da die Aminosäure an dieser Stelle in einem Loop jedoch nicht stark konserviert ist (Konservierungsscore 6), wurde die Mutation als unklar eingestuft. Dies entspricht ebenso dem bislang vorhandenen klinischen Bild. Die LOVD-Datenbank enthält nur zwei Einträge zu dieser Mutation. Bei einem Betroffenen sind weder Polypen, noch Darmkrebs bekannt, die zweite Mutation wurde im Rahmen eines Screenings von FAP-Patienten ohne *APC*-Mutation gefunden.

**M283V:** Für diese Variante wurde eine reduzierte Expression (63%) demonstriert. Da die ausgetauschte Aminosäure zwar in der Adenin-Erkennungsdomäne liegt (Konservierungsscore 9), aber die gleichen Eigenschaften wie die ursprüngliche AS aufweist, ist die Variante bezüglich der Pathogenität unklar. SIFT und PolyPhen-2 sagen hingegen einen Defekt voraus. Funktionelle Assays demonstrierten für diese Variante, die an der Adenin-Erkennung beteiligt ist, eine reduzierte Glykosylaseaktivität (10% im Vergleich zum WT) [219]. Klinisch wurden 2 Fälle berichtet, wo die Variante jeweils im Rahmen genetischer *MUTYH*-Untersuchungen bei Patienten mit multiplen Adenomen und CRC nachgewiesen wurde [229, 230]. Die Auswirkungen dieser Variante scheinen somit, gegensätzlich zur Einordnung in dieser Arbeit, pathogen zu sein.

**P295L:** Diese Variante zeichnet sich durch ein normales Expressionslevel (82%) bei gleichzeitig strukturstörendem AS-Austausch im Fe-S-Motiv (Konservierungsscore 9) aus,

weshalb sie als wahrscheinlich pathogen klassifiziert wurde, einhergehend mit den Ergebnissen von SIFT und PolyPhen-2. Darüber hinaus offenbarten funktionelle *in vitro* Tests schwerwiegende Einschränkungen sowohl der Glykosylaseaktivität als auch der DNA-Bindung [114]. Als biallelisch heterozygote Mutation wurde diese Variante bereits mit polypen-tragenden Patienten und CRC in Verbindung gebracht [98, 211, 229, 231]. In einem 36 Jahre alten Patienten mit 50-100 Polypen, der noch keine Dickdarntumore aufwies wurden hingegen homozygote Mutationen dieser Variante nachgewiesen [98]. Demnach scheint für die Träger dieser Mutation ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Polypen zu bestehen, weshalb diese regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen unterzogen werden sollten.

**R309C:** Die Expression dieser Variante war vergleichbar mit dem WT-Level (98%). Die Aminosäure in einer Helix-Struktur an dieser Stelle ist nicht konserviert (Konservierungsscore 3), weswegen die Variante als wahrscheinlich nicht pathogen eingestuft wurde. Die Ergebnisse von SIFT und PolyPhen-2 stimmen damit überein. *In vitro* Tests sprechen ebenso dafür, dass die Variante nicht krankheitsauslösend ist, da die Glykosylaseaktivität dem WT entspricht [219]. Gemäß Aretz *et al.* handelt es sich um eine seltene Variante, da sie bei nur einem von 329 Polyposis-Patienten monoallelisch auftrat [90]. Allgemein wurde die Variante in monoallelischer Form jedoch bereits mehrmals in jungen Polyposis-Patienten, ohne dem Auftreten von CRC, berichtet [90, 223, 224]. Auch der Fund der heterozygoten biallelischen Y179C/R309C Mutation resultierte in einem milden Phänotyp von 10-20 Polypen ohne CRC bei einem 58-jährigen Patienten [232]. Die *in vitro* als nicht pathogen eingestufte Variante korreliert somit mit einem milden Polyposis-Phänotyp. Nichtsdestotrotz sollten Betroffene engmaschig betreut werden.

**Q338H:** Diese Variante kennzeichnet sich durch eine normale Expression dem WT entsprechend aus (107%) und der AS-Austausch war vernachlässigbar, da die Aminosäure nicht konserviert ist (Konservierungsscore 1). Dies ist in Übereinstimmung mit den Plattformen SIFT und PolyPhen-2, die ebenso keine Pathogenität für diese Veränderung voraussagen. Funktionelle Assays unterstützen diese Beobachtungen, da sich die Variante in Glykosylase- und DNA-Bindungs-Assays ähnlich dem WT verhielt [114, 225]. Die Q338H-Variante ist, abgesehen von den Hotspot-Mutationen, die in dieser Arbeit untersuchte Variante mit den meisten Einträgen in der LOVD-Datenbank und wurde als SNP in Europa, Amerika und Japan berichtet. Sie lag meist heterozygot mit einer anderen (Hotspot-)Mutation oder homozygot in verschiedenen Patienten vor (Magenkrebs, Darmpolypen, CRC), wurde in der Literatur aber bisher nicht als krankheitsauslösend eingestuft [75, 121, 122, 213, 231, 233–235].

**P359L:** Die Aminosäure dieser Variante ist hochkonserviert (Konservierungsscore 9) und befindet sich in einer Loop-Struktur nahe der DNA-Helix. Der AS-Austausch ist, einhergehend mit SIFT und PolyPhen-2, strukturstörend. Da zudem die Expression verringert vorlag (55%), wurde die Variante als wahrscheinlich pathogen eingeordnet. P359L ist bislang nur in einer

---

Studie bei zwei Patienten mit multiplen Darmadenomen gefunden worden und wurde vom klinischen Bild als unklare Variante eingestuft [223]. Funktionelle Daten für eine genauere Zuordnung sind bislang nicht vorhanden.

**R364C:** Diese Variante ist stark konserviert (Konservierungsscore 8) und liegt nah an der OG-Erkennungsstelle. Sie zeichnet sich durch ein reduziertes Expressionslevel (71%) und einen schwerwiegenden AS-Austausch aus, wodurch sie in Übereinstimmung mit SIFT und PolyPhen-2 als wahrscheinlich pathogen eingestuft wurde. Ein Träger dieser Variante aus Marseille (Frankreich) ist zwar bekannt, jedoch liegen keine weiteren klinischen Informationen zu diesem Betroffenen in Form einer Publikation vor [Sylviane Olschwang, LOVD].

**A373V:** Diese Variante ist durch eine normale Expression (89%) und einen Konservierungsscore von 7 gekennzeichnet. Der AS-Austausch ist übereinstimmend mit SIFT und PolyPhen-2 nicht sehr gravierend, woraus sich eine Einordnung als wahrscheinliche nicht pathogen ergab. Diese Klassifizierung stimmt mit funktionellen *in vitro* Assays überein, da keine Einschränkungen der Glykosylaseaktivität festgestellt wurden [219, 234]. Klinische Daten sind nur aus Japan und Korea bekannt, aber nicht in der kaukasischen Bevölkerung berichtet. Dort wurde eine monoallelische A373V-Mutation in einer 65-jährigen Patientin mit 13 Polypen, aber ohne CRC gefunden. Lediglich das Vorkommen mit einer weiteren heterozygoten Mutation (G286E/A373V) führte zum Auftreten von Polypen und CRC. Im Gegensatz dazu wurde diese monoallelische Mutation in etwa 5% der gesunden Kontrollprobanden entdeckt [234, 236]. Während die *in vitro* Daten keine Pathogenität voraussagen, scheint dennoch eine gewisse Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Polypen vorzuliegen. Solange nicht mehr klinische Daten vorhanden sind, sollten Träger dieser Mutation Vorsorgeuntersuchungen in Erwägung ziehen.

**P405L:** Diese Variante befindet sich an einer hochkonservierten Stelle (Konservierungsscore 9) des MUTYH-Proteins in einer Loop-Struktur. Der AS-Austausch wirkt strukturstörend und die Variante ist bezüglich ihrer Expression stark eingeschränkt (32%) und wurde folglich als wahrscheinlich pathogen eingeordnet. Diese *in vitro* Daten korrelieren mit dem klinischen Phänotyp. In der LOVD-Datenbank sind 23 Einträge allein aus Niederlande und Deutschland verzeichnet, die als pathogen klassifiziert wurden (zusammengefasst von Vogt *et al.*, [98]). Etwa 8% der untersuchten MAP-Patienten enthielten diese Keimbahnvariante, 4 davon in homozygoter Form. Letztere litten alle unter Polypen und CRC und verstarben vor dem 60. Lebensjahr. Auch die Einträge aus Belgien (ohne Literaturangabe) und Schweden [233] ordneten diese Variante als pathogen ein.

**R426C:** Die Expression dieser Variante betrug die Hälfte des Wildtyps (54%). Die Aminosäure ist an dieser Stelle nicht konserviert (Konservierungsscore 4) wodurch der Schweregrad des AS-Austauschs vernachlässigbar ist und die Variante als unklar eingestuft wurde. Die Plattformen SIFT und PolyPhen-2 schätzen die Variante als nicht pathogen ein. Das klinische

Bild zeigt das Vorkommen dieser Variante in FAP- und MAP-Patienten, sowie Patienten mit Lungenkrebs als auch in gesunden Kontrollprobanden [90, 96, 119, 212, 233, 237]. Daher gilt die Variante klinisch bisher ebenso als unklar.

**R474P:** Diese Variante befindet sich nicht in einer nicht sehr konservierten Region (Konservierungsscore 6) von MUTYH und wird nur zu  $\frac{2}{3}$  im Vergleich zum WT exprimiert (63%), weshalb sie in dieser Arbeit als unklar bezüglich der Pathogenität eingestuft wurde. Die Plattformen SIFT und PolyPhen-2 sagen jedoch ein beschädigtes Protein voraus. Klinische Daten sind derzeit zu dieser Variante nicht vorhanden, weswegen sie weiterhin als unklare Variante eingestuft wird.

**A489T:** Das Expressionslevel dieser Variante ist zwar mit dem WT vergleichbar (90%), nichtsdestotrotz wurde sie in Übereinstimmung mit SIFT und PolyPhen-2 aufgrund eines folgeschweren AS-Austauschs in einem hochkonservierten Bereich (Konservierungsscore 8) nahe der DNA- und OG-Erkennungsstellen als wahrscheinlich pathogen eingeordnet. Gefunden wurde die Variante bislang bei zwei australischen Polyposis-Patienten ohne nachweisbare APC-Mutation. In einem 34-jährigen Patienten mit über 34 Polypen, aber ohne CRC, trat die Mutation heterozygot (Y179T/A489T) auf [238]. Klinisch lässt sich daraus keine klare Klassifizierung dieser Variante ableiten.

**V493F:** Diese Variante zeichnet sich durch einen strukturstörenden AS-Austausch bei starker Konservierung (Konservierungsscore 8) aus und wurde einhergehend mit den Vorhersage-Plattformen und einer reduzierten Expression (35%) als wahrscheinlich pathogen deklariert. Die Variante wurde 1x in Deutschland [90] und 4x in Frankreich berichtet [223, 239]. Das klinische Bild ist dennoch nicht eindeutig, da die Variante sowohl in heterozygoter Form in einem Patienten mit Darmpolypen und CRC [90] gefunden wurde, als auch in homozygoter Form bei einem gesunden Kontrollpatienten, einem Patienten mit sporadischem Darmkrebs [239] und in zwei Polyposis-Patienten [223] vorkam.

**S515F:** Die Variante wurde im Vergleich zum WT-Protein nur etwa halb so stark exprimiert (58%). Der AS-Austausch wurde als nicht gravierend interpretiert, da die Aminosäure an dieser Stelle nicht konserviert ist (Konservierungsscore 1). Dies ist einhergehend mit der Einschätzung von PolyPhen-2, lediglich SIFT sagt einen schadhaften Defekt voraus, weswegen die Variante als unklar eingeordnet wurde. Die zu dieser Variante vorliegenden funktionellen *in vitro* Daten ergaben keinen pathogenen Effekt, da die Glykosylaseaktivität dem WT entsprach [219]. Die kaukasische Bevölkerung ist von diesem SNP betroffen und hat in der LOVD-Datenbank 23 Einträge, wobei das Auftreten sehr heterogen ist. Die Variante wurde sowohl in gesunden Kontrollprobanden als auch in Patienten mit Darmpolypen und CRC gefunden [75, 118, 122, 223, 229, 239, 240]. Außerdem kam sie in gesunden Kontrollprobanden und zugehörigen Betroffenen von Lungenkrebs und HNPCC vor [212, 241]. Das klinische Bild ist somit nicht eindeutig und die Variante weiterhin als unklar einzuordnen.

**L529M:** Diese Variante wurde anhand der gemessenen Parameter dieser Arbeit als wahrscheinlich pathogen eingeordnet, da sie unabhängig des Schweregrads des AS-Austauschs nicht mehr exprimiert wurde (7%). Der AS-Austausch ist prinzipiell nicht gravierend (Konservierungsscore 5), wie es auch von SIFT und PolyPhen-2 vorausgesagt wurde. Somit liegt das Problem wahrscheinlich auf mRNA-Ebene. Zu dieser Variante liegen weder klinische noch funktionelle *in vitro* Daten vor, obwohl in der LOVD-Datenbank zwei Einträge vorhanden sind. Diese sind jedoch ohne Literaturangabe, wodurch keine Aussage zum Phänotyp und keine Korrelation mit diesem möglich ist.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass 17 der 29 untersuchten Varianten (59%) eine Übereinstimmung der Klassifizierung, anhand der in dieser Arbeit erhobenen *in vitro* und *in silico* Parameter, mit dem klinischen Phänotyp aufwiesen (V22M, R109W, W131R, P157L, R182H, R185W, V215M, R245H, G250D, A266G, R274W, P295L, Q338H, A373V, P405L, R426C, S515F). Bei sieben der analysierten Varianten (24%) war die eigene Einordnung gegensätzlich zu den in der LOVD-Datenbank hinterlegten klinischen Daten (I223V, R241Q, M283V, R309C, P359L, A489T, V493F). Hierbei ist allerdings zu vermerken, dass das klinische Bild häufig durch geringe Patientendaten nicht endgültig ist und zudem experimentell erhobene Daten *in vivo* Vorgänge nur zum Teil widerspiegeln können. Außerdem stellt das Homologiemodell nur eine Annäherung an das humane MUTYH-Protein dar. Bei weiteren fünf Varianten (17%) war keine Korrelation der Klassifizierung möglich, da der klinische Phänotyp aufgrund fehlender Daten unklar blieb (W103R, D236N, R364C, R474P, L529M).

Ohne Korrelation aller vorhandenen Daten für einzelne Varianten ist eine korrekte Abschätzung der Pathogenität unsicher. In dieser Arbeit wurde allerdings eine Variante identifiziert, deren Proteinexpression kaum mehr nachweisbar war (L529M), wodurch diese ohne weiteres als pathogen einzustufen ist. Für weiterhin unklare Varianten müssen mehr Patientendaten erhoben und in die LOVD-Datenbank eingetragen werden. Außerdem sind die vorhandenen Daten zu jeder Variante sehr heterogen, wodurch eine eindeutige Abschätzung des klinischen Phänotyps zusätzlich erschwert wird. Für zukünftige Studien wären deshalb prospektive Studien mit international einheitlich, festgelegten Parametern sinnvoll, um eine bessere Homogenisierung der Datenlage zu erreichen. Des Weiteren sollten fehlende funktionelle Daten, die einen wichtigen Hinweis auf die Funktionsfähigkeit des MUTYH-Proteins geben, ergänzt werden. Nur so können unklare Varianten klassifiziert werden, wodurch betroffenen Patienten eine eindeutige Diagnose ermöglicht wird.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, das MUTYH-Protein aufzureinigen, um VUS nachzubilden und für funktionelle Assays wie dem Glykosylase-Assay und DNA-Bindungs-Assay zu verwenden. Die Schwierigkeit bestand darin, ausreichend aufgereinigtes Protein zu erhalten [242]. Die Expression und Aufreinigung geschieht bisher zumeist aus Bakterien (BL21-CodonPlus(DE3) *E. coli*) oder Insektenzellen [204].

Eukaryotische Expressionssysteme haben im Gegensatz zu bakteriellen Systemen den Vorteil, dass die Proteine posttranslationale Modifikationen enthalten und so dem humanen System besser ähneln [243]. Aus diesem Grund ist es erstrebenswert, die *in vitro* Experimente in eukaryotischen Systemen durchzuführen. Außerdem kommt es immer wieder zu widersprüchlichen Ergebnissen bei der Bewertung der Funktionalität von MUTYH-Varianten, was wahrscheinlich mit der Verwendung unterschiedlicher Methoden und Protokolle zusammenhängt [204, 226]. Darum wären einheitlich etablierte Assays wünschenswert. Im Zuge dieser Arbeit wurde versucht, das MUTYH-Protein mittels Sf9-Insektenzellen und aus humanen HEK293-Kulturzellen aufzureinigen, was allerdings nicht sehr sauber gelang (nicht gezeigt). Erst bei der Rückkehr zum bakteriellen System und der Aufreinigung gemäß Ali *et al.* [114] gelang die Aufreinigung eines GST-getagten MUTYH-Proteins, wenn auch nicht sehr sauber. Allerdings konnten Ali *et al.* das MUTYH-Protein ebenso nur partiell aufreinigen und nutzten es dennoch für nachfolgende funktionelle Assays. Es scheint also schwierig, das MUTYH-Protein rein zu isolieren.

Die Vorhersage-Plattformen SIFT und PolyPhen-2 stellen ein erstes hilfreiches Werkzeug zur Einschätzung von Aminosäureaustauschen dar, sind jedoch nicht zuverlässig genug für endgültige Aussagen, da die Angaben beider Plattformen in sieben Fällen (24%) konträr waren. Die eigene Einordnung der Varianten mit Hilfe des Homologiemodells stimmte etwa zu 64% mit den Plattformen überein (62% SIFT; 66% PolyPhen-2). SIFT verlässt sich bei der Bewertung allein auf Sequenz-Homologien, um Vorhersagen zu treffen [140, 141]. PolyPhen-2 hingegen ist etwas komplexer. Es zieht neben evolutionären Betrachtungen auch strukturelle Eigenschaften mit ein [142]. Da die Plattformen nicht in der Lage sind, literarische, experimentelle und klinische Ergebnisse in ihre Bewertung miteinzubeziehen, bleiben *in vitro* Assays und die Betrachtung klinischer Daten unerlässlich.

### 4.3 Ausblick

Das in dieser Arbeit erfolgreich etablierte *MUTYH*-Promotor-Minigenmodell stellt das erste Transkriptions- und Spleißmodell für *MUTYH* dar. Damit wurde ein humangenetisches, diagnostisches Werkzeug entwickelt, welches zukünftig für die Evaluation von Promotorvarianten genutzt werden kann.

Verschiedene Studien haben bereits ein erhöhtes Darmkrebsrisiko und die Entstehung weiterer Tumore außerhalb des Kolons für biallelische *MUTYH*-Mutationsträger belegt [244]. Neben der Risikoeinschätzung biallelischer Mutationen rückt auch immer mehr die Untersuchung der Auswirkungen monoallelischer *MUTYH*-Mutationen in den Vordergrund [244–247]. Beispielsweise wurden bei Analysen von Plotz *et al.* Expressionsdaten von gesunden Kontrollpatienten (ohne Polypen, Kolonkarzinomen und wesentlichen *MUTYH*-

Mutationen) und Polyposis-Patienten verglichen. Dabei wurde ein SNP entdeckt, welcher zur Reduktion einer Transkriptvariante von *MUTYH* führte, wodurch ein erhöhtes Krebsrisiko auch für monoallelisch heterozygote Mutationsträger möglich ist [95]. Zudem konnte eine umfangreiche Meta-Analyse von Win *et al.* zeigen, dass Menschen mit einer geerbten monoallelischen Mutation des *MUTYH*-Gens ein geringfügig erhöhtes Risiko (~15%) für kolorektale Tumore haben [245]. Das größte Problem bei solchen Studien sind allerdings die analysierten Fallzahlen, da monoallelische Varianten eine geringe Penetranz aufweisen. Des Weiteren wird zur Risikobewertung der Tumorentstehung von biallelischen *MUTYH*-Mutationsträgern bislang nur das *in vitro* Risiko von Patientenvarianten mit dem klinischen Phänotyp korreliert. Es gibt bisher jedoch keine Mausmodelle, an denen die Risiken für eine Tumorentwicklung anhand des *knock-ins* von *MUTYH*-Varianten getestet wurden. An dieser Stelle könnte das bereits unter 4.1.2 erwähnte CRISPR/Cas9-System zum Einsatz kommen. So bestünde in Zukunft die Möglichkeit, *MUTYH*-Varianten spezifisch in das Mausgenom einzufügen, um Voraussagen über das generelle Tumorrisiko (auch außerhalb des Darms) zu treffen. Somit könnten die Risiken für Patienten mit sowohl mono- als auch biallelischen *MUTYH*-Mutationen besser prognostiziert werden, wodurch die Vorsorge entsprechend angepasst werden könnte.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835): 366–374. doi: 10.1038/35077232
2. Lindahl T, Wood RD (1999) Quality control by DNA repair. *Science* 286(5446): 1897–1905
3. Freidberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis, Revised*. American Society Microbiology
4. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E et al. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17(18): 5497–5508. doi: 10.1093/emboj/17.18.5497
5. Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 335–346. doi: 10.1038/nrm1907
6. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW et al. (2010) Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138(6): 2044–2058. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.054
7. Jiricny J (1998) Replication errors: Challenging the genome. *EMBO J* 17(22): 6427–6436. doi: 10.1093/emboj/17.22.6427
8. David SS, Williams SD (1998) Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair. *Chem Rev* 98(3): 1221–1262
9. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17): 7915–7922
10. Bernstein C, R. A, Nfonam V et al. (2013) DNA Damage, DNA Repair and Cancer. In: Chen C (ed) *New research directions in DNA repair*. InTech, Croatia
11. Fromme JC, Banerjee A, Verdine GL (2004) DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol* 14(1): 43–49. doi: 10.1016/j.sbi.2004.01.003
12. Wiederhold L, Leppard JB, Kedar P et al. (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell* 15(2): 209–220. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.003
13. Thompson LH, Brookman KW, Jones NJ et al. (1990) Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* 10(12): 6160–6171
14. Caldecott KW (2003) XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* 2(9): 955–969. doi: 10.1016/S1568-7864(03)00118-6
15. Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A et al. (2001) XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* 104(1): 107–117

16. Stucki M, Pascucci B, Parlanti E et al. (1998) Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 17(7): 835–843. doi: 10.1038/sj.onc.1202001
17. van Loon B, Hubscher U (2009) An 8-oxo-guanine repair pathway coordinated by MUTYH glycosylase and DNA polymerase lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(43): 18201–18206. doi: 10.1073/pnas.0907280106
18. Dianov GL, Sleeth KM, Dianova II et al. (2003) Repair of abasic sites in DNA. *Mutat Res* 531(1-2): 157–163
19. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E et al. (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37(11): 3575–3580. doi: 10.1021/bi972999h
20. Kuo CF, McRee DE, Fisher CL et al. (1992) Atomic structure of the DNA repair 4Fe-4S enzyme endonuclease III. *Science* 258(5081): 434–440
21. Wyatt MD, Allan JM, Lau AY et al. (1999) 3-methyladenine DNA glycosylases: Structure, function, and biological importance. *Bioessays* 21(8): 668–676. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199908)21:8<668:AID-BIES6>3.0.CO;2-D
22. Mol CD, Parikh SS, Putnam CD et al. (1999) DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28: 101–128. doi: 10.1146/annurev.biophys.28.1.101
23. Bruner SD, Norman DP, Verdine GL (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403(6772): 859–866. doi: 10.1038/35002510
24. Thayer MM, Ahern H, Xing D et al. (1995) Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J* 14(16): 4108–4120
25. Nash HM, Bruner SD, Scharer OD et al. (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 6(8): 968–980
26. Jacobs AL, Schar P (2012) DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. *Chromosoma* 121(1): 1–20. doi: 10.1007/s00412-011-0347-4
27. Neeley WL, Essigmann JM (2006) Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* 19(4): 491–505. doi: 10.1021/tx0600043
28. Burrows CJ, Muller JG (1998) Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem Rev* 98(3): 1109–1152
29. Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 239–267. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851
30. David SS, O'Shea VL, Kundu S (2007) Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447(7147): 941–950. doi: 10.1038/nature05978

31. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349(6308): 431–434. doi: 10.1038/349431a0
32. Michaels ML, Miller JH (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol* 174(20): 6321–6325
33. Barnes DE, Lindahl T (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38: 445–476. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.092448
34. Lee S, Verdine GL (2009) Atomic substitution reveals the structural basis for substrate adenine recognition and removal by adenine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(44): 18497–18502. doi: 10.1073/pnas.0902908106
35. Brinkmeyer MK (2012) Mismatch recognition and base excision repair of natural and unnatural amino acid variations of the adenine DNA glycosylases, mutY and MUTYH. University of California, Davis, Davis, Calif.
36. Nghiem Y, Cabrera M, Cupples CG et al. (1988) The mutY gene: a mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C---T.A transversions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(8): 2709–2713
37. Cabrera M, Nghiem Y, Miller JH (1988) mutM, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C---T.A transversions. *J Bacteriol* 170(11): 5405–5407
38. Michaels ML, Cruz C, Grollman AP et al. (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 7022–7025
39. Au KG, Cabrera M, Miller JH et al. (1988) *Escherichia coli* mutY gene product is required for specific A-G---C.G mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23): 9163–9166
40. Lu AL, Tsai-Wu JJ, Cillo J (1995) DNA determinants and substrate specificities of *Escherichia coli* MutY. *J Biol Chem* 270(40): 23582–23588
41. Bulychev NV, Varaprasad CV, Dorman G et al. (1996) Substrate specificity of *Escherichia coli* MutY protein. *Biochemistry* 35(40): 13147–13156. doi: 10.1021/bi960694h
42. Gogos A, Cillo J, Clarke ND et al. (1996) Specific recognition of A/G and A/7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) mismatches by *Escherichia coli* MutY: Removal of the C-terminal domain preferentially affects A/8-oxoG recognition. *Biochemistry* 35(51): 16665–16671. doi: 10.1021/bi960843w
43. Out AA, Tops CMJ, Nielsen M et al. (2010) Leiden Open Variation Database of the MUTYH gene. *Hum Mutat* 31(11): 1205–1215. doi: 10.1002/humu.21343

44. Slupska MM, Baikarov C, Luther WM et al. (1996) Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 178(13): 3885–3892
45. Makalowska I (2008) Comparative analysis of an unusual gene arrangement in the human chromosome 1. *Gene* 423(2): 172–179. doi: 10.1016/j.gene.2008.06.030
46. Lu AL, Fawcett WP (1998) Characterization of the recombinant MutY homolog, an adenine DNA glycosylase, from yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 273(39): 25098–25105
47. Yang H, Clendenin WM, Wong D et al. (2001) Enhanced activity of adenine-DNA glycosylase (Myh) by apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1) in mammalian base excision repair of an A/GO mismatch. *Nucleic Acids Res* 29(3): 743–752
48. Slupska MM, Luther WM, Chiang JH et al. (1999) Functional expression of hMYH, a human homolog of the *Escherichia coli* MutY protein. *J Bacteriol* 181(19): 6210–6213
49. Fortini P, Parlanti E, Sidorkina OM et al. (1999) The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 274(21): 15230–15236
50. Michaels ML, Tchou J, Grollman AP et al. (1992) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* 31(45): 10964–10968
51. Parker A, Gu Y, Mahoney W et al. (2001) Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem* 276(8): 5547–5555. doi: 10.1074/jbc.M008463200
52. Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T et al. (1993) Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem* 268(31): 23524–23530
53. Guan Y, Manuel RC, Arvai AS et al. (1998) MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily. *Nat Struct Biol* 5(12): 1058–1064. doi: 10.1038/4168
54. Volk DE, House PG, Thiviyanathan V et al. (2000) Structural similarities between MutT and the C-terminal domain of MutY. *Biochemistry* 39(25): 7331–7336
55. Fromme JC, Banerjee A, Huang SJ et al. (2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature* 427(6975): 652–656. doi: 10.1038/nature02306
56. Michaels ML, Pham L, Nghiem Y et al. (1990) MutY, an adenine glycosylase active on G-A mispairs, has homology to endonuclease III. *Nucleic Acids Res* 18(13): 3841–3845
57. Lukianova OA, David SS (2005) A role for iron-sulfur clusters in DNA repair. *Curr Opin Chem Biol* 9(2): 145–151. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.02.006

58. Kuo CF, McRee DE, Cunningham RP et al. (1992) Crystallization and crystallographic characterization of the iron-sulfur-containing DNA-repair enzyme endonuclease III from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 227(1): 347–351
59. Porello SL, Cannon MJ, David SS (1998) A substrate recognition role for the 4Fe-4S<sub>2</sub><sup>+</sup> cluster of the DNA repair glycosylase MutY. *Biochemistry* 37(18): 6465–6475. doi: 10.1021/bi972433t
60. Chepanoske CL, Golinelli MP, Williams SD et al. (2000) Positively charged residues within the iron-sulfur cluster loop of *E. coli* MutY participate in damage recognition and removal. *Arch Biochem Biophys* 380(1): 11–19. doi: 10.1006/abbi.2000.1890
61. Noll DM, Gogos A, Granek JA et al. (1999) The C-terminal domain of the adenine-DNA glycosylase MutY confers specificity for 8-oxoguanine:adenine mispairs and may have evolved from MutT, an 8-oxo-dGTPase. *Biochemistry* 38(20): 6374–6379. doi: 10.1021/bi990335x
62. Luncsford PJ, Chang D-Y, Shi G et al. (2010) A structural hinge in eukaryotic MutY homologues mediates catalytic activity and Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex interactions. *J Mol Biol* 403(3): 351–370. doi: 10.1016/j.jmb.2010.08.045
63. Brinkmeyer MK, David SS (2015) Distinct functional consequences of MUTYH variants associated with colorectal cancer: Damaged DNA affinity, glycosylase activity and interaction with PCNA and Hus1. *DNA Repair* 34: 39–51. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.08.001
64. Wiederholt CJ, Delaney MO, Pope MA et al. (2003) Repair of DNA containing Fapy.dG and its beta-C-nucleoside analogue by formamidopyrimidine DNA glycosylase and MutY. *Biochemistry* 42(32): 9755–9760. doi: 10.1021/bi034844h
65. Tsai-Wu JJ, Liu HF, Lu AL (1992) *Escherichia coli* MutY protein has both N-glycosylase and apurinic/aprimidinic endonuclease activities on A.C and A.G mispairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(18): 8779–8783
66. Manlove AH, McKibbin PL, Doyle EL et al. (2017) Structure Activity Relationships Reveal Key Features of 8-Oxoguanine:Adenine Mismatch Detection by the MutY DNA Glycosylase. *ACS Chem Biol*. doi: 10.1021/acscchembio.7b00389
67. Chmiel NH, Golinelli MP, Francis AW et al. (2001) Efficient recognition of substrates and substrate analogs by the adenine glycosylase MutY requires the C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 29(2): 553–564
68. Francis AW, David SS (2003) *Escherichia coli* MutY and Fpg utilize a processive mechanism for target location. *Biochemistry* 42(3): 801–810. doi: 10.1021/bi026375
69. Livingston AL, O'Shea VL, Kim T et al. (2008) Unnatural substrates reveal the importance of 8-oxoguanine for in vivo mismatch repair by MutY. *Nat Chem Biol* 4(1): 51–58. doi: 10.1038/nchembio.2007.40

70. Porello SL, Williams SD, Kuhn H et al. (1996) Specific Recognition of Substrate Analogs by the DNA Mismatch Repair Enzyme MutY. *J Am Chem Soc* 118(44): 10684–10692. doi: 10.1021/ja9602206
71. Porello SL, Leyes AE, David SS (1998) Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates. *Biochemistry* 37(42): 14756–14764. doi: 10.1021/bi981594
72. Mol CD, Izumi T, Mitra S et al. (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination corrected. *Nature* 403(6768): 451–456. doi: 10.1038/35000249
73. Wilson SH, Kunkel TA (2000) Passing the baton in base excision repair. *Nat Struct Biol* 7(3): 176–178. doi: 10.1038/73260
74. Prasad R, Shock DD, Beard WA et al. (2010) Substrate channeling in mammalian base excision repair pathways: passing the baton. *J Biol Chem* 285(52): 40479–40488. doi: 10.1074/jbc.M110.155267
75. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J et al. (2002) Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30(2): 227–232. doi: 10.1038/ng828
76. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF (2001) The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10(7): 721–733
77. Chmiel NH, Livingston AL, David SS (2003) Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: Complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes. *J Mol Biol* 327(2): 431–443
78. Sampson JR, Jones S, Dolwani S et al. (2005) MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4): 679–683. doi: 10.1042/BST0330679
79. International Agency for Research on Cancer (2012) Colorectal Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Accessed 16 May 2017
80. International Agency for Research on Cancer (2012) Fact Sheets by Population: Germany. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). Accessed 16 May 2017
81. Zentrum für Krebsregisterdaten (2012) Darmkrebs. [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html). Accessed 16 May 2017
82. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK et al. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 343(2): 78–85. doi: 10.1056/NEJM200007133430201

83. Grady WM (2003) Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 124(6): 1574–1594
84. Jo W-S, Chung DC (2005) Genetics of hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol* 32(1): 11–23. doi: 10.1053/j.seminoncol.2004.09.034
85. Valle L (2016) Recent Discoveries in the Genetics of Familial Colorectal Cancer and Polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1016/j.cgh.2016.09.148
86. Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM (2015) Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. *Surg Clin North Am* 95(5): 1067–1080. doi: 10.1016/j.suc.2015.05.004
87. Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S (2003) Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2(1): 43–55
88. Knudson AG (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 10914–10921
89. Spirio L, Olschwang S, Groden J et al. (1993) Alleles of the APC gene: An attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75(5): 951–957
90. Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H et al. (2006) MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 119(4): 807–814. doi: 10.1002/ijc.21905
91. Nielsen M, Hes FJ, Nagengast FM et al. (2007) Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clin Genet* 71(5): 427–433. doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00766.x
92. Sampson JR, Dolwani S, Jones S et al. (2003) Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 362(9377): 39–41. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13805-6
93. Rau TT, Dawson H, Hartmann A et al. (2017) Hereditäres Dickdarmkarzinom. *Pathologe* 38(3): 156–163. doi: 10.1007/s00292-017-0294-9
94. Jones N, Vogt S, Nielsen M et al. (2009) Increased colorectal cancer incidence in obligate carriers of heterozygous mutations in MUTYH. *Gastroenterology* 137(2): 489-94, 494.e1; quiz 725-6. doi: 10.1053/j.gastro.2009.04.047
95. Plotz G, Casper M, Raedle J et al. (2012) MUTYH gene expression and alternative splicing in controls and polyposis patients. *Hum Mutat* 33(7): 1067–1074. doi: 10.1002/humu.22059
96. Fleischmann C, Peto J, Cheadle J et al. (2004) Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer. *Int J Cancer* 109(4): 554–558. doi: 10.1002/ijc.20020

- 
97. Lubbe SJ, Di Bernardo MC, Chandler IP et al. (2009) Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTYH mutation. *J Clin Oncol* 27(24): 3975–3980. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6853
  98. Vogt S, Jones N, Christian D et al. (2009) Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 137(6): 1976-85.e1-10. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.052
  99. Wasielewski M, Out AA, Vermeulen J et al. (2010) Increased MUTYH mutation frequency among Dutch families with breast cancer and colorectal cancer. *Breast Cancer Res Treat* 124(3): 635–641. doi: 10.1007/s10549-010-0801-7
  100. Cleary SP, Cotterchio M, Jenkins MA et al. (2009) Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: A multisite case-control study. *Gastroenterology* 136(4): 1251–1260. doi: 10.1053/j.gastro.2008.12.050
  101. Lipton L, Halford SE, Johnson V et al. (2003) Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res* 63(22): 7595–7599
  102. Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y et al. (2000) Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res* 28(6): 1355–1364
  103. Takao M, Aburatani H, Kobayashi K et al. (1998) Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 26(12): 2917–2922
  104. Takao M, Zhang QM, Yonei S et al. (1999) Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 27(18): 3638–3644
  105. Oka S, Nakabeppu Y (2011) DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis. *Cancer Sci* 102(4): 677–682. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01869.x
  106. Desch CE, Benson AB3, Somerfield MR et al. (2005) Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol* 23(33): 8512–8519. doi: 10.1200/JCO.2005.04.0063
  107. Plotz G (2013) Antrag auf Gewährung einer Forschungsförderung durch die Deutsche Krebshilfe: Ermittlung der onkogenen und funktionellen Rolle humaner genetischer Varianten von MUTYH durch Analyse von Expression, Spleißung und Proteinfunktion. Statistische Datenauswertung der Leiden Open Variation Database von MUTYH
  108. Graham FL, Smiley J, Russell WC et al. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59–74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59
  109. DuBridges RB, Tang P, Hsia HC et al. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7(1): 379–387

110. Trojan J, Zeuzem S, Randolph A et al. (2002) Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* 122(1): 211–219
111. Scherer WF (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: iv. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine* 97(5): 695–710. doi: 10.1084/jem.97.5.695
112. Jacob S, Aguado M, Fallik D et al. (2001) The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 61(17): 6555–6562
113. Koi M, Umar A, Chauhan DP et al. (1994) Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 54(16): 4308–4312
114. Ali M, Kim H, Cleary S et al. (2008) Characterization of mutant MUTYH proteins associated with familial colorectal cancer. *Gastroenterology* 135(2): 499–507. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.035
115. Oka S, Leon J, Tsuchimoto D et al. (2014) MUTYH, an adenine DNA glycosylase, mediates p53 tumor suppression via PARP-dependent cell death. *Oncogenesis* 3: e121. doi: 10.1038/oncsis.2014.35
116. Vogelstein B, Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* 70(4): 523–526
117. Petersohn D, Thiel G (1996) Role of zinc-finger proteins Sp1 and zif268/egr-1 in transcriptional regulation of the human synaptobrevin II gene. *Eur J Biochem* 239(3): 827–834
118. Peterlongo P, Mitra N, Sanchez de Abajo A et al. (2006) Increased frequency of disease-causing MYH mutations in colon cancer families. *Carcinogenesis* 27(11): 2243–2249. doi: 10.1093/carcin/bgl093
119. Gómez-Fernández N, Castellví-Bel S, Fernández-Rozadilla C et al. (2009) Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet* 10: 57. doi: 10.1186/1471-2350-10-57
120. Wilson VL, Jones PA, Momparler RL (1983) Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Res* 43(8): 3493–3496
121. Tao H, Shinmura K, Suzuki M et al. (2008) Association between genetic polymorphisms of the base excision repair gene MUTYH and increased colorectal cancer risk in a Japanese population. *Cancer Sci* 99(2): 355–360. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00694.x

- 
122. Zhou X-L, Djureinovic T, Werelius B et al. (2005) Germline mutations in the MYH gene in Swedish familial and sporadic colorectal cancer. *Genet Test* 9(2): 147–151. doi: 10.1089/gte.2005.9.147
123. Frommer M, McDonald LE, Millar DS et al. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(5): 1827–1831
124. Shapiro R, Braverman B, Louis JB et al. (1973) Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem* 248(11): 4060–4064
125. Tollefsbol T (ed) (2010) *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*, 1st edn. Academic Press
126. Holland PM, Abramson RD, Watson R et al. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16): 7276–7280
127. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463–5467
128. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
129. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685
130. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1): 23–28
131. Klenow H, Henningsen I (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65(1): 168–175
132. Tomizawa T, Kigawa T, Koshiba S et al. (2005) Solution structure of the NUDIX domain from human A/G-specific adenine DNA glycosylase alpha-3 splice isoform
133. O'Shea VL, Horvath MP, David SS (2010) MutY adenine glycosylase bound to a transition state analog (1N) paired with dG in duplexed DNA
134. Kulis M, Esteller M (2010) DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 70: 27–56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2
135. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ et al. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434(7031): 338–345. doi: 10.1038/nature03441
136. Graw J (2010) *Genetik*, 5., vollst. überarb. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin u.a.
137. Meek DW (2009) Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer* 9(10): 714–723. doi: 10.1038/nrc2716
-

138. López I, Tournillon A-S, Nylander K et al. (2015) p53-mediated control of gene expression via mRNA translation during Endoplasmic Reticulum stress. *Cell Cycle* 14(21): 3373–3378. doi: 10.1080/15384101.2015.1090066
139. Hinrichsen I, Brieger A, Trojan J et al. (2013) Expression defect size among unclassified MLH1 variants determines pathogenicity in Lynch syndrome diagnosis. *Clin Cancer Res* 19(9): 2432–2441. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3299
140. Ng PC, Henikoff S (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11(5): 863–874. doi: 10.1101/gr.176601
141. Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3812–3814
142. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013) Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 7: Unit7.20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76
143. Aretz S, Tricarico R, Papi L et al. (2014) MUTYH-associated polyposis (MAP): evidence for the origin of the common European mutations p.Tyr179Cys and p.Gly396Asp by founder events. *Eur J Hum Genet* 22(7): 923–929. doi: 10.1038/ejhg.2012.309
144. Hamilton JP (2011) Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis* 29(2): 130–135. doi: 10.1159/000323874
145. Strathdee G, Brown R (2002) Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med* 4(4): 1–17. doi: 10.1017/S1462399402004222
146. Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13(7): 484–492. doi: 10.1038/nrg3230
147. Sproul D, Meehan RR (2013) Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. *Brief Funct Genomics* 12(3): 174–190. doi: 10.1093/bfgp/els063
148. Ballestar E, Esteller M (2005) The epigenetic breakdown of cancer cells: from DNA methylation to histone modifications. *Prog Mol Subcell Biol* 38: 169–181
149. Hatziapostolou M, Iliopoulos D (2011) Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cell Mol Life Sci* 68(10): 1681–1702. doi: 10.1007/s00018-010-0624-z
150. Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21(2): 163–167. doi: 10.1038/5947
151. Sliwinska A, Sitarek P, Toma M et al. (2017) Decreased expression level of BER genes in Alzheimer's disease patients is not derivative of their DNA methylation status. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.07.010
152. Poonian MS, McComas WW, Nussbaum AL (1977) Chemical synthesis of two deoxyribododecanucleotides for the attachment of restriction termini to an artificial minigene. *Gene* 1(5-6): 357–372

- 
153. Tournier I, Vezain M, Martins A et al. (2008) A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum Mutat* 29(12): 1412–1424. doi: 10.1002/humu.20796
154. Gaildrat P, Killian A, Martins A et al. (2010) Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods Mol Biol* 653: 249–257. doi: 10.1007/978-1-60761-759-4\_15
155. Soukarieh O, Gaildrat P, Hamieh M et al. (2016) Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools. *PLoS Genet* 12(1): e1005756. doi: 10.1371/journal.pgen.1005756
156. Harvey SE, Cheng C (2016) Methods for Characterization of Alternative RNA Splicing. *Methods Mol Biol* 1402: 229–241. doi: 10.1007/978-1-4939-3378-5\_18
157. van der Klift HM, Jansen AML, van der Steenstraten N et al. (2015) Splicing analysis for exonic and intronic mismatch repair gene variants associated with Lynch syndrome confirms high concordance between minigene assays and patient RNA analyses. *Mol Genet Genomic Med* 3(4): 327–345. doi: 10.1002/mgg3.145
158. Pearson H (2006) Silent mutations speak up. *news@nature* 102: 6368. doi: 10.1038/news061218-12
159. Le Cong, Ran FA, Cox D et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121): 819–823. doi: 10.1126/science.1231143
160. Mali P, Yang L, Esvelt KM et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121): 823–826. doi: 10.1126/science.1232033
161. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
162. Liang X, Potter J, Kumar S et al. (2015) Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol* 208: 44–53. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024
163. Lin JM, Collins PJ, Trinklein ND et al. (2007) Transcription factor binding and modified histones in human bidirectional promoters. *Genome Res* 17(6): 818–827. doi: 10.1101/gr.5623407
164. Michaud J, Praz V, James Faresse N et al. (2013) HCFC1 is a common component of active human CpG-island promoters and coincides with ZNF143, THAP11, YY1, and GABP transcription factor occupancy. *Genome Res* 23(6): 907–916. doi: 10.1101/gr.150078.112
165. Ngondo-Mbongo RP, Myslinski E, Aster JC et al. (2013) Modulation of gene expression via overlapping binding sites exerted by ZNF143, Notch1 and THAP11. *Nucleic Acids Res* 41(7): 4000–4014. doi: 10.1093/nar/gkt088
-

166. Seo Y-K, Chong HK, Infante AM et al. (2009) Genome-wide analysis of SREBP-1 binding in mouse liver chromatin reveals a preference for promoter proximal binding to a new motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13765–13769. doi: 10.1073/pnas.0904246106
167. Trung NT, Kremmer E, Mittler G (2016) Biochemical and cellular characterization of transcription factors binding to the hyperconserved core promoter-associated M4 motif. *BMC Genomics* 17: 693. doi: 10.1186/s12864-016-3033-3
168. Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H et al. (1998) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 12(1): 34–44
169. Smale ST, Kadonaga JT (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72: 449–479. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520
170. Dynan WS, Tjian R (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35(1): 79–87
171. Freiman RN, Tjian R (2002) Neurodegeneration. A glutamine-rich trail leads to transcription factors. *Science* 296(5576): 2149–2150. doi: 10.1126/science.1073845
172. Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP et al. (1989) Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* 59(5): 827–836
173. Courey AJ, Tjian R (1988) Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55(5): 887–898
174. Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J et al. (1988) Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 242(4885): 1566–1570
175. Kingsley C, Winoto A (1992) Cloning of GT box-binding proteins: A novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12(10): 4251–4261. doi: 10.1128/MCB.12.10.4251
176. Wierstra I (2008) Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* 372(1): 1–13. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.074
177. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR et al. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51(6): 1079–1090
178. Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP et al. (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234(4772): 47–52
179. Kadonaga JT, Jones KA, Tjian R (1986) Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *Trends in Biochemical Sciences* 11(1): 20–23. doi: 10.1016/0968-0004(86)90226-4

- 
180. Letovsky J, Dynan WS (1989) Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Res* 17(7): 2639–2653
181. Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J (2001) Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188(2): 143–160. doi: 10.1002/jcp.1111
182. Philipson S, Suske G (1999) A tale of three fingers: The family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 27(15): 2991–3000
183. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381): 15–16. doi: 10.1038/358015a0
184. Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4): 275–283. doi: 10.1038/nrm2147
185. Harris SL, Levine AJ (2005) The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24(17): 2899–2908. doi: 10.1038/sj.onc.1208615
186. Horn HF, Vousden KH (2007) Coping with stress: Multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26(9): 1306–1316. doi: 10.1038/sj.onc.1210263
187. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL et al. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356(6366): 215–221. doi: 10.1038/356215a0
188. Harvey M, Vogel H, Morris D et al. (1995) A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nat Genet* 9(3): 305–311. doi: 10.1038/ng0395-305
189. Lavigne A, Maltby V, Mock D et al. (1989) High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 9(9): 3982–3991
190. Sherr CJ (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 731–737. doi: 10.1038/35096061
191. Danovi D, Meulmeester E, Pasini D et al. (2004) Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol* 24(13): 5835–5843. doi: 10.1128/MCB.24.13.5835-5843.2004
192. Hainaut P, Hollstein M (2000) p53 and human cancer: The first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77: 81–137
193. Oka S, Ohno M, Tsuchimoto D et al. (2008) Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J* 27(2): 421–432. doi: 10.1038/sj.emboj.7601975
194. Chatterjee A, Mambo E, Osada M et al. (2006) The effect of p53-RNAi and p53 knockout on human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOgg1) activity. *FASEB J* 20(1): 112–114. doi: 10.1096/fj.04-3423fje
-

195. Belle I de, Wu J-X, Sperandio S et al. (2003) In vivo cloning and characterization of a new growth suppressor protein TOE1 as a direct target gene of Egr1. *J Biol Chem* 278(16): 14306–14312. doi: 10.1074/jbc.M210502200
196. Sperandio S, Tardito S, Surzycki A et al. (2009) TOE1 interacts with p53 to modulate its transactivation potential. *FEBS Lett* 583(13): 2165–2170. doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.004
197. Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K et al. (2006) Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem* 387(4): 373–379. doi: 10.1515/BC.2006.050
198. Collins AR (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21(3): 238–246. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199903)21:3<238:AID-BIES8>3.0.CO;2-3
199. Isogawa A (2004) Functional cooperation of Ogg1 and Mutyh in preventing G: C--T: a transversions in mice. *Fukuoka Igaku Zasshi* 95(1): 17–30
200. Russo MT, Luca G de, Degan P et al. (2004) Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases. *Cancer Res* 64(13): 4411–4414. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0355
201. Isoda T, Nakatsu Y, Yamauchi K et al. (2014) Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci* 10(8): 940–947. doi: 10.7150/ijbs.9241
202. Hwang B-J, Shi G, Lu A-L (2014) Mammalian MutY homolog (MYH or MUTYH) protects cells from oxidative DNA damage. *DNA Repair* 13: 10–21. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.10.011
203. Huch R, Jürgens KD, Engelhardt S (eds) (2011) *Mensch, Körper, Krankheit: Anatomie, Physiologie, Krankheitsbilder; Lehrbuch und Atlas für die Berufe im Gesundheitswesen*, 6. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München
204. Mazzei F, Viel A, Bignami M (2013) Role of MUTYH in human cancer. *Mutat Res* 743-744: 33–43. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.03.003
205. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E et al. (2003) 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res* 531(1-2): 127–139
206. Kim KC, Lee IK, Kang KA et al. (2013) 7,8-Dihydroxyflavone suppresses oxidative stress-induced base modification in DNA via induction of the repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycosylase-1. *Biomed Res Int* 2013: 863720. doi: 10.1155/2013/863720
207. Darmkrebs - Zahlen und Fakten. <https://www.dkfz.de/de/presse/darmkrebs-zahlen-fakten.html>. Accessed 12 Sep 2017
208. Ricci MT, Miccoli S, Turchetti D et al. (2017) Type and frequency of MUTYH variants in Italian patients with suspected MAP: A retrospective multicenter study. *J Hum Genet* 62(2): 309–315. doi: 10.1038/jhg.2016.132

- 
209. Giráldez MD, Balaguer F, Bujanda L et al. (2010) MSH6 and MUTYH deficiency is a frequent event in early-onset colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 16(22): 5402–5413. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1491
210. Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB et al. (2008) Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum Mutat* 29(11): 1265–1272. doi: 10.1002/humu.20897
211. Nielsen M, Joerink-van de Beld MC, Jones N et al. (2009) Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 136(2): 471–476. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.056
212. Al-Tassan N, Eisen T, Maynard J et al. (2004) Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to the risk of lung carcinoma. *Hum Genet* 114(2): 207–210. doi: 10.1007/s00439-003-1033-2
213. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N et al. (2004) Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 96(21): 1631–1634. doi: 10.1093/jnci/djh288
214. Shin E-J, Chappell E, Pethe V et al. (2007) MYH mutations are rare in prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 133(6): 373–378. doi: 10.1007/s00432-006-0181-x
215. Komine K, Shimodaira H, Takao M et al. (2015) Functional Complementation Assay for 47 MUTYH Variants in a MutY-Disrupted *Escherichia coli* Strain. *Hum Mutat* 36(7): 704–711. doi: 10.1002/humu.22794
216. Wang J, Ni H, Chen L et al. (2005) Preparation and analysis of cSNP chip on hepatocellular carcinoma-related genes. *HBPD INT* 4(3): 398–402
217. Di Gregorio C, Frattini M, Maffei S et al. (2006) Immunohistochemical expression of MYH protein can be used to identify patients with MYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 131(2): 439–444. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.049
218. Ponti G, Ponz de Leon M, Maffei S et al. (2005) Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin Genet* 68(5): 442–447. doi: 10.1111/j.1399-0004.2005.00519.x
219. Goto M, Shinmura K, Nakabeppu Y et al. (2010) Adenine DNA glycosylase activity of 14 human MutY homolog (MUTYH) variant proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer. *Hum Mutat* 31(11): E1861-74. doi: 10.1002/humu.21363
220. D'Agostino VG, Minoprio A, Torreri P et al. (2010) Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis. *DNA Repair* 9(6): 700–707. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.03.008
221. Molatore S, Russo MT, D'Agostino VG et al. (2010) MUTYH mutations associated with familial adenomatous polyposis: functional characterization by a mammalian cell-based assay. *Hum Mutat* 31(2): 159–166. doi: 10.1002/humu.21158
-

222. Cattaneo F, Molatore S, Mihalatos M et al. (2007) Heterogeneous molecular mechanisms underlie attenuated familial adenomatous polyposis. *Genet Med* 9(12): 836–841. doi: 10.1097/GIM.0b013e31815bf940
223. Olschwang S, Blanché H, Moncuit C de et al. (2007) Similar colorectal cancer risk in patients with monoallelic and biallelic mutations in the MYH gene identified in a population with adenomatous polyposis. *Genet Test* 11(3): 315–320. doi: 10.1089/gte.2007.9995
224. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M et al. (2003) Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 348(9): 791–799. doi: 10.1056/NEJMoa025283
225. Wooden SH, Bassett HM, Wood TG et al. (2004) Identification of critical residues required for the mutation avoidance function of human MutY (hMYH) and implications in colorectal cancer. *Cancer Lett* 205(1): 89–95. doi: 10.1016/j.canlet.2003.10.006
226. Kundu S, Brinkmeyer MK, Livingston AL et al. (2009) Adenine removal activity and bacterial complementation with the human MutY homologue (MUTYH) and Y165C, G382D, P391L and Q324R variants associated with colorectal cancer. *DNA Repair* 8(12): 1400–1410. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.09.009
227. Ushijima Y, Tominaga Y, Miura T et al. (2005) A functional analysis of the DNA glycosylase activity of mouse MUTYH protein excising 2-hydroxyadenine opposite guanine in DNA. *Nucleic Acids Res* 33(2): 672–682. doi: 10.1093/nar/gki214
228. Russell AM, Zhang J, Luz J et al. (2006) Prevalence of MYH germline mutations in Swiss APC mutation-negative polyposis patients. *Int J Cancer* 118(8): 1937–1940. doi: 10.1002/ijc.21470
229. Lejeune S, Guillemot F, Triboulet J-P et al. (2006) Low frequency of AXIN2 mutations and high frequency of MUTYH mutations in patients with multiple polyposis. *Hum Mutat* 27(10): 1064. doi: 10.1002/humu.9460
230. van Puijenbroek M, Nielsen M, Tops CMJ et al. (2008) Identification of patients with (atypical) MUTYH-associated polyposis by KRAS2 c.34G T prescreening followed by MUTYH hotspot analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin Cancer Res* 14(1): 139–142. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1705
231. Croitoru ME, Cleary SP, Berk T et al. (2007) Germline MYH mutations in a clinic-based series of Canadian multiple colorectal adenoma patients. *J Surg Oncol* 95(6): 499–506. doi: 10.1002/jso.20724
232. Niessen RC, Sijmons RH, Ou J et al. (2006) MUTYH and the mismatch repair system: partners in crime? *Hum Genet* 119(1-2): 206–211. doi: 10.1007/s00439-005-0118-5
233. Kanter-Smoler G, Björk J, Fritzell K et al. (2006) Novel findings in Swedish patients with MYH-associated polyposis: mutation detection and clinical characterization. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(4): 499–506. doi: 10.1016/j.cgh.2006.01.005

- 
234. Yanaru-Fujisawa R, Matsumoto T, Ushijima Y et al. (2008) Genomic and functional analyses of MUTYH in Japanese patients with adenomatous polyposis. *Clin Genet* 73(6): 545–553. doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.00998.x
235. Goto M, Shinmura K, Yamada H et al. (2008) OGG1, MYH and MTH1 gene variants identified in gastric cancer patients exhibiting both 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine accumulation and low inflammatory cell infiltration in their gastric mucosa. *J Genet* 87(2): 181–186
236. Kim D-W, Kim I-J, Kang H-C et al. (2007) Germline mutations of the MYH gene in Korean patients with multiple colorectal adenomas. *Int J Colorectal Dis* 22(10): 1173–1178. doi: 10.1007/s00384-007-0289-8
237. Aceto G, Curia MC, Veschi S et al. (2005) Mutations of APC and MYH in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum Mutat* 26(4): 394. doi: 10.1002/humu.9370
238. Kairupan CF, Meldrum CJ, Crooks R et al. (2005) Mutation analysis of the MYH gene in an Australian series of colorectal polyposis patients with or without germline APC mutations. *Int J Cancer* 116(1): 73–77. doi: 10.1002/ijc.20983
239. Küry S, Buecher B, Robiou-du-Pont S et al. (2007) The thorough screening of the MUTYH gene in a large French cohort of sporadic colorectal cancers. *Genet Test* 11(4): 373–379. doi: 10.1089/gte.2007.0029
240. Kambara T, Whitehall VLJ, Spring KJ et al. (2004) Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 40(1): 1–9. doi: 10.1002/gcc.20011
241. Görgens H, Krüger S, Kuhlisch E et al. (2006) Microsatellite stable colorectal cancers in clinically suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients without vertical transmission of disease are unlikely to be caused by biallelic germline mutations in MYH. *J Mol Diagn* 8(2): 178–182. doi: 10.2353/jmoldx.2006.050119
242. Gu Y, Lu AL (2001) Differential DNA recognition and glycosylase activity of the native human MutY homolog (hMYH) and recombinant hMYH expressed in bacteria. *Nucleic Acids Res* 29(12): 2666–2674
243. Protein Expression Systems. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/protein-expression-systems.html>. Accessed 14 Sep 2017
244. Win AK, Cleary SP, Dowty JG et al. (2011) Risks of cancers for carriers of monoallelic MUTYH mutation with a family history of colorectal cancer. *Hered Cancer Clin Pract* 9(Suppl 1): P40. doi: 10.1186/1897-4287-9-S1-P40
245. Win AK, Hopper JL, Jenkins MA (2011) Association between monoallelic MUTYH mutation and colorectal cancer risk: a meta-regression analysis. *Fam Cancer* 10(1): 1–9. doi: 10.1007/s10689-010-9399-5

246. Webb EL, Rudd MF, Houlston RS (2006) Colorectal cancer risk in monoallelic carriers of MYH variants. *Am J Hum Genet* 79(4): 768-71; author reply 771-2. doi: 10.1086/507912
247. Theodoratou E, Campbell H, Tenesa A et al. (2010) A large-scale meta-analysis to refine colorectal cancer risk estimates associated with MUTYH variants. *Br J Cancer* 103(12): 1875–1884. doi: 10.1038/sj.bjc.6605966

---

## 6 ANHANG

### Firmenverzeichnis

Abcam	Cambridge, UK
Agilent Technologies	Waldbronn
Analytik Jena	Jena
Amersham	Braunschweig
AppliChem	Darmstadt
Applied Biosystems	Warrington, UK
Bandelin	Berlin
BD Biosciences	Heidelberg
Beckmann Coulter	Krefeld
Bio Rad	München
C.B.S.	Darmstadt
Eurofins (MWG Operon)	Ebersberg
Fuji	Tokio, Japan
GE Healthcare	Uppsala, Schweden
Genomed	Löhne
Gibco	Dreieich
Greiner	Frickenhausen
Invitrogen	Karlsruhe
Lonza	Köln
Millipore	Schwalbach
Minerva Biolabs	Berlin
New England Biolabs	Beverly, USA
Peqlab	Erlangen
Polysciences	Hirschberg an der Bergstraße
Promega	Mannheim
Qiagen	Hilden
Roche	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, USA
Sarstedt	Nürmbrecht
Sigma-Aldrich	München
Thermo Fisher Scientific	Dreieich
Vilber Lourmat	Eberhardzell
Zeiss	Jena

### Sequenz des *MUTYH*-Promotor-Minigens

Die gesamte pcDNA3-Vektorsequenz ist nicht dargestellt. Diese ist unter <http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pcdna3.htm> (Stand: 08.12.2017) abzurufen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur der Teil der pcDNA3-Vektorsequenz angegeben, der den einklonierten Bereich von *MUTYH* umgibt.

```
gacggatcgggagatctcccgatcccctatggctgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatag
ttaagccagtatctgctccctgcttgtgtgttgaggctgctgagtagtgccgagcaaaatttaagc
tacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtaggcgttttgcgctgc
ttcgagcttggtagcagctcggatccacatccactacgggaacctggactactagctcctcccaga
tgttgtgcttttgctgacaccacctgggggttaggaggggtgatggatggtcatgcttaaggaaagagc
ccaggggaacagacaccaagctaggccacggtaggtggtaagggggtagtttccattggtagctt
tcccacaagccttgttaacccacgtgttctacacacaggccttgagtgagaaatgcctgaatttg
gggagaggaagcctgagctcttctactggcttgtatgagcctgggtaaataactcccacctcgcttc
acaatctgtagaggagaaagtggactagacgaccttggattctttttcccatgtcctgcaggaaac
atthttgtagggcttgaggatctcagctcccttaatatcccacagggatccatactactgttctcatgg
tgccccagcgcacaagcaacagctcccagtaagcccagagcctggcagtgccccacaccagagctc
ccaatacgtcctaccttcccttggatcacaacgctcaatccactccactgaactgaatcacaactatt
actactaaccgttatgagctccagactacatctcccgcctgctccatcagccccatgctcccacg
ctccaggcttttgagccggagccggtgtacaacggaactttagtctcctcgtggctagttcagg
cggaaggagcagtcctctgaagcttgaggagcctctagaactatgagcccgaggccttcccctctccc
agagcgcagaggccttgaaggctacctctgggaagccgctcaccgtcgggaagctgcccggagctgaaac
tgcgccatcgtcactgtcggcgccatgacaccgctcgtctcccgcctgagtcgtctgtgggtacgct
ggacttgccgtcctcctggcgcggttcaggcagtcggggatggggcgggggtctcgcctcgggtc
gccgatgggtcgaacttccgttcagacgtcccgggtccggcgccggggaaggcagcctggcgcgcgcta
attgctattggcctgtgctgcccgtcgcagcccgggtggaccgagccacgccccctggagtgcgc
cggaaagccgggcgcgctagagctcgcgggaggtaatctttctctcctgctctcggcgccgggaacgcg
ggcctccgtgttctgctgtcttcatcagcgtggcccgccggtagggggtagtgggggtgctgggtt
ggccttccagagaaggtgacgctgctgagctgagcttaagcagcccaggagtttagactaggaga
gggtcgtgtgggggaaagaaggcgttctgggcatcggtaaatcccagagaggatggagagctcag
gatctccagaaagtgaagagggcgggagtgggccatcggaggaggctgccaggggtgtaagagcgac
cgattggtagggaaagcttttgaataatccaatcaagtataatgtgaactgaattaaggctggcag
tatggatggcgaggaaggacaaattgtgaagcagctaggcggatagtcgacctagagggtgattga
atthgaaagaggttccataggccgggcggtggctcacgctgtaatcccagcactttgggaggccga
ggcgggcggattacctgaggtccggagttcaaaaccagcctggccaacatggtgaaaccccgctcteta
ctaaaagtacaaaaaaattagctgggtatgggtgcgggcgctgtaatcccactacttgggaggctga
ggcaggagaatcgcttgaacctgggaggcagaggttgcggtgagccgagatcacgccatthttgcactt
cagcctaggcaacaagagcgaactccgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaattcctattggagac
tagttgatctcagtgtcagccagccaagagtaaacccgtgagcatcttgagagtgcttgagagaa
gctggaccccatgtgaatggtggatgagagggagatagctatcacccttggaaaggcctcaaaatthgg
cctcatthgtgactgactgcttggctgggtctttttgtttcaggccatcatgaggaagccacgagcag
ccgtgggaagtggcacaggaagcaggcagccaggaaggaggcagaagcatgctaagaacaac
agtcaggccaagcctagcgttgtgatgtaaggaactaggttggccaaggctcattggccatga
aaggcagattcaggctgggaagggttggtagatcgtatcaagacattaagagacttactaaggggccag
gtgcggtggctcacacctgtaatcccagcactttgggaggccgaggcaggtggatcccttgagccag
gagthttgagaccagcttgggtaacatggcgaaatcccctctctatgctcgcgtgggtggtagcgtctg
tagtcccagctactcgggaagctgaggtgacaggatcgcttgagcctggaaggcagaagttgactga
```

gtcaagataatgcaactgcatttcagctctgggcaacagagccagactcctgtctcaaaacaaaagaga  
 ctactgaggggtgtaattctgactgtattgctgtgtgacattgggacaattgctctgaatggctgctt  
 tcttaccagtaaaatggagcagtagttcagcatttcctccctcatgtggctttcatgggaccaaataga  
 gtttatgagcctgaaagtgttttgtgaataggaaggtcctgcaccagtatacattctagctggctaaa  
 actattaggttttcattatggctcagagacaagccagtagtaccaccctgagaaaattaaggccagaa  
 acttagccacagctacacacaattacataactctggctctgactccagctcaaagcttaagggggtta  
 gttgggggaagccctaagtgggagcactgcccacaggctgctgtgtcccaagaccctgatgcacagc  
 ctgtgcagggatgattgctgagtgctcctggggccccagcagcctggccaggcagccggaagaggtgg  
 tattgcaggcctctgtctcctacatctattcagagacgtagctgaagtcacagccttccgaggg  
 agcctgctaagctggtacgaccaagagaaaacgggacctaccatggagaagacgggttaggcaggcgagg  
 agcagggacagtgggtgggaggcaggcaccagccccctccaccctaactcctcatctggggttgc  
 tgacaggcagaagatgagatggacctggacaggcgggcatatgctgtgtcagtlacatctcctgagagca  
 gggccactttgcctcgagcatgcatctagagggcctattctatagtgtcactaaatgctagagctc  
 gctgatcagcctcgactgtgccttcta

MUTYH-Sequenz

pcDNA3-Vektorsequenz

Exon 1 alpha

Exon 1 gamma

Exon 1 beta

Exon 2-4

Spleißstellen

Veränderte Basen am Ende von Exon 2

### Sequenz der Bisulfit-konvertierten DNA mit Markierung der analysierten Cytosine

Die analysierten Cytosine im CpG-Kontext (welche methyliert sein können) sind als rote Y (für Pyrimidin) dargestellt. Alle Cytosine außerhalb von CpG-Dinukleotiden sind durch die Bisulfit-Behandlung zu T konvertiert. Insgesamt wurden in einem Bereich von 669 Basen 62 mögliche Methylierungsstellen der CpG-Insel im Bereich des ersten Exons von *MUTYH* untersucht (siehe Abbildung 3.1).

TGAAGTTTGAGGAGTTTTTAGAATTATGAGTTYGAGGTTTTTTTTTTTTTTAGAGYGTAGAGGTTTTG  
 AAGGTTATTTTTGGGAAGTYGTTTATYGTYGGAAAGTTGYGGGAGTTGAAATTGYGTTATYGTTATTGT  
 YGGYGGTTATGATATYGTTYGTTTTYGTTTGAGTYGTTTGTGGGTAYGTTGGATTTGYGTTYGTTTT  
 TTTGGYGYGGTTTTAGGTAGTYGGGGATGGGGYGGGTTTTYGTYGTYGGGTYGTYGATGGGTYGAATTT  
 TYGTTTAGAYGTTTTYGGGTTYGGYGYGGGGAAGGTAGTTTGGYGYGYGTTAATTGTTTATTGGTTTTGT  
 GTTGTYGGTTYGTAGTTYGGGTGGATTYAGGTTAYGTTTTTTGGAGTGYGTGGAAAGTYGGGYGYGT  
 TAGAGTTYGYGGGAGGTAATTTTTTTTTTTTTTGTYYYGGYGGGAAAYGYGGGTTTTTYGTGTTTTGT  
 TGTTTTTATTAGYGTGGGTGYGGGTAGGGGGTAGTGGGGTGGTTGGGTTTTTTAGAGAAGG  
 TGA YGTTGTTT GAGTTGAGTTTAAAGTAYGTTTAGGAGTTAGATTAGGAGAGGGTYGTGTGGGGGAAA  
 GAAGGGYTTTTGGGTATYGGTAAATTTTTAGAGAGGATGGAGAGTTTAGTGATTTT

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Frankfurt, im Dezember 2017

---

Nicole Köger

## Publikationen

**Nicole Köger**, Angela Brieger, Inga Hinrichsen, Stefan Zeuzem, Guido Plotz (2018) Analysis of MUTYH alternative transcript expression, promoter function and the effect of human genetic variants. – *in Vorbereitung*

**Köger N**, Paulsen L, López-Kostner F, Della Valle A, Vaccaro CA, Palmero EI, Alvarez K, Sarroca C, Neffa F, Kalfayan PG, Gonzalez ML, Rossi BM, Reis RM, Brieger A, Zeuzem S, Hinrichsen I, Dominguez-Valentin M, Plotz G. (2018) Evaluation of MLH1 variants of unclear significance. *Genes Chromosomes Cancer*. doi: 10.1002/gcc.22536

Richter AM, Kiehl S, **Köger N**, Breuer J, Stiewe T, Dammann RH (2017) ZAR1 is a novel epigenetically inactivated tumour suppressor in lung cancer. *Clin Epigenetics* 2;9:60. doi: 10.1186/s13148-017-0360-4

Hinrichsen I, Schäfer D, Langer D, **Köger N**, Wittmann M, Aretz S, Steinke V, Holzapfel S, Trojan J, König R, Zeuzem S, Brieger A, Plotz G (2015) Functional testing strategy for coding genetic variants of unclear significance in MLH1 in Lynch syndrome diagnosis. *Carcinogenesis* 36(2):202-11. doi: 10.1093/carcin/bgu239

Seguí N, Navarro M, Pineda M, **Köger N**, Bellido F, González S, Campos O, Iglesias S, Valdés-Mas R, López-Doriga A, Gut M, Blanco I, Lázaro C, Capellá G, Puente XS, Plotz G, Valle L (2015) Exome sequencing identifies MUTYH mutations in a family with colorectal cancer and an atypical phenotype. *Gut* 64(2):355-6. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307084

## Posterpräsentationen auf Fachkonferenzen

### Präsentation der eigenen Forschungsergebnisse als Poster:

- 07/2017      Analysis of patient mutations and knockout variants on MUTYH expression.  
*InSiGHT: 7th biennial meeting*. Florence, Italy, July 5-8, 2017
- 09/2016      MUTYH promoter regulation and analysis of patient mutations. *DGDR: DNA  
Repair 2016*. Essen, Germany, September 12-16, 2016
- 07/2016      Investigating the regulation of the tissue-specific expression of MUTYH.  
*Science Day des Fachbereichs Medizin*. Frankfurt a. M., Germany, July 14,  
2016. **Posterpreisgewinner**
- 04/2016      Investigating MUTYH promoter function: the setup of a minigene modell. *10th  
Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to  
disease*. Egmond aan Zee, The Netherlands, April 17-22, 2016