

Aus dem Institut für Humangenetik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
Eingereicht über das Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

## **MUTATIONSANALYSE EUKARYOTER GENE**

**BRCA-Genomanalyse von 35 Familien mit  
Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen mit  
vergleichenden Studien über unterschiedliche  
Analyseverfahren.**

---

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Eingereicht von

**HELENE BONGARD geb. SORMBROEN**

Gießen 2002

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

ISBN 3-89687-633-3

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2003

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wetttenberg  
Printed in Germany

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE  
[www.vvb-ips.de](http://www.vvb-ips.de)

**Aus dem Institut für Humangenetik  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
Betreuer: Prof. Dr. J. Horst**

**Eingereicht über das Institut für Biochemie und Endokrinologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. W. Schoner**

## **Mutationsanalyse eukaryoter Gene**

**BRCA-Genomanalyse von 35 Familien mit Mamma-  
und/oder Ovariakarzinomen mit vergleichenden Studien  
über unterschiedliche Analyseverfahren.**

**INAUGURAL- DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von  
HELENE BONGARD geb. SORMBROEN  
Tierärztin aus Oslo, Norwegen**

**Gießen 2002**

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann  
Dem Dekan des Fachbereichs Veterinär-  
medizin  
Justus-Liebig-Universität, Giessen**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Horst  
Institut für Humangenetik  
Westfälische Wilhelms-Universität, Münster**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wilhelm Schoner  
Institut für Biochemie und Endokrinologie  
Justus-Liebig-Universität, Giessen**

**Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.03**

**Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.**

**Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften:**

Markoff A., Sornbroen H., Bogdanova N., Preisler-Adams S., Ganev V., Dworniczak B., Horst J. (1998): Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. European Journal of Human Genetics. 6, 145-150.

Markoff A., Sornbroen H., Bogdanova N., Ganev V., Dworniczak B., Horst J. (1998): Conformation-sensitive gel electrophoresis in ultrathin-layer polyacrylamide gels. Balkan Journal of Medical Genetics. 1(4), 185-186.

**Kongreßbeitrag:**

Kongreß Innsbruck, 16-19 April 1997:

Markoff A., Sornbroen H., Vladimirov V., Grueva A., Ganev V., Dworniczak B., Sirakov L., Horst J.(1997): Mutation analysis in the BRCA 1 gene in 20 bulgarian breast cancer patients. Med.Genetik. Abstractsammlung 1, 111.

Diese Arbeit wurde an dem Institut für Humangenetik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Prof. Dr. J. Horst und mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, des von der Deutschen Krebshilfe geförderten Forschungsprojektes „Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom“ sowie des Bulgarischen Nationalfonds für Wissenschaft und Forschung durchgeführt.

***für Julia Maria und Leonard***

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Die Epidemiologie von Brust- und Eierstockkrebs	1
1.2	Die klinischen Aspekte von Brust- und Eierstockkrebs	1
1.3	Die hereditären Formen von Brust- und Eierstockkrebs und deren beteiligte Gene	4
1.4	<b>Das BRCA1- Gen</b>	<b>5</b>
1.4.1	Die Struktur des BRCA1-Gens	5
1.4.2	Die Vererbung des BRCA 1-Gens, und die Entstehung dessen Malignität	6
1.4.3	Die Funktion des BRCA1-Genprodukts	7
1.5	<b>Gegenwärtige Methoden für die Mutationsanalyse</b>	<b>9</b>
1.5.1	Klassifizierung von Mutationsanalyse-Methoden	10
1.5.2	Grundlagen der verschiedenen Mutationsanalyse-Methoden	11
1.6	<b>Aufgabenstellung und Ziele</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>27</b>
2.1.1	Klinische Auswahl von Patientinnen	27
2.1.2	Klinische Auswahl von Kontrollpatientinnen	30
2.1.3	Puffer und Lösungen	30
2.1.4	Bezugsquellen der Chemikalien und Enzyme	35
2.1.5	Enzyme	36
2.1.6	Oligonukleotide	37
2.1.7	Geräte und Verbrauchsmaterial	38
2.1.8	Fragmentlängenstandards	40
2.2	<b>Methoden</b>	<b>40</b>
2.2.1	Biologisches Probenmaterial	40
2.2.2	Gesamt-RNA-Isolierung mit TRIzol™	41
2.2.3	Isolierung genomischer DNA	42
2.2.4	Konzentrierung von DNA-Lösungen	42
2.2.5	Photometrische Bestimmung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren	43
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.7	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	47
2.2.8	Elektrophoresen	48
2.2.8.1	Agarose-Gel-Elektrophorese	48
2.2.8.1.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	49
2.2.8.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	51
2.2.8.2.1	Nicht denaturierende horizontale PAGE	51

2.2.8.2.2 „Single Strand Conformation Polymorphismus“-(SSCP)	51
2.2.8.2.2.1SSCP in einem horizontalen Elektrophorese-System	51
2.2.8.2.2.2„Polyethylenglycol“ (PEG)-SSCP in einem vertikalen Elektrophorese-System	53
2.2.8.2.2.3„Mutation Detection Electrophoresis“ (MDE)-SSCP in einem horizontalen Elektrophorese-System	54
2.2.8.2.3 „Conformation Sensitive-Gel-Electrophoresis“ (CSGE) in einem ultra-dünnen horizontalen Elektrophorese-System	54
2.2.9 Restriktionsendonuklease-Analyse	55
2.2.10 „Protein Truncation“- Test (PTT)	55
2.2.11 DNA-Sequenziermethode (Kettenabbruch-Methode) nach Sanger	57
2.2.11.1 Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	57
2.2.11.2 Nicht- radioaktive Sequenzierung	59
2.2.12 Autoradiographie	61
2.2.13 Nichtradioaktive Nachweismethoden für Nukleinsäuren	62
2.2.13.1 Silberfärbung nach Budowle	62
2.2.13.2 Ethidiumbromidfärbung	62
2.2.14 Haplotypbestimmung	63
2.2.15 Statistische Analyse	63
2.2.16 Computer-Analyse	64
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Optimierung der „Conformation Sensitive“ Gel- Elektrophorese (CSGE)- Analyse</b>	<b>65</b>
<b>3.2 Mutationsanalyse des BRCA 1 Brustkrebsgens</b>	<b>66</b>
3.2.1 Ergebnisse der „Protein Truncation“-Test (PTT)- Analyse	66
3.2.2 Ergebnisse der „Single Strand Conformation Polymorphismus“ (SSCP)- Analyse	67
3.2.3 Ergebnisse der „Conformation Sensitive“-Gel-Elektrophorese (CSGE)- Analyse	70
3.2.4 Sequenzierung	71
3.2.5 Ergebnisse der SSCP/CSGE- Analyse	74
3.2.6 Ergebnisse der Restriktionsendonuklease- Analyse	76
3.2.7 Anhäufung von Polymorphismen bei Patientinnen und Kontrollpatientinnen	77
3.2.8 BRCA1-Isoformen	80
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>81</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>88</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>90</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>92</b>



Abbildung 1: Modell der Mehrschritt-Karzinogenese des Mammakarzinoms	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Chromosoms 17 und der Lokalisation des BRCA1-Gens	4
Abbildung 3: Der strukturelle Aufbau des BRCA1-Gens mit Darstellung der Größenunterschiede der Exons 1 bis 24	6
Abbildung 4: Struktur des Kettenabbruchnukleotids Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat (ddNTP) verglichen mit einem Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (dNTP)	12
Abbildung 5: Das Prinzip der „Single Strand Conformation Polymorphismus“ (SSCP)-Analyse	15
Abbildung 6: Das Prinzip der Erfassung von Heteroduplexmolekülen mittels CSGE-Molekülen	17
Abbildung 7: „Protein Truncation“-Test (PTT)	25
Abbildung 8: Stammbäume der untersuchten Patientinnen	29
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Formate für die Amplifikation aller 24 Exons des BRCA1-Gens mit zusätzlichen Angaben zu der jeweiligen Fragmentgröße der verschiedenen Formate	47
Abbildung 10: Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	59
Abbildung 11: CSGE -Analyse von BRCA1 PCR-Produkten	66
Abbildung 12: Genomische PTT-Formate des BRCA1-Gens	67
Abbildung 13: SSCP-Analyse von Exon 11 (P2731) in einem Ultradünnschicht-Gel (Multiphor-Format)	68
Abbildung 14: SSCP-Analyse von Exon 11 (P2430) in einem Polyacrylamid-Gel mit 0,5% PEG	68
Abbildung 15: SSCP-Analyse von Polymorphismen des BRCA1-Gens in einem MDE-Gel	69
Abbildung 16: SSCP-Analyse in einem Polyacrylamid-Gel mit 0,5% PEG	69
Abbildung 17: CSGE-Analyse von Polymorphismen des BRCA1-Gens in einem Ultradünnschicht-Gel (Multiphor-Format)	71
Abbildung 18: Direktes automatisches Sequenzieren (A.L.F)	73
Abbildung 19: Restriktionsanalyse von P(4427) im Exon 13 von BRCA1	76
Abbildung 20: PHDsec-Konformationsanalyse für die Sekundär-Struktur von bestimmten Exon 11-Abschnitten mit der häufigen (BRCA1) und der seltenen (BRCA1*) polymorphen Aminosäure	80

Abbildung 21: Schematisches Verfahren für die BRCA 1-Mutationsanalyse

85

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Verschiedene Mutationsanalyse-Methoden und ihre grundlegenden Merkmale	11
Tabelle 2: Zusammengefasste Daten der ausgewählten Patientinnen	27
Tabelle 3: Spezifität und Bezugsquellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen	37
Tabelle 4: PCR-Zykluseinstellung für die SSCP- und CSGE-Formate in einen PCR-Thermocycler	45
Tabelle 5: PCR-Zykluseinstellung für die PTT-Formate in einen PCR-Thermocycler	46
Tabelle 6: Pipettierschema für die Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung	57
Tabelle 7: Zykluseinstellung für „Cycle Sequencing“	60
Tabelle 8: Komponenten des A-C-G-T-Mix des „Cycle Sequencing“	61
Tabelle 9: Ergebnisse der SSCP-Analyse im Ultradünnschicht-Gel und in einem Polyacrylamid-Gel mit 0,5% PEG	70
Tabelle 10: Ergebnisse des Mutations-Screening	75
Tabelle 11: Polymorphismen im BRCA1-Gen, die mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen identifiziert werden können	76
Tabelle 12: BRCA1 und BRCA1* - Genotypen und ihre Allel -Verteilung	78
Tabelle 13: Systemoptimierung der CSGE	82

## Grafikverzeichnis

---

Grafik 1: BRCA1-Genotypen in Patientinnen und Kontrollen	79
Grafik 2: BRCA1/BRCA1*-Allelverteilung in Patientinnen und Kontrollen	79

μ	Mikro
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASO	Allele Specific Oligonucleotides
BAA	Bisacrylamid
bp	Basenpaar
BRCA1	Breast Cancer Gene 1
BRCA2	Breast Cancer Gene 2
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cross-linking-ratio
CCM	Chemical Cleavage of Mismatch
CSGE	Conformation Sensitive Gel Electrophoresis
DdF	Dideoxy-Fingerprinting
ddH <sub>2</sub> O	2-fach destilliertes Wasser
ddNTP	2'3'dideoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DGGE	Denaturant Gradient Gel Elektrophoresis
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppel-strang DNA
DT-PCR	Directed Termination PCR
g	Gram
HA	Heteroduplex-Analyse
kb	Kilobasen
l	Liter
LCP	Long-Chain Polymer
LCR	Ligase Chain Reaction
M	Mol
m	Milli
MDE	Mutation Detection Electrophoresis
min	Minute

n	Nano
NTP	Nucleosidtriphosphat
P	Polymorphismus
PAAG	Polacrylamidgel
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamide Gel Elektrophoresis
PASA	Primer-Aided Specific Amplification
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
PTT	Protein Truncation Test
RA	Restriction Analysis
RE	Restriktionsendonuklease
REF	Restriction Fingerprinting
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsin	Placental Ribonuclease Inhibitor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chain- Reaction
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylhydrogensulfat (ionisches Detergenz)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelsystem
SE-Puffer	Sodium-EDTA-Puffer
SSCA	Single Strand Conformation Analysis
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
u	Unit
üN	über Nacht

### 1 Einleitung

#### 1.1 Die Epidemiologie von Brust- und Eierstockkrebs

Brust- und Eierstockkrebs sind die zwei häufigsten Karzinomkrankungen der Frau, die absolut häufigste Karzinomtodesursache der Frau in der westlichen Welt und in der Altersgruppe zwischen 35 und 55 Jahren sogar die häufigste Todesursache der Frau überhaupt. Die Erkrankungsinsidenz nimmt derzeit besonders bei jungen Frauen zu (1,2,3). Obwohl Hormon- und Umweltfaktoren in der Ätiologie dieser Krebserkrankungen eine Rolle spielen, sind die wichtigsten Faktoren Alter und familiäre Anamnese (4). Ca. 5% aller Brustkrebsfälle haben eine genetische Prädisposition (5,6). Keimbahnmutationen der Brustkrebsgene BRCA1 und BRCA2 scheinen eine Hauptursache für das vererbte Mammakarzinom und das vererbte Mamma-/Ovarialkarzinomsyndrom zu sein (7,8,9,10,11). Nach derzeit zusammenfassenden Statistiken liegt das kumulative Risiko für Trägerinnen mit BRCA1-Gendefekt, bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken, bei 82% (Frauen-Allgemeinpopulation: 9% bis zum 70 Lebensjahr). Hiervon erkranken mehr als 60% der Patientinnen vor dem 50. Lebensjahr. Das Risiko der Gendefekträgerinnen, bis zum 70. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, liegt bei 44% (2,12,13,14). Weitere signifikante Ko-Inzidenzen sind für Endometrium-, Prostata-, Kolon- und Pankreaskarzinome in diesen Familien beschrieben (14). Männliche BRCA1-Gendefekträger haben bis zum 70. Lebensjahr ein kumulatives Risiko von 8%, ein Prostatakarzinom zu entwickeln (dreifaches Risiko der sonstigen Population). Männliche und weibliche Gendefekträger haben vor Erreichen des 70. Lebensjahres ein kumulatives Risiko von 6%, ein Kolonkarzinom zu entwickeln (vierfaches Risiko der sonstigen Population) (15). Mutationen des BRCA2-Gens sind häufiger in Familien mit Fällen von männlichem sowie weiblichem Brustkrebs (9,10,16,17), wogegen das Risiko, Eierstockkrebs zu entwickeln, kleiner ist als bei BRCA1-Familien (10,16).

#### 1.2 Die klinischen Aspekte von Brust - und Eierstockkrebs

In einigen Universitätskliniken besteht die Möglichkeit der genetischen Untersuchung für Ratsuchende aus Hochrisikofamilien. Die Zentren werden auf eigene Initiative oder auch aufgrund ärztlichen Rates aufgesucht. Bei der Beratung

## Einleitung

geht es vor allem darum zu ermitteln, ob ein erhöhtes Brustkrebs-/Eierstockkrebs-Risiko besteht. Dazu werden möglichst vollständige Angaben über die an Krebs erkrankten oder verstorbenen Familienmitglieder benötigt. Frauen mit erheblicher familiärer Belastung wird nach ausführlicher Information und Beratung eine genetische Untersuchung angeboten. Ergibt der Test eine erbliche Belastung, kommt es darauf an, einen möglicherweise auftretenden Tumor frühzeitig zu erkennen. Dazu kann die Selbstersuchung der Brüste ebenso beitragen wie regelmäßige Ultraschall- und Röntgenuntersuchungen. Hierzu muss aber berücksichtigt werden, dass sich diese Untersuchungen bei Patientinnen < 40 Jahren als weniger aussagekräftig darstellen, da eine hohe Gewebsdichte vorliegt. Erst mit 40-50 Jahren sind diese Untersuchungen einfacher durchzuführen. Teilweise wird vorgeschlagen, die Brüste und auch die Eierstöcke prophylaktisch chirurgisch entfernen zu lassen. Dies schließt aber nicht völlig aus, dass später doch noch Krebsherde entstehen. Ein solches Vorgehen ist in den Niederlanden und in der Vereinigten Staaten durchaus üblich (18). Krebsleiden, verursacht durch BRCA1/BRCA2-Gene, gehören weder in die Kategorie therapierbarer noch in die Kategorie nicht therapierbarer Krankheiten. Dabei muss man bedenken, dass eine Brust- b.z.w. Eierstockentfernung keine Therapie darstellt. Bei den Krebsleiden, verursacht durch BRCA1/BRCA2, gehören vielmehr die präventiven Untersuchungen in den Vordergrund. Bei Patientinnen mit erfolgter Mutationsanalyse wird eine bessere präventive Versorgung ermöglicht, da viele Untersuchungen früher eingeleitet werden können. Durch moderne molekularbiologische Techniken sind neue Einsichten in die molekularen Mechanismen der Karzinomentstehung und -progression gewonnen worden. Das Modell der sogenannten Mehrschrittkarzinogenese, die ausgehend von der normalen Epithelzelle über physiologische und unphysiologische Zellproliferation hin zum Carcinoma in situ und dann zum invasiven Karzinom mit zirkulierenden Tumorzellen und Fernmetastasen führt, integriert unterschiedlichste Faktoren. Die einzelnen Faktoren, deren zeitliches Auftreten und ihre Interaktionen sind überwiegend noch unbekannt, dennoch können einige dieser Faktoren in einem hypothetischen Arbeitsmodell zusammengefasst werden (Abbildung 1: Modell der Mehrschritt-Karzinogenese des Mammakarzinoms)(2).

# Einleitung

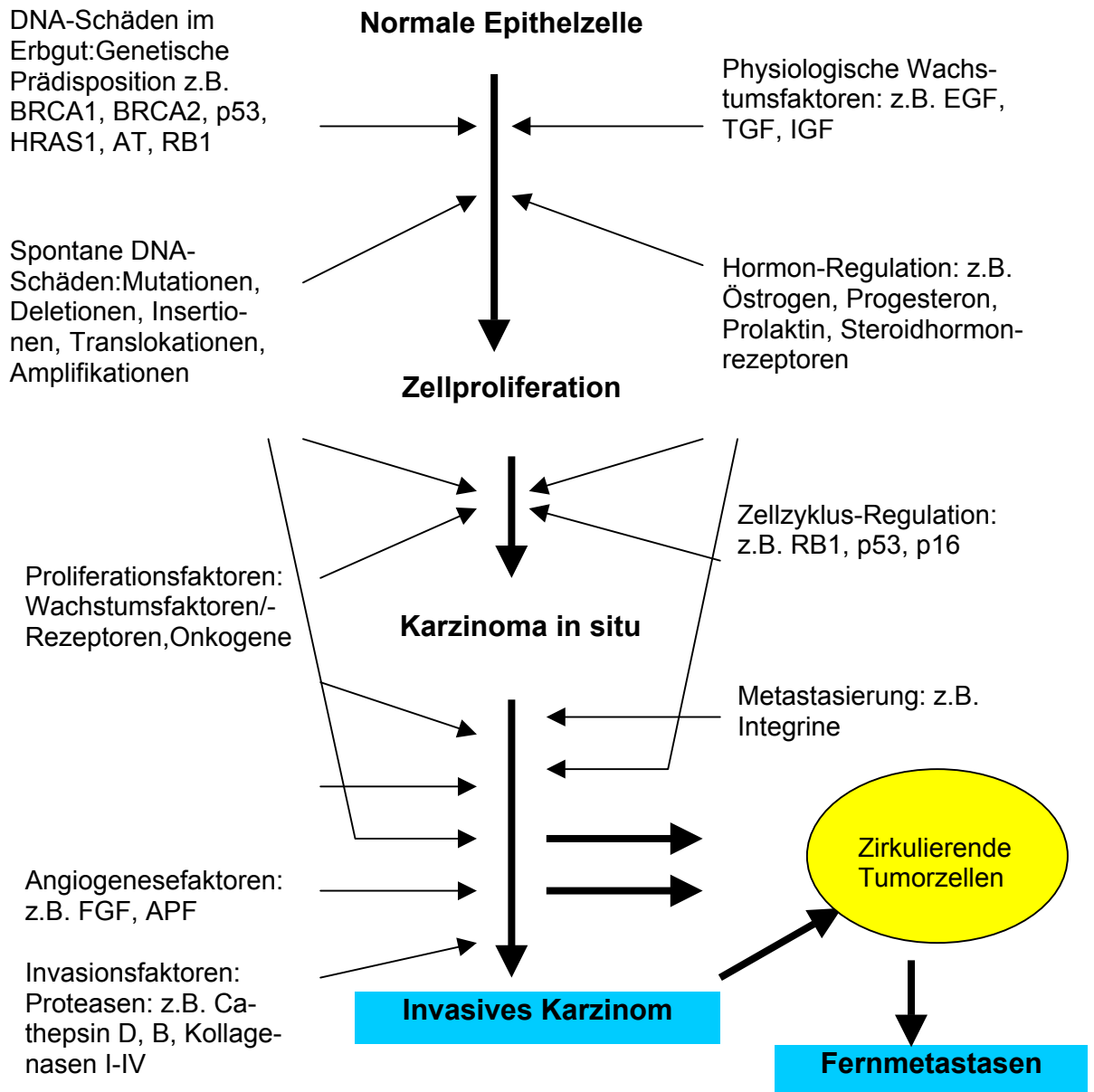


Abbildung 1: Modell der Mehrschritt-Karzinogenese des Mammakarzinoms.



## Einleitung

### 1.3 Die hereditären Formen von Brust- und Eierstockkrebs und deren beteiligte Gene

Zwei potentielle Tumor-Suppressor-Gene, BRCA1 und BRCA2, die beide eine Bedeutung für erblichen Brustkrebs-Eierstockkrebs haben, sind bislang kloniert und charakterisiert worden. Das BRCA1-Gen wurde 1990 an Chromosom 17q21 gekoppelt. Eine detaillierte Genkarte für die 600kb große Region 17q21 zwischen den DNA-Markern D17S1321 und D17S1325 wurde mit Hilfe von Kopplungsanalysen erstellt. Das BRCA1-Gen wurde 1994 kloniert und sequenziert (Abbildung 2) (8).

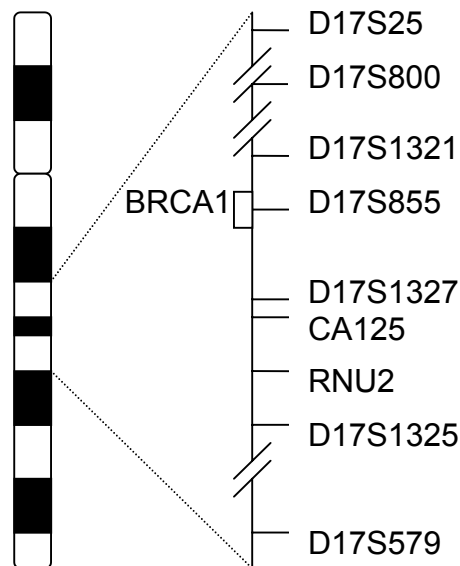


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Chromosoms 17 und der Lokalisation des BRCA1-Gens. Die relevante BRCA1-beinhaltende Region ist erweitert worden, um die Lokalisation der früher entdeckten Gene CA125 und RNU2 zu zeigen. Der Marker D17S855 ist innerhalb BRCA1 lokalisiert.

Das BRCA2-Gen auf Chromosom 13q12-13 wurde 1994 durch Kopplungsanalyse lokalisiert (11) und anschließend 1995 kloniert (9,10).

BRCA1 ist laut bisherigen Untersuchungen zu einem größeren Anteil an erblichem Brust- und Eierstockkrebs beteiligt als BRCA2. In 200 Familien mit mindestens 4 Fällen von Brustkrebs zeigten ca. 50% aller Familien Kopplung und/oder Mutationen mit dem bzw. in dem BRCA 1-Gen. Ca. 30% der Familien waren mit BRCA2 gekoppelt, und ca. 20% betreffen weder BRCA1 noch BRCA2. In einer Auswahl dieser Familien mit Brust- und Eierstockkrebs sind

## Einleitung

75% BRCA 1 und 23% zu BRCA2 zugeordnet; nur eine Familie ist ungeklärt (19). In der gleichen Untersuchung wurde außerdem eine mögliche Kopplung des Östrogen-Rezeptor-Gens mit Brustkrebs gezeigt (20).

Mindestens zwei weitere Gene, p53 und ein Androgen-Rezeptor, werden ebenfalls für eine erbliche Prädisposition von Brustkrebs verantwortlich gemacht. Mutationen in dem Tumorsuppressor-Gen<sup>1</sup> p53 führen zu multiplen Krebsformen in Familien mit Li-Fraumeni-Syndrom, das Brustkrebs, Sarkome, Leukämie und andere Neoplasien hervorruft (21). Mutationen in dem mit dem X-Chromosom gekoppelten Androgen-Rezeptor führen bei Männern mit dem seltenen Reifenstein-Syndrom zu Brustkrebs (22). Epidemiologische Studien legen nahe, dass Träger von Mutationen in dem Ataxia Telangiectasi (AT)-Gen<sup>2</sup> ein erhöhtes Risiko haben, an Brustkrebs zu erkranken (23,24). Das Ausmaß an Brustkrebs bei AT-Trägern wird mit 3,8% eingeschätzt (25).

### 1.4 Das BRCA1-Gen

#### 1.4.1 Die Struktur des BRCA1-Gens

BRCA 1 und BRCA 2 sind große Gene mit einer komplexen genomischen Struktur. BRCA1 beinhaltet 24 Exons, davon sind 22 Exons kodierend, mit einer Spannweite von 80kb genomischer DNA und einem Transkript von 7,8kb, das

---

<sup>1</sup>Tumor-Suppressor-Gene: Tumor-Suppressor-Gene sind eine Gruppe von Genen, die normalerweise die Teilung von Zellen unterdrücken. Der Verlust der normalen Funktion in beiden Allelen führt zu unkontrollierter Zellteilung und Tumorwachstum. Die Anwesenheit eines normalen Allels unterdrückt die Entstehung des Tumors (Tumor-Suppression). Der Funktionsverlust muss beide Allele betreffen, bevor eine Wirkung eintritt d.h. Mutationen in Tumor-Suppressor-Genen verhalten sich auf zellulärer Ebene rezessiv.

Mutationen in dem p53-Gen gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Zellen von verschiedenen bösartigen Tumoren bei Menschen. Das p53-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 und codiert für ein nucleäres Protein von 53.000 Daltons (daher die Bezeichnung p53). Das p53-Protein ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und ist ein Transkriptionsfaktor. Die Inaktivierung von p53 durch Mutation resultieren in gestörter Kontrolle des Zellzyklus und Krebsentwicklung. DNA-Schäden in Zellen führen zu erhöhter Expression von p53 und Unterbrechung des Zellzyklus in G1. Verläuft die DNA-Reparatur erfolgreich, so stirbt die Zelle ab (Zelltod, Apoptosis). Geschädigte Zellen mit mutantern p53-Protein werden nicht in G1 arretiert. Es bleibt nicht genügend Zeit für Reparatur, und in der nächsten S-Phase wird der Schaden verdoppelt. Lane D.P. (1992): p53, guardian of the genome. Nature. 358, 15-16.

<sup>2</sup>Ataxia Telangiectasi (AT): Eine Gruppe autosomal rezessiv erblicher Erkrankungen mit neurologischen und immunologischen Defekten, verursacht durch eine Translokation 7q/14p. Charakteristische Telangiectasien von Gefäßen entwickeln sich in den ersten Lebensjahren in der Bindehaut der Augen. Die cerebelläre Ataxie beginnt gleichfalls in den ersten Lebensjahren und ist zunächst progressiv, später stationär. Die Immundefizienz führt zu schweren Infektionen der Lunge und des Bronchialsystems. Lymphom und Leukämie sind relativ häufige Komplikationen. Passarge E. (1994): Taschenatlas der Genetik: Thieme Verlag; p. 338.

## Einleitung

für 5592 Nukleotide kodiert. Das zentrale Exon 11 beinhaltet ~60% der kodierenden Sequenz, die restlichen 21 Exons sind relativ klein. Abbildung 3 zeigt den strukturellen Aufbau des BRCA1-Gens mit Darstellung der Größenunterschiede der Exons 1 bis 24 (26). Das Proteinprodukt besteht aus 1863 Aminosäuren (8).

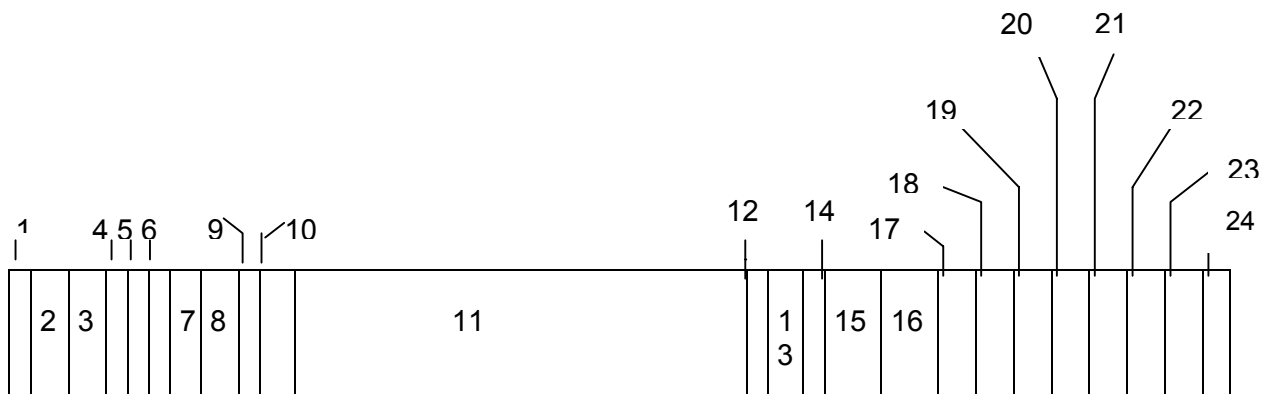


Abbildung 3: Der strukturelle Aufbau des BRCA1-Gens mit Darstellung der Größenunterschiede der Exons 1 bis 24 (26).

### 1.4.2 Die Vererbung des BRCA 1-Gens, und die Entstehung dessen Malignität.

Die genetische Prädisposition wird bei Vorliegen einer Keimbahnmutation autosomal dominant vererbt, wobei das prädisponierende Allel wie ein rezessives Allel in einer somatischen Zelle fungiert. Die vererbte Kopie des mutierten Allels ist verantwortlich für die Prädisposition, der Verlust beziehungsweise die Inaktivierung des Wildtypallels in der somatischen Zelle führt zur Ausprägung des malignen Phänotyps (2). Nach Kopplungsuntersuchungen ist in 45% aller Familien mit signifikant häufigerem Auftreten von „early-onset“-Mammakarzinomen und in mindestens 75% aller Familien mit signifikant häufigerem Auftreten von Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen eine Inaktivierung des BRCA1-Gens für die Tumorentstehung verantwortlich. Tumoren der BRCA1-Mutationsträgerinnen zeigten sich in den untersuchten Tumoren als ein Verlust der Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity) in der BRCA1 Region. Dieser Heterozygotieverlust im Genom der Tumorzellen wird durch die Zweischritt-Hypothese der Tumorgenese von Knudson erklärt. Der erste Schritt auf dem

## Einleitung

Weg zum Tumor ist eine ererbte (oder eine somatische) Mutation in dem einen Allel des Gens. Sie lässt die Zellfunktion noch unbeeinträchtigt. Der zweite Schritt, der Verlust des Normalallels, zum Beispiel durch eine Deletion, hinterlässt das mutierte Allel im homozygoten Zustand, die Zelle ist dadurch zur Krebszelle geworden. Die Suszeptibilität wird also dominant vererbt, der maligne Phänotyp aber ist rezessiv (27).

In Fällen sporadischer Mammakarzinome sind zwar in sehr geringer Zahl BRCA1 Mutationen (13), aber noch keine BRCA2-Mutationen gefunden worden. Somatische Mutationen in der kodierenden Region von BRCA1 wurden nur in einigen sporadischen Ovarialkarzinomen entdeckt (28,29). In 30 und 70% der sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinome kann ebenfalls ein Verlust der BRCA1-Region nachgewiesen werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Verbindung zwischen der Lokalisation der BRCA1-Mutation und der Möglichkeit, an Brust- und Ovarialkarzinomen zu erkranken, besteht. Diese sogenannte Genotyp-Phänotyp-Korrelation deutet darauf hin, dass Mutationen im 3'-Ende des BRCA1-Gens mit einer geringeren Anzahl von Ovarialkarzinomen verbunden sind (30).

### 1.4.3 Die Funktion des BRCA1-Genprodukts

Die Funktion des BRCA1-Genproduktes ist die Beteiligung an der Reparatur transkriptions-aktiver DNA, die durch Oxidation beschädigt ist (31). Die hervortretende charakteristische Eigenschaft dieses Proteins ist ein RING-Motiv nahe des Amino(N)-Endes. Dieses RING-Motiv ist eine Cystein reiche Sequenz, die auch in verschiedenen Gruppen von Regulator-Proteinen gefunden wurde. Es ist vorgeschlagen worden, dass das Ring-Motiv als Grenzfläche bei der DNA-Erkennung oder der Protein-Protein-Interaktion (32) dient.

Kürzlich wurde ein RING-Protein (terminus: BARD1) identifiziert, das in vivo mit dem BRCA1-Genprodukt reagiert. „Missense-Mutationen“<sup>3</sup> im BRCA1-Gen zerstören die Wechselwirkung zwischen diesen zwei Proteinen, was darauf

---

<sup>3</sup>Missense-Mutation (Falsch-Sinn-Mutation): Aufgrund eines Nukleotidaustausches wird die genetische Information geändert. Die Bedeutung des betreffenden Codons ändert sich: aus „Sinn“ wird „Falsch-Sinn“, „missense“. Im Genprodukt wird eine Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht. Das kann für das Protein sehr verschiedenen Folgen haben, abhängig von der Art der ausgetauschten Aminosäuren und von der Lage der AS im Protein. Knippers R. (1997): Molekulare Genetik. 7 Auflage: Thieme Verlag; p. 272.

## Einleitung

hinweist, dass BARD1 eine Rolle bei der Tumorsuppression durch BRCA1 (33) spielt. Da die Normal-Allele von BRCA1 in Tumoren, die in diesen Familien vorkommen, typischerweise verloren gegangen oder inaktiviert sind, lässt sich daraus schließen, dass das BRCA1-Protein als Tumor-Supressor funktioniert, und dass das RING-Motiv hierbei eine essentielle Rolle spielt. Das BRCA1-Protein wurde mit Rad51 über die Aminosäuren 758-1064, kodiert durch Teile von Exon11, assoziiert (34). Rad 51 gehört zu einer Proteinfamilie, die eine normale Rekombination vermittelt. Hefezellen, die eine Mutation im Rad51-Gen zeigen, können keine normale mitotische Rekombination durchführen oder Doppelstrang-Brüche reparieren, sind aber lebensfähig (35). Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit einem homozygoten, nicht funktionellen Rad51, frühembryonale Sterblichkeit. Überdies, zeigen Zellen von Rad51<sup>-/-</sup>-Embryonen, wie BRCA1<sup>-/-</sup>-Embryonen, einen Proliferationsdefekt, was für Rad51 eine zusätzliche Rolle in der Zellwachstumkontrolle nahelegt (36,37). Diese Befunde indizieren eine Rolle des BRCA1-Proteins in nukleären Prozessen, die zu normaler chromosomaler Rekombination und zur genomischen Reparatur-Kontrolle führen. Das Carboxy(c)-Ende (letzte 11 AS) des BRCA1-Genproduktes ist essentiell für die Bindung an den RNA-Polymerase II-Holoenzym-Komplex. Bei ca. 90% der klinisch relevanten Mutationen ist dieser Abschnitt des BRCA1-Gens deletiert (38). Es wurde außerdem gezeigt, dass das Carboxy(c)-Ende des BRCA1-Genproduktes (AS 1528-1863) eine Transkriptions-Aktivität zeigt. Dieser Transkriptions-Transaktivator<sup>4</sup> ist durch ein sogenanntes Zinkfingermotiv erkennbar. In Sequenzen die zu vier verschiedenen Mutationen aus BRCA1-Familien korrespondieren, ist diese Funktion komplett aufgehoben (39). Das aus 1863 Aminosäuren bestehende Zinkfinger-Protein wird durch Östrogene induziert (40,41,42).

Die letzten 202 AS des Carboxy-Endes, auch BRCT (BRCA1-C-Terminus)-Domäne genannt, enthalten eine homologe Sequenz des humanen Proteins 53BP1, was in der Lage ist, das universale Tumorsupressor-Gen p53 zu binden (43). Ebenfalls wurde eine große Ähnlichkeit mit dem Hefeprotein RAD9 gezeigt, das in dem DNA-Reparatur-Kontrollzyklus an den beiden Kontrollstatio-

---

<sup>4</sup>Transkriptions-Transaktivator: Proteine die in der Aktivierung von Transkriptions-Kontrollmechanismen beteiligt sind. Gayther S.A., Ponder A.J. (April 1997): Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes and the possibilities for predictive testing. Mol Med Today, 168-174.

## Einleitung

nen G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> involviert ist (44). Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen, die in DNA-Reparatur-Vorgängen involviert sind (45), wurden ebenfalls berichtet. BRCA2 beinhaltet 27 Exons, mit einer Spannweite von 70kb genomischer DNA und einem Transkript von 11,3kb. Das Proteinprodukt besteht aus 3418 Aminosäuren. Die Funktion dieses Proteins ist unbekannt. Es besitzt keine Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Proteinen, mit Ausnahme einer Sequenz des BRCA1-Gens und einer Granin<sup>5</sup>-Sequenz am Carboxy-Ende (46).

### 1.5 Gegenwärtige Methoden für die Mutationsanalyse

In den letzten 10 Jahren wurde eine große Zahl von Mutationen entdeckt, die genetische Störungen und erbliche Krebsleiden verursachen. Die Ansammlung dieses Wissens wird durch das Humane Genom-Projekt unterstützt. Die Methoden, bekannte und unbeschriebene Mutationen zu entdecken, sind von großer Bedeutung und haben eine breite Anwendung erfahren.

Es gibt 3 Anwendungsgebiete für die Mutationsanalyse:

- In der Forschung, um Mutationen eines Gens zu finden, die für eine korrespondierende Krankheit verantwortlich sind. Die Entdeckung und Charakterisierung von pathologischen Mutationen bildet die Grundlage für eine Genotyp/Phänotyp-Korrelation und ermöglicht die funktionelle Charakterisierung von verschiedenen molekulären Domänen des Proteinproduktes.
- In der Diagnostik, um bekannte und unbeschriebene Mutationen, die für eine spezielle Krankheit verantwortlich sind, zu entdecken. Es werden einfache und zuverlässige Methoden verlangt, die einen möglichst hohen Prozentsatz gefundener Mutationen gewährleisten. Diese Informationen werden für die genetische Beratung, pränatale oder diagnostische Tätigkeiten, und um das Vorkommen von Polymorphismen für Kopplungsanalysen zu ergründen, eingesetzt.
- In verschiedenen Screening-Programmen von Populationen und Risikogruppen, um spezifische Mutationen zu erfassen (z.B. Brustkrebs). Dazu ist eine bequeme und zuverlässige Technologie gefragt, um Mutationen nachzuweisen, und mit der prophylaktischen Möglichkeit, adequate Vorsorge-

---

<sup>5</sup>Granin: Granin gehört zu eine Gruppe von säure Proteinen die Calcium binden können, und die sich in deren Anwesenheit anhäufen. Die nehmen wahrscheinlich an proteolytischen Reaktionen teil und sind im Golgi-Apparat sowie in sekretorischen Vesikeln in der Zelle vorhanden. Steeg P. (1994): Granin expectations in breast cancer?. Nat Genet. 12, 223-225.

## Einleitung

maßnahmen der Mutationsträger zu ermöglichen. Die Bedeutung solcher Studien steigt mit der Ansammlung des Wissens über die molekulare Pathologie von Krebserkrankungen, da Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen bekannte Ursachen der Malignität sind. In bestimmten genetischen Störungen sind bekannte Mutationen in verantwortlichen Genen zu finden. Sie können durch diagnostische Mutationsanalyse erfasst werden. Eine Vielzahl von genetischen Störungen ist aber durch eine große Mutationsheterogenität und eine hohe Frequenz von sogenannten „privaten“ Mutationen gekennzeichnet. In diesen Fällen ist es erforderlich, Methoden zu verwenden, Gene vollständig nach potentiellen Mutationen abzusuchen. Aufgrund der Komplexität der Mutationsanalyse ist es eine Herausforderung, elegante Methoden für die Charakterisierung von Mutationen zu etablieren, um eine genetische Beratung zu ermöglichen und eine individuelle Diagnose und Prognose stellen zu können.

### 1.5.1 Klassifizierung von Mutationsanalyse-Methoden

Die DNA-Sequenzierung ist die grundlegende Methode für die Entdeckung und Identifizierung von Mutationen. Da die Sequenzierung sehr zeit- und kostenintensiv ist, sind andere Methoden entwickelt worden, um DNA-Abschnitte zu analysieren, so dass große Abschnitte eines Moleküls nicht sequenziert werden müssen. Letztendlich ist die Frage umstritten, ob man die direkte Sequenzierung oder eine Vor-Analyse mit anschließendem Sequenzieren bevorzugt.

Die Prinzipien der verschiedenen Mutationsanalyse-Methoden können in physikalische, chemische und enzymatische Methoden eingeteilt werden. Physikalische Methoden sind z.B. Einzelstrang-Konformationsanalyse (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP), Heteroduplex-Analyse (HA) und Elektrophorese in denaturierenden Gradienten-Gelen (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis DGGE). Chemische Methoden sind z.B. die Modifikation durch Carbodiimid (Carbodiimide Modification) oder chemische Spaltung von falsch gepaarten Nukleotiden (Chemical Cleavage of Mismatch CCM). Enzymatische Methoden sind z.B. die DNA-Sequenzierung und die enzymatische Spaltung von falsch gepaarten Nukleotiden (Enzymatic Cleavage of Mismatch). Mit Hinblick auf die zu untersuchenden Proben können Mutationsanalysen eingeteilt werden in DNA-, RNA- und Protein-Methoden. DNA-Methoden sind die oben-

## Einleitung

genannten physikalischen Methoden und die DNA-Sequenzierung. Ein Beispiel für eine RNA-Methode ist die Spaltung von falsch gepaarten Nukleotiden mit Hilfe von RNase (Rnase Cleavage of Mismatch). Eine Protein-Methode ist der Protein Truncation Test (PTT). Verschiedene Mutationsanalyse-Methoden und ihre grundlegenden Merkmale sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Methode	Screening	Diagnose	Prinzip			analysiertes Molekül		
			P	C	E	DNA	RNA	Protein
Sequenzierung	+	+	-	-	+	+	-	-
Denaturant Gradient Gel Elektrophoresis (DGGE)	+	-	+	-	-	+	-	-
Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	+	-	+	-	-	+	+	-
Heteroduplex-Analyse (HA)	+	+	+	-	-	+	-	-
Carbodiimide Modification	+	-	-	+	-	+	-	-
Chemical cleavage of mismatch	+	-	-	+	-	+	-	-
Enzymatic cleavage of mismatch	+	-	-	-	+	+	+	-
Restriktionsanalyse	+	+	-	-	+	+	-	-
Restriction Endonuclease Fingerprinting (REF) dideoxy Fingerprinting (ddF)	+	-	+	-	+	+	-	-
Protein Truncation Test (PTT)	+	-	-	-	+	-	-	+
Allele-specific oligonucleotides (ASO)	-	+	+	-	-	+	-	-
Allele-specific amplificton (PASA)	-	+	-	-	+	+	-	-
Ligase chain reaction (LCR)	-	+	-	-	+	+	-	-

Tabelle 1: Verschiedene Mutationsanalyse-Methoden und ihre grundlegenden Merkmale (P- physikalisch, C- chemisch, E-enzymatisch).

### 1.5.2 Grundlagen der verschiedenen Mutationsanalyse-Methoden

#### a) DNA-Sequenzierung

Aus den verschiedenen, in den vergangenen Jahren entwickelten Methoden zur schnellen Sequenzierung von DNA, gelten zwei Methoden als besonders zuverlässig und einfach:



## Einleitung

Die Sequenzierung endmarkierter DNA durch basenspezifische chemische Spaltungen (Maxam und Gilbert (47)) und die Analyse durch sog. „geprinte“ enzymatische Synthese (Sanger et al.(48,49)).

Für die Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde die Ketten-Abbruchmethode nach Sanger et al. durchgeführt (49). Diese Methode beinhaltet die *in vitro*-Synthese eines DNA-Stranges durch eine DNA-Polymerase mit einer einzelsträngigen DNA (denaturierte dsDNA) als Matritze. Die Synthese startet an der Stelle, an der ein Oligonukleotid (Sequenzierungsprimer) mit der Matritze assoziiert. Die Synthese-Reaktion wird durch den Einbau eines Nukleotid-Analogons terminiert, das keine weitere DNA-Elongation erlaubt. Die Ketten-Terminations-Analoga sind 2'3'-Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddNTPs). Diesen fehlt die 3'-OH-Gruppe, die für die Kettenverlängerung notwendig ist. Die Struktur der beiden Nukleotiden Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat (ddNTP) und Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (dNTP) werden in Abbildung 4 verglichen.

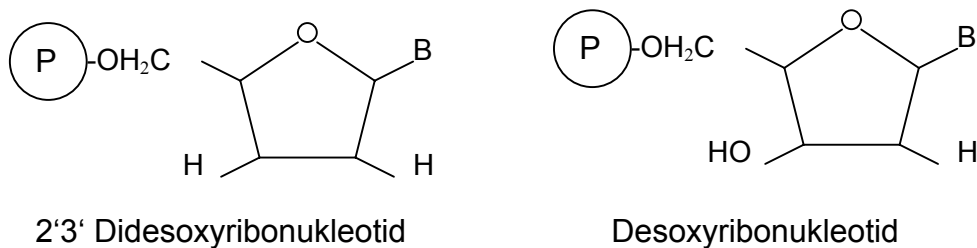


Abbildung 4: Struktur des Kettenabbruchnukleotids Dideoxy-Nukleosid-Triphosphat (ddNTP) verglichen mit einem Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (dNTP).

Wenn geeignete Mischungen von dNTPs und einem der vier ddNTPs verwendet werden, dann stoppt die Enzym katalysierte Polymerisation anteilig an der Stelle, an der ein ddNTP eingebaut werden kann. Vier separate Reaktionen, jede mit einem anderen ddNTP, ergeben die vollständige Sequenzinformation. Die Markierung der neusynthetisierten DNA-Stränge kann entweder radioaktiv oder durch einen Fluoreszenz-Farbstoff erfolgen.

### b) Denaturant Gradient Gel Elektrophoresis (DGGE)

Wenn doppel-strängige DNA steigenden, denaturierenden Bedingungen ausgesetzt wird (Harnstoff, Formamid, Temperatur), trennen sich Teile des Doppelstrangs, er schmilzt. Beide Stränge sind aber immer noch in anderen Abschnit-

## Einleitung

ten verbunden, die einen höheren GC%-Gehalt haben. Diese Auftrennung des Doppelstranges führt zu einer raschen Hemmung der elektrophoretischen Mobilität. Bei Vorliegen einer Mutation, ist die benötigte Konzentration an denaturierendem Agens verändert. Die Verlangsamung der Mobilität in der Elektrophorese unterscheidet sich dementsprechend für die beiden Moleküle, und das mutante Molekül kann durch ein variiertes Bandenmuster entdeckt werden. Das Gel wird mit einem steigenden denaturierenden Anteil (Formamid/Harnstoff) gegossen und läuft bei 60°C konstant. Die chemische Komponente kann durch unterschiedliche Temperaturbedingungen ersetzt werden und wird dementsprechend TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) genannt. Mit Hilfe von DGGE können DNA-Fragmente zwischen 100-500bp untersucht werden. Eine wichtige Modifikation, um die Erfassung der Mutationen zu verbessern, ist eine mit Hilfe von PCR und spezifischem Primer mit erhöhtem Schmelzpunkt kreierte GC-Sequenz an einem Ende des zu untersuchenden Fragments. Dadurch befindet sich das zu untersuchende Fragment in einer niedrig schmelzenden Domäne und es können fast alle, statt nur ca. 50% der Mutationen entdeckt werden (50). Diese Methode benötigt eine spezielle elektrophoretische Ausstattung. Die erforderliche Synthese einer teuren GC-reichen 40bp-Sequenz und arbeitsaufwändige Vorprüfungen, machen diese Methode vergleichsweise ungeeignet.

### c) Einzelstrang Konformations-Polymorphismus (Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP))

Der Einzelstrang Konformations-Polymorphismus (SSCP) wurde erstmals 1989 von Orita et al. (51) beschrieben, um bekannte Mutationen und Polymorphismen oder auch unbekannte Mutationen zu identifizieren. Die einfache Anwendung und die Vielseitigkeit, kombiniert mit einem hohen Entdeckungspotential (ca. 80% (52)) von Mutationen, macht diese Methode sehr geeignet für die Untersuchung von DNA-Fragmenten.

Für diese Methode werden normale (Wildtyp) DNA und mutierte DNA mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert, anschließend denaturiert und zuletzt wird eine Elektrophorese in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel durchgeführt. Die beiden Einzelstränge, von jedem denaturierten PCR-Produkt, nehmen eine dreidimensionale Konformation an, die von der Primär-

## Einleitung

Sequenz abhängig ist. Falls eine Mutation vorliegt, kann sich dies eventuell in einem unterschiedlichen Bewegungsablauf eines oder beider DNA-Stränge zeigen. Das Prinzip der SSCP-Analyse ist in Abbildung 5 schematisch gezeichnet (53). Falls diese unterschiedlichen DNA-Banden vorliegen, müssen die PCR-Produkte mit Hilfe der DNA-Sequenzierung genau untersucht werden, um die genaue Art und Lokalisation der Mutation festzustellen.

## Einleitung

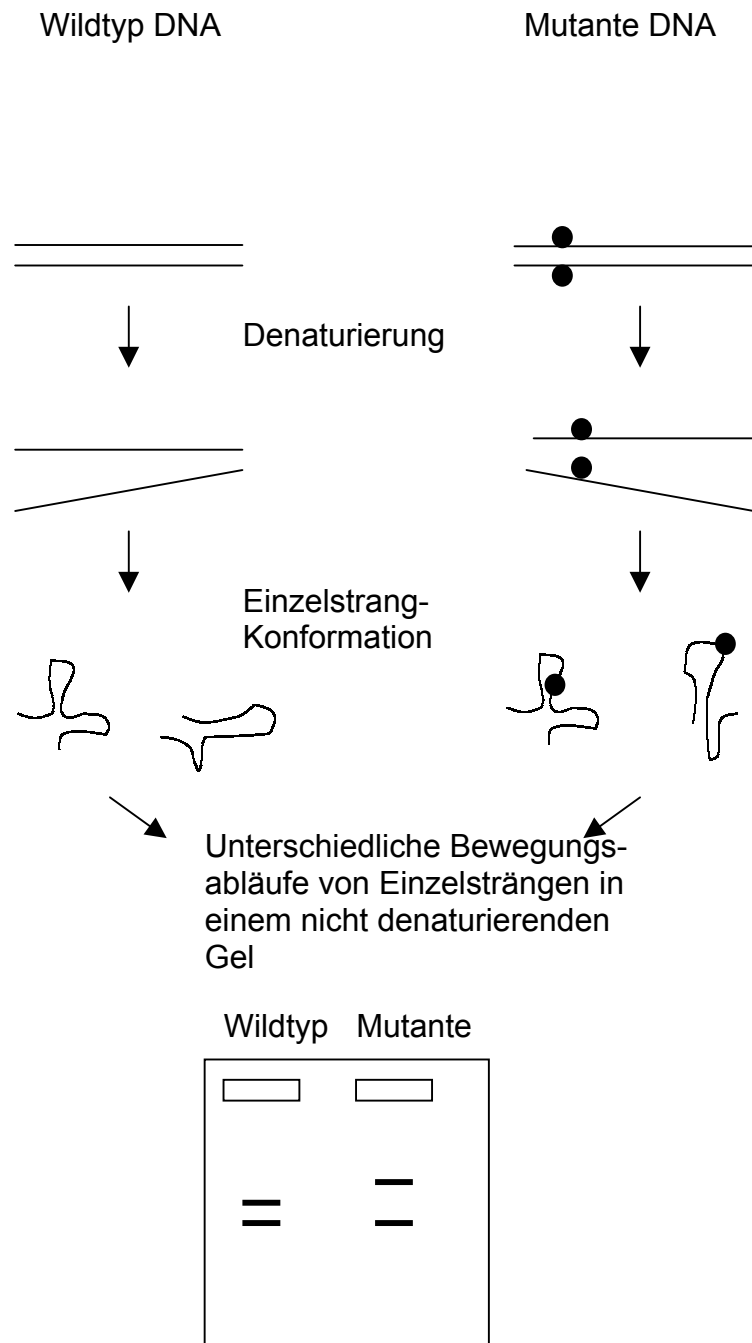


Abbildung 5: Das Prinzip der „Single Strand Conformation Polymorphismus“ (SSCP)-Analyse.

Das ursprüngliche Protokoll von Orita et al. ist vielfach modifiziert worden, in dem Parameter betreffend Gelmatrix, %-Anteil von Acrylamid und cross-linking Rate, verwendete Puffer, Temperatur und Zugabe von neutralen Stoffen wie z.B. Glycerol verändert sind. Der bevorzugte Gelparameter für die Trennung von Einzelsträngen in der Größenordnung von 200-300bp, in der die Methode

## Einleitung

am sensibelsten und zuverlässigsten ist, beträgt 12% Acrylamid (54) mit einem Quervernetzungsanteil (%C) zwischen 1 und 3 (55). Unter diesen Bedingungen werden die sogenannten „long fibre-Gele“ gebildet, die genügend Dichte besitzen, aber trotzdem eine große Poren-Matrix mit größerer Flexibilität als andere Zusammensetzungen beinhalten (56). Die Sensitivität dieser Methode vermindert sich mit dem Größenzuwachs des PCR-Produktes, und ist weniger als 50%, wenn Fragmente > 400 Basenpaare analysiert werden (53). Die Verwendung von Hydrolink-MDE-Gelen® ergibt ebenfalls gute Ergebnisse (57). Es ist berichtet worden, dass die SSCP-Analyse in Anwesenheit eines wasserlöslichen Lang-Ketten-Polymers (LCP-SSCP) optimiert wird (55). Dadurch erreicht man eine Trennung von Einzelstrang-DNA in einer kürzeren Zeit (1-3 Stunden) als übrige SSCP-Protokolle, und erweitert die Anwendbarkeit dieser SSCP-Analyse auf 400-500bp-lange DNA-Fragmente. Es ist vorgeschlagen worden, dass die Zugabe von LCP (in diesem Falle Polyethylenglycol), zusätzlich zu einer hochauflösenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese, die Einzelstrang-Auflösung verbessert (56). In vielen Untersuchungen wurde Radioaktivität ( $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$  markiertes dCTP) verwendet (53). In diesem Falle wurde statt einer radioaktiven Untersuchung ein hochauflösendes Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese System mit nachfolgender Silber-Färbung nach Budowle durchgeführt (58).

In dieser Arbeit wird SSCP unter zwei Bedingungen durchgeführt; zum einen wird SSCP mit der LCP (Polyethylenglycol PEG-SSCP) in sogenannten Minigelen durchgeführt, zum anderen ohne LCP in sogenannten ultradünnschichtigen Gelen.

### d) Heteroduplex-Analyse (HA)

Die Heteroduplex-Analyse wird oft als SSCP-Zwillings-Methode bezeichnet. Beide Methoden sind schnell, haben eine einfache Anwendung und beide ergänzen sich, wenn sie zusammen angewendet werden. Das physikalische Prinzip von HA ist wieder eine Konformationsänderung, aber diesmal in der Doppelstrang-DNA. Die Heteroduplexmoleküle werden während der Denaturierung und anschließender Renaturierung der PCR-Reaktion gebildet. Sie werden mit Hilfe der PAG-Elektrophorese sichtbar gemacht. Die klassische HA benutzt nicht denaturierende Konditionen für die Elektrophorese. Die Gele sind entweder Po-

## Einleitung

lyacrylamidgele, Hydrolink-MDE-Gele™ oder Hydrolink-D500-Gele (59). Wie bei SSCP beträgt die optimale Länge für die zu analysierenden DNA-Fragmente 200-300bp. (60). Es ist gezeigt worden, dass die elektrophoretische Mobilität von Heteroduplex-Molekülen mit der gleichen Art von Nukleotidaustausch von der benachbarten Frequenz abhängt (61). Die modifizierte HA-Methode von Ganguly et al. (62), die Conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE), verwendet denaturierende Substanzen wie Formamid und Ethylenglycol sowohl in der Probenzubereitung als auch in den „long-fibre“-Gelen (10% Acrylamid, %C=1). Unter milden denaturierenden Bedingungen wird bei einem Basenaustausch eine Biegung der Doppelhelix bewirkt; es kommt zu einem besser nachweisbaren Mobilitätsunterschied von DNA-heteroduplex- und homoduplex-Molekülen während der Gel-Elektrophorese (Abbildung 6, Punkt 2, sog. „Bend“).

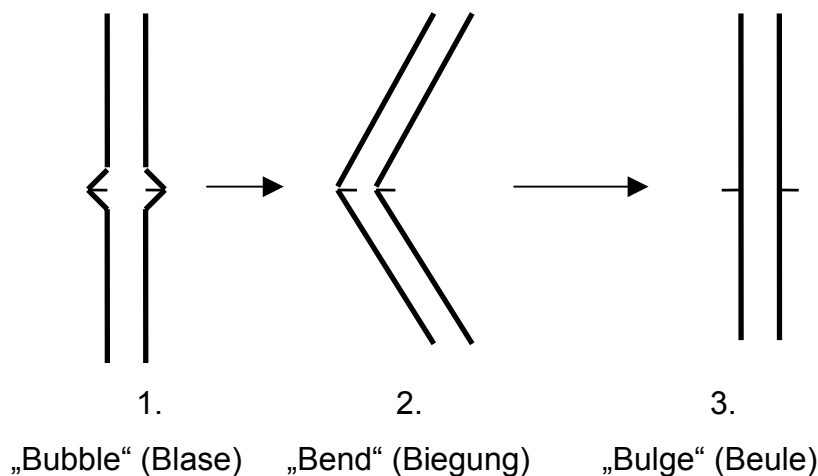


Abbildung 6: Das Prinzip der Erfassung von Heteroduplexmolekülen mittels CSGE-Molekülen.

Durch erhöhte Konzentration von denaturierenden Komponenten kommt es dagegen zu einer Rotation beider betreffenden Basen aus der Doppel-Helix hinaus, und entsprechend ist die Nachweismöglichkeit von vorhandenen Hetero- bzw. Homoduplex-Molekülen im Gel geringer (Abbildung 6, Punkt 3, sog. „Bulge“). Ebenfalls führt eine Blasenbildung (Abbildung 6, Punkt 1, sog. „Bubble“), wo beide falsch gepaarten Basen in der Doppelhelix verbleiben, nicht zu einer

## Einleitung

genügenden Änderung der Konformation, um eine elektrophoretische Mobilitätsänderung zu bemerken (62).

Diese Methode kann sehr effektiv für Fragmente zwischen 200 und 800bp eingesetzt werden. Eine Schwachstelle ist aber, dass eine Mutation sich weniger als 50bp vom Fragmentende befinden sollte (62).

Die Vorteile und Nachteile von HA sind der von SSCP sehr ähnlich. Diese Methode ist technisch einfach mit einer nicht radioaktiven Sichtbarmachung der DNA, und weist in Kombination mit SSCP fast 100% der Mutationen nach.

### e) Carbodiimid-Methode

Diese Methode findet wenig Anwendung außerhalb des Labors, da diese Methode optimiert hat. Sie wird hauptsächlich verwendet, um Mutationen in Kollagen-Genen zu finden (63).

Carbodiimid, das ursprünglich verwendet wurde, um die Struktur von RNA zu analysieren, reagiert spezifisch mit fehlgepaarten G- und T- Nukleotiden in dem DNA-Molekül (64). Wenn sich das umfangreiche Carbodiimid-Molekül an eine dieser fehlgepaarten Basen haftet und anschließend eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente mit normaler und mutierter Sequenz erfolgt, zeigt das mutierte Fragment, verglichen mit normalen Kontrollen, eine herabgesetzte Migration. Theoretisch sollte diese Methode 100% aller Mutationen entdecken, da Mutationen der A- und C-Basen, G- und T-Basen an dem komplementären Strang ungepaart hinterlassen.

### f) Chemische Spaltung von falsch gepaarten Nukleotiden (Chemical Cleavage of Mismatch)

Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass fehlgepaarte C-Basen in Heteroduplex-Molekülen spezifisch mit Hydroxylamin und T-Basen in Heteroduplex-Molekülen spezifisch mit Osmium-Tetraoxiden reagieren. Mutationen in G oder A können am komplementären Strang entdeckt werden. Der Reaktion der beiden Chemikalien mit den fehlgepaarten Basen wird nach der Interaktion mit Piperidin, das die Phosphodiesterbindung an den fehlgepaarten Nukleotiden spaltet, festgestellt. Die Produkte dieser chemischen Spaltung werden elektrophoretisch aufgetrennt, und die Größe der entstandenen Fragmente indizieren den Sitz einer Mutation (65). Die Markierung und Sichtbarmachung der DNA-

## Einleitung

Fragmente erfolgt radioaktiv mit Hilfe der Silberfärbung nach Budowle (66), oder mit Hilfe von fluoreszierendem markiertem Primer und anschließendem automatischem Sequenzieren mit Laseranregung (67,68). Der größte Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensibilität (fast 100%). Die Position einer Mutation kann direkt abgeleitet werden; die benötigten Chemikalien sind leicht zugänglich und billig. Außerdem können große Fragmente (1kb) direkt untersucht werden. Die benötigten Chemikalien sind aber toxisch, und die Methode erfordert viele Manipulationen. Die nicht radioaktive Variante zeigt eine niedrigere Sensibilität auf.

### g) Enzymatische Spaltung von falsch gepaarten Nukleotiden (Enzymatic Cleavage of Mismatch)

Das Prinzip einer enzymatischen Spaltung von Fehlpaarungen ist die enzymatische Hydrolyse von Phosphordiesterbindungen der fehlgepaarten Nukleotide. Es gibt verschiedene Gruppen von Enzymen, die hier einsetzbar sind.

- Ribonuklease A-Rnase A hydrolysiert Phosphordiesterbindungen der Pyrimidine in Einzelstrang-RNA. Mit Hilfe von elektrophoretischer Auftrennung können kleinere Fragmente als Zeichen von Fehlpaarungen nachgewiesen werden. Die existierende Variante dieses Tests benutzt eine PCR mit speziellem Primer, über den T7- und SP6- Sequenzen am 5'-Ende eingebaut werden. Diese Amplifikate werden in vitro transkribiert und die entstandene Doppelstrang-RNA wird bei 68°C inkubiert, um Heteroduplex-Moleküle zwischen Wildtyp und Mutante zu entwickeln. Die entstandenen Heteroduplex-Moleküle werden mit Rnase A inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Sichtbarmachung erfolgt mit Ethidiumbromid. Die zu untersuchenden Proben können eine Länge von 1kb haben. Die Sensitivität dieser Methode beträgt ca. 60-80%, aber genaue Studien fehlen noch (69).
- SI-Nuklease wird spezifisch für Einzelstränge eingesetzt und führt zu einer Degradierung der Nukleinsäuren. Dieses Enzym kann multiple Substitutionen und Insertionen/Deletionen entdecken, ist aber für Punktmutationen nicht geeignet.
- T4 Endonuklease VII: dieses Enzym besitzt die Möglichkeit, ungewöhnliche DNA-Strukturen (z.B. kreuzförmige DNA-Strukturen) aber auch einzelne Basenfehlpaarungen zu entdecken (70).



## Einleitung

Diese Methode ist ebenfalls begrenzt einsetzbar, da Studien über die Sensibilität fehlen.

### h) Restriktionsendonuklease-Analyse

Als Restriktionsendonukleasen bezeichnet man eine Gruppe von bakteriellen Enzymen, die DNA sequenzspezifisch spalten. Sie sind Teil eines vom jeweiligen Organismus kontrollierten Restriktions-Modifikationssystems. Sie wurden von Arbel (1962) zufällig entdeckt, als er versuchte, Phagen in unterschiedlichen Wirtsbakterien wachsen zu lassen. Bei einem Wirtswechsel funktionierten zwar die ersten Schritte der Infektion, nämlich die Absorption und die Penetration, die eingedrungene DNA wurde aber von dem neuen Wirt als fremd erkannt und enzymatisch hydrolysiert. Die DNA der Phagen unterlag einer Restriktion. Zur Abwehr von Fremd-DNA, die durch Phageninfektion, Konjugation oder Transformation in die Bakterien eingebracht werden, produzieren Bakterien Restriktionsendonucleasen, die eine Tetra-bis Hexanucleotid-Folge erkennen und die DNA an dieser Stelle oder in ihrer Nähe hydrolysieren<sup>6</sup> (71). In dem Wirt geschehen zwei Prozesse; einerseits verfügt dieser Wirt über einen Mechanismus (die Restriktion), der die biologische Aktivität der Phagen vermindert, andererseits kann er über einen zweiten Mechanismus (die Modifikation) einige der infizierenden DNA-Moleküle so verändern, dass sie eine nachfolgende Infektion auf dem gleichen Wirt effizient vollziehen können. In Arbeiten von Arber (72) und Meselson (73) konnte gezeigt werden, dass das Phänomen der Restriktion auf der Spaltung der fremden DNA durch sog. Restriktionendonukleasen und das der Modifikation auf einer Methylierung der DNA beruht. Mit der Methylierung bestimmter Basen an der Erkennungsstelle der Endonukleasen schützt der Organismus seine eigene DNA vor der Verdauung durch diese Enzyme; er erwirbt Immunität.

Heute gebraucht man diesen Ausdruck im übertragenen Sinn für das Fragmentieren von DNA. Ein Restriktionssystem besteht immer aus zwei enzymatischen Elementen, einer Nuklease und einer Methylase. Man unterscheidet drei Arten von RE, die Typen I, II, und III (74)

---

<sup>6</sup> schneiden

## Einleitung

Die Enzyme in Klasse I und III benötigen zur DNA-Hydrolyse NAD oder ATP als Kofaktor, während die Nukleasen der Klasse II Kofaktor unabhängig sind. Ebenso ist bei Klasse I und III die Restriktions- und Modifikationsaktivität in einem Proteinkomplex vereinigt, während die Enzyme der Klasse II nur eine nukleolytische Aktivität besitzen. Die Nukleasen II spalten die DNA sequenzspezifisch, und bei II und III sind Enzymbindestelle und Hydrolyse-Ort identisch oder benachbart. Bei Klasse I-Enzymen können zwischen Erkennungsstelle und Schnittstelle mehr als 1000 Nukleotide liegen. Für die Gentechnik sind nur die Enzyme der Klasse II von Bedeutung (71).

Über 10 000 Bakterien von angelegten Kultursammlungen, Krankenhäusern, Boden- und Wasserproben von der ganzen Welt sind untersucht worden, um neue Restriktionsenzyme zu finden. Von diesen sind ca. 2500 Enzyme gefunden worden (75). Die Nomenklatur der RE leitet sich von den Organismen ab, aus dem das Protein isoliert wurde. Als nächstes folgt evtl. die Stammbezeichnung, und die Zahl listet die Enzyme in der Reihenfolge ihrer Isolierung auf.

Restriktionsenzyme erkennen vier, fünf oder sechs Basenpaare innerhalb einer DNA-Sequenz, wenn diese palindromisch<sup>7</sup> angeordnet sind. Die Hydrolyse der Phosphorsäurediesterbindung in beiden Strängen kann symmetrisch oder um bis zu vier Nukleotide versetzt ablaufen.

Die Restriktionendonukleasen können in der Mutationsanalyse erfolgreich eingesetzt werden. Da diese Enzyme bestimmte Sequenzen erkennen und spalten können, führt eine Mutation und die veränderte Sequenz dazu, dass im Falle eines Verlustes dieser Schnittstelle eine Spaltung der mutierten DNA nicht stattfindet. Im Falle einer neu entstandenen Schnittstelle wird es nur die mutante DNA schneiden. Restriktionsenzyme werden für den Nachweis von Polymorphismen eingesetzt. Sie haben eine weite Verbreitung bei der Entstehung von genetischen Markern und in der diagnostischen Untersuchung bekannter Mutationen. Die Verwendung bei unbekanntem Mutationen ist begrenzt, da weniger als 50% aller Mutationen mit Hilfe der Restriktionsanalyse entdeckt werden können (76).

---

<sup>7</sup>Palindrom: Ein Palindrom ist ein Wort oder Satz, der vorwärts oder rückwärts die gleiche Bedeutung ergibt.

## Einleitung

- i) Restriction Endonuclease Fingerprinting (REF), dideoxy Fingerprinting (ddF) und Directed Termination PCR (DT-PCR).

Diese drei Techniken gehören zu einer neuen Generation kombinierter Anwendungen von Mutationsanalyse-Techniken. Man versucht dadurch, 100% aller Mutationen zu entdecken und DNA-Fragmente bis Kilobasengröße zu untersuchen. Diese Methode basiert auf einer Kombination von SSCA und einer enzymatischen Reaktion, die für SSCA geeignete DNA-Fragmente herstellt. Dies erfolgt durch multiple Restriktionsverdauung für REF, Primerverlängerung und Primerbeendigung mit einem Dideoxy-Terminator für ddF oder direkte Termination an einem der vier Nukleotiden während der PCR im Falle von DT-PCR.

Die multiplen Kopien, die durch die enzymatischen Reaktionen entstehen, decken verschiedene Regionen des DNA-Fragmentes ab und werden anschließend mit Hilfe von SSCP untersucht. Diese Methoden werden als „Fingerprinting“ bezeichnet, da die entstandenen unterschiedlichen Fragmente eine einzigartige Signatur der zu untersuchenden Sequenz ergeben.

REF ist eine Kombination von RA mit 5-6 verschiedenen Restriktionsendonukleasen und SSCA (77). Die individuellen Restriktionsansätze werden gemischt, die Produkte werden an einem Ende markiert, denaturiert und in nicht denaturierenden Acrylamidgelen aufgetrennt. Die unterschiedlichen Bandenmuster können dann aufgrund einer unterschiedlichen Tertiärstruktur der DNA (SSCA-Komponente) oder durch eine mit Hilfe von RA entdeckte Variation in der Sequenz erklärt werden. Diese Art von Analyse entdeckt nahezu 100% aller Mutationen. Die Nachteile dieser Methode sind die benötigte Auswahl von Restriktionsendonukleasen, spezifisch für jedes DNA-Fragment, die komplizierte präzise Einschätzung von Konzentrationen, die in jeder individuellen Reaktion benötigt werden, so dass jede Reaktion die gleiche Signalstärke nach der Sichtbarmachung der DNA aufweist. DdF ist eine Kombination von SSCP und der Sanger Sequenz-Methode und beruht auf einer Gelelektrophorese von Sequenzprodukten die mit einem einzelnen dideoxy-Nukleotid (ddG) (78) erhalten wurden. DdF kann ebenfalls ca. 100% aller Mutationen entdecken.

Directed Termination-PCR stellt PCR-Fragmente von einer spezifischen Sequenz für die Analyse in denaturierenden oder nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen dar (79). Der direkte Kettenabbruch während der PCR erfolgt durch das Einsetzen eines der vier Nukleotide in einer suboptimalen Konzentration.

## Einleitung

Diese Konzentration sollte 5-10-mal niedriger als die der anderen Nukleotide sein. Die Sichtbarmachung erfolgt durch die Inkorporation eines <sup>35</sup>S-markierten Analogons des limitierten Nukleotids. Die Sensibilität beträgt nahezu 100%

### j) Protein Truncation Test (PTT)

Der größte Anteil der identifizierten Mutationen im BRCA 1-Gen führt zu einem verkürzten, nicht funktionsfähigen Protein (80). Solche Mutationen beinhalten kleine Deletionen und Insertionen, Nukleotidsubstitutionen oder Spleiß-Variationen (81).

Kleine Deletionen und Insertionen, die nicht durch drei teilbar sind, führen zu Leseraster-Verschiebungen<sup>8</sup>, die in den meisten Fällen zu vorzeitigen Stop-Codons führen, die wiederum zu einem Translationsende und verkürzten Proteinprodukt führen (82). Diese Mutationen, zusammen mit Spleißvariationen und Nonsense-Mutationen<sup>9</sup>, können bei Vorhandensein von verkürzten Translationsprodukten mit Hilfe des PTT (Protein Truncation Test) nachgewiesen werden (80,83). Dies ist eine der elegantesten molekularbiologischen Methoden, Mutationen in Proteinen zu entdecken. Die PTT-Methode nutzt die Amplifikation von genomischer DNA oder RNA (mit Hilfe von RT-PCR) mit einem Vorwärts-Primer, der einen T7-Polymerase-Promoter<sup>10</sup> beinhaltet und eine eukaryotische Translations-/Initiations-Sequenz.

Eine in vitro stattfindene Transkription und Translation von PCR-Produkten und eine nachfolgende SDS-PAGE-Analyse wird ein normales (Wildtyp)- Protein-Fragment von einem verkürzten („truncated“)- Protein-Fragment in einer he-

---

<sup>8</sup> Leseraster-Verschiebung (frameshift): Eine Veränderung der Codonfolge in einem Gen entsteht durch Addition (Insertion) bzw. durch Verlust (Deletion) von 1 (oder 2) Nukleotiden. Der Triplet-Takt, mit dem die Information bei der Proteinsynthese übersetzt wird, hat eine andere Bedeutung bekommen; das normale Leseraster ist verändert. Knippers R. (1997): Molekulare Genetik: Thieme Verlag; pp. 274-275.

<sup>9</sup> Nonsense- oder Leseraster-Mutation: „Sinn“-Codons können durch Nucleotidaustausch in „Unsinn“-oder „Stop“-Codons umgewandelt werden, solche „nonsense“-Mutationen sind durch die Synthese unvollständiger Proteinfragmente gekennzeichnet, denn das im Inneren der mRNA liegende Terminationscodon zwingt den Proteinsyntheseapparat zum Halt und zur Freisetzung des bis dahin gebildeten Peptidfragments. Knippers R. (1997): Lehrbuch der Genetik: Thieme Verlag; pp. 273-274.

<sup>10</sup> Ein Promotor ist eine DNA-Region, an welche die bakterielle RNA-Polymerase als Voraussetzung zur Initiation der Transkription eines prokaryotischen Gens oder einer Gruppe von Genen (sog. Operons) binden muß. Er ist Teil eines größeren DNA-Abschnittes, der sog. Transkriptionseinheit, die neben dem Promotor die kodierenden Regionen sowie einen Terminator enthält. Winnacker E.L. (1985): Gene und Klone-Eine Einführung in die Gentechnologie: VHC Verlagsgesellschaft mbH; pp.191-193.

## Einleitung

terozygoten<sup>11</sup> Probe unterscheiden. Wenn man die Größe des verkürzten Protein-Fragments abschätzt, kann man berechnen, in welcher Region die „Non-sense“ - oder Leseraster-Mutation vorkommt; eine direkte Sequenzierung dieser Region wird die genaue Art der Mutation identifizieren (84).

Matritzen-DNA-Stränge für den PTT werden mit Hilfe der PCR hergestellt, indem man cDNA<sup>12</sup>, die mit Reverser-Transkriptase aus mRNA (RT-PCR) synthetisiert wird, vervielfältigt. Alternativ kann genomische DNA eingesetzt werden, vor allem dann, wenn man es mit einer langen zusammenhängenden Sequenz wie z.B. dem Exon 11 des BRCA1-Gens zu tun hat. Hier gibt es keine Introns, die sonst bei der PCR mit amplifiziert werden und die Reaktion stören würden. Während der PCR wird eine 36 Basenpaare lange Verlängerung an dem Ende zugefügt, das mit dem Aminoende korrespondiert. Dieses Stück kodiert für die Bakteriophagen-T7 Promoter-Sequenz und ein eukaryotisches Translations-Initiations-Signal. Die gleichzeitig stattfindene Transkription und Translation der amplifizierten Produkte findet in einem Kaninchen-Reticulozyten-Lysat-System mit Hilfe von radioaktiv markierten Aminosäuren statt. Es gibt zusätzlich eine kommerziell erhältliche, nicht-radioaktive Variante dieser Methode, basierend auf dem Einsatz von biotinmarkierten Aminosäuren. Die Translationsprodukte werden anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE aufgelöst und mit Autoradiographie nachgewiesen (85). Mit Hilfe dieser Methode können Fragmente mit einer Länge von 2-3kb untersucht werden. Viele Mutationen des BRCA1- Gens wurden mit Hilfe des PTT gefunden (80). Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der PTT-Methode.

---

<sup>11</sup>Heterozygote: Ein Individuum mit einem Paar verschiedener Allele eines bestimmten Gens. Verschiedene Allele können durch Mutation in einem der beiden Allele entstehen. Winnacker E.L. (1985): Gene und Klone-Eine Einführung in die Gentechnologie: VHC Verlagsgesellschaft mbH, Appendix C, Glossar der Gentechnologie

<sup>12</sup> cDNA: eine DNA, die von der mRNA als Matrize kopiert wurde (copy-DNA), Gassen H.G., Martin A., Bertram S. (1996): Gentechnik-Einführung in Prinzipien und Methoden: Gustav Fischer Verlag; Kap.17: Glossar.

# Einleitung

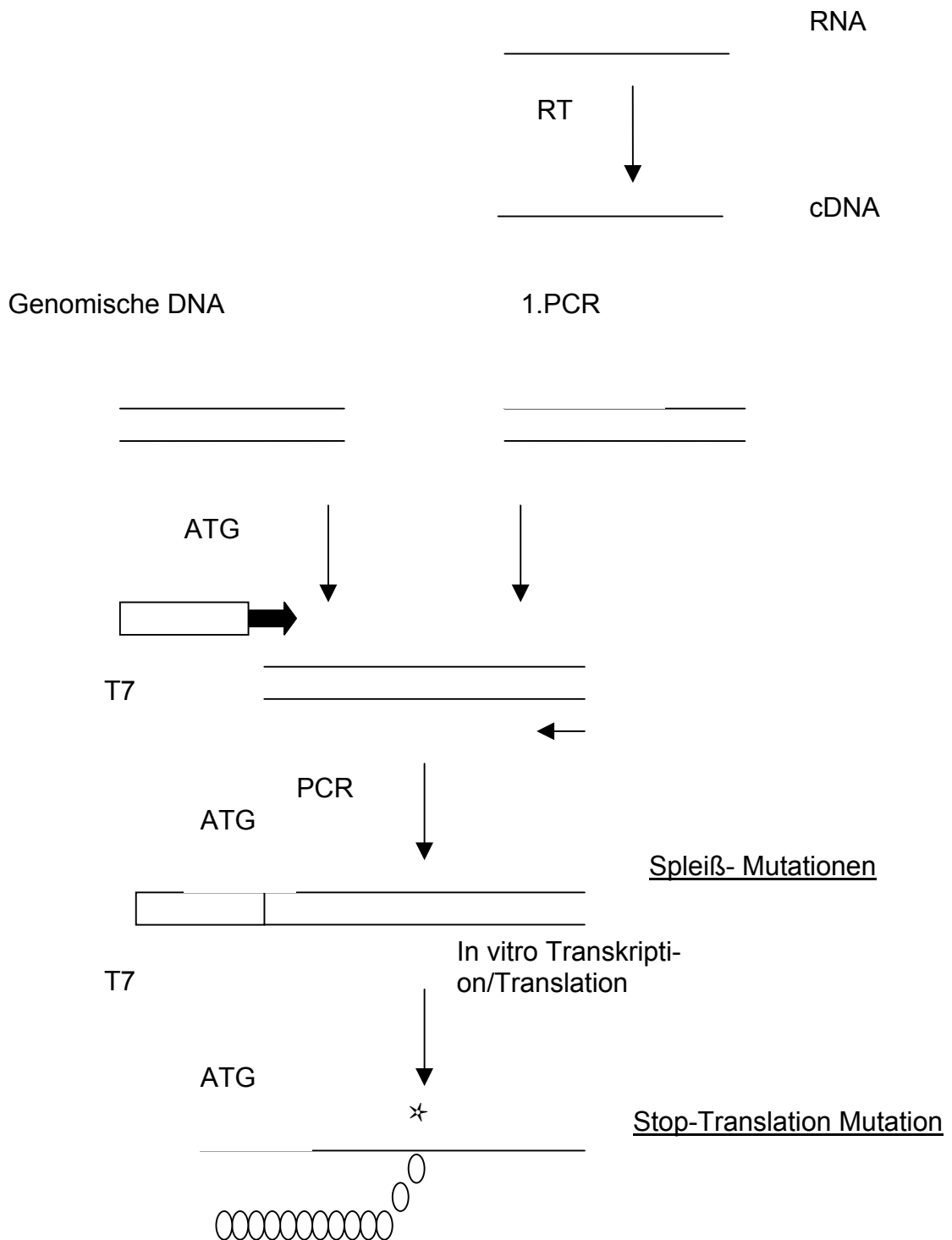


Abbildung 7: „Protein Truncation“-Test (PTT).

Die genomische Struktur des BRCA1-Gens ist kompliziert und der schnelle Nachweis von Mutationen ist eine technische Herausforderung (86,87). Diese Probleme müssen gelöst werden, falls Krankenhäuser und Krebskliniken mit

## Einleitung

DNA-Tests versorgt werden sollen. Von den verschiedenen Genveränderungen im BRCA1-Gen, die bis jetzt publiziert sind, führen 87% zu verkürzten Proteinen als Folge einer „Nonsense“- oder Leseraster-Mutation und daher scheint das Einsetzen von PTT sehr sinnvoll (14).

### 1.6 Aufgabenstellung und Ziele

Zu der vorliegenden Arbeit sollte die Mutationen eukaryoter Gene analysiert werden. Die Analyse erfolgt im Rahmen einer Studie von insgesamt 35 bulgarischen Patientinnen mit Mamma-und/oder Ovarialkarzinom. Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines schnellen und zuverlässigen Verfahrens für die Mutationsanalyse des BRCA1-Gens, um möglichst alle Sequenz-Veränderungen des BRCA 1-Gens zu erfassen. Diese Arbeit kann wie folgt gegliedert werden:

- \* Die PTT-Analyse und die spezifische Anwendung für das BRCA 1-Gen.
- \* Eine Optimierung von existierenden Techniken (SSCP und CSGE)
- \* Ein Vergleich zwischen verschiedenen SSCP-Formaten
- \* Ein Vergleich zwischen SSCP und CSGE

Im Laufe der Untersuchung der kompletten kodierenden Sequenz des BRCA1-Gens bei 35 Brustkrebs-Patientinnen und 70 Kontrollen aus Bulgarien wurden fünf Polymorphismen entdeckt, L→P871, E→G1038, K→R1183, S→P1431 und S→G1613, die zwei verschiedene Haplotypen bilden. Der seltene Haplotyp wurde als *BRCA1\** bezeichnet, es wurde eine vergleichende Studie über deren Verteilung in der Patientinnen- und Kontrollgruppe durchgeführt. Alle fünf genannten Polymorphismen führen zu Aminosäure-Substitutionen. Dadurch ist zu erwarten, dass die beiden Haplotypen unterschiedliche Proteinisoformen bilden. Beim Versuch, einen funktionellen Unterschied dieser Haplotypen zu entdecken, wurde eine Vorhersage-Analyse der Sekundärstruktur (PHDsec algorithm) der BRCA1 und BRCA1\* Protein-Isoformen durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Klinische Auswahl von Patientinnen

Diese Analyse erfolgte im Rahmen einer Studie von insgesamt 35 Patientinnen aus Bulgarien mit vergleichenden Studien über unterschiedliche Analyseverfahren. Die Häufigkeit von Brustkrebs in der kaukasischen Population wird auf 43,3 in 100 000 Fällen (5) geschätzt. In der bulgarischen Population ist die Verbreitung von Brustkrebs bei Frauen mit 64,5 in 100 000 Fällen (88) deutlich höher. Für diese Studie wurde eine erste Gruppe von 21 Patientinnen über folgende zwei Kriterien ausgesucht: Zum einen wurden Patientinnen ausgesucht, die zwei oder mehrere Brustkrebsfälle in der Familie vorweisen können, oder Patientinnen die beidseitigen Brustkrebs zeigen. Zum anderen wurden nur Patientinnen mit einem Erkrankungsalter unter 50 Jahren ausgesucht.

Eine Übersicht über die Eigenschaften des untersuchten Patientinnenkollektivs gibt Tabelle 2.

Anzahl der Patientinnen	Durchschnittsalter bei der Diagnose	Unilaterales Karzinom	Bilaterales Karzinom
21	47.5	14(67%)	7(33%)

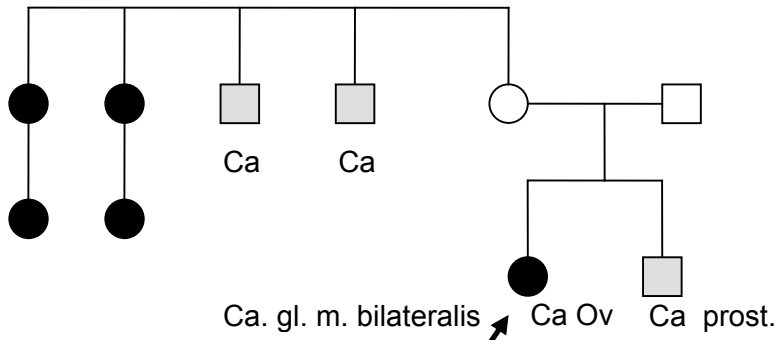
Tabelle 2: Zusammengefasste Daten der ausgewählten Patientinnen.

Die restlichen 14 Patientinnen wurden mit Hilfe von familiärer Anamnese mit Hinblick auf Mammakarzinome/Ovarialkarzinome untersucht. Hier liegen Stammbäume der Vererbung der Karzinomerkrankung vor. Die Stammbäume sind aus Abbildung 8 ersichtlich.

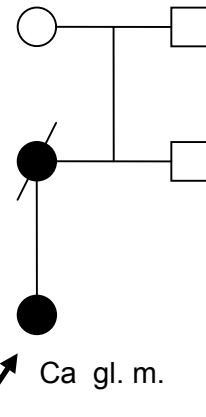
Die Patientinnen stammen vom Patientengut des National Oncology Centre und des Medical Genetics Department of the Queen Joanna University Hospital in Sofia, Bulgaria.



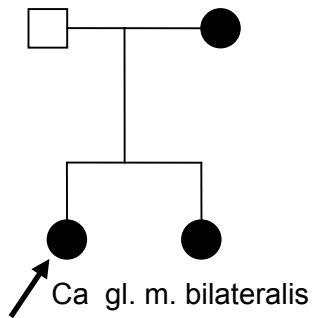
Material und Methoden



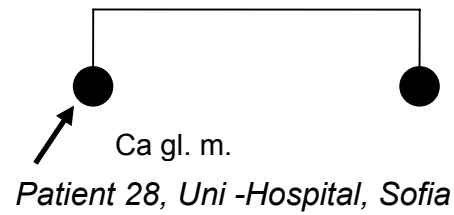
Patient 23, Uni-Hospital, Sofia



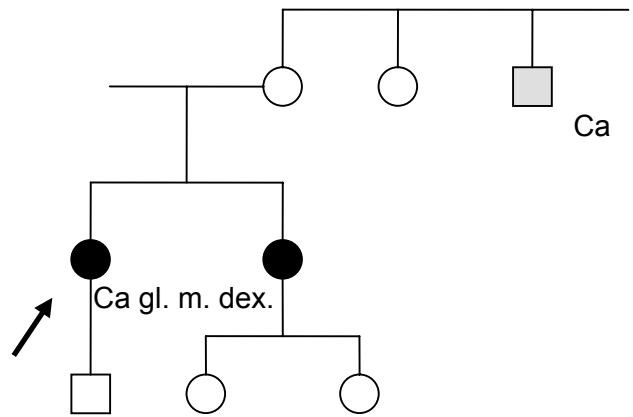
Patient 24, Uni-Hospital, Sofia



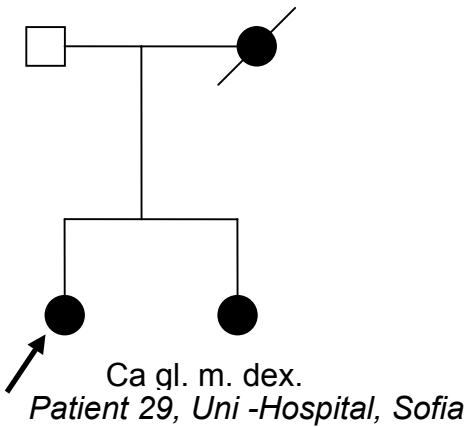
Patient 25, Uni-Hospital, Sofia



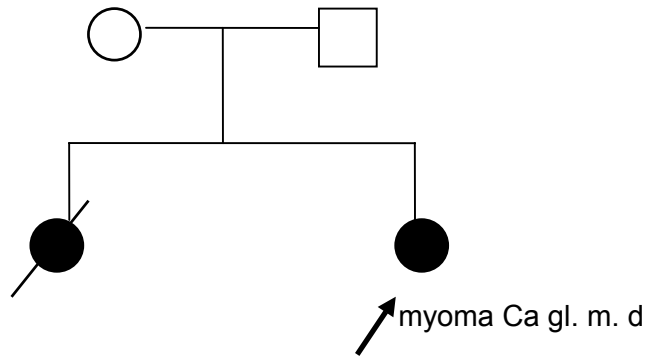
Patient 28, Uni-Hospital, Sofia



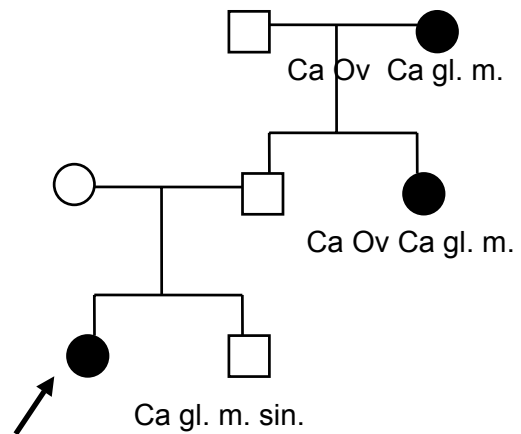
Patient 30, Uni-Hospital, Sofia



Patient 29, Uni-Hospital, Sofia

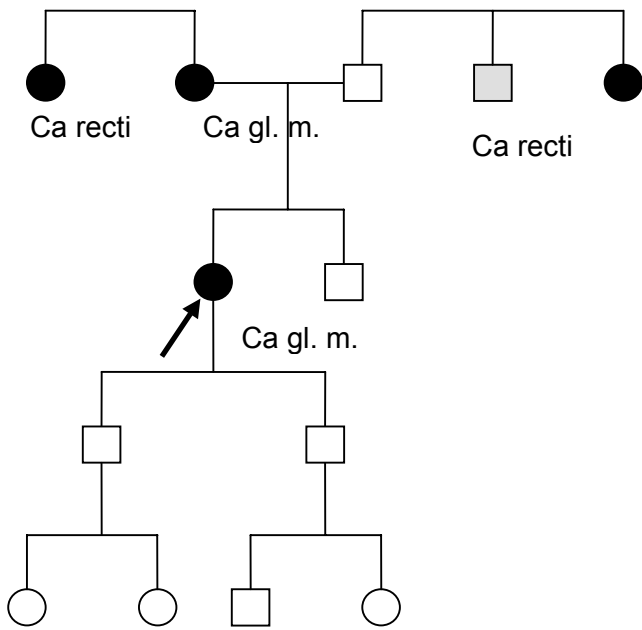


Patient 32, Uni-Hospital, Sofia

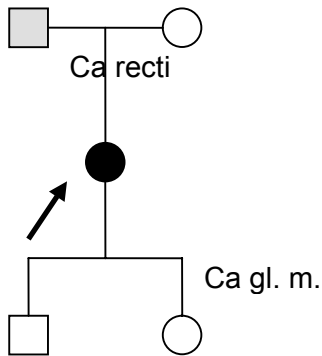


Patient 31, Uni-Hospital, Sofia

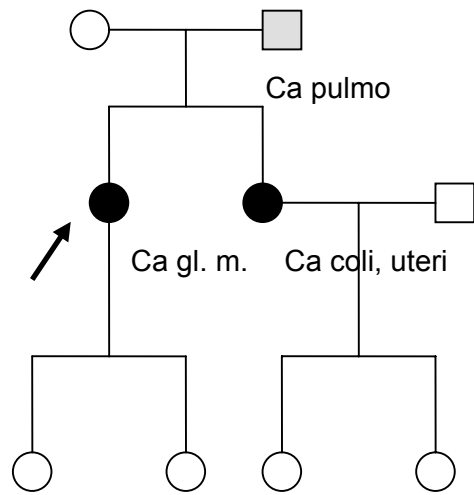
## Material und Methoden



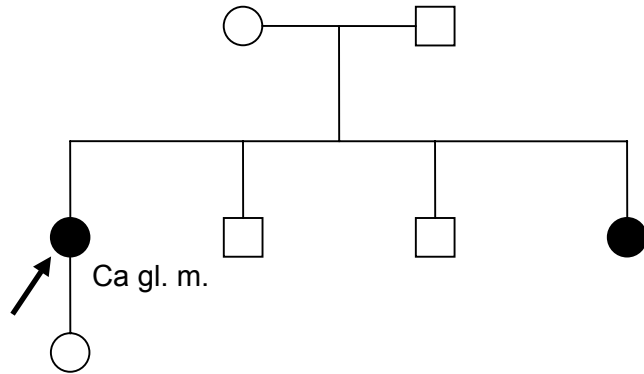
*Patient 33, Uni -Hospital, Sofia*



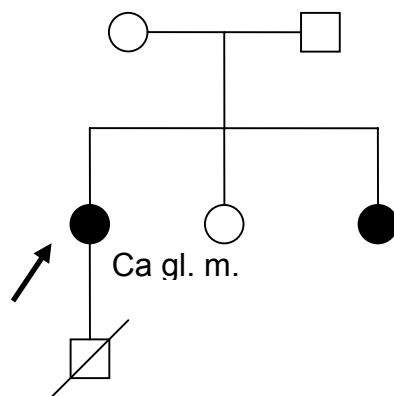
*Patient 35, Uni -Hospital, Sofia*



*Patient 34, Uni -Hospital, Sofia*



*Patient 36, Uni -Hospital, Sofia*



*Patient 37, Uni -Hospital, Sofia*

Abbildung 8: Stammbäume der untersuchten Patientinnen

(Männliche Personen sind durch Quadrate, weibliche Personen durch Kreise wiedergegeben. Schwarze Kreise zeigen Patientinnen die von einem Krebsleiden befallen sind. Männliche Betroffene sind durch graue Quadrate symbolisiert. Bei verstorbenen Patienten sind die Symbole durchgestrichen. Bei einer Reihe von Geschwistern ist links das älteste, dann das zweitälteste usw. notiert. Die Pfeile zeigen die untersuchten Patientinnen).

## Material und Methoden

### 2.1.2 Klinische Auswahl von Kontrollpatientinnen

Die zu untersuchenden 70 Kontrollpatientinnen stammen aus ADPKD- (autosomal dominant polycystische Nierenerkrankung) betroffenen bulgarischen Familien. Die ausgesuchten Kontrollen sind nicht verwandte, gesunde Frauen zwischen 20-50 Jahren ohne familiären BRCA1 Hintergrund.

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

#### DNA-Puffer

##### **TE-Puffer**

10mM Tris-HCl  
1 mM EDTA, pH 7,6

#### Elektrophorese-Puffer

##### **TBE-Puffer (10x)**

1M Tris-Borat  
0,83 M Borsäure  
10 mM EDTA, auf 1l ddH<sub>2</sub>O

##### **TAE-Puffer (50x)**

2M Tris  
1M NaAcetat  
50mM EDTA, pH 7,4, auf 1l ddH<sub>2</sub>O

##### **Tris-Glycin-Puffer (5x)**

0,25M Tris  
2,5 M Glycin, pH 8,3-8,6  
50 ml 20% SDS, auf 1l ddH<sub>2</sub>O

#### Enzympuffer

##### **Taq-Polymerase-Puffer (10x)**

0,5 M KCl  
0,1 M Tris-HCl (pH 8,3)  
0,01-0,03M MgCl<sub>2</sub>

##### **Restriktionsendonuklease-Puffer**

###### Bsr I, NEPuffer 3

100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol (pH 7,9)

###### BstN<sub>I</sub>, NEPuffer 2 + BSA

50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol (pH 7,9)  
100µg/ml BSA

###### Ear I- NEPuffer 1

10mM Bis Tris Propan-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, (pH 7,0)

###### Mnl I, NEPuffer 2 + BSA

50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol (pH 7,9)

## Material und Methoden

100µg/ml BSA

Hinf I, NEPuffer 2

50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol (pH 7,9)

### Puffer und Lösungen für die CSGE-Analyse

#### **Polyacrylamidgel (10% Acrylamid, C=1, AA:BAA=99:1; 25ml)**

7 ml ddH<sub>2</sub>O

4 ml Tris-HCOOH Puffer (600mM)

4 ml Ethylen-Glycol

10 ml Acrylamid (40%, AA:BAA=99:1)

200µl SDS (20%)

500 µl APS (10%)

50 µl TEMED

#### **Acrylamidlösung (40%, C=1, AA:BAA=99:1)**

198g Acrylamid

2g Bisacrylamid, bis 500 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

#### **Tris-HCOOH-Puffer (600mM)**

2,3 ml 88% Ameisensäure (88xHCOOH)

Tris-Base (pH 9,0), auf 100 ml ddH<sub>2</sub>O

#### **Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer**

0,5 mol/l Tris

50 mmol/l Glycin

pH 8,3-8,6

#### **Lade-Puffer (2x CSGE)**

TE-Puffer (2x, pH:9)

30% Formamid

20% Ethylen-Glycol

0,025% Bromphenolblau

### Puffer und Lösungen für die SSCP-Analyse

#### **Polyacrylamidgel für horizontale-SSCP (10% PAAG, AA:BAA=29:1; 80ml)**

44 ml ddH<sub>2</sub>O

16 ml Tris-Sulfat-Puffer

20 ml Acrylamid (40%, AA:BAA=29:1)

640 µl APS (10%)

80 µl TEMED

#### **Tris-Sulfat-Puffer (350mM)**

2,15 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

etwa 45,4g Tris-Base (pH9,0), auf 1l ddH<sub>2</sub>O

## Material und Methoden

### **Polyacrylamidgel für Polyethylenglycol-SSCP (12% PAAG, AA:BAA=39:1 C%=2,5; 20 ml)**

11,3 ml ddH<sub>2</sub>O  
2 ml 10xTris-HCOOH  
6 ml 40% Accugel (AA:BAA=39:1)  
500 µl 20% PEG (polyethylenglycol)  
200µl 10% APS  
20 µl TEMED

### **Acrylamidlösung (40%, C=2.5, AA:BAA=39:1)**

195g Acrylamid  
5g Bisacrylamid, bis 500 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

### **Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer**

0,5 mol/l Tris  
50 mmol/l Glycin  
pH 8,3-8,6

### **Ladepuffer für SSCP**

0,25 g/l Xylene-cyanol  
0,25g Bromphenolblau  
10mM EDTA, bis pH 7,5 in Formamid

### **Polyacrylamidgel für MDE-SSCP-Gel (10% PAAG; 80ml)**

20ml Serdogel™ SSCP(2x)  
4,8 ml TBE (10x)  
8,2 ml Glycerin (99.5%)  
47 ml ddH<sub>2</sub>O  
640 µl APS  
80 µl TEMED

## Puffer und Lösungen für die PTT-Analyse

### **SDS PAGE-Laufpuffer (10x)**

30g Tris-Base  
144g Glycine  
50ml 20%SDS, auf 1L ddH<sub>2</sub>O

### **20% SDS**

200g Dodecylsulfat-Natriumsalz auf 1l ddH<sub>2</sub>O

### **SDS-Proben-Puffer(2x)**

100mM Tris-HCl, pH 6,8  
4% SDS  
0,1% Bromphenolblau  
20% Glycerin  
200mM DTT

## Material und Methoden

### **Sammelgel (10ml)**

1,5ml 40% AA (39:1)  
1,25ml Tris 1M (pH 6,3)  
50µl 20%SDS  
7,5 ml ddH<sub>2</sub>O  
100µl 10%APS  
10µl TEMED

### **Trenngel (40ml)**

12 ml 40% AA (39:1)  
10 ml Tris 1,5M (pH 8,8)  
200µl 20%SDS  
17,5 ml ddH<sub>2</sub>O  
400 µl 10%APS  
40 µl TEMED

## Lösung für die nicht radioaktive Sequenzierung

### **Sequenzgel (6.75% AA, AA:BAA=19:1)**

25,9 ml ddH<sub>2</sub>O  
3,6 ml 10x TBE (Endkonzentration 0.6xTBE)  
25,2g Harnstoff  
0,1 ml 40% Acrylamidlösung (AA:BAA=19:1)  
210µl APS  
53µl TEMED

## Puffer für die Isolierung von DNA aus kernhaltigen Zellen mittels NaCl

### **Lysis-Puffer für Isolation von DNA aus kernhaltigen Zellen mittels NaCl**

155mM (8,29g) NH<sub>4</sub>Cl  
10mM (1,00g) KHCO<sub>3</sub>  
0,1mM (0,034g) Na<sub>2</sub>EDTA  
auf 1l ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4 (HCl/NaOH)

### **SE-Puffer für Isolierung von DNA aus kernhaltigen Zellen mittels NaCl**

75mM (4,39g) NaCl  
25mM (8,41g) Na<sub>2</sub>EDTA  
pH 8,0 (NaOH)

## Div.-Lösungen

### **DNA-Standard-Leiter (für TBE-Elektrophorese)**

15 µl DNA-Leiter (100bp)  
35µl TE-Puffer (1x)  
40µl TBE-Puffer (1x)  
10µl Ladepuffer (mit Glycerol)

**BPB-Lösung (mit Glycerol) für Agarose / Acrylamidgel-Elektrophorese**

10mM Tris

1mM EDTA

50% Glycerol

0,025 g/l Bromphenolblau

pH 7,0

**Ethidiumbromidlösung 1%**

10 mg/ml Ethidiumbromid in aqua dest.

**Silberfärbung nach Budowle**

1. Oxidierer (1% HNO<sub>3</sub>)

15,4 ml 65% HNO<sub>3</sub>, auf 1l ddH<sub>2</sub>O

2. Silberlösung

0,012 M AgNO<sub>3</sub>, auf 1l ddH<sub>2</sub>O

3. Entwickler

0,28 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

0,185g/l Paraformaldehyd, auf 1l ddH<sub>2</sub>O

4. Stop-Lösung (5% Essigsäure)

5. Konservierungs-Lösung (5% Glycerol)

## Material und Methoden

### 2.1.4 Bezugsquellen der Chemikalien und Enzyme

Acrylamid purum, (Roth)

Acrylamidlösung , 40%, AA:BAA=29:1, (Accugel, National diagnostics Atlanta)

Agarose, (Eurogentec)

Ameisensäure, HCOOH,88%, (Merck)

APS, Ammoniumperoxidisulfat, (BIO-RAD, Bio-Science research-products)

Bisacrylamid cryst., N,N'-Methylene bisacrylamide (Serva)

Borsäure, (Merck)

Bromphenolblau, (Serva)

Chloroform, (Roth)

DEPC-Wasser, (Sigma)

DNA-Leiter:

100bp: MBI Fermentas

1kb: MBI Fermentas

dNTPs, (Gibco BRL)

EDTA, (Serva)

Essigsäure, CH<sub>3</sub>COOH, 100%, (Roth)

Ethanol, abs., (Baker)

Ethidiumbromid, (Roth)

Ethidiumbromid, (Serva)

Ethylen-Glycol, (Merck)

Formamid (Merck)

Glycerol, (Merck)

Glycin, (Roth)

Isopropanol, (Merck)

Kits:

Gel Extracton Spin Kit/250, Jet quick, (Genomed)

QIAquick Gel Extraction Kit, (Qiagen)

QIAquick PCR Purification Kit, (Qiagen)

PCR product pre-sequencing-Kit, (U.S.B)

Thermo Sequenase cycle Sequenzing, (Amersham life science)

TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System, (Promega)

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, (Gibco BRL)



## Material und Methoden

Autoread Sequenz Kit, (Pharmacia)

Natriumkarbonat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , (Sigma)

Paraformaldehyd,  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , (Merck)

PEG, Polyethylenglycol, (PEG 6000, Sigma)

Pronase, (Sigma)

Rnase OUT™, Ribonuclease Inhibitor, (Gibco BRL)

RNAsin, (Gibco BRL)

Salpetersäure,  $\text{HNO}_3$ , 100%, (Merck)

Schwefelsäure,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 96%, (Roth)

SDS, Lauryl Sulfate, Sodium Salt, (Sigma)

Silbernitrat,  $\text{AgNO}_3$ , (Merck)

TEMED, N,N,N`N`-Tetramethylethylendiamin, (BIO-RAD, Bio-Science research-products)

Tris, (Merck)

TRIzol™, Gibco BRL

Urea, 40%, (Serva)

Urea, (Ultrapure USB™ United States Biochemical)

Xylencyanol, (Fluka)

(Alle hier nicht- aufgeführten Chemikalien stammten von Merck)

### 2.1.5 Enzyme

1. Taq-DNA-Polymerase (Genetisch hergestellte Form von *Thermus aquaticus*, die in *E.coli* (AmpliTaq™) synthetisiert wird).

Hersteller: Gibco BRL, Konzentration: 5U/μl oder MBI Fermentas, 5U/μl

2. SuperScript™ IIRNase-H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (RT) (Das Enzym ist eine DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA als Matrize zur Synthese des komplementären DNA Stranges benutzt).

Hersteller: Life Technologies, Konzentration: 200 Einheiten/μl

3. Restriktionsendonukleasen (siehe Tabelle 3: Spezifität und Bezugsquellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen).

Restriktionsendonuklease	Schnittstellen	Hersteller
<b>Mae I</b> (1-5 units/μl)	C↓TAG	Boehringer Mannheim GmbH
<b>Mnl I</b> (5,000 units/μl) Herkunft: Moraxella nonliquefaciens	5'...CCTC(N)7▼...3' 3'...GGAG(N)6▲...5'	New England Biolabs, Inc.
<b>Hinf I</b> (5,000 units/μl) Herkunft: Haemophilus influenza	5'...G▼ANTC...3' 3'...CTNA▲G...5'	New England Biolabs, Inc.
<b>Ear I</b> (5,000units/μl) Herkunft: Enterobacter aerogenes	5'...CTCTTC(N)1▼...3' 3'...GAGAAG(N)4▲...5'	New England Biolabs, Inc.
<b>BstN I</b> (10,000units/μl) Herkunft: Bacillus stearothermophilus	5'...CC▼T GG...3' 3'...GG A▲CC...5'	New England Biolabs, Inc
<b>Bsr I</b> (5,000units/μl) Herkunft: Bacillus stearothermophilus	5'...ACTGGN▼...3' 3'...TGAC▲CN...5'	New England Biolabs, Inc.

Tabelle 3: Spezifität und Bezugsquellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen.

### 2.1.6 Oligonukleotide

1. BRCA1 Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide für die Herstellung von Fragmenten geeignet für die SSCP- und CSGE- Analyse.

Hersteller: Eurogentec

Angaben zu Oligonukleotid-Sequenzen siehe Friedman et al. (89).

2. BRCA1 Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide für die Herstellung von Fragmenten geeignet für die PTT- Analyse.

Hersteller: Pharmacia Biotech

Angaben zu Oligonukleotid-Sequenzen siehe Hogervorst et al. (90).

## Material und Methoden

### 2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterial

Analysewaage:	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sartorius laboratory, 110g-0,1mg</li><li>• Sartorius laboratory, 2000g-0,01g</li></ul>
Automated Laser Fluorescent Sequenzer A.L.F.:	Pharmacia
Autoradiographie-Metallkassette:	Siemens
Biomax-Röntgen-Film:	Kodak
Computer-Kamera:	Cybertech CSI
Destillationsgerät:	Destamat® Bi18E, Heraeus Quarzglas
Eismaschine:	Ziegra
Elektrophorese Power-Supply:	EPS 500/400
Elektrophorese-Kammer für Agarose-Gele:	Pharmacia, GNA 100
Filter, steril:	Sartorius Minisart
Gel-Fix (Hydrophile adhäsive Film):	Serva
Geltrockner:	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bio-Rad, Model 583 „Gel Dryer“</li><li>• Drygel Sr. slab gel dryer, Model SE 1160, Hoefer scientific instruments, San Francisco</li></ul>
Gene Quant II, RNA/DNA Calculator:	Pharmacia Biotech
Kryostat:	Pharmacia Biotech Multitemp III
Metallstabrührer:	Heidolph, MR 2000, l/min:0-1250
Mikrowelle-Gerät:	<ul style="list-style-type: none"><li>• Micromat AEG</li><li>• Panasonic Dimension 4</li></ul>
Parafilm „M“:	American National Can™
PCR-Thermocycler:	Autogene II, Grant Instruments Ltd., Vertreter Deutschland: CLI analytische Laborgeräte GmbH, Emersacker
pH-Meter:	Knick

## Material und Methoden

Pipetten (Auslauf), Steril/Plastik:	10 ml (Sarstedt)
Pipettenspitzen:	<ul style="list-style-type: none"><li>• kobaltsterilisiert (Greiner)</li><li>• gammasterilisiert, mit Filtereinsatz (Biozym)</li></ul>
Pipettierhilfen:	<ul style="list-style-type: none"><li>• Gilson (France) pipetman, p1000, p200, p100, p20</li><li>• Eppendorf, 0,5-10<math>\mu</math>l</li></ul>
Reaktionsgefäße:	<ul style="list-style-type: none"><li>• 0,5 ml Cups (Eppendorf)</li><li>• 1,5 ml Cups (Greiner)</li><li>• 15 ml Röhrrchen (Falcon)</li><li>• 50 ml Röhrrchen (Falcon)</li></ul>
Schüttler:	Bio-Dancer, New Brunswick Scientific, USA
Sofortkamera:	Polaroid 667
SSCP-Kammer Power-Supply:	Pharmacia Biotech, Elektrophoresis Power-Supply EPS 3500
SSCP-Minigel-Kammer (mit dazugehörige Glasplatten, Kämmen und „spacer“):	Pharmacia, Mighty Small II SE 250/SE260
SSCP-Multiphor-Kammer:	Pharmacia LKB, Multiphor II, mit zugehörigem „Elektrophoresis Power-Supply“ EPS 3500
UV-Licht-Gerät für Computer-Kamera:	Vilber Lourmat (France), 312 nm
UV-Lichtquelle für Sofortkamera:	Bachofer Laboratoriumsgeräte, 302 nm
Vakuumpumpe mit Kühlfalle:	ABM Greifenberger Antriebstechnik, Bachofer (Kühlfalle)
Vortex:	Heidolph, Reax 2000, 1/min 200-2400
Wasserbad:	<ul style="list-style-type: none"><li>• Julabo 5 VC</li><li>• GFL</li></ul>
Whatman-Papier 3MM:	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Zentrifuge:	<ul style="list-style-type: none"><li>• Biofuge pico, Heraeus instruments</li><li>• Biofuge fresco, Heraeus instruments</li></ul>

## Material und Methoden

### 2.1.8 Fragmentlängenstandards

Hersteller: MBI Fermentas

Bande	100bp DNA-Leiter	1kb DNA-Leiter
1	1000bp	10000bp
2	900bp	8000bp
3	800bp	6000bp
4	700bp	5000bp
5	600bp	4000bp
6	500bp	3500bp
7	400bp	3000bp
8	300bp	2500bp
9	200bp	2000bp
10	100bp	1500bp
11	80bp	1000bp
14		250bp

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Biologisches Probenmaterial

Die zu untersuchenden Proben bestehen aus DNA oder RNA. Sie wurden aus peripheren Lymphozyten gewonnen. Die Lymphozyten-Isolierung erfolgte aus EDTA-Blut. Zur Lyse der Erythrozyten werden 10 ml EDTA-Blut in einem Falcon-Röhrchen mit 30 ml Lysis-Puffer (Lysis-Puffer für Isolation von DNA aus kernhaltigen Zellen mittels NaCl (2.1.3)) gemischt und 30 Minuten auf Eis gekühlt. In dieser Zeit muss die Probe mehrere Male durch Invertieren gut gemischt werden.

Nach der Zentrifugation (10 Minuten bei 1000rpm, 4°C) befinden sich die kernhaltigen Zellen im Pellet. Der Überstand wird vorsichtig verworfen, die Probe auf einem Papierhandtuch gut abgetropft und das Pellet schließlich in 10 ml kaltem Lysis-Puffer (siehe oben) resuspendiert und wie oben abzentrifugiert. Das Lymphozyten enthaltende Pellet wird anschließend zweimal mit 0,15 M KCL-Lösung gewaschen. Dieses Probematerial wird unmittelbar zur DNA- und RNA-Isolierung weiterverarbeitet.

## Material und Methoden

### 2.2.2 Gesamt-RNA-Isolierung mit TRIzol™

TRIzol™ ist eine monophasische Lösung von Phenol und Guanidiniumisothiocyanat. Diese stark proteindenaturierende Lösung führt zur Lyse der Zellen und zur Denaturierung der Proteine, RNA bleibt aber erhalten.

Aufgrund der hohen Sensitivität der RNA gegenüber den allgegenwärtigen RNAsen müssen diese Arbeitsmethoden mit viel Sorgfalt durchgeführt werden. Dafür werden eigens für RNA zu benutzende RNase-freie Einmalplastikmaterialien und als RNase-frei deklarierte Lösungen verwendet.

Diese Methode beruht auf einer Weiterentwicklung der Einzelschritt-RNA-Isolationsmethode von Chomzynski P. (91,92).

Lyse der Zellen: 1 ml TRIzol™-Reagenz wird zum Lymphozytenpellet gegeben und anschließend durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend wird die Lösung in ein Eppendorfggefäß überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur bis zur kompletten Lyse inkubiert. 200 µl Chloroform werden zugegeben, anschließend 15 Sekunden gemischt und 2-3 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

Phasentrennung: Die Lösung wird 15 Minuten bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Eine Phenol/Chloroform-Phase mit DNA und kleineren Proteinen befindet sich unten, in der Mitte befindet sich eine Interphase mit größeren Proteinen und oben eine ausschließlich RNA-enthaltende wässrige Phase. Die wässrige Phase wird abgenommen und anschließend in ein neues Eppendorfggefäß überführt (ca. 600 µl).

Fällung: Für die Präzipitation der RNA werden 500 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zentrifugation 13000rpm, 10 min bei 4°C. Der Überstand wird verworfen. Zurück bleibt ein weißliches gelartiges RNA-Pellet.

Waschen: Ca. 200µl 70% Ethanol zupipettieren, mischen, und anschließend bei 13000rpm, 1-2 Minuten bei 4°C zentrifugieren. Der Überstand wird verworfen. Das RNA-Pellet wird an der Luft getrocknet, indem die Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Zelltüchern umgekehrt ca. 1/2-1 Stunde aufgestellt werden.

Lösen: Das RNA-Pellet wird in 200µl H<sub>2</sub>O (DEPC-Wasser, d.h. mit Zugabe von RNAase-Inhibitoren) aufgelöst. Um die Auflösung zu beschleunigen, wird die Lö-

## Material und Methoden

sung bei 55-60°C ca 10 Minuten erhitzt. Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration erfolgt photometrisch (2.2.5). Die RNA wird bei -20°C gelagert.

### 2.2.3 Isolierung genomischer DNA (93).

Zell-Lyse: das Pellet mit den kernhaltigen Zellen wird in 5 ml SE-Puffer (Puffer für die Isolierung von DNA aus kernhaltigen Zellen mittels NaCl (2.1.3))

aufgenommen, 25µl Pronase und 250µl SDS (20%) dazugegeben und bei RT ü.N./bei 37°C oder 55°C mehrere Stunden inkubiert.

Aussalzen der DNA: Nach der Proteolyse wird 1,4 ml gesättigtes NaCl (6M, steril) zugegeben und 15“ auf dem Vortex gemischt. Zentrifugation: 2500 rpm für 15 min bei RT. Der Überstand enthält die DNA und wird in ein neues Falcon-Röhrchen überführt.

Fällung der DNA: 2 Volumen Ethanol bei RT zugeben; die DNA fällt als Knäuel aus und kann mit einem sterilen Glashäkchen herausgefischt und in einem neuen Röhrchen getrocknet werden.

Lösen der DNA: 500-1500µl TE-Puffer zugeben, über Nacht bei RT schütteln.

### 2.2.4 Konzentrierung von DNA-Lösungen

Die Konzentrierung von Nukleinsäuren erfolgt üblicherweise durch Präzipitation mit Ethanol. Das Nukleinsäure-Präzipitat, das sich in der Anwesenheit monovalenter Kationen bildet, wird durch Zentrifugation wiedergewonnen und in der gewünschten Konzentration in Puffer gelöst.

- Zur DNA-Lösung wird 1/10 Volumen Na-Acetat (3M, pH 5,2) und das 1-2 fache Volumen an absolutem Ethanol (-20°C) gegeben. Die Präzipitation kann durch Kälte (30 min -70°C) unterstützt werden.
- Die DNA wird durch Zentrifugation bei 4°C oder RT(10-20 min, 13-15000 rpm) pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen.
- Das DNA-Pellet wird 1- bis 2-mal mit mindestens 500µl 70%-Ethanol (-20°C) gewaschen (10 min Zentrifugation).
- Nach dem Trocknen wird die DNA in der gewünschten Menge Wasser oder Puffer (TE, pH 7,5) gelöst.

## Material und Methoden

### 2.2.5 Photometrische Bestimmung der Qualität und Quantität von Nucleinsäuren

Die Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit von Nucleinsäuren kann photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm und 260 nm bestimmt werden. Die Ablesung bei 260nm erlaubt die Berechnung der DNA-Konzentration in der Probe, d.h. das Absorptionsmaximum für Nucleinsäuren liegt bei 260 nm. Proteine und andere Substanzen wie Phenol und Agarose absorbieren maximal bei 280 nm, so dass der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  die Berechnung der Sauberkeit der Nucleinsäure erlaubt (94). Saubere Präparationen von DNA und RNA haben  $OD_{260}/OD_{280}$  -Werte von jeweils 1,8 und 2,0. Falls eine Kontamination vorliegt (z.B. durch Proteine oder Phenol), ist der  $OD_{260}/OD_{280}$  -Koeffizient deutlich geringer als die oben genannten Werte. Der Wert von  $OD_{260}=1$  entspricht einer Konzentration von 50µg/ml für Doppelstrang-DNA, 40µg/ml für Einzelstrang-DNA und RNA, und 20µg/ml für Einzelstrang Oligonukleotide. Die Messung der Extinktion erfolgt in einer Verdünnung von 1/21 bei 360 nm, 280 nm und 260nm gegen das Lösungsmittel (TE-Puffer) als Leerwert in einem Volumen von 105 µl in einer Quarzküvette, wobei die Messung bei 360 nm als Nullabgleich durch die Messung von Streulicht diente.

### 2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird verwendet, um ein DNA-Segment, das zwischen zwei bekannten DNA-Frequenzen liegt, zu vervielfachen. Diese Synthesereaktion wird durch eine DNA-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, Taq DNA-Polymerase (95)), beschleunigt.

Das Prinzip der DNA-Amplifikation besteht aus der zyklischen Wiederholung von 3 Schritten:

- 1) Trennung („Denaturierung“) der beiden komplementären DNA-Stränge einer dsDNA durch Erhitzen auf 94°C. Die Stränge der Doppelhelix trennen sich, da die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Nucleotidpaaren gelöst werden.
- 2) Hybridisierung („Annealing“) von 2 komplementären Startermolekülen („Primer“) an je einen der beiden DNA-Stränge bei ~55°C. Die „Primer“ sind synthetische Oligonukleotide von 20-30 Basen Länge, die sich an die Enden der zu amplifizierenden Ziel-DNA binden.



## Material und Methoden

- 3) Elongation der komplementären DNA-Stränge von den 3'-OH-Enden der beiden Oligonukleotide aus („Primer Extension“) entlang der beiden DNA-Einzelstränge.

Dieser Kreis von Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese wird vielmals (meist 30-mal) wiederholt. Dadurch erfolgt die exponentielle Vermehrung eines DNA-Fragments, dessen Länge durch den Abstand der beiden Primer definiert ist. Da das entstandene Produkt aus einem Zyklus Elternstrang für den nächsten Zyklus ist, vervielfältigt sich dieses Segment exponentiell (96).

Die PCR-Reaktionen für die Formate der SSCP- und CSGE-Analyse wurden in 50µl - Ansätzen ausgeführt, die folgende Bestandteile enthalten:

50-100 ng genomische Doppelstrang-DNA (das verwendete biologische Probenmaterial siehe 2.2.1), 1XPCR-Puffer (5 µl 10xPCR-Puffer), 150µM/Reaktionansatz Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils in der Konzentration von 10 mM), 30 pmol der jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide (89) und ca. 2 U Taq-Polymerase. Mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µl Gesamtvolumen auffüllen.

Für die PCR-Reaktionen wurde folgende PCR-Zykluseinstellung in einem PCR-Thermocycler verwendet (Tabelle 4). Wegen des Einflusses der Hybridisierungstemperatur wurden neben dem sogenannten Normalzyklus, der mit Standardtemperaturen (94°C, 57°C, 72°C) arbeitet, auch ein Zyklus getestet, der durch eine höhere Hybridisierungstemperatur gekennzeichnet ist („Perfect Annealing (PA)“ -Zyklus).

## Material und Methoden

„Normal“-Zyklus:

PCR-Zyklen	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
erster Zyklus	3 min 94°C		
wiederholende Zyklen (30-35-mal)	0,8 min 94 °C	0,5 min 57°C	0,5 min 72°C
letzter Zyklus			7 min 72°C

„Perfect Annealing (PA)“-Zyklus:

PCR-Zyklen	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
erster Zyklus	3 min 94°C		
wiederholende Zyklen (30-35-mal)	1 min 94 °C	1 min 60°C	2 min 72°C
letzter Zyklus			7 min 72°C

Tabelle 4: PCR-Zykluseinstellung für die SSCP- und CSGE-Formate in einem PCR-Thermocycler. Neben dem sogenannten Normalzyklus, der mit Standard-Temperaturen (94°C, 57°C, 72°C) arbeitet, wurde auch ein Zyklus getestet, der durch eine höhere Hybridisierungs-Temperatur (60°C) gekennzeichnet ist („Perfect Annealing (PA)“-Zyklus).

Die 45 Formate des BRCA1-Gens wurden wie folgt amplifiziert: 21 Formate für jeweils ein Exon, mit Ausnahme von Exon 1 und Exon 4 (nicht kodierend). Exon 11 wird, aufgrund der Größe, in 24 überlappende Formate aufgeteilt: Exon 11 A<sub>i</sub>, A, B, B<sub>2</sub>, C, D, D<sub>2</sub>, E, E<sub>2</sub>, F, G, H, H<sub>2</sub>, I, I<sub>2</sub>, J, K, K<sub>2</sub>, L, M, N, O, P, P<sub>i</sub>. (Oligonukleotid-Sequenzen siehe (89)). Die Größe der zu analysierenden Fragmente beträgt 200-300 Basenpaare.

Für die PTT-Analyse wurden Oligonukleotide nach Hogervorst et al. (80) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in 50µl - Ansätzen ausgeführt, die folgende Bestandteile enthalten:

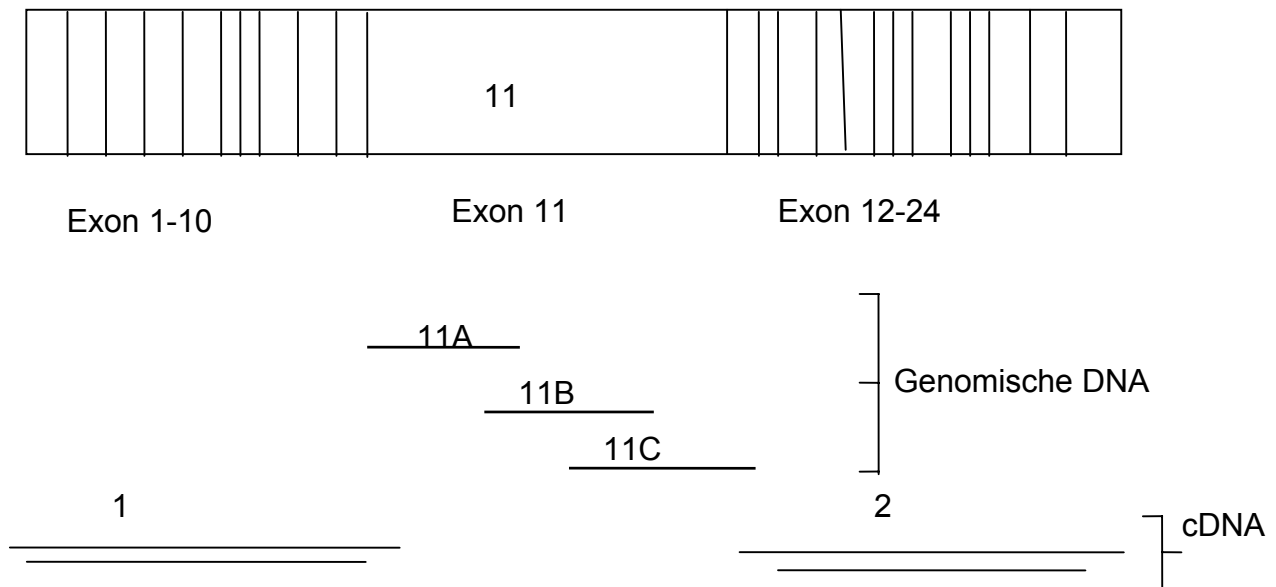
200ng genomische Doppelstrang-DNA (das verwendete biologische Probematerial. siehe 2.2.1), 1X PCR-Puffer (5µl 10x PCR-Puffer), 150µM/Reaktionsansatz Desoxyribonukleosid-triphosphat (dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils in der Konzentration von 10 mM), 20 pmol der jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide (80) und ca. 2 U Taq-Polymerase.

PCR-Zykluseinstellung für die PTT-Formate sind in Tabelle 5 gezeigt.

PCR-Zyklen	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
erster Zyklus	4 min 94°C		
wiederholende Zyklen (35-mal)	1 min 94 °C	1 min 57°C	2 min 72°C
letzter Zyklus			7 min 72°C

Tabelle 5: PCR-Zykluseinstellung für die PTT-Formate in einem PCR-Thermocycler.

Exon 11 konnte direkt aus genomischer DNA in drei verschiedenen Formaten (11A, 11B und 11C) amplifiziert werden. Exon 11 des BRCA1-Gens besteht aus einer langen zusammenhängenden Sequenz. Hier gibt es keine Introns, die sonst bei der PCR mit amplifiziert werden und die Reaktion stören würden. Die Exons 1-10 und 12-24 wurden über c-DNA amplifiziert, indem man cDNA, die mit Reverser-Transkriptase aus mRNA (RT-PCR (2.2.7) synthetisiert wird, vervielfältigt. Abbildung 9 zeigt die schematische Darstellung der Formate für die Amplifikation aller 24 Exons des BRCA1-Gens.



Fragmentgröße der genomischen Formate:

- 11A (Nukleotid 793-2125)      1333bp
- 11B (Nukleotid 1921-3359)      1463bp
- 11C (Nukleotid 3061-4161)      1123bp

### Fragmentgröße der cDNA-Formate:

1 (Exon 1-10, Nukleotid 100-979)	880bp
2 (Exon 12-24, Nukleotid 4153-5672)	1541bp

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Formate für die Amplifikation aller 24 Exons des BRCA1-Gens mit zusätzlichen Angaben zu der jeweiligen Fragmentgröße der verschiedenen Formate.

### 2.2.7 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um RNA mittels PCR zu amplifizieren, sind mindestens 2 Schritte erforderlich:

1. Die cDNA-Synthese mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) und 2. die PCR mit cDNA als Matrize und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase.

Zu 1: Für die DNA-Synthese werden 1-5µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Synthese wird durch Zugabe von Oligo(dt)-Oligonukleotiden gestartet, die spezifisch am 3'-Ende hybridisieren. Verwendet wurde die DNA-Polymerase SUPERSRIPT™ II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase. 1-5µg Gesamt-RNA (7 µl) und 2 µl Oligo(dt)-Oligonukleotide (5pmol/µl) werden in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt, 15 min bei 65°C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Danach werden dem Ansatz 10 µl einer Mischung aus folgenden Komponenten hinzugefügt: RNA-sin (1µl), 5XRT-Puffer (4µl), 0,1 M DTT (2µl), dNTPs (3µl, 10mM). Anschließend werden die Reaktionsansätze gemischt, abzentrifugiert und bei RT 10 min inkubiert. Nach Zugabe von SUPERSRIPT™ II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (1µl[200U/µl]) erfolgt eine Inkubation für 60min bei 42°C, 30 min bei 50°C und 10 min bei 70°C. Die Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zu 2: RT-PCR, d.h. PCR mit zuvor synthetisierter cDNA als Matrize, erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie die oben genannte Standard-PCR (2.2.6). Anstelle genomischer DNA wird aber 2 µl des cDNA-Synthese-Ansatzes eingesetzt.

## Material und Methoden

### 2.2.8 Elektrophoresen

#### 2.2.8.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese beruht auf der Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Proteine und Nukleinsäuren beinhalten viele geladene oder ionisierbare Gruppen mit einem weiten Spektrum von pK-Werten. Dadurch ist das elektrophoretische Verfahren vom pH-Wert des Mediums und damit von Art und Konzentration der verwendeten Pufferlösung abhängig. Hauptladungsträger bei Nukleinsäuren sind die Phosphat-Gruppen, wobei die gleichen pK-Werte für jeden Nukleotidbaustein vorliegen. Die Trennung erfolgt in diesem Fall nicht einfach in einer Pufferlösung, sondern in einer Trägermatrix aus Agarose. Aufgrund dieser Technik wird das Ergebnis der Trennung „eingefroren“, und kann deshalb zur Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt werden. Die Lokalisierung der DNA im Gel kann direkt durch Färbung mit geringen Mengen des fluorisierenden und interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid nachgewiesen werden (97). Agarose-Gel-Elektrophorese wird verwendet, um DNA-Fragmente aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes zu trennen. Kleine Fragmente bewegen sich schneller als große Fragmente. Die zurückgelegte Strecke variiert invers mit dem Logarithmus des Molekulargewichtes. Die Größe eines Fragments kann geschätzt werden, indem man verschiedene DNA-Fragmentlängenstandards einsetzt, deren Größen durch Angaben von Herstellern bekannt sind (2.1.8) (98). Diese Methode ist schnell, einfach und sensibel, und ist die gebräuchlichste Methode um z.B. PCR-Produkte auf Reinheit und Größe zu überprüfen oder um eine Spaltung mit Restriktionendonukleasen zu beurteilen. Aus dem Agarosegel können die DNA-Fragmente ausgeschnitten und aufbereitet werden, um für weitere Untersuchungen (z.B. Sequenzierungen) eingesetzt zu werden.

Agarose ist ein neutrales, gelbildendes Polysaccharid aus Seetang, das in Lösung unter Erhitzung doppelhelikale Abschnitte ausbildet, wodurch nach Abkühlung der Lösung ein Netzwerk durch Wasserstoffbrückenbildung entsteht. Die Porengröße ist von der Agarose-Konzentration abhängig. Sehr große DNA-Moleküle sind fast unbeweglich in hohen Konzentrationen, während kleine Fragmente sich bei geringen Konzentrationen gleichmäßig bewegen, und deshalb nicht zu unterscheiden sind. Die Gel-Konzentration muss also entsprechend so festgelegt werden, dass die zu untersuchenden Moleküle aufgetrennt werden können. Gele mit 0,3% Aga-

## Material und Methoden

rose sind in der Lage, DNA-Moleküle zwischen 5 und 60kb zu trennen, und DNA-Moleküle zwischen 0,1 und 3kb benötigen ein 2% Gel. Diese Methode beschreibt eine horizontales Elektrophorese-System. Das Gel ist während der Elektrophorese mit Puffer bedeckt und wird oft als „submarine“- (Untersee) Gel-System bezeichnet (99).

- 1-3g Agarose/100 ml TBE-Puffer (je nach gewünschter Konzentration der Agarose) kurz aufkochen und auf ca. 60°C abkühlen lassen.
- Zugabe von 0,5µg/ml Ethidiumbromid aus einer 10% Stammlösung.
- Agarose-Lösung in den abgedichteten Gelträger einfüllen und die Kämme einsetzen.
- Nach dem Erstarren der Agarose die Kämme entfernen, den Gelträger in die Kammer einsetzen und mit TBE-Puffer überschichten.
- DNA-Proben (5-20µl, ggf. mit Puffer verdünnen) mit ca. 1µl Bromphenolblau (BPB)-Lösung mischen und in die Taschen einfüllen.

Die BPB-Lösung dient verschiedenen Zwecken: Durch den Sucrose-Gehalt wird die Dichte der DNA erhöht, so dass diese in den Taschen absinkt. Die blaue Färbung erleichtert das Auftragen der DNA und anhand der Wanderung der BPB-Front lässt sich der Gellauf kontrollieren.

- Elektrophorese

50 ml -Gele: 60 min 80 Volt

200 ml - Gele: 60-90 min 100-120 Volt

- Gele mit UV-Licht (260 nm) bestrahlen und auf Polaroid-Filme fotografieren. Die DNA-Banden sind durch das fluorisierende Ethidiumbromid orange gefärbt.

### 2.2.8.1.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Solubilisierung<sup>13</sup> der Agarose und der selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an der QIAquick-Kieselgel-Membran bei einer hohen Salzkonzentration und niedrigem pH, während die Kontaminanten durch die Membran gelangen. Die hohe Konzentration von Natriumperchlorat im Solubilisierungspuffer zerstört die Wasserstoff-

---

<sup>13</sup> Der Einschluß von Molekülen, festen Teilchen, Flüssigkeiten oder Gasen in oder auf Mizellen unabhängig von deren elektrischer Ladung, der eine Lösung der Partikel in der Flüssigkeit vor-täuscht. Pschyrembel klinisches Wörterbuch (1990). 256 Auflage. Berlin, New York: Walter der Gruyter; p. 1555.

## Material und Methoden

Bindungen zwischen den Zuckern in dem Agarose-Polymer, so dass das Agarosestück in Lösung geht. Gleichzeitig führt die hohe Salzkonzentration zu einer Trennung von DNA und DNA-bindenden Proteinen. Inkubation der DNA-Lösung in dieser stark elektrolytischen Umgebung mit großen Anionen ( $\text{ClO}_4^-$ ) bewirkt darüber hinaus eine Modifikation der Wasserstruktur, die die DNA zur Adsorption an die Kieselgel-Membran zwingt (100, 101).

- Ausschneiden des DNA-Fragments:

Aus einem 1-2%-igen Agarosegel werden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben.

- Solubilisierung der Agarose:

Pro 100 mg Agarosestück werden 300 µl QX1- Puffer (das ca. 3 fache Volumen des Gels) zugegeben und die Agarose bei 50°C 5-10 Minuten gelöst. Dabei wird alle 2-3 Minuten leicht geschüttelt, um die Auflösung zu beschleunigen.

- Adsorption der DNA an die QIAquick-Kieselgel-Membran:

Zu der Lösung werden 100 µl Isopropanol (das 1-fache Volumen des Gels) gegeben, kurz gemischt und anschließend wird die Lösung in eine QIAquick-Säule, die in einem Auffanggefäß steht, überführt. Zentrifugation (1', 13000rpm). Der pH-Wert dieser Lösung muss saurer als 7.5 sein, um eine ausreichende Haftung der DNA an der Membran zu gewährleisten. Der pH-Wert soll deshalb am besten mit pH-Papier untersucht werden, und eventuell mit einer Säure angesäuert werden. Die Flüssigkeit in dem Auffanggefäß wird anschließend verworfen. Die DNA haftet jetzt an der Membran.

- Waschen der QIAquick-Kieselgel-Membran:

0,75 ml Puffer PE (ethanolhaltig) wird auf die Säule gegeben, und anschließend zentrifugiert (1', 13000rpm), wodurch Agarose und Kontaminanten (z.B. Salze, Enzyme, nicht verwendete Oligonukleotiden, Agarose, Ladepuffer, Ethidiumbromid) entfernt werden. Die Flüssigkeit im Auffanggefäß wird anschließend verworfen. Der Waschpuffer wird durch erneute Zentrifugation (1', 13000 min) vollständig abgezogen.

- Elution (Auswaschung) der DNA:

Das QIAquick Reagenzgefäß in ein sauberes Eppendorfgefäß setzen

## Material und Methoden

und 50 µl dest. H<sub>2</sub>O in die Mitte der Membran geben. Ca. 1 Minute warten, so dass die DNA sich völlig auflösen kann, anschließend zentrifugieren (1', 13000rpm). Die DNA befindet sich jetzt in dem Eppendorfgefäß und kann direkt für nachfolgende Reaktionen eingesetzt werden.

### 2.2.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Acrylamid (AA) ist ein Monomer, das in der Anwesenheit des Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS), und des Stabilisators TEMED (N,N,N'-tetramethylethylenediamine) in lange Ketten polymerisiert. Wird Methylenbisacrylamid (BAA) dazugegeben, kommt es zusätzlich zu einer Quervernetzung, wobei die Porengröße und damit das Trennverhalten sich durch Variationen des Verhältnisses Acrylamid/Methylenbisacrylamid und der Gesamtkonzentration an Acrylamid verändern lässt (102).

#### 2.2.8.2.1 Nichtdenaturierende horizontale PAGE

Die nicht denaturierende horizontale PAGE wurde ebenfalls für die Qualitätskontrolle und zur Größenbestimmung von PCR-Produkten eingesetzt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Agarose-Gelelektrophorese besteht in der besseren Auftrennung der Fragmente. Durch die Silberfärbung wird die Nachweisgrenze für DNA um mindestens eine Zehnerpotenz herabgesetzt (103). Es wurden 10%ige Acrylamidlösungen (AA:BAA=29:1) mit 1x Tris-Sulfat-Puffer verwendet (2.1.3). Nach Zugabe von APS (10µl APS 10%/ml Acrylamidlösung) und TEMED (1µl TEMED/ml Acrylamidlösung) wurde die Lösung auf die Glasplatten (Flap-Technik, 2.2.8.2.2.1) gegossen und zur Polymerisierung für 1 Stunde stehen gelassen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Multiphor II Gelkammer (2.2.8.2.2.1) bei 2W für 1h.

#### 2.2.8.2.2 „Single Strand Conformation Polymorphismus“ (SSCP)

Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden der Mutationsanalyse“ (1.5)) beschrieben. Es werden hier nur die eingesetzten Protokolle beschrieben.

##### 2.2.8.2.2.1 SSCP in einem horizontalen Elektrophorese-System

Diese SSCP wurde in einer Multiphor II Gelkammer durchgeführt. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Kryostaten, der eine direkte Verbindung zu der Kühlplatte



## Material und Methoden

hat, konstant bei 10°C gehalten. Das Gel-Maß beträgt 160 x 250 x 0,75mm und die verwendete Technik mit Hilfe von Gel-Fix™ wird als „Flap-Technik“ bezeichnet. Das Gel-Fix™ ist eine transparente Trägerfolie aus Polyester. Die Oberfläche ist auf beiden Seiten mit einer Acrylatschicht aktiviert, die mit monomerem Acrylamid kovalent reagiert. Die zu benutzenden Glasplatten (eine präparierte Glasplatte und eine Deckplatte) werden gründlich mit Spülmittel und Wasser gereinigt, anschließend getrocknet und mit Ethanol abgewischt. Die eine Platte wird mit Tesa-Adhesive-Tape präpariert, um später Taschen für die Applikation von Proben auf das Gel zu erhalten. Dafür werden 5 Lagen Tesa-Film (0,75mm) benötigt, um Taschen und äußere Umrandungen des Gels herzustellen. Die andere Glasplatte wird mit Wasser leicht befeuchtet und anschließend mit Gel-Fix™-Folie bedeckt, die gleichmäßig mit einer Rolle aufgedrückt wird. Diese Deckplatte wird dann auf die untere präparierte Glasplatte gelegt, nachdem die 12% (AA:BAA=29:1) SSCP-Gel-Lösung (2.1.3) aufgetragen worden ist. Das Gel wird anschließend für ungefähr eine Stunde stehen gelassen, um zu erstarren.

Die Multiphorkammer-Platte wird mit Wasser leicht bedeckt, und das Gel wird, mit den Geltaschen zur Kathode, ohne Luftblasen vorsichtig aufgelegt. Als Verbindung zwischen dem Acrylamidgel und den Elektroden dienen 3%ige Agarose-Streifen mit 10xTB als Elektrophorese-Puffer und Bromphenol-blau, welche parallel zueinander an den äußeren Rändern des Geles aufgelegt werden. Die aufzutragenden Proben (PCR-Produkte mit Formate der SSCP-Analyse (2.2.6)) werden anschließend, nach Zugabe des gleichen Volumens Stop-Mix, mit Formamid denaturiert. Dadurch trennen sich die Doppel-Stränge, da die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Nucleotidpaaren gelöst werden. Die Denaturierung findet im Wasserbad bei 94°C für 3-5 Minuten statt. Anschließend werden die Proben auf Eis gestellt.

Die Geltaschen werden mit jeweils 5 µl der zu untersuchenden Proben beladen. Die Gel-Elektrophorese findet bei 8 Watt (ca. 280Volt) für ca. 3-4 Stunden (je nach Größe) statt. Die Gele werden anschließend mit „Silberfärbung nach Budowle“ angefärbt und auf einen Vakuum-Geltrockner für ca. 1 Stunde getrocknet.

## Material und Methoden

### 2.2.8.2.2.2. „Polyethylenglycol“ (PEG)-SSCP in einem vertikalen Elektrophorese-System

Zur Präparierung dieser Gele wurde das Minigel-System von Pharmacia verwendet. Die beiden Gel-Glasplatten werden wie oben beschrieben vorbereitet und anschließend mit „Gel-Fix®“ bedeckt. Statt die untere Platte mit Tesa-Adhesive-Tape zu präparieren, werden in diesem Falle „Spacer“ angepasst, anschließend wird die Deckplatte aufgelegt und in einem Gelstativ festgeklammert. Die Gel-Lösung (12%PAAG, AA:BAA=39:1, C%=2,5) (2.1.3) wird mit Hilfe einer Pipette in die Gelkammer gegossen und ein „Haifischzahn“-Probenkamm (Geltaschenformer) eingeführt. Das Gel wird für ungefähr 45 Minuten zum Polymerisieren stehen gelassen. Anschließend werden die Platten aus dem Gelstativ gelöst, der vorher eingefügte Kamm entfernt und die überschüssigen Acrylamidreste an den Gelplatten mit lauwarmem Wasser abgespült.

Die aufzutragenden Proben (PCR-Produkte mit Formate der SSCP-Analyse (2.2.6)) werden nach Zugabe des gleichen Volumens Stop-Mix mit Formamid für PEG-SSCP denaturiert. Dadurch trennen sich die Doppel-Stränge, da die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Nucleotidpaaren gelöst werden. Die Denaturierung findet im Wasserbad bei 94°C für 3-5 Minuten statt. Anschließend werden die Proben auf Eis gestellt.

Zur Vorbereitung der Elektrophorese wird die Gelkammer mit Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffern aufgefüllt. Um gute Ergebnisse zu erzielen, wird ein Gel-„Vorlauf“ durchgeführt. Dafür werden die Taschen mit normalen Lade-Puffer (mit Glycerol) beladen, und anschließend wird eine Elektrophorese bei 5 W durchgeführt bis der Farbstoff 1/3 der Gel-Länge erreicht hat. Dadurch wird das Gel auf die Bedingungen eingestellt, die für die später auftragende Proben erforderlich sind; außerdem besteht die Möglichkeit den Lauf des Farbstoffes zu beurteilen, um das System als optimal einzuschätzen.

Anschließend werden die Proben (PCR-Produkte mit Formate der SSCP-Analyse (2.2.6)) (10 µl) aufgetragen.

Die Elektrophorese findet bei 5 Watt statt. Das Gel wird mit Hilfe eines Kryostaten auf 12°C gekühlt. Die Laufzeit ist unterschiedlich, je nach Größe und Sequenz der DNA, beträgt jedoch durchschnittlich ca. 1-2 Stunden.

## Material und Methoden

Das Gel wird anschließend von den Platten gelöst und haftet an der Folie. In diesem Zustand wird das Gel mittels „Silberfärbung nach Budowle“ angefärbt, und auf Whatmann-Papier in einem Vakuum-Geltrockner bei 85°C für ca. 1 Stunde getrocknet.

### 2.2.8.2.2.3 „Mutation Detection Electrophoresis“ (MDE)-SSCP in einem horizontalen Elektrophorese-System

Für die Mutationssuche wurde zusätzlich die Gelmatrix MDE-Gel (MDE=Mutation Detection Electrophoresis-Gel=modifiziertes Acrylamid) (10% PAAG, 2.1.3) ausprobiert. Diese SSCP wurde in einer Multiphor II Gelkammer durchgeführt. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Kryostaten, der eine direkte Verbindung zur Kühlplatte hat, konstant bei 10°C gehalten. Das Gel-Maß betrug 160 x 250 x 0,75mm, und die verwendete Technik war wieder die „Flap-Technik“. Als Laufpuffer wurde 0.6 x TBE verwendet. Die Elektrophorese fand bei 8 Watt statt. Die Laufzeit betrug 4 Stunden.

### 2.2.8.2.3 „Conformation Sensitive-Gel-Electrophoresis“ (CSGE) in einem ultradünnen horizontalen Elektrophorese-System

Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden für die Mutationsanalyse“ (1.5)) erläutert. Es wird hier die im Labor aktuelle Variante dieser Methode beschrieben. Die „Conformation Sensitive Gel Elektrophoresis“ wurde ebenfalls auf einer Multiphor II Gelkammer bei konstant 20°C durchgeführt. Das Gel-Maß betrug 160 x 250 x 0,3mm, und die verwendete „Flap-Technik“ mit Hilfe von Gel-Fix™ wurde unter SSCP-Techniken beschrieben. Die eine Platte wird mit Tesa-Adhesive-Tape präpariert, um später Taschen für die Applikation von Proben auf dem Gel zu erhalten. Dafür werden nur zwei Lagen Tesa-Film benötigt, um Taschen und äußere Umrandungen des Gels herzustellen. Das Gel beinhaltet 10% Polyacrylamid, %C=1 mit 15% Harnstoff (Urea) und 10% Ethylenglycol als denaturierende Reagenzien. Der Gel-Puffer besteht aus Tris-Ameisensäure und der Lauf-Puffer ist Tris-Glycin (diskontinuierliches Elektrophorese-System) (2.1.3). Mit Hilfe von zwei Lagen Whatman-Papier 3MM wird der Lauf-Puffer hier durchgeleitet und damit der Anfang und das Ende des Gels mit den Elektroden verbunden.

## Material und Methoden

Die zu untersuchende Proben (PCR-Produkte mit Formate der CSGE-Analyse (2.2.6)), wird bei 68°C für eine Stunde inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Damit werden mögliche Heteroduplex-Moleküle erzeugt. Für die Inkubation werden gewöhnlich 1,2µl PCR-Produkt (ca.100ng DNA) mit 4,5 µl ddH<sub>2</sub>O vermischt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wird 1µl Ladebuffer für CSGE zugegeben, und jeweils 3,5µl Probe werden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird für ungefähr 1,5-1,7 Stunden bei 5W durchgeführt. Nach der Elektrophorese erfolgt eine „Silberfärbung nach Budowle“ und die Gele werden anschließend auf einem Geltdrockner bei 85°C 1h lang getrocknet.

### 2.2.9 Restriktionsendonuklease-Analyse

Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden der Mutationsanalyse“ (1.5)) beschrieben. Die Auswahl der jeweils genutzten Restriktionsenzyme (siehe 2.1.5) zur Identifizierung und Charakterisierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Computerprogramm DNASIS. In der Regel wurde die Restriktion mit 5 µl PCR-Produkt (ca. 500ng), 1,5 µl 10x Puffer und 0,5 µl (ca. 1 U) Enzym in einem Gesamtvolumen von 10 µl unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Restriktion wurde sowohl Agarosegelelektrophoretisch als auch mittels nicht denaturierender PAGE kontrolliert und ausgewertet.

### 2.2.10 „Protein Truncation“- Test (PTT)

Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden der Mutationsanalyse“ (1.5)) beschrieben. Die Amplifikation unterschiedlicher PTT-Formate ist im Kapitel 2.2.6 geschildert. Es wird hier nur die praktischen Durchführung der Methode dargestellt.

Die Glasplatten für den PTT werden zuerst mit Aceton gereinigt, um Fettreste zu entfernen; anschließend wird 2 mal mit ddH<sub>2</sub>O gesäubert. Auf der größeren unteren Platte werden die „spacer“ angebracht (seitliche und untere Abgrenzung des Gels), anschließend wird die kleinere obere Platte aufgelegt. Die Platten werden mit Hilfe von Klammern an den unteren und den seitlichen Rändern festgeklemmt. Das Trenngel und das Sammelgel werden hergestellt (2.1.3). Zuerst wird das Trenngel bis ungefähr 1 cm unter den unteren Rand eines probeweise angepass-

## Material und Methoden

ten „Haifischzahn“-Probenkammes (Geltaschenformer) gegossen. Anschließend werden vorsichtig einige  $\mu\text{l}$  Butanol an die Geloberfläche gegeben, um einen ebenen Rand zu erhalten. Das Gel wird zum Erstarren für 30 min stehen gelassen. Das Butanol wird anschließend mit destilliertem Wasser weggespült. Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen, ein „Haifischzahn“-Probenkamm für die später aufzutragenden Proben eingesetzt und festgeklammert. Das Gel wird für 60 min stehen gelassen, um zu erstarren. Anschließend wird das Gel in die Gelkammer gebracht, und die Pufferbehälter werden mit 1x SDS-PAGE Laufpuffer gefüllt.

Pipettierschema für einen PTT-Ansatz:

RRL*	25 $\mu\text{l}$
Puffer**	2 $\mu\text{l}$
T7-Polymerase***	1 $\mu\text{l}$
AA-Mix (-Methionon)****	1 $\mu\text{l}$
<sup>35</sup> S-Methionin	4 $\mu\text{l}$
Rnasin*****	1 $\mu\text{l}$
PCR-Produkt	5 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	<u>11<math>\mu\text{l}</math></u>
	50 $\mu\text{l}$

\*TNT<sup>®</sup> Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL)

\*\*TNT<sup>®</sup> Reaction Buffer

\*\*\*TNT<sup>®</sup> RNA Polymerase

\*\*\*\*Amino Acid Mixture minus Methionin

\*\*\*\*\*RNasin<sup>®</sup> Ribonuklease Inhibitor, 40u/ $\mu\text{l}$

- Inkubation: 120' bei 30°C

- Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  2x SDS-Proben-Puffer.

- Denaturieren der Proben bei 95°C, 3-4 Minuten, anschließend die Proben auf Eis stellen.

- Die denaturierten Proben werden in die Slots pipettiert. Als positive Kontrolle für die stattfindende Reaktion wird in der Etablierungsphase der Methode Luciferase Proteinmarker in der Konzentration 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ebenfalls in einen Slot pipettiert. Der Luciferase Proteinmarker ist in der TNT<sup>®</sup> T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)-Kit enthalten (2.1.4). Ein Proteinlängenmarker ist nicht erforderlich. Da immer mehrer Proben mit bekannten im Normalfall gleichbleibenden Molekulargewichten nebeneinander aufgetragen werden, fallen abweichende Proteinprodukte auch ohne Proteinlängenmarker auf.

## Material und Methoden

- Elektrophorese bei 30mA für 4h.

(die Zeit ist optimal eingestellt für Proben mit 1500bp, also 500 Aminosäuren)

- Das Gel wird auf Whatmann-Papier, Vaakumtrockner 85°C für ca. 2h, getrocknet

- Autoradiographie für 24h.

### 2.2.11 DNA-Sequenziermethode (Kettenabbruch-Methode) nach Sanger

Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden für die Mutationsanalyse“(1.5)) beschrieben. Es wird hier die aktuelle Durchführung dieser Methode dargestellt.

#### 2.2.11.1 Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Der PCR product pre-sequencing-Kit (U.S.B) beinhaltet eine neue Methode für die Vorbereitung von PCR-Produkten (Doppelstrang DNA) für die Sequenzierung. Methoden wie Gelreinigung, Sedimentation, Filtrierung oder magnetische Separierung sind überflüssig geworden, indem man 2 Enzyme einsetzt, die sehr effektiv dNTP's und „Primer“ aus der PCR-Amplifikation entfernen. Die PCR benutzt zwei „Primer“, dNTP's und die Taq-Polymerase, um multiple Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren. Wenn diese komplett ist, sind die meisten dNTP's und Primer intakt, und diese würden mit der Sequenzreaktion interferieren, die ebenfalls von einzelsträngigen Startermolekülen und Nukleotiden Gebrauch machen. Bei dieser Methode werden deshalb zwei hydrolytische Enzyme, Shrimp Alkaline Phosphatase und Exonuclease I bei 37 °C für 15 Minuten eingesetzt. Anschließend werden die Enzyme bei 80°C für 15 Minuten Hitze-inaktiviert. Tabelle 6 zeigt das Pipettierschema für die Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung.

PCR-Produkt	5µl
Exonuklease I (10.0 units/µl)	1µl
Shrimp Alkaline Phosphatase (2.0 units/µl)	1µl
15 Minuten, 37°C	
15 Minuten, 80°C	

Tabelle 6: Pipettierschema für die Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung.

Shrimp Alkaline Phosphatase und Exonuclease I sind in PCR-Puffern aktiv, deshalb sind keine zusätzlichen Puffer erforderlich. Exonuclease I entfernt überflüssi-

## Material und Methoden

ge einzelsträngige Oligonukleotide und eventuelle fremde Einzelstränge, die bei der PCR entstanden sind. Die Shrimp Alkaline Phosphatase entfernt die überschüssigen dNTP's aus der PCR-Mischung, die bei der Markierungsphase den Sequenzierungsprozess stören können. Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung.

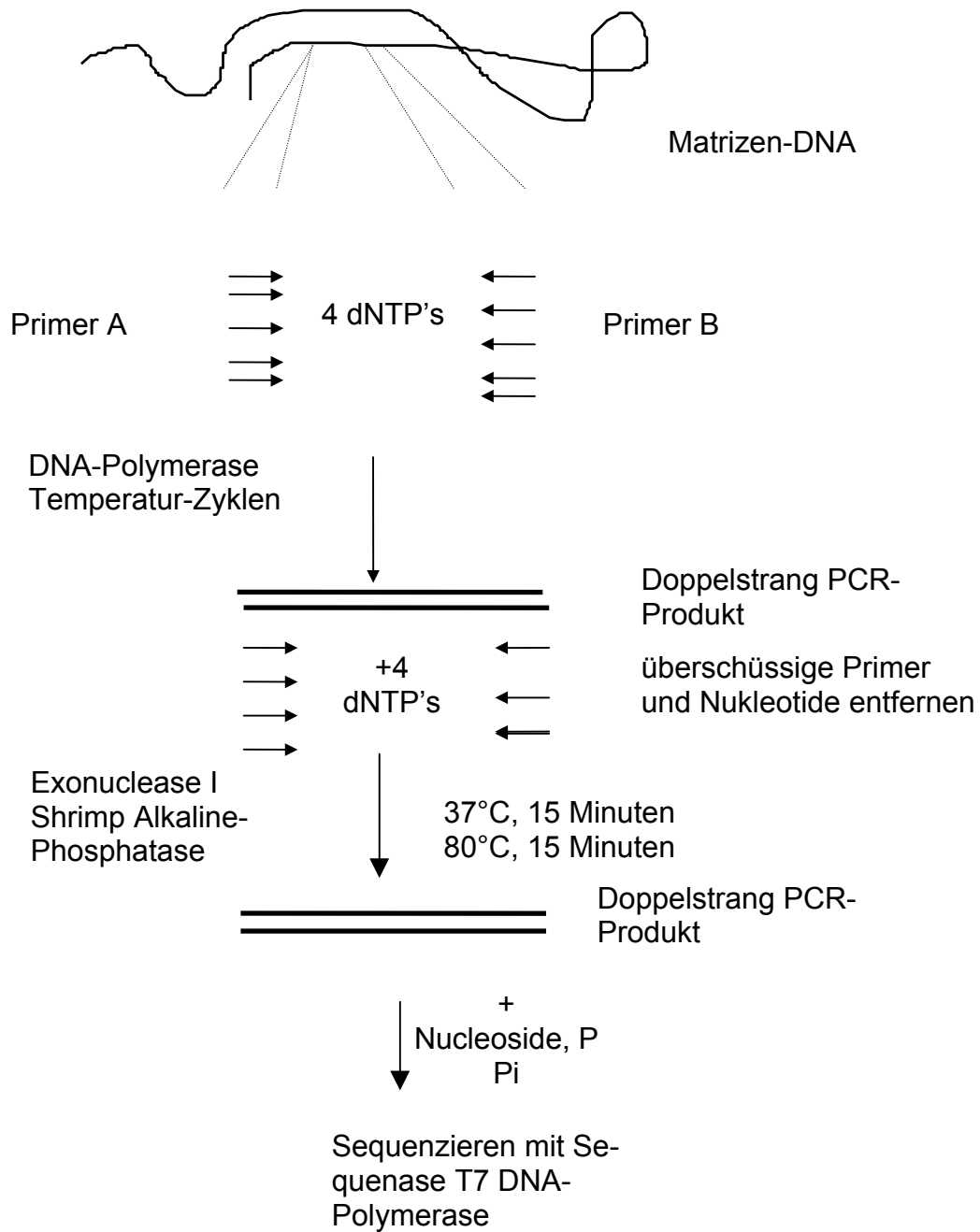


Abbildung 10: Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung.

### 2.2.11.2 Nicht radioaktive Sequenzierung

Bei dieser nicht radioaktiven Sequenzierung (Thermo Sequenase "Cycle Sequencing" mit 7-deaza-dGTP und Fluorescein-markierten Primern) wurde die Standard-Didesoxy-Methode mit dem automatischen Sequenzierungs-Kit von Amersham life science durchgeführt. Die Markierung der Proben erfolgt hierbei



## Material und Methoden

durch Einsatz von Fluorescein-markierten Primern. Dabei sind die Konzentrationen von dNTP's und ddNTP's so abgestimmt, dass für den Einbau eines dNTPs oder des entsprechenden ddNTPs die gleiche Chance besteht. Wenn die synthetisierten Fragmente in Acrylamidgelen aufgetrennt werden, kann die Sequenz automatisch durch den Automated Laser Fluorescent Sequenzer (A.L.F.) von Pharmacia abgelesen werden. Proben von 10 Sequenzreaktionen können hierbei parallel aufgetragen werden. Während der Elektrophorese passieren die markierten DNA-Fragmente einen Laserstrahl. Die entstehenden Fluoreszenz-Signale werden detektiert und automatisch für die anschließende Analyse gespeichert. Die Auswertung der Sequenz erfolgt durch die integrierte Computer-Software.

Das Cycle Sequencing benutzt wiederholte Zyklen thermischer Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung (Polymerisation), um das Signalniveau zu erhöhen (siehe Tabelle 7). Nach zehn Zyklen können schon bis zu zehn-mal so viele Produkte im Vergleich zur Matrizen-DNA vorliegen.

Denaturierung	30-mal-Zyklen
94°C, 4'	94°C, 3' (Denaturierung)
	65°C, 3' (Hybridisierung)
	72°C, 3' (Polymerisation)

Tabelle 7: Zykluseinstellung für „Cycle Sequencing“.

Das Cycle-Sequencing ist dann eine ideale Methode, wenn die Menge der Matrizen-DNA gering ist oder wenn die Sensitivität des Systems gering ist.

Pipettierschema für das „Cycle Sequencing“:

- Gereinigtes Doppelstrang- PCR-Produkt 7 µl
- Primer M13<sup>14</sup> /Cy5 (Interaktiva)<sup>15</sup> 2,75µl (10pmol)
- ddH<sub>2</sub>O auf 25µl

davon jeweils 6µl zu 2µl A-C-G-T-Mix. Komponenten des A-C-G-T-Mix sind in Tabelle 8 aufgelistet.

<sup>14</sup>M13: Bakteriophage, das ein einzelsträngiges, zirkuläres DNA-Genom enthält und auf E.coli-Zellen wächst. Diese Phagen sind für die Herstellung rekombinanter DNA in einzelsträngiger Form hervorragend geeignet: Winnacker E.L.: Gene und Klone; pp. 73-76.

<sup>15</sup>Der Primer M13/Cy5 wird als Universal-Primer eingesetzt und ist am 5'-Ende mit Fluorescein markiert (Cy5).

A-Mix (Grün)	C-Mix (Blau)	G-Mix (Gelb)	T-Mix (Rot)
dATP	dATP	dATP	dATP
dCTP	dCTP	dCTP	dCTP
dTTP	dTTP	dTTP	dTTP
7 deaza-dGTP <sup>16</sup>	7 deaza-dGTP <sup>16</sup>	7 deaza-dGTP <sup>16</sup>	7 deaza-dGTP <sup>16</sup>
Tris-HCl (pH 9,5)	Tris-HCl (pH 9,5)	Tris-HCl (pH 9,5)	Tris-HCl (pH 9,5)
Magnesium-Cl.	Magnesium-Cl.	Magnesium-Cl.	Magnesium-Cl.
Tween 20	Tween 20	Tween 20	Tween 20
Nonidet P-40	Nonidet P-40	Nonidet P-40	Nonidet P-40
2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol
thermostabile Pyrophosphatase	thermostabile Pyrophosphatase	thermostabile Pyrophosphatase	thermostabile Ppyrophosphatase
Thermo Sequenase DNA-Polymerase	Thermo Sequenase DNA-Polymerase	Thermo Sequenase DNA-Polymerase	Thermo Sequenase DNA-Polymerase
ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP

Tabelle 8: Komponenten des A-C-G-T-Mix des „Cycle sequencing“.

Es wurden 6,75%ige Acrylamidgele (AA:BAA=19:1) verwendet. Nach Zugabe von APS (10µl APS 10% /ml Acrylamidlösung) und TEMED (1µl TEMED/ml Acrylamidlösung) wurde die Lösung mit Hilfe einer Spritze zwischen die gereinigten Glasplatten gegossen, der Probenkamm (Geltaschenformer) eingefügt, und zum Erstarren 1h stehen gelassen. Das Acrylamidgel wurde anschließend in den Automated Laser Fluorescent Sequenzer (A.L.F.) eingebaut, 0,6x TBE-Puffer wurde in die Pufferkammern eingefüllt und die Elektroden angeschlossen. Nach einem kurzen Probelauf wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt über Nacht. Die Auswertung der Sequenz erfolgt durch die integrierte Computer-Software.

### 2.2.12 Autoradiographie

Zur Visualisierung der radioaktivmarkierten DNA-Proben der PTT-Gele wurde die Methode der Autoradiographie eingesetzt. Das getrocknete PTT-Gel wird in eine Autoradiographie-Metallkassette eingelegt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die mit <sup>35</sup>S markierten Gele werden üN bei RT exponiert. Durch die Reaktion der radioak-

<sup>16</sup>Die Verwendung von 7-deaza-dGTP in der Nukleotidmix eliminiert Artefakte, die durch Kompression während der Gelelektrophorese entstehen können.

## Material und Methoden

tiven Zerfallsprodukte (Emission von Elektronen) mit den Silberhalogeniden des Röntgenfilms wird bei der Entwicklung des Films ein Abbild erzeugt (104). Durch das Auflegen einer Verstärkungsfolie lässt sich die Dauer der Exposition reduzieren. Wird die Verstärkerfolie bei dem radioaktiven Zerfall von Elektronen, die den Film durchdringen, getroffen, so werden Photonen emittiert. Diese werden ebenso von den Silberhalogeniden der äußeren Filmschicht aufgefangen und führen zu einer Verstärkung der Intensität des Autoradiogramms (105).

### 2.2.13 Nichtradioaktive Nachweismethoden für Nukleinsäuren

#### 2.2.13.1 Silberfärbung nach Budowle (58)

Die Silberfärbung ist eine gesundheitlich unbedenkliche Methode, die eine permanente Dokumentation erlaubt, da das Gel anschließend auf Whatmann-Papier getrocknet wird. Es werden im Einzelnen folgende Schritte durchgeführt:

- 10 Minuten Fixierung des Gels in 10% Ethanol
- 3 Minuten oxidieren in 1%  $\text{HNO}_3$
- 5-10 Sekunden waschen in Aqua dest.
- 20 Minuten baden in  $\text{AgNO}_3$
- 1 Minute waschen in Aqua dest.
- Reduktion mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /Paraformaldehyd (Entwickler), bis ausreichende Qualität vorhanden ist
- 10 Minuten stoppen mit 5% Essigsäure
- 10 Minuten in 5% Glycerol fixieren

#### 2.2.13.2 Ethidiumbromidfärbung

Durch in DNA interkalierendes Ethidiumbromid ( $\text{EtBr}^-$ ) kann man leicht Nukleinsäuren nachweisen. Die Nachweisgrenze beträgt ca. 50-100ng. Der DNA- $\text{EtBr}^-$ -Komplex wird durch Bestrahlung mit UV-Licht von einer Wellenlänge zwischen 250-360 nm zur Fluoreszenz angeregt, die über Photographie mit Rotfilter dokumentiert werden kann. Es bestehen zwei Möglichkeiten  $\text{EtBr}^-$  der DNA zuzufügen. Es kann während der Agarose-Gel-Herstellung in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$  zugefügt werden. Da diese Interkalation geringfügig das Laufverhalten der Nukleinsäuren verändert, besteht aber auch die Möglichkeit, das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese in einem  $\text{EtBr}^-$ -Bad zu färben.

## Material und Methoden

### 2.2.14 Haplotypbestimmung

Im Laufe der Untersuchung der kompletten kodierenden Sequenz des BRCA1-Gens bei 35 Brustkrebs-Patientinnen und 70 Kontrollen aus Bulgarien wurden fünf Polymorphismen entdeckt, L→P871, E→G1038, K→R1183, S→P1431 und S→G1613, die zwei verschiedene Haplotypen bilden. Der seltene Haplotyp wurde als *BRCA1\** bezeichnet, es wurde eine vergleichende Studie über deren Verteilung in der Patientinnen- und Kontrollgruppe durchgeführt. Für E→G1038, K→R1183, S→P1431, S→G1613 wurden die Haplotypen durch Restriktionendonuklease-Analyse der korrespondierenden DNA-Formate der beiden Elternteile bestätigt. Für DNA-Amplikate, die P871 und/oder L871 beinhalten, wurden die Haplotypen durch CSGE, SSCP und Sequenzieren untersucht. Wenn die Probanden heterozygot für alle Loci waren, wurde eine primer-aided specific amplification (PASA) durchgeführt, um den Haplotyp zu zeigen. Primer und PCR-Bedingungen wurden ausgesucht, um drei aufeinanderfolgende Exon11- Allele (L871, G1038 und R1183) in zwei Reaktionen zu amplifizieren. Oligonukleotide für (L871, G1038) sind 5'-CAAGCGCCAGTCATTTGCTCT-3' und 5'-CTTCATTAATATTGCTTGAGCTGGCTC-3' und die PCR-Bedingungen sind 30 Zyklen mit 0,8 min Denaturation bei 94°C, 0,5 min Hybridisierung bei 62°C und 0,5 min Elongation bei 72°C. Die Oligonukleotide für (G1038, R1183) sind 5'-CGTAATAACATTAGAFAAATGTTTTTAAAGG-3' und 5'-GACTCCTGCTAAGCTCTCC-3' und die PCR-Bedingungen sind 27 Zyklen mit 0,8 min Denaturation bei 94°C, 0,5 min Hybridisierung bei 62°C und 0,5 min Elongation bei 72°C.

### 2.2.15 Statistische Analyse

Die Schätzung von Allel-Frequenzen wurde durch die Allel-Zähl-Methode durchgeführt. Die Genotyp-Verteilung verglichen mit dem Hardy-Weinberg Equilibrium wurde mit der Chi-quadrat-Methode ausgeführt. Die Bestimmung von Frequenz-Sicherheits-Intervall (frequency confidence intervals (0.95CI)), und der Vergleich zwischen der Träger-/Allel-Frequenz in beiden Gruppen (Chi-quadrat Methode und direkten Wahrscheinlichkeitskalkulation) wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (106).

## Material und Methoden

### 2.2.16 Computer-Analyse

Die Restriktionsanalyse der Amplifikate wurde mit Hilfe der Computerprogramme DNAsis und MacMolly simuliert. Die Oligonukleotide für PASA wurden mit Hilfe des Macintosh Programms Oligo 4,0 ausgesucht. Die Sekundärstruktur-Vorhersage für Protein-Isoformen wurde durch die PHDsec Algorithm-Methode (107) an dem EMBL Predict Protein Server in Heidelberg, Deutschland ausgeführt.

### 3 Ergebnisse

Genomische-DNA und Gesamt-RNA aus 35 nicht verwandten bulgarischen Patientinnen mit Familienanamnese für Brustkrebs-und/oder Eierstockkrebs oder beidseitig betroffenen Brustkrebspatientinnen wurde auf Mutationen in dem BRCA1-Gen mit Hilfe von PTT und konformations-analytischen Verfahren (SSCP und CSGE) untersucht.

#### 3.1 Optimierung der „Conformation Sensitive“ Gel- Elektrophorese (CSGE)-Analyse

Das verwendete Protokoll dieser Arbeit ist eine Modifikation des Originalprotokolls von Ganguly et al. (62), die ich in Zusammenarbeit mit Dr. Arseni Markoff entwickelt und verbessert habe (108). Diese Modifikation ermöglicht eine kürzere Elektrophorese-Zeit und lässt dadurch mehr Patienten bei leichter Handhabung und höherer Sensivität der Methode untersuchen. Dieses Protokoll benutzt sehr dünne Polyacrylamidgele (d.h. Ultradünnschicht-System) in einer horizontalen Laufrichtung und ein diskontinuierliches Elektrophoresesystem (d.h. zwei verschiedene Pufferzusammensetzungen). Anschließend folgt die Silberfärbung nach Budowle, um DNA-Banden sichtbar zu machen. Mit Hilfe einer präzisen Temperaturkontrolle zusammen mit den beschriebenen Pufferbedingungen wird eine gute Auftrennung der DNA-Banden erreicht. Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden für die Mutationsanalyse“, 1.5.2, Heteroduplex-Analyse (HA)) beschrieben. Die PCR-Reaktionen für die CSGE-Formate sind unter Kapitel 2.2.6 und die praktische Durchführung der Methode ist unter Kapitel 2.2.8.2.3 beschrieben. Wie in Abbildung 11 gezeigt wird, können unter mild denaturierenden Bedingungen (15% Urea, 10% Ethylen-Glycol) unterschiedliche Bewegungsmuster von Homo- und Heteroduplex-DNA während einer Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden. Heteroduplex-DNA bewegen sich in den Gelen langsamer als korrespondierende Homoduplex-DNA.

## Ergebnisse

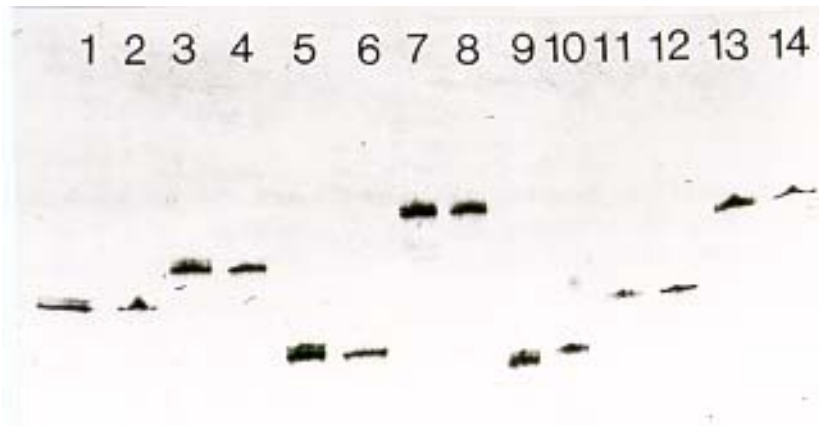


Abbildung 11: CSGE-Analyse von BRCA1 PCR-Produkten. Die Spuren 1-14 zeigen (ungerade Spuren): Patientinnen mit Polymorphismen im heterozygoten Zustand (+/-) für die P(1186), P(2201), P(2430), P(2731), P(3667), P(4410) und P(4956) und Kontrollen (gerade Spuren) mit neutralem Genotyp (-/-) für diese Polymorphismen.

### 3.2 Mutationsanalyse des BRCA 1 Brustkrebsgens

#### 3.2.1 Ergebnisse der „Protein Truncation“-Test (PTT)- Analyse

Bei der elektrophoretischen Analyse der Translationsprodukte entsprechend den Fragmenten I (Exon 2-10), II (Exon 12-24), und der 3 Subfragmente von Exon 11 (A, B und C), wurden nur Banden entdeckt, die den Molekulargewichten der normalen, nicht verkürzten Polypeptide entsprechen. Bei der Analyse von Fragment I beobachtete man bei allen untersuchten Patientinnen ein normales Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 33 kDa. Bei der Fragment II- Analyse wurde bei allen Patientinnen der untersuchten Gruppe ein normales Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 58 kDa. nachgewiesen. Bei der Untersuchung des Subfragmente A, B und C von Exon 11 des BRCA 1-Gens wurden bei allen Patientinnen normale Polypeptide mit Molekulargewichten von 50, 54 und 41 kDa. entdeckt. Abbildung 12 zeigt die elektrophoretische Analyse der Subfragmenten A, B und C (Exon 11) bei fünf untersuchten Patientinnen. Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden der Mutationsanalyse“, 1.5.2) erklärt. Die Amplifikation unterschiedlicher PTT-Formate ist unter Kapitel 2.2.6 und die praktische Durchführung der Methode unter Kapitel 2.2.10 beschrieben.

## Ergebnisse

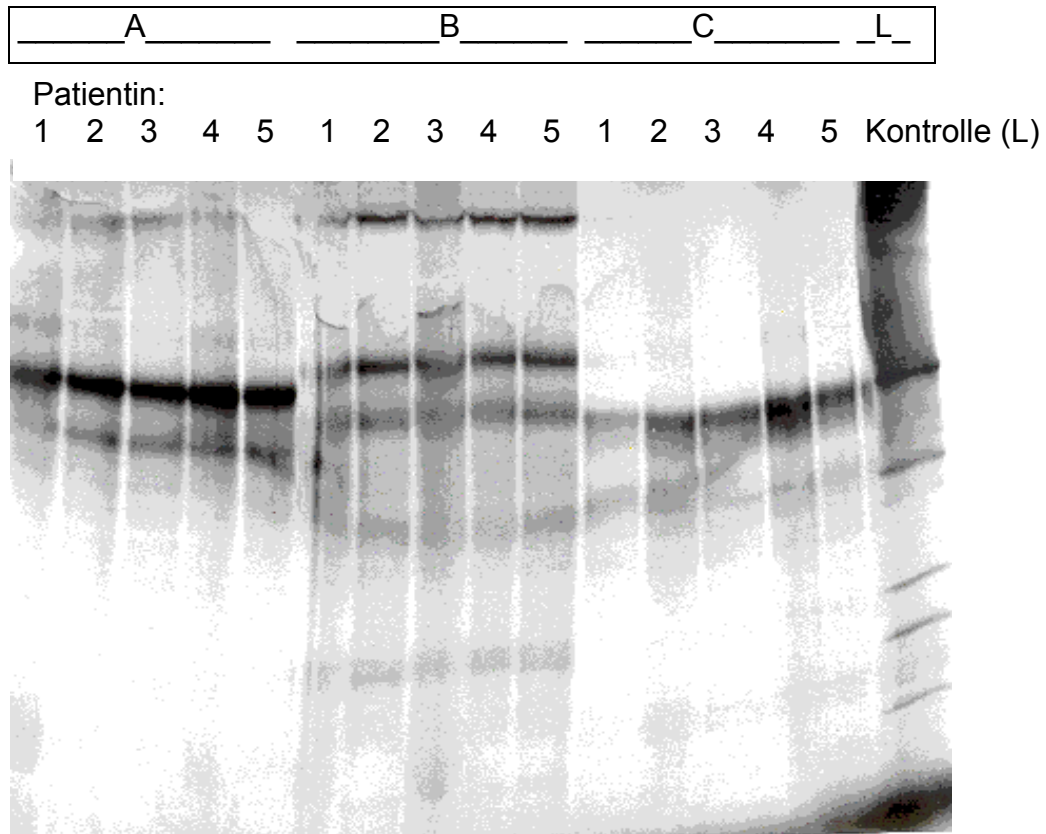


Abbildung 12: Genomische PTT-Formate des BRCA1-Gens. Bei den Patientinnen 1-5 wurden die drei Subfragmente von Exon 11 (A, B und C) auf verkürzten Translationsprodukten untersucht. Bei allen Patientinnen sind normale Polypeptide nachgewiesen. Bande A: 50 kDa; Bande B: 54 kDa und Bande C: 41 kDa. Als Proteinkontrolle wird Luciferase (L) eingesetzt. Die höchste Bande (Majorbande) ist 61 kDa, die restlichen Banden sind degradiertes Protein.

### 3.2.2 Ergebnisse der „Single Strand Conformation Polymorphismus“ (SSCP)-Analyse

Amplifikate der gesamten kodierenden Region von BRCA1 wurden durch SSCP-Analyse untersucht. Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden der Mutationsanalyse“, 1.5.2) erklärt. Die PCR-Reaktionen für die SSCP-Formate sind unter Kapitel 2.2.6 und die praktische Durchführung der Methode unter Kapitel 2.2.8.2.2 beschrieben.

In 8 der analysierten Formate wurden, verglichen mit den Normalkontrollen, Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität bei insgesamt drei verschiedenen Elektrophoresebedingungen (SSCP in Ultradünnschicht-Gel, PEG-SSCP und MDE-Gel-SSCP) festgestellt.



## Ergebnisse

Abbildung 13 bis Abbildung 15 zeigen die SSCP-Analyse in Ultradünnschicht-Gel (Multiphor-Format) (Abbildung 13), PEG-SSCP (Abbildung 14) und MDE-Gel-SSCP (Abbildung 15).

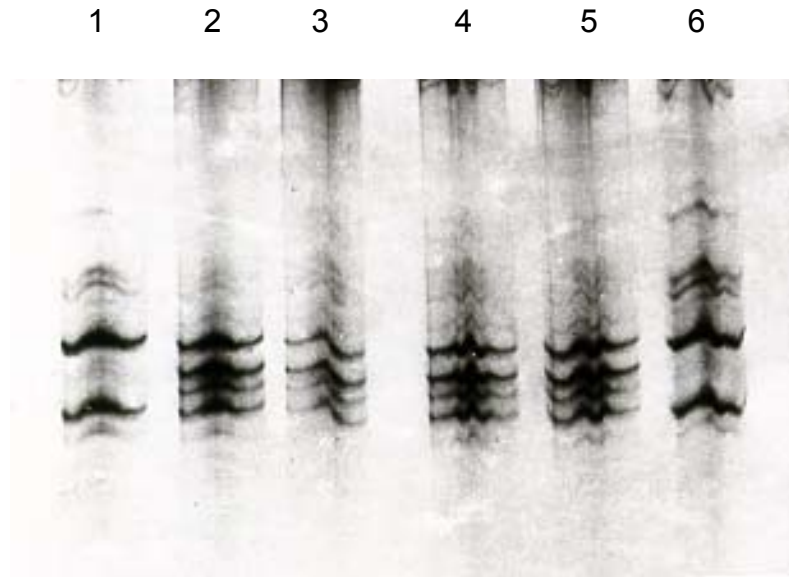


Abbildung 13: SSCP-Analyse von Exon 11 (P2731) in einem Ultradünnschicht-Gel (Multiphor-Format). Spuren 1 und 6 sind PCR-Produkte von Nichtträgern dieses Polymorphismus, Spuren 2 - 5 sind PCR-Produkte von heterozygoten Trägern.

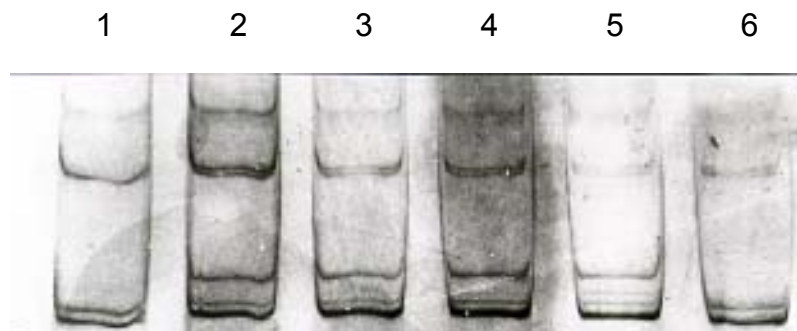


Abbildung 14: SSCP-Analyse von Exon 11, (P2430) in einem Polyacrylamid-Gel mit 0,5% PEG. Spuren 1 und 6 sind PCR-Produkte von Nichtträgern dieses Polymorphismus, Spuren 2 - 5 sind PCR-Produkte von heterozygoten Trägern.

## Ergebnisse

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

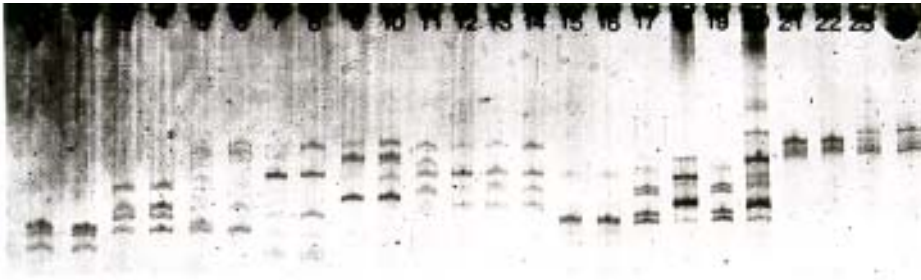


Abbildung 15: SSCP-Analyse von Polymorphismen des BRCA1-Gens in einem MDE-Gel. Die Spuren 1-24 zeigen: heterozygote Patientinnen (ungerade Spuren) für die P (666-67), P(1186), P(2201), P(2430), P(2731), P(3232), P(3238), P(3667), P(4410), P(4427), P(4956) P(5396 + 128) und Kontrollen (gerade Spuren) mit neutralem Genotyp für diese Polymorphismen.

P (3667) wurde nur in PEG-SSCP nachgewiesen. Abbildung 16 zeigt die SSCP-Analyse für P(3667) in einem Polyacrylamid-Gel mit 0,5% PEG. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der SSCP-Analyse im Ultradünnschicht-Gel und in einem Polyacrylamid-Gel mit 0,5% PEG aufgelistet.

Patientin:  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 K

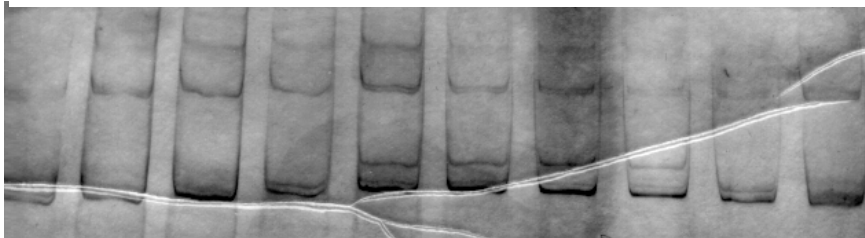


Abbildung 16: SSCP-Analyse in einem Polyacrylamid-Gel mit 0.5% PEG. Spuren 5-8 zeigen heterozygote Patientinnen für die P(3667). Die Spuren 1,2,3,4,9 und K (Kontrolle) zeigen Patientinnen mit neutralem Genotyp für diesen Polymorphismus.

## Ergebnisse

identifizierter Polymorphismus	BRCA1-Exon	PEG-SSCP	SSCP in Ultradünnschicht-Gel
P(2201)	11	+	+
P(2430)	11	+	+
P(2731)	11	+	+
P(3232)	11	+	+
P(3238)	11	+	+
P(3667)	11	+	(-)
P(4410)	13	+	+
P(4427)	13	+	+

Tabelle 9: Ergebnisse der SSCP-Analyse im Ultradünnschicht-Gel und in einem Polyacrylamid-Gel mit 0.5% PEG. P(3667) wurde nur in PEG-SSCP nachgewiesen, die restlichen Polymorphismen waren durch beide Methoden nachweisbar.

### 3.2.3 Ergebnisse der „Conformation Sensitive“-Gel-Elektrophorese“ (CSGE)-Analyse

Formate des gesamten kodierenden Bereichs von BRCA1 wurden durch CSGE-Analyse untersucht. In 12 der analysierten Formate wurden Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität der doppelsträngigen Fragmente im Vergleich zu den Normalkontrollen, sowie auch das Auftreten von Doppelbanden, das indikativ für Heteroduplexentstehung ist, entdeckt. Solche Unterschiede wurden im Intron 8 (bei 11 Patientinnen), Format 11B (bei 2 Patientinnen), 11G (bei 11 Patientinnen), 11H (bei 11 Patientinnen), 11H2 (bei 11 Patientinnen), 11I2 (bei 11 Patientinnen), 11K2 (bei 12 Patientinnen), 11L (bei 12 Patientinnen), 11N (bei 11 Patientinnen), 13 (bei 11 Patientinnen), Exon 16 (bei 11 Patientinnen) und Intron 20 (bei 1 Patientin) gefunden. Mit Hilfe der CSGE-Analyse wurden insgesamt 12 Polymorphismen nachgewiesen, die vollständig in der folgenden Abbildung 17 dargestellt sind.

## Ergebnisse



Abbildung 17: CSGE-Analyse von Polymorphismen des BRCA1-Gens in einem Ultradünnschicht-Gel. Die Spuren 1-24 zeigen heterozygote Patientinnen für Polymorphismen in der angegebenen Reihenfolge: P(666-67), P(1186), P(2201), P(2430), P(2731), P(3232), P(3238), P(3667), P(4410), P(4427), P(4956) und P(5396 + 128) (ungerade Spuren), und von Kontrollen mit neutralem Genotyp für diesen Polymorphismen (gerade Spuren).

### 3.2.4 Sequenzierung

DNA-Fragmente, die sich bei den elektrophoretischen Auftrennungen anders als der Wildtyp verhielten, wurden teilweise durch direktes automatisches Sequenzieren (A.L.F.) untersucht. Das Prinzip dieser Methode wurde in der Einleitung („Gegenwärtige Methoden der Mutationsanalyse“, 1.5.2) erklärt. Die praktische Durchführung der Methode wurde unter Kapitel 2.2.11 beschrieben. Alle Fragmente zeigten Sequenzvariationen (Tabelle 10: Ergebnisse des Mutations-Screening). Bei den durchgeführten Analysen wurden 12 Veränderungen der Nukleotidsequenz von BRCA1 gefunden und charakterisiert. 11 davon sind Nukleotidsubstitutionen und eine Veränderung ist eine Nukleotiddeletion. 2 dieser Sequenzvariationen sind intronische Polymorphismen und die restlichen 10 sind Variationen im kodierenden Bereich von BRCA 1. Von den 10 Variationen im kodierenden Bereich führen 7 zu einem Aminosäureaustausch: Gln356>Arg (P1186), Leu871>Pro(P2731), Glu1038>Gly(P3232), Ser1040>Asn(P3238), Lys1183>Arg (P3667), Ser1431>Pro(P4410), Ser1613>Gly(P4956) und 3 sind neutrale Polymorphismen: Ser694(T>C), Leu771(T>C) und Ser11436(T>C). Alle identifizierten Varianten wurden durch CSGE und 8 davon auch durch SSCP nachgewiesen. Von allen entdeckten Polymorphismen sind 11 bekannt und 1 Polymorphismus in

## Ergebnisse

Intron 20 ist neu (P(5396+128)). Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der direkten automatischen Sequenzierung der Polymorphismen P(2731) und P(5396+128).

# Ergebnisse

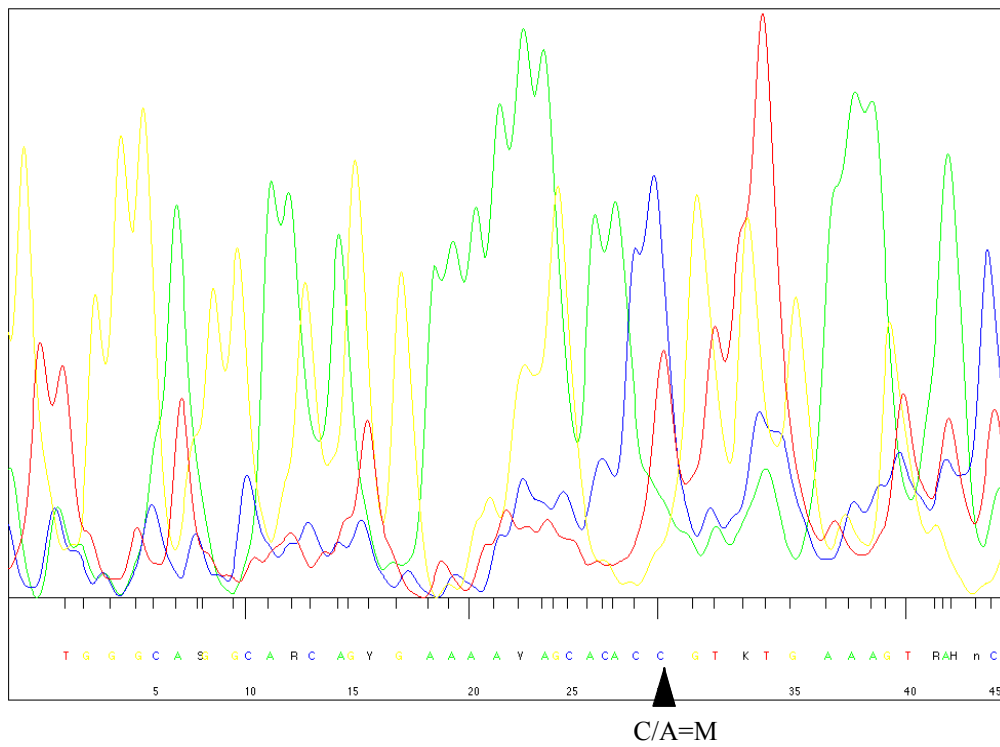
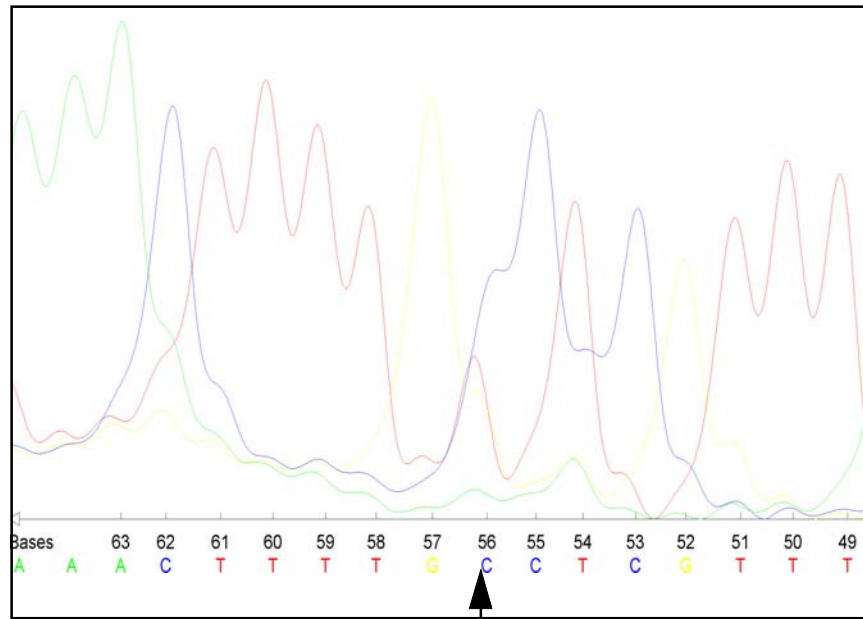


Abbildung 18: Direktes automatisches Sequenzieren (A.L.F.) der Polymorphismen P(2731): C>T (oben) und P(5396+128): C>A (unten). Die veränderten Basen sind mit Y (oben) und M (unten) entsprechend gekennzeichnet und mit Pfeilen gezeigt.

## Ergebnisse

### 3.2.5 Ergebnisse der SSCP/CSGE- Analyse

Genomische DNA von 35 Brust-/Eierstockkrebspatientinnen mit einer bekannten familiären Anamnese, die mit Hilfe von PTT untersucht wurden, sind im Hinblick auf Mutationen im BRCA1-Gen untersucht worden. PCR-Produkte der gesamten kodierenden Sequenz des Gens wurden mit Hilfe von SSCP- und CSGE-Analyse analysiert. Die meisten DNA-Fragmente, die eine unterschiedliche elektrophoretische Auftrennung im Vergleich zum Wild-Typ aufwiesen, wurden sequenziert und alle zeigten eine variante Sequenz. Einige Polymorphismen in Exon 11, 13 und 16, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym entweder vernichten oder schaffen, wurden nicht sequenziert, sondern mit Hilfe der entsprechenden Restriktionsanalyse bestätigt. Die Ergebnisse der SSCP- und CSGE-Analyse, des direkten Sequenzierens und der Restriktionsanalyse sind in der Tabelle 10 gezeigt.

## Ergebnisse

Identifizierte Polymorphismus	Systematischer Name	BRCA1 Exon	SSCP	CSGE	veränderte Sequenz	veränderte AS	Art der Identifizierung	berichtete allelische Frequenz	allelische Frequenz in dieser Studie
P(666-67)	IVS8-67delT	I-8	-	+	delT	-	Sequenzieren	0,33	0,1
P(1186)	Q >R356	11	-	+	A >G	Gln356 >Arg	Sequenzieren	0,06	0,05
P(2201)	2201 T>C	11	+	+	T >C	still, Ser694	Sequenzieren	0,24	0,1
P(2430)	2430 T>C	11	+	+	T >C	still, Leu771	Restriktions- Endonuklease, Bsr I	0,33	0,1
P(2731)	L >P871	11	+	+	C >T	Leu871>Pro	Sequenzieren	0,34	0,1
P(3232)	E > G1038	11	+	+	A >G	Glu1038 >Gly	Sequenzieren	0,33	0,1
P(3238)	S > N1040	11	+	+	G >A	Ser1040>Asn	Sequenzieren	0,02	0,05
P(3667)	K >R1183	11	+	+	A >G	Lys1183>Arg	Restriktions- Endonuklease, MnlI	0,32	0,1
P(4410)	S >P1431	13	+	+	T >C	Ser1431>Pro	Restriktions- Endonuklease, MnlI	0,33	0,1
P(4427)	4427T >C	13	+	+	T >C	Still, Ser1436	Restriktions- Endonuklease, Earl	0,33	0,1
P(4956)	S >G1613	16	-	+	A >G	Ser1613>Gly	Restriktions- Endonuklease, BstNI	0,31	0,1
P(5396+128)	IVS20+128C >A	I-20	-	+	C >A	-	Sequenzieren	-	0,025

Tabelle 10: Ergebnisse des Mutations-Screening.



## Ergebnisse

### 3.2.6 Ergebnisse der Restriktionsendonuklease-Analyse

Manche Polymorphismen in Exon 11, 13 und 16, die zu einer Veränderung einer Restriktionsschnittstelle führen, konnten mit Hilfe der Restriktionsanalyse nachgewiesen werden. Eine Tabelle der verwendeten Restriktionsenzyme, das Vorhandensein oder Fehlen einer Schnittstelle und entstandene Produkte sind in der unten aufgeführte Tabelle 11 aufgelistet.

BRCA1 Exon	Poly-morphismen	Restriktions-Endonuklease	Schnitt-stelle J/N	Produkt (bp)	Spaltprodukte(bp) homozygote DNA (-/-)	Spaltprodukte(bp) heterozygote DNA (-/+)
11	P(2430)	Bsr I	J	285	137,148	148,94,43
11	P(3667)	Mnl I	J	253	171,37,29,15	108,63,37,29,15
13	P(4410)	Mnl I	J	280	280	280,160,120
13	P(4427)	Ear I	N	280	177,103	280,177,103
16	P(4956)	BstN I	J	375	375	375,235,140
16	P(5029)	Mae I	J	375	375	375,311,64

Tabelle 11: Polymorphismen im BRCA1-Gen, die mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen identifiziert werden können. Die verwendeten Restriktionsenzyme, das Vorhandensein oder Fehlen einer Schnittstelle und entstandene Produkte bei den Patientinnen mit neutralem Genotyp (homozygote DNA (-/-)) und den heterozygoten Patientinnen (heterozygote DNA (+/-)) sind aufgelistet.

In der Abbildung 19 ist die Restriktions-Analyse von P(4427) im Exon 13 gezeigt.

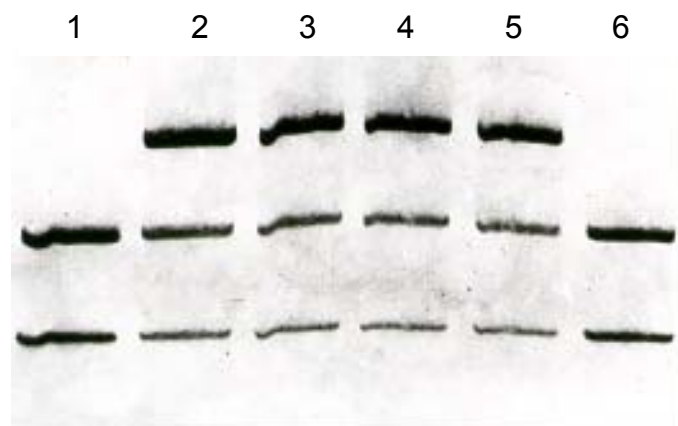


Abbildung 19: Restriktionsanalyse von P(4427) im Exon 13 von BRCA1. Die Restriktionsstelle für *EarI* geht bei heterozygoten Patientinnen (+/-) mit der P(4427) in einem Allel verloren und erzeugt die Spaltprodukte: 280bp, 177bp und 103bp (Spuren 2-5). Spuren 1

## Ergebnisse

und 6 zeigen homozygoten Kontrollen mit neutralem Genotyp (-/-). Hier sind zwei Spaltprodukte (177bp und 103bp) vorhanden.

Die Restriktions- und SSCP- Analyse für die BRCA1- Polymorphismen zeigten das Vorkommen der homozygot selteneren Form IVS8-667delT, 2201T →C, 2430T→C, L→P871, E→G1038, K→R1183, 4427T→C und S→G1613 bei zwei weiteren der untersuchten Patientinnen.

### 3.2.7 Anhäufung von Polymorphismen bei Patientinnen und Kontrollpatientinnen

Alle 35 Brustkrebspatientinnen dieser Untersuchung wurden auf Mutationen des BRCA1-Genes mit Hilfe von SSCP und CSGE-Techniken, nach einem Prescreening mit PTT, untersucht. Alle DNA-Fragmente, die eine unterschiedliche elektrophoretische Auftrennung verglichen mit dem Wild-Typ zeigten, wurden sequenziert bzw. mit Hilfe der Restriktionsanalyse identifiziert, und alle beinhalteten eine Sequenzaberration. Die Verteilung von fünf Polymorphismen die zu Aminosäure-Austauschen führen (L→P871, E→G1038, K→R1183, S→P1431, S→G1613), gaben Anlass zu weiteren Untersuchungen. Im Laufe einer Haplotyp-Untersuchung wurden die beiden Haplotypen (P871, E1038, K1183, S1431, S1613) und (L871, G1038, R1183, P1431, G1613) identifiziert. Die Haplotypen wurden als *BRCA1* und *BRCA1\** bezeichnet, wobei letzterer den selteneren Haplotyp darstellt. Dessen Verteilung bei den Patientinnen wurde überprüft. Dabei wurde gefunden, dass die *BRCA1\**-Frequenz in der Patientinnengruppe deutlich niedriger ist als in der kaukasischen Population in anderen Studien (81). Aufgrund dieser Befunde wurde eine Gruppe von 70 Kontrollpatientinnen auf diese Polymorphismen ebenfalls untersucht. Hier wurden die gleichen zwei Haplotypen gefunden, die Allel-Frequenz des seltenen Haplotyps (0,36, 95% confidence interval (CI) 0,32-0,40) unterscheidet sich nicht von früheren Angaben in der kaukasischen Population. Die Verteilung der Genotyp-Frequenz in der Kontrollgruppe (Tabelle 12: *BRCA1*- und *BRCA1\**-Genotypen und ihre Allel-Verteilung) unterscheidet sich nicht wesentlich von dem zu erwartenden Hardy-Weinberg Equilibrium: ( $\chi^2=1,16$ ,  $p>0,05$ ). Vergleiche der Genotyp-Verteilung zeigen erhebliche statistische Unterschiede ( $\chi^2=20,298$ ,  $p=0,007$ ), wobei hetero-und homozygote Träger des *BRCA1\**-Haplotyps in deutlicher Minderzahl sind (siehe Tabelle 12 und Grafik 1). Vergleiche der Allel-frequenz der beiden Gruppen zeigen einen ähnlichen Trend

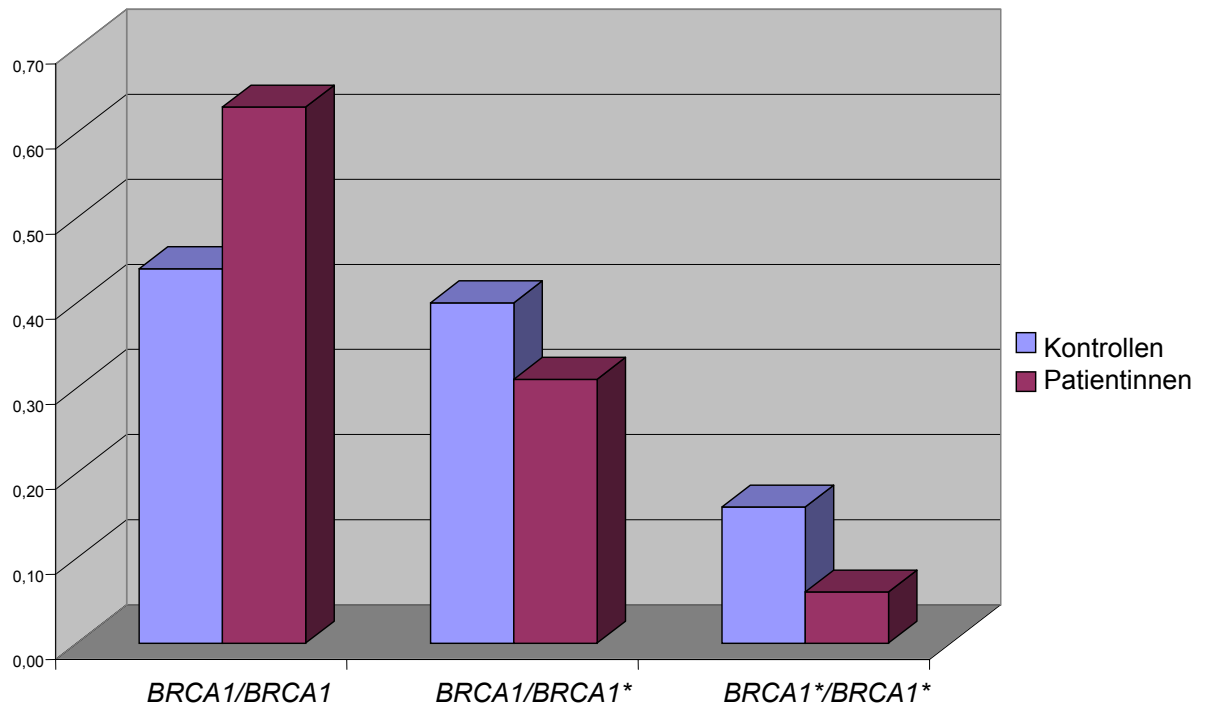
## Ergebnisse

(Tabelle 12 und Grafik 2), wobei das seltene Allel (*BRCA1\**) in der Patientinnen-  
gruppe ( $\chi^2=4,46$ ,  $p=0,013$ ) unterrepräsentiert ist.

Parameter	Kontrollen	Patientinnen	Statistik
<b>GENOTYPEN</b>			
Totale Anzahl	70	35	$\chi^2=20,298$ $p=0,007$
<i>BRCA1/BRCA1</i>			
Anzahl	31	22	
Frequenz	0,44	0,63	
0,95 CI	0,38-0,50	0,55-0,71	
<i>BRCA1/BRCA1*</i>			
Anzahl	28	11	
Frequenz	0,40	0,31	
0,95 CI	0,34-0,46	0,24-0,39	
<i>BRCA1*/BRCA1*</i>			
Anzahl	11	2	
Frequenz	0,16	0,06	
0,95 CI	0,11-0,20	0,02-0,10	
<b>ALLELE</b>			
Totale Anzahl	140	70	$\chi^2=4,46$ $p=0,013$
<i>BRCA1</i>			
Anzahl	90	55	
Frequenz	0,64	0,79	
0,95 CI	0,60-0,68	0,74-0,83	
<i>BRCA1*</i>			
Anzahl	50	15	
Frequenz	0,36	0,21	
0,95 CI	0,32-0,40	0,17-0,26	

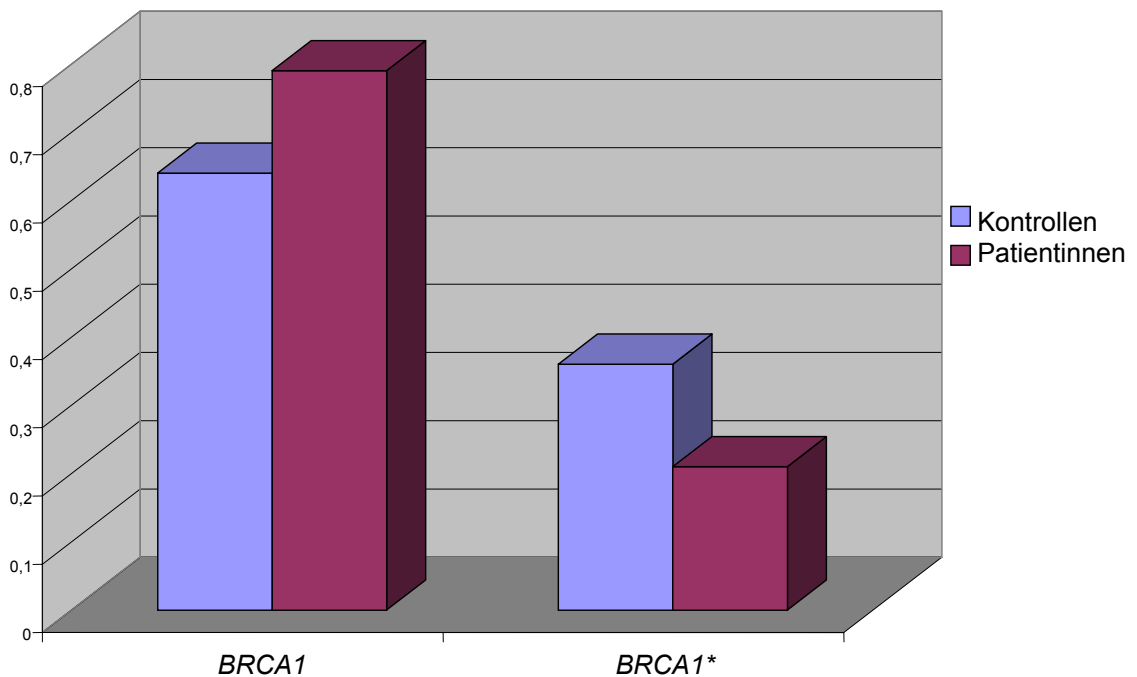
Tabelle 12: *BRCA1*- und *BRCA1\**-Genotypen und ihre Allel-Verteilung.

## Ergebnisse



Grafik 1: *BRCA1/BRCA1\**- Genotypen in Patientinnen und Kontrollen (Auf der Ordinate ist die Frequenz aufgetragen).

Grafik 2: *BRCA1/BRCA1\**- Allelverteilung in Patientinnen und Kontrollen (Auf der Ordinate ist die Frequenz aufgetragen).



## Ergebnisse

### 3.2.8 BRCA1-Isoformen

Die seltenen Allele (L871, G1038, R1183, P1431, G1613 ) lassen eine neue BRCA1-Isoform, BRCA1\*, entstehen. Die vergleichende Sekundär-Struktur-Analyse (PHDsec Algorithm) ist in Abbildung 20 gezeigt. Ein Vergleich der Sekundär-Struktur der polymorphen Regionen der BRCA1 und BRCA1\*-Isoformen, zeigt eine unterschiedliche Verteilung und Zusammensetzung der Faltblatt (E)- und Helix (H)-Konformationen in den Sequenzen um die Aminosäuresubstitutionen.

pos. 764-883

BRCA1	
AA	VESSSISLVPGTDYGTQESISLLEVSTLGKAKTEPNKCVSQCAAFENPKGLIHGCSKDNR
PHD sec	E EEEEE HHHHHHHHHHHH EE EE
AA	NDTEGFKYPLGHEVNHRSRETSIEMEESELDAQYLQNTFKVSKRQSFAPFSNPGNAEEEECA
PHD sec	EEE HHHHHHHHHHHH EEEE HHHH
BRCA1*	
AA	VESSSISLVPGTDYGTQESISLLEVSTLGKAKTEPNKCVSQCAAFENPKGLIHGCSKDNR
PHD sec	E EEEEE EEEEEHHHHH EEE
AA	NDTEGFKYPLGHEVNHRSRETSIEMEESELDAQYLQNTFKVSKRQSFALFSNPGNAEEEECA
PHD sec	EE HHHHHHHHHHHH EEEEE HHHH

pos. 944-1063

BRCA1	
AA	CSIKGGSRFCLSSQFRGNETGLITPNKHGLLQNPYRIPPLFPFKSFKVTKCKKNLLEENF
PHD sec	EEEE E E EEEE
AA	EEHSMSPEREMGNENIPSTVSTISRNNIRENVFK <u>E</u> ASSSNINEVGSSTNEVGSSINEIGS
PHD sec	EEEE EE EEEE
BRCA1*	
AA	CSIKGGSRFCLSSQFRGNETGLITPNKHGLLQNPYRIPPLFPFKSFKVTKCKKNLLEENF
PHD sec	EEEE EE EEEE
AA	EEHSMSPEREMGNENIPSTVSTISRNNIRENVFK <u>G</u> ASSSNINEVGSSTNEVGSSINEIGS
PHD sec	EEEE EEEE

pos. 1124-1243

BRCA1	
AA	FSPYLISDNLEQPMGSSHASQVCSETPDDLDDGEIKEDTSFAENDIKESSAVFSKSVQ <u>K</u>
PHD sec	EEE HHHH EE EE
AA	GELSRSPSPFTHTHLAQGYRRGAKKLESSEENLSSSEDEELPCFQHLLFGKVNNIPSQSTR
PHD sec	HHHHHHHHH
BRCA1*	
AA	FSPYLISDNLEQPMGSSHASQVCSETPDDLDDGEIKEDTSFAENDIKESSAVFSKSVQ <u>R</u>
PHD sec	E HHHH EE
AA	GELSRSPSPFTHTHLAQGYRRGAKKLESSEENLSSSEDEELPCFQHLLFGKVNNIPSQSTR
PHD sec	HHHHHHHHH HHH

Abbildung 20: PHDsec-Konformationsanalyse für die Sekundär-Struktur von bestimmten Exon 11-Abschnitten mit der häufigen (BRCA1) und der seltenen (BRCA1\*) polymorphen Aminosäure. Die veränderten Aminosäuren sind unterstrichen. Ein Vergleich der Sekundär-Struktur der polymorphen Regionen der BRCA1- und BRCA1\*-Isoformen, zeigt eine unterschiedliche Verteilung und Zusammensetzung der Faltblatt(E)- und Helix(H)-Konformationen in den Sequenzen um die Aminosäuresubstitutionen.

#### 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Untersuchungsmethode für Mutationen des BRCA1-Gens etabliert werden, die neben dem „Protein-Truncation-Test“ Mutationen nachweisen kann, die nicht zur frühzeitigen Translationsstop führen. Um die Sensibilität der beiden Methoden SSCP und CSGE zu vergleichen, wurden 35 Brustkrebspatientinnen mit familiärer Anhäufung der Krankheit mit diesen molekularbiologischen Methoden untersucht. Eine komplette Untersuchung durch PTT war zuerst negativ ausgefallen. Im Laufe der Untersuchung wurden benigne Polymorphismen, aber keine Mutationen gefunden. Der Grund dafür ist bei der Auswahl der Patientinnen zu suchen, da die Selektionsfaktoren nicht streng genug waren (die Zahl der betroffenen Verwandten ersten Grades hatte zwei nicht überschritten). Es müssen auch mögliche Mutationen des zweiten Brustkrebs-Gens BRCA2 berücksichtigt werden.

Die beiden molekularbiologischen Methoden SSCP und CSGE besitzen den Vorteil der relativ einfachen Anwendung und sind, verglichen mit der Sequenzierung des kompletten Gens, mit weit geringeren Kosten verbunden. Es wurde gezeigt, dass die Voruntersuchung der kodierenden Sequenz mit anschließendem Sequenzieren auffallender PCR-Sequenzen am effizientesten und kostensparendsten ist (109). Die Wahl der Primerkombinationen für die PCR-Amplifikationen für die Formate der SSCP- und CSGE-Analyse erfolgte nach der Arbeit von Friedman, L.S. et al. (89). Die optimale Primer-Konzentration ließ sich in einigen Testansätzen einstellen, so dass nur geringer Hintergrund (Primer-Wolken, unspezifische DNA-Banden) bei der elektrophoretischen Auswertung sichtbar war. Wegen des Einflusses der Hybridisierung-Temperatur wurden neben dem sogenannten Normalzyklus, der mit Standard-Temperaturen (94°C, 57°C, 72°C) arbeitete, auch ein Zyklus getestet, der durch eine höhere Hybridisierung-Temperatur gekennzeichnet ist. Mit diesem „Perfect Annealing“ (PA)-Zyklus ließ sich in einigen Testansätzen die Spezifität verbessern, erkennbar durch geringeren Hintergrund bei der elektrophoretischen Auswertung. Exon 17, 18, 19, 20, 23 und 24 des BRCA1-Gens ließen sich sogar mit einer um 7°C höheren Hybridisierung-Temperatur spezifisch darstellen. Es wurde außerdem im Rahmen dieser

## Diskussion

Arbeit ein optimiertes Protokoll für die CSGE- Analyse erstellt (108) (siehe Tabelle 13).

<b>Systemoptimierung CSGE</b>	
1. Acrylamid-Konzentration:	5%, 8%, <u>10%</u> , 12%
2. Acrylamid:Bisacrylamid:	19:1, 29:1, 39:1, <u>99:1</u>
3. Unterschiedliche Denaturierungskomponenten:	15% Formamid 10% Urea <u>15% Urea</u>
4. Unterschiedliche Denaturierungsverfahren:	<u>a) 68°C, 1h</u> b)94°C, 5 Min. - 50°C, 15 Min.
5. Temperatur bei der Elektrophorese	10°C, <u>20°C</u> , 30°C
6. Denaturierungsvorgang mit bzw. <u>ohne Ladepuffer</u> , im letztgenannten Falle wurde der Ladepuffer nach der Denaturierung den Proben zugegeben	
7. Färbung der CSGE-Gele:	<u>a)Silberfärbung nach Budowle</u> b) Ethidiumbromid

Tabelle 13: Systemoptimierung der CSGE. Die verschiedenen Angaben beziehen sich auf unterschiedliche Möglichkeiten der Methodenoptimierung, die im Rahmen dieser Untersuchung getestet wurden. Die Varianten wurden frei nach Erfahrungswerten ausgewählt. Die in dem optimierten Protokoll verwendeten Parameter sind unterstrichen.

In der Literatur sind unterschiedliche Angaben zu der Sensibilität der SSCP-Untersuchung von 35%-80% (52,109,110) angegeben. Faktoren wie Sequenzabfolge, Basenaustausch im analysierten Fragment und die Fragmentlänge wirken auf die Sensibilität der Konformations abhängigen Methoden ein. Der optimale Einsatz der SSCP-Analyse wird bei DNA-Fragmenten in der Größenordnung von 200-400bp erreicht (109). Sämtliche untersuchten BRCA1-Formate befanden sich in dieser Größenordnung. Nach Einsatz der drei optimierten SSCP-Analyse-Verfahren wurde ein geringer Unterschied der Sensitivität der PEG-SSCP verglichen mit MDE-SSCP und Polyacrylamid-SSCP festgestellt (Abbildung 13 bis Abbildung 15). Mit Hilfe des MDE-Gels und des Polyacrylamid-Gels konnten unter den angegebenen Bedingungen die gleichen Polymorphismen nachgewiesen werden,

## Diskussion

nur mit PEG-SSCP war darüber hinaus K>R1183 (P(3667) nachweisbar (Abbildung 16). Die PEG-SSCP-Gele führen zu klareren Bandenmustern, die Nachteile sind jedoch eine stärkere Kompression und eine niedrigere Sensitivität der Färbung.

Ein Grund für die anscheinend niedrigere Sensitivität der SSCP-Analyse in diesem Mutations-Screening könnte darin liegen, dass fast alle identifizierten Aberrationen Nukleotidsubstitutionen sind. CSGE stellt offensichtlich eine sensiblere Technik für diesen Typ Mutationen dar, in dem die Konformationsunterschiede, die nachgewiesen werden, auf falsch gepaarten Basenpaaren (base-pair mismatch) beruhen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass manche Mutationen, trotz der Verwendung beider Methoden, unentdeckt bleiben (falsch negativ sind). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Position des Basenaustausches im Amplifikat und der Sensitivität der SSCP-Methode gefunden werden. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Arbeiten überein, die sich mit optimierten Bedingungen dieser Technik beschäftigt haben (55,56). Es gibt Polymorphismen, die in der Mitte der untersuchten Fragmente liegen und erfolgreich mit Hilfe der SSCP-Analyse identifiziert werden können (S>P1431), und andere, die nicht identifiziert werden können (Q>R356), obwohl deren Position weit vom Fragmentende entfernt liegen. Umgekehrt gibt es Sequenzabberationen wenige zehn Basenpaare vom Fragmentende entfernt (S>G1613), die von der Negativ-Kontrollen nicht unterschieden werden können, und solche die weiter am Ende des Fragments lokalisiert sind, und trotzdem ein verändertes elektrophoretisches Verhalten bei der SSCP-Analyse zeigen (T>C2201).

Es ist schwierig, eine Erklärung für die falsch-negativen Ergebnisse dieser SSCP-Analyse zu finden. Das BRCA1-Gen hat einen vergleichsweise niedrigen GC-Gehalt mit 41,6%, im Gegensatz zum AT-Gehalt, der in Teilen von Exon 11 bis zu 61,2% erhöht sein kann. Es ist anzunehmen, dass in den zu untersuchenden Amplifikaten Sequenzabschnitte vorliegen, in denen Variationen nicht zu einer ausreichenden Konformationsänderung der Einzelstränge führen, um durch die SSCP-Analyse nachweisbar zu sein. Vorstellbar ist auch, dass die Optimierung individueller Probebedingungen die Anzahl der falsch-negativen Resultate reduziert. Die Sequenzzusammensetzung der Basenaberrationen sind bestimmt eine wichtige



## Diskussion

Variable für unterschiedliche Konformationen. In dieser Studie war aber nur eine quantitative Schätzung möglich.

Der Vergleich dieser Screening-Ergebnisse zeigt die erhöhte Sensibilität von CSGE für den Nachweis von Sequenzaberrationen wie „Missense“-Mutationen oder benigne Polymorphismen. Für Sequenzen mit einem vergleichsweise hohen AT-Inhalt (>50%), scheint die CSGE-Analyse besser als die SSCP-Analyse geeignet zu sein. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Labors ermittelt (persönliche Mitteilung, B. Weber). Beide Methoden sind ähnlich in ihrer Anwendung, aufgrund ihrer relativ einfachen Technik sollte CSGE beim Mutationsscreening AT-reicher, multi-exoner Gene jedoch bevorzugt eingesetzt werden. Aufgrund der Befunde dieser Untersuchung wird die Durchführung der molekularbiologischen Mutationsanalyse des BRCA1-Gens wie schematisch gezeichnet empfohlen (siehe Abbildung 21: Schematisches Verfahren für die BRCA1-Mutationsanalyse).

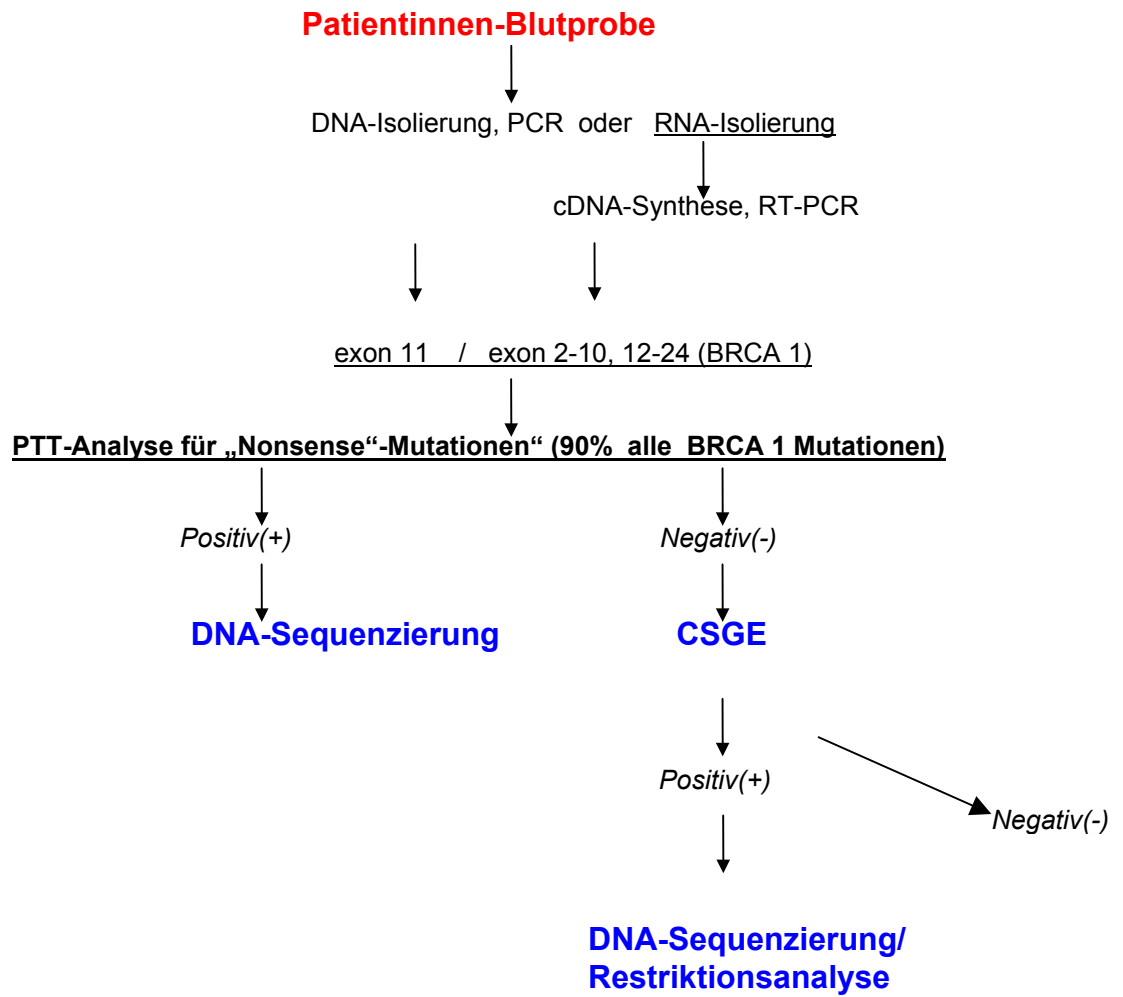


Abbildung 21: Schematisches Verfahren für die BRCA1-Mutationsanalyse.

## Diskussion

Es wurde neulich berichtet, dass manche der BRCA1-Polymorphismen, die im Rahmen dieser Untersuchung nachgewiesen werden, in einem kompletten oder teilweisen Kopplungsungleichgewicht vorliegen (111,112). Es wurde allerdings kein Unterschied in der Verteilung der Allele dieser Polymorphismen zwischen der Patientinnen- und der Kontrollgruppe festgestellt, mit Ausnahme von Q→R356. Eine protektive Funktion der R356-Allels gegen Brustkrebs wurde vorgeschlagen (111). Die unerwarteten Befunde, dass die (L871, G1038, R1183, P1431, G1613)-Haplotypen, die zu der BRCA1\*-Isoform führen, eine niedrigere Frequenz in der untersuchten Patientengruppe haben, kann aufgrund von Populationsunterschieden erklärt werden, oder auf einem Trend beruhen, der in einer größeren Patientengruppe schwer zu erkennen ist (Tabelle 12: *BRCA1*- und *BRCA1\**-Genotypen und ihre Allel-Verteilung.). Befunde über die gleichen Haplotypen im BRCA1-Gen wurden ebenfalls in anderen Patientengruppen deutscher Herkunft berichtet (113) (Dr. S. Preisler-Adams, persönliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, dass die assoziierte BRCA1\*-Isoform kein spezifisches Merkmal der bulgarischen Population ist. Auf dieser Grundlage wäre es interessant, die Verteilung der BRCA1- und BRCA1\*- Isoformen in Patientinnen und normalen Kontrollen anderen ethnischen Ursprungs zu untersuchen. Ohne diese Daten ist es nicht möglich, über eine eventuelle evolutionäre Bedeutung der beiden BRCA1-Varianten zu spekulieren. Der Befund, dass BRCA1\* bei den Brustkrebspatientinnen seltener auftritt als bei den normalen Kontrollen könnte ein Hinweis auf eine protektive Funktion dieser Isoform sein. Es muss berücksichtigt werden, dass die meisten Patientinnen dieser Studie von der National Centre of Oncology, Sofia, mit invasiven Karzinomen diagnostiziert wurden, und dass die Patientinnen radikalen chirurgischen Behandlungen unterliegen. Es könnte sein, dass *BRCA1\** eine protektive Rolle nicht im Auftreten sondern in der Entwicklung des Brustkrebses ausübt. Im Falle einer weiteren Selektion von Patientinnen mit ausschließlich invasiven Karzinomen zeigt das seltenere Auftreten von *BRCA1\** noch deutlichere Tendenzen. In der untersuchten Patientinnengruppe könnten aber ebenfalls die niedrigere Frequenz der hetero- und homozygoten Träger von *BRCA1\** durch früheren Tod wegen des sich rasch ausbreitenden Brustkrebses erklärt werden. In diesem Fall konnten nur Patientinnen mit invasiven Karzinomen analysiert werden, die einen gewissen Zeitraum nach der Diagnose überlebt haben, und nicht diejenigen, die

## Diskussion

früher gestorben sind. Letzteres könnte auf eine bessere Überlebensrate für BRCA1-Träger und eine im Gegenteil protektive Funktion von *BRCA1\** hinweisen. Um zu klären, ob *BRCA1\** zu Veränderungen der Proteinstruktur führt, ist es erforderlich, die Verteilung in invasiven und nicht-invasiven Tumoren zu untersuchen und adäquate funktionelle Tests zu etablieren. Ob die Veränderungen in der Sekundär-Struktur, die durch die umfassenden Aminosäuresubstitutionen bei der *BRCA1\**-Isoform ausgelöst werden, eine funktionelle Bedeutung für das *BRCA1\**-Protein haben, ist schwierig einzuschätzen. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die Aminosäurepositionen 871 und 1038 in der Anheftungs-Domäne von Rad51 (AS 758-1064) positioniert sind. Rad51 gehört zu einer Proteinfamilie, die eine normale Rekombination vermitteln (1.4.3). Die Aminosäureposition 1613 befindet sich am Carboxy(c)-Ende von BRCA1 (AS 1528-1863), das Transkriptions-Aktivität zeigt (1.4.3). Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um einen möglichen Einfluss dieser Aminosäuresubstitutionen im BRCA1 auf andere Proteinfaktoren zu klären. Es wurde gezeigt, dass BRCA1 während der späten G<sub>1</sub> - und der S-Phase des Zellzyklus hyperphosphoryliert ist (114) und kurz nach der M-Phase vorübergehend dephosphoryliert ist. Diese reversible Phosphorylierung von Serinresten in Proteinen kann zur Änderung der Funktion dieser Proteine führen, und es wurde vorgeschlagen, dass BRCA1 ein Phosphoprotein ist, das sich im Verlauf des Zell-Zyklus qualitativ und quantitativ verändert. S1431 und S1613 könnten ebenfalls phosphoryliert sein; in der *BRCA1\**-Isoform wären diese möglichen Phosphorylierungsstellen jedoch verlorengegangen, was ebenfalls eine Bedeutung für die Funktion dieses Protein haben könnte.

## 5 Zusammenfassung

Um ein selektives Mutationsanalyse-Verfahren für BRCA1, eines der Gene, das für erblichen Brust-Eierstockkrebs verantwortlich ist, zu entwickeln, wurden 35 Patientinnen aus Bulgarien sowie 70 normale Kontrollpatientinnen untersucht. Die Patientinnen, die gezielt mit Hinblick auf familiären Brustkrebs/Eierstockkrebs ausgesucht wurden, wurden zuerst mit Hilfe des PTT komplett untersucht, um eventuell vorliegende „Nonsense“-Mutationen zu entdecken. Da diese Untersuchung negativ ausfiel, wurde das weitere Screening mit Hilfe von drei verschiedenen SSCP-Formaten (SSCP, PEG-SSCP, MDE-SSCP) und CSGE fortgesetzt. Das CSGE-Protokoll wurde für diese Untersuchung optimiert. In dieser Studie wurden 12 Sequenzvariationen nachgewiesen, davon 11 Nukleotidsubstitutionen sowie eine Deletion. Zwei dieser Variationen sind intronische Polymorphismen, die restlichen zehn liegen innerhalb der Exons. Von den nachgewiesenen 12 Polymorphismen sind 11 in der Literatur bereits beschrieben, einer ist neu. Alle Sequenzvariationen wurden mit Hilfe von CSGE, und acht der Polymorphismen ebenfalls mit Hilfe der SSCP entdeckt. Keine der Sequenzvariationen konnte allein durch SSCP-Analyse identifiziert werden. Aufgrund der spezifischen Sequenzabberationen (Nukleotidsubstitutionen) und des vergleichsweise hohen Prozentsatzes von AT (58,4%) im BRCA1-Gen stellt CSGE die sensitivere Methode dar. Diese Schlussfolgerung steht in Einklang mit anderen strategischen Analysen für BRCA1, und diese Tatsache kann weiterhin für die Mutations-Analyse von AT-reichen, multi-Exon Genen wichtig sein (115).

Die Untersuchung von fünf bekannten Polymorphismen von Exon 11 bis Exon 16, die zu Aminosäure-Austauschen führen (Aminosäure-Position 871, 1038, 1183, 1431 und 1613) ergaben zwei distinkte Haplotypen, genannt *BRCA1* und *BRCA1\**. Um das Kopplungs-Ungleichgewicht der Probanden zu untersuchen, die für alle Polymorphismen heterozygot sind, wurde die „primer-aided allele-specific Amplifikation“ (PASA) in Exon 11 (Aminosäure 871, 1038 und 1183) durchgeführt. Während *BRCA1* das translatierte Produkt des *BRCA1*-Allels repräsentiert, führen die fünf Nukleotidsubstitutionen in *BRCA1\** zu Aminosäure-Austauschen in den oben genannten Positionen. Dieses ergibt eine molekular unterschiedliche *BRCA1*-Isoform, *BRCA1\**. Die errechnete Allel-Frequenz für *BRCA1\** beträgt 0,36 in der Kontrollgruppe (95% confidence interval (CI) 0,32-0,40) und 0,21 in der Pa-

## Zusammenfassung

tientinnengruppe (95% CI 0,17-0,26). Das seltenere Vorkommen des *BRCA1*\*-Allels bei den Brustkrebspatientinnen könnte einen Populationsunterschied darstellen, oder auf eine benachteiligende/beschützende Funktion in der Entwicklung von Krebs hinweisen. Die Bedeutung dieses seltenen Haplotyps für den normalen, bzw. für den Brustkrebs-Phänotyp bleibt ein Thema weiterer Studien.

## 6 Summary

In order to develop a selective mutation screening strategy for BRCA1, one of the genes responsible for hereditary predisposition to breast cancer, we analysed by single-strand conformation polymorphism (SSCP) and conformation-sensitive gel electrophoreses (CSGE) a cohort of 35 Bulgarian breast cancer patients, as well as 70 normal control patients, prescreened for nonsense mutations by the protein truncation test. By assaying the complete coding sequence of the gene applying both methods, we were able to detect 12 sequence alterations: 11 nucleotide substitutions and one deletion. Two of the alterations are intronic polymorphisms, the rest are exon sequence variants. Of the 12 polymorphisms identified, 11 are already described and one is new. All sequence changes were detected by CSGE and eight of them were also shown by SSCP analysis. There was no sequence alterations which could be detected by SSCP analysis only. CSGE turned out to be the more sensitive technique in our assay. We propose that because of the specificity of most sequence variants detected (nucleotide substitutions) and the comparatively high percentage of AT content of the BRCA1 gene (58,4%). This observation is in agreement with other accepted strategies of analysis for BRCA1 and it may prove useful for mutation screening of AT-rich, multi-exon genes (115).

Studying the distribution of five common, amino-acid changing polymorphisms from exon 11 to exon 16 (amino acid positions 871, 1038, 1183, 1431 and 1613), we obtained only two major haplotypes designated as *BRCA1* and *BRCA1\**. To test linkage disequilibrium in probands heterozygous for all polymorphic sites, primer-aided allele-specific amplification (PASA) was performed in exon 11 (amino acids 871, 1038, 1183). While *BRCA1* represents the translation product of the *BRCA1* allele, the five nucleotide substitutions detected in *BRCA1\** resulting in amino acid changes at the positions indicated above give rise to a molecularly distinct *BRCA1* isoform, *BRCA1\**. Obtained allele frequencies for *BRCA1\** were 0,36 in the control group (95% confidence interval (CI) 0,32-0,40) and 0,21 among breast cancer patients (95% CI 0,17-0,26). The underrepresentation of the rare allele among breast cancer patients could be indicative for a populational difference or disadvantage/protective function in the development of cancer. What is

## Summary

the importance of the rare haplotype for the normal, respectively the breast cancer phenotype remains a subject of further studies.



## 7 Literaturverzeichnis

---

1. Garfinkel L., Boring C.C., Health C.W. Jr. (1994): Changing trends: an overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer* 74, 222-228.
2. Beckmann, Niederacher, Goecke, Bodden-Heidrich, Schnürch, Bender. (1997): Hochrisikofamilien mit Mamma-und Ovarialkarzinomen, *Deutsches Ärzteblatt* 94, Heft 4, B139-B145.
3. Robert Koch Institut, Berlin: Statistische Daten zur Krebsinzidenz 1995
4. Gayther S., Ponder B. (1997): Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes and the possibilities for predictive testing. *Mol Med Today*, 168-174.
5. Newman B., Austin M.A., Lee M., King M.C. (1998): Inheritance of breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high risk families. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85, 1-5.
6. Claus E.B., Risch N., Thompson D. (1991): Genetic Analysis of Breast Cancer and Stereoid Hormone Study. *Am J Hum Genet*. 48, 232-242.
7. Langenbeck U. (1995): Umwelt und Erbe in der Entstehung des Brustkreb- ses. *Deutsches Ärzteblatt*. 92, A 2408-2413.
8. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D. et al. (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 226, 66-71.
9. Tavtigian S.V., Simard J., Rommens J. et al. (1996): The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet*. 12, 333-337.
10. Wooster R., Bignell G., Lancaster J. et al. (1995): Identification of the breast cancer gene BRCA2. *Nature*. 378, 789-792.
11. Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J. et al. (1994): Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Sci- ence*. 265, 2088-2090.
12. Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., Narod S.A., Goldgar D.E., The Breast Cancer Linkage Consortium. (1994): Risks of breast cancer in BRCA1- mutations carriers. *Lancet*. 343, 692-695.
13. Langston A.A., Malone K.E., Thompson J.D., Daling J.R., Ostrander E.A. (1996): BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med*. 334, 137-142.

14. Shattuck-Eidens D., McClure M., Simard J. et al. (1995): A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. *JAMA*. 273, 535-541.
15. Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., Narod S.A., Goldgar D.E. (1994): Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*. 343, 692-695.
16. Couch F.J., Farid L.M., DeShano M.L., Tavtigian S.V, Calzone K., Campeau L., Peng Y. et al. (1996): BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet*. 13, 123-125.
17. Phelan C.M., Lancaster J.M., Tonon P., Gumbs C., Cochran C., Carter R., Ghadirian P. et al. (1996): Mutation Analysis of the BRCA2 gene in 49 site-specific breast cancer families. *Nat Genet*. 13, 120-122.
18. Flöhl R. (27.08 1997): Gentest auf Brustkrebs überschätzt; Nur bei starker familiärer Belastung vertretbar. *Frankfurter Allgemeine Zeitung*
19. Szabo C.I., King M-C.(1995): Inherited breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 4, 1811-1817.
20. Zuppan P.J., Hall J.M., Lee M.K., Pongikitmongkol M., King M-C.(1991): Possible linkage of the estrogen receptor gene to breast cancer in a family with late-onset disease. *Am J Hum Genet*. 48, 1065-1068.
21. Malkin P.L., Strong L.C., Fraumeni J.F., Nelson J.R., Kim D.H., Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z., Tainsky M.A., Friend S.H. (1990): Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 250, 1233-1238.
22. Wooster R., Mangion J., Eeles R., Smith S., Dowsett M., Averill D., Barrett-Lee P., Easton D.F., Ponder B.A., Stutton M.R. (1992): A germline mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifensyndrom. *Nat Genet*. 2, 132-134.
23. Swift M., Morrell D., Massey R.B., Chase C.L. (1991): Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med*. 325, 1831-1836.
24. Borresen A.L., Andersen T.I., Tretli S., Heiberg A., Moller P. (1990): Breast cancer and other cancers in Norwegian families with ataxia-telangiectasia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2, 339-340.
25. Easton D.F. (1994): Cancer risks in AT-heterozygotes. *Int J Radiation Biol*. 66,177-182.

- 
26. BRCA1 Image Map, Breast Information Core (BIC) [http://www.nhgri.nih.gov/intramural\\_research/Bic/Member/brca1\\_condensed\\_database.html](http://www.nhgri.nih.gov/intramural_research/Bic/Member/brca1_condensed_database.html)
  27. Langenbeck U. (September 1995): Umwelt und Erbe in der Entstehung des Brustkrebses. Deutsches Ärzteblatt 92. Heft 37, B1789-B1792.
  28. Hosking L., Trowsdale J., Nicolai H. et al. (1995): A somatic BRCA1 mutation in an ovarian tumor. Nat Genet. 11, 428-433.
  29. Merajver S.D., Pham T.M., Carduff R.F. et al. (1995): Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumors. Nat Genet. 9, 439-443.
  30. Gayther S.A., Warren W. et al. (1995): Germline Mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for an genotype-phenotype correlation. Nat Genet. 11, 428-433.
  31. Gowen L.C., Avrutskaya A.V., Latour A.M., Koller B.H., Leadon S.A. (1998): BRCA 1 Required for Transcription-Coupled Repair of Oxidative DNA Damage. Science. 281, 1009 -1012.
  32. Saurin A.J., Borden K.L.B., Boddy M.N. Freemont P.S. (1996): Does this have a familiar RING?. TIBS. 21, 208-214.
  33. Wu L.C., Wang Z.W., Tsan J.T. et al. (1996): Identification of a RING protein that can interact *in vivo* with the BRCA1 gene product. Nat Genet. 14, 430-440.
  34. Scully R., Chen J., Plug A., Xiao Y., Weaver D., Feunteun J., Ashley., Livingston D. (1997): Association of BRCA1 with Rad51 in Mitotic and Meiotic Cells. Cell. 88, 265-275.
  35. Shinohara A., Ogawa H., Ogawa T. (1992): Rad51 protein involved in repair and recombinant in *Saccharomyces cerevisiae* is a RecA-like protein. Cell. 69, 457-470.
  36. Lim D.S., Hasty P. (1996): A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a p53 mutation. Mol Cell Biol. 16, 7133-7143.
  37. Tsuzuki T., Fujii Y., Sakumi K., Tominaga Y., Nakao K., Sekiguchi M., Matsushiro A., Yoshimura Y., Morita T. (1996): Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 93, 6236-6240.
  38. Scully R., Anderson S.F., Chao D.M., Wei W., Ye L., Young R.A., Livingston D., Parvin J.D. (1997): BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. Proc Natl Acad Sci USA. 94, 5605-5610.

39. Chapman M.S., Verma I.M. (1996): Transcriptional activation by BRCA1. *Nature*. 382, 678-679.
40. Gudas J.M., Nguyen H., Li T., Cowan K.H. (1995): Hormone dependent regulation of BRCA1 in Human breast cancer cells. *Cancer Res.* 55, 4561-4565.
41. Lane T.F., Deng C., Elson A., Lyu M.S., Kozak C.A., Leder P. (1995): Expression of BRCA1 is associated with terminal differentiation of ectodermally and mesodermally derived tissues in mice. *Genes Dev.* 9, 2712-2722.
42. Marquis S.T., Rajan J.V., Wynshaw-Boris A. et al. (1995): The developmental pattern of BRCA1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nat Genet.* 11, 17-26.
43. Koonin E.V., Altschul S.F., Bork P. (1996): BRCA1 protein products: Functional motifs. *Nat Genet.* 13, 266-268.
44. Siede W., Friedberg A.S., Dianova I., Friedberg E.C. (1994): Charakterization of G<sub>1</sub> checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents. *Genetics.* 138, 271-281.
45. Bork P., Hofmann K., Bucher P., Neuwald A.F., Altschul S.F., Koonin E.V. (1997): A superfamily of conserved domains in DNA damage responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEBJ.* 11, 68-75.
46. Häkansson S., Johannsson O., Johannsson U. et al. (1997): Moderate Frequency of BRCA1 and BRCA2 Germ-Line Mutations in Scandinavian Familial Breast Cancer. *Am J Hum Genet.* 60, 1068-1078.
47. Maxam A.M., Gilbert W. (1980): Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499-560.
48. Winnacker, E.L. (1985): *Gene und Klone – Eine Einführung in die Gentechnologie*: VCH Verlagsgesellschaft mbH; pp. 61-73.
49. Sanger F., Nickler S., Coulson A.R., (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74, 5463-5467.
50. Myers R.M., Fischer S.G., Lerman L.S., Maniatis T. (1985): Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13, 3131-3145.
51. Orita, Suzuki, Sekiya, Hayashi. (1989): Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics.* 5, 874-879.

52. Cotton R.G.H. (1993): Current methods of mutation detection. *Mutat Res.* 285, 125-144.
53. Grompe, M. (1993): The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet.* 5, 111-117.
54. Savov A., Angelicheva D., Jordanova A., Eigel A., Kalaydjieva L. (1992): High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res.* 20, 6741-6742.
55. Glavac D., Dean M. (1993): Optimization of the single-strand confirmation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat.* 2, 404-414.
56. Markoff A., Savov A., Vladimirov V., Bogdanova N., Kremensky I., Ganev V. (1997): Optimisation of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of water-soluble long chain polymers. *Clin Chem* 43(1), 30-33.
57. Ravnik M., Glavac D., Dean K. (1994): Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet.* 3, 801-807.
58. Budowle, Chakraborty, Giusti, Eisenberg, Allen. (1991): Analysis of the VNTR Locus DIS80 by the PCR Followed by High-Resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* 48,137-144.
59. Perry D.J., Carrell R.W. (1992): Hydrolink gels:a rapid and simple approach to the detection of DNA mutations in thromboembolic disease. *J. Clin Pathol.* 45, 158-160.
60. Keen J., Lester D., Inglehearn C., Curtis A., Bhattachara S. (1991): Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on hydrolink gels. *Trends in Genet.* 7, 5.
61. White M.B., Carvalho M., Derse D., O'Brien S.J., Dean M. (1992): Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics.* 12, 301-306.
62. Ganguly, Rock, Darwin, Prockop. (1993): Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 10325-10329.
63. Zhuang J.P., Constantinou C.D., Ganguly A., Prockop D.J. (1991): A single base mutation in type I procollagen (COL1A1) that converts glycine alpha 1-541 to aspartate in a lethal variant of osteogenesis imperfecta:detection of the mutation with a carbodiimide reaction of DNA heteroduplexes and direct sequencing of products of the PCR. *Am J Hum Genet.* 48, 1186-1191.

64. Novack D.F., Casna J.J, Fischer S.G., Ford J.P. (1986): Detection of single base-pair mismatches in DNA by chemical modification followed by electrophoresis in 15% polyacrylamide gel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83, 586-590.
65. Cotton R.G.H., Rodrigues N.R., Campbell R.D. (1988): Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85, 4397-4401.
66. Saaleba J.A., Ramus S.J., Cotton R.G. (1992): Complete mutation detecting using unlabeled chemical cleavage. *Hum Mutat*. 1, 63-69.
67. Verpy E., Biasotto M., Meo T., Tosi M. (1994): Efficient detection of point mutations on color-coded strands of target DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 1873-1877.
68. Haris I.I., Green P.M., Bentley D.R., Gianelli F. (1994): Mutation detection by fluorescent chemical cleavage: application to hemophilia B. *PCR-Methods*. 3, 268-271.
69. Goldrick M.M., Kimball G.R., Liu Q., Martin L.A., Sommer S.S, Tseng J.Y. (1996): A rapid robust method for screening for unknown point mutations. *Biotechniques*. 21, 106-112.
70. Solaro P.C., Birkenkamp K., Pfeiffer P., Kemper B. (1993): Endonuclease VII of phage T4 triggers mismatch correction in vitro. *J Mol Biol*. 230 (3), 868-877.
71. Gassen H.G., Martin A., Bertram S. (1996): *Gentechnik-Einführung in Prinzipien und Methoden*: Gustav Fischer Verlag; pp. 129-130.
72. Arber W., Linn S. (1969): DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem*. 38, 467-500.
73. Meselson M., Yuan R. (1968): DNA restriction enzyme from *E.coli*. *Nature*. 217, 1110-1114.
74. Winnacker E.L. (1985): *Gene und Klone – Eine Einführung in die Gentechnologie*: VCH Verlagsgesellschaft mbH; p. 4.
75. Wilson G.G. (1993): *Restriction Endonucleases: An Overview*. The NEB Transcript. 5(1), 1-5.
76. Landegren U., Kaiser R., Caskey C.T., Hood L. (1988): DNA diagnostics, molecular techniques and automation. *Science*. 242, 229-237.
77. Liu Q., Sommer S.S. (1995): Restriction endonuclease fingerprinting (REF): a sensitive method for screening mutations in long, contiguous segments of DNA. *Biotechniques*. 18, 470-477.

78. Blaszyk H., Hartmann A., Schroeder J.J., MCGovern R.M., Sommer S.S., Kovach J.S. (1995): Rapid and efficient screening for p53 gene mutations by dideoxy fingerprinting. *Biotechniques*. 18, 256-260.
79. Chen J., Hebert P.D.N. (1998): Directed termination PCR: a one-step approach to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 26, 1546-1547.
80. Hogervorst F.B.L., Cornelis R.S., Bout M., van Vliet M., Oosterwijk J.C., Olmer R., Bakker B., Klijn J.G.M., Vasen H.F.A., Meijers-Heijboer H., Menko F.H., Cornelisse C.J., den Dunnen J.T., Devilee P., van Ommen G.J.B. (1995): Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet.* 10, 208-212.
81. Couch F.J., Weber B.L. and the Breast Cancer Information Core. (1996): Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. *Hum Mutat.* 8, 8-18.
82. Roest P.A., Roberts R.G., van der Tuijn A.C., Heikoop J.C., van Ommen G.J., Dunnen J.T. (1993): Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. *Neuromuscul Disord.* 3 (5-6), 391-394.
83. van der Luijt R.B., Hogervorst F.B.L., Den Dunnen J.T., Meera Khan P., van Ommen G.J.B. (1996): PTT-protein truncation test. *Laboratory Protocols for Mutation Detection*. Oxford: Oxford University Press; pp. 140-152
84. Plummer S.J., Anton-Culver H., Webster L., Noble B., Liao S., Kennedy A., Belinson J., Casey G. (1995): Detection of BRCA 1 mutations by the protein truncation test. *Hum Mol Genet.* 4 (10), 1989-1991.
85. Landegren U. (1996): *Laboratory Protocols for Mutation Detection*: Oxford University Press; pp.140-151.
86. Nowak R. (1994) : Breast cancer gene: many mutations make test difficult. *Science.* 266, 1470.
87. Castilla et al. (1994): Mutations in the BRCA 1 gene in families with early-onset breast und ovarian cancer. *Nat Genet.* 8, 387-391.
88. National Oncological Centre, Bulgarian Oncological Society, Sofia (1994): *Cancer Incidence in Bulgaria.* 3, 52.
89. Friedman L.S., Ostermeyer E.A., Szabo C.I., Dowd P., Lynch E.D., Rowell S.E., King M.C. (1994): Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet.* 8, 400.
90. Hogervorst F.B.L. et al. (1995): Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet.* 10, 212.

91. Chomczynski P., Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1), 156-159.
92. Chomczynski P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 15(3), 532-534.
93. Miller S.A., Dykes D.D., Potesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3), 1215.
94. Sambrook, Fritsch, Maniatis. (1989): *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Second edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press.; p. E 5.
95. Chien A., Edgar E.B., Treia J.M. (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 127, 1550-1557.
96. Sambrook, Fritsch, Maniatis. (1989): *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Second edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press.; pp. 141-144.
97. Sambrook, Fritsch, Maniatis. (1989): *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Second edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press.; pp. 6.3- 6.13.
98. Davis L.G., Dibner M.D., Battey J.F. (1986): *Basic Methods in Molecular Biology:* Elsevier Science Publishing Co; pp. 58-61.
99. Walker J.M. (1984): *Methods in Molecular Biology.* Second edition. New Jersey: Humana Press Inc.; pp. 43-50.
100. Vogelstein G., Gillespie D. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76, 615-619.
101. Hamaguchi K., Geiduschek E.P. (1962): The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. *JACS.* 84, 1329-1337.
102. Chrambach A., Rodbard D. (1971): Polyacrylamid Gel Elektrophoresis. *Science.* 172, 440-451.
103. Berry M.J., Samuel C.E. (1982): Detection of subnanograms amounts of RNA in polyacrylamid gels in the presence and absence of protein by staining with silver. *Anal Biochem.* 124, 180-184.
104. Sambrook, Fritsch, Maniatis. (1989): *Molecular cloning; A laboratory manual.* Second edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press; pp. E.21-E.23.



105. Swanstrom R., Shank P.R. (1978): X-Ray intensifying screens greatly enhance detection by autoradiographie of radioactive isotopes. *Anal Biochem.* 86, 184-192.
106. McClave J., Dietrich F. (1979): *Statistics*. San Francisco: Delen Publ.Co; p. 778.
107. Rost B., Sander C. (1994): Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins.* 20, 55-72.
108. Markoff A., Sormbroen H., Bogdanova N., Ganey V., Dworniczak B., Horst J. (1998): Conformation-sensitive gel electrophoresis in ultrathin-layer polyacrylamide gels. *Balkan J Med Genet.* 1(4), 185-186.
109. Ravnik-Glavac M., Glavac D., Dean M. (1994): Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet.* 3(5), 801-807.
110. Sarkar G., Yoon H.S., Sommer S.S. (1992): Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res.* 20, 871-878.
111. Dunning A.M., Chiano M., Smith N.R., Dearden J., Gore M., Oakes S., Wilson C., Stratton M., Easton D., Clayton D., Ponder B.A.J. (1997): Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet.* 6, 285-289.
112. Durocher F., Shattuck-Eidens D., McClure M., Labrie F., Skolnick M.H., Goldgar D.E., Simard J. (1996): Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Hum Mol Genet.* 5, 835-842.
113. Ehlers C., Fahsold R. (1997): Distribution of common polymorphism throughout the coding region of BRCA1 reveals two distinct haplotypes. *Med Genet.* 1, 89-90.
114. Ruffner H., Verma I.M. (1997): BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 7138-7143.
115. Markoff A., Sormbroen H., Bogdanova N., Presler-Adams S., Ganey V., Dworniczak B., Horst J. (1998): Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. *Eur J Hum Genet.* 6, 145-150.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Horst danke ich im besonderen Maße für die Ermöglichung dieser Promotionsschrift, für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes in seinem Institut, und seine stets hilfreiche und freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Schoner danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser externen Doktorarbeit und für seine freundliche und hilfreiche Unterstützung.

Herrn Dr. Markoff und Frau Dr. Bogdanova danke ich für die ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion, Betreuung und freundschaftlichen Zusammenarbeit.

Frau Dr. Preisler-Adams danke ich für die gute Zusammenarbeit und Ihre freundliche Unterstützung.

Bei allen Mitarbeitern des DNA-Labors möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Und bei meinem Mann Thomas bedanke ich mich für die Unterstützung am Computer.