

Aus dem Institut für Humangenetik
des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

**Untersuchungen von genetischen Alterationen
in sporadischen Mamma- und Kolonkarzinomen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anthi Tsimtsiri

aus Veria / Griechenland

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Singh

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. B. Brandt

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5
2. EINLEITUNG	6
2.1 Genetische Alterationen bei Tumoren	6
2.2 Das Mammakarzinom	8
2.3 Das Kolonkarzinom	13
2.4 Nachweis von genetischen Alterationen bei Tumoren	18
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 MATERIALIEN	21
3.1.1 Tumorgewebe und Blutproben	21
3.1.2 DNA-Sonden	21
3.1.3 PCR-Primer	22
3.1.4 Exonspezifische Oligonucleotidsequenzen	23
3.1.5 Allelspezifische Oligonucleotidsequenzen	23
3.1.6 Chemikalien und Enzyme	24
3.1.7 Medien, Lösungen und Puffer	24
3.2 METHODEN	27
3.2.1 Isolierung von genomischer DNA	27
3.2.1a Isolierung genomischer DNA aus Blut	27
3.2.1b Isolierung genomischer DANN aus Tumorgewebe	28
3.2.2 Agarosegel-Elektrophorese	28
3.2.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen	29
3.2.3a Spaltung von menschlicher, genomischer DNA durch Restriktionsendonucleasen	29
3.2.3b Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonucleasen	29
3.2.3c Plasmidpräparation	30
3.2.3d Southern-Blot-Hybridisierung	32
3.2.4 Untersuchungen zum Verlust der Heterozygotie (LOH) mittels Analyse des MikrosatellitenLängenpolymorphismus	34
3.2.4a Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
3.2.4b Polyacrylamid Elektrophorese (PAA)	35
3.2.5 Methoden zum Mutationscreening	36
3.2.5a Single Strand Conformation Polymorphismus (SSCP)	36
3.2.5b Heteroduplex-Analyse	37
3.2.5c Allelspezifische Oligonucleotid (ASO) –Technik	37
3.2.5d DNA- Sequenzierung	39
3.2.6 STATISCHE AUSWERTUNG	40
4. ERGEBISSE	41
4.1 UNTERSUCHUNGEN ZUM LOH UND ANDEREN GENETISCHEN VERÄNDERUNGEN BEI SPORADISCHEN MAMMA- UND KOLONKARZINOMEN UND KORRELATION MIT HISTO- PATHOLOGISCHEN PROGNOSEFAKTOREN	41
4.1.1 Untersuchungen mittels Mikrosatellitenmarkern	41
4.1.1a Mammakarzinome	41
4.1.1b Kolonkarzinome	46
4.1.2 Untersuchen von RFLP's mit BGP-spezifische Sonden	46
4.1.3 Korrelation genetischer Veränderungen von Tumorzellen mit histopathologischen Prognosefaktoren	48
4.1.3a Mammakarzinome	48

4.1.3b Kolonkarzinome	52
4.2. UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON MUTATIONEN IM BRCA1-GEN BEI SPORADISCHEN MAMMAKARZINOMEN	54
4.2.1 SSCP-Analyse von Exon 2, 5 und 20 des BRCA1 Gens	54
4.2.2 Heteroduplex-Analyse von Exon 2, 5 und 20 des BRCA1 Gens	56
4.2.3 Sequenzierung	57
4.3. UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON BEKANNTEN MUTATIONEN IM BRCA1-GEN BEI SPORADISCHEN MAMMA- UND KOLONKARZINOMEN	59
4.3.1 Analysen mit ASO – Technik	59
5. DISKUSSION	61
5.1. UNTERSUCHUNGEN ZUM VERLUST DER HETEROZYGOTIE UND KORRELATION MIT HISTOPATHOLOGISCHEN PROGNOSEFAKTOREN	61
5.1.1 CHROMOSOM 17q13-21	61
5.1.2 CHROMOSOM 13q13	63
5.1.3 CHROMOSOM 19q13	63
5.2. UNTERSUCHUNGEN IN DER BRCA-1 GENREGION	65
6. ZUSAMMENFASSUNG	72
7. LITERATURVERZEICHNIS	74

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Der Nachweis und die Charakterisierung spezifischer genetischer Veränderungen in Tumoren tragen nicht nur zum Verständnis der Tumorphathogenese bei, sondern dienen auch dem Ziel, molekulare Prognoseparameter zu etablieren. In der vorliegenden Arbeit sollte die mögliche Rolle von einigen genetischen Alterationen in den Regionen 13q13, 17q13-21 und 19q13 als molekulare Prognosemarker für sporadische Mamma- und Kolonkarzinome durch Korrelation mit etablierten histopathologischen Prognoseparametern evaluiert werden. Dazu sollte durch vergleichende Untersuchungen von Blut- und Tumor-DNA die Häufigkeit des Vorkommens von Verlusten der Heterozygotie (LOH) sowie anderer genetischer Alterationen in diesen Regionen bestimmt und mit histopathologischen Parametern der Tumore wie z.B. Grading korreliert werden. Kolonkarzinome zeigen eine veränderte Genexpression des BGP (CEACAM1) Gens. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, das BGP Gen, das zur Familie des Carninoembryonalen Antigens gehört, auf LOH als möglichen Hinweis auf eine Tumorsuppressorfunktion des Gens hin zu untersuchen. Da bisher kein Polymorphismus für das BGP Gen nachgewiesen wurde, sollten zunächst neue BGP-spezifische DNA-Sonden zum Nachweis von RFLP's (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen) in DNA gesunder Probanden entdeckt und dann in LOH Untersuchungen eingesetzt werden. Keimbahnmutationen im BRCA1 Gen verursachen eine Disposition zu Mamma- und Ovariakarzinomen. Die Frage, welche Rolle somatische Mutationen im BRCA1 Gen bei der Pathogenese sporadischer Tumore spielen, ist daher von besonderem Interesse. Zum Zeitpunkt der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit waren noch keine Mutationen im BRCA1 Gen bei sporadischen Mammakarzinomen beschrieben worden. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit der Nachweis von Mutationen im BRCA1 Gen sporadischer Tumore, speziell in den Exons 2, 5 und 20. Mit Hilfe der Screening-Verfahren SSCP- und Heteroduplex-Analyse sollten verdächtige Proben herausgefiltert und anschließend sequenziert werden. Zusätzlich sollten die Tumore mit Hilfe der ASO-Technik hinsichtlich zweier spezifischer, bei erblichen Mammakarzinomen häufig auftretender Punktmutationen in den Exons 2 und 20 des BRCA1 Gens untersucht werden.

2. EINLEITUNG

2.1 GENETISCHE ALTERATIONEN BEI TUMOREN

Die Tumorphathogenese wird als ein komplexer Vorgang angesehen, an dem mehrere genetische und epigenetische Ereignisse beteiligt sind. In den zurückliegenden Jahren wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren genetische Veränderungen zur Tumorentstehung beitragen. Spezifische genetische Veränderungen eines oder mehrerer dieser Gene können zur Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle führen. Durch klonales Wachstum der entarteten Zelle kommt es daraufhin zu einer abnormen Vergrößerung des Gewebes. Dabei ist im neoplastischen Gewebe das Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Differenzierung und Apoptose in Richtung Proliferation verschoben und / oder die Apoptose ist blockiert. Maligne Tumore unterscheiden sich von benignen durch infiltratives und destruktives Wachstum. Sie haben das Potential zur Metastasenbildung. Solide Tumore epithelialen Ursprungs werden als Karzinome bezeichnet. Geht das Tumorstadium von einer mesodermalen Zelle aus, spricht man von Sarkomen. Schon 1914 postulierte Boveri, dass die krebsartige Entartung auf der Veränderung des Genoms beruht. Peyton Rous konnte Anfang dieses Jahrhunderts bei Hühnern mit Viren Sarkome erzeugen. Rous-Sarkomviren enthalten in ihrem Genom die Information für das Src-Protein, eine Kinase, die Tyrosylreste in Proteinen phosphoryliert, wodurch dieses Protein ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt ist. Das für das Src-Protein kodierende SRC-Gen ist ein Onkogen, das auch beim Menschen vorkommt. Bisher wurden 60-70 virale Onkogene entdeckt, die sich von zellulären Genen herleiten. Diese Onkogene haben als Protoonkogene die Aufgabe, das normale Zellwachstum zu regulieren. Durch Mutation oder Dysregulation können Protoonkogene zu Onkogenen werden, die aktiv an der malignen Transformation beteiligt sind.

1971 hatte Knudson die „Two Hit“ – Theorie formuliert, die besagt, dass es erst als Folge der Inaktivierung beider Allele eines Retinoblastom-Gens zur Entstehung eines Retinoblastoms kommt. Cavenee und Mitarbeiter konnten diese Theorie 1983 durch Untersuchungen an sporadischen Formen des Retinoblastoms untermauern. Das Retinoblastom-Gen repräsentiert eine weitere Klasse von Tumorgenen, die Tumorsuppressorgene. Diese sind Gene, die als Wildtyp die Tumorentwicklung hemmen. Durch Inaktivierung beider Allele können sie zur malignen Transformation einer normalen

Zelle beitragen (Knudson et al. 1975, Cavenee et al.1983, Knudson 1986,1996, Deville et al.2001).

Spezifische genetische Veränderungen von Tumorgenen, also von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, können sowohl spontan durch Fehler in der DNA-Replikation auftreten als auch durch mutagene Karzinogene induziert werden. Endogene Karzinogene sind z.B. Sauerstoffradikale. Zu den exogenen Karzinogenen zählen chemische Karzinogene wie Tabak und Anilinfarben, aber auch Strahlung und Viren. Ein bis zwei Prozent aller menschlichen Tumore sind erblich bedingt. Tumorgene, die in der Keimbahn von Personen mit familiärer Tumordisposition alteriert sind, können auch bei der Entstehung sporadischer Tumore, bei denen genetische Alterationen von Tumorgenen nur in somatischen Zellen auftreten, eine Rolle spielen. Hinweise auf eine erbliche Disposition für Tumorerkrankungen sind das Auftreten eines bestimmten Tumors oder von seltenen Tumoren bei zwei oder mehreren Verwandten ersten Grades, die Manifestation des Tumors in einem frühen Lebensalter, das Vorkommen multipler Tumoren bei einem Patienten in einem Organ oder in typischer Kombination (z.B. Mamma- und Ovarialkarzinom) und die Assoziation von Tumoren mit angeborenen Fehlbildungen. Eine familiäre Disposition kann unter anderem für das Mamma- und Kolonkarzinom vorliegen. In den letzten Jahren wurden durch Genotypisierung und Phänotypisierungsmethoden die Progression des Brustkrebses intensiv analysiert, wobei sich zwei Karzinomrisikotypen sich herausstellen. 1. Mit hohem Karzinomrisiko (Grad III) 2. Mit niedrig Karzinomrisiko (Grad I). Die Grad I und die tubuläre Karzinome zeigen neben einem typischen hohen Verlust des 16q nur eine geringe Zahl von genetischen Alterationen , wobei Grad III Tumore sich mit Verlusten von 11q, 14q, 8p,13q und mit Gewinnen (Amplifikationen) von 17q, 8q 11q und 20q (Roynance et al. 1999, Perou et al. 2000, Buerger et al. 2001) auszeichnen. Die Aufgabe in den nächsten Jahren wird es sein, das Verständnis der molekularen Evolution der Brustkrebsentstehung in praktische Methoden umzuwandeln und diese passend für die diagnostische Zwecke zu verwenden.

2.2 DAS MAMMAKARZINOM

Das Mammakarzinom ist das häufigste Malignom der Frau in der westlichen Welt. Die Inzidenz beträgt 1 : 1000 Frauen pro Jahr mit einem Altersgipfel in der 7. Lebensdekade. Neben einer familiären Prädisposition, die etwa 5% aller Brustkrebserkrankungen ausmacht, werden endokrine und Umwelteinflüsse als Risikofaktoren diskutiert (Preiß et al. 1999). Epidemiologische Studien zeigten, dass Korrelationen zwischen dem Auftreten von Mammakarzinomen und Merkmalen wie frühe Menarche, fehlende oder späte Schwangerschaften und dem Vorliegen einer fibrozystischen Mastopathie mit atypischen Hyperplasien, bestehen. Desweiteren wurde bei Frauen mit erhöhtem Konsum von fetthaltigen Speisen, die mit der Östrogenproduktion postmenopausal interagieren, eine höhere Inzidenz von Mammakarzinomen gefunden (De Waard 1975, Colditz et al. 1993). Als weiterer Risikofaktor wird eine Strahlenexposition angesehen.

Die Beurteilung der Erkrankung und ihrer Prognose sowie entsprechende Therapieentscheidungen erfolgen an Hand der pathologisch-anatomischen und histopathologischen Befunde (WHO-Klassifikation nach Rosen und Obermann 1992, van Nuys-Klassifikation und Silverstein et al. 1991 Stadieneinteilung entsprechend der TNM-Klassifikation). Gesicherte klassische Prognosefaktoren sind der axilläre Lymphknotenstatus (Nodalstatus), der histologische Differenzierungsgrad (Grading), der Progesteronrezeptorstatus und der Steroidhormonrezeptorstatus.

Zur Beurteilung der Prognose werden außerdem Tumormarker wie CEA, CA15-3, TPA und EGF-Rezeptor hinzugezogen. Sogenannte „neuere Prognosefaktoren“ wie Ki-67, c-erb B2 (HER2-neu) und TP53, die immunhistochemisch nachgewiesen werden können, sollten nur bei speziellen Fragestellungen (z.B. im Rahmen von Studien) untersucht werden. Da ihre prognostische Relevanz mit Ausnahme von c-erb B2 noch umstritten ist, ist die Analyse dieser Parameter nach heutigem Kenntnisstand als Routineuntersuchung nicht gerechtfertigt.

Ein Ziel der molekulargenetischen Tumorforschung ist die Identifizierung von spezifischen genetischen Veränderungen in Tumoren, die unabhängige prognostische Parameter darstellen und somit zu Therapieentscheidungen herangezogen werden können. Unter diesem Aspekt sollten in der vorliegenden Arbeit klassische Prognosefaktoren wie Grading oder Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus mit genetischen Veränderungen wie Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) bei sporadischen Mamma- und

Kolonkarzinomen korreliert werden (Deville et al. 1989, Lakhani et al. 1999, Washington et al. 2000, Selim et al. 2001, Larson et al. 2002). In den letzten Jahren sind Dank vieler Forschungsgruppen in Rahmen der Humangenomprojekts viele Möglichkeiten in der Tumorbilogie entstanden, die eine Analyse der Struktur und Expression von tausenden Genen auf Chip basierten Arrays erlauben. Die Fähigkeit der so erhaltenen molekulargenetischen Markerprofile wird zurzeit für die Prognose, den klinischen Verlauf und Therapieerfolg von Karzinomerkrankungen überprüft (siehe Diskussion Seite 68).

Eine weitere Aufgabe der molekulargenetischen Tumordiagnostik ist, durch den Nachweis spezifischer Mutationen in bekannten Tumorgenen, die hereditäre Disposition für Tumore zu untersuchen. Seitdem mit BRCA1 und BRCA2 zwei Brustkrebs-spezifische Tumorgene kloniert wurden (BRCA1: Hall et al.1990, King 1990, Miki et al. 1994, Vogelstein und Kinzler 1994, BRCA2: Wooster et al. 1994,1995, Tavtigian et al. 1996), die mit einer erblichen Disposition zum Mammakarzinom korrelieren, kann ein erhöhtes Brustkrebs-Risiko mit molekulargenetischen Methoden nachgewiesen werden (Easton et al. 1996).

Das BRCA1 Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q21) zwischen den Markern D17S1321 und D17S1325. Es erstreckt sich über eine Länge von circa 1 Mb, besitzt 24 Exons, kodiert für ein Protein mit 1863 Aminosäuren und besitzt mit einem Zinkfinger am aminoterminalen Ende Transkriptionsfaktor-Aktivität (Black 1994, Miki et al. 1994).

In der Abb. 1 ist das menschliche Chromosom 17 schematisch dargestellt (Miki et al. 1994). Die Region, die das BRCA1 Gen enthält, wird distal von den bekannten Genen CA125 und RNU begrenzt. Intragenisch liegt der Marker D17S855, einer der Marker, die ich für meine LOH-Analysen in sporadischen Tumoren benutzte.

Smith et al. (1992), Cropp et al.(1993,1994) und Foulkes und Narod (1995), zeigten eine hohe Frequenz von LOH im Bereich des BRCA1 Gens bei sporadischen Brust- und Ovarialkarzinomen. Dies spricht dafür, dass das BRCA1 Gen ein Tumorsuppressorgen ist (siehe 1.4).

Charakteristische Mutationen des BRCA1 Gens wurden bei familiären Mamma- und Ovarialkarzinomen gefunden (Simard et al. 1994, Sorlie et al. 1998). Nach Ponder (1994) war bei über 80% der Frauen, die vor dem 40. Lebensjahr an einem Mamma- und Ovarialkarzinom erkrankten, das BRCA1 Gen verändert. Bethwaite und Mitarbeiter zeigten 1996 in ihrer Studie, dass ca. 40% aller familiär gehäuft auftretenden Brustkarzinome genetische Veränderungen im BRCA1 Gen aufweisen. Erste Berichte über Mutationen im BRCA1 Gen bei sporadischen Mammakarzinomen erschienen um 1999

(Garcia Patino et al. 1998, Khoo et al. 1999). Mehrere Studien familiärer Mammakarzinome (Brown et al.1996, Katagiri et al. 1996, Ozelik et al. 1996) haben festgestellt, dass Mutationen im BRCA1 Gen unregelmäßig verstreut liegen und keine Hotspot-Sequenzen aufweisen (Futreal et al. 1992, Miki et al. 1994, Simard et al. 1994, Shattuck-Eidens et al. 1995, Couch und Weber 1996, Sorlie et al.1998). Mutationsträgerinnen haben ein erhöhtes Risiko für Ovarialkrebs (Thompson und Easton, 2002).

Studien von Simard et al. (1994) zeigten, dass einige BRCA1 Mutationen in Familien mit erhöhtem Brustkrebsrisiko, wie z. B. Ashkenazi Jüdinnen, eine höhere Inzidenz aufweisen. Dazu gehört die 185delAG-Mutation des Exons 2. Dies ist eine Deletion eines AG Dinucleotids im Kodon 23 des Exons 2 des BRCA 1 Gens, welches ein Stop Signal am Kodon 39 hervorruft. Struewing et al. (1995a) hat die 185delAG-Mutation mit einer Häufigkeit von 0,9% (8/858) bei Ashkenazi Jüdinnen gefunden. Die Mutation 5383insC im Exon 20 des BRCA1 Gens wurde mit einer Häufigkeit von 0,13% bei Ashkenazi Jüdinnen mit Brustkrebs nachgewiesen (Roa et al. 1996, Tonin et al. 1996). Von besonderem Interesse hinsichtlich des Verständnisses der Pathogenese des Mammakarzinoms ist die Frage, ob diese Mutationen auch bei sporadischen Tumoren vorkommen, und dies sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

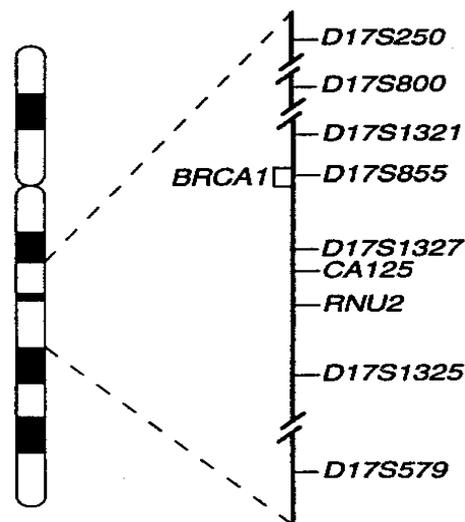


Abb. 1: Region des BRCA1 Gens mit flankierenden Markern auf Chromosom 17q (Miki et al. 1994)

Im September 1994 wurde ein zweites Tumorsuppressorgen, das BRCA2 in der Region 13q12-q13 von der Arbeitsgruppe Wooster et al. lokalisiert und 1996 von Tavatigian et al. kloniert. Mit Hilfe der LOH-Analysen war gehäuft ein Verlust von Heterozygotie in diesem Bereich bei familiären Brustkarzinomen gefunden worden. Die Region ist circa 6 Centimorgan groß und liegt zwischen den Markern D13S260 und D13S171. Das BRCA2 Gen ist 70 kb groß, hat ein Transcript von 11 kb, besitzt 26 Exons und kodiert für ein Protein von 3418 Aminosäuren. Wie beim BRCA1 kommen auch beim BRCA2 Mutationen unregelmäßig verstreut im gesamten Gen vor (Lancaster et al. 1996, Tavatigian et al. 1996). Allelverluste in sporadischen Brusttumoren lassen vermuten, dass es sich bei dem BRCA2 Gen ebenfalls um ein Tumorsuppressorgen handelt. In 45% der Fälle mit familiärem Mammakarzinom (Easton et al. 1993) fanden sich Mutationen im BRCA2 Gen, nicht jedoch in jenen mit Ovarialkarzinomen. Andersen et al. (1996) und Couch et al. (1996) zeigten, dass das BRCA2 Gen in 40% der Familien verändert war, in denen Männer an Brustkrebs erkrankten.

Der Nachweis von strukturellen Änderungen sowohl intragenisch im BRCA1 Gen als auch in benachbarten Regionen der Gene BRCA1 und BRCA2 bei sporadischen Tumoren und deren Korrelation mit histopathologischen Prognoseparametern soll unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

Weitere Gene, die eine Disposition für das familiär gehäufte Auftreten von Mammakarzinomen tragen können, sind das Ataxia Teleangiectasie (ATM) Gen, das EST Gen und das HRAS1 Gen. Nach Foster et al. (1996) haben heterozygote Anlageträgerinnen des defekten ATM-Gens ein 4- bis 12-fach höheres Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Die neueren Untersuchungen haben diese Beobachtung nicht bestätigt (Izatt et al. 1999, Angele et al. 2000). Chen et al. (1998) postulierten, dass das ATM Gen kein Tumorsuppressorgen sei und Mutationen im ATM Gen nicht allein die Ursache für die Brustkrebsentstehung seien. Eine relevante Nebenbeobachtung machten Appleby et al. im Jahre 1997, in dem sie fanden, dass Patientinnen mit Mammakarzinomen und Veränderungen im ATM Gen nach Radiotherapie schwere Gewebsnekrosen entwickeln.

Ein durch Brustkrebs gekennzeichnetes hereditäres Krebs-Syndrom mit autosomal dominantem Erbgang ist das Li-Fraumeni-Syndrom. Die molekulare Grundlage für das Li-Fraumeni-Syndrom ist bei der überwiegenden Zahl der Patienten eine Keimbahnmutation

im TP53 Gen (Malkin et al. 1990, Zaleda Headman et al. 1997). Das TP53 Gen ist das bei Krebserkrankungen des Menschen am häufigsten veränderte Gen (Wagener 1996). Somatische TP53 Mutationen treten bei etwa 50% der sporadischen Tumore auf (Zeleda-Headman et al. 1994). Es handelt sich um ein Tumorsuppressorgen, das durch bestimmte Punktmutationen in seiner kodierenden Sequenz zu einem dominanten Onkogen werden kann. Li et al. (1997) klonierten das PTEN Gen welches in etwa bei 10% der Brusttumoren mutiert ist.

Bei einer Vielzahl von Fällen familiär gehäuft auftretender Mammakarzinome konnten die krankheitsverursachenden Gene noch nicht identifiziert werden. Bei der Suche nach solcher Gene mit Hilfe von LOH und Kopplungsuntersuchungen in Familien mit vererbten- und spontanem Brustkrebs haben Hinweise auf Chromosomen 8p12, 3p, 12q, 20q und 22q13 ergeben (Sato et al. 1990, Andersen et al. 1992, Simard et al. 1993, Kirchweger et al. 1994, Thompson et al. 2002), die bis jetzt aber erfolglos geblieben sind. Es wird vermutet dass der gemeinsame Effekt von einigen wenig penetranten Genvarianten ein erhöhtes Krebsrisiko in Patienten ohne Mutationen in BRCA1 und BRCA2 Gene erzeugen. Daher ist die Entdeckung weiterer Tumorgene ein Ziel molekulargenetischer Tumorforschung, das dem Verständnis der Tumorphogenese und damit möglicherweise der Entwicklung neuer Therapieansätze dient.

2 DAS KOLONKARZINOM

Bei den malignen Kolontumoren handelt es sich in 95% der Fälle um Adenokarzinome, die sich aus gutartigen Adenomen entwickeln. Es sind die häufigsten Tumore des Gastrointestinaltraktes in Deutschland. Bei rechtzeitiger Entdeckung haben sie eine günstige Prognose. Die Tumore sind zu 50% im Rektosigmoid, zu 25% im Colosigmoid und in zu 10% im Zökumbereich lokalisiert. Die Inzidenz liegt bei 2,5: 10000 Einwohner pro Jahr in Deutschland. In den USA ist das Kolonkarzinom der zweithäufigste Krebs beim Mann und der dritthäufigste bei der Frau. Die höchste Inzidenz wird in Australien und Neuseeland, die niedrigste in Afrika und Südamerika festgestellt. Diese epidemiologischen Daten verweisen auf den Einfluß von Umweltfaktoren auf die Entstehung von Kolonkarzinomen. Einige Studien wie die Studie von Hsing et al. 1998 zeigen, dass ein hoher Konsum von tierischem Fett und Fleisch sowie ein niedriger Anteil von Pflanzenfasern in der Nahrung mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko korrelieren. Dieses Ergebnis wurde in der prospektiven Kohortenstudie von Fuchs und Giovannucci (1999) nicht bestätigt. Eine hohe Zufuhr von Ballaststoffen konnte das Erkrankungsrisiko nicht minimieren. Als kanzerogene Metabolite werden bakterielle Metabolite in Gallensäuren, flüchtige Phenole und Methylazoxymethane diskutiert. Als weitere Karzinogene werden Asbest und Nitrosamine angesehen.

Disponierende Erkrankungen sind kolorektale Adenome, besonders die familiäre Kolonadenomatose und Colitis ulcerosa nach 10 jährigem Krankheitsverlauf sowie Morbus Crohn nach 15 jährigem Krankheitsverlauf.

Frühsymptome sind Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Stuhlunregelmäßigkeiten, Wechsel von Obstipation und Diarrhoen als sogenannte paradoxe Diarrhoen, Bleistiftstuhl, Blutungen und Blutauflagerungen auf dem Stuhl sowie Schmerzen. Der Manifestationsgipfel liegt im 60. bis 70. Lebensjahr. Die Erkrankung kann aber auch vor dem 30. Lebensjahr auftreten.

Bei sporadischen Kolonkarzinomen werden in verschiedenen Tumorstadien unterschiedliche genetische Alterationen beobachtet. Mutationen der RAS Gene finden sich bei zahlreichen großen Adenomen und Karzinomen. Vogelstein und Mitarbeiter (1988) fanden in bestimmten Stadien der Entstehung und Progression sporadischer kolorektaler Tumore in nahezu 50% der Fälle Punktmutationen des RAS Gens. Es wird vermutet, dass bei der Tumorentwicklung die Onkogene RAS und MYC durch Mutationen

aktiviert werden. Gleichzeitig können aber auch Gene ihre Funktion verlieren, die normalerweise die Tumorgenese unterdrücken; Tumorsuppressorgene wie z.B. das TP53 Gen oder das APC Gen auf Chromosom 5q21-22 für das Kolonkarzinom Adenomatosis polyposis coli.

Alleldeletionen betreffen bei der familiären Kolonpolypose das Chromosom 5q. Bei den kolorektalen Karzinomen können noch Alleldeletionen auf den Chromosomen 17p und 18q hinzukommen. Fearon zeigte 1990 an seinem Modell die Adenom-Karzinom-Sequenz in der kolorektalen Karzinogenese. Einige Mutationen von Tumorgenen sind mit frühen Tumorstadien assoziiert, wie zum Beispiel Mutationen des FAP Gens, während andere Mutationen erst später in der Tumorprogression auftreten wie z.B. p53 Mutationen.

Eine Übersicht über das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC= human nonpolyposis colorectal cancer) gibt die Arbeit von Wehner et al. (1997). Die autosomal dominante Prädisposition zum HNPCC beruht auf Keimbahnmutationen in 4 Genen (hMSH2, hMLH1, hPMS1 und hPMS2), die ein Mismatch Repair verursachen (Wagener 1996). Bisher wurden bereits über 40 Keimbahnmutationen in den Reparaturgenen hMSH2 und hMLH1 beschrieben. Die größte Zahl dieser Defekte wurde durch direktes Sequenzieren oder durch Protein-Truncation-Tests entdeckt. Mit Hilfe von SSCP- und Heteroduplex-Analysen als Screeningmethoden entdeckten Wehner et al. (1997) 8 neue Keimbahnmutationen in den Genen hMSH2 und hMLH1 sowohl bei familiär gehäuft auftretenden Tumoren als auch bei scheinbar sporadischen Tumoren, die eine Mikrosatelliten-Instabilität zeigen. In Wehner's Studie wurde bei einem Patienten mit mutmaßlich sporadischem Tumor eine Keimbahnmutation gefunden.

Die familiäre Adenomatosis Polyposis coli (FAP) ist gekennzeichnet durch multiple Kolonpolypen, die im 2.-3. Lebensjahrzehnt entstehen und Vorstufen für Darmkrebs sind. Durch Kopplungsanalysen in einer Familie eines Patienten mit einer Deletion auf Chromosom 5q wurde erstmals durch Bodmer et al. (1987) sowie zeitgleich durch Leppert et al. (1987) der FAP-Locus entdeckt. Aber auch Solomon et al. (1987) und Vogelstein et al. (1988) haben in nicht familiären Formen von Kolonkarzinomen diesen häufigen Allelverlust beschrieben.

Die Beobachtung von Sasaki et al. (1989), daß FAP-Patienten Heterozygotieverluste bezüglich genetischer Marker auf Chromosom 5q zeigen, ließ vermuten, dass für die Entstehung eines Karzinoms eine komplette Inaktivierung dieses Locus erforderlich ist.

Einige Veränderungen von Tumorgenen sind mit frühen Tumorstadien assoziiert, während andere Mutationen erst später in der Tumorprogression auftreten und somit eher die Invasivität und damit die Metastasierung beeinflussen.

Das in Abbildung 2 dargestellte Modell zeigt Mutationen von Tumorgenen, die bei der Entwicklung von einem normalen Epithel zu einem kolorektalen Karzinom im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz auftreten können.

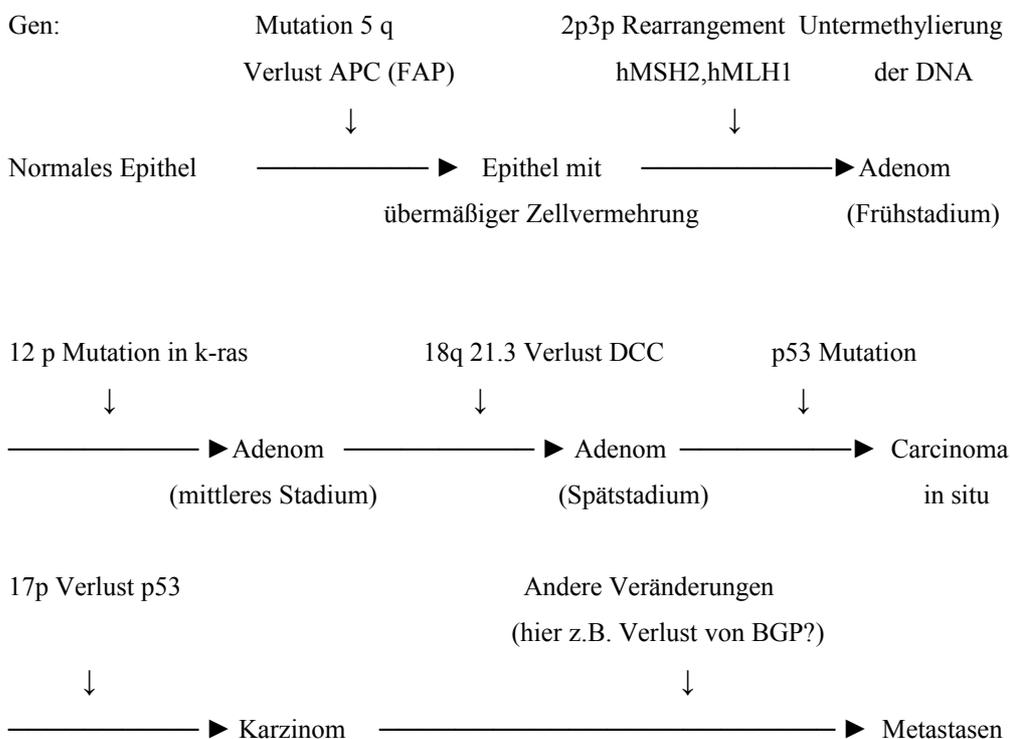


Abb.2: Mutationen von Tumorgenen, die bei der malignen Transformation eines normalen Epithels zum Karzinom auftreten [Geändert nach Fearon und Vogelstein 1990, Wagener 1996].

Ein fraglicher Tumorsuppressorgen, das in der Pathogenese des Kolonkarzinoms möglicherweise eine Rolle spielt (Kunath et al. 1998) und in dieser Arbeit untersucht wurde, ist das Biliäre Glycoprotein (BGP). Das BGP oder CD66a oder seit dem Jahre 2000 CEACAM1 genannt, ist ein Zelladhäsionsmolekül aus der Immunglobulinsuperfamilie, die im Epithel-, Endothel- und myeloischen Zellen normaler Gewebe exprimiert wird.

Nach Sippel et al. (1993) liegt die Bedeutung des BGP einerseits in einer Adhäsionsfunktion bei der hepatozytischen Aggregation während der Embryogenese und andererseits in der Bildung der Kolongewebearchitektur. Nach Thompson et al. (1991) gehört das BGP zur CEA-Familie (Carcinoembryonales Antigen) und zur Immunglobulin Superfamilie im Bereich von Chromosom 19q13.1-q13.3, eine Annahme, die von Skubitz et al. (1993) bestätigt wurde. Das menschliche CEA ist ein Oberflächenglycoprotein, das 1965 von Gold und Freedman als Tumorantigen entdeckt und untersucht wurde. Thompson und Mitarbeiter klonierten 1995 das CEA Gen und studierten dessen Expression in einigen Organen. Das CEA kommt in zahlreichen Geweben vor (Prall et al. 1996).

In einer Arbeit von Keck et al. (1995) wurde die Expression von CEA in gastrointestinalen Tumoren untersucht. NCA (nonspecific crossreacting antigen) wurde upreguliert in Kolontumoren, andere CEA Untergruppen wie das BGP1 und CGM2 jedoch waren bezüglich ihrer transkriptionellen Aktivität downreguliert, sowohl in menschlichen Kolonkarzinomen als auch in Kolonkarzinomen von Mäusen und entsprechenden Zelllinien. Die Expression von CD66a ist in den meisten kolorektalen Karzinomen und in den hepatischen Tumoren downreguliert (Neumaier et al. 1993, Rosenberg et al. 1993).

In den intensiven Arbeiten von Neumaier und Wagener am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu CEA- und NCA-spezifischer mRNA die Expression von BGP-spezifischer mRNA in mehr als 80% der kolorektalen Karzinome im Vergleich zur korrespondierenden normalen Mukosa downreguliert ist (Wagener 1996).

Der Verlust der CD66a Expression geht einher mit einem Verlust der Zelladhäsion und erleichtert somit das Ablösen einer Tumorzelle aus dem Zellverband mit dem Resultat einer Metastasierung. Weiterhin hat bereits Sippel et al. (1993) und später auch Godfraind und Langreth (1995) vermutet, dass das BGP Mikroorganismen bindet und enzymatische ecto-ATPase Aktivität besitzt sowie für den Gallensalztransport mitverantwortlich ist.

Die Downregulation der BGP Genexpression in Kolonkarzinomen ist möglicherweise auf einen Verlust der Heterozygotie zurückzuführen. Dies würde dafür sprechen, dass das BGP Gen Tumorsuppressoraktivität besitzt.

Um diese Theorie zu erhärten, war es ein Anliegen meiner Arbeit, Polymorphismen für den BGP-Locus zu finden und anschließend LOH-Analysen durchzuführen. Bei sporadischen kolorektalen Karzinomen ist zu 90% das CEA-Gen verändert (Neumaier et al. 1993). Besonders in der CEA-Familie sind die mRNA's des CD66a und CGM2, die mRNA's häufig downreguliert. (Nollau et al. 1997). Auch wurde die Expression von CEACAM1 Protein in verschiedenen anderen Tumoren wie Prostata-, Harnblasen-, Endometrium- und Brustkarzinomen untersucht und erniedrigt gefunden (Kleinerman et al. 1995, 1996, Luo et al. 1997, Bamberger et al 1998, 2001, 2002). Diese und andere Studien erhärteten die Vermutung, dass das BGP/ CEACAM1 ein Tumorsuppressorgen ist. In Brustkarzinomen war das Gen in nur etwa 30 % der Brustkarzinome downreguliert (Riethdorf et al. 1997, Huang et al. 1998). Kirschner et al. (2004) fanden, dass die Expression und Alteration von CEACAM1 in den Karzinomen in situ und invasiven Brustkarzinomen keinen Unterschied zeigen.

3 NACHWEIS VON GENETISCHEN ALTERATIONEN BEI TUMOREN

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, treten genetische Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bei erblichen Tumoren in der Keimbahn auf, während sie bei nicht erblichen Formen von Krebs nur in somatischen Zellen vorkommen. Dementsprechend unterscheiden sich die molekulargenetischen Nachweisverfahren. Mit Hilfe von Kopplungsanalysen wurden beim familiär gehäuft auftretenden Brustkrebs die disponierenden Gene BRCA1 und BRCA2 identifiziert. Nachdem bei einem Patienten mit Familiärer Adenomatose Polyposis (FAP) eine cytogenetisch erkennbare Deletion auf 5q entdeckt worden war (Bodmer et al. 1987, Leppert et al. 1987), konnte auch das verursachende FAP Gen durch Kopplungsanalysen kartiert werden.

Ein anderer methodischer Ansatz bietet sich für sporadisch auftretende Tumore an. Hier lassen sich spezifische genetische Alterationen durch Vergleich der DNA aus Tumorgewebe mit DNA aus gesundem Gewebe des Patienten, z.B. Blut, identifizieren. So können tumorspezifische Deletionen durch vergleichende Analyse von Chromosomenabschnitten, für die eine konstitutive Heterozygotie nachgewiesen wurde, gefunden werden. Der Verlust eines Allels, d.h. der Verlust der Heterozygotie (LOH), in der Tumor-DNA dient als Hinweis auf Loci von potentiellen Tumorsuppressorgenen, die als Folge der Deletion inaktiviert werden.

Bei Mammakarzinomen wurden Verluste der Heterozygotie häufig in den Regionen 13q14 (RB-Locus), 17q21 (BRCA1-Locus) und 13q12-13 (BRCA2-Locus) festgestellt (Sato et al. 1990, Andersen et al. 1992, Chen et al. 1992, Zeleda-Headman et al. 1994, Nagai et al. 1999). Auch solche Verluste sind in den Regionen der Chromosomen 1p, 1q32, 3p24, 7q31, 11p15, 11q13, 16q22, 17p21, 19q und Xq gefunden worden (Review in Larson et al. 2002). In Kolonkarzinomen sind folgende Regionen hauptsächlich durch LOH betroffen: 8p, 18p, das TP53 Gen auf dem Chromosom 17p, sowie das DCC Gen auf Chromosom 18q (Marshall, 1991). Tanner et al. (1995) berichteten über eine deutliche Amplifikation der Region 20q13 in Brusttumoren.

Erste Untersuchungen zum Verlust der Heterozygotie wurden 1980 mit Hilfe der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse durchgeführt (Botstein et al. 1980, Gusella, 1986, Pellagata et al. 1998). Hierfür wurde genomische DNA mit Restriktionsendonucleasen geschnitten und im Agarosegel aufgetrennt. DNA-

Polymorphismen, die Restriktionsenzymststellen verändern, konnten so durch die unterschiedliche Länge der DNA-Fragmente nachgewiesen werden.

1985 fanden Jeffreys und Mitarbeiter, dass es im menschlichen Genom Regionen gibt, die aus kurzen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen (Tandem repeats) bestehen. Die Anzahl dieser Einheiten und somit die Länge der entsprechenden DNA-Fragmente, kann von Mensch zu Mensch variieren (Polymorphismus). Mikrosatelliten bestehen aus einfachen repetitiven DNA-Sequenzen einer Länge von meist 1 bis 4 Basenpaaren. Mit Hilfe der PCR-Technik und polymorpher Mikrosatellitenmarker kann DNA aus gesunden Geweben betroffener Patienten (z.B. Leukozyten des peripheren Blutes) im Vergleich zu DNA aus Tumorgewebe in Hinblick auf polymorphe DNA-Fragmente (Mikrosatellitenfragment-Längenpolymorphismen) analysiert werden. Dies erlaubt den Nachweis des Verlustes der Heterozygotie (LOH) und anderer genetischer Veränderungen wie Insertionen, Translokationen und Instabilität. Dabei ergibt sich bei der Analyse von Gewebeproben aus Tumoren die Schwierigkeit, dass der Verlust der Heterozygotie sich oft als scheinbar unvollständiger Verlust zeigt, d.h. lediglich als Abschwächung einer Bande im Gel.

Mutationen in bekannten Tumorgenen können durch verschiedene Screening-Verfahren und anschließende Sequenzierung nachgewiesen werden. Eines dieser Verfahren ist die SSCP (single strand conformation polymorphism)-Analyse, die erstmals 1989 von Orita beschrieben wurde. Die Technik beruht auf dem Prinzip, dass DNA-Einzelstränge von PCR-Produkten mit unterschiedlicher Primärstruktur sich in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld eines Polyacrylamidgels unterscheiden. Die SSCP-Methode gibt mit 80-90%-iger Sicherheit einen Hinweis auf veränderte DNA-Sequenzen (Orita et al. 1989, Dean und Gerard 1991, Hayashi, 1991).

Ein weiteres Verfahren des Mutationscreenings in PCR-Produkten ist die Heteroduplex-Analyse (Triggs und Gravel 1989, Keen et al. 1991). Die Sensitivität der Heteroduplexanalyse beträgt bei DNA-Fragmenten bis 300 bp ca. 80-90% und ist somit vergleichbar mit der SSCP-Technik (White et al. 1992, Grompe 1993). Heteroduplexstränge weisen gegenüber Homoduplexsträngen eine veränderte Sekundärstruktur auf, die eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit in Polyacrylamidgelen zur Folge hat, so dass eine zusätzliche, langsamer wandernde Bande nachgewiesen werden kann.

Zum Nachweis häufig auftretender Mutationen können spezielle Techniken wie die ASO-Methode (allelel specific oligonucleotide hybridisation) nach Michaud et al. (1992) eingesetzt werden. Hierbei werden bekannte Punktmutationen mit Hilfe von Oligonucleotidsonden einer Länge von 15-20 Nucleotiden nachgewiesen. Die denaturierte Tumor-DNA hybridisiert nur dann mit der Oligonucleotidsonde und wird zu einem Doppelstrang, wenn die Basensequenz zwischen Sonde und DNA vollständig komplementär ist. Es reicht eine einzige Fehlpaarung aus, damit der Heteroduplex auseinanderfällt, so dass in der anschließenden Southernblotanalyse keine Produkte nachweisbar sind.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 Tumorgewebe und Blutproben

Tumorgewebe und Blutproben von 44 Mammakarzinom-Patientinnen wurden von der Frauenklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sowie Tumor- und Blut-DNA von 10 Kolonkarzinom-Patienten aus dem Krankenhaus Elim zur Verfügung gestellt. Ferner wurde aus Blut isolierte DNA von 13 gesunden Probanden kaukasischer Abstammung zur RFLP-Analyse verwendet.

Histopathologisch waren diese invasiven Mammakarzinome folgendermaßen definiert:

Das Grading ergab 7 Proben von Grad 1 = gut differenzierte Tumore, 18 von Grad 2 und 19 von Grad 3 = wenig differenziert; 29 Patientinnen waren nodalpositiv, 15 waren nodalnegativ, 7 Patientinnen waren nur ER (Östrogenrezeptor)-positiv, 4 nur PR (Progesteronrezeptor)-positiv, 7 zeigten keine Expression von Östrogen – oder Progesteronrezeptoren, bei 26 waren beide Rezeptoren positiv. Die Altersspanne der Patientinnen lag zwischen 34 bis 78 Jahren.

Die histopathologische Charakterisierung der Kolonkarzinome ergab folgende Befunde:

Grad 1 = kein Patient, Grad 2 = 9 Patienten, Grad 3 = 1 Patient; Stadium Dukes A = 1 Patient, Dukes B = 1 Patient, Dukes C = 7 Patienten, Dukes D = 1 Patient; 3 Patienten hatten den Primärtumor im Sigma, einer im Colon ascendens, drei im Rektum, zwei im Coecum, bei einem Patienten war die Lokalisation unbekannt.

3.1.2 DNA-Sonden

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende DNA-Sonden verwendet:

- c-BGP (Chr. 19q13.1-q13.2)
- BGP-3'UTR (untranslated region) (PstI-Fragment) in pb Bluescript II KS+ mit einer Fragmentgröße von 396 bp (Nucleotid-Position 1677-2072)(R. Paxton, Beckmann Research Institute of the City of Hope, Duarte)
- 5'-BGP: Klonierte Sonde

Diese drei DNA-Sonden wurden vom Institut für Klinische Chemie des UKE (Prof. Dr. M. Neumaier) als Plasmide zur Verfügung gestellt.

3.1.3 PCR-Primer

Für die vorliegende Arbeit wurden für folgende Marker PCR-Primer im Institut für Zellbiochemie, Prof. Richter, Service Labor, chemisch synthetisiert:

f = upstream primer (sense) r = downstream primer (antisense)

Marker D19S178 (MFD 139)	lokalisiert auf Chromosom 19q13, Länge 135-189 bp Primer f 5' - CACAACACTGTTTCATTTGTC r 5' - TTTCAGTAGAATTTTCAGGCC
Marker CEA (NCA)	lokalisiert auf Chromosom 19q13, Länge 95-111 bp Primer f 5' - CTGCTGACTTTGACTCAGTA r 5' - GGTCCTGAGCAGGTCTCTTC
Marker RNU 2	lokalisiert auf Chromosom 17 q12-21, Länge 160 –162 bp Primer f 5' - GAAGAAGCACGGGTGTAAGA r 5' - TCCCACTCTCATCCACATTC
Marker D17S588 (42D6)	lokalisiert auf Chromosom 17q13-21, Länge 154-174 bp Primer f 5' - CCTGGTCTAGGAAGAGTGTA r 5' - GTGTAAGCATCTGTGTATACTAC
Marker D17S855	lokalisiert auf Chromosom 17q21, Länge 143-155 bp Primer f 5' - GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG r 5' - ACACAGACTTGTCCTACTGCC
Marker FLT1	lokalisiert auf Chromosom 13q12, Länge 222-242 bp Primer f 5' - GACCCGTGCCTTGTTTCCTAG r 5' - GTAACCTTAAAATTCCAGTTTCC

3.1.6. Chemikalien und Enzyme

Chemikalien, Lösungsmittel und Farbstoffe von folgenden Firmen wurden verwendet:

Boehringer Mannheim, Merck und Pharmacia.

Restriktionsenzyme, Klenow Enzym der DNA-Polymerase I sowie Taq-DNA-Polymerase wurden von den Firmen Gibco-BRL, Pharmacia und Beckmann bezogen.

Das Multiprime-DNA-labelling system und die radioaktiven Nukleotide stammen von der Firma Amersham Buchler.

3.1.7 Medien, Lösungen und Puffer

TB Medium:

Lsg. A: 12 g Tryptone
24 g Yeast Extract
4 ml Glycerol (87 %)
in 900 ml Aqua dest.

Lsg. B: 0,17 M KH_2PO_4
0,72 M K_2HPO_4
in 100 ml Aqua dest. gelöst und steril mit einem Filter auf die autoklavierte Lsg. A filtrieren

Agarplatten:

1g Bacto-Agar auf
100 ml TB-Medium
wurden in der Mikrowelle gelöst, danach auf 50°C abgekühlt und 1 µl Ampicillin pro 1 ml Medium zugeben; Platten gießen

Lösungen für die Plasmid-Präparation nach Maniatis:

Lösung 1) 50 mMol Glucose
25 mMol Tris-HCl (pH 8,0)
10 mMol EDTA (pH 8,0)
in 50 ml Aqua dest., steril filtriert

Lösung 2) 0,2 N NaOH
1% SDS-Lsg

Lösung 3) 5 M Kaliumacetat in 50 ml Ansatz

Denhardt's Solution: 2 %Ficoll, 2%Polyvinylpyrrolidol, 2%BSA
Heringsperma DNA (10 mg/ml): 100 mg Heringsperma, Boehringer Mannheim
in 10 ml Aqua inject. Mit einer Spritze lösen, bei 95°C denaturieren und bei -80°C lagern.

Prähybridisierungslösung:	15 ml 20x SSC-Lsg. 5 ml Denhardt's Solution 1,25 ml 20 % SDS-Lsg. auf 50 ml aqua dest. aufgefüllt.
Hybridisierungslösung:	Heringsperma-DNA vor dem Hinzufügen 5 min denaturieren und tRNA (200 µl a 100ml) entspricht der Prähybridisierungslösung nach Zugabe von 32P markierter DNA-Sonde
20x SSC:	3,0 M NaCl 0,3 M NaCitrat (PH 7,0)
20x SSPE:	3,60 M NaCl 0,20 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,02 M EDTA
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl (pH 7,2) 0,001 M EDTA gelöst in 1000 ml Aqua dest., (pH 7,0)
Formamid-Puffer nach Maniatis für PAA Färbung:	10 ml Formamid 10 mg Xylene cyanol FF 10 mg Bromphenolblau 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 200 µl
20% SDS:	20 g SDS (Sodiumdodecylsulfat) in 100 ml Aqua dest.
0,5 M EDTA – Lsg.:	93,06 g EDTA in 500 ml Aqua dest., pH 8,0 auf NaOH einstellen
Chloropan:	200 ml geschmolzenes Phenol mit 50 ml 10x TE nach Maniatis equilibrieren bis die Phasentrennung nicht mehr sichtbar ist ca. 1-3 h, 250 ml Chloroform 250 mg Hydroxychinolin hinzufügen
30% Acrylamid-Stammlösung:	29% Acrylamid, 1% NN,N' Methylenbis- acrylamid lichtgeschützt lagern

TE-Puffer:	Für chromosomale DNA nach Singh: 10 mM Tris-Cl 0,1 mM EDTA, pH 8,0
TAE-Puffer:	Für Agarose Gelelektrophorese: 0,04 M Trisacetat 0,002 M Na-EDTA für 1000 ml 50x TAE werden 242 g Tris-HCl und 57,1 ml Eisessig + 100 ml 0,5 M EDTA verwendet
0.5x TBE – Puffer:	0,045 M Trisborate 0,001 M EDTA
Stoppuffer:	25 % Ficoll 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol auf 10 ml Aqua dest. aufgefüllt
Agarosegel:	2,4 g Agarose 6 ml 50x TAE in 300 ml Aqua dest. lösen
Blutpuffer:	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na-EDTA

3 METHODEN

3.2.1 Isolierung von genomischer DNA

3.2.1a Isolierung genomischer DNA aus Blut

10 ml venöses EDTA-Blut wurden unter Zugabe einer dreifachen Menge eines Hämolyse-puffers auf Eis unter leichtem Schütteln 15 min inkubiert. Danach folgte eine 20 min Zentrifugation bei 3000 rpm und Raumtemperatur.

Für die Proteolyse wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 10 ml SE-Puffer (SE-Puffer: 75mM NaCl, 25 mM Na-EDTA pH 8,0) suspendiert. Nach Hinzufügen von 500 µl 20 % SDS und 100 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) wurde es für 2-4 h bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert.

Die vorhandenen Proteine wurden durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Die lysierte Zellsuspension wurde mit 10 ml SE-Puffer und jeweils mit dem gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach längerem Schwenken und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 6000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Röhrchen pipettiert und zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) behandelt, um Phenolrückstände zu entfernen. Dazu wurden 3,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol zu der wässrigen Phase gegeben, 10 min geschwenkt und 10 min. bei 6000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Der wässrige DNA-Überstand wurde mit 1/30 Vol. 3 M Na-acetat und gleichem Vol eiskaltem 98 % Ethanol gefällt. Die DNA-Flocken wurden mit einer hakenförmig zugeschmolzenen Pasteurpipette herausgefischt. Zur Entfernung der Salzgehalts wurde das DNA-Pellet mehrfach mit 70 % Ethanol gewaschen. Das restliche Ethanol wurde durch Auftupfen der präzipitierten DNA auf Parafilmfolien entfernt.

Die DNA wird in ein steriles Eppendorf tube übertragen und in TE-Puffer für ca. 2-3 h unter Schütteln gelöst.

3.2.1b Isolierung genomischer DNA aus Tumorgewebe

Die genomische DNA aus Tumorgewebe von Mammakarzinomen wurde von unserer Gruppe isoliert. Die DNA von Kolonkarzinomen wurde im Elim Krankenhaus isoliert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ein Gramm des im flüssigem Stickstoff eingefrorenes Tumorgewebe wurde mit einem Skalpell zerteilt und in einem vorgekühltes Gefäß gegeben.

Nach 3-maligem Dismembrieren des Gewebes über 40 sec wurde das erhaltene Tumorpulver in 20 ml Gewebepuffer (100 mM Tris, 5 mM Na-EDTA, 1% SDS, Proteinase K, f.c. 100 µg/ml) überführt und gut vermischt. Waren Klümpchen im Gemisch, so wurde dies einige Stunden bei 60°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 1 Volumenteil Chloroform erfolgte die Proteinextraktion. Nach dem Schütteln der Tumorproben und Zentrifugation über 20 min bei 3000 rpm, wurde die Protein-Interphase durch Behandlung des Überstandes mit Chloroform entfernt und erneut bei 3000 rpm 20 min zentrifugiert. Dem Überstand wurde 10 M LiCl (f.c. 2,5M) hinzugefügt und über Nacht auf Eis inkubiert. Das durch das Zentrifugieren bei 16000 rpm über 45 min entstandene Pellet enthielt RNA, der Überstand DNA.

3.2 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode. Der Ladepuffer dient dazu, die Dichte der Proben zu erhöhen, so daß die DNA direkt in die Taschen fällt und der Lauf der Proben im Gel sichtbar gemacht werden kann. Für die grobe Orientierung über die Größe der PCR-Produkte wurde eine 0,8% Agarose-Lösung in 1 % TAE-Puffer hergestellt, in der Mikrowelle erhitzt, auf 60-70° C abgekühlt und in eine vorpräparierten Plastikkammer (Vorder- und Hinterseiten wurden mit Klebeband zugeklebt und ein Kamm eingesetzt) bis zu einer Dicke von 3-5 mm gegossen. Die Zähne des Kammes ragen 1 mm über dem Boden der Kammer, so daß nach dem Aushärten des Gels Taschen entstehen. Die Klebestreifen und der Kamm werden aus der Kammer vorsichtig entfernt, und das Gel wird in eine mit 1 % TAE gefüllte, horizontale Elektrophoresekammer gelegt.

3.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische Basensequenzen eines DNA-Stranges erkennen und spalten. Durch einen speziellen Restriktionspuffer, der Magnesiumionen enthält wird eine optimale Aktivität der Restriktionsenzyme erreicht. In dieser Arbeit wurde genomische DNA mit 10 verschiedenen Restriktionsendonucleasen gespalten und anschließend auf Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Da durch die Spaltung eine Vielzahl von Fragmenten entstehen, sind einzelne Banden nicht erkennbar. Bei der Spaltung von Plasmid-DNA jedoch stellen sich einzelne Banden nach der Agarosegelelektrophorese gut dar.

3.2.3a Spaltung menschlicher, genomischer DNA durch Restriktionsendonucleasen

10 µl DNA (1µg/ml) wurden in ein Eppendorftube überführt. Dazu kamen 2 µl Restriktionspuffer sowie 2 µl Restriktionsenzym (das entspricht 3-5 U Enzym auf 1 µg genomischer DNA) hinzu. Das Gemisch wurde mit 6 µl Aqua injectabilia auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer gestoppt und anschließend in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.3b Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonucleasen

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige in Bakterien autonom replizierende DNA-Moleküle, die als Vektoren häufig benutzt werden. Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen wird inserierte DNA aus Plasmiden isoliert.

25µl Plasmid-DNA (Konzentration 1 µg/µl) wurden mit 5 µl Restriktionspuffer sowie 5 µl Restriktionsenzym (etwa 5 U/µg DNA) vermischt und mit Aqua injectabilia in 50µl Gesamtvolumen 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zusatz von 10x Ladepuffer beendet und die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die geschnittene Plasmid-DNA wird bei – 20 °C aufbewahrt.

3.2.3c Plasmidpräparation

DNA-Ligation

Mit Hilfe des Enzyms Ligase können die Enden zweier Nukleinsäuremoleküle miteinander verknüpft werden (Ligation). Für Klonierungsexperimente werden hierfür als Vektoren zirkuläre Plasmide, die durch bestimmte Restriktionsenzyme an einer definierten Stelle gespalten werden, mit einer Ziel-DNA (menschliche DNA) verbunden.

Der Ligationsansatz wurde nicht in unserem Labor durchgeführt. Plasmid-DNA und Insert wurden von der Abteilung für Biochemie uns zur Verfügung gestellt.

Transformation:

Als Transformation wird das Einschleusen von DNA-Molekülen in Wirtszellen (Bakterien, Hefen) bezeichnet, in denen sie sich dann als Replikon unabhängig vom Chromosom der Wirtszelle vermehren können. Um eine Permeabilität für die Aufnahme der Fremd-DNA in E. coli DH-5a Bakterien zu erzielen, d.h. um sie kompetent zu machen, wurden sie nach der Methode von Mandel und Higa (1970) mit CaCl_2 vorbehandelt und anschließend bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurden die eingefrorenen DH-5a E. coli Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde ca. 40 ng rekombinante DNA zu je 200 μl Zell-Aliquot zupipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Bei langsamer Erwärmung auf 42°C im Wasserbad wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) hinzugefügt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach wurden 200 μl Zellsuspension auf selektivem LB-Agarmedium (d.h. mit Antibiotikazusatz) ausplattiert und für 16 h bzw. über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diesen Platten können nur Bakterien wachsen, die den Vektor mit dem entsprechenden Resistenzgen besitzen. Anschließend können durch Entnahme von Einzelkolonien die Zellen in 10 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht weiter vermehrt werden.

Isolierung der Plasmid-DNA und des Inserts

Die Zellyse erfolgte mittels alkalischer Behandlung. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 5 ml eiskalter Dehydratationslösung (10 % Glucose, 50 mM Tris-HCl, pH 8) gelöst. Anschließend wurde ein proteinverdauendes Lysozym (1 Spatelspitze) hinzugefügt. Durch Gabe von 10 ml eines alkalischen Detergenz (0,2 N NaOH und 1% SDS) wurden die DNA der Zellen denaturiert. Nach Hinzufügen von 7,5 ml eiskaltem 5 M Kalium-Acetat-Puffer und starkem Schütteln wurde das geschlossene zirkuläre Plasmid renaturiert. Um die renaturierte Plasmid-DNA von der restlichen denaturierten linearisierten genomischen DNA und Bakterienzelltrümmern zu trennen, wurde bei 4°C für 20 min bei

9000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde durch sterilen Zellstoff in JA 20 tubes überführt und 2 Volumenteile 96% Ethanol hinzugefügt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 16.000 rpm wurden die Pellets vakuumgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml TE gelöst und 10 µl aufgekochte RNase pro Tube hinzugegeben.

Nach Zugabe von 1 Volumen-Äquivalent Phenol/Chloroform und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol sowie 2 Volumen-Äquivalenten 96% Ethanol /Lithiumchlorid (5M 1/12,5 des Volumens), wurde die präzipitierte DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Nach 30 min Zentrifugation mit 16000 rpm wurde das Pellet von der Alkoholfraktion abgetrennt.

Zur Entsalzung des Pellets wurde mehrmals mit 70 % Ethanol gewaschen und der Alkohol im Vakuumtrockner abgedampft. Die DNA wurde in TE-Puffer nach Maniatis gelöst.

Nach Herausschneiden des DNA-Inserts aus dem rekombinanten Plasmid mit Hilfe eines Restriktionsenzym, wurde die DNA elektrophoretisch in 1,2 % Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Sicht ein Stück DEAE-Membran (Schleicher & Schüll, AN 45) vor und nach dem zu isolierenden Fragment in einem mit dem Skalpell präparierten Gelschlitz eingesetzt. Nach Fortfahren der Elektrophorese für 10 min bei 150 V, wanderte das Insert in die Membran, an die es fest bindet. Anschließend wurden die Agarose Reste von der Membran durch TE-Puffer entfernt und die Membran in einem Eppendorf Tube mit 400 µl Elutionspuffer NA 45 (Puffer nach Schleicher und Schüll) für 1 h bei 70°C inkubiert. Nach dem Entfernen der Membran wurde die Insert-DNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol bei -20°C über Nacht präzipitiert, das Pellet 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst.

3.2.3d Southern-Blot-Hybridisierung

DNA-Transfer auf eine Nylonmembran

Um mit Hilfe von Southern-Blots Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen nachzuweisen, wurde die DNA von 13 gesunden Probanden mit 10 verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, denaturiert und für eine Hybridisierung auf eine Nylonmembran übertragen.

Es wurde 10 µl DNA mit 1/10 Restriktionsenzym, 1/10 des entsprechenden Puffers und 3/10 Aqua dest. in ein Eppendorftube pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden in einem 0,8 % Agarosegel elektrophoretisch bei 15-20 V aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente durch Alkalibehandlung (15 min bei Raumtemperatur in 0,25 M HCl, danach 30 min in 1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH) unter Schütteln denaturiert und für 30 min in einer 1,5 M NaCl + 0,5 M Tris-HCl + 10 mM EDTA-Lsg. neutralisiert.

Das Gel wurde anschließend auf einen selbstgefertigten Blotting-Aufbau, der 20x SSPE-Puffer enthielt, gelegt und mit einer zuvor in 2x SSPE equilibrierten Nylonmembran bedeckt. Das Ganze wurde mit einem circa 10 cm dicken Zellstoffstapel überschichtet und mit einer Glasplatte und Steinen beschwert. Der Transfer der DNA auf die Membran dauerte circa 24 Stunden. Anschließend wurde die Membran in einer Plastiktüte bei – 18°C bis zur Hybridisierung gelagert.

Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Um die DNA-Sonde radioaktiv zu markieren, wurde der „Megaprime Labelling-Kit“ (Firma Amersham) verwendet. Vor der Markierungsreaktion wurde die Sonde (50 µl Gesamtansatz enthielt 5 µl einer 25 ng DNA-Sonde und 5 µl Primer) für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die DNA-Sonde zum Labelling-Mix (10 µl Labelling-mix Puffer + 23 µl Aqua dest + 2 µl Enzym + 5 µl $\alpha^{32}\text{dCTP}$) dazu pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Vor der Messung des Einbaus von radioaktiven Nucleotiden mußten die nicht eingebauten Nucleotide durch eine 1x TE equilibrierte Sephadex G50 Säule von Pharmacia abgetrennt werden. Zur Bestimmung der Ausgangsradioaktivität wurde 1µl des DNA-Sondengemisches abgenommen und mit 49µl Aqua destillata gemischt. Die restlichen 49

μ l DNA-Sonde wurden auf die Säule gegeben und mit 1x TE-Puffer eluiert und die Aktivität durch Messung eines Aliquots im Szintillationszähler (LS 1801, Beckmann) bestimmt. Der Einbau war probenspezifisch und lag zwischen 10^7 und 10^9 cpm/ μ g/DNA.

Hybridisierung von Southern-Blots

Die Nylonfilter wurden in eine Plastiktüte gegeben, mit 10 ml einer Prähybridisierungslösung versetzt und für 1 h bei 63°C unter Schütteln inkubiert. Die Prähybridisierungslösung enthält 200 μ l denaturierte Heringsperma-DNA (10 mg/ml) sowie 40 μ l tRNA (2 μ g/ml), um unspezifische DNA-Bindungen und RNA's abzublocken. Nach der Präinkubation wurde die Prähybridisierungslösung abgossen und durch 10 ml Hybridisierungslösung ersetzt, die neben Heringsperma-DNA und tRNA auch die radioaktiv markierte DNA-Sonde (ca 10^7 cpm/10 ml), die zuvor bei 95°C für 5 min denaturiert und auf Eis gelegt abgekühlt worden war, enthält. Nach gutem Verteilen der Hybridisierungslösung auf dem Filter wurde die Plastiktüte luftblasenfrei zugeschweißt und in eine Sicherheitstüte gelegt. Die Inkubation des Filters erfolgte unter Schütteln über Nacht bei 63°C in einem mit Aqua destillata gefüllten Gefäß.

Danach wurde die Hybridisierungslösung abgossen, und der Filter in Lösungen mit abfallender SSC- und SDS-Konzentration gewaschen, um unspezifisch gebundenes Probenmaterial vom Filter zu lösen:

2x	SSC / 0,2%	SDS	30 min bei 63°C
1x	SSC / 0,1%	SDS	30 min bei 63°C
	0,5%	SSC / 0,05%	SDS 30 min bei 63°C
	0,2%	SSC / 0,02%	SDS 30 min bei 63°C
	0,1%	SSC / 0,01%	SDS 30 min bei 63°C

Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Filter in feuchtem Zustand in Plastikfolie eingeschweißt. Die Exposition auf Röntgenfilme Kodak-Xomat erfolgte über Nacht bei minus 70°C. Die anschließende Filmentwicklung erfolgte in den Automaten des Institutes für Radiologie in der Universitätsklinik Eppendorf.

3.4 Untersuchungen zum Verlust der Heterozygotie (LOH) mittels Analyse des Mikrosatelliten-Längenpolymorphismus

3.2.4a Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Technik, die von Mullis und Faloonat (1987) in der Firma Cetus in USA entwickelt wurde. Das Prinzip dieser Methode besteht aus der zyklischen Wiederholung von 3 Schritten, in denen ein bestimmter Genabschnitt, welcher durch bekannte Primer begrenzt wird, in einer exponentiellen Funktion vervielfältigt wird: Denaturierung und Trennung der beiden komplementären DNA-Stränge durch Erhitzen auf 94°C, Anbindung (annealing) von zwei komplementären Startern = Primern (kurze DNA Sequenzen von ca. 20 Nukleotiden) bei ca 50-60°C und Synthese der entsprechenden komplementären DNA-Abschnitte vom 3'OH-Ende der Primer mit Hilfe der Taq-Polymerase (Beckmann) bei 72°C für je 2 min (1 Kb pro min) durch Einbau von dNTP's. Die Produkte dienen als Matrize für die nächste Amplifikation. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler von Biomed.

Reaktionsansatz:

10 µl PCR Puffer (mit MgCl₂ 1,5 mM)
1 µl BSA (Bovines Serum-Albumin)
1 µl d – NTP's (200 µMol)
1 µl Primer A (0,25 µMol)
1 µl Primer B
84,5 µl Aqua dest.
1 µl DNA (0,5 µg)
0,5 µl Taq – Polymerase (2,5 Einheiten)

Summe: 100 µl Endvolumen

Die Denaturierung zu Einzelsträngen erfolgte bei 92°C, die Anbindung bei 52°C und die Primer vermittelte Extension bei 70 °C jeweils für 2 min. Der Zyklus wurde 40-fach wiederholt. Für jeden folgenden Zyklus wurde die Primer Extension für 1 Sekunde verlängert.

Der Ansatz wird in sterile Eppendorftubes pipettiert und mit 3 Tropfen sterilem Mineralöl (Mineral oil white light NF) gegen das Verdampfen der Lösung pipettiert.

Die Größe der PCR-Produkte wurde im 2 % igen Agarose-Gel kontrolliert (Siehe 2.2.3.a).

3.2.4b Polyacrylamid Elektrophorese (PAA)

Mit Hilfe der PAA-Elektrophorese können wesentlich kleinere DNA-Fragmente als bei der Agarosegel-Elektrophorese von einander getrennt werden.

Das zuerst monomere Acrylamid wird durch die Anwesenheit von Ammoniumpersulfat und den Stabilisator TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) durch eine Kettenreaktion polymerisiert. Durch Zugabe von 1/30 N,N'-Methylenbisacrylamid entsteht ein Netz, welches als Lösung auf eine präparierte Glaskammer aufgetragen wird und bei Zimmertemperatur aushärtet. Wird Harnstoff dazugegeben, so wird die Basenpaarung unterdrückt, so dass Einzelstrang-DNA auf dem Gel betrachtet werden kann. Dies bezeichnet man als denaturierendes Gel. Ohne Hinzugabe von Harnstoff, d.h. im nichtdenaturierenden PAA-Gel, würde auf den Gelen eine Doppelstrang-DNA vorliegen.

In dieser Arbeit wurden für die Untersuchungen zum Verlust der Heterozygotie 8% denaturierende PAA-Gele für die Trennung von Einzelstrang-DNA (ssDNA) verwendet. Es wurden 2 geschliffene Glasplatten mit einer Größe von 21,5 cm x 20 cm benutzt, wobei die obere Glasplatte am oberen Rand eine Kerbung für den Einsatz eines Kammes enthält. Nach einer fettfreien Säuberung der Glasplatten wurde auf der unteren Platte ein Gelsupportfilm (21,3 cm x 21 cm, Firma Quiagen) mit seiner lipophilen Seite aufgedrückt. Auf der hydrophilen oberen Seite des Films schließen Teflonspacer die Ränder der Platte. Darüber wurde die zweite Glasplatte gelegt und festgespannt.

In einer Falcontube wurden 35 ml 8 %-16 % PAA mit 5-10% Urea mit 120 µl APS (Ammoniumpersulfat) und 50 µl TEMED gemischt und anschließend in die präparierte Glasplattenkammer gegossen. Das Gel mit den Glasplatten wurde in eine Elektrophoresekammer gespannt und mit 1x TBE-Puffer in vertikaler Position bei 600-800 V für ca. 30 min probegefahren. Je nach Marker wurde entweder 8% oder 16 % PAA mit 7% Urea benutzt: Für den Marker FLT und D17S855 wurden 12% PAA mit 7 M Urea verwendet, für den Marker D6 16% PAA mit 7 M Urea und für die Marker M39 und NC 8% PAA mit 7 M Urea.

Probenansatz:	4 µl PCR – Produkt
	8 µl Ladepuffer mit Formamid und Farbe
Standard:	0,5 µl Phi-X-DNA
	6,5 µl Ladepuffer mit Formamid und Farbe

Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und bis zum Einsetzen in das Gel in Eis gestellt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben im PAA-Gel erfolgte über 2-6 h bei 600-800 V. Anschließend wurden die aufgetrennten PCR-Produkt mit einer Silberfärbung des Gels, bei der Silbernitrat zu Silber reduziert wird, sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel mit einem Ethanol/Essigsäuregemisch für 20 min unter kräftigem Schütteln fixiert. In einer 0,1 % igen AgNO₃-Lsg wurde das Gel für 10 min inkubiert und der Überschuss später mit Aqua dest. ausgewaschen. Nach einer Inkubation in einer alkalischen Lösung mit 0,15% Formaldehyd für 30 min schlägt sich das Silber an der DNA nieder, so dass Banden sichtbar werden. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Waschen in einer 0,75% Na₂CO₃-Lsg. abgestoppt. Die Auswertung der LOH-Analyse erfolgte optisch. Eine Bandenabschwächung von mehr als 40% (densitometrisch orientiert) wurde als LOH eingestuft. Da die Tumproben nicht microdisseziert waren, lag eine hohe Konzentration von nicht mutierten Genen in Lymphozyten und Bindegewebe, so dass kein völliges Verschwinden der Bande bei Heterozygotieverlust vorlag.

3.5 Methoden zum Mutationsscreening

3.2.5a Single Strand Conformation Polymorphismus (SSCP)

Einzelsträngige DNA neigt zur Ausbildung komplexer Strukturen, die durch schwache intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert werden. Durch die DNA-Sequenz bedingte Konformationsunterschiede können als Veränderung in der elektrophoretischen Mobilität dargestellt werden. Zur Untersuchung von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen werden PCR-Produkte denaturiert und auf ein *nichtdenaturierendes* Polyacrylamidgel geladen. Mit Hilfe der SSCP Analyse können Unterschiede zwischen dem Wildtypmuster und Mutationen nachgewiesen werden.

Etwa 20 ng/µl PCR-Produkt wurden mit einem Formamid-haltigen Ladepuffer bei 95°C für 10 min denaturiert, auf Eis gelegt und anschließend in die Taschen eines 8%-12% Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 300 V für 3 h gefahren. Zum Nachweis der Banden erfolgte eine Silberfärbung (s. 2.2.4b).

3.2.5b Heteroduplex-Analyse

Die elektrophoretische Mobilität von Heteroduplexsträngen ist im Polyacrylamidgel geringer als die von Homoduplexsträngen, so dass sie als zusätzliche, langsamer wandernde Banden nachweisbar sind. Auf diesem Prinzip beruht die Heteroduplex-Analyse, die ebenso wie die SSCP-Methode Hinweise auf mögliche Mutationen in den zu untersuchenden PCR-Produkten gibt (Triggs und Gravel 1989). Etwa 7 µl (30 ng/µl) PCR-Produkt wurden zunächst bei 95°C für 5 min denaturiert und dann bei konstanter Temperatur von 68°C für 60 min inkubiert, so dass sich nach dem Zufallsprinzip komplementäre Einzelstränge zu Doppelsträngen verbinden. Diese Proben wurden in einem nichtdenaturierten 6%-12% PAA-Gel bei 300 V für 3-4 Stunden gefahren und anschließend in der beschriebenen Weise durch Silberfärbung sichtbar gemacht (s. 2.2.4b).

3.2.5c Allelspezifische Oligonucleotid (ASO) – Technik

Punktmutationen können durch allelspezifische Oligonucleotidsonden nachgewiesen werden. Eine Oligonucleotidsonde von 15 bis 20 Nucleotiden bildet mit einem zu untersuchenden PCR-Produkt nur dann einen Doppelstrang, wenn die komplementäre Basensequenz vollständig übereinstimmt. Liegt nur eine einzige Fehlpaarung vor, fällt der Heteroduplex auseinander, so dass die zu untersuchende Sequenz nicht als radioaktiv markiert nachweisbar ist.

Präparation von Oligonucleotiden

Die Primer und die allelspezifischen Oligonucleotide, die komplementär zu den normalen und zu den mutierten Allelen sind, wurden durch die β-Cyanoethylphosphoramid-chemische Methode unter Verwendung des DNA-Synthesizer des Applied Biosystems synthetisiert. Anschließend wurden die Oligonucleotide durch Chromatographie mit Hilfe von Nick Column oder NAP Column von Pharmacia gereinigt.

25 bis 50 ng großen ASO-Proben (ASO-Protokoll) wurden an ihrem 5'-Ende mit 100 µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP markiert und mit 1 µl (10 U) T4-Polynukleotid-Kinase (Boehringer Mannheim) und Kinasepuffer-Gemisch 30 min bei 37°C inkubiert.

Genotypisierung des Exons 2 (185delAG in Codon 23) und des Exons 20 (5382insC in Codon 1756) des BRCA1-Gens

1 µg genomische DNA wurde in der PCR zur Amplifikation der Exons 2 und 20 eingesetzt.

8 µl Oligonucleotide als Primer wurden mit 10 µl Reaktionsgemisch, bestehend aus 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 67,0 mM Tris-HCL, 6,7 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercapto-Ethanol, 200 µg/ml Rinder-Serum-Albumin) gemischt und mit 2 µl Desoxynukleotid-Triphosphate (entsprechend je 200 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP) sowie 1µl Taq Polymerase (2,5U) und 200µl H₂O hinzugefügt. Zuletzt wurde die Probe mit 35 µl Mineralöl abgedeckt.

Die Amplifikation des 135 Bp langen Fragmentes wurde in 40 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierungszeit betrug 2 min bei 93°C, die Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge erfolgte über 2 min bei 52°C, während für die Amplifikation des gesuchten DNA – Abschnittes 3 min bei 70°C angesetzt wurden. Dieser Schritt wurde nach jedem Zyklus um 2 Sekunden verlängert.

Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden nach der Polymerase-Kettenreaktion geelektrophoretisch in 2% Agarosegelen aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und bei UV-Licht betrachtet.

Hybridisierung und Autoradiographie

2µl des PCR-Produktes wurden auf eine Nylonmembran (Biodyne A Pall Membran) aufgetropft und für 2 min in einer Lösung aus 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl denaturiert. Anschließend wurde der Blot in 3 M Natriumacetat; pH 5,5 für 2 min neutralisiert und durch kurze UV Exposition für 3 min fixiert.

Nach Prähybridisierung in 2,5 % Denhardts-Lösung, Sodiumdodecylsulfat, 1 µg/ml Heringsperma-DNA bei 42°C wurde der Filter für 1 h bei 42°C in der gleichen Prähybridisierungslösung ohne Heringsperma-DNA und zusätzlich mit 10 x 10⁶ cpm/ml des ³²P-ATP am 5`Ende der ASO-Proben (12,5 bis 50 ng) inkubiert korrespondierend zur normalen (N) oder mutierten (M) Sequenz. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 42°C im Wasserbad.

Nach Waschen des Nylonfilters über 60 min in 2x SSC bei 55°C für Oligonukleotid A (normal) und 58°C für das Oligonukleotid B (mutiert) erfolgte die Autoradiographie. Dazu wurden die hybridisierten Membranen in einer Fotokassette zwischen 2 Verstärkerfolien

auf einen Film gelegt und zwischen 30 min und 30 h bei – 80°C gelagert, je nach Konzentration und Alter der markierten Oligonukleotide.

(N = für Exon 20: 5' – GAG AAT CCC AGG ACAG)

(M = für Exon 20: 5' – GAG AAT CCC CAG GAC AG)

(N = für Exon 2 : 5' – ATC TTA GAG TGT CCC AT)

(M = für Exon 2: 5' – ATC TTA GTG TCC CAT CT)

3.2.5d DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von Didesoxynucleotiden, d.h. von Nucleotidanaloga, die bei der Synthese der DNA für den Abbruch der Kettenverlängerung sorgen. Die zu sequenzierende PCR-DNA wird zunächst einzelsträngig gemacht, so dass die Primer sich anlagern können. Ausgehend von den Primern synthetisiert DNA-Polymerase in vier Parallelreaktionen mit den jeweiligen Didesoxynucleotiden neue DNA-Stränge. Jedes der vier verschiedenen Didesoxynucleotide ist mit einem unterschiedlichen Farbstoff markiert, der vom Counter dann abgelesen wird. Die Sequenzierung der Tumorproben wurden im Applied Biosystem DNA-Sequencer Modell 373 A durchgeführt.

Reinigen der PCR-Produkte mit der Quiagen-Säule:

15 µl des zu sequenzierenden PCR-Produktes wurden mit 75 µl PB-Puffer auf die Quiagen-Säule aufgetragen und für 1 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 750 µl PE-Puffer der Firma Quiagen auf die Säule wurde erneut für eine halbe Minute zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Filtrates und dem anschließendem trockenen Zentrifugieren wurde die Säule mit dem gereinigten PCR-Produkt in ein 1,5 ml Tube transferiert und dieses mit 20µl Elutionspuffer (TE 0,1 mM, pH 8,0) heraus gelöst.

PCR

Es wurde ein Kit der Firma Applied Biosystems (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reacting Kit) mit Ampli Taq-Polymerase, FS benutzt. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Gesamtansatz von 20 µl: 8 µl Terminator Ready Reaction Mix, 2 µl PCR Produkt (30 ng/µl), 2 pmol Primer und Aqua dest.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem GeneAmp System 2400 unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1) 3 min bei 96°C 2) 30 sec bei 96°C 3) 5 sec bei 50°C 4) 4 sec bei 60°C. Schritt 2-4 wurde 25-fach wiederholt.

Ethanol-Präzipitation und Sequenzierung der Produkte:

Die Sequenzierungsprodukte wurden durch Ethanolpräzipitation von überschüssigen Terminatoren und Primern gereinigt. In eine 1,5 ml Mikrozentrifugentube wurde 2,0 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,6, 50 µl 95% Ethanol und des 20 µl des PCR-Produktes pipettiert, danach gut geschüttelt und für 10 min auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Proben für 15 bis 30 min in der Eppendorffzentrifuge auf höchster Stufe (13.000 rpm) zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet luftgetrocknet. Das getrocknete PCR-Produkt wurde mit 20 µl Template mixture (Applied Biosystems) aufgenommen. Die gelösten Proben wurden für 2 min auf 90°C erhitzt, danach auf Eis gestellt und anschließend auf den Applied Biosystems 377 geladen.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der LOH-Analysen in Korrelation zu klinisch-pathologischen Prognoseparametern erfolgte im Institut für Biomathematik bei Herrn Prof. Dr. med. Berger mit dem SPSS 6,0 für Windows-Programm.

Statistische Signifikanz liegt dann vor, wenn die P-Werte $< 0,05$ sind (Sachs 1992). Aufgrund des sehr kleinen Stichprobenumfangs ist der exakte Test von R. A. Fisher auf Unabhängigkeit zweiseitig errechnet worden.

4. ERGEBNISSE

4.1 UNTERSUCHUNGEN VON LOH UND ANDEREN GENETISCHEN VERÄNDERUNGEN BEI SPORADISCHEN MAMMA- UND KOLONKARZINOMEN UND KORRELATION MIT HISTOPATHOLOGISCHEN PROGNOSEFAKTOREN

4.1.1 Untersuchungen mittels Mikrosatellitenmarkern

DNA aus Gewebeproben sporadischer Mammakarzinome von 44 nicht miteinander verwandten Patientinnen und von 10 Kolonkarzinomen wurde im Vergleich zu DNA aus dem peripheren Blut der Patienten an 6 Loci in den Regionen 13q13, 17q12-21 und 19q13 in Hinblick auf Verlust der Heterozygotie und anderer genetischer Veränderungen untersucht.

4.1.1a Mammakarzinome

Ein Verlust der Heterozygotie zeigt sich auf den Gelen durch einen Bandenverlust oder eine Abschwächung der Bandenintensität. Weitere genetische Alterationen wie Insertionen, Mutationen oder Translokationen stellen sich als zusätzliche Bande oder als eine Bandenverschiebung dar.

Für den Marker D19S178 auf dem Chromosom 19q13 zeigten 84% der Patienten eine konstitutive Heterozygotie. 11% der Mammakarzinome der heterozygoten Patientinnen zeigten einen Verlust der Heterozygotie. Bei 11% der Mammakarzinome lagen andere genetische Alterationen vor (Tabelle 1).

Tabelle 1: Genetische Alterationen bei Mammakarzinomen

Chromosomale Region	Marker	Anzahl Tumore	Heterozygotie (%)	LOH (%)	Andere Änderungen gesamt (%)
19q13	D19S178	44	37 (84)	4 (11)	4 (11)
	CEA	44	44 (100)	6 (14)	9 (20)
13q13	FLT1	44	44 (100)	8 (18)	9 (21)
17q13-21	RNU2	44	44 (100)	0 (0)	0 (0)
	D17S588	44	44 (100)	7 (16)	2 (5)
	(42D6) D17S855	44	44 (100)	10 (23)	12 (27)

Für den Marker CEA wurden 14% LOH und weitere 20% genetische Alterationen gefunden.

Der Marker FLT1 auf dem Chromosom 13q13 zeigte beim gleichen Patientenkollektiv 18% Heterozygotieverlust und 21% andere Änderungen.

Im Chromosom 17q13-21 zeigte der Dinucleotidrepeatmarker D17S588 16% LOH und 5% andere Änderungen. Der Dinucleotidrepeatmarker D17S855 erbrachte 23% LOH und 27% genetische Alterationen. Der Marker RNU2 zeigte weder LOH noch weitere Änderungen. Die höchste LOH-Rate zeigte der Marker D17S855, der innerhalb des BRCA1-Gens liegt, mit 23%.

Abb.3.1: PCR- Produkte des Markers D19S178 von Blut- und Tumor-DNA in einem 2% Agarosegel . Spur 8: Größenmarker Phi-X 174 DNA geschnitten mit HaeIII.

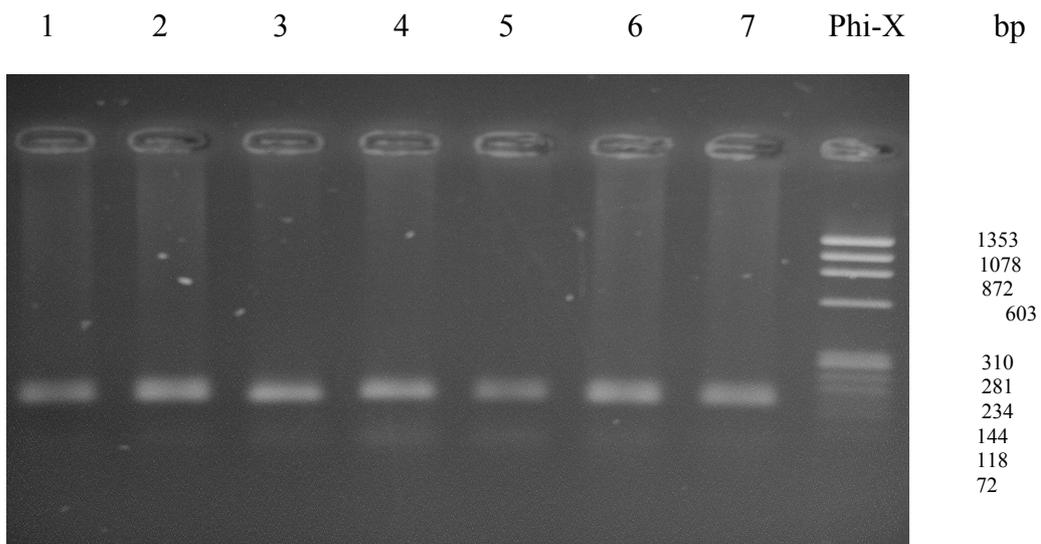


Abb. 3.2: Paarweiser Vergleich der Blut(B) und Tumor(T) DNA bezüglich Mikrosatelliten

Abb.3.2a: Nachweis von LOH für den Mikrosatellitenmarker D19S178 in einem 8% Polyacrylamidgel.

Die Tumor-DNA Nr. 182 und 183 zeigen einen Heterozygotieverlust.
 Spur 6 (Tumor-DNA Nr. 182): Bandenabschwächung im unteren PCR-Produkt
 Spur 8 (Tumor-DNA Nr. 183): Deutlicher Bandenverlust des oberen PCR-Produktes.

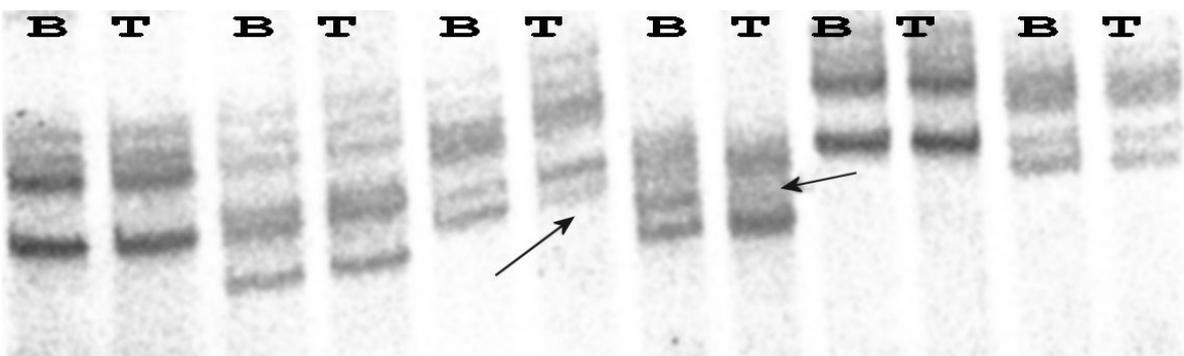


Abb. 3.2b: Nachweis von LOH für den Mikrosatellitenmarker D17S588 in einem 8% Polyacrylamidgel. Die Tumor-DNA zeigt einen Heterozygotieverlust.

Spur 4 Bandenabschwächung im oberen PCR-Produkt.

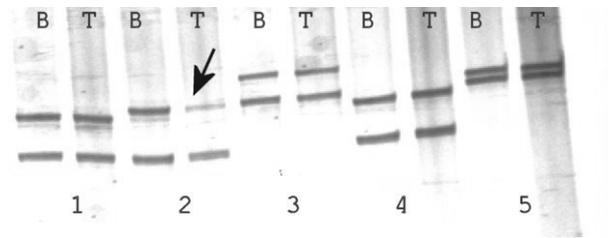


Abb. 3.2c: Nachweis von LOH für den Mikrosatellitenmarker D17S855 in einem 8% Polyacrylamidgel. Spur 2 zeigt Bandenabschwächung im unteren Allel.

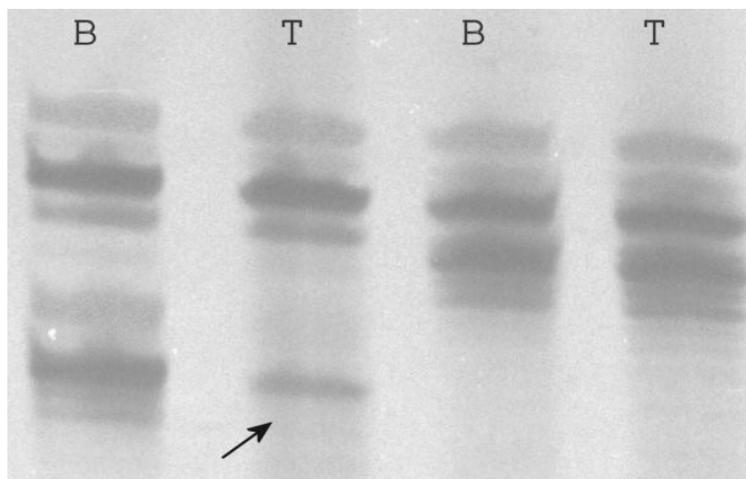
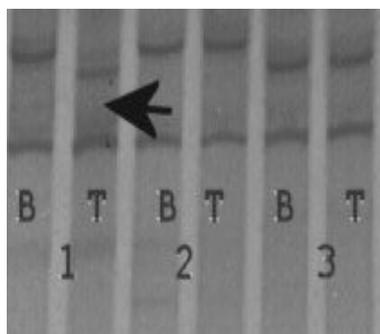
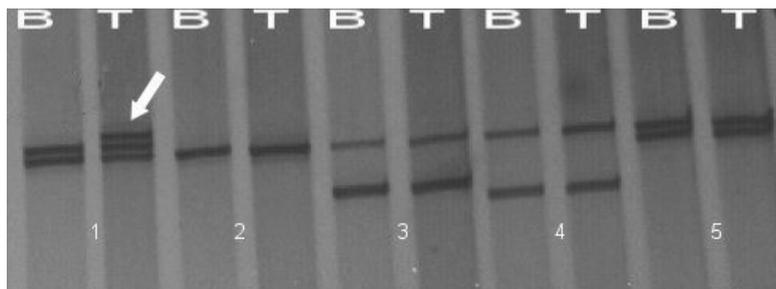


Abb 3.2d: Beispiele für andere Änderungen in PCR Produkte; Paarweiser Vergleich von der Blut und Tumor DNA bezüglich der Marker A: D17S855, B: FLT1, C und D: D17S588. Die veränderten Fragmente sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

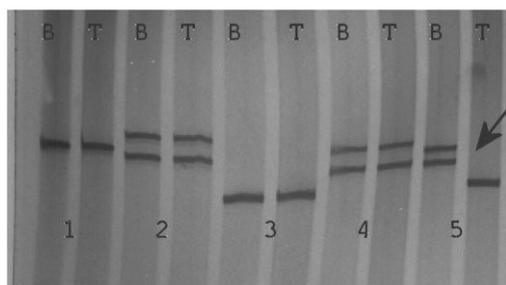
A



B



C



D

4.1.1b Kolonkarzinome

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, zeigen bei den hier untersuchten Kolonkarzinomen nur der Marker D19S178 auf Chromosom 19q13 und der Marker D17S855 auf Chromosom 17q13 jeweils einen LOH. Mit Hilfe der Marker D17S855 und D17S588 wurden andere genetische Alterationen entdeckt.

Tabelle 2: Genetische Alterationen bei kolorektalen Karzinomen

Chromosomale Region	Marker	Gesamt Anzahl	Heterozygotie (%)	LOH (%)	Andere Änderungen (%)
19q13	D19S178	10	9 (90)	1 (11)	0 (0)
	CEA	10	10 (100)	0 (0)	0 (0)
13q13	FLT1	10	10 (100)	0 (0)	0 (0)
17q13-21	RNU2	10	10 (100)	0 (0)	0 (0)
	D17S588	10	10 (100)	0 (0)	3 (30)
	D17S855	10	10 (100)	1 (11)	1 (11)

4.1.2 Untersuchung von RFLPs mit BGP-spezifischen Sonden

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war, für das BGP Gen einen Heterozygotieverlust nachzuweisen, um so einen Hinweis auf eine mögliche Tumorsuppressorfunktion des Gens zu erhalten. Da jedoch bisher kein Polymorphismus für das BGP Gen beschrieben ist, sollte zunächst ein häufiger Polymorphismus dieses Gens gefunden werden, um diesen anschließend für LOH-Analysen einzusetzen.

Drei klonierte genomische BGP-spezifische Sonden (BGP, 5'-BGP, BGP-utr) wurden für RFLP-Analysen von 13 DNA-Proben nichtverwandter Europäer eingesetzt, die mit 10 verschiedenen Restriktionsenzymen (Pst I, Sal I, BamH I, Rsa I, Pvu II, Dde I, Hpa II, Hind III, Hae III, Mbo I) geschnitten wurden. Trotz intensiver Arbeiten ergaben sich keine auswertbaren Hybridisierungen. Die Ursache hierfür scheint in den benutzten Sonden zu liegen. In der Annahme, dass sie möglicherweise sehr viele repetitive Sequenzen beinhalten könnten, wurde zur Hybridisierungslösung zusätzlich Cot-DNA gegeben, um die Repeat-Sequenzen auf dem jeweiligen Blot zu unterdrücken. Dies führte jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. Aus diesem Grund konnten die LOH-Analysen für den BGP-Locus nicht erfolgreich durchgeführt werden.

4.1.3 Korrelation genetischer Veränderungen von Tumorzellen mit histopathologischen Prognosefaktoren

Die dokumentierten molekularbiologischen Alterationen wurden mit folgenden histopathologischen Prognoseparametern mit dem Exakten Test nach Fisher auf Unabhängigkeit getestet:

- a) Bei Mammakarzinomen: Nodalstatus, Grading, Progesteronrezeptorstatus und Östrogenrezeptorstatus
- b) Bei Kolonkarzinomen: Nodalstatus, Grading und Lokalisation des Tumors

4.1.3a Mammakarzinome

Tabelle 3: Anzahl der Tumoren mit genetischen Alterationen aufgeschlüsselt entsprechend histopathologischen Prognoseparametern

Locus	TUMORE MIT ALLEN GENET. ÄNDERUNGEN (INCL. LOH)(%)					TUMORE OHNE ÄNDERUNGEN (%)				
	Chr19q	Chr19q	Chr17q	Chr17q	Chr13q	Chr19q	Chr19q	Chr17q	Chr17q	Chr13
Marker	D19S178	CEA	D17S588	D17S855	FLT1	D19S178	CEA	D17S588	D17S855	FLT1
Nodal	8 (28)	11(40)	8 (28)	17 (59)	8 (28)	21 (72)	18 (60)	21 (72)	12 (41)	21(72)
positiv										
Nodal	1 (7)	4 (27)	1 (7)	5 (33)	9 (60)	14(93)	11(73)	14 (93)	10 (67)	6 (40)
negativ										
Grad 1	1 (17)	1 (20)	0 (0)	2 (29)	1 (14)	5 (83)	4 (80)	6(100)	5 (71)	6 (86)
Grad 2	4 (31)	6 (30)	3 (17)	8 (44)	4 (27)	9 (69)	14 (70)	15 (83)	10 (56)	11(73)
Grad 3	4 (22)	8 (42)	6 (30)	12(63)	8 (36)	14 (78)	11 (58)	14 (70)	7 (37)	14(64)
ER	8 (30)	12 (36)	6 (18)	14 (42)	10 (31)	19 (70)	21 (64)	27 (82)	19 (58)	22(69)
positiv										
ER	1 (10)	3 (27)	3 (27)	8 (73)	4 (33)	9 (90)	8 (73)	8 (73)	3 (27)	8(67)
negativ										
PR	7 (30)	9 (33)	7 (25)	15 (54)	11 (39)	16 (70)	18 (67)	21 (75)	13 (46)	17(61)
positiv										
PR	2 (14)	5 (29)	4 (25)	7 (44)	3 (19)	12 (86)	12 (71)	12 (75)	9 (56)	13(81)
negativ										

Tabelle 4: Korrelation der Anzahl von Tumoren mit genetischen Änderungen mit histopathologischen Prognosekriterien bei Mammatumoren

Tabelle 4.1) Nodalstatus

Marker	Nodalstatus	Anzahl der untersuchten Tumore	Tumore mit genetischen Änderungen(%)	Tumore ohne genetische Änderungen(%)
Marker D19S178	nodal-positiv	29	8 (28%)	21 (72%)
	nodal-negativ	15	1 (7%)	14 (93%)
P=0,3349				
Marker CEA	nodal-positiv	29	11 (40%)	18 (60%)
	nodal-negativ	15	4 (27%)	11 (73%)
P=0,84				
Marker RNU2	Alle Proben waren nodal-negativ			
Marker D17S588	nodal-positiv	29	8 (28%)	21 (72%)
	nodal-negativ	15	1 (7%)	14 (93%)
P= 0,335				
Marker D17S855	nodal-positiv	29	17 (59%)	12 (41%)
	nodal-negativ	15	5 (33%)	10 (67%)
P= 0,513				
Marker FLT1	nodal-positiv	29	8 (28%)	21 (72%)
	nodal-negativ	15	9 (60%)	6 (40%)
P= 0,773				

Tab. 4.2) Grading

Marker	Grading	Anzahl der untersuchten Tumore	Tumore mit genetischen Änderungen(%)	Tumore ohne genetische Änderungen(%)
D19S178	Grad 1	6	1 (17%)	5 (83%)

	Grad 2	13	4 (31%)	9 (69%)
	Grad 3	18	4 (22%)	14 (78%)
P= 0,882				
CEA	Grad 1	5	1 (20%)	4 (80%)
	Grad 2	20	6 (30%)	14 (70%)
	Grad 3	19	8 (42%)	11 (58%)
P= 0,664				
D17S588	Grad 1	6	0 (0%)	6 (100%)
	Grad 2	18	3 (17%)	15 (83%)
	Grad 3	20	6 (30%)	14 (70%)
P= 0,301				
D17S855	Grad 1	7	2 (29%)	5 (71%)
	Grad 2	18	8 (44%)	10 (56%)
	Grad 3	19	12 (63%)	7 (37%)
P= 0,260				
FLT1	Grad 1	7	1 (14%)	6 (86%)
	Grad 2	15	4 (27%)	11 (73%)
	Grad 3	22	8 (36%)	14 (64%)
P= 0,403				

Tab. 4.3) Progesteron-Rezeptorstatus

Marker	Progesteron-rezeptorstatus	Anzahl der untersuchten Tumore	Tumore mit gesamten genetischen Änderungen (%)	Tumore ohne genetische Änderungen (%)
Marker D19S178	positiv	23	7 (30%)	16 (70%)
	negativ	14	2 (14%)	12 (71%)
P= 1				
Marker CEA	positiv	27	9 (33%)	18 (67%)
	negativ	17	5 (29%)	12 (71%)
P= 1				
Marker D17S588	positiv	28	7 (25%)	21 (75%)
	negativ	16	4 (25%)	12 (75%)
P= 1				

Marker D17S855	positiv	28	15 (54%)	13 (46%)
	negativ	16	7 (44%)	9 (56%)
P= 0,935				
Marker FLT1	positiv	28	11 (39%)	17 (61%)
	negativ	16	3 (19%)	13 (81%)
P= 1				

Tab. 4.4) Östrogenrezeptorstatus

Marker	Östrogerezeptor -status	Anzahl der untersuchten Tumore	Tumore mit gesamten genetischen Änderungen (%)	Tumore ohne genetische Änderungen (%)
D19S178	positiv	27	8 (30%)	19 (70%)
	negativ	10	1 (10%)	9 (90%)
P= 0,598				
Marker CEA	positiv	33	12 (36%)	21 (64%)
	negativ	11	3 (27%)	8 (73%)
P= 0,992				
Marker D17S588	positiv	33	6 (18%)	27 (82%)
	negativ	11	3 (27%)	8 (73%)
P= 0,884				
Marker D17S855	positiv	33	14 (42%)	19 (58%)
	negativ	11	8 (73%)	3 (27%)

P= 0,497				
Marker FLT1	positiv	32	10 (31%)	22 (69%)
	negativ	12	4 (33%)	8 (67%)
P= 0,277				

Bezüglich des Nodalstatus der Mammakarzinome konnte keine statistisch signifikante Korrelation zu genetischen Alterationen festgestellt werden.

Hinsichtlich des histologischen Grades fiel auf, dass je undifferenzierter die Mammakarzinome sind, desto höher der Anteil von genetischen Änderungen ist. Jedoch ergibt sich bei der statistischen Auswertung mit dem Fisher-Test keine Assoziation. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das Patientenkollektiv zu klein ist.

In Bezug auf den Rezeptorstatus lässt sich sowohl für den Östrogen- als auch für den Progesteronrezeptor keine statistisch signifikante Korrelation zwischen genetischen Alterationen und diesen histopathologischen Parametern nachweisen.

4.1.3b Kolonkarzinome

Tab. 5) Korrelation der Anzahl von Tumoren mit genetischen Alterationen zu histopathologischen Prognosekriterien bei Kolontumoren

Vergleiche der Kolontumoren bezogen auf dem Nodalstatus, zeigten bei den nodal-negativen Patienten im Vergleich zu den nodal-positiven ein vermehrtes Vorkommen genetischer Änderungen, wobei diese Korrelation jedoch nicht statistisch signifikant war (Tabelle 5.1). Bei allen Kolontumoren war der histologische Grad II festgestellt worden, so dass hier kein Vergleich möglich war (Tabelle5.2). Auch zwischen der Häufigkeit von genetischen Alterationen und der Tumorlokalisation ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation (Tabelle 5.3), wegen der geringen Anzahl von Proben.

Tab. 5.1) Nodalstatus

Marker	Nodalstatus	Anzahl der untersuchten Tumore	Tumore mit genetischen Änderungen (%)	Tumore ohne genetische Änderungen (%)
Marker D19S178	nodal-positiv	3	0 (0%)	3 (100%)
	nodal-negativ	6	1 (17%)	5 (83%)
P= 1				
Marker CEA	nodal-positiv	4	0 (0%)	4 (100%)
	nodal-negativ	6	0 (0%)	6 (100%)
P=1				
Marker D17S588	nodal-positiv	4	1 (25%)	3 (75%)

	nodal-negativ	6	2 (33%)	4 (67%)
P= 1				
Marker D17S855	nodal-positiv	4	1 (25%)	3 (75%)
	nodal-negativ	6	1 (17%)	5 (83%)
P=1				
Marker RNU2	Nodal-positiv	4	0 (0%)	4 (100%)
	nodal-negativ	6	0 (0%)	6 (100%)
P=1				
Marker FLT1	Nodal-positiv	4	1 (25%)	3 (75%)
	nodal-negativ	6	1 (17%)	5 (83%)
P= 1				

Tabelle 5.2) Grading

Alle untersuchten Tumore hatten einen Differenzierungsgrad von II.

Grad	Anzahl der Tumore	Genetische Alterationen (%)			Keine Änderungen (%)		
		Chr. 19q	Chr. 17q	Chr. 13q	Chr. 19q	Chr. 17q	Chr. 13q
Grad II	10	1 (10)	4 (40)	1 (10)	9 (90)	6 (60)	9 (90)

Tabelle 5.3) Lokalisation der Kolonkarzinome

Marker	Tumore mit genetischer Änderungen					Tumore ohne genetischer Änderungen				
	D19S178	CEA	D17S588	D17S855	FLT1	D19S178	CEA	D17S588	D17S 855	FLT1
Coecum	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
Colon asc.	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Sigmoid	0	0	1	0	1	3	3	2	3	2
Rectum	1	0	1	1	0	2	3	2	2	3
nicht beschrieben	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1

4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON MUTATIONEN IM BRCA1-GEN BEI SPORADISCHEN MAMMAKARZINOMEN

Mit Hilfe der SSCP- und Heteroduplex-Technik wurden 44 DNA Proben aus sporadischen Mammakarzinomen zum Nachweis von Mutationen in drei bei erblichen Tumoren häufig alterierten Exons des BRCA1 Gens untersucht.

4.2.1 SSCP-Analyse von Exon 2, 5 und 20 des BRCA1 Gens

Da in einigen Literaturstellen (Hayashi 1991, Dean et al.1991, Hayashi und Yandell 1993) angegeben wird, dass bei der SSCP-Technik die Umgebungstemperatur (Raumtemperatur oder 4°C) den Bandenlauf verändert, wurden in dieser Arbeit die ersten 20 Proben parallel bei 4°C, Raumtemperatur und Raumtemperatur mit Einsatz eines Ventilators untersucht. Es fand sich kein Unterschied im Bandenverlauf. Die weiteren Gele wurden daher alle bei Raumtemperatur mit Einsatz eines Ventilators gefahren.

Tabelle 6: SSCP-Analyse von 3 Exons des BRCA-1 Gens

Exon	Anzahl der untersuchten Tumore	Anzahl der auffälligen Proben (%)
2	44	3 (7%)
5	44	1 (2%)
20	44	0 (0%)

In dem vorliegenden Patientenkollektiv konnten für PCR-Produkte des Exon 2 bei 3 Tumor-DNA Proben ein gegenüber der Blut-DNA veränderter Bandenlauf dargestellt werden, dagegen zeigte das Exon 5 nur in einer Probe eine veränderten Bandenlauf. Das Exon 20 zeigte in keinem Fall ein verändertes Bandenmuster. Für weitere Analysen wurden die auffälligen PCR-Produkte direkt sequenziert.

Abb. 3.3: Darstellung eines 2% igen Agarose-Gels mit PCR-Produkte von BRCA1 Exons 2, 5 und 20 . Der Marker ist die PhiX DNA, gespalten mit Hae III Resriktionsenzym.

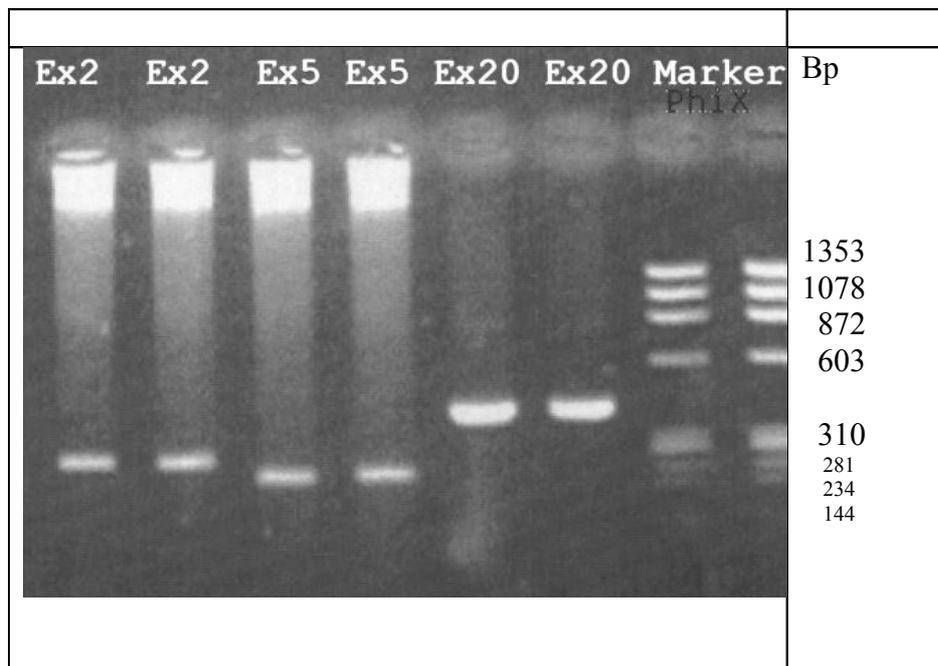


Abb.3.3.a Darstellung eines 8% igen SSCP-Gels mit paarweise aufgetragenen PCR-Produkten des Exons 2 von Blut- und Tumor-DNA (Silberfärbung). Die PCR-Produkte der Tumor- DNA mit dem Pfeil sind auffällig.

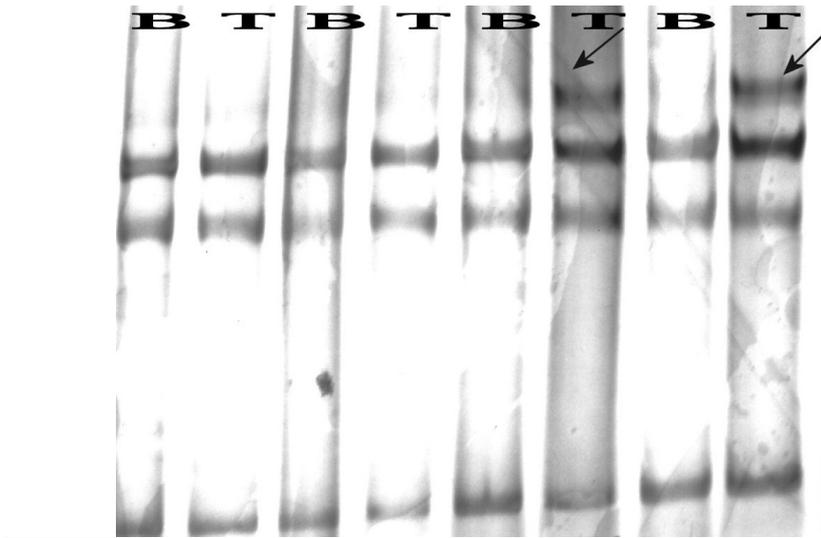
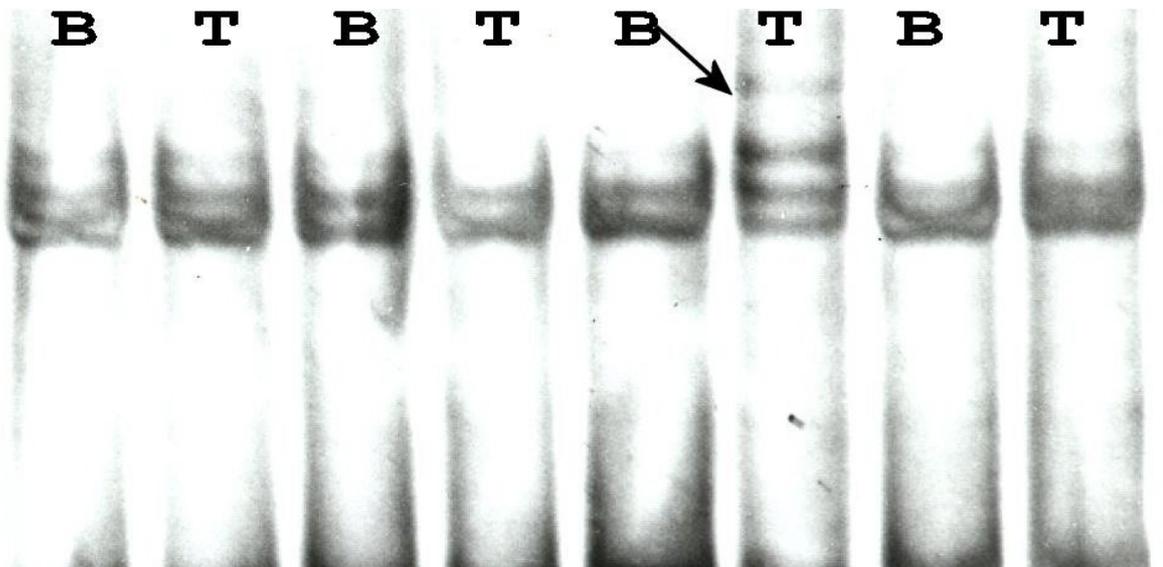


Abb. 3.3b: Darstellung eines 8% igen SSCP-Gels mit paarweise aufgetragenen PCR-Produkten des Exons 5 von Blut- und Tumor-DNA (Silberfärbung). Das PCR-Produkt einer der Tumor- DNA ist auffällig.



4.2.2 Heteroduplex-Analyse von Exon 2, 5 und 20 des BRCA1 Gens

Aus Tab. 7 ist ersichtlich, dass ein verändertes Laufverhalten in der Heteroduplex-Analyse weder für PCR-Produkte der Exons 2 und 5 noch des Exon 20 nachweisbar war. Von 44 untersuchten DNA- Fragmenten wies keine Tumor-DNA Probe ein abweichendes Laufverhalten im Sinne eines Heteroduplex auf.

Tabelle 7 : Heteroduplex-Analyse von 3 Exons des BRCA1 Gens

Exon	Anzahl der untersuchten Tumore	Anzahl der auffälligen Proben (%)
2	44	0 (0%)
5	44	0 (0%)
20	44	0 (0%)

4.2.3 Sequenzierung

Vier Proben, die in der SSCP-Technik auffällig waren, wurden sequenziert. Für keine der im Screening auffälligen Proben konnte durch direkte Sequenzierung eine Mutation nachgewiesen werden.

Abb. 3.4: Bild einer direkten Sequenzierung der PCR-Produkte des Exon 2 von der Probe Nr. 150. Es zeigt keine abweichende Basenabfolge von Exon 2.

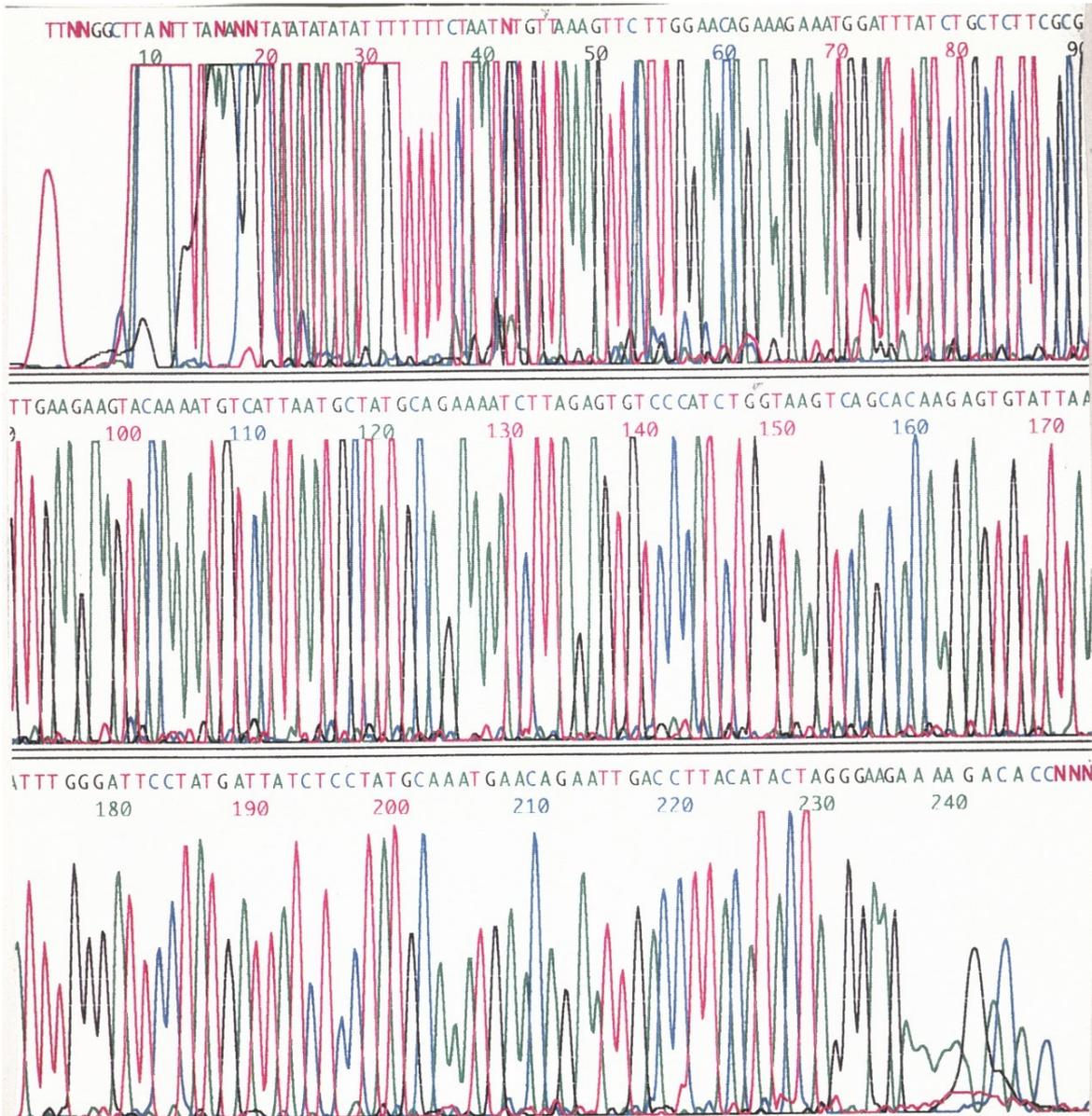
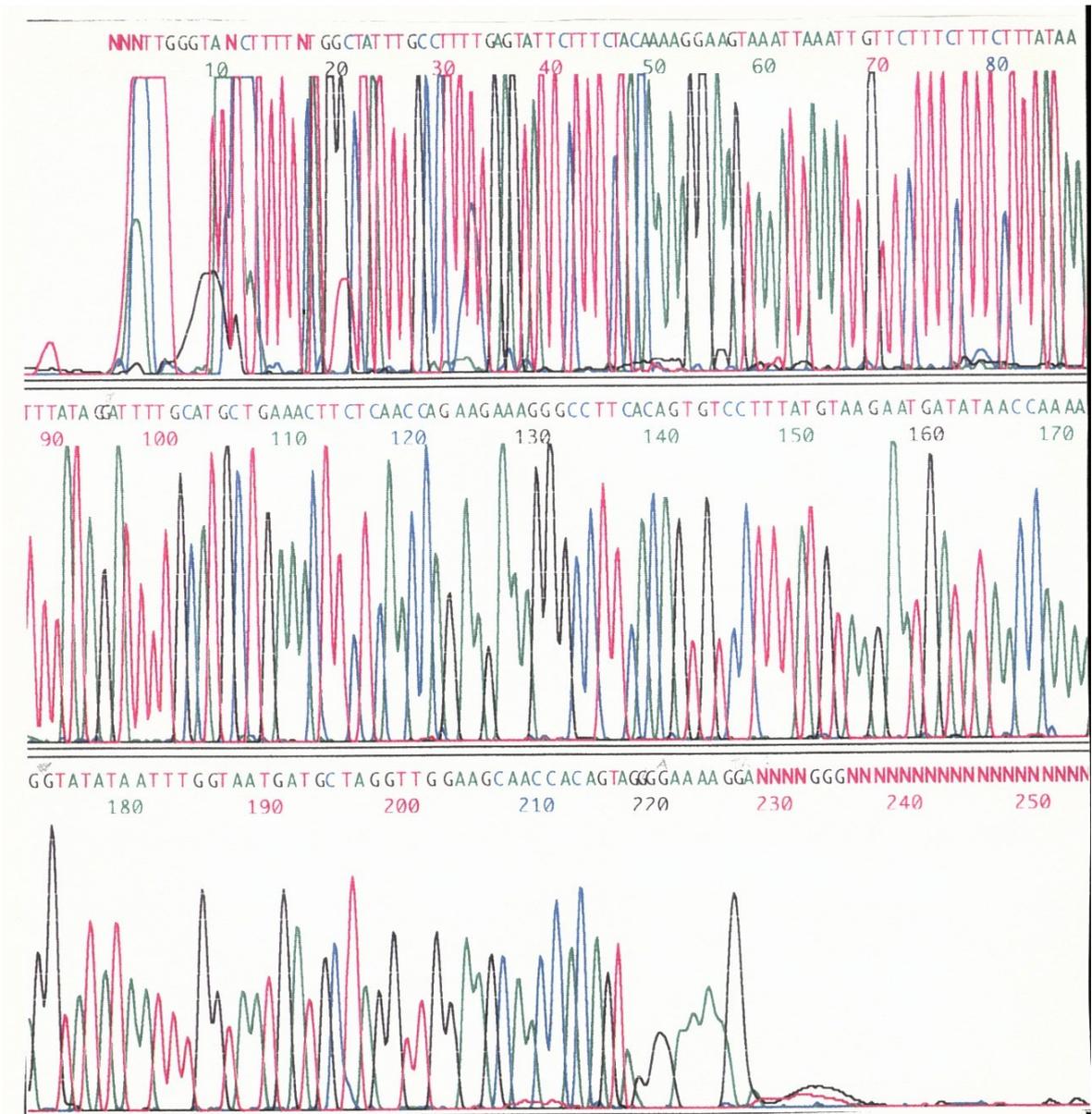


Abb. 3.5: Bild einer direkten Sequenzierung der PCR-Produkte des Exons 5 für die DNA – Nr. 189. Es zeigt eine normale Basenabfolge des Exon 5.



4.3 UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON BEKANNTEN MUTATIONEN IM BRCA1-GEN BEI SPORADISCHEN MAMMA- UND KOLONKARZINOMEN

4.3.1 Analysen mit der ASO – Technik

Mit Hilfe der ASO-Technik wurden alle 44 Mammakarzinome und 10 Kolonkarzinome auf 2 spezifische, bei erblichen Mammakarzinomen häufig auftretende Mutationen (AG Deletion im Codon 23 für Exon 2 und Insertion C im Codon 1756 für Exon 20) untersucht. Es wurde aber keine genetische Veränderung festgestellt.

Abb. 3.6: Hybridisierung von Dot-blot Filtern der PCR-Produkte des Exons 2 von 20 Patientinnen mit der Oligonucleotidsonden für die Wildtyp Sequenz und 185del-AG Mutation von Exon 2 im BRCA 1 Gen.

Abb. 3.6a: Hybridisierung mit Oligosonde für Wildtyp Sequenz.

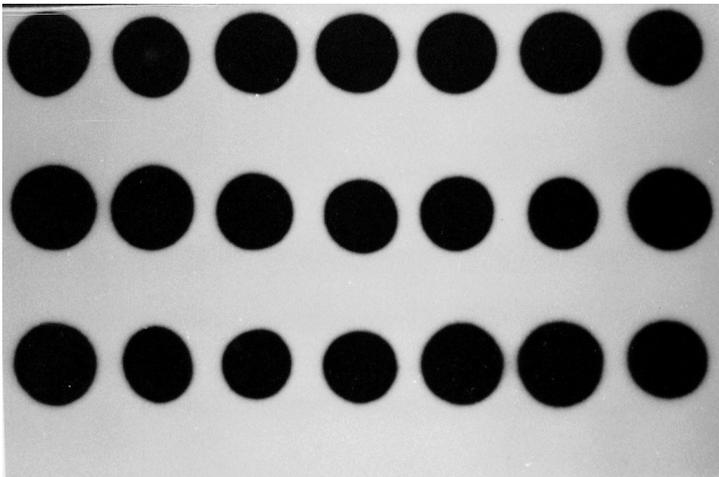
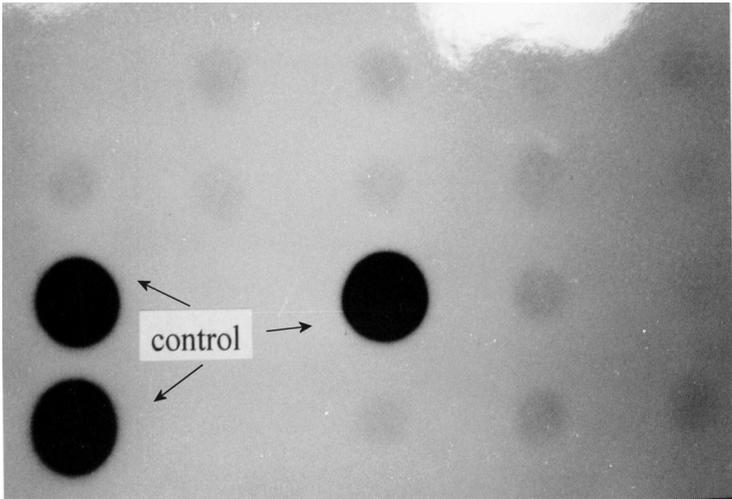


Abb. 3.6b: Hybridisierung von Dot-blot Filter der PCR-Produkte des Exons 2 von 17 Patientinnen mit der Oligosonde für 185delAG Mutation.

Die Kontrolle (Control) ist das PCR Produkt von DNA einer Patientin mit 185delAG Mutation.



5 DISKUSSION

5.1 UNTERSUCHUNGEN ZUM VERLUST DER HETEROZYGOTIE UND KORRELATION MIT HISTOPATHOLOGISCHEN PROGNOSEFAKTOREN

Mutationen in Tumorsuppressorgenen sind im allgemeinen rezessiv. Das bedeutet, dass das Vorhandensein eines Wildtyp-Allels ausreichend ist, um die normale Funktion des Gens aufrecht zu erhalten (Levine et al. 1993). Erst ein mutagenes Ereignis im zweiten Allel desselben Gens, z.B. Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH), führt dann zum Verlust der Tumorsuppressorfunktion.

Eine Vielzahl von Heterozygotieverlusten in bestimmten Genloci wurde inzwischen in Tumorzellen verschiedener Herkunft gefunden und teilweise molekularbiologisch charakterisiert. Sie werden als ein deutlicher Hinweis auf die Existenz von Tumorsuppressorgenen gewertet. In der vorliegenden Arbeit wurden LOH-Analysen durchgeführt, um mutmaßliche Lokalisationen von Tumorsuppressorgenen auf drei Chromosomen nachzuweisen, die Häufigkeit ihres Vorkommens mit histopathologischen Prognosefaktoren zu korrelieren und somit ihre Bedeutung als mögliche molekulare Prognosefaktoren abzuschätzen.

5.1.1 Chromosom 17q13-21

Die Arbeitsgruppe von Cropp et al. (1993) hat bei sporadischen Mammatumoren LOH-Analysen mit 18 polymorphen Markern für das Chromosom 17 durchgeführt. In 3 unabhängigen Regionen (1. Region zwischen D17S73 und NME1; 2. Die zentrale Region zwischen den Markern D17S86 und D17S21 und 3. Die Region zwischen den Markern D17S20 und D17S77) wurden gehäuft Heterozygotieverluste gefunden: 37% LOH mit dem Marker D17S73, 45% mit NME1, 20% mit D17S86 und 35% mit D17S21. LOH-Raten von 7% ergab der Marker D17S20 und 37% der Marker D17S77. Yamashita et al (1996) fanden wenig LOH in dieser Region in sporadischen Mammakarzinomen bei den Japanerinnen.

In meiner Arbeit konnte ich bei den 44 untersuchten Mammatumoren auf dem Chromosom 17q 16% Heterozygotie-Verluste mit dem Marker D17S588 sowie 23% LOH mit dem Marker D17S855 nachweisen. Bei 10 Kolontumoren wurde für den Markerlocus D17S855 nur in einer Probe ein Heterozygotieverlust beobachtet. Der Marker RNU2 zeigte weder in den Mammakarzinomen noch in Kolonkarzinomen genetische Alterationen.

Die Raten der Heterozygotieverluste und anderer genetischer Änderungen, wie Insertionen, Deletionen, Translokationen, zeigten in dem vom mir untersuchten Patientengut keine statistisch signifikante Korrelation zu histopathologischen Prognosekriterien wie Östrogenrezeptorstatus, Progesteronrezeptorstatus, Nodalstatus und histopathologischem Grading.

In der Literatur wurden recht unterschiedliche Ergebnisse zur Korrelation von LOH Analysen zu histopathologischen Prognosefaktoren beschrieben. Bedingt durch die relativ aufwendige Methodik ist das untersuchte Patientengut zumeist sehr klein, so dass der statistischen Auswertung Grenzen gesetzt sind. In der Arbeit von Rita K. Schmutzler et al. (1995), die ein Patientenkollektiv von 47 Mammakarzinompatientinnen untersuchte, fielen die LOH-Analysen ähnlich aus wie in der vorliegenden Arbeit. So fand sie beispielsweise in der Region von D17S855 einen Heterozygotieverlust von 22%, der statistisch signifikant mit dem positiven Nodalstatus korrelierte ($p=0,0039$). Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass sich in dem von mir untersuchten Kollektiv weniger nodalpositive Patientinnen befanden (66 %) als in dem Patientengut (84%) von Schmutzler et al. (1995).

Ein weit größeres Patientenkollektiv untersuchte Callahan et al. (1993) in einer Studie mit 160 sporadischen Mammakarzinomen, bei der die LOH-Raten auf dem Chromosom 17q bei 32% lagen. Diese Verlustrate korrelierte statistisch signifikant mit dem negativen Östrogenrezeptorstatus ($p<0,02$). Weder in der Arbeit von Schmutzler et al. (1995) noch in dem von mir untersuchten Patientengut konnte eine solche Korrelation nachgewiesen werden möglicherweise auf Grund der niedrigeren Patientenanzahl oder des Einsatzes anderer Marker.

Beckmann et al. (1996) und Niederacher et al. (1997) untersuchten mit verschiedenen BRCA1- und BRCA2 Markern, so auch D17S855, sporadische und familiäre Brustkarzinome auf LOH. Dabei stellten sie fest, dass Verluste der Heterozygotie in Brustkarzinomen, nachgewiesen mit BRCA1 Markern, signifikant korrelierten mit der Tumorgröße (bei D17S855 $p=0,023$), mit dem höheren histopathologischen Grad (bei D17S855 $p=0,0036$); jedoch nicht mit dem Lymphknotenstatus und dem Alter der Patienten.

5.1.2 Chromosom 13q13

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren der Marker FLT1, der in der Nachbarschaft des BRCA2 Gens in der Region 13q12 liegt, für LOH-Analysen eingesetzt. Bei den insgesamt 10 untersuchten Kolonkarzinom-DNA Proben wurde mit dem Marker FLT kein Heterozygotieverlust gesehen.

Für die 44 Brusttumore ergaben die LOH-Analysen 18% Heterozygotieverlust sowie 21% andere genetische Änderungen wie Bandenverschiebungen oder das Auftreten neuer Banden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Studie von Collins et al. (1995), der zeigte, dass bei sporadischen Mammakarzinomen in ca. 20-30% ein Allelverlust in der BRCA2 Region auftritt. Auch bei familiär gehäuft auftretenden Brustkrebs und männlichen Brustkrebs ist LOH häufig in der Region 13q13 zu finden.

In der zuvor dargestellten Arbeit von Callahan et al. (1993) wurde auch die Region 13q14.1 untersucht, in der das Retinoblastomgen liegt. Die Autoren fanden eine LOH-Rate von 30%, die mit dem histopathologischen Grad III statistisch signifikant korrelierte ($p < 0,031$). Diese LOH-Untersuchungen führten zur Klonierung des BRCA2 Gens in dieser Region. Auch Schmutzler et al. (1995) untersuchten diesen Locus bei Mammakarzinomen und fanden LOH-Raten von 28-30%, die jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zu einem der histopathologischen Prognosefaktoren aufwiesen.

5.1.3 Chromosom 19q13

Für die chromosomale Region 19q13 wurden bei Tumoren häufig LOH beschrieben. Pollascik et al. (1996) untersuchte Nierenzellkarzinome, bei denen er 43% LOH in der Region 19q mit dem Marker D19S246 bei Onkozytomen fand. A. Bicher et al. (1997) untersuchte menschliche Ovarialkarzinome und wies bei 53% der Tumore LOH in der chromosomalen Region 19q nach.

In der vorliegenden Arbeit wurden die 44 Brustkrebstumor-DNA Proben sowie die DNA von 10 Kolontumoren mit 2 spezifischen Markern für die Region 19q13, D19S178 und CEA, auf Heterozygotieverluste und andere genetische Änderungen untersucht. Die LOH-Rate lag für den Marker D19S178 bei Mammatumoren bei 11% und für CEA bei 14%, andere genetische Änderungen wurden bei 11% bzw. 20% der Tumore beobachtet. Die

Untersuchung von Kolontumoren zeigte nur bei einer von 9 Proben einen Heterozygotieverlust mit dem Marker D19S178.

Die Häufigkeit der anderen Änderungen, die ein Ausdruck der Deletionen, Insertionen, Translokationen als Mikrosatellit Instabilität erfasst werden, ist bei den hier untersuchten Tumoren gering ausgefallen. Eine ähnliche Beobachtung bei Brusttumoren ist auch von Anbazhagan et al. (1999) gemacht worden.

Die in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Mikrosatellitenmarkern nachgewiesenen genetischen Alterationen zeigten keine statistisch signifikante Korrelation zu den histopathologischen Prognoseparametern der Tumore, so dass sie als Prognoseparameter ungeeignet erscheinen. Die von anderen Autoren nachgewiesenen statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den Raten der Verluste der Heterozygotie und histopathologischen Prognosefaktoren wie Nodalstatus oder histologischer Grad 3 konnten sich jedoch in großen Kollektiven nicht als Prognosefaktoren etablieren.

Prognostische Aussagekraft bei an Mammakarzinomen erkrankten Patientinnen hat die Expression des c-erb B2 Proteins. Das Onkogen Her2/neu (c-erbB2) liegt auf Chromosom 17q21. Seine Aktivierung führt zur verstärkten Expression des Onkogenproduktes, eines transmembranösen Glykoprotein-Rezeptors (p185-Her2) mit Tyrosin-Kinase-Aktivität. Dieser Rezeptor vermittelt wachstumstimulierende Eigenschaften. Bei 30% der Mammakarzinome kommt es zu einer Überexpression dieses Faktors, der mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. In Patientinnen, die das c-erbB2 in hohem Maße exprimieren, wurde festgestellt, dass eine adjuvante Therapie nach dem CMF-Protokoll (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-FU) keinen Erfolg bringt. Hier wären anthrazyklinhaltige Präparate oder die Therapie mit einem neuen monoklonalen Antikörper, dem Trastuzumab (HER 2-Antikörper= Herceptin) wirksamer. In Phase II Studien bei Mammakarzinomen zeigten sich Remissionsraten von 15% bei Gabe von Herceptin allein, wogegen durch Kombinationstherapie mit Anthrazyklinen oder Taxanen Remissionsraten von 62% erzielt werden konnten (Empfehlungen des Tumorzentrums München (ASCO 1999). Der Verlust des CEA's bei hepatozellulären Karzinomen wurde als ein weiterer prognostischer Faktor gefunden. Cruz et al. (2005)

5.2 UNTERSUCHUNGEN IN DER BRCA-1 GENREGION

Trägerinnen von Mutationen im BRCA1 oder BRCA2 Gen besitzen ein Risiko von 56% für die Entwicklung eines Mammakarzinoms bis zum 75. Lebensjahr (Couch et al. 1997, Healy 1997). Häufige Mutationen im BRCA1 Gen wurden im Exon 2, 5 und 20 beobachtet. Dabei wurde die 185 del AG Mutation im Exon 2 und die 1583 Insertion C im Exon 20 am häufigsten gesehen, insbesondere in Ashkenazi-Familien. Strüwing et al. (1995a, b) untersuchten 858 Ashkenazi-Jüdinnen (aus osteuropäischer Abstammung) auf genetische Änderungen und fanden die Mutation 185 del AG im Exons 2 des BRCA1 Gens mit einer Häufigkeit von 0,9%. Eine von 100 Frauen in Ashkenazi-Familien hat somit das Risiko ein Brust- oder Ovarialkarzinom zu entwickeln. Nahezu 20% der Jüdinnen, die Brustkrebs unter 42 Jahren entwickeln, und 32% der Familien mit gehäuft auftretenden Mammakarzinomen tragen die 185 del-AG Mutation im BRCA1 Gen. In der übrigen Bevölkerung kommen Mutationen im BRCA1 und BRCA2 Gen mit einer Häufigkeit von etwa 0,12% vor, so dass eine von 800 Frauen Trägerin einer solchen Mutation ist. Demgegenüber sind es 2,3% der Ashkenazi-Jüdinnen (1 von 40 Frauen), die BRCA1 und BRCA2 Mutationen in ihrer Erbinformation enthalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der ASO-Technik DNA von 44 sporadischen Mammakarzinomen und von 10 Kolonkarzinomen auf die 185 del AG Mutation im Exon 2 und die 1583 Insertion C im Exon 20 hin untersucht. Es wurden jedoch keine Mutationen gefunden. Schattuck-Eidens et al. (1995) untersuchten 50 italienische Frauen mit familiär gehäuft auftretendem Mammakarzinom auf die Anwesenheit der obengenannten Mutationen im Exon 2 und 20 und fanden jeweils eine Mutation im Exon 2 und eine im Exon 20 des BRCA 1 Gens. De Benedetti et al. (1996) untersuchten 70 italienische Frauen, die an Brust- und/oder an Ovarialkarzinomen erkrankten und eine positive Familienanamnese besaßen, mit Hilfe des Protein-Truncation- Test und Sequenzierung auf die Anwesenheit von BRCA-1 Mutationen. Sie fanden bei 31% der Patientinnen mit positiver Familienanamnese und bei 7% der Patientinnen mit frühauftretendem Brustkrebs BRCA-1 Mutationen. 89% der Brustkarzinome mit BRCA-1 Mutationen wiesen den histopathologischen Grad 3 auf. 100 % der BRCA-1 positiven Ovarialkarzinome entsprachen dem endometroiden Typ.

Die Autoren schlußfolgerten, dass dieser spezifische histopathologische Grad 3 ein Kriterium sein könnte, um selektiv Fälle für eine BRCA-1 Mutationsanalyse zu

verwenden. Sporadische Ovarialkarzinome zeigten in dieser Studie keine genetischen Veränderungen. Marajev et al. (1995) fanden BRCA1 Genmutationen in spontaner Ovarialkrebs. Berchuck et al. (1998) fanden in etwa 56% der Patientinnen mit hereditärem Ovarialkrebs germline Mutationen in BRCA1 Gen sowie somatische Mutationen dieses Gens nur in 5% der Fälle von spontanem Ovarialkarzinom.

Mit Hilfe der SSCP- und Heteroduplexanalyse wurden in der vorliegenden Arbeit 44 sporadische Brustkarzinome und 10 Kolonkarzinome auf genetische Alterationen (Bandenverluste, Verschiebungen oder Hinzukommen von neuen Banden) der Exons 2, 5 und 20 des BRCA1 Gens untersucht. Die auffälligen Proben wurden anschließend sequenziert. In keiner der Proben war in Exon 2, 5 oder 20 eine somatische Mutation des BRCA1 Gens nachweisbar. Dieses Ergebnis stimmt mit den von anderen Arbeitsgruppen erhobenen Befunden überein, die auch keine Mutationen in BRCA1 gen bei sporadischen Brustkarzinome nachweisen konnten (Katagiri et al. 1996, Valamathi et al. 2004). Mutationen im BRCA1-Gen wurden nur in äußerst seltenen Fällen beschrieben (Kajima et al. 1998, Khoo et al. 1999). Ein Grund dafür mag darin liegen, dass Spontanmutationen dieses Gens in einer sehr geringen Frequenz vorkommen. Ein anderer Grund könnte darin liegen, dass die Gene sehr groß sind, so dass Mutationen nur mit sehr großem Aufwand nachweisbar sind. Skolnik (1994) hat 44 nichtfamiliäre Brust- und Ovarialkarzinome auf genetische Änderungen im BRCA-1 Gen untersucht. Dabei konnte bei 4 Patientinnen ein Defekt im Gen gefunden werden. Bei genauerer Untersuchung stellte sich jedoch heraus, dass bei diesen 4 Patientinnen das BRCA-1 Gen auch in den normalen Zellen mutiert war. Die vier Patientinnen waren Mitglieder von Hochrisikofamilien und fälschlicherweise sporadische Formen zugeordnet worden. Khoo et al. (1999) beschrieben bei einer Patientin mit sporadischem Mammakarzinom eine Mutation im Exon 11 des BRCA1 Gen.

Obwohl bei der überwiegenden Zahl sporadischer Mammakarzinome keine Mutationen im BRCA1 Gen nachweisbar sind, weisen sie häufig eine verminderte Expression des BRCA1 Gen auf (Yoshikawa et al. 1999). Die Ergebnisse von in vitro Experimenten lassen vermuten, dass die Downregulierung der BRCA1 Genexpression durch DNA-Methylierung kontrolliert wird (Magdinier et al. 1998 und 2000, Benchaib et al. 2000, Scully und Livingston 2000). Ingvarsson 1999 wies darauf hin, dass sporadische Mammakarzinome insgesamt weniger genetische Defekte aufweisen als erbliche Brusttumore mit genetischen Aberrationen im BRCA1 oder BRCA2 Gen. Auch die Unterschiede in klinisch-pathologischen Merkmalen sprechen dafür, dass der

Karzinogenese von erblichen und sporadischen Mammakarzinome unterschiedliche Pathogenesemechanismen zugrunde liegen (Chappuis et al. 2000).

Eine interessante Theorie stellten Jensen und Mitarbeiter (1996) zur Funktion des BRCA1 Gens und seines Genproduktes auf. Sie fanden, dass das BRCA1 Genprodukt sich wie ein Granin verhält und sich in Sekretvesikeln befindet, so dass das BRCA1 Genprodukt nur das Wachstum der Zellen hemmt, die diesen Sekretionsweg enthalten.

Eine mögliche Erklärung, warum die Gene BRCA1 und BRCA2 selten in sporadischen Brustkarzinomen verändert sind, haben erstmals Kinzler und Vogelstein 1997 vorgestellt. Sie unterschieden zwischen Gatekeeper- und Caretaker-Genen (Torhüter- und Wachmeister-Gene). Die Gatekeeper-Gene regulieren das Wachstum des Tumors, indem sie den Zelltod initiieren. Jeder Zelltyp hat nur ein oder wenige Gatekeeper-Gene. Bei Inaktivierung dieser Gene entsteht Krebs, dadurch dass kein Zelltod mehr erfolgt. Beispiele dafür sind das Retinoblastom, von Hippel-Lindau-Syndrom, Neurofibromatose Typ I und Adenomatose polyposis coli. Für die Tumorentwicklung müssen beide Gene mütterlicher- und väterlicherseits alteriert sein. Bei Inaktivierung der Caretaker Gene entstehe eine genetische Instabilität, die dann zur Mutation aller Gene auch die der Gatekeeper-Gene führe und damit wieder zum unkontrolliertem Wachstum. Kinzler und Vogelstein (1997) vermuteten, dass das BRCA1- und BRCA2 Gen zu den Caretaker-Genen gehören.

Mit dem klonieren des BRCA1 und BRCA2 Gens ist eine präsymptomatische Diagnostik für eine Vielzahl von Frauen mit erblichen BRCA1 und BRCA2 Gendefekten möglich. Diese Methode, die zwar in einigen Fällen sehr hilfreich ist, gefährdete Risikogruppen ausfindig zu machen, bringt im Allgemeinen Konflikte mit sich. Einerseits kann die Identifikation von Genträgern durch diese Methoden hilfreich sein, um diese Zielgruppe, in der gehäuft Mammakarzinome vorkommen, besser zu überwachen und rechtzeitig chirurgisch zu therapieren ohne eine anschließende adjuvante Chemotherapie durchführen zu müssen. Auf der anderen Seite bringen diese „Krebsteste“ den Betroffenen Unsicherheit, soziale Stigmatisierung, eventuell Verlust des Arbeitsplatzes und nicht zuletzt bei präventiver chirurgischer Ablatio mammae starke psychische Belastung.

Foulkes und Narod (1995) stellen in ihre Arbeit dar, dass nur Frauen von präsymptomatischen Genanalysen profitieren, die betroffene lebende Verwandte haben. In

den nächsten Jahren wird das Testen auf Mutationen im BRCA1 und BRCA2 Gene Routine werden.

Über die tatsächliche Bedeutung positiver Befunde und ihrer Konsequenzen wird noch kontrovers diskutiert. In den USA haben sich Patientinnen, die Mutationen im BRCA1 oder BRCA2 Gen tragen, zur beidseitigen prophylaktischen Mastektomie entschlossen. Die Ablatio mammae bei positiven BRCA1 Genträgern erscheint mir verfrüht, da die Betroffenen zwar ein erhöhtes Erkrankungsrisiko haben, es jedoch nicht sicher ist, ob die Betroffenen an Krebs erkranken werden. Vergleichbar dem Fearon Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz für Kolonkarzinome ist auch für Mammakarzinome eine in mehreren Schritten erfolgende Karzinogenese anzunehmen (Ingvarsson 1999). Weitere Untersuchungen zur Etablierung molekularer Prognosefaktoren sind daher notwendig, um auf bestimmte Tumorstadien und Formen abgestimmte Empfehlungen für therapeutische Interventionen geben zu können.

Auch bei vererbtem Brustkrebs sind in etwa 1/3 der Familien keine Mutationen in den BRCA1 und BRCA2 Genen gefunden worden (Andersen, 1996). Es gibt aber auch überzeugende Gründe, dass andere hochpenetrante Gene die Anfälligkeit zu einem Brustkrebs erhöhen.

Bei der Suche nach solchen Genen mit Hilfe von CGH, LOH und Kopplungsuntersuchungen in Familien mit vererbtem- und spontanem Brustkrebs haben Hinweise auf die Chromosomen 8p₁₂₋₂₂ (Seitz et al. 1997, Rahman et al. 2000), 13q21 (Kainu et al. 2000), 12q und 20q (Tanner et al. 1995, Collins et al. 1998) ergeben. Bis jetzt sind diese Hinweise widersprüchlich geblieben (Rahman et al. 2000) und trotz intensiver Suche keine verantwortlichen Gene in diesen Intervallen gefunden worden. In einigen Fällen von syndromal vererbtem Krebs, bei denen auch Brustkrebs vorkommt, zeigen bis zu 10% Mutationen in den Genen PTEN, STK/LB1 (Li et al. 1997, Chen et al. 1998, Chen und Lindblom 2000) oder ATM (Chenevix-Trench et al. 2002). Die Mutationen dieser Gene wurden jedoch in Kohorten von reinen Brustkrebspatienten nicht gehäuft gefunden (Chen et al. 1998). ATM Mutationen, die biallelisch zu Ataxia-Teleangiectasia führen, erhöhen bei Vorkommen in monoallelischen Form die Suszeptibilität zu Brustkrebs (Renwick et al. 2006). Kürzlich wurde ein neuer Signalweg gefunden der unter der Mitwirkung von BRCA Genen und Fanconi Anämie Genen für die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen beteiligt ist (Chang et al. 1999, D'Andrea und Grompe 2003). Allerdings haben erste Untersuchungen keine häufige Mutationen in den FA Genen von Patienten mit Brustkrebs gezeigt (Seal et al. 2003). Homozygote Mutationen in BRCA2

Gen führen zu FA Typ D1(Howlett et al. 2002), in PALB2 Gen führen zu FA Typ N (Xia et al. 2007, Reid et al. 2007) und in BRP1 Gen zu FA Typ J (Seal et al. 2006). Die Mutationen in PALB2 Gen und BRP1Gen in hetrozygoter Form kommen häufiger bei Patientinnen mit Brustkrebs vor (Erkko et al. 2007, Rahman et al. 2007, Walsh und King. 2007).

Es wird vermutet, dass ein gemeinsamer Effekt von zahlreichen nicht so hoch penetranten Genen, die als häufige DNA-Varianten vorkommen, jedoch ein geringes aber maßgeblich erhöhtes Krebsrisiko in Patienten ohne BRCA Mutationen erzeugen, existieren.

Diese Annahme ist durch kürzlich gefundene 1100delC Mutation in einem zellulären Checkpoint Kinase Gen CHEK2 bestätigt worden (Meijers-Heijboer et al. 2002). CHEK2 ist eine wichtige Komponente des Reperatur-mechanismus, der geschädigte DNA ortet und repariert. In der Normalbevölkerung kommt diese Mutation in Frequenz von etwa 1% vor, ist jedoch bei Frauen in Familien mit Brustkrebs um etwa 3,5 fach erhöht. Das relative Risiko für Brustkrebs bei Mutationsträgern ist in diesen Familien für Frauen 2 und für Männer 10. In diesem Zusammenhang haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass es eine Assoziation zu erhöhtem Brustkrebsrisiko ergibt, wenn Mutationen in den neue gefundenen Genen BRIP1 und PALB2 (Erkko et al. 2007, Rahman et al. 2007) und in einer Variante des CASP8 Gens (Cox et al. 2007) vorliegen. Zwei kürzlich durchgeführten sehr große genomweite Assoziationsstudien, die tausende von Patientinnen und Kontrollen vergleichend für mehr als 2000 SNPs geprüft haben, identifizierten vier neue Loci (FGFR2, TNRC9, MAP3K1 and LSP1) die ein erhöhtes Risiko für Brustkarzinom beherbergen (Easton et al. 2007, Hunter et al. 2007). Eine ähnliches Verhalten für eine Variante rs13387042 auf Chromosom 2q25 und rs38033662 auf 16q12 entdeckte eine groß angelegte Studie in Island für den Estrogenrezeptor positiven Mammakarzinom (Stacey et al. 2007). Eine Studie bezüglich 12 häufig vorkommende SNPs in BRIP1 Gen und deren Assoziation mit Vorkommen von Brustkrebs und Ovarialkrebs hat keine auffällige Ergebnisse geliefert (Song et al. 2007).

Die in den 90iger Jahren häufig benutzte Methode der LOH Bestimmung in Tumoren hat wegen ihrer technischen Begrenzungen wie Reinheit der benutzten Tumorgewebe, einiger theoretischer Einwände (Tomlinson et al. 2002) und der geringen Zahl der verwertbaren Mikrosatelliten ihre Popularität verloren. Durch Verbesserung der Mikrodissektion, Benutzung Paraffin eingebetteter Tumore, verbesserte Quantifizierung und Entdeckung der zahlreichen SNP Loci konnten die spezifischen Fragestellungen der Tumorbologie mit

dieser Methode jetzt mit Erfolg bearbeitet werden (Selim et al. 2002, Sasaki et al. 2001, Zhou 2003, Lips et al. 2005, Jacobs et al. 2007). Zu erwähnen wäre die Prüfung der Mechanismen zur Klonalität, Entwicklung der Sekundärtumoren und Metastasen (Keranguevan et al. 1997, Osborne et al. 2000, Regitnig et al. 2002), Heterogenität der Brusttumoren und des umliegenden Gewebes (Deng et al. 1996, Shen et al. 1999, Aubele et al. 2000, Lichy et al. 2000, Monifar et al. 2000, Larson et al. 2002, Gabrielsson und Argani. 2002 , Schlechter et al. 2004) sowie Zwillingsstudien (Hamilton und Mack 2003). Ein Übersicht für Anwendung neuer Methoden der Bestimmung von Mikrosatelliteninstabilität in Bezug auf die Prognose von Kolorektale Tumoren ist bereits erschienen (Popat et al. 2005).

Neue Möglichkeiten ergaben sich ab dem Jahr 2000 durch das Human Genomprojekt durch das viele neue Gene und SNP's entdeckt wurden, die sich auf Grund der neu entwickelten Mikrochip Methode zeitsparender untersuchen lassen (Lips et al. 2005). Die CGH Methode auf chromosomaler Ebene (Pinkel et al. 1998) wurde jetzt mit Mikrochip basierten CGH Array (Bruder et al.2001), cDNA Array (Pollack et al. 2002, Wooster und Weber 2003), SNParray (Matsuzaki et al. 2004), Methylierungsarray (Baylin et al. 1998, 2000) und Proteinarray ergänzt, um Tausende von Genen auf ihre Struktur und Expression zu untersuchen. Die Anwendung dieser neuen Methodiken hat auch Erfolge in der Brusttumorforschung gezeigt. Erwähnenswert ist die Entdeckung eines mit Brustkrebs assoziierten SNP. Durch Einsatz von Millionen von SNP's, die sich für die Suche von Suszeptibilitätsgenen gut eignen, ist es gelungen ein stummes SNP in *LIG4* (ein Gen, das für eine DNA-Ligase kodiert und für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA verantwortlich ist) zu finden, das mit der Überlebensrate von Patienten mit Brustkrebs assoziiert ist (Goode et al. 2002). Ein anderes Highlight der cDNA Array Untersuchungen ist die Entdeckung von einem Verband von 70 Genen, deren Expression in Brusttumoren zur Einteilung der Patienten in Gruppen mit guter und schlechter Prognose des klinischen Verlaufs vornehmen läßt (Sorlie et al. 2001, Van de Vijver et al. 2002, Van't Veer et al. 2002, Helmboldt et al. 2003, Zhao et al. 2004, Pittman et al. 2004, Dai et al. 2005, Ein-Dor et al. 2005, Hanneman et al. 2005, Van't Veer et al. 2005). Ähnliche Untersuchungen sind mit der Überprüfung des Methylierungsgrades bei einer Reihe von Genen auf Mikrochips in Arbeit (Cattaro et al. 1999, Niwa et al. 2000, Widschwender et al. 2004, Maier et al. 2005, Martens et al. 2005, Shinozaki 2005). Diese neu gewonnenen Erkenntnisse werden jetzt in größeren Serien von Patienten untersucht, um ihre Gültigkeit zu untermauern. Ebenso wird versucht diese Methoden so zu verfeinern und zu sensitiveren, so dass die

Untersuchungen in leicht zu gewinnbareren Geweben wie Serum Blut und einzelne Zellen (Pantel und Woelfle 2004, Schwarzenbach et al. 2004 und 2007, Diehl et al. 2005, Leung et al. 2005, Müller und Pantel 2005, Müller et al. 2006, Taback et al. 2006, Dutt und Beroukhem 2007) durchgeführt werden können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Während für erbliche Mamma- und Kolonkarzinome krankheitsverursachende Keimbahnmutationen in Genen beschrieben wurden, die bei einem Teil der familiär gehäuft auftretenden Tumore eine präsymptomatische Diagnostik der Disposition für diese Erkrankungen erlauben, ist die Rolle spezifischer genetischer Alterationen somatischer Zellen für die Karzinogenese und deren Bedeutung als molekulare Prognosefaktoren bisher nur unzureichend charakterisiert. Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher erstens die Evaluierung genetischer Alterationen von Tumorzellen sporadischer Mamma- und Kolonkarzinome als molekulare Prognosefaktoren, insbesondere von Verlusten der Heterozygotie als Hinweis auf mögliche Loci von Tumorsuppressorgenen, und zweitens der Nachweis von somatischen Mutationen bei sporadischen Tumoren in dem bei erblichen Mamma- und Ovarialkarzinomen in der Keimbahn häufig mutierten BRCA1 Gen.

Für Untersuchungen zum Verlust der Heterozygotie (LOH) in den chromosomalen Regionen 13q13, 17q12-21 und 19q13 wurde DNA aus Gewebeproben von 44 sporadischen Mammakarzinomen und 10 Kolonkarzinomen im Vergleich zur DNA aus dem peripheren Blut der Patienten mit 6 verschiedenen Mikrosatellitenmarkern analysiert und optisch ausgewertet. Am häufigsten wurden genetische Alterationen mit dem Marker D17S855, der intragenisch im BRCA 1 Gen liegt, gefunden: Bei 23% der Mammakarzinome Verlust der Heterozygotie und bei 27 % andere genetische Änderungen, wie z.B. Insertionen Mutationen oder Translokationen. Mit den Markern D19S178 (Region 19q13), CEA (Region 19q13), FLT1 (Region 13q12) und D17S588 (Region 17q13-21) wurden Verluste der Heterozygotie in bis zu 18% und andere genetische Veränderungen in bis zu 21% der Mammakarzinome gefunden. Bei jeweils nur einem von 10 untersuchten Kolonkarzinomen konnte ein Verlust der Heterozygotie in der chromosomalen Region 19q13 bzw. 17q13-21 entdeckt werden. Andere genetische Änderungen wurden in der Region 17q13-21 mit dem Marker D17S588 bei 3 und mit dem Marker D17S855 bei einem der Kolonkarzinome aufgezeigt. Die mit den hier verwendeten Mikrosatellitenmarkern nachgewiesenen Raten genetischer Alterationen zeigten in dem exakten Test nach Fisher keine statistisch signifikante Korrelation zu gesicherten histopathologischen Prognosefaktoren wie Nodalstatus, Grading, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und Lokalisation der Tumoren, so dass diesen genetischen Alterationen in diesem Patientenkollektiv keine prognostischen Relevanz zukommt.

Durch Mutationscreening mit der SSCP- und Heteroduplex-Methode und nachfolgende Sequenzierung auffälliger Proben konnten bei 44 sporadischen Mammakarzinomen keine somatischen Mutationen in den Exons 2, 5 und 20 des BRCA1 Gens nachgewiesen werden. Ebenso erbrachten die mittels der Allelspezifischen Oligonucleotid (ASO)-Technik durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis zweier bei erblichen Mammakarzinomen häufig vorkommender Mutationen, der 5832 Insertion C im Codon 1756 des Exons 20 und der 185 del AG-Mutation im Codon 23 des Exons 2, keine positiven Befunde bei 44 sporadischen Mammakarzinomen und 10 Kolonkarzinomen.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass im Gegensatz zu erblichen Mammakarzinomen für die Pathogenese sporadischer Mammakarzinome, weniger Mutationen des BRCA1 Gens als wie berichtet, vielmehr eine veränderte Regulation der Expression des BRCA1 Gens eine Rolle zu spielen scheint. Diese Tatsache sollte bei weiteren Untersuchungen zur Etablierung molekularer Prognoseparameter sporadischer Tumore Berücksichtigung finden.

7. Literaturverzeichnis

Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E (1999) Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 5 : 839-844

Andersen TI (1996) Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility. *Acta Oncol.* 35: 407-09

Andersen TI, Gaustad A, Ottestad L, Farrants GW, Nesland JM, Tveit KM and Børresen AL (1992) Genetic alterations of the tumour suppressor gene regions 3p, 11p, 13q, 17p and 17q in human breast carcinomas. *Genes Chrom. Cancer* 4: 113-121

Andersen TL, Borresen AL, Moller P (1996) A common BRCA1 mutation in norwegian breast and ovarian cancer. *Am. J Hum Genet* 59 : 486-487

Angele S, Trilleux P, Mertel-Plauche G et al. (2000) Abnormal expression of ATM and P53 gene in breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6:3536-3544

Appleby JM, Barber JB, Levine E, Varley JM et al. (1997) Absence of mutations in the ATM gene in breast cancer patients with severe responses to radiotherapy. *Brit. J. Cancer* 76:1546-1549

Aubele M, Cummings M, Walsh A et al (2000) Heterogeneous chromosomal aberrations in intraductal breast lesions adjacent to invasive carcinoma. *Anal Cell Pathol* 20: 17-24

Bamberger AM, Kappes H, Methner C et al. (2002) Expression of adhesion molecule CEACAM (CD66a, BGP, C-CAM) in breast cancer is associated with the expression tumor suppressor gene Rb, Rb2, and p27. *Virchows Arch.* 440: 139-144

Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann et al. (1998) Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am. J Pathol.* 152 (6):1401-06

Bamberger AM, Sudahl S, Wagener C, Koning T (2001) Expression pattern of the adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM, CD66a, BGP) in gestational trophoblastic lesions. *Int. J. Gyn. Pathol.* 20(2):160-165

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alteration in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 72: 141-196

Baylin SB, Bolinsky SA, Herrman JG (2000) Aberrant methylation of gene promoters in cancer-concepts, misconcepts and promise. *J Nat Cancer Inst.* 92:1460-1461

Beckmann MW, Picard F, An HX, van Roeyen CRC, Dominik SI, et al. (1996) Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *Brit. J. Cancer* 73: 1220-1226

Benchab M, Lenoir GM, Guerin JF, Dante R (2000) Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *FASEB* 14: 1585-94

Berchuck A, Herom KA, Carney ME, Lancaster J et al. (1998) Frequency of germline and somatic BRCA1 mutations in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 9: 2433-2437

Bethwaite F, Smith N, Wellington (1996) Breast cancer susceptibility genes. *N. Z. Med. J.* 109 (1029): 327-328

Bicher A, Ault K, Kimmelman A, Gershenson D, Reed E, and Liang B (1997) Loss of heterozygosity in human ovarian cancer on chromosome 19 q. *Gyn. Oncol.* 66: 36-40

- Black D(1994) BRCA1 down, BRCA2 to go. *Current Biol.* 4: 1023-24
- Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A. et al.(1987) Localisation of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328: 614-16
- Botstein D, White R.L, Skolnick M, Davis R.W (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-31
- Boveri T (1914) *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren* . Gustav Fischer Verlag.Jena
- Brown MA, Xu CF, Nicolai H, Griffiths B, Chambers JA, Black D, Solomon E (1996) The 5' end of the BRCA 1 gene lies within a duplicated region of human chromosome 17q21. *Oncogene* 12: 2507-13
- Bruder CE, Hivvela C, Tapia-Paz I, Fromson I, et al.(2001) High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH *Hum.Mol.Genet* 10: 271-282
- Buenger H, Mommers EC, Littman R, et al.(2001) Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *J Pathol* . 194: 165-170
- Callahan R, Cropp C, Merlo GR, Diella F, et al.(1993) Genetic and molecular heterogeneity of breast cancer cells. *Clinica Chimica Acta* 217: 63-73
- Cattaro A, Harris WH, Xu CF, Solomon A (1999) Methylation of BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene* 18: 1957-1965
- Cavenee WK, Dryja TP, Philipps RA, Benedict WF, et al.(1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779-784
- Chang JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R. (1999) BRCA1, BRCA2, and RAD51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res.* 59:1752-1756
- Chappuis PO, Nephertot V, Foulkes WD (2000) Clinical-pathological characteristics of BRCA1- and BRCA2 related breast cancer. *Semin. Surg. Oncol.*18: 287-95
- Chen J, Birkholtz GG, Lindblom P, Rubio C, Lindblom A (1998) The role of ataxia-telangiectasia heterozygotes in familial breast cancer. *Cancer Res.* 58: 1376-79
- Chen J and Lindblom A (2000) Germline mutation screening of STK11/LKB1 gene in familial breast cancer with LOH on 19P. *Clin. Genet.* 57: 394-397
- Chen J and Lindblom P, Lindblom A (1998) A study of the PTEN/MMAC1 gene in 136 breast cancer families. *Hum. Genet.* 102: 124-125
- Chen LC, Kurisu W, Ljung BM, Goldman EX, Moore H and Smith HS(1992) Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. *J. Nat. Cancer Inst.* 84 : 506-510
- Chenevix-Trench G, Spurdle AB, Gatei M et al. (2002) Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. *J Nat. Cancer Inst.* 94: 205-215
- Colditz GA, Egan KM and Stampfer MJ (1993) Hormone replacement therapy and risk of breast cancer: results from epidemiologic studies. *Am. J. Ob. Gyn.* 168: 1473-80
- Collins C, Rommens BM, Knowbel D, Godfrey T et al. (1998) Positional cloning of ZNF217 and NABC1 genes amplified at 20q13 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 8703-8708
- Collins N, McManus R, Wooster R, Mangion J, Seal S et al.(1995) Consistent loss of the wild-type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome

13q12-13. *Oncogene* 10: 1673-75

Couch FJ, Weber BL: Mutations and polymorphisms in the familial early onset breast cancer (BRCA1) gene. *Breast Cancer Information Core. Hum. Mutat.* 8: 8-18 (1996)

Couch FJ, Weber BL: Breast Cancer. In Vogelstein B, Kinzler KW editors. *The genetic basis of cancer.* New York (NY) McGraw Hill p. 537-564 (1998)

Couch FJ, Farid LM, DeShano ML et al.: BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet* 13: 123-125 (1996)

Couch FJ, DeShano ML, Blackwood M et al. (1997) BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 336: 1409-1415

Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, et al. (2007) A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat. Genet.* 39: 352-358

Cropp CS, Champeme MH, Lideraeau R, Callahan R (1993) Identification of three regions on chromosome 17 q in primary human breast carcinomas which are frequently deleted. *Cancer Res.* 53: 5617-19

Cropp CS, Nevalinna HA, Pyrhönen S, Tenman UH, Salmikangas P, Albertsen H, White R, Callahan R (1994) Evidence for involvement of BRCA 1 in sporadic breast carcinomas. *Cancer Res.* 54: 2548-51

Cruz PV, Wakai T, Shirai Y, Yokoyama N, Hatakeyama K (2005) Loss of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule expression is an adverse prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 104: 354-360

D'Andrea AD and Grompe M (2003) The Fanconi Anemia /BRCA pathway. *Nat.Rev.Cancer* 3 : 23-34

Dai H, Van't Veer LJ, Lamb J et al. (2005) A cell proliferation signature is marker of extreme poor outcome in subpopulation of breast cancer patients. *Cancer Res.* 65:4059-4066

De Benedetti VMG, Radice P, Mondini P, Satti G, Conti A, et al (1996) Screening for mutations in exon 11 of the BRCA1 gene in 70 Italian breast and ovarian cancer patients by protein truncation test. *Oncogene* 13:1353-57

De Waard F (1975) Breast cancer incidence and nutritional status with particular reference to body weight and height. *Cancer Res.* 35: 3351-6

Dean M, Gerrard B (1991) Helpful hints for the detection of single-stranded conformation polymorphisms. *Biotechniques* 10: 332-333

Deng G, Lu Y, Zlatnikov G, Thor AD, Smith HS (1996) Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* 274: 2057-2059

Deville P, Claton-Jensen AM, Cornelisse CJ (2001) Ever since Knudson. *Trends in Genet.* 17:569-577

Deville P, van den Broek M, Kuipers-Dijkshoorn N, Kolluri R, Khan P (1989) At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinomas. *Genomics* 5: 554-60

Diehl F, Li M, Hey Y et al. (2005) Detection and quantitation of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Nat Acad Sci USA* 102: 16566-16573

- Dutt A, Beroukhi R (2007) Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 19 : 43-49
- Easton DF, Bishop DT, Crockford GP, et al. (1993) Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res.* 57: 3347-50
- Easton DF, Ford D, Peto J et al. (1996) Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv.* 18: 95-113
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Ponder BA et al. (2007) Genome wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature Genet.* 447: 1087-1093
- Ein-Dor L, Kela I, Getz D, Givol D (2005) Outcome signature genes in breast cancer: Is there a unique set? *Bioinformatics* 21: 171-178
- Erkko H, Xia B, Nikkila J et al. (2007) A recurrent mutation of PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 446: 316-319
- Fearon ER and Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-67
- Foster KA, Harrington P, Kerr J, Russell P, Di Croccio RA et al. (1996) Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res.* 16: 3622-25
- Foulkes WD, Narod SA (1995) Hereditary breast and ovarian cancer: epidemiology, genetic screening and predictive testing. *Clin. Invest. Med.* 18: 473-83
- Fuchs C, Giovannucci EC et al. (1999) Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N. Engl. J. Med.* 340: 169-176
- Futreal PA, Söderquist P, Marks JR, Inglehart JD, Cochran C, Barrett JC and Wiseman R (1992) Detection for frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphism. *Cancer Res.* 52: 2624-2427
- Gabrielsson E, Argani P (2002) Heterogeneity in the pathology and molecular biology of breast cancer. *Current Genomics.* 3: 477-488
- Garcia-Patino E, Gomendino B, Provencio M et al. (1998) Germline BRCA1 mutations in women with sporadic breast cancers: clinical correlations. *Clin. Oncol* 6: 115-120
- Godfraind C, Langreth SG (1995) Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab. Invest.* 73 : 615-627
- Gold P and Freedman SO (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122: 467-81
- Goode EL, Dunning AM, Kuschel B et al. (2002) Effect of germline genetic variation on breast cancer survival in a population based study. *Cancer Res.* 62: 3052-3057
- Grompe M (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 5:111-117
- Gusella J F (1986) DNA polymorphism and human disease. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 831-854

- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA et al. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250: 1684-1689
- Hamilton AS, Mack TM (2003) Puberty and genetic susceptibility to breast cancer, a case control study of twins. *N Engl. J. Med.* 348: 2313-2322
- Hanneman J, Osterkamp HM, Bosch C et al. (2005) Changes in gene expression associated with response to non adjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 23: 3331-3342
- Hayashi K (1991) A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic c-DNA. *Cold Spring Harbor Lab. Press* 1: 34-38
- Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SCCP? *Hum. Mutat.* 2: 338-346
- Healy B (1997) BRCA genes bookmaking, fortune telling, and medical care. *N. Engl. J. Med.* 336: 1448-1449
- Helmboldt P, Haerting J, Kolbel H et al. (2003) Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl. J Med.* 348: 1715-1717
- Howlett NG, Taniguchi T, Olsen S et al. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. *Science* 297: 606-609
- Hsing AW, Mc Laughlin JK, Chow WH, Schuman LM, Co Chien HAT, Gridley G, et al. (1998) Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. *Int. J. Cancer* 77: 549-553
- Huang J, Simpson JF, Glackin C, Riethorf L, Wagener C, Shively JE (1998) Expression of biliary glycoprotein (CD66a) in normal and malignant breast epithelial cells. *Anticancer Res.* 18:3203-3212
- Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB et al. (2007) A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 39:870-874
- Ingvarsson S (1999) Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 9: 277-88
- Izatt L, Greenman JA, Hodgson S et al. (1999) Identification of germline missense mutations and rare allelic variants in the ATM gene in early onset breast cancer. *Genes Chromosomes cancer* 26:286-294
- Jacobs S, Thompson ER, Nannva Y et al. (2007) Genomewide highresolution detection of copy number loss of heterozygosity and genotypes from formalin fixed, paraffin embedded tumor tissue using microchips. *Cancer Res.* 67: 2544-2551
- Jeffreys AJ, Wilson V, Tehin SL (1985) Individual specific fingerprints of hypervariable minisatellite region in human DNA. *Nature* 316: 67-73
- Jensen RA, Thompson ME, Jetton TL, Szabo C, v.d. Meer R, Helou B, et al. (1996) BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin. *Nature Genet.* 12:303-311
- Kainu T, Juo SH, Desper R, et al. (2000) Somatic deletions in hereditary breast cancers implicate 13q21 as a putative breast cancer susceptibility locus. *Proc. Nat. Acad.Sci. USA* 97: 9603-9608

- Kajima G, Murakami Y, Ohuchi N et al. (1998) Nonsense mutation at codon 63 of BRCA1 gene in breast cancer patients. *Jap. J.Cancer Res.* 89 : 837-841
- Katagiri T, Emi M, Ito I, Kobayashi K, et al. (1996) Mutations in the BRCA 1 gene in Japanese breast cancer patients. *Hum. Mutat.* 7: 334-39
- Keck U, Nedellec P, Beauchemin N, Thompson J and Zimmerman W (1995) The cea10 gene encodes a secreted member of the murine carcinoembryonic antigen family and is expressed in the placenta, gastrointestinal tract and bone marrow. *Eur. J. Biochem.* 229: 455-64
- Keen J, Lester D, Inglehearn C, Curtis A, Bhattacharya S, et al.(1991) Rapid detection of single base mismatches and heteroduplexes on hydrolink gels. *Trends Genet.* 7 : 5
- Keranguevan F, Noguchi T, Conlon F et al. (1997) Genome wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Res.* 57: 5469-5474
- Kesell DP, Black DM, Solomon E, Spurr NK (1993) Localization of a second NM23 gene, NME2 to chromosome 17q21-q22. *Genomics* 17: 522-524
- Khoo US, Ozcelik H, Cheung AN, Chow LW, Ngan HY, Done SJ, Liang AC, Chan VW, Au GK, Ng WF, Poon CS, Leung YF, Loong F, Ip P, Chan GS, Andrulis IL, Lu J, Ho FC (1999) Somatic mutations in the BRCA1 gene in Chinese sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene* 18: 4643-4646
- King MC (1990) Genetic analysis of cancer in families. *Cancer Surv.* 1990, 9:417-435
- Kinzler KW, Vogelstein W (1997) Cancer susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386(627):772-773
- Kirchweger R, Zeilinger R, Schneeberger C, Speiser P, Louason G and Theillet G (1994) Patterns of allele losses suggest the existence of five distinct regions of LOH on chromosome 17 in breast cancer. *Int. J. Cancer.* 56: 193-199
- Kirschner J, Hardy J, Wilczynski S & Shively J (2004) Cell-cell adhesion molecule CEACAM1 is expressed in normal breast and milk and associates with β 1 integrin in a 3D model of morphogenesis. *J.Mol. Histol.* 35:287-299
- Kleinermann DI, Cinney CP, Zhang WW, Lin SH, Van NT, Hsieh JT (1996) Suppression of human bladder cancer growth by increased expression of C-CAM 1 gene in an orthotopic model. *Cancer Res.* 56:3431-3435
- Knudson AG. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 68:820-823
- Knudson AG (1986) Genomics of human cancer. *Ann. Rev. Genet.* 20: 231-251
- Knudson AG (1996) Hereditary Cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 135-140
- Knudson AG, Hetticote HW, Brown BW (1975) Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 5116-5120
- Kunath T, Ordonez-Garcia, C, Turbide C, Beauchemin N (1995) Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* 22, 2375-82
- Lakhani SR, Chaggar R, Davies S, et al. (1999) Genetic alterations in normal luminal and myoepithelial cells of breast. *J Pathol.* 189: 496-503
- Larson PS, Morenas ADL, Bennet SR, Cupples LA, Rosenberg CL (2002) Loss of

heterozygosity or allele imbalance in histologically normal breast epithelium is distinct from loss of heterozygosity or allele imbalance in co-existing carcinomas. *Am. J. Pathology* 161: 283-290

Leppert M, Dobbs M, Scamler P, O'Connell P, Nakamura Y, et al.(1987) The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238: 1411-13

Leung WK, Chu ES, Chan MW et al.(2005) Potential diagnostic and prognostic values of detecting promoter hypermethylation in serum of patients with gastric cancers. *Brit J Cancer* 92: 2190-2194

Levine MN, Bramwell V, Prithard K et al.(1993) The Canadian experience with intensive fluorouracil and cyclophosphamide in patients with early stage breast cancer. *Drugs* 45: suppl.2. 51-59

Li J, Yen C, Liaw D (1997) PTEN, a putative tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947

Lichy JH, Delboge F, Zavor M, Tsai MM, Traubenberger JK (2000) Genetic heterogeneity in ductal carcinoma of the breast. *Lab. Invest.* 80:291-301

Lips EH, Dierssen JW, Eijk RV, Oosting J et al.(2005) Reliable high throughput genotyping and loss of heterozygosity in formalin fixed, paraffin embedded tumors using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res.* 65 : 10188-10191

Lo YL, Yu JC, Huang CS, Tseng SL, Chang KJ et al. (1998) Allelic loss of BRCA1, BRCA2 genes and other regions on 17q and 13q in breast cancer among women of Taiwan. *Int. J. Cancer.* 79: 580-587

Luo W, Wood CG, Earley K, Hung M-C, Lin SH (1997) Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by an epithelial cell adhesion molecule (E-Cadherin): The adhesion and growth suppression are mediated by different domains. *Oncogene* 14:1697-1704

Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, et al. (2005) Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *Am J Pharmacogenomics* 5: 223-232

Magdinier F, Billard LM, Wittmann G, Frappart L, Lo YL, Yu JC, Huang CS, Tseng SL, Chang KJ et al. (1998) Allelic loss of BRCA1, BRCA2 genes and other regions on 17q and 13q in breast cancer among women of Taiwan. *Int. J. Cancer.* 79: 580-587

Magdinier F, Billard LM, Wittmann G et al.(2000) Regional methylation of 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *FASEB J* 11: 585-594

Marajev SD, Pham TM, Cardiff RF et al.(1995) Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumors. *Nat Genet* 9: 439-443

Martens JWM, Nimmrich I, Koenig T, Look MP, Harbeck N, Model F, Kluth A et al. (2005) Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer. *Cancer Res.* 65: 4101-4117

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr. Nelson CE, Kim DH, et al. (1990) Germline p

53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233-38

Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Biotechnology* 24: 198-201

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. N.Y.

Marshall JC (1991) Tumor suppressor genes. *Cell* 64: 313-26

Matsuzaki H, Loi H, Dong S et al. (2004) Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one primer assay on a high density oligonucleotide array. *Genome Res* 14: 414-425

Meijers-Heijboer H, Van den Oudweland A, Klijn J et al. (2002) Low penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2 1100delC in non carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat. Genet.* 31:55-59

Michaud J, Brody LC, Steel G, Gontaine G, Martin LS, Valle D, and Mitchell G (1992) Strand-separating Conformational Polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine d-aminotransferase gene. *Genomics* 13: 389-94

Miki Y, Swensen J, Shattuck Eidens D, Futreal PA, Harshman K, et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA 1. *Science* 266: 66-71

Monifar F, Man YG, Arnold L, Ratscheck M, Tavassoli FA (2000) Concurrent and independent genetic alterations in stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res.* 60: 2562-2566

Müller V, Pantel K (2005) BM micrometastases and circulating tumor cells in breast cancer patients : where have we been, where are we now and where does the future lie? *Cytotherapy* 7: 478-482

Müller I, Urban K, Pantel K, Scharzenbach H.(2006) Comparison of genetic alterations in circulating microsatellite DNA in blood plasma sample of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Ann.NY Acad Sci.* 1075: 222-229

Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-50

Nagai MA, Medeiros AU, Brentani MM, Bretani RR, Marques LA, Mazoyer S and Mulligan LM (1995) Five distinct deleted regions on chromosome 17 defining different subsets of human primary breast tumors. *Oncology* 52(6): 448-53

Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10744-10748

Niederacher D, Picard F, Van Royen C, Ann HX, Bender HG and Beckmann MW. (1997) Patterns of allelic loss on chromosome 17 in sporadic breast carcinomas detected by fluorescence labeled microsatellite analysis. *Genes Chrom. Cancer* 18:181-192

Niwa Y, Oyama T, Nakajima T (2000) Aberrant methylation of BRCA1 occurs in human breast cancer tumors. *J Cancer Res.* 91 : 519-526

Nollau P, Scheller H, Kona-Horstmann, M Rohde S, Hagenmuller F, Wagener C, Neumaier M

(1997) Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. *Cancer Res.* 57(12):2354-57

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-79

Osborne RJ, Hamster MG (2000) A Genomewide map showing regions of loss of heterogeneity/allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Res.*60: 3706-3712

Osborne C, Wilson P, Tripathy D (2004) Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostics and therapeutic applications. *Oncologist* 9:361-377

Ozcelik H, Antebi YJ, Cole D, Andrulis I (1996) Heteroduplex and protein truncation analysis of the BRCA1 185delAG mutation. *Hum. Genet.* 98: 310-312

Pantel K und Woelfle U (2004) Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors. *J Biol Regu Homeost Agents* 18: 120-125

Pellegata NS, Ranzani GN, Renault B, Fattorini P, Magni E, et al. (1993) Loss of heterozygosity and K-ras gene mutations in gastric cancer. *Hum. Genet.* 92: 244-49

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 406: 747-752

Pinkel D, Seagraves A, Sudar D, Clark S et al. (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat.Genet.* 20:207-211

Pittman J, Huang E, Dressman H, Hovng CP et al. (2004) Models for prediction of disease outcome based on multiple gene expression patterns and clinical data. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 101 :8341-8346

Pollascik TJ, Cairns P, Epstein JI, Fuzesi L, et al. (1996) Distal nephron renal tumors : microsatellite allelotype. *Cancer Res.* 56 : 1892-95

Pollack JR, Sorlie T, Perou CM et al. (2002) Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional programme of human breast tumors. *Proc. Nat Acad Sci USA* 99: 12963-12968

Ponder B (1994) Searches begin and end. *Nature* 371, Sep 22(6495): 279

Popat S, Hubner R, Houlsten RS (2005) Systematic review of microsatellit instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 23: 609-618

Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck HD, Drzeniek Z, Helmchen U, Löning T, Wagener C (1996) CD 66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen familiy, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J. Histochem. And Cytochem.* 44: 35-41

Preiß, Dornoff, Hagmann, Schmieder (1999) Empfehlungen zur Therapie. *Onkologie* 1999(Onkologische Arbeitsgemeinschaft Saar-Pfalz-Mosel-eV): 120-128

Rahman N, Seal S, Thompson D et al. (2007) PALB2, which encodes a BRCA2 interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat.Genet.* 39:165-167

Rahman N, Teare MD, Seal S et al. (2000) Absence of evidence for familial breast cancer

susceptibility gene at chromosome 8p12-p22. *Oncogene* 19: 4170-4173

Reid S, Schindler D, Hananberg H et al. (2007) Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet.* 39:162-164

Riethdorf L, Lisboa BW, Henkel W, Naumann M, Wagner C, Löning T. (1997) Differential expression of CD66a(BGP), a cell adhesion molecule of carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant and malignant lesions of human mammary gland. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 957-963

Regitnig P, Moser R, Thalhammer M, et al. (2002) Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding local recurrences. *J. Pathol.* 198: 190-197

Renwick A, Thompson D, Seal S et al. (2006) ATM mutations that cause ataxia-teleangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat. Genet.* 38: 873-875

Roa B, Boyd A, Volcik K, Richards CS (1996) Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat. Genet.* 14: 188-90

Rosen und Obermann, 1992. zitiert in Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (1999) *Kompandium internistischer Onkologie.* 3 Auflage. Seite 395

Rosenberg M, Nedellec P, Jothy S, Fleiszer D, Turbide C, Beauchemin N (1993) The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer Res.* 53: 4938-45

Royle R, Gorman P, Harris W, et al. (1999) Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res.* 59: 1433-1436

Sachs L (1992) *Angewandte Statistik,* 7 Aufl. Springer Verlag . S. 311-16 und 477-79

Sasaki M, Okamoto M, Sato C, Sugio K, Soejima JI, Iwama T, et al. (1989) Loss of constitutional heterozygosity in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli and those with nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 49 : 4402-06

Sasaki T, Tahira T, Suzuki A et al. (2001) Precise estimation of single-nucleotide polymorphisms by quantitative SSCP analysis of pooled DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 214-218

Sato T, Tamigami A, Yamakawa K, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y (1990) Allelotype of breast cancer. Cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res.* 50: 7184-89

Schlechter BL, Young G, Larson PL et al. (2004) Quantitative DNA fingerprinting may distinguish new primary breast cancers from disease recurrence. *J. Clin. Oncol.* 22 : 1830-1838

Scully R, Livingston DM (2000) In search of the tumor suppression functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408: 429-432

Schmutzler R K, Homann A, Bierhoff E, Wiestler O D, Daimling A, Krebs D (1995)

Nachweis genetischer Alterationen in sporadischen Brusttumoren. Gyn. Geburtshilfliche Rundsch. 35 (Suppl. 1), 63-67

Schwarzenbach H, Müller V, Stahmann N, Pantel K.(2004) Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer. Ann. N.Y.Acad. Sci. 1022: 25-32

Schwarzenbach H, Chun FK, Lange I et al. (2007) Detection of tumor specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. Int. J. Cancer 120: 1465-1471

Seal S, Barfoot R, Jayatilika H, Smith P et al. (2003) Evaluation of fanconi anemia genes in familial breast cancer predisposition. Cancer Res. 63: 8596-8599

Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A et al.(2006) Truncating mutations in the fanconi anemia J gene BRIP1 are low penetrance breast cancer susceptibility alleles. Nat.Genet :38: 1239-1241

Seitz S, Rohde K, Bender E, Nothnagel A et al. (1997) Deletion mapping and linkage analysis provide strong indication for the involvement of human chromosome 8p12-p22 in breast carcinogenesis. Brit. J Cancer 76: 983-991

Selim AG, Ryan A, El-Ayat GA, Wells CA (2002) Loss of heterozygosity and allelic imbalance in apocrine metaplasia of breast: microdissection microsatellite analysis. J Pathol 196: 287-291

Selim AG, Ryan A, El-Ayat GA, Walls CA (2001) Loss of heterozygosity and allelic imbalance in apocrine adenosis of the breast. Cancer Detect Prev 25: 262-267

Shattuck-Eidens D, Mc. Clure M, Simard J, Labrie F, Naod S, Couch F et al.(1995) A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA 1 breast and ovarian susceptibility gene JAMA 273: 535-541

Shen TS, Vortmeyer AO, Zhuang Z, Tavasolli FA.(1999) High frequency of allelic loss of BRCA2 gene in pregnancy associated breast cancer. J.Nat.Cancer Inst. 91: 1680-1687

Shinozaki M, Hoon DSB, Guliano AE et al. (2005) Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with entimental node metastasis. Clin Cancer Res. 11: 2156-2162

Silverstein MJ, Waisman JR, Gierson ED et al.(1991) Radiation therapy for intraductal carcinoma. Is it an equal alternative. Arch Surg 126: 1541-1542

Simard J, Feunteun J, Lenoir G, Tonin P, Nomand F, LuuT, Vivier A, et al.(1993) Genetic mapping of the breast- ovarian cancer syndrome to a small interval on chromosome 17q12-21 exclusion of candidate genes. EDH 17B2 and RARA. Hum. Mut. Genet. 2: 1193-99

Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommen J et al.(1994) Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. N. Genet. 8: 8399-8404

Sippel, CJ, Suchy, FJ, Ananthanarayan M, Perlumutter DH et al.:(1993)The rat liver ecto-ATPase is also a canalicular bile acid transport proteine. J. Biol. Chem. 268: 2083-2091

Skolnick M (1994) The glittering prize. Nature Genet. 8: 105-06

- Skubitz KM, Ducks TP, Skubitz AP, Goulli SA (1993) Antiserum to carcinoembryonic antigen recognizes a phosphotyrosine – containing protein in human colon cancer cell lines. *FEBS- Lett.* 318: 200-204
- Smith SA, Easton DF, Evans DGR, Ponder BAJ, et al.(1992) Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nat. Genet.* 2: 128-31
- Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, et al.(1987) Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 328 : 616-19
- Song H, Ramus SJ, Kjaer SK et al. (2007) Tagging single nucleotide polymorphisms in the BRIP1 gene and susceptibility to breast and ovarian cancer. *PLoS ONE.* 7: 268
- Sorlie T, Andersen TL, Borresen-Dale AL (1998) Mutation screening of BRCA1 using PTT and LOH analysis at 17q21 in breast cancer carcinomas from familial and nonfamilial cases. *Breast Cancer Res Treat* 48: 259-264
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad Sci USA* 98: 10869-10874
- Stacey SN, Manolescu A, Sulem P et al. (2007) Common variants on chromosomes 2q25 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nature Genet.* 39 :865-869
- Struwing JP, Abeliovich D, Peretz T, Avihai N, Laback MM, Collins FS, and Brody LC(1995a) The carrier frequency of the BRCA1 185 del AG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat. Genet.* 11: 198-200
- Struwing JP, Brody LC, Erdos MR, Kase RG, Giambarras TR, Smith SH, Collins FS, et al. (1995b) Detection of eight BRCA1 mutations in 10 breast/ovarian cancer families, including 1 family with male breast cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 1-7
- Taback B, Saha S, Hoon DS (2006) Comparative analysis of mesenteric and peripheral blood circulating tumor DNA in colorectal cancer patients. *Ann NY Acad Sci* 1075: 197-2003
- Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A et al. (1995) Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer. Prognostic implications. *Clin. Cancer Res.* 1:1455-1461
- Tavtigian SV, Simrad J, Rommels J et al. (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q linked kindreds. *Nat Genet* 12: 333-337
- Thompson E, Dragovic RL, Stephanson SA, Eccles DM, Campbell IG, Dobrovic A.(2005) A novel duplication polymorphism in FANCA promoter and its association with breast and ovarian cancer. *BMC Cancer* 5: 43-48
- Thompson D and Easton DF (2002) Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J.Nat.Cancer Inst.*94: 1358-1365
- Thompson D, Szabo CI, Mangion J, et al. (2002) Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from breast cancer consortium. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA* . 99: 827-831
- Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 5: 344-46
- Thompson ME (1995) Molecular cloning and expression of CEA gene family members.

Tumor Biol. 16: 10-16

Tomlinson IPM, Lambros NBK, Roynance RR (2002) Loss of heterozygosity analysis: Practically and conceptually flawed? *Genes Chr. Cancer* 34 : 349-353

Tonin P, Weber B, Offit K, Crauch F, Rebbeck TR, Neuhausen S, et al. (1996) Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat. Med.* 2: 1179-83

Triggs-Raine BL, Gravel RA (1989) Diagnostic heteroduplexes. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 337-39

Valamathi MT, Sawney M, Deo SSV et al. (2004) Novel germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in Indian breast cancer families *Hum. Mut.* 23: 205-216

Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, et al. (2002) A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 347: 1999-2009

Van der Looij C, Jansen AM, Van Eijck R et al. (2002) A sporadic breast tumor with a somatic acquired complex genomic rearrangement in BRCA1 *Genes Chrom. Cancer.* 27 : 295-302

Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536

Van't Veer LJ, Paik S, Hayes DF (2005) Gene expression profiling of breast cancer: A new tumor marker. *J. Clin. Oncol.* 23: 1631-1635

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, et al. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319: 525-32

Vogelstein B, Kinzler KW (1994) Has the breast cancer gene been found. *Cell* 79: 1-3

Wagener C (1996) Einführung in die Molekulare Onkologie. Thieme Verlag, Stuttgart

Walsh T, King MC (2007) Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* 11, February

Washington C, Delbague F, Abero F, et al. (2000) Loss of heterozygosity in fibrocytic change of breast cancer: genetic relationship between benign proliferative and associated carcinomas *Am J Pathol.* 157: 323-329

Wehner M, Buschhausen L, Lamberti C, Kruse R, et al. (1997) Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). Eight novel germline mutations in hMSH2 or hMLH1 genes. *Hum. Mut.* 10: 241-44

White BM, Carvalho M, Derse D, O'Brien J, Dean M (1992) Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12: 301-06

Widschwendner M, Siegmund KD, Muller HM, Fiegel H, Marth C, Muller-Holzner E, Jones PA, Laird PW (2004) Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res.* 64: 3807-3813

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, et al. (1994) Localisation for a breast cancer susceptibility gene, BRCA 2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265: 2088-90

Wooster R, Bignell G, Lancaster J et al. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378: 789-792

Wooster R, Weber BL (2003) Genomic medicine: Breast and ovarian cancer. *N Engl. J Med.*

348: 2339-2347

Xia B, Dorman JC, Ameziane N et al.(2007) Fanconi anemia is associated with a defect in BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet.* 39: 159-161

Yamashita T, Iwasave H, Yamashita I et al.(1996) Low frequency of heterozygosity in BRCA1 region in japanese sporadic breast cancers. *Breast Cancer* 3: 167-173

Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, Shinohara H, Yamauchi A, et al. (1999) Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and is frequent loss in BRCA1-associated cases. *Clin.-Cancer Res.* 5:1249-61

Zelada-Hedman M, Torrella M, Mesyuita R, Nordenskjold M, Skoog L, Lindlom A (1994) Loss of heterozygosity studies in tumors from families with breast-ovarian cancer syndrome. *Hum. Genet.* 94: 231-34

Zelada-Hedman M, Borresen-Dale AC, Claxo A, Chen J, Skoog L, Lindblom A (1997) Screening for TP53 mutations in patients and tumors in 109 swedish breast cancer families. *Br J Cancer* 75: 1201-1204

Zhao H, Langerod A, Ji Y et al. (2004) Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of breast . *Mol. Biol. Cell.* 15: 2523-2536