

**Aus dem Institut für Humangenetik
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Direktor: Prof. Dr. A. Gal

**Mutationsanalyse der Gene FANCE, Kiss1 und PIK3CA bei
sporadischem Brustkrebs**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Christiane Droßbach
aus Hamburg
Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: *5. 1. 2020*

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: *Prof Dr. S. Singh*
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: *Prof Dr. E. Dikomey*
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: *Prof Dr. B. Brandt*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Fragestellung.....	6
2. Einführung.....	7
2.1 Brustkrebs	7
2.1.1 Epidemiologie, Klinik und Diagnostik.....	7
2.1.2 Prädisponierende Faktoren.....	9
2.1.3 Genetik des sporadischen Mammakarzinoms.....	10
2.2 Fanconi Anämie, Komplementärgruppe E (FANCE).....	11
2.2.1 Genetik der Fanconi Anämie.....	12
2.2.2 FANCE.....	13
2.2.3 Einige Informationen zu anderen Komplementationsgruppen.....	13
2.2.4 FA/BRCA-Signalweg.....	15
2.3 Kiss1	19
2.4 Phosphatidylinositolkinase-3-Ca (PIK3CA).....	21
3. Material und Methoden.....	23
3.1 Chemikalien	23
3.2 Enzyme	23
3.3 Puffer, Lösungen und Medien	23
3.4 Verwendete Geräte	25
3.5 Materialien: Tumorgewebe und Zelllinien	26
3.6 Kultur der Zelllinien	27
3.6.1 Primärkultur.....	27
3.6.2 Subkultur.....	27
3.6.3 Kryokonservierung.....	27
3.7 DNA-Isolierung.....	28
3.7.1 Isolierung genomischer DNA aus Blut.....	28
3.7.2 Isolierung genomischer DNA aus Tumorgewebe.....	29
3.7.3 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen.....	29
3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
3.8.1 Prinzipien der PCR.....	30
3.8.2 Oligonukleotidprimer.....	31

3.8.3 Durchführung der PCR.....	32
3.9 Agarosegel- Elektrophorese.....	33
3.9.1 Herstellung des Agarosegels.....	33
3.9.2 Laden der Agarosegele.....	34
3.9.3 Durchführung der Elektrophorese.....	34
3.9.4 Färben und Dokumentation der Agarosegele.....	35
3.10 SSCP-Gel-Elektrophorese (Single Strand Conformation Polymorphism).....	35
3.10.1 Prinzipien des SSCP-Gels.....	35
3.10.2 Herstellung der SSCP-Gele.....	36
3.10.3 Vorbereitung von Gel und Elektrophoresekammer.....	37
3.10.4 Vorbereitung der Proben.....	37
3.10.5 Durchführung der Polyacrylamid-Elektrophorese.....	37
3.10.6 Färbung des SSCP-Gels und Dokumentation.....	38
3.11 Nichtradioaktive Sequenzierung der PCR-Produkte.....	38
3.11.1 Prinzipien der nichtradioaktiven Sequenzierung.....	38
3.11.2 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	39
3.11.3 Sequenzierungs-PCR.....	40
3.11.4 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte.....	40
3.11.5 Fragmentanalyse mit dem ABI Prism DNA-Analyzer	41
3.12 Restriktionsschnitt Analyse	41
3.13 Bestimmung der DNA-Konzentration	42
3.13.1 Spektrophotometrie.....	42
3.13.2 DNA-Konzentrationsabschätzung anhand eines DNA-Standards.....	42
3.14 RNA-Präparation aus kultivierten Zellen.....	42
3.15 Herstellung von cDNA.....	43
4. Ergebnisse.....	44
4.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Qualitätskontrolle durch Gelelektrophorese	44
4.2 SSCP-Mutationsanalyse	46
4.3 DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte	49
4.4 cDNA-Erstellung und Sequenzierung	59
5. Diskussion.....	60
6. Zusammenfassung.....	67
7. Literatur.....	68
8. Anhang.....	78

Danksagung.....	78
Lebenslauf.....	79
Eidesstattliche Versicherung.....	80

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung	Seite 8
Tabelle 2	Charakteristika der 13 Fanconi Gene	Seite 12
Tabelle 3	Überblick über die verwendeten Primer, sowie deren Annealing-Temperatur	Seite 31
Tabelle 4	In dieser Arbeit gefundene Mutationen	Seite 54
Tabelle 5	Häufigkeiten von Polymorphismen bei <i>FANCE</i>	Seite 54
Abbildung 1	Lokalisationshäufigkeiten der Tumorknoten	Seite 7
Abbildung 2	FA/BRCA-Signalweg	Seite 18
Abbildung 3	Skizze PIK-Akt-Signalweg	Seite 22
Abbildung 4	Agarose-Gel mit Marker	Seite 45
Abbildung 5	SSCP-Gel <i>FANCE</i> , Exon 2, Tumor-DNA	Seite 46
Abbildung 6	SSCP-Gel <i>FANCE</i> , Exon 5, Tumor-DNA	Seite 46
Abbildung 7	Komplettes SSCP-Gel, <i>FANCE</i> , Exon 6, Tumor-DNA	Seite 47
Abbildung 8	SSCP-Gel, <i>FANCE</i> , Exon 6, Tumor-DNA	Seite 47
Abbildung 9	SSCP-Gel, <i>Kiss1</i> , Exon 3, Tumor-DNA	Seite 48
Abbildung 10	SSCP-Gel, <i>PIK3CA</i> , Exon 20, Tumor-DNA	Seite 48
Abbildung 11	Sequenzen <i>FANCE</i> , Exon 2; Polymorphismus an mRNA-Position 572	Seite 51
Abbildung 12	Sequenzen <i>FANCE</i> , Intron 3, Polymorphismus im Intron 3	Seite 52
Abbildung 13	Sequenzen <i>FANCE</i> , Exon 9, Polymorphismus mit Missense-Mutation an mRNA-Position 1689	Seite 53
Abbildung 14	Sequenzen, <i>Kiss1</i> , Exon 2	Seite 55
Abbildung 15	Sequenzen <i>Kiss1</i> , Exon 3	Seite 56
Abbildung 16	Sequenzen <i>Kiss1</i> , Exon 4	Seite 57
Abbildung 17	Sequenzen <i>PIK3CA</i> , Exon 20, ↓ Mutation A3140G; + Polymorphismus an Position 3202	Seite 58
Abbildung 18	Sequenz der cDNA von <i>FANCE</i> , Exon 4, 5, 6	Seite 59

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
AP	Activator Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
Ca	Carcinom/Karzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Fanconi Anämie
FAAP	Fanconi Anämie assoziiertes Protein
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HR	Homologe Rekombination
KP	Kisspeptid
NLS	Nucleus Localisation Signal
LOH	Loss of Heterozygosity
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLS	Kernlokalisationssignal (Nucleus localization signal)
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIP2	Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidyl-3,4,5-Triphosphat
P3K	Phosphatidylinositol-3-Kinasen
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SP1	Specifity Protein
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin

1. Fragestellung

Brustkrebs ist in den westlichen Ländern der häufigste maligne Tumor der Frau mit ca. 18000 Todesfällen pro Jahr in Deutschland. Im metastasierten Stadium sind keine Heilungsmöglichkeiten bekannt. Es ist daher von großer Wichtigkeit, die genetischen Grundlagen, insbesondere für sporadischen Brustkrebs, zu verstehen. Aus diesem Wissen können sich neue Möglichkeiten zur frühen Diagnostik, zu Therapien und prognostischen Markern der Erkrankung ergeben. Es ist bekannt, dass ca. 5% der Brustkrebspatienten erblich belastet sind. Dies ist hauptsächlich auf Keimbahnmutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* zurückzuführen. Die anderen 95% der Brustkrebserkrankungen treten sporadisch auf, mit polygenen somatischen Mutationen deren Mechanismus bisher nicht bekannt ist. Wahrscheinliche Kandidaten sind hier Gene, deren Produkte an Prozessen des Zellzyklus, der DNA-Reparatur oder der Apoptose direkt oder indirekt beteiligt sind. Kürzlich wurde ein neuer Signalweg zur DNA-Reparatur aufgeklärt in dem *BRCA1* und *BRCA2* mit mindestens 8 der bekannten 11 Fanconi Anämie-Genen (*FANCA*; *FANCB*; *FANCC*; *FANCD1*; *FANCD2*; *FANCE*; *FANCF*; *FANCG*) interagieren.

Um dieser Frage nachzugehen, soll in dieser Dissertation in einem Kollektiv von 42 Brustkrebspatienten und 5 Brustkrebs-Zelllinien eine Mutationsanalyse für das Gen ***FANCE*** durchgeführt werden. Außerdem soll das vermutliche Metastasensuppressorgen ***Kiss1*** analysiert werden. Zu diesem Zweck soll zunächst Tumor-DNA und DNA der Zelllinien nach DNA-Präparation mit PCR in allen Exons, einschließlich Exon-Intron-Boundaries amplifiziert werden und dann mit SSCP-Elektrophorese und direkter Sequenzierung untersucht werden. Sollten sich Mutationen finden, wird mithilfe von Blut-DNA der entsprechenden Patienten untersucht, ob es sich eventuell um Keimbahnmutationen handelt. Beide Gene sind wegen ihrer verhältnismäßig kleinen Größe ausgewählt worden um den finanziellen Aufwand gering zu halten.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen auffällig hohen Mutationsraten in den Exons 9 und 20 bei dem Gen ***PIK3CA*** bei Brustkrebs, sollen bei etwa 15 Tumoren auch hier Mutationsanalysen zur Kontrolle der Methoden durchgeführt werden.

2.Einführung

2.1 Brustkrebs

2.1.1 Epidemiologie, Klinik und Diagnostik

Brustkrebs, ein vom Epithel ausgehender Tumor, ist in den westlichen Ländern einer der häufigsten malignen Tumore der Frau. Das Erkrankungsrisiko beträgt ca. 7-10%, dies bedeutet etwa 45000-50000 Neuerkrankungen allein in Deutschland pro Jahr. Dabei ist ein Altersgipfel zwischen 50 und 70 Jahren zu beobachten. Der Anteil erkrankter Frauen unter 40 Jahre, sowie die absolute Häufigkeit, scheinen in westlichen Ländern, beziehungsweise Ländern die verwestlichen anzusteigen.

Die Erkrankung ist als systemisch anzusehen. Sie tritt häufig multizentrisch auf und auch bei früher Diagnose (Stadium 1 oder 2, s. Tabelle 1) hat oft schon eine Metastasierung stattgefunden. Diese lässt sich jedoch vielfach erst später nachweisen.

Es gibt keine Frühsymptome, oft ist der erste Hinweis ein tastbarer Knoten in der Brust (Lokalisationsverteilung siehe Abbildung 1). Dieser ist in der Regel derb und schmerzlos und wird zu etwa 60% von den Frauen selbst entdeckt. Weitere Hinweise sind Einziehung oder Unverschieblichkeit der Haut, Retraktion der Mamille, Orangenhaut oder Hautödeme. Es kann auch zu tastbaren Knoten in der Haut oder der Axilla kommen sowie zum Lymphödem des ipsilateralen Armes. Bei sehr fortgeschrittenen Tumoren kommt es zur Fixation des Tumors am Musculus pectoralis oder am Thorax sowie zum exulzierenden Karzinom (Haag et al. 2005).

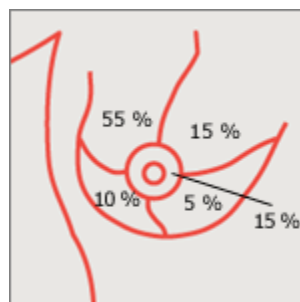


Abbildung 1: Lokalisationshäufigkeiten der Tumorknoten (nach Haag et al. 2005)

Metastasen finden sich besonders in den Lymphknoten der ipsilateralen Axilla und bei hämatogener Aussaat in Knochen, Leber, Pleura, Lunge, Haut, Gehirn oder Ovarien.

T= Tumor	
Tcis	Carcinoma in situ= nicht infiltrierendes intraduktales Ca o. Lobuläres Ca in situ o. M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T1	Tumor <2cm (T1mic: <0,1cm; T1a: 0,1-0,5cm; T1b: 0,5-1cm; T1c 1-2cm)
T2	Tumor 2-5cm
T3	Tumor >5cm
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Brustwand (T4a) oder Haut (T4b); (T4c=T4a+T4b), entzündliches Ca (T4d)
N= Node (Lymphknoten)	
N0	Keine Lymphknoten befallen
N1mic	Lymphknoten Mikrometastase (>0,02-0,2cm)
N1	1-3 bewegliche ipsilaterale axilläre Lymphknoten (N1a), ipsilaterale Lymphknotenmikrometastasen entlang der A. Mammaria interna (N1b), (N1c=N1a+N1b)
N2	4-9 fixierte ipsilaterale axilläre Lymphknoten (N2a), ipsilaterale klinisch erkennbare Metastase entlang der A. Mammaria interna (N2b) ohne gleichzeitige axilläre Metastasen
N3	Metastasen ab 10 ipsilateralen Lymphknoten oder ipsilaterale infraklavikuläre Lymphknoten (N3a), Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. Mammaria interna und axilläre Lymphknoten (N3b) oder ipsilaterale supraklavikuläre Lymphknoten (N3c)
M= Metastasen	
M1	Nachgewiesene Fernmetastasen (auch kontralaterale Mamma, zervikale Lymphknoten, Lymphknoten entlang der kontralateralen A. Mammaria interna)

Stadien:

- I: T1N0M0
- IIA: T2N0M0 und T1N1M0
- IIB: T3N0M0 und T2N1M0
- IIIA: T1-2N2M0 und T3N1-2M0
- IIIB: T4N0-2M0
- IIIC: alle N3M0
- IV: alle M1

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung nach Haag et al. 2005

Zur Früherkennung eines Brustkrebs` sollte die Brust regelmäßig auch von den Frauen selber untersucht und Mammographien durchgeführt werden.

Zur Diagnostik gehören neben einer ausführlichen Anamnese (inklusive Familienanamnese) und einer körperlichen Untersuchung eine Bildgebung

(Mammographie, Sonographie, NMR), die Gewinnung von Material für eine histologische Tumorbestimmung, Bestimmung des Hormonrezeptorstatus und des HER2-Proteins sowie ein komplettes Staging zur Metastasensuche und Laboruntersuchungen mit Hormonbestimmung (prä- oder postmenopausales Karzinom?) und Tumormarkern (CEA, CA 15-3, CA 19-9) zur Verlaufskontrolle. Die Therapieentscheidungen erfolgen anhand der TNM-Klassifikation sowie des Hormonrezeptorstatus und einer eventuellen Metastasierung.

Nach wie vor sind operative Eingriffe, zunehmend brusterhaltend durchgeführt, und Radiatio, sowie die klassische Chemotherapie (in der Regel eine Polychemotherapie mit 5-Fluorouracil, Cyclophosphamid und einem Anthracyclin) wichtige therapeutische Optionen. Hinzu kommt bei einem positiven Hormonrezeptorstatus die Gabe von Antiöstrogenen (Tamoxifen), Gestagenen (Methoxyprogesteron-Acetat), Androgenen oder Aromatasehemmern (diese verhindern die Bildung von Östrogenen, z.B. Anastrozol, Letrozol). Bei Patientinnen, bei denen eine HER2-Überexpression nachgewiesen wurde, kann der monoklonale Antikörper Trastuzumab gegeben werden.

2.1.2 Prädisponierende Faktoren

Es gibt viele prädisponierende Faktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms. Etliche sind von der geographischen Lage abhängig, wie zum Beispiel Sonnenlicht oder Umgebungstrahlung. Zu nennen sind auch hormonale Faktoren wie zum Beispiel Nulliparität, späte Erstparität, nicht Stillen, frühe Menarche und späte Menopause. Ebenso spielen verschiedene Umweltgifte (DDT, Lindane), Nikotin- und Alkoholabusus, Bestrahlung in der Jugend, Diabetes mellitus, Adipositas (besonders nach der Menopause), Brustkrebs der Gegenseite, Bewegungsmangel und ganz allgemein das Alter eine Rolle.

Verschiedene Syndrome erhöhen das Risiko (Li-Fraumeni-Syndrom [*TP53*-Gen], Ataxia teleangiectatica [*ATM*-Gen], Cowden-Syndrom [*PTEN*-Gen]). Ganz entscheidend wird das Mammakarzinomrisiko durch eine bestehende familiäre Disposition erhöht (ca. 5-10% aller Fälle). Patienten mit Betroffenen in

der nahen Verwandtschaft (z.B. Mutter, Schwester, Vater), insbesondere bei frühem Erkrankungsbeginn haben ein bis zu achtfach erhöhtes Risiko.

Wird eine Mutation der bekannten Tumorsuppressor-Gene *BRCA1* oder *BRCA2* nachgewiesen, steigt das Risiko auf das 10-20fache an (Russo u. Russo 2004; Schmidt-Matthiesen 2005). Etwa zwei Drittel der Patienten mit familiärem Brustkrebs weisen eine solche Mutation auf (Venkitaraman 2004). Behandlung, Verlauf oder Prognose lassen sich durch den Nachweis einer BRCA-Mutation jedoch nicht vorhersagen oder beeinflussen. Es bleiben bisher lediglich frühere und intensivere Vorsorgemaßnahmen und bei Auftreten eines Karzinoms die Therapie nach Histologie, Staging etc.

2.1.3 Genetik des sporadischen Mammakarzinoms

Das sporadische Mammakarzinom macht mit etwa 95% den Großteil der Erkrankungen aus (Haag et al. 2005).

Es kommt bei diesen Erkrankungen nur selten zu Mutationen der *BRCA1*- und *BRCA2*-Gene (Khoo et al. 1999, Miki et al. 1996), jedoch finden sich häufig Allelverluste (Schmutzler et al. 1997). Auch die Expression von *BRCA1* ist in knapp 30% der sporadischen Erkrankungen vermindert (Yoshikawa et al. 1999). Kinzler und Vogelstein haben 1997 die Unterscheidung von Caretaker- und Gatekeeper-Genen vorgestellt. Letztere initiieren den Zelltod oder führen zu einem Zellzyklusarrest, während die Caretaker-Gene das Genom vor Mutationen schützen (van Heemst et al. 2007). Es scheint also recht häufig in irgendeiner Form die Funktion der *BRCA1*- und *BRCA2*-Genprodukte betroffen zu sein, die zu den Caretaker-Genen gezählt werden. Sie sind über einen komplexen Signalweg an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt (siehe 2.2.5 FA/BRCA-Signalweg).

In ca. 50% der Erkrankungsfälle findet sich eine Mutation in *TP53* (Thorlacius et al. 1995). Dieses Gen wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es an der Kontrolle des Zellzyklus, der Induktion von Apoptose und der DNA-Reparatur mitwirkt (Wikipedia 12.03.2008). Etwa 10% der Brusttumoren weisen eine Mutation im *PTEN*-Gen, einem Tumorsuppressorgen, auf (Li et al. 1997). Dieses Protein ist an der Regulierung der Zellteilung beteiligt. 2007 berichteten

Hunter et al. von einem SNP (Single Nucleotid Polymorphism) im Intron 2 des *FGFR*-Gen. Dieser ist assoziiert mit sporadischem Brustkrebs. Des weiteren wird von *CASP8* (Cox et al. 2007), *TNRC9*, *MAP3K1* und *LSP1* (Easton et al. 2007) im Zusammenhang mit Brustkrebs berichtet.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass weitere Gene gefunden werden, die mit Brustkrebs assoziiert sind. Deren genaue Bedeutung für die Kanzerogenese und Metastasenbildung zu erforschen, wird noch etliche Zeit dauern. Wichtig ist auch zu klären, welche Bedeutung diese Genveränderungen im Hinblick auf Therapie oder Prognose der Erkrankung haben. In dieser Arbeit wurden ein Gen aus dem FA-BRCA-Signalweg zur DNA-Reparatur (*FANCE*) sowie ein Metastasensuppressorgen (*Kiss1*) auf Mutationen untersucht. Als Kontrolle wurden einige Proben bezüglich Mutationen in *PIK3CA* untersucht.

2.2 Fanconi Anämie, Komplementärgruppe E (*FANCE*)

Fanconi Anämie ist eine seltene autosomal- und X-Chromosomal-rezessive Erbkrankheit, die alle ethnischen Gruppen betrifft. Sie hat Knochenmarkversagen, körperliche Anomalien sowie ein erhöhtes Krebsrisiko zur Folge. Diese Symptome entstehen nach bisherigen Forschungsergebnissen durch die Rolle der Fanconi Anämie Proteine an der DNA-Reparatur. Über weitere Aufgaben der Proteine ist bisher wenig bekannt.

Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung 1927 von dem Schweizer Pädiater Professor Guido Fanconi.

Die Prävalenz liegt bei ca. 1-5 pro 1 Millionen Einwohner weltweit und die Hetereozygotenrate bei 0,3-1% (Joenje u. Patel 2001). Die Erkrankung zeichnet sich durch eine große Variabilität bei Phänotyp und Genotyp aus. Es gibt die typische Form, in der hämatologische Veränderungen und körperliche Anomalien kombiniert auftreten. Aber es gibt auch Betroffene, bei denen nur das eine oder andere auftritt. Auch innerhalb einer Familie variiert die Erkrankung sehr stark bezüglich der Symptome und der Verlaufsform (Hoffman et al. 1991).

2.2.1 Genetik der Fanconi Anämie

Die genetischen Grundlagen der Erkrankung sind sehr unterschiedlich. Mittlerweile sind 13 verschiedene Komplementationsgruppen bekannt, denen jeweils ein anderes Gen und damit Protein zugrunde liegt. Innerhalb der Gruppen gibt es wiederum verschiedene Mutationen, welche die Krankheit im Schweregrad differieren lassen. Wie Tabelle 2 zeigt, sind die Gene über das gesamte Genom verteilt.

Gruppe (Häufigkeit)	Gen	Genlokus	Exons	Protein- größe	Amino- säuren
A (66%)	<i>FANCA</i>	16q24.3	43	163 kDa	1455
B (~2%)	<i>FANCB</i>	Xp22.31	9	95	859
C (10%)	<i>FANCC</i>	9q22.3	15	63	558
D1 (~2%)	<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12-13	28	380	3418
D2 (~2%)	<i>FANCD2</i>	3p25.3	44	155, 162	1451
E (2%)	<i>FANCE</i>	6p21-22	10	60	536
F (2%)	<i>FANCF</i>	11p15	1	42	374
G (9%)	<i>FANCG/XRCC9</i>	9p13	14	68	622
I (~2%)	<i>FANKI/KIAA1794</i>	15q25-26	37	140,147	1268
J (~2%)	<i>FANCJ/BRIP1/BACH1</i>	17q22-24	20	141	1249
L (<0,2%)	<i>FANCL/PHF9/POG</i> (FAAP43)	2p16.1	14	43	375
M (<0,2%)	<i>FANCM/Hef</i> (FAAP250)	14q21.2	23	250	2048
N (~2%)	<i>FANCN/PALB2</i>	16p12.1	13	131	1186

Tabelle 2 Charakteristika der 13 Fanconi Gene nach Wang 2007, Seal et al. 2003, Ensembl 12.02.08

Viele Gene weisen nur zu anderen Vertebraten Homologien auf. Bei *FANCD2* gibt es jedoch auch Homologien zum Beispiel mit *Drosophila melanogaster*. Es scheint also, als ob *FANCD2* entwicklungsgeschichtlich älter sei und die anderen Gruppen sich später gebildet haben (Blom et al. 2002, Joenje u. Patel 2001). Auch die Gruppen *FANCI*, *FANCJ*, *FANCL* und *FANCM* sind nicht nur bei Vertebraten zu finden (Wang 2007).

2.2.2 FANCE

Das von mir untersuchte Gen *FANCE* verbindet den von den Fanconi Proteinen gebildeten Kernkomplex mit den bekannten Genen für ein erhöhtes Brustkrebsrisiko *BRCA1* und *BRCA2* (siehe unten und Abbildung 2). Mutationen führen zu besonders schweren Krankheitsverläufen und einem sehr hohen Risiko an akuter myeloischer Leukämie (AML) zu erkranken (Medhurst et al. 2001). *FANCE* liegt auf Chromosom 6p21.2-22.3. In dieser Region liegen auch Gene für Histone und der Major Histocompatibility Complex Class II (HLA II). Dies macht es im Falle einer nötig gewordenen Knochenmarkstransplantation schwieriger nicht betroffene Geschwister zu finden, welche HLA-kompatibel sind. Die Patienten sind daher oft auf die weniger erfolgreiche Fremdtransplantation angewiesen (Waisfisz et al. 1999, de Winter et al. 2000a). Das Gen wird auf 10 Exons kodiert und umfasst 1611 Nukleotide beziehungsweise 536 Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt 59 kDa (de Winter et al. 2000a). Überraschenderweise zeigte eine kristallographische Analyse des stärker konservierten C-Terminus ein sich wiederholendes helikales Motiv, welches sich nicht aus der Aminosäuresequenz ableiten ließ (Nookala et al. 2007). Zwei Kernlokalisationssignale (NLS) scheinen im Protein vorhanden zu sein und führen zu einer vorwiegend nukleären Lokalisation (de Winter et al. 2000a, Pace et al. 2002). Phosphorylierungen an Thr346 und Ser374 durch *Chk1* sind für die Stabilisierung gegen Mitomycin C wichtig und erfolgen kurz nach einer DNA-Schädigung. Welche anderen Funktionen damit einhergehen und ob dadurch vielleicht der Abbau und damit eine negative Regulation erreicht wird, ist noch nicht klar (Wang et al. 2007). Die Funktion wird genauer in Kapitel 1.2.5 beschrieben.

2.2.3 Einige Informationen zu anderen Komplementationsgruppen

Bis heute sind die Proteine in ihrer Funktion weitgehend unbekannt. Sie enthalten wenige bekannte Domänen.

FANCA ist in allen Geweben vorhanden, die Konzentration ist jedoch in lymphatischem Gewebe, Hoden und Ovarien deutlich höher (Joenje u. Patel 2001). Es enthält zwei Kernlokalisationssignale (NLS) (Taniguchi u. D'Andrea

2006). Zwischen FANCA und FANCG gibt es eine direkte Interaktion (Garcia-Higuera et al. 1999, Medhurst et al. 2001, Léveille et al. 2004).

FANCB hat ebenfalls ein NLS (Taniguchi u. D'Andrea 2006) und bildet einen Subkomplex mit FANCL und FAAP100 (Ling et al. 2007). Es wird als einziges x-chromosomal vererbt (Meetei et al. 2004).

FANCC ist sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert. Es bildet einen Subkomplex mit FANCE (s.u.) (Medhurst et al. 2001). Zudem werden Funktionen im Cytoplasma postuliert, wie zum Beispiel die Beteiligung an Apoptosesignalen (Bogliolo et al. 2002, Taniguchi u. D'Andrea 2006) oder an der Detoxifikation von Radikalen (Pace et al. 2002).

FANCD1 ist identisch mit BRCA2. Monoallele Mutationen führen zu einem erhöhten Risiko für Brustkrebs, biallele Mutationen zu FA (Howlett et al. 2002). Es interagiert direkt mit RAD51 und reguliert darüber die homologe Rekombination (HR). Zudem stabilisiert es blockierte Replikationsgabeln (Taniguchi u. D'Andrea 2006). Es lagert sich an einzel- und doppelsträngige DNA an (D'Andrea 2003).

FANCD2 wird an Lysin 561 von FANCL monoubiquitiniert (Garcia-Higuera et al. 2001). Diese aktivierte Form ist besonders am Chromatin lokalisiert (Taniguchi u. D'Andrea 2006, Wang u. Andreassen 2004), wo auch BRCA1 ist. Es kommt wohl zu einer Interaktion zwischen FANCD2 und BRCA1 (Garcia-Higuera et al. 2001).

FANCF ist ein Protein, dessen Funktion bisher nicht gut aufgeklärt ist. Es ist vorwiegend im Kern lokalisiert (de Winter et al. 2000). Der C-Terminus geht eine Bindung mit FANCG ein und stabilisiert darüber die Bindung FANCA-FANCG (Medhurst et al. 2001, Medhurst et al. 2006). Der N-Terminus ist wichtig für eine direkte Interaktion mit dem FANCC-FANCE-Subkomplex (De Winter et al. 2000, Léveille et al. 2004, Medhurst et al. 2006).

FANCG scheint die Anwesenheit oder Aufrechterhaltung des Kernkomplexes zu verstärken (Garcia-Higuera 1999), was an den sieben TPRs im C-Terminus liegen könnte. Dies sind Tetratricopeptid-Wiederholungen (repeats= TPR), welche wohl Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Blom et al. 2002).

FANCI ist seit kurzem identifiziert (Dorsmann et al. 2007), es weist Homologien zu FANCD2 auf (Sims et al. 2007). Das Protein scheint parallel zu FANCD2

monoubiquitiniert zu werden und im Signalweg an ähnlicher Stelle seine Funktion zu haben (Smogorzewska et al. 2007, Wang 2007).

FANCI ist eine ATPase und 5'-3'-Helikase. Es bindet direkt an BRCA1 (Levrain et al. 2005, Taniguchi u. D'Andrea 2006). Über die genaue Funktion ist noch nicht viel bekannt. Eventuell wirkt es an *Translesion Synthesis* mit (Wang 2007).

FANCD1 ist eine E3-Ligase und scheint damit die katalytische Untereinheit des Komplexes für die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI zu sein (Meetei et al. 2003a, Taniguchi u. D'Andrea 2006, Wang 2007).

FANCF kommt vorwiegend im Kern vor und hat eine Helikase und eine Endonuklease Domäne, wobei letztere degeneriert ist und ihre Funktion verloren haben dürfte. Die Helikase Domäne scheint in vivo zu einer ATP-abhängigen Translokaseaktivität zu führen und darüber den Komplex an der DNA zu positionieren (Meetei et al. 2005, Wang 2007). Es wird bei DNA-Schäden phosphoryliert und interagiert direkt mit DNA (Meetei et al. 2005, Mosedale et al. 2005, Wang 2007).

FANCG interagiert mit BRCA2 und RAD51. Ein Mangel führt zu Instabilität und zu Fehllokalisationen von BRCA2 und zu schlechter HR-Reparatur (Wang 2007, Xia et al. 2006).

2.2.4 FA/BRCA-Signalweg

Die Fanconi-Anämie-Gene beteiligen sich an DNA-Reparaturmechanismen mittels des FA-Signalwegs oder auch FA/BRCA-Pathway. Dieser Pathway behebt mit homologer Rekombination Doppelstrangbrüche in der S-Phase sowie nach DNA-Schäden (Rothfuss u. Grompe 2004, Mi u. Kupfer 2005). Es wird auch von anderen Reparaturmechanismen berichtet, an denen sich der Signalweg beteiligt, wie zum Beispiel *Translesion synthesis* (Nakanishi et al. 2005).

Der entscheidende Schritt für die DNA-Reparatur ist die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI, welche voneinander abhängig sind (Smogorzewska et al. 2007, Wang 2007).

Das FA/BRCA-Netzwerk wird bei Replikationsproblemen durch Phosphorylierungen an FANCA, FANCE, FANCG und FANCM durch ATR aktiviert (auch CHEK1 und eventuell weitere Kinasen sind beteiligt) (Wang 2007, Wang et al. 2007).

Acht der FA-Proteine (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM) bilden zusammen mit FAAP24 und FAAP100 (FAAP= Fanconi Anämie Assoziiertes Protein) den Kernkomplex. Der Zusammentritt geschieht über verschiedene Subkomplexe (Medhurst et al. 2006, Nookala et al. 2007, Wang 2007).

Einer dieser Subkomplexe ist FANCE/FANCC. Beide sind voneinander abhängig bezüglich der Akkumulation im Kern und des Schutzes gegen DNA-Schäden. Diese Akkumulation ist nicht nur von den NLS abhängig, sondern auch von den Interaktionen mit FANCC. Fehlen die NLS bei FANCE, erfolgt die Akkumulation in Abhängigkeit von FANCC (Léveille et al. 2006). Ist FANCC unfähig in den Kern zu gelangen, verbleibt ein Teil von FANCE im Cytoplasma. FANCC braucht FANCE um im Kern zu akkumulieren (Pace et al. 2002, Taniguchi u. D'Andrea 2002) und wird dort eventuell von FANCA und FANCB stabilisiert (Léveille et al. 2006). Es werden mehrere FA-Proteine gebraucht um FANCE im Kern zu stabilisieren. (Léveille et al. 2006) Die Bindung FANCE/FANCC wird durch direkte Interaktion mit FANCF stabilisiert (Gordon et al. 2005, Léveille et al. 2004). FANCE hat eine schwache oder transiente Bindung an FANCA/FANCG (Medhurst et al. 2001), welche durch FANCF stabilisiert werden muss (Léveille et al. 2004).

Erst die vorhandene Bindung FANCE/FANCC mit FANCF ermöglicht die Zusammenlagerung mit den Subkomplexen FANCA/FANCG und FANCB/FANCL (Medhurst et al. 2006) um FANCM herum (Medhurst et al. 2006, Léveille et al. 2006) und erst alle Teile zusammen bilden den stabilen Komplex, der es FANCL ermöglicht je ein Ubiquitinmolekül auf FANCD2 und FANCI zu übertragen (Blom et al. 2002, Thomashewski et al. 2004, Wang 2007).

In Abbildung 2 soll versucht werden einen Teil der vielschichtigen und bisher nur in Ansätzen verstandenen Interaktionen zu verdeutlichen.

Ob die Subkomplexe noch andere Funktionen im Cytoplasma oder im Kern haben ist zur Zeit noch unklar.

FANCE/FANCC bildet einen stabilen Komplex mit FANCD2 (Pace et al. 2002, Gordon et al. 2005, Léveille et al. 2006) und könnte so die Übertragung von einem Ubiquitinmolekül erleichtern. Gleichzeitig interagiert es auch direkt mit BRCA2/FANCD1 am Chromatin (Léveille et al. 2006, Wang et al. 2004, Taniguchi u. D'Andrea 2006).

Aktiviertes FANCD2 lagert sich an Chromatin an, wo es unter anderem durch BRCA1 stabilisiert wird (Wang 2007). BRCA1 bindet direkt mit FANCD2 und bildet einen Komplex mit BRCA2/FANCD1 (Cantor u. Andreassen 2006). In diesem Teil des Pathways üben auch FANCD1, RAD50, NBS1, MRE11 und andere Proteine ihre Funktion aus (siehe Diskussion) (Wang 2007, Walsh u. King 2007).

Der Kernkomplex wiederum ist auch mit weiteren Genen verknüpft, die sich im Bloom-Syndrom-Komplex zusammenfassen lassen. Beide Komplexe zusammen werden zur Zeit als BRAF-Superkomplex (BLM [Bloomberg Syndrom], RPA [Replication Protein A], FA, Topo III α [Topoisomerase]) verstanden (Meetei et al. 2003, Wang 2007).

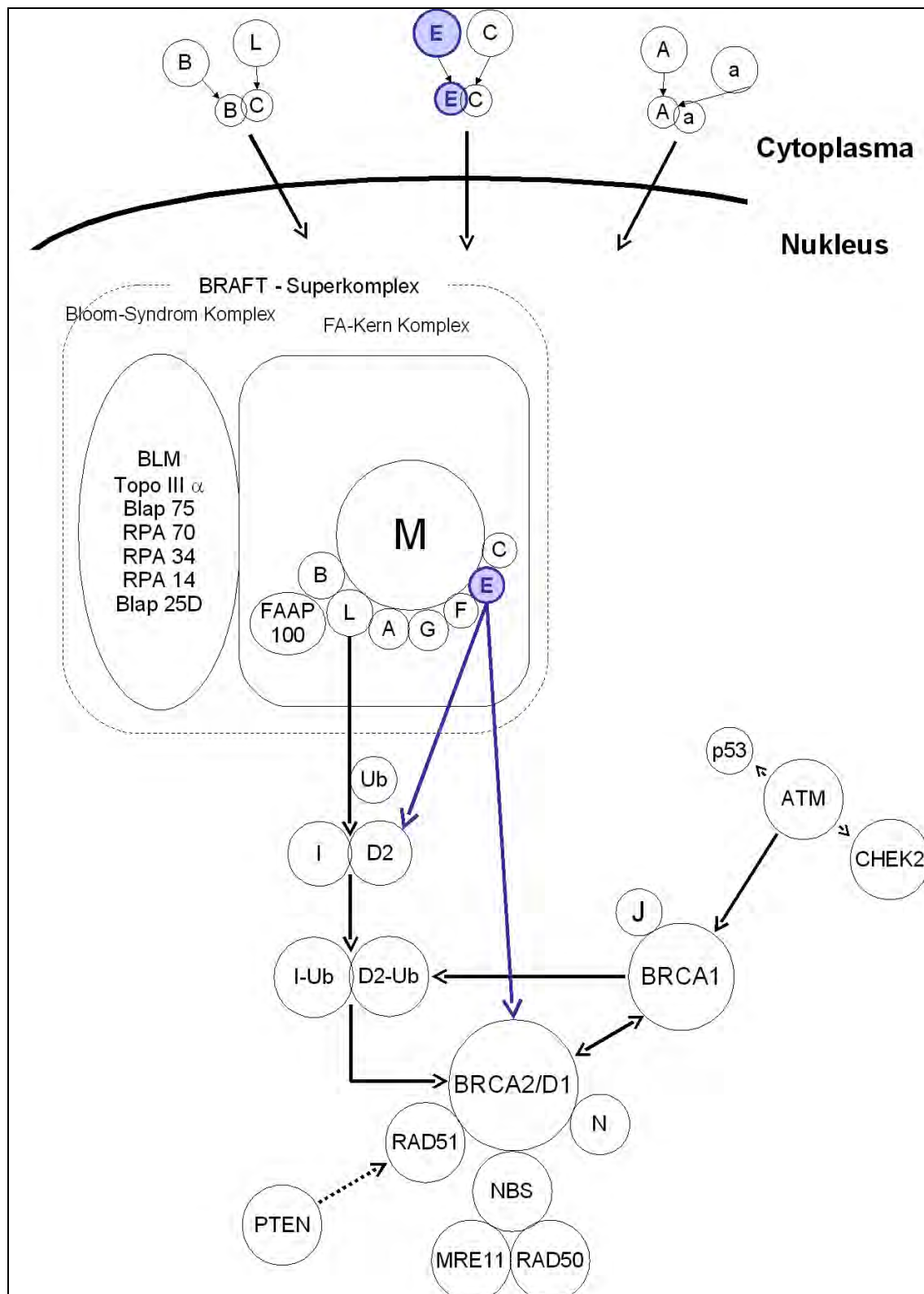


Abbildung 2: FA/BRCA-Signalweg; A=FANCA, B=FANCB, C=FANCC, D1=FANCD1, D2=FANCD2, E=FANCE, F=FANCF, G=FANCG, I=FANCI, J=FANCI, L=FANCL, M=FANCM, N=FANCN, Ub=Monoubiquitin

Skizze modifiziert nach (Wang 2007, Walsh u. King 2007, Mathew 2006)

2.3 Kiss1

Kisspeptide (KP), die Genprodukte von *Kiss1*, sind ein mutmaßlicher Metastasensuppressor (Lee u. Welch 1997). Metastasensuppressoren führen nur zur Verhinderung von Metastasen, das eigentliche Tumorwachstum wird von ihnen nicht beeinträchtigt. KP-54 wurde 1996 in malignen Melanomen gefunden (Lee et al. 1996). Es ist in den höchsten Konzentrationen in der Plazenta zu finden (Ohtaki et al. 2001, Mead et al. 2007, Lee et al. 1996).

Das Gen liegt auf Chromosom 1q32, besteht aus vier Exons (West et al. 1998) und umfasst 145 Aminosäuren. Die ersten beiden Exons werden nicht translatiert, die beiden anderen nur teilweise (West et al. 1998).

Es wurden Phosphorylierungsstellen für PKC (Proteinkinasen C) (West et al. 1998), und eine PEST Sequenz berichtet. Letzteres prädisponiert Proteine zur Ubiquitination und Degradation. Dies lässt auf eine kurze Halbwertszeit im Cytosol (geschätzt werden 30 Sekunden [Debie u. Welch 2001]) schließen (Mead et al. 2007). Dort wurden drei biologisch aktive Peptide gefunden: KP10, KP13, KP54. KP10 ist zwischen Ratten, Mäusen und Menschen hochkonserviert (Mead et al. 2007).

Eine mögliche Signalsequenz lässt vermuten, dass es sich um ein sekretorisches Protein handelt. Dies ließ sich aber bisher nicht bestätigen (Kotani et al. 2001, Mead et al. 2007).

KPs haben einen Einfluss auf die sexuelle Entwicklung des Menschen indem sie die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse aktivieren und dadurch die Pubertät initiieren (Li et al. 2007). Bei weiblichen Mäusen konnte gezeigt werden, dass Kiss1 im Hypothalamus durch Estradiol reguliert wird. Hierfür bilden Östrogenrezeptor Alpha und Sp1 (Specificity Protein 1) einen Komplex (Li et al. 2007).

Der C-Terminus der Peptide ist für die hohe Affinität der Bindung an den Rezeptor und dessen Aktivierung verantwortlich. Es handelt sich um einen G-Protein gekoppelten, membrangebundenen Rezeptor, GPR54. Dieser führt nach seiner Aktivierung zu einer intrazellulären Calciummobilisation, stimuliert die Freisetzung von Arachidonsäure und aktiviert ERK1/2 (extrazelluläre signalregulierte Kinase) sowie eventuell p38, Akt oder andere. Über Rho-Aktivierung wird die Formation von Streßfibern induziert (Kotani et al. 2001).

KP54 scheint die Motilität der Zelle zu verhindern, sowie deren Morphologie über Änderungen der Aktinfilamente zu ändern (Mead et al. 2007). KP inhibiert bei GPR54 exprimierenden Zellen die Invasion, Metastasierung und Chemotaxis (Ohtaki et al. 2001). Die Rezeptorendichte der Plazenta wird von der Früh- zur Spätschwangerschaft geringer, übereinstimmend mit der Abnahme des invasiven Wachstums (Mead et al. 2007). Kiss1 weist Ähnlichkeiten mit Neuropeptiden auf (Nash u. Welch 2006).

Mittlerweile ist herausgekommen, dass auf Chromosom 6 ein Regulator, *AP-2α* (activator protein), für *Kiss1* und dadurch für die Metastasensuppression liegt (Mitchell et al. 2006). Die Expression von *Kiss1* in Brustkrebszellen korreliert direkt mit der Expression von *AP-2α* und *SP1* (specificity protein), zwei Transkriptionsfaktoren (Mitchell et al. 2006). Die DNA-Bindungsdomäne von *AP-2α* ist für diese Modulation nicht notwendig. *Kiss1* wird durch zwei Bindungsstellen für *Sp1* am Promoter reguliert. *AP-2α* wirkt dabei im Komplex mit *Sp1*. Fehlt *AP-2α*, wie bei vielen Brustkrebstypen und anderen Tumoren, so wird die Expression von *Kiss1* nicht aktiviert (Mitchell et al. 2006).

Lee und Welch zeigten 1997 eine deutliche Suppression der Metastasenbildung in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435. *Kiss1*-Expression führte zu einer deutlich geringeren Fähigkeit zur Koloniebildung auf Agar. In gesundem Brustgewebe findet sich *Kiss1*, es könnte also eine inverse Korrelation zu progressivem Tumorwachstum geben (Lee u. Welch 1997). Dies würde zusammenpassen mit der Beobachtung, dass die *Kiss1*-Expression im Verlauf der Progression von malignen Melanomen abnimmt (Shirasaki et al. 2001). Der genaue Mechanismus der Metastasensuppression ist bisher nicht klar (Harms et al. 2003). Es scheint jedoch, dass der Rezeptor GPR54 nicht entscheidend ist und es entweder einen anderen Rezeptor gibt oder KP parakrin wirkt (Nash et al. 2007).

Martin et al. zeigten 2005 in ihrer Studie, dass *Kiss1* in Brusttumoren in höheren Konzentrationen vorhanden war als in normalem Gewebe. Zudem waren die Konzentrationen höher (im Sinne einer Überexpression) bei Lymphknotenmetastasen und bei aggressiveren Tumoren (Grading und TNM).

Eventuellen Mutationen in *Kiss1* wurde bisher nicht nachgegangen bezüglich der Metastasensuppression.

2.4 Phosphatidylinositolkinase-3-Ca (PIK3CA)

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) sind Lipidkinasen, welche als „second-messenger“ die Umwandlung von Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidyl-3,4,5-Triphosphat (PIP₃) katalysieren. Hierdurch wird der Akt-Signalweg aktiviert, welcher diverse Prozesse in der Zelle beeinflusst (Zellvermehrung, Wachstum, Überleben, Motilität, Apoptose, siehe Abbildung 3) (Lee et al. 2005, Li et al. 2006, Vivanco u. Sawyers 2002). Darüber hinaus sind PI3Ks an verschiedenen anderen Signalwegen beteiligt, die teilweise auch zur Onkogenese beitragen. Die Gruppe der PI3K besteht aus mindestens 12 Enzymen, lässt sich in verschiedene Klassen unterteilen und ist erstmals in den 1980ern ins Blickfeld der Krebsforschung gekommen. (Fry 2001, Vivanco u. Sawyers 2002) Die PI3K der Klasse IA sind Heterodimere, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit (p110 α , p110 β , p110 δ) und einer regulatorischen Einheit (p85 α , p85 β , p85 γ) (Campbell et al. 2004, Lee et al. 2005, Vivanco u. Sawyers 2002).

Besonders interessant für die Tumorgenese scheint das Protein p110 α (*PIK3CA*) zu sein. Dessen Gen liegt auf Chromosom 3q26.3, ein Bereich der bei vielen Tumoren amplifiziert ist (Saal et al. 2005, Wu et al. 2005). Es umfasst 20 kodierende Exons, ist 1068 Aminosäuren groß (NCBI) und hat onkogenes Potential. *PIK3CA* ist unter anderem bei Ovarial- und Zervixkarzinomen sowie Weichteiltumoren des Nasenrachenraumes amplifiziert, nicht jedoch bei Mamma-Karzinomen. In anderen Tumoren, wie Mamma-, Hepatozellulärem- oder Colon-Karzinom finden sich vermehrt Mutationen (Buttitta et al. 2005, Campbell et al. 2004, Wu et al. 2005). Beides führt zu einer erhöhten Aktivität des PIK-Akt-Signalwegs, dessen Dysregulation wohl zur Tumorgenese führt. (Buttitta et al. 2005, Campbell et al. 2004, Lee et al. 2005, Li et al. 2006, Samuels et al. 2004, Wu et al. 2005).

Es handelt sich bei *PIK3CA* um heterozygote, somatische Missense-Mutationen mit einer Mutationsrate von etwa 25-27% (Bachmann et al. 2004, Buttitta et al. 2005, Campbell et al. 2004, Lee et al. 2005, Saal et al. 2005, Samuels et al. 2004). Diese konzentrieren sich im Wesentlichen auf die helikale Domäne von Exon 9 und die Kinase-Domäne von Exon 20 (Bachmann et al. 2004, Buttitta et al. 2005, Kang et al. 2005, Li et al. 2006, Samuels et al. 2004, Wu et al. 2005).

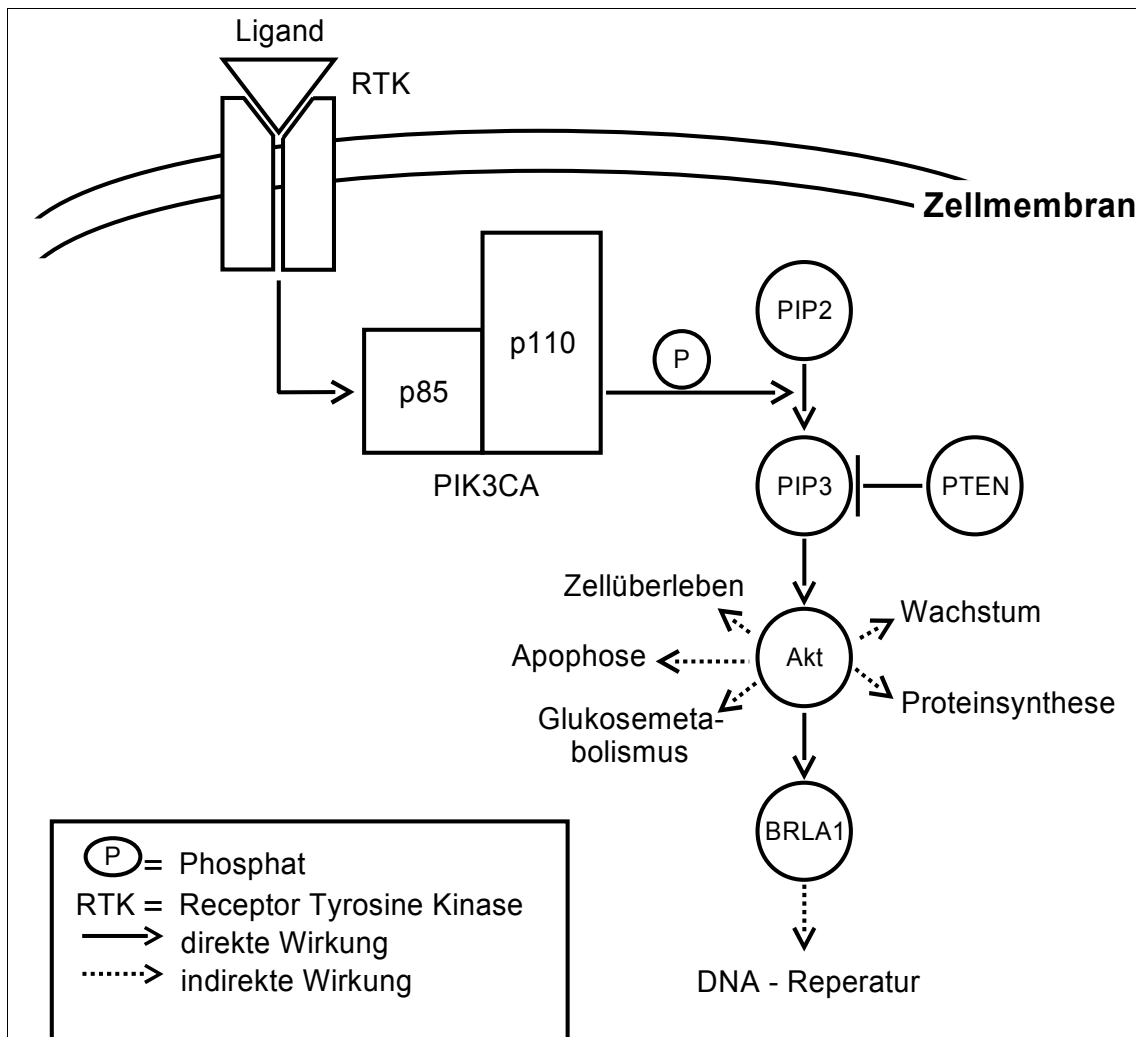


Abbildung 3 Skizze PIK-Akt-Signalweg

Skizze modifiziert nach Fry (2001), Vivanco et al. (2002) und www.cellsignal.com

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Farbstoffe und Lösungsmittel waren jeweils zur Analyse bestimmt. Sie wurden bezogen über die Firmen Boehringer Mannheim, Gibco BRL, Merck und Sigma.

3.2 Enzyme

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde mit HotStarTaq Master Mix der Firma Qiagen (enthält HotStarTaq Polymerase, PCR Buffer mit 3mM MgCl₂ und 400µM von jedem dNTP) gearbeitet.

Es wurden die Restriktionsenzyme Bsr I und TaqI der Firma New England Biolabs verwendet.

3.3 Puffer, Lösungen und Medien

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der Lösungen, Puffer und Medien angegeben, die häufig verwendet wurden. Für die Herstellung wurde entionisiertes Wasser verwendet.

TBE (1x):

-Tris-(hydroxymethan)	54g
-Borsäure	27g
-EDTA-Stammlösung	3,7g
-Aqua dest.	ad 5l
auf pH 8,0 einstellen	

TE-Puffer (nach Singh):

-Tris-(hydroxymethan)/HCl	10mM
-EDTA-Lösung	1mM
auf pH 8,0 einstellen	

Lyse-Puffer:

- Ammoniumchlorid (NH_4Cl) 8,3g (155mM)
 - Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) 1g (19mM)
 - EDTA-Stammlösung 0,034g (0,5M)
- auf pH7,4 einstellen

Polyacrylamid-Stammlösung (30%):

- Acrylamid 28,5%
 - N,N'-Methylenbisacrylamid 1,5%
- Lösung muss lichtgeschützt bei 4°C lagern

EDTA-Stammlösung (pH 8,0):

Ethylendiamintetraaminessigsäure 0,5M

SDS 20% Stammlösung:

SDS 20 g
Aqua dest. 100 ml

Chloropan:

Phenol 200 ml
TE (pH 8.0) 50 ml
Chloroform 250 ml
Hydroxychinolin 250 ml

Chloroform-Isoamylalkohol:

Chloroform 24 Teile
Isoamylalkohol 1 Teil

Formamid-Ladepuffer für SSCP-Gele:

- Formamid 10ml
- EDTA-Stammlösung 0,2ml
- Xylencyanol 10mg
- Bromphenolblau 10mg

Ladepuffer (5x) für Agarose-Gele:

-Ficoll	2,5mg
-Bromphenolblau	25mg
-Xylencyanol	25mg
-Aqua dest.	10ml

Lösung für Ethidiumbromidfärbung:

-TBE-Puffer	40ml
-Aqua dest.	40ml
-Ethidiumbromid	0,5µg/ml

Lösung ist maximal 2 Tage verwendbar

Lösungen für Silbernitratfärbung:

- <i>Fixierer</i> : Ethanol	10%
-Salpetersäure (HNO ₃)	1%

-Silbernitrat-Lösung:

Silbernitrat (AgNO ₃)	2,01g
Aqua dest.	ad 1l

-Entwickler:

Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	59,2g
Formaldehyd	1080µl
Aqua dest.	ad 2l

-Stopplösung: Essigsäure 10%

Molekulargewichtsmarker:

φX174 DNA/Hae III Markers (von 72Bp bis 1353Bp)

3.4 Verwendete Geräte**PCR-Geräte:**

- OmniGene der Firma Hybaid
- MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler der Firma Biozym

- GeneAmp PCR System 9700 der Firma Applied Biosystems
- PCR-Express Firma Hybaid
- ABI 9700

Zentrifuge:

- Eppendorf Laborzentrifuge: Centrifuge 5415
- Hettich Zentrifuge: Hettich Rotana/S

Cleanbench:

- Cleanbench der Firma Bleymehl, Typ ASW-UP 2000

SSCP-Kammer:

- SSCP-Kammer Life Technologies, Modell S2 der Firma Gibco BRL
- Electrophoresis constant Power Supply, ECPS 2000/300

Agarosegelelektrophoresekammer:

- Elektrophoresekammer Life Technologies der Firma Gibco BRL
- Elektrophoresis Power Supply Life Technologies der Firma Gibco BRL

Thermoblock:

- Thermoblock Dri-Block DB-2A der Firma Techne

Schüttelmaschine:

- Schüttelmaschine LS20 der Firma Gebhardt

3.5 Materialien: Tumorgewebe und Zelllinien

Es wurde Tumorgewebe und Blut von 48 Brustkrebspatientinnen der Frauenklinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus wurde mit DNA aus kultivierten Zelllinien (MCF-7, T47D, HBL-100, B509, MDA-MB-231) gearbeitet.

3.6 Kultur der Zelllinien

3.6.1 Primärkultur

Die erworbenen Zellen wurden auf 50ml Primärkulturflaschen verteilt, jeweils von Anzuchtmedium (F10 der Firma Gibco) überdeckt. Um Infektionen der Kulturen zu vermeiden, wurden dem Medium die Antibiotika Gentamycin (50µg/ml) und Streptomycin (100µg/ml) zugesetzt. Außerdem enthielt das Anzuchtmedium 20% fetales Kälberserum. Bei 37°C und 5% CO²-Atmosphäre wurden die Kulturflaschen in einen Brutschrank gelegt. Für einen konstanten CO₂-Gehalt in den Flaschen wurden die Deckel nicht komplett geschlossen. Es wurde alle zwei Tage im Durchlichtmikroskop untersucht, ob Wachstum eingetreten war. Sobald die gesamte Kulturfläche von Zellen bedeckt war, wurden Subkulturen angelegt.

3.6.2 Subkultur

Wenn die gesamte Kulturfläche mit Zellen bedeckt ist (Konfluenz), muss eine Subkultur angelegt werden. Hierzu wird zunächst das Medium abgezogen und anschließend ca. 2ml Trypsinlösung (0,05% Trypsin) auf die Zellen gegeben. Die führt zur Lösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche. Nach 5 Minuten bei 37°C werden die Zellen in ca. 20ml Medium MEM10%FCS der Firma Gibco (enthält 10% Kälberserum) gegeben und auf zwei neue 200ml Kulturflaschen verteilt.

Am nächsten Tag sind die Zellen wieder am Boden adhäsisiert. Alle drei Tage wird das Kulturmedium durch frisches ersetzt. Ist nach ca. 10 Tagen der Boden wieder vollständig, wird die Kultur in 500ml Kulturflaschen überführt und wenn deren Boden erneut vollständig bedeckt ist eine weitere Subkultur angelegt. Dieses Vorgehen führt dazu, dass die Zellen im Wachstum bleiben.

3.6.3 Kryokonservierung

Von der etablierten Kultur werden die Zellen einiger Kulturflaschen in flüssigem Stickstoff bei –196°C eingefroren.

Es wird wieder Trypsin in die Kulturflaschen gegeben, nachdem das Medium abgezogen ist. Die Zellen werden in Medium MEM10%FCS der Firma Gibco (enthält 10% Kälberserum) aufgenommen und für 5 Minuten bei 500U/Min zentrifugiert. Nachdem das Medium abgezogen ist, werden die Pellets in einem mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzten Medium resuspendiert. Dieses dient als Einfriermedium. Von dieser Suspension werden je ca. 1,5ml in Tiefgefrier Röhrchen pipettiert, für 2 Minuten bei 500U/Min zentrifugiert und anschließend langsam eingefroren. Hierfür werden die Röhrchen zuerst bei 4°C für eine Stunde im Kühlschrank gelagert, bevor sie für 12 Stunden in einem Styroporbehälter mit Trockeneis bedeckt werden. Erst danach werden sie in einem Kunststoffbehälter in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt. Der Behälter lagert dort bei -150 bis -160°C in der Gasphase über dem flüssigen Stickstoff.

In dieser Form können Zellen über Jahre ohne Verlust ihrer Lebensfähigkeit lagern. Nach zwei Wochen wurde die Lebensfähigkeit der Zellen überprüft indem wieder eine Zellkultur angelegt wurde. Vorher wurden die Zellen runterzentrifugiert, der DMSO-Überstand verworfen und die Zellen in 10ml Medium resuspendiert.

3.7 DNA-Isolierung

3.7.1 Isolierung genomischer DNA aus Blut

Für die DNA-Isolierung aus Blut wurden von den 42 Brustkrebspatientinnen aus Na-EDTA-Röhrchen 10ml venöses Blut in Falcon-Röhrchen überführt. Entweder wurde das Blut direkt mit 30ml Lysepuffer versetzt und für 10 Minuten unter mehrmaligem schütteln auf Eis inkubiert, oder es wurde einige Tage bei 4°C beziehungsweise länger bei -80°C gelagert. Das inkubierte Blut wurde 7 Minuten bei 3000U/Min zentrifugiert und der Überstand danach abgegossen. Das Pellet aus Zellkernen wurde anschließend in 5ml SE-Puffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 500µl SDS-Lösung (10%) und 50µl Proteinkinase K gegeben. Nachdem dieses Gemisch drei bis vier Stunden bei 55°C auf dem Schüttler inkubiert wurde, erfolgte die erneute Zugabe von 5ml SE-Puffer. Außerdem wurden 1,6ml gesättigte Kochsalzlösung (6M) zugefügt und alles

zusammen kräftig geschüttelt. Es folgte eine erneute Zentrifugation (10 Minuten bei 3000U/Min). Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen übertragen und die DNA mit der 2,5-fachen Volumenmenge 95%igem Ethanol gefällt. Nach dem Herausfischen mit einer sterilen Nadel wurde die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde die DNA in einem autoklavierten Eppendorf-Tube über Nacht getrocknet und in 500 bis 1000µl TE-Puffer gelöst. Die Aufbewahrung dieser Präparation findet im Kühlraum bei 4°C statt.

3.7.2 Isolierung genomischer DNA aus Tumorgewebe

In ein vorgekühltes Gefäß wurde 1g, mit einem Skalpell zerkleinertes und in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Tumorgewebe gegeben. Dieses wurde dreimal über 40 Sekunden dismembriert und das erhaltene Tumorpulver in 20ml Gewebepuffer (100mM Tris, 5mM Na-EDTA, 1% SDS, Proteinase K, f.c. 100µg/ml) überführt und gut vermischt. Die Proben wurden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinextraktion erfolgte durch Zugabe von einem Volumenteil Chloroform. Hierzu wurden die Tumorproben geschüttelt, bei 3000U/Min über 20 Minuten zentrifugiert und anschließend die Protein-Interphase durch Behandlung mit Chloroform entfernt. Danach wurde erneut 20 Minuten mit 3000U/Min zentrifugiert. Dem Überstand wurden 10 M Lithiumchlorid (f.c. 2,5M) hinzugefügt. Dies wurde über Nacht auf Eis inkubiert. Eine Zentrifugation bei 16000U/Min über 45 Minuten führte zu einem RNA-haltigen Pellet und einem Überstand, welcher die von uns gebrauchte DNA enthielt.

3.7.3 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen

Das gesamte Medium einer dicht bewachsenen Kulturflasche wird entfernt, es werden 5ml SE-Puffer, 500µl SDS-Lösung (10%) und 50µl Proteinkinase K hinzugefügt und das Gemisch anschließend bei 55°C für 3-4 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Die Lösung wird in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es werden 1,6ml NaCl-Lösung (6M) hinzugegeben und das Gemisch wird kräftig geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (10 Minuten bei 3000U/Min) wird der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen übertragen.

Die DNA wird mit der 2,5fachen Volumenmenge 95%igem Ethanol gefällt, mit einer sterilen Nadel herausgefischt und in 70%igem Ethanol gewaschen. In einem autoklavierten Eppendorf-Tube trocknet die DNA über Nacht und wird schließlich in 300-500µl TE-Puffer gelöst.

Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C.

3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.8.1 Prinzipien der PCR

Saiki et al. beschrieben 1985 erstmals das Prinzip der PCR. Diese konnte durch die Einführung von thermostabilen DNA-Polymerasen aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* automatisiert werden und ermöglicht eine Amplifizierung von DNA-Sequenzen. Das Prinzip besteht aus der spezifischen Bindung von Oligonukleotidprimer-Paaren, die die zu amplifizierende Zielregion flankieren.

Die PCR verläuft in drei Schritten, die in mehreren Zyklen durchlaufen werden: Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei 94-95°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden komplementären DNA-Strängen der Template-DNA aufgebrochen und diese trennen sich (*Denaturierung*). Zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA (*Annealing*) wird die Temperatur auf 55-65°C gesenkt. Diese Temperatur hängt von den jeweiligen Primern ab. Wird sie zu hoch gewählt, lagern sich die Primer eventuell nicht richtig an die DNA, wird sie zu niedrig gewählt, können sich die Primer an den falschen Stellen anlagern. Danach wird die Temperatur auf 72°C erhöht, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase (*Elongation*). Jetzt wird der Primer durch die Polymerase mit den freien Nukleotiden verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, welche der ursprünglichen Template-DNA entspricht. Der Primer verbleibt an der DNA.

3.8.2 Oligonukleotidprimer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden anhand von veröffentlichten Sequenzen ausgesucht. Es wurden Primerpaare für die drei kodierenden Exons von *Kiss1* synthetisiert, sowie 12 Paare für Fanconi E (Exon 2 wurde aufgrund der Größe in drei überlappende Teile zerlegt) und für *PIK3Ca* Exon 9 und Exon 20. Die Firma MWG-Biotech GmGH stellte alle Primer her, diese wurden nach Herstellerangaben verdünnt und im Tiefkühlfach (-20°C) gelagert.

Die Länge der Primer lag zwischen 18 und 26 Basen. Die Hybridisierungsstellen befinden sich in den Intronbereichen vor und hinter den jeweiligen Exons, beziehungsweise bei Fanconi E, Exon 2 und auch überlappend im Exon. Es wurde versucht, dass ein Anteil der Basen Guanin und Cytosin von 40-60% nicht überschritten wurde und nicht mehr als vier gleiche Basenpaare in Folge im Primer lagen. Auf diese Weise sollten Fehlhybridisierungen und Frameshifts verhindert werden. Ebenfalls durften die Primer nicht miteinander hybridisieren, sollten möglichst gering komplementär an ihrem 3'-Ende sein und keine internen Sekundärstrukturen bilden wie zum Beispiel Haarnadeln (Hairpins). Letzteres führt zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit des Annealings.

Exon	Primern ame	Sequenz	Annealing- Temperatur
FE 1	FE 1FB	GCT GAG GCC CCA CAC CAG AG	Sehr schwierig, am besten FE 1FB/ FE 1RH bei 63°C
FE 1	FE 1RB	CCT CGA TGT CCC GCA CAC AG	
FE 1	FE 1FH	AAC GCC GAG GAG AGC TTG TAA	
FE 1	FE 1RH	AGC AAG TGC TCA GTG AAG GGT	
FE 1	FE 1AF	CTC CTG CTG CAG GCG CTG CAG	
FE 1	FE 1AR	CTG CAG CGC CTG CAG CAG CAG	
FE 2	FE 2.1F	GCC CCC AGC TCT GCC CAG TC	66°C
FE 2	FE 2.1R	CCC CCA AAT CCC TTC GCA GC	66°C
FE 2	FE 2.2F	GAT GTC CCT GCT GAT GGC CG	67°C
FE 2	FE 2.2R	TGG GGA CCC TCT TCC CCT CA	67°C
FE 2	FE 2.3F	CAG CAG CCT GGG AAA CGC AG	67°C
FE 2	FE 2.3R	TCC CAA GCA GCC TTC CCC AT	67°C
FE 3	FE 3F	AAC CGG GCT TGG GGT CAT GC	63°C
FE 3	FE 3R	CCC TCC CCC AGC CAG CTT GT	63°C
FE 4	FE 4F	ACT TGT CAC TGA GGG CTC TG	63°C
FE 4	FE 4R	CCC TAT CGC TGA GAG AGA AA	63°C

FE 5	FE 5F	AGC CCT TGG TTC CTT CCC CT	63°C
FE 5	FE 5R	CCC TTC TGA GGG CCC AGT TG	63°C
FE 6	FE 6F	ATG CTG TTG AAA TGA AGA AGA A	60°C; schwierig, FE 6F/FE 7R bei 60°C
FE 6	FE 6R	GCC GGG ATG CCG AGG AGC AGC CG	
FE 6	FE 6R2	GTA ACA GAA TGC CCA GCC TGT	
FE 6	FE 6R3	ACA CTG AGG GCA GAG CTA	
FE 7	FE 7F	GGC TGG GCA TTC TGT TAC CG	63°C
FE 7	FE 7R	GCA GGG CCC AAC ACA TGT GA	63°C/ 60°C
FE 8	FE 8F	TGC CCT GCT GTG GGA GTT GG	63°C
FE 8	FE 8R	CCC AGG AAC CCC GTG TGC TT	63°C
FE 9	FE 9F	GAC TGG CTG AAT GAA GAG CC	63°C
FE 9	FE 9R	GCC AGC ACT CAG GGT TTT AT	63°C
FE 10	FE 10F	GAT CAG TTG CTG GAG TCC TG	63°C
FE 10	FE 10R	CAG CCT TTA TCC TCA GGC TA	63°C
KS 2	KS 2F	AAG GGA TGT GAT CAG GGA GCT	63°C
KS 2	KS 2R	CAG AGC ATC CCC AGG TCA	63°C
KS 3	KS 3F	CTG TGC CTG ACC TAG TCT TTG	60°C
KS 3	KS 3R	TTG CAA CAA CCC ACT TGC TC	60°C
KS 4	KS 4F	GGT GTT GCA AAG CCA TCT TTC	63°C
KS 4	KS 4R	ATT GCC TCG GGT TGG AAG CT	63°C
PIK 9	PIK 9F	GAT TGG TTC TTT CCT GTC TCT G	60°C
PIK 9	PIK 9R	CCA CAA ATA TCA ATT TAC AAC CAT TG	60°C
PIK 20	PIK 20F	TGA CAT TTG AGC AAA GAC CTG	60°C
PIK 20	PIK 20F2	TTG CAT ACA TTC GAA AGA CC	60°C
PIK 20	PIK 20R	TGA CAT TTG AGC AAA GAC CTG	60°C
cDNA1		ATG ATG CTA AAG GTC TGG CT	
cDNA2		TTA GAG GGA TTG GAG GAT GCC C	
cDNA3		ATT TGG CAC AGA AGG AGG TC	

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer, sowie deren Annealing-Temperatur

FE= Fanconi E KS=Kiss-1 PIK=PIK3CA

3.8.3 Durchführung der PCR

Die PCR wurde mit HotStarTaq Polymerase der Firma Qiagen bei fast allen Exons problemlos durchgeführt. Schwierigkeiten ergaben sich insbesondere bei Exon 1, Fanconi E. Dies ließ sich auch mit Zugabe von Magnesium, Betaine oder Lösung Q (beides Firma Quiagen) bei verschiedenen Temperaturen nicht gut amplifizieren. Die besten Produkte ergaben sich bei der Primerkombination FE 1FB/FE 1RH. Diese ließen sich jedoch nicht entsprechend weiter nutzen, so dass die Darstellung im SSCP-Gel nur sehr unvollständig erfolgte. Auch der Versuch, das Produkt mittels Restriktionsenzymen zu verkleinern und dann

besser im SSCP-Gel darstellen zu können, scheiterte. Ebenso verschiedene Versuche der Sequenzierung.

Standardprogramm der PCR:

1. 94°C 18 Minuten Denaturierung und Polymeraseaktivierung
2. 94°C 1:30 Minuten Denaturierung
3. 60°C 1:30 Minuten Annealing
4. 72°C 2 Minuten Elongation

Wiederholung der Schritte 2-4 für 35 Zyklen

5. 72°C 8 Minuten Abschließende Elongation

Die Annealing-Temperatur variiert je nach Exon (siehe Tabelle 1). Das Reaktionsvolumen betrug 25µl oder 50µl.

Protokoll für 25µl:

12,5µl HotStarTaq Polymerase

11µl Aqua dest

0,5µl Primer Forward (Endkonzentration 0,5µM)

0,5µl Primer Reverse (Endkonzentration 0,5µM)

0,5µl Template-DNA (<1µg)

Die Proben, die im Gerät Omnigene der Firma Hybaid durchgeführt wurden, sind mit ca. 30µl Mineralöl überschichtet worden, um die Konzentrationen des Reaktionsgemisches konstant zu halten. Bei den anderen Geräten war dies nicht nötig, da diese über einen beheizten Deckel verfügten.

Alle Produkte wurden mit einer Agarosegel-Elektrophorese (siehe 3.9) auf ihre Qualität geprüft. Die nicht sofort für SSCP-Gele oder Sequenzierung benötigten Produkte wurden im Kühlraum bei 4°C gelagert.

3.9 Agarosegel- Elektrophorese

3.9.1 Herstellung des Agarosegels

Die Konzentration der Agarosegele variiert je nachdem, welche Art von DNA aufgetrennt werden soll. So wird für genomische DNA oder ihre Schnittprodukte

0,8%iges Agarosegel verwendet, für Plasmid-DNA 1,2%ige Gele und für die Auftrennung von PCR-Produkten eignet sich besonders gut 2%iges Agarosegel. Dieses wurde hier auch verwendet.

Dazu sind 2g Agarose und 100ml TBE-Puffer in eine Laborflasche gegeben worden und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt worden. Nachdem die Agaroselösung auf 60-70°C abgekühlt war, wurde sie in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Dieser enthielt einen oder zwei Kunststoffkämme, die die Geltaschen ausgeformt haben. Die Anzahl der Taschen war von der Kammgröße abhängig.

Nach vollständiger Aushärtung des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer eingebracht, welche mit 1x TBE gefüllt war. Dieser Puffer musste das Gel komplett bedecken.

3.9.2 Laden der Agarosegele

5µl der zu trennenden DNA (hier PCR-Produkt) und 0,5µl Ladepuffer wurden vermischt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Zum Abschätzen der Molekulargröße wurde bei einigen Fällen der Molekulargewichtsmarker ϕ X174 DNA/Hae III Markers in eine zusätzliche Tasche pipettiert (0,5µl Marker und 0,5µl Ladepuffer). Die Molekulargrößen der Banden sind: 72, 118, 194, 234, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 Basenpaare.

3.9.3 Durchführung der Elektrophorese

Durch Anlegen einer Gleichstromspannung von 75-100V erfolgt die Auftrennung. Die DNA wandert im elektrischen Feld vom negativen zum positiven Pol. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der DNA-Stücke abhängig. Je kleiner das Fragment desto schneller wandert es im elektrischen Feld.

Bei einer Spannung von 90V dauerte es im Schnitt ungefähr eine Stunde bis zur Auftrennung der Produkte.

3.9.4 Färben und Dokumentation der Agarosegele

Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, müssen diese mit Ethidiumbromid gefärbt werden. Dazu ist das Gel 15 Minuten in einer Ethidiumbromidfärbelösung geschüttelt und anschließend 10 Minuten in 200ml 1x TBE gewaschen worden.

Die so gefärbte DNA ist auf einer UV-Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 302nm zu beurteilen. Die Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera. Die Bilder konnten anschließend entweder ausgedruckt oder direkt am Computer verarbeitet werden.

3.10 SSCP-Gel-Elektrophorese (Single Strand Conformation Polymorphism)

3.10.1 Prinzipien des SSCP-Gels

DNA-Fragmente, welche einige hundert Basenpaare (<400) lang sind, lassen sich mit einer SSCP-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism) auf Mutationen und Polymorphismen untersuchen. Dafür wird das DNA-Fragment zuerst durch eine PCR vervielfältigt, größere Fragmente eventuell durch Restriktionsendonukleasen in kleinere zerteilt und anschließend durch Erhitzen in Einzelstränge zerlegt, also thermisch denaturiert. Die Unterschiede in Größe, Ladung und Struktur des Moleküls führen zu verschiedenen Laufeigenschaften in der Elektrophorese. In nicht denaturierenden Bedingungen ist zudem die Struktur, welche sich durch Interaktionen der Nukleotidbasen, ergibt von Bedeutung. Auch sie bestimmt die Laufeigenschaft mit. Schon eine einzelne Basensubstitution kann diese Struktur so verändern, dass sich die mutierte von der ursprünglichen Form deutlich im Laufverhalten bei den nicht-denaturierenden Bedingungen des Gels unterscheidet. Es ist so möglich, DNA-Fragmente relativ schnell auf Punktmutationen hin zu screenen.

3.10.2 Herstellung der SSCP-Gele

Es wurden 8%ige Polyacrylamid-Gele verwendet.

Zunächst wurden Glasplatten der Größen 250x450x5mm und 250x400x5mm mit Aqua dest. gereinigt und mit Ethanol 75% poliert. Dieses sollte die Entstehung von Luftblasen beim Gießen des Gels verhindern.

Die beiden Glasplatten wurden übereinandergelegt, wobei die größere unten lag. Zwischen den Platten lagen an den langen Seiten so genannte Spacer. Dies sind Kunststoffstreifen von 10mm Breite und 0,5mm Dicke. Sie trennen die Platten voneinander und verhindern seitliches Auslaufen der Polyacrylamid-lösung. Metallklammern fixieren diesen dreischichtigen Aufbau.

Nachdem die Platten vorbereitet waren, wurde die Lösung hergestellt. Hierbei sind unbedingt Handschuhe zu tragen, wegen der neurotoxischen Wirkung des nichtpolymerisierten Polyacrylamids.

SSCP-Gel: (8%Polyacrylamidgel)

82ml TBE (1x)

35ml Polyacrylamid-Stammlösung (30%)

1ml APOS (Ammoniumperoxidsulfat) (10%)

0,5µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

APOS und TEMED werden direkt vor dem Gießen hinzugefügt. TEMED dient als Radikal der Polymerisation und APOS als Katalysator der Reaktion.

Die Lösung wird gleichmäßig auf den Vorsprung der größeren Glasplatte gegossen und mittels Kapillarkräften zwischen die Glasplatten gesogen.

Ist der gesamte Zwischenraum mit Lösung gefüllt, wird ein 0,5mm dicker Kunststoffkamm mit 32 Zähnen zum Ausformen der Geltaschen in den Spalt zwischen den Platten geschoben, wieder beginnend am Vorsprung der größeren Platte. Auch der Kamm wurde mit Metallklammern fixiert.

Nach ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur ist das Gel polymerisiert, der Kamm wird vorsichtig entfernt und das Gel kann verwendet werden.

3.10.3 Vorbereitung von Gel und Elektrophoresekammer

Das Gel wird in eine vertikale Elektrophoreseapparatur für Polyacrylamidgele eingespannt und beide Pufferkammern mit TBE 1x gefüllt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass am unteren Gelrand keine Luftblasen zurückbleiben. Beim Befüllen der oberen Pufferkammer muss beobachtet werden, ob die Glasplatten mit der Apparatur dicht abschließen oder ob Puffer aus der oberen in die untere Kammer läuft.

Die Geltaschen werden mit Hilfe einer 10ml Spritze und Kanüle mit Puffer gespült um eventuelle Gelreste oder nicht polymerisiertes Acrylamid aus den Taschen zu entfernen.

Um mögliche Verunreinigungen aus dem Gel zu beseitigen wird ein ca. 20 minütiger Vorlauf bei 5 Watt durchgeführt.

3.10.4 Vorbereitung der Proben

Es werden 6µl PCR-Produkt und 7µl Formamid-Ladepuffer in ein Eppendorf-Tube pipettiert, für 10 Minuten in einem Thermoblock bei 95° denaturiert und anschließend schnell auf Eis gelegt. Dies verhindert, dass die DNA erneut hybridisiert und gewährleistet die von der Methode geforderte einzelsträngige DNA.

3.10.5 Durchführung der Polyacrylamid-Elektrophorese

Die Proben werden zügig aufgetragen und Spannung und Stromstärke so eingestellt, dass das Netzgerät 5-6 Watt Leistung bringt.

Die Laufzeit liegt, etwas abhängig von der Größe des PCR-Produktes, bei 15-20 Stunden. Die tatsächlich benötigte Dauer der jeweiligen Produkte ließ sich durch die unterschiedlichen Farbstoffe des Puffers gut abschätzen. Diese haben ein unterschiedliches Wanderungsverhalten im Gel und geben dadurch einen Hinweis, wie weit die einzelsträngige oder die noch doppel-strängige DNA gewandert war.

3.10.6 Färbung des SSCP-Gels und Dokumentation

Nach der Elektrophorese wurden die Platten direkt aus der Apparatur genommen. Die beiden Glasplatten wurden von einer Ecke aus vorsichtig voneinander getrennt, wobei das Gel an einer der Platten haften blieb (meistens der unteren). Die Spacer wurden ebenfalls entfernt.

Die Glasplatte mit dem Gel wurde mit dem Gel nach unten über ein Waschtablett mit 10%igem Ethanol gelegt. Nun wurde das Gel an einer Ecke von der Glasplatte gelöst und glitt dann vollständig und glatt in das Ethanol. Nach 10 Minuten in dieser Lösung war das Gel fixiert.

Das Waschtablett wurde auf einen Schüttler unter den Abzug gestellt. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde das Ethanol abgesaugt und dann ca. 300ml 1% HNO_3 in das Tablett gegossen. Dieses wurde nach 3-minütigem Schütteln wieder abgesaugt. Es folgten zwei Waschungen mit Aqua dest. für jeweils 2 Minuten. Anschließend erfolgte die Färbung mit Silbernitratlösung. Dafür wurde das Gel mit 300ml Silbernitratlösung übergossen und für 30 Minuten geschüttelt. Nach dem Absaugen wurden wieder zwei Waschungen mit Aqua dest. für zwei Minuten durchgeführt. Die Silbernitratlösung sowie das Waschwasser wurden in einem gesonderten Behälter entsorgt.

Als nächster Schritt wurde Entwicklerlösung zugegeben. Ungefähr 200ml wurden auf das Gel gegeben und sofort wieder abgesaugt, die weiteren 300ml verblieben für etwa 10 Minuten. Wenn dann Banden gut sichtbar waren, wurde der Entwickler abgesaugt und die Reaktion mit ca. 300ml 10%iger Essigsäure gestoppt. Diese wurde nach dem Absaugen noch einmal mit Aqua dest. rausgewaschen und anschließend das Gel in Folie eingeschweißt.

Die fertigen Gele wurden in einem Kühlraum bei 4°C im Dunkeln gelagert bis sie fotografiert wurden.

3.11 Nichtradioaktive Sequenzierung der PCR-Produkte

3.11.1 Prinzipien der nichtradioaktiven Sequenzierung

Bei der Sanger-Sequenzierung wird die DNA zunächst denaturiert, mit einem Primer hybridisiert und dieser mit einer DNA-Polymerase verlängert. Neben den üblichen dNTP's sind im Ansatz 2'-3'-Dideoxynukleotide enthalten (ddATP,

ddTTP, ddGTP, ddCTP). Die Elongation des Primers bricht ab, wenn ein solches 2'-3'-Dideoxynukleotid eingebaut wird. Hier fehlt eine 3'-OH-Gruppe an welche das nächste Nukleotid angehängt werden könnte. Der Einbau dieser Dideoxynukleotide erfolgt nach den Gesetzen der Statistik.

Auf diese Weise kommt es zu einem Gemisch von Fragmenten unterschiedlicher Länge, welche alle mit einem Dideoxynukleotid enden. Diese Fragmente lassen sich nun wiederum elektrophoretisch nach ihrer Länge basenpaargenau auftrennen. Das verwendete Gel muss denaturierend sein, weil sonst die einzelsträngige DNA zu Sekundärstrukturen, neigt die die Laufgeschwindigkeit im Gel beeinflusst. Eine saubere Auftrennung wäre nicht mehr möglich.

Bei der BigDye Terminator Sequenzierung sind die Dideoxynukleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Da jedes der vier Nukleotide einen anderen Farbstoff hat, kann die Reaktion in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Es wird für jede Probe nur eine Spur im Polyacrylamidgel bei der Auftrennung gebraucht.

Für die Detektion der aufgetrennten Fragmente im ABI-PRISM DNA-ANALYZER wird der fluoreszenzmarkierte Terminator mit einem Laser der Wellenlänge 488nm angeregt. Über einen Spektrographen wird das ausgesendete Licht in seine Spektralfarben zerlegt. Diese werden zeitgleich mit einem hochauflösenden Pixelfeld einer CCD-Kamera erfasst. Die erhobenen Daten sind anschließend an einem Computer mit entsprechender Anwendersoftware abgespeichert worden.

3.11.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte mussten vor der Sequenzierungsreaktion aufgereinigt werden.

Hierzu wurde das komplette Produkt mit 120µl 100%igen Ethanol und 20µl Ammoniumacetat (3M) in ein autoklaviertes Eppendorf-Tube pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 13 000U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. In einem zweiten Schritt wurde das Produkt in 70%igem Ethanol für 10 Minuten bei 13 000U/Min zentrifugiert,

erneut bei Raumtemperatur. Auch hier wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden anschließend über Nacht unter der Cleanbench getrocknet oder für 10 Minuten bei 37°C in einen Thermoblock gestellt. Nach dem Trocknen sind die Proben mit 20µl TE-Puffer in Lösung gebracht und bei 4°C im Kühlraum gelagert worden.

In einem anderen Protokoll werden 5µl PCR-Produkt mit 0,2µl ExoSap und 1,8µl Aqua dest. in Minitubes pipettiert und erst 15 Minuten bei 37°C, anschließend 15 Minuten bei 80°C inkubiert. In diese Tubes werden anschließend 2µl BigDye und 0,5µl Primer zugegeben.

3.11.3 Sequenzierungs-PCR

Die aufgereinigten und gelösten Produkte wurden für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Für die Reaktion wurden in Minitubes 2,5µl Aqua dest., 2µl BigDye Sequenzierungsmix, 0,5µl des benötigten Primers sowie 5µl der gereinigten PCR-Produktes pipettiert.

Der BigDye Sequenzierungsmix enthielt die erforderlichen dNTP's, die fluoreszenzmarkierten ddNTP's und die Taq-Polymerase Ampli-Taq.

Durchgeführt wurde die Reaktion im PCR-Express der Firma Hybaid sowie im ABI 9700.

Programm für die Sequenzierungs-PCR:

1. 1 Minute 96°C
2. 20 Sekunden 96°C
3. 5 Sekunden 50°C
4. 4 Minuten 60°C

Schritt 2. und 3. werden 24mal wiederholt

3.11.4 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Es wurden 10µl des Sequenzierungsproduktes, 90µl Aqua dest., 10µl Natriumacetat (3M) und 250µl 100%iger Ethanol in ein autoklaviertes Eppendorf-Tube pipettiert, gemischt und dann 20 Minuten bei Raumtemperatur bei 13 000U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Nach Zugabe von 250µl 70%igem Ethanol wurde weitere 5 Minuten

zentrifugiert. Auch dieser Überstand wurde verworfen und das Produkt getrocknet. Hierzu wurde wieder entweder ein Heizblock (37°C, 5 Minuten) verwendet oder die Proben über Nacht unter die Cleanbench gestellt. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

3.11.5 Fragmentanalyse mit dem ABI Prism DNA-Analyzer

Die weitere Verarbeitung und das Bedienen des DNA-Analyzers wird von den technischen Assistentinnen des Instituts für Humangenetik übernommen. Die fertigen Sequenzen können nach einigen Tagen im Computer abgerufen und ausgewertet werden.

3.12 Restriktionsschnitt Analyse

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann DNA an ganz spezifischen Stellen geschnitten werden. Auf diese Weise lässt sich durch den Verlust oder das neue Auftreten von Schnittstellen etwas über Mutationen in einem Exon sagen. Die Fragmente werden nach der PCR mittels Agarose-Elektrophorese sichtbar gemacht.

Protokolle für 20µl Gesamtansatz:

10µl PCR-Produkt

2µl Reaktionspuffer

2µl Enzym Bsr I

6µl Aqua dest.

Oder:

10µl PCR-Produkt

2µl Reaktionspuffer

1µl Enzym TaqI

7µl Aqua dest.

Die Inkubation erfolgte für 5 Stunden bei 65°C.

3.13 Bestimmung der DNA-Konzentration

3.13.1 Spektrophotometrie

Ab einer DNA-Konzentration von 500ng/ml ist dieses Verfahren anwendbar. Die optische Dichte einer definierten Verdünnung der zu bestimmenden DNA-Lösung wird bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1,0 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

Die Qualität der präparierten DNA lässt sich aus dem Quotienten der optischen Dichten bei 260nm und 280nm abschätzen. Werte von 1,8 bis 2,0 sprechen hierbei für eine saubere DNA.

3.13.2 DNA-Konzentrationsabschätzung anhand eines DNA-Standards

Wenn eine Spektrophotometrie nicht durchführbar ist, so kann ein Aliquot der DNA-Lösung gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden. Durch den Vergleich der Bandenintensitäten kann später die DNA-Menge abgeschätzt werden.

Statt der Verdünnungsreihe können auch Längenmarker verwendet werden. Hier sind die gesamt aufgetragene Menge und die Fragmentlängen bekannt, so dass sich auch hier die Banden als Mengenmarker verwenden lassen und die Bandenintensität Rückschlüsse auf die eigene DNA-Lösung erlaubt.

3.14 RNA-Präparation aus kultivierten Zellen

Es handelt sich um Zellen aus Subkulturen bei denen es noch nicht zur Konfluenz gekommen ist. In dieser Wachstumsphase wird besonders viel RNA transkribiert, was zu einer größeren Ausbeute führt.

Mit 2ml RNAzolTMB werden die Monolayer-Kulturen direkt in der 500ml Kulturflasche lysiert. Diese wird einige Minuten geschwenkt, sodass alle Zellen bedeckt und lysiert sind. Anschließend wird das Homogenat in Eppendorf-Tubes überführt und zur Phasentrennung mit 0,2ml Chloroform pro 2ml Homogenat versetzt. Die Tubes werden geschlossen, 30 Sekunden kräftig geschüttelt und dann für 5 Minuten auf Eis gelagert. Zentrifugation (15 Minuten

bei 1400U/Min) führt zur Phasentrennung, wobei die RNA in der oberen farblosen, wässrigen Phase verbleibt. DNA und Proteine sind in der organischen zweiten Phase zu finden. Die wässrige Phase wird in ein neues steriles Tube überführt und mit einem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Dieses Gemisch wird für 15 Minuten auf Eis gelagert, danach 15 Minuten bei 14000U/Min zentrifugiert. Die RNA bildet jetzt ein gelbweißes Pellet. Der Überstand wird entfernt, das Pellet in 75%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

Bevor die RNA bei -80°C gelagert werden kann, muss sie noch in 100µl RNase-freiem Wasser (mittels Diethylpyrocarbonat hergestellt [DEPC-Wasser]) gelöst werden.

3.15 Herstellung von cDNA

Es wurde die gesamte isolierte RNA in einem 100µl Ansatz verwendet. Dies bedeutete 5µg RNA (bei einer RNA-Lösung von 0,5µg/µl). Für diese Untersuchung wurden die Lösungen benutzt, die mit dem Kit der Firma Qiagen geliefert wurden.

Protokoll:

10µl RNA

10µl Inkubationspuffer

5µl Primer

4µl dNTP's

1µl Rnase-Inhibitor

69µl Aqua dest.

Es wird in ein steriles Eppendorf-Tube pipettiert, gemischt und das Tube anschließend bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Abschließend wird es für 1 Minute auf Eis gelagert.

Danach wird 1µl reverse Transkriptase „Superskript“ (200 Units) hinzugegeben und die Proben 1Stunde bei 42°C inkubiert.

Aufbewahrt werden die Proben bei -25°C.

4. Ergebnisse

4.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Qualitätskontrolle durch Gelelektrophorese

Die Sequenzen waren bekannt und in der NCBI-Datenbank verfügbar, beziehungsweise bei *Kiss1* im Artikel von West et al. (1998). Mittels dieser Sequenzen wurden Primer ausgewählt, jeweils in 3'-5'- und 5'-3'-Richtung. Diese Primer haben alle eine Größe von etwa 20 Basen und liegen mit Abstand zum Exon im Intronbereich beziehungsweise überlappend im Exon (*FANCE*, Exon 2; *PIK3CA*, Exon 20), wenn ein Exon sehr groß ist. Für alle Primerpaare die unter Standardbedingungen keine guten Ergebnisse erbrachten, wurden verschiedene Bedingungen ausgetestet. Insbesondere Änderungen der Annealingtemperatur führten zu einer Verbesserung. Die Zugabe von Lösung Q (Firma Quiagen) oder Magnesiumchlorid führten zu keiner eindeutigen Verbesserung. Die HotStarTaq-Polymerase besitzt offenbar bei 1,5mM Magnesiumchlorid ihr Optimum.

Die genauen Bedingungen der einzelnen Primer sowie deren Sequenz sind im Kapitel 2 „Material und Methoden“ in Tabelle 3 (Seite 31) aufgeführt. Zur Ergebniskontrolle wurde immer eine Gelelektrophorese mit 2%-Agarosegel durchgeführt und das gefärbte Gel abfotografiert. Hierdurch wurde sichergestellt, dass das gewünschte DNA-Fragment in ausreichender Menge synthetisiert wurde und es keine Nebenprodukte gab.

Bei einem guten Ergebnis ist eine scharf abgegrenzte Bande zu sehen, die in etwa der zu erwartenden Größe entspricht. Zum Abschätzen der richtigen Größe wurde als Längenstandard der Marker ϕ X174 DNA/Hae III benutzt. Mit dem gleichen Primerpaar erzeugte Produkte sollen stets die gleiche Bande ergeben.

Sehr schwache Banden sind ein Hinweis für eine geringe Synthese. Diese ließ sich durch eine Optimierung der Bedingungen, meist ein Herabsetzen der Annealingtemperatur zur erleichterten Anlagerung der Primer, verbessern.

Waren neben einer Hauptbande schwächere Banden zu sehen, so war dies ein Zeichen für Nebenprodukte. Diese können das Ergebnis verfälschen und sollten

daher vermieden werden. Besonders häufig treten sie auf, wenn sich Basensequenzen in den DNA-Abschnitten nur gering von denen der Primer unterscheiden. In der Regel führt ein Anheben der Annealingtemperatur dazu, dass die Primer sich nur an der vollständig korrespondierenden DNA-Sequenz anlagern. Allerdings geschieht dies teilweise auf Kosten der Ausbeute des Hauptproduktes (siehe oben).

Bei **FANCE** konnten Probleme bei der Amplifikation von Exon 5 durch Temperaturänderungen gelöst werden, bei Exon 6 konnte ich aufgrund der geringen Größe beider Exons auf den Reverse-Primer von Exon 7 (siehe Tabelle 3, Seite 31) zurückgreifen. Zwei Versuche einen Reverse-Primer für Exon 6 zu erstellen, scheiterten an schlechter Ausbeute beziehungsweise an zu vielen Nebenprodukten.

Große Probleme bereitete dagegen **FANCE**, Exon 1. Trotz etlicher Versuche mit zwei verschiedenen Primerpaaren, die auch kreuzweise benutzt wurden, ließ es sich weder über Änderung der Annealingtemperatur noch durch Zugabe von Lösung Q oder Magnesiumchlorid sicher amplifizieren. Die besten Ergebnisse ließen sich durch Zugabe von Betaine erreichen, doch auch diese war nicht zuverlässig reproduzierbar.

Für die anderen Primerpaare wurden gute Ergebnisse mit den erarbeiteten Bedingungen erzielt.

Bei **Kiss1** gab es nach einigen Versuchen mit verschiedenen Temperaturen bei den Exons 3 und 4 auch gute Ergebnisse. Exon 2 wurde bei nicht optimalen Ergebnissen weiter bearbeitet. Bei **PIK3CA** ließen sich mit allen Primern sehr gute Ergebnisse erzielen.



Abbildung 4 : Agarosegel mit Marker, FANCE, Exon 3, Tumor-DNA, Größe der Banden des Molekulargewichtsmarkers ϕ X174 DNA/Hae III (von oben nach unten: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 234, 194 Basen)

4.2 SSCP-Mutationsanalyse

Nach Durchführung der SSCP-Elektrophorese und Färben der Gele konnten in der Mutationsanalyse bei **FANCE** bei den Exons 2.1 und 2.2 abweichende Wanderungsmuster nachgewiesen werden. Die Banden wiesen dabei drei verschiedene Muster auf (Abbildung 5).

In **FANCE**, Exon 5 fand sich bei MCF-7 ein Shift, der sich reproduzieren ließ (Abbildung 6).

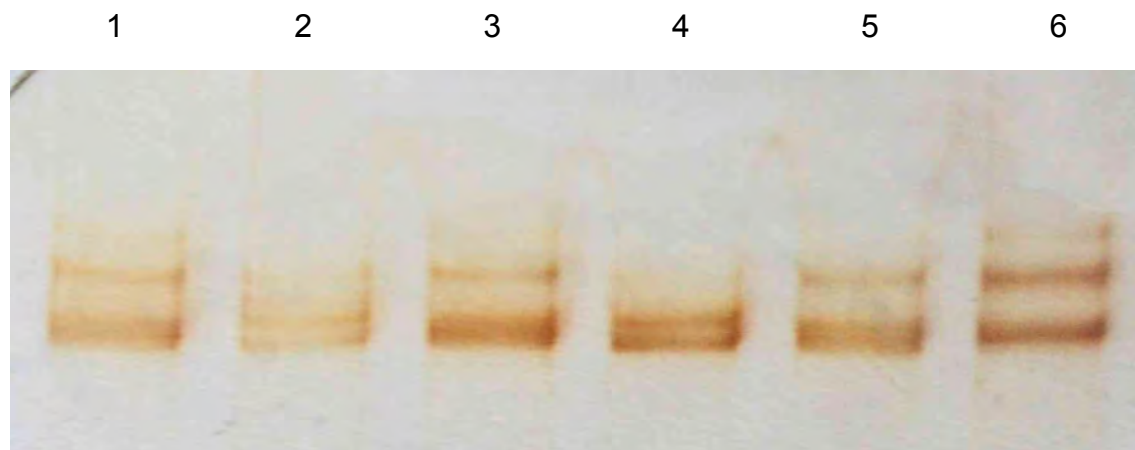


Abbildung 5: SSCP-Gel von PCR-Produkten von **FANCE**, Exon 2, Tumor-DNA, 8% Acrylamid-Gel mit 1%TBE, es ist ein Shift bei den Banden der 2. und 4. gegenüber den Spuren 1,3 und 5 zu erkennen sowie ein drittes Bandenmuster in der 6. Spur gegenüber allen anderen gezeigten.

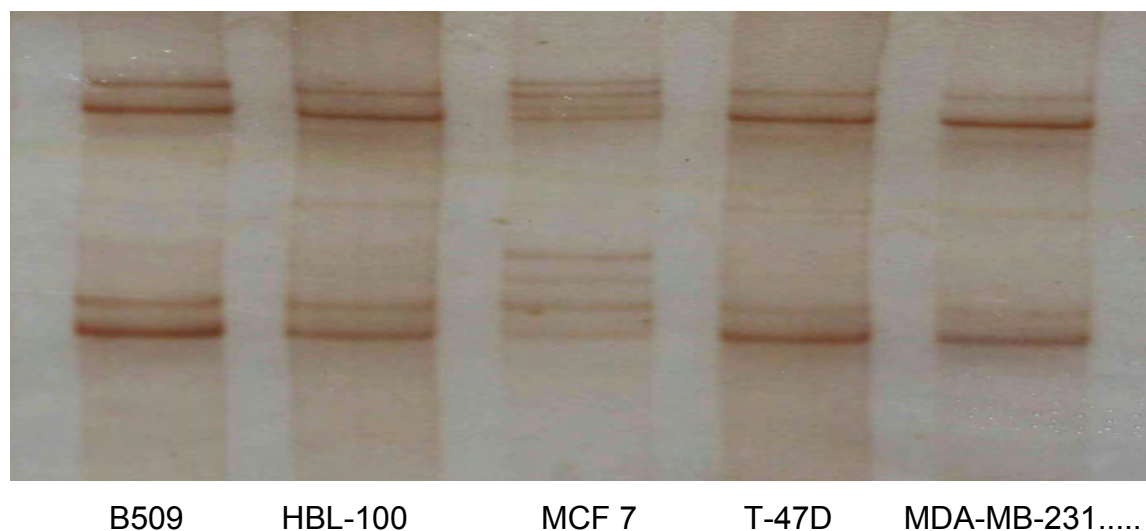


Abbildung 6: SSCP-Gel von PCR-Produkten von **FANCE**, Exon 5, DNA von Brustkrebs-Zelllinien, 8% Acrylamid-Gel mit 1%TBE, deutlich ist der Shift in der 3. Spur bei MCF-7 zu erkennen.

Überraschenderweise fanden sich in *FANCE*, Exon 9 keine deutlich abweichenden Wanderungsmuster, obwohl auch hier ein Polymorphismus in der Literatur (NCBI) beschrieben ist.

Die anderen Exons von *FANCE* wiesen keine abweichenden Bandenmuster auf (Abbildung 7 und Abbildung 8).

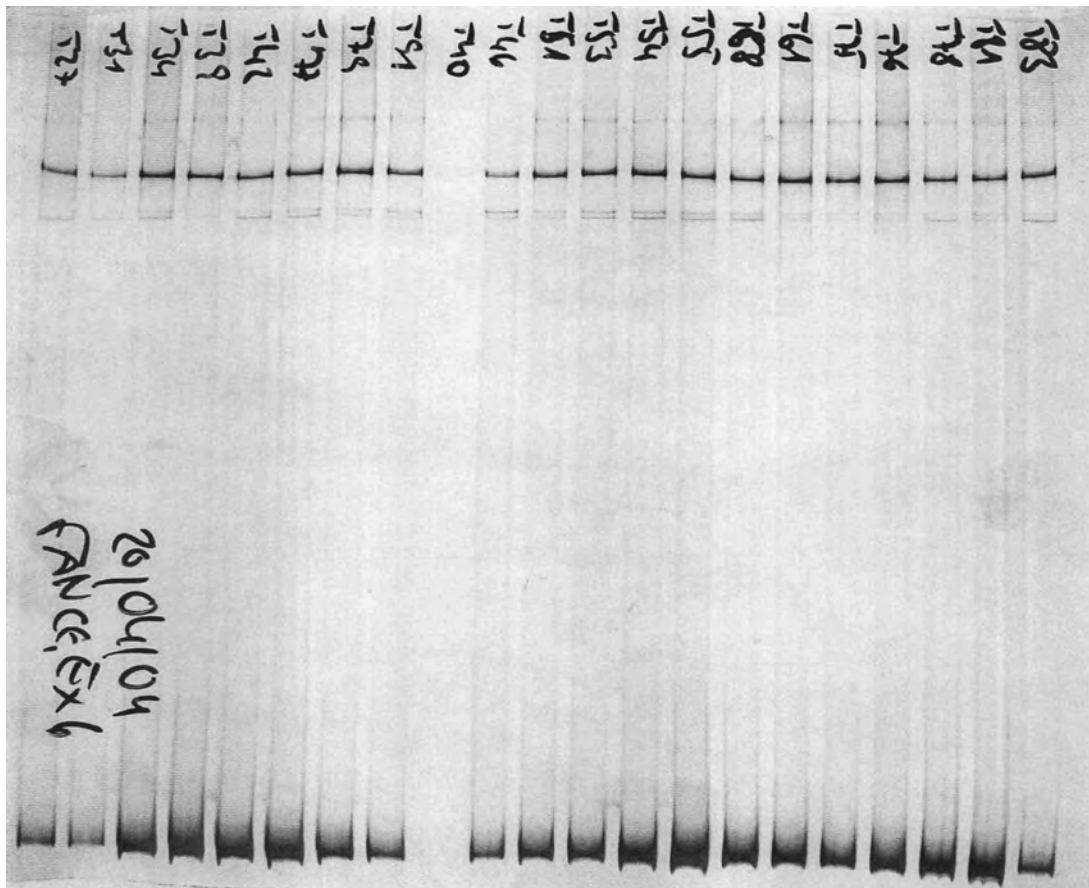


Abbildung 7: komplettes SSCP-Gel von PCR-Produkten von *FANCE* , Exon 6, DNA von Brustkrebstumoren, 8% Acrylamid-Gel mit 1%TBE, gleichmäßige Banden



Abbildung 8: Ausschnitt aus Abbildung 7, SSCP-Gel von PCR-Produkten von *FANCE* , Exon 6, DNA von Brustkrebstumoren, 8% Acrylamid-Gel mit 1%TBE

Kiss1 zeigte bei den untersuchten Exons 2, 3, 4 kein auffälliges Wanderungsverhalten.

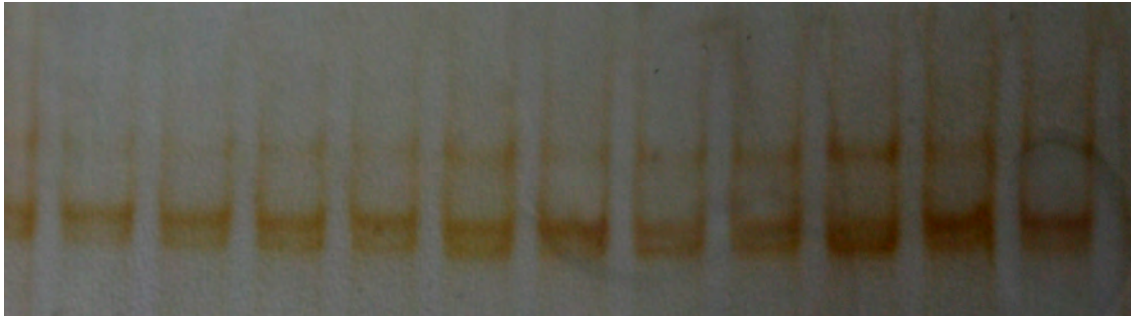


Abbildung 9: SSCP-Gel von PCR-Produkten von *Kiss1*, Exon 3, DNA von Brustkrebstumoren, 8% Acrylamid-Gel mit 1%TBE, identische Banden

PIK3CA

Die SSCP-Gele von *PIK3CA* waren im Wesentlichen unauffällig. Bei der Zelllinie T-47D ließ sich ein Shift schwach nachweisen.

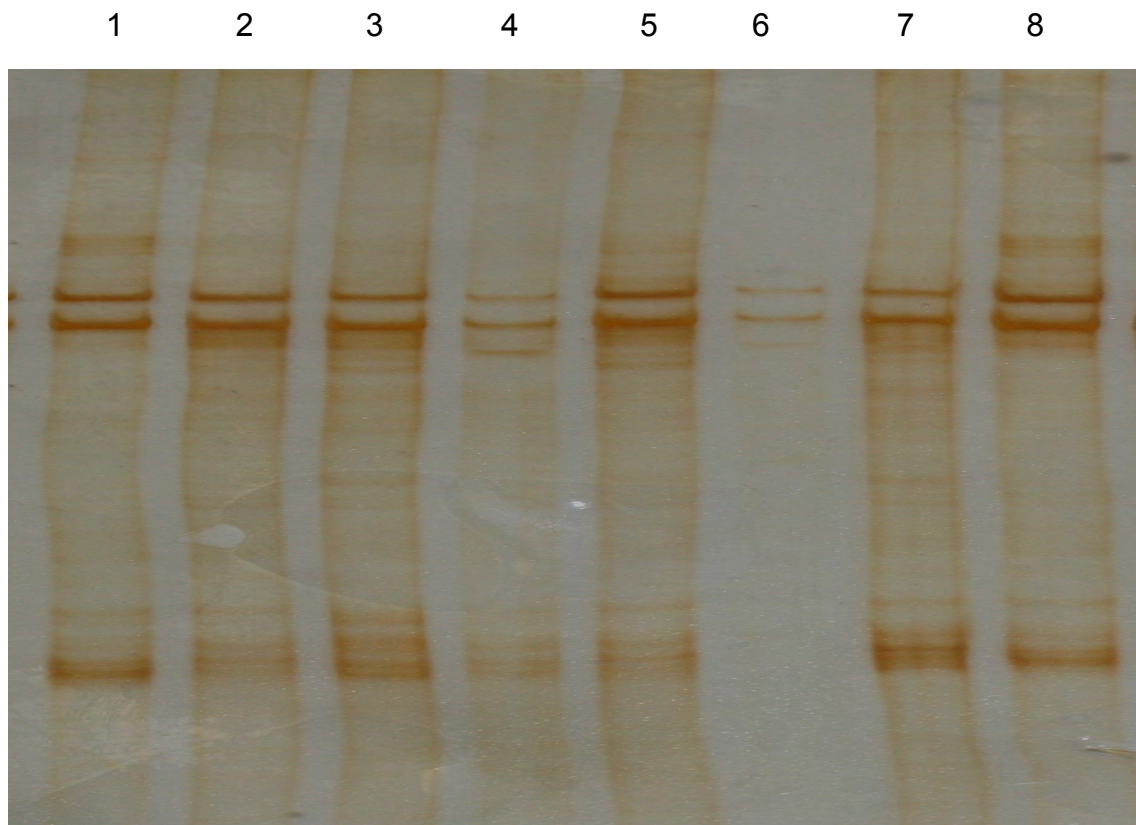


Abbildung 10: SSCP-Gel, *PIK3CA*, Exon 20, Tumor-DNA, 8% Acrylamid-Gel mit 1%TBE, verdächtig auf einen Shift in Spur 4 (Zelllinie T-47D), Spur 6 ist nicht beladen

4.3 DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte

PCR-Produkte sollten nach der SSCP-Gelelektrophorese sequenziert werden, um genauere Informationen bezüglich abweichenden Wanderungsverhaltens zu bekommen. Die Ergebnisse wurden mit Sequenzen der publizierten NCBI-Datenbank verglichen. Auf diese Weise ließen sich Abweichungen schnell aufspüren.

Als erstes wurden Proben mit einem auffälligen Bandenmuster in der SSCP-Gelelektrophorese sequenziert. Anschließend auch etliche andere Proben.

Finden sich Abweichungen in der Sequenz, so muss überlegt werden was diese bedeuten. Es gibt Missense Mutationen, welche zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen. Hier wird unterschieden in Restriktion oder Deletion, wobei ein DNA-Abschnitt fehlt, in Insertion, wobei ein zusätzliches DNA-Stück integriert wird und in Punktmutationen, bei denen lediglich ein Nukleotid durch ein anderes ersetzt wird. Stille Mutationen kommen auch vor. Hier hat das veränderte Nukleotid keinen Einfluss auf die Aminosäure. Dies ist möglich, da 21 Aminosäuren durch 64 unterschiedliche Basentriplets kodiert werden. So ist bei etlichen Aminosäuren die dritte Position des Codons unbedeutend (zum Beispiel bei Prolin, welches durch CCU, CCC, CCA, CCG kodiert wird). Stille Mutationen können beim Splicing der RNA eine Bedeutung erlangen, wenn es durch sie zu anderen oder neuen Splicingstellen kommt und dadurch die Aminosäuresequenz des Proteins verändert wird. Um dies auszuschließen muss aus der RNA eine cDNA gewonnen werden.

Als Polymorphismus wird das gleichzeitige Vorkommen von verschiedenen Allelen am gleichen Genlocus bezeichnet, wenn dieses häufiger vorkommt als der Mutationsrate entspricht (mindestens 1%). Häufig tritt ein Polymorphismus dort auf, wo eine Nukleotid-substitution zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führt und es dadurch nicht zu einem Selektionsdruck kommt. Es kann aber auch sein, dass durch den Polymorphismus eine genetische Varianz entsteht, welche unter bestimmten Lebensbedingungen einen Vorteil bedeutet. Die bessere Malaria-resistenz bei Menschen mit Sichelzellanämie ist ein Beispiel hierfür.

Die Sequenzierungen von **FANCE**, Exon 2.1 und 2.2 ergaben einen bekannten Polymorphismus an Position 572 (c.572 C>A, Abbildung 11). Der Wildtyp ist laut NCBI Datenbank Allel C, die Mutation Allel A. Die Mutation liegt im Codon an dritter Stelle und führt so nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Es ist in allen Fällen Prolin. Die Verteilung bei Europäern liegt bei 0,091 für A/A, 0,409 für A/C und bei 0,500 für C/C (NCBI => SNP, siehe Tabelle 5, Seite 54). Es zeigte sich bei der Sequenzierung einiger Tumor-DNAs von Exon 3 ein Polymorphismus in Intron 3, 39 Basen nach dem Ende des Exons (siehe Abbildung 12)

Der in **FANCE**, Exon 5 aufgefallene Shift im SSCP-Gel für MCF-7 ließ sich in verschiedenen Sequenzierungen nicht bestätigen. Die Sequenz war entweder nicht verwertbar oder völlig übereinstimmend mit der Gen-Datenbank sowohl in 3'-5'- als auch in 5'-3'-Richtung (NCBI, Ensembl).

Obwohl in **FANCE**, Exon 9 nur einige kaum wahrnehmbare Shifts auffielen, habe ich einige Proben sequenziert. Es zeigte sich, dass es auch hier Abweichungen von der Referenzsequenz gibt, die einen Polymorphismus der Literatur bestätigen (Abbildung 13). An Position 1689 (c.1689G>A) tritt neben dem Wildtyp Guanin auch die Base Adenin auf. Da hier die erste Position des Codons codiert wird, kommt es in diesem Fall zu einem Aminosäuretausch von Alanin zu Threonin. Dies ist eine Missense-Mutation.

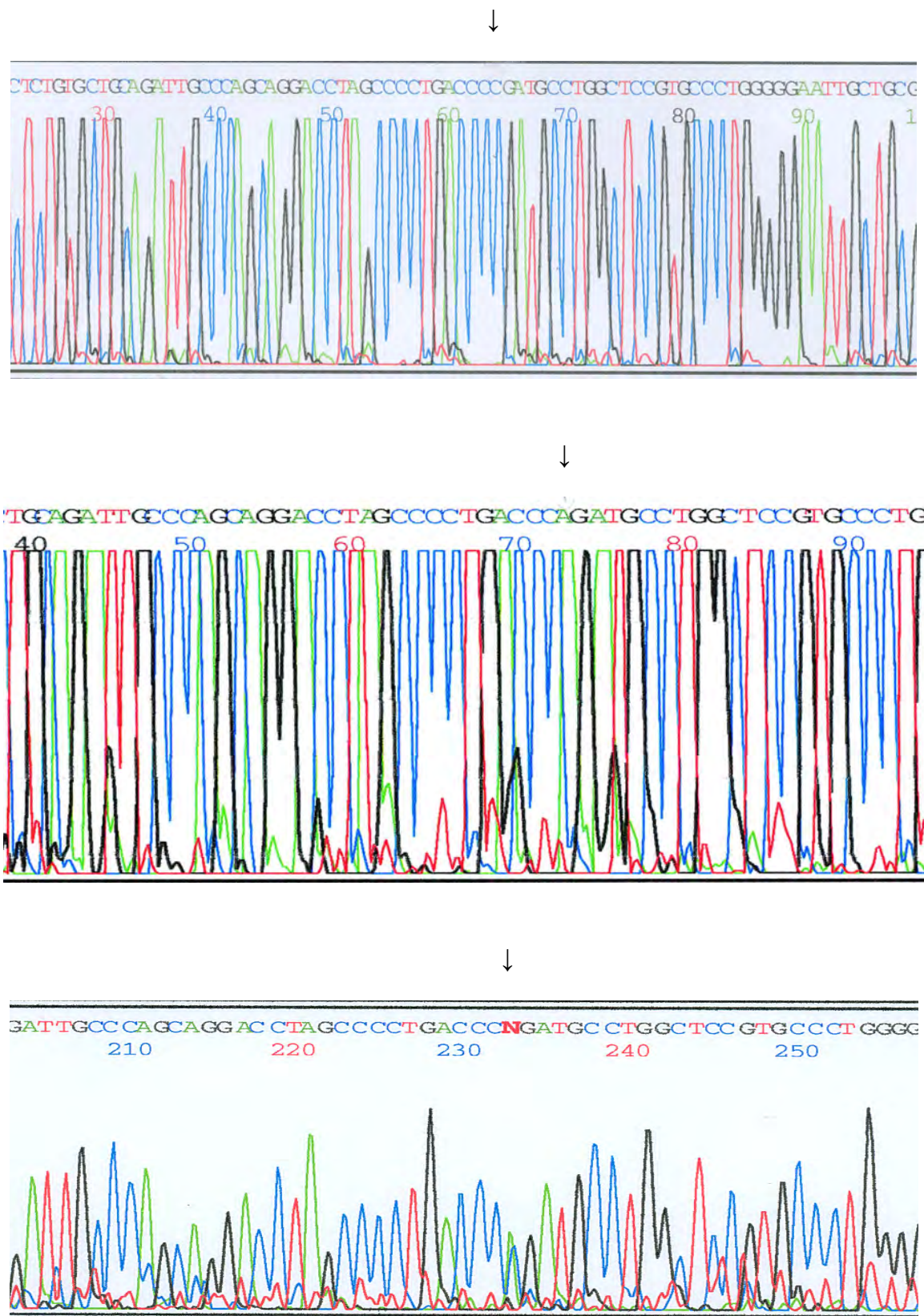


Abbildung 11: Sequenzen *FANCE*, Exon 2; Polymorphismus an Position 572; oben C/C (Wildtyp), Mitte A/A, unten A/C (jeweils unterhalb des Pfeils)

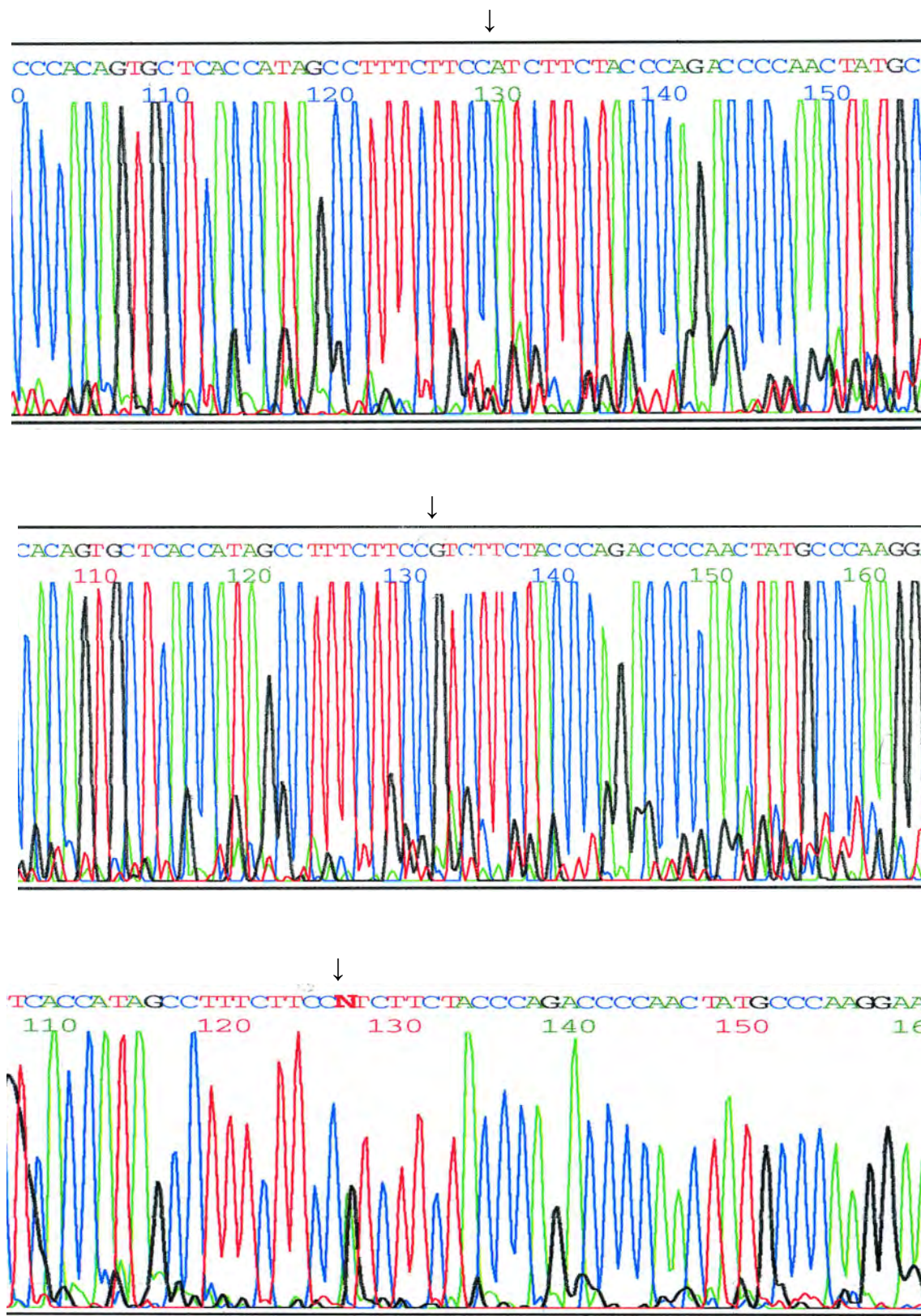


Abbildung 12: Sequenzen *FANCE*, Intron 3, Polymorphismus im Intron 3; oben A/A, Mitte G/G, unten A/G

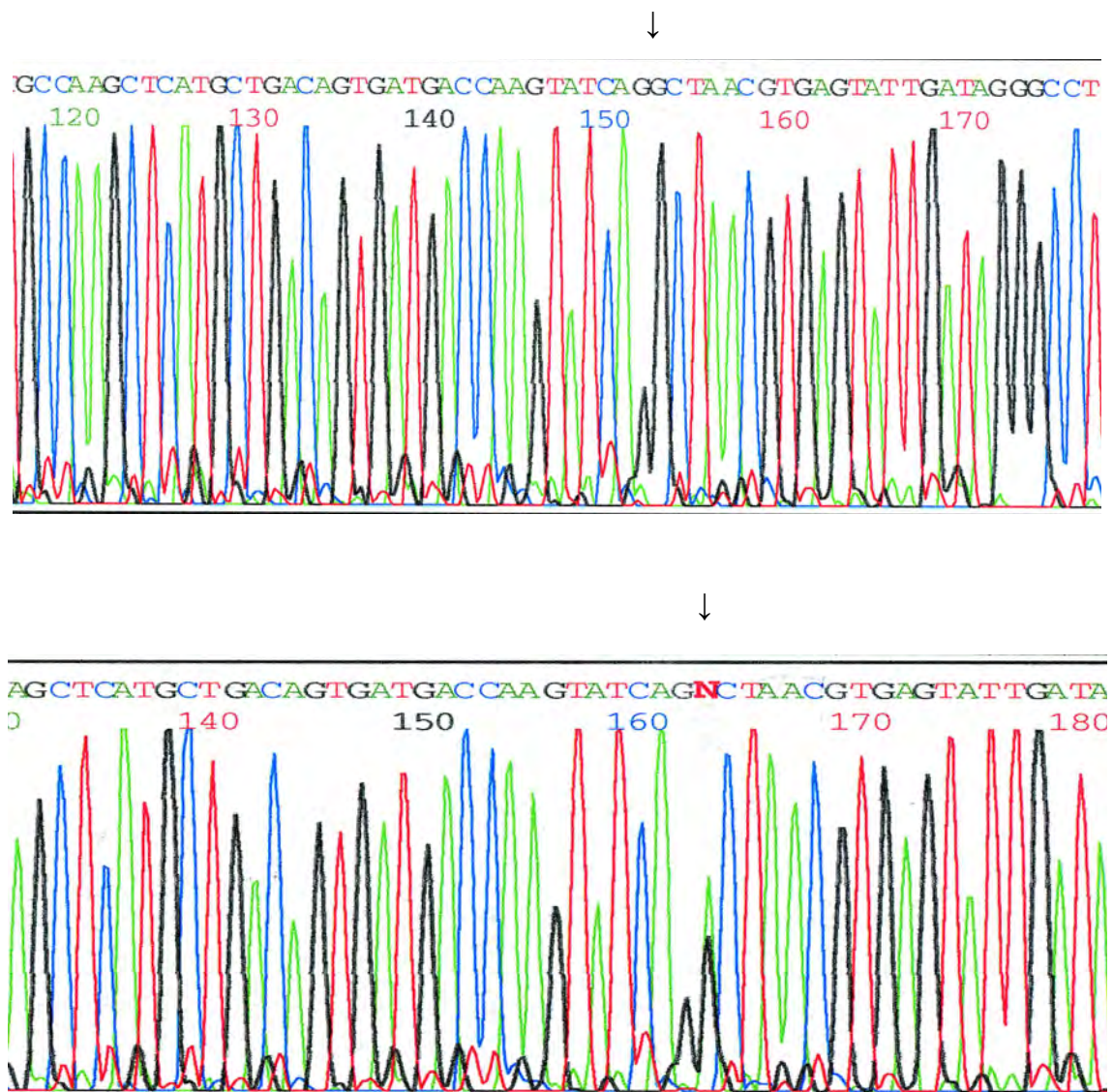


Abbildung 13: Sequenzen *FANCE*, Exon 9, Polymorphismus mit Missense-Mutation an mRNA-Position 1689; oben Wildtyp (G/G), unten Mutation (G/A, Alanin wird zu Threonin, Missense Mutation)

Gen	Exon/ Intron	Nukleo- -tid	Mutation	Amino- säure	Anzahl gefundener Mutationen	Homo-/ Hetero- zygot	neu/be- kannt	Typ der Mutation
<i>FANCE</i>	Exon 2	387	C>A	P129P	12	C/A	Bekannt	SNP
					2	A/A		
	Intron 3		A>G		4	A/G	Bekannt	SNP
					7	G/G		
	Exon 9	1504	G>A	A502T	5	G/A	Bekannt	SNP, Missense- Mutation
<i>Kiss1</i>	Exon 2		G>A		1	G/A	bekannt	Untrans- latierte Region
	Exon 4	396	C>G	P81A	s. West et al.		Bekannt	Missense
<i>PIK3CA</i>	Exon 20	3140	A>G	H1047R	T-47D		Bekannt	
		3202	A>G		3	A/G	Neu	

Tabelle 4: in dieser Arbeit gefundene Mutationen

Exon/Intron	SNP mRNA- Position Genotyp	an und Populations- genetische Häufigkeit*	Untersuchte Sequenzen	erwartete Anzahl	Tatsächliche Anzahl
Exon 2	572 C/C	50%	30	15/30	15/30
	572 C/A	49%		14/30	12/30
	572 A/A	1%		0-1/30	2/30
Intron 3	A/A	20%	14	2-3/14	3/14
	A/G	50%		7/14	4/14
	G/G	30%		4-5/14	7/14
Exon 9	1689 G/G	92%	14	13/14	9/14
	1689 A/G	8%		1-2/14	5/14**

* laut NCBI

** primär auffällige SSCs sequenziert.

Tabelle 5: Häufigkeiten von Polymorphismen bei FANCE

Bei den Sequenzen von ***Kiss1*** war beim ersten Protokoll viel Hintergrund zu sehen. Die Sequenzen daher zum großen Teil nicht verwertbar. Die wenigen guten Sequenzen von Exon 2 wiesen alle die gleichen Abweichungen von der Referenzsequenz von West et al. 1998 auf. Es stellte sich bei Heranziehen einer weiteren Referenzsequenz (www.ensembl.org) heraus, dass die erste Referenzsequenz fehlerhaft ist. West et al. berichten von vier Exons, in den

Datenbanken von NCBI und Ensembl finden sich nur drei Exons. Deren erstes, mein zweites Exon (im weiteren Verlauf werde ich die Nummerierung von West et al. verwenden), beginnt zudem 20 Bp früher. Direkt vor Exon 2 von West et al. ist ein Guanin zu viel verzeichnet. 11-13Bp vor Exonende sind bei West et al. drei Guanin in Folge, in den anderen Referenzsequenzen nur zwei. Im Intronbereich nach dem Exon 2 ist ein Adenin zu wenig angegeben, es müssen jedoch zwei in Folge sein. Darüber hinaus fand sich in einer Probe ein Basentausch im nicht translatierten Teil an Position 61, der bei Ensembl.org als Mutation bekannt ist.

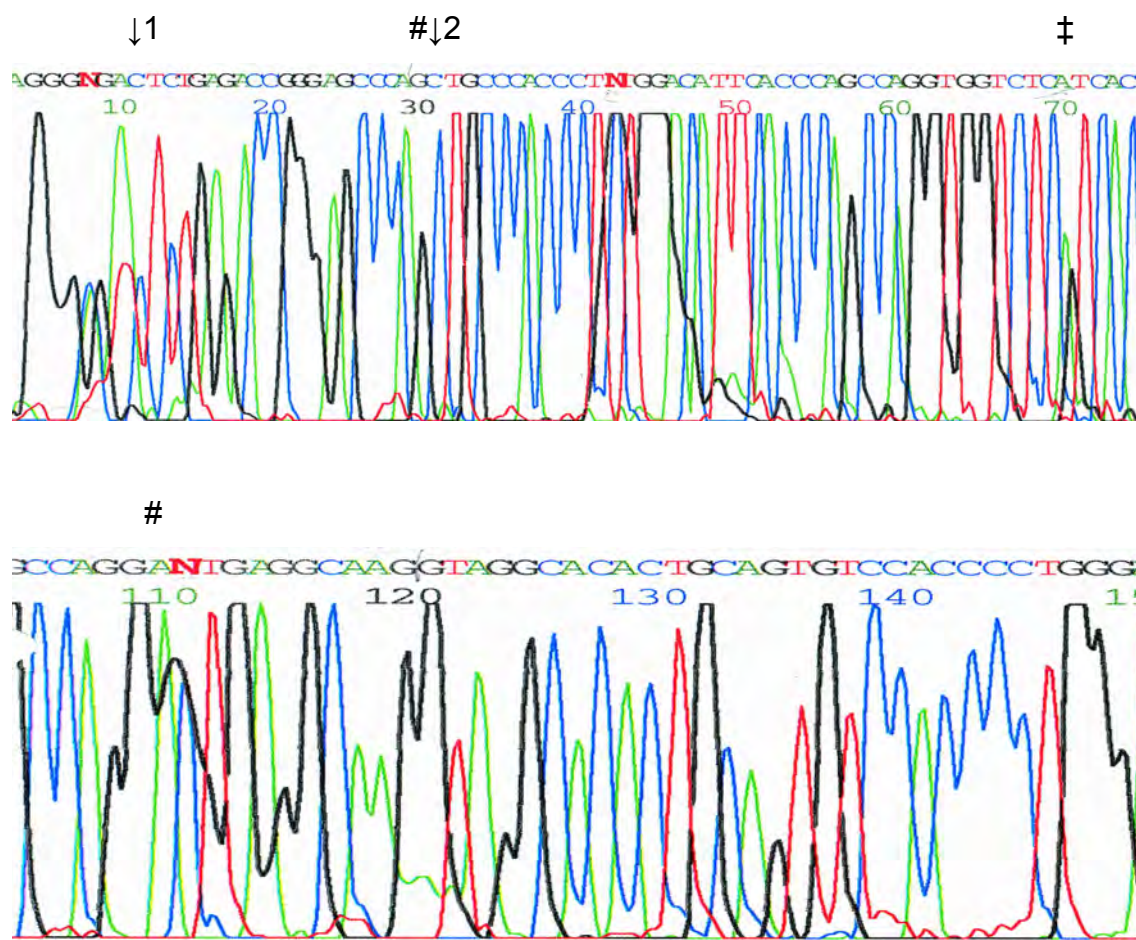


Abbildung 14: Sequenzen *Kiss1*, Exon 2; ‡ Basentausch Guanin zu Adenin an Position 61,

↓differierender Exonbeginn (↓1: Exonbeginn bei NCBI, ↓2: Exonbeginn bei West et al.);

jeweils bei West et al. ein Guanin mehr, also zuviel, verzeichnet,

N ist jeweils auf Background zurückzuführen

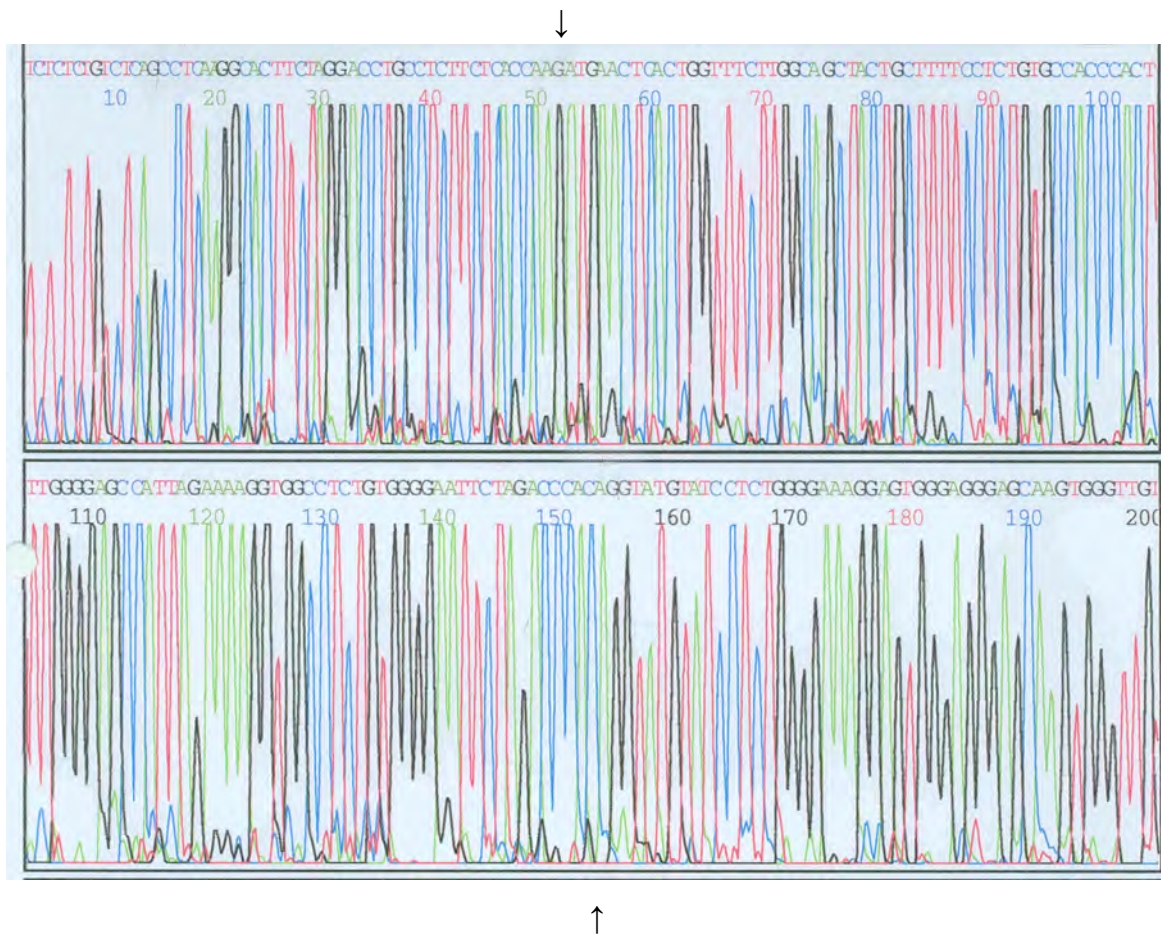


Abbildung 15: unauffällige Sequenz von *Kiss1*, Exon 3, bei ↓ beginnt das Exon mit ATG, bei ↑ endet es mit CAG

Bei Exon 3 ergaben sich keine Auffälligkeiten bei der Sequenzierung der Zelllinien und fünf Tumor-DNAs. Es fanden sich weder Abweichungen von der Referenzsequenz noch Mutationen.

Exon 4 ließ sich aufgrund der Größe nur vollständig sequenzieren, indem in beide Richtungen je eine Sequenz durchgeführt wurde. Der translatierte Bereich der Sequenzen war bis auf zwei regelhafte Abweichungen von der Referenz unauffällig. Diese Abweichungen ließen sich mit den oben genannten Alternativen klären: An Stelle 139 des Exons (c.396G>C) steht bei West et al. ein Guanin statt Cytosin. Dies ist zugleich eine Missense Mutation in den anderen beiden Datenbanken. Aus Prolin würde Arginin entstehen. An Position 307 fehlt bei West et al. ein Adenin. Es kommt dadurch zur Verschiebung des

Leserasters und auf diese Weise zu sieben zusätzlichen Codons gegenüber den anderen Referenzsequenzen.

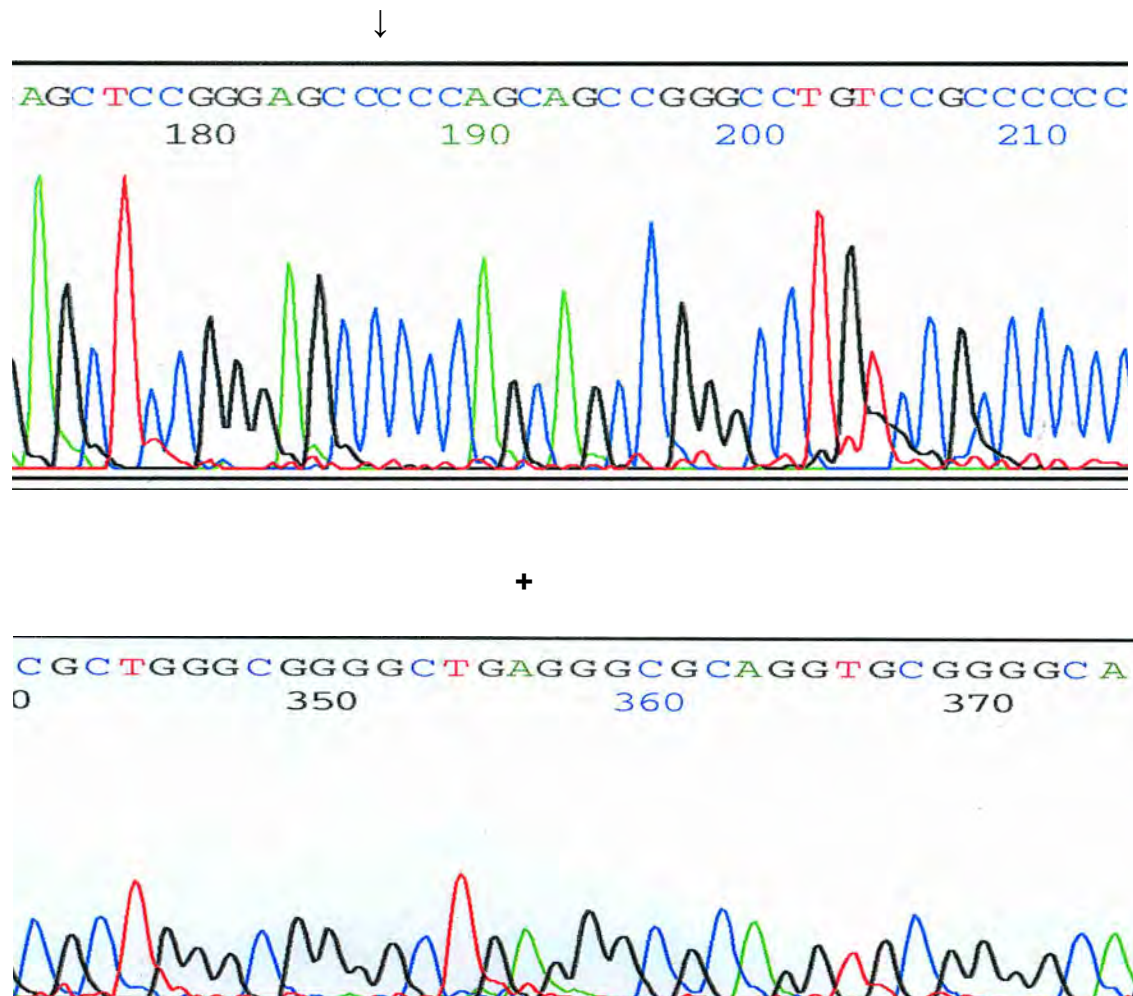


Abbildung 16: Sequenzen *Kiss1*, Exon 4 ↓ Guanin bei West et al., statt Cytosin und dadurch Missense-Mutation mit Bildung von Arginin statt Prolin

+ Adenin, dass bei West et al. fehlt und dadurch zum vorzeitigen Stopcodon führt

Die in der Literatur beschriebenen Mutationen für **PIK3CA** waren bei der geringen Anzahl (Exon 9: 8 Tumor-DNAs und 3 Zelllinien; Exon 20: 7 Tumor-DNAs und 4 Zelllinien) der durchgeführten Sequenzen nicht nachvollziehbar. Die Mutation c.3140A>G, wie von Bachmann et al. (2004) beschrieben, fand sich in der Zelllinie T-47D. Außerdem fiel an Position 3202 ein möglicher Polymorphismus auf: T-47D, HBL-100 und H602 waren jeweils heterozygot mit A und G (siehe Abbildung 17).

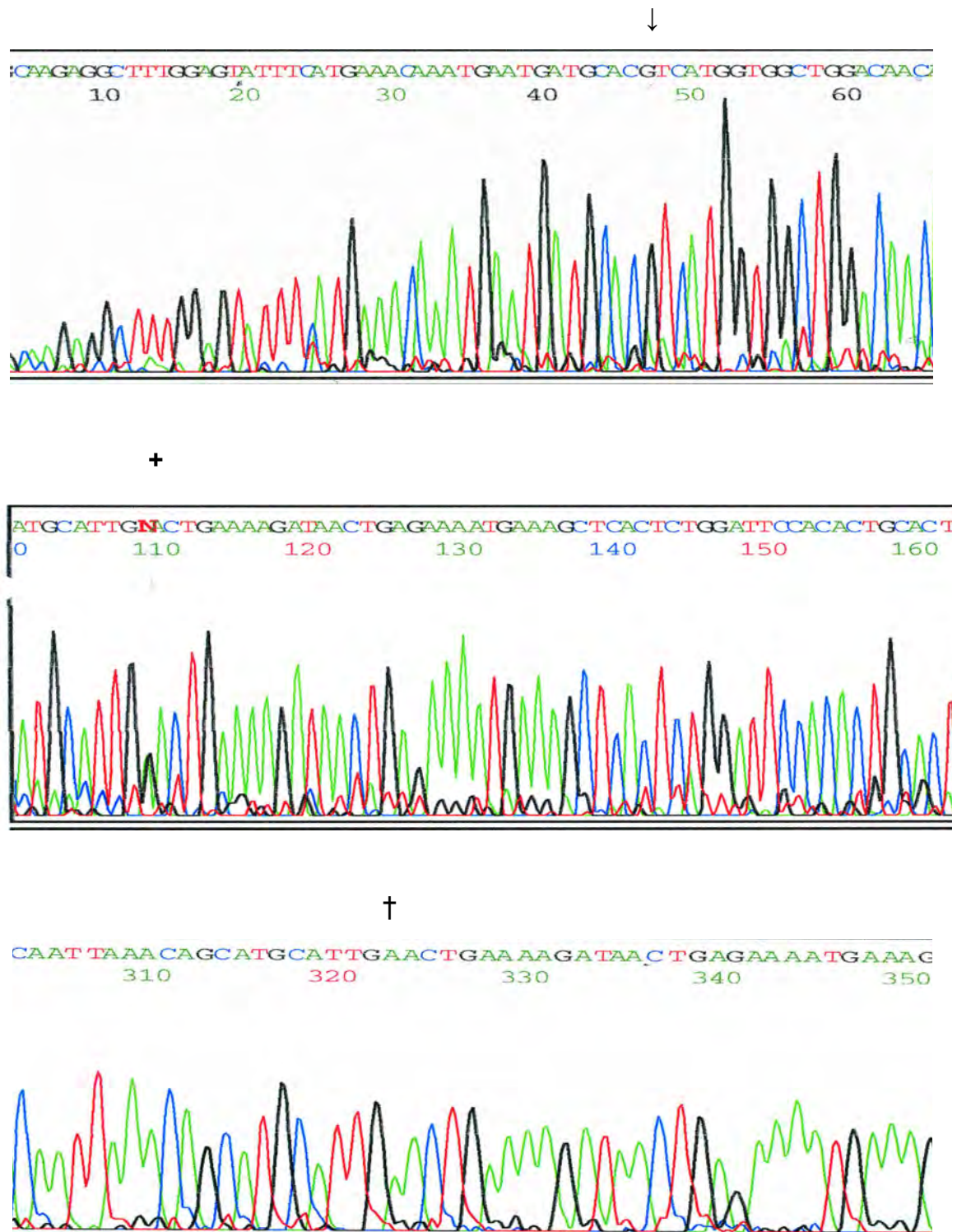


Abbildung 17: Sequenzen *PIK3CA*, Exon 20, ↓ bekannte Mutation A3140G (oben);
 + Polymorphismus an Position 3202 Heterozygot mit Guanin und Adenin, † Wildtyp
 homozygot für A (Mitte und unten)

4.4 cDNA-Erstellung und Sequenzierung

Der im SSCP-Gel mehrfach aufgefallene Shift bei FANCE, Exon 5 in der DNA der Tumorzelllinie von MCF-7 ließ sich trotz wiederholter Versuche in der Sequenzierung nicht darstellen. Deshalb wurde von einer Zellkultur der Linie MCF-7 RNA präpariert, daraus cDNA hergestellt, diese mittels PCR vervielfältigt und anschließend sequenziert. Auf diese Weise wurde auf RNA-Ebene der Bereich Exon 3-5 von *FANCE* untersucht. Die sehr guten Sequenzen sind völlig übereinstimmend mit der mRNA-Referenzsequenz (siehe Abbildung 18).

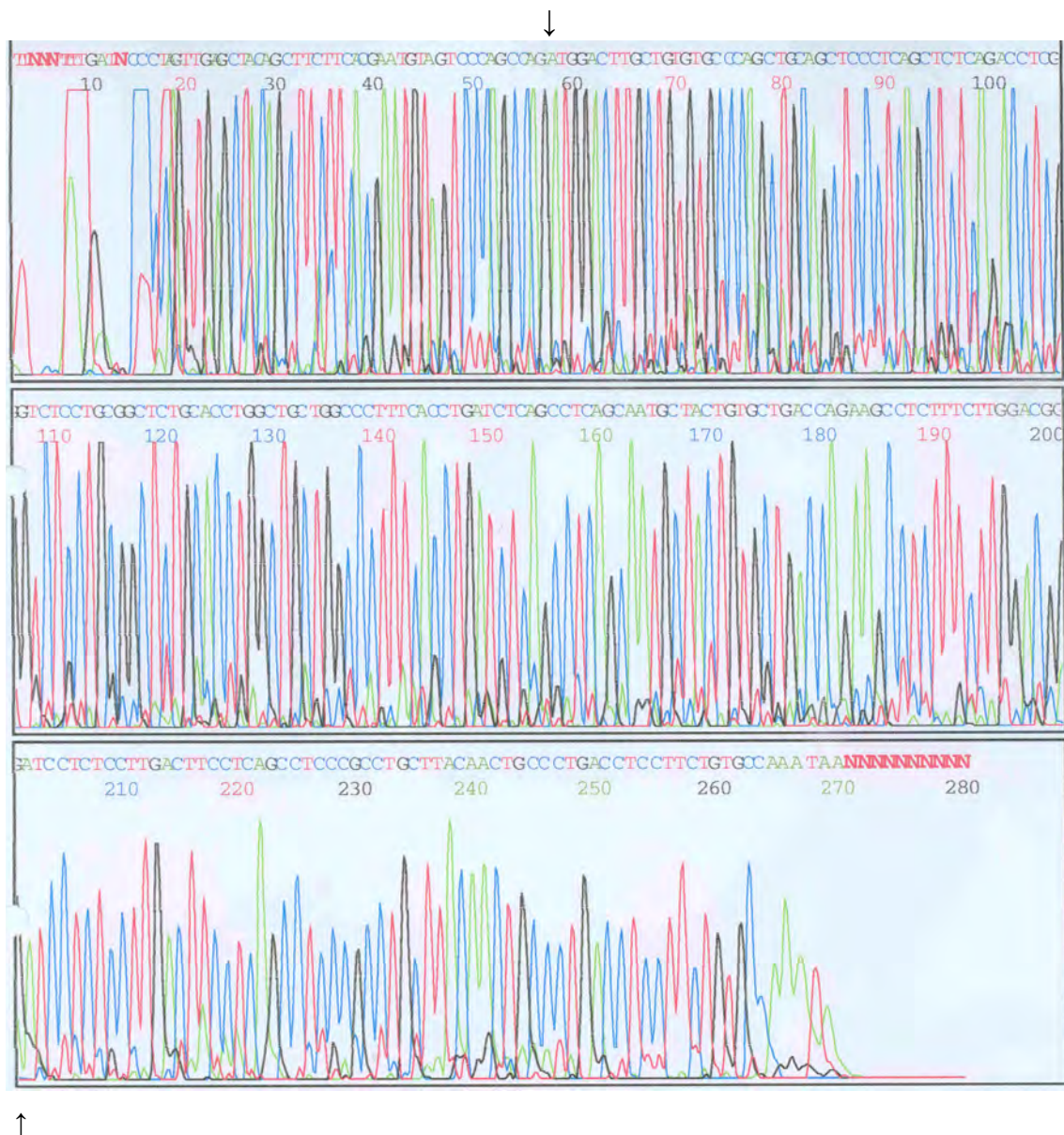


Abbildung 18: cDNA-Sequenz von Exon 4, 5, 6 von FANCE der Zelllinie MCF-7, ↓ Beginn von Exon 5 mit ATGG, davor Ende von Exon 4, ↑ Beginn von Exon 6 bei ATCC

5. Diskussion

Es gibt familiär gehäuft auftretende Fälle von Brustkrebs, denen zum Beispiel Mutationen in den *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen zugrunde liegen. Der Großteil mit etwa 95% ist jedoch sporadisch. Bei diesen treten eher Änderungen der Expression (Yoshikawa et al. 1999) oder Allelverluste (Schmutzler et al. 1997) von *BRCA1* und *BRCA2* auf. Die Funktion der Genprodukte scheint allerdings recht häufig betroffen zu sein. Insgesamt gibt es wenig aktuelle Literatur zu sporadischem Brustkrebs und der Großteil der Artikel bezieht sich wie Khoo et al. (1999) oder Yoshikawa et al. (1999) auf bestimmte Bevölkerungsgruppen.

Nachdem im Juli 2002 von Howlett et al. (Howlett et al. 2002) gezeigt wurde, dass *BRCA2* identisch ist mit *FANCD1*, stellte sich die Frage, ob andere Fanconi Anämie auslösende Gene bei heterozygoten Mutationen ein Brustkrebsrisiko bedeuten.

In dieser Arbeit wurde das kleinste zum damaligen Zeitpunkt bekannte Gen der Fanconi-Anämie-Gene, ***FANCE***, auf Mutationen hin untersucht.

Wie bereits erwähnt, lassen sich mit der SSCP-Mutationsanalyse relativ schnell viele Proben screenen. Allerdings führt nicht jede Änderung in der Faltung der DNA-Einzelstränge zu einem veränderten Laufverhalten im Polyacrylamidgel. Teilweise stellt sich das veränderte Laufverhalten auch nur unter bestimmten Bedingungen (Temperatur, Gelzusammensetzung) dar. So können Mutationen übersehen werden, beziehungsweise wird die Analyse deutlich aufwendiger und verliert daher ihren Vorteil an Zeit und Aufwand gegenüber der direkten Sequenzierung. Zudem weist ein verändertes Bandenmuster im SSCP-Gel zwar auf eine veränderte Basensequenz hin, es ist jedoch keine Aussage über die Art der Änderung zu machen. Es muss also im zweiten Schritt die Sequenzierung erfolgen. Am besten eignet sich die SSCP-Analyse für Mutationsanalysen mit bekannten Bedingungen und seltenen Polymorphismen. Letztere führen auch zu einem anderen Laufverhalten und können dadurch die Arbeit vermehren.

Der bekannte Polymorphismus bei *FANCE* in Exon 2 ließ sich im SSCP-Gel und der Sequenzierung nachweisen, die Polymorphismen von Exon 9 und Intron 3 stellten sich jedoch unter den durchgeführten Bedingungen nicht dar. Andererseits ließ sich der deutliche Shift im SSCP-Gel von MC7 in Exon 5 trotz mehrfacher Versuche nicht in der Sequenzierung darstellen. Die Sequenzen waren entweder unauffällig oder in beide Richtungen nicht verwertbar. Dies könnte daran liegen, dass die Primer nur an normaler DNA angreifen. Aus diesem Grund wurde in diesem Fall RNA präpariert und die daraus resultierende cDNA sequenziert. Auch diese war unauffällig (siehe Abbildung 18). Es könnte sich hier um das Phänomen des Alleldrops handeln, wobei der Primer bevorzugt an die normale Sequenz bindet.

Eine große Studie aus Großbritannien (Seal et al. 2003) untersuchte Keimbahn-DNA von 88 Patienten mit familiärem Brustkrebs, welche *BRCA1* und *BRCA2* negativ sind. Es wurden alle DNAs auf Mutationen in *FANCE*, sowie den anderen bekannten Fanconi-Anämie-Genen *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCF* und *FANCG* gescreent. Bei all diesen Untersuchungen fanden sich nur neun Missense-Mutationen. Von diesen waren zwei in der Literatur bekannt und von den sieben neuen waren fünf auch in den gesunden Kontrollen vorhanden. Es blieben also zwei Mutationen bei den Betroffenen, die als potenzielle Auslöser für Brustkrebs gelten konnten. Eine davon ist in *FANCE* lokalisiert. Hier wird an Nukleotidposition 1094 Adenin statt Guanin gefunden. Dies führt an Aminosäureposition 365 zu einem Austausch von Arginin zu Lysin. Diese Mutation könnte MCF-7 zugrunde liegen. Insgesamt fand sich jedoch kein Zusammenhang dieser Fanconi-Gene mit familiärem Brustkrebs. Ob die Mutationsrate bei sporadischem Brustkrebs höher ist, bleibt offen und bedarf weiterer Untersuchungen. Für *FANCE* scheint es jedenfalls analog zur Studie auch bei sporadischem Brustkrebs keine Auffälligkeiten zu geben.

Seit Beginn meiner Arbeit wurden verschiedene weitere Fanconi-Gene entdeckt und untersucht. So wurde 2004 von Levitus et al. über *FANCI* und *FANCI/Bach1/BRIP1* berichtet, im Oktober 2003 von Meetei et al. (2003a) festgestellt, dass *PHF9* ein Fanconi-Gen, *FANCL*, ist; im September 2005

stellten Meetei et al. *FANCM* vor. Und Xia et al. stellten in 2006 die Verbindung von *PALB2* und *BRCA2* vor und 2007 die Identifizierung von *PALB2* als *FANCN*. Die Gene sind sequenziert, seit kurzem auch *FANCI* (Dorsmann et al. 2007), und es ist auch etwas über die Funktionen bekannt (siehe auch Abbildung 2, Seite 18). *FANCL*, *FANCM* und *FANCN* sind Bestandteile des Kernkomplexes, wobei *FANCL* die E3-Ligase ist, welche *FANCD2* monoubiquitiniert. (Meetei et al. 2003A, Wang 2007). *FANCI* scheint parallel zu *FANCD2* ebenfalls monoubiquitiniert zu werden, über die weitere Funktion ist aber noch nichts bekannt (Smogorzewska et al. 2007). *FANCI/BACH1/RBIP1* ist ein Effektor von *BRCA1* und als solcher nach dem Kernkomplex im Pathway anzusiedeln (Cantor u. Andreassen 2006, Litman et al. 2005, Levrin et al. 2005, Seal et al. 2006, Wang 2007). Alle Gene könnten in der Lage sein die Funktion von *BRCA1* und *BRCA2* zu ändern und damit zu einer Prädisposition für Brustkrebs führen.

Homozygote Veränderungen in diesen Genen führen immer zur Fanconi Anämie. Diese wird oft im Alter von 3-14 Jahren diagnostiziert.

Neben einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit fallen auch beschleunigte Telomerverkürzungen auf (Bogliolo et al. 2002, D'Andrea 2003). Die Telomerlänge ist wiederum wichtig für die Chromosomenstabilität.

Die klinischen Merkmale sind sehr heterogen. Es kommt neben Hautveränderungen und Wachstumsretardierungen besonders zu Anomalien der oberen Extremität und bei Jungen der Gonaden. Im Laufe des Lebens entwickelt sich ein schleichendes Knochenmarkversagen. Daneben ist das Leben der Patienten durch ein deutlich erhöhtes Krebsrisiko bedroht. Besonders häufig bildet sich eine akute myeloische Leukämie (AML) aus. Aber auch das Risiko für solide Tumore, besonders Plattenepithelkarzinome, ist erhöht (Hoffman et al. 1991, Mathew 2006).

Therapiert wird Fanconi Anämie heute mit Androgenen, Cytokinen und zuletzt einer Knochenmarktransplantation. Dennoch bleibt das erhöhte Krebsrisiko bestehen.

Mutationen in den Genen *FANCI/BACH1/BRIP1* (Cantor u. Andreassen 2006, Seal et al. 2006) und *FANCN/PALB2* (Rahmann et al. 2007) führen in heterozygoter Form zu einem etwa zweifach erhöhten Risiko an Brustkrebs zu

erkranken. Die Studien beziehen sich allerdings auf familiären Brustkrebs. *FANCI/BACH1/BRIP1* und *FANCD1/PALB2* sind damit ähnlich zu bewerten wie *CHEK2*, *ATM*, *NBS1* oder *RAD50*, die ein 2-4fach erhöhtes Risiko aufweisen und deren Proteine mit dem FA/BRCA-Pathway interagieren (siehe Abbildung 2, Seite 18). Das Brustkrebsrisiko ist bei *p53* und *PTEN* noch deutlich höher (Thorlacius et al. 1995, Walsh u. King 2007). *NBS1* und *RAD50* bilden zusammen mit *MRE11* einen Komplex (MRN-Komplex), der eine wichtige Rolle bei der Registrierung von DSB spielt und dazu führt, dass *ATM* aktiviert wird. Aktiviertes *ATM* phosphoryliert wiederum diverse Enzyme, unter anderem *p53* und *CHEK2*, die wichtig sind für Checkpoint-Rückmeldungen und DNA-Reparatur (Williams et al. 2007).

Die ursprüngliche These, dass Gene der Fanconi-Gruppe an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt sind, hat sich als korrekt herausgestellt. Nur scheint nicht *FANCD1* als Verbindung zwischen dem Kernkomplex und *BRCA1/2* beteiligt zu sein, sondern zwei Gene die nach dem Komplex direkt mit *BRCA1* bzw. *BRCA2* interagieren (siehe Abbildung 2, Seite 18).

Das als Metastasensuppressorgen beschriebene ***Kiss1*** wird in den meisten Arbeiten auf seine Expression hin untersucht (Lee u. Welch 1997, Mitchell et al. 2006, Shirasaki et al. 2001) oder in Bezug auf seinen Rezeptor GPR54 (Harms et al. 2003, Kotani et al. 2001, Ohtaki et al. 2001). Die einzige Arbeit auf DNA-Ebene untersucht keine Tumor-DNA und ist von West et al. (1998). Hier wurden vorrangig die Intron-Exon-Grenzen untersucht. Die daraus resultierende Sequenz wies etliche Fehler auf. In der vorliegenden Arbeit sollte die genomische Ebene untersucht werden.

So weit bei der geringen Zahl von Proben Rückschlüsse möglich sind, kommt es bei *Kiss1* in Exon 2 und 3 nicht zu Mutationen die bei Brustkrebs auftreten. Außer dem Basentausch bei einer Tumor-DNA (s.o.) fanden sich auch die in der Literatur (NCBI, Ensembl) beschriebenen SNPs nicht in meinen Proben. Es wurden nicht alle Proben sequenziert. Und so bleiben hier Fragen offen.

In der neueren Literatur gibt es Hinweise, dass *Kiss1* im zentralen Nervensystem von Östrogenrezeptoren reguliert wird (NCBI-Literaturrecherche). Da das Vorhandensein von Östrogenrezeptor alpha ein

Kriterium für die Beurteilung der Prognose von Brustkrebs ist, wäre auch dies noch eine Möglichkeit, die genauere Funktion von *Kiss1* als Metastasen-suppressor zu erforschen. Marot et al. (2007) berichten von niedrigen *Kiss1*-Spiegeln bei Rezeptor-negativen Zellen. Wohingegen Zellen, die Rezeptor-positiv aber mit Tamoxifen (ein Antiöstrogen) behandelt sind, hohe Spiegel von *Kiss1* und GPR54 aufweisen. Diese hohen Spiegel sind überraschend mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall verbunden. Es stellt sich also die Frage, ob diese Patientinnen tatsächlich von ihrer Therapie profitieren.

Das Hauptinteresse scheint sich zur Zeit auf die Funktionen bei der sexuellen Reife des Menschen zu richten (NCBI-Literaturrecherche). Es wäre vielleicht auch interessant zu untersuchen, ob schon zu diesem Zeitpunkt die Expression von *Kiss1* verändert wird.

Auch die Promoterregion von *Kiss1* könnte interessante Veränderungen aufweisen. Wie Li et al. (2007) berichten gibt es drei Östrogenrezeptor-elemente, GC-reiche Sp1-Bindungsstellen sowie zwei AP1-Bindungsstellen. Mutationen in diesen Bereichen könnten auch für eine veränderte Aktivität verantwortlich sein.

Bei **PIK3CA** fanden sich in den untersuchten Exons 9 und 20 unterschiedliche Bandenmuster im SSCP-Gel, diese ließen sich aber nicht mit Abweichungen der Sequenz korrelieren. Es könnte sein, dass die Bedingungen für die SSCP-Gele nicht ideal waren und es dadurch zu nicht aussagekräftigen Bandenmustern gekommen ist. Die durchgeführten Sequenzen waren weitgehend unauffällig. Es wurden zur Kontrolle allerdings insgesamt nur 15 Tumor-DNAs und drei bzw. 4 Zelllinien sequenziert.

Die in der Literatur genannten Mutationen konzentrieren sich im wesentlichen auf die helikale Domäne von Exon 9 und die Kinase-Domäne von Exon 20 (Bachmann et al. 2004, Buttitta et al. 2005, Kang et al. 2005, Li et al. 2006, Samuels et al. 2004, Wu et al. 2005), weshalb diese beiden Exons zur Kontrolle mit untersucht wurden. In diesen beiden Exons sind wiederum besonders häufig p.E542K (c.1624G>A), p.E545K (c.1633G>A) (Exon 9) und p.H1047R (c.3140A>G) (Exon 20) verändert.

Nach den Ergebnissen der Literatur (Bachmann et al. 2004, Lee et al. 2005, Samuels et al. 2004) müssten ca. 25% der Proben Mutationen aufweisen, also bei der untersuchten Tumor-DNA etwa 3-4 Proben. Studien die sich vornehmlich auf SSCP-Analyse stützen, weisen wegen der geringeren normalen Hintergrund-DNA sogar noch etwas höhere Mutationsraten auf (Buttitta et al. 2005, Li et al. 2006). Werden Zelllinien untersucht liegen die Mutationsraten knapp unter 30% (Bachmann et al. 2004, Saal et al. 2005, Wu et al. 2005). Demgegenüber liegen die Mutationsraten bei *p53* (16%) und *erbB2* (16%) deutlich niedriger. Aufgefallen ist in der vorliegenden Arbeit aber nur eine bekannte Mutation an Position 3140, in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Bachmann et al. (2004), bei T-47D .

An Position 3202 fiel bei den Tumorzelllinien T-47D, HBL-100, H602 jeweils G und A in den Sequenzen auf. Diese Abweichung konnte ich in der Literatur nicht als bekannten SNP finden. Es ist zu überlegen, ob diese Veränderung nur in Tumorzellen auftritt. Aufgrund von zeitlichen Gründen konnte ich dies nicht weiterverfolgen. Insgesamt könnte es sich bei der geringen Probenanzahl um ein rein statistisches Problem handeln, weshalb sich die Zahlen aus der Literatur weder widerlegen noch bestätigen ließen.

Es scheint so, als ob es entweder zu Mutationen bei *PIK3CA* oder zum Verlust von *PTEN*, einer Tumorsuppressorgens, kommt (Saal et al. 2005). Letzteres reguliert inhibierend die PI3K-Funktionen indem es PIP3 wieder zu PIP2 umwandelt (Zhao et al. 2005). Ein Verlust führt also auch zu erhöhter Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs. Mutationen in *PTEN* sind bekannt bei malignen Tumoren, besonders bei Glioblastomen, Ovarial- und Prostata-Karzinomen. Ein Verlust der Heterozygotie ist bei ca. 30-40% der sporadischen Mamma-Karzinome bekannt (Fry 2001). Intaktes *PTEN* wird für die Therapie mit Trastuzumab, Herceptin®, gebraucht (Saal et al. 2005).

PIK3CA ist interessant, da es aufgrund der Häufigkeit der Mutationen einen Ansatz für einen möglichen therapeutischen Nutzen bietet, der nicht nur Einzelnen vorbehalten ist. Über die Regulation durch *PTEN* ist es mit Trastuzumab und einer Resistenz gegen dieses Medikament in Verbindung gebracht worden (Berns et al. 2007).

Es wird auch weiterhin nach prognostischen Faktoren für die Erkrankung gesucht und auch hier steht PIK3CA im Interesse der Forschung (Barbareschi et al. 2007). Insgesamt muss aber angesichts der widersprüchlichen Angaben in der Literatur noch einige Forschungsarbeit geleistet werden.

6. Zusammenfassung

Es wurden die Gene *FANCE*, *Kiss1* und *PIK3CA* bei 42 sporadischen TumordnAs und 6 Brustkrebs-Zelllinien mit SSCP-Analyse und direkter Sequenzierung auf Mutationen untersucht.

Diese Analyse ergab keinen auffallenden Zusammenhang zwischen Mutationen bei *FANCE* und Brustkrebs. Dies Ergebnis ist übereinstimmend mit zwei Studien, die nach der Durchführung der Analysen veröffentlicht wurden. Dennoch hat sich der Ansatz in der Gruppe der Fanconi Gene nach Mutationen für Brustkrebs zu suchen mittlerweile als richtig herausgestellt. In den Arbeiten von Cantor u. Andreassen (2006), Seal et al. (2006) und Rahmann et al. (2007) sind Mutationen in den Genen *FANCI/BACH1/BRIP1* und *FANCD1/PALB2* als Risiken für Brustkrebs unter anderem in *Nature Genetics* vorgestellt worden.

Bei ***Kiss1*** wurden in dieser Arbeit keine Mutationen gegenüber der Referenzsequenz von NCBI und Ensembl gefunden, allerdings etliche Abweichungen von der Referenzsequenz von West et al. (1998). Es könnte sein, dass die metastasensupprimierende Wirkung auf Expressionsebene reguliert wird.

Bei ***PIK3Ca*** konnte eine in der Literatur beschriebene Mutation in der Zelllinie T-47D nachgewiesen werden. Zudem fiel in dieser Studie eine neue Mutation, c.3202G>A in drei Zelllinien auf. Dies konnte aus zeitlichen Gründen nicht weiter untersucht werden.

Bei *Kiss1* und besonders bei *Pik3CA* könnte das negative Ergebnis an der kleinen Anzahl untersuchter Tumore liegen.

Es bleibt der weiteren Forschung überlassen den genauen Mechanismus der Metastasensuppression bei *Kiss1* beziehungsweise die genaue Rolle von *PIK3CA* bei Onkogenese sowie Therapie und Verlauf der Erkrankung herauszufinden.

7. Literatur

Alpi A, Langevin F, Mosedale G, Machida YJ, Dutta A, Patel KJ (2007) UBE2T, the Fanconi anemia core complex, and FANCD2 are recruited independently to chromatin: a basis for the regulation of FANCD2 monoubiquitination, *Mol. Cell. Biol.* 27:8421-8430

Ameziane N, Errami A, Léveillé F, Fontaine C, de Vries Y, van Spaendonk RML, de Winter JP, Pals G, Joenje H (2008) Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening, *Hum. Mutat.* 29(1):159-166

Bachmann KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH (2004) The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers, *Cancer Biol Ther.* 3(8):772-775

Bader AG, Kang S, Vogt PK (2006) Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA* 103(5):1475-1479

Baynes C, Healey CS, Pooley KA, Scollen S, Luben RN, Thompson DJ, Pharoah PDP, Easton DF, Ponder BAJ, Dunning AM, the SEARCH breast cancer study (2007) Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk, *Breast Cancer Res* 9(2):R27 (online)

Blom E, van de Vrugt HJ, de Winter JP, Arwert F, Joenje H (2002) Evolutionary clues to the molecular function of Fanconi anemia genes, *Acta Haematol.* 108(4):231-236

Bogliolo M, Cabré O, Callén E, Castillo V, Creus A, Marcos R, Surrallés J (2002) The Fanconi anemia genome stability and tumor suppressor network, *Mutagenesis* 17(6):529-538

Buttitta F, Felicioni L, Barassi F, Martella C, Paolizzi D, Fresu G, Salvatore S, Cuccurullo F, Mezzetti A, Campani D, Marchetti A (2005) PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma, *J Pathol* 208(3):350-355

Campbell IG, Russell SE, Choong DYH, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CSF, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA (2004) Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer, *Cancer Res* 64(21):7678-7681

Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, Balasubramanian S, Reed MW, Pooley KA, Scollen S, Baynes C, Ponder BA, Chanock S, Lissowska J, Brinton L, Peplonska B, Southey MC, Hopper JL, McCredie MR, Giles CG, Fletcher O, Johnson N, dos Santos Silva I, Gibson L, Bojesen SE, Nordestgaard BG,

Axwelsson CK, Torres D, Hamann U, Justenhoven C, Brauch H, Chang-Claude J, Kropp S, Risch A, Wang-Gohrke S, Schürmann P, Bogdanova N, Dörk T, Fagerholm R, Aaltonen K, Blomqvist C, Nevalinna H, Seal S, Renwick A, Stratton MR, Rahmann N, Sangrajrang S, Hughes D, Odefrey F, Brennan P, Spurdle AB, Chenevix-Trench G, Kathleen Cunningham Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer, Beesley J, Mannermaa A, Hartikainen J, Kataja V, Kosma VM, Couch FJ, Olson JE, Goode EL, Broeks A, Schmidt MK, Hogervorst FB, Van't Veer LJ, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Wedrén S, Hall P, Low YL, Liu J, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Sigurdson AJ, Stredrick DL, Alexander BH, Struwing JP, Pharoah PD, Easton DF, Breast Cancer Association Consortium (2007) A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk, *Nat Genet.* 39(3):352-358

Cantor SB, Andreassen PR (2006) Assessing the link between BACH1 and BRCA1 in the FA-pathway, *Cell Cycle* 5(2):164-167

D'Andrea AD (2003) The Fanconi road to cancer, *Genes Dev.* 17(16):1933-1936

Debies MT, Welch DR (2001) Genetic basis of human breast cancer metastasis, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6(4):441-451

De Winter JP, Léveillé F, van Berkel CGM, Rooimans MA, van der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H (2000a) Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene, *Am J Hum Genet.* 67(5):1306-1308

De Winter JP, van der Weel L, de Groot J, Stone S, Waisfisz Q, Arwert F, Scheper RJ, Kruijff FAE, Hoatlin ME, Joenje H (2000b) The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG, *Hum Mol Genet.* 9(18):2665-2674

Dorsmann JC, Levitus M, Rockx D, Rooimans MA, Oostra AB, Haitjema A, Bakker ST, Steltenpool J, Schuler D, Mohan S, Schindler D, Arwert F, Pals G, Mathew CG, Waisfisz Q, de Winter JP, Joenje H (2007) Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI, *Cell Oncol* 29(3):181-182

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R, SEARCH collaborators, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevalinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Hunter DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P,

Wedren S, Liu J, Low YL, Bogdanova N, Schürmann P, Dörk T, Tollenaar RA, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JG, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MW, Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCredie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Spurdle AB, Beesley J, Chen X, kConFab, AOCs Management Group, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR, Ponder (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci, *Nature* 447(7148):1087-1093

Fry MJ (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play?, *Breast Cancer Res* 3(5):304-312

Garcia-Higuera I, Kuang Y, Näf D, Wasik J, D'Andrea (1999) Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex, *Mol Cell Biol.* 19(7):4866-4873

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway, *Mol Cell* 7(2):249-262

Gordon SM, Alon N, Buchwald M (2005) FANCC, FANCE and FANCD2 form a ternary complex essential to the integrity of the Fanconi anemia DNA damage response pathway, *J Biol Chem.* 280(43):36118-36125

Haag P, Hanhart N, Müller M (Hrsg) (2005) Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis, 2. Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach

Harms JF, Welch DR, Miele ME (2003) KISS1 metastasis suppression and emergent pathways, *Clin Exp Metastasis* 20(1):11-18

Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H (Hrsg) (1991) Hematology: Basic Principles and Practice, 3. Auflage, Churchill Livingstone, New York

Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, de Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox WA, D'Andrea AD (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia, *Science* 297(5581):606-609

Joenje H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia, *Nat Rev Genet.* 2(6):446-457

Kang S, Bader AG, Vogt PK (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic, *Proc Natl Acad Sci USA* 102(3):802-807

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(32):4643-4646

Kotani M, Dethreux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vandenwinden J-M, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandepuut F, Blampain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M (2001) The metastasis suppressor KISS1 encodes Kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54, *J Biol Chem* 276(37):34631-43636

Lee J-H, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR (1996) KISS1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene, *J Natl Cancer Inst* 88(23):1731-1737

Lee J-H, Welch DR (1997) Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KISS1, *Cancer Res* 57(12):2384-2387

Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2005) PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and Hepatocellular carcinomas, *Oncogene* 24(8):1477-1480

Lèveille F, Blom E, Medhurst AL, Bier P, Laghmani EH, Johnson M, Rooimans MA, Sobock A, Waisfisz Q, Arwert F, Patel KJ, Hoatlin ME, Joenje H, de Winter JP (2004) The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein, *J Biol Chem* 279(38):39421-39430

Lèveille F, Ferrer M, Medhurst AL, Laghmani EH, Rooimans MA, Bier P, Steltenpool J, Titus TA, Postlethwait JH, Hoatlin ME, Joenje H, de Winter JP (2006) The nuclear accumulation of the Fanconi anemia protein FANCD1 depends on FANCC, *DNA Repair (Amst)*. 5(5):556-565

Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, Lash A, Barakat RR, Borgen PI, Boyd J (2005) Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers, *Clin Cancer Res* 11(8):2875-2878

Levitius M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NFC, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, de Winter JP, Joenje H (2004) Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes, *Blood* 103(7):2498-2503

Levrin O, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, Batish SD, Kalb R, Velleuer E, Barral S, Ott J, Petrini J, Schindler D, Hanenberg H, Auerbach AD (2005) The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia, *Nat Genet*. 37(9):931-933

Li SY, Rong M, Grier F, Iacopetta B (2006) PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome, *Breast Cancer Res Treat* 96(1):91-95

Li D, Mitchell D, Luo J, Yi Z, Cho SG, Guo J, Li X, Ning G, Wu X, Liu M (2007) Estrogen regulates KISS1 expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes, *Endocrinology* 148(10):4821-4828

Ling C, Ishiai M, Ali AM, Medhurst AL, Neveling K, Kalb R, Yan Z, Xue Y, Oostra AB, Auerbach AD, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Takata M, Meetei AR, Wang W (2007) FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway, *EMBO J.* 26(8):2104-2114

Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, Andreassen PR, Cantor SB (2005) BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF, *Cancer Cell.* 8(3):255-265

Marot D, Bieche I, Aumas C, Esselin S, Bouquet C, Vacher S, Lazenec G, Perricaudet M, Kutenn F, Lidereau R, de Roux N (2007) High tumoral levels of KISS1 and G-protein-coupled receptor 54 expression are correlated with poor prognosis of estrogen receptor-positive breast tumors, *Endocr Relat Cancer* 14(3):691-702

Martin TA, Watkins G, Jiang WG (2005) KiSS-1 expression in human breast cancer, *Clin Exp Metastasis* 22(6):503-511

Mathew CG (2006) Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer, *Oncogene.* 25(43):5875-5884

Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP (2007) Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system, *Br J Pharmacol* 151(8):1143-1153

Medhurst AL, Huber PAJ, Waisfisz Q, de Winter JP, Mathew CG (2001) Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway, *Hum Mol Genet.* 10(4):423-429

Medhurst AL, Laghmani EH, Steltenpool J, Ferrer M, Fontaine C, de Groot J, Rooimans MA, Scheper RJ, Meetei AR, Wang W, Joenje H, de Winter JP (2006) Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway, *Blood* 108(6):2072-2080

Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W (2003a) A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia, *Nat Genet.* 35(2):165-170

Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, Hoatlin ME, Wang W (2003b) A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom Syndrome, *Mol Cell Biol.* 23(10):3417-3426

Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin ME, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H (2004) X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B, *Nat Genet.* 36(11):1219-1224

Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin ME, Joenje H, de Witner JP, Wang W (2005) A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M, *Nat Genet* 37(9):958-963

Mi J, Kupfer GM (2005) The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S-phase, *Blood* 105(2):759-766

Miki Y, Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto T, Nakamura Y (1996) Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers, *Nat Genet.* 13(2):245-247

Mitchell DC, Abdelrahim M, Weng J, Stafford LJ, Safe S, Bar-Eli M, Liu M (2006) Regulation of KiSS-1 metastasis suppressor gene expression in breast cancer cells by direct interaction of transcription factors Activator Protein-2 α and Specificity Protein-1, *J Biol Chem* 281(1):51-58

Mosedale G, Niedzwiedz W, Alpi A, Perrina F, Pereira-Leal JB, Johnson M, Langevin F, Pace P, Patel KJ (2005) The vertebrate Hef ortholog is a component of the Fanconi anemia tumor-suppressor pathway, *Nat Struct Mol Biol* 12(9):763-771

Nakanishi K, Yang Y-G, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, Wang Z-Q, Jasin M (2005) Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair, *Proc Natl Acad Sci USA* 102(4):1110-1115

Nash KT, Welch DR (2006) The KiSS1 metastasis suppressor: mechanistic insights and clinical utility, *Front Biosci* 11:647-659

Nash KT, Phadke PA, Navenot JM, Hurst DR, Accavitti-Loper MA, Sztul E, Vaidya KS, Frost AR, Kappers JC, Peiper SC, Welch DR (2007) Requirement of KiSS1 secretion for multiple organ metastasis suppression and maintenance of tumor dormancy, *J Natl Cancer Inst* 99(4):309-321

Nookala RK, Hussain S, Pellegrini L (2007) Insights into Fanconi anemia from the structure of the human FANCE, *Nucleic Acids Res.* 35(5):1638-1648

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Horf A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Metastasis suppressor gene KiSS1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor, *Nature* 411(6837):613-617

Pace P, Johnson M, Tan WM, Mosedale G, Sng C, Hoatlin ME, de Winter JP, Joenje H, Gergely F, Patel KJ (2002) FANCE: the link between Fanconi anemia complex assembly and activity, *EMBO J* 21(13):3414-3423

Rahmann N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagati T, Jayatilake H, McGuffog L, Hanks S, Evans DG, Eccles D, Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR (2007) PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene, *Nat Genet* 39(2):142-143

Rothfuss A, Grompe M (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA Pathway, *Mol Cell Biol.* 24(1):123-134

Russo J, Russo H (2004) *Molecular Basis of Breast Cancer, Prevention and Treatment*, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heideberg

Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malström P-O, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R (2005) PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, an ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma, *Cancer Res* 65(7):2554-2559

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers, *Science* 304(5670):554

Schmidt-Matthiesen H, Wallwiener D (Hrsg) (2005) *Gynäkologie und Geburtshilfe, Lehrbuch für Studium und Praxis*, 10.Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart

Schmutzler RK, Bierhoff E, Werkhausen T, Fimmers R, Speiser P, Kubista E, Krebs D, Zeillinger R, Wiestler OD, Von Deimling A (1997) Genomic deletions in the BRCA1, BRCA2 and TP53 regions associate with low expression of the estrogen receptor in sporadic breast carcinoma, *Int J Cancer* 74(3):322-325

Seal S, Barfoot R, Jayatilake H, Smith P, Renwick A, Bascombe L, McGuffog L, Evans DG, Eccles D (2003) Evaluation of Fanconi anemia genes in familial breast cancer predisposition, *Cancer Res* 63(24):8596-8599

Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliot A, Kelly P, Barfoot R, Chافتai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, Norh B, McGuffog L, Evans DG, Eccles D (2006) Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles, *Nat Genet* 38(11):1239-1241

Shriasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K (2001) Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS1 during melanoma progression an its

association with LOH of chromosome 6q16.3-q23, *Cancer Res* 61(20):7422-7425

Sims AE, Spiteri E, Sims RJ 3rd, Arita AG, Lach FP, Landers T, Wurm M, Freund M, Neveling K, Hanenberg H, Auerbach AD, Huang TT (2007) FANCI is the second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway, *Nat Struct Mol Biol* 14(6):564-567

Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Ballif BA, Gygi SP, Hofmann K, S'Andrea AD, Elledge SJ (2007) Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair, *Cell* 129(2):289-301

Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2005) Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases, *J Cancer Res Clin Oncol* 131(3):191-198

Taniguchi T, D'Andrea AD (2002) The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC, *Blood* 100(7):2457-2462

Taniguchi T, D'Andrea AD (2006) Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress, *Blood* 107(11):4223-4233

Thomaszewski A, High AA, Drozd M, Shabanowitz J, Hunt DF, Grant PA, Kupfer GM (2004) The Fanconi anemia core complex forms four complexes of different sizes in different subcellular compartments, *J Biol Chem* 279(25):26201-26209

Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, Morita M, Kokeji Y, Baba H, Maehara (2006) Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer, *Breast Cancer* 13(2):137-144

van Heemst, den Reijer PM, Westendorp RG (2007) Ageing of cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers; *Eur J Cancer* 43(15):2144-2152

Venkitaraman AR (2004) Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anemia proteins, *Nat Rev Cancer* 4(4):266-276

Vivanco I, Sawyers CL (2002) The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt pathway in human cancer, *Nat Rev Cancer* 2(7):489-501

Waisfisz Q, Saar K, Morgan NV, Altay C, Leegwater PA, de Winter JP, Komatsu K, Evans GR, Wegner R-D, Reis A, Joenje H, Arwert F, Mathew CG, Pronk JC, Digweed M (1999) The Fanconi anemia group E gene, FANCE, maps to chromosome 6p, *Am J Hum Genet* 64(5):1400-1405

Walsh T, King M-C (2007) Ten genes for inherited breast cancer, *Cancer Cell* 11(2):103-105

Wang W (2007) Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anemia and BRCA proteins, *Nat Rev Genet* 8(10):735-748

Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD (2004) Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin, *Mol Cell Biol* 24(13):5850-5862

Wang X, Kennedy RD, Ray K, Stuckert P, Ellenberger T, D'Andrea AD (2007) Chk1-mediated phosphorylation of FANCE is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway, *Mol. Cell. Biol.* 27:3098-3108

Welch DR, Steeg PS, Rinker-Schaeffer CW (2000) Molecular biology of breast cancer metastasis. Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis, *Breast Cancer Res* 2(6):408-416

West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE (1998) Chromosome localization and genomic structure of the KiSS1 metastasis suppressor gene (KISS1), *Genomics* 54(1):145-148

Williams AS, Williams JS, Tainer JA (2007) Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template, *Biochem Cell Biol* 85(4):509-520

Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, Chatterjee A, Goldenberg D, Gollin SM, Sukumar S, Trink B, Sidransky D (2005) Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer, *Breast Cancer Res* 7(5):609-616

Xia B, Sheng Q, Nakanichi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2, *Mol Cell* 22(6):719-729

Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q, Pals G, Errami A, Gluckmann E, Llera J, Wang W, Livingston DM, Joenje H, de Winter JP (2007) Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2, *Nat Genet* 39(2):159-161

Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, Shinohara H, Yamauchi A, Suga K, Okuyama T, Shimada T, Noguchi S, Gazdar AF, Yamaoka Y, Takahashi R (1999) Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases, *Clin Cancer Res* 5(6):1249-1261

Zhao JJ, Liu Z, Wang L, Shin E, Loda MF, Roberts TM (2005) The oncogenic properties of mutant p110 $\alpha\beta\alpha$ and p110 β phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 102(51):18443-18448

Internetadressen

NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed

Ensembl: www.ensembl.org/index.html

Wikipedia: www.wikipedia.de und www.wikipedia.com

www.cellsignal.com

8. Anhang

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Gal, geschäftsführender Direktor des Instituts für Humangenetik, dafür, dass ich in seinem Institut diese interessante Fragestellung bearbeiten durfte.

Insbesondere bedanke ich mich an dieser Stelle herzlich bei Herrn Prof. Dr. Surjit Singh für die kompetente Betreuung vor Ort und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Mein Dank gilt ebenfalls allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie, dass sie mir das Studium und diese Arbeit ermöglicht haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift