

Aus der
Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. Reincke

cDNA-Analysen bei Patienten mit Lynch-Syndrom

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von
Susanne Keinath

aus
München

2011

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Frau Prof. Dr. med. Elke Holinski-Feder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Burkhard Göke

Prof. Dr. Joachim-Ulrich Walther

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Frau Dr. rer. nat. Monika Morak

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2011

1. EINLEITUNG	6
1.1. Das kolorektale Karzinom (CRC)	6
1.1.1. Sporadische und hereditäre Formen	6
1.1.2. Das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC)	7
1.1.2.1. Epidemiologie	7
1.1.2.2. Die Rolle des DNA- <i>Mismatch</i> -Reparatur-Systems in der Pathogenese	7
1.1.2.3. Diagnostik	9
1.1.2.4. Klinik	10
1.1.2.5. Vorsorge	11
1.2. Klassifikation von Mutationen	12
1.2.1. Deletionen, Nonsense- und Missense-Mutationen	12
1.2.2. Spleißmutationen	13
1.2.2.1. Spleißmechanismus	13
1.2.2.2. Aberrantes Spleißen	15
1.2.3. Nonsense-mediated-mRNA-decay (NMD)	16
1.2.4. Nonsense-assoziiertes alternatives Spleißen	18
1.3. Zielsetzung	18
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1. Das Patientenkollektiv	20
2.1.1. Voruntersuchungen	20
2.1.1.1. Mikrosatellitenanalyse	20
2.1.1.2. Immunhistochemie	20
2.1.1.3. DHPLC-gestützte Mutationsanalyse	20
2.1.1.4. Bestimmung von großen Deletionen und Duplikationen über MLPA	21
2.1.2. Auswahl der Patienten	21
2.2. Chemikalien und andere Materialien	22
2.3. Isolationstechniken für Nukleinsäuren	22
2.3.1. DNA Isolation	22
2.3.2. RNA Isolation und cDNA-Gewinnung	23
2.3.3. RT-PCR	23
2.4. Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	24
2.4.1. Standard PCR	24
2.4.2. Long Range-PCR	25
2.5. Gelelektrophorese	26
2.6. Reinigung von PCR-Produkten	26
2.7. DNA-Sequenzierung	27
2.7.1. Sequenzreaktion	27
2.7.2. Sequenzaufreinigung	28
2.7.3. Sequenzanalyse	28
2.8. Bestätigung	28
3. ERGEBNISSE	29

3.1.	Alternatives Spleißen in Individuen	29
3.2.	Untersuchung von Patienten auf cDNA-Ebene	30
3.2.1.	Mutationen mit vermuteter Pathogenität.....	30
3.2.1.1.	Spleißmutationen in <i>MLH1</i>	30
3.2.1.2.	Stoppmutationen in <i>MLH1</i>	36
3.2.1.3.	Spleißmutationen in <i>MSH2</i>	37
3.2.1.4.	Stoppmutationen und Deletionen in <i>MSH2</i>	39
3.2.1.5.	Spleißmutation in <i>MSH6</i>	42
3.2.2.	Expression und Analyse der Spleißvarianten bei 26 Patienten mit unklarer Sequenzveränderung..	43
3.2.2.1.	Biallelisch exprimierte unklare Sequenzveränderungen in <i>MLH1</i>	43
3.2.2.2.	Monoallelisch oder stark reduziert exprimierte unklare Sequenzveränderungen in <i>MLH1</i>	46
3.2.2.3.	Biallelisch exprimierte unklare Sequenzveränderungen in <i>MSH2</i>	49
3.2.2.4.	Biallelisch exprimierte unklare Sequenzveränderungen in <i>MSH6</i>	50
3.2.3.	Expression bei 16 Patienten mit Polymorphismus.....	52
3.2.3.1.	Biallelische Expression des p.I219V SNP in <i>MLH1</i>	52
3.2.3.2.	Monoallelische Expression des p.I219V SNP in <i>MLH1</i>	53
3.2.3.3.	Weitere SNPs in <i>MLH1</i>	55
3.2.3.4.	SNPs in <i>MSH2</i>	55
3.2.4.	LR-PCR bei Patienten mit IHC-Ausfall ohne Sequenzveränderungen im entsprechenden Gen.....	56
3.2.5.	Übersicht über Pathogenität aller untersuchten Sequenzveränderungen	58
4.	DISKUSSION	59
4.1.	Alternatives Spleißen	59
4.2.	Beurteilung der Mutationen mit vermuteter Pathogenität.....	60
4.2.1.	Spleißmutationen im hochkonservierten Bereich des Exon-Intron-Übergangs	61
4.2.2.	Auswirkungen von vorzeitigen Stoppcodons.....	65
4.3.	Pathogenität unklarer Sequenzveränderungen	68
4.3.1.	Monoallelische Expression von unklaren Varianten.....	68
4.3.2.	In silico-Vorhersage dieser unklaren Varianten	70
4.3.3.	Sequenzveränderungen ohne Pathogenität	72
4.3.4.	Fraglich pathogene Sequenzveränderungen	73
4.4.	Bewertung des pathogenen Effekts bei unvollständigem NMD/ aberrantem Spleißen	75
4.5.	Übertragbarkeit der Untersuchungen an Blutlymphozyten auf Darmmukosa	75
4.6.	Monoallelische Expression von SNPs	76
4.7.	Übersicht der untersuchten Sequenzveränderungen im Vergleich mit Literaturdaten	78
4.8.	Ausblick.....	79
5.	ZUSAMMENFASSUNG	81
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	90
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	92

9. TABELLENVERZEICHNIS.....	94
ANHANG	95
DANKSAGUNG	107

1. Einleitung

1913 beschrieb Aldred Warthin zum ersten Mal eine Familie mit einem „*familial cancer syndrome*“, die 1971 von Lynch und Krush der Entität des hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) zugeordnet wurde (Lynch und de la Chapelle, 1999). In den 90er Jahren wurden Mutationen in den Genen des DNA-Reparatursystems für Basenfehlpaarungen als verantwortlich für die vererbte Prädisposition an einem solchen Tumor zu erkranken, identifiziert. Trotz verbesserter Genanalysen zur Mutationsdetektion werden auch heute noch bei ca. 30% der Patienten, bei denen aufgrund von Familienanamnese und/ oder Tumoreigenschaften der begründete Verdacht auf Vorliegen eines HNPCC-Syndroms besteht, in den entsprechenden Genen entweder keine Mutationen oder nicht sicher als pathogen einzustufende Sequenzveränderungen gefunden (Mangold et al., 2005; Liu et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob die DNA der Reparaturgene in Patienten mit Verdacht auf eine HNPCC-assoziierte Tumorerkrankung in RNA umgeschrieben und korrekt gespleißt wird. Dazu wurden cDNA-Analysen von Patienten durchgeführt, bei denen bereits detektierte Mutationen Fehler im Spleißmechanismus vermuten lassen, von Patienten mit unklaren Sequenzveränderungen und von Patienten ohne detektierbare Veränderung.

1.1. Das kolorektale Karzinom (CRC)

1.1.1. Sporadische und hereditäre Formen

In Deutschland erkranken jährlich ca. 50.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom. Es stellt so die zweithäufigste Tumorerkrankung sowohl bei Männern nach dem Prostatakarzinom, als auch bei Frauen nach dem Mammakarzinom dar. Damit liegt das durchschnittliche Risiko eines jedes einzelnen im Laufe seines Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken bei 7%. Der Altersgipfel liegt aber jenseits des 50. Lebensjahres. Der Großteil der Erkrankungen tritt sporadisch auf. Bei bis zu einem Drittel der Patienten lassen sich familiäre Häufungen nachweisen, denen wahrscheinlich ein Zusammenwirken polygener Erbgänge und exogener Faktoren zugrunde liegen. Die genetischen Ursachen sind hier aber noch unklar. Bei ca. 5-10% der Karzinome lassen sich monogene, meist autosomal-dominante Erbgänge nachweisen. Diese zeichnen sich durch ein frühes Erkrankungsalter und multiples Auftreten von Tumoren aus. Dazu zählen die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), seltenere hamartomatöse Polyposis-Syndrome, wie das Peutz-Jeghers-Syndrom und das Cowden-Syndrom, sowie das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), das

für die Mehrzahl der monogen-erblichen CRC verantwortlich ist. Durch den zugrundeliegenden autosomal-dominanten Erbgang haben Kinder ein 50%iges Risiko, die Prädisposition von einem betroffenen Elternteil geerbt zu haben. Bei FAP ist eine Mutation im *APC*-Gen, einem Tumorsuppressor-Gen, ursächlich für die frühe Krebsentstehung. Sie führt dazu, dass meist bereits vor dem 20. Lebensjahr multiple Polypen im Darm auftreten, womit die Wahrscheinlichkeit einer Karzinomentstehung nahezu 100% beträgt. Hamartomatöse Polyposen gehen mit einer erhöhten Entartungswahrscheinlichkeit in den, sich in der Umgebung der Polypen befindlichen Epithelzellen einher (Geißler und Graeven, 2005; Holinski-Feder und Grabowski, 2006). Auf Pathogenese und Epidemiologie von HNPCC wird im folgenden Punkt eingegangen.

1.1.2. Das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC)

1.1.2.1. Epidemiologie

Das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) ist mit ca. 5-8% die häufigste Form der erblichen kolorektalen Karzinome. Die Vererbung folgt einem autosomal-dominanten Erbgang mit einer unvollständigen Penetranz von etwa 60% bei Mutationsträgern bis zum 70. Lebensjahr. Daneben ist aber auch das Risiko für extrakolonische Tumore erhöht. Für Endometriumkarzinome beträgt das Lebenszeitrisiko bis zu 60%, aber auch Ovarial-, Magen-, Dünndarm-, Urothel-, hepatobiliäre und Gehirntumore treten gehäuft auf. Daneben haben Patienten mit Muir-Torre-Syndrom, einer Unterform des HNPCC, auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an einem Talgdrüsenkarzinom zu erkranken. Manifestiert sich HNPCC in einer Familie ausschließlich als CRC spricht man von Lynch I, im Unterschied zu Lynch II bei zusätzlicher extrakolonischer Manifestation (Lynch et al., 1993). Ursächlich für die erhöhte Wahrscheinlichkeit, an einem Karzinom zu erkranken, sind Keimbahnmutationen in den Genen des DNA-*Mismatch*-Reparatur-Systems. Um die Pathogenese nachvollziehen zu können, wird im folgenden Abschnitt der Mechanismus des Reparatursystems kurz erklärt.

1.1.2.2. Die Rolle des DNA-*Mismatch*-Reparatur-Systems in der Pathogenese

Beim DNA-*Mismatch*-Reparatur-System oder „*Mismatch-Repair-System*“ (MMR) handelt es sich um Fehlerkorrektursystem, das neu synthetisierte DNA auf fehlgepaarte Basen und kleine Insertions- und Deletions-Schleifen (*loops*) überprüft. Dabei können die Mutationen von zwei Heterodimeren, die die frisch replizierte DNA entlangwandern und nach Fehlern absuchen, erkannt werden. Sowohl das hMut α -Heterodimer, bestehend aus MSH2 und

MSH6, als auch das hMutS β -Heterodimer, das sich aus MSH2 und MSH3 zusammensetzt, sind dazu in der Lage. Letzteres erkennt dabei vor allem Insertionen und Deletionen, wohingegen hMutS α auch für das Erkennen von Basenfehlpaarungen wichtig ist. Für die Reparatur der erkannten Fehler ist ein als hMutL bezeichneter Heterodimer-Komplex aus MLH1 und PMS2 verantwortlich. Dabei wird die entsprechende Stelle ausgeschnitten und neu synthetisiert (Jiricny und Nyström-Lahti, 2000; Kolodner, 1996).

Betroffene des HNPCC-Syndroms tragen in allen Zellen bereits eine vererbte Mutation in einem der genannten Gene. Das zweite Allel ist aber noch ausreichend, um die Funktion des MMR zu erfüllen. Erst wenn es im Laufe des Lebens zu einer zweiten Mutation in dem entsprechenden Gen kommt (*second hit* nach der „*Two-Hit Theory*“ von Knudson), kann das Reparatursystem seiner „*caretaker*“ Funktion nicht mehr nachkommen. Es treten in der betroffenen Zelle vermehrt Mutationen auf, die vom Reparatursystem nicht erkannt werden und damit auch nicht beseitigt werden können. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit einer Entartung und die Karzinomentstehung wird sehr wahrscheinlich.

Die als Mikrosatelliten bezeichneten DNA-Abschnitte, die aus repetitiven Einheiten von 1-2 Basenpaaren bestehen, sind durch Schleifenbildung besonders anfällig für Replikationsfehler der Polymerase. Es kommt bei einem defekten MMR im Tumor zu nicht mehr reparierten Längendifferenzen der Mikrosatelliten im Vergleich zum gesunden Gewebe. Das Vorliegen der sogenannten Mikrosatelliteninstabilität im Tumor kann dabei helfen, die Verdachtsdiagnose für HNPCC zu stellen.

Im HNPCC-Patientenkollektiv findet man für die verschiedenen Gene sehr unterschiedliche Mutationsraten. Während *MLH1*-Mutationen für ca. 40% und *MSH2*-Mutationen für ca. 50% der HNPCC-Patienten verantwortlich sind, spielen Mutationen in *MSH6* nur bei ca. 8% die ursächliche Rolle (Mangold et al., 2005). Dabei erkranken *MSH6*-Mutationsträger durchschnittlich an einem leichteren Phänotyp, der sich durch ein späteres Erkrankungsalter und geringere Penetranz auszeichnet (Plaschke et al., 2004). *MLH1*-Mutationsträger erkranken durchschnittlich früher und häufiger an einem kolorektalen Karzinom als *MSH2*-Mutationsträger, wohingegen bei *MSH2*-Mutationsträgern häufiger assoziierte Tumorerkrankungen der Prostata, Blase und Niere auftreten (Goecke et al., 2006). Mutationen im *MSH3*-Gen konnten bislang nicht als ursächlich für HNPCC nachgewiesen werden, was möglicherweise an der redundanten Funktion von hMutS α und hMutS β liegt. Das *PMS2*-Gen trägt nur in sehr seltenen Fällen Mutationen (Peltomäki, 2005).

1.1.2.3. Diagnostik

Bereits im Jahr 1990 wurden zum ersten Mal klinische Kriterien definiert, die für das Vorliegen eines Lynch-Syndroms sprechen:

Die **Amsterdam I-Kriterien** (Vasen und Muller, 1991):

- mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem Kolon- oder Rektumkarzinom
- einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen
- Erkrankungen in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen
- mindestens ein Patient mit der Diagnose des Kolon- oder Rektumkarzinoms vor dem 50. Lebensjahr
- Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP)

(dabei müssen alle Kriterien erfüllt sein)

Da diese Kriterien nur von ca. 60% der betroffenen Familien erfüllt werden, wurden sie 1999 erweitert um HNPCC-assoziierte Tumore. Diese als **Amsterdam II** bezeichneten Kriterien umfassen auch Tumore von Endometrium, Dünndarm, Magen, Ovarien, ableitenden Harnwegen, ZNS, Haut, Pankreas und Gallengang. Die übrigen Kriterien bleiben identisch (Vasen et al., 1999).

Die großzügigeren **Bethesda-Kriterien** wurden zum ersten Mal im Jahr 1996 definiert und 2003 überarbeitet. Sie sollten dabei helfen, weitere Familien, in denen vermutlich HNPCC vorliegt, zu erkennen. Denn es zeigte sich, dass die Amsterdam-Kriterien gerade bei kleinerer Familiengröße oder späterem Erkrankungsalter nicht zutreffen, obwohl auch hier MMR-Mutationen gefunden wurden.

Als aktuelle Bethesda-Kriterien gelten (Umar et al., 2004):

- kolorektales Karzinom vor dem 50. Lebensjahr
- synchrone/ metachrone Kolon- und Rektumkarzinome oder HNPCC-assoziierte Tumorerkrankungen (Endometrium, Dünndarm, Magen, Ovar, ableitende Harnwege, ZNS, Haut, Pankreas, hepatobiliäre Tumore)
- zwei oder mehr betroffene Familienmitglieder, erstgradig miteinander verwandt
- Kolon- oder Rektumkarzinom mit hochgradiger Mikrosatelliteninstabilität vor dem 60. Lebensjahr

(bereits bei Erfüllung eines der Kriterien besteht HNPCC-Verdacht, der weiter abgeklärt werden sollte)

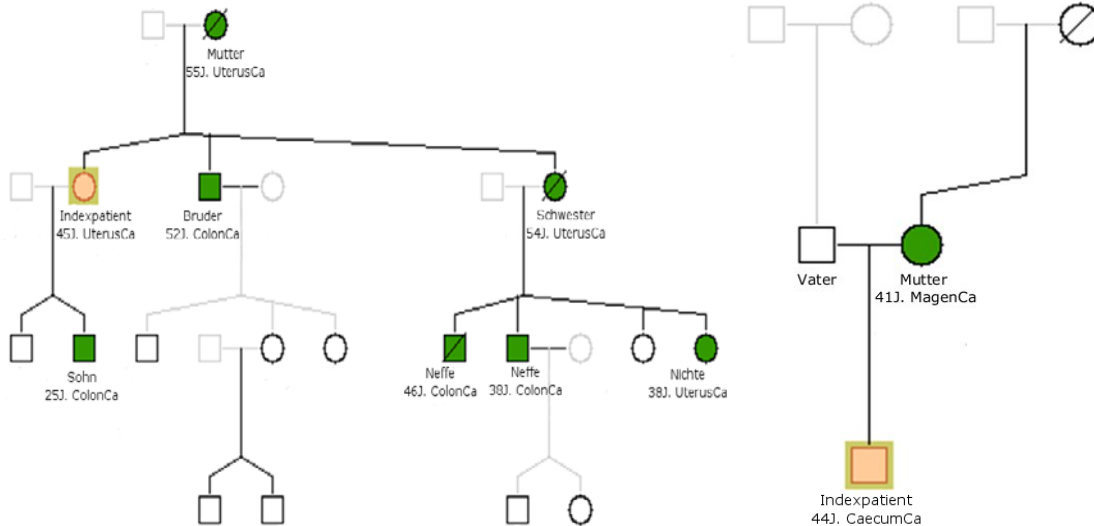


Abbildung 1:

Der Stammbaum von Patient TM ist typisch für eine Familie, die die Amsterdam-Kriterien erfüllt.

Im Gegensatz dazu erfüllt der Stammbaum von Patient TW nur die Bethesda-Kriterien.

Erfüllen Patienten eines der genannten Kriterien, erfolgt eine weitere Abklärung bezüglich HNPCC. Dabei wird der Tumor zunächst auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) untersucht. Darüber hinaus wird im Tumorgewebe eine immunhistochemische Färbung für die Proteine MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 durchgeführt. Fällt eine Proteinfärbung aus, erhält man einen Hinweis auf das betroffene Gen. Ist eines der zwei genannten Untersuchungsverfahren positiv, wird eine Mutationsanalyse aller Exons des jeweiligen Gens in genomischer DNA durchgeführt. In 70% der Amsterdam positiven Familien mit mikrosatelliteninstabilen Tumoren kann eine Keimbahnmutation in einem der DNA-Reparaturgene gefunden werden. In den übrigen 30% bleibt die molekulargenetische Ursache weiter unklar (Liu et al., 1996). Erfüllen Familien nur die Bethesda-Kriterien, werden bei nur 56% der untersuchten Patienten pathogene Mutationen gefunden (Mangold et al., 2005).

1.1.2.4. Klinik

HNPCC-assoziierte Tumore zeigen auch klinische und histologische Auffälligkeiten. So weisen die HNPCC-Tumoren im Vergleich zu sporadischen Tumoren des Kolorektums, auch wenn sie bei Erstdiagnose in einem nach der TNM-Klassifikation weiter fortgeschrittenem Stadium bezogen auf die lokale Tumorausdehnung sind, deutlich seltener Fernmetastasen auf (Watson et al., 1998). Außerdem sind die Tumoren häufig von einem für HNPCC typischen entzündlichen Infiltrat umgeben, was in der Literatur als „*Crohns like lesion*“ beschrieben wird (Jass et al., 2002). Bei gleichem Tumorstadium haben HNPCC-Patienten ein durchschnittlich längeres Überleben als Patienten mit sporadischen CRC (Sankila et al., 1996;

Watson et al., 1998; Ribic et al., 2003). Diese Unterschiede lassen sich durch eine verstärkte Reaktion des Immunsystems gegen das Tumorgewebe erklären. Aufgrund des Defekts im Reparatursystem weisen diese HNPCC-Tumorzellen im Vergleich zu sporadisch entstandenen Tumorzellen überdurchschnittlich viele Mutationen auch in Oberflächenmolekülen auf und können so vom Immunsystem besser erkannt werden. Die erhöhte Mutationsrate führt aber auch dazu, dass die Adenom-Karzinom-Frequenz, die normalerweise einen Zeitraum von 8-10 Jahren einnimmt, bei einem Defekt im MMR bereits in 1-2 Jahren durchlaufen wird. Auffällig ist auch, dass sich HNPCC-assoziierte Tumore oft proximal der linken Kolonflexur befinden, im Gegensatz zu sporadischen Tumoren, die zu einem Großteil rektal oder zumindest gehäuft in distalen Darmabschnitten auftreten. Die Rate an syn- und metachronen Tumoren ist bei HNPCC-Patienten erhöht (Lynch und de la Chapelle, 1999; Holinski-Feder und Grabowski, 2006). Das Erkrankungsrisiko der HNPCC-Patienten mit nachgewiesener Keimbahnmutation in einem der DNA-*Mismatch*-Reparaturgene beträgt für Karzinome im Kolorektum 68%, im Endometrium 62%, im Ovar 13%, im Magen 6,9%, im hepatobiliären System 9,1%, im Urothel 7,6%, in der Niere 4,7% und im ZNS 4,5% bis zum 70. Lebensjahr (Aarnio et al., 1999).

1.1.2.5. Vorsorge

Um bei nachgewiesener Keimbahnmutation in den DNA-*Mismatch*-Reparaturgenen oder Verdacht auf Vorliegen eines HNPCC-Syndroms der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Karzinomentstehung vorzubeugen, gibt es besondere Anweisungen zu einer intensivierten Vor- und Nachsorge. Im Rahmen der Tumorfrüherkennung wird HNPCC-Patienten und Angehörigen zu folgenden Untersuchungen geraten (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom der DGVS):

10 Jahre vor Erstdiagnose in der Familie, spätestens ab dem 25. Lebensjahr jährlich

- umfassende gynäkologische Untersuchung mit endovaginalem Ultraschall und Zytologie
- Anamnese und körperliche Untersuchung
- Abdomensonographie
- Koloskopie

ab dem 35. Lebensjahr zusätzlich jährlich

- Gastroskopie

So können Tumoren bereits in frühen Stadien oder Vorstufen erkannt und entsprechend therapiert bzw. entfernt werden. Bereits die alleinige regelmäßige Koloskopie soll die

Lebenserwartung der Betroffenen um sieben Jahre erhöhen (Vasen et al., 1998). Den Verwandten eines HNPCC-Patienten wird bei bekannter Mutation eine molekulargenetische Untersuchung angeboten. Hat die Risikoperson die Mutation nicht geerbt, besteht für sie kein erhöhtes Tumorrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung und sie kann aus der intensivierten Vorsorge entlassen werden. Für Verwandte von Patienten, die Träger von Mutationen unklarer Pathogenität sind oder bei denen keine pathogene Mutation gefunden wurde, besteht diese Möglichkeit der prädiktiven Testung nicht. Es ist deshalb für diese Menschen von besonderer Bedeutung, dass wir die molekularen Grundlagen und genetischen Mechanismen des HNPCC-Syndroms besser verstehen lernen.

1.2. **Klassifikation von Mutationen**

1.2.1. *Deletionen, Nonsense- und Missense-Mutationen*

Zum jetzigen Zeitpunkt sind laut der Datenbank InSiGHT (*International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors*) ungefähr 500 verschiedene pathogene Mutationen für die vier DNA-Mismatch-Reparaturgene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* beschrieben (Peltomäki, 2005). Dabei sind ca. 14% der Familien mit bekannter pathogener Mutation Träger einer Deletion einzelner oder mehrerer Exons der DNA-Reparaturgene, vor allem in *MLH1* und *MSH2*. Weitere pathogene Veränderungen sind Nonsense-Mutationen. Dabei kommt es entweder durch die Basenveränderung einer Punktmutationen zu einem vorzeitigen Stoppcodon (*Premature Termination Codon* PTC) oder durch Insertion oder Deletion von einzelnen Basen entsteht eine Verschiebung des Leserahmens. Ein verschobener Leserahmen lässt meist bald nach der Mutation ein vorzeitiges Stoppcodon entstehen. Ein trunkiertes Protein ist nicht funktionsfähig. Die mRNA (*messenger RNA*) mit vorzeitigem Stoppcodon kann von der Zelle im Rahmen des *Nonsense-mediated-mRNA-decay* abgebaut, um dominant-negative Effekte des defekten Proteins zu vermeiden. Auf diesen Mechanismus wird im Punkt 1.2.3. noch genauer eingegangen.

In ihrer Pathogenität deutlich schwieriger zu beurteilen sind Missense-Mutationen. Die Auswirkungen einer veränderten Aminosäure, ebenso wie Insertionen oder Deletionen einzelner Aminosäuren ohne Leserahmenverschiebung, können nur in funktionellen Studien untersucht werden. Aber selbst stille Mutationen, die keine Veränderung der Aminosäuresequenz im Protein nach sich ziehen, können eine pathogene Wirkung haben, wenn sie eine für den Spleißmechanismus wichtige Sequenz betreffen. Durch verändertes Spleißen entsteht ein verkürztes oder verlängertes Protein mit eingeschränkter Funktion oder

das veränderte Spleißen schafft durch Leserahmenverschiebung ein PTC und die RNA wird vorzeitig abgebaut.

1.2.2. Spleißmutationen

1.2.2.1. Spleißmechanismus

Ein verändertes Spleißverhalten kann eine entscheidende Rolle in der pathogenen Wirkung einer Mutation spielen. Die meisten menschlichen Gene bestehen aus Exons und Introns. Exons enthalten den für die Aminosäuresequenz codierenden Bereich, während Introns im Rahmen der Prozessierung der transkribierten mRNA bereits im Zellkern entfernt werden. Dieser Prozess wird als Spleißen bezeichnet. Für ein funktionierendes Spleißen sind vor allem intronische, aber auch exonische Sequenzen verantwortlich. Jedes Intron beginnt mit den Basen G (Guanin) und T (Thymin) am 5'-Ende, der Spleißdonorstelle, und endet mit einem A (Adenin) und G am 3'-Ende, der Spleißakzeptorstelle (GT-AG-Regel). Diese vier Basen zeigen eine 100%ige Konservierung bei allen Exons. Darüberhinaus ist ein ca. 20 Nukleotide vom 3'-Ende des Introns entfernt liegendes A als Verzweigungsstelle (*branch site*) wichtig.

Im Rahmen des Spleißvorganges kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Adenins an der Verzweigungsstelle auf das Nukleotid an der 5'-Spleißdonorstelle. Durch kovalente Bindung der beiden entsteht eine Lassostruktur des Introns. Beim Zusammenfügen der zwei Exonenden wird der Intron-Exon-Übergang auch an der 3'-Stelle gespalten und das Intron als Lasso freigesetzt (siehe Abb.2). Katalysiert wird die beschriebene Reaktion von einem als Spleißosom bezeichneten Komplex. Er besteht aus mehreren Ribonukleoproteinpartikeln (U1-, U2-, U4-, U5-, U6-snRNPs), die sich aus snRNA (*small nuclear RNA*) und Proteinen zusammensetzen.

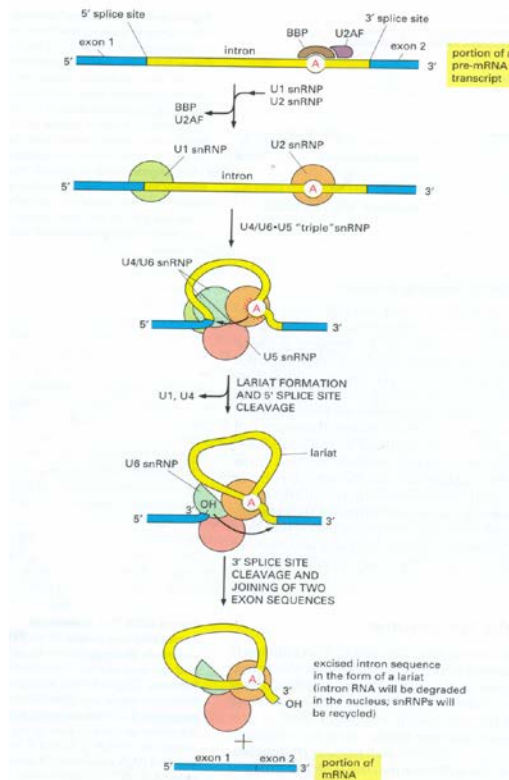


Abbildung 2: **Spleißmechanismus:** Nach der Transkription wird die *messenger*-RNA gespleißt, um die Introns zu entfernen. Dazu bildet das A an der Verzweigungsstelle eine Lassostruktur mit der Spleißdonorstelle. Bei der Verbindung der Spleißdonorstelle des einen Exons mit der Spleißakzeptorstelle des folgenden Exons wird das Intron als Lasso freigesetzt.

Für einen funktionierenden Spleißvorgang spielen noch weitere DNA-Sequenzen eine entscheidende Rolle. Wichtig sind zum einen Nukleotide, die die unmittelbar am Spleißvorgang beteiligten Sequenzen umgeben, zum anderen ist aber auch ein Polypyrimidinabschnitt vor dem Ende des Introns von Bedeutung (Black, 2003; Lewin, 2003; Karp, 2005).

Folgende Regionen zeichnen sich durch eine vergleichsweise hohe Konservierung aus (Lewin, 1994):

←Intron			Exon		Intron→								
.....	C	A	G	A	G	G	T	A	A	G	T
	65	100	100		64	73	100	100	62	68	84	63	%

Abbildung 3: **Prozentuale Konservierung der am Spleißen beteiligten Basen**

Darüber hinaus helfen auch im Exon gelegene Bereiche bei der Identifikation der korrekten Spleißstelle. *Exon Splice Enhancers* (ESE) sind degenerierte Sequenzen mit einer Länge von 6-8 Nukleotiden, an die regulatorische Spleißproteine binden können. Sie verstärken das

Spleißen. *Exon Splice Silencers* (ESS), die den Spleißmechanismus supprimieren, sind noch nicht so detailliert beschrieben und untersucht, sind aber wohl in Aufbau und Wirkmechanismus ähnlich (Blencowe, 2000; Cartegni et al., 2002; Fairbrother et al., 2002; Fairbrother und Chasin, 2000). Außerdem finden sich auch im Intron Sequenzen, die als *Splice Enhancer* oder *Splice Silencer* (ISE und ISS) wirken können.

Das Zusammenwirken all dieser Faktoren führt selbst in gesunden Zellen nicht immer zu identischen Ergebnissen. So beobachteten Modrek et al., 2001, dass mehr als 40% der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden. Das bedeutet, dass bei diesen Genen mindestens zwei verschieden prozessierte mRNAs aus einer nativen mRNA-Matrize entstehen. Beispielsweise können beim Spleißen einzelne Exons mitentfernt werden.

1.2.2.2. Aberrantes Spleißen

Es ist offensichtlich, dass Mutationen in vielfältiger Weise in den komplizierten Mechanismus des Spleißens eingreifen können. 15% der pathogenen Punktmutationen haben eine Störung des Spleißvorgangs zur Folge (Krawczak et al., 1992). Verschiedene Mechanismen sind hierbei denkbar:

Zum einen kann durch eine Mutation der Spleißdonor-, Spleißakzeptor-, oder Verzweigungsstelle ein Intron nicht mehr als solches erkannt und entfernt werden.

Genauso kann es aber auch zum Überspringen des Exons in der Prozessierung kommen. Wird das Exon nicht als solches erkannt, kann es gemeinsam mit den zwei benachbarten Introns entfernt werden. Dieser Vorgang wird als *Exon-Skipping* bezeichnet. Die verkürzte mRNA kann entweder in ein Protein mit Funktionsbeeinträchtigung translatiert werden, oder durch eine Leserahmenverschiebung wird ein vorzeitiges Stoppcodon codiert. Als dritter Mechanismus ist die Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle zu nennen. Es handelt sich dabei um eine Nukleotidsequenz, die einer tatsächlichen Spleißstelle ähnelt, normalerweise aber nicht für die Spleißreaktion verwendet wird. Kommt es zur Inaktivierung einer physiologischen Spleißstelle, kann das Spleißosom auf der Suche nach Alternativen die kryptische Spleißstelle benutzen. Diese kann sowohl im Intron als auch im Exon gelegen sein, entsprechend entsteht eine verlängerte bzw. verkürzte mRNA (indirekte Aktivierung).

In gleicher Weise kann eine Sequenz durch eine aktivierende Mutation zu einer neuen Spleißstelle werden. Man spricht in diesem Zusammenhang von direkter Aktivierung (siehe Abb. 4).

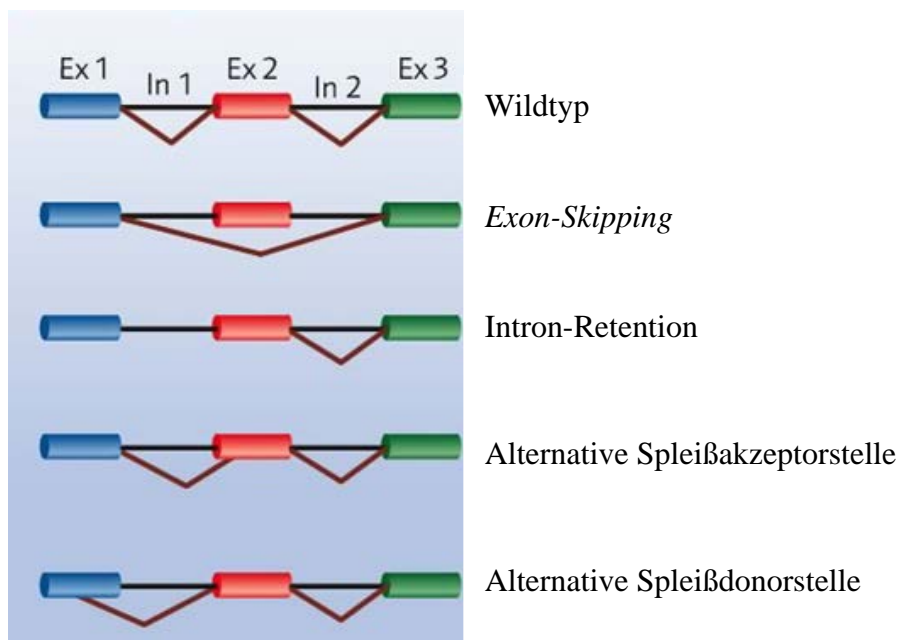


Abbildung 4: **Möglichkeiten des alternativen und aberranten Spleißens:** Sowohl durch das physiologische alternative Spleißen als auch beim aberrantem Spleißen kann es zum Auslassen von einzelnen Exons kommen (*Exon-Skipping*). Auch das Verbleiben von Introns ist möglich. Daneben können aber auch alternative Spleißstellen im Exon aktiviert werden.

Mutationen der ESE und ESS Sequenzen, die den Spleißvorgang regulieren, greifen in diesen Prozess in vielschichtiger Art und Weise ein. Die Auswirkungen von Mutationen sind deshalb nur schwer vorherzusehen. Das trifft im Besonderen für Missense- und stille Mutationen zu. Obwohl sie die Aminosäuresequenz nur in einer Position bzw. nicht verändern, können sie gravierende Folgen für den Spleißvorgang haben und werden so in ihrer Pathogenität oft unterschätzt. Genauso greifen intronische Varianten, die mit den gängigen Sequenzierpraktiken oft nicht erfasst werden unter Umständen entscheidend in den Spleißvorgang ein (Cartegni et al., 2002).

Die Lage von ESE oder anderen für den Spleißvorgang wichtigen Sequenzen mit Hilfe von Computerprogrammen vorherzusagen bleibt aufgrund der Komplexität der beteiligten Mechanismen schwierig und funktioniert, abgesehen von den hochkonservierten Spleißsequenzstellen, nur unzureichend (Auclair et al., 2006; Pagenstecher et al., 2006; Sharp et al., 2004).

1.2.3. *Nonsense-mediated-mRNA-decay (NMD)*

Beim *Nonsense-mediated-mRNA-decay* (NMD) handelt es sich um eine Art RNA-Kontrollsystem. Entsteht bei einer Leserahmenverschiebung durch eine Nonsense-Mutation oder durch aberrantes Spleißen ein vorzeitiges Stoppcodon (*Premature Termination Codon*:

PTC), kann die mutierte mRNA durch das NMD-Kontrollsystem erkannt und abgebaut werden. Dadurch können die potentiell schädlichen Auswirkungen eines mutierten oder trunkeierten Proteins vermieden werden (dominant-negativer Effekt). Eine Restfunktion des Proteins ist jedoch hier nicht möglich, denn auch ein in seiner Funktion nur gering eingeschränktes Protein wird abgebaut. Damit ein verfrühtes Stoppcodon erkannt wird, muss es mindestens 55 Nukleotide vor dem letzten Intron liegen (siehe Abb.5).

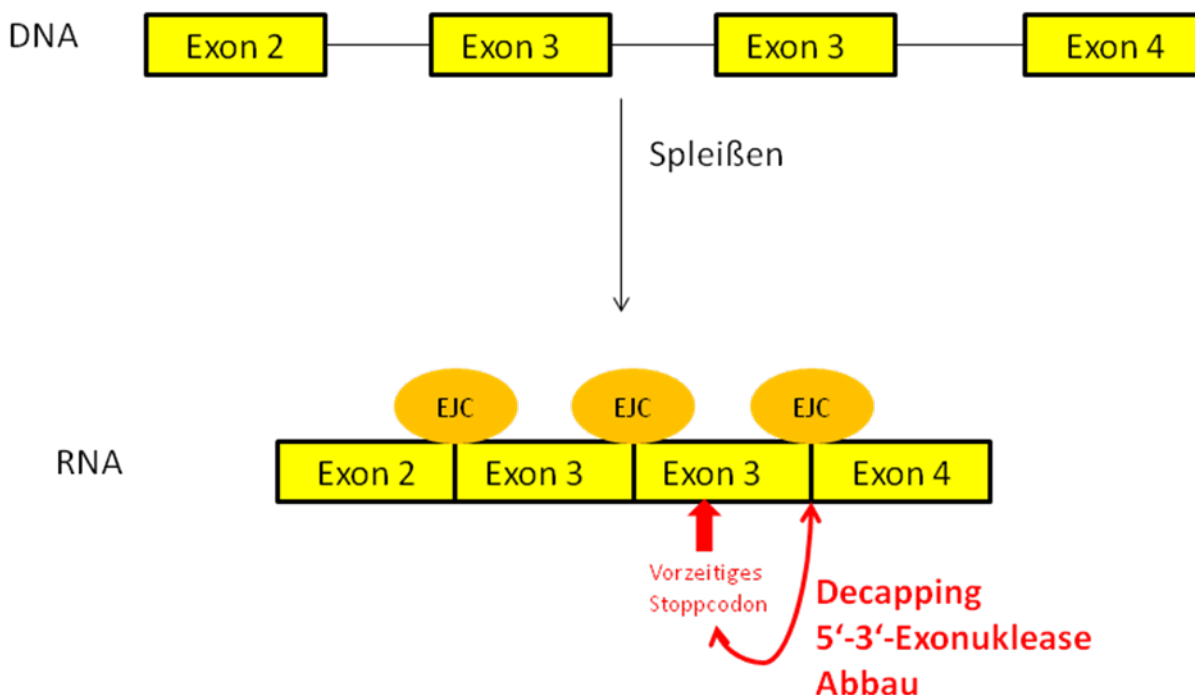


Abbildung 5: *Nonsense-mediated-mRNA-decay* (NMD): Nachdem die Introns beim Spleißvorgang entfernt wurden, bleibt die Verbindungsstelle zwischen zwei Exons durch den *Exon-Junction-Complex* (EJC) markiert. So kann der NMD ein vorzeitiges Stoppcodon erkennen und die betroffene mRNA wird nach Entfernung ihrer Cap-Struktur von einer Exonuklease abgebaut.

Wird das Intron beim Spleißvorgang entfernt, bleibt die entsprechende Stelle mit einer als *Exon-Junction-Complex* (EJC) bezeichneten Proteingruppe markiert. Der EJC besteht aus mindestens 10 Proteinen, im Zentrum ein Tetramer aus Y14, MAGOH, eIF4AIII und MLN51 (Chang et al., 2007). Beim Spleißen wird der EJC 20- 24 Nukleotide oberhalb der Exon-Exon-Übergänge platziert und verlässt mit der RNA den Zellkern. Bei einer ersten Translation werden die EJC vom Ribosom entfernt. Befindet sich ein vorzeitiges Stoppcodon auf der RNA, wird die Translation abgebrochen und ein EJC verbleibt an der RNA. An der Stelle der Termination der Translation (in diesem Fall also am vorzeitigen Stoppcodon) wird UPF-1 (*up-frameshift protein*), eine RNA-Helikase, rekrutiert, die mit der UPF-1 Kinase SMG-1 den SURF-Komplex bildet. Er bindet über UPF-2 und UPF-3b an den EJC. Diese Interaktion

zwischen SURF und EJC ist entscheidend für die Erkennung des vorzeitigen Stoppcodons. Damit kann die SMG-1 Kinase UPF-1 phosphorylieren. Durch die Dephosphorylierung wird die Entfernung der Cap-Struktur der RNA ausgelöst. Damit kann die mRNA von einer 5'-3'-Exonuklease abgebaut werden. Dieser Abbau soll zwischen 90 und 99% der mRNA betreffen (Wagner und Lykke-Andersen, 2002). RNAs mit PTCs, die weniger als 55 Nukleotide vom letzten Intron entfernt sind, werden nicht abgebaut (Wilkinson, 2005; Wagner und Lykke-Andersen, 2002; Cartegni et al., 2002; Karp, 2005; Chang et al., 2007).

1.2.4. Nonsense-assoziiertes alternatives Spleißen

Manchmal führt ein PTC aber auch zu einer Entfernung des betroffenen Exons durch Spleißen. Mehrere mögliche Ursachen werden hierfür diskutiert. Zum einen könnte ein bereits im Kern lokalisierter Mechanismus die RNA auf Fehler im Leserahmen untersuchen und im entsprechenden Fall das betroffene Exon entfernen. Es ist aber auch denkbar, dass Nonsensemutationen die cis-Elemente (ESS und ESE) des Spleißvorgangs verändern und es so zum Auslassen des betroffenen Exons kommt (Wang et al., 2002; Cartegni et al., 2002).

1.3. Zielsetzung

Trotz klinischem Verdacht auf HNPCC-Syndrom ist in ca. 30% der Amsterdam-positiven Patienten mit mikrostabilen instabilen und/oder immunhistochemisch auffälligen Tumoren die genetische Ursache unklar (Liu et al., 1996; Gille et al., 2002; Wang et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe von cDNA-Analysen bei Patienten mit Lynch-Syndrom folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

In der cDNA von Patienten mit *in silico* vorhergesagten Spleißmutationen in den DNA Mismatch-Reparaturgenen sollte untersucht werden, ob diese tatsächlich Spleißveränderungen verursachen. Außerdem sollte überprüft werden, ob ein aberrant gespleißtes Transkript mit vorzeitigem Stoppcodon durch den *Nonsense-mediated-mRNA-decay* (NMD) abgebaut wird. Dieser Abbau durch NMD sollte zudem in der cDNA von Patienten mit einer Nonsense-Mutation untersucht werden.

Desweiteren sollte die cDNA von Patienten mit exonischen Sequenzveränderungen unklarer Pathogenität wie Missense-Mutationen oder stillen Mutationen untersucht werden. Hier stellte sich die Frage, ob die Sequenzveränderung zu einem aberranten Spleißen des Allels führt und damit als pathogen eingestuft werden kann. Denn durch diese Sequenzveränderungen können einerseits *Exon Splice Enhancer* (ESE), die das Spleißen verstärken, zerstört werden, oder andererseits neue *Exon Splice Silencer* (ESS), die den Spleißmechanismus unterdrücken,

generiert werden. Zudem kann eine neue Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstelle im Exon generiert werden. Eine aberrant gespleißte mRNA kann entweder in ein nicht-funktionsfähiges Protein translatiert werden, oder dem NMD unterliegen. Bei monoallelischer Expression muss von einer fehlenden Transkription des Allels, von aberrantem Spleißen oder vom Abbau des fehlenden Allels ausgegangen werden, dem entweder die unklare Sequenzveränderung, eine intronische Sequenzveränderung oder ein mit heutigen Methoden noch nicht detektierbarer Pathomechanismus zu Grunde liegt.

Um das Ausmaß von Spleißveränderungen durch codierende Sequenzveränderungen einschätzen zu können, muss bekannt sein, welche alternativen Spleißvarianten im Blut gesunder Personen vorkommen. Daher wurden die physiologischen Spleißvarianten in cDNA aus Blut von Kontrollpersonen charakterisiert.

Bei Patienten mit immunhistochemischem Ausfall in einem der MMR-Gene, aber ohne nachweisbare Mutation oder Deletion sollten häufige nicht-pathogene Polymorphismen dazu genutzt werden, um eine fehlende Transkription oder den vollständigen Abbau der RNA auszuschließen. Wird ein genomisch heterozygoter Polymorphismus in der cDNA nur noch monoallelisch vorgefunden, ist das ein Hinweis auf noch unbekannte Pathomechanismen im betroffenen DNA-Reparaturgen (wie Methylierung, nicht detektierbare Deletionen, genomische Rearrangements/ Translokationen, Promotormutationen oder Promotordeletionen, Spleißveränderungen durch Intronveränderungen). So sollen Familienangehörige bereits mit Hilfe von Segregationsanalysen dahingehend untersucht werden, ob sie das stillgelegte Allel und damit ein erhöhtes Darmkrebsrisiko tragen, auch wenn die ursächliche molekulare Mutation noch unbekannt ist.

Bei Patienten mit MLH1-Ausfall ohne detektierbare Mutation, die einen *BRAF*-mutationsnegativen Tumor aufweisen –also keinen Hinweis auf sporadische Tumorentstehung– sollte ein durch intronische Varianten verursachtes aberrantes Spleißen ausgeschlossen werden.

Genauso sollte auch bei Patienten ohne Polymorphismus, aber mit immunhistochemischem Ausfall von MSH2 oder MSH6 über Sequenzierung des Gesamttranskripts zumindest aberrantes Spleißen ausgeschlossen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Das Patientenkollektiv

2.1.1. Voruntersuchungen

Die Auswahl der Patienten für die Untersuchung ihrer cDNA erfolgte in mehreren Schritten: Dazu wurden HNPCC-Familien entsprechend den Amsterdam- bzw. den Bethesda-Kriterien eingeteilt. Für Indexpatienten beider Gruppen wurden zunächst Mikrosatelliten- und immunhistochemische Analysen des Tumorgewebes durchgeführt. Ergaben sich hier pathologische Ergebnisse, wurde eine Analyse des entsprechenden DNA-Reparaturgens angeschlossen. War in einer Familie, die die Amsterdam-Kriterien erfüllte kein Tumormaterial vorhanden, wurden alle DNA-Reparaturgene analysiert. Diese Analysen wurden im Rahmen der Routine-Diagnostik durchgeführt.

2.1.1.1. Mikrosatellitenanalyse

Die Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität erfolgte mit Hilfe der Mikrosatellitenmarker vom Bethesda-Panel (D2S123, D5S346 (APC), BAT25, D17S250 (Mfd15) und BAT26) im Tumormaterial im Vergleich zu Normalgewebe (Boland et al., 1998).

2.1.1.2. Immunhistochemie

Parallel dazu wurden in den jeweiligen pathologischen Instituten Schnitte aus Paraffin-Blöcken des Tumors immunhistochemisch auf die Präsenz der Genprodukte MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 hin untersucht.

Die Mikrosatellitenanalysen und immunhistochemischen Untersuchungen an Tumoren wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Dietmaier et al., 1997; Boland et al., 1998).

2.1.1.3. DHPLC-gestützte Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse der Gene *MLH1*, *MSH2* und *MSH6* wurde in genomischer Patienten-DNA mittels denaturierender *High Performance* („Hochdurchsatz-“) Flüssigkeitschromatographie (DHPLC) in allen Exons des jeweiligen Gens durchgeführt. Zeigten sich Unterschiede gegenüber der Wildtyp-DNA, wurden die Sequenzveränderungen durch Sequenzierung verifiziert. Diese Technik macht es möglich, zuverlässig Punktmutationen und kleine Deletionen oder Insertionen mit einer Sensitivität von 95% nachzuweisen. Größere chromosomale Rearrangements, die eine Deletion bzw. Duplikation ganzer Exons bewirken, können mit dieser Methode jedoch nicht nachgewiesen werden.

Mittlerweile wurde dazu übergegangen, die Gene direkt mit der HRM-Methode (*High resolution melting*) auf Mutationen zu screenen, beziehungsweise direkt zu sequenzieren.

2.1.1.4. Bestimmung von großen Deletionen und Duplikationen über MLPA

Deletionen und Duplikationen einzelner oder mehrerer Exons in *MLH1* und *MSH2* wurden mit der MLPA-Methode (Multiplex-ligationsabhängige PCR-Amplifikation) überprüft (Grabowski et al., 2005). Der MLPA-Kit P003 (MRC Holland) enthält 19 Exon-Sondenpaare für *MLH1*, 16 Exon-Sondenpaare für *MSH2*, und sieben Kontroll-Sondenpaare spezifisch für DNA-Sequenzen außerhalb der Gene *MLH1* und *MSH2*. Genauso wurde auch *MSH6* komplett (10 Sondenpaare) und *PMS2* partiell (13 Sondenpaare) mit Hilfe des MLPA-Kits P008 (MRC-Holland) auf Deletionen und Duplikationen überprüft.

Bei Basensubstitutionen im Bereich der Sondenhybridisierungsstellen kann es zum fälschlichen Nachweis einer Deletion eines einzelnen Exons mittels MLPA kommen. Zum Ausschluss von Sequenzvarianten wurde daher eine Sequenzierung des als deletiert angezeigten Exons eingesetzt.

2.1.2. *Auswahl der Patienten*

Im Verlauf der letzten 6 Jahre wurden von über 1000 Familien mit Verdacht auf HNPCC-Syndrom klinische Befunde wie OP-Berichte, Koloskopie- und Pathologie-Befunde und Stammbäume gesammelt und bei auffälligen Ergebnissen in Immunhistochemie oder Mikrosatellitenanalyse eine Mutationsanalyse und ein Deletions- und Duplikationsscreening durchgeführt.

75 Indexpatienten wurden für die cDNA-Analysen ausgewählt: Bei zwölf Patienten mit Mutationen in hochkonservierten Spleißsequenzen sollte das aberrante Spleißen charakterisiert werden. Die cDNAs von neun Patienten mit Nonsense-Mutation wurde im Hinblick auf NMD untersucht. Von 26 Patienten mit unklaren Sequenzveränderungen in einem der MMR-Gene wurde die cDNA unabhängig von Mikrosatelliteninstabilität oder Immunhistochemie des Tumors sequenziert. Bei 28 Patienten mit hoher Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) im Tumor und/oder pathologischen Ergebnissen in der Immunhistochemie konnte keine krankheitsverursachende Mutation in *MLH1*, *MSH2* oder *MSH6* nachgewiesen werden. Auch diese Patienten wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von cDNA-Analysen weiter untersucht.

2.2. Chemikalien und andere Materialien

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase (5 U/μl)	Applied Biosystems
GeneAmp PCR-Puffer (10x, mit 15 mM MgCl ₂)	Applied Biosystems
dNTPs (2 mM)	GE Healthcare
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma
<i>Expand Long Template</i> PCR Enzym	Roche
Puffer-System-I (10x)	Roche
Längenstandard Fast Ruler™, Low Range	Fermentas
Längenstandard V und XIV	Roche Diagnostics
LE Agarose	Biozym
Oligonukleotidprimer (s. Anhang)	eurofins MWG
Orange G Probenauftragspuffer: 0,05 % Orange G in 25 % Ficoll™PM400 in destilliertem Wasser	Merck Amersham Biosciences
TBE-Puffer:	
10,2 % TRIS	Roth
5,5 % Borsäure	Calbiochem
0,75 % Titriplex	Merck
in destilliertem Wasser und 1:10 verdünnen	

Kits

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v1.1	Applied Biosystems
ExoSAP-IT	usb
<i>First-strand</i> cDNA Synthese Kit	Amersham Biosciences
FlexiGene DNA Kit	QIAGEN
PAXgene™ Blood RNA Kit	PreAnalytiX
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Sephadex G-50	Sigma Aldrich

2.3. Isolationstechniken für Nukleinsäuren

2.3.1. *DNA Isolation*

Die DNA-Isolation aus EDTA Blut erfolgte mit dem FlexiGene DNA Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.3.2. RNA Isolation und cDNA-Gewinnung

Die Isolierung der RNA aus den Blutlymphozyten erfolgte mit Hilfe des PAXgene™ Blood RNA Kit (PreAnalytiX) nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Beurteilung der RNA-Qualität und -Quantität wurde ein Aliquot der isolierten RNA (1 - 2 µl) auf ein 0,7 %-iges Agarose-Gel aufgetragen und auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Reverse Transkription

Für die reverse Transkription präparierter RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde der *First-strand* cDNA Synthese Kit (Amersham Biosciences) verwendet. Etwa 3 µg Gesamt-RNA dienten als Ausgangsmenge. Die denaturierte RNA wurde auf Eis mit dem Erststrang-Reaktionsmix (1x RT-Puffer, dNTPs, Reverse Transkriptase), DTT-Lösung und dem als Primer dienenden NotI-d(T)₁₈ – Oligomer (0,2 µg) vermischt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.3.3. RT-PCR

Die Amplifikation von cDNA-Fragmenten erfolgte aus synthetisierter Erststrang-cDNA der Reversen Transkription. Etwa 90 ng cDNA wurden in die RT-PCR eingesetzt.

Zum Test auf die Amplifizierbarkeit der synthetisierten Erststrang-cDNA und zum Ausschluss genomischer Kontamination wurde eine RT-PCR mit *GAPDH*-Primern gemacht:

GAPDH-F: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'

GAPDH-R: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3'

Der Vorwärtsprimer (in Exon 7) und der Rückwärtsprimer (in Exon 8) amplifizieren ein cDNA-Fragment von 282 Basenpaare. Diese Primer flankieren ein genomisches Fragment mit Intron von ca. 500 Basenpaare und dienen gleichzeitig als Test auf DNA-Kontaminationen.

Allgemein empfiehlt es sich, Primer für cDNAs exon- oder intronüberspannend zu setzen. RT-PCR-Reaktionen wurden nach dem Standard-Protokoll der Ampli-Taq Gold durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.1.).

2.4. Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

2.4.1. *Standard PCR*

Eine DNA-Amplifikation mit Hilfe der Standard-PCR (*Polymerase chain reaction*) erfolgte nach der Methode von Saiki et al. (1988). Detaillierte Beschreibungen der Primersequenzen finden sich im Anhang.

Ausgangsmaterial für die PCR-Amplifikation in einem Reaktionsansatz von 25 µl in 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Amersham Biosciences), je 0,4 pmol/µl (10 pmol) Oligonukleotidprimer (F für *forward* und R für *reverse*) und 0,625 U Taq-DNA-Polymerase waren ca. 50 - 200 ng DNA oder cDNA. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert und lyophilisiert geliefert.

Als Standard-PCR-Protokoll wurde der Ansatz der Ampli-Taq Gold verwendet:

Reagenzien für Ampli-Taq Gold PCR-Ansatz	µl für 1x
GeneAmp PCR-Puffer (10x, mit 15 mM MgCl ₂ Roche/ Applied Biosystems)	2,5
dNTPs (2 mM)	2,0
Primer F (20 pmol/µl)	0,5
Primer R (20 pmol/µl)	0,5
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase (5 U/µl, Roche/ Applied Biosystems)	0,125
100 - 200 ng genomische DNA oder 90 ng cDNA	1 - 2
ddH ₂ O ad 25 µl Gesamtreaktionsvolumen	ad 25 µl

Tabelle 1: Reagenzien für Ampli-Taq Gold PCR-Ansatz

Die PCR-Reaktion erfolgte in 0,5 ml Reaktionsgefäßen oder 96-er Thermowell-Platten in einem programmierbaren Thermocycler (MJ Research PTC-200) entweder mit einem spezifischen Temperatur-Programm oder als *Touch Down-Programm*.

Für die spezifische PCR wurden folgende Bedingungen eingehalten:

- | | | |
|--|-----------|----------------|
| 1. initiale Denaturierung | 95°C | 10 min |
| 2. Denaturierung | 95°C | 30 sec |
| 3. Primeranlagerung | 56 - 60°C | 30 sec |
| 4. Synthese | 72°C | 30 sec - 1 min |
| 5. Wiederholung der Schritte 2 - 4 in 29 - 39 Zyklen | | |
| 6. finale Elongation | 72°C | 5 min |
| 7. finale Denaturierung | 95°C | 2 min |

Die *Touch Down-PCR* erfolgte unter folgenden Bedingungen nach der Methode von Don, et al., 1991:

- | | | |
|--|------|----------------|
| 1. initiale Denaturierung | 95°C | 10 min |
| 2. Denaturierung | 95°C | 30 sec |
| 3. Primeranlagerung | 64°C | 30 sec |
| 4. Synthese | 72°C | 30 sec – 1 min |
| 5. Wiederholung der Schritte 2 - 4 in 9 Zyklen, dabei wird die Anlagerungstemperatur pro Zyklus um 1°C abgesenkt | | |
| 6. Denaturierung | 95°C | 30 sec |
| 7. Primeranlagerung | 54°C | 30 sec |
| 8. Synthese | 72°C | 30 sec – 1 min |
| 5. Wiederholung der Schritte 6 - 8 in 29 - 39 Zyklen | | |
| 6. finale Elongation | 72°C | 7 min |
| 7. finale Denaturierung | 4°C | 10 min |

Das PCR-Reaktionsprogramm umfasste zwischen 29 und 39 Zyklen, wobei die PCR-Variablen wie Temperatur und Zeit der Primer-DNA-Anlagerung in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung und Länge der jeweiligen Primer und die DNA-Synthesezeit je nach Größe des zu amplifizierenden PCR-Produkts optimiert wurden.

2.4.2. Long Range-PCR

Für Fragmente ab einer Länge von ca. 1000 bis 4000 Basenpaaren wurde das *Expand Long Template* PCR System von Roche verwendet. Das PCR-Protokoll hierfür lautet:

Reagenzien für Long Range-PCR Ansatz	µl für 1x
Puffer-System-I (10x, Roche)	2,5
dNTPs (2 mM)	0,875
Primer F (20 pmol/µl)	0,75
Primer R (20 pmol/µl)	0,75
<i>Expand Long Template</i> PCR Enzym (Roche)	0,375
100 - 200 ng genomische DNA oder 90 ng cDNA	1 – 2
ddH ₂ O ad 25 µl Gesamtreaktionsvolumen	ad 25 µl

Tabelle 2: Reagenzien für *Long Range-PCR* Ansatz

Die Amplifikation erfolgte als *Touch Down*-PCR-Programm unter folgenden Bedingungen:

1. initiale Denaturierung	94°C	2 min
2. Denaturierung	94°C	10 sec
3. Primeranlagerung	64°C	30 sec
4. Synthese	68°C	2 – 4 min
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4 in 13 Zyklen, dabei wird die Anlagerungstemperatur pro Zyklus um 1°C abgesenkt		
6. Denaturierung	94°C	10 sec
7. Primeranlagerung	50°C	30 sec
8. Synthese	68°C	2 – 4 min
5. Wiederholung der Schritte 6 - 8 in 29 - 39 Zyklen		
6. finale Elongation	72°C	7 min
7.	4°C	10 min

2.5. Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten fand unter folgenden Bedingungen statt:

1-2%-ige Agarose-Gele mit 6 - 8 mm Geldicke und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid-Endkonzentration in 1x TBE-Puffer wurden bei 2 - 5 V/cm Elektrodenabstand in TBE-Puffer betrieben. 4 µl des aufzutragenden PCR-Produkts wurden 1:1 mit Orange G Probenauftragspuffer gemischt, in die Geltaschen aufgetragen und ihrer Größe nach aufgetrennt. Ein mitgeführter Längenstandard ermöglichte die Interpretation der Ergebnisse. Je nach erwarteter Größe des Fragments wurden die Längenstandards V, XIV (Roche Diagnostics) oder der Längenstandard Fast Ruler™, Low Range (Fermentas) verwendet. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte unter einem UV-Transilluminator (Herolab) bei 300 nm Wellenlänge. Bei Vorliegen einer einzelnen Bande konnte das PCR-Produkt direkt gereinigt werden, alternativ erfolgte eine Gelextraktion einzelner ausgeschnittener Banden.

2.6. Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung der amplifizierten PCR-Produkte standen zwei Verfahren zur Verfügung. Entweder wurde sie mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers über eine Säule durchgeführt. Alternativ erfolgte die Reinigung über Verdau

einzelsträngiger Nukleotide mittels ExoSAP-IT (Exonuklease und *Shrimp Alkaline Phosphatase, usb*) nach dem Protokoll des Herstellers.

Gelextraktion

Zeigten sich bei einer PCR-Amplifikation in der Gelelektrophorese mehrere Banden, wurde der verbliebene Reaktionsansatz nach Zumischung von Orange G Probenauftragspuffer im Verhältnis 1:5 vollständig auf das Gel aufgetragen. Nach Beurteilung der Fragmentlängen wurden die einzelnen Banden ausgeschnitten und die PCR-Fragmente mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert.

2.7. DNA-Sequenzierung

2.7.1. Sequenzreaktion

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode. In die Sequenzreaktion wurden 50 - 100 ng gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Zur doppelsträngigen DNA-Matrize wurden 1,7 µl BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v1.1 (Applied Biosystems), 3 pmol Primer und ddH₂O bis auf ein Gesamtvolumen von 10 µl zugegeben. Der Sequenzansatz wurde für den Vorwärts- (F) und Rückwärts- (R) Primer jeweils getrennt angesetzt. Es wurden dabei die zur Amplifikation verwendeten Primer oder innenliegende (*nested*) Primer in die Sequenzreaktion eingesetzt.

Die Sequenzreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 94°C 30 sec
2. 50°C 15 sec
3. 60°C 4 min
4. Wiederholung der Schritte 1 - 3 in 25 Zyklen

2.7.2. Sequenzaufreinigung

Nach Beendigung der zyklischen Sequenzreaktion wurde der Reaktionsansatz gereinigt. Dazu wurden Sephadex G-50-Säulen (Sigma Aldrich) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.7.3. Sequenzanalyse

Die automatisierte Sequenzbestimmung erfolgte auf dem Sequenziergerät 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen auf POP 6 Polymer. Die Sequenzrohdaten wurden mit dem Softwarepaket 3100 Data Collection Software Version 3.0 erfasst und im Programmpaket Analyses 3.7 (Applied Biosystems) als Elektropherogramme dargestellt. Die Sequenzanalyse erfolgte im Vergleich zu Wildtyp-Sequenzen. Bei reduziert exprimierten Allelen konnten *forward*- und *reverse*- Sequenz mit der genomischen Sequenz verglichen werden. Obwohl keine quantitativen Analysemethoden verwendet wurden, versuchten wir in der Zusammenschau dieser Methoden eine prozentuale Abschätzung der Allel-Reduzierung.

2.8. **Bestätigung**

Alle auffälligen und möglicherweise pathologischen Ergebnisse wurden grundsätzlich in einer zweiten unabhängigen PCR und Sequenzreaktion bestätigt.

3. Ergebnisse

3.1. Alternatives Spleißen in Individuen

In cDNAs von Kontroll-Individuen wurden häufig auftretende alternative Spleißprodukte untersucht und bestimmt, um diese normalen alternativen Spleißprodukte von pathogenen Spleißveränderungen unterscheiden zu können. Dazu wurden sowohl kleine PCR-Fragmente vor allem von stark alternativ gespleißten Exons als auch *Long Range*-PCRs der kompletten Gene von *MLH1*, *MSH2* und *MSH6* analysiert.

In kleineren PCRs wurde alternatives Spleißen von den Exons 6, 9, 9-10, 10-11, 9-10-11, 12, 16 und 17 in *MLH1*, von Exon 13 in *MSH2* und von Exon 3 in *MSH6* beobachtet. In laborinternen Vorarbeiten wurde zusätzlich alternatives Spleißen von *MLH1* Exon 9-10-11-12-13, 14-15 und 15 identifiziert.

Alle auftretenden alternativen Spleißprodukte im Rahmen einer *Long Range*-PCR der kompletten Gene nachzuweisen, war nicht möglich. Die betrachteten Unterschiede betragen oft nur wenige 100 Basenpaare. Um die Auftrennung geringer Differenzen bei Genlängen von über 2000 Basenpaaren (2271 Basenpaare für *MLH1*, 2805 Basenpaare für *MSH2* und 4083 Basenpaare für *MSH6*) zu erreichen, waren sehr lange Laufzeiten im Gel nötig. Da die alternativen Spleißprodukte aber im Vergleich zum Wildtyp eine stark verminderte Intensität aufweisen, hatte ihre Intensität bis zum Zeitpunkt der Dokumentation schon so stark abgenommen, dass sie im Gelbild nicht mehr nachzuweisen waren.

Hingegen konnten aberrant gespleißte Produkte, die nicht durch NMD abgebaut wurden und eine zum Wildtyp vergleichbare Intensität besaßen, trotz langer Gellaufzeit der *Long Range*-PCR, noch detektiert werden. Die aberrant gespleißte Bande war auch zum Beispiel bei einem Längenunterschied von 99 Basenpaaren, wie bei der Patientin GU in *MLH1*, oder bei einem Längenunterschied von 150 Basenpaaren, wie bei der Patientin RM in *MSH2*, vom Wildtyp deutlich zu unterscheiden. Damit konnte die *Long Range*-PCR zwar zum Ausschluss aberranten Spleißens bei Patienten genutzt werden, nicht aber zum Nachweis aller auftretenden alternativen Spleißprodukte.

Die Beurteilung des alternativen Spleißens im Vergleich zu den aberranten Spleißprodukten erfolgte deshalb ausschließlich durch parallel zu den Patienten-PCRs durchgeführte Kontrollen. Die Intensität der aufgetretenen Produkte wurde am Gelbild verglichen. Die Entscheidung, bei welchen Produkten es sich um alternativ beziehungsweise aberrant gespleißte Fragmente handelte, war meist eindeutig, da die pathologisch aufgetretenen Formen in ihrer Intensität deutlich imponierten.

3.2. Untersuchung von Patienten auf cDNA-Ebene

3.2.1. Mutationen mit vermuteter Pathogenität

Zunächst wurden Patienten untersucht, bei denen aufgrund der betroffenen Position eine Pathogenität zu erwarten war. Dabei handelte es sich zum einen um Spleißmutationen: Sequenzveränderungen, die am Exon-Intron-Übergang lokalisiert sind und damit für korrektes Spleißen essentiell sind (Spleißmutationen), zum anderen um Nonsense-Mutationen: Stoppmutationen, größere Exondeletionen oder Leserahmenverschiebungen, die ein frühzeitiges Stoppcodon generieren und zum Abbau der RNA durch NMD (*Nonsense-mediated-mRNA-decay*) führen müssten. Es sollte hier überprüft werden, inwieweit der zu erwartende Pathomechanismus tatsächlich eintritt.

3.2.1.1. Spleißmutationen in *MLH1*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon/Intron	cDNA-Position	potentielle Aminosäure-Veränderung	SNP	Expression	Diagnose
GU	A1	kein Tumor		<i>MLH1</i> : Intron 2 / Exon 3	c.208-1_208 delGA	p.K70Kfs X22		Spleißmutation ΔEx 3: 50%: if	26J RektumCa
RC	A1	MSI		<i>MLH1</i> : Exon 8	c.677G>A (letzte Base)	p.R226Q	P8	monoallelisch; ΔEx8: p.Q197RfsX8 →NMD	42J CaecumCa, 44J MammaCa, 54J SigmaCa
MJ	A1			<i>MLH1</i> : Exon 8	c.677G>T (letzte Base)	p.R226L	P8	fast monoallelisch; ΔEx8: p.Q197RfsX8 →NMD	34J Polyp, Ratsuchende, da Mutter mit 35J ColonCa
GT	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.676C>T (vorletzte Base)	p.R226X	P8	reduziert; Stoppmutation →NMD und/oder Spleißmutation ΔEx8: p.Q197RfsX8 →NMD	33J ColonCa
PM	A1	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Intron 9	c.790+1delG			Spleißmutation Δ9: schwach:oof; Δ9-10: wie WT:if; Δ9-11: schwach:oof	46J ColonCa
KU	B	MSS	MLH1, PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 11	c.1038G>C (letzte Base)	p.Q346H	P8	Spleißmutation Δ10-11: schwach:oof z.T. NMD	Ratsuchender, da Bruder ColonCa
NW	A1	MSI	MLH1, PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 18	c.2103G>C (letzte Base)	p.Q701H	P8	monoallelisch; Spleißmutation Δ17, Δ17-18 und Δ18: alle if	37J ColonCa
OS	B	MSI	n.a.	<i>MLH1</i> : Intron 17	c.1990-1G>A			Spleißmutation Δ17, Δ17-18 und Δ18: alle if	Ratsuchende, da Tante mit 40J SigmaCa

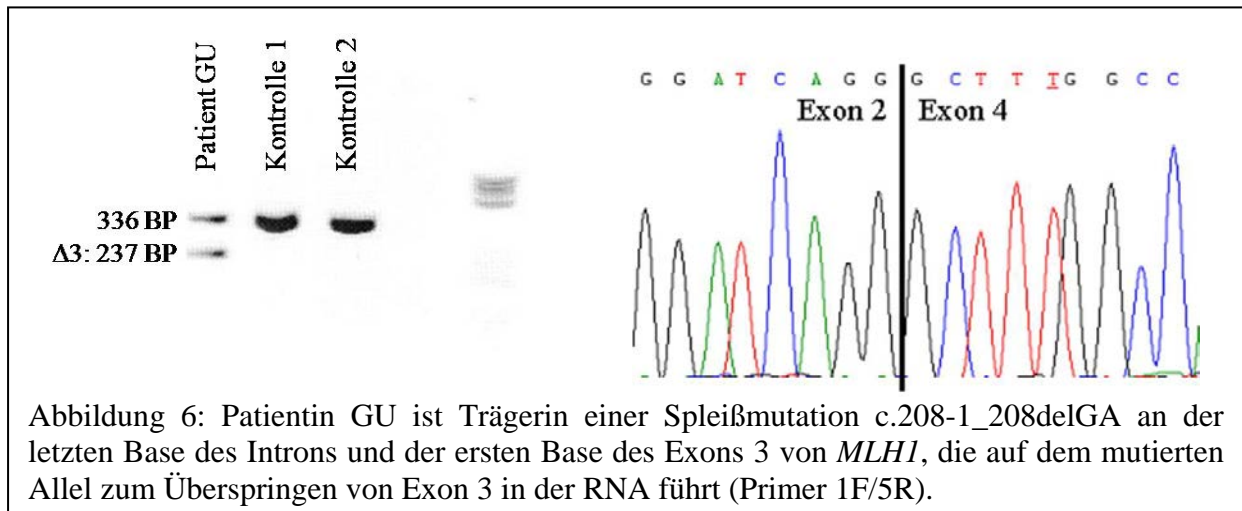
Tabelle 3: Patienten mit Mutationen in *MLH1*, bei denen ein Spleißdefekt vorhergesagt wird

(if= *in frame*; oof= *out of frame*; fs= *frameshift*; n.a.= nicht auswertbar; Ca= Karzinom; J= Alter bei Diagnose in Jahren)
(P8: *MLH1* Exon 8: c.655A>G; p.I219V: nicht pathogene Sequenzvariante)

In *MLH1* wurden folgende Mutationen im Hinblick auf das Auftreten aberranten Spleißens untersucht:

➤ ***MLH1* Intron2/Exon 3: c.208-1_208delGA**

Patientin GU zeigt eine Deletion von c.208-1_208delGA, es handelt sich dabei um die letzte Base des Introns und die erste Base von Exon 3 und damit eine zu 100% konservierte Spleißsequenzposition (siehe Abb.3).

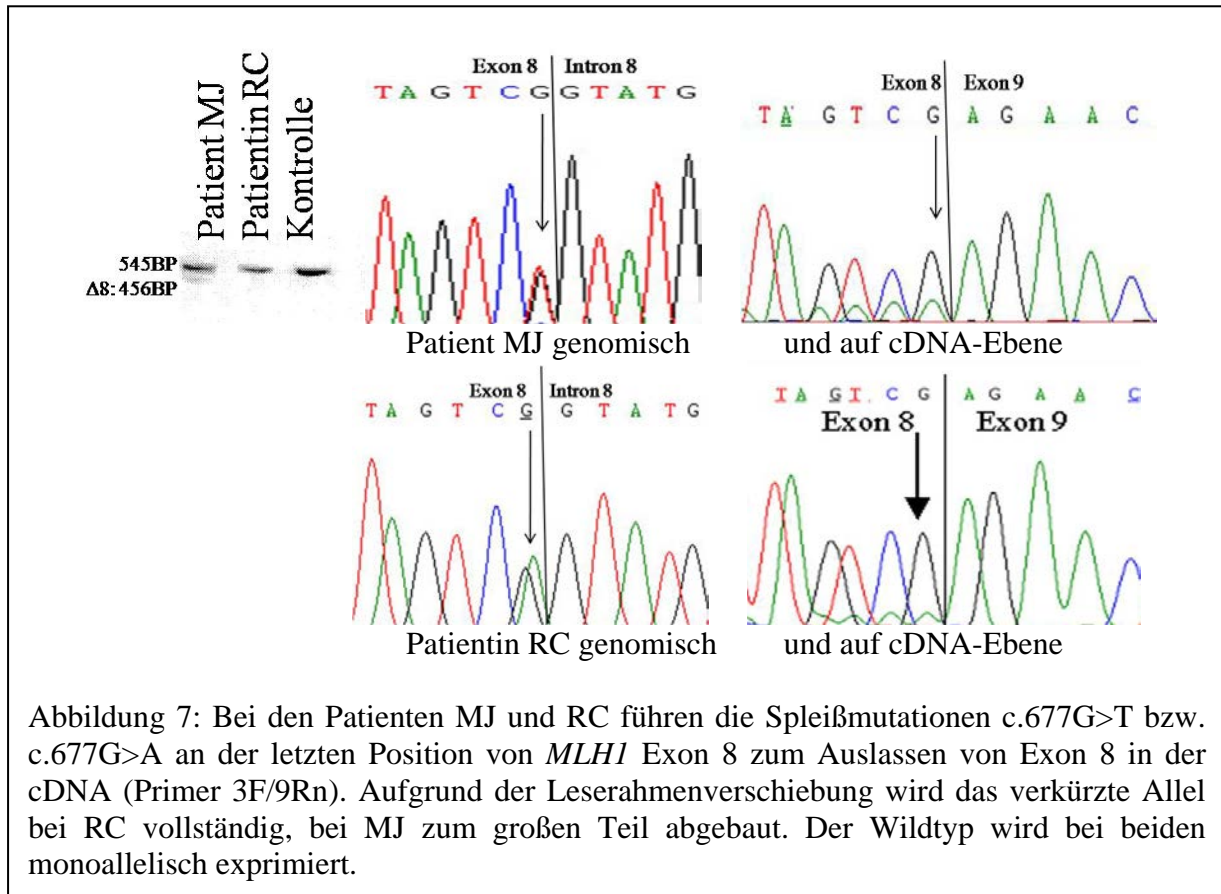


In der Amplifikation der cDNA von Exon 1F und 5R waren im Gelbild die Wildtyp-Bande und eine zusätzliche Bande mit ähnlicher Intensität sichtbar, die um das Exon 3 verkürzt war (siehe Abb.6). In der Sequenzierung der Wildtyp-cDNA-Bande von Exon 3 war nur die Normal-Sequenz, jedoch nicht die z.T. im Exon liegende Sequenzveränderung nachweisbar. Damit konnte gezeigt werden, dass die vorliegende Mutation das korrekte Spleißen zu 100% verhindert und zum vollständigen aberranten Spleißen des Exons 3 im mutierten Allel führt. Durch das Auslassen von Exon 3 (*Exon-Skipping*) in der cDNA wird das codierte Protein um 33 Aminosäuren verkürzt, es kommt aber nicht zu einer Leserahmenverschiebung. Das erklärt, dass kein Abbau der fehlerhaften cDNA vorlag. Es konnte bestätigt werden, dass es sich bei der vorliegenden Deletion *MLH1* Ex.3: c.208-1_208delGA um eine Spleißmutation handelt. Vom Funktionsverlust des veränderten Proteins ist aufgrund der Verkürzung um 33 Aminosäuren auszugehen, auch wenn kein Tumor dieser Patientin für immunhistochemische oder Mikrosatellitenanalysen verfügbar war.

➤ ***MLH1* Exon 8: c.677G>A; p.R226Q und c.677G>T; p.R226L**

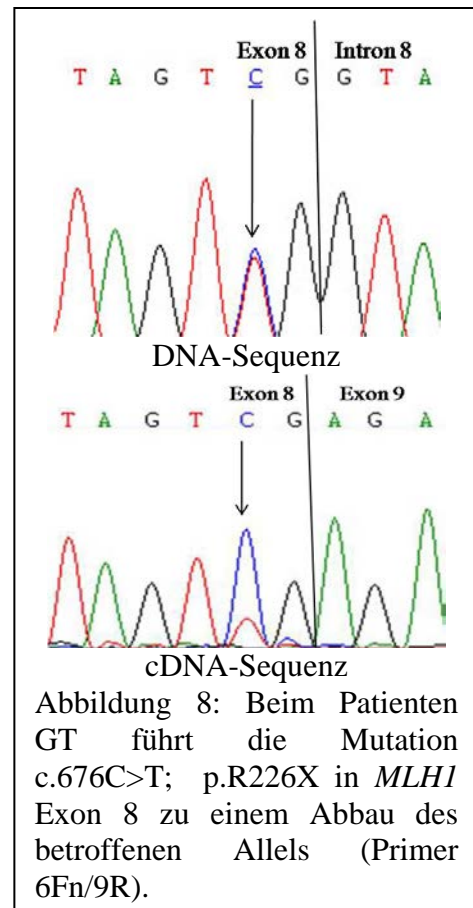
An Position c.677G ist Patientin RC Trägerin einer Punktmutation nach Adenin (p.R226Q), Patient MJ einer Punktmutation nach Thymin (p.R226L). Es handelt sich dabei jeweils um die

letzte Base im Exon 8 und damit eine zu 73% konservierte Nukleinsäure. Die cDNAs wurden mit den Primern 3F und 9Rn amplifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide an Position c.677 im Wildtyp monoallelisch Guanin exprimieren, bei RC war im Gel keine zweite Bande sichtbar, bei MJ zeigte sich eine zweite um 89 Basenpaare verkürzte Bande, die sich in der Sequenzierung als das um Exon 8 verkürzte Produkt darstellte (siehe Abb.7). Diese Bande hatte aber im Vergleich zur Wildtypbande eine deutlich geringere Intensität (ca. 25%). Der bei beiden Patienten zusätzlich vorliegende bekannte Polymorphismus in Exon 8, wurde mit dem 7/8F und 9R Primer untersucht. Er lag, wie zu erwarten, bei beiden quasi monoallelisch vor, da ja der 7/8F Primer nicht an den entsprechenden Exon-Exon-Übergang zwischen 7 und 9 am aberrant gespleißten Allel binden kann. Es wurde also gezeigt, dass die Mutation zu vollständigem *Exon-Skipping* führt. Da es durch das Fehlen von Exon 8 in der RNA zu einem *frameshift* und einem vorzeitigen Stoppcodon nach 21 Basenpaaren kommt, wird die mutierte RNA von dem als *Nonsense-mediated-mRNA-decay* (NMD) bezeichneten Mechanismus als fehlerhaft erkannt und abgebaut. Es bestehen interindividuelle Unterschiede zwischen MJ und RC, was die Vollständigkeit des Abbaus betrifft. Die vermutete Pathogenität der vorhergesagten Spleißmutationen konnte für beide Patienten nachgewiesen werden.



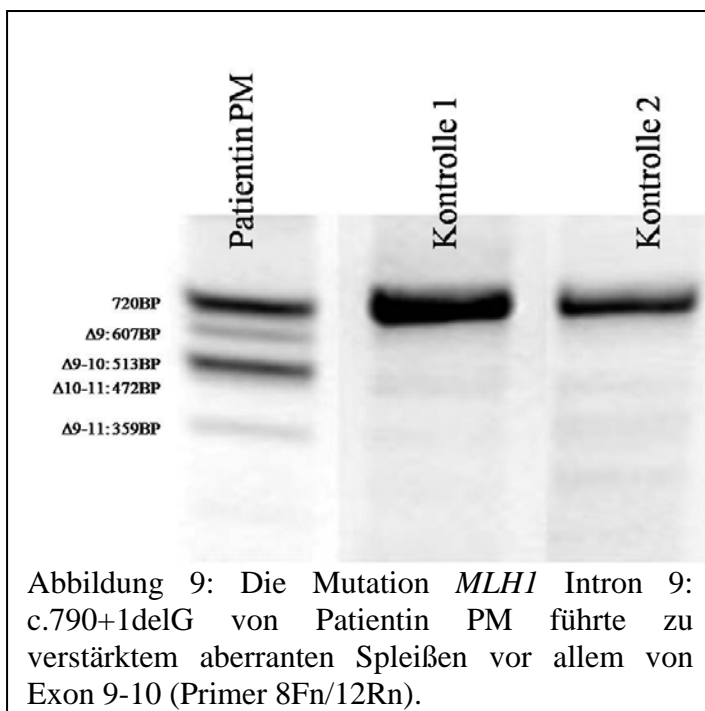
➤ ***MLH1* Exon 8: c.676C>T; p.R226X**

Genauso wurde auch die cDNA des Patienten GT mit der Mutation c.676C>T; p.R226X an der vorletzten Stelle ebenfalls von Exon 8 mit dem 6Fn und 9R Primer untersucht. Die Mutation befindet sich an einer zu 64% konservierten Spleißstelle. Im Gel konnte keine zweite Bande detektiert werden, die auf aberrantes Spleißen deutet. Die Sequenzierung ergab eine reduzierte Expression des mutierten Allels sowohl in der Mutationsstelle (siehe Abb.8) als auch im SNP von Exon 8. Neben der möglichen Veränderung des Spleißverhaltens erscheint das vorzeitige Stoppcodon p.R226X als Ursache für den Abbau von 80-90% des mutierten Allels möglich. Der tatsächlich zugrunde liegende Pathomechanismus in der RNA konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, da die Mutation an sich bereits pathogen ist.



➤ ***MLH1* Intron 9: c.790+1delG**

Die Patientin PM wurde aufgrund der Deletion in c.790+1delG, der ersten Base des Introns nach Exon 9 und damit einer 100%-ig konservierten Spleißstelle mit den Primern in Exon 8Fn

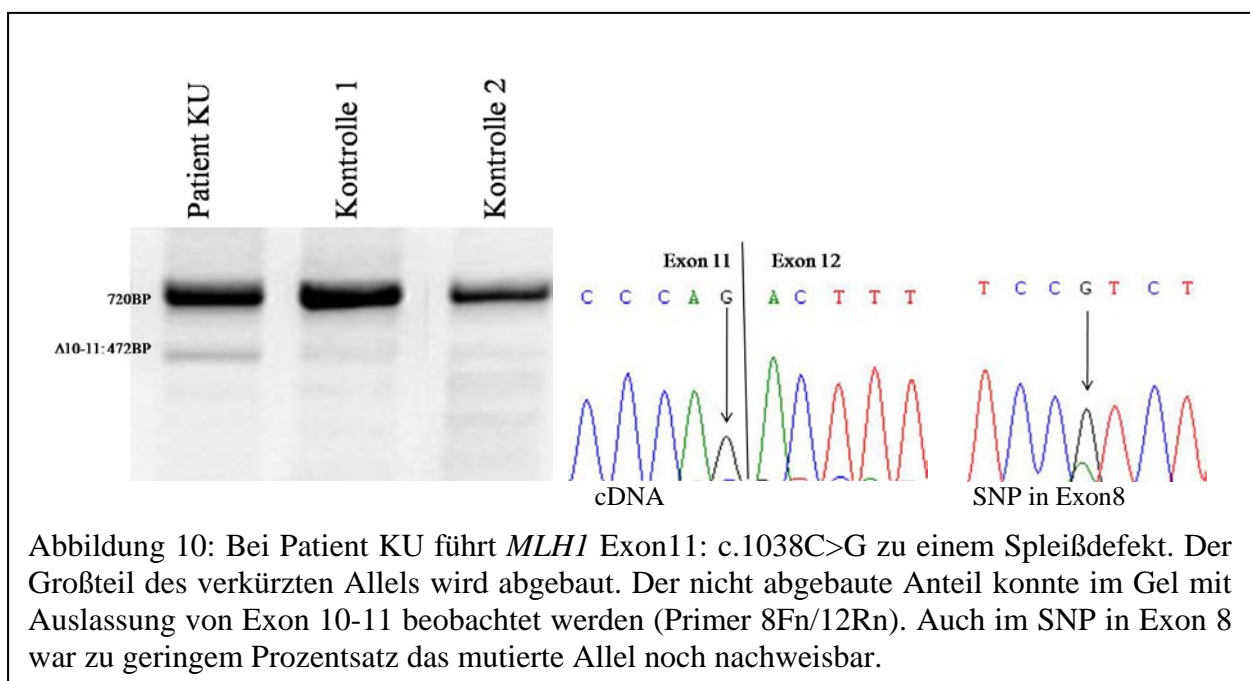


und 12Rn untersucht. Im Gelbild zeigten sich fünf Banden unterschiedlicher Intensität, deren Identität durch separate Gelextraktionen und Sequenzierung geklärt wurde. Aufgrund der intronischen Lage der Mutation konnten nur die entstandenen, alternativ und aberrant gespleißten Fragmente im Gel analysiert und identifiziert werden, nicht jedoch die Expression der einzelnen Allele bestimmt werden. Neben der

Wildtypbande lag eine um Exon 9 verkürzte Bande mit geringer Intensität, eine um Exon 9 und 10 verkürzte Bande, mit vergleichbarer Intensität wie die Wildtypbande und um Exon 10 und 11 sowie um Exon 9, 10 und 11 verkürzte Banden vor, die im Gel nur schwach erschienen (siehe Abb.9). Durch Auslassen von Exon 9 und 10 kommt es zu keiner Leserahmenverschiebung. Somit wird die um Exon 9-10 verkürzte RNA nicht durch NMD abgebaut. Das veränderte Spleißverhalten mit verstärktem *Exon-Skipping* von Exons 9 und 10 konnte durch Untersuchung der cDNA ihrer Tochter, die die gleiche Mutation trägt, bestätigt werden. *Exon-Skipping* von Exon 9, 9-10, 10-11, 9-11 wird auch im Rahmen des alternativen Spleißens bei gesunden Kontrollen in geringem Ausmaß beobachtet.

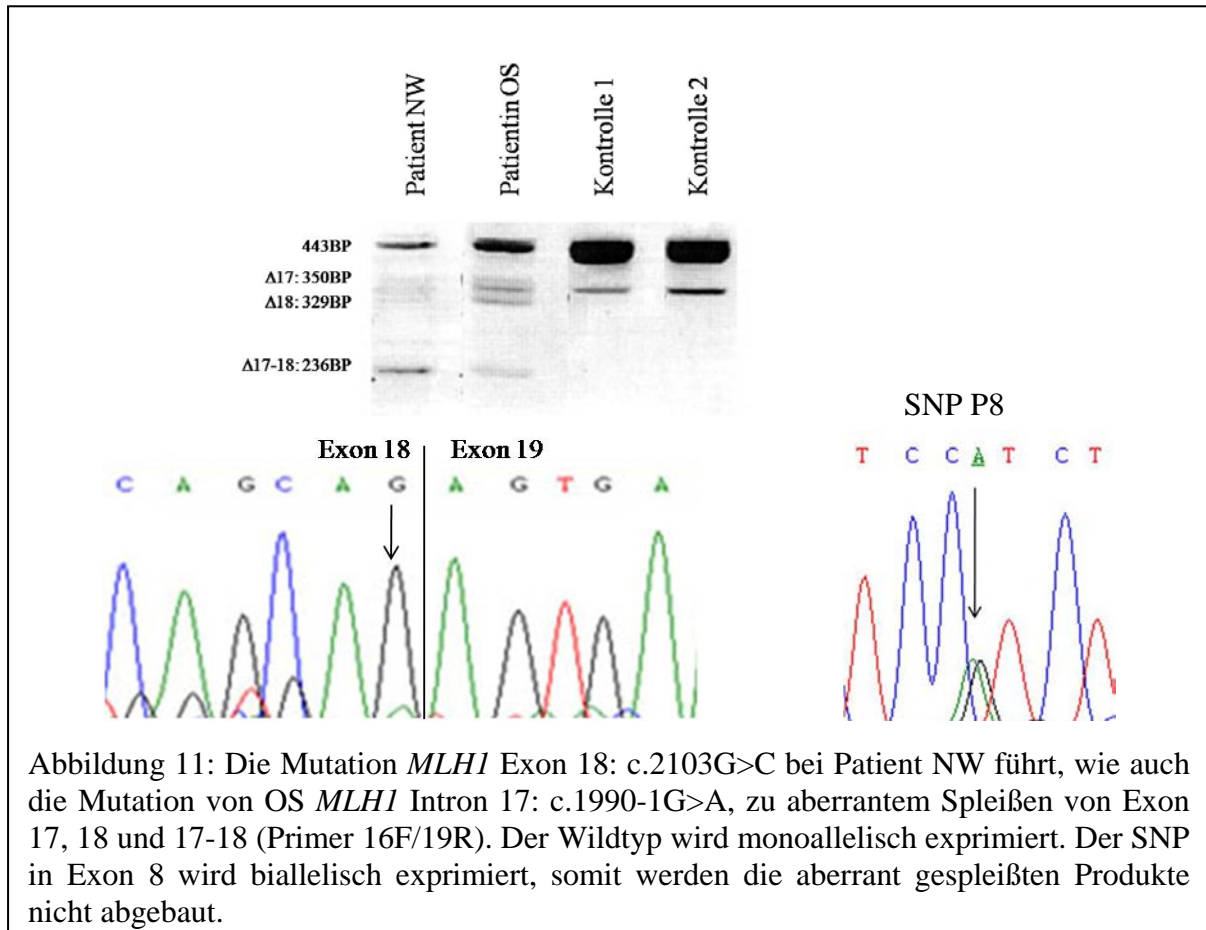
➤ ***MLH1* Exon 11: c.1038G>C; p.Q346H**

Beim Patienten KU untersuchten wir eine Mutation in der letzten und damit zu 73% konservierten Base des Exons 11: c.1038G>C; p.Q346H. In der PCR mit 8Fn und 12Rn zeigte sich ein im Vergleich zu gesunden Kontrollen leicht verstärktes Spleißen von Exon 10-11. In der Sequenzierung der Wildtypbande war eine monoallelische Expression der Mutation sichtbar. Die Mutation an der letzten Base von Exon 11 muss also zu einem vollständigen Auslassen von Exon 11 führen. Amplifizierten wir aber den SNP in Exon 8, war auch das die Mutation tragende A-Allel noch reduziert mit einer Intensität von ca. 30% nachweisbar (siehe Abb.10). Das bedeutet 70% des aberrant gespleißten Produkts werden abgebaut, die übrigen ca. 30% lassen sich sowohl im SNP als auch im Gelbild noch nachweisen. Damit führt die Mutation zu einem vollständigen *Exon-Skipping*, die verkürzte RNA wird aufgrund der Leserahmenverschiebung größtenteils abgebaut.



➤ ***MLH1* Exon 18: c.2103G>C; p.Q701H**

Die Mutation des Patienten NW von c.2103G>C; p.Q701H in der letzten Base von Exon 18 wurde mit einer PCR von Exon 16F bis 19R amplifiziert. Im Gelbild erschienen mehrere aberrant gespleißte Produkte. In der Sequenzierung des Wildtyp-Fragments war die Mutation im Exon 18 auf RNA-Ebene nicht mehr nachweisbar, der Wildtyp wurde monoallelisch exprimiert. Währenddessen lag der SNP in Exon 8 biallellisch exprimiert vor (siehe Abb.11). Damit wird das mutierte Exon durch verändertes Spleißen vollständig entfernt, jedoch kaum abgebaut. Bei den aberrant gespleißten Fragmenten handelte es sich um Produkte mit Auslassung von Exon 17, 18 oder 17-18 (*Exon-Skipping*). Die Auslassung von Exon 17 ist eine Form des alternativen Spleißens, die auch bei gesunden Kontrollen in geringem Maße vorkommt. Das schwache aberrante Spleißen von Exon 18 und das stärkere aberrante Spleißen von Exon 17-18 (ca. 60% des Wildtyps) wurden weder bei den parallel durchgeführten Kontrollen noch in der Literatur in Kontrollpersonen beobachtet. Durch das Auslassen von Exon 18 bzw. 17-18 in der cDNA wird das codierte Protein um 38 bzw. 78 Aminosäuren verkürzt, es kommt aber in beiden Fällen nicht zu einer Leserahmenverschiebung. Damit wurde auch für diese Patienten die Pathogenität der Mutation nachgewiesen.



➤ ***MLH1* Intron 17: c.1990-1G>A**

Die Patientin OS, deren Mutation c.1990-1G>A ebenfalls das Exon 18 betrifft, aber sich an der letzten zu 100% konservierten intronischen Base vor Exon 18 befindet, zeigte ein vergleichbares Gelbild (siehe Abb.11). Aufgrund der intronischen Lage der Mutation und fehlenden SNPs konnte die Wildtyp-Bande nicht näher untersucht werden. Die Frage, ob das mutierte Allel zum Teil abgebaut wird, konnte nicht beantwortet werden.

3.2.1.2. Stoppmutationen in *MLH1*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	potentielle Aminosäure-Veränderung	SNP	Expression	Diagnose
WL	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon13	c.1490insC	p.R497PfsX6		reduziert	ColonCa
DU	A1	MSI	n.a.	<i>MLH1</i> : Exon 18	c.2092_2093delTC	p.S698RfsX5	P8 P17	biallelisch, da Stopp im letzten Exon	41J DuodenumCa

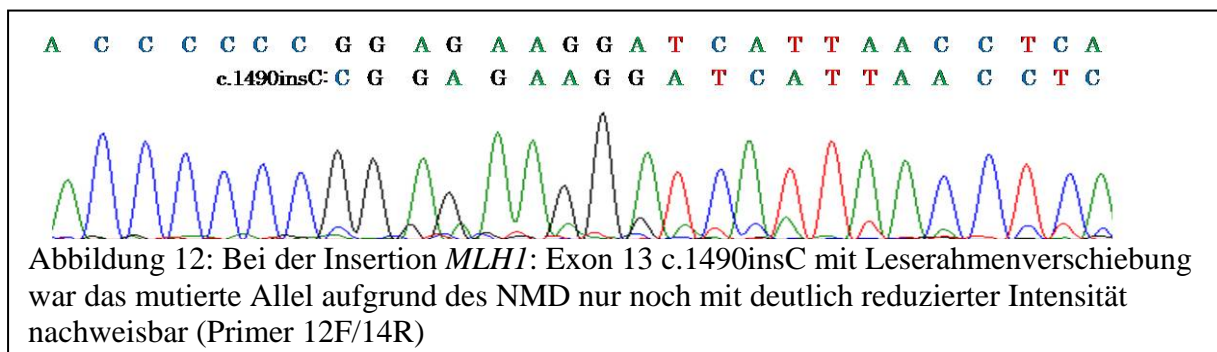
Tabelle 4: Patienten mit Mutationen in *MLH1*, die ein vorzeitiges Stoppcodon induzieren

(fs= frameshift; n.a.=nicht auswertbar; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

(P8: *MLH1* Exon 8: c.655A>G; p.I219V; P17: *MLH1* Exon 17: c.1959G>T; p.L653L: nicht pathogene Sequenzvarianten)

➤ ***MLH1* Exon 13: c.1490insC**

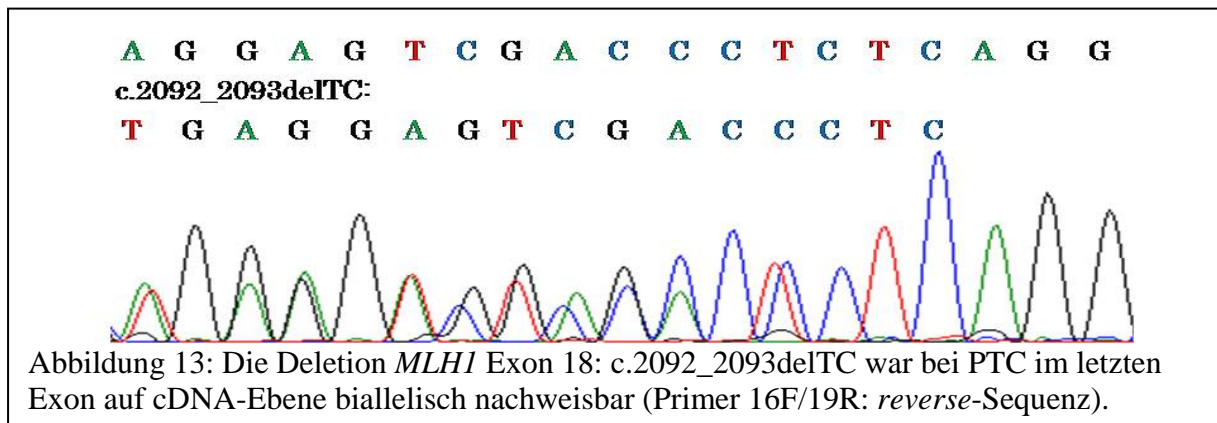
Bei Patient WL führt das durch die Insertion *MLH1*: Exon 13 c.1490insC nach sechs Basen generierte vorzeitige Stoppcodon, wie zu erwarten, zu einem Abbau des mutierten Allels. In der PCR mit den Primern 12F und 14R war das mutierte Allel nur noch mit einer verminderten Intensität von ca. 10% nachweisbar (siehe Abb.12).



➤ ***MLH1* Exon 18: c.2092_2093delTC; p.S698RfsX5**

Die cDNA des Patienten DU wurde aufgrund der Deletion in *MLH1* Exon 18: c.2092_2093delTC; p.S698fs, die nach 5 Basenpaaren in Exon 19 zu einem vorzeitigen Stoppcodon führt, mit dem 16F und 19R Primer untersucht. Dabei zeigte sich eine biallelische Expression der Mutation (siehe Abb.12). Auch die SNPs in Exon 8 p.I219V und 17 p.L653L

waren biallelisch exprimiert. Es findet kein NMD statt, da das vorzeitige Stoppcodon im letzten Exon liegt. Die Mutation wird aufgrund des vorzeitigen Stoppcodons als pathogen eingestuft.



3.2.1.3. Spleißmutationen in *MSH2*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon/Intron	cDNA-Position	potentielle Aminosäure-Veränderung	Expression	Diagnose
RM	B	MSI	<i>MSH2</i>	<i>MSH2</i> : Intron 5	c.942+3A>T		Spleißmutation Δ5:50% : if	62J RektumCa
TW	B	MSI-L	kein Tumor	<i>MSH2</i> : Exon 7	c.1275A>G (vorletzte Base)	p.E425E	Spleißmutation krypt.c.1228 reduzierte Bande; if	44J CaecumCa
BE	A1			<i>MSH2</i> : Intron 7	c.1276+1G>T		Spleißmutation krypt.c.1228 reduzierte Bande; if	

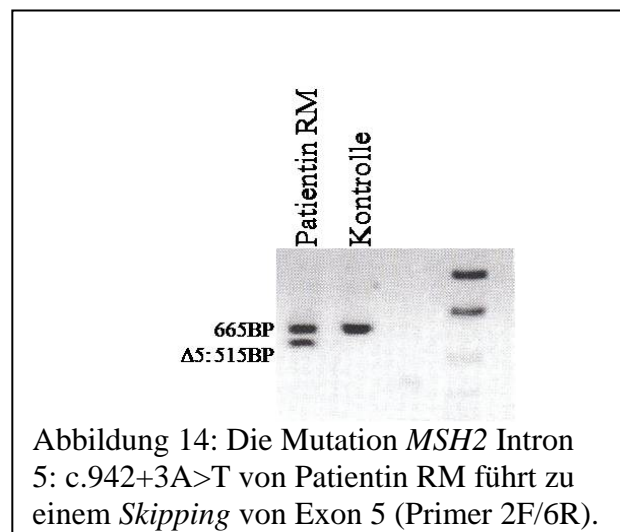
Tabelle 5: Patienten mit Mutationen in *MSH2*, bei denen ein Spleißdefekt vorhergesagt wird

(if= *in frame*; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

In *MSH2* wurden bei drei Patienten Spleißmutationen vorhergesagt:

➤ *MSH2* Intron 5: c.942+3A>T

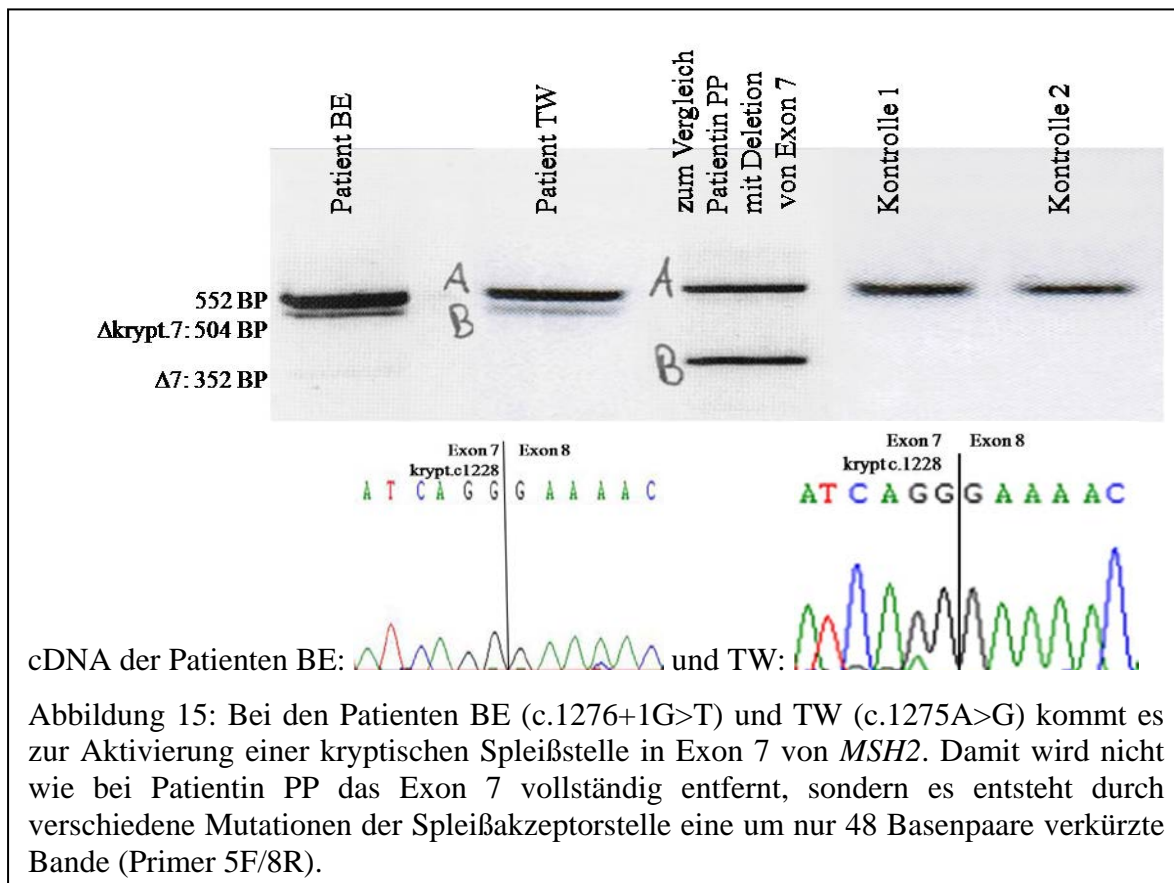
Darunter die Patientin RM, die eine Mutation im Intron 5 an der Stelle c.942+3A>T trägt. Es handelt sich dabei um eine zu 62% konservierte Stelle. Die Analyse mit den 2F und 6R Primern ergab im Gel zwei Banden gleicher Intensität (siehe Abb.14). Es handelt sich dabei um die Wildtyp-Bande und die durch *Exon-Skipping* von Exon 5 entstandene



Bande. Da aberrantes Spleißen von Exon 5 das entstehende Protein ohne Leserahmenverschiebung um 50 Aminosäuren verkürzt, findet kein Abbau der verkürzten RNA statt.

➤ ***MSH2* Exon 7: c.1275A>G; p.E425E**

Da der Patient TW die stille Mutation c.1275A>G; p.E425E an der vorletzten Base des Exons 7 von *MSH2* trägt, die eine zu 64% konservierte Speißstelle darstellt, wurde die cDNA mit in Exon 5F und 8R gelegenen Primern analysiert.



Im Gelbild (siehe Abb.15) konnten drei Banden unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. Durch Sequenzierung wurde die Identität dieser Banden geklärt. Die Bande mit der größten Intensität entsprach dem Wildtyp-cDNA-Fragment mit einer Länge von 552 Basenpaaren, in deren Sequenz das mutierte Allel fast nicht mehr nachweisbar war (<10%). Eine um 48 Basenpaare verkürzte Bande erschien im Gel mit ungefähr einem Drittel der Intensität im Vergleich zum Wildtyp. Die Entstehung dieser Bande ist auf die Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle bei *MSH2* in Exon 7 an Position c.1228 zurückzuführen. Der Leserahmen bleibt dabei erhalten. Eine dritte um 200 Basenpaare verkürzte Bande fand sich

im Gelbild mit Auslassung von Exon 7 (*Exon-Skipping*). Allerdings erschien diese dritte Bande im Vergleich zu den beiden anderen in geringer Intensität. Die komplette Auslassung von Exon 7 führt, im Gegensatz zum aberranten Spleißen an der kryptischen Spleißstelle, zu einem *frameshift*. Die geringe Intensität der um Exon 7 verkürzten Bande kann aufgrund eines NMD erklärt werden.

➤ ***MSH2* Intron 7: c.1276+1G>T**

Bei Patient BE, der Träger einer *MSH2*-Spleißmutation (c.1276+1G>T) an der ersten intronischen Position nach Exon 7 ist (Konservierung 100%), konnte eine vergleichbare Form des aberranten Spleißens im gleichen Exon mit drei Banden im Gelbild beobachtet werden (siehe Abb.15). Es kommt hier durch eine andere Mutation zur Aktivierung derselben kryptischen Spleißstelle an Position c.1228. Auch eine dritte schwache Bande entstand durch Auslassung von Exon 7 (*Exon-Skipping*) konnte nachgewiesen werden. Welcher Prozentsatz seiner RNA aberrant gespleißt wird, konnte aufgrund der intronischen Lage dieser Mutation nicht untersucht werden.

3.2.1.4. Stoppmutationen und Deletionen in *MSH2*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	potentielle Aminosäure-Veränderung	Expression	Diagnose
NH	A1	Kein Tumor		<i>MSH2</i> : Exon 2	Del Exon 2	p.G71Gfs X10 (Exon3)	≠kein NMD	27J RektumCa + CaecumCa
JW	A1	MSI	<i>MSH2</i>	<i>MSH2</i> : Exon 4	c.687delA	p.K229Kfs X17 (Exon4)	reduziert	36J CaecumCa
PP	A2	MSI	<i>MSH2</i> , <i>MSH6</i>	<i>MSH2</i> : Exon 7	Del Exon 7	p.R359Rfs X17 (Exon8)	≠kein NMD	47J synchrones ColonCa
PJ	A1			<i>MSH2</i> : Exon 7	c.1165C>T	p.R389X (Exon7)	reduziert	47J Polypen
DK	B			<i>MSH2</i> : Exon 7	c.1212T>A	p.C404X (Exon7)	reduziert	30J CaecumCa, 33J CervixCa, 39J UterusCa
TM	A1		<i>MSH2</i> , <i>MSH6</i>	<i>MSH2</i> : Exon 9	c.1408delG	p.V470X (Exon9)	→NMD	45J UterusCa
GE	B	MSI	<i>MSH2</i> , <i>MSH6</i>	<i>MSH2</i> : Exon 12	c.1861C>T	p.R621X (Exon12)	Stoppmutation ≠kein NMD	44J EndometriumCa, 47J ColonCa, 53J RektumCa

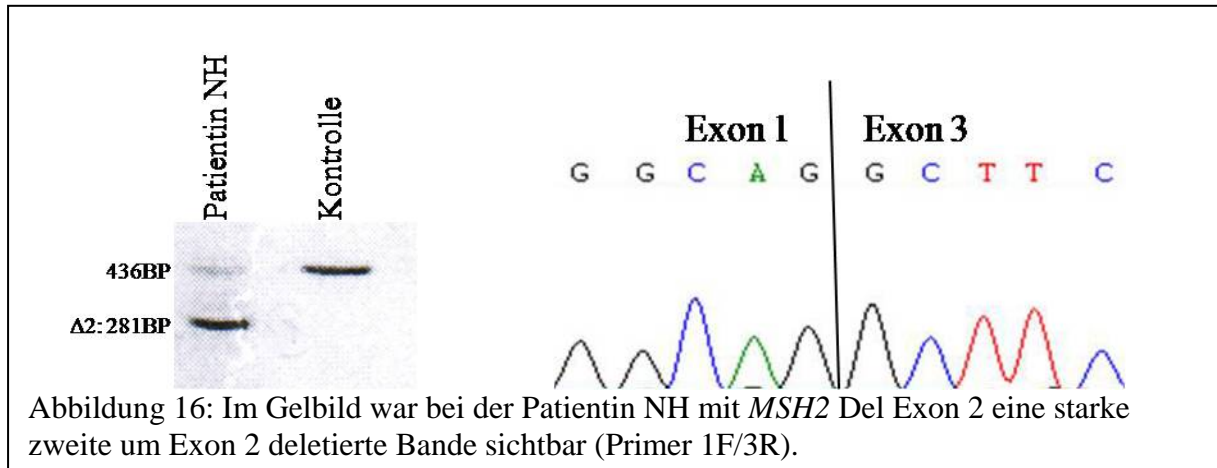
Tabelle 6: Patienten mit Mutationen in *MSH2*, die ein vorzeitiges Stoppcodon induzieren

(fs= *frameshift*; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

Bei den sieben aufgrund von Nonsense-Mutationen in *MSH2* untersuchten Patienten ist mit einem Abbau des betroffenen Allels zu rechnen:

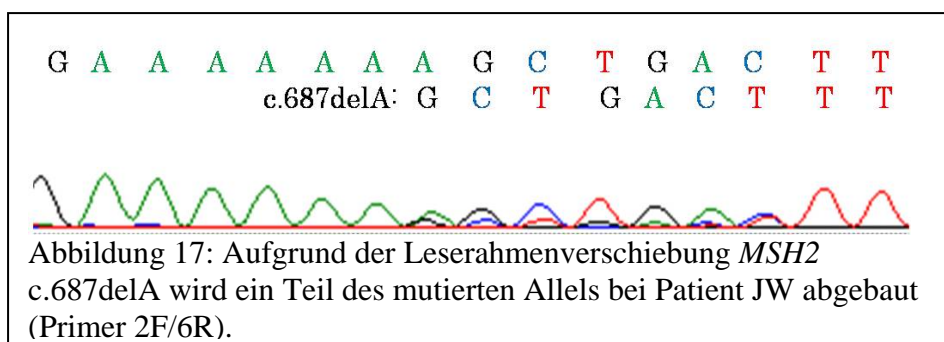
➤ ***MSH2* Del Exon 2; p.G71GfsX10**

Die Patientin NH mit einer Deletion von Exon 2 zeigte in der PCR mit 1F und 3R trotz Leserahmenverschiebung und Stopp nach 10 Basenpaaren keinen mRNA Abbau. Das mutierte Allel war mit starker Intensität exprimiert (siehe Abb.16).



➤ ***MSH2* Exon 4: c.687delA; p.K229KfsX17**

Patient JW, bei dem es durch die Deletion c.687delA in Exon 4 zu einer Leserahmenverschiebung und einem PTC nach 17 Basenpaaren kommt, wurde mit Hilfe des 2F und 6R Primers auf cDNA-Ebene analysiert. Dabei zeigte sich im Gel eine spezifische Bande von 417 Basenpaaren Länge, in deren Sequenzierung neben dem Wildtypallel auch eine reduzierte Expression des mutierten Allels nachzuweisen war (siehe Abb.17). Der Abbau durch NMD ist also in diesem Fall nicht vollständig, betrifft aber den Großteil des mutierten Allels.



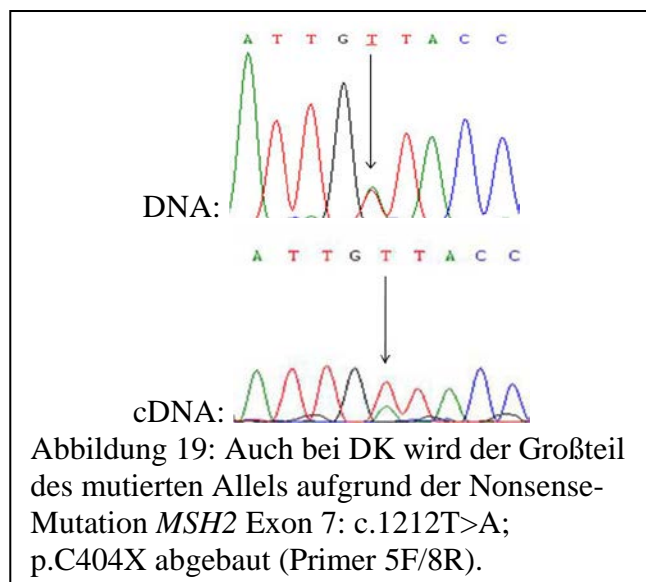
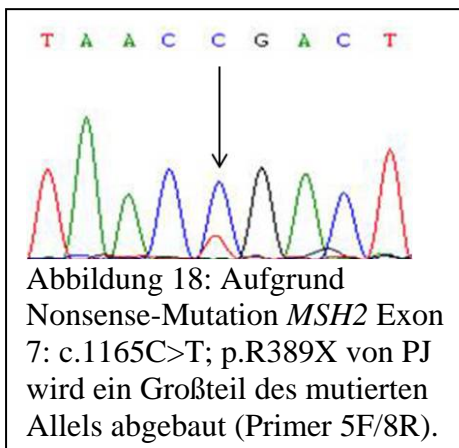
➤ ***MSH2* Del Exon 7; p.R359RfsX17**

Bei der Patientin PP mit einer Deletion von Exon 7 zeigte sich in der PCR mit 5F und 8R neben der Wildtypbande, die um 200 Basen verkürzte durch Deletion von Exon 7 entstandene Bande in ähnlicher Intensität (siehe Abb.13). Obwohl diese Deletion durch den *frameshift*

bereits nach 17 Aminosäuren ein Stoppcodon generiert, wird die RNA nicht abgebaut. Diese Mutation ist aufgrund des PTC auf Proteinebene pathogen.

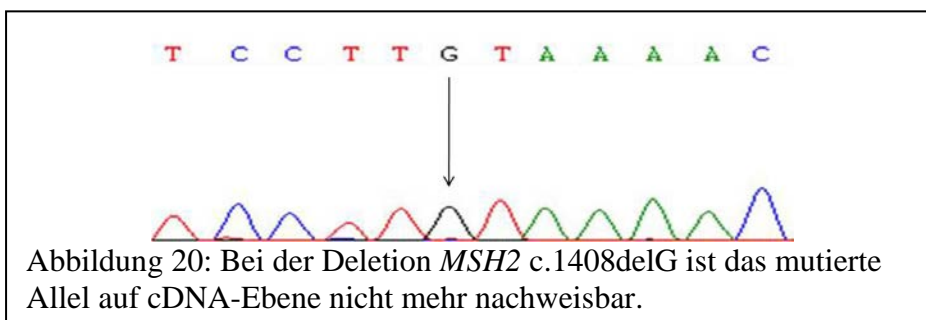
➤ ***MSH2* Exon 7: c.1165 C>T; p.R389X und c.1212T>A; p.C404X**

Die cDNAs der Patientinnen PJ und DK, die beide Stoppmutationen in Exon 7 tragen, nämlich c.1165 C>T; p.R389X (siehe Abb.18) und c.1212T>A; p.C404X (siehe Abb.19), zeigten in der Amplifikation und Sequenzierung mit den Primern 5F und 8R eine deutlich reduzierte Expression des mutierten *MSH2*-Allels von nur noch ca. 30 %. Damit ist für diese Sequenzveränderungen der beschriebene Pathomechanismus hauptsächlich ein *Nonsense-mediated-mRNA-decay* und nicht ein frühzeitiger Abbruch der Translation.



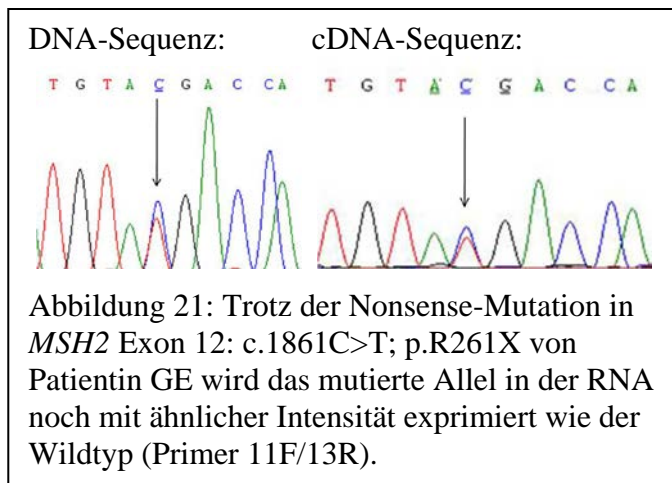
➤ ***MSH2* Exon 9: c.1408delG; p.V470X**

Durch die Deletion *MSH2* c.1408delG; p.V470X der Patientin TM wird ein vorzeitiges Stoppcodon generiert. In der PCR mit 7F und 11R ließ sich nur der Wildtyp monoallelisch amplifizieren (siehe Abb.20). Das mutierte Allel wird durch NMD komplett abgebaut.



➤ ***MSH2* Exon 12: c.1861C>T; p.R621X**

Bei Patientin GE mit der Nonsense-Mutation in Exon 12: c.1861C>T; p.R621X waren beide Allele in einer PCR von Exon 11F bis 13R mit ähnlicher Intensität in der Sequenz repräsentiert (siehe Abb.21). Neben dem Wildtyp waren keine weiteren Banden im Gelbild sichtbar. Es findet trotz des PTC in Exon 12 (von 16 Exons) kein NMD statt.



3.2.1.5. Spleißmutation in *MSH6*

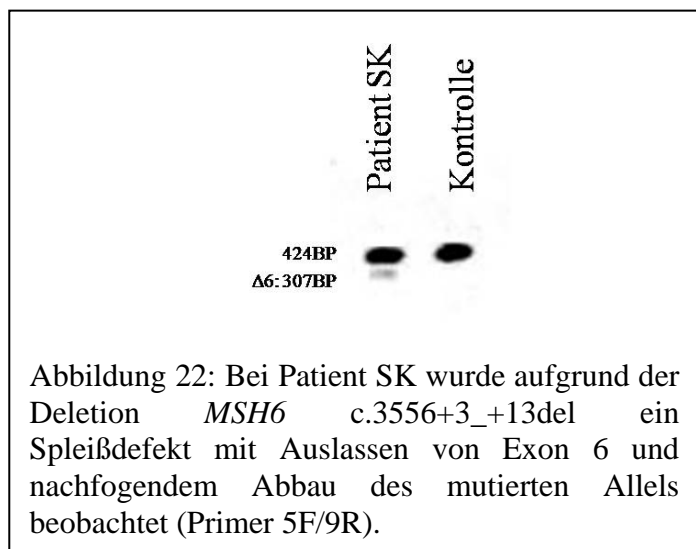
Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon/Intron	cDNA-Position	potentielle Aminosäure-Veränderung	Expression	Diagnose
SK	A2	MSI	MSH6	<i>MSH6</i> : Intron 6	c.3556+3_+13del		Spleißmutation ΔEx6: p.A1147VfsX9 →z.T. NMD	52J CaecumCa

Tabelle 7: Patienten mit Mutationen in *MSH6*, bei denen ein Spleißdefekt vorhergesagt wird

(fs= frameshift; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

➤ ***MSH6* Intron 6: c.3556+3_+13del**

In *MSH6* ist der Patient SK Träger einer Deletion von Teilen der Spleißdonorstelle: Exon 6 c.3556+3_+13del. Damit sind Basen betroffen, die eine Konservierung von bis zu 84% aufweisen. Da durch das Entfernen von Exon 6 eine Leserahmenverschiebung entsteht, wurde ein Abbau des betroffenen Allels erwartet. In der PCR mit 5F und 9R war neben dem Wildtypallel noch eine zweite um 118 Basenpaare verkürzte Bande nachweisbar mit ca. 50%-iger Intensität (siehe Abb.22). Sie entstand durch Skipping von Exon 6. Damit führt die Mutation zwar zu aberrantem Spleißen, es wird aber nur ein Teil der verkürzten RNA abgebaut.



3.2.2. Expression und Analyse der Spleißvarianten bei 26 Patienten mit unklarer Sequenzveränderung

26 Patienten mit heterozygoten Sequenzveränderungen unklarer Pathogenität (16 in *MLH1*, 2 in *MSH2*, 8 in *MSH6*) wurden nicht nur auf biallelische Expression, sondern auch auf die Möglichkeit eines veränderten Spleißverhaltens in diesem Exon und umliegenden Exons geprüft.

3.2.2.1. Biallelisch exprimierte unklare Sequenzveränderungen in *MLH1*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon/ Intron	cDNA-Position	Aminosäure	SNP	Expression	Diagnose
OK	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 2	c.159G>A	p.E53E		biallelisch	40J UterusCa 66J ColonCa
GK	A1	MSI		<i>MLH1</i> : Exon 3	c.238T>G	p.F80V		biallelisch	39J Polypen, Ratsuchender, da Verwandter 51J synchrones ColonCa
EA	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 12	c.1321G>A	p.A441T		biallelisch	54J ColonCa
CM	B	MSI	MLH1,PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 16	c.1851_1853 delGAA	p.K618del		biallelisch	41J+43J ColonCa
				<i>MSH2</i> : Intron 13	c.2211-6C>A			kein aberantes Spleißen	
ZR	B	MSI	MLH1,PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 16	c.1865T>C	p.L622P	P8	biallelisch	48J ColonCa
WA	A1	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 17	c.1918C>T	p.P640S	P19	biallelisch	47J OvarialCa, 63J SigmaCa
BC	B	MSI	MLH1,PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 17	c.1961C>T	p.P654L		biallelisch	47J MagenCa
MG	A1	MSI	MLH1,PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 17	c.1961C>T	p.P654L		biallelisch	43J ColonCa
				<i>MLH1</i> : Intron 13	c.1558+27G>A			kein aberrantes Spleißen	
WR	B	kein Tumor		<i>MLH1</i> : Exon 18	c.2030G>A	p.S677N		biallelisch	41J RektumCa
PA	B	MSI	MLH1,PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 18	c.2041G>A	p.A681T		biallelisch	37J CaecumCa
				<i>MLH1</i> : Intron 9	c.790+10A>G			kein aberrantes Spleißen	
SL	A1	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 18	c.2041G>A	p.A681T		biallelisch	54J synchrones ColonCa

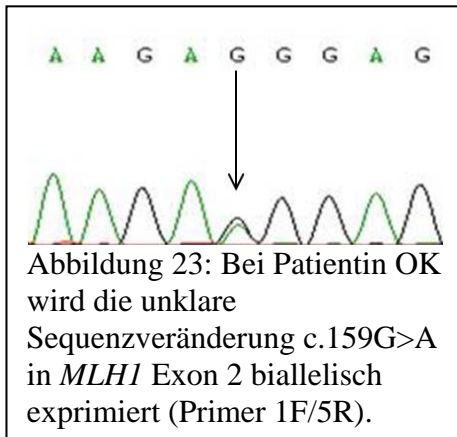
Tabelle 8: Patienten mit biallelisch exprimierter unklarer Sequenzveränderung in *MLH1*

(Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

(P8: *MLH1* Exon 8: c.655A>G; p.I219V; P19: *MLH1* Exon 19: c.2146G>A; p.V716M: nicht pathogene Sequenzvarianten)

Von den 16 Patienten mit unklaren Veränderungen in *MLH1* zeigten 11 weder ein auffälliges Spleißverhalten noch konnte eine monoallelische Expression festgestellt werden.

➤ ***MLH1* Exon 2: c.159G>A; p.E53E und Exon 3: c.238T>G; p.F80V**



Das waren im Einzelnen die Patienten OK und GK, deren cDNA mit dem 1F und 5R Primer amplifiziert wurde. Die jeweilige Bande im Gel war spezifisch ohne zusätzliche Banden anderer Spleißprodukte und sowohl die Sequenzveränderung in *MLH1* Exon 2: c.159G>A; p.E53E (siehe Abb.23) als auch die in Exon 3: c.238T>G; p.F80V werden biallelisch mit gleicher Intensität exprimiert.

➤ ***MLH1* Exon 12: c.1321G>A; p.A441T**

Exon 12 von Patientin EA mit der unklaren *MLH1*-Missense-Mutation c.1321G>A; p.A441T war in der PCR mit den in Exon 11F und 14R gelegenen Primern ohne aberrante Spleißprodukte amplifizierbar und zeigte eine biallelische Expression. Die schwache zweite Bande im Gel entsprach dem alternativen Spleißen von Exon 12, das auch in gesunden Kontrollen auftritt.

➤ ***MLH1* Exon 16: c.1851_53del GAA; p.K618del und
MSH2 Intron 13: c.2211-6C>A**

Bei Patientin CM lagen zwei Veränderungen unklarer Pathogenität vor. Die Deletion in *MLH1* Exon 16: c.1851_53del GAA; p.K618del führt, wie sich mit Hilfe einer PCR zwischen Exon 13F und 17R und Sequenzierung des Fragments mit 16F und 17R zeigte, zu keinem aberranten Spleißen und wird biallelisch exprimiert. Eine zweite in *MSH2* Intron13: c.2211-6C>A gelegene Variante zeigte ebenfalls keine Veränderungen im Spleißverhalten, untersucht an einem Fragment von Exon 13F bis 16R. Aufgrund der intronischen Lage der Sequenzveränderung und fehlender SNPs in *MSH2* konnte eine biallelische Expression nicht untersucht werden. Da aberrantes Spleißen von Exon 14 zu einer out-of-frame-Deletion führen würde, kann eine durch diese Veränderung induzierte Pathogenität nicht vollständig ausgeschlossen werden.

➤ ***MLHI* Exon 16: c.1865T>C; p.L622P**

Patientin ZR zeigte sowohl in der Missense-Mutation unklarer Pathogenität in *MLHI* Exon 16: c.1865T>C; p.L622P mit den Primern 13F und 17R als auch im bekannten Polymorphismus in Exon 8 eine biallelische Expression und nur eine spezifische Wildtyp-Bande.

➤ ***MLHI* Exon 17: c.1918C>T; p.P640S, Exon 17: c.1961C>T; p.P654L,
Exon 18: c.2030G>A; p.S677N und Intron 13 c.1558+27G>A**

Die Patienten WA, BC, MG und WR wurden mit Primern in *MLHI* Exon 16F und 19R untersucht. Dabei zeigten sowohl WA mit Exon 17: c.1918C>T; p.P640S als auch BC und MG mit Exon 17: c.1961C>T; p.P654L als auch WR mit Exon 18: c.2030G>A; p.S677N eine spezifische Amplifikation und biallelische Expression. Bei WA wurde zusätzlich eine biallelische Expression des SNP in Exon 19 nachgewiesen. Die zusätzliche intronische Veränderung c.1558+27G>A in *MLHI* bei MG verursachte in der Amplifikation mit Primern 11F und 14R kein verändertes Spleißverhalten.

➤ ***MLHI* Exon 18: c.2041G>A; p.A681T und Intron 9 c.790+10A>G**

Bei den Patientin PA und SL zeigte die PCR mit 16F und R19 zur Untersuchung der Auswirkung von *MLHI* Exon 18: c.2041G>A; p.A681T eine biallelische Expression. Auch die PCR mit 8Fn und 12Rn zur Untersuchung der unklaren Veränderung c.790+10A>G im Intron 9 von PA war spezifisch. Ein vollständiger Abbau des *MLHI* Allels konnte aufgrund der biallelischen Expression der Missense-Mutation in Exon 18 ausgeschlossen werden.

Ausgeschlossen wurde mit diesen Untersuchungen nur ein verändertes Spleißverhalten und monoallelische Expression, die auch unabhängig von der Sequenzveränderung als Pathomechanismus auftreten kann. Die Pathogenität dieser biallelisch exprimierten heterozygoten Sequenzveränderungen für die Funktion des Proteins bleibt weiterhin unklar.

3.2.2.2. Monoallelisch oder stark reduziert exprimierte unklare Sequenzveränderungen in *MLH1*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	Aminosäure	SNP	Expression	Diagnose
FU	A1	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 10	c.793C>T	p.R265C	P8	stark reduziert	46J ColonCa
SM	A1	MSI	MLH1,PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 10	c.793C>T	p.R265C	P8	stark reduziert	42J ColonCa
DI	A1	MSI	MLH1,PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 2	c.191A>G	p.N64S		biallelisch (A-Allel reduziert)	47J CaecumCa
				<i>MLH1</i> : Exon 11	c.986A>C	p.H329P		Spleißmutation Δ10-11:schwach:ooof z.T. NMD	
WC	A1	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 11	c.986A>C	p.H329P		Spleißmutation Δ10-11:schwach:ooof z.T. NMD	32J SigmaCa, 60J ColonCa
HJ	A1		MLH1,MSH2	<i>MLH1</i> : Exon 17	c.1984A>C (6. letzte Base im Exon 17)	p.T662P		Spleißmutation Wildtyp reduziert; Δ17:verstärkt: if	Ratsuchende, da Mutter 47J SigmaCa

Tabelle 9: Patienten mit monoallelisch oder stark reduziert exprimierter unklarer Sequenzveränderung in *MLH1*

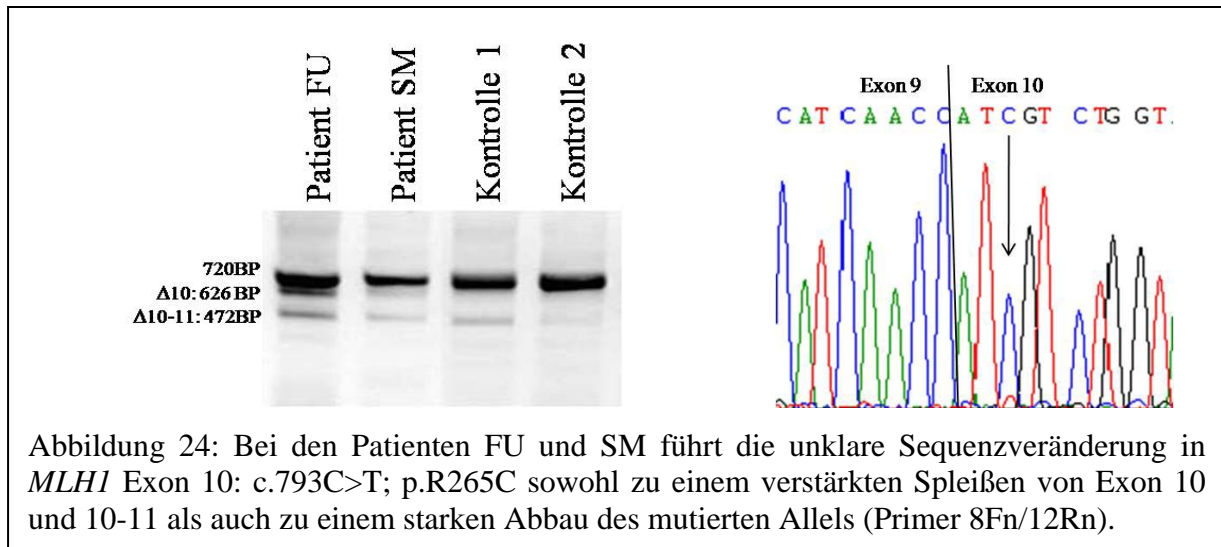
(if=*in frame*; ooof=*out of frame*; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

(P8: *MLH1* Exon 8: c.655A>G; p.I219V: nicht pathogene Sequenzvariante)

Eine deutlich reduzierte Expression des Wildtypallels von *MLH1* wurde hingegen bei fünf Patienten, die Träger von drei unterschiedlichen Sequenzveränderungen waren, vorgefunden:

➤ ***MLH1* Exon 10: c.793C>T; p.R265C**

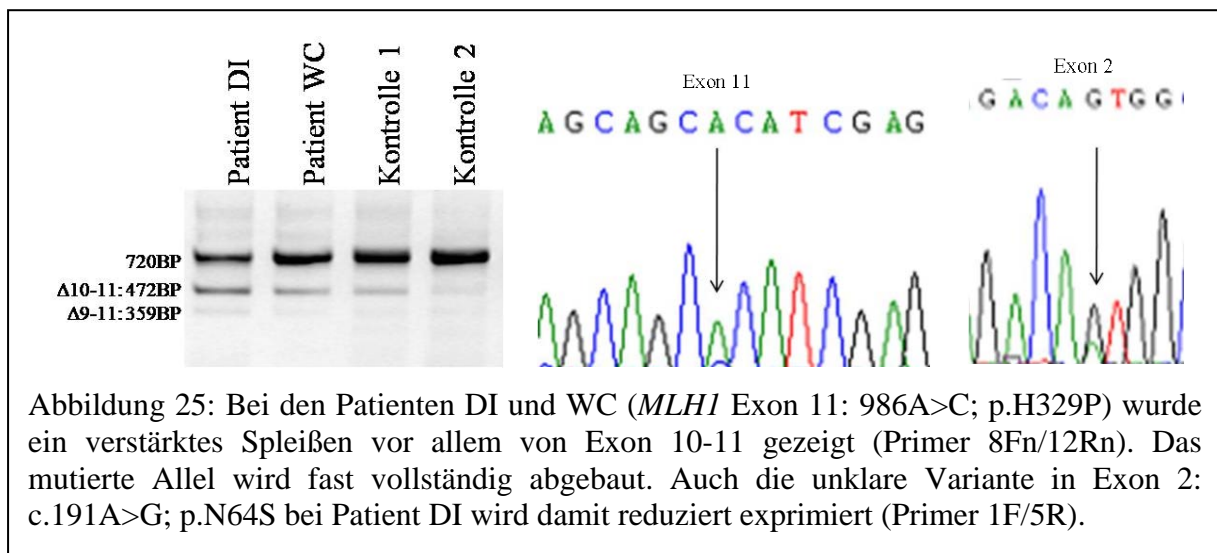
Die cDNA der Patienten FU und SM mit *MLH1* Exon 10: c.793C>T; p.R265C, einer Sequenzveränderung, die sich an dritter Stelle im Exon 10 befindet und keine Spleißstellenkonservierung aufweist, wurde mit den Primern 8Fn und 12Rn amplifiziert. Das Gelbild zeigte bis auf das leicht verstärkte Spleißen von Exon 10 (*out of frame*) und Exon 10 bis 11 (*out of frame*) keine Auffälligkeiten. Aber in der Sequenzierung des gel-extrahierten Wildtypfragments erschien das mutierte T-Allel im Vergleich zum Wildtyp-C deutlich reduziert (nur ca. 10% Restintensität) (siehe Abb.24). Auch der SNP in Exon 8 zeigte eine fast monoallelische Expression des G-Allels bei FU und des T-Allels bei SM. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die beschriebene Mutation zu einem fast vollständigen Abbau des betroffenen Allels führt und damit pathogen ist. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein durch die Mutation hervorgerufenes aberrantes Spleißen mit Verlust von Exon 10, der zur Verschiebung des Leserahmens durch das Fehlen von 94 Basenpaaren und dadurch zum nahezu vollständigen Abbau durch den NMD führt.



➤ ***MLH1* Exon 11: 986A>C; p.H329P** (und Exon 2: c.191A>G; p.N64S)

Patient DI ist Träger zweier Missense-Mutationen unklarer Pathogenität in *MLH1*. Auf einem *MLH1*-Allel war die Mutation in Exon 2: c.191A>G; p.N64S und auf dem anderen Allel die Mutation in Exon 11: c.986A>C; p.H329P nachgewiesen worden. Exon 2: c.191A>G; p.N64S wurde, wie in einer PCR mit dem 1F und 5R Primern gezeigt, biallelisch und ohne Zusatzbanden exprimiert. Allerdings war das Wildtyp A-Allel auf eine Intensität von ca. 50% reduziert, damit liegt ein ca. 50%-iger NMD des Allels vor. Die Ursache hierfür stellte die Missense-Mutation in Exon 11 dar: In der PCR mit 8Fn und 12Rn zur Untersuchung der Veränderung in Exon 11: c.986A>C; p.H329P zeigte sich, obwohl die Sequenzveränderung mehr als 50 Basenpaare von den beiden benachbarten Exon-Intron-Grenzen entfernt liegt, ein verändertes Spleißverhalten. Neben dem Wildtypfragment (720 Basenpaare) erschienen im Gel eine zweite um 248 Basenpaare verkürzte Bande mit einer im Vergleich zu gesunden Kontrollen verstärkten Intensität und eine dritte um 361 Basenpaare verkürzte Bande, aber mit deutlich geringerer Intensität (siehe Abb.25). Die Sequenzierung zeigte im Wildtypfragment eine monoallelische Expression des Wildtyp A-Allels. Das mutierte Allel wird in Exon 11 vollständig aberrant gespleißt. In der zweiten Bande fehlt nicht nur, wie erwartet, das die Mutation tragende Exon 11 (*out of frame*), sondern es lag eine um Exon 10 und 11 (*out of frame*) verkürzte cDNA vor. Obwohl es durch das Entfernen der zwei Exons zu einer Leserahmenverschiebung kommt, wird die verkürzte RNA nur unvollständig durch NMD abgebaut. Es muss davon ausgegangen werden, dass ein solches Protein seine Aufgabe in der DNA-Reparatur nicht erfüllen kann. Auch ein unter Umständen zusätzlich vorliegendes *Exon-Skipping* von Exon 11 führt zu einer Leserahmenverschiebung, und wäre damit aufgrund des NMD am Gelbild als zusätzliche Bande nicht nachweisbar. Die dritte schwache Bande wurde

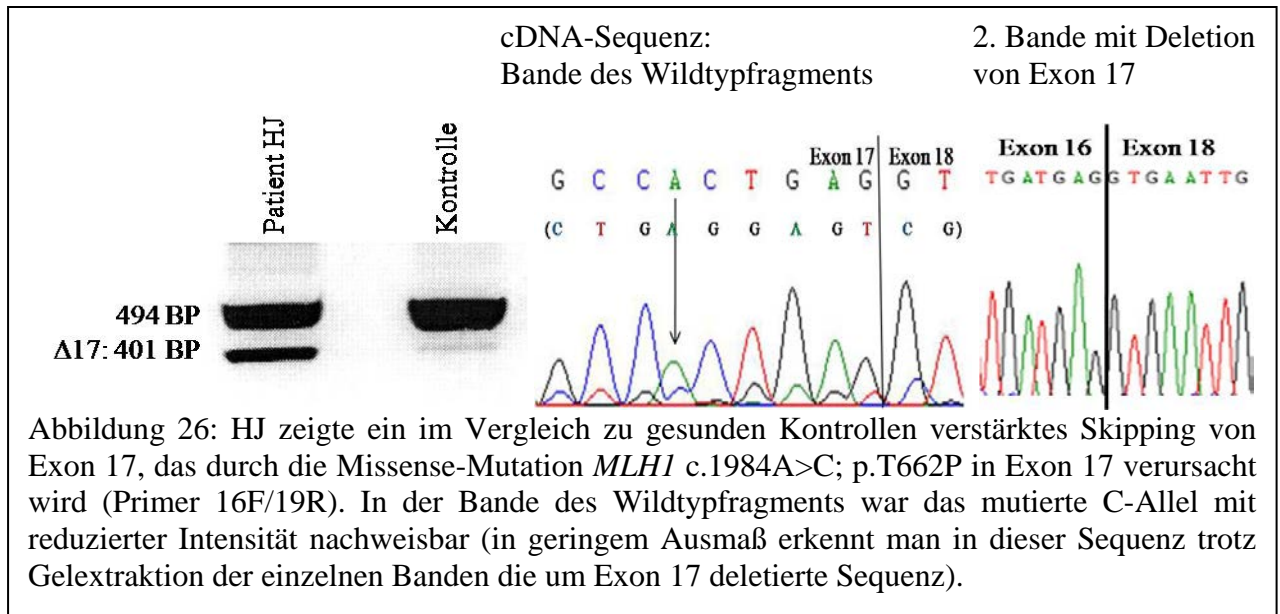
als ein alternatives Spleißen von Exon 9 bis 11 (*out of frame*) identifiziert. Ein alternatives Spleißen dieses Fragments wurde in ähnlicher Intensität aber auch bei gesunden Kontrollen beobachtet, es handelt sich hier also um eine physiologische Form alternativen Spleißverhaltens. Die reduzierte Expression des Wildtyp A-Allels in der Missense-Mutation in Exon 2 entstand durch einen unvollständigen Abbau des Allels aufgrund der Mutation in Exon 11, die das normale Spleißen von Exon 11 vollständig verhindert.



Genauso war auch Patient WC Träger derselben Mutation in Exon 11. Auch bei ihm war in der PCR ein verstärktes *Exon-Skipping* von Exon 10 bis 11 zu beobachten, die Sequenzierung zeigte eine monoallelische Expression des Wildtyp A-Allels in c.986.

➤ ***MLH1* Exon 17: c.1984A>C; p.T662P**

Patientin HJ trägt eine Mutation in der 6. Base vor dem Exonende von Exon 17: c.1984A>C; p.T662P. Für diese Position liegt keine Spleißstellenkonservierung vor (siehe Abb.3). Ihre cDNA wurden mit Hilfe des 16F und 19R Primers amplifiziert. Dabei zeigte sich neben dem Wildtypfragment eine starke zweite Bande im Gel, die aufgrund aberranten Spleißens von Exon 17 entsteht (siehe Abb.26). Durch Fehlen von Exon 17 würde ein um 31 Aminosäuren verkürztes Protein ohne Leserahmenverschiebung entstehen. Die Sequenzierung der Wildtypbande ergab ein auf ca. 30% reduziertes Vorliegen des mutierten C-Allels. Zur Bewertung des Ausmaßes physiologischen alternativen Spleißens von Exon 17 wurden die PCR von HJ parallel mit 10 gesunden Kontrollen durchgeführt. Bei den Kontrollen ließ sich alternatives Spleißen von Exon 17 beobachten, aber in viel geringerem Ausmaß als bei der Patientin. Damit handelt es sich bei der Missense-Mutation c.1984A>C um eine Sequenzveränderung, die das alternative Spleißen von Exon 17 extrem verstärkt.



3.2.2.3. Biallelisch exprimierte unklare Sequenzveränderungen in *MSH2*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	Aminosäure	SNP	Expression	Long Range-PCR	Diagnose
LR	B		MSH2,MSH6	<i>MSH2</i> : Exon 6	c.998G>A	p.C333Y		biallelisch	<i>MSH6</i> * oB	52J ColonCa
LJ	A2	MSI		<i>MSH2</i> : Exon 12	c.1986G>C	p.Q662H		biallelisch		76J UrothelCa

Tabelle 10: Patienten mit unklarer Sequenzveränderung in *MSH2*

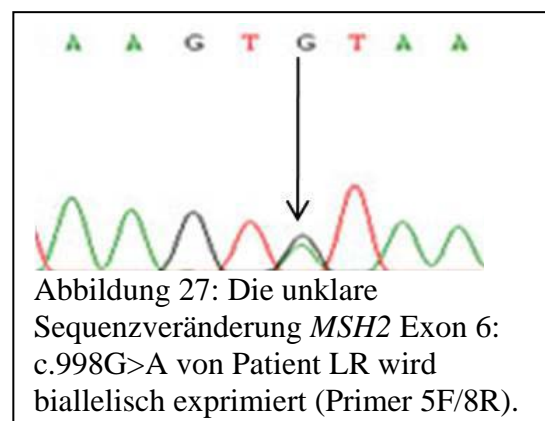
(oB=ohne pathologischen Befund; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

(Die *MSH6**-Long Range-PCR wurde in zwei Fragmenten durchgeführt, von Exon 1 bis 4 und von Exon 4 bis 10.)

In *MSH2* wurden zwei Patienten mit unklaren Sequenzveränderungen untersucht. Bei ihnen ergaben sich auf cDNA-Ebene keine Hinweise auf Pathogenität.

➤ *MSH2* Exon 6: c.998G>A; p.C333Y

Die in *MSH2* Exon 6 gelegene Missense-Mutation c.998G>A; p.C333Y bei Patient LR konnte mit den Primern in Exon 5F und 8R spezifisch ohne Hinweis auf aberrantes Spleißen amplifiziert werden. Die Sequenzierung zeigte eine biallelische Expression (siehe Abb.27).



➤ *MSH2* Exon 12: c.1986G>C; p.Q662H

Die Missense-Mutation in *MSH2* Exon 12: c.1986G>C; p.Q662H bei Patient LJ wurde mit den Primern 11F und 13R amplifiziert und anschließend sequenziert. Weder aberrantes Spleißen noch eine reduzierte Expression des mutierten Allels in der Sequenz konnten detektiert werden.

3.2.2.4. Biallelisch exprimierte unklare Sequenzveränderungen in *MSH6*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhisto-chemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	Aminosäure	SNP	Expression	Long Range-PCR	Diagnose
BI	B	MSI	MSH6	<i>MSH6</i> : 5'-UTR	c.1-159C>T c.1-448G>A		P3 in <i>MSH6</i>	biallelisch		55J SigmaCa
KL	B	MSS	n.a.	<i>MSH6</i> : 5'-UTR	c.1-18G>T		P1 in <i>MSH6</i>	biallelisch		45J CervixCa, 34J Rektumadenom, 44J Sigmaadenom, 45J UterusCa
SR	A1	MSI	MSH2	<i>MSH6</i> : Exon 2	c.276A>G	p.P92P		biallelisch	<i>MSH2</i> oB	39J ColonCa
WI	B	MSI	MSH2,MSH6	<i>MSH6</i> : Exon 2	c.276A>G	p.P92P	P4 in <i>MSH6</i>	biallelisch	<i>MSH2</i> oB	26J CaecumCa
PS	A1	MSI-L		<i>MSH6</i> : Exon 4	c.2633T>C	p.V878A		biallelisch		56J RektumCa
SU	A2	MSI	MSH2,MSH6	<i>MSH6</i> : Exon 4	c.3037delAA G	p.K1013d el		biallelisch		38J Sigma-/RektumCa
SY	B	MSI-L	MLH1,MSH6	<i>MSH6</i> : Exon 5	c.3306T>A	p.T1102T		biallelisch	<i>MLH1</i> oB	46J RektumCa
BG	B	MSI	MLH1,MSH6	<i>MSH6</i> : Exon 5	c.3306T>A	p.T1102T		biallelisch	<i>MLH1</i> oB	70J MagenCa

Tabelle 11: Patienten mit unklarer Sequenzveränderung in *MSH6*

(n.a.=nicht auswertbar; oB=ohne pathologischen Befund; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

(P3 in *MSH6*: *MSH6* Exon 3: c.540T>C; p.D180D; P1 in *MSH6*: *MSH6* Exon 1: c.116G>A; p.G39E;

P4 in *MSH6*: *MSH6*: Exon 4: c.642C>T; p.Y214Y: nicht pathogene Sequenzvarianten)

Bei acht Patienten haben die in *MSH6* gelegenen unklaren Sequenzveränderungen keinen Einfluss auf die Transkription und das Spleißverhalten der RNA.

Im Einzelnen waren es folgende Patienten:

➤ *MSH6* c.1-159C>T und c.1-448G>A

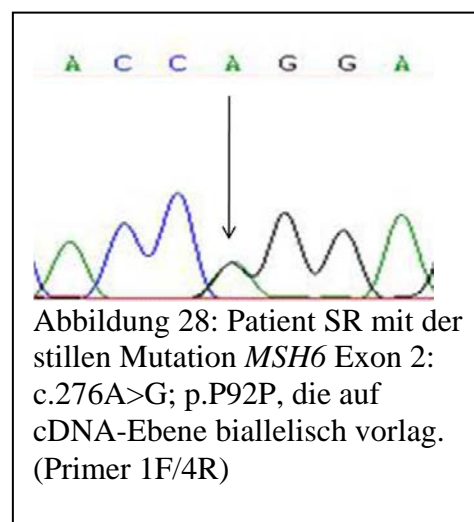
Der Patient BI wurde aufgrund eines immunhistochemischen Ausfalls von *MSH6* die biallelische Expression des Polymorphismus in Exon 3: c.540T>C; p.D180D überprüft. Diese konnte bestätigt werden, damit sind auch die unklaren Sequenzveränderungen im Promotorbereich von *MSH6*: c.1-159C>T und c.1-448G>A nicht pathogen, da sie die Transkription nicht beeinträchtigen.

➤ ***MSH6* c.1-18G>T**

Patientin KL hatte eine unklare Sequenzveränderung im 5'-UTR von *MSH6* bei c.1-18G>T, die eine Promotormutation aufgrund einer mutierten Transkriptionsfaktorbindestelle darstellen könnte. Sie wurde mit den Primern im 5'-UTR und Exon 2 analysiert, dabei konnte zusätzlich der SNP in *MSH6* Exon 1 c.116G>A; p.G39E ausgewertet werden, der biallelisch exprimiert war. Die Sequenzveränderung im 5'-UTR von *MSH6* verändert somit nicht die Transkription des Allels.

➤ ***MSH6* Exon 2: c.276A>G; p.P92P**

Die cDNA der Patienten SR und WI wurde mit in Exon 1 und 4 gelegenen Primern untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die stille Mutation in Exon 2: c.276A>G; p.P92P biallelisch exprimiert wird. Der vorliegende immunhistochemische Ausfall des *MSH2*-Gens konnte aufgrund von fehlenden codierenden Sequenzveränderungen dieses Gens bei beiden Patienten nicht auf biallelische Expression der cDNA untersucht werden. Eine von *MSH2* durchgeführte *Long Range-PCR* zeigte kein aberrantes Spleißen.



➤ ***MSH6* Exon 4: c.2633T>C; p.V878A und c.3037delAAG; p.K1013del**

Die Patienten PS und SU mit Sequenzveränderungen in *MSH6* Exon 4 wurden mit den 4if und 5R Primern für c.2633T>C; p.V878A und den 4jF und 5R Primern für c.3037delAAG; p.K1013del untersucht. Beide Patienten zeigten im Gel eine spezifische Bande, die durch biallelische Expression beider Allele zustande kam. So kann wegen der beobachteten biallelischen Expression aberrantes Spleißen ausgeschlossen werden. Die genannten Mutationen führen nicht zum vollständigen Abbau des betroffenen Allels. Die Pathogenität der Missense-Mutationen und der Deletion einer Aminosäure auf Proteinebene bleibt weiterhin unklar.

➤ ***MSH6* Exon 5: c.3306T>A; p.T1102T**

Die cDNA der zwei Patienten SY und BG mit einer stillen Mutation in *MSH6* Exon 5: c.3306T>A; p.T1102T (siehe

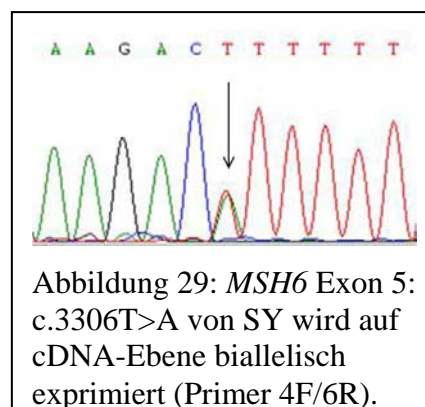


Abb.29) wurde mit den Primern 4F und 6R amplifiziert. Die Sequenzveränderung wurde biallelisch exprimiert, es lag kein aberrantes Spleißen vor. Damit hat die stille Mutation keinen Einfluss auf die korrekte Transkription des Allels. Sie kann aufgrund dieser Ergebnisse als nicht-pathogen eingestuft.

3.2.3. Expression bei 16 Patienten mit Polymorphismus

Die Überprüfung auf biallelische Expression der MMR-Gene auf cDNA-Ebene wurde in 16 Patienten mit heterozygotem Polymorphismus und immunhistochemischem Ausfall im entsprechenden Gen durchgeführt.

3.2.3.1. Biallelische Expression des p.I219V SNP in *MLH1*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhistochemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	Aminosäure	Expression	LongRange PCR	Diagnose
MS	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	biallelisch		42J ColonCa
OF	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	biallelisch		17J ColonCa
DA	A1	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	biallelisch		67J ColonCa
TG	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	biallelisch	<i>MLH1</i> oB	47J ColonCa
SE	A1	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	biallelisch	<i>MLH1</i> oB	77J ColonCa
AO	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	biallelisch	<i>MLH1</i> oB	Z.n.Hemikolektomie Jejunumsegmentresektion
KS	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	biallelisch		70J Synchrones ColonCa
LA	B	MSI	MLH1,PMS2	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	biallelisch	<i>MLH1</i> oB	64J SigmaCa

Tabelle 12: Patienten mit biallelischer Expression des p.I219V Polymorphismus in *MLH1*

(oB=ohne pathologischen Befund; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren; Z.n.=Zustand nach)

Elf Patienten mit immunhistochemischem Ausfall von MLH1 waren Träger des heterozygoten Polymorphismus in Exon 8: c.655A>G; p.I219V. Die PCR auf cDNA-Ebene wurde mit Primern am Exon-Übergang zwischen Exon 7/8F und 8/9R durchgeführt. Alternatives Spleißen kann hiermit nicht überprüft werden. Im Gelbild erschien bei allen Patienten nur eine einzelne spezifische Bande. Die Sequenzierung zeigte in der cDNA von acht Patienten eine biallelische Expression im beschriebenen Polymorphismus. Damit wurde die Transkription beider Allele für diese acht Patienten bestätigt, und Promotordefekte sowie ein defekt-vermittelter RNA-Abbau (NMD: *Nonsense-mediated RNA-decay*) ausgeschlossen.

Zusätzlich wurde bei den Patienten TG, SE, LA und AO, da sie keine *BRAF*-Mutation tragen, die typisch für eine sporadische Tumorentstehung ist, eine *Long Range*-PCR von *MLH1* durchgeführt, um Spleißveränderungen zu überprüfen, die ggf. von tiefen intronischen Sequenzveränderungen verursacht werden könnten. Die *Long Range*-PCR der gesamten *MLH1*-cDNA war bei allen unauffällig.

3.2.3.2. Monoallelische Expression des p.I219V SNP in *MLH1*

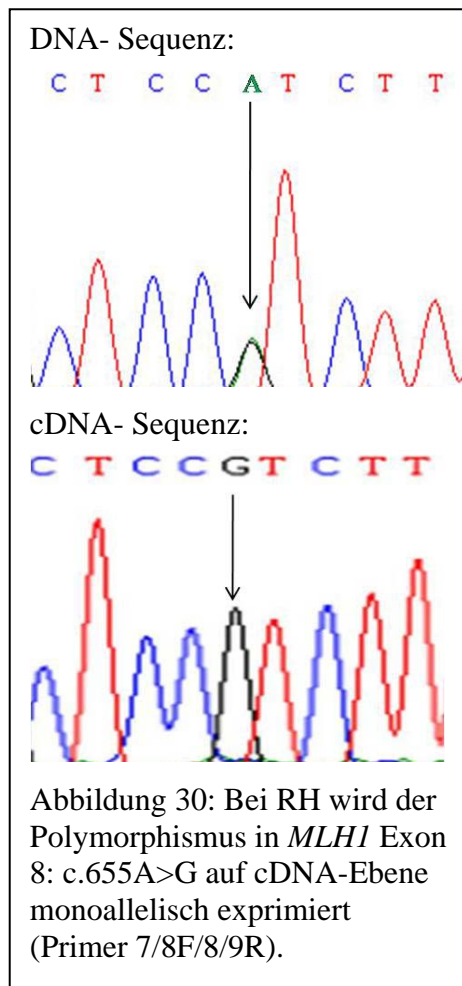
Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhistochemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	Aminosäure	Expression	<i>LongRange</i> PCR	Diagnose
MK	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	monoallelisch	<i>MLH1</i> oB	38J MagenCa, 51J RektumCa
RH	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	monoallelisch	<i>MLH1</i> oB	44J ColonCa
BO	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 8	c.655A>G	p.I219V	monoallelisch		35J AdenoCa 42,48J gutartiger Hauttumor 49J Talgdrüsen adenom

Tabelle 13: Patienten mit monoallelischer Expression des p.I219V Polymorphismus in *MLH1*

(oB=ohne pathologischen Befund; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

Drei der elf Patienten zeigten eine monoallelische Expression eines Allels im heterozygoten SNP c.655A>G; p.I219V, die sich nicht durch eine Sequenzveränderung im kodierenden Bereich erklären lässt, sondern durch andere Pathomechanismen verursacht wird. Mögliche Erklärungen sind die transkriptionelle Stilllegung eines Allels, aberrantes Spleißen, ein Abbau der mRNA durch NMD, genomische Rearrangements wie chromosomale Inversionen und Translokationen sowie weitere, bislang unbekannte Mechanismen.

Bei RH wurde eine monoallelische Expression des G-Allels festgestellt (siehe Abb.30). Es muss davon ausgegangen werden, dass das A-Allel durch einen unbekanntem Pathomechanismus ausgeschaltet wird. Da eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch aberrantes Spleißen von Exon 8 die cDNA des betroffenen A-Allels mit den verwendeten Primern nicht mehr amplifizierbar war, wurden auch größere Fragmente untersucht. Dazu wurden PCRs mit Primern in Exon 3 und 9 und eine *Long Range*-PCR zur Amplifikation des gesamten *MLH1*-Gens mit den Primern von Exon 1 und 19 durchgeführt. Beide PCRs zeigten im Gel spezifisch das Wildtypfragment ohne zweite Bande. Auch hier war das G-Allel monoallelisch exprimiert. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass das komplette A-Allel auf cDNA-Ebene nicht vorhanden ist. Um auszuschließen, dass Basenveränderungen, die evtl. nur in einem Mosaik, also einem geringen Anteil der Blutzellen vorliegen, im Mutationsscreening übersehen wurden, erfolgte die Sequenzierung der genomischen DNA aller Exons von *MLH1*. Auch hierbei konnte kein Hinweis auf die mögliche Ursache für das vollständige Fehlen des einen Allels gefunden werden. Die Analyse des Promotors zeigte keine Mutation oder Methylierung. Zudem wurden größere Deletionen im Gen und Promotor ausgeschlossen. Der zu Grunde liegende Pathomechanismus konnte also mit den gängigen Untersuchungsmethoden nicht erklärt werden. Aufgrund des heterozygoten Polymorphismus konnte jedoch den vier Kindern des Patienten RH -auch ohne den ursächlichen Gendefekt zu kennen- eine prädiktive Diagnostik in Form einer Segregationsanalyse angeboten werden. In der Segregationsanalyse wird geprüft ob seine Kinder das pathogene Allel geerbt haben. Die Mutter war homozygot für das A-Allel in Position c.655, damit müssen die zwei Kinder, die genomisch homozygot A sind, auch das pathogene A-Allel vom Vater geerbt haben.



	Vater	A	G
Mutter		AA	AG
A		AA	AG
A		AA	AG

Diesen Kindern mit pathogenem Allel wurde ein intensiviertes Vorsorgeprogramm gemäß den HNPCC-Richtlinien angeraten. Dagegen wurde den anderen zwei Kindern, die heterozygot im Polymorphismus c.655A>G sind und das funktionelle Allel geerbt haben, eine Risikoreduktion für Tumorentstehung auf Normalbevölkerungsniveau mitgeteilt. Diese zwei Kinder mit funktionellem Allel, die im SNP heterozygot waren, zeigten auf cDNA-Ebene, wie zu erwarten, eine biallelische Expression.

Die Patienten BO und MK, die ebenfalls eine monoallelische Expression in *MLH1* aufwiesen, zeigten eine vollständige Methylierung eines Allels in allen untersuchten CpG-Dinukleotiden des *MLH1*-Promotors, die zu einer transkriptionellen Stilllegung des Allels führt und funktionell einer Keimbahnmutation entspricht. Für diese Patienten war die Ursache der monoallelischen Expression somit geklärt.

3.2.3.3. Weitere SNPs in *MLH1*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhistochemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	Aminosäure	Expression	Diagnose
BB	A1	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 17	c.1959G>T	p.L653L	biallelisch	44J ColonCa
HB	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> : Exon 19	c.2146G>A	p.V716M	biallelisch	37J ColonCa
VU	A1			<i>MLH1</i> : Exon 19	c.2146G>A	p.V716M	biallelisch	Adenome

Tabelle 14: Patienten mit weiteren Polymorphismen in *MLH1*

(Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

Bei drei weiteren Patienten mit immunhistochemischem Ausfall von MLH1 wurde die cDNA von Exon 16 bis 19 in einer PCR mit den entsprechenden Primern amplifiziert und sequenziert. So konnte gezeigt werden, dass diese drei Patienten auch auf cDNA-Ebene in ihren SNPs (c.1959G>T; p.L653L in Exon 17 bzw. c. 2146G>A; p.V716M in Exon 19) biallelisch exprimiert waren. Ein vollständiges Fehlen eines Allels kann damit ausgeschlossen werden, ebenso wurde kein aberrantes Spleißen detektiert.

3.2.3.4. SNPs in *MSH2*

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhistochemische Ausfälle	Gen und Exon	cDNA-Position	Aminosäure	Expression	LongRange PCR	Diagnose
GS	A1	kein Tumor		<i>MSH2</i> : Exon 11	c.1666T>C	p.L556L	biallelisch		56J Caecumadenom, Ratsuchende, da Mutter 50J, 61J ColonCa
FW	B	MSS	evtl.MSH6,PMS2	<i>MSH2</i> : Exon 11	c.1666T>C	p.L556L	biallelisch	<i>MSH6</i> * oB	UterusCa, OvarialCa

Tabelle 15: Patienten mit Polymorphismen in *MSH2*

(oB=ohne pathologischen Befund; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

(Die *MSH6**-Long Range-PCR wurde in zwei Fragmenten durchgeführt, von Exon 1 bis 4 und von Exon 4 bis 10.)

Der heterozygote SNP c.1666T>C; p.L556L in *MSH2* Exon 11 wurde bei den Patienten GS und FW biallelisch exprimiert. Es lag kein aberrantes Spleißen vor.

Bei Patientin FW mit fraglich immunhistochemischem Ausfall in *MSH6* und *PMS2* konnte *MSH6* aufgrund von fehlenden codierenden Polymorphismen nicht auf biallelische Expression untersucht werden.

3.2.4. LR-PCR bei Patienten mit IHC-Ausfall ohne Sequenzveränderungen im entsprechenden Gen

Patienten, die einen immunhistochemischen Ausfall in *MLH1*, *MSH2* oder *MSH6* hatten, aber keine codierende heterozygote Sequenzveränderung im entsprechenden Gen aufwiesen, konnte nicht auf biallelische Expression hin getestet werden. Daher wurde eine Amplifikation des gesamten Gentranskripts durchgeführt, um zumindest starkes, aberrantes Spleißen auszuschließen, das zum Beispiel durch intronische Mutationen verursacht werden könnte.

Patient	Kriterium	Mikro-satelliten	Immunhistochemische Ausfälle	Long Range-PCR	Diagnose
HW	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> oB	55J synchrones ColonCa
HA	B		MLH1	<i>MLH1</i> oB	
WH	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> oB	44J ColonCa
HO	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> oB	41J ColonCa
SA	B	MSI	MLH1	<i>MLH1</i> oB	44J Adenome, Ratsuchende, da Vater 47J RektumCa, 57J ColonCa
HK	B	MSI	MLH1, PMS2	<i>MLH1</i> oB	38J DünndarmCa + MagenCa
WE	A2	MSI	MLH1, PMS2	<i>MLH1</i> oB	Ratsuchende, da Mutter 56J ColonCa
KK	B	MSI	MSH2, MSH6	<i>MSH2</i> oB <i>MSH6</i> oB	31J EndometriumCa 61J ColonCa
LB	B	MSI	MSH2, MSH6	<i>MSH2</i> oB <i>MSH6</i> * oB	29J ColonCa+RektumCa
HE	B	MSI	MSH2, MSH6	<i>MSH2</i> oB <i>MSH6</i> * oB	64J Ca des rektosigmoidalen Übergangs
SC	B	MSI	MSH2, MSH6	<i>MSH2</i> oB <i>MSH6</i> * oB	Ratsuchende, da Bruder 46J RektumCa
BU	B	MSI	MSH6	<i>MSH6</i> oB	55J SigmaCa

Tabelle 16: Patienten mit immunhistochemischem Ausfall ohne codierende Sequenzveränderung

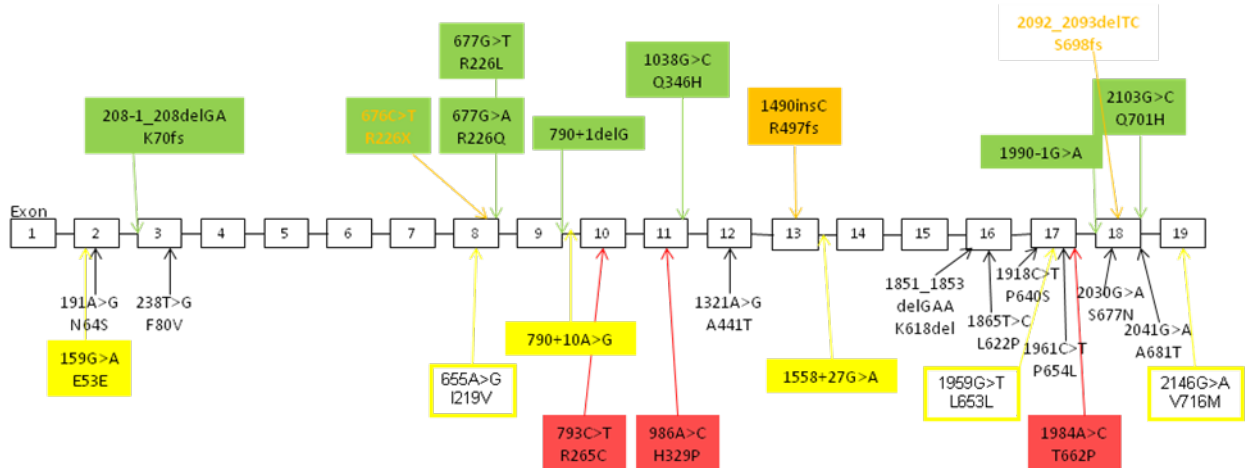
(oB=ohne pathologischen Befund; Ca=Karzinom; J=Alter bei Diagnose in Jahren)

(Die *MSH6**-Long Range-PCR wurde in zwei Fragmenten durchgeführt, von Exon 1 bis 4 und von Exon 4 bis 10.)

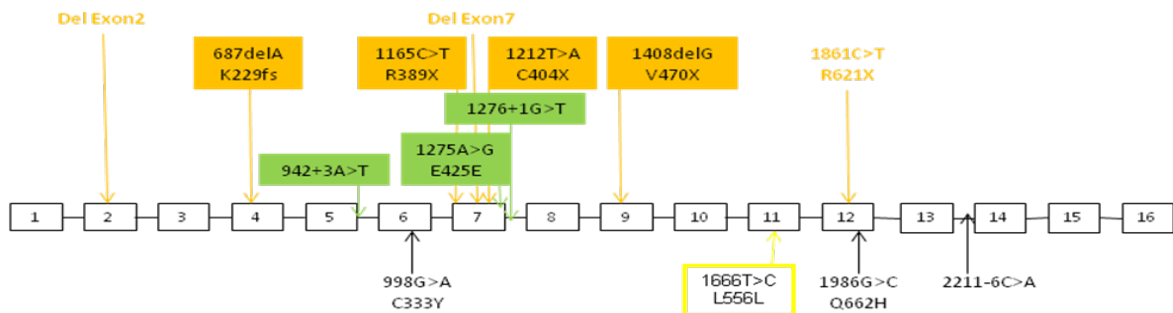
Dazu wurde bei neun Patienten *MLH1* mit dem 1F und 19Rn Primer und bei fünf Patienten *MSH2* mit dem 1F und 16R Primer amplifiziert. Anschließend wurde das gesamte Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Dabei konnte kein aberrantes Spleißen detektiert werden. Eine *Long Range*-PCR von *MSH6* sollte bei sechs Patienten mit immunhistochemischem Ausfall in *MSH6* durchgeführt werden. Mit dem 1F und 10R Primer ließen sich aber nur die cDNA von KK und BU amplifizieren. Deshalb wurde bei den übrigen Patienten das *MSH6*-Gen in zwei Fragmenten von Exon 1 bis 4 und von Exon 4 bis 10 amplifiziert (*MSH6**-LR). Im Gelbild ergab sich bei keinem der Patienten der Verdacht auf ein pathologisches Spleißverhalten. So konnte bei diesen Patienten zwar ausgeschlossen werden, dass durch aberrantes Spleißen zusätzliche Banden entstehen. Da wir aber die biallelische Expression nicht überprüfen konnten, wäre ein durch aberrantes Spleißen mit Leserahmenverschiebung induzierter Abbau eines Allels nicht erkannt worden. Auch eine transkriptionelle Stilllegung eines Allels konnte mit Hilfe der *Long Range*-PCR nicht nachgewiesen werden. Um diese Frage zu klären, müssten mit anderen Techniken quantitative PCRs etabliert und durchgeführt werden.

3.2.5. Übersicht über Pathogenität aller untersuchten Sequenzveränderungen

MLH1:



MSH2:



MSH6:

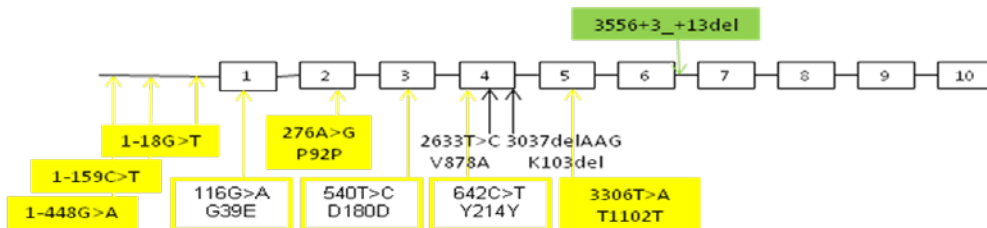


Abbildung 31: Zusammenfassung für alle Gene: Pathogenität der untersuchten Sequenzveränderungen auf RNA-Ebene

Nonsense-Mutationen mit NMD

Nonsense-Mutationen ohne NMD

Spleißmutationen mit aberrantem Spleißen, bei Frameshift mit NMD

Spleiß- / Nonsense-Mutation mit NMD

Unklare Sequenzveränderung: biallelisch exprimiert, kein aberrantes Spleißen → auf Proteinebene weiterhin unklar

Unklare Sequenzveränderung: biallelisch exprimiert, kein aberrantes Spleißen → nicht pathogen, da kein Effekt auf Proteinebene

Unklare Sequenzveränderung: verändertes Spleißverhalten → pathogen

SNPs, die auch häufig bei gesunden Kontrollen beobachtet werden → nicht pathogen

4. Diskussion

4.1. Alternatives Spleißen

Alternatives Spleißen spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Vielfalt an Proteinen. Das menschliche Genom besteht aus nur 32000 Genen im Vergleich zu 14000 Genen bei der Fruchtfliege oder 6000 Genen bei der Bäckerhefe. Um die Komplexität höherer Eukaryonten zu erreichen, sollen unter anderem 40-60% der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden können (Modrek et al., 2002). Die theoretisch denkbaren Spleißprodukte belaufen sich bei zahlreichen Genen auf mehrere 100 Isoformen. Das *Dscam*-Gen (*Down syndrome cell-adhesion molecule*) der Fruchtfliege kann potentiell in 38016 unterschiedliche Transkripte gespleißt werden (Cartegni et al., 2002).

Auch Gene, die nur für ein Protein codieren, werden in geringem Umfang alternativ gespleißt. So wurde in den *Mismatch*-Reparatur-System-Genen *MLH1* und *MSH2* alternatives Spleißen beobachtet. Bei *MSH6* sind bisher in der Literatur keine alternativen Spleißprodukte beschrieben. Fasst man alle in unseren Versuchen aufgetretenen und in der Literatur beschriebenen alternativen Spleißprodukte zusammen, ergibt sich folgendes Bild (**fett** sind diejenigen markiert, die wir auch in unseren Kontrollen beobachteten; *kursiv* diejenigen, die nur nach Anreicherung alternativer Spleißprodukte beobachtet werden konnten):

<i>MLH1</i> :	Exon 6	
	Exon 9	(Clarke et al., 2000; Genuardi et al.,1998)
	Exon 6-9	(Genuardi et al.,1998)
	Exon 9-10	(Clarke et al., 2000; Genuardi et al.,1998)
	<i>Exon 10</i>	(Venables und Burn, 2006)
	Exon 10-11	(Clarke et al., 2000)
	Exon 9-10-11	(Clarke et al., 2000; Genuardi et al.,1998)
	Exon 9-10-11-12-13	
	Exon 12	(Genuardi et al.,1998)
	Exon 14-15	
	Exon 15	
	<i>Exon 15-16-17-18</i>	(Venables und Burn, 2006)
	<i>Exon 14-15-16-17-18</i>	(Venables und Burn, 2006)
	Exon 16	(Genuardi et al.,1998)
	Exon 17	(Genuardi et al.,1998)
<i>MSH2</i> :	<i>Exon 3</i>	(Venables und Burn, 2006)

Exon 5	(Clarke et al., 2000; Genuardi et al.,1998)
Exon 2-3-4-5-6	(Clarke et al., 2000)
Exon 2-3-4-5-6-7	(Genuardi et al.,1998)
Exon 2-3-4-5-6-7-8	(Genuardi et al.,1998)
Exon 13	(Clarke et al., 2000; Genuardi et al.,1998; Mori et al., 1997)
<i>Exon 10</i>	(Venables und Burn, 2006)

MSH6: Exon 3

Da eine Identifikation aller auftretenden alternativen Spleißprodukte im Rahmen einer *Long Range-PCR* der Gene nicht möglich war, wurden kleinere PCR-Fragmente untersucht. Alle in Kontroll-Individuen auftretenden alternativen Spleißprodukte wurden mit Vorsicht beurteilt, um diese interindividuell möglichen alternativen Spleißprodukte nicht mit pathologischen Spleißveränderungen, die auf Mutationen basieren, zu verwechseln. Es wurde deshalb immer das alternative Spleißen in einer Kontrolle mit anderen Kontrollen verglichen. Die Beurteilung aberranter Spleißprodukte von Patienten erfolgte ausschließlich durch parallel durchgeführte Kontrollen. Die Intensität der aufgetretenen Produkte wurde im Gelbild verglichen.

Nach Anreicherung alternativer Spleißprodukte konnten Venables und Burn, 2006 zusätzlich alternatives Spleißen von *MLH1* Exon 10, 15 bis 18, 14 bis 18 und *MSH2* Exon 3 und 10 nachweisen. Damit werden neben den in unseren Versuchen nachweisbaren alternativen Spleißprodukten, auch andere alternative Spleißprodukte gebildet. Sie liegen allerdings ohne Anreicherung in zu geringer Intensität vor, um detektiert zu werden, sei es weil sie nur in geringem Ausmaß gebildet werden, oder weil ein Großteil durch NMD abgebaut wird. Damit wird klar, dass nur der konkrete Vergleich der Intensität der aufgetretenden alternativen Spleißprodukte die Unterscheidung zwischen physiologisch und pathologisch ermöglichen kann. Erschwert wird diese Unterscheidung durch interindividuelle Unterschiede. So mussten pathogene Formen aberranten Spleißens immer im Vergleich zu mehreren gesunden Kontrollen betrachtet werden.

4.2. Beurteilung der Mutationen mit vermuteter

Pathogenität

50% der krankheitsverursachenden Mutationen im Exon sollen das Spleißverhalten verändern (Blencowe, 2006). Dazu kommen noch Mutationen an den konservierten Spleißsequenzen im

Intron. So wurde aberrantes Spleißen als Ursache für zahlreiche Krankheiten wie Mukoviszidose, Marfan Syndrom, Duchenne Muskeldystrophie, Retinitis pigmentosa, spinale Muskelatrophie, Neurofibromatose, Hämophilie und Thalassämie gefunden (Pajares et al., 2007; Cartegni et al., 2002).

Auch beim Lynch-Syndrom betreffen viele Mutationen der MMR-Gene die Spleißsequenzen des Exon-Intron-Übergangs. Für alle Mutationen, die aufgrund ihrer Lage in diesem hochkonservierten Bereich pathogene Veränderungen der RNA erwarten ließen, konnten wir in unseren Untersuchungen eine Veränderung des Spleißverhaltens auf cDNA-Ebene zeigen. Die zehn Mutationen, die ein vorzeitiges Stoppcodon generieren, wurden auch auf cDNA-Ebene untersucht, um sowohl NMD als auch Nonsense-assoziiertes-alternatives-Spleißen zu untersuchen. Es ist dabei von großem Nutzen, die eigenen Ergebnisse mit Publikationen zu vergleichen. Denn es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass ein beobachtetes *Exon-Skipping* nicht durch die als Ursache angenommene Mutation, sondern durch eine nicht detektierte, tief intronisch gelegene Sequenzveränderung hervorgerufen wird. Gerade wenn ein vollständiger Abbau des Allels vorlag, wären entsprechende spleiß-verändernde Sequenzen in allen Introns denkbar. Zeigten sich in anderen Arbeitsgruppen bei der Untersuchung nicht verwandter Patienten vergleichbare Ergebnisse, kann die Mutation mit hoher Sicherheit als krankheitsverursachend klassifiziert werden. Von noch viel größerer Bedeutung ist der Vergleich mit nicht verwandten Patienten bei unklaren Sequenzveränderungen.

4.2.1. Spleißmutationen im hochkonservierten Bereich des Exon-Intron-Übergangs

Vier Patienten mit Mutationen in den für den Spleißvorgang zu 100% konservierten Positionen -2, -1, +1 und +2 wurden untersucht:

➤ ***MLH1* Intron 2/ Exon 3: c.208-1_208delGA**

Die noch nicht beschriebene Mutation *MLH1* c.208-1_208delGA hatte, wie erwartet, ein vollständiges aberrantes Spleißen von Exon 3 zur Folge und ist damit auf cDNA-Ebene pathogen. Der Leserahmen bleibt trotz *Exon-Skipping* erhalten. Exon 3 wird physiologisch nicht alternativ gespleißt.

➤ ***MLH1* Intron 9: c.790+1delG**

Die Mutation in *MLH1* Intron 9 c.790+1delG führte zu einem aberranten Spleißen von Exon 9-10 (*in frame*) in einem zur Intensität der Wildtypbande vergleichbarem Ausmaß. Das alleinige *Exon-Skipping* von Exon 9 (*out of frame*) war nur in sehr geringem Umfang nachweisbar. Auch bei den *in vitro* Analysen von Auclair et al., 2006 zeigte sich das Skipping von Exon 9 und 10. Die Frage, warum zusätzlich zum Exon 9 auch das Exon 10 entfernt wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Exon 9 und 10 werden auch in Gesunden in geringem Prozentsatz alternativ gespleißt (Genuardi et al., 1998). Bemerkenswert ist außerdem, dass durch das zusätzliche Entfernen von Exon 10 der Leserahmen erhalten bleibt, wohingegen bei alleinigem Auslassen von Exon 9 das Allel aufgrund eines *frameshift* durch NMD abgebaut werden müsste. Damit kann es im Gelbild unter Umständen nicht mehr detektiert werden. Das beobachtete Entfernen von benachbarten Exons macht aber auch klar, dass am komplizierten Mechanismus des Spleißens noch weit mehr als die bekannten, in der Einleitung geschilderten Grundlagen eine Rolle spielen.

➤ ***MLH1* Intron 17: c.1990-1G>A**

Die Auswirkung auf ein verändertes Spleißen von der im Intron 17 von *MLH1* gelegenen Mutation c.1990-1G>A wurde bislang vermutet (Mangold et al., 2005) und konnte in dieser Arbeit durch Nachweis des *Exon-Skipping* von Exon 18 und Exon 17-18 gezeigt werden. Es tritt dabei keine Leserahmenverschiebung auf. Das Auslassen von Exon 18 wurde auch bei der an benachbarter Position c.1990-2A>G gelegenen Mutation von Krüger et al., 2004 beobachtet. Da beide Nukleotide gemeinsam die Spleißakzeptorstelle bilden, und beide in einer zu 100% konservierten Sequenz liegen, scheinen vergleichbare Konsequenzen plausibel.

➤ ***MSH2* Intron 7: c.1276+1G>T**

Die kryptische Spleißstelle in Exon 7 von *MSH2* wurde bereits beschrieben (Auclair et al., 2006: c.1276+2T>A und Pagenstecher et al., 2006: c.1275A>G). Jetzt konnte gezeigt werden, dass auch bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mutation c.1276+1G>T (Mangold et al., 2005) die gleiche kryptische Spleißstelle aktiviert wird (siehe Abb.32). Da das kryptisch gespleißte Produkt im Vergleich zum Wildtypallel mit verminderter Intensität vorlag, wird wahrscheinlich auch nur ein Teil des mutierten Allels kryptisch gespleißt. Der übrige Teil könnte aufgrund einer Leserahmenverschiebung bei Auslassen des kompletten Exons 7 durch NMD abgebaut werden.

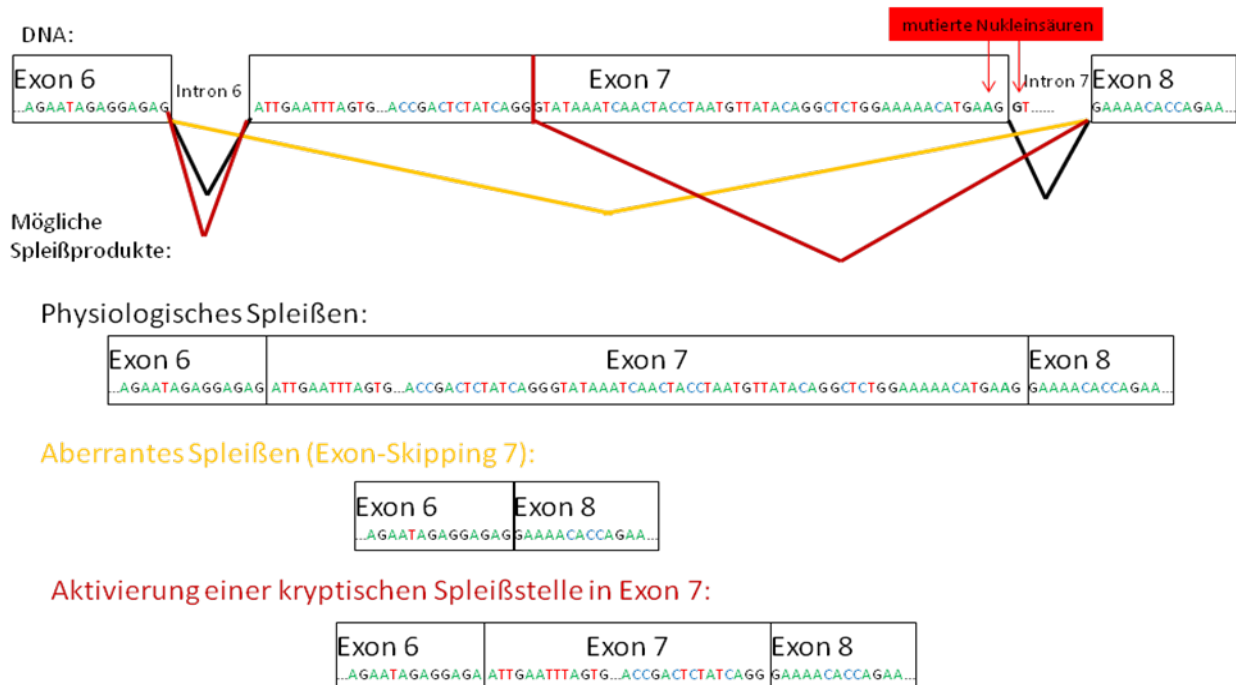


Abbildung 32: Die Mutationen am 5'-Ende von *MSH2* Exon 7 aktivieren eine kryptische Spleißstelle in Exon 7 c.1228. Dabei wird nicht das komplette Exon 7 ausgelassen, was einen Verlust von 200 Basenpaaren mit Leserahmenverschiebung bedeuten würde, sondern es fehlen nur 48 Basenpaare. Der Leserahmen bleibt erhalten.

Auch Mutationen in den restlichen stark konservierten Nukleotiden am Exon-Intron-Übergang können ein korrektes Spleißen verhindern:

➤ ***MLH1* Exon 8: c.677G>A; p.R226Q**

Die schon mehrfach untersuchte Veränderung in der letzten Base von Exon 8 in *MLH1* c.677G>A; p.R226Q führte auch in unseren Versuchen zum vollständigen Abbau der mRNA des mutierten Allels (Pagenstecher et al., 2006). Durch Inhibition des NMD *in vitro* konnte gezeigt werden, dass tatsächlich aberrantes Spleißen von Exon 8 durch eine Verschiebung des Leserahmens den Abbau induziert (Sharp et al., 2004; Spaepen et al., 2006).

➤ ***MLH1* Exon 8: c.677G>T; p.R226L**

Auch die Mutation c.677G>T; p.R226L die sich ebenfalls in der letzten Base von *MLH1* Exon 8 befindet, induzierte aufgrund des *frameshifts* bei aberrantem Spleißen von Exon 8 einen fast vollständigen NMD.

➤ ***MLH1* Exon 8: c.676C>T; p.R226X**

Betrachtet man die Nonsense-Mutation auf *MLH1* c.676C>T; p.R226X (Mangold et al., 2005), der vorletzten Base von Exon 8, war die beobachtete deutliche Reduktion der

Expression zu erwarten, ob aber das vorzeitige Stoppcodon den NMD der cDNA induziert oder ob das bereits im Zellkern stattfindende aberrante Spleißen von Exon 8 das Nonsense-Codon entfernt und durch die Leserahmenverschiebung ein neues PTC induziert, bleibt fraglich.

➤ ***MLH1* Exons 11: c.1038G>C; p.Q346H**

Bei der Mutation in der letzten Base von *MLH1* Exons 11: c.1038G>C; p.Q346H war das Wildtypallel monoallelisch exprimiert. Wie auch bei Pagenstecher et al., 2006, kam es zu einem im Vergleich zu gesunden Kontrollen verstärkten aberranten Spleißen von Exon 10 bis 11. Der Großteil des mutierten Allels wurde jedoch abgebaut, da auch der SNP in Exon 8 reduziert vorlag. Eine zusätzliche Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle im Intron 11, wie sie Pagenstecher et al., 2006 beobachteten, konnten wir bei diesem Patienten nicht nachweisen.

➤ ***MLH1* Exon 18: c.2103G>C; p.Q701H**

Ebenfalls wurde eine Mutation der letzten Base in *MLH1* Exon 18 c.2103G>C; p.Q701H untersucht. Da es hier zu vollständigem *Exon-Skipping* von Exon 18 und Exon 17-18, beide ohne Leserahmenverschiebung, kam und die Mutation in der Wildtypbande nicht mehr nachweisbar war, kann diese Mutation als verifizierte Spleißmutation eingestuft werden.

➤ ***MSH2* Intron 5: c.942+3A>T**

Bei der Mutation im Intron 5 von *MSH2* c.942+3A>T, die zu einem vollständigen *Exon-Skipping* ohne Leserahmenverschiebung führte, handelt es sich um eine häufig in HNPCC-Patienten nachgewiesene Veränderung. Auch Spaepen et al., 2006 und Froggatt et al., 1996 beobachteten aufgrund dieser Spleißmutation ein vollständiges Auslassen von Exon 5.

➤ ***MSH2* Exon 7: c.1275A>G; p.E425E**

Die in der vorletzten Base von *MSH2* Exon 7 gelegene Mutation c.1275A>G; p.E425E mit Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle wurde auch von Pagenstecher et al., 2006 untersucht. Auch hier wurde nur ein Teil des mutierten Allels kryptisch gespleißt.

Damit sind wohl nicht interindividuelle Unterschiede für das Ausmaß aberranten Spleißens verantwortlich, sondern es handelt sich um reproduzierbare Beobachtungen, die sich in der Tat auf die Mutation zurückführen lassen.

➤ ***MSH6* Intron 6 c.3556+3_+13del**

Die einzige in *MSH6* beobachtete Spleißmutation im Intron 6: c.3556+3_+13del führte zum Auslassen von Exon 6, ca. 50% des mutierten Allels wurden aufgrund der Leserahmenverschiebung durch das *Exon-Skipping* abgebaut.

Man kann also zusammenfassen, dass sowohl die vorletzte Base, die eine durchschnittliche Konservierung von 64%, als auch die letzte Base mit einer Konservierung von 73% in unseren Fällen immer unentbehrlich für korrektes Spleißen waren. Das gleiche gilt für die Position +3, die bei 62% aller Introns konserviert ist. Damit konnte bei allen zwölf Patienten, bei denen aberrantes Spleißen aufgrund der Lokalisation der Sequenzveränderung im konservierten Exon-Intron-Übergang erwartet wurde, auch aberrantes Spleißen nachgewiesen werden. Die Spleißmutationen wurden damit alle bestätigt, es konnte bei allen ihre Pathogenität auf cDNA-Ebene gezeigt werden. Zum Teil wurden dem von der Mutation betroffenen Exon benachbarte Exons mitentfernt. So entstand bei einer Mutation an der Spleißdonorstelle von *MLH1* Exon 9 zum großen Teil eine um Exon 9-10 verkürzte RNA, die in geringem Ausmaß auch physiologisch durch alternatives Spleißen entsteht. Der Leserahmen bleibt damit erhalten. Bei zwei anderen Mutationsträgern kam es aufgrund unterschiedlicher Spleißmutationen am Exonende zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle in *MSH2* Exon 7. Damit kann man bei Mutationen im konservierten Bereich des Exon-Intron-Übergangs, auch wenn keine cDNA zur Untersuchung vorhanden ist, mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass die Mutation pathogen ist. Trotzdem kann eine Verifikation vorhergesagter Spleißmutationen und ihre konkrete Auswirkung auf die RNA und somit auf das gebildete Protein nur durch cDNA-Analysen gezeigt werden.

4.2.2. Auswirkungen von vorzeitigem Stoppcodons

Bei Nonsense-Mutationen und Deletionen bzw. Insertionen, die durch Verschiebung des Leserahmens nach wenigen Basen ein vorzeitiges Stoppcodon (PTC) generieren, ist die Pathogenität eindeutig. Aber erst in den letzten Jahren setzte sich mehr und mehr die Erkenntnis durch, dass diese Mutationen nicht erst deletäre Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz haben, sondern bereits auf mRNA-Ebene durch den *Nonsense-mediated-mRNA-decay* (NMD) entfernt werden und gar kein verändertes Protein gebildet wird. So sollen RNAs mit vorzeitigem Stoppcodon, wenn das PTC mehr als 55 Basenpaaren vor der letzten Exon-Exon-Grenze liegt, zu 90-99% degradiert werden (Wagner und Lykke-Andersen, 2002). Um das Auftreten und die Effizienz des NMD genauer zu untersuchen, wurden cDNA-Analysen von Patienten mit vorzeitigem Stoppcodon durchgeführt.

➤ ***MLH1* Exon 13: c.1490insC**

Die in *MLH1* gelegene Insertion Exon13 c.1490insC (Moslein et al., 1996) führte durch die Leserahmenverschiebung und das dadurch entstandene vorzeitige Stoppcodon zu einem fast vollständigen Abbau der betroffenen RNA.

➤ ***MLH1* Exon 18: c.2092_2093delTC; p.S698RfsX5**

Der fehlende Abbau des die Deletion c.2092_2093delTC tragenden *MLH1*-Allels entspricht den Regeln des NMD, da sich das induzierte Stoppcodon im letzten Exon befindet.

Damit konnte bei dem Patienten mit vorzeitigem Stoppcodon vor dem letzten Exon von *MLH1* ein NMD beobachtet werden, während das Stoppcodon im letzten Exon keinen Abbau induziert. Damit entspricht das Auftreten des NMD in *MLH1* bei den untersuchten Patienten der theoretischen Vorhersage.

➤ ***MSH2* Exon 4: c.687delA; p.K229KfsX17, Exon 7: c.1165 C>T; p.R389X und c.1212T>A; p.C404X, Exon 9: c.1408delG; p.V470X**

Die in *MSH2* gelegenen Nonsensemutationen c.1165C>T; p.R389X (Mangold et al., 2005), c.1212T>A; p.C404X und c.1408delG p.V470X (Mueller-Koch et al., 2005) sowie die *frameshift*-Mutation c.687delA (Mangold et al., 2005) ziehen, wie zu erwarten, einen fast vollständigen Abbau des betroffenen Allels nach sich.

➤ ***MSH2* Exon 12: c.1861C>T; p.R621X, Del Exon 2; p.G71GfsX10, Del Exon 7; p.R359RfsX17**

Dahingegen waren sowohl die Stoppmutation in *MSH2* Exon 12 c.1861C>T; p.R621X (Niessen et al., 2006) als auch die Deletionen von Exon 2 bzw. Exon 7, die im jeweils folgenden Exon ein Stoppcodon induzieren, auf cDNA-Ebene biallelisch exprimiert, obwohl ein NMD erwartet wurde.

Während zahlreiche Publikationen außer in den bekannten Ausnahmen, wie intronfreien Genen und einer Lage zu nah am 3'-Ende von einem zuverlässigen und schnellen Abbau durch NMD sprechen (Byers, 2002; Prince und Gunson, 1998; Lewis et al., 2003; Cartegni et al., 2002; Wilkinson, 2005), gibt es Hinweise, dass sich die Effizienz des NMD sowohl zwischen verschiedenen Geweben als auch interindividuell unterscheidet. Kerr et al., 2001 beobachteten bei der gleichen Nonsense-Mutation im Dystrophin Gen bei einem Patienten Muskeldystrophie Duchenne und bei einem anderen Patienten die mildere Muskeldystrophie

Becker-Kiener. Als Ursache postulierten sie das unterschiedliche Ausmaß des NMD bei verschiedenen Patienten. Für das bei Marfan-Syndrom mutierte *FBNI* Gen wurde gezeigt, dass ein Allel mit vorzeitigem Stoppcodon in Fibroblasten zwar durch NMD vollständig abgebaut wird und ohne NMD-Inhibition nicht mehr nachweisbar ist, in Blutleukozyten dieser Abbau aber nur teilweise stattfindet. Das PTC-tragende Transkript war in PAXgene stabilisiertem Blut mit einer Intensität zwischen 33 und 80% nachweisbar, wobei die Intensität des betroffenen Allels auf genomischer Ebene bei 50% lag (Magyar et al., 2009). Auch bei der Schmid metaphysealen Chondrodysplasie wurde beobachtet, dass eine Nonsense-Mutation im Gen für Kollagen X kompletten NMD in Knorpelzellen verursacht, aber nur unvollständigen NMD in Lymphoblasten und Osteoblasten (Bateman, 2003). PTCs im *OPAI* Gen, das bei autosomal dominanter Optikusatrophie mutiert ist, führten nur in drei der untersuchten acht Patienten zu einem deutlichen Abbau des mutierten Allels in Leukozyten, in Lymphoblasten war der Abbau dagegen immer nachweisbar (Schimpf et al., 2008). Linde et al., 2007 sehen eine erbliche Eigenschaft der Zellen als Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Effizienz des NMD.

Systematische Untersuchungen zu den Auswirkungen von PTCs in *MSH2* und *MLH1* gibt es meines Wissens nicht. In unseren Untersuchungen war der erwartete NMD bei nur vier der untersuchten sieben Patienten (57%) mit pathogenen *out of frame* Deletionen oder Nonsense-Mutationen in *MSH2* tatsächlich nachzuweisen. Bei dem untersuchten Patienten mit vorzeitigem PTC in *MLH1* lag ein NMD vor. Das Ausmaß des NMD variiert dabei stark, zum Teil sind die mutierten Transkripte nicht mehr nachweisbar, zum Teil liegen sie nur reduziert vor. Da wir bei unseren Patienten nur Leukozyten in PAXgene stabilisiertem Blut untersuchen konnten, ist keine Aussagen zum Ausmaß des NMD von *MLH1* und *MSH2* in anderen Geweben möglich. Fasst man die Ergebnisse der genannten Publikationen zur Effizienz des NMD in anderen Genen zusammen, war in Leukozyten oft nur ein unvollständiger Abbau nachweisbar. Die Ursachen, warum manche mRNA-Transkripte nicht durch NMD abgebaut werden, sind noch unklar.

Es ist zu erwarten, dass die mutierten Proteine durch das vorzeitige Stoppcodon dennoch einen Funktionsverlust des betroffenen Allels verursachen. Denn im Gegensatz zu anderen genetischen Erkrankungen wie der Muskeldystrophie Typ Duchenne versus Becker-Kiener, bei denen es für die phänotypische Ausprägung von entscheidender Bedeutung ist, ob ein Protein mit Restfunktion gebildet wird oder nicht, spielt es beim Lynch-Syndrom keine Rolle, ob von einem mutierten Allel ein nicht funktionelles, ein in seiner Funktion eingeschränktes oder kein Protein entsteht. Grundsätzlich kann auch beim Lynch-Syndrom aufgrund des

fehlenden cDNA-Abbaus ein dominant negativer Effekt des mutierten Proteins nicht vollständig ausgeschlossen werden. So wäre zum Beispiel durch bessere Bindung an Funktionspartner eine Hemmung des nicht-mutierten Allels denkbar. Damit könnte es sich bei den Nonsense-Mutationen nicht um Sequenzveränderungen mit „*Loss of function*“ handeln, sondern es würde gegebenenfalls ein „*Gain of function*“ entstehen.

4.3. Pathogenität unklarer Sequenzveränderungen

Von den 50% der auf mRNA-Ebene pathogenen Mutationen können mehr als 10% nur mit Hilfe von cDNA-Analysen erkannt werden, da sie sich nicht an den konservierten Nukleotiden des Exon-Intron-Übergangs befinden (Teraoka et al., 1999; Cartegni et al., 2002). Neben Veränderungen der Proteinsequenz beeinflussen Missense-Mutationen auf RNA-Ebene *Exon Splice Enhancer* und *Exon Splice Silencer*. Auch stille Mutationen können einen ESE oder ESS verändern.

Aus diesem Grund wurden die cDNAs von Patienten mit unklaren Sequenzveränderungen untersucht. Zum einen konnte damit die Frage geklärt werden, ob diese Veränderungen aberrantes Spleißen auslösen, zum anderen wurde bei biallelischer Expression der unklaren Veränderung gezeigt, dass beide Allele exprimiert werden und kein Abbau bzw. eine transkriptionelle Stilllegung durch eine nicht detektierte Veränderung vorliegt. Deshalb wurde bei diesen Veränderungen sowohl untersucht, ob sie biallelisch exprimiert werden, als auch das Gel auf aberrante Spleißprodukte hin untersucht. Von den insgesamt 25 unterschiedlichen Sequenzvarianten konnten drei als pathogen klassifiziert werden. Bei acht Sequenzveränderungen handelt es sich um stille Mutationen, intronische Mutationen oder Promotormutationen, die keinen Einfluss auf das Spleißverhalten haben und damit als nicht pathogen klassifiziert werden. Die übrigen 14 Sequenzveränderungen konnten mit Hilfe der cDNA-Analysen nicht weiter charakterisiert werden, denn die Pathogenität von Missense-Mutationen auf Proteinebene bleibt bei normalem Spleißverhalten weiterhin unklar.

4.3.1. *Monoallelische Expression von unklaren Varianten*

➤ ***MLH1 Exon 10: c.793C>T; p.R265C***

Da wir auf cDNA-Ebene die fast monoallelische Expression des Wildtyps mit nur leicht verstärktem Spleißen von Exon 10 und Exon 10-11 in zwei nicht verwandten Patienten mit *MLH1 c.793C>T; p.R265C* beobachteten, können wir mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass tatsächlich diese Sequenzveränderung aberrantes Spleißen von Exon 10 bzw. Exon 10-11 (beide *frameshift*) induziert und somit den Abbau des betroffenen Allels

verursacht. Da das c.793T-Allel nicht mehr korrekt gespleißt wird, handelt es sich um eine pathogene Sequenzveränderung. In funktionellen Untersuchungen war die Reparaturaktivität durch diese Mutation deutlich reduziert (Takahashi et al., 2007; Ellison et al., 2001).

➤ ***MLH1* Exon 11: 986A>C; p.H329P**

Während Raevaara et al., 2005 bei der Veränderung *MLH1* c.986A>C; p.H329P eine normale *in vitro* Reparaturaktivität, aber eine verminderte Expression des Proteins in 293T Zellen beobachteten, beschrieben Takahashi et al., 2007 eine Reduktion der Reparaturaktivität auf 25,7% bei normaler Expression. Unsere Analysen deuten darauf hin, dass die Pathogenität dieser unklaren Variante bereits auf RNA-Ebene zu finden ist und eine Untersuchung der Proteinfunktion damit irrelevant ist. Die cDNA-Analysen zeigen in zwei unabhängigen Indexpatienten als beschrittenen Mechanismus vollständiges aberrantes Spleißen des mutierten Allels in Exon 11 mit konsekutivem NMD bei Leserahmenverschiebung durch Exon-Skipping von Exon 11 bzw. Exon 10-11.

➤ ***MLH1* Exon 17: c.1984A>C; p.T662P**

Die cDNA-Analyse der Sequenzvariante c.1984A>C; p.T662P an der 6. letzten Base von *MLH1* Exon 17 ergab ein im Vergleich zum alternativen Spleißen zwar verstärktes, aber dennoch unvollständiges *Exon-Skipping* von *MLH1* Exon 17 im mutierten Allel, da es im Wildtypfragment zu ca. 30% vorhanden war. Auch in den cDNA-Analysen von Pagenstecher et al., 2006 zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis mit partiellem Spleißdefekt des mutierten Allels. *In vitro* Analysen zeigten für diese Veränderung eine Reduktion der Reparaturaktivität auf 64%, was keinen eindeutig pathogenen Wert darstellt (Takahashi et al., 2007). Da das veränderte Spleißen von ca. 70% des mutierten Allels deutlich jenseits des in Gesunden beobachteten alternativen Spleißens liegt, wird diese Mutation im Rahmen dieser Arbeit als HNPCC-verursachend gewertet.

Damit wurde bei fünf der untersuchten 26 Patienten (19%) mit Missensemutation oder stiller Mutation die Pathogenität der unklaren Sequenzveränderung durch Spleißdefekte gezeigt. Die fünf Patienten waren Träger von drei verschiedenen Mutationen (*MLH1* c.793C>T, c.986A>C und c.1984A>C). Von den 25 untersuchten Sequenzveränderungen sind damit drei Veränderungen auf cDNA-Ebene pathogen (12%).

4.3.2. *In silico*-Vorhersage dieser unklaren Varianten

Bei diesen drei Missense-Mutationen (*MLH1* c.793C>T, c.986A>C und c.1984A>C), die sich auf cDNA-Ebene als pathogen erwiesen wurde im Rahmen der Routinediagnostik eine *in silico*-Vorhersage durchgeführt. Mit Hilfe der Programme „Alamut“ und „ESEfinder“ wird versucht die Lage von Bindungsstellen für Spleißproteine vorherzusagen und so eine Aussage darüber zu treffen, ob die Missense-Mutation für den Spleißvorgang relevant ist. Bei den von uns untersuchten Mutationen mit Spleißdefekt auf cDNA-Ebene ergaben sich in der *in silico*-Vorhersage folgende Ergebnisse:

Bei *MLH1* Exon 10: c.793C>T; p.R265C handelt es sich eine Sequenzveränderung, die in den cDNA-Analysen fast vollständiges aberrantes Spleißen mit konsekutivem NMD des mutierten Allels induzierte. Trotzdem zeigt diese Mutation in den *in silico*-Vorhersagen „Alamut“ und „ESEfinder“ keine Veränderung der für den Spleißvorgang wichtigen Proteinbindungsstellen (siehe Abb.33).



Abbildung 33: *MLH1* Exon 10: c.793C>T; p.R265C in der *in silico*-Vorhersage („Alamut“ und „ESEfinder“)

Auch *MLH1* Exon 11: 986A>C; p.H329P führte in den cDNA-Analysen zu aberrantem Spleißen und einem Abbau des mutierten Allels. Während in der *in silico*-Vorhersage „Alamut“ keine Veränderung des Spleißvorgangs erkannt wird, zeigt der „ESEfinder“, dass durch die Mutation eine SRp55-Bindungsstelle (gelb) durch ein SF2/Asf-Bindungsstelle (pink) ersetzt wird (siehe Abb.34). Damit verändern sich durch diese Missense-Mutation die Bindungsstellen für beim Spleißvorgang relevante Proteine.



Abbildung 34: *MLH1* Exon 11: 986A>C; p.H329P in der *in silico*-Vorhersage

MLH1 Exon 17: c.1984A>C; p.T662P zeigte in den cDNA-Analysen ein unvollständiges Exon-Skipping von Exon 17. Die *in silico*-Vorhersage „Alamut“ erkennt keine Veränderung des Spleißverhaltens. Dahingegen beschreibt die Vorhersage „ESEfinder“ eine neu generierte Bindungsstelle für das SF2/Asf-Protein (pink), die Bindungsstelle für das SC35-Protein (blau) wird stärker und die Bindungsstelle für das SRp40-Protein (grün) wird in Richtung 3'-Ende verschoben und zeigt eine reduzierte Intensität (siehe Abb.35).



Abbildung 35: *MLH1* Exon 17: c.1984A>C; p.T662P in der *in silico*-Vorhersage

Damit erkennt die *in silico*-Vorhersage „Alamut“ keine der in cDNA-Analysen pathogenen Missense-Mutationen als Sequenzveränderung, die das Bindungsverhalten der Spleißproteine beeinträchtigt. Die *in silico*-Vorhersage „ESEfinder“ beschreibt für zwei der drei Missense-Mutationen eine veränderte Bindung der Spleißproteine. Obwohl in der *in silico*-Vorhersage von *MLH1* c.1984A>C die meisten Veränderungen der Bindungsstellen vorhergesagt wurden, bewirkt diese Mutation nur partielles aberrantes Spleißen des Allels, während die Missense-Mutation *MLH1* c.793C>T, für die keine Veränderungen vorhergesagt wurden, ein fast vollständiges aberrantes Spleißen des Allels verursacht. Damit kann mit *in silico*-Vorhersagen nur unzureichend die tatsächliche Relevanz der Missense-Mutationen auf cDNA-Ebene gezeigt werden und für die abschließende Klärung der Pathogenität einer Missense-Mutation sind cDNA-Analysen unerlässlich.

4.3.3. Sequenzveränderungen ohne Pathogenität

- ***MLH1* Exon 2: c.159G>A; p.E53E, *MSH6* Exon 2: c.276A>G; p.P92P und Exon 5: c.3306T>A; p.T1102T**

Handelt es sich um eine biallelisch exprimierte stille Mutation, die das Spleißverhalten nicht verändert, kann eine von dieser Sequenzveränderung verursachte Pathogenität ausgeschlossen werden. Das trifft auf die noch nicht beschriebene Mutation *MLH1* c.159G>A; E53E, die bei je zwei Patienten beobachteten Varianten *MSH6* c. 276A>G; P92P und *MSH6* c.3306T>A; T1102T (Kolodner et al., 1999) zu.

- ***MLH1* Intron 13 c.1558+27G>A und Intron 9: c.790+10A>G**

Genauso können auch intronische Varianten, wenn nachgewiesen wurde, dass sie das Spleißen nicht beeinflussen, als nicht-pathogen gewertet werden. Neben dem Nachweis, dass am Gelbild kein verändertes Spleißverhalten detektierbar ist, muss gezeigt werden, dass das Gen biallelisch exprimiert wird, um einen vollständigen Abbau eines falsch gespleißten Produkts auszuschließen. Das traf für die Sequenzveränderungen *MLH1* c.790+10A>G und c.1558+27G>A zu. Durch die zusätzlich in *MLH1* vorliegenden unklaren Varianten c.2041G>A; p.A681T bzw. c.1961C>T; p.P654L konnte über biallelische Expression gezeigt werden, dass diese intronischen Mutationen tatsächlich keine Auswirkungen auf die entstehende mRNA haben.

➤ ***MSH2* Intron 13: c.2211-6C>A**

Die intronische Variante c.2211-6G>A in *MSH2* kann aufgrund fehlender sonstiger Varianten nicht auf biallelische Expression überprüft und damit auch nicht endgültig klassifiziert werden.

➤ ***MSH6* c.1-18G>T, c.1-159C>T und c.1-448G>A**

Bei den in der Promotorregion von *MSH6* gelegenen Mutationen c.1-159C>T und c.1-448G>A konnte durch Analyse des SNP *MSH6* c.540T>C gezeigt werden, dass die mRNA biallelisch produziert wird. Damit können die Promotormutationen als nicht-pathogen klassifiziert werden.

Die Mutation im 5'-UTR von *MSH6* c.1-18G>T wurde wie auch der gleichzeitig vorliegende SNP *MSH6* c.116G>A auf cDNA-Ebene biallelisch exprimiert. Grundsätzlich ist bei Mutationen im 5'-UTR eine Beeinflussung der Translationinitiation möglich. Dabei handelt es sich aber vor allem um Mutationen in den dem Startcodon direkt benachbarten Basen (Kozak, 2002). Da zusätzlich der Tumor bei der Patientin mikrosatellitenstabil war, werten wir die Sequenzveränderung c.1-18G>T als nicht-pathogen.

Die Sequenzveränderungen von neun Patienten (*MLH1* c.159G>A, c.790+10A>G, c.1558+27G>A, *MSH6* c.276A>G, c.3306T>A, c.1-18G>T, c.1-159C>T und c.1-448G>A) können damit als nicht krankheitsverursachend gewertet werden (35%).

4.3.4. Fraglich pathogene Sequenzveränderungen

Bei den übrigen untersuchten unklaren Varianten (siehe Tab. 8, 10 und 11) ergab sich kein Hinweis auf aberrantes Spleißen und/ oder Abbau durch NMD. Aufgrund der biallelischen Expression kann auch eine, durch nicht detektierte intronische Mutationen oder Promotormutationen induzierte, reduzierte Expression eines Allels ausgeschlossen werden. Die Relevanz der veränderten Aminosäure im Protein kann nur mit Hilfe von funktionellen Untersuchungen der Reparaturfunktion beziehungsweise der Bindung im Heterodimer klassifiziert werden. Da für manche der Missense-Mutationen bereits solche *in vitro* Untersuchungen durchgeführt wurden, sollen in der folgenden Tabelle bereits bekannte Informationen zu den unklaren Veränderungen zusammengefasst werden. Um einen Anhalt für die Pathogenität der übrigen unklaren Varianten zu geben, wurde außerdem die Konservierung der betroffenen Aminosäure im Vergleich zu *Saccharomyces cerevisiae*, die evtl. Lage in einer Bindungsdomäne und eine durch die Mutation veränderte Ladung

bestimmt. Zusätzlich wurde mit Hilfe des Vorhersageprogramms PolyPhen die Auswirkung der Veränderung *in silico* eingestuft:

Gen	cDNA-Position	Aminosäurenveränderung	Konservierung der AS	Binding domain	Ladung	PolyPhen	Literatur
<i>MLH1</i>	c.191A>G	p.N64S	ja		beide hydrophil und neutral	probably damaging (PSIC: 2.425)	<i>in vitro</i> MMR-Aktivität: 36,6% (Takahashi et al., 2007) Segregationsanalyse pos. und nicht in Kontrollgruppe (Spaepen et al., 2006)
<i>MLH1</i>	c.238T>G	p.F80V	ja		beide hydrophob	probably damaging (PSIC: 2.944)	<i>in vitro</i> MMR-Aktivität: 6% vs. 23,7% (Raevaara et al., 2005 vs. Takahashi et al., 2007)
<i>MLH1</i>	c.1321G>A	p.A441T	nein		A hydrophob >T hydrophil neutral	benign (PSIC: 0.100)	<i>in vitro</i> MMR-Aktivität: 71,1% (Takahashi et al., 2007)
<i>MLH1</i>	c.1851_1853 delGAA	p.K618del	nein	<i>Exo1</i> und <i>PMS1,2</i>	K basisch		keine funktionellen Untersuchungen beschrieben
<i>MLH1</i>	c.1865T>C	p.L622P	ja	<i>Exo1</i> und <i>PMS1,2</i> Pfam domain	beide hydrophob	probably damaging (PSIC: 2.616)	<i>in vitro</i> MMR-Aktivität: 69,2% (Takahashi et al., 2007)
<i>MLH1</i>	c.1918C>T	p.P640S	ja	<i>PMS2</i>	P hydrophob >S hydrophil neutral	probably damaging (PSIC: 2.929)	<i>in vitro</i> MMR-Aktivität: 53,6% (Takahashi et al., 2007)
<i>MLH1</i>	c.1961C>T	p.P654I	ja		beide hydrophob	probably damaging (PSIC: 3.340)	<i>in vitro</i> MMR-Aktivität: 49,1% (Takahashi et al., 2007)
<i>MLH1</i>	c.2030G>A	p.S677N	nein		beide AS hydrophil und neutral	benign (PSIC: 1.403)	noch nicht beschrieben
<i>MLH1</i>	c.2041G>A	p.A681T			A hydrophob >T hydrophil neutral	possibly damaging (PSIC: 1.774)	<i>in vitro</i> MMR-Aktivität: 69,8% (Takahashi et al., 2007)
<i>MSH2</i>	c.998G>A	p.C333Y	ja		beide AS hydrophil und neutral	probably damaging (PSIC: 3.993)	<i>in vitro</i> MMR-Aktivität unzureichend (Ollila et al., 2006)
<i>MSH2</i>	c.1986G>C	p.Q662H	nein	<i>Exo1</i> und <i>MSH3,6</i>	Q hydrophil sauer > H hydrophil basisch	benign (PSIC: 1.346)	noch nicht beschrieben
<i>MSH6</i>	c.2633T>C	p.V878A	nein		beide hydrophob	possibly damaging (PSIC: 1.540)	Häufigkeit bei Kontrollen 0.015→benigne (Barnetson et al., 2008)
<i>MSH6</i>	c.3037delA AG	p.K1013del	nein		K basisch		noch nicht beschrieben

Tabelle 17: Patienten mit fraglich pathogenen Sequenzveränderungen

Binding domain bestimmt mit <http://www.blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html> und <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

Konservierung der Aminosäure im Vergleich zu *Saccharomyces cerevisiae*: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi?

Ladung der Aminosäure nach http://de.wikipedia.org/wiki/Genetischer_Code

PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>): Vorhersageprogramm für Sequenzveränderungen:

PSIC >2→wahrscheinlich pathogen

PSIC 1,5-2→fraglich

PSIC <1,5→benigne

4.4. Bewertung des pathogenen Effekts bei unvollständigem NMD/ aberrantem Spleißen

Schwierig ist die Einschätzung der Pathogenität, wenn das mutationstragende Allel nur teilweise im Rahmen des NMD abgebaut wird bzw. aberrant gespleißt wird. Liegt dem NMD ein *frameshift* zu Grunde, kann von der Pathogenität der Mutation auf Proteinebene beim Lynch-Syndrom auf jeden Fall ausgegangen werden, auch wenn das mutierte Allel nicht oder nicht vollständig abgebaut wird. Handelt es sich um eine Missense-Mutation ist es schwieriger zu beurteilen, ob die Auswirkungen auf cDNA-Ebene oder Proteinebene pathogen sind. Für Proteinanalysen gingen Takahashi et al., 2007 in ihren funktionellen Untersuchungen der Reparaturaktivität von mutierten MLH1-Proteinen von einem Schwellenwert von weniger als ca. 60% aus. Diesen legten sie fest, indem sie das Ausmaß der Reparaturaktivität in den bekannten SNPs bei gesunden Kontrollen bestimmten.

Im Gegensatz zu Erkrankungen wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) und Mukoviszidose, bei denen eine Korrelation zwischen der Schwere der Mutation, abhängig von der betroffenen Proteindomäne bzw. dem Ausmaß des *Exon-Skippings*, und dem Phänotyp nachweisbar ist, besteht bei HNPCC kein solcher Genotyp-Phänotyp-Zusammenhang (Hernegger et al., 2002; Neklason et al., 2004; Pagani und Baralle, 2004). Es gilt die klassische „*Two-Hit Theory*“ von Knudson. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb nur diejenigen Missense-Mutationen als pathogen gewertet, die eine Reduktion der Expression des mutierten Allels auf deutlich weniger als die Hälfte zeigten.

4.5. Übertragbarkeit der Untersuchungen an Blutlymphozyten auf Darmmukosa

Von den MMR-Gentranskripten *MLH1* und *MSH2* ist bekannt, dass viele Exons in geringem Ausmaß alternativ gespleißt vorliegen und dass die Spleißvarianten gewebespezifisch wie auch interindividuell unterschiedlich sein können. Mori et al., 1997 untersuchten das alternative Spleißen von *MSH2* Exon 13 in verschiedenen Geweben. Das Expressionsmuster variierte bei den untersuchten Individuen stark, war aber nicht gewebspezifisch. Genuardi et al., 1998 verglichen das Auftreten von alternativem Spleißen in Blutlymphozyten und in Kolonmukosa. Dabei waren mit Ausnahme von *MLH1* Exon 6-9, Exon 10-11 und *MSH2* Exon13 alle alternativen Spleißprodukte auch in normaler Kolonmukosa nachweisbar. Das alternative Spleißen von *MSH2* Exon 13 war auch bei Clarke et al., 2000 nur in

Blutlymphozyten, Makrophagen, und Haut, nicht aber in Kolonmukosa oder anderen Geweben nachweisbar.

Dennoch wird in allen Zielgeweben Lynch-Syndrom-assoziiierter Tumore dasselbe MMR-Protein gebildet, und das vorwiegende mRNA-Transkript für die Translation wird in allen Geweben gleich gespleißt. Beim aberrantem Spleißen, das durch eine Keimbahnmutation verursacht wird, ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse von Blutlymphozyten sich auf andere Gewebe übertragen lassen. Daher sollte die Pathogenität einer Mutation, die das normale Spleißen verhindert, auf alle Gewebe übertragbar sein. Die Tatsache, dass die Mutationen, die in Blutlymphozyten pathogene Effekte zeigen, bei Patienten mit Lynch-Syndrom-assoziierten Tumoren auftreten und zu Mikrosatelliteninstabilität und immunhistochemischem Ausfall des betroffenen Proteins im Tumor führen, bekräftigt diese Annahme. Um das tatsächliche Ausmaß des aberranten Spleißens durch Sequenzveränderungen in Zellen der Darmmukosa zu bestimmen, müssen Untersuchungen an entsprechenden Zellen durchgeführt werden. Dazu ist die Gewinnung von cDNA aus Darmepithelzellen von betroffenen Patienten im direkten Anschluss an die Biopsie bei einer Koloskopie erforderlich. Eine entsprechende Untersuchung zur Bestätigung der in Blut identifizierten Spleißmutationen war im Rahmen der Doktorarbeit bisher nicht möglich, ist aber in der Arbeitsgruppe geplant.

4.6. Monoallelische Expression von SNPs

Mit der Untersuchung von heterozygoten SNPs wird zwar nicht die genetische Ursache für die Tumorentstehung geklärt, trotzdem können sie zum Nachweis monoallelischer Expression eines Allels genutzt werden. Damit ist es möglich, das pathogene Allel zu identifizieren. Man kann so zum einen das betroffene Gen gezielter untersuchen, um unter Umständen die Ursache der monoallelischen Expression zu finden. Zum anderen kann man Familienangehörigen anbieten, mit Hilfe einer Segregationsanalyse zu klären, ob sie das pathogene Allel geerbt haben, auch ohne den Pathomechanismus zu kennen.

Eine monoallelische Expression des SNP c.655A>G; p.I219V, die wir bei drei von elf Patienten beobachteten und bei Patient RH nicht erklären konnten, wurde auch von Renkonen et al., 2003 beobachtet: von den 20 nach klinischen und anamnestischen Kriterien ausgewählten mutationsnegativen Patienten zeigte einer eine monoallelische Expression des Polymorphismus. Eine mögliche Erklärung sind intronische Mutationen. Regulatorische Elemente im Intron können sowohl wenige 50-100 als auch bis zu 1000 Basenpaare vom Intron entfernt liegen (Pagani und Baralle, 2004).

Im Choroideremia Gen wurde zum Beispiel eine Mutation an Position c.314+10127T>A beschrieben, die durch Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle zur Insertion eines Pseudoexons von 98 Basenpaaren Länge führt (van den Hurk et al., 2003). Um bei unseren Patienten ohne codierenden SNP, bei denen ein Defekt aufgrund eines Ausfall in der Immunhistochemie vermutet wurde, einen ähnlichen Mechanismus auszuschließen, wurden LR-PCRs der Gentranskripte durchgeführt. Trotzdem kann ein unauffälliges Gelbild ein durch intronische Mutationen verändertes Spleißverhalten, das zu einem vollständigen Abbau des mutierten Allels führt, nicht ausschließen.

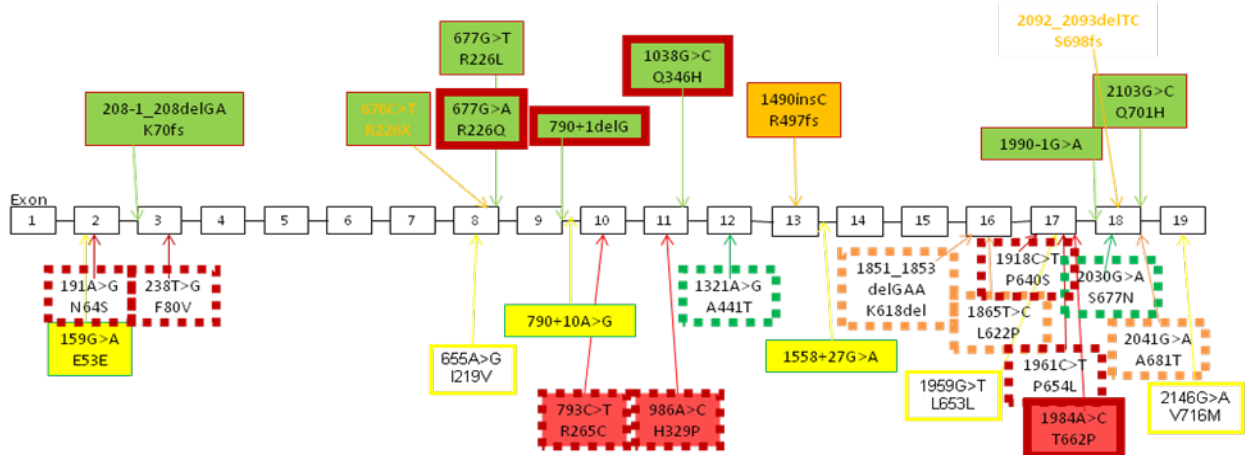
Aber auch Promotorveränderungen sind als Ursache monoallelischer Expression denkbar. In *MLH1* stellt die Methylierung des Promotors eine mögliche Ursache für die transkriptionelle Stilllegung des betroffenen Allels dar (Hitchins und Ward, 2009; Niessen et al., 2009; Morak et al., 2008). So auch bei den von uns analysierten Patienten BO und MK. Beim Patient RH war der *MLH1*-Promotor nicht methyliert. Promotormutationen oder -deletionen wurden im Kernpromotor ebenfalls nicht detektiert.

Bei *MSH2*-defizienten ungarischen und niederländischen HNPCC-Familien wurden mehr als 5 kb vor dem Transkriptionsstart von *MSH2* gelegene Deletionen beobachtet, die die Promoterregion von *MSH2* nicht beeinträchtigen (Kovacs et al., 2009; Ligtenberg et al., 2009; Niessen et al., 2009). Die großen Keimbahndeletionen umfassen die letzten Exons des *TACSTD1*- (*EPCAM*-) Gens, dessen Stoppcodon und die folgende Polyadenylierungssequenz. Aufgrund der fehlenden Transkriptionstermination des *TACSTD1*-Transkripts kommt es zur Fortsetzung der Transskription über die Promotorregion bis in *MSH2* Exon 2 und 3 hinein. Durch diesen „*read through*“ wird die *MSH2*-Transkription behindert. Es wird eine Methylierung des *MSH2*-Promotors in Zellen mit hoher *TACSTD1*-Expression ausgelöst. Der methylierte Promotor verstärkt eine funktionelle Stilllegung des betroffenen Gens. Bei den Patienten mit *TACSTD1*-Deletionen wurden ein *MSH2*-Ausfall in der Immunhistochemie und eine Mikrosatelliteninstabilität im Tumor beobachtet. Das ist ein Beispiel dafür, dass auch entfernte Regionen die Transkription auf komplexe Weise verändern können.

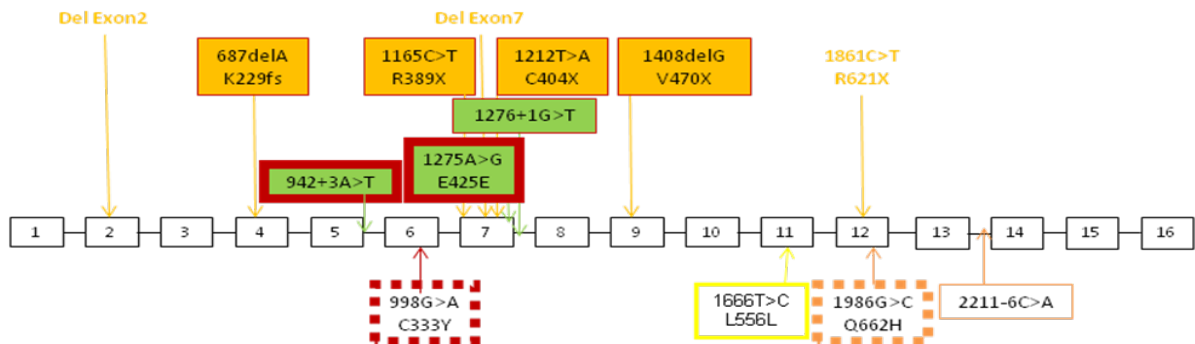
Ein weiteres Beispiel für Pathomechanismen, die zu monoallelischer Expression führen, sind genomische Umbauten, wie Inversionen, bei denen die Genfunktion zerstört wird.

4.7. Übersicht der untersuchten Sequenzveränderungen im Vergleich mit Literaturdaten

MLH1:



MSH2:



MSH6:

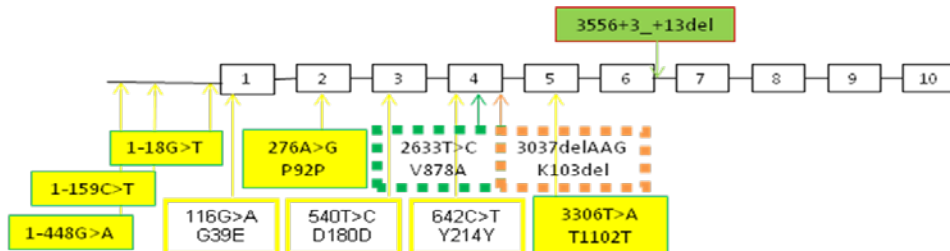


Abbildung 36: Zusammenfassung für alle Gene: Vergleich mit Literaturdaten

Sequenzveränderungen und Mutationen, die in unseren Analysen pathogen waren: neu
Sequenzveränderungen und Mutationen, die in unseren Analysen fraglich blieben: neu
Sequenzveränderungen und Mutationen, die in unseren Analysen benigne waren: neu
Sequenzveränderungen und Mutationen, die auch in anderen Arbeitsgruppen pathogene Auswirkungen zeigten
Sequenzveränderungen und Mutationen, die auch in anderen Arbeitsgruppen benigne waren
Unklare Sequenzveränderungen, bei denen funktionelle Analysen, Konservierung, Bindungsdomäne, Änderung der Ladung und das Vorhersageprogramm Polyphen für einen pathologischen Funktionsverlust sprechen
Unklare Sequenzveränderungen, bei denen funktionelle Analysen, Konservierung, Bindungsdomäne, Änderung der Ladung und das Vorhersageprogramm Polyphen fraglich sind
Unklare Sequenzveränderungen, bei denen funktionelle Analysen, Konservierung, Bindungsdomäne, Änderung der Ladung und das Vorhersageprogramm Polyphen für Benignität sprechen

4.8. Ausblick

Im Rahmen von weiterführenden cDNA-Untersuchungen könnten vor allem folgende Fragestellungen näher untersucht werden:

Bei den Patienten mit monoallelischer Expression und vermutetem NMD gibt es die Möglichkeit mit Hilfe von Puromycin den Abbau durch NMD zu verhindern (Nomura et al., 2000). Auf diese Weise könnte aberrantes Spleißen nachgewiesen werden, auch wenn im aberrant gespleißten Transkript durch *Exon-Skipping* ein vorzeitiges Stoppcodon entsteht. Mit dieser Methode könnte man die Missense-Mutationen in *MLH1*: c.793C>T; p.R265C und c.986A>C; p.H329P, die in unseren Analysen einen fast vollständigen Abbau des mutierten Allels induzierten, näher untersuchen und nachweisen welche Exons dadurch aberrant gespleißt werden.

Auch beim Patienten RH mit einer monoallelischen Expression unklarer Ursache im SNP c.655A>G; p.I219V von *MLH1* Exon 8 könnte eine Hemmung des NMDs hilfreich sein. Möglicherweise liegt hier ein aberrantes Spleißen vor, das z.B. durch eine intronische Veränderung hervorgerufen wird und normalerweise vom NMD abgebaut wird. Findet man kein aberrantes Transkript, so wird das fehlende Allel vermutlich nicht transkribiert, in diesem Fall muss nach den Ursachen (wie z.B. Promotordefekte oder größere genomische Rearrangements wie Inversionen) gesucht werden. Um spleißverändernde intronische Veränderungen genomisch nachzuweisen, kann auch eine Amplifikation und Sequenzierung der in Frage kommenden Introns von *MLH1* durchgeführt werden. Intronische Sequenzveränderungen und stille Mutationen, die auf cDNA-Ebene keine Pathogenität zeigten, konnten als nicht-pathogen eingestuft werden. Bei Missense-Mutationen dagegen, die auf cDNA-Ebene spleißneutral sind, müssen in weiterführenden funktionellen Analysen im Protein die Auswirkung der Aminosäurenveränderung charakterisiert werden.

Bei Patienten mit Ausfall in der Immunhistochemie, die weder codierende unklare Sequenzveränderungen noch Polymorphismen hatten, könnte man mit Hilfe einer quantitativen Methode überprüfen, ob eine Transkription beider Allele des Gens stattfindet. Im Falle einer biallelischen Expression des Gens ist von einer sporadischen Tumorentstehung mit Genstilllegung über Methylierung auszugehen, das trifft vor allem für Patienten mit *MLH1*-Ausfall im Tumor zu, oder zwei somatischen Mutationen im *MMR*-Gen, ein Keimbahndefekt im *MMR*-Gen ist damit unwahrscheinlich. Bei monoallelischer Expression dagegen muss nach dem zugrunde liegenden Pathomechanismus gesucht werden. Hier kommen verschiedene Möglichkeiten in Frage, die die Transkription verhindern oder nicht zum Transkript führen, das untersucht wird.

Die in unseren Untersuchungen auf cDNA-Ebene aus Blutlymphozyten verifizierten Spleißmutationen müssen in Untersuchungen an cDNA aus Darmmukosa bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

Insgesamt wurde von 75 Patienten mit Verdacht auf Lynch-Syndrom PAXgene-cDNA auf Spleißveränderungen untersucht. Davon waren zwölf Patienten Träger von Mutationen an der Spleißakzeptor- bzw. Spleißdonorstelle von Exons der Gene *MLH1*, *MSH2* oder *MSH6*, die alle -wie erwartet- ein aberrantes Spleißen der mRNA verursachten. Dabei kam es aber bei einigen Patienten zu einem aberranten Spleißen, das nicht nur das betroffene Exon, sondern zusätzlich ein oder mehrere benachbarte Exons aus dem Transkript mitentfernte. Bei zwei Patienten konnte die Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle beobachtet werden.

Von den neun Patienten, die Träger eines vorzeitigen Stoppcodons waren, konnte in drei Patienten der erwartete Abbau des mutierten Allels durch NMD nicht nachgewiesen werden. Die Ursache für interindividuelle Unterschiede in der Effizienz des NMD sind noch unklar.

Die größte Bedeutung haben die hier durchgeführten cDNA-Analysen für Patienten mit Sequenzveränderungen unklarer Pathogenität. Bei fünf von 26 Patienten mit unklaren Sequenzveränderungen konnte deren Pathogenität bereits auf cDNA-Ebene durch den Nachweis ihrer spleißverändernden Wirkung gezeigt werden. Die Sequenzveränderung in *MLH1*: c.1984A>C; p.T662P führte in der cDNA der Patientin zu einem stark verstärkten aberranten Spleißen von Exon 17. Bei Vorliegen der Mutation c.986A>C; p.H329P in *MLH1* Exon 11 wurde das mutierte Allel aufgrund eines Spleißdefekts in zwei unabhängigen Patienten zum großen Teil abgebaut. Auch bei der Mutation in *MLH1* Exon 10: c.793C>T; p.R265C wurde das mutationstragende Allel in zwei Patienten falsch gespleißt und abgebaut. Wir vermuten als zugrundeliegenden Mechanismus den NMD der aberranten Spleißtranskripte mit Leserahmenverschiebung und vorzeitigem Stoppcodon. Damit handelt es sich bei 19% der Patienten mit unklarer Sequenzveränderung um eine spleißverändernde Mutation, obwohl sich die Sequenzveränderungen nicht in den konservierten Positionen der Spleißsequenzen am Anfang oder Ende des Exons befinden. Bei 35% der Patienten konnte die unklare Sequenzveränderung als nicht-pathogen gewertet werden. Es handelt sich um drei stille Mutationen, zwei intronische Mutationen und drei Promotormutationen, die biallelisch exprimiert werden. Die übrigen Missense-Mutationen können nur in funktionellen Untersuchungen auf Proteinebene abschließend geklärt werden.

Aber auch bei 28 Patienten ohne fraglich pathogene Sequenzveränderung waren cDNA-Analysen hilfreich. In 19% der Fälle wurde ein vorhandener SNP nur monoallelisch exprimiert, so konnten wir, selbst wenn die Ursache vorerst unbekannt blieb, den Defekt eines Allels nachweisen. Von den drei Patienten mit monoallelischer Expression in *MLH1* blieb bei

einem die Ursache bisher unklar, bei zweien konnte eine Methylierung des Promotors auf einem Allel als Ursache nachgewiesen werden.

Long Range-PCRs zur Amplifikation des ganzen Gentranskripts wurden bei 18 Patienten mit immunhistochemischem Ausfall ohne codierende Sequenzveränderung im jeweiligen Gen durchgeführt. Dabei konnte bei keinem der untersuchten Patienten aberrantes Spleißen nachgewiesen werden.

Die cDNA-Analysen können also bei den ca. 30% der Patienten mit Verdacht auf Lynch-Syndrom, aber ohne sicher pathogene Mutation durchaus hilfreich sein. Wenn auf cDNA-Ebene ein Spleißdefekt gezeigt wird, liegt ein Keimbahndefekt mit Prädisposition für die Tumorerkrankung vor und gegebenenfalls kann die zugrundeliegende genetische Ursache erklärt werden. Damit geben wir den Angehörigen der Patienten die Möglichkeit sich über prädiktive Diagnostik untersuchen zu lassen, ob sie das pathogene Allel tragen.

Trotzdem bleiben bei zahlreichen Patienten die molekularen Mechanismen, die für die Tumorentstehung verantwortlich sind, weiter unklar. Zum einen können in den untersuchten Genen nicht detektierte Pathomechanismen vorliegen, zum anderen können aber auch Mutationen in anderen Genen für die Tumore verantwortlich sein, wie z.B. Mutationen im *MUTYH*-Gen der Basen-Exzisions-Reparatur. Die Komplexität der Tumorentstehung wirft noch viele spannende Fragen auf.

6. Literaturverzeichnis

- Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen HJ (1999). Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 81(2): 214-8.
- Auclair J, Busine MP, Navarro C, Ruano E, Montmain G, Desseigne F, Saurin JC, Lasset C, Bonadona V, Giraud S, Puisieux A and Wang Q (2006). Systematic mRNA analysis for the effect of *MLH1* and *MSH2* missense and silent mutations on aberrant splicing. *Hum Mutat* 27(2): 145-54.
- Barnetson RA, Cartwright N, van Vliet A, Haq N, Drew K, Farrington S, Williams N, Warner J, Campbell H, Porteous ME, Dunlop MG (2008). Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer. *Hum Mutat* 29(3): 367-74.
- Bateman JF, Freddi S, Natrass G, Savarirayan R (2003). Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage. *Hum Mol Genet.* 12(3): 217-25.
- Black DL (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
- Blencowe BJ (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 25(3): 106-10.
- Blencowe BJ (2006). Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126(1): 37-47.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN and Srivastava S (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58(22): 5248-57.
- Byers PH (2002). Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest* 109(1): 3-6.
- Cartegni L, Chew SL and Krainer AR (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3(4): 285-98.
- Chang YF, Imam JS and Wilkinson MF (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76: 51-74.
- Clarke LA, Jordan P and Boavida MG (2000). Cell type specificity in alternative splicing of the human mismatch repair gene *hMSH2*. *Eur J Hum Genet* 8(5): 347-52.
- Davoodi-Semiromi A, Lanyon GW, Davidson R, Connor MJ (2000). Aberrant RNA splicing in the *hMSH2* gene: molecular identification of three aberrant RNA in Scottish patients with colorectal cancer in the West of Scotland. *Am J Med Genet* 95(1):49-52.

- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R and Rüschoff J (1997). Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57(21): 4749-56.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19(14): 4008.
- Ellison AR, Lofing J and Bitter GA (2001). Functional analysis of human *MLH1* and *MSH2* missense variants and hybrid human-yeast *MLH1* proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* 10(18): 1889-900.
- Fairbrother WG, Chasin LA (2000). Human genomic sequences that inhibit splicing. *Mol Cell Biol* 20(18): 6816-25.
- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297(5583): 1007-13.
- Froggatt NJ, Brassett C, Koch DJ, Evans DG, Hodgson SV, Ponder BA, Maher ER (1996). Mutation screening of *MSH2* and *MLH1* mRNA in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome. *J Med Genet* 33(9): 726-30.
- Geißler M and Graeven U (2005). Das kolorektale Karzinom. Evidenzbasierte Leitlinien. Thieme, Stuttgart.
- Genuardi M, Viel A, Bonora D, Capozzi E, Bellacosa A, Leonardi F, Valle R, Ventura A, Pedroni M, Boiocchi M and Neri G (1998). Characterization of *MLH1* and *MSH2* alternative splicing and its relevance to molecular testing of colorectal cancer susceptibility. *Hum Genet* 102(1): 15-20.
- Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, Wijnen JT, van Schooten RJ, Dommering CJ, Meijer GA, Craanen ME, Nederlof PM, de Jong D, McElgunn CJ, Schouten JP and Menko FH (2002). Genomic deletions of *MSH2* and *MLH1* in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer* 87(8): 892-7.
- Goecke T, Schulmann K, Engel C, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Schackert HK, Kloor M, Kunstmann E, Vogelsang H, Keller G, Dietmaier W, Mangold E, Friedrichs N, Propping P, Kruger S, Gebert J, Schmiegel W, Rueschoff J, Loeffler M and Moeslein G (2006). Genotype-phenotype comparison of German *MLH1* and *MSH2* mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. *J Clin Oncol* 24(26): 4285-92.
- Grabowski M, Mueller-Koch Y, Grasbon-Frodl E, Koehler U, Keller G, Vogelsang H, Dietmaier W, Kopp R, Siebers U, Schmitt W, Neitzel B, Gruber M, Doerner C, Kerker B, Ruemmele P, Henke G and Holinski-Feder E (2005). Deletions account for 17% of pathogenic germline alterations in *MLH1* and *MSH2* in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Genet Test* 9(2): 138-46.
- Hernegger GS, Moore HG and Guillem JG (2002). Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. *Dis Colon Rectum* 45(1): 127-34; discussion 134-6.

- Hitchins MP, Ward RL (2009). Constitutional (germline) *MLH1* epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 46(12):793-802.
- Holinski-Feder E and Grabowski M (2006). Erbliches nicht polypöses kolorektales Karzinom - HNPCC. *Med Genet*.
- Holinski-Feder E and Morak M (2008). [Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma: state of the art]. *Dtsch Med Wochenschr* 133(33): 1690-5.
- Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J and Leggett BA (2002). Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *Eur J Cancer* 38(7): 858-66.
- Jiricny J and Nyström-Lahti M (2000). Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 10(2): 157-61.
- Karp G (2005). *Molekulare Zellbiologie*. Springer, Berlin.
- Kerr TP, Sewry CA, Robb SA, Roberts RG (2001). Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet*. 109(4): 402-7.
- Kolodner R (1996). Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* 10(12): 1433-42.
- Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP (1999). Germ-line *msh6* mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 59(20): 5068-74.
- Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E (2009). Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 30(2):197-203.
- Kozak M (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299(1-2):1-34.
- Krawczak M, Reiss J and Cooper DN (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90(1-2): 41-54.
- Krüger S, Bier A, Plaschke J, Höhl R, Aust DE, Kreuz FR, Pistorius SR, Saeger HD, Rothhammer V, Al-Taie O, Schackert HK (2004). Ten novel *MSH2* and *MLH1* germline mutations in families with HNPCC. *Hum Mutat* 24(4): 351-2.
- Lewin B (1994). *Genes V*. Oxford University Press, New York.
- Lewin B (2003). *Genes VIII*. Benjamin Cummings; United States Ed edition.
- Lewis BP, Green RE and Brenner SE (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 189-92.

- Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, van Kessel AG, Yuen ST, van Krieken JH, Leung SY, Hoogerbrugge N (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 41(1):112-7.
- Linde L, Boelz S, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem B (2007). The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells. *Eur J Hum Genet*. 15(11): 1156-62.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B and Kinzler KW (1996). Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 2(2): 169-74.
- Lynch HT and de la Chapelle A (1999). Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 36(11): 801-18.
- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR (1993). Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 104(5): 1535-49.
- Magyar I, Colman D, Arnold E, Baumgartner D, Bottani A, Fokstuen S, Addor MC, Berger W, Carrel T, Steinmann B, Mátyás G (2009). Quantitative sequence analysis of FBN1 premature termination codons provides evidence for incomplete NMD in leukocytes. *Hum Mutat*. 30(9): 1355-64.
- Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Mathiak M, Buettner R, Engel C, Loeffler M, Holinski-Feder E, Muller-Koch Y, Keller G, Schackert HK, Kruger S, Goecke T, Moeslein G, Kloor M, Gebert J, Kunstmann E, Schulmann K, Ruschoff J and Propping P (2005). Spectrum and frequencies of mutations in *MSH2* and *MLH1* identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 116(5): 692-702.
- Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C (2001). Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res* 29(13): 2850-9.
- Modrek B and Lee C (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 30(1): 13-9.
- Morak M, Schackert HK, Rahner N, Betz B, Ebert M, Walldorf C, Royer-Pokora B, Schulmann K, von Knebel-Doerberitz M, Dietmaier W, Keller G, Kerker B, Leitner G, Holinski-Feder E (2008). Further evidence for heritability of an epimutation in one of 12 cases with *MLH1* promoter methylation in blood cells clinically displaying HNPCC. *Eur J Hum Genet* 16(7):804-11.
- Mori Y, Shiwaku H, Fukushige S, Wakatsuki S, Sato M, Nukiwa T and Horii A (1997). Alternative splicing of h*MSH2* in normal human tissues. *Hum Genet* 99(5): 590-5.
- Moslein G, Tester DJ, Lindor NM, Honchel R, Cunningham JM, French AJ, Halling KC, Schwab M, Goretzki P and Thibodeau SN (1996). Microsatellite instability and mutation analysis of h*MSH2* and h*MLH1* in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 5(9): 1245-52.

- Mueller-Koch Y, Vogelsang H, Kopp R, Lohse P, Keller G, Aust D, Muders M, Gross M, Daum J, Schiemann U, Grabowski M, Scholz M, Kerker B, Becker I, Henke G and Holinski-Feder E (2005). Hereditary non-polyposis colorectal cancer: clinical and molecular evidence for a new entity of hereditary colorectal cancer. *Gut* 54(12): 1733-40.
- Neklason DW, Solomon CH, Dalton AL, Kuwada SK and Burt RW (2004). Intron 4 mutation in *APC* gene results in splice defect and attenuated FAP phenotype. *Fam Cancer* 3(1): 35-40.
- Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Hollema H, Ligtenberg MJ, de Walle HE, de Vries EG, Karrenbeld A, Buys CH, van der Zee AG, Hofstra RM and Kleibeuker JH (2006). Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 55(12): 1781-8.
- Niessen RC, Hofstra RM, Westers H, Ligtenberg MJ, Kooi K, Jager PO, de Groote ML, Dijkhuizen T, Olderode-Berends MJ, Hollema H, Kleibeuker JH, Sijmons RH (2009). Germline hypermethylation of *MLH1* and *EPCAM* deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 48(8):737-44.
- Nomura S, Sugano K, Kashiwabara H, Taniguchi T, Fukayama N, Fujita S, Akasu T, Moriya Y, Ohhigashi S, Kakizoe T and Sekiya T (2000). Enhanced detection of deleterious and other germline mutations of *hMSH2* and *hMLH1* in Japanese hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Biochem Biophys Res Commun* 271(1): 120-9.
- Ollila S, Sarantaus L, Kariola R, Chan P, Hampel H, Holinski-Feder E, Macrae F, Kohonen-Corish M, Gerdes AM, Peltomäki P, Mangold E, de la Chapelle A, Greenblatt M, Nyström M (2006). Pathogenicity of *MSH2* missense mutations is typically associated with impaired repair capability of the mutated protein. *Gastroenterology* 131(5): 1408-17.
- Pagani F and Baralle FE (2004). Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 5(5): 389-96.
- Pagenstecher C, Wehner M, Friedl W, Rahner N, Aretz S, Friedrichs N, Sengteller M, Henn W, Buettner R, Propping P and Mangold E (2006). Aberrant splicing in *MLH1* and *MSH2* due to exonic and intronic variants. *Hum Genet* 119(1-2): 9-22.
- Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R and Montuenga LM (2007). Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 8(4): 349-57.
- Peltomäki P (2005). Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 4(3): 227-32.
- Plaschke J, Engel C, Kruger S, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Mangold E, Moeslein G, Schulmann K, Gebert J, von Knebel Doeberitz M, Ruschoff J, Loeffler M and Schackert HK (2004). Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic *MSH6* germline mutations compared with families with *MLH1* or *MSH2* mutations: the German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium. *J Clin Oncol* 22(22): 4486-94.
- Prince RC and Gunson DE (1998). Prions are copper-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 23(6): 197-8.

- Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, Hampel H, Lynch E, Lonnqvist KE, Holinski-Feder E, Sutter C, McKinnon W, Duraisamy S, Gerdes AM, Peltomaki P, Kohonen-Ccorish M, Mangold E, Macrae F, Greenblatt M, de la Chapelle A and Nystrom M (2005). Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of *MLH1*. *Gastroenterology* 129(2): 537-49.
- Renkonen E, Zhang Y, Lohi H, Salovaara R, Abdel-Rahman WM, Nilbert M, Aittomaki K, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Lindblom A and Peltomaki P (2003). Altered expression of *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* in predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21(19): 3629-37.
- Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M and Gallinger S (2003). Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349(3): 247-57.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-91.
- Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ and Mecklin JP (1996). Better survival rates in patients with *MLH1*-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 110(3): 682-7.
- Schimpf S, Fuhrmann N, Schaich S, Wissinger B (2008). Comprehensive cDNA study and quantitative transcript analysis of mutant OPA1 transcripts containing premature termination codons. *Hum Mutat.* 29(1): 106-12.
- Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rödel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C (2008). Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Z Gastroenterol* 46(8): 799-840.
- Sharp A, Pichert G, Lucassen A and Eccles D (2004). RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in *MLH1* and *BRCA1*. *Hum Mutat* 24(3): 272.
- Spaepen M, Vankeirsbilck B, Van Opstal S, Tejpar S, Van Cutsem E, Geboes K, Legius E and Matthijs G (2006). Germline mutations of the h*MLH1* and h*MSH2* mismatch repair genes in Belgian hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) patients. *Fam Cancer* 5(2): 179-89.
- Strachan T and Read AP (2005). *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Takahashi M, Shimodaira H, Andreutti-Zaugg C, Iggo R, Kolodner RD and Ishioka C (2007). Functional analysis of human *MLH1* variants using yeast and *in vitro* mismatch repair assays. *Cancer Res* 67(10): 4595-604.
- Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengut S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA and Concannon P (1999). Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 64(6): 1617-31.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN and Srivastava S (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96(4): 261-8.

van den Hurk JA, van de Pol DJ, Wissinger B, van Driel MA, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, van den Born LI, Heckenlively JR, Brunner HG, Zrenner E, Ropers HH and Cremers FP (2003). Novel types of mutation in the choroideremia (CHM) gene: a full-length L1 insertion and an intronic mutation activating a cryptic exon. *Hum Genet* 113(3): 268-75.

Vasen HF and Muller H (1991). [DNA studies in families with hereditary forms of cancer]. *Ned Tijdschr Geneesk* 135(36): 1620-3.

Vasen HF, van Ballegooijen M, Buskens E, Kleibeuker JK, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Menko FH and Meera Khan P (1998). A cost-effectiveness analysis of colorectal screening of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma gene carriers. *Cancer* 82(9): 1632-7.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP and Lynch HT (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116(6): 1453-6.

Venables JP and Burn J (2006). EASI--enrichment of alternatively spliced isoforms. *Nucleic Acids Res* 34(15): e103.

Wagner E and Lykke-Andersen J (2002). mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci* 115(Pt 15): 3033-8.

Wang J, Chang YF, Hamilton JI, Wilkinson MF (2002). Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 10(4): 951-7.

Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, Propping P and Mangold E (2003). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in *MSH2* and *MLH1* genes. *Int J Cancer* 103(5): 636-41.

Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, Smyrk T, Lemon S, Shashidharan M, Franklin B, Karr B, Thorson A and Lynch HT (1998). Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer* 83(2): 259-66.

Wilkinson MF (2005). A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet* 21(3): 143-8.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A1	Amsterdam I-Kriterien
A2	Amsterdam II-Kriterien
Abb.	Abbildung
APC	Adenomatöse Polyposis coli
AS	Aminosäure
B	Bethesda-Kriterien
BP	Basenpaare
<i>BRAF</i>	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
C	Cytosin
Ca	Karzinom
cDNA	komplementäre DNA
CRC	kolorektales Karzinom
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
del	Deletion
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DHPLC	denaturierende <i>High Performance</i> („Hochdurchsatz-“) Flüssigkeitschromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribo-Nukleotid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EJC	<i>Exon-junction-complex</i>
ESE	<i>Exon Splice Enhancer</i>
ESS	<i>Exon Splice Silencer</i>
F	vorwärts (<i>forward</i>)
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
fs	Leserahmenverschiebung (<i>frameshift</i>)
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom
HRM	<i>High resolution melting</i>
if	ohne Leserahmenverschiebung (<i>in frame</i>)
IHC	Immunhistochemie
ins	Insertion
ISE	<i>Intron Splice Enhancer</i>
ISS	<i>Intron Splice Silencer</i>
J	Jahre
kb	Kilobasen

krypt.	kryptisch
LR	<i>Long Range</i>
<i>MLH1</i>	Mut L homolog 1
MLPA	Multiplex-ligationsabhängige Proben-Amplifikation
MMR	Reparatursystem für Basenfehlpaarungen (<i>Mismatch-Repair-System</i>)
mRNA	Boten- (<i>messenger-</i>) RNA
<i>MSH2</i>	<i>Mut S homolog 2</i>
<i>MSH6</i>	<i>Mut S homolog 6</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	hohe Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
n.a.	nicht auswertbar
NMD	<i>Nonsense-mediated-mRNA-decay</i>
oB	ohne pathologischen Befund
oof	mit Leserahmenverschiebung (<i>out of frame</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>PMS2</i>	<i>Postmeiotic segregation increased 2</i>
PTC	vorzeitiges Stoppcodon (<i>premature termination codon</i>)
R	rückwärts (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
T	Thymin
TRIS	Trisaminomethan
U	Uracil
UTR	untranslatierte Region
Z.n.	Zustand nach
z.T.	zum Teil
Δ	Deletion

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielstammbäume.....	10
Abbildung 2: Der Spleißmechanismus.....	14
Abbildung 3: Prozentuale Konservierung der am Spleißen beteiligten Basen.....	14
Abbildung 4: Möglichkeiten des alternativen und aberranten Spleißens.....	16
Abbildung 5: <i>Nonsense-mediated-mRNA-decay</i> (NMD).....	17
Abbildung 6: Patientin GU <i>MLH1</i> c.208-1_208delGA.....	31
Abbildung 7: Patienten MJ <i>MLH1</i> c.677G>T und RC <i>MLH1</i> c.677G>A.....	32
Abbildung 8: Patient GT <i>MLH1</i> c.676C>T.....	33
Abbildung 9: Patientin PM <i>MLH1</i> c.790+1delG.....	33
Abbildung 10: Patient KU <i>MLH1</i> c.1038C>G.....	34
Abbildung 11: Patienten NW <i>MLH1</i> c.2103G>C und OS <i>MLH1</i> c.1990-1G>A.....	35
Abbildung 12: Patient WL <i>MLH1</i> Exon 13: c.1490insC.....	36
Abbildung 13: Patient DU <i>MLH1</i> Exon 18: c.2092_2093delTC.....	37
Abbildung 14: Patientin RM <i>MSH2</i> c.942+3A>T.....	37
Abbildung 15: Patienten BE <i>MSH2</i> c.1276+1G>T und TW <i>MSH2</i> c.1275A>G.....	38
Abbildung 16: Patientin NH <i>MSH2</i> Del Exon 2; p.G71GfsX10.....	40
Abbildung 17: Patient JW <i>MSH2</i> Exon 4: c.687delA; p.K229KfsX17.....	40
Abbildung 18: Patientin PJ <i>MSH2</i> c.1165C>T; p.R389X.....	41
Abbildung 19: Patientin DK <i>MSH2</i> c.1212T>A; p.C404X.....	41
Abbildung 20: Patientin TM <i>MSH2</i> Exon 9: c.1408delG; p.V470X.....	41
Abbildung 21: Patientin GE <i>MSH2</i> c.1861C>T; p.R261X.....	42
Abbildung 22: Patient SK <i>MSH6</i> c.3556del+3_+13.....	42
Abbildung 23: Patientin OK <i>MLH1</i> c.159G>A; p.E53E.....	44
Abbildung 24: Patienten FU und SM <i>MLH1</i> c.793C>T; p.R265C.....	47
Abbildung 25: Patienten DI und WC <i>MLH1</i> 986A>C; p.H329P.....	48
Abbildung 26: Patientin HJ <i>MLH1</i> c.1984A>C; p.T662P.....	49
Abbildung 27: Patient LR <i>MSH2</i> c.998G>A; p.C333Y.....	49
Abbildung 28: Patient SR <i>MSH6</i> c.276A>G; p.P92P.....	51
Abbildung 29: Patient SY <i>MSH6</i> c.3306T>A; p.T1102T.....	52
Abbildung 30: Patient RH <i>MLH1</i> c.655A>G.....	54
Abbildung 31: Zusammenfassung für alle Gene: Pathogenität der untersuchten Sequenzveränderungen auf RNA-Ebene.....	58

Abbildung 32: Übersicht zur kryptische Spleißstelle in <i>MSH2</i> Exon 7	63
Abbildung 33: <i>MLH1</i> Exon 10: c.793C>T; p.R265C in der <i>in silico</i> -Vorhersage.....	70
Abbildung 34: <i>MLH1</i> Exon 11: 986A>C; p.H329P in der <i>in silico</i> -Vorhersage.....	71
Abbildung 35: <i>MLH1</i> Exon 17: c.1984A>C; p.T662P in der <i>in silico</i> -Vorhersage.....	71
Abbildung 36: Zusammenfassung für alle Gene: Vergleich mit Literaturdaten.....	77

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien für Ampli-Taq Gold PCR-Ansatz.....	24
Tabelle 2: Reagenzien für <i>Long Range</i> -PCR Ansatz.....	25
Tabelle 3: Patienten mit Mutationen in <i>MLH1</i> , bei denen ein Spleißdefekt vorhergesagt wird	30
Tabelle 4: Patienten mit Mutationen in <i>MLH1</i> , die ein vorzeitiges Stoppcodon induzieren.....	36
Tabelle 5: Patienten mit Mutationen in <i>MSH2</i> , bei denen ein Spleißdefekt vorhergesagt wird	37
Tabelle 6: Patienten mit Mutationen in <i>MSH2</i> , die ein vorzeitiges Stoppcodon induzieren.....	39
Tabelle 7: Patienten mit Mutationen in <i>MSH6</i> , bei denen ein Spleißdefekt vorhergesagt wird	42
Tabelle 8: Patienten mit biallelisch exprimierter unklarer Sequenzveränderung in <i>MLH1</i>	43
Tabelle 9: Patienten mit monoallelisch oder stark reduziert exprimierter unklarer Sequenzveränderung in <i>MLH1</i>	46
Tabelle 10: Patienten mit unklarer Sequenzveränderung in <i>MSH2</i>	49
Tabelle 11: Patienten mit unklarer Sequenzveränderung in <i>MSH6</i>	50
Tabelle 12: Patienten mit biallelischer Expression des p.I219V Polymorphismus in <i>MLH1</i>	52
Tabelle 13: Patienten mit monoallelischer Expression des p.I219V Polymorphismus in <i>MLH1</i>	53
Tabelle 14: Patienten mit weiteren Polymorphismen in <i>MLH1</i>	55
Tabelle 15: Patienten mit Polymorphismen in <i>MSH2</i>	55
Tabelle 16: Patienten mit immunhistochemischem Ausfall ohne codierende Sequenzveränderung	56
Tabelle 17: Patienten mit fraglich pathogenen Sequenzveränderungen.....	74

Anhang

Primersequenzen:

<i>MLH1_c1Fn</i>	GCTGGACGAGACAGTGGT
<i>MLH1_c1F</i>	GCGGCCAGCTAATGCTATC
<i>MLH1_c3F</i>	TGTATGTGAAAGGTTCACTAC
<i>MLH1_c4F</i>	TACAACGAAAACAGCTGATGG
<i>MLH1_c6Fn</i>	TAGCCACGAGGAGAAAAGC
<i>MLH1_c7/8F</i>	CTCAGTTAAAAACAAGGAGAG
<i>MLH1_c8Fn</i>	TGTTAGGACACTACCCAATG
<i>MLH1_c8F</i>	TTCGCTCCATCTTTGGAAATG
<i>MLH1_c9F</i>	CCCTAGCCTTCAAAATGAATG
<i>MLH1_c10F</i>	TCAACTTCCTTGAGAAAAGCC
<i>MLH1_c11F</i>	GCAGCACATCGAGAGCAAG
<i>MLH1_c12F</i>	GATAAGACAGATATTTCTAGTG
<i>MLH1_c13F</i>	GGAGAAGGATCATTAACTC
<i>MLH1_c13Fn</i>	GAGTCTCCAGGAAGAAATTA
<i>MLH1_c16F</i>	TGGTCCCAAAGAAGGACTTG
<i>MLH1_c5R</i>	GGGGCTTTCAGTTTTCCATC
<i>MLH1_c6Rn</i>	TTCCCATATTCTTCACTTGG
<i>MLH1_c8/9R</i>	TTTCTATCAGTTCTCGACTAAC
<i>MLH1_c9R</i>	CATTCATTTTGAAGGCTAGGG
<i>MLH1_c9Rn</i>	TGCACTTCTTCACTGAGTAG
<i>MLH1_c10R</i>	GTACAGGAATGGGTGTGTG
<i>MLH1_c11Rn</i>	CATCCTGGAGGAATTGGAG
<i>MLH1_c12R</i>	CGAGGTCAGACTTGTGTGTG
<i>MLH1_c12Rn</i>	TTGGCAGCCACTTCAGCAG
<i>MLH1_c14R</i>	CCCACGAAGGAGTGGTTATG
<i>MLH1_c14Rn</i>	CAAGGCCCACTGAGGATTC
<i>MLH1_c16R</i>	TGCAAGCATCTCAGCCTTC
<i>MLH1_c17R</i>	AAAGGGGGCACATAGTTGTC
<i>MLH1_c18R</i>	GGTCGACTCCTCAGATATG
<i>MLH1_c19R</i>	GATCAGGCAGGTTAGCAAGC
<i>MLH1_c19Rn</i>	AGAACACATCCCACAGTGC
<i>MSH2_c1F</i>	CCAGGGGGTGATCAAGTAC
<i>MSH2_c2F</i>	TGGAAATAAGGCATCCAAGG
<i>MSH2_c4F</i>	CCTCAACCGGTTGTTGAAAG
<i>MSH2_c5F</i>	GGATATTGCAGCAGTCAGAGC
<i>MSH2_c7F</i>	CAAACCTACAAGATTGTTACCG
<i>MSH2_c10F</i>	TAGTACTGTAGATATCCAGAAG
<i>MSH2_c11F</i>	CCAGGATGCCATTGTTAAAG
<i>MSH2_c13F</i>	GTTTCATGGCTGAAATGTTGG
<i>MSH2_c3R</i>	CTCTCCTCCGGGTAAAACAC
<i>MSH2_c4R</i>	TTCAACAACCGGTTGAGGTC
<i>MSH2_c6R</i>	AGGCAGCCAGAGACTGAGAG
<i>MSH2_c8R</i>	TTTCCTGAAACTTGGAGAAGTC

<i>MSH2_c11R</i>	TAACAATGGCATCCTGGGC
<i>MSH2_c13R</i>	TGGGCCATGAGTACTATCAC
<i>MSH2_c14R</i>	TAATGAATCTTTGGTTGCAGAC
<i>MSH2_c16R</i>	AGGGCATTGTTCACCTTG
<i>MSH6_5'-UTR</i>	CGCGCGGTAGATGCGGTGCTTTTAG
<i>MSH6_c1Fn</i>	CGCTGAGTGATGCCAACAA
<i>MSH6_c1F</i>	AAGGCGAAGAACCTCAACG
<i>MSH6_c3F</i>	GCTTGAATTGGCAGTTTGTG
<i>MSH6_c4if</i>	TTTCTGCTCTGGAAGGATTC
<i>MSH6_c4jF</i>	TGAACAGAGCCTCCTGGAAT
<i>MSH6_c4F</i>	GGCGACTGTTCTATAACTTTG
<i>MSH6_c5F</i>	GGCAAGTCTACGCTTATG
<i>MSH6_c8F</i>	CTTGCTGAGACTATAAAATGTCG
<i>MSH6_c2R</i>	CTGTACATGAACACGGACTG
<i>MSH6_c4R</i>	CGGCTACTTCGCCTAGATCC
<i>MSH6_c5R</i>	ATCTTCCGGCAACAGAATTAC
<i>MSH6_c6R</i>	TCTGTCTGAGGCACCAAGTC
<i>MSH6_c9R</i>	GGCTGGGGTCTTCACATTC
<i>MSH6_c10R</i>	CACCTTTGGTCAGAAGTCAAC

1001 | Exon11 | Exon12
 |
 |← c11Rn-Primer |
 TCCTGGGCTCCAATTCCTCCAGGATGTA CTTT CACCCAGACTTTTGCTACCA
 1051 |
 |← c12R-Primer |
 GGA CTTGCTGGCCCCTCTGGGGAGATGGTTAAATCCACAACAAGTCTGAC
 1101 |
 |
 CTCGTCTTCTACTTCTGGAAGTAGTGATAAGGTCTATGCCACCAGATGG
 1151 |
 |
 TTCGTACAGATTCCC GGGAACAGAAGCTTGATGCATTTCTGCAGCCTCTG
 1201 |
 |
 AGCAAACCCCTGTCCAGTCAGCCCCAGGCCATTGT CACAGAGGATAAGAC
 1251 |
 |← c12F-Primer |
 AGATATTTCTAGTGGCAGGGCTAGGCAGCAAGATGAGGAGATGCTTGAAC
 1301 |
 |← c12Rn-Primer |
 TCCCAGCCCCTGCTGAAGTGGCTGCCAAAATCAGAGCTTGGAGGGGGAT
 1351 |
 |
 ACAACAAAGGGGACTTCAGAAATGTCAGAGAAGAGAGGACCTACTTCCAG
 1401 | Exon12 | Exon13
 |
 CAACCCAGAAAGAGACATCGGGAAGATTCTGATGTGGA AATGGTGGAAAG
 1451 |
 |← c13F-Primer |
 ATGATTCCCGAAAGGAAATGACTGCAGCTTGTACCCCCGGAGAAGGATC
 1501 |
 |← c13Fn-Primer |
 ATTAACCTCACTAGTGTTTTGAGTCTCCAGGAAGAAATTAATGAGCAGGG
 1551 | Exon13 | Exon14
 |
 ACATGAGGTTCTCCGGGAGATGTTGCATAACCACTCCTTCGTGGGCTGTG
 1601 |
 |← c14R-Primer |
 TGAATCCTCAGTGGGCCTTGGCACAGCATCAAACCAAGTTATACCTTCTC
 1651 | Exon14 | Exon15
 |
 AACACCACCAAGCTTAGTGAAGA ACTGTTCTACCAGATACTCATTTATGA
 1701 | Exon15 | Exon16
 |
 TTTTGCCAATTTTGGTGTTCCTCAGGTTATCGGAGCCAGCACCGCTCTTTG
 1751 |
 |
 ACCTTGCCATGCTTGCCTTAGATAGTCCAGAGAGTGGCTGGACAGAGGAA
 1801 |
 |← c16F-Primer |
 GATGGTCCCAAAGAAGGACTTGCTGAATACATTGTTGAGTTTCTGAAGAA
 1851 | Exon16 | Exon17
 |← c16R-Primer |
 GAAGGCTGAGATGCTTGCAGACTATTTCTCTTTGGA AATTGATGAGGAAG
 1901 |
 |
 GGAACCTGATTGGATTACCCCTTCTGATTGACA ACTATGTGCCCCCTTTG
 1951 | Exon17 | Exon18
 |
 GAGGGACTGCCTATCTTCATTCTTCGACTAGCCACTGAGGTGAATTGGGA
 2001 |

CGAAGAAAAGGAATGTTTTGAAAGCCTCAGTAAAGAATGCGCTATGTTCT
 2051 Exon18
 |
 ← c18R-Primer
 ATTCCATCCGGAAGCAGTACATATCTGAGGAGTCGACCCTCTCAGGCCAG
 2101 Exon19
 |
 CAGAGTGAAGTGCCTGGCTCCATTCCAAACTCCTGGAAGTGGACTGTGGA
 2151
 |
 ACACATTGTCTATAAAGCCTTGCGCTCACACATTCTGCCTCCTAAACATT
 2201
 |
 ← c19R-Primer
 TCACAGAAGATGGAAATATCCTGCAGCCTTGCTAACCTGCCTGATCTATAC
 2251 Exon19
 |
 ← c19Rn-Primer
 AAAGTCTTTGAGAGGTGTTAAat atggttatttatgcactgtgggatgtg
 2301
 |
 ttcttcttttctctgtattccgatacaaagtgttgatcaaagtgtgat

MSH2 :

1 Exon1
 |
 ATGGCGGTGCAGCCGAAGGAGACGCTGCAGTTGGAGAGCGCGGCCGAGGT
 51
 |
 CGGCTTCGTGCGCTTCTTTCAGGGCATGCCGGAGAAGCCGACCACCACAG
 101
 |
 TCGCCTTTTCGACCGGGGCGACTTCTATACGGCGCACGGCGAGGACGCG
 151
 |
 ← c1F-Primer
 CTGCTGGCCGCCCGGAGGTGTTCAAGACCCAGGGGGTGATCAAGTACAT
 201 Exon1 Exon2
 |
 GGGCCCGGCAGGAGCAAAGAATCTGCAGAGTGTGTGCTTAGTAAAATGA
 251
 |
 ATTTTGAATCTTTTGTAAGATCTTCTTCTGGTTCGTCAGTATAGAGTT
 301
 |
 ← c2F-Primer
 GAAGTTTATAAGAATAGAGCTGGAAATAAGGCATCCAAGGAGAATGATTG
 351 Exon2 Exon3
 |
 GTATTTGGCATATAAGGCTTCTCCTGGCAATCTCTCTCAGTTTGAAGACA
 401
 |
 TTCTCTTTGGTAACAATGATATGTCAGCTTCCATTGGTGTGTTGTGGGTGTT
 451
 |
 AAAATGTCCGCAGTTGATGGCCAGAGACAGGTTGGAGTTGGGTATGTGGA
 501
 |
 TTCCATACAGAGGAACTAGGACTGTGTGAATTCCTGATAATGATCAGT
 551
 |
 TCTCCAATCTTGAGGCTCTCCTCATCCAGATTGGACCAAAGGAATGTGTT
 601 Exon3 Exon4
 |
 ← c3R-Primer
 TTACCCGGAGGAGAGACTGCTGGAGACATGGGGAAACTGAGACAGATAAT

651
|
TCAAAGAGGAGGAATTCTGATCACAGAAAGAAAAAAGCTGACTTTTCCA
701
|
CAAAGACATTTATCAGGACCTCAACCGGTTGTTGAAAGGCAAAAAGGGA
751
|
GAGCAGATGAATAGTGCTGTATTGCCAGAAATGGAGAATCAGGTTGCAGT
801
|
TTCATCACTGTCTGCGGTAATCAAGTTTTTTAGAACTCTTATCAGATGATT
851
|
CCAACTTTGGACAGTTTGAAGTACTACTTTTGACTTCAGCCAGTATATG
901
|
AAATTGGATATTGCAGCAGTCAGAGCCCTTAACCTTTTTTCAGGGTTCTGT
951
|
TGAAGATAACCACTGGCTCTCAGTCTCTGGCTGCCTTGCTGAATAAGTGTA
1001
|
AAACCCCTCAAGGACAAAGACTTGTTAACCAGTGGATTAAGCAGCCTCTC
1051
|
ATGGATAAGAACAGAATAGAGGAGAGATTGAATTTAGTGGAAGCTTTTGT
1101
|
AGAAGATGCAGAATTGAGGCAGACTTTACAAGAAGATTTACTTCGTCGAT
1151
|
TCCAGATCTTAACCGACTTGCCAAGAAGTTTCAAAGACAAGCAGCAAAC
1201
|
TTACAAGATTGTTACCGACTCTATCAGGGTATAAATCAACTACCTAATGT
1251
|
TATACAGGCTCTGGAAAAACATGAAGGAAAACACCAGAAATTATTGTTGG
1301
|
CAGTTTTTGTGACTCCTCTTACTGATCTTCGTTCTGACTTCTCCAAGTTT
1351
|
CAGGAAATGATAGAAACAACCTTTAGATATGGATCAGGTGGAAAACCATGA
1401
|
ATTCCTTGTA AACCTTCATTTGATCCTAATCTCAGTGAATTAAGAGAAA
1451
|
TAATGAATGACTTGGAAAAGAAGATGCAGTCAACATTAATAAGTGCAGCC
1501
|
AGAGATCTTGGCTTGGACCCTGGCAAACAGATTAAACTGGATTCCAGTGC
1551
|
ACAGTTTGGATATTACTTTTCGTGTAACCTGTAAGGAAGAAAAGTCCTTC
1601
|
GTAACAATAAAAACCTTTAGTACTGTAGATATCCAGAAGAATGGTGTTAAA
1651
|

Diagram illustrating the genomic structure and primer locations for a gene. The sequence is divided into exons (Exon 4 to Exon 11) and introns. Primers are indicated by arrows above the sequence:

- c4R-Primer**: Reverse primer spanning Exon 4 and Exon 5.
- c4F-Primer**: Forward primer spanning Exon 4 and Exon 5.
- c5F-Primer**: Forward primer spanning Exon 5 and Exon 6.
- c6R-Primer**: Reverse primer spanning Exon 6 and Exon 7.
- c7F-Primer**: Forward primer spanning Exon 7 and Exon 8.
- c8R-Primer**: Reverse primer spanning Exon 8 and Exon 9.
- c10F-Primer**: Forward primer spanning Exon 10 and Exon 11.

TTTACCAACAGCAAATTGACTTCTTTAAATGAAGAGTATACCAAAAATAA
 1701
 |
 AACAGAATATGAAGAAG^{c11R-Primer}CCCAGGATGCCATTGTTAAAG^{c11F-Primer}GAAATTGTCAATA
 1751 Exon11 | Exon12
 |
 TTTCTTCAGGCTATGTAGAACCAATGCAGACACTCAATGATGTGTTAGCT
 1801
 |
 CAGCTAGATGCTGTTGTCAGCTTTGCTCACGTGTCAAATGGAGCACCTGT
 1851
 |
 TCCATATGTACGACCAGCCATTTTGGAGAAAGGACAAGGAAGAATTATAT
 1901
 |
 TAAAAGCATCCAGGCATGCTTGTGTTGAAGTTCAAGATGAAATTGCATTT
 1951 Exon12
 |
 ATTCCTAATGACGTATACTTTGAAAAAGATAAACAGATGTTCCACATCAT
 2001 Exon13
 |
 TACTG^{c13R-Primer}GCCCCAATATGGGAGGTAAATCAACATATATTGACAAACTGGGG^{c13F-Primer}
 2051
 |
 TGATAGTACTCATGGCCCAAATTGGGTGTTTTGTGCCATGTGAGTCAGCA
 2101
 |
 GAAGTGTCCATTGTGGACTGCATCTTAGCCCGAGTAGGGGCTGGTGACAG
 2151
 |
 TCAATTGAAAGGAGTCTCCAC^{c14R-Primer}GTTTCATGGCTGAAATGTTGG^{c14F-Primer}GAAACTGCTT
 2201 Exon13 | Exon14
 |
 CTATCCTCAGGTCTGCAACCAAAGATTCATTAATAATCATAGATGAATTG
 2251
 |
 GGAAGAGGAACTTCTACCTACGATGGATTTGGGTTAGCATGGGCTATATC
 2301
 |
 AGAATACATTGCAACAAAGATTGGTGCTTTTTTGCATGTTTGCAACCCATT
 2351
 |
 TTCATGAACTTACTGCCTTGGCCAATCAGATACCAACTGTTAATAATCTA
 2401
 |
 CATGTCACAGCACTCACCACTGAAGAGACCTTAACTATGCTTTATCAGGT
 2451 Exon14 | Exon15
 |
 GAAGAAAGGTGTCTGTGATCAAAGTTTTGGGATTCATGTTGCAGAGCTTG
 2501
 |
 CTAATTTCCCTAAGCATGTAATAGAGTGTGCTAAACAGAAAGCCCTGGAA
 2551
 |
 CTTGAGGAGTTTCAGTATATTGGAGAATCGCAAGGATATGATATCATGGA
 2601 Exon15 | Exon16
 |
 ACCAGCAGCAAAGAAGTGCTATCTGGAAAGAGAGCAAGGTGAAAAAATTA
 2651
 |
 TTCAGGAGTTCCTGTCC^{c16R-Primer}CAAGGTGAAACAAATGCCCTTTACTGAAATGTCA

2701
 |
 GAAGAAAACATCACAATAAAGTTAAAACAGCTAAAAGCTGAAGTAATAGC
 2751 Exon16
 |
 AAAGAATAATAGCTTTGTAAATGAAATCATTTCACGAATAAAAGTTACTA
 2801
 |
 CGTGA|aaaatcccagtaatggaatgaaggtaatattgataagctattgtc

MSH6 :

cgctccccccagatttcccgccagcaggagc cgcgcggttagatgcggtg
 5'-UTR-Primer
 |
 ctttttaggagctccgtccgacagaacggttgggccttgccggctgtcggg|
 1 Exon1
 |
ATGTCGCGACAGAGCACCCCTGTACAGCTTCTTCCCCAAGTCTCCGGC**CGCT**
 51
 |
c1Fn-Primer
 GAGTGATGCCAACAAGGCCCTCGGCCAGGGCCTCACGCGAAGGCGGCCGTG
 101
 |
 CCGCCGCTGCCCCCGGGCCTCTCCTTCCCAGGCGGGGATGCGGCCTGG
 151
 |
 AGCGAGGCTGGGCCTGGGCCAGGCCCTTGGCGCGATCCGCGTCACCGCC
 201
 |
c1F-Primer
 CAAGGCGAAGAACCTCAAC**CG**GAGGGCTGCGGAGATCGGTAGCGCCTGCTG
 251 Exon1 Exon2
 |
 CCCCACCA**G**TTGTGACTTCTCACCAGGAGATTTGGTTTGGGCCAAGATG
 301
 |
 GAGGGTTACCCCTGGTGGCCTTGTCTGGTTTACAACCACCCCTTTGATGG
 351
 |
 AACATTCATCCGCGAGAAAGGGAAAT**CAGTCCGTGTT**CATGTACAGTTTT
 401
 |
 TTGATGACAGCCCAACAAGGGGCTGGGTTAGCAAAAGGCTTTTAAAGCCA
 451 Exon2 Exon3
 |
 TATACAG**G**TTCAAATCAAAGGAAGCCAGAAGGGAGGTCATTTTTACAG
 501
 |
 TGCAAAGCCTGAAATACTGAGAGCAATGCAACGTGCAGATGAAGCCTTAA
 551
 |
 ATAAAGACAAGATTAAGAG**GCTTGAATTGGCAGTTTGT**GATGAGCCCTCA
 601 Exon3 Exon4
 |
 GAGCCAGAAGAGGAAGAAGAGATGGAG**G**TAGGCACA**ACTT**ACGTAACAGA
 651
 |
 TAAGAGTGAAGAAGATAATGAAATTGAGAGTGAAGAGGAAGTACAGCCTA
 701
 |
 c4R-Primer

AGACACAAGGATCTAGGCGAAGTAGCCGCCAAATAAAAAACGAAGGGTC
751
|
ATATCAGATTCTGAGAGTGACATTGGTGGCTCTGATGTGGAATTTAAGCC
801
|
AGACACTAAGGAGGAAGGAAGCAGTGATGAAATAAGCAGTGGAGTGGGGG
851
|
ATAGTGAGAGTGAAGGCCTGAACAGCCCTGTCAAAGTTGCTCGAAAGCGG
901
|
AAGAGAATGGTGACTGGAAATGGCTCTCTTAAAAGGAAAAGCTCTAGGAA
951
|
GGAAACGCCCTCAGCCACCAAACAAGCAACTAGCATTTCATCAGAAACCA
1001
|
AGAATACTTTGAGAGCTTTCTCTGCCCTCAAATTTCTGAATCCCAAGCC
1051
|
CACGTTAGTGGAGGTGGTGTGATGACAGTAGTCGCCCTACTGTTTGGTATCA
1101
|
TGAAACTTTAGAATGGCTTAAGGAGGAAAAGAGAAGAGATGAGCACAGGA
1151
|
GGAGGCCTGATCACCCCGATTTTGATGCATCTACACTCTATGTGCCTGAG
1201
|
GATTTCTCAATTCTTGTACTCCTGGGATGAGGAAGTGGTGGCAGATTAA
1251
|
GTCTCAGAACTTTGATCTTGTGATCTGTTACAAGGTGGGGAAATTTTATG
1301
|
AGCTGTACCACATGGATGCTCTTATTGGAGTCAGTGAAC TGGGGCTGGTA
1351
|
TTCATGAAAGGCAACTGGGCCATTCTGGCTTTCCTGAAATTGCATTTGG
1401
|
CCGTTATTCAGATTCCCTGGTGCAGAAGGGCTATAAAGTAGCACGAGTGG
1451
|
AACAGACTGAGACTCCAGAAATGATGGAGGCACGATGTAGAAAGATGGCA
1501
|
CATATATCCAAGTATGATAGAGTGGTGTGAGGAGGGAGATCTGTAGGATCAT
1551
|
TACCAAGGGTACACAGACTTACAGTGTGCTGGAAGGTGATCCCTCTGAGA
1601
|
ACTACAGTAAGTATCTTCTTAGCCTCAAAGAAAAAGAGGAAGATTCTTCT
1651
|
GGCCATACTCGTGCATATGGTGTGTGCTTTGTTGATACTTCACTGGGAAA
1701
|
GTTTTTCATAGGTCAGTTTTTCAGATGATCGCCATTGTTCGAGATTTAGGA

1751
|
CTCTAGTGGCACACTATCCCCAGTACAAGTTTTATTTGAAAAAGGAAAT
1801
|
CTCTCAAAGGAAACTAAAACAATTCTAAAGAGTTCATTGTCCTGTTCTCT
1851
|
TCAGGAAGGTCTGATACCCGGCTCCCAGTTTTGGGATGCATCCAAAACCTT
1901
|
TGAGAACTCTCCTTGAGGAAGAATATTTTAGGGAAAAGCTAAGTGATGGC
1951
|
ATTGGGGTGATGTTACCCAGGTGCTTAAAGGTATGACTTCAGAGTCTGA
2001
|
TTCCATTGGGTTGACACCAGGAGAGAAAAGTGAATTGGCCCTCTCTGCTC
2051
|
TAGGTGGTTGTGTCTTCTACCTCAAAAATGCCTTATTGATCAGGAGCTT
2101
|
TTATCAATGGCTAATTTTGAAGAATATATTCCTTGGATTCTGACACAGT
2151
|
CAGCACTACAAGATCTGGTGCTATCTTCACCAAAGCCTATCAACGAATGG
2201
|
TGCTAGATGCAGTGACATTAAACAACCTTGGAGATTTTTCTGAATGGAACA
2251
|
AATGGTTCTACTGAAGGAACCCTACTAGAGAGGGTTGATACTTGCCATAC
2301
|
TCCTTTTGGTAAGCGGCTCCTAAAGCAATGGCTTTGTGCCCCACTCTGTA
2351
|
ACCATTATGCTATTAATGATCGTCTAGATGCCATAGAAGACCTCATGGTT
2401
|
GTGCCTGACAAAATCTCCGAAGTTGTAGAGCTTCTAAAGAAGCTTCCAGA
2451
|
TCTTGAGAGGCTACTCAGTAAAATTCATAATGTTGGGTCTCCCCTGAAGA
2501
|
GTCAGAACCACCCAGACAGCAGGGCTATAATGTATGAAGAACTACATAC
2551
|
AGCAAGAAGAAGATTATTGATTTTC^{c4iF-Primer}TTTCTGCTCTGGAAGGATTC[→]CAAAGT
2601
|
AATGTGTAAAATTATAGGGATCATGGAAGAAGTTGCTGATGGTTTTAAGT
2651
|
CTAAAATCCTTAAGCAGGTCATCTCTCTGCAGACAAAAAATCCTGAAGGT
2701
|
CGTTTTCTGATTTGACTGTAGAATTGAACCGATGGGATACAGCCTTTGA
2751
|

CCATGAAAAGGCTCGAAAGACTGGACTTATTACTCCCAAAGCAGGCTTTG
 2801
 |
 ACTCTGATTATGACCAAGCTCTTGCTGACATAAGAGAAAAATGAACAGAGC
 2851
 |
 CTCTGGAAATACCTAGAGAAACAGCGCAACAGAATTGGCTGTAGGACCAT
 2901
 |
 AGTCTATTGGGGGATTGGTAGGAACCGTTACCAGCTGGAAATTCCTGAGA
 2951
 |
 ATTTCACTACTCGCAATTTGCCAGAAGAATACGAGTTGAAATCTACCAAG
 3001
 |
 AAGGGCTGTAAACGATACTGGACCAAACACTATTGAAAAGAAGTTGGCTAA
 3051
 |
 TCTCATAAATGCTGAAGAACGGAGGGATGTATCATTGAAGGACTGCATGC
 3101
 |
 GGCGACTGTTCTATAACTTTGATAAAAATTACAAGGACTGGCAGTCTGCT
 3151
 |
 GTAGAGTGTATCGCAGTGTGGATGTTTTACTGTGCCTGGCTAACTATAG
 3201
 |
 TCGAGGGGGTGATGGTCCTATGTGTCGCCAGTAATTCTGTTGCCGGAAG
 3251
 |
 ATACCCCCCTTCTTAGAGCTTAAAGGATCACGCCATCCTTGCATTACG
 3301
 |
 AAGACTTTTTTTGGAGATGATTTTATTCTAATGACATTCTAATAGGCTG
 3351
 |
 TGAGGAAGAGGAGCAGGAAAATGGCAAAGCCTATTGTGTGCTTGTACTG
 3401
 |
 GACCAAATATGGGGGGCAAGTCTACGCTTATGAGACAGGCTGGCTTATTA
 3451
 |
 GCTGTAATGGCCCAGATGGGTGTTACGTCCCTGCTGAAGTGTGCAGGCT
 3501
 |
 CACACCAATTGATAGAGTGTTTACTAGACTTGGTGCCCTCAGACAGAATAA
 3551
 |
 TGTCAGGTGAAAGTACATTTTTTGTGAATTAAGTGAAACTGCCAGCATA
 3601
 |
 CTCATGCATGCAACAGCACATTCTCTGGTGCTTGTGGATGAATTAGGAAG
 3651
 |
 AGGTACTGCAACATTTGATGGGACGGCAATAGCAAATGCAGTTGTTAAAG
 3701
 |
 AACTTGCTGAGACTATAAAAATGTCGTACATTATTTTCAACTCACTACCAT
 3751
 |
 TCATTAGTAGAAGATTATTCTCAAATGTTGCTGTGCGCCTAGGACATAT

3801 Exon9
|
GGCATGCATGGTAGAAAATGAATGTGAAGACCCCAGCCAGGAGACTATTA
3851
|
CGTTCCTCTATAAATTCATTAAGGGAGCTTGTCTAAAAGCTATGGCTTT
3901
|
AATGCAGCAAGGCTTGCTAATCTCCCAGAGGAAGTTATTCAAAGGGACA
3901 Exon9
|
TAGAAAAGCAAGAGAATTTGAGAAGATGAATCAGTCACTACGATTATTTTC
4001 Exon10
|
GGGAAGTTTGCCTGGCTAGTGAAAGGTCAACTGTAGATGCTGAAGCTGTC
4051 Exon10
|
CATAAATTGCTGACTTTGATTAAGGAATTATAGactgactacattggaag
4101
|
ctttgagttgacttctgaccaaagggtggtaaattcagacaacattatgat
c10R-Primer

Danksagung

Diese Dissertation entstand in der Arbeitsgruppe HNPCC von Frau Prof. Dr. Elke Holinski-Feder und Frau Dr. Monika Morak am Institut für Humangenetik und an der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU München in der Zeit von Dezember 2006 bis September 2008.

Eine Zeit, in der ich Einblicke gewinnen durfte in die Laborarbeit und mit kompetenter Anleitung selbstständig arbeiten konnte. Die Ergebnisse wurden stets mit großem Interesse diskutiert. Diese Zeit hat mich um viele Erfahrungen reicher gemacht hat. Dafür möchte ich mich gerne bedanken:

Ich möchte mich bedanken bei Frau Prof. Dr. Elke Holinski-Feder für die Möglichkeit in der HNPCC- Arbeitsgruppe erste Laborerfahrungen zu sammeln, für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung von Patienten- und Versuchsmaterial und die konstruktive Kritik und Diskussion über die Ergebnisse der Arbeit.

Frau Dr. Monika Morak danke ich herzlich für die gute Betreuung und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Ich wurde hervorragend eingearbeitet, für meine Fragen war immer Zeit und die Ergebnisse wurden ausführlich diskutiert. Auch während des Schreibens der Arbeit hatte sie ein offenes Ohr für meine Fragen und hat sie mit viel Sorgfalt und Mühe Korrektur gelesen. Vielen Dank dafür.

Außerdem möchte ich mich bei Brigitte und Sari bedanken. Sie nahmen sich viel Zeit, um mich gründlich in die Laborabläufe einzuweisen und bei Problemen waren sie immer bereit weiterzuhelfen. Die Zusammenarbeit mit ihnen war mir ein Vergnügen.

Den Mitarbeitern des MGZ danke ich für die Durchführung der Vorarbeiten zu dieser Arbeit und die Unterstützung bei Versuchen, Fragen und Problemen.

Helena und Martina danke ich für ihre gute Laune und die netten Gespräche, mit denen alles noch viel mehr Spaß machte.