

Institut für Humangenetik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

**Etablierung und Evaluierung eines PCR-basierten
Deletionsscreenings zum Nachweis genomischer
Deletionen am Beispiel des APC-Gens**

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

vorgelegt von
Anne Ostendorf
aus München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Dipl. chem. Elke Holinski-Feder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Albert
Prof. Dr. T. Igo-Kemenes

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: _____

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
1.1. Tumorgenese.....	1
1.1.1. Allgemein.....	1
1.1.2. Einteilung der Krebsgene.....	4
1.1.3. Identifizierung von Krebsgenen.....	5
1.1.4. Kolorektale Tumorgenese	7
1.2. FAP – Familiäre Adenomatöse Polyposis	8
1.2.1. Historie.....	8
1.2.2. Klinik und Diagnostik (APC).....	8
1.2.3. Therapie und Vorsorge.....	10
1.3. Adenomatöse Polyposis Coli	11
1.3.1. Das Gen (APC)	11
1.3.2. Genotyp-Phänotyp-Korrelation.....	15
1.3.3. Das Protein – die molekulare Struktur	17
1.3.4. Die Aufgaben in der Zelle.....	22
1.3.4.1. Zelldifferenzierung und -proliferation.....	22
1.3.4.2. Zellmigration	23
1.3.4.3. Zelladhäsion	24
1.3.4.4. Chromosomale Instabilität	25
1.3.4.5. Zellzyklus.....	25
1.4. Möglichkeiten der Feststellung eines Heterozygotenstatus	25
1.5. Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material	29
2.1. Verwendete Oligonukleotide	29
2.2. Laborgeräte.....	29
2.3. Laborhilfsmittel	30
2.4. Chemikalien, Kits, usw.....	30
2.5. Lösungen, Medien und Sonstiges	31
2.5.1. DNA-Extraktion.....	31
2.5.2. PCR und Auftrennung im Agarose-Gel	31
2.5.3. HPLC	32
3. Methoden	33
3.1. Isolierung der DNA	33
3.1.1. DNA-Extraktion aus Vollblut	33
3.1.2. DNA-Extraktion aus Gewebeproben	34
3.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	34
3.3. DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
3.3.1. Standard-PCR	35
3.3.2. Multiplex-PCR.....	36
3.4. Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel	38
3.5. HPLC mit Fluoreszenzdetektor	39
3.5.1. Auswertung.....	40
4. Ergebnisse	41
4.1. Multiplex-Ansätze	42
4.2. Reaktionskinetik der Multiplex-PCRs	43
4.2.1. h57JDH.....	43
4.2.2. 45h1914	44
4.2.3. 11h1ALI.....	44
4.2.4. 2Mh1T	45
4.3. Variation und Normwerte-Verteilung.....	45

4.3.1.	Variation innerhalb einer Kontroll-DNA dargestellt am Ansatz h57JDH	46
4.3.2.	Variation zwischen verschiedenen Kontroll-DNAs (Ansatz 45h1914 mit 11 verschiedenen DNAs)	49
4.4.	Auswertung der Verhältnisrelationen	51
4.4.1.	Allgemein.....	51
4.4.2.	HPLC-Auswertung.....	52
4.4.2.1.	Multiplexansatz h57JDH.....	53
4.4.2.2.	Multiplexansatz 45h1914	55
4.4.2.3.	Multiplexansatz 11h1ALI.....	58
4.4.2.4.	Multiplexansatz 2Mh1T	61
4.4.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	63
5.	Diskussion.....	65
5.1.	Multiplex-PCR.....	65
5.2.	Die Reaktionskinetik der Multiplex-PCRs	67
5.3.	HPLC-Analyse.....	69
5.4.	Variation und Normwerteverteilung.....	71
5.4.1.	Variation innerhalb einer Kontroll-DNA	71
5.4.2.	Variation zwischen verschiedenen Kontroll-DNAs	72
5.5.	Deletionsscreening für FAP-Patienten.....	74
5.5.2.	Patienten.....	78
6.	Zusammenfassung und Ausblick	83
7.	Literatur.....	85
8.	Anhang	96
8.1.	Oligonukleotide	96
8.2.	Bedingungen und Zusammensetzung der Multiplex-PCR-Ansätze	97
8.2.1.	45h1914	97
8.2.2.	h57JDH.....	98
8.2.3.	11h1ALI.....	98
8.2.4.	2Mh1T	98
8.3.	HPLC-Gradienten und Retentionszeiten.....	98
8.4.	Sequenz von APC mit Aminosäuren und Intron-Exon Grenzen	99
8.5.	Homologien von APC-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies.....	106
8.6.	Absolutwerte.....	110
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	115
9.1.	Verzeichnis der Abbildungen	115
9.2.	Verzeichnis der Tabellen	116
	Danksagung.....	117
	Erklärung.....	118
	Lebenslauf	119

Abkürzungsverzeichnis

A	<u>A</u> denin
AAPC	attenuierte <u>a</u> denomatöse <u>P</u> olyposis <u>C</u> oli
Abb.	<u>A</u> bbildung
ACN	<u>A</u> cetoni <u>t</u> ril
APC	<u>a</u> denomatöse <u>P</u> olyposis <u>C</u> oli
AS	<u>A</u> minosäure
Asef	<u>A</u> PC- <u>s</u> timulated <u>g</u> uanine <u>n</u> ucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor
AT	<u>A</u> taxia <u>t</u> eleangiectasia
ATM	<u>A</u> taxia <u>t</u> eleangiectatica <u>m</u> utiertes Gen
ATP	<u>A</u> denosin-5'- <u>t</u> riphosphat
β-TRCP	<u>β</u> - <u>t</u> ransducin <u>r</u> ep <u>e</u> at <u>c</u> ontaining <u>p</u> rotein
BLM	<u>B</u> l <u>o</u> oms Syndrom
BMPR1A	<u>b</u> one <u>m</u> orphogenetic <u>p</u> rotein <u>r</u> eceptor <u>T</u> ype <u>1A</u>
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aar(e)
BRCA	Brustkrebs-Gene (<u>B</u> reast <u>c</u> ancer, Gene 1 und 2)
C	<u>C</u> ytosin
°C	Grad <u>C</u> elsius
Ca	Karzinom (<u>C</u> arcinoma)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<u>c</u> yclin- <u>d</u> e <u>p</u> endent- <u>k</u> inase)
CDKN	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor(<u>c</u> yclin <u>d</u> e <u>p</u> endent <u>k</u> inase <u>i</u> nhibitor)
cDNA	komplementäre (<u>c</u> omplementary) <u>D</u> N <u>A</u>
cen	<u>C</u> entromer
CHRPE	kongenitale (<u>c</u> ongenital) <u>H</u> ypertrophie des <u>r</u> etinalen <u>P</u> igmentepithels
CK	<u>C</u> asein <u>K</u> inase
CpA	Dinukleotid mit der Basenfolge <u>CA</u> in 5'- 3'-Orientierung
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge <u>CG</u> in 5'- 3'-Orientierung
DCC	Gen <u>d</u> eletiert in kolorektalen Karzinomen (<u>c</u> olorectal <u>c</u> arcinoma)
DHPLC	denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<u>d</u> enaturing <u>h</u> igh- <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
DMD	<u>D</u> uchenne <u>M</u> uskeld <u>y</u> strophie
DNA	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure (<u>a</u> cid)
dNTP	<u>d</u> esoxy- <u>N</u> ukleotid-5'- <u>t</u> riphosphat
ds	<u>d</u> oppel <u>s</u> trängig
Dsh	<u>d</u> es <u>s</u> hevelled
EB	<u>e</u> nd- <u>b</u> inding protein
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> mintetraessigsäure (<u>a</u> cid)
EtOH	Ethanol
EtBr	<u>E</u> thidium <u>b</u> romid
EXT	<u>E</u> xostosen
Fa.	<u>F</u> irma
Fam.	<u>F</u> amiliär
6-fam	<u>6</u> -Carboxyfluorescein Phosphoramid
FAP	familiäre <u>a</u> denomatöse <u>P</u> olyposis
FHIT	<u>f</u> ragile <u>h</u> istidine <u>t</u> riad gene
FISH	<u>F</u> luoreszenz- <u>i</u> n- <u>s</u> itu- <u>H</u> ybridisierung

FRAT	<i>frequently rearranged in advanced t-cell lymphomas</i>
G	<u>G</u> uanin
GBP	<u>G</u> uanylate- <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
GSK3 β	<u>G</u> lykogensynthase <u>k</u> inase- <u>3</u> β
h	Stunde(n) (<i>hour</i>)
HCC	hepatozelluläres Karzinom (<i>hepatocellular Carcinoma</i>)
hDLG	<i>human disc large guanylatcyclase</i>
heptad	Gruppe von sieben Aminosäuren, die oft in einem Protein vorkommen
hMLH	<u>h</u> umanes <u>m</u> ut <u>L</u> <u>H</u> omolog (E. coli)
hMSH	<u>h</u> umanes <u>m</u> ut <u>S</u> <u>H</u> omolog (E. coli)
HNPCC	<u>h</u> ereditäres <u>n</u> on-polipöses Kolon-Karzinom (<i>Colon-Carcinoma</i>)
HPRC	<u>h</u> ereditäres <u>p</u> apilläres Nierenkarzinom (<i>renal Carcinoma</i>)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
H ₂ O _{bd}	Zweimal destilliertes Wasser (<i>Bidest</i>)
H ₂ O _{HPLC}	für HPLC-Geräte gereinigtes Wasser
Kap.	<u>K</u> apitel
kb	<u>K</u> ilobasen(paare)
KCl	<u>K</u> alium <u>ch</u> lorid
Konz.	<u>K</u> onzentration
KRT	Keratin
l	<u>L</u> iter
Lef	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LKB	Serin-Threonin Kinase (STK11)
LOH	Verlust der Heterozygotie (<i>loss of heterozygosity</i>)
LS V	<u>L</u> ängen <u>s</u> tandard <u>V</u>
M	<u>M</u> olar
Mb	<u>M</u> egabasen(paare)
MCR	<u>M</u> utation <u>C</u> luster <u>R</u> egion
MEN	<u>M</u> ultiple <u>e</u> ndokrine <u>N</u> eoplasie (Typ 1 und 2)
MET	<u>m</u> et Protoonkogen (Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor)
min	<u>M</u> inute(n)
ml	<u>M</u> illiliter
μ l	<u>M</u> ikroliter
mM	<u>M</u> illimolar
mRNA	<u>m</u> essenger Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
MYC	<i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYH	<u>m</u> ut <u>Y</u> <u>h</u> omolog (E. coli)
NaCl	<u>N</u> atrium <u>ch</u> lorid
n.b.	nicht bekannt
NBCCS	<u>N</u> ävöides <u>B</u> asal Zell Karzinom (<i>Cell Carcinoma</i>) <u>S</u> yndrom
NES	Kernexportsignal (<i>nuclear export signals</i>)
NF	<u>N</u> euro <u>f</u> ibromatose
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	<u>N</u> anometer
OD	optische <u>D</u> ichte
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Phosphat
p	kurzer Chromosomenarm (<i>petit</i>)

PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pers.	<u>pers</u> önlich
PMS	<i>postmeiotic segregation increased S. cerevisiae</i>
Pos.	<u>Pos</u> ition
PP2A	<u>Protein</u> phosphatase <u>2A</u>
PTP-BL	<u>Protein</u> <u>Tyrosin</u> <u>Phosphatase</u>
PTCH	<i>patched homolog</i>
PTEN	Phosphatase und <u>Tensin</u> Homolog
q	langer Chromosomenarm (<i>queue</i>)
RAS	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RB	<u>Retinoblastom</u>
RET	<i>rearranged during transfection protooncogene</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	<u>Raum</u> temperatur
s.	siehe
S.	<u>S</u> eite
SAMP	Serin-Alanin-Methionin-Prolin
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
sec	Sekunde(n) (<i>seconds</i>)
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
SE	Natrium-EDTA-Puffer (<i>sodium-EDTA</i>)
SMAD	<u>SMA</u> und <u>MAD</u> verwandtes Protein
T	<u>Thymin</u>
Tab.	<u>Tab</u> elle
Tamra	<u>Tetra</u> methylrhodamin
Taq	<u>Thermophilus</u> <u>aquaticus</u>
TBE	<u>Tris</u> - <u>Borat</u> - <u>EDTA</u> -Puffer
TCF	T-Zell Faktor (<i>T-cell factor</i>)
TE	<u>Tris</u> - <u>EDTA</u> -Puffer
TEAA	<u>Tetraethylammonium</u> acetat
Temp.	<u>Temper</u> atur
Tet	<u>Tetra</u> chloro-Fluoreszein-Phosphoramid
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _M	Annealing-Temperatur
Tris	<u>Tris</u> (hydroxymethyl)aminomethan
TSC	tuberöse Sklerose (<i>sclerose</i>)
U	enzymatische Einheit (<i>unit</i>)
ÜN	über <u>N</u> acht
UV	<u>Ultr</u> aviolett
V	<u>V</u> olt
VHL	<u>von</u> - <u>Hippel</u> - <u>Lindau</u>
Vol.	<u>V</u> olumen
Wnt	<u>wingless</u> type
WT	<u>Wilms</u> <u>Tumor</u>
XP	<u>X</u> eroderma pigmentosa (Gruppe A, B,C und D)

1. Einleitung

1.1. Tumorgenese

1.1.1. Allgemein

Anfang des letzten Jahrhunderts stellte Theodor Boveri die Hypothese auf, dass die Entstehung von Karzinomen mit Chromosomenanomalien assoziiert sei (Boveri, 1914). Der erste eindeutige Beweis dafür wurde in den 1960er Jahren von Nowell und Hungerford erbracht (Nowell and Hungerford, 1960). Sie entdeckten das Philadelphia-Chromosom – eine Translokation der Chromosomen 9 und 22 (Rowley, 1980) – in den Blutzellen von an chronischer myeloischer Leukämie (CML) erkrankten Patienten.

Jedes Karzinom ist das Ergebnis eines unabhängigen Evolutionsprozesses einer einzelnen Zelle. Die Akkumulation von aufeinanderfolgenden Mutationen vollzieht sich Schritt für Schritt. Jede einzelne Mutation bringt entweder einen selektiven Nachteil oder Vorteil mit sich. Dabei kann sich eine immer weiter expandierende Zellpopulation entwickeln, die zu einem Tumor und schließlich zu einem Karzinom führen kann. Aber nicht nur die Anhäufung von Mutationen, sondern auch die Reihenfolge der betroffenen Gene determiniert die Entstehung und die Eigenheit des Karzinoms. Nur Mutationen in Genen, die Einfluss auf das Zellwachstum haben, können die Tumorbildung initiieren, die sich dann durch Mutationen in anderen Genen weiter fortsetzt. Die Mehrheit dieser Mutationen ist somatisch und nur in individuellen Krebszellklonen zu finden.

Etwa 10-15% der Krebspatienten sind von erblich bedingten Krebsformen betroffen. Bis heute sind mehr als 20 verschiedene erbliche Krebserkrankungen beschrieben und spezifischen Keimbahnmutationen in den verantwortlichen Genen zugeordnet worden. Das Risiko an Krebs zu erkranken wird für jemanden, der ein mutiertes Allel eines krebsverursachenden Gens trägt, von verschiedenen Faktoren beeinflusst: der Funktion des mutierten Gens, Art und Lokalisation der Mutation, anderen zellulären Genen, Diäten, Lebensstil, Umwelt, u. v. m. (Fearon, 1997).

Die Entscheidung, ob es sich um eine erblich bedingte Krebsform handelt, ist oft nicht leicht zu treffen. Eine erbliche Form einer Krebserkrankung sollte immer dann in Erwägung gezogen

werden, wenn mehrere Familienmitglieder in jungen Jahren an Krebs erkranken, es sich um seltene Krebserkrankungen (z. B. Retinoblastome, Osteosarkome) handelt oder die Betroffenen multiple Primärtumore entwickeln. Inkomplette Penetranz und Phänokopien erschweren die Unterscheidung zwischen vererbten und sporadischen Formen (Fearon, 1997).

Nachfolgend sind ein Großteil der bekannten erblich bedingten Krebsformen aufgeführt.

Syndrom	Häufigkeit	Primärtumor	assoziierte Krebsformen	chromosomale Lokalisation	kloniertes Gen	Funktion des Genproduktes
Dominante Vererbung – Tumor-Suppressor-Gene						
Fam. Retinoblastom	1:23000	Retinoblastom	Osteosarkom	13q14.3	RB1	Regulation von Zellzyklus und Transkription
Li-Fraumeni-Syndrom	1:10000	Sarkome, Brustkrebs	Gehirntumor, Leukämie	17p13.1	p53	Transkriptionsfaktor und Apoptoseregulation
Fam. adenomatöse Polyposis (FAP)	1:8000	Kolorektaler Tumor	Kolorektale Adenome, Magen- und Duodenum-Ca, Osteome, CHRPE	5q21-22	APC	s. Text
Hereditärer non polipöser kolorektaler Tumor (HNPCC)	1:3500	Kolorektaler Tumor	Tumore im Endometrium, Ureter, Gallengang, an den Ovarien, Glioblastom	2p16, 3p21, 14q14.3, 2q32, 7p22, 2p16	hMSH2, hMLH1, hMLH3, PMS1, PMS2, hMSH6	DNA-Reparatur
Neurofibromatose Typ1 (NF1)	1:3500	Neurofibrom	Neurofibrosarkome, akute myeloische Leukämie, Gehirntumore	17q11.2	NF1	GAP für p21 Ras-Proteine
Neurofibromatose Typ2 (NF2)	1:40000	Akustikusneurinom Meningeom	Gliome, Ependyome	22q12.2	NF2	Bindung von Membranproteinen an das Zytoskelett
Wilms Tumor (WT)	1:12000	Wilms Tumor	Aniridie, genitale Anomalien, mentale Retardierung	11p13	WT1	Transkriptioneller Repressor
Wiedmann-Beckwith-Syndrom	1:13700	Wilms Tumor	Organomegalie, Hepatoblastom, adrenokortikales Ca.	11p15	CDKN1C	Zellzyklusregulator
Nävöides Basalzell Karzinom Syndrom (NBCCS)	1:64000	Basalzellen Hautkrebs	Kieferzysten, Medulloblastome, ovariale Fibrome	9q22.3	PTCH	Transmembranöser Rezeptor
Fam. Brustkrebs	7% aller Mamma-Cas	Brustkrebs,	Ovarialtumor	17q21	BRCA1	Interaktion mit Rad51 Protein, Reparatur von Doppelstrangbrüchen
Fam. Brustkrebs		Brustkrebs	Männl. Brustkrebs, Pankreas-Ca.	13q12	BRCA2	Interaktion mit Rad51 Protein
Von-Hippel-Lindau Syndrom (VHL)	1:36000	Nieren-Ca	Phäochromozytom, retinale Angiome, Hämangioblastome	3p25	VHL	Regulator der transkriptionellen Elongation durch RNA-Polymerase II
Fam. Nierenzellkarzinom		Klarzelliges Nieren-Ca	Lungen-, Nieren-, Magen- und Cervix-Ca.	3p14.2	FHIT	Nukleosidhydrolase

Fam. Magenkrebs		Magen-Ca	Brust-, Kolon-, Haut- und Lungen-Ca	16q22.1	E-Cadherin	Zelladhäsionsregulation
Hereditäres Prostata-Ca		Prostatakrebs		1q25	RNaseL	Zellproliferation
Multiple endokrine Neoplasie Typ1 (MEN1)	1:4000	Pankreas-Inselzell-Ca.	Parathyroidhyperplasie, Hypophysenadenome	11q13	MEN1	Transkription
Cowden Krankheit	1:200000	Brustkrebs, follikulärer Schilddrüsenkrebs	Intestinale hamartöse Polypen, Hautläsionen	10q23	PTEN	Dual-Spezifische Phosphatase mit Ähnlichkeit zu Tensin
Multiple Exostosen	1:60000	Exostosen	Chondrosarkom	8q24.1, 11p11-13, 19p	EXT1, EXT2, EXT3	EXT1 und 2 bilden Komplex als Glykosyltransferasen. EXT3 n.b.
Juvenile Polyposis	1:16000-100000	Polyposis	Pankreas- und Kolon-Ca, Hamartome	18q21.1 10q22.3	SMAD4 BMPR1A	Signaltransduktion Serin-Threonin-Kinase
Peutz-Jeghers-Syndrom	1:25000	Kolorektaler Tumor	Hamartome, Kolon-, Rektum- und Brust-Ca	19p13	LKB1	Serin-Threonin-Kinase
Tuberöse Sklerose	1:10000	Sklerose	Nieren- und Gehirntumore	16p13.3	TSC2	Zellzyklusregulator
Palmoplantare Keratodermie		Ösophagus-Ca	Leukoplakie	17q12-21	KRT9 KRT16	n.b.
Rezessive Syndrome – Tumor-Suppressor-Gene						
Ataxia Teleangiektasia (AT)	Selten	Lymphome, Leukämien	Brustkrebs	11q22.3	ATM	Chromosomale Stabilisation
Blooms Syndrom	Selten	Hauttumor		15q26.1	BLM	DNA-Helikase
Xeroderma Pigmentosa (XP)		Melanom, Spinaliom		9q22.3 3p25 19q13.2	XPA XPC XPD	DNA-Reparatur
Familiäre Polyposis Coli		Kolorektaler Tumor		1p34.3 – p32.1	MYH	Interaktion mit hMSH6, Prädisposition für somat. Mutation GC → TA
Dominante Vererbung – Protoonkogene						
Hereditärer papillärer Nieren Tumor (HPRC)		Renaler Tumor (papillärer Typ)		7q31	<i>MET</i>	Transmembranöser Rezeptor
Multiple endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN2)	1:30000 selten	Medullärer Schilddrüsenkrebs	Fam. medullärer Schilddrüsenkrebs <u>Typ2A</u> : Phäochromozytom, Parathyroidhyperplasie <u>Typ2B</u> : Phäochromozytom, muköses Hamartom	10q11.2	<i>RET</i>	Transmembranöser Rezeptor
Fam. Melanom	10% aller Melanome	Melanom	Pankreas-Ca, dysplastische Nävi	9p21 12q13	p16 (CDKN2) <i>CDK4</i>	Inhibitor von CDK4 und CDK6

Tab. 1: Erblich bedingte Krebsformen. Angelehnt an (Fearon, 1997), (Macleod, 2000). Die Tabelle hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

1.1.2. Einteilung der Krebsgene

Krebs verursachende Gene werden in zwei Klassen unterteilt: die Protoonkogene und die Tumor-Supressor-Gene. Die Protoonkogene regulieren die Zellproliferation. Zu den Genprodukten zählen zytoplasmatische Messenger, Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Zellzyklusfaktoren. Durch Mutationen werden aus Protoonkogenen Onkogene. Sie agieren auf Zellniveau immer dominant, d. h., dass eine Mutation in einem Allel für eine Entartung der Zelle ausreichen kann. Eine somatische Mutation des anderen Allels ist nicht erforderlich. Die Mutation eines Allels führt entweder zu einem Funktionszuwachs (*gain of function*) in der Zelle und somit zu einer erhöhten Zellproliferation oder einem Funktionsverlust (*loss of function*), der den Eintritt der Zelle in die Apoptose verhindert und somit der Zelle eine längere Überlebensdauer ermöglicht.

Mutationen in Tumor-Supressor-Genen führen zu einem Funktionsverlust (*loss of function*) des Genproduktes (Haber and Harlow, 1997). Zu diesen Genprodukten gehören Proteine, die in der Wachstumsinhibierung, Apoptose, Zellzyklusregulierung, Transkriptionsregulierung, DNA-Reparatur und den Signaltransduktionswegen eine wichtige Rolle spielen. In Übereinstimmung mit Knudsons „two hit“ Theorie (Knudson, 1971) der Keimbahndefekt in einem Tumor-Supressor-Gen auf somatischer Ebene rezessiv. Es kommt also erst nach Mutation des korrespondierenden normalen Allels zur Karzinomentwicklung (Fearon and Vogelstein, 1990), (Weinberg, 1994).

Unabhängig davon, ob es sich bei einer Keimbahnmutation eines Krebsgens um ein Tumor-Supressor-Gen oder ein Protoonkogen handelt, sind zusätzliche somatische Mutationen in anderen Genen, meist Protoonkogenen, für die weitere Krebsentwicklung nötig.

Erblich bedingte Krebsformen

Erblich bedingte Krebsformen entstehen auf der Basis von Keimbahnmutationen in Protoonkogenen oder Tumor-Supressor-Genen. Keimbahnmutationen in diesen Genen wirken störend auf die Regulation der Zellteilung und führen zu einer Proliferation der Zellteilung oder verhindern die Apoptose. Erst die nachfolgenden Mutationen geben einer Zelle die malignen Eigenschaften (z.B. Zellkontaktverlust ohne Apoptose, Metastasenbildung, infiltrierendes Wachstum).

Die meisten erblichen Krebsformen folgen einem dominanten Vererbungsmuster bedingt durch Mutationen in der Keimbahn. Sowohl bei Tumor-Supressor-Genen als auch bei Protoonkogenen führt eine Keimbahnmutation (Heterozygotie) zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko. Al-

lerdings ist bei Tumor-Supressor-Genen neben der Keimbahnmutation zur weiteren Krebsentwicklung eine somatische Mutation im zweiten Allel nötig. Onkogene benötigen dagegen nur ein mutiertes Allel – bei vererbten Formen ist das die Keimbahnmutation. Die Tatsache, dass bis zur endgültigen Entartung von Zellen zusätzliche Mutationen in anderen Genen erforderlich sind erklärt, dass es bei Keimbahnmutationen von Krebsgenen nicht immer zu einer Krebsentstehung kommt.

Krebssyndrome, die einem rezessiven Erbgang folgen, sind selten (AT, XP, Blooms Syndrom). Sie beruhen auf die Keimbahninaktivierung beider Allele von Tumor-Supressor-Genen, die DNA-Reparaturproteine kodieren. Das Krankheitsbild und das DNA-schädigende Agens sind für jedes Syndrom spezifisch. Nur wenn beide Allele in der Keimbahn inaktiviert sind – also Homozygotie besteht – ist ein erhöhtes Krankheitsrisiko vorhanden. In allen Körperzellen sind beide Allele des verantwortlichen Gens funktionslos. Dass dieser Ausfall nur in bestimmten Organen zu Tumoren führt, liegt wahrscheinlich an der unterschiedlichen gewebsspezifischen Expression dieser Gene. Manche Autoren setzen die DNA-Reparaturgene als dritte Gruppe neben die Protoonko- und Tumor-Supressor-Gene (Weinberg, 1994), (Chung and Rustgi, 1995).

Sporadische Krebsformen

Bei sporadischen Karzinomen verhält es sich ähnlich: Protoonkogene benötigen auf somatischer Ebene nur ein mutiertes Allel zur Karzinomentwicklung. Mutierte Tumor-Supressor-Gene verhalten sich meist rezessiv, d. h., dass beide Allele somatisch verändert sein müssen, damit es zur Tumorentartung kommt.

1.1.3. Identifizierung von Krebsgenen

Die Forschung an erblichen Krebserkrankungen bietet interessante Einblicke in die sporadischen Krebsformen. Somatische Mutationen in sporadischen Krebsformen verändern häufig Gene, die auch bei erblich bedingten Krebssyndromen betroffen sind. Auch die Funktion von Signaltransduktionswegen wurde durch die Studie an diesen Genen verständlicher.

Die Methode der Wahl zur Kartierung von krebsverursachenden Genen ist die Kopplungsanalyse. Die Suche nach Krebsgenen kann durch zytogenetische Untersuchungen unterstützt werden. Obwohl große chromosomale Defekte selten sind, haben solche Veränderungen geholfen, Loci von Genen zu finden, z. B. Deletionen (Retinoblastom (Francke, 1976), Wilms Tumor (Riccardi et al., 1978), FAP (Herrera et al., 1986)) und balancierte Translokationen (Neurofibromatose Typ1 (Fountain et al., 1989)). Schätzungsweise haben 10-15% aller Krebsformen einen großen erblichen Anteil.

Ist ein Gen kartiert, können Kandidatengene in dieser Region durch positionelle Klonierung, LOH (*loss of heterozygosity*) und/oder Datenbanksuche isoliert und untersucht werden. Als Beweis, dass es sich bei einem Kandidatengen um das gesuchte Gen handelt, muss bei jedem Betroffenen in einer Familie eine Mutation gefunden werden und in funktionellen Studien gezeigt werden, dass dieses Gen kausal an der Erkrankung beteiligt ist.

- **LOH** im Tumorgewebe ist ein Anzeichen, dass es sich bei dem mutierten Gen um ein Tumor-Supressor-Gen handelt (Cavenee et al., 1983), (Fearon and Vogelstein, 1990). In Karzinomen von Betroffenen mit einer Keimbahnmutation in einem Tumor-Supressor-Gen wird das andere Allel somatisch meist via LOH inaktiviert. In sporadischen Krebsformen, die auf ein Tumor-Supressor-Gen zurückzuführen sind, sind beide Allele durch somatische Mutationen inaktiviert, doch erst bei der zweiten Mutation (LOH) kommt es zu einer Wachstumszunahme der Tumorzellen. LOH Studien haben zur Lokalisation der Gene NF2, MEN1 und NBCCS geführt (Seizinger et al., 1986), (Seizinger et al., 1987), (Chandrasekharappa et al., 1997), (Hahn et al., 1996).
- **Positionelles Kandidatengen:** Dieses Verfahren beruht auf Kopplungsanalyse und Sequenzierung. Eine genomweite Kopplungsanalyse kartierte MEN2 auf Chr.10q11-12 und HPRC auf 7q31-34 (Mulligan et al., 1993), (Mulligan et al., 1994), (Schmidt et al., 1997). LOH Studien in diesen Regionen waren negativ, so dass Tumor-Supressor-Gene als Verursacher dieser Syndrome ausschieden. Es wurden in beiden Regionen Protoonkogene gefunden (RET in 10q11.2 und MET in 7q31).
- Die dritte Methode, Kandidatengene ausfindig zu machen benutzt das bekannte Wissen über **genetische und biochemische Transduktionswege** in normalen Zellen und in Krebszellen, da Mutationen in Krebszellen eine bestimmte Anzahl von kritischen zellulären Signalwegen angreifen und eine Mutation in einem von verschiedenen Genen innerhalb eines Weges ähnliche phänotypische Konsequenzen (Heterogenität) hervorruft. So wurden wichtige Einblicke in die Kanzerogenese von Melanomen und Kolonkarzinomen gewonnen. Ein Beispiel dieser Methode ist HNPCC: Hier halfen frühere Studien über Defekte in DNA-Reparatur-Systemen in Bakterien und Hefen. Das Auftreten tausender somatischer Mutationen in kurzen, wiederholten DNA-Sequenzen in Krebszellen von HNPCC-Patienten legte den Verdacht nahe, dass die Krebszellen einen Defekt in der DNA-Synthese oder in der DNA-Reparatur haben. Kopplungsstudien haben zwei der Gene auf die Chromosome 2p (hMSH2) und 3p (hMLH1) kartiert (Marra and Boland, 1995).

Die Proteine, die durch die in Tab. 1 aufgeführten Krebsgene kodiert werden, sind an vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt: Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Erhaltung der genomischen Integrität. Diese Proteine funktionieren als Transmembranrezeptoren (MET, PTCH, RET), zytoplasmatische, regulatorische oder strukturelle Proteine (NF1, PTEN, APC, NF2), Transkriptionsfaktoren oder Regulatoren der Transkription (p53, WT1, RB1, VHL), Zellzyklusfaktoren (CDK4, p16), oder es sind DNA-Reparatur-Proteine (hMSH2, hMLH1, ATM, BRCA1, BRCA2, XPA, XPC, XPD, BLM).

Weitere Untersuchungen von vererbten Mutationen, die die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken beeinflussen, werden helfen, Krebs rechtzeitig zu erkennen, richtig und effektiv zu behandeln und möglicherweise eines Tages zu verhindern.

1.1.4. Kolorektale Tumorgenese

Kolorektale Karzinome sind in der westlichen Welt – unabhängig vom Geschlecht oder ethnischen Ursprung – nach Lungenkarzinomen die zweithäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen (Dept. of health, 1998). Die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome entsteht auf dem Boden vorbestehender Adenome, initiiert durch eine Mutation im APC-Gen. Das *lifetime*-Risiko eines Kolonkarzinoms liegt in der westlichen Bevölkerung bei 5%, steigt aber dramatisch mit dem Alter an. Mindestens 50% der westlichen Bevölkerung bekommt bis zum Alter von 70 Jahren einen kolorektalen Tumor (Adenom), der bei jedem zehnten bösartig entartet (Kinzler and Vogelstein, 1996), (Fodde, 2002).

Kolorektale Karzinome bieten ein gutes System zur Erforschung genetischer Veränderungen während der Entwicklung eines menschlichen Tumors. Sie entstehen auf dem Boden eines gutartigen Adenoms und entwickeln sich über mehrere Stadien hin bis zum metastasierenden Karzinom. Dickdarmkrebs entwickelt sich typischerweise über Dekaden hinweg. Nach der von Vogelstein etablierten Adenom-Karzinom-Sequenz sind zur endgültigen Entwicklung wahrscheinlich sechs genetische Ereignisse nötig (s. Abb. 1), von denen die ersten in etwa 85% Mutationen in APC sind (Fearon and Vogelstein, 1990). Der Funktionsverlust von APC triggert eine Kette molekularer und histologischer Veränderungen. Entscheidend für die Tumormorphologie und -progression ist eher die zeitliche Abfolge von Mutationen in unterschiedlichen Genen als die Menge von Mutationen (Fodde et al., 2001).

Neben den sporadischen Formen von kolorektalen Tumoren gibt es zwei erbliche Syndrome – FAP und HNPCC. Epidemiologische Studien belegen, dass mehr als 15% aller kolorektalen Karzinome ein dominantes Vererbungsmuster aufweisen (Kinzler and Vogelstein, 1996).

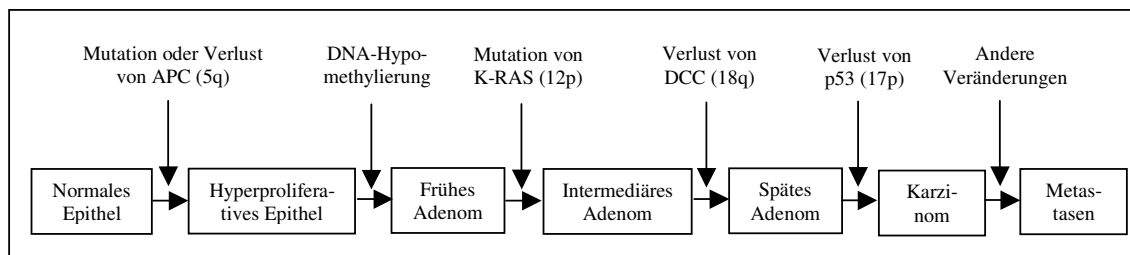


Abb. 1: Schritte der kolorektalen Karzinomentwicklung mit Angabe der betroffenen Gene, nach (Kinzler and Vogelstein, 1996).

1.2. FAP – Familiäre Adenomatöse Polyposis

1.2.1. Historie

Als „dissimilierte Polypen des Rektums“ beschrieb Harrison Cripps 1882 die ersten beiden Fälle von adenomatöser Polyposis in *Transaction of the Pathological Society of London* (Cripps, 1882). Schon damals erkannte er die charakteristischen Zeichen von multiplen Polypen und assoziiertem Blut im Stuhl und bemerkte, dass es sich bei den beiden Fällen um Geschwister handelte. 1925 wurde dieses Krankheitsbild von Lockhart-Mummery erstmals unter dem Namen „familiäre adenomatöse Polyposis“ (FAP) veröffentlicht (Lockhart-Mummery, 1925).

Die autosomal dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis umfasst ungefähr 1% aller kolorektalen Karzinomerkrankungen mit einer Häufigkeit von 1:8000 in der westlichen Welt (Bisgaard et al., 1994). Bei 75% der betroffenen Familien lässt sich eine positive Familienanamnese erheben; die übrigen Erkrankungsfälle werden durch Neumutationen verursacht. Das verantwortliche Gen, APC (*adenomatöse polyposis coli*), ist ein Tumor-Supressor-Gen und liegt auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q21). Seit 2003 ist ein weiteres Gen (MYH, 1p34.3-32.1) als Ursache von FAP identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein DNA-Reparatur-Gen mit autosomal rezessiver Vererbung (Sieber et. al., 2003).

1.2.2. Klinik und Diagnostik (APC)

Für Personen, die eine genetische Prädisposition für FAP geerbt haben, besteht ein hundertprozentiges Karzinomrisiko. Klinisch imponiert die Erkrankung in der zweiten Lebensdekade durch progressive Entwicklung multipler (>100) kolorektaler Adenome, insbesondere im distalen Dickdarmabschnitt, die als obligate Präkanzerose zu werten sind. Meist kommt es im dritten bis vierten Lebensjahrzehnt zu einer malignen Entartung. Häufig treten bei FAP-Patienten vor allem im Bereich des oberen Gastrointestinaltraktes zusätzliche Neoplasien (Adenome im

Magen, Duodenum und an der Papilla Vateri) mit erhöhtem Karzinomrisiko auf. Bei 40% der Patienten werden Drüsenkörperzysten des Magens gefunden. Diese sind jedoch nicht mit einem erhöhten Karzinomrisiko verbunden. Des Weiteren werden Zahn-/Kieferanomalien (17%), Osteome (75-90%) und Hautneoplasien wie Epidermoidzysten (50%) und Desmoide (10-15%) beobachtet. Die Desmoide finden sich als semimaligne, infiltrativ wachsende Tumoren im Bereich von Hautnarben und häufig intraabdominell im Mesenterium. Etwa 60% der FAP-Patienten weisen eine Pigmentanomalie der Retina ohne Beeinflussung des Visus auf, die sogenannte kongenitale Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels (CHRPE) (Blair and Trempe, 1980). Weniger häufige extrakolonische Manifestationen sind Schilddrüsenkarzinome, adrenokortikale Tumore, Hepatoblastome, Astrozytome und Medulloblastome (Giardiello et al., 1991), (Naylor and Gardner, 1981), (Kartheuser et al., 1999). Eine weniger schwere Form der FAP, die attenuierte adenomatöse Polyposis Coli (AAPC), ist durch eine geringe Anzahl von Polypen (<100) charakterisiert, zeigt aber auch extrakolonische Manifestationen (Spirio et al., 1993). Das Risiko, an Kolonkrebs zu erkranken bleibt dabei erhöht; es richtet sich dabei grob nach der Anzahl der Polypen (Debinski et al., 1996). Der Erkrankungsbeginn liegt im Vergleich zur klassischen FAP im Durchschnitt etwa 15 Jahre später, aber immer noch zehn Jahre früher als bei sporadischen Krebsformen (Spirio et al., 1993). Als Gardner-Syndrom wird die Kombination von kolorektalen Polypen mit epidermalen Zysten und gutartigen Osteoidtumoren des Kiefers und der Röhrenknochen beschrieben (Gardner, 1962). Das Turcot-Syndrom bezeichnet das Auftreten von kolorektalen Polypen und zerebellären Medulloblastomen (Hamilton et al., 1995), (Paraf et al., 1997).

Die klinischen Charakteristika der FAP sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

Erkrankung	Definition	Kolon und Rektum	Extrakolonische Manifestation
Klassische FAP	>100 kolorektale Adenome (Polypen)	>100 Adenome distal > proximal	Adenome und Karzinome im Duodenum, selten im Magen, benigne Drüsenkörperzysten im Magen, CHRPE, seltener: Schilddrüsen-Ca, Hepatoblastome, Astrozytome
Gardner-Syndrom	>100 kolorektale Adenome (Polypen)	> 100 Adenome	Epidermoidzysten, Osteome, Desmoide
Turcot Syndrom	>100 Adenome, ZNS-Tumor	> 100 Adenome	Medulloblastome
Attenuierte FAP* (AAPC)	5-100 Adenome, spätere Manifestation (~55. LJ)	5-100 Adenome proximal > distal	(wie klassische FAP)

Tab. 2: FAP-Formen und Charakteristika von FAP (*Überlappung mit HNPCC)

Das Auftreten der extrakolonischen Manifestationen ist abhängig von der Lokalisation der vererbten Mutation im APC-Gen (eine genauere Beschreibung folgt in Kap. 1.3.1.).

1.2.3. Therapie und Vorsorge

Die bisher einzige Möglichkeit, das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms bei Trägern einer APC-Keimbahnmutation zu verhindern, besteht in der operativen Entfernung des gesamten Kolons und Rektums. Diese Operation kann heute fast immer kontinenterhaltend durchgeführt werden. Bei operierten FAP-Patienten hat die Nachsorge das Ziel, Krankheitserscheinungen, die außerhalb des Dickdarms liegen, frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls therapeutisch anzugehen. Hier sind vor allem Polypen des oberen Gastrointestinaltraktes sowie Desmoide zu erwähnen.

Wenn die in der Familie krankheitsverursachende Mutation bekannt ist, kann im Rahmen einer humangenetischen Beratung eine prädiktive molekulargenetische Analyse angeboten werden. Allen Anlageträgern und nicht getesteten Risikoträgern in der Familie sollten engmaschige Kontrolluntersuchungen empfohlen werden (s. Tab. 3). Gleichzeitig kann Familienmitgliedern ohne APC-Mutation diese Belastung erspart und die Angst vor einem erhöhten Tumorrisiko genommen werden. Wird bei dem Indexpatienten einer Familie keine Mutation im APC-Gen gefunden, bleibt die Möglichkeit einer indirekten molekulargenetischen Analyse des FAP-Genortes.

Neuere Studien geben Hinweise, dass Celecoxib, ein Cyclooxygenase-2-Inhibitor die Anzahl kolorektaler Adenome in FAP reduzieren kann (Steinbach et al., 2000).

Alter	Untersuchung	Frequenz
Ab dem 10. Lebensjahr	Körperliche Untersuchung	einmal jährlich
	Rektosigmoidoskopie (bei Beobachtung erster Polypen Koloskopie statt Rektosigmoidoskopie)	einmal jährlich
	Abdomensonographie	einmal jährlich
	Augenärztliche Untersuchung auf CHRPE	Einmalig
Vor der prophylaktischen Kolektomie bzw. ab dem 30. Lebensjahr	Erste Gastro-Duodenoskopie, danach ➤ bei Nachweis von Adenomen ➤ ohne Nachweis von Adenomen	einmal jährlich alle drei Jahre

Tab. 3: Vorsorgeplan bei Verdacht auf FAP

1.3. Adenomatöse Polyposis Coli

1.3.1. Das Gen (APC)

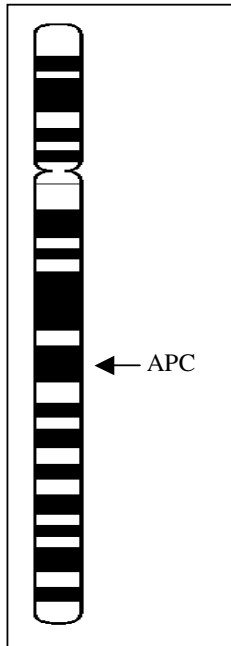


Abb. 2: Chromosom 5 mit Lokalisation der Bande 5q21-22 und dem APC-Gen.

Das seit 1991 identifizierte Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q21-22) lokalisiert, s. Abb. 2 und 3, (Kinzler et al., 1991). Das APC-Gen besteht aus insgesamt 21 Exons, die sich über eine Länge von 98kb erstrecken. Die Exons 1-15 kodieren mit 8535bp das aus 2843 Aminosäuren (311.8kDa) bestehende konventionelle APC-Protein. (Grodén et al., 1991), (Thliveris et al., 1996). Zusätzlich werden durch sechs alternativ expremierte Exons (0.1, 0.2, 0.3, BS, 9A und 10A) verschiedene Proteinisoformen kodiert (s. Abb. 4 und 5) (Thliveris et al., 1994), (Hori et al., 1993). Die Größe der Exons reicht von 85bp (Exon 2) bis 379bp (Exon 9), während das letzte Exon (15) mit 6574bp bemerkenswert lang ist und damit 75% des APC-Proteins kodiert.

Durch alternatives Spleißen kann das APC-Gen verschiedene Isoformen generieren. Am 5'-Ende des Gens (vor Exon 1) wurden bisher vier weitere Exons entdeckt – 0.3, BS (*brain specific*), 0.1 und 0.2 (s. Abb. 4).

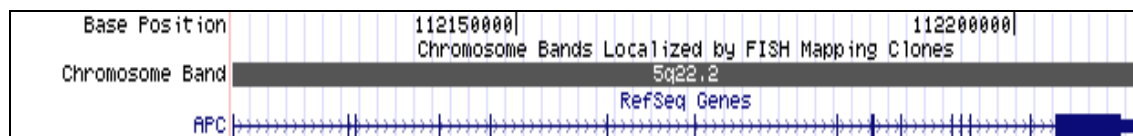


Abb. 3: Darstellung der genomischen Intron-Exon-Struktur des APC-Gens (Exons 1-15). Die oberste Reihe gibt die Basenposition im Genom an. Der Balken in der Mitte stellt die Chromosomenbande 5q22.2 dar. Die unterste Zeile entspricht dem APC-Gen. Die vertikalen Striche stellen die einzelnen Exons da. Das große Exon 15 ist als Box am Ende des Gens abgebildet. Zwischen den vertikalen Strichen (Exons) liegen die Introns. Die kleinen Pfeile geben die Leserichtung an. (Quelle: <http://genome.ucsc.edu>)

Durch diese vier zusätzlichen Exons können weitere neun verschiedene mRNA-Isoformen entstehen (0.3-1-2; 0.3-2; BS-1-2; BS-2; 0.1-0.2-1-2; 0.1-0.2-2; 0.1-1-2; 0.1-2; 0.3-BS-1, s. Abb. 5) (Thliveris et al., 1994), (Santoro and Grodén, 1997), (Hori et al., 1993). Ob diese Isoformen durch gewebsspezifische Modifikation entstehen, ist noch nicht endgültig geklärt. Auffallend ist jedoch das Überwiegen von APC mRNAs ohne Exon 1 in postmitotischen, differenzierten Geweben wie Herz und Gehirn. Die Initiationsstelle der Translation des Exons 1 wird bei dessen Fehlen durch Initiationsstellen in den Exons 0.2, 0.3 und BS ersetzt. In Exon 0.1 wurde keine Initiationsstelle gefunden. Dies und das Auftreten Leserahmen-verschiebender Polymor-

phismen in Nicht-Betroffenen in Exon 0.1 lassen darauf schliessen, dass es sich bei Exon 0.1 um ein nicht-kodierendes Exon handelt (Santoro and Groden, 1997). Auch von den

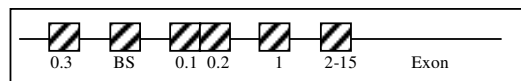


Abb. 4: Reihenfolge der 5' Exons im Genom
– 0.3-BS-0.1-0.2-1 bis 15

Exons 9 und 10 sind alternative Splicevarianten bekannt. Von beiden existieren je zwei Isoformen (9 und 9a / 10 und 10a) (Thliveris et al., 1996). In Exon 9a sind die Basen 934-1236 der mRNA deletiert und daher das Protein um 101 Aminosäuren verkürzt (Groden et al., 1991), Exon 10A ist dagegen um 18 Aminosäuren länger als Exon 10 (Sulekova et al., 1995), (Xia et al., 1995). Es kodiert zusammen mit dem Exon 9A zusätzliche *heptad*-Wiederholungen (s. Kap. 1.3.3). APC-Transkripte, die dieses verlängerte Motiv beinhalten, können möglicherweise spezifische Protein-Protein-Interaktionen durch Formierung einer *coiled-coil*-Struktur eingehen. Eine weitere alternative Spleißform ist durch das Fehlen von Exon 14 charakterisiert. Sie ist von großer funktioneller Signifikanz, da der ORF (*open reading frame*) des langen Exon 15 verändert wird. Es werden dann nur noch 19 Aminosäuren des Exon 15 translatiert. Dieses verkürzte Protein kommt physiologisch in einem geringen Prozentsatz in Körperzellen vor. Ob es eine bestimmte Aufgabe in der Zelle übernimmt, ist bisher noch nicht geklärt (Sulekova et al., 1995), (Sulekova et al., 1999).

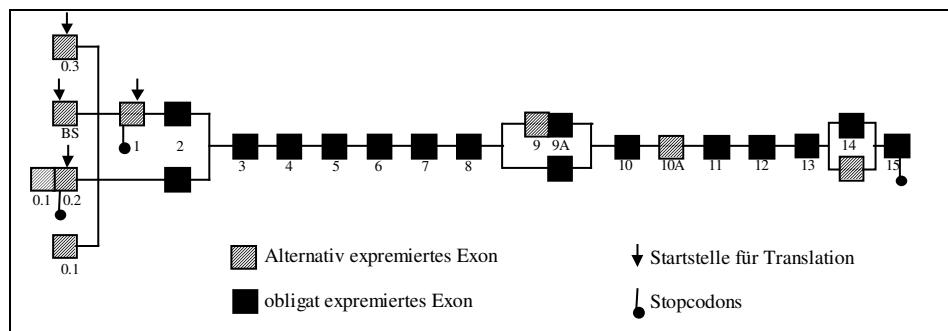


Abb. 5.: Schematische Darstellung von acht der neun alternativen Isoformen von APC. Exon 1 kodiert eine Translationsstartsequenz (Pfeil). Die 5' Exons 0.3, BS und 0.2 enthalten ebenfalls eine Translationsstartsequenz. Diese sind in-frame mit Exon 2. Nicht dargestellt ist die neunte Isoform 0.3-BS-1. Angelehnt an (Santoro and Groden, 1997).

Mutationen in APC, ob somatisch oder in der Keimbahn, sind die ersten in der Krebsentstehung (Powell et al., 1992) und werden in 80% aller kolorektalen Adenome und Karzinome gefunden. APC-Keimbahnmutationen sind bisher nur in kolorektalen Karzinomen, Magen- und Pankreaskrebs gefunden worden. Möglicherweise hängt das mit den gewebespezifischen Isoformen von APC zusammen (Horii et al., 1993). (Nagase et al., 1993).

Die Mehrzahl (>95%) aller APC-Mutationen verursachen durch Stopmutationen (~33%) oder durch Verschiebung des Leserahmens (~62%) einen vorzeitigen Synthese-Abbruch (Soussi,

1999), (Nagase et al., 1993), (Beroud et al., 1996). Beides führt zu einem verkürzten Protein, dem das wichtige Carboxylende fehlt (Andreutti-Zaugg et al., 1999). Die restlichen Mutationen (5%) sind Punktmutationen, die zum Austausch von Aminosäuren führen, was je nach Eigenschaft und Lokalisation der Aminosäure im Protein unterschiedliche Auswirkungen haben kann – von keiner Funktionsbeeinträchtigung bis hin zum völligen Funktionsausfall.

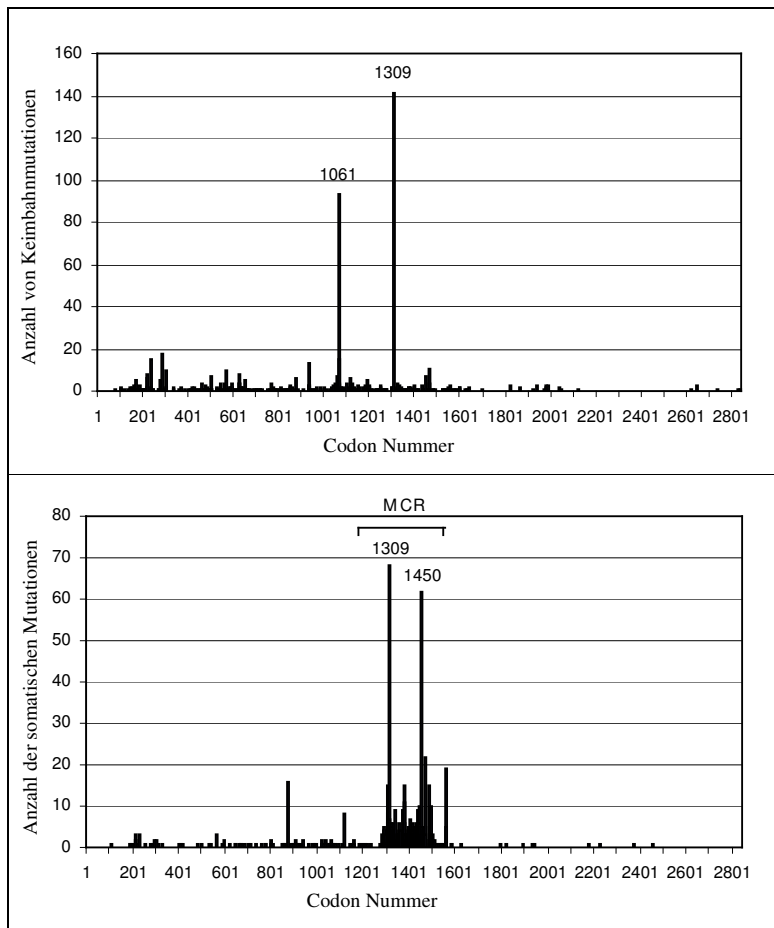


Abb. 6: Verteilung der Keimbahnmutationen im APC-Gen (n = 1024) in Bezug auf die Codonnummer. Die Daten basieren auf der APC-Datenbank von Thierry Soussi (<http://p53.curie.fr>)

Abb. 7: Verteilung der somatischen Mutationen im APC-Gen in kolorektalen Tumoren (n = 814) mit Darstellung der MCR (Codon 1284-1580). Die Daten basieren auf der APC-Datenbank von Thierry Soussi (<http://p53.curie.fr>)

Über 80 Prozent der APC-Mutationen liegen in der 5'-Hälfte des Gens. Allerdings unterscheidet sich das Verteilungsmuster der Mutationen in der 5'-Hälfte je nachdem, ob eine Mutation ihren Ursprung in der Keimbahn oder in einer somatischen Zelle hat (s. Abb. 6/7). Keimbahnmutationen sind über die ganze erste Hälfte des Gens verteilt (Codons 200-1600). Zu einem Drittel sind die Aminosäuren 1061 und 1309 betroffen. (Nagase et al., 1993), (Beroud et al., 1996) Durch Deletion von 5bp (ACAAA bei Codon 1061 und AAAGA bei Codon 1309) kommt es bei beiden zu einer Verschiebung des Leserahmens. Dies führt ebenso zu einem Synthese Abbruch wie eine Methylierung oder Desaminierung von CpG-Inseln – das Codon CGA für Arginin beispielsweise wird durch eine Desaminierung nach einer Methylierung zu TGA (Codon 283), einem Stop-Codon (Beroud et al., 1996), (Wallis et al., 1999). Zwei Drittel der

somatischen Mutationen in APC sind in der Region zwischen den Codons 1284 und 1580, der MCR (*mutation cluster region*) zu finden (Miyoshi et al., 1992). Die hauptsächlich betroffenen Codons sind 1309 und 1450.

Knudsons „two-hit“ Theorie zufolge führt neben der Keimbahnmutation eine somatische Mutation oder ein Verlust des Wildtyp-Allels zur Ausprägung von FAP. Allerdings besagt diese Theorie, dass die beiden Mutationen unabhängig voneinander stattfinden. APC weicht von diesem Schema ab. Die Position und die Art der zweiten Mutation hängen von der Lokalisation der Keimbahnmutation ab (Nagase et al., 1993), (Lamlum et al., 1999), (Smits et al., 2000). Liegt die Keimbahnmutation zwischen den Aminosäuren 1194-1392, führt dies in der Regel zu einem Verlust des korrespondierenden Alleles (LOH). Tritt die erste Mutation außerhalb dieser Region auf, führt die zweite Mutation durch Verschiebung des Leserahmens oder durch eine Punktmutation im Großteil der Fälle zu einem verkürzten Protein (Lamlum et al., 1999). Auch hier sind bei den Punktmutationen hauptsächlich C→T Substitutionen in CpG- und CpA-Inseln zu finden (Miyoshi et al., 1992).

Nach der Theorie des „*just-right-signalling*“ beruht dieses Phänomen auf einem bestimmten Selektionsmechanismus. Die Konstellationen in Tumorzellen zeigen, dass nach der Mutation des zweiten Allels mindestens eine 20-AS-Wiederholung (β-Catenin-Bindungsstelle) erhalten bleibt (s. Abb. 8). Dadurch wird eine gewisse Restkapazität des APC (Reduktion des β-Catenin-Spiegels) gewährleistet. Eine komplette Funktionslosigkeit des APC-Proteins (keine 20-AS-Wiederholung) bewirkt durch eine hohe Akkumulation von β-Catenin in der Zelle eine Aktivierung von Apoptosefaktoren und damit den Zelltod. Zellen ohne β-Catenin-Bindungsstellen sterben, und es überleben und entarten nur Zellen mit mindestens einer Bindungsstelle, also einem Mindestmaß an Restkapazität (Albuquerque et al., 2002).

Als alternativer Angriffspunkt für somatische Mutationen werden die beiden Promoterregionen 1A und 1B gehandelt, wobei bis dato nur für den zumeist aktiven 1A-Promotor Hypermethylierungen beschrieben sind, die zur Unterexpression von APC führen (Hiltunen et al., 1997), (Esteller et al., 2000). Genomische Deletionen ganzer Exons werden in der Literatur nur selten beschrieben. Bekannt sind bisher Deletionen der Exons 4, 8, 11, 12, 13, 14 und 15 bzw. Teile dessen (A, D und F) (Sieber et al., 2002), (Su et al., 2000), (Su et al., 2002), (Cao et al., 2000), (Cao et al., 2001), (De Rosa et al., 1999), (Flintoff et al., 2001), (Bala et al., 1997).

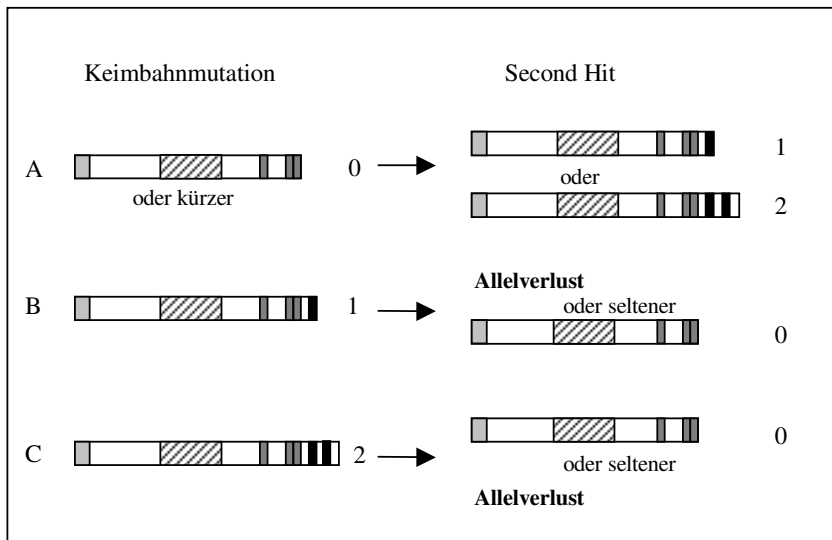


Abb. 8: Die Position und der Typ der zweiten Mutation in FAP-Polypen hängen von der Lokalisation der Keimbahnmutation ab. Die Keimbahnmutation und der second hit (die somatische Mutation) sind durch ihr verkürztes Protein repräsentiert.
 zu A: Führt die Keimbahnmutation zu einem verkürzten Protein ohne 20-AS-Einheit, resultiert die zweite Mutation in einem verkürzten Protein mit einem oder zwei 20-AS-Einheiten
 zu B: Endet die Keimbahnmutation mit einem Protein mit einer 20-AS-Einheit, wird bei einem Großteil der Tumore die zweite Kopie durch LOH eliminiert.
 zu C: Besitzt das Protein nach Keimbahnmutation 2 20-AS-Einheiten, weist die zweite Kopie nach Mutation keine 20-AS-Einheit mehr auf.

Erste Box (hellgrau): Oligomerisationsdomäne, gestrichelte Box: Armadillo-Wiederholungen, dunkelgraue Boxen: 15-AS-Wiederholungen, schwarze Boxen: 20-AS-Wiederholungen. Die Nummern neben den schematischen Proteinen zeigen die Anzahl der vorhandenen 20-AS-Wiederholungen (schwarze Boxen).

1.3.2. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die autosomal dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) umfasst ca. 1% aller kolorektalen Karzinomerkrankungen mit einer Häufigkeit von ca. 1:10.000 in unserer Bevölkerung. Bei ca. 75% der betroffenen Familien lässt sich eine positive Familienanamnese erheben; die übrigen Erkrankungsfälle werden durch neu aufgetretene genetische Veränderungen (Neumutationen) verursacht.

Wie in Kap. 1.2.2. erwähnt gibt es bei FAP bezogen auf die Keimbahnmutationen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen (Fodde and Khan, 1995) (s. Tab. 4).

Form der FAP	Betroffene Codons / Region
Schwere Form (>5000 Polypen)	1250-1465, 233, 486, 499
Schwere Form mit frühem Erkrankungsbeginn	1309
Milde Form (1000-2000 Polypen)	213-1597
Attenuierte Form	< Exon 5, > 1595, Exon 9A
Extrakolonische Manifestationen:	
CHRPE	457-1445; 543-1309 (je nach Autor)
Desmoide	1403-1578; 1310-2011 (je nach Autor)
Duodenale Adenome	976-1067
Hepatoblastome	457-1309
Andere	1445-1578; 1395-1493 (je nach Autor)

Tab. 4: Formen von FAP mit typischer Mutationslokalisierung

Bei Patienten mit einer schweren Form der FAP (>5000 Polypen) werden Mutationen in mittleren Teil des Gens (Codons 1250-1465) beobachtet (Nagase et al., 1992), (Bertario et al., 2003), es sind aber auch Mutationen in den Codons 233 (Exon 6) (Nugent et al., 1994), 486

und 499 (beide Exon 11) (Eccles et al., 1997) beschrieben. Eine besonders schwere Form mit frühem Erkrankungsbeginn (Durchschnittsalter bei Manifestation 35 Jahre) tritt bei Patienten mit Mutationen des Codons 1309 und dem unmittelbar benachbarten 3'-Teil auf (Nugent et al., 1994), (Caspari et al., 1994), (Gayther et al., 1994), (Bertario et al., 2003). Mutationen in den Codons 213-1597 gehen mit einer milderen Form von FAP (1000-2000 Polypen), aber duodenalen Adenomen (Bertario et al., 2003) einher. Liegt die Mutation an den extremen Enden des Gens (vor Exon 5 und hinter Codon 1595) oder in Exon 9A, bildet sich eine attenuierte Form von FAP (AAPC) mit wenigen Polypen und einem späteren Erkrankungsbeginn aus (Soravia et al., 1998), (Spirio et al., 1993), (van der Luijt et al., 1996), (Young et al., 1998). Die extrakolonischen Manifestationen verteilen sich in verschiedene Bereiche des APC-Gens. CHRPE tritt mit Mutationen im Bereich der Codons 457-1445 (Spirio et al., 1993), (Wallis et al., 1994), (Olschwang et al., 1993) bzw. Codons 543-1309 (Bertario et al., 2003). Desmoid-Tumore sind vermehrt bei Mutationen im Bereich der Codons 1403-1578 (Caspari et al., 1995), (Davies et al., 1995) bzw. Codons 1310-2011 (Bertario et al., 2003) zu finden. Mutationen der Codons 976-1067 führen verstärkt zu duodenalen Adenomen (Bertario et al., 2003), und Hepatoblastome kommen bei Mutationen am 5'-Ende vor (Wallis et al., 1999), (Giardiello et al., 1996). Weitere extrakolonische Manifestationen (Osteome, epidermale Zysten, Tumore des oberen Gastrointestinaltraktes) treten bei Mutationen der Codons 1445-1578 (Caspari et al., 1995) bzw. 1395-1493 (Wallis et al., 1999) auf.

Erklärbar ist das Phänomen der Genotyp-Phänotyp-Korrelation zum einen durch die unterschiedlichen Domänen des APC-Proteins (die phänotypische Auswirkung richtet sich nach betroffener Domäne), zum anderen durch einen dominant-negativen Effekt. APC arbeitet als Homodimer; bei Verkürzung eines der Monomere im Mittelteil ist die Arbeit des Wildtypallels mehr behindert als wenn sich die Mutation in den Randbezirken des Proteins befindet (Bodmer, 1999), (Cottrell et al., 1992). Trotz grober Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zeigen Patienten mit derselben Mutation unterschiedliche phänotypische Manifestationen (allelische Variation) (Giardiello et al., 1994), (Nugent et al., 1994). Das lässt auf das Vorhandensein von modifizierenden Genen schließen (Houlston et al., 2001).

Neben den oben beschriebenen Mutationen gibt es in der Literatur zwei charakterisierte APC-Keimbahnvarianten (I1307K, E1317Q). Derzeit wird diskutiert, welchen Einfluss die beiden – insbesondere I1307K – auf die Entstehung von Adenomen bzw. Karzinomen haben. Je nach Auswahl der zu untersuchenden Personen zeigt I1307K eine prädisponierende Wirkung auf die Entstehung von Tumoren oder nicht. Ein milder prädisponierender Faktor für Entartungen ist

aber nicht auszuschließen (Laken et al., 1997), (Gryfe et al., 1998), (Gryfe et al., 1999), (Woodage et al., 1998), (Figer et al., 2001), (Redston et al., 1998), (Petersen et al., 1998), (Frayling et al., 1998), (Yuan et al., 1998), (Prior et al., 1999), (Gruber et al., 1999), (Lamlum et al., 2000), (Rozen et al., 1999), (Rozen et al., 2002), (Silverberg et al., 2001), (Sieber et al., 2003).

Das klinische Bild der Patienten, bei denen eine dieser Varianten nachgewiesen wurde, entspricht dem einer attenuierten FAP mit wenigen Polypen und Ausbildung von Adenomen oder Karzinomen im frühen Lebensalter. Die Variante I1307K ist bei 6-9% der Ashkenazi-Juden zu finden. Sie ist durch einen T→A Austausch im Codon 1307 charakterisiert, der zu einer Substitution von Isoleucin (I) zu Lysin (K) für und so zu einem poly(Adenin)₈-Stück im Gen führt. Dadurch wird dieser Abschnitt instabil und begünstigt im direkten Umfeld das Auftreten somatischer Mutationen, die durch ein vorzeitiges Stop-Codon zu einem Syntheseabbruch führen können. Viele der bei Patienten gefundenen somatischen Mutationen befinden sich auf dem I1307K-Allel. Es wird angenommen, dass I1307K nicht ursächlich für die Entartung ist, sondern vielmehr die durch diese Variante begünstigten Mutationen die Bildung von Adenomen und Karzinomen beschleunigen können (Laken et al., 1997). Die zweite Variante – E1317Q – ist hochkonserviert (s. Kap. 8.5). Auch sie wurde sowohl in Patienten mit Adenomen als auch mit Karzinomen entdeckt. Der Basenaustausch führt zu einer Substitution einer Glutaminsäure (Q) für ein Glutamin (E). Beide Varianten verändern die Ladung von APC im Bereich der β-Catenin-Bindungsstellen und üben so womöglich einen milden dominant-negativen Effekt aus, der zur Bildung von Adenomen prädisponieren kann (Frayling et al., 1998).

1.3.3. Das Protein – die molekulare Struktur

Die Inaktivierung von APC ist ein frühes Ereignis in der Entwicklung von familiärem und sporadischem Dickdarmkrebs. APC ist ein multifunktionelles Protein, das in vielen Zellprozessen beteiligt ist – Regulation der Zellproliferation, -migration, -adhäsion, zytoskelettaler Organisation, chromosomaler Stabilität und Apoptose. Die Interaktion mit einer Vielzahl zellulärer Proteine wird durch die verschiedenen Proteindomänen (Homodimerisationsdomäne, Homologie-domäne, Armadillo-Region, 15- und 20-Aminosäurewiederholungen, SAMP Wiederholungen, die basische Domäne, die nukleären Import- und Exportsignale und dem C-Terminus mit Bindungsstellen für diverse Proteine) ermöglicht (s. Abb. 9) (Polakis, 1997).

- Die Bildung von Homodimeren wird durch die hydrophoben Reste der *heptad*-Wiederholungen in der *Homodimerisationsdomäne* ermöglicht. Die Aminosäuren 6-57 sind für eine

Homodimerbildung unbedingt erforderlich. Mutationen in dieser Region könnten einen dominant-negativen Effekt verursachen, da die Bindung zwischen einem Wildtyp und einem mutierten APC-Proteins nicht funktionsfähig wäre und nicht genügend Wildtyp-Wildtyp Dimere vorlägen, um die Aufgaben innerhalb der Zelle zu bewältigen (Su et al., 1993), (Joslyn et al., 1993), (Bodmer, 1999).

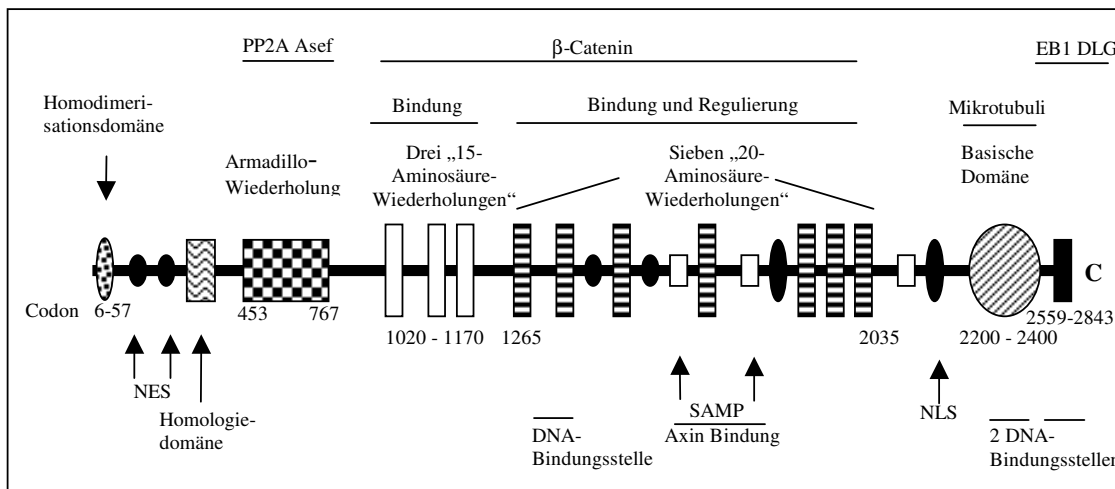


Abb. 9: APC-Protein mit funktionellen Domänen. Die Zahlen geben die Codonnummer an, an der eine Domäne anfängt bzw. aufhört. Jede Domäne ist durch ein Symbol dargestellt, die Symbole von mehr als einmal vorkommenden Domänen sind nur einmal beschriftet:

● → NES, ○ → NLS, □ → SAMP

- Die hochkonservierte *Armadillo-Region* ist zwischen den Codons 453 und 766 lokalisiert und besteht aus sieben Kopien eines 42 Aminosäuren langen Motivs (Peifer et al., 1994). Diese Domäne spielt bei Protein-Protein Interaktionen eine Rolle. Bisher sind zwei Proteine bekannt, die an diese Region binden: die regulatorische B56-Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A) und Asef (*APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor*). Über die katalytische Untereinheit von PP2A wird Axin, ein Protein, das den Abbau von β-Catenin mitreguliert, gebunden (Seeling et al., 1999), (Hsu et al., 1999). Dieser Komplex ist Bestandteil des Wnt-Signalweges (*wingless type*) (s. Abb. 10). Der APC-Asef Komplex reguliert wahrscheinlich das Aktinnetzwerk des Zytoskeletts der Zellen, die Zellmorphologie und -migration (Kawasaki et al., 2000), (Kawasaki et al., 2003). Mutationen können hier zu einer Migrationsstörung führen.
- APC beinhaltet zwei verschiedene Arten von hochkonservierten *Aminosäurewiederholungen*, eine mit 15 und eine mit 20 sich wiederholenden Aminosäuresequenzen. Die 15-Aminosäuresequenz kommt dreimal, die 20-Aminosäuresequenz dagegen siebenmal in APC vor (Su et al., 1993), (Rubinfeld et al., 1993). Beide Arten können, nachdem sie durch GSK3β phosphoryliert wurden, β-Catenin – einen weiteren wichtigen Bestandteil des Wnt-

Signalweges und eine strukturelle Komponente der Zelladhäsionsverbindungen – binden (Rubinfeld et al., 1996). Aber nur die 20-AS-Wiederholungen sind in der Lage, β -Catenin durch Phosphorylierung für den nachfolgenden Abbau zu markieren (Munemitsu et al., 1995). Für die Bindung von β -Catenin reicht zwar eine 20-AS-Sequenz aus, für die Phosphorylierung werden aber mindestens drei 20-AS-Wiederholungen benötigt (Rubinfeld et al., 1997). Durch Mutationen in dieser Region werden die 20-AS-Wiederholungen durch vorzeitigen Synthese-Abbruch unterbrochen, was zu einer Akkumulation von β -Catenin führt. Die 15-AS-Wiederholungen bleiben in der Regel intakt.

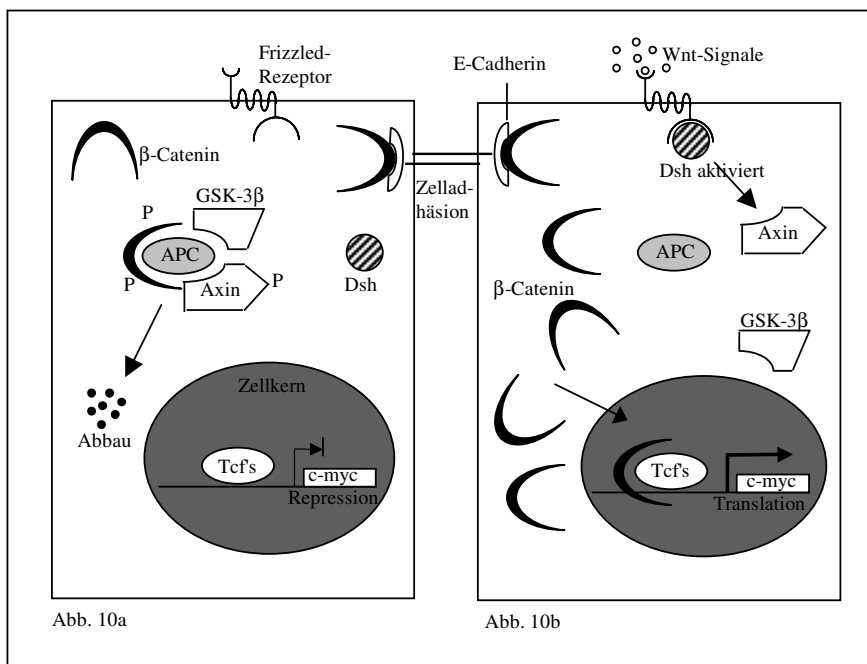


Abb. 10: Wnt-Signalweg. Zelltransduktion von APC und β -Catenin ohne (10a) und mit (10b) Wnt-Signalen.

10a: In der Abwesenheit von Wnt-Signalen bildet freies β -Catenin mit APC, Axin und GSK-3 β einen Komplex. Durch GSK-3 β phosphoryliert wird β -Catenin von Proteasomen abgebaut. Daher kann β -Catenin nicht in den Zellkern wandern und auch keine Transkriptionsfaktoren aktivieren.

10b: In Anwesenheit von Wnt-Signalen wird Dsh aktiviert. Dieses bindet und dephosphoryliert Axin. Axin kann damit keine Bindung mehr mit APC und GSK-3 β eingehen. Somit wird β -Catenin nicht phosphoryliert. Es kommt zur Anreicherung von β -Catenin im Zytoplasma. β -Catenin wandert in den Zellkern und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren

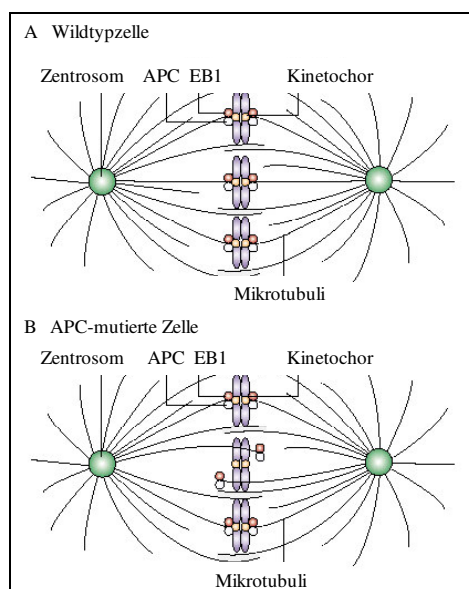
- Innerhalb der 20-AS-Wiederholungen liegen drei *SAMP-Wiederholungen* (Serin-Alanin-Methionin-Prolin) Diese sind Plattformen für die Bindungen von Axin, das zusätzlich wie oben beschrieben auch über PP2A gebunden wird. APC bildet mit Axin, β -Catenin und GSK3 β einen tetrameren Komplex, der zur Zerstörung von β -Catenin führt. (Behrens et al., 1998), (Hart et al., 1998)
- Die *basische Domäne* zwischen Aminosäure 2200 und 2400, beinhaltet ihrem Namen nach viele basische Aminosäuren (Arginin und Lysin), aber auch viele Proline. (Munemitsu et al., 1994), (Smith et al., 1994). Diese Region bindet freies Tubulin und unterstützt die Tubulinorganisation (Deka et al., 1998), (Zumbrunn et al., 2001). Diese Domäne ist bei verkürzten APC-Proteinen selten erhalten.

- Die *C-terminale-Region* ist wichtig für den Zellzyklus und die Wachstumskontrolle durch Bindung von mindestens drei Proteinen – EB1, hDLG und PTP-BL (Su et al., 1995), (Matsumine et al., 1996), (Erdmann et al., 2000). EB1 (*end-binding protein*) gehört zu den Tubulin-bindenden Proteinen und spielt während der Zellteilung eine wichtige Rolle bei der Organisation des Spindelapparates (Su et al., 1995). hDLG (*human disc large guanylatcyclase*) ist Mitglied der membranassoziierten Guanylatzyklen, die in die Aufrechterhaltung der Zellpolarität und in der Hemmung der Zellproliferation involviert sind (Matsumine et al., 1996). Die Interaktion von PTP-BL (*protein tyrosine phosphatase*) mit APC im Zellkern moduliert möglicherweise indirekt das Gleichgewicht von Phosphorylierung und Dephosphorylierung APC-assoziiierter Proteine (Erdmann et al., 2000).

Abb. 11: Die mitotischen Spindeln im Verhältnis zu APC.

A In APC Wildtypzellen akkumuliert APC an den Kinetochoren. Dort erleichtert es wahrscheinlich die Bindung der Spindelmikrotubuli an die Kinetochore durch Interaktion mit Mikrotubuli assoziiertem Protein EB1.

B In Zellen, die ein verändertes APC-Protein exprimieren ist die Interaktion zwischen Kinetochoren und Spindelmikrotubuli gestört. Das führt zu chromosomaler Instabilität



- Die *NES* (*nuclear export signals*) am N-Terminus (Codons 68-77) und innerhalb der 20-AS-Wiederholungen (Codons 165-174) werden benötigt, um APC zusammen mit β -Catenin aus dem Kern auszuschleusen. Dabei korrespondieren sie mit der dritten, vierten und siebenten 20-AS-Sequenz. Die Abwesenheit der NES führt zu einer Akkumulation von β -Catenin im Kern (Neufeld et al., 2000), (Henderson, 2000).
- Die zwei *NLSs* (*nuclear localization signals*), Aminosäuren 1767-1772 und 2048-2053, sind für die Einschleusung von APC in den Kern notwendig. Reguliert wird auch dieser Prozess wahrscheinlich über Phosphorylierung (Zhang et al., 2000).
- Außer den bisher beschriebenen Domänen gibt es drei potentielle *DNA-Bindungsstellen*. Jede enthält einen speziellen Bereich, der sich aus drei bis fünf Wiederholungen eines 5-Aminosäure langen Stückes zusammensetzt. Die erste DNA-Bindungsstelle überlappt den

proximalen Anteil der zweiten 20-AS-Sequenz, die zweite befindet sich innerhalb der basischen Domäne und die letzte liegt nahe dem C-Terminus von APC. Diese Domänen binden vorzugsweise A/T-reiche DNA-Sequenzen und regulieren möglicherweise direkt oder indirekt die Transkription ausgewählter Gene (Deka et al., 1999).

Dem APC verwandte Proteine wurden in mehreren Vertebraten, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* gefunden (Hayashi and al., 1997), (Thorpe and al., 1997). Im Mausgenom wurden APC und APC-2 und korrespondierend im Menschen APC und APC-L identifiziert (Nakagawa et al., 1998). APC-2 und APC-L werden im folgenden unter APC2/L weitergeführt, da sie im hohen Maße übereinstimmen. In *Drosophila* gibt es ebenfalls zwei Formen, APC-D und APC-E (Hayashi et al., 1997), (Yu et al., 1999). Alle identifizierten Proteine spielen eine Rolle im Wnt-Signalweg, ihre zentralen Anteile (Armadillo und β -Catenin-Bindungsstelle) sind hoch konserviert, sie differieren aber signifikant im C-terminalen Bereich und somit in ihrer Bindungsfähigkeit mit anderen Proteinen. Die Variationen zwischen den APC-Proteinen sind am C-terminalen Ende am größten. E-APC und APC2/L fehlt die basische Domäne, die EB1- und die hDLG-Bindungsstelle (van Es et al., 1999), (Nakagawa et al., 1998), (Yu et al., 1999).

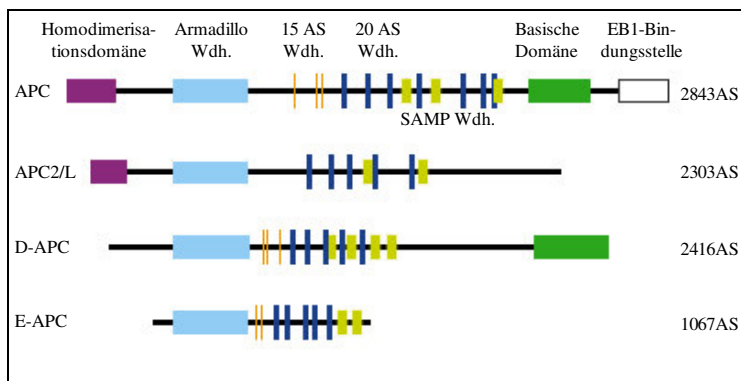


Abb. 12: Schematische Darstellung unterschiedlicher APC-Proteine; Vertebraten (APC, APC2/L) und *Drosophila* (APC-D, APC-E). Die Anzahl der Aminosäuren jedes Proteins sind rechts angegeben. Die dünnen, großen vertikalen Striche stellen die 15-AS-Wiederholungen dar, die dicken, großen vertikalen Striche dagegen die 20-AS-Wiederholungen. SAMP-Wiederholungen sind durch kleine, dicke vertikale Kästen angezeigt. Angelehnt an Dikovskaya et al., 2001.

APC2/L liegt innerhalb eines 50kb genomischen Fragments auf Chromosom 19p13.3 (van Es et al., 1999) – eine Region, die oft bei verschiedenen Krebsarten, insbesondere bei Ovarialkarzinomen, verloren geht. APC2/L wird in vielen verschiedenen Geweben, besonders aber im Gehirn exprimiert (Nakagawa et al., 1998). Es ist mit seinen 2303 Aminosäuren APC in seiner Struktur sehr ähnlich. Im Gegensatz zu APC fehlen APC2/L die 15-AS-Wiederholungen und die hDLG-Bindungsregion, außerdem besitzt es nur fünf 20-AS-Wiederholungen. Nachgewiesen ist, dass es mit β -Catenin interagiert, und das β -Catenin-Level beeinflusst (Nakagawa et al., 1998).

Die Unterschiede und Homologien zwischen APC und APC2/L legen den Schluss nahe, dass beide Proteine überlappende Funktionen wie die Regulierung des Wnt-Signalweges, aber auch

unterschiedliche Aufgaben haben. Bewiesen ist, dass APC2/L die Folgen einer Inaktivierung von APC nicht ausgleichen kann. (van Es et al., 1999)

Die Aminosäuresequenzen von APC im Menschen, in der Maus und Xenopus sind im Anhang (s. Kap. 8.5) mit Hervorhebung der Homologien dargestellt.

1.3.4. Die Aufgaben in der Zelle

APC ist ein vielseitiges Protein, das an einer Unzahl zellulärer Prozesse – Regulation der Zellproliferation, Zellmigration, -adhäsion, zytoskelettale Organisation und chromosomaler Stabilität – beteiligt ist. Jede dieser Funktionen kann eine APC Inaktivierung mit der Tumorgenese verbinden.

1.3.4.1. Zelldifferenzierung und -proliferation

Eine der Hauptaufgaben von APC ist die Regulation des Wnt-Signalweges (s. Abb. 13), der wiederum die Zelldifferenzierung und -proliferation steuert (Peifer and Polakis, 2000). Der Ausdruck Wnt ist ein Akronym für die orthologen Gene *wingless* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und *WNT1* (früher *int-1*) der Maus *Mus musculus*. Diese Gene (*wingless* und *WNT*) waren die ersten charakterisierten Mitglieder einer Genfamilie, die für sezernierte Glykoproteine mit einem konservierten Muster kodieren. Diese Genfamilie ist mit derzeit 13 Mitgliedern im Menschen, Maus, Fruchtfliege und *C. elegans* mit einer Homologie von 40-90% sehr groß (Sharpe et al., 2001).

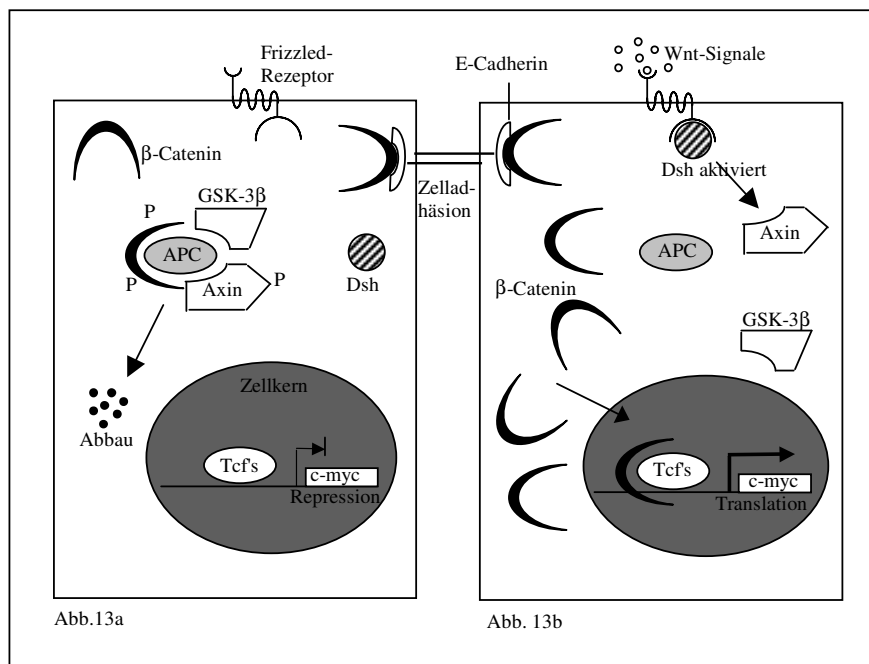


Abb. 13: Wnt-Signalweg. Zelltransduktion von APC und β-Catenin ohne (13a) und mit (13b) Wnt-Signalen.

13a: In der Abwesenheit von Wnt-Signalen bildet freies β-Catenin mit APC, Axin und GSK-3β einen Komplex. Durch GSK-3β phosphoryliert wird β-Catenin von Proteasomen abgebaut. Daher kann β-Catenin nicht in den Zellkern wandern und auch keine Transkriptionsfaktoren aktivieren.

13b: In Anwesenheit von Wnt-Signalen wird Dsh aktiviert. Dieses bindet und dephosphoryliert Axin. Axin kann damit keine Bindung mehr mit APC und GSK-3β eingehen und somit wird β-Catenin nicht phosphoryliert. Es kommt zur Anreicherung von β-Catenin im Zytoplasma. β-Catenin wandert in den Zellkern und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren.

In Abwesenheit von Wnt-Signalen wird freies zytoplasmatisches β -Catenin an den Multiproteinkomplex, bestehend aus APC, GSK3 β , PPA2 und Axin, gebunden (Hart et al., 1998), (Behrens et al., 1998), (Kishida et al., 1998). GSK3 β phosphoryliert in diesem Komplex β -Catenin an vier N-terminalen Serinen und Threoninen und markiert es dadurch zur Ubiquitinierung durch β -TRCP (*β -transducin repeat containing protein*) und zum Abbau durch Proteasome (s. Abb. 13) (Jiang and Struhl, 1998), (Marikawa and Elinson, 1998), (Aberle et al., 1997). Anwesende Wnt-Signale lösen eine Kaskade von Vorgängen in der Zelle aus. Die Bindung eines Wnt-Signals an einen Frizzled-Rezeptor aktiviert das Protein Dsh (*deshevelled*), das wiederum mit einer Vielzahl anderer Moleküle interagiert, unter anderen mit CK1 (Casein Kinase 1), CK2 und Inhibitoren des Wnt-Signalweges GBP/FRAT1 (Boutros and Mlodzik, 1999), (Peters et al., 1999), (Willert et al., 1997), (Li et al., 1999). Aktiviertes Dsh destabilisiert den APC/GSK3 β /Axin-Komplex durch direkte Bindung und Dephosphorylierung von Axin. Das dadurch im Zytoplasma akkumulierende freie β -Catenin transloziert daraufhin in den Nukleus (Yokoya et al., 1999). Im Zellkern bindet es an Tcf-4, einen Transkriptionsfaktor aus der TCF/Lef Familie (Behrens et al., 1996), der in Zusammenarbeit mit β -Catenin als Koaktivator die Transkription bestimmter Gene anregt, wie z. B. c-Myc (Wachstumsstimulator), CyclinD und Tcf-1 (negativer Regulator) (He et al., 1998), (Tetsu and McCormick, 1999), (Roose et al., 1999).

Fällt ein Teil des Komplexes von APC, GSK3 β , AAP2 und Axin aus, kommt es zur Akkumulation von β -Catenin und somit zur Expression von Genen, die die Zellproliferation anregen. Ebenso können Mutationen in β -Catenin, die dazu führen, dass sich β -Catenin der Zerstörung entziehen kann, eine solche Entwicklung auslösen (Morin et al., 1997).

Während somatische Mutationen in APC vornehmlich in Dickdarmkrebs und Melanomen gefunden wurden, werden somatische β -Catenin-Mutationen in einer Vielzahl von Tumoren (hepatozelluläres Karzinom, Medulloblastom, Kolon-, Ovarial-, Prostata- und Uteruskarzinomen) detektiert (Chan et al., 1999), (de La Coste et al., 1998), (Fukuchi et al., 1998), (Voeller et al., 1998), (Zurawel et al., 1998). Mutationen in Axin wurden in hepatozellulären, kolorektalen Karzinomen (Satoh et al., 2000), (Liu et al., 2000) und Lebertumoren (Lustig et al., 2002) entdeckt.

1.3.4.2. Zellmigration

Tumoren des intestinalen Epithels, die von einem Verlust von APC herrühren, sind durch eine abnorme Gewebearchitektur charakterisiert, die aus einer defekten Zellmigration und/oder

Zelladhäsion resultiert. Normalerweise steigt die Expression von APC in den Darmepithelzellen während der Wanderung Richtung Zottenspitze an. Dieser Expressionsanstieg wirkt dem β -Catenin entgegen und erlaubt so die Differenzierung. Ist APC mutiert, wandern die Epithelzellen anstatt in Richtung Zottenspitze zur Kryptenbasis und differenzieren sich nicht (Moss and al., 1996), (Fodde et al., 2001). Es gibt noch keine genauen Vorstellungen wie APC in die Zellmigration involviert ist. Es wird angenommen, dass APC durch Bindung von Asef das Aktin-Netzwerk des Zytoskelettes reguliert (Kawasaki et al., 2000) und über die Bindung von Mikrotubuli in die Zellarchitektur eingreift (Nathke et al., 1996), (Munemitsu et al., 1994), (Smith et al., 1994), (Kawasaki et al., 2003)

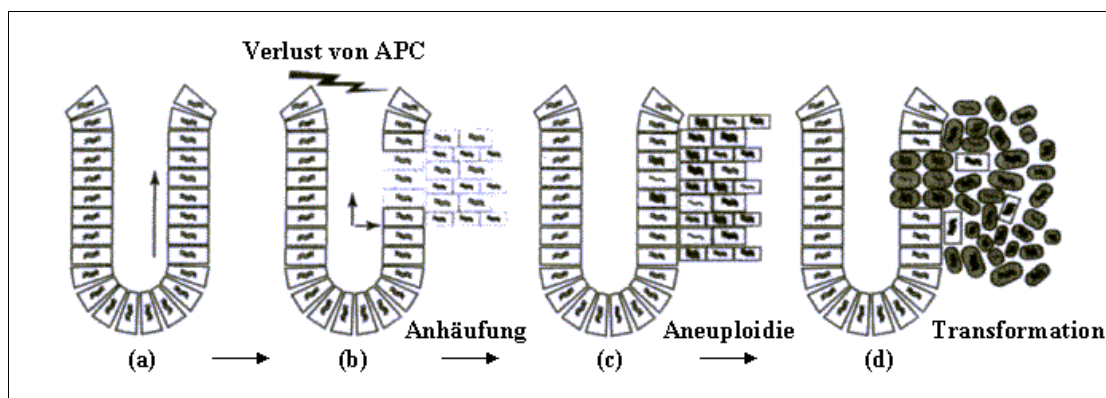


Abb. 14: Möglicher Mechanismus der Tumorentstehung durch APC-Mutationen. Normalerweise migrieren Dickdarmepithelzellen rasch Richtung Darmlumen (a). Bei Verlust von oder Mutationen in APC weichen die Zellen möglicherweise von ihrer Route ab (b), werden aufgrund von Defekten während der Chromosomensegregation aneuploid (c) und vermehren sich inadäquat durch Transkription proliferativer Gene (d). (Dikovskaya et al., 2001)

1.3.4.3. Zelladhäsion

Die Zelladhäsion wird durch APC über β -Catenin und E-Cadherin reguliert. Gebunden an das zytoplasmatische Ende von E-Cadherin, einem Ca^{2+} -abhängigem Adhäsionsmolekül ist β -Catenin an der Gewebeorganisation und -architektur beteiligt. Durch Aktivierung von E-Cadherin wirkt β -Catenin beim Zusammenhalt der Zellen sowie der Zellbeweglichkeit und -wanderung mit (s. Abb. 13). APC und E-Cadherin kompetieren um die Bindung an β -Catenin. Ist APC mit β -Catenin verbunden, kann sich E-Cadherin nicht anlagern. Dadurch kommt es zu einem Integritätsverlust der Adhäsionsverbindungen (Kintner, 1992), (Nagafuchi and Takeichi, 1988). APC ist damit Teil eines Sensorsystems; sind die interzellulären Kontakte aufgehoben, wandert APC in den Kern, so dass sich β -Catenin mit E-Cadherin verbinden kann und die Zelladhäsion zunimmt. Wenn die Zellverbindungen wieder intakt sind, wandert APC wieder ins Zytoplasma. Studien belegen, dass auch γ -Catenin, ein wichtiger Bestandteil der Desmosome, von APC reguliert wird (Kolligs et al., 2000), (Barker and Clevers, 2000).

1.3.4.4. Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität ist in nahezu allen Kolonkarzinomen zu finden. Die C-terminale Region von APC bildet das Verbindungsstück zwischen Spindelapparat und Chromosomen durch Bindung an Mikrotubuli, EB1 (*end-binding protein*) und Kinetochore (s. Abb. 11) und trägt damit zur Aufrechterhaltung der *chromosomalen Stabilität* bei. EB1 ist an die distalen (plus) Pole der zytoplasmatischen Tubuli und Spindelmikrotubuli, aber auch an die Zentromere während des gesamten Zellzyklus assoziiert (Su et al., 1995), (Morrison et al., 1998), (Mimori-Kiyosue et al., 2000). Das Fehlen dieser Bindungsregion in APC in den meisten Tumorzellen kann die Aneuploidie, die besonders bei Kolonkarzinomen häufig auftritt, erklären (Fodde et al., 2001), (Kaplan et al., 2001), (Miyoshi et al., 1992). Fehlt diese Region, ist die stabilisierende Wirkung von APC auf die Mikrotubuli herabgesetzt (Zumbrunn et al., 2001). Auch diese Bindung von APC an die Mikrotubuli wird durch Phosphorylierung durch GSK3 β positiv moduliert.

1.3.4.5. Zellzyklus

Im Zellzyklus übernimmt APC die Rolle eines Kontrollpunktes. Überexpression von APC unterdrückt den Schritt des Zellzyklus von der G₀/G₁-Phase in die S-Phase durch Regulation des β -Catenin/TCF-Komplexes (Baeg et al., 1995), (Ishidate et al., 2000), (Heinen et al., 2002).

Die bisher bekannten Informationen legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Störung des Zellverbundes, die konsequente Umordnung der zellulären Architektur und das uneingeschränkte Zellwachstum frühe Stufen in der Entwicklung kolorektaler Adenome und Karzinome sind. Die weitere Erforschung der genauen Vorgänge in der Zelle bei der Krebsentwicklung und der Beteiligung von APC daran birgt neue Aspekte für die Entwicklung von Medikamenten zur Krebsbehandlung.

1.4. Möglichkeiten der Feststellung eines Heterozygotenstatus

Die eleganteste und sicherste Methode zur Feststellung einer Heterozygotie eines Genortes ist die Sequenzierung. Hierbei können jedoch nur Punktmutationen, Basenaustausche oder kleinere Deletionen innerhalb von Amplifikaten bzw. Exons erkannt werden. Sind ein oder mehrere Exons deletiert lässt sich über die Sequenzierung nicht feststellen, ob ein oder zwei Kopien des sequenzierten DNA-Abschnittes vorliegen. Für diesen Fall gibt es andere Methoden: Southern-

Blot, Mikrosatelliten, RT-PCR, FISH, quantitative Endpunkt-PCR und quantitative Echtzeit-PCR mit LightCycler-Technik.

- Die nach ihrem Entdecker E.M. Southern benannte Methode – *Southern-Blot Analyse* – ist im Vergleich zur PCR-Technik mit einem erheblich höheren Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. Homozygote Deletionen lassen sich anhand fehlender Banden diagnostizieren. Bei Heterozygoten muss sich die Auswertung der Southern-Blot Analyse jedoch auf die Quantifizierung von Intensitätsunterschieden zwischen einzelnen Banden stützen.
- Die *Mikrosatelliten-Analyse* kann nur angewandt werden, wenn sich in dem zu untersuchenden Gen viele hoch polymorphe CA-Wiederholungen befinden. Diese werden routinemäßig für die indirekte Kopplungsanalyse eingesetzt, die immer dann Anwendung findet, wenn keine Mutation nachgewiesen werden konnte. Mikrosatelliten können jedoch unter bestimmten Voraussetzungen auch für den direkten Deletionsnachweis verwendet werden. Liegt beim Indexpatienten eine Deletion vor, die auch eine CA-Wiederholung umfasst, kann diese zur direkten Abklärung des Heterozygotenstatus der Verwandten des Betroffenen herangezogen werden. Ein limitierender Faktor dieser Untersuchungsmethode ist die Informativität der Marker.
- Die *RT-PCR* ist eine sehr aufwendige Methode, bei der eine frische Blutprobe der Betroffenen benötigt wird. Aus Lymphozyten werden zunächst kleine Mengen mRNA isoliert. Diese wird in cDNA transformiert und in überlappenden Teilabschnitten amplifiziert. Deletionen stellen sich in der Gelelektrophorese als verkürzte Produkte dar. Bei Heterozygoten liegen zwei unterschiedlich große Produkte vor. Ein weiterer Nachteil der RT-PCR ist, dass nicht viele Proteine in Lymphozyten expremiert werden und somit die Anzahl der möglichen zu untersuchenden Gene beschränkt ist.
- Bei der *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* (FISH) werden genspezifische Sonden zur direkten Erkennung von Heterozygoten eingesetzt. Eine gezielte Diagnostik bietet sich an, wenn beim Indexpatienten eine definierte Deletion vorliegt. Wichtig ist dabei die Größe des Deletionsbereiches. Bei Deletionen mehrerer Exons genügt die Hybridisierung einer Sonde aus dem inneren Bereich der Deletion zusammen mit einer Referenzprobe zur eindeutigen Bestimmung des Chromosoms.
- Die Untersuchung des Heterozygotenstatus erfolgt bei der *quantitativen Endpunkt PCR* mittels Multiplex-PCR. Hierbei werden pro PCR-Ansatz mehrere Exons gleichzeitig amplifiziert. Nur bei X-chromosomal vererbten Krankheiten sind bei den männlichen Betroffenen aufgrund der unterschiedlichen Größe der PCR-Produkte Deletionen einzelner oder

mehrerer Exons nach der Gelelektrophorese der charakteristischen Banden direkt erkennbar. Bei den weiblichen Überträgerinnen und allen autosomal bedingten Erkrankungen werden neben den Exons der mutierten Genkopie auch die Exons der unveränderten Genkopie amplifiziert. Die Deletion eines Exons wird sich daher nicht in Form einer fehlenden Bande, sondern lediglich als abgeschwächte Bande darstellen. Da Intensitätsunterschiede von 50% in der Regel nicht mittels Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen nachweisbar sind, werden zur quantitativen Auswertung fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt und über Fragmentgele oder ein HPLC-Gerät ausgewertet. Probleme stellen jedoch minimale Schwankungen in der Reaktionskinetik zwischen den verschiedenen Ansätzen dar. Es ist daher empfehlenswert, eine Reaktion mehrfach zu wiederholen und nicht die absolute Kurvenoberfläche, sondern das Verhältnis der Flächen unterhalb der Deletionskurven und einer Nachbarkurve als Messgröße zu verwenden. Ist die Lage der Deletion noch unbekannt, können die Quotienten jeder einzelnen Kurve mit allen anderen Kurven innerhalb einer Multiplex-PCR berechnet werden (s. Kap. 3.5.1). Idealerweise wird die Produktmenge am Ende der exponentiellen Phase der PCR bestimmt.

- Bei der *Echtzeit-PCR* mittels Light-Cycler-Technologie wird die vorhandene Produktmenge während der exponentiellen Phase der PCR direkt gemessen. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der sehr kurzen Reaktionszeit. Im Regelfall beträgt die Analysezeit etwa 20 Minuten, dabei werden etwa 30 PCR-Zyklen durchlaufen. Daran anschließend erfolgt die quantitative Auswertung. Die kurze Reaktionszeit wird durch die Verwendung sehr kleinkalibriger Glaskapillaren erreicht, in denen Temperaturwechsel in kürzester Zeit erfolgen können. Die Messung des Produktzuwachses während der Annealing-Phase kann über verschiedene Methoden erfolgen. Nach jedem Amplifikationsschritt erfolgt dann eine graphische Darstellung. Nach jedem PCR-Zyklus erhöht sich die Menge des gemessenen Signals proportional zur Menge des spezifischen Produkts.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorgelegten Arbeit bestand darin, ein Deletionscreening ganzer Exons mittels quantitativer Multiplex-PCR zu etablieren. Als Gen zur Etablierung wurde das APC-Gen, verantwortlich für die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) gewählt. FAP ist eine monogene Erkrankung (familiärer Darmkrebs), die durch eine Keimbahnmutation im APC-Gen ausgelöst wird. Es kommt zur Bildung von vielen adenomatösen Polypen im Dickdarm aus denen sich

schließlich Karzinome entwickeln. Das APC-Gen liegt auf Chr. 5q21 und erstreckt sich im Genom über eine Länge von 98kb. Es kodiert mit seinen 8535bp ein sehr großes Protein bestehend aus 2843 Aminosäuren. Mit den herkömmlichen Methoden zur Mutationssuche lässt sich nur bei etwa 70% der FAP Patienten eine Mutation nachweisen. Die Literatur zeigt, dass das APC-Gen auf Grund seiner Größe ebenso wie das Dystrophin zu größeren genomischen Deletionen neigt. Mittels dieser Arbeit soll eine brauchbare, zur Routinediagnostik anwendbare Methode zur Detektion großer genomischer Deletionen im APC-Gen etabliert werden. Dazu sollten Multiplex-Ansätze aus den Exons des APC-Gens zusammengestellt und über HPLC-Analyse die Produktmengen der einzelnen Exons bestimmt werden. Die erhobenen Produktmengen der Exons innerhalb eines Multiplexansatzes sollten nun in einem festgelegtem Schema verglichen werden. Nach Auswertung der Ergebnisse sollten Deletionen ganzer Exons identifizierbar werden. Zur Analyse stehen Patienten mit klinisch diagnostizierter FAP zur Verfügung bei denen eine bisherige Mutationssuche erfolglos war. Für jeden Patienten sollten die Ergebnisse analysiert und diskutiert werden.

Die hier etablierte Methode soll in der Routinediagnostik bei FAP-Patienten, bei denen bisher keine Mutation gefunden wurde, breite Anwendung finden und so den zugrundeliegenden Gendefekt auf zeigen. Basierend auf HPLC ist diese Methode auch auf andere Gene anwendbar. Besonderen Stellenwert hätte sie bei Genen, bei denen die konventionelle Mutationssuche nur einen Teil der Mutationen erkennt.

2. Material

2.1. Verwendete Oligonukleotide

Die für die Polymerase-Kettenreaktionen benötigten Oligonukleotide wurden bei der Fa. Metabion synthetisiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen Tet oder 6-fam fluoreszenzmarkiert. Die Primer wurden in der angegebenen Menge TE-Puffer auf eine Konzentration von 100pmol/ μ l gelöst. Zur Überprüfung der Stockkonzentration wurden 1ml in 23 H₂O_{bd} verdünnt und 8ml auf einem HPLC-Gerät laufen gelassen. Die Primer wurden daraufhin individuell verdünnt, so dass in jeder Gebrauchslösung dieselbe Konzentration vorlag. Die Verdünnungen mit H₂O_{bd} lagen zwischen 1:5 - 1:10. Die einzelnen Primer und ihre genauen PCR-Bedingungen sind im Anhang aufgelistet. Die Primersequenzen wurden aus Groden et al., 1991 übernommen.

2.2. Laborgeräte

Autoklav	Fa. Bachofer
Brutschrank	Fa. Heraeus
DNA-Konzentrationsmeßgerät Gene Quant	Fa. Pharmacia
Elektrophoresis Power Pac 300	Fa. Bachofer
Gelelektrophoresekammern	Fa. Efenberger
Kühlschrank (-4°C)	Fa. Liebherr
Magnetrührer IKAMAG Reo	Fa. Bachofer
Mikroliter Tischzentrifuge für 1,5ml	Fa. Hettich
Mikrowelle ER-7620	Fa. Toshiba
Mixer 5432	Fa. Eppendorf
Peltier Thermo Cycler PTC-200	Fa. MJ Research
Photographie-Apparatur	Fa. Herold
Pipetboy-acu	Fa. Integra Biosciences
Pipetten 2 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Fa. Gilson
Reaktionsgefäßständer	Fa. Efenberger
Schüttelinkubator	Fa. Bachofer
Schüttelrad	Fa. Bachofer
Sterilbank SterilGard Hood	Fa. The Baker Company
Tiefkühlschrank (-20°C)	Fa. Liebherr
Tiefkühltruhe (-80°C) Colora UF85-170T	Fa. Heraeus
UV-Transilluminator, Wellenlänge 300nm	Fa. Herolab
Vortex REAX 2000	Fa. Heidolph
Waage P1210 und AC100	Fa. Mettler

Wave™ DNA Fragment Analysis System:	Fa. Transgenomic
D-7000 HPLC System Manager	
L-7100 Pumpe	
L-7200 Auto Sampler	
L-7300 Säulen-Ofen	
L-7400 UV-Detektor	
L-7485 Fluoreszenzdetektor	
Zentrifuge Rotixa/RP	Fa. Hettich

2.3. Laborhilfsmittel

Abdeckfolien für Mikrotiterplatten (HPLC geeignet)	Fa. Nunc
Mikrotiterplatten	Fa. Biozym
Pipettenspitzen für Gilson-Pipetten	Fa. Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Fa. Eppendorf; Fa. Sarstedt
Reaktionsröhrchen 15ml, 50ml	Fa. Sarstedt

2.4. Chemikalien, Kits, usw.

Acetonitril (ACN)	Apotheke Klinikum Innenstadt
Agarose Seakem	Fa. Biozym
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Fa. Merck
Amplitaq Gold (2,5 U/μl)	Fa. Perkin Elmer
Amplitaq Gold 10x Puffer	Fa. Perkin Elmer
Borat	Fa. Fluka
Chloroform	Fa. Merck
DNA-Polymerization Mix (20mM/dNTP)	Fa. Pharmacia
EDTA (Titrplex)	Fa. Merck
Ethanol absolut	Fa. Merck
Ethidiumbromid	Fa. Serva
Ficoll	Fa. Seromed
Gelatine	Fa. GibcoBRL
Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck
Längenstandard LS V (10μl/ml)	Fa. Roche
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. Merck
OrangeG	Fa. Merck
PBS	Apotheke Klinikum Innenstadt
Primer	Fa. Metabion
Pronase E	Fa. Sigma
Proteinkinase K	Fa. Quiagen
QIAamp-DNA-Mini-Kit	Fa. Quiagen
RNase	Fa. Quiagen
SDS	Fa. Sigma
TEAA	Fa. Transgenomic
Tris	Fa. Amersham

2.5. Lösungen, Medien und Sonstiges

Alle Lösungen wurden mit destilliertem Wasser (H_2O_{bd}) oder mit für HPLC gereinigtem Wasser (H_2O_{HPLC}) angesetzt und je nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Aufbewahrung erfolgte – falls nicht anders vermerkt bei Raumtemperatur – in gespülten und autoklavierten Glasgefäßen.

2.5.1. DNA-Extraktion

SE-Puffer (pH 8,0)	75mM NaCl → 4,39g NaCl 25mM EDTA 12,5ml/0,2M EDTA mit H_2O_{bd} auf 100ml auffüllen
TE-Puffer (pH 7,4)	10mM Tris → 2ml/1M Tris 1mM EDTA → 1ml/0,2M EDTA mit H_2O_{bd} auf 200ml auffüllen
Ery-Lyse-Puffer (pH 7,6) Lagerung: 4°C	155mM NH_4Cl → 8,29g NH_4Cl 10mM $KHCO_3$ → 1,0g $KHCO_3$ 0,1mM EDTA → 0,5ml 0,2M EDTA mit H_2O_{bd} auf 1000ml auffüllen
Protease (Pronase E)	20mg/ml in H_2O_{bd} lösen
20% SDS	20g SDS mit H_2O_{bd} auf 100ml auffüllen

2.5.2. PCR und Auftrennung im Agarose-Gel

5M NaCl	292g NaCl mit H_2O_{bd} auf 1000ml auffüllen
0,2M EDTA (pH 8,0)	7,45g EDTA mit H_2O_{bd} auf 100ml auffüllen
1M Tris (pH 7,4/ 8,3)	12,11g Tris mit H_2O_{bd} auf 100ml auffüllen
5M KCl	37,28g KCl mit H_2O_{bd} auf 100ml auffüllen
10x TBE-Puffer	510g Tris 275g Borat 37,2g EDTA mit H_2O_{bd} auf 5l auffüllen
25% Ficoll	10g Ficoll 40 ml H_2O_{bd} ÜN auf das Schüttelrad

Auftragspuffer	25% Ficoll eine Messerspitze OrangeG
Ethidiumbromidlösung Lagerung: 4°C, lichtgeschützt	100mg EtBr in 10ml H ₂ O _{bd} lösen
Längenstandard LS V(10µg/ml)	1 Vol. Längenstandard (µg/µl) 1,5Vol. H ₂ O _{bd} 22,5Vol. Auftragspuffer
PCR-Nukleotid-Mix (2mM/dNTP) Lagerung: -20°C	1Vol. DNA Polymerization Mix 9Vol. H ₂ O _{bd}

2.5.3. HPLC

Puffer A (für HPLC-Gerät)	500µl ACN 100ml TEAA mit H ₂ O _{HPLC} auf 2l auffüllen
Puffer B (für HPLC-Gerät)	500ml ACN 100ml TEAA mit H ₂ O _{HPLC} auf 2l auffüllen
Waschpuffer (für HPLC-Gerät)	80ml ACN mit H ₂ O _{HPLC} 1l auffüllen
ACN 75%	750 ACN mit H ₂ O _{HPLC} auf 1l auffüllen

3. Methoden

3.1. Isolierung der DNA

3.1.1. DNA-Extraktion aus Vollblut

Material

Ery-Lyse-Puffer
SE-Puffer
SDS
Pronase E
NaCl
Ethanol 100%
Ethanol 70%
TE-Puffer

Durchführung

Bei der DNA-Extraktion aus Vollblut müssen zunächst die kernlosen Erythrozyten entfernt werden. Dazu wird zum Blut 50ml Ery-Lyse-Puffer (4°C) gegeben, der die Erythrozyten lysiert. Nach der folgenden Zentrifugation (100rpm, 7°C, 10min), wird der Überstand dekantiert. Das Pellet wird zur Entfernung der letzten Erythrozytenreste nochmals lysiert und der Überstand entfernt. Anschließend wird das Sediment gelockert. Für den folgenden Zellverdau werden dem Pellet 5ml SE-Puffer, 0,25ml SDS und 25µl Pronase E hinzugefügt. Der Ansatz wird über Nacht im Brutschrank bei 37°C stengelassen. Zur Ausfällung der Proteine werden 2ml 5M NaCl zugegeben, der Ansatz dann gevortext und anschließend zentrifugiert (3000rpm, RT, 10min). Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und die DNA dort mit 2,5Vol. kaltem Ethanol (100%) gefällt. Nach einem Waschschrift in ~5ml Ethanol (70%) wird die DNA in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Verdunstung des Ethanols wird der DNA TE-Puffer hinzugefügt. Die Aufbewahrung der extrahierten DNA erfolgt bei 4°C (Miller et al., 1988).

3.1.2. DNA-Extraktion aus Gewebeproben

Material

QIAamp-DNA-Mini-Kit (AL-Puffer, Puffer AW-1 und AW-2, QIAamp-DNA-Mini-Säule)
Proteinkinase K
RNase A

Durchführung

Die Gewebeprobe wird mit einem Skalpell zerkleinert und in Puffer ATL mit Proteinase K (QIAGEN) bei 56°C im Schüttelinkubator üN lysiert. Es erfolgt eine RNase A-Inkubation für 2min bei RT und nach Zugabe von AL-Puffer eine Inkubation für 10min bei 70°C. Die Probe wird mit Ethanol gemischt, auf die QIAamp-DNA-Mini-Säule aufgebracht und mit den Puffern AW-1 und AW-2 gewaschen. Danach wird die DNA trocken zentrifugiert und mit H₂O_{bd} von der Membran eluiert.

3.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Prinzip

Die optische Dichte (OD) ist definiert als die durch eine Lösung absorbierte Lichtmenge. Sie kann mit Hilfe eines Spektralphotometers (Gene Quant der Fa. Pharmacia) gemessen werden. Über einen Extinktionskoeffizienten kann die Konzentration einer gelösten Verbindung bestimmt werden. Jede Substanz hat einen für sie spezifischen Extinktionskoeffizienten. Das Absorptionsmaximum der gemessenen Substanz bestimmt die Wellenlänge, mit der die Messung durchgeführt wird. Für Nukleinsäuren liegt das Absorptionsmaximum bei 260nm.

Durchführung

Vor der ersten Messung wird das Gerät mit H₂O_{bd} als Referenz geeicht. Die gelöste DNA wird 1:100 mit H₂O_{bd} verdünnt und anschließend zur Messung eingesetzt. Für ein genaueres Ergebnis wird eine 200µl-Verdünnung angesetzt, gut gemischt und die OD zweimal gemessen. Der Mittelwert der beiden Messungen wird in die unten genannte Formel eingesetzt.

$$\text{Gemessene OD} \times 5 = X \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Soll zusätzlich die Reinheit der DNA-Lösung bestimmen werden, wird von der gleichen Probe eine Messung bei 280nm (dem Absorptionsmaximum von Proteinen) durchgeführt und hieraus der Quotient bestimmt ($A_{260/280}$). Ein Quotient zwischen 1,8 und 1,95 lässt auf eine sehr reine DNA-Lösung schließen.

3.3. DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.3.1. Standard-PCR

Prinzip

Mit Hilfe der PCR (Saiki et al., 1988) kann *in vitro* ein definiertes Stück DNA bis zu 10^6 mal kopiert werden. Ein Amplifikationszyklus der PCR besteht aus drei Schritten.

- In der *Denaturierungsphase* wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang (ca. 100ng DNA/Ansatz) bei 94°C denaturiert, so dass die DNA einzelsträngig vorliegt.
- Während der *Anlagerungs-Phase* (Annealing) bindet an jeden DNA-Strang ein Primer. Für jedes Primerpaar muss die optimale Temperatur gefunden werden, die sich an der Basenzusammensetzung der Primer orientiert. Als Anhaltspunkt kann für die Basen G und C jeweils mit 4°C und für die Basen A und T jeweils mit 2°C gerechnet werden. Von der mittleren Temperatur der Primer können für den ersten Test 5°C abgezogen werden.

$$[(A + T) \times 2^{\circ}\text{C} + (G + C) \times 4^{\circ}\text{C}] - 5^{\circ}\text{C} = \text{Annealing Temp.}$$

- In der *Synthesephase* wird eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet. Um die größtmögliche Leistung zu erzielen, erfolgt die Synthese bei der Temperatur der optimalen Enzymaktivität. Für AmplitaqGold liegt die optimale Temperatur bei 72°C . Neben den Desoxyribonukleotiden (dGTP, dCTP, dATP und dTTP), einem DNA-Matrixstrang und einem Primer mit freier 3'-OH-Gruppe benötigt die Polymerase Mg^{2+} -Ionen als Co-Faktor.

Jeder Amplifikationszyklus führt zur Verdopplung des Ausgangssubstrats. Bei einer symmetrisch ablaufenden PCR vermehren sich die kopierten DNA-Fragmente exponentiell. Die optimale Zyklusanzahl muss für jeden Primer bestimmt werden und ist abhängig von Spezifität und Basenfolge der Primer.

Vor dem ersten Zyklus wird die DNA bei 94°C denaturiert. Nach dem letzten Zyklus schließt sich eine 72°C -Phase an, um alle Amplifikationsschritte zu beenden. Die gesamte DNA ist wieder doppelsträngig.

Material

10x AmplitaqGold PCR-Puffer

PCR-Nukleotid-Mix (2mM/dNTP)

Synthetische fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Primer (20pmol/ μl in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$, pH 7,4)

DNA-Polymerase (5U/ μl)

Template-Material

Als Template wird die wie in Kap. 3.1.1. und 3.1.2. beschrieben extrahierte DNA verwendet.

Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wird die DNA mit H_2O_{bd} auf eine Konzentration von 50ng/ μ l verdünnt.

Durchführung

Für eine standardisierte Doppelstrang-PCR werden je 50 μ l Gesamtansatz folgende Komponenten zusammenpipettiert:

10x PCR-Puffer	5 μ l
DNTPs (2pmol/ μ l)	5 μ l
Primer R (20pmol/ μ l)	1 μ l
Primer F (20pmol/ μ l)	1 μ l
DNA-Polymerase	0,2 μ l
DNA (150ng)	X μ l
H_2O_{bd}	X μ l
	<hr/>
	50 μ l

Die PCR-Reaktion wird in 0,5ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Das jeweilige PCR-Programm richtet sich nach den Primer-Bedingungen, der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, der gewünschten Produktmenge und der Spezifität der Reaktion.

PCR-Programm:

1. 94°C 10min
2. 94°C 1 min
3. x°C 1 min
4. 72°C 1 min
5. 72°C 10min

Schritte 2–4 werden max. 40 mal wiederholt

Der Vorteil der AmplitaqGold zu anderen Polymerasen ist, dass sie bei Raumtemperatur inaktiv ist und erst bei Temperaturen von 70°C aktiv wird. Dadurch wird die Bildung von Primer-multimeren unterdrückt, die die Primerkonzentration herabsetzen und die Auswertung des Agarose-Gels stören. Außerdem wird die Amplifikation unspezifischer Produkte unterbunden, da die Primer bei 70°C überwiegend spezifisch binden.

3.3.2. Multiplex-PCR

Prinzip

Die Multiplex-PCR erfolgt analog zur Vorschrift der Standard-PCR. Im Gegensatz zur Standard-PCR werden mehrere verschiedene Primerpaare zusammen in einen Ansatz gegeben, um eine simultane Amplifikation mehrerer DNA-Abschnitte zu erreichen. Dies reduziert Arbeit, Kosten und das Risiko von Kontaminationen. Bei der Zusammenstellung der Ansätze müssen

einige Punkte beachtet werden. Die zu amplifizierenden Produkte müssen unterschiedliche Längen haben, um sie später unterscheiden zu können. Die Primer sollten zwischen 22bp und 30bp lang sein und in gleicher Konzentration vorliegen. Außerdem empfiehlt sich eine Polymerase, die erst bei einer bestimmten Temperatur zu arbeiten beginnt.

Die Schwierigkeit bei der Multiplex-PCR besteht darin, dass sich nicht alle DNA-Abschnitte in beliebiger Kombination amplifizieren lassen. Die Primer stören sich gegenseitig, so dass ein PCR-Produkt, das sich alleine gut amplifizieren lässt, in Kombination mit einem anderen möglicherweise nicht detektierbar ist. Oder dass durch Hinzufügen eines Primerpaares zu einer gut funktionierenden Kombination mehrerer Paare die Amplifikation eines DNA-Abschnittes unterdrückt wird.

Um die Auswertung zu vereinfachen, empfiehlt es sich die Primerpaare im Verhältnis so einzusetzen, dass die Produktmengen in etwa gleich sind. Dabei kann es vorkommen, dass ein Primerpaar in bis zu vierfacher Konzentration im Vergleich zu einem anderen eingesetzt werden muss.

Aus mehreren Gründen empfiehlt es sich direkt fluoreszenzmarkierte Primer zu benutzen. Zum einen ist damit sicher gestellt, dass auch jedes Amplifikat detektiert werden kann, zum anderen muss das PCR-Produkt für weitere Analysen nicht mehr gefällt werden, was zu einem Verlust von Amplifikat führen würde. Die in dieser Arbeit benutzten Primer sind mit 6-fam oder Tet markiert.

Material und Template-Material s. Kap. 3.3.1.

Durchführung

Für eine Multiplex-PCR Doppelstrang-PCR werden je 50µl Gesamtansatz folgende Komponenten zusammenpipettiert:

10x PCR-Puffer	5µl
dNTPs (2pmol/µl)	5µl
Verschiedene Primer R (20pmol/µl)	Xµl
Verschiedene Primer F (20pmol/µl)	Xµl
DNA-Polymerase	0,25µl
DNA (150ng)	Xµl
H ₂ O _{bd}	Xµl
	<hr/>
	50µl

Die PCR-Reaktion wird in 0,5ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Das jeweilige PCR-Programm richtet sich nach den Primer-Bedingungen, der Größe der zu amplifizierenden DNA-Fragmente, der gewünschten Produktmenge und der Spezifität.

PCR-Programm s. Kap. 3.3.1.

Die einzelnen Bedingungen der Multiplex-Ansätze sind im Anhang (s. Kap. 8.2) aufgeführt.

3.4. Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel

Prinzip

Aufgrund der negativen Eigenladung der PO_4^{3-} -Gruppen kann die DNA in einem elektrischen Feld nach Längen aufgetrennt werden. Größere DNA-Fragmente laufen langsamer durch das Agarose-Gel als kürzere. Die Banden eines mitlaufenden Standards definieren die Länge der Fragmente.

Material

1x TBE-Puffer
Agarose
Ethidiumbromid 10mg/ml
Auftragspuffer
Längenstandard LS V

Durchführung

Die Zusammensetzung des Gels wird je nach Länge der aufzutragenden DNA-Fragmente gewählt. Längere Fragmente erfordern niederprozentigere Gele. Für die Auftrennung von PCR-Produkten eignet sich am besten ein zweiprozentiges Agarose-Gel.

Die Agarose wird in der Mikrowelle in 1x TBE-Puffer gelöst und so lange aufgeköcht, bis die Flüssigkeit klar und ohne Schlieren ist. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wird Ethidiumbromid (2µl/100ml Gel) zugegeben und die Lösung in die vorbereiteten Schalen gegossen. Nach etwa 20min ist das Gel fest geworden. Die Kämmen werden entfernt und das Gel in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Die vorbereiteten Proben (5µl PCR-Produkt + 5µl Auftragspuffer) und der Längenstandard LS V können dann aufgetragen werden.

Nach einer Laufzeit von etwa 20min bei 80V können die Banden unter UV-Licht visuell überprüft und ab fotografiert werden (s. Abb. 15).

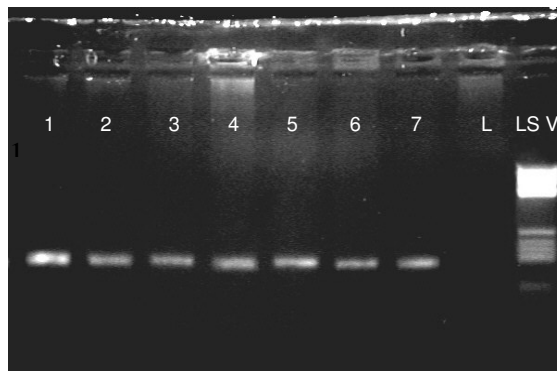


Abb. 15: Auftrennung von PCR-Produkten auf einem Agarosegel. Spuren 1–7 PCRs mit dem Marker DXS990 8. Spur Leerwert (L), 9. Spur Längenstandard (LS V).

3.5. HPLC mit Fluoreszenzdetektor

Prinzip

Das HPLC-Verfahren beruht auf dem Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. DNA-Fragmente werden in eine Säule injiziert. Die hydrophobe, neutrale Polymermatrix aus Polystyren-Divinylbenzol der Säule kann über das Triethylammonium-Kation (TEAA) des Eluentensystems an die negativ geladene DNA binden. TEAA weist die Eigenschaften eines Brückenmoleküls auf. Die hydrophilen Ammonium-Kationen binden an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, während die Alkylgruppen an die hydrophobe Oberfläche der Polymermatrix binden. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgt mittels Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie. Die DNA-Fragmente werden von der Polymermatrix mit einer kontinuierlich steigenden Acetonitrilkonzentration (Gradient) eluiert. Längere Fragmente haften im Vergleich zu kürzeren Fragmenten stärker an der Säule. Bei einer nicht denaturierenden Temperatur (50°C) verläuft das Trennverfahren der DNA-Fragmente strikt nach Fragmentlänge und ist unabhängig von der Basenzusammensetzung.

Ist die DNA abgelöst wird sie durch eine Durchflusszelle gespült, hier befindet sich eine UV-Lampe, die bei 260nm die DNA misst. Nachgeschaltet ist ein Fluoreszenzdetektor, der die im PCR Produkt eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe tet (536nm), 6-fam (520nm) und tamra (576nm) detektiert. Die erhöhte Affinität zwischen Säulenmatrix und fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten führt zu einer verlängerten Retentionszeit der untersuchten Fragmente. Diese Verlängerung der Retentionszeit kann durch einen höheren Prozentsatz an organischer Lösung (z. B. Puffer B) ausgeglichen werden. Während zwar die Retentionszeit durch eine Fluoreszenzmarkierung beeinflusst wird, ist kein Verlust der Auflösung zu verzeichnen.

Die genauen Gradienten für die einzelnen Multiplex-Ansätze sind im Anhang (s. Kap. 8.3) aufgeführt.

Material

Puffer A

Puffer B

Waschpuffer

75% ACN

Durchführung

Zur HPLC-Analyse mit Fluoreszenzdetektor werden fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte benötigt. Dazu werden fluoreszenzmarkierte Primer in dem in Kap. 3.3. beschriebenen PCR-Ansatz benutzt. Von den PCR Produkten wurden je nach Produktmenge 7-11µl in eine Mikro-

titerplatte pipettiert und in das HPLC-Gerät gestellt.

Die Produkte werden der Länge nach aufgetrennt und das Integral der Flächen unter den Kurven berechnet. Um die Kurven aus den Multiplex-Ansätzen zu den Exons sicher zuordnen zu können, wurden die Exons einzeln amplifiziert und ausgewertet und einmalig ein TAMRA-Längenstandard aufgetragen. Die jeweiligen Zeiten, bei denen die Exonkurven erscheinen, sind dem Anhang zu entnehmen.

3.5.1. Auswertung

Bei der quantitativen Endpunkt-PCR werden in Multiplex-Ansätzen mehrere Exons des zu untersuchenden Gens zusammen mit einem Exon eines anderen Gens als Kontrolle amplifiziert. Die Fläche unterhalb jeder Kurve entspricht der Produktmenge des jeweiligen Exons (s. Abb. 16). Die Integrale der Flächen der Exons werden dann zueinander ins Verhältnis gesetzt. Um Unterschiede in der Amplifikation in den einzelnen Reaktionsgefäßen auszugleichen, wird jedes Exon-Verhältnis nochmal ins Verhältnis gesetzt mit dem gleichen Verhältnis einer Kontrolle gesetzt.

Beispiel: Exon A und Exon B sollen ausgewertet werden. Das Verhältnis zwischen den Integralen der Flächen der Exonkurven der Exons A und B wird bei einer Kontrollperson gebildet $(A/B)_K$ und genauso bei einem Patienten $(A/B)_P$. Diese beiden Verhältnisse werden nun zueinander ins Verhältnis gesetzt $(A/B)_K/(A/B)_P$. Im Idealfall ist das Ergebnis 1 \rightarrow keine Deletion oder Duplikation. Bei einem Wert um die 0,5 spricht das für eine Deletion von Exon B oder eine Duplikation von Exon A beim Patienten. Umgekehrt bei einem Wert um die 2 liegt eine Deletion von Exon A oder eine Duplikation von Exon B des Patienten vor.

Diese Verhältnisbildung wird für jedes Exon-Verhältnis der Multiplex-Ansätze vorgenommen. Die Referenzwerte $(A/B)_K$ werden wie folgt ermittelt. Neben den Patienten laufen in einem Ansatz drei bis fünf Kontroll-Personen mit. Für jedes Exonverhältnis wird derjenige Wert bestimmt, der den Median aus den Werten der Kontrollpersonen bildet. Dieser wird dann als Referenz $(A/B)_K$ für die Patienten verwendet.

Um mehrere Exon umfassende Deletionen nicht zu übersehen ist in jedem Multiplex-Ansatz ein Exon eines anderen Gens enthalten. So ist gewährleistet, dass auch Deletionen detektiert werden, bei denen alle Exons eines Multiplex-Ansatzes des zu untersuchenden Gens deletiert sind. In diesem Fall zeigen nur die Verhältnisse mit dem Kontroll-Exon Auffälligkeiten.

4. Ergebnisse

Die Erfassung genomischer Deletionen, die ein oder mehrere Exons umfassen, ist mit herkömmlichen Methoden schwierig, wenn nicht ganz unmöglich. Der Ansatz dieser Arbeit stützt sich bei der Suche nach deletierten Exons auf eine PCR-basierte quantitative Analyse von Genkopien. Die in einem Allel deletierten Exons liegen im Genom im Gegensatz zu den nicht deletierten Exons in einfacher Kopie vor. Bei einem Vergleich der Amplifikate einzelner Exons untereinander sind deletierte Exons durch eine verminderte Produktmenge zu identifizieren. Um sicher zu gehen, dass alle Exons, deren Produktmengen miteinander verglichen werden, die gleichen Amplifikationsbedingungen erhalten, wurden Multiplex-PCR-Ansätze etabliert, in denen mehrere Exons parallel in einem Reaktionsröhrchen amplifiziert wurden. Um auch eine vollständige Deletion eines Allels des APC-Gens zu erfassen, wurde in jedem Multiplex-Ansatz zusätzlich zu den Exons des APC-Gens ein Exon eines anderen Gens von einem anderen Chromosom mitamplifiziert. Die Produktmengen der einzelnen Exons wurden über HPLC-Analyse ermittelt und nach einem festgelegtem Schema untereinander ins Verhältnis gesetzt und ausgewertet.

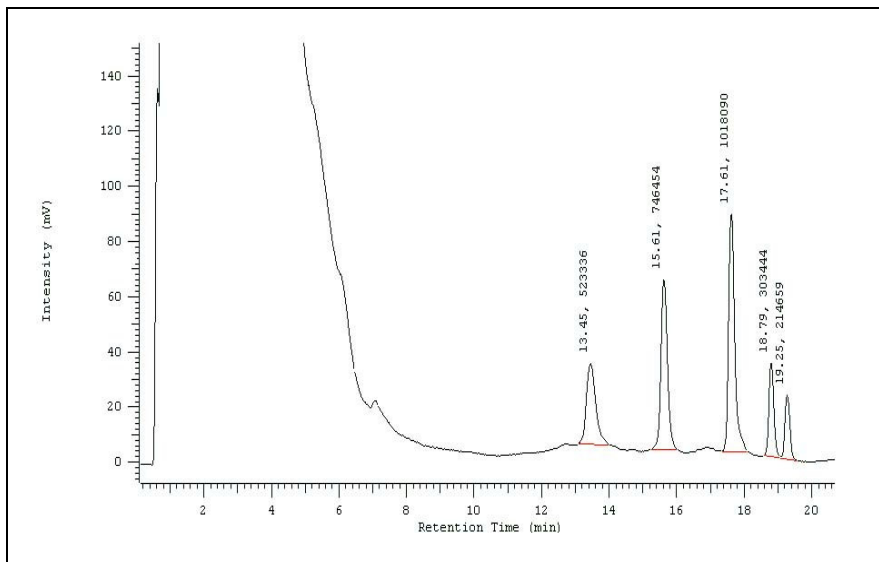


Abb. 16: Darstellung der HPLC-Analyse des Ansatzes h57JDH. Es werden fünf Exons gleichzeitig amplifiziert. Jedes Signal steht für ein Exon. Die y-Achse gibt die gemessene Intensität in mV an, die x-Achse die Retentionszeit in min. Die erste Zahl über den Kurven gibt den Zeitpunkt (Retentionszeit) an, an dem diese Bande die höchste Intensität ausstrahlte, die zweite Zahl steht für das Integral der Fläche unter der Kurve.

4.1. Multiplex-Ansätze

Für die Analyse einer quantitativen Endpunkt-PCR mussten mehrere Exons in einem Ansatz amplifiziert werden. Dafür wurden sogenannte Multiplex-Ansätze zusammengestellt. Drei bis vier Exons des APC-Gens wurden mit einem passenden Kontrollexon aus dem hMLH1-Gen (3p21.2) oder dem hMSH2-Gen (2p22-p21) kombiniert. Bei der Zusammenstellung wurde darauf geachtet, dass alle Exons unterschiedlich lang waren, aber ähnliche Amplifikationsbedingungen aufwiesen. Zur Überprüfung ob alle Exons amplifiziert wurden, wurden die PCRs auf einem Ethidiumbromid-Gel aufgetragen.

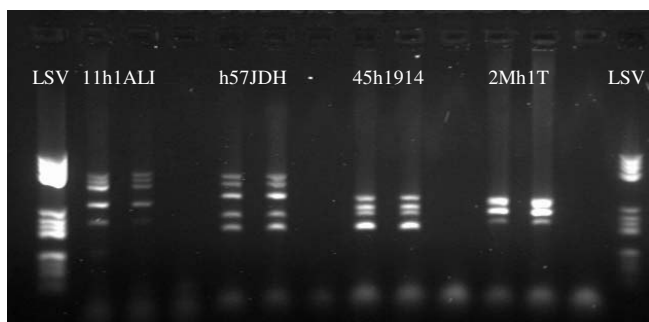


Abb. 17: Darstellung der Multiplex-Ansätze auf einem Agarose-Gel. Jeweils zweimal derselbe Ansatz, dann eine leere Spur, ist 2Mh1T ist noch nicht vollständig aufgetrennt, daher sind keine vier getrennten Banden sichtbar. In der ersten und letzten Spur der Längenstandard LSV zur Orientierung der Bandenlänge aufgetragen.

Die in dieser Arbeit bearbeiteten Multiplex-Ansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

Multiplex-Ansatz	APC-Exons (Länge in bp)	Kontrollexon
h57JDH	Exon 7 (239bp); 15J* (318bp), 15D* (383bp), 15H* (427bp)	hMLH1 Exon 5 (190bp)
45h1914	Exon 4 (196bp), 5 (244bp), 14 (308bp)	hMLH1 Exon 19 (270bp)
11h1ALI	Exon 11 (216bp), 15A* (373bp), 15L* (417bp), 15I* (440bp)	hMSH2 Exon1 (284bp)
2Mh1T	Exon 2 (216bp), 15M* (255bp), 15T* (303bp)	hMSH2 Exon1 (284bp)

Tab. 5: Zusammensetzung der Multiplex-Ansätze. Die einzelnen PCR-Bedingungen sind dem Anhang (Kap. 8.2) zu entnehmen.

*Da das Exon 15 des APC-Gens so lang war, dass es nicht an einem Stück amplifiziert werden konnte, wurde es in 23 sich überlappenden Teilen (A-W) amplifiziert.

Die Benennung der zusammengestellten Multiplex-Ansätze ergab sich aus den Längen der Exons beginnend mit dem kürzesten Exon. Die Kontrollexons wurden vor ihrer Exonnummer mit einem „h“ als Kurzform für hMLH1 bzw. hMSH2 gekennzeichnet.

Weitere mögliche Multiplex-Ansätze für das APC-Gen, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden, sind:

Exon	3	O	N	G
Größe (bp)	250	292	339	385
Exon	1	W	E	
Größe (bp)	207	342	430	
Exon	S	9	K	F
Größe (bp)	307	327	383	435

Tab. 6: Weitere Multiplex-Ansätze

4.2. Reaktionskinetik der Multiplex-PCRs

Um die Reaktionskinetik für jeden Multiplex-Ansatz darstellen zu können, wurde für jeden Multiplex-Ansatz eine Reihe erstellt. Dabei wurden 14 PCR-Reaktionsgefäße aus einem Mastermix gefüllt. Durch Zufügen der DNA in den Mastermix wurde sichergestellt, dass in jedem Reaktionsgefäß identische DNA-Mengen waren, um die Ansätze später vergleichen zu können. Nach 14 Zyklen wurde das erste Reaktionsgefäß aus der PCR-Maschine geholt und bei 72°C 10min in einen Wärmeblock gestellt. Nach jeweils zwei Zyklen wurde dieser Schritt bis nach dem 36. Zyklus wiederholt. Das letzte Reaktionsgefäß und die Leerkontrolle durchliefen 40 Zyklen. Die verschieden lang amplifizierten PCRs wurden nun auf einem HPLC-Gerät mit Fluoreszenzdetektor injiziert.

Die Integrale der Flächen unter den Exonkurven wurden berechnet und in einem Excel-Diagramm mit logarithmischer Skalierung aufgetragen. Aus diesen Kurven war das Ende der exponentiellen Phase (lineare Steigung) bzw. der Übergang in die Sättigungsphase ersichtlich. Bei allen Multiplex-Ansätzen konnte der Fluoreszenzdetektor des HPLC-Gerätes bei einer Einspritzmenge von 10µl erst nach 18 bzw. 20 Zyklen PCR-Produktmengen detektieren, die sich auswerten ließen.

Für das weitere Deletionscreening wurden anhand der erstellten Reihen zwei Zyklen zur Auswertung ausgewählt. Der frühere Zyklus sollte am Ende der exponentiellen Phase rangieren, es sollte aber sicher gestellt sein, dass sich alle Exons noch in der exponentiellen Phase befinden. Der spätere Zyklus sollte in der Sättigungsphase aller Exons liegen.

4.2.1. h57JDH

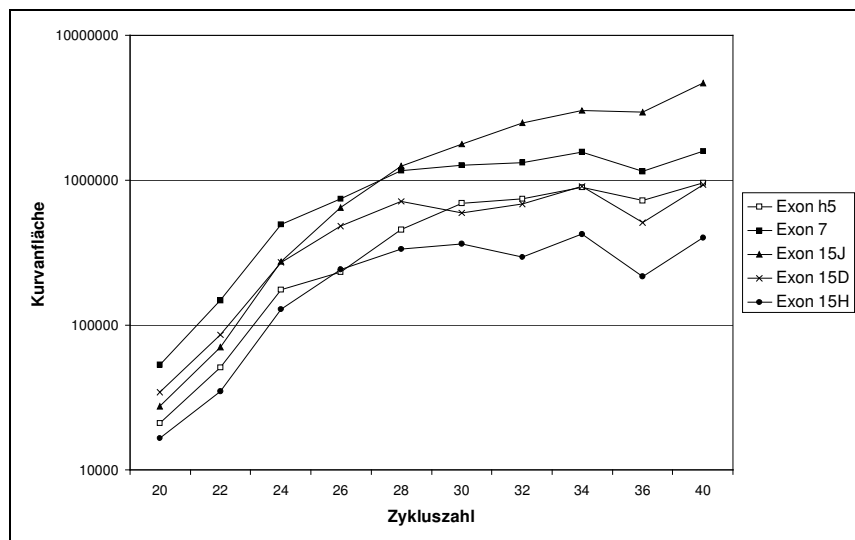


Abb. 18: Reihe von h57JDH. Die X-Achse gibt die Zykluszahl an, die die PCR bis zur Auswertung durchlaufen hat. Die Werte der Y-Achse ergeben sich aus dem Integral der Fläche unter den Kurven.

Bei diesem Ansatz konnte erst ab einer Zyklusanzahl von 20 PCR-Amplifikat detektiert werden. Die exponentielle Phase ging für die Exons h5, 7, 15D und 15H nach 24 Zyklen langsam in die Sättigungsphase über. Für Exon 15J war die Übergangsphase später etwa bei Zyklus 28. Die Zyklen 24 und 30 wurden für die weitere Analyse ausgewählt.

4.2.2. 45h1914

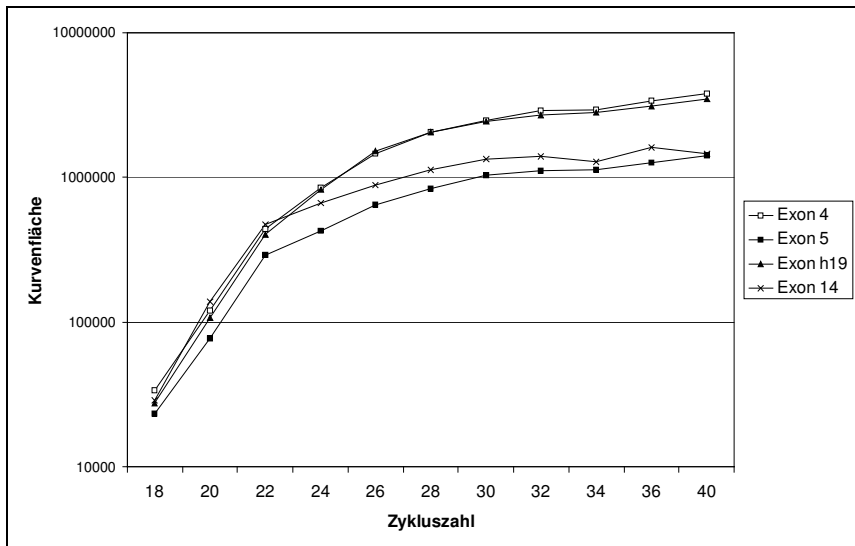


Abb. 19: Reihe von 45h1914. Die X-Achse gibt die Zykluszahl an, die die PCR bis zur Auswertung durchlaufen hat. Die Werte der Y-Achse ergeben sich aus dem Integral der Fläche unter den Kurven der Exons.

Die ersten Werte dieses Multiplex-Ansatzes konnten nach 18 Zyklen erfasst werden. Deutlich war die exponentielle Phase bei allen Exons bis Zyklus 22 zu erkennen. Nach 22 Zyklen ging die Reaktion für alle vier Exons in die Sättigungsphase über. Für das Deletionscreening in diesem Multiplex-Ansatz wurden die Zyklen 22 am Ende der exponentiellen Phase und 30 in der Sättigungsphase ausgewählt.

4.2.3. 11h1ALI

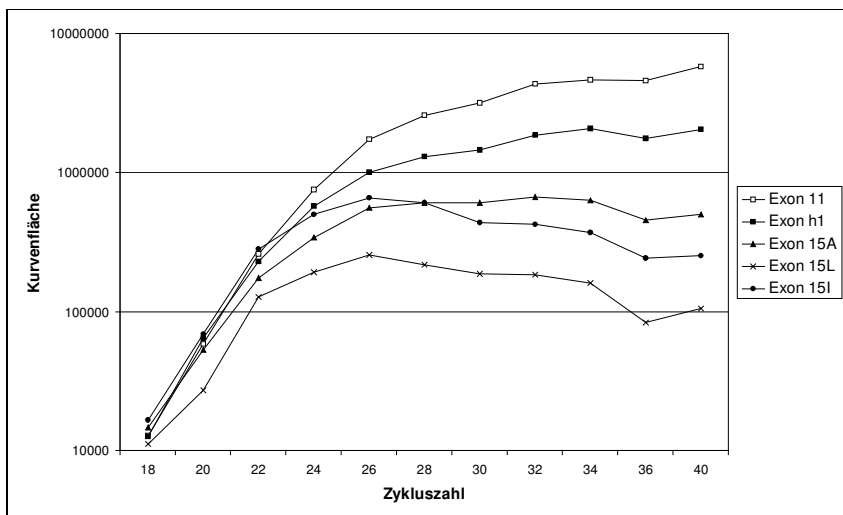


Abb. 20: Reihe von 11h1ALI. Die X-Achse gibt die Zykluszahl an, die die PCR bis zur Auswertung durchlaufen hat. Die Werte der Y-Achse ergeben sich aus dem Integral der Fläche unter den Kurven.

Die exponentielle Phase endete für Exon 15I, 15A und 15L nach 22 Zyklen. Exon h1 und 11 gingen nach 26 Zyklen in die Sättigungsphase über. Die weitere Analyse wurde nach 22 und 28 Zyklen durchgeführt.

Deutlich war hier ein Abfall der Produktmenge für die Exons 15I und 15L nach 26 bzw. 28 Zyklen zu sehen. Während die Produktmenge von Exon 15A bis zum Ende annähernd gleich blieben, stieg für die Exons 11 und h1 die Produktmenge nach der exponentiellen Phase weiter an.

4.2.4. 2Mh1T

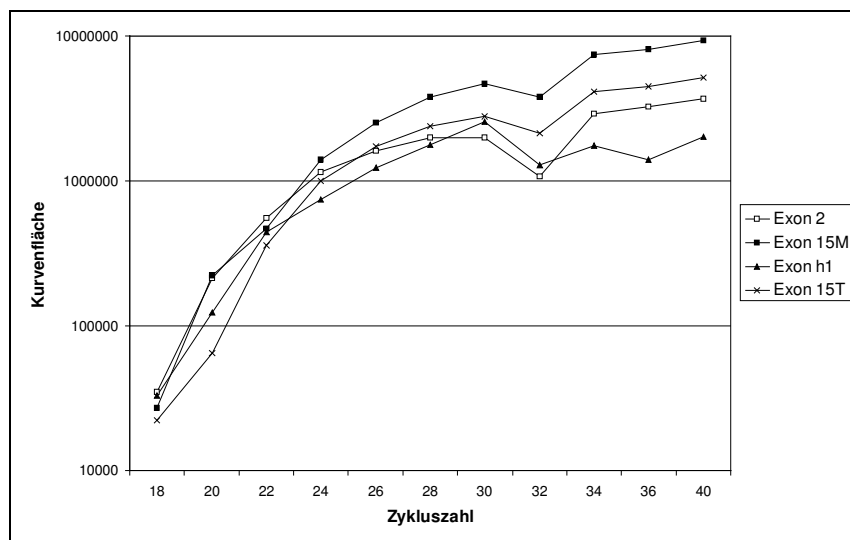


Abb. 21: Reihe von 2Mh1T. Die X-Achse gibt die Zykluszahl an, die die PCR bis zur Auswertung durchlaufen hat. Die Werte der Y-Achse ergeben sich aus dem Integral der Fläche unter den Kurven.

Nach 18 Zyklen waren erste Werte erfassbar. Hier war das Ende der exponentiellen Phase schwierig zu definieren. Nach Zyklus 22 fing für die Exons 2 und h1 die Sättigungsphase an. Die Exons 15M und 15T befanden sich noch bis Zyklus 24 in der exponentiellen Phase. Daher wurde das Deletionsscreening für die Zyklen 22 und 28 etabliert.

4.3. Variation und Normwerte-Verteilung

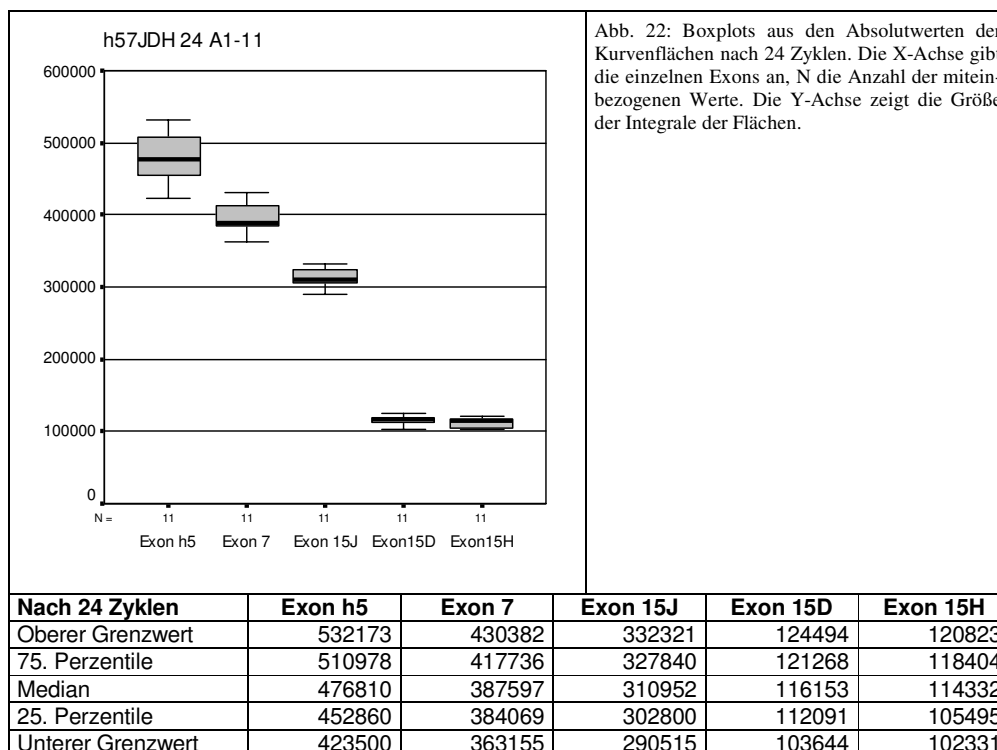
Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots mit einem Statistikprogramm (SPSS – „*superior performance software system*“) erstellt. Der dicke Balken im grauen Bereich (Box) stellt den Median dar. Der Median ist der Wert, den die Person genau in der Mitte der Stichprobe geliefert hat. 50% der Fälle liegen in der Box: Der obere Rand halbiert wiederum die obere Hälfte der Stichprobe (der Rand liegt also an der 75. Perzentile). Entsprechendes gilt für die untere Hälfte: Der untere Rand entspricht dem 25. Perzentil. Die kleinen Kreise bezeichnen sogenannte Ausreißer – Werte, die mehr als 1,5 Box-Längen vom 25. bzw. 75. Perzentil ent-

fernt liegen. Die dünnen waagrechten Striche zeigen die höchsten bzw. niedrigsten beobachteten Werte an, die noch keine Ausreißer sind, also noch innerhalb des 1,5fachen Interquartilenabstandes (Box-Länge) liegen. Noch extremere Werte werden als Sternchen dargestellt: Diese liegen mehr als drei Box-Längen vom 25. und 75. Perzentil entfernt. Die Zahl neben den Kreisen bzw. Sternchen zeigt an um welchen Wert der Datengruppe es sich handelt.

4.3.1. Variation innerhalb einer Kontroll-DNA dargestellt am Ansatz h57JDH

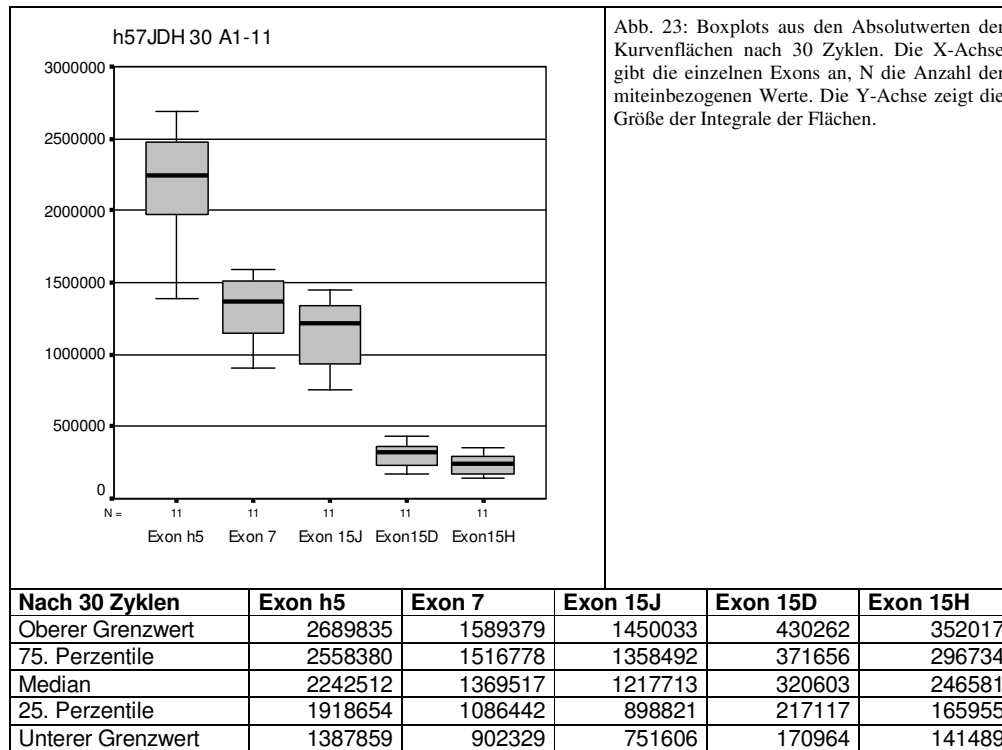
Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Reaktionen wurde für den Multiplex-Ansatz h57JDH für die Zyklenzahl 24 und 30 je elfmal dieselbe DNA eingesetzt. Zur Erstellung der Boxplots wurden die Flächen (Absolutwerte) unter den Exonkurven errechnet. Um diese Daten jedoch besser mit den Daten des Deletionsscreenings vergleichen zu können, wurden auch Boxplots erstellt, die das Verhalten der Exonverhältnisse zeigen. Dabei wurde das Integral von jeder Kurvenfläche eines Exons mit dem Integral der Kurvenfläche von jedem anderen Exon des Ansatzes ins Verhältnis gesetzt.

Darstellung der Absolutwerte (Ansatz h57JDH elfmal dieselbe DNA)



Die Produktmengen (Integral der Kurvenfläche) der Exons hatten nach 24 Zyklen eine relativ geringe Streubreite (s. Abb. 18a). Für die Exons 15D und 15H war sie sehr klein (103644-124494, $\Delta 20850$) bzw. (102331-120823, $\Delta 18492$). Eine zunehmende Variationsbreite war von

Exon 15J (290515-332321, $\Delta 41806$) über Exon 7 (363155-430382, $\Delta 67227$) bis Exon h5 (423500-532173, $\Delta 108673$) mit ansteigenden Absolutwerten zu bemerken.



Ähnlich wie nach 24 Zyklen war nach 30 Zyklen die Streubreite für die Exons 15D (170964-430262, $\Delta 259298$) und Exons 15H (141489-352017, $\Delta 210528$) am geringsten, aber größer als nach 24 Zyklen. Exon 7 (902329-1589379, $\Delta 687050$) und Exon 15J (751606-1450033, $\Delta 698427$) hatten in etwa die gleiche Spanne. Auffallend war die große Variationsbreite für Exon h5 (1387859-2689835, $\Delta 1301976$).

Darstellung der Exonverhältnisse (Ansatz h57JDH elfmal dieselbe DNA)

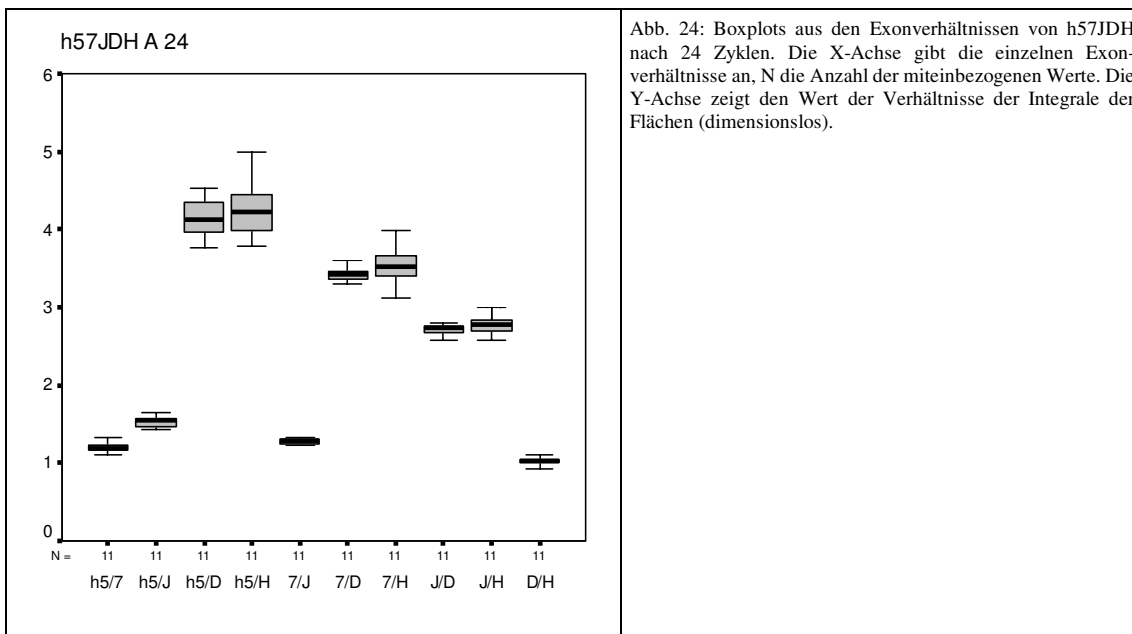
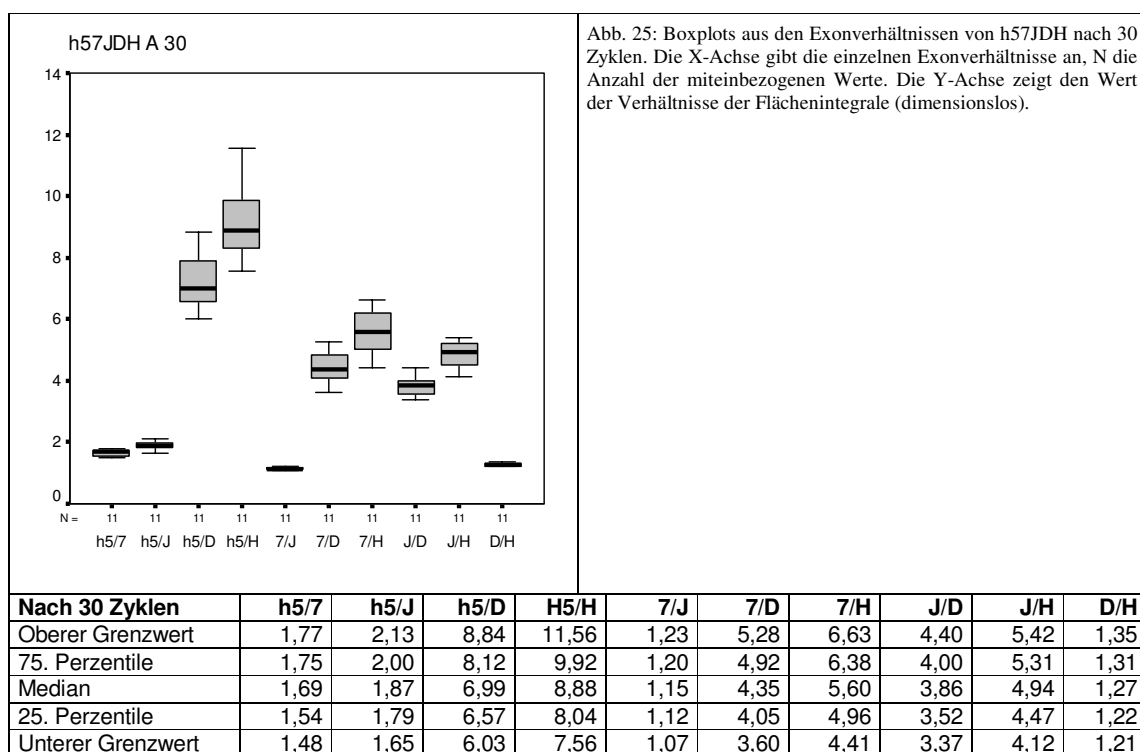


Abb. 24: Boxplots aus den Exonverhältnissen von h57JDH nach 24 Zyklen. Die X-Achse gibt die einzelnen Exonverhältnisse an, N die Anzahl der miteinbezogenen Werte. Die Y-Achse zeigt den Wert der Verhältnisse der Integrale der Flächen (dimensionslos).

Nach 24 Zyklen	h5/7	h5/J	h5/D	h5/H	7/J	7/D	7/H	J/D	J/H	D/H
Oberer Grenzwert	1,32	1,66	4,54	4,99	1,32	3,69	3,98	2,80	3,03	1,11
75. Perzentile	1,26	1,57	4,35	4,48	1,30	3,46	3,69	2,77	2,85	1,07
Median	1,19	1,55	4,13	4,23	1,28	3,43	3,52	2,74	2,77	1,03
25. Perzentile	1,17	1,45	3,90	3,96	1,24	3,35	3,39	2,67	2,70	1,00
Unterer Grenzwert	1,11	1,42	3,76	3,79	1,22	3,30	3,13	2,58	2,57	0,93

Nach 24 Zyklen waren kleine Variationsbreiten für die Exonverhältnisse 7/J (1,22 – 1,32, $\Delta 0,1$), h5/7 (1,11 – 1,32, $\Delta 0,21$), D/H (0,93 – 1,11, $\Delta 0,18$) und J/D (2,58 – 2,80, $\Delta 0,22$) zu verzeichnen. Zunehmende Spannweite zeigten 7/D (3,30 – 3,71, $\Delta 0,41$), h5/J (1,42 – 1,66, $\Delta 0,44$), J/H (2,57 – 3,05, $\Delta 0,48$), 7/H (3,13 – 3,78, $\Delta 0,65$), h5/D (3,76 – 4,54, $\Delta 0,78$) und h5/H (3,79 – 4,99, $\Delta 1,2$).



Auch nach 30 Zyklen hatten h5/7 (1,58 – 1,77, $\Delta 0,19$), 7/J (1,07 – 1,23, $\Delta 0,16$) und D/H (1,21 – 1,35, $\Delta 0,14$) sehr wenig Abweichung um den Median, h5/J (1,65 – 2,13, $\Delta 0,48$) etwas mehr. Die übrigen Boxplots zeigten eine größere Spannbreite. Bei 7/D (3,60 – 5,28, $\Delta 1,68$), J/D (3,37 – 4,40, $\Delta 1,03$) und J/H (4,12 – 5,42, $\Delta 1,30$) lag die Variation im gleichen Bereich; 7/H (4,41 – 6,63, $\Delta 2,22$) zeigte wenig mehr. h5/D (6,03 – 8,84, $\Delta 2,61$) und h5/H (7,56 – 11,56, $\Delta 4,00$) setzten sich deutlich ab.

4.3.2. Variation zwischen verschiedenen Kontroll-DNAs

(Ansatz 45h1914 mit 11 verschiedenen DNAs)

Um die Variationsbreite der gesunden Population zu ermitteln, wurden 11 Kontroll-DNAs für den Multiplex-Ansatz 45h1914 jeweils nach Zyklus 22 und 30 ausgewertet. Hierbei wurden nicht die Absolutwerte miteinander verglichen, sondern wie auch im späteren Deletionsscreening die Verhältnisse der Exons. Dabei wurden die Integrale der Flächen unter den Exonkurven der HPLC-Analyse bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Diese Verhältnisse konnten innerhalb eines Ansatzes verglichen werden.

Die Kontrollen wurden von 1-11 durchnummeriert (K1-K11), jede Kontrolle wurde in beiden Ansätzen mit derselben Nummer gekennzeichnet.

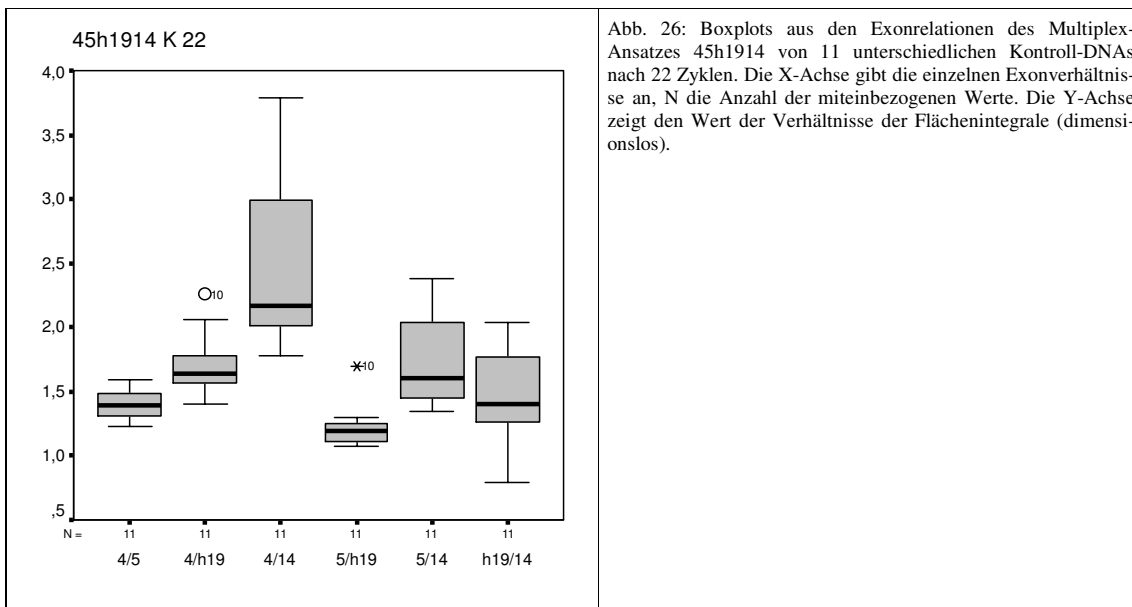
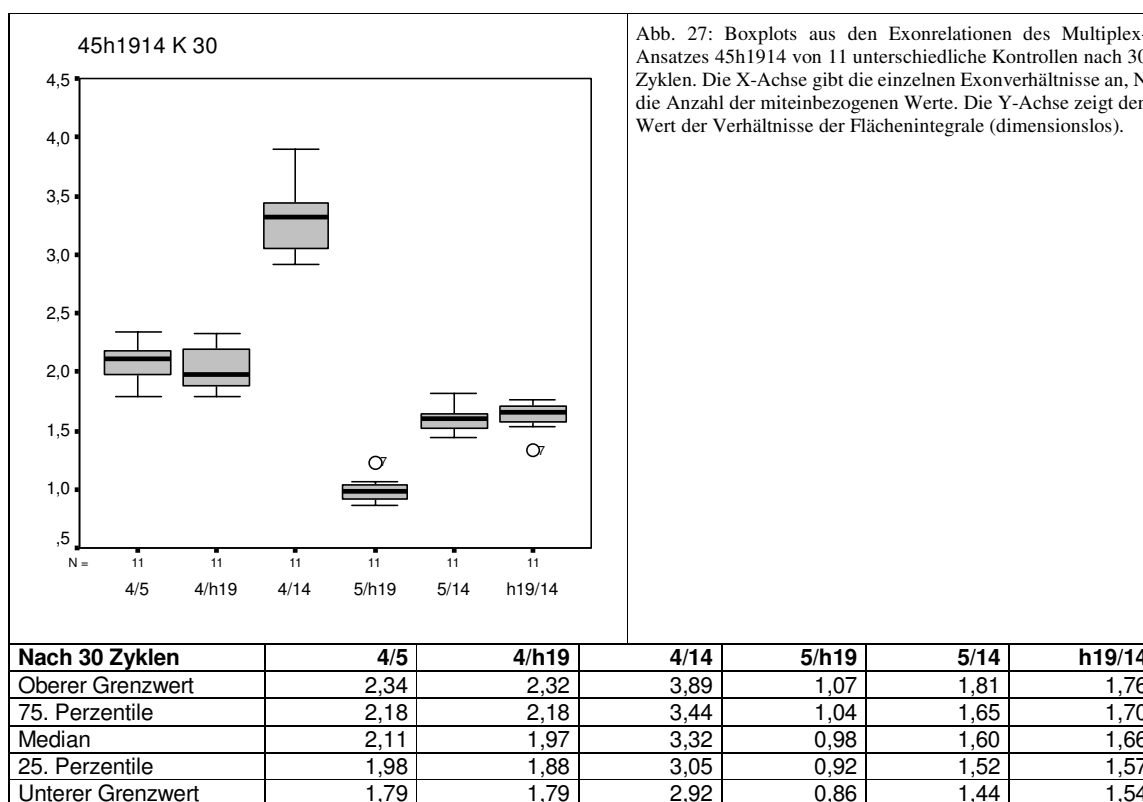


Abb. 26: Boxplots aus den Exonrelationen des Multiplex-Ansatzes 45h1914 von 11 unterschiedlichen Kontroll-DNAs nach 22 Zyklen. Die X-Achse gibt die einzelnen Exonverhältnisse an, N die Anzahl der miteinbezogenen Werte. Die Y-Achse zeigt den Wert der Verhältnisse der Flächenintegrale (dimensionslos).

Nach 22 Zyklen	4/5	4/h19	4/14	5/h19	5/14	h19/14
Oberer Grenzwert	1,59	2,06	3,79	1,30	2,38	2,04
75. Perzentile	1,49	1,85	3,21	1,27	2,08	1,83
Median	1,39	1,64	2,17	1,19	1,60	1,41
25. Perzentile	1,29	1,56	2,02	1,11	1,45	1,21
Unterer Grenzwert	1,23	1,41	1,78	1,08	1,34	0,79

Nach 22 Zyklen zeigte 5/h19 (1,08 – 1,30, $\Delta 0,28$) die kleinste Variation gefolgt von 4/5 (1,23 – 1,59, $\Delta 0,36$) und 4/h19 (1,41 – 2,06, $\Delta 0,65$). Eine größere Spannbreite hatten schon 5/14 (1,34 – 2,38, $\Delta 1,04$) und h19/14 (0,79 – 2,04, $\Delta 1,25$). Auffällig war die große Variation für 4/14 (1,78 – 3,79, $\Delta 2,01$). Bei 4/h19 und 5/h19 gab es jeweils einen Ausreißer. In beiden Fällen handelte es sich um dieselbe Kontroll-DNA K10.



Auch nach 30 Zyklen hatte 5/h19 (0,86 – 1,03, $\Delta 0,17$) die kleinste Abweichung vom Median gefolgt von h19/14 (1,54 – 1,76, $\Delta 0,22$). 5/14 (1,44 – 1,81, $\Delta 0,37$), 4/5 (1,79 – 2,34, $\Delta 0,55$) und 4/h19 (1,79 – 2,32, $\Delta 0,53$) bewegten sich in derselben Region. Eine deutlich größere Spannbreite zeigte wieder 4/14 (2,92 – 3,89, $\Delta 0,97$). Bei den Ausreißern bei 5/h19 und h19/14 handelte es sich in beiden Fällen um die Kontroll-DNA K7.

4.4. Auswertung der Verhältnisrelationen

4.4.1. Allgemein

Die Auswertung der in der HPLC-Analyse der vier Multiplex-Ansätze erhobenen Werte erfolgte nach einem bestimmten Schema. Zunächst wurden für jede DNA pro Multiplex-Ansatz die Integrale der Flächen unter den exonspezifischen Kurven erhoben. Diese Flächenintegrale wurden untereinander ins Verhältnis gesetzt (immer nur Werte einer DNA innerhalb eines Multiplex-Ansatzes). Damit diese gebildeten Verhältnisse zwischen den DNAs vergleichbar wurden, mussten diese Verhältnisse wiederum mit einem Referenzwert ins Verhältnis gesetzt werden. Die Referenzwerte ergaben sich aus den Werten der Kontroll-DNAs. Für jedes Exonverhältnis

wurde derjenige Wert als Referenzwert bestimmt der den Median in der Kontrollgruppe gebildet hat.

Arbeitsschritte der Auswertung

1. Integral der Flächen unter den Kurven erfassen (z. B. Exon 4, 5, h19, 14)
2. Verhältnisse untereinander bilden (z. B. 4/5, 4/h19, 4/h14, 5/h19, 5/14, h19/14)
3. Referenzwert für jedes Verhältnis bestimmen (Median aus der Kontrollgruppe)
4. Doppelverhältnisbildung (z. B. $(4/5)_{\text{Kontrolle}} / (4/5)_{\text{Patient}}$)

Die Grenzwerte dieser doppelten Verhältnisbildung waren für alle Multiplex-Ansätze gleich. Die Grenzwerte, ab denen eine Deletion bzw. eine Duplikation des einen oder anderen Exons definiert wurde, wurden auf unter 0,67 und über 1,5 festgesetzt. Lagen die Werte zwischen 0,67 und 1,5 wurde keine Deletion oder Duplikation konstatiert.

$$(A/B)_K / (A/B)_P < 0,67 \rightarrow \text{Deletion von } B_P \text{ oder Duplikation von } A_P$$

$$(A/B)_K / (A/B)_P > 1,5 \rightarrow \text{Deletion von } A_P \text{ oder Duplikation von } B_P$$

Ein Exon war erst dann sicher als deletiert anzusehen, wenn alle Verhältnisse in denen das Exon enthalten war, dieselbe Tendenz zur Deletion zeigten.

4.4.2. HPLC-Auswertung

In den folgenden Tabellen wurden die Quotienten aus den Exonverhältnissen der Referenzperson $(\text{Exon A/Exon B})_K$ und den Exonverhältnissen der Patienten $(\text{Exon A/Exon B})_P$ gebildet:

$$(A/B)_K / (A/B)_P$$

Der erste Teil jeder Tabelle zeigt die Werte der einzelnen Exonverhältnisse für jeden Patienten. Die Zeile „Referenz“ gibt für jedes Verhältnis den Medianwert der Kontrollgruppe an. Im unteren Teil sind die Werte der Doppelverhältnisbildung (Referenzwert/Patientenwert) aufgeführt. Die hervorgehobenen Zellen in diesem Tabellenbereich indizieren die Werte, die außerhalb des definierten Normalbereichs lagen.

Aus labortechnischen Gründen konnten pro Multiplex-Ansatz nicht alle Patienten plus den notwendigen Kontrollen aus einem Mastermix bearbeitet werden. Für jede Zykluszahl wurden daher pro Multiplex-Ansatz zwei Mastermixe erstellt. Jeder Mastermix ist für sich im folgenden in einer Tabelle dargestellt, da Patienten nur mit Kontrollen aus demselben Mastermix verglichen werden dürfen. Für jeden Multiplex-Ansatz gibt es daher vier Tabellen, jeweils zwei pro Zykluszahl.

Bei allen untersuchten DNAs handelt es sich um Proben aus Blut oder Tumorgewebe von Patienten mit klinisch diagnostizierter FAP, bei denen mit herkömmlichen Methoden keine Muta-

tion gefunden werden konnte.

4.4.2.1. Multiplexansatz h57JDH

1. Ansatz nach 24 Zyklen

Exon Verhältnisse										
Patienten	h5/7	h5/J	h5/D	h5/H	7/J	7/D	7/H	J/D	J/H	D/H
Pat.A	0,81	1,18	1,22	1,60	1,45	1,50	1,97	1,03	1,36	1,31
Pat.B	0,57	1,11	0,93	1,21	1,94	1,62	2,13	0,84	1,10	1,31
Pat.C	0,65	1,39	1,08	1,46	2,15	1,67	2,25	0,78	1,05	1,35
Pat.D	1,50	2,58	2,63	3,35	1,72	1,75	2,24	1,02	1,30	1,28
Pat.E	1,56	2,21	2,75	4,05	1,42	1,77	2,59	1,24	1,83	1,47
Pat.F	0,75	1,19	1,24	1,94	1,59	1,66	2,59	1,04	1,63	1,56
Pat.G	0,88	1,23	1,34	1,80	1,40	1,53	2,05	1,09	1,46	1,34
Referenz-Wert	0,79	1,27	1,26	1,82	1,59	1,66	2,28	1,01	1,44	1,43
Werte nach doppelter Verhältnisbildung										
Pat.A	0,97	1,08	1,03	1,13	1,09	1,11	1,16	0,98	1,06	1,09
Pat.B	1,36	1,14	1,34	1,48	0,83	1,03	1,08	1,20	1,31	1,10
Pat.C	1,22	0,91	1,16	1,24	0,74	0,99	1,01	1,30	1,37	1,06
Pat.D	0,53	0,49	0,48	0,54	0,92	0,95	1,02	0,99	1,10	1,12
Pat.E	0,51	0,57	0,46	0,45	1,12	0,94	0,88	0,81	0,79	0,97
Pat.F	1,06	1,07	1,01	0,94	1,00	1,00	0,88	0,97	0,88	0,92
Pat.G	0,90	1,03	0,94	1,01	1,14	1,09	1,11	0,92	0,98	1,07

Die Werte der Pat. A, B, C, F und G zeigen keine Werte außerhalb des definierten Normbereichs. Bei den Pat. D und E liegen die Werte für die Exonverhältnisse h5/7, h5/J, h5/D und h5/H unterhalb des unteren Grenzwertes von 0,67. Bei beiden Patienten sind die Exons 7, 15J, 15D und 15H deletiert.

2. Ansatz nach 24 Zyklen

Exon Verhältnisse										
Patienten	h5/7	h5/J	h5/D	h5/H	7/J	7/D	7/H	J/D	J/H	D/H
Pat.H	0,34	1,33	1,45	1,62	3,87	4,24	4,73	1,09	1,22	1,12
Pat.I	0,31	0,92	1,26	1,46	2,93	4,01	4,65	1,37	1,59	1,16
Pat.K	0,33	0,59	0,59	0,83	1,77	1,78	2,50	1,00	1,41	1,41
Pat.L	0,33	0,59	0,59	0,79	1,82	1,81	2,42	1,00	1,33	1,33
Pat.M	0,32	0,60	0,64	0,90	1,86	1,99	2,79	1,07	1,50	1,40
Referenz-Wert	0,31	0,58	0,63	0,81	2,04	1,98	2,59	0,97	1,49	1,30
Werte nach doppelter Verhältnisbildung										
Pat.H	0,91	0,44	0,43	0,50	0,53	0,47	0,55	0,89	1,22	1,16
Pat.I	1,00	0,63	0,50	0,56	0,69	0,49	0,56	0,71	0,94	1,12
Pat.K	0,94	0,99	1,06	0,97	1,15	1,12	1,04	0,97	1,06	0,92
Pat.L	0,96	0,98	1,06	1,03	1,12	1,09	1,07	0,97	1,12	0,97
Pat.M	0,97	0,97	0,98	0,90	1,09	1,00	0,93	0,91	0,99	0,92

Alle Werte der Patienten K, L und M liegen im Normbereich. Bei Pat. H sind die Werte für die Exonrelationen h5/J, h5/D, h5/H, 7/J, 7/D und 7/H unterhalb des unteren Grenzwertes, die übrigen Werte sind im Normbereich. Daher kann auf eine Deletion der Exons 15J, 15D und 15H bei Pat. H geschlossen werden. Die Werte für Pat. I zeigen ebenfalls für h5/J, h5/D, h5/H, 7/D und 7/H Auffälligkeiten, allerdings nicht für 7/J. Hier sind die Exons 15D und 15H deletiert. Wahrscheinlich auch 15J, da 15J im Verhältnis zur Kontrolle eine Deletion anzeigt und die

Werte für die Verhältnisse mit 15D und 15H im Normbereich liegen. Für eine eindeutige Deletion müsste 7/J unterhalb des Grenzwertes liegen.

In der folgenden Graphik werden beide PCR-Ansätze zusammengefasst. Die schwarzen horizontalen Balken stellen die Grenzwerte 1,5 und 0,67 des Normalbereiches dar. Deutlich ist die Unterschreitung des unteren Grenzwertes bei den Pat. D, E und H zu sehen. Ebenso ist gut zu erkennen, dass die Werte der Pat. A bei allen Verhältnissen im Normbereich bleiben. Um die Graphik übersichtlich zu gestalten sind die Pat. B, C, F, G, K, L und M (keine Auffälligkeiten) nicht dargestellt.

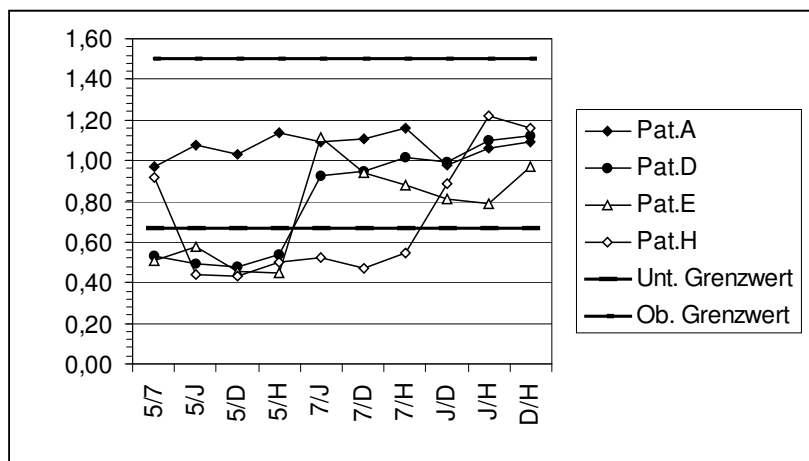


Abb. 28: Graphische Darstellung der Exondeletionen. Jedem Patienten ist ein spezifisches Symbol zugeordnet. Die X-Achse zeigt die Exonverhältnisse an. Deutlich ist die Unterschreitung des unteren Grenzwertes bei den Pat. D, E und H zu sehen und damit Deletion der Exons 7, 15J, 15D und H bei Pat. D und E, sowie Deletion der Exons 15J, 15D und 15H bei Pat. H. Ebenso ist gut zu erkennen, dass die Werte der Pat. A bei allen Verhältnissen im Normbereich bleiben

1. Ansatz nach 30 Zyklen

Exon Verhältnisse										
Patienten	h5/7	h5/J	h5/D	h5/H	7/J	7/D	7/H	J/D	J/H	D/H
Pat.A	1,72	1,48	2,96	3,30	0,86	1,72	1,91	2,00	2,22	1,11
Pat.B	1,53	1,51	2,91	3,22	0,98	1,90	2,10	1,93	2,13	1,11
Pat.C	1,53	1,59	3,06	3,35	1,04	2,00	2,19	1,93	2,11	1,09
Pat.D	3,61	3,57	9,21	9,89	0,99	2,55	2,74	2,58	2,77	1,07
Pat.E	3,15	3,01	6,83	7,34	0,95	2,17	2,33	2,27	2,44	1,08
Pat.F	1,50	1,51	2,75	3,75	1,01	1,83	2,50	1,82	2,49	1,36
Pat.G	1,81	1,75	3,02	4,12	0,97	1,66	2,27	1,72	2,35	1,36
Referenz-Wert	1,78	1,70	3,61	4,23	0,96	1,99	2,19	2,14	2,26	1,10
Werte nach doppelter Verhältnisbildung										
Pat.A	1,04	1,15	1,22	1,28	1,11	1,16	1,15	1,07	1,02	0,99
Pat.B	1,16	1,13	1,24	1,31	0,97	1,05	1,04	1,11	1,06	1,00
Pat.C	1,16	1,07	1,18	1,26	0,92	1,00	1,00	1,11	1,07	1,01
Pat.D	0,49	0,48	0,39	0,43	0,97	0,78	0,80	0,83	0,82	1,03
Pat.E	0,57	0,57	0,53	0,58	1,00	0,92	0,94	0,94	0,93	1,03
Pat.F	1,19	1,13	1,31	1,13	0,95	1,08	0,88	1,17	0,91	0,81
Pat.G	0,98	0,97	1,20	1,03	0,99	1,20	0,97	1,24	0,96	0,81

Nach 30 Zyklen zeigt sich das gleiche Bild wie nach 24 Zyklen. Die Werte für h5/7, h5/J, h5/D und h5/H sind bei den Pat. D und E vermindert, d.h. dass auch hier bei diesen Patienten eine Deletion der Exons 7, 15D, 15J und 15H zu sehen ist. Die übrigen Verhältnisse wie auch die Werte der anderen Patienten liegen im Normbereich.

2. Ansatz nach 30 Zyklen

Exon Verhältnisse		H5/7	h5/J	H5/D	h5/H	7/J	7/D	7/H	J/D	J/H	D/H
Pat.H		2,12	3,48	8,90	11,53	1,65	4,20	5,45	2,56	3,31	1,30
Pat.I		2,53	3,66	11,24	14,25	1,45	4,45	5,64	3,07	3,89	1,27
Pat.K		2,11	1,57	3,22	4,59	0,74	1,52	2,17	2,05	2,93	1,43
Pat.L		2,07	1,49	3,16	4,73	0,72	1,52	2,28	2,11	3,17	1,50
Pat.M		1,96	1,55	3,18	5,08	0,79	1,62	2,59	2,05	3,28	1,60
Referenz-Wert		2,29	1,62	3,49	5,23	0,79	1,62	2,35	2,19	3,24	1,48
Werte nach doppelter Verhältnisbildung											
Pat.H		1,08	0,46	0,39	0,45	0,48	0,39	0,43	0,86	0,98	1,14
Pat.I		0,91	0,44	0,31	0,37	0,55	0,36	0,42	0,71	0,83	1,17
Pat.K		1,08	1,03	1,09	1,14	1,07	1,07	1,08	1,07	1,11	1,04
Pat.L		1,10	1,08	1,11	1,10	1,10	1,06	1,03	1,04	1,02	0,99
Pat.M		1,17	1,05	1,10	1,03	1,00	1,00	0,91	1,07	0,99	0,93

Eine Deletion der Exons 15J, 15D und 15H bei den Pat.H und I wird durch herabgesetzte Werte der Exonrelationen h5/J, h5/D und h5/H wiedergespiegelt. Die Pat. K, L und M zeigen keinen Hinweis auf eine Deletion.

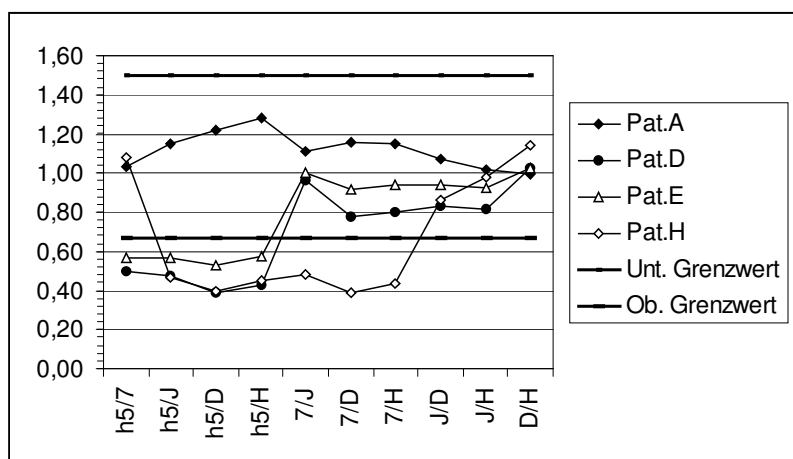


Abb. 29: Die Graphik zeigt die Werte der auffälligen Pat. D, E und H und des unauffälligen Pat. A nach 30 Zyklen. Deutlich ist für die Pat. D, E und H eine Unterschreitung des unteren Grenzwertes zu erkennen und damit Deletion der Exons 7, 15J, D und H bei Pat. D und E, sowie Deletion der Exons 15J, D und H bei Pat. H. Pat. A bleibt für alle Exonrelationen im Normbereich. Die X-Achse zeigt die Exonverhältnisse an.

4.4.2.2. Multiplexansatz 45h1914

1. Ansatz nach 22 Zyklen

Exon Verhältnisse		4/5	4/h19	4/14	5/h19	5/14	h19/14
Pat.A		2,45	2,12	3,32	0,86	1,35	1,57
Pat.B		1,26	1,03	1,67	0,82	1,32	1,61
Pat.C		1,73	1,47	1,56	0,85	0,90	1,06
Pat.D		2,24	0,79	1,87	0,35	0,84	2,38
Pat.E		2,03	0,71	1,75	0,35	0,86	2,45
Pat.F		1,74	1,45	2,18	0,84	1,26	1,50
Pat.G		2,17	1,44	3,88	0,67	1,79	2,69
Referenz-Wert		1,74	1,45	1,91	0,84	1,15	1,47
Werte nach doppelter Verhältnisbildung							
Pat.A		0,80	0,72	0,68	0,97	0,85	0,89
Pat.B		1,38	1,40	1,15	1,02	0,87	0,91
Pat.C		1,01	0,99	1,23	0,99	1,28	1,39
Pat.D		0,78	1,85	1,02	2,39	1,38	0,62
Pat.E		0,86	2,03	1,09	2,39	1,33	0,60
Pat.F		1,00	1,00	0,87	1,01	0,92	0,98
Pat.G		0,80	1,00	0,49	1,26	0,64	0,55

Bei den Pat. D und E liegen die Werte für 4/h19 und 5/h19 über dem oberen Grenzwert und der Wert für h19/14 ist erniedrigt. Diese Kombination zeigt eine Deletion der Exons 4, 5 und 14 an. Im Gegensatz dazu sind bei Pat. G die Werte für 4/14, 5/14 und h19/14 erniedrigt, d.h. dass von einer Deletion von Exon 14 auszugehen ist. Die Pat. A, B, C und F zeigen keine auffälligen Werte.

2. Ansatz nach 22 Zyklen

Exon Verhältnisse						
Patienten	4/5	4/h19	4/14	5/h19	5/14	h19/14
Pat.H	1,03	2,35	2,18	2,27	2,11	0,93
Pat.I	0,91	2,56	1,86	2,79	2,03	0,73
Pat.K	0,95	5,76	0,74	6,06	0,78	0,13
Pat.L	0,85	2,12	0,64	2,47	0,75	0,30
Pat.M	0,95	2,72	0,80	2,87	0,84	0,29
Pat.E	0,96	1,14	0,86	1,20	0,89	0,75
Referenz-Werte	0,98	2,32	0,80	2,33	0,81	0,34
Werte nach doppelter Verhältnisbildung						
Pat.H	0,95	0,99	0,36	1,03	0,38	0,37
Pat.I	1,07	0,91	0,43	0,83	0,40	0,47
Pat.K	1,03	0,40	1,08	0,38	1,04	2,67
Pat.L	1,15	1,10	1,24	0,94	1,08	1,13
Pat.M	1,04	0,85	1,00	0,81	0,96	1,17
Pat.E	1,03	2,03	0,93	1,95	0,90	0,46

Es zeigt sich eine Erniedrigung der Werte für 4/14, 5/14 und h19/14 bei den Pat. H und I, die eine Deletion von Exon 14 anzeigen. Eine Wiederholung von Pat. E zeigt dasselbe Ergebnis wie im ersten Ansatz. Eine Deletion der Exons 4, 5 und 14. Bei Pat. K zeigen 4/h19 und 5/h19 erniedrigte Werte; h19/14 einen erhöhten. Entweder liegt hier ein Duplikation der Exons 4, 5 und 14 vor oder das Kontrolllexon h19 ist deletiert. Die übrigen Werte liegen im Normbereich.

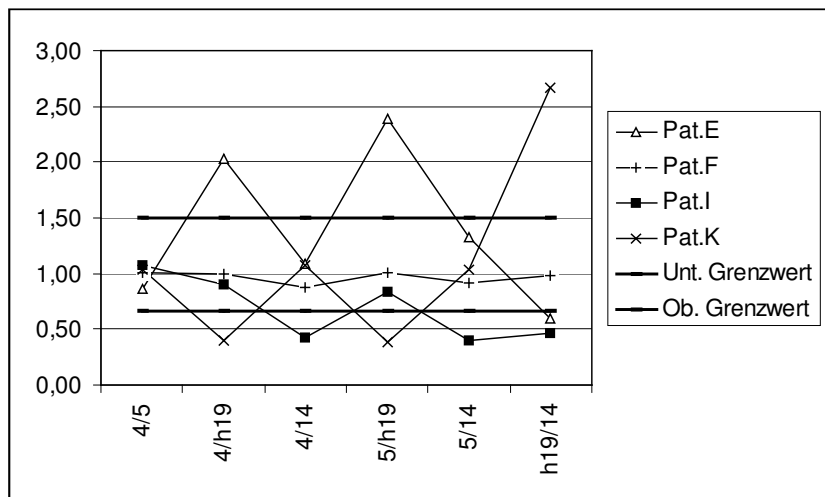


Abb. 30: Dargestellt sind die auffälligen Patienten (Pat. E, I und K), sowie Pat.F mit als unauffälligen Werten zum Vergleich. Eine Deletion der Exons 4, 5 und 14 bei Pat. E ist durch die ausserhalb des Normbereichs liegenden Werte (4/h19, 5/h19 und h19/14) erkennbar. Die Deletion von Exon 14 bei Pat. I wird durch die Werte von 4/14, 4/14, h19/14 ausserhalb des Normbereichs veranschaulicht. Pat. K läuft gegensätzlich zu der Kurve von Pat. E. Daher liegt der Schluss auf eine Deletion des Kontrolllexons h19 bzw. Duplikation der Exons 4, 5 und 14 nahe. Die X-Achse zeigt die Exonverhältnisse an.

1. Ansatz nach 30 Zyklen

Exon Verhältnisse						
Patienten	4/5	4/h19	4/14	5/h19	5/14	h19/14
Pat.A	4,70	1,20	5,12	0,26	1,09	4,26
Pat.B	4,78	1,67	6,32	0,35	1,32	3,78
Pat.C	3,98	1,44	5,50	0,36	1,38	3,82
Pat.D	3,98	0,70	4,51	0,18	1,13	6,47
Pat.E	3,13	0,56	3,21	0,18	1,03	5,75
Pat.F	4,23	1,36	4,23	0,32	1,00	3,11
Pat.G	3,94	1,07	7,33	0,27	1,86	6,87
Referenz-Wert	4,41	1,37	4,72	0,32	1,19	3,44
Werte nach doppelter Verhältnisbildung						
Pat.A	0,94	1,14	0,92	1,25	1,09	0,81
Pat.B	0,92	0,82	0,75	0,91	0,90	0,91
Pat.C	1,11	0,95	0,86	0,88	0,86	0,90
Pat.D	1,11	1,97	1,05	1,83	1,05	0,53
Pat.E	1,41	2,45	1,47	1,79	1,16	0,60
Pat.F	1,04	1,01	1,12	1,00	1,19	1,10
Pat.G	1,12	1,28	0,64	1,18	0,64	0,50

Die Werte für 4/h19 und 5/h19 sind auch nach 30 Zyklen bei den Pat. D und E erhöht, sowie für h19/14 erniedrigt. Es liegt daher eine Deletion der Exons 4, 5 und 14 vor. Bei Pat. G ist Exon 14 deletiert, angezeigt durch die erniedrigten Werte von 4/14, 5/14 und h19/1. Normwerte für die Pat. A, B, C und F.

2. Ansatz nach 30 Zyklen

Exon Verhältnisse						
Patienten	4/5	4/h19	4/14	5/h19	5/14	h19/14
Pat.H	2,51	1,03	5,65	0,41	2,26	5,48
Pat.I	2,60	1,07	8,92	0,41	3,43	8,37
Pat.K	2,38	2,05	2,40	0,86	1,01	1,17
Pat.L	2,87	0,97	2,63	0,34	0,92	2,71
Pat.M	2,87	1,10	2,76	0,38	0,96	2,50
Referenz-Wert	2,87	1,10	2,63	0,40	0,96	2,50
Werte nach doppelter Verhältnisbildung						
Pat.H	1,15	1,07	0,47	0,98	0,43	0,46
Pat.I	1,10	1,04	0,30	0,99	0,28	0,30
Pat.K	1,21	0,54	1,10	0,47	0,95	2,14
Pat.L	1,00	1,14	1,00	1,19	1,04	0,92
Pat.M	1,00	1,00	0,96	1,05	1,00	1,00

Eine Erniedrigung der Werte für 4/14, 5/14 und h19/14 bei den Pat. H und I definieren eine Deletion von Exon 14. Pat. K zeigt das gleiche Muster wie nach 22 Zyklen. 4/h19 und 5/h19 zeigten erniedrigte Werte; h19/14 erhöhte. Entweder liegt hier ein Duplikation der Exons 4, 5 und 14 vor oder h19 als Kontrollexon ist deletiert. Die Werte der Pat. L und M liegen im Normbereich.

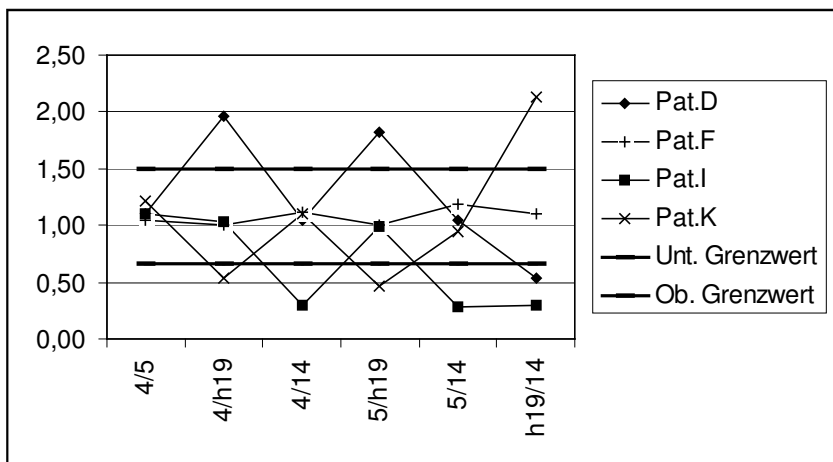


Abb. 31: Die Graphik zeigt die auffälligen Pat. D, I und K. Die Deletion der Exons 4, 5 und 14 bei Pat. D ist durch die ausserhalb des Normbereichs liegenden Werte (4/h19, 5/h19 und h19/14) erkennbar. Die Deletion von Exon 14 bei Pat. I wird durch die Werte von 4/14, 4/14, h19/14 ausserhalb des Normbereichs veranschaulicht. Pat. K läuft gegensätzlich zu der Kurve von Pat. D. Daher liegt der Schluss auf eine Deletion des Kontrollexons h19 nahe. Pat.F ist in allen Verhältnissen innerhalb der Grenzen. Die X-Achse zeigt die Exon-verhältnisse an.

4.4.2.3. Multiplexansatz 11h1ALI

1. Ansatz nach 22 Zyklen

Exon Verhältnisse										
Patienten	11/h1	11/A	11/L	11/I	h1/A	h1/L	h1/I	A/L	A/I	L/I
Pat.A	0,50	0,84	0,59	0,45	1,67	1,17	0,89	0,70	0,53	0,76
Pat.B	0,41	0,80	0,49	0,39	1,94	1,20	0,95	0,62	0,49	0,79
Pat.C	0,34	0,97	0,40	0,38	2,83	1,15	1,10	0,41	0,39	0,95
Pat.D	0,30	0,97	0,85	0,65	3,24	2,84	2,17	0,88	0,67	0,76
Pat.E	0,37	1,13	1,00	0,67	3,05	2,69	1,80	0,88	0,59	0,67
Pat.F	0,53	0,84	0,65	0,53	1,60	1,23	1,01	0,77	0,63	0,82
Pat.G	0,52	0,94	0,79	0,52	1,81	1,53	1,00	0,84	0,55	0,65
Referenz-Wert	0,54	0,93	0,67	0,55	1,73	1,28	1,02	0,77	0,59	0,71
Werte nach doppelter Verhältnisbildung										
Pat.A	1,17	1,25	1,51	1,36	1,04	1,31	1,17	1,24	1,09	0,87
Pat.B	1,27	1,18	1,61	1,44	0,91	1,29	1,14	1,40	1,22	0,86
Pat.C	1,08	0,84	1,33	1,11	0,76	1,25	1,03	1,62	1,31	0,80
Pat.D	1,98	1,09	1,05	0,94	0,54	0,54	0,48	0,99	0,87	0,86
Pat.E	1,59	0,93	0,89	0,91	0,57	0,57	0,58	0,98	0,98	0,99
Pat.F	1,12	1,25	1,37	1,15	1,09	1,24	1,03	1,13	0,92	0,81
Pat.G	1,14	1,12	1,12	1,17	0,96	1,00	1,04	1,03	1,05	1,01

Bei Pat. D und E sind die Werte für 11/h1 erhöht, für h1/A, h1/L und h1/I erniedrigt. Daraus ergibt sich eine Deletion der Exons 11, 15A, 15L und 15I. Pat. Die erhöhten Werte für 11/L bei den Pat. A und B, sowie der erhöhte Wert von A/I von Pat. C haben als alleinigen auffälligen Wert hinsichtlich einer Deletion keine Aussagekraft. Alle übrigen Werte liegen im Normbereich.

2. Ansatz nach 22 Zyklen

Exon Verhältnisse										
Patienten	11/h1	11/A	11/L	11/I	h1/A	h1/L	h1/I	A/L	A/I	L/I
Pat.H	0,17	0,65	0,32	0,28	3,80	1,89	1,64	0,50	0,43	0,87
Pat.I	0,34	1,35	0,79	0,61	4,00	2,34	1,81	0,59	0,45	0,77
Pat.K	0,27	0,53	0,36	0,31	1,97	1,34	1,14	0,68	0,58	0,85
Pat.L	0,30	0,62	0,40	0,33	2,07	1,34	1,09	0,65	0,53	0,81
Pat.M	0,38	0,54	0,43	0,36	1,43	1,13	0,95	0,79	0,66	0,84
Referenz-Wert	0,38	0,62	0,52	0,37	1,61	1,37	1,14	0,68	0,62	0,81
Werte nach doppelter Verhältnisbildung										
Pat.H	2,47	1,11	1,79	1,53	0,44	0,73	0,73	1,65	1,43	0,97
Pat.I	1,13	0,46	0,66	0,61	0,40	0,58	0,63	1,47	1,37	1,05
Pat.K	1,42	1,18	1,45	1,21	0,82	1,02	1,00	1,26	1,07	0,95
Pat.L	1,26	0,99	1,29	1,13	0,78	1,02	1,05	1,33	1,18	1,00
Pat.M	1,00	1,14	1,21	1,03	1,13	1,21	1,21	1,09	0,94	0,97

Bei Pat. I liegt eine Deletion der Exons 15A, 15L und 15I vor, angezeigt durch die erniedrigten Werte von 11/A, 11/L, 11/I, h1/A, h1/L und h1/I. Die Kombination der aus dem Normbereich fallenden Werte (11/h1, 11/L, 11/I, h1/A und A/L) für Pat. H gibt kein eindeutiges Bild für eine Deletion. Möglicherweise sind die Exons 11 und 15A deletiert, allerdings spricht der Normalwert von A/I dagegen. Die Werte der Pat. K, L und M liegen alle innerhalb der Grenzwerte.

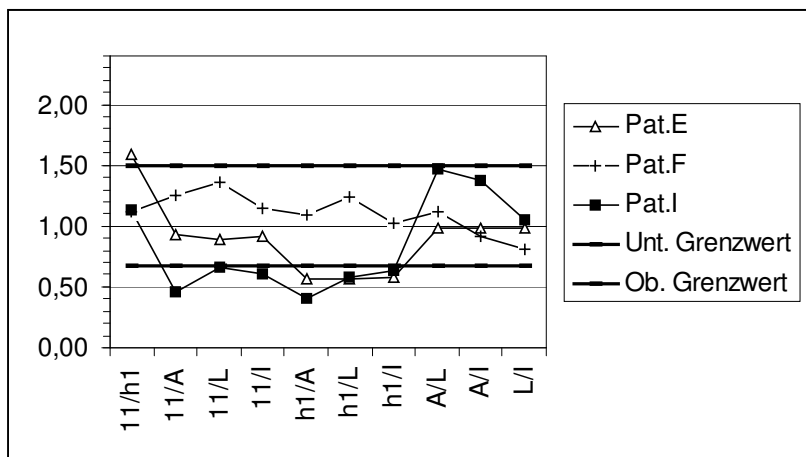


Abb. 32: Die Graphik stellt die Werte der Pat. E, F und I dar. Die Pat. E und I zeigen Werte ausserhalb der Norm. Bei Pat. E sprechen die erhöhten Werte für 11/h1, und die erniedrigten Werte für h1/A, h1/L und h1/I für eine Deletion der Exons 11, 15A, 15L und 15I. Bei Pat. I liegt eine Deletion der Exons A, 15L und 15I vor, angezeigt durch die erniedrigten Werte von 11/A, 11/L, 11/I, h1/A, h1/L und h1/I. Alle Werte von Pat. F liegen im Normbereich. Die X-Achse zeigt die Exonverhältnisse an

1. Ansatz nach 28 Zyklen

Exon Verhältnisse										
Patienten	11/h1	11/A	11/L	11/I	h1/A	h1/L	h1/I	A/L	A/I	L/I
Pat.A	2,02	3,85	7,50	4,53	1,91	3,72	2,24	1,95	1,17	0,60
Pat.B	1,76	3,09	5,21	3,28	1,75	2,96	1,86	1,69	1,06	0,63
Pat.C	1,66	3,13	4,40	2,96	1,89	2,65	1,78	1,40	0,94	0,67
Pat.D	1,50	4,38	7,25	4,90	2,91	4,83	3,26	1,66	1,12	0,68
Pat.E	1,31	2,79	4,11	2,78	2,13	3,15	2,13	1,48	1,00	0,67
Pat.F	2,48	4,19	7,45	5,03	1,69	3,01	2,03	1,78	1,20	0,68
Pat.G	1,66	3,67	7,17	4,28	2,21	4,33	2,58	1,95	1,17	0,60
Referenz-Wert	2,17	3,55	6,05	3,81	1,64	2,49	1,65	1,67	1,07	0,66
Werte nach doppelter Verhältnisbildung										
Pat.A	1,08	0,92	0,81	0,84	0,86	0,67	0,73	0,86	0,91	1,10
Pat.B	1,23	1,15	1,16	1,16	0,94	0,84	0,89	0,99	1,01	1,05
Pat.C	1,31	1,13	1,38	1,29	0,87	0,94	0,92	1,19	1,13	0,99
Pat.D	1,44	0,81	0,83	0,78	0,56	0,52	0,50	1,01	0,96	0,98
Pat.E	1,66	1,27	1,47	1,37	0,77	0,79	0,77	1,13	1,07	0,98
Pat.F	0,88	0,85	0,81	0,76	0,97	0,83	0,81	0,94	0,89	0,98
Pat.G	1,31	0,97	0,84	0,89	0,74	0,57	0,64	0,85	0,92	1,11

Die aus dem Normbereich fallenden Werte der Pat. D, E und G ergeben in der vorliegenden Kombination kein einheitliches Bild für eine Deletion. Die erniedrigten Werte für h1/A, h1/L und h1/I bei Pat. D deuten eine Deletion der Exons 15A, 15L und 15I an. Gegen eine solche Deletion sprechen die Normalwerte für 11/A, 11/L und 11/I. Wahrscheinlicher ist eine zusätzliche Deletion von Exon 11 auch wenn 11/h1 einen Normwert anzeigt. Ähnliches gilt für Pat. G. Eine Deletion der Exons 15L und 15I ist durch die erniedrigten Werte von h1/L und h1/I angezeigt. Da aber alle anderen Werte normal sind, ist davon nicht auszugehen. Der einzelne pathologische Wert von Pat. E (11/h1) gibt bei sonst unauffälligen Werten allenfalls einen Hinweis auf ein deletiertes Exon 11. Die Werte der Pat. A, B, C und F liegen alle im Normbereich.

2. Ansatz nach 28 Zyklen

Exon Verhältnisse										
Patienten	11/h1	11/A	11/L	11/I	h1/A	h1/L	h1/I	A/L	A/I	L/I
Pat.H	1,73	3,46	4,77	3,49	2,00	2,76	2,01	1,38	1,01	0,73
Pat.I	2,24	10,63	19,98	12,66	4,74	8,90	5,64	1,88	1,19	0,63
Pat.K	1,72	3,13	4,85	3,31	1,82	2,82	1,92	1,55	1,06	0,68
Pat.L	2,22	4,14	11,01	6,11	1,87	4,97	2,75	2,66	1,47	0,55
Pat.M	1,95	3,33	5,71	3,87	1,71	2,94	1,99	1,72	1,17	0,68
Referenz-Wert	2,07	3,83	7,43	4,73	1,67	2,95	1,85	1,94	1,24	0,64
Werte nach doppelter Verhältnisbildung										
Pat.H	1,19	1,10	1,56	1,36	0,83	1,07	0,92	1,41	1,23	0,87
Pat.I	0,92	0,36	0,37	0,37	0,35	0,33	0,33	1,03	1,04	1,01
Pat.K	1,14	1,18	1,43	1,33	0,93	1,03	0,94	1,22	1,13	0,93
Pat.L	0,96	0,94	0,68	0,79	0,88	0,58	0,67	0,72	0,84	1,16
Pat.M	1,06	1,15	1,30	1,22	0,98	1,00	0,93	1,13	1,06	0,94

Pat. I zeigt mit der Erniedrigung der Werte 11/A, 11/L, 11/I, h1/A, h1/L und h1/I eine Deletion der Exons 15A, 15L und 15I. Der einzeln erhöhte Wert für 11/L der Pat. H indiziert zwar eine

Deletion von Exon 11, dies ist aber bei sonst unauffälligen Werten unwahrscheinlich. Eine Deletion der Exons 15L und 15I ist bei Pat. L nicht anzunehmen, da nur h1/L und h1/I ausserhalb der Norm liegen, nicht aber 11/I, 11/L, A/L und A/I. Die Pat. K und M zeigen Normwerte.

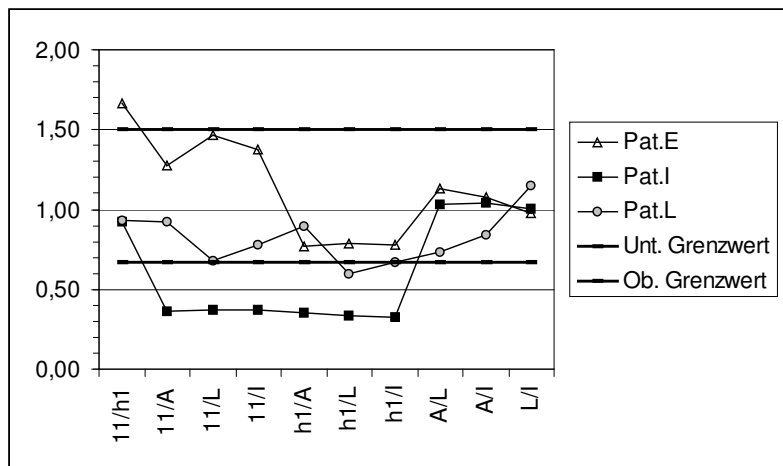


Abb. 33: Die Graphik stellt die Werte der Pat. E, I und L dar. Alle drei Kurven verlassen den Normbereich. Die X-Achse zeigt die Exonverhältnisse an. Allerdings ist nur bei Pat. I eine Deletion der Exons 15A, 15L und 15I nachzuziehen durch erniedrigte Werte von 11/A, 11/L, 11/I, h1/A, h1/L und h1/I. Die pathologischen Werte von Pat. E und L ergeben keine eindeutige Deletion.

4.4.2.4. Multiplexansatz 2Mh1T

1. Ansatz nach Zyklus 22

Exon Verhältnisse						
Patienten	2/M	2/h1	2/T	M/h1	M/T	h1/T
Pat.A	1,29	1,49	1,91	1,15	1,48	1,28
Pat.B	1,37	1,56	2,14	1,14	1,56	1,37
Pat.C	1,26	1,34	1,91	1,07	1,52	1,42
Pat.D	1,08	0,74	1,76	0,69	1,62	2,37
Pat.E	1,22	0,84	1,99	0,68	1,63	2,38
Pat.F	1,21	1,27	1,99	1,05	1,64	1,57
Pat.G	0,58	0,86	0,80	1,48	1,37	0,93
Pat.M	1,23	1,60	2,06	1,30	1,68	1,29
Referenz-Wert	1,25	1,37	2,07	1,03	1,57	1,48
Werte nach doppelter Verhältnisbildung						
Pat.A	0,97	0,92	1,08	0,89	1,06	1,15
Pat.B	0,91	0,88	0,97	0,90	1,01	1,08
Pat.C	0,99	1,02	1,09	0,96	1,04	1,04
Pat.D	1,15	1,84	1,18	1,50	0,97	0,63
Pat.E	1,02	1,64	1,04	1,51	0,96	0,62
Pat.F	1,03	1,08	1,04	0,98	0,96	0,94
Pat.G	2,24	1,68	2,82	0,71	1,20	1,43
Pat.M	1,02	0,85	1,00	0,79	0,94	1,15

Eine Deletion der Exons 2, 15M und 15T ist bei den Pat. D und E festzustellen. Beide zeigen erhöhte Werte für 2/h1 und M/h1, sowie erniedrigte für h1/T. Die bei Pat. G erhöhten Werte für 2/M, 2/h1, 2/T und h1/T definieren eine Deletion des Exon 2. Die Werte der Pat. A, B, C, F und liegen im Normbereich.

2. Ansatz nach Zyklus 22

Exon Verhältnisse						
Patienten	2/M	2/h1	2/T	M/h1	M/T	h1/T
Pat.H	2,80	2,79	4,12	1,00	1,47	1,48
Pat.I	2,81	1,58	3,38	0,56	1,20	2,14
Pat.K	1,25	1,64	1,78	1,31	1,42	1,08
Pat.L	1,24	1,57	1,77	1,26	1,42	1,12
Referenz-Wert	1,24	1,68	1,77	1,26	1,42	1,12
Werte nach doppelter Verhältnisbildung						
Pat.H	0,50	0,71	0,47	1,32	0,94	0,62
Pat.I	0,44	1,06	0,52	2,25	1,18	0,46
Pat.K	0,99	1,02	1,00	0,96	1,00	0,91
Pat.L	1,00	1,07	1,00	1,00	1,00	0,88

Hier liegt eine Deletion der Exons 15M und 15T bei Pat. I vor, angezeigt durch erniedrigte Werte von 2/M, 2/T und h1/T sowie die Erhöhung von M/h1. Die Kombination der erniedrigten Werte von 2/M, 2/T und h1/T bei Pat. H deutet auch auf eine Deletion der Exons 15M und 15T hin. Allerdings fehlt für eine unstrittige Deletion ein pathologischer Wert für M/h1. Die Pat. K und L zeigen Normwerte.

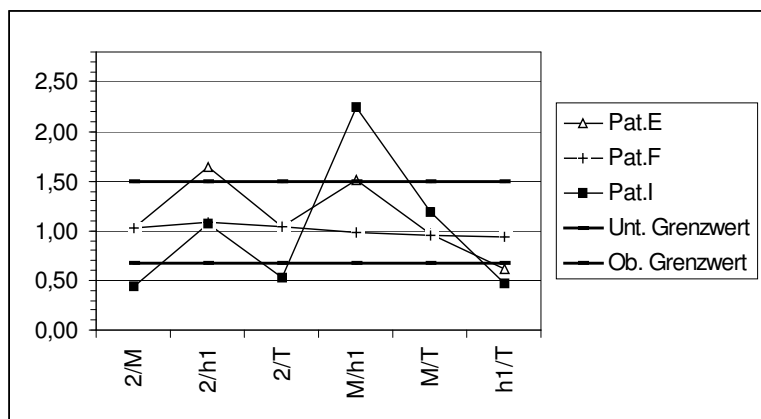


Abb. 34: Angezeigt werden die Werte der Pat. E, F und I. Gut zu erkennen ist neben den aus dem Normbereich fallenden Werten der Pat. E und I die im Normbereich sich befindende Linie von Pat. F. Eine Deletion der Exons 2, 15M und 15T ist bei Pat. E festzustellen (erhöhte Werte für 2/h1 und M/h1, sowie erniedrigte für h1/T). Pat. I zeigt eine Deletion der Exons 15M und T durch erniedrigte Werte von 2/M, 2/T und h1/T an. Die X-Achse zeigt die Exonverhältnisse an.

1. Ansatz nach 28 Zyklen

Exon Verhältnisse						
Patienten	2/M	2/h1	2/T	M/h1	M/T	h1/T
Pat.A	0,23	0,47	0,50	2,07	2,20	1,06
Pat.B	0,31	0,67	0,68	2,18	2,22	1,02
Pat.C	0,32	0,64	0,69	1,98	2,14	1,08
Pat.D	0,28	0,35	0,60	1,26	2,14	1,71
Pat.E	0,20	0,23	0,45	1,16	2,29	1,98
Pat.F	0,26	0,53	0,60	2,05	2,34	1,14
Pat.G	0,18	0,38	0,38	2,12	2,11	1,00
Referenz-Wert	0,26	0,52	0,55	2,21	2,15	1,06
Werte nach doppelter Verhältnisbildung						
Pat.A	1,14	1,11	1,11	1,07	0,98	1,00
Pat.B	0,84	0,77	0,81	1,01	0,97	1,05
Pat.C	0,81	0,82	0,80	1,12	1,00	0,98
Pat.D	0,99	1,56	0,97	1,74	0,99	0,62
Pat.E	1,32	2,29	1,23	1,91	0,94	0,54
Pat.F	1,01	0,99	0,92	1,08	0,92	0,93
Pat.G	1,44	1,36	1,45	1,04	1,02	1,07

Bei Pat. D und E liegt eine Deletion der Exons 2, 15M und 15T vor (2/h1 und M/h1 erhöht, sowie h1/T erniedrigt). Die übrigen Werte liegen im Normbereich.

2. Ansatz nach 28 Zyklen

Exon Verhältnisse						
Patienten	2/M	2/h1	2/T	M/h1	M/T	h1/T
Pat.H	0,81	1,14	1,76	1,41	2,18	1,55
Pat.I	0,64	0,74	1,46	1,15	2,29	1,99
Pat.K	0,33	0,66	0,68	2,00	2,06	1,03
Pat.L	0,32	0,64	0,72	2,00	2,24	1,12
Pat.M	0,29	0,65	0,67	2,21	2,26	1,02
Referenz-Wert	0,36	0,74	0,76	2,30	2,15	0,86
Werte nach doppelter Verhältnisbildung						
Pat.H	0,48	0,68	0,47	1,56	0,98	0,58
Pat.I	0,56	1,01	0,52	1,99	0,94	0,43
Pat.K	1,08	1,13	1,13	1,15	1,04	0,83
Pat.L	1,11	1,16	1,07	1,15	0,96	0,77
Pat.M	1,21	1,14	1,15	1,04	0,95	0,84

Die Kombination der erhöhten (M/h1) und erniedrigten (2/M, 2/h1, 2/T, h1/T) Werte für die Pat. H und I ergeben eine Deletion der Exons 15M und 15T. Die Werte der Pat. K, L und M liegen im Normbereich.

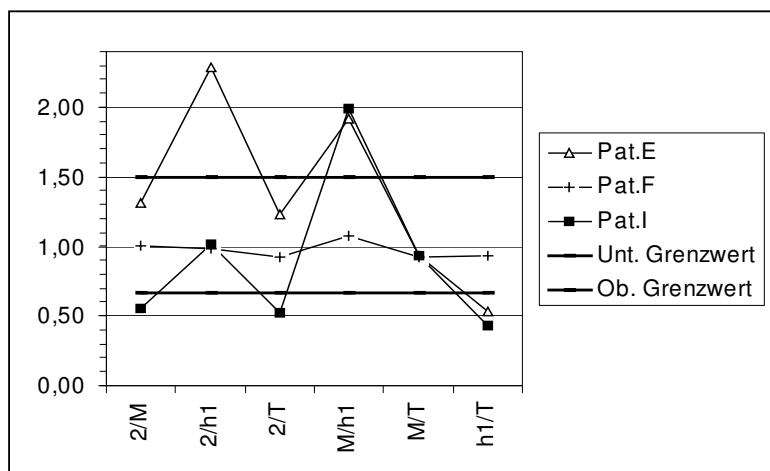


Abb. 35: Dargestellt sind die Werte der Pat. E, F und I. Die Kurven der Pat. E und I zeigen durch das Verlassen des Normbereiches Deletionen an. Eine Deletion der Exons 2, 15M und 15T ist bei Pat. E festzustellen (erhöhte Werte für 2/h1 und M/h1, sowie erniedrigte für h1/T). Pat. I zeigt eine Deletion der Exons 15M und T durch erniedrigte Werte von 2/M, 2/T und h1/T an. Die X-Achse zeigt die Exonverhältnisse an.

4.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgenden Tabellen zeigen zusammengefasst die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse. Für jeden Patienten wurde für jeweils den frühen und späten Zyklus die Deletionen der einzelnen Exons eingetragen. Bei nicht eindeutigen Deletionen wurde ein Fragezeichen eingetragen. In Zusammenschau der vier Multiplex-Ansätze konnten die zusammenhängenden Deletionen über das ganze Gen erkannt werden (letzte Spalte der Tabelle).

Früher Zyklus (22 bzw. 24)

Exons	2	4	5	7	11	14	15A	15D	15H	15I	15J	15L	15M	15T	Deletionen
Patienten															
Pat.A					?										o.B.
Pat.B					?										o.B.
Pat.C							?								o.B.
Pat.D	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	delAPC
Pat.E	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	delAPC
Pat.F															o.B.
Pat.G	Del.					Del.									del2/14
Pat.H					?	Del.	?	Del.	Del.		Del.		Del.?	Del.?	del14/15?
Pat.I						Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	?	Del.	Del.	Del.	del14/15
Pat.K		Dupl.	Dupl.			Dupl.									Dupl.4-14?
Pat.L															o.B.
Pat.M															o.B.

Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse nach 22 bzw. 24 Zyklen

Später Zyklus (28 bzw. 30)

Exons	2	4	5	7	11	14	15A	15D	15H	15I	15J	15L	15M	15T	Deletionen
Patienten															
Pat.A															o.B.
Pat.B															o.B.
Pat.C															o.B.
Pat.D	Del.	Del.	Del.	Del.	?	Del.	Del.?	Del.	Del.	Del.?	Del.	Del.?	Del.	Del.	delAPC
Pat.E	Del.	Del.	Del.	Del.	?	Del.		Del.	Del.		Del.		Del.	Del.	delAPC?
Pat.F															o.B.
Pat.G						Del.				?		?			del14
Pat.H					?	Del.		Del.	Del.		Del.		Del.	Del.	del14/15?
Pat.I						Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	del14/15
Pat.K		Dupl.	Dupl.			Dupl.									Dupl.4-14?
Pat.L										?		?			o.B.
Pat.M															o.B.

Tab. 8: Zusammenfassung der Ergebnisse nach 28 bzw. 30 Zyklen

5. Diskussion

Die autosomal-dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) umfasst ca. 1% aller kolorektalen Karzinomerkrankungen mit einer Häufigkeit von ca. 1:8.000 in unserer Bevölkerung. Bei ca. 75% der betroffenen Familien lässt sich eine positive Familienanamnese erheben; die übrigen Erkrankungsfälle werden durch neu aufgetretene genetische Veränderungen (Neumutationen) verursacht.

Mit den heute verfügbaren Methoden kann bei etwa 70-80% der Betroffenen, in denen aufgrund genealogischer und klinischer Kriterien FAP eindeutig vorliegt, die zu Grunde liegende Mutation im APC-Gen gefunden werden. Als Ursache für die Erkrankung der restlichen 20-30% bestehen mehrere Möglichkeiten. Zum einen könnten Steuerungselemente des APC-Gens oder auch andere Gene mutiert sein, deren Produkte mit demjenigen des APC-Gens im Wnt-Signaltransduktionsweg zusammenwirken, zum anderen könnte es an der Methodik mangeln die genetischen Veränderung im APC-Gen aufzuspüren. Üblicherweise werden bei den bisher angewandten Methoden zur Erfassung von Veränderungen in einem Gen zwar Punktmutationen und kleine Deletionen erkannt, nicht aber Deletionen ganzer Exons. Aber gerade bei großen Genen (z.B. Dystrophin-Gen) kommt es häufig zu Deletionen ganzer Exons (Yau et al., 1996). Durch monoallelische Mutationsanalyse (MAMA) konnte bei sieben von neun FAP-Patienten, bei denen mit der herkömmlichen Methodik keine Mutation gefunden wurde, eine reduzierte Expression eines Allels nachgewiesen werden (Laken et al., 1999). Dies legt den Schluss nahe, dass es Veränderungen des APC-Gens geben muss, die bisher noch nicht erkannt werden konnten. In der Literatur wurde bisher wenig über genomische Rearrangements oder Exondeletionen veröffentlicht (s. Tab. 13). Die Identifizierung von genomischen Veränderungen bei 4 von 30 FAP-Familien (Su et al., 2000) lässt aber vermuten, dass Rearrangements im APC-Gen nicht selten sind.

Aus diesen Überlegungen entstand das Projekt, ein Deletionsscreening für ganze Exons am APC-Gen zu etablieren.

5.1. Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ist eine Variante der normalen (Uniplex-)PCR, bei der zwei oder mehr Zielsequenzen durch mehr als ein Primerpaar amplifiziert werden. Sie wurde seit ihrer Erst-

beschreibung 1988 (Chamberlain et al., 1988) erfolgreich in vielen Bereichen – Analyse von Gendelektionen, Mutationen, Polymorphismen (Rithidech et al., 1997), (Shuber et al., 1993), quantitativer Analyse (Zimmermann et al., 1996) und RT-PCR (Crisan, 1994) – eingesetzt. Auch auf dem weiten Feld der infektiösen Erkrankungen hat sich die Multiplex-PCR als wertvoll bei der Identifikation von Viren (Markoulatos et al., 1999), Bakterien (Hendolin et al., 1997) und Parasiten (Harris et al., 1998) erwiesen.

Die Optimierung der Multiplex-PCR wirft verschiedene Schwierigkeiten auf, z. B. schlechte Sensitivität und Spezifität oder präferentielle Amplifikation einer Zielsequenz.

Bei der Zusammenstellung der in dieser Arbeit benutzten Multiplex-Ansätze wurde zunächst auf die Länge der zu amplifizierenden Produkte und die Amplifikationsbedingungen der einzelnen Primer geachtet. Die Längen der Amplifikate mussten sich soweit unterscheiden, dass sie in der HPLC-Analyse als zwei getrennte Signale erschienen (Minimum 40-50bp).

Spezielle Aufmerksamkeit wurde auf das Design der Primer gerichtet. Idealerweise sollten alle Primerpaare in einer Multiplex-PCR in etwa dieselbe Effizienz bei der Amplifikation zeigen. Das wurde durch Primer erreicht, die ähnliche optimale Amplifikationstemperaturen (Primerlänge 18-28bp, GC-Gehalt 45-60%) und untereinander keine Homologien aufwiesen (Brownie et al., 1997), (Henegariu et al., 1997).

Präferentielle Amplifikation einer Zielsequenz zu den anderen Amplifikaten in einer Multiplex-PCR ist ein bekanntes Phänomen. Dafür gibt es mehrere Gründe – z. B. die Beschaffenheit der Sequenz an sich, die flankierenden Sequenzen oder die Bindungsfähigkeit der Primer. Bei diesem Prozess hat die am besten amplifizierte Sequenz eine negative Wirkung auf die Amplifikation der schwächsten Sequenz, was unter anderem auch an der limitierten Verfügbarkeit von Enzym und Nukleotiden liegt (Mutter and Boyton, 1995), (Wagner et al., 1994). Um der präferentiellen Amplifikation entgegenzuwirken, wurden die Primer der verschiedenen Exons in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Von einer initialen Primerkonzentration von 0.2 μ M wurde die Konzentration der „starken“ Primer herabgesetzt und die der „schwachen“ Primer erhöht. Die endgültigen Konzentrationen (0.08-0.3 μ M) variierten erheblich (Markoulatos et al., 2002).

Die Veränderung der Konzentrationen anderer Komponenten, wie Puffer, dNTPs, MgCl₂ und Enzym in Multiplex-PCR im Vergleich zur eingesetzten Konzentration in Uniplex-PCR, zeigte keine verbesserte Sensitivität und/oder Spezifität.

Die Annealing-Temperatur war ein weiterer wichtiger Parameter. Obwohl viele Primer alleine bei einer Temperatur von 56-60°C eine optimale Amplifikation aufwiesen, zeigte sich, dass bei

Multiplex-PCR eine Temperatur, die 4-8°C unter der spezifischen Temperatur lag, die besten Ergebnisse erzielte (Markoulatos et al., 2002).

Durch Einsetzen einer Hot-Start-Polymerase konnten zusätzlich nicht-spezifische Reaktionen, die durch Primer-Annealing bei niedrigen Temperaturen (4-25°C) entstehen, eliminiert werden. Nachdem die Multiplex-Gruppen zusammengestellt waren, wurde in einem ersten Probelauf festgestellt, ob alle Produkte amplifiziert wurden. Durch Längenvergleich mit den jeweiligen Uniplex-PCRs der einzelnen Exons auf einem Agarose-Gel und durch HPLC-Analyse konnte festgestellt werden, dass es sich bei den in den Multiplex-PCRs amplifizierten Produkten tatsächlich, um die gewünschten Amplifikate gehandelt hat.

Während es theoretisch kein Limit für die Anzahl der gleichzeitig amplifizierten Sequenzen gibt, begrenzen aber die Schwierigkeiten bei der Etablierung der PCR-Bedingungen die Anzahl der Zielsequenzen. Bisher wurde von einer Multiplex-Reaktion mit 25 menschlichen Sequenzen (DMD) berichtet (Yau et al., 1996). In dieser Arbeit haben wir uns auf maximal fünf PCR-Fragmente pro Ansatz beschränkt.

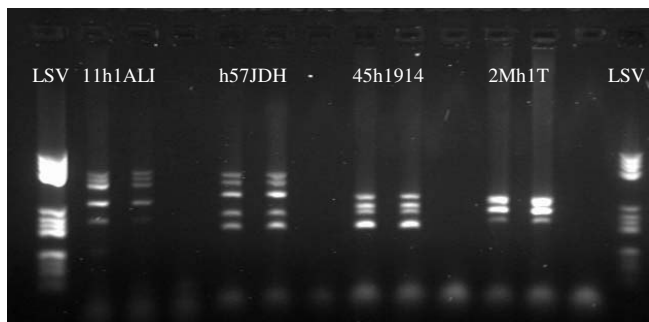


Abb. 36: Darstellung der Multiplex-Ansätze auf einem Agarose-Gel. Jeweils zweimal derselbe Ansatz, dann eine leere Spur. 2Mh1T ist noch nicht vollständig aufgetrennt, daher sind keine vier getrennten Banden sichtbar. In der ersten und letzten Spur wurde der Längenstandard LSV zur Orientierung der Bandenlänge aufgetragen.

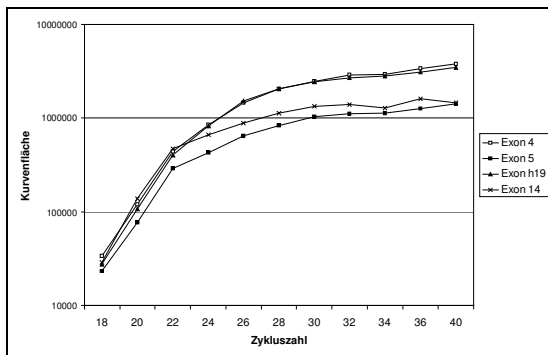
5.2. Die Reaktionskinetik der Multiplex-PCRs

Zur Auswertung des hier etablierten Deletionscreenings war von Bedeutung, dass alle in einem Multiplex-Ansatz amplifizierten Exons der PCR-typischen Amplifikationskurve mit exponentieller Phase und Sättigungsphase folgten und dass die Kurven der einzelnen Exons nicht zu sehr voneinander abwichen. An den gezeigten Reihen (s. Abb. 37) ist das Erreichen dieses Ziels gut erkennbar. Alle Kurven innerhalb eines Ansatzes liegen innerhalb eines tolerablen Bereiches, d. h. sie amplifizieren im Sinne des zeitlichen Ablaufes der logarithmischen Phase relativ gleichmäßig. Es ist jedoch festzustellen, dass die einzelnen Kurven bei zunehmenden Zyklen immer mehr voneinander abweichen. Anfangs kleine Unterschiede in den Produktmengen werden durch die exponentielle Vervielfältigung in der PCR größer und die Ressourcen

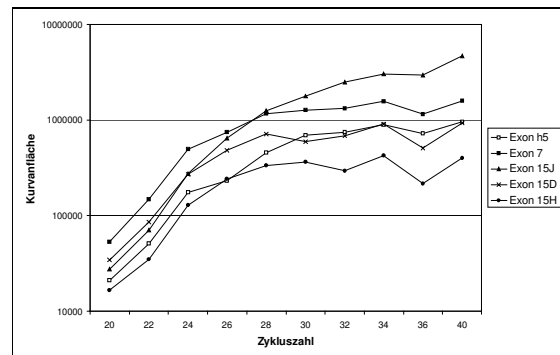
(dNTPs und Enzym) werden mit zunehmender Zykluszahl immer weniger, so dass in der Sättigungsphase die Reaktion mit höherer Amplifikationsrate die noch vorhandenen Ressourcen den Reaktionen mit niedrigerer Amplifikationsrate entziehen.

Bei den Ansätzen 45h1914 und 2Mh1T (s. Abb. 37) ist eine einheitliche exponentielle Phase und Sättigungsphase der unterschiedlichen Exons erkennbar. Der Ansatz h57JDH zeigt eine größere Abweichung der einzelnen Kurven, dennoch kann für jede Kurve der typische Reaktionsverlauf nachvollzogen werden und auch der Übergang von der exponentiellen Phase in die Sättigungsphase liegt tolerabel bei allen Exons zwischen dem 24. und 28. Zyklus. Der Ansatz 11h1ALI weist die größte Diskrepanz zwischen den Exonkurven auf. In der exponentiellen Phase liegen die Amplifikationsmengen noch eng beieinander. In der Sättigungsphase differieren die Kurvenverläufe der einzelnen Amplifikate aber erheblich. Bei zwei Kurven ist sogar ein Produktmengenabfall zu beobachten. Eine Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die zur Verfügung stehenden Enzym- und dNTP-Moleküle von Reaktionen mit höherer Amplifikationsrate (Exon 11 und Kontrollaxon h1) weggefangen und verbraucht werden und so die Menge der schon wieder abgebauten Produkte in diesen Reaktionen höher ist als die der neu amplifizierten.

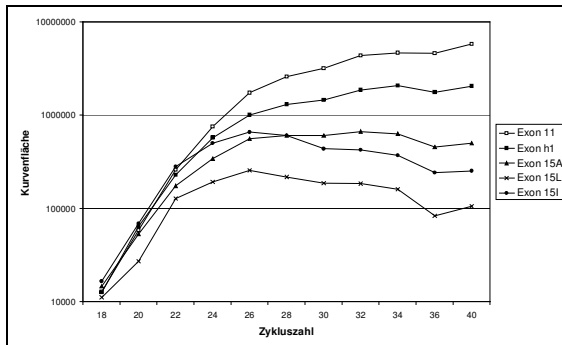
A: Reihe des Ansatzes 45h1914



B: Reihe des Ansatzes h57JDH



C: Reihe des Ansatzes 11h1ALI



D: Reihe des Ansatzes 2Mh1T

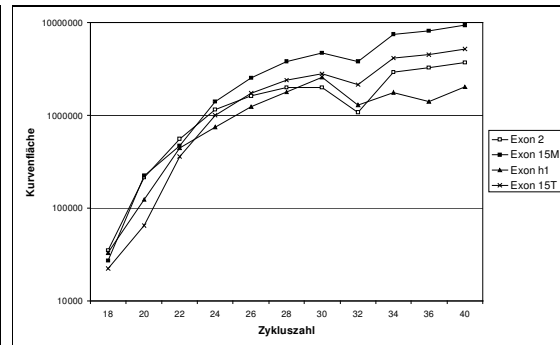


Abb. 37: Alle Reihen der vier Multiplex-Ansätze (A) 45h1914, (B) h57JDH, (C) 11h1ALI, (D) 2Mh1T

Nach Auswertung der Reaktionskinetik wurden für jeden Ansatz die Zykluszahlen festgesetzt nach denen die Analyse erfolgen sollte. Nach dem frühen Zyklus sollten sich alle Reaktionen noch in der exponentiellen Phase befinden und nach dem späten Zyklus die Sättigungsphase eingetreten sein. Für die einzelnen Ansätze bedeutete dies Analysen nach folgenden Zyklen (s. Kap.4.2):

- Für den Ansatz 45h1914 erfolgte die Analyse nach 22 und 30 Zyklen, da sich nach 22 Zyklen alle vier Exons noch in der exponentiellen Phase befanden und nach 30 Zyklen der Übergang in die Sättigungsphase von allen Exons abgeschlossen war.
- Für den Ansatz h57JDH erfolgte die Analyse nach 24 und 30 Zyklen. Nach 24 Zyklen ging für die Exons h5, 7, 15D und 15H die exponentielle Phase schon langsam in die Sättigungsphase über. Daher wurde nach 24 Zyklen analysiert. Da für Exon 15J der Übergang in die Sättigungsphase erst etwa bei Zyklus 28 abgeschlossen war, wurde die späte Analyse nach 30 Zyklen durchgeführt.
- Für den Ansatz 11h1ALI erfolgte die Analyse nach 22 und 28 Zyklen, da sich nach 22 Zyklen noch alle fünf Exons in der exponentiellen Phase befanden. Exon 11 war erst nach 26 Zyklen in die Sättigungsphase übergegangen, daher wurde nach 28 Zyklen eine Analyse durchgeführt.
- Für den Ansatz 2Mh1T erfolgte die Analyse nach jeweils 22 und 28 Zyklen. Hier war das Ende der exponentiellen Phase schwierig zu definieren. Nach Zyklus 22 fing für die Exons 2 und h1 die Sättigungsphase an. Die Exons 15M und 15T befanden sich noch bis Zyklus 24 in der exponentiellen Phase. Daher wurde das Deletionsscreening für die Zyklen 22 und 28 etabliert.

Ansatz	Früher Zyklus (exponentiellen Phase)	Später Zyklus (Sättigungsphase)
45h1914	22	30
h57JDH	24	30
11h1ALI	22	28
2Mh1T	22	28

Tab. 9 Übersicht über die Analysezyklen der Multiplex-Ansätze

5.3. HPLC-Analyse

Die Längenanalyse von Nukleinsäurefragmenten wurde bisher meist mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Agarose- und Polyacryl-Gele sind die gebräuchlichsten für die elektrophoretische Auftrennung, die Identifikation und die Reinigung von DNA-Fragmenten. Die Elektrophorese ist aber mit einer begrenzten Möglichkeit zur Automatisierung zeit- und arbeitsinten-

siv. Die Extraktion von einzelnen Banden aus dem Gel ist aufwendig und eine Quantifizierung ist kaum möglich (erheblicher Aufwand mit geringer Aussagekraft).

Das WAVE-DNA-Fragment-Analyse-System bietet gute Bedingungen für eine schnelle und vollständige Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten von 50-2000bp (Hecker et al., 2000). Die untersuchten DNA-Fragmente können durch Flächenintegration quantifiziert und durch Auffangen der Fraktion in einem zusätzlichen Reaktionsröhrchen für weitere Untersuchungen isoliert werden. Die längenabhängige Auftrennung der dsDNA-Fragmente ist sequenzunabhängig und die Retentionszeiten sind reproduzierbar.

Die Analyse von DNA-Fragmenten auf dem WAVE-System ist hochautomatisiert und benötigt nur minimale manuelle Intervention. Die HPLC-Analyse hat über der Gelelektrophorese den Vorteil einer kurzen Analysezeit und einer vollautomatischen Probenanalyse. Die PCR oder auch der Restriktionsverdau kann direkt ohne zusätzliche Präparation injiziert werden. Die Chromatogramme werden bei 260nm und/oder bei der Emissionswellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzmarkers erstellt.

Fluoreszenzmoleküle werden häufig zur Markierung von DNA benutzt. Meist wird ein einzelnes Fluophor an das 5'-Ende eines Primers gebunden. Das führt zu einer einfach markierten Probe. Fluoreszierende Moleküle sind meist aromatische, hydrophobische und organische Moleküle. Die bei HPLC verwendete Säulenmatrix ist ebenfalls hydrophob. Die erhöhte Affinität zwischen Säulenmatrix und fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten führt zu einer verlängerten Retentionszeit der untersuchten Fragmente. Diese Verlängerung der Retentionszeit kann durch einen höheren Prozentsatz an organischer Lösung (z. B. Puffer B) ausgeglichen werden. Während zwar die Retentionszeit durch eine Fluoreszenzmarkierung beeinflusst wird, ist kein Verlust der Auflösung zu verzeichnen.

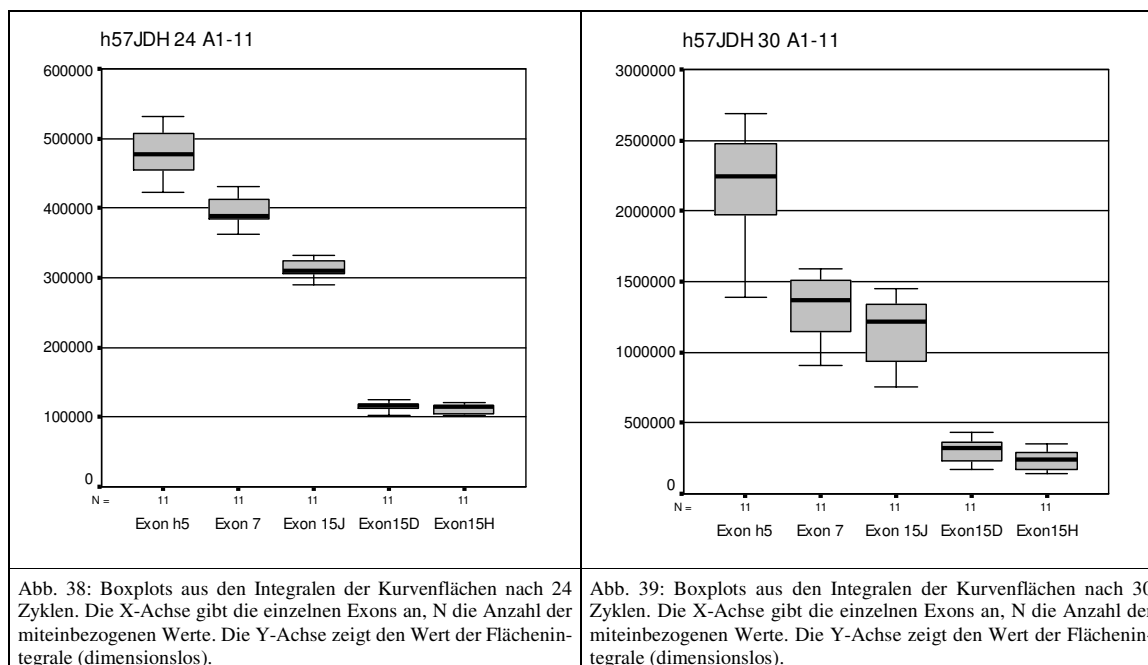
Zur Steigerung der Sensitivität wurden in dieser Arbeit fluoreszenzmarkierte Primer benutzt. Die Ermittlung von Produktmengen durch Fluoreszenzdetektoren zeigte sich sensibler als durch die herkömmliche Detektion der DNA bei 260nm.

5.4. Variation und Normwerteverteilung

5.4.1. Variation innerhalb einer Kontroll-DNA

Absolutwerte

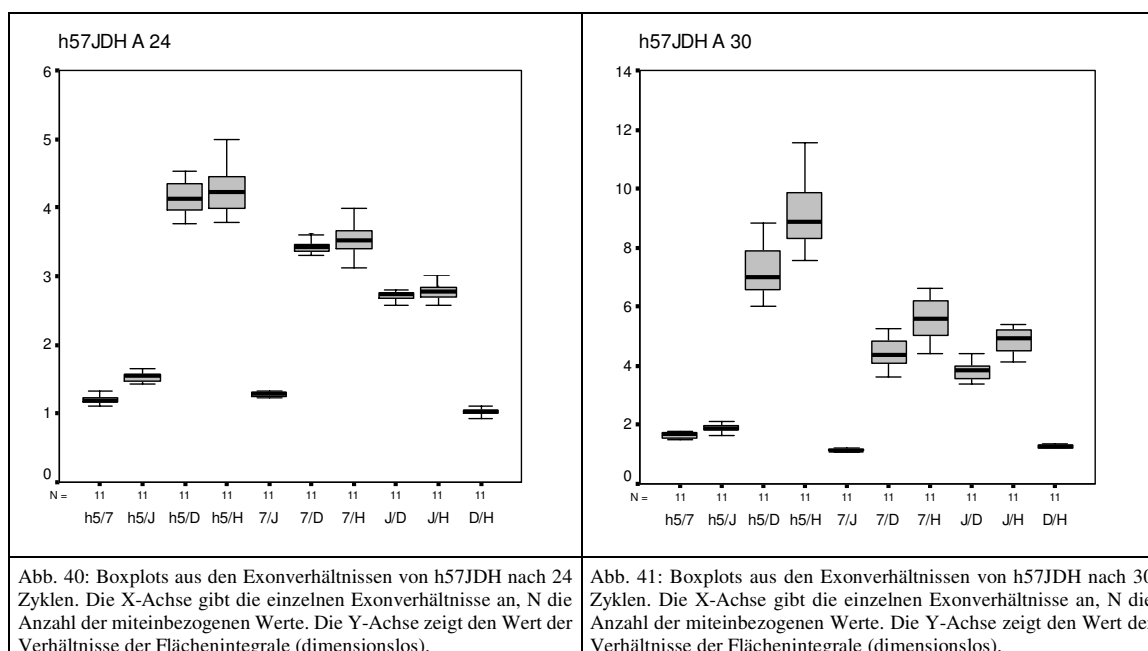
In Kap. 4.3.1 wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eindeutig dargestellt. Nach Auswertung von elf Ansätzen h5JDH mit elfmal dergleichen DNA sind die Variationen der Absolutwerte bei allen Exons nach 24 Zyklen relativ klein (s. Abb. 38). Allerdings kann festgestellt werden, dass mit ansteigender Menge des PCR-Produkt (größer werdende Fläche in der HPLC-Analyse) die Variationsbreite zunimmt. Die Erklärung liegt in der Reaktionskinetik der PCR. Bei Exons, die von Anfang an eine höhere Amplifikationsrate aufweisen, wirkt sich durch die exponentielle Produktvermehrung eine leicht unterschiedliche DNA-Ausgangsmenge nach mehreren Zyklen auf die Variationsbreite mehr aus als bei Exons mit kleiner Amplifikationsrate. Daher ist bei hoher Amplifikationsrate nach vielen Zyklen proportional mehr Produkt vorhanden als bei kleiner Amplifikationsrate.



Nach 30 Zyklen ist die Variationsbreite der Absolutwerte eindeutig größer (s. Abb. 39). Schon leicht unterschiedliche DNA-Ausgangsmengen bewirken bei steigender Zykluszahl eine immer größer werdende Diskrepanz der Produktmenge. Auch hier ist eine größere Variationsbreite bei Exons mit hoher Amplifikationsrate (Exon h5) im Vergleich zu Exons mit niedriger Amplifikationsrate (Exons 15D und 15H) zu beobachten.

Exonverhältnisse

Bei Betrachtung der Exonverhältnisse fallen für die Zykluszahlen 24 und 30 geringe Variationsbreiten auf (s. Abb. 40/41). Vergleichsweise größere Variationsbreiten werden bei den Verhältnissen beobachtet, die aus Exons gebildet werden, deren Absolutwerte (Amplifikationsrate) sehr unterschiedlich ausfielen – z. B. das Verhältnis aus Exon h5 mit hohen Absolutwerten (großer Amplifikationsrate) und Exon 15D mit kleinen Absolutwerten (geringer Amplifikationsrate). Sehr kleine Variationsbreiten traten dagegen bei Exons auf, deren Absolutwerte nahe beieinander lagen, also deren Amplifikationsrate vergleichbar war – z. B. das Verhältnis aus Exon 7 und Exon 15J. Daraus ist zu schliessen, dass je kleiner die Unterschiede in der Amplifikationsrate der einzelnen Exons sind, desto geringer ist die Variation bei Bildung der Exonverhältnisse.

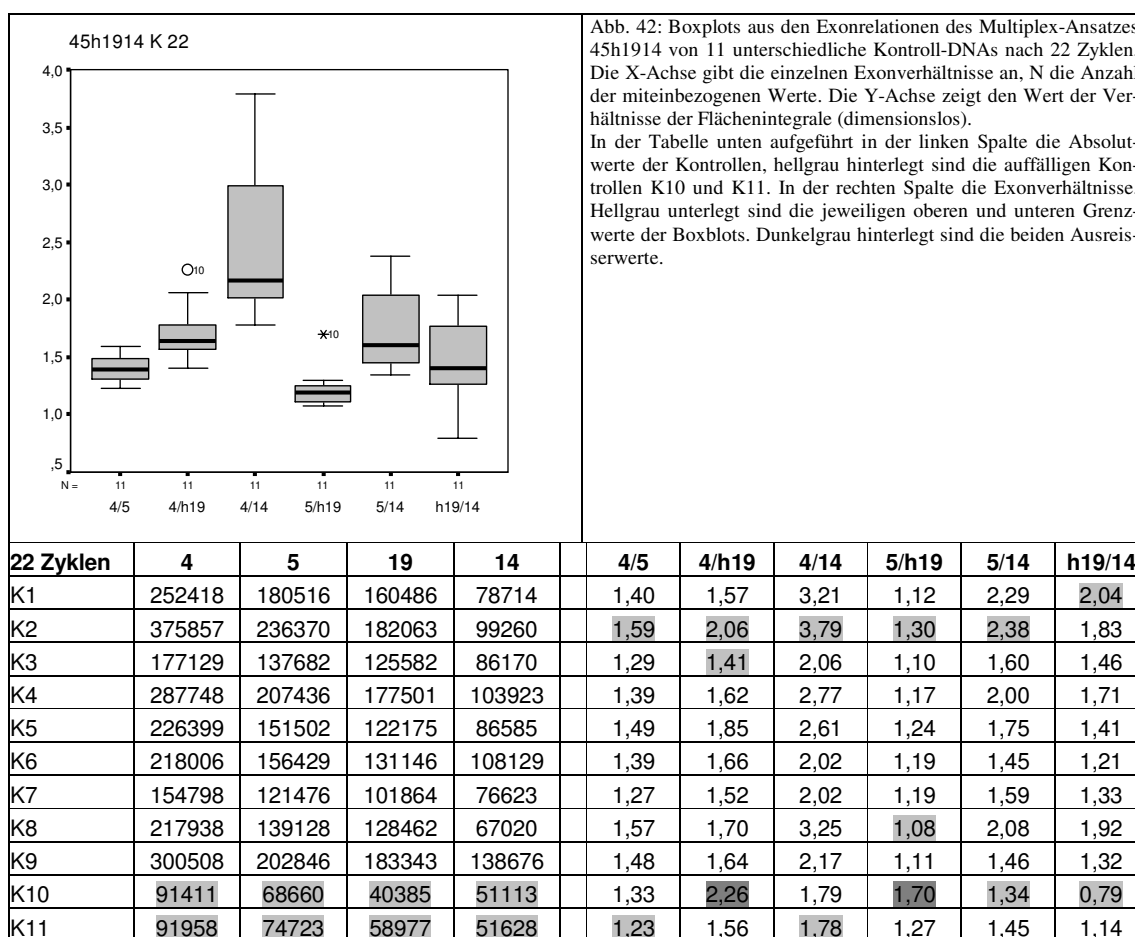


5.4.2. Variation zwischen verschiedenen Kontroll-DNAs

Um einen Überblick über die Spannweite der Werte aus den Exonverhältnissen einer Kontrollgruppe zu erlangen, wurden DNAs von elf gesunden Kontrollpersonen in einem Multiplex-Ansatz (45h1914) analysiert (Abb. 42/43). Nach 22 Zyklen zeigte sich eine erhebliche Variationsbreite für drei Exonverhältnisse (4/14, 5/14 und h19/14). Bei den Absolutwerten fiel auf, dass bei allen Exons von zwei Kontrollen (K10 und K11) sehr viel weniger Produkt erfasst worden war als bei den anderen Kontrollen. Bei Bestimmung der Exonverhältnisse bildeten die Verhältnisse dieser beiden Kontrollen in den Exonverhältnissen 4/5, 4/14, 5/14 und h19/14 den

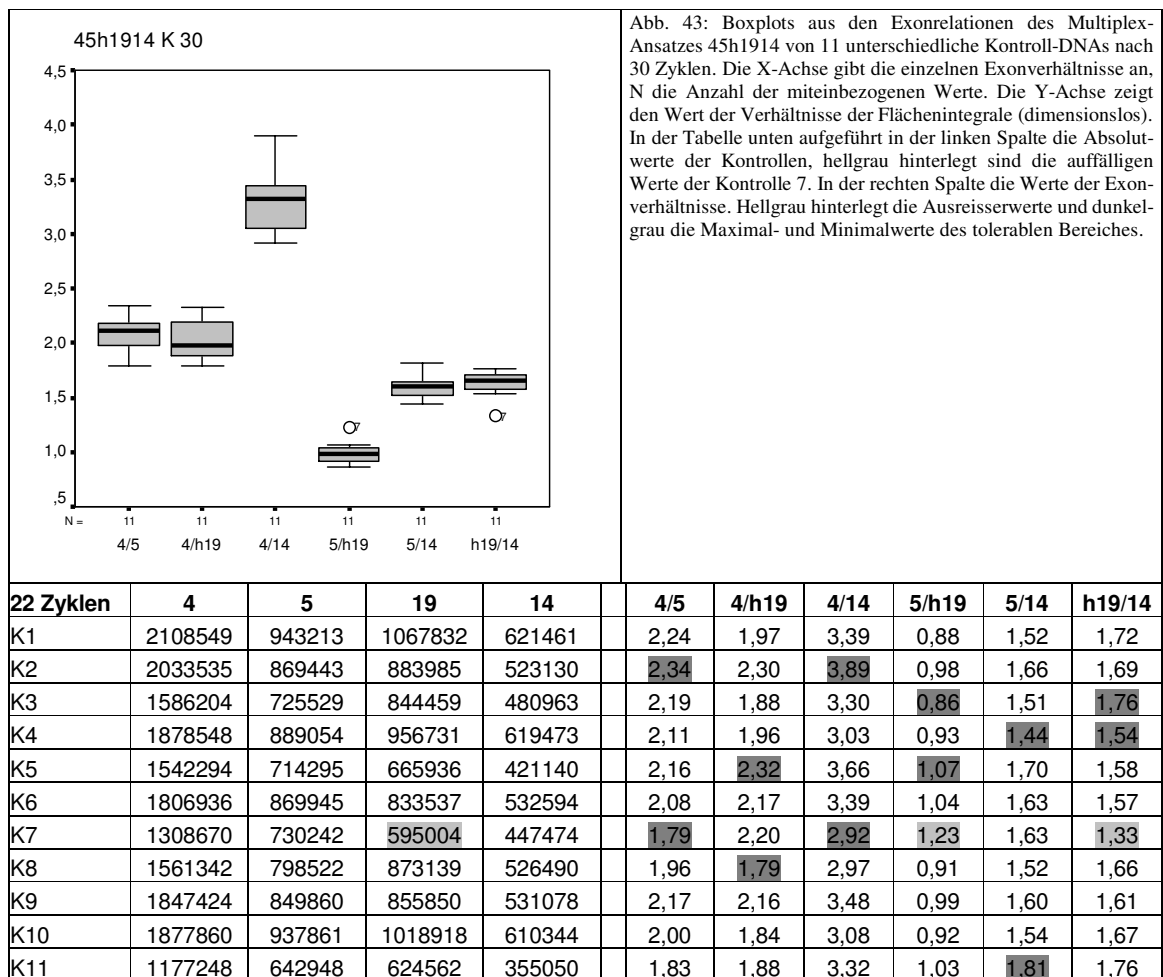
unteren Grenzwert oder fielen sogar aus dem Boxplot raus, da sie um mehr als das 1.5fache der Box-Länge vom 75. Perzentil abwichen (4/h19, 5/h19). Die Ursache für die niedrigen Produktmengen in diesen beiden Kontrollen war möglicherweise eine niedrigere DNA-Ausgangsmenge durch Pipettierungenauigkeit. Des Weiteren war in den Absolutwerten des Exon 14 eine größere Schwankungsbreite zu verzeichnen als bei den anderen Exons. Möglicherweise ist dies durch den teilweise schon vollzogenen Übergang in die Sättigungsphase von Exon 14 bedingt. Diese beiden Umstände erklären die große Schwankungsbreite der Verhältnisse 4/14, 5/14 und h19/14 (s. Abb. 37).

Bei der Auswertung der für das Deletionsscreening erhobenen Werte ist es daher bedeutsam, dass sich die Absolutwerte der Patienten und der Kontrollen nicht all zu sehr unterscheiden.



Nach 30 Zyklen stellen sich die Variationsbreiten relativ gering dar (Abb. 43). Die Absolutwerte sind bei allen Kontrollen in allen Exons vergleichbar. Die Kontrolle K7 stellt sich in zwei Verhältnissen (5/h19 und h19/14) als Ausreißer dar. Eine größere Abweichung der Absolutwerte ist in keinem Exon festzustellen, allerdings ist der Absolutwert von Exon h19 im Vergleich zu den anderen Kontrollen verhältnismäßig klein. An diesem Beispiel ist gut zu erken-

nen wie wichtig es ist, dass alle Exonverhältnisse an denen ein Exon beteiligt ist auf ein Abweichen von den Grenzwerten hin zu untersuchen. Erst wenn alle Verhältnisse ausgewertet und in Zusammenschau schlüssig eine Deletion ergeben, ist diese als eindeutig anzunehmen.



Bei ähnlichen Absolutwerten der Kontrollen und der Patienten (Kontrollexon ist dabei entscheidend, alle anderen Exons könnten deletiert sein) kann von einer relativ geringen Schwankungsbreite der Exonverhältnisse ausgegangen werden.

5.5. Deletionscreening für FAP-Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative vergleichende Multiplex-Dosis-Analyse zur Erkennung veränderter Kopienanzahl im APC-Gen etabliert. Bei dieser Methode wurde durch Produktmengenvergleich von Patientenexons untereinander und im Vergleich mit einem Kontrollexon ein Ungleichgewicht festgestellt und so Deletionen ganzer Exons oder des gesamten APC-Gens erkannt. Werden alle Exons eines Genes untersucht, können die Endpunkte der De-

letionen und deren Wirkung auf den Leserahmen identifiziert und möglicherweise eine Aussage über den Phänotyp gemacht werden.

Durch die oben beschriebenen Vorversuche konnten stabile Bedingungen für die Etablierung eines Deletionsscreenings geschaffen werden. Die Ergebnisse sind reproduzierbar und die Abweichungen innerhalb einer Kontrollgruppe sind bei standardisierten Verhältnissen tolerabel. Je Multiplex-Ansatz wurden die zu untersuchenden Patienten mit mind. fünf Kontrollen (zur Bestimmung des Referenzwertes) nach jeweils zwei verschiedenen Zyklenanzahlen analysiert. Die Bedingungen für die PCR und die HPLC-Analyse waren für jeden Ansatz standardisiert (s. Kap. 8.2. und 8.3.)

Die Analyse der erhobenen Werte folgte einem festgelegten Schema. Zunächst wurden bei jedem Patienten $(\text{ExonA}/\text{ExonB})_P$ und jeder Kontrolle $(\text{ExonA}/\text{ExonB})_K$ Verhältnisse der Exons gebildet. Für jedes Exonverhältnis wurde ein Referenzwert aus den Exonverhältnissen der Kontrollen ermittelt. Als Referenzwert für ein Exonverhältnis wurde der Wert bestimmt, der den Median für dieses Exonverhältnis in der Kontrollgruppe gebildet hatte. Die Exonverhältnisse der Patienten $(\text{ExonA}/\text{ExonB})_P$ wurden wiederum mit dem spezifischen Referenzwert $(\text{ExonA}/\text{ExonB})_K$ ins Verhältnis gesetzt $((\text{ExonA}/\text{ExonB})_K / (\text{ExonA}/\text{ExonB})_P)$.

Arbeitsschritte der Auswertung

1. Integral der Flächen unter den Kurven erfassen (z. B. Exon 4, 5, h19, 14)
2. Verhältnisse untereinander bilden (z. B. $4/5$, $4/h19$, $4/h14$, $5/h19$, $5/14$, $h19/14$)
3. Referenzwert für jedes Verhältnis bestimmen (Median aus der Kontrollgruppe)
4. Doppelverhältnisbildung (z. B. $(4/5)_{\text{Kontrolle}} / (4/5)_{\text{Patient}}$)

Durch die doppelte Verhältnisbildung wurde die Voraussetzung für eine einheitliche Festlegung der Grenzwerte geschaffen, da dadurch Schwankungen der durchschnittlichen Amplifikationsrate zwischen den Reaktionsröhrchen (z.B. mehr dNTPs oder Enzym in einem Reaktionsgefäß) ausgeglichen werden.

Die Festlegung der Grenzwerte für den Normbereich dieser doppelten Verhältnisbildung stütze sich auf folgende Überlegungen und empirische Erfahrungen. Theoretisch wäre bei zwei vorliegenden Kopien des untersuchten Gens – in diesem Fall APC – nach doppelter Verhältnisbildung der Wert 1 zu erwarten, dementsprechend bei einer Duplikation oder Deletion eines Exons der Wert 2 bzw. 0,5, je nachdem ob sich das deletierte bzw. duplizierte Exon im Zähler oder Nenner befand. Da die Exonamplifikationen aber wie oben beschrieben bestimmten Schwankungen unterliegen, sind diese Grenzen zu streng, um verwertbare Ergebnisse zu

erhalten. Wichtig bei der Festlegung der Grenzwerte war, dass der Normbereich symmetrisch um 1 angelegt wurde (wie 0,5 (1/2) und 2 (2/1) symmetrisch um 1 liegen). Zur Festsetzung der Grenzwerte in dieser Arbeit (1,5 und 0,67, entsprechend 3/2 und 2/3) führte die Annahme, dass von einer Deletion bzw. Duplikation gesprochen werden kann, wenn ein Exon zu einem anderen in mindestens der 1,5-fachen Menge vorliegt.

$$(\text{ExonA/ExonB})_{\text{K}}/(\text{ExonA/ExonB})_{\text{P}} < 0,67 \rightarrow \text{Deletion von Exon B}_{\text{P}} \text{ oder Duplikation von Exon A}_{\text{P}}$$

$$(\text{ExonA/ExonB})_{\text{K}}/(\text{ExonA/ExonB})_{\text{P}} > 1,5 \rightarrow \text{Deletion von Exon A}_{\text{P}} \text{ oder Duplikation von Exon B}_{\text{P}}$$

Je nachdem wie die Verhältnisse gebildet werden, also welches Exon im Nenner oder im Zähler steht, muss der erhaltene Wert interpretiert werden. Werte $< 0,67$ sprechen für eine Deletion des Exons im Nenner, Werte $> 1,5$ für eine Deletion des Exons im Zähler.

Durch die Bildung aller möglichen Exonverhältnisse innerhalb eines Ansatzes und nicht nur die Bildung der Verhältnisse zwischen den APC-Exons und des Kontrollexons, wurde eine Deletion immer mehrfach bestätigt. Denn bei einer Deletion eines Exons ist nicht nur der Wert im Vergleich mit dem Kontrollaxon auffällig, sondern auch die Werte im Vergleich mit den anderen Exons des APC-Gens. Andererseits müssen, wenn zwei oder mehrere Exons deletiert sind, die Werte zwischen den deletierten Exons im Normbereich liegen, da diese wiederum in der gleichen Kopienanzahl vorliegen. Durch dieses Verfahren können falsch positive Werte schnell erkannt werden.

Bei allen untersuchten DNAs handelt es sich um Proben aus Blut oder Gewebe von Patienten mit der klinischen Diagnose einer FAP, bei denen mit herkömmlichen Methoden keine Mutation im APC-Gen gefunden werden konnte.

Die Ergebnisse wurden für die zwei untersuchten Zyklen getrennt zusammengefasst.

Früher Zyklus (22 bzw. 24; exponentielle Phase)

Exons	2	4	5	7	11	14	15A	15D	15H	15I	15J	15L	15M	15T	Deletionen
Pat.A					?										o.B.
Pat.B					?										o.B.
Pat.C							?								o.B.
Pat.D	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	delAPC
Pat.E	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	delAPC
Pat.F															o.B.
Pat.G	Del.					Del.									del2/14
Pat.H					?	Del.	?	Del.	Del.		Del.		Del.?	Del.?	del14/15?
Pat.I						Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	?	Del.	Del.	Del.	del14/15
Pat.K		Dupl.	Dupl.			Dupl.									Dupl.4-14?
Pat.L															o.B.
Pat.M															o.B.

Tab. 10: Zusammenfassung der Ergebnisse nach 22 bzw. 24 Zyklen

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt bei den Pat. D und E deutlich eine Deletion des ganzen APC-Gens. Auch wenn eine Deletion von Exon 15J bei Pat. I nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte ist hinsichtlich der Deletionen der benachbarten Exonanteile eine Deletion der Exons 14 und des ganzen Exons 15 anzunehmen. Die Deletionen bei Pat. H sind nicht zusammenhängend und daher schwer zu interpretieren. Möglicherweise sind auch hier die Exons 14 und 15 deletiert, da eine unzusammenhängende Deletion von Exon 15 unwahrscheinlich ist. Fraglich ist eine Deletion des Exons 11. Ein ebenso uneinheitliches Bild bietet Pat. G mit deletierten Exon 2 und 14. Erklärbar ist dieses Muster durch die Bildung einer genomischen Inversion, bei der es zu einer Deletion dieser beiden Exons kommt. Die Ergebnisse von Pat. K bieten ein besonderes Bild. Eine Duplikation einzelner unzusammenhängender Exons (Exon 4, 5 und 14) ist zwar möglich, aber durch die große Lücke zwischen Exon 5 und 14 nicht zu erwarten. Daher liegt hier wahrscheinlich eine Deletion des Kontrollexons h19 vor. h19 ist ein Exon eines für HNPCC verantwortlichen Gens, hMLH1. Vermutlich liegt hier eine zufällige Diagnose eines HNPCC-Syndroms bei nicht eindeutiger Klinik vor. Die einzelnen pathologischen Werte bei Pat. A, B und C sind nicht als Deletionen zu werten.

Später Zyklus (28 bzw. 30; Sättigungsphase)

Exons	2	4	5	7	11	14	15A	15D	15H	15I	15J	15L	15M	15T	Deletionen
Patienten															
Pat.A															o.B.
Pat.B															o.B.
Pat.C															o.B.
Pat.D	Del.	Del.	Del.	Del.	?	Del.	Del.?	Del.	Del.	Del.?	Del.	Del.?	Del.	Del.	delAPC
Pat.E	Del.	Del.	Del.	Del.	?	Del.		Del.	Del.		Del.		Del.	Del.	delAPC?
Pat.F															o.B.
Pat.G						Del.				?		?			del14
Pat.H					?	Del.		Del.	Del.		Del.		Del.	Del.	del14/15?
Pat.I						Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	Del.	del14/15
Pat.K		Dupl.	Dupl.			Dupl.									Dupl.4-14?
Pat.L										?		?			o.B.
Pat.M															o.B.

Tab. 11: Zusammenfassung der Ergebnisse nach 28 bzw. 30 Zyklen.

Die Analyse nach dem späten Zyklus zeigt ein leicht verändertes Bild. Auch hier ist bei Pat. I eine Deletion der Exons 14 und 15 zu verzeichnen. Pat. H zeigt ein ähnlich uneinheitliches Bild. Es liegt wahrscheinlich auch hier eine Deletion der Exons 14 und 15 mit einer zusätzlichen fraglichen Deletion des Exon 11 vor. Die Pat. D und E zeigen nach 28 bzw. 30 Zyklen kein einheitliches Bild mehr. Bei Pat. D ist nur die Deletion von Exon 11 fraglich, so dass auch hier von einer Deletion des ganzen APC-Gens gesprochen werden kann. Anders bei Pat. E, bei dem kein durchgehendes Muster zu erkennen ist. Die Analyse der Exons 15A, I und L ergab keine Deletion, eine Deletion von Exon 11 ist somit nicht bewiesen. Trotzdem ist bei eindeutigen Deletionen der Exons 2, 4, 5, 7, 14, 15D, 15H, 15J, 15M und 15T eine Deletion des ganzen

Gens wahrscheinlich. Bei Pat.G ist im Gegensatz zum frühen Zyklus nur eine Deletion von Exon 14 zu erkennen, die Werte für Exon 2 zeigen keine Deletion. Bei Pat. K ist das gleiche Bild zu erkennen wie nach dem frühen Zyklus (s. dort). Die einzelnen pathologischen Werte der Pat. L, K (Exon 11) und G (Exon 15I, 15L) sind nicht als Deletionen zu werten.

Früher Zyklus	Patienten	Später Zyklus
o. B.	Pat. A	o. B.
o. B.	Pat. B	o. B.
o. B.	Pat. C	o. B.
delAPC	Pat. D	delAPC
delAPC	Pat. E	delAPC?
o. B.	Pat. F	o. B.
del2 und 14	Pat. G	del14
del14/15?	Pat. H	del14/15?
del14/15	Pat. I	del14/15
Dupl.4-14/ delh19	Pat. K	Dupl.4-14/ delh19
o. B.	Pat. L	o. B.
o. B.	Pat. M	o. B.

Tab. 12: Gegenüberstellung der Ergebnisse des frühen und späten Zyklus.

Die Tabelle zeigt noch einmal zusammengefasst die Ergebnisse der Analysen nach zwei Zyklenzahlen. Die Ergebnisse nach beiden Zyklen stimmen zum Großteil überein. In beiden Analysen sind dieselben Patienten ohne Befund und alle Patienten, die nach dem frühen Zyklus Deletionen aufwiesen, zeigten auch Deletionen nach dem späten Zyklus, wenn auch zum Teil mit leicht unterschiedlichen Mustern. Ein wenig einheitlicheres Bild zeigt sich nach der Analyse des frühen Zyklus am Ende der exponentiellen Phase. Trotzdem ist es ratsam für diese Art des Deletionsscreening die DNAs bei zwei verschiedenen Zykluszahlen zu analysieren.

Die Auswertung der Analysen zeigt, dass mit der etablierten Methode Deletionen ganzer Exons aufzuspüren sind. Die Festlegung der Bruchpunkte ist nach Analyse aller Exons des Genoms sicher festzustellen.

5.5.1. Patienten

Pat. D und E

Bei den DNAs der Pat. D und E handelt es sich um Proben aus dem Blut (E) und gesunder Darmschleimhaut (D) eines an klassischer FAP erkrankten Patienten. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit liegt sowohl im Blut als auch im Gewebe am ehesten eine Deletion des gesamten APC-Gens vor. Da die Deletion im Blut und in gesunder Schleimhaut detektierbar ist, handelt es sich dabei mit Sicherheit um die Keimbahnmutation. Im Tumorgewebe müsste nach Knudsons two-hit Theorie eine weitere Mutation oder Deletion im anderen Allel vorliegen. Leider stand kein Tumorgewebe zur Analyse zur Verfügung. Nach der Theorie des *just-right-signalling* (s. Abb. 8) müsste die zweite Mutation im Tumorgewebe so liegen, dass das Prote-

in noch mindestens eine 20-AS-Wiederholung (β -Catenin-Bindungsstelle) aufweist. Damit läge die Mutation auf jeden Fall in Exon 15. Bisher wurde in der Literatur nur in einem Artikel Keimbahndeletionen des ganzen APC-Gens beschrieben (Sieber et al., 2002). Bei den untersuchten DNAs handelte es sich wie auch bei Pat. D/E um Patienten mit klassischer FAP.

Pat. B und G

Auch die Proben der Pat. B und G entstammen aus dem Blut (G) und Tumorgewebe (B) einer von FAP betroffenen Patienten. Bei Pat. G wurde in beiden Zyklen eine Deletion des Exon 14 detektiert und im frühen Zyklus zusätzlich eine Deletion von Exon 2. Da diese Probe (G) aus dem Blut entnommen wurde, liegt hier die Keimbahnmutation zugrunde. Ob es sich nun nur um eine Deletion Exon 14 oder um eine kombinierte Deletion Exon 2 und 14 (durch Inversion) handelt, ist nicht eindeutig festzustellen. Im Tumorgewebe (Pat. B) konnte keine Deletion gefunden werden. Möglicherweise ist das mutierte Allel im Tumor völlig deletiert. Die zweite (*second hit*) Mutation liegt eventuell in den nicht untersuchten Exons.

Keimbahndeletionen des Exon 14 sind in der Literatur häufiger beschrieben, sowohl in Form einer echten Deletion als auch in der Variante einer Spleißstellenmutation (Sieber et al., 2002), (Cao et al., 2000), (Su et al., 2000). mRNA-Transkripte ohne Exon 14 (Leichtketten-APC) sind aber auch in normalen Zellen in einem bestimmten Verhältnis zu Exon 14-enthaltenden-Transkripten zu finden. Beim Herausspleißen von Exon 14 kommt es durch Verschiebung des Leserahmens zu einem verkürzten Exon 15 mit nur 19 Aminosäuren und somit zu einem Protein, das nicht alle Aufgaben von APC erfüllen kann. Inzwischen sind fünf molekulare Interaktionspartner von APC bekannt, die an den Teil des Proteins binden, der durch Exon 15 kodiert wird. Diese Daten zeigen die Bedeutsamkeit des Exon 15 und seinen Stellenwert in der Aufrechterhaltung der Tumor-Supressor-Funktion in Kolonzellen. Daher ist es überraschend, dass in normalen Zellen mRNA-Transkripte ohne Exon 14 produziert werden. Allerdings besitzen diese physiologischen Leichtkettenproteine verglichen mit den durch Stopmutationen verkürzten APC-Proteinen eine erstaunlich hohe intrazelluläre Stabilität. Möglicherweise kommt es durch Deletion des Exon 14 zum Überwiegen der Leichtketten-APC. Diese quantitative Imbalance ist möglicherweise ein neuer Pathomechanismus mit einer Prädisposition zu FAP. (Bala et al., 1997).

Pat. A und C

Auch dieses Probenpaar entstammt aus Blut (A) und gesunder Darmschleimhaut (C) eines Patienten mit klinisch diagnostizierter klassischer FAP ohne Mutationsnachweis. In keiner der beiden DNAs konnte eine eindeutige Deletion nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt eine Deletion im nicht untersuchten Bereichen des Gens.

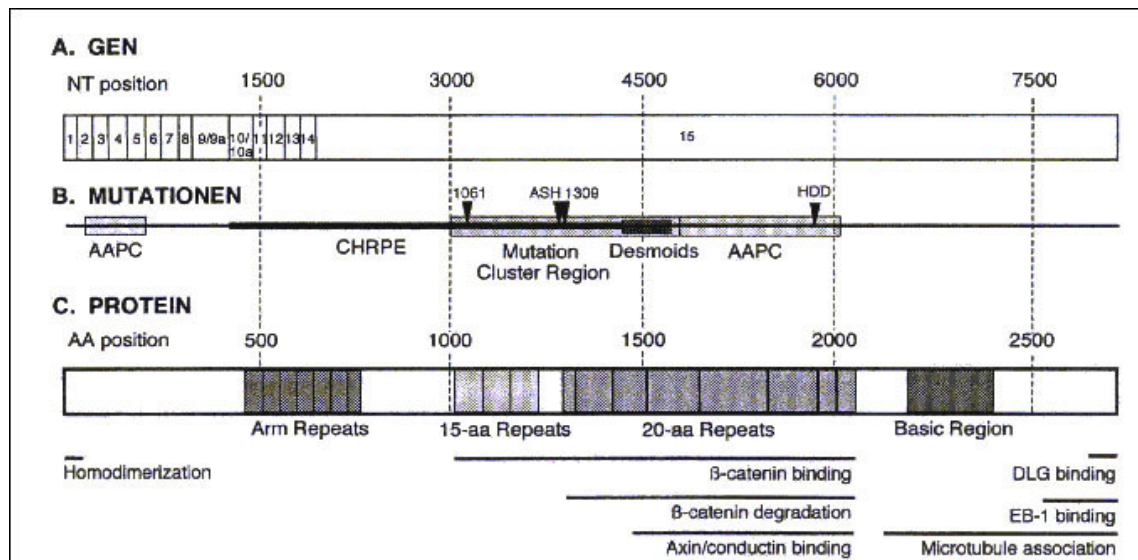


Abb. 44: APC-Gen mit Mutationsspektrum, klinischer Korrelation und Protein-Struktur. (A) Das APC-Gen besteht aus 15 Exons und 8535bp kodierender Sequenz. Die alternativ gespleißten Exons 9 und 10 sind auch dargestellt. (B) Keimbahnmutationen assoziiert mit AAPC sind vornehmlich an den 3' und 5'-Enden des Gens. Die meisten Mutationen sind im mittleren Drittel zu finden – *mutation cluster region*. 1061 und 1309 markieren die am häufigsten mutierten Codons. ASH gibt das Codon an, das oft bei Mutationen bei Ashkenazi-Juden gefunden wird (11307K). Regionen in denen Mutationen mit CHRPE oder Desmoids assoziiert sind ebenfalls markiert. (C) Das APC-Protein besteht aus verschiedenen Domänen mit insgesamt 2843 Aminosäuren. Angelehnt an (Goss and Groden, 2000).

Pat.H und I

Bei diesen beiden Patienten (DNA jeweils aus Blut extrahiert) liegt höchstwahrscheinlich eine Deletion der Exons 14 und 15 vor. Hierbei handelt es sich in beiden Fällen um eine Keimbahnmutation. Leider konnten von beiden Patienten keine Gewebeprobe erhalten und untersucht werden. Nach der Theorie des *just-right-signalling* (s. Abb. 8) müsste im Tumor die zweite Mutation so liegen, dass das daraus resultierende APC noch mindestens eine 20-AS-Wiederholung aufweist. Da das durch die Keimbahnmutation (del14/15) veränderte Allel über keine β -Catenin-Bindungsstelle mehr verfügt. Sind Exon 14 und 15 deletiert, kommt es zu einem Verlust der C-terminalen Region, aller β -Catenin-Bindungsstellen und einem Teil der Armadillo-Wiederholungen (Protein-Interaktion, Axin-Bindungsstelle). Es resultiert ein funktionsloses Protein. In der Literatur wird von isolierten Deletionen des Exon 14 und 15 berichtet, aber nicht von einer Kombination der beiden Exons (Su et al., 2002), (Su et al., 2000), (Sieber et al., 2002), (Cao et al., 2000). Die Klinik dieser in der Literatur beschriebenen Patienten ist sehr

variabel, von milder Ausprägung bis hin zu schwerer FAP mit frühem Erkrankungsbeginn.

Pat. K

Die Ergebnisse bei Pat. K (Blut) sind unterschiedlich interpretierbar. Es handelt sich entweder um eine Duplikation der Exons 4, 5 und 14 oder um eine Deletion des Kontrollexons Exon h19 des Gens hMLH1. Da die Exons 7 und 11 eindeutig in doppelter Kopie vorliegen, ist eine isolierte Duplikation der drei Exons 4, 5 und 14 unwahrscheinlich. Das klinische Erscheinungsbild gab zunächst erste Hinweise auf eine attenuierte Form der FAP mit wenigen Polypen im Kolon. Die histologische Untersuchung der abgetragenen Polypen ergab jedoch, dass es sich hierbei um hyperplastische Polypen und nicht um Adenome gehandelt hat. Eine FAP ist damit eher unwahrscheinlich. Auch die tumorbezogene Familienanamnese war unauffällig. Die Möglichkeit einer Deletion von h19 ist durchaus gegeben und wird in einer gesonderten Analyse untersucht.

Pat. F, L und M

Bei keinem der drei Patienten (Blut) konnte eine Deletion gefunden werden. Da nicht alle Exons des APC-Gens untersucht wurden, kann dennoch eine Deletion Ursache der Erkrankung sein. Bei Pat. F ist eine Keimbahnmutation weitgehend ausgeschlossen. Als Sohn von Pat. G ohne nachweisbare Deletion des Exon 14 und/oder Exon 2 und ohne jegliche klinische Manifestation ist bei Pat. F derzeit nicht von einer FAP auszugehen.

Deletion	Art der Mutation	Referenz
del4	Splicesitemut	(Su et al., 2000)
del8-15	Deletion	(Flintoff et al., 2001)
del11	Deletion	(Cao et al., 2000)
del11-12	Deletion	(Su et al., 2000)
del11-13	Deletion	(Andreutti-Zaugg et al., 1999)
del11-15	submikroskop. Del.	(Mandl et al., 1996)
del14	Deletion	(Sieber et al., 2002)
del14	Deletion	(Cao et al., 2000)
del14	Splicesitemutation	(Cao et al., 2000)
del14	Splicesitemutation	(Bala et.al, 1997)
del14	Deletion	(Su et al., 2000)
del15	Deletion	(Su et al., 2002)
delAPC	Deletion	(Sieber et al., 2002)
delAPC	submikroskop. Del.	(De Rosa et.al, 1999)

Tab. 13: Zusammenfassung der bisher in der Literatur beschriebenen APC-Deletionen

Zum Vergleich wurde die Auswertung der Multiplex-Ansätze über ein Fragmentgel vorgenommen. Die Ergebnisse unterscheiden sich nur geringfügig voneinander (s. Tab. 14).

Früher Zyklus		Patienten	Später Zyklus	
HPLC	Fragmentgel		HPLC	Fragmentgel
o.B.	o.B.	Pat.A	o.B.	-
o.B.	o.B.	Pat.B	o.B.	-
o.B.	o.B.	Pat.C	o.B.	-
delAPC	del4-15	Pat.D	delAPC	delAPC
delAPC	del4-15	Pat.E	delAPC?	delAPC?
o.B.	-	Pat.F	o.B.	o.B.
del2 und 14	-	Pat.G	del14	o.B.
del14/15?	del11-15	Pat.H	del14/15?	del14/15?
del14/15	del14/15	Pat.I	del14/15	del14/15
Dupl4-14/delh19	-	Pat.K	Dupl4-14/delh19	Dupl4-14/delh19
o.B.	o.B.	Pat.L	o.B.	-
o.B.	o.B.	Pat.M	o.B.	-

Tab. 14: Vergleich HPLC mit Fragmentgelanalyse

6. Zusammenfassung und Ausblick

Seit der Identifikation von APC wurden mehr als 250 verschiedene Keimbahnmutationen entdeckt. Beinahe alle diese Mutationen münden in ein verkürztes APC-Protein. Obwohl größere Deletionen im APC-Gen beschrieben worden sind (Joslyn et al., 1993), (Mandl et al., 1996) handelt es sich bei den meisten identifizierten Mutationen um Nukleotidmutationen oder kleine Insertionen bzw. Deletionen. Routinemethoden zum Nachweis von Mutationen, wie SSCP, DHPLC, Sequenzierung und PTT erkennen etwa 70% der Keimbahnmutationen bei der klassischen FAP und 10% bei attenuierter FAP (Lamlum et al., 2000), (Miyoshi et al., 1992), (Cottrell et al., 1992). Es gibt also noch FAP-Patienten, bei denen keine Mutation im APC-Gen gefunden wurde. Bei HNPCC, einer anderen Form eines erblichen kolorektalen Karzinoms, wurde kürzlich gezeigt, dass 5% der Erkrankungen auf eine exonüberspannende Deletion im hMSH2-Gen zurückzuführen sind (Wijnen et al., 1998). Analog dazu könnten solche submikroskopischen Deletionen bei einigen FAP-Patienten übersehen worden sein. Bisher wurden nur wenige genomische Veränderungen beschrieben und die Prävalenz dieser Veränderungen ist noch unklar.

Verschiedene quantitative Methoden zum Nachweis von Exondeletionen wurden bisher in der Literatur beschrieben – Southern Blot, Oligonukleotid Hybridisierung, PTT, kompetitive PCR und erst in jüngerer Zeit real-time PCR und komparative genomische Hybridisierung (CGH), zur Gendosisbestimmung. Jede brauchbare Dosisanalyse sollte bestimmte Kriterien, wie Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit erfüllen und sollte ökonomisch im Zeit- und Materialaufwand sein. Da die automatisierte Fragmentanalyse bereits in genetischen Diagnostiklabors üblich ist, stellt die Dosis-Quotient-Analyse eine gute Methode zur Erkennung von Mikrodeletionen und Duplikationen dar. Trotzdem bleibt die Analyse von quantitativer PCR durch die logarithmische Reaktionskinetik schwierig. Die Evaluierung der Ergebnisse ist aufwendig und erfordert im Vorfeld neben einer präzisen standardisierten Vorgehensweise eine genaue Vorarbeit über die Reaktionskinetik der einzelnen PCRs. Ist die Analyse für einen Multiplex-Ansatz aber erst einmal etabliert, ist sie eine robuste und verlässliche Methode zur Detektion von genomischen Deletionen. Die Dosis-Quotient-Analyse ist nicht auf das APC-Gen beschränkt, sondern auch auf andere Gene mit mehreren Exons anwendbar.

Pathologische Duplikationen und Deletionen sind schon seit langem bekannt bei α -Globin und Dystrophin bis hin zu Tumor-Supressor-Genen wie BRCA1, BRCA2 und hMSH2. Deshalb ist

es wichtig, dass genetische Tests zur Erkennung einer veränderten Gendosis, dort eingeführt werden, wo konventionelle Punktmutationsanalysen scheitern.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Deletionsscreening mittels quantitativer Multiplex-PCR am Beispiel des APC-Gens etabliert, mit dem Deletionen ganzer Exons detektiert werden können. Die Gendosis einzelner Exons wird dabei durch Vergleich der Produktmengen der Exons untereinander und mit einem Kontrollexon eines anderen Gens ermittelt. Die Analysen zeigen, dass durch quantitative PCR durchaus verlässliche Ergebnisse erzielt werden können. Bei sechs der zwölf untersuchten DNA-Proben (Blut und Gewebe) konnten Deletionen eines oder mehrerer Exons nachgewiesen werden. Bei einem Patienten liegt der Verdacht nahe, dass das Kontrollexon, ein Exon eines anderen Gens (hMLH1, HNPCC) deletiert ist. Das hieße, dass es sich bei der Erkrankung dieses Patienten nicht um eine FAP sondern um ein HNPCC gehandelt hat.

- Pat D und E → delAPC (Blut)
- Pat.G → del14, 2? (Blut)
- Pat.H und I → del14/15 (Blut)
- Pat.K → delhMLH1 Exon 19 / dupl4,5,14 (Blut)

In der Literatur sind bisher 13 unterschiedliche submikroskopische Deletionen für das APC-Gen beschrieben (De Rosa et al., 1999), (Flintoff et al., 2001), (Su et al., 2000), (Sieber et al., 2002), (Cao et al., 2000), (Bala et al., 1997), (Mandl et al., 1996), (Andreutti-Zaugg et al., 1999). In dieser Arbeit wurden in einem Kollektiv von neun Patienten mit klinisch gesicherter FAP und negativer Punktmutationsanalyse fünf weitere Deletionen im APC-Gen als krankheitsverursachende Mutation nachgewiesen. Diese Erkenntnisse zusammengenommen legen die Schlussfolgerung nahe, dass submikroskopische Deletionen im APC-Gen häufiger vorkommen als bisher angenommen, eventuell weil sie durch konventionelle Methoden unentdeckt geblieben sind.

Es ist offensichtlich, dass in Zukunft die FAP-Familien genauer und sorgfältiger untersucht werden müssen, um mehr über genomische Änderungen und deren Folgen zu erfahren.

7. Literatur

- Aberle, H., A. Bauer, et al. (1997). "Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." Embo J **16**(13): 3797-804.
- Albuquerque, C., C. Breukel, et al. (2002). "The 'just-right' signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade." Hum Mol Gen **11**(13): 1549-1560.
- Andreutti-Zaugg, C., A. Couturier, et al. (1999). "Detection of protein truncating mutations in exons 1-14 of the APC gene using an in vivo fusion protein assay. Mutations in brief no. 214. Online." Hum Mutat **13**(2): 170-1.
- Baeg, G. H., A. Matsumine, et al. (1995). "The tumour suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase." Embo J **14**(22): 5618-25.
- Bala, S., Z. Sulekova, et al. (1997). "Constitutive APC exon 14 skipping in early-onset familial adenomatous polyposis reveals a dramatic quantitative distortion of APC gene-specific isoforms." Hum Mut **10**: 201-206.
- Barker, N. and H. Clevers (2000). "Catenins, Wnt signaling and cancer." Bioessays **22**(11): 961-5.
- Behrens, J., B. A. Jerchow, et al. (1998). "Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta." Science **280**(5363): 596-9.
- Behrens, J., J. P. von Kries, et al. (1996). "Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1." Nature **382**(6592): 638-42.
- Beroud, C., T. Soussi, et al. (1996). "APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines." Nucleic Acids Research **24**(1): 121-124.
- Bertario, L., A. Russo, et al. (2003). "Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis." J Clin Onc **21**(9): 1698-1707.
- Bisgaard, M. L., K. Fenger, et al. (1994). "Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate." Hum Mutat **3**(2): 121-5.
- Blair, N. P. and C. L. Trempe (1980). "Hypertrophy of the retinal pigment epithelium associated with Gardner's syndrome." Am J Ophthalmol **90**(5): 661-7.
- Bodmer, W. (1999). "Familial adenomatous polyposis (FAP) and its gene, APC." Cytogenet Cell Genet **86**(2): 99-104.
- Boutros, M. and M. Mlodzik (1999). "Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways." Mech Dev **83**(1-2): 27-37.
- Boveri, T. (1914). *Zur Frage der Entstehung maligner Tumore*, Gustav Fischer Verlag.
- Brownie, J., S. Shawcross, et al. (1997). "The elimination of primerdimer accumulation in PCR." Nucleic Acids Res **25**: 3235-3241.
- Cao, X., K. W. Eu, et al. (2000). "APC mutation and phenotypic spectrum of Singapore familial adenomatous polyposis patients." Eur J Hum Genet **8**(1): 42-8.
- Cao, X., K. W. Eu, et al. (2001). "Topoisomerase-I- and Alu-mediated genomic deletions of the APC gene in familial adenomatous polyposis." Hum Genet **108**(5): 436-42.

- Caspari, R., W. Friedl, et al. (1994). "Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer." Lancet **343**(8898): 629-32.
- Caspari, R., S. Olschwang, et al. (1995). "Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444." Hum Mol Genet **4**(3): 337-40.
- Cavenee, W. K., T. P. Dryja, et al. (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." Nature **305**(5937): 779-84.
- Chamberlain, J., R. Gibbs, et al. (1988). "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification." Nucleic Acids Res **16**: 11141-11156.
- Chan, E. F., U. Gat, et al. (1999). "A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin." Nat Genet **21**(4): 410-3.
- Chandrasekharappa, S. C., S. C. Guru, et al. (1997). "Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1." Science **276**(5311): 404-7.
- Chung, D. and A. Rustgi (1995). "DNA mismatch repair and cancer." Gastroenterology **109**: 1685-1699.
- Cottrell, S., D. Bicknell, et al. (1992). "Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas." Lancet **340**(8820): 626-30.
- Cripps, H. (1882). "Two cases of disseminated polypus of the rectum." Trans Pathol Soc Lond **33**: 165-188.
- Crisan, D. (1994). "Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukemias." Ann Clin Lab Sci **24**: 355-363.
- Davies, D. R., J. G. Armstrong, et al. (1995). "Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the APC gene." Am J Hum Genet **57**(5): 1151-8.
- de La Coste, A., B. Romagnolo, et al. (1998). "Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8847-51.
- De Rosa, M., M. Scarano, et al. (1999). "Three submicroscopic deletions at the APC locus and their rapid detection by quantitative-PCR analysis." Eur J Hum Genet **7**(6): 695-703.
- Debinski, H. S., S. Love, et al. (1996). "Colorectal polyp counts and cancer risk in familial adenomatous polyposis." Gastroenterology **110**(4): 1028-30.
- Deka, J., P. Herter, et al. (1999). "The APC protein binds to A/T rich DNA sequences." Oncogene **18**(41): 5654-61.
- Deka, J., J. Kuhlmann, et al. (1998). "A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein tau." Eur J Biochem **253**(3): 591-7.
- Dikovskaya, D., J. Zumbunn, et al. (2001). "The adenomatous polyposis coli protein: in the limelight out at the edge." Trends Cell Biol **11**(9): 378-84.
- Eccles, D. M., P. W. Lunt, et al. (1997). "An unusually severe phenotype for familial adenomatous polyposis." Arch Dis Child **77**(5): 431-5.
- Erdmann, K. S., J. Kuhlmann, et al. (2000). "The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain." Oncogene **19**(34): 3894-901.

- Esteller, M., A. Sparks, et al. (2000). "Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer." Cancer Res **60**(16): 4366-71.
- Fearon, E. R. (1997). "Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer." Science **278**(5340): 1043-50.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Figer, A., R. Shtoyerman-Chen, et al. (2001). "Phenotypic characteristics of colo-rectal cancer in I1307K APC germline mutation carriers compared with sporadic cases." Br J Cancer **85**(9): 1368-71.
- Flintoff, K., E. Sheridan, et al. (2001). "Submicroscopic deletion of the APC gene: a frequent cause of familial adenomatous polyposis that may be overlooked by conventional mutation scanning." J Med Genet **38**(2): 129-32.
- Fodde, R. (2002). "The APC gene in colorectal cancer." Eur J Cancer **38**: 867-871.
- Fodde, R. and P. M. Khan (1995). "Genotype-phenotype correlations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene." Crit Rev Oncog **6**(3-6): 291-303.
- Fodde, R., J. Kuipers, et al. (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." Nat Cell Biol **3**(4): 433-8.
- Fodde, R., R. Smits, et al. (2001). "APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer." Nature Reviews Cancer **1**(55-67).
- Fountain, J. W., M. R. Wallace, et al. (1989). "Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis." Science **244**(4908): 1085-7.
- Francke, U. (1976). "Retinoblastoma and chromosome 13." Cytogenet Cell Genet **16**(1-5): 131-4.
- Frayling, I. M., N. E. Beck, et al. (1998). "The APC variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10722-7.
- Fukuchi, T., M. Sakamoto, et al. (1998). "Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium." Cancer Res **58**(16): 3526-8.
- Gardner, E. J. (1962). "Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts." Am J Hum Genet **14**: 376-390.
- Gayther, S. A., D. Wells, et al. (1994). "Regionally clustered APC mutations are associated with a severe phenotype and occur at a high frequency in new mutation cases of adenomatous polyposis coli." Hum Mol Genet **3**(1): 53-6.
- Giardiello, F. M., A. J. Krush, et al. (1994). "Phenotypic variability of familial adenomatous polyposis in 11 unrelated families with identical APC gene mutation." Gastroenterology **106**(6): 1542-7.
- Giardiello, F. M., G. J. Offerhaus, et al. (1991). "Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis." J Pediatr **119**(5): 766-8.
- Giardiello, F. M., G. M. Petersen, et al. (1996). "Hepatoblastoma and APC gene mutation in familial adenomatous polyposis." Gut **39**(96): 867-9.
- Goss, K. H. and J. Groden (2000). "Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor." J Clin Oncol **18**(9): 1967-79.

- Groden, J., A. Thliveris, et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." Cell **66**(3): 589-600.
- Gruber, S. B., G. M. Petersen, et al. (1999). "Cancer, crash sites, and the new genetics of neoplasia." Gastroenterology **116**(1): 210-2.
- Gryfe, R., N. Di Nicola, et al. (1998). "Somatic instability of the APC I1307K allele in colorectal neoplasia." Cancer Res **58**(18): 4040-3.
- Gryfe, R., N. Di Nicola, et al. (1999). "Inherited colorectal polyposis and cancer risk of the APC I1307K polymorphism." Am J Hum Genet **64**(2): 378-84.
- Haber, D. and E. Harlow (1997). "Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age." Nat Genet **16**(4): 320-2.
- Hahn, H., C. Wicking, et al. (1996). "Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome." Cell **85**(6): 841-51.
- Hamilton, S. R., B. Liu, et al. (1995). "The molecular basis of Turcot's syndrome." N Engl J Med **332**(13): 839-47.
- Harris, E., G. Kropp, et al. (1998). "Single step multiplex assay for characterisation of New World Leishmania complexes." J Clin Microbiol **36**: 1989-1995.
- Hart, M. J., R. de los Santos, et al. (1998). "Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta." Curr Biol **8**(10): 573-81.
- Hayashi, S. and e. al. (1997). "A drosophila homolog of the tumor supressor gene adenomatous polyposis coli downregulates beta-catenin bur its cytogetic expression is not essential for the regulation of armadillo." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 242-247.
- He, T. C., A. B. Sparks, et al. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." Science **281**(5382): 1509-12.
- Hecker, K., S. Green, et al. (2000). "Analysis and purification of nucleid acids by ion-pair reversed high performance liquid chromatography." J Biochem Biophys Methods **46**(1-2): 83-93.
- Heinen, C. D., K. H. Goss, et al. (2002). "The APC tumor suppressor controls entry into S-phase through its ability to regulate the cyclin D/RB pathway." Gastroenterology **123**(3): 751-63.
- Henderson, B. R. (2000). "Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover." Nat Cell Biol **2**(9): 653-60.
- Hendolin, P., A. Markkanen, et al. (1997). "Use of multiplex PCR for simultaneously detection of four bacterial species in middle ear effusions." J Clin Microbiol **35**: 2854-2858.
- Henegariu, O., N. Heerema, et al. (1997). "Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol." BioTechniques **23**: 504-511.
- Herrera, L., S. Kakati, et al. (1986). "Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q." Am J Med Genet **25**(3): 473-6.
- Hiltunen, M. O., L. Alhonen, et al. (1997). "Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma." Int J Cancer **70**(6): 644-8.
- Horii, A., S. Nakatsuru, et al. (1993). "Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression." Hum Mol Genet **2**(3): 283-7.

- Houlston, R., M. Crabtree, et al. (2001). "Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes." *Gut* **48**(1): 1-5.
- Hsu, W., L. Zeng, et al. (1999). "Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain." *J Biol Chem* **274**(6): 3439-45.
- Ishidate, T., A. Matsumine, et al. (2000). "The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase." *Oncogene* **19**: 365-372.
- Jiang, J. and G. Struhl (1998). "Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb." *Nature* **391**(6666): 493-6.
- Joslyn, G., D. S. Richardson, et al. (1993). "Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 11109-13.
- Kaplan, K. B., A. A. Burds, et al. (2001). "A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation." *Nat Cell Biol* **3**(4): 429-32.
- Kartheuser, A., C. Walon, et al. (1999). "Familial adenomatous polyposis associated with multiple adrenal adenomas in a patient with a rare 3' APC mutation." *J Med Genet* **36**(1): 65-7.
- Kawasaki, Y., R. Sato, et al. (2003). "Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells." *Nat Cell Biol* **5**(3): 211-5.
- Kawasaki, Y., T. Senda, et al. (2000). "Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling." *Science* **289**(5482): 1194-7.
- Kintner, C. (1992). "Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain." *Cell* **69**(2): 225-36.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, et al. (1991). "Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21." *Science* **253**(5020): 661-5.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell* **87**(2): 159-70.
- Kishida, S., H. Yamamoto, et al. (1998). "Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin." *J Biol Chem* **273**(18): 10823-6.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 820-3.
- Kolligs, F. T., B. Kolligs, et al. (2000). "gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin." *Genes Dev* **14**(11): 1319-31.
- Laken, S. J., N. Papadopoulos, et al. (1999). "Analysis of masked mutations in familial adenomatous polyposis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2322-6.
- Laken, S. J., G. M. Petersen, et al. (1997). "Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC." *Nat Genet* **17**(1): 79-83.
- Lamlum, H., N. Al Tassan, et al. (2000). "Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q." *Hum Mol Genet* **9**(15): 2215-21.
- Lamlum, H., M. Ilyas, et al. (1999). "The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis." *Nat Med* **5**(9): 1071-5.

- Li, L., H. Yuan, et al. (1999). "Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1." *Embo J* **18**(15): 4233-40.
- Liu, W., X. Dong, et al. (2000). "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." *Nat Genet* **26**(2): 146-7.
- Lockhart-Mummery, A. (1925). "Cancer and heredity." *Lancet* **1**: 427-429.
- Lustig, B., B. Jerchow, et al. (2002). "Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors." *Mol Cell Biol* **22**(4): 1184-93.
- Macleod, K. (2000). "Tumor suppressor genes." *Curr Opin Genet Dev* **10**(1): 81-93
- Mandl, M., R. Caspari, et al. (1996). "Familial adenomatous polyposis: a submicroscopic deletion at the APC locus in a family with mentally normal patients." *Hum Genet* **97**(2): 204-8.
- Marikawa, Y. and R. P. Elinson (1998). "beta-TrCP is a negative regulator of Wnt/beta-catenin signaling pathway and dorsal axis formation in Xenopus embryos." *Mech Dev* **77**(1): 75-80.
- Markoulatos, P., V. Samara, et al. (1999). "Development of a quadriplex polymerase chain reaction for human cytomegalovirus." *J Clin Lab Anal* **13**: 99-105.
- Markoulatos, P., N. Siafakas, et al. (2002). "Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach." *J Clin Lab Anal* **16**: 47-51.
- Marra, G. and C. R. Boland (1995). "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives." *J Natl Cancer Inst* **87**(15): 1114-25.
- Matsumine, A., A. Ogai, et al. (1996). "Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein." *Science* **272**(5264): 1020-3.
- Miller, S., D. Sykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, et al. (2000). "Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells." *J Cell Biol* **148**(3): 505-18.
- Miyoshi, Y., H. Ando, et al. (1992). "Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4452-6.
- Miyoshi, Y., H. Nagase, et al. (1992). "Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene." *Hum Mol Genet* **1**(4): 229-33.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." *Science* **275**(5307): 1787-90.
- Morrison, E. E., B. N. Wardleworth, et al. (1998). "EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle." *Oncogene* **17**(26): 3471-7.
- Moss, S. and e. al (1996). "Inward growth of colonic adenomatous polyps." *Gastroenterology* **111**: 1425-1432.
- Mulligan, L. M., C. Eng, et al. (1994). "Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC." *Nat Genet* **6**(1): 70-4.
- Mulligan, L. M., J. B. Kwok, et al. (1993). "Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A." *Nature* **363**(6428): 458-60.

- Munemitsu, S., I. Albert, et al. (1995). "Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 3046-50.
- Munemitsu, S., B. Souza, et al. (1994). "The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro." Cancer Res **54**(14): 3676-81.
- Mutter, G. and K. Boyton (1995). "PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies." Nucleic Acids Res **23**: 1411-1418.
- Nagafuchi, A. and M. Takeichi (1988). "Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain." Embo J **7**(12): 3679-84.
- Nagase, H., Y. Miyoshi, et al. (1992). "Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients." Cancer Res **52**(14): 4055-7.
- Nagase, H., Y. Nakamura, et al. (1993). "Mutation of the APC (Adenomatous Polyposis Coli) Gene." Human Mutation **2**: 425-434.
- Nakagawa, H., Y. Murata, et al. (1998). "Identification of a brain-specific APC homologue, APCL, and its interaction with beta-catenin." Cancer Res **58**(22): 5176-81.
- Nathke, I. S., C. L. Adams, et al. (1996). "The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration." J Cell Biol **134**(1): 165-79.
- Naylor, E. W. and E. J. Gardner (1981). "Adrenal adenomas in a patient with Gardner's syndrome." Clin Genet **20**(1): 67-73.
- Neufeld, K. L., D. A. Nix, et al. (2000). "Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12085-90.
- Nowell, P. and D. A. Hungerford (1960). "Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes." Natl Cancer Inst **25** 85-109.
- Nugent, K. P., R. K. Phillips, et al. (1994). "Phenotypic expression in familial adenomatous polyposis: partial prediction by mutation analysis." Gut **35**(11): 1622-3.
- Olschwang, S., A. Tiret, et al. (1993). "Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients." Cell **75**(5): 959-68.
- Paraf, F., S. Jothy, et al. (1997). "Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases?" J Clin Oncol **15**(7): 2744-58.
- Peifer, M., S. Berg, et al. (1994). "A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles." Cell **76**(5): 789-91.
- Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." Science **287**(5458): 1606-9.
- Peters, J. M., R. M. McKay, et al. (1999). "Casein kinase I transduces Wnt signals." Nature **401**(6751): 345-50.
- Petersen, G. M., G. Parmigiani, et al. (1998). "Missense mutations in disease genes: a Bayesian approach to evaluate causality." Am J Hum Genet **62**(6): 1516-24.
- Polakis, P. (1997). "The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor." Biochim Biophys Acta **1332**(3): F127-47.

- Powell, S., N. Zilz, et al. (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." *Nature* **359**: 235-37.
- Prior, T. W., R. B. Chadwick, et al. (1999). "The I1307K polymorphism of the APC gene in colorectal cancer." *Gastroenterology* **116**(1): 58-63.
- Redston, M., K. L. Nathanson, et al. (1998). "The APC1307K allele and breast cancer risk." *Nat Genet* **20**(1): 13-4.
- Riccardi, V. M., E. Sujansky, et al. (1978). "Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion." *Pediatrics* **61**(4): 604-10.
- Rithidech, K., J. Dunn, et al. (1997). "Combining multiplex and touch down PCR to screen murine microsatellite polymorphisms." *BioTechniques* **23**: 26-45.
- Roose, J., G. Huls, et al. (1999). "Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1." *Science* **285**(5435): 1923-6.
- Rowley, J. D. (1980). "Chromosome abnormalities in human leukemia." *Annu Rev Genet* **14**: 17-39.
- Rozen, P., T. Naiman, et al. (2002). "Clinical and screening implications of the I1307K adenomatous polyposis coli gene variant in Israeli Ashkenazi Jews with familial colorectal neoplasia. Evidence for a founder effect." *Cancer* **94**(10): 2561-8.
- Rozen, P., R. Shomrat, et al. (1999). "Prevalence of the I1307K APC gene variant in Israeli Jews of differing ethnic origin and risk for colorectal cancer." *Gastroenterology* **116**(1): 54-7.
- Rubinfeld, B., I. Albert, et al. (1996). "Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly." *Science* **272**(5264): 1023-6.
- Rubinfeld, B., I. Albert, et al. (1997). "Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene." *Cancer Res* **57**(20): 4624-30.
- Rubinfeld, B., B. Souza, et al. (1993). "Association of the APC gene product with beta-catenin." *Science* **262**(5140): 1731-4.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**: 487-491.
- Santoro, I. and J. Groden (1997). "Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation." *Cancer Res* **57**: 488-494.
- Satoh, S., Y. Daigo, et al. (2000). "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." *Nat Genet* **24**(3): 245-50.
- Schmidt, L., F. M. Duh, et al. (1997). "Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas." *Nat Genet* **16**(1): 68-73.
- Seeling, J. M., J. R. Miller, et al. (1999). "Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A." *Science* **283**(5410): 2089-91.
- Seizinger, B. R., R. L. Martuza, et al. (1986). "Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma." *Nature* **322**(6080): 644-7.
- Seizinger, B. R., G. Rouleau, et al. (1987). "Common pathogenetic mechanism for three tumor types in bilateral acoustic neurofibromatosis." *Science* **236**(4799): 317-9.

- Sharpe, C., N. Lawrence, et al. (2001). "Wnt signalling: a theme with nuclear variations." Bioessays **23**(4): 311-18.
- Shuber, A., J. Skoletsky, et al. (1993). "Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis." Hum Mol Genet **2**: 153-158.
- Sieber, O., L. Lipton, et al. (2003). Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis and germ-line mutations in MYH. N Engl J Med **348**(9): 791-9.
- Sieber, O., L. Lipton, et al. (2003). "Colorectal tumorigenesis in carriers of the APC I1307K variant: lone gunman or conspiracy?" J Pathol **199**(2): 137-9.
- Sieber, O. M., H. Lamlum, et al. (2002). "Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2954-8.
- Silverberg, M. S., C. Clelland, et al. (2001). "Carrier rate of APC I1307K is not increased in inflammatory bowel disease patients of Ashkenazi Jewish origin." Hum Genet **108**(3): 205-10.
- Smith, K. J., D. B. Levy, et al. (1994). "Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton." Cancer Res **54**(14): 3672-5.
- Smits, R., N. Hofland, et al. (2000). "Somatic APC mutations are selected upon their capacity to inactivate the beta-catenin downregulating activity." Genes Chromosomes Cancer **29**(3): 229-39.
- Soravia, C., T. Berk, et al. (1998). "Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli." Am J Hum Genet **62**(6): 1290-301.
- Soussi, T. (1999). APC mutation database. www.p53.curie.fr
- Spirio, L., S. Olschwang, et al. (1993). "Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis." Cell **75**(5): 951-7.
- Steinbach, G., P. Lynch, et al. (2000). "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis." N Engl J Med **342**: 1246-52.
- Su, L. K., M. Burrell, et al. (1995). "APC binds to the novel protein EB1." Cancer Res **55**(14): 2972-7.
- Su, L. K., K. A. Johnson, et al. (1993). "Association between wild type and mutant APC gene products." Cancer Res **53**(12): 2728-31.
- Su, L. K., W. Kohlmann, et al. (2002). "Different familial adenomatous polyposis phenotypes resulting from deletions of the entire APC exon 15." Hum Genet **111**(1): 88-95.
- Su, L. K., G. Steinbach, et al. (2000). "Genomic rearrangements of the APC tumor-suppressor gene in familial adenomatous polyposis." Hum Genet **106**(1): 101-7.
- Su, L. K., B. Vogelstein, et al. (1993). "Association of the APC tumor suppressor protein with catenins." Science **262**(5140): 1734-7.
- Sulekova, Z., J. Reina-Sanchez, et al. (1995). "Multiple APC messenger RNA isoforms encoding exon 15 short open reading frames are expressed in the context of a novel exon 10A-derived sequence." Int J Cancer **63**(3): 435-41.
- Sulekova, Z., M. Raymond, et al. (1999). "Exon 14-skipping of the adenomatous polyposis coli gene in purified epithelial cells of colonic mucosa and tumors." Anticancer Res **19**(1A): 601-4.
- Tetsu, O. and F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." Nature **398**(6726): 422-6.

- Thliveris, A., H. Albertsen, et al. (1996). "Long-Range Physical Map and Deletion Characterization of the 1100-kb NotI Restriction Fragment Harboring the APC Gene." Genomics **34**: 268-270.
- Thliveris, A., W. Samowitz, et al. (1994). "Demonstration of promotor activity and alternative splicing in the region 5' to exon 1 of the APC gene." Cancer Res **54**: 2991-2995.
- Thorpe, C. and e. al. (1997). "Wnt signalling polarizes an early C. elegans blastomere to distinguish endoderm from mesoderm." Cell **90**: 695-705.
- van der Luijt, R. B., P. Meera Khan, et al. (1996). "Germline mutations in the 3' part of APC exon 15 do not result in truncated proteins and are associated with attenuated adenomatous polyposis coli." Hum Genet **98**(6): 727-34.
- van Es, J. H., C. Kirkpatrick, et al. (1999). "Identification of APC2, a homologue of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor." Curr Biol **9**(2): 105-8.
- Voeller, H. J., C. I. Truica, et al. (1998). "Beta-catenin mutations in human prostate cancer." Cancer Res **58**(12): 2520-3.
- Wagner, A., N. Blackstone, et al. (1994). "Survey of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift." Syst Biol **43**: 250-261.
- Wallis, Y. L., F. Macdonald, et al. (1994). "Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis." Hum Genet **94**(5): 543-8.
- Wallis, Y. L., D. G. Morton, et al. (1999). "Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype- phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition." J Med Genet **36**(1): 14-20.
- Weinberg, R. (1994). "Oncogenes and tumor suppressor genes." Cancer J Clin **44**(3): 160-170.
- Wijnen, J., H. van der Klift, et al. (1998). "MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC." Nat Genet **20**: 326-328.
- Willert, K., M. Brink, et al. (1997). "Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled." Embo J **16**(11): 3089-96.
- Woodage, T., S. M. King, et al. (1998). "The APC11307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews." Nat Genet **20**(1): 62-5.
- Xia, L., K. A. St Denis, et al. (1995). "Evidence for a novel exon in the coding region of the adenomatous polyposis coli (APC) gene." Genomics **28**(3): 589-91.
- Yau, S. C., M. Bobrow, et al. (1996). "Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis." J Med Genet **33**(7): 550-8.
- Yokoya, F., N. Imamoto, et al. (1999). "beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner." Mol Biol Cell **10**(4): 1119-31.
- Young, J., L. A. Simms, et al. (1998). "A family with attenuated familial adenomatous polyposis due to a mutation in the alternatively spliced region of APC exon 9." Hum Mutat **11**(6): 450-5.
- Yu, X. and e. al. (1999). "A new Drosophila APC homolog associated with adhesive zones of epithelial cells." Nat Cell Biol **1**: 144-151.
- Yuan, Z. Q., L. Kasprzak, et al. (1998). "I1307K APC and hMLH1 mutations in a non-Jewish family with hereditary non-polyposis colorectal cancer." Clin Genet **54**(4): 368-70.

- Zhang, F., R. L. White, et al. (2000). "Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12577-82.
- Zimmermann, K., B. Schogl, et al. (1996). "Quantitative multiplex competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaktion tube." BioTechniques **21**: 480-484.
- Zumbrunn, J., A. Kinoshita, et al. (2001). "Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubules stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation." Curr. Biol. **11**(22): 44-49.
- Zurawel, R. H., S. A. Chiappa, et al. (1998). "Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations." Cancer Res **58**(5): 896-9.

8. Anhang

8.1. Oligonukleotide

APC Exons	Primersequenz	T _M	Länge (bp)
1	5' - AGGTCCAAGGGTAGCCAAGG - 3' 5' - TAAAAATGGATAAACTACAATTTAAAAG - 3'	58°C	207
2	5' - AAATACAGAATCATGTCTTGAAGT - 3' 5' - ACACCTAAAGATGACAATTTGAG - 3'	58°C	217
3	5' - TAACTTAGATAGCAGTAATTTCCC - 3' 5' - ACAATAAACTGGAGTACACAAGG - 3'	58°C	250
4	5' - ATAGGTCATTGCTTCTTGCTGAT - 3' 5' - TGAATTTTAATGGATTACCTAGGT - 3'	58°C	196
5	5' - ATAGGTCATTGCTTCTTGCTGAT - 3' 5' - TGTAATTCATTTTATTCCTAATAGCTC - 3'	58°C	244
6	5' - GGTAGCCATAGTATGATTATTCT - 3' 5' - CTACCTATTTTTATACCCACAAAC - 3'	60°C	204
7	5' - AAGAAAGCCTACACCATTTTTGC - 3' 5' - GATCATTCTTAGAACCATCTTGC - 3'	62°C	249
8	5' - ACCTATAGTCTAAATTATACCATC - 3' 5' - ACCTATAGTCTAAATTATACCATC - 3'	56°C	183
9	5' - AGTCGTAATTTTGTTCCTAAACTC - 3' 5' - TGAAGGACTCGGATTTACGCG - 3'	62°C	410
10	5' - AAACATCATTGCTCTTCAAATAAC - 3' 5' - TACCATGATTTAAAAATCCACCAG - 3'	60°C	216
11	5' - GATGATGTCTTTTTCTCTTGC - 3' 5' - CTGAGCTATCTTAAGAAATACATG - 3'	60°C	216
12	5' - TTTTAAATGATCCTCTATTCTGTAT - 3' 5' - ACAGAGTCAGACCCTGCCTCAAAG - 3'	56°C	180
13	5' - TTTCTATTCTTACTGCTAGCATT - 3' 5' - ATACACAGGTAAGAAATTAGGA - 3'	56°C	307
14	5' - TAGATGACCCATATTCTGTTC - 3' 5' - CAATTAGGTCTTTTGAGAGTA - 3'	58°C	310
15°	5'-GTTACTGCATACACATTGTGAC-3' 5'-GCTTTTTGTTCCTAACATGAAG-3'	60°C	373
15B	5' - AGTACAAGGATGCCAATATTATG - 3' 5' - ACTTCTATCTTTTTCAGAACCAG - 3'	60°C	347
15C	5' - ATTTGAATACTACAGTGTACCC - 3' 5' - CTTGTATTCTAATTTGGCATAAAG - 3'	60°C	390
15D	5' - CTGCCATACACATTCAAACAC - 3' 5' - TGTTTGGGTCTTGCCCATCTT - 3'	62°C	382
15E	5' - AGTCTTAAATATTCAGATGAGCAG - 3' 5' - GTTCTCTTCATTATATTTTATGCTA - 3'	58°C	430
15F	5' - AAGCCTACCAATTATAGTGAACG - 3' 5' - AGCTGATGACAAAGATGATAATG - 3'	60°C	435
15G	5' - AAGAAACAATACAGACTTATTGTG - 3' 5' - AAGAAACAATACAGACTTATTGTG - 3'	58°C	385
15H	5' - ATCTCCCTCCAAAAGTGGTGC - 3' 5' - TCCATCTGGAGTACTTCTGTG - 3'	60°C	411
15I	5' - AGTAAATGCTGCAGTTCAGAGG - 3' 5' - TAGAAGTTGTACACAGGCAG - 3'	60°C	442
15J	5' - CCCAGACTGCTTCAAATTACC - 3' 5' - GAGCCTCATCTGTACTTCTGC - 3'	60°C	319
15K	5' - CCCTCCAAATGAGTTAGCTGC - 3' 5' - TTGTGGTATAGGTTTTACTGGTG - 3'	60°C	352
15L	5'-ACCCAACAAAATCAGTTAGATG-3' 5'-GTGGCTGGTAACTTTAGCCTC-3'	60°C	415

15M	5' - ATGATGTTGACCTTTCCAGGG - 3' 5' - ATTGTGTAACTTTTTCATCAGTTGC - 3'	58°C	254
15N	5' - AAAGACATACCAGACAGAGGG - 3' 5' - CTTTTTTGGCATTGCGGAGCT - 3'	58°C	339
15O	5' - AAGATGACCTGTTGCAGGAATG - 3' 5' - GAATCAGACGAAGCTTGTCTAGAT - 3'	58°C	292
15P	5' - CCATAGTAAGTAGTTTACATCAAG - 3' 5' - AAACAGGACTTGTACTGTAGGA - 3'	56°C	411
15Q	5' - CAGCCCCTTCAAGCAAACATG - 3' 5' - GAGGACTTATTCCATTTCTACC - 3'	56°C	373
15R	5' - CAGTCTCCTGGCCGAAACTC - 3' 5' - GTTGACTGGCGTACTAATAACAG - 3'	60°C	362
15S	5' - TGGTAATGGAGCCAATAAAAAGG - 3' 5' - TGGGAGTTTTTCGCCATCCAC - 3'	60°C	307
15T	5' - TGTCTCTATCCACACATTCGTC - 3' 5' - ATGTTTTTCATCCTCACTTTTTTGC - 3'	58°C	302
15U	5' - GGAGAAGAAGTGGAGTTTCATC - 3' 5' - TTGAATCTTTAATGTTTGGATTTGC - 3'	56°C	402
15V	5' - TCTCCCACAGGTAATACTCCC - 3' 5' - GCTAGAACTGAATGGGGTACG - 3'	60°C	276
15W	5' - CAGGACAAAATAATCCTGTCCC - 3' 5' - ATTTTCTTAGTTTCATTCTTCCTC - 3'	58°C	307

Kontroll-Primer

Gen und Exon	Primersequenz	T _M	Länge (bp)
hMLH1 Exon 5	5' - GATTTTCTCTTTTCCCCTTGGG - 3' 5' - CAAACAAAGCTTCAACAATTTAC - 3'	54°C	190
hMLH1 Exon 19	5' - GACACCAGTGTATGTTGG - 3' 5' - AGAGAAAGAAGAACACATCCC - 3'	54°C	270
hMSH2 Exon1	5' - TCGCGCATTTTTCTTCAACC - 3' 5' - GTCCCTCCCCAGCACGC - 3'	54°C	285

8.2. Bedingungen und Zusammensetzung der Multiplex-PCR-Ansätze

Alle Multiplex-Ansätze durchliefen dasselbe PCR-Programm.

PCR-Programm:

1. 94°C 10min
2. 94°C 1 min
3. 54°C 1 min
4. 72°C 1 min
5. 72°C 10min

Schritte 2–4 wurden max. 40 mal wiederholt

8.2.1. 45h1914

10x PCR-Puffer	5µl
dNTPs (2pmol/µl)	5µl
Primer 4F, 5F, h19F, 14F (20pmol/µl)	1µl, 1.2µl, 0.4µl, 1.5µl
Primer 4R, 5R, h19R, 14R (20pmol/µl)	1µl, 1.2µl, 0.4µl, 1.5µl
DNA-Polymerase	0.25µl
DNA (50ng/µl)	3µl
H ₂ O _{bd}	28.55µl
	50µl

8.2.2. h57JDH

10x PCR-Puffer	5µl
dNTPs (2pmol/µl)	5µl
Primer h5F, 7F, 15JF, 15DF, 15HF (20pmol/µl)	1µl, 1µl, 0.4µl, 1µl, 1.5µl
Primer h5R, 7R, 15JR, 15DR, 15FR (20pmol/µl)	1µl, 1µl, 0.4µl, 1µl, 1.5µl
DNA-Polymerase	0.25µl
DNA (50ng/µl)	3µl
H ₂ O _{bd}	26.95µl
	50µl

8.2.3. 11h1ALI

10x PCR-Puffer	5µl
dNTPs (2pmol/µl)	5µl
Primer 11F, h1F, 15AF, 15LF, 15IF (20pmol/µl)	0.5µl, 0.7µl, 1µl, 1µl, 1µl
Primer 11R, h1R, 15AR, 15LR, 15IR (20pmol/µl)	0.5µl, 0.7µl, 1µl, 1µl, 1µl
DNA-Polymerase	0.25µl
DNA (50ng/µl)	3µl
H ₂ O _{bd}	28.35µl
	50µl

8.2.4. 2Mh1T

10x PCR-Puffer	5µl
dNTPs (2pmol/µl)	5µl
Primer 2F, 15MF, h1F, 15TF (20pmol/µl)	1.5µl, 0.7µl, 1µl, 1µl
Primer 2R, 15MR, h1R, 15TR (20pmol/µl)	1.5µl, 0.7µl, 1µl, 1µl
DNA-Polymerase	0.25µl
DNA (50ng/µl)	3µl
H ₂ O _{bd}	28.35µl
	50µl

8.3. HPLC-Gradienten und Retentionszeiten**45h1914**

Zeit (min)	Puffer B (%)	Puffer A (%)	Flow (ml/min)		Retentionszeiten (min)	
0	65	35	0.9	Extinktion 521nm	Exon4	17,15
3	48	52	0.75		Exon5	18,70
10	48	52	0.75	Emission 536nm	Exonh19	19,00
19	35	65	0.75		Exon14	20,03
20	35	65	0.75			
20.1	0	100	0.75			
20.6	0	100	0.75			
20.7	65	35	0.75			

h57JDH

Zeit (min)	Puffer B (%)	Puffer A (%)	Flow (ml/min)		Retentionszeiten (min)	
0	65	35	0.5	Extinktion 495nm	Exonh5	13,40
3	48	52	0.75		Exon7	15,60
8	48	52	0.75	Emission 520nm	Exon15J	17,70
17	35	65	0.75		Exon15D	19,85
18	35	65	0.75		Exon15H	19,30
18.1	0	100	0.75			
18.6	0	100	0.75			
18.7	65	35	0.75			

11h1ALI / 2Mh1T

Zeit (min)	Puffer B (%)	Puffer A (%)	Flow (ml/min)		Retentionszeiten (min)	
0	65	35	0.9	Extinktion 495nm	Exon11	15,10
3	48	52	0.75		Exonh1	18,30
8	48	52	0.75	Emission 520nm	Exon15A	20,30
20	35	65	0.75		Exon15L	21,20
21	35	65	0.75		Exon15I	21,60
21.1	0	100	0.75		Exon2	15,50
21.6	0	100	0.75		Exon15M	17,50
21.7	65	35	0.75		Exon15T	19,15

8.4. Sequenz von APC mit Aminosäuren und Intron-Exon Grenzen

Die Sequenzfolge wird dargestellt. Jede Zeile zeigt 50 Basen und direkt darunter die dazugehörige Übersetzung in Aminosäuren. Die Exongrenzen werden durch Hervorhebung der ersten bzw. letzten Base angezeigt.

1	A TGGCTGCAG	CTTCATATGA	TCAGTTGTTA	AAGCAAGTTG	AGGCACTGAA	50
1	M--A--A--A	--S--Y--D-	-Q--L--L--	K--Q--V--E	--A--L--K-	17
51	GATGGAGAAC	TCAAATCTTC	GACAAGAGCT	AGAAGATAAT	TCCAATCATC	100
18	-M--E--N--	S--N--L--R	--Q--E--L-	-E--D--N--	S--N--H--L	34
101	TTACAAAAC	GGAAACTGAG	GCATCTAATA	TGAA CG AAGT	ACTTAAACAA	150
35	--T--K--L-	-E--T--E--	A--S--N--M	--K--E--V-	-L--K--Q--	50
151	CTACAAGGAA	GTATTGAAGA	TGAAGCTATG	GCTTCTTCTG	GACAGATTGA	200
51	L--Q--G--S	--I--E--D-	-E--A--M--	A--S--S--G	--Q--I--D-	67
201	TTTATTAGAG	CGTCTTAA AG	AG GCTTAACTT	AGATAGCAGT	AATTTCCTCG	250
68	-L--L--E--	R--L--K--E	--L--N--L-	-D--S--S--	N--F--P--G	84
251	GAGTAAACT	GCGGTCAAAA	ATGTCCTCC	GTTCTTATGG	AAGCCGGGAA	300
85	--V--K--L-	-R--S--K--	M--S--L--R	--S--Y--G-	-S--R--E--	100
301	GGATCTGTAT	CAAGCCGTTT	TGGAGAGTGC	AGTCCTGTTC	CTATGGGTTC	350
101	G--S--V--S	--S--R--S-	-G--E--C--	S--P--V--P	--M--G--S-	117
351	ATTCCAAGA	AGAGGGTTTG	TAAATGGAAG	CAGAGAAAGT	ACTGGATATT	400
118	-F--P--R--	R--G--F--V	--N--G--S-	-R--E--S--	T--G--Y--L	134
401	TAGAAGAACT	TGAGAAAGAG	AG CTCATTGC	TTCTTGCTGA	TCTTGACAAA	450
135	--E--E--L-	-E--K--E--	R--S--L--L	--L--A--D-	-L--D--K--	150
451	GAAGAAAAG	AAAAAGACTG	GTATTACGCT	CAACTTCAGA	ATCTCACTAA	500
151	E--E--K--E	--K--D--W-	-Y--Y--A--	Q--L--Q--N	--L--T--K-	167
501	AAGAATAGAT	AGTCTTCCTT	TAACTGAAAA	TT TTTCCTTA	CAAACAGATA	550
168	-R--I--D--	S--L--P--L	--T--E--N-	-F--S--L--	Q--T--D--M	184
551	TGACCAGAAG	GCAATTGGAA	TATGAAGCAA	GGCAAATCAG	AGTTGCGATG	600
185	--T--R--R-	-Q--L--E--	Y--E--A--R	--Q--I--R-	-V--A--M--	200
601	GAAGAACAAC	TAGGTACCTG	CCAGGATATG	GAAAAACGAG	CACA CC GAAG	650
201	E--E--Q--L	--G--T--C-	-Q--D--M--	E--K--R--A	--Q--R--R-	217
651	AATAGCCAGA	ATTCAGCAA	TCGAAAAGGA	CATACTTCGT	ATACGACAGC	700
218	-I--A--R--	I--Q--Q--I	--E--K--D-	-I--L--R--	I--R--Q--L	234
701	TTTTACAGTC	CCAAGCAACA	GAAGCAGA GA	GGTCATCTCA	GAACAAGCAT	750
235	--L--Q--S-	-Q--A--T--	E--A--E--R	--S--S--Q-	-N--K--H--	250
751	GAAACCGGCT	CACATGATGC	TGAGCGGCAG	AATGAAGGTC	AAGGAGTGGG	800
251	E--T--G--S	--H--D--A-	-E--R--Q--	N--E--G--Q	--G--V--G-	267

801	AGAAATCAAC	ATGGCAACTT	CTGGTAATGG	TCAGCGTTC	ACTACACGAA	850
268	-E--I--N--	M--A--T--S	--G--N--G-	-Q--G--S--	T--T--R--M	284
851	TGGACCATGA	AACAGCCAGT	GTTTTGAGTT	CTAGTAGCAC	ACACTCTGCA	900
285	--D--H--E-	-T--A--S--	V--L--S--S	--S--S--T-	-H--S--A--	300
901	CCTCGAAGGC	TGACAAGTCA	TCTGGGAACC	AAEGTGGAAA	TGGTGTATTC	950
301	P--R--R--L	--T--S--H-	-L--G--T--	K--V--E--M	--V--Y--S-	317
951	ATTGTTGTC	ATGCTTGGTA	CTCATGATAA	GGATGATATG	TCGCGAACTT	1000
318	-L--L--S--	M--L--G--T	--H--D--K-	-D--D--M--	S--R--T--L	334
1001	TGCTAGCTAT	GTCTAGCTCC	CAAGACAGCT	GTATATCCAT	GCGACAGTCT	1050
335	--L--A--M-	-S--S--S--	Q--D--S--C	--I--S--M-	-R--Q--S--	350
1051	GGATGTCTTC	CTCTCCTCAT	CCAGCTTTTA	CATGGCAATG	ACAAAGACTC	1100
351	G--C--L--P	--L--L--I-	-Q--L--L--	H--G--N--D	--K--D--S-	367
1101	TGTATTGTTG	GGAAATTCCC	GGGGCAGTAA	AGAGGCTCGG	GCCAGGGCCA	1150
368	-V--L--L--	G--N--S--R	--G--S--K-	-E--A--R--	A--R--A--S	384
1151	GTGCAGCACT	CCACAACATC	ATTCACTCAC	AGCCTGATGA	CAAGAGAGGC	1200
385	--A--A--L-	-H--N--I--	I--H--S--Q	--P--D--D-	-K--R--G--	400
1201	AGGCGTGAAA	TCCGAGTCTC	TCATCTTTTG	GAACAGATAC	GCGCTTACTG	1250
401	R--R--E--I	--R--V--L-	-H--L--L--	E--Q--I--R	--A--Y--C-	417
1251	TGAAACCTGT	TGGGAGTGGC	AGGAAGCTCA	TGAACCAGGC	ATGGACCAGG	1300
418	-E--T--C--	W--E--W--Q	--E--A--H-	-E--P--G--	M--D--Q--D	434
1301	ACAAAAATCC	AAAGCCAGCT	CCTGTTGAAC	ATCAGATCTG	TCCTGCTGTG	1350
435	--K--N--P-	-M--P--A--	P--V--E--H	--Q--I--C-	-P--A--V--	450
1351	TGTTGTTCAA	TGAAACTTTC	ATTTGATGAA	GAGCATAGAC	ATGCAATGAA	1400
451	C--V--L--M	--K--L--S-	-F--D--E--	E--H--R--H	--A--M--N-	467
1401	TGAACTAEGG	GGACTACAGG	CCATTGCAGA	ATTATTGCAA	GTGGACTGTG	1450
468	-E--L--G--	G--L--Q--A	--I--A--E-	-L--L--Q--	V--D--C--E	484
1451	AAATGTACGG	GCTTACTAAT	GACCACTACA	GTATTACTACT	AAGACGATAT	1500
485	--M--Y--G-	-L--T--N--	D--H--Y--S	--I--T--L-	-R--R--Y--	500
1501	GCTGGAATGG	CTTTGACAAA	CTTGACTTTT	GGAGATGTAG	CCAACAAEGC	1550
501	A--G--M--A	--L--T--N-	-L--T--F--	G--D--V--A	--N--K--A-	517
1551	TACGCTATGC	TCTATGAAAAG	GCTGCATGAG	AGCACTTGTG	GCCCAACTAA	1600
518	-T--L--C--	S--M--K--G	--C--M--R-	-A--L--V--	A--Q--L--K	534
1601	AATCTGAAAAG	TGAAGACTTA	CAGCAEGTTA	TTGCAAGTGT	TTTGAGGAAT	1650
535	--S--E--S-	-E--D--L--	Q--Q--V--I	--A--S--V-	-L--R--N--	550
1651	TTGCTTTGGC	GAGCAGATGT	AAATAGTAAA	AAGACGTTGC	GAGAAGTTGG	1700
551	L--S--W--R	--A--D--V-	-N--S--K--	K--T--L--R	--E--V--G-	567
1701	AAGTGTGAAA	GCATTGATGG	AATGTGCTTT	AGAAGTTAAA	AAEGGAATCAA	1750
568	-S--V--K--	A--L--M--E	--C--A--L-	-E--V--K--	K--E--S--T	584
1751	CCCTCAAAAG	CGTATTGAGT	GCCTTATGGA	ATTTGTCAGC	ACATTGCACT	1800
585	--L--K--S-	-V--L--S--	A--L--W--N	--L--S--A-	-H--C--T--	600
1801	GAGAATAAAG	CTGATATATG	TGCTGTAGAT	GGIGCACTTG	CATTTTTGGT	1850
601	E--N--K--A	--D--I--C-	-A--V--D--	G--A--L--A	--F--L--V-	617
1851	TGGCACTCTT	ACTTACCGGA	GCCAGACAAA	CACTTTAGCC	ATTATTGAAA	1900
618	-G--T--L--	T--Y--R--S	--Q--T--N-	-T--L--A--	I--I--E--S	634
1901	GTGGAGGTGG	GATATTACGG	AATGTGTCCA	GCTTGATAGC	TACAAATGAG	1950
635	--G--G--G-	-I--L--R--	N--V--S--S	--L--I--A-	-T--N--E--	650
1951	GACCACAEGC	AAATCCTAAG	AGAGAACAAC	TGCTACAAA	CTTTATTACA	2000
651	D--H--R--Q	--I--L--R-	-E--N--N--	C--L--Q--T	--L--L--Q-	667
2001	ACACTTAAAA	TCTCATAGTT	TGACAATAGT	CAGTAATGCA	TGTGGAACTT	2050
668	-H--L--K--	S--H--S--L	--T--I--V-	-S--N--A--	C--G--T--L	684

2051	TGTGGAATCT	CTCAGCAAGA	AATCCTAAAG	ACCAGGAAGC	ATTATGGGAC	2100
685	--W--N--L-	-S--A--R--	N--P--K--D	--Q--E--A-	-L--W--D--	700
2101	ATGGGGGCGAG	TTAGCATGCT	CAAGAACCTC	ATTCAATTCAA	AGCACAAAAT	2150
701	M--G--A--V	--S--M--L-	-K--N--L--	I--H--S--K	--H--K--M-	717
2151	GATTGCTATG	GGAAGTGCTG	CAGCTTTAAG	GAATTCATG	GCAAATAGGC	2200
718	-I--A--M--	G--S--A--A	--A--L--R-	-N--L--M--	A--N--R--P	734
2201	CTGCGAAGTA	CAAGGATGCC	AATATTATGT	CTCCTGGCTC	AAGCTTGCCA	2250
735	--A--K--Y-	-K--D--A--	N--I--M--S	--P--G--S-	-S--L--P--	750
2251	TCTCTTCATG	TTAGGAAACA	AAAAGCCCTA	GAAGCAGAAT	TAGATGCTCA	2300
751	S--L--H--V	--R--K--Q-	-K--A--L--	E--A--E--L	--D--A--Q-	767
2301	GCACTTATCA	GAAACTTTTG	ACAATATAGA	CAATTTAAGT	CCCAAGGCAT	2350
768	-H--L--S--	E--T--F--D	--N--I--D-	-N--L--S--	P--K--A--S	784
2351	CTCATCGTAG	TAAGCAGAGA	CACAAGCAAA	GTCTCTATGG	TGATTATGTT	2400
785	--H--R--S-	-K--Q--R--	H--K--Q--S	--L--Y--G-	-D--Y--V--	800
2401	TTTGACACCA	ATCGACATGA	TGATAATAGG	TCAGACAATT	TTAATACTGG	2450
801	F--D--T--N	--R--H--D-	-D--N--R--	S--D--N--F	--N--T--G-	817
2451	CAACATGACT	GTCCTTTCAC	CATATTTGAA	TACTACAGTG	TTACCCAGCT	2500
818	-N--M--T--	V--L--S--P	--Y--L--N-	-T--T--V--	L--P--S--S	834
2501	CCTCTTCATC	AAGAGGAAGC	TTAGATAGTT	CTCGTTCTGA	AAAAGATAGA	2550
835	--S--S--S-	-R--G--S--	L--D--S--S	--R--S--E-	-K--D--R--	850
2551	AGTTTGGAGA	GAGAACGCGG	AATTGGTCTA	GGCAACTACC	ATCCAGCAAC	2600
851	S--L--E--R	--E--R--G-	-I--G--L--	G--N--Y--H	--P--A--T-	867
2601	AGAAAATCCA	GGAAGTCTCT	CAAAGCGAGG	TTTGCAGATC	TCCACCACTG	2650
868	-E--N--P--	G--T--S--S	--K--R--G-	-L--Q--I--	S--T--T--A	884
2651	CAGCCCAGAT	TGCCAAAGTC	ATGGAAGAAG	TGTCAGCCAT	TCATACCTCT	2700
885	--A--Q--I-	-A--K--V--	M--E--E--V	--S--A--I-	-H--T--S--	900
2701	CAGGAAGACA	GAAGTTCTGG	GTCTACCACT	GAATTACATT	GTGTGACAGA	2750
901	Q--E--D--R	--S--S--G-	-S--T--T--	E--L--H--C	--V--T--D-	917
2751	TGAGAGAAAT	GCACTTAGAA	GAAGCTCTGC	TGCCCATACA	CATTCAAACA	2800
918	-E--R--N--	A--L--R--R	--S--S--A-	-A--H--T--	H--S--N--T	934
2801	CTTACAATTT	CACTAAGTCG	GAAAATTCAA	ATAGGACATG	TTCTATGCCT	2850
935	--Y--N--F-	-T--K--S--	E--N--S--N	--R--T--C-	-S--M--P--	950
2851	TATGCCAAAT	TAGAATACAA	GAGATCTTCA	AATGATAGTT	TAAATAGTGT	2900
951	Y--A--K--L	--E--Y--K-	-R--S--S--	N--D--S--L	--N--S--V-	967
2901	CAGTAGTAGT	GATGGTTATG	GTAAAAGAGG	TCAAATGAAA	CCCTCGATTG	2950
968	-S--S--S--	D--G--Y--G	--K--R--G-	-Q--M--K--	P--S--I--E	984
2951	AATCCTATTC	TGAAGATGAT	GAAAGTAAGT	TTTGCAGTTA	TGGTCAATAC	3000
985	--S--Y--S-	-E--D--D--	E--S--K--F	--C--S--Y-	-G--Q--Y--	1000
3001	CCAGCCGACC	TAGCCCATAA	AATACATAGT	GCAAATCATA	TGGATGATAA	3050
1001	P--A--D--L	--A--H--K-	-I--H--S--	A--N--H--M	--D--D--N-	1017
3051	TGATGGAGAA	CTAGATACAC	CAATAAATTA	TAGTCTTAAA	TATTCAGATG	3100
1018	-D--G--E--	L--D--T--P	--I--N--Y-	-S--L--K--	Y--S--D--E	1034
3101	AGCAGTTGAA	CTCTGGAAGG	CAAAGTCCTT	CACAGAATGA	AAGATGGGCA	3150
1035	--Q--L--N-	-S--G--R--	Q--S--P--S	--Q--N--E-	-R--W--A--	1050
3151	AGACCCAAAC	ACATAATAGA	AGATGAAATA	AAACAAAGTG	AGCAAAGACA	3200
1051	R--P--K--H	--I--I--E-	-D--E--I--	K--Q--S--E	--Q--R--Q-	1067
3201	ATCAAGGAAT	CAAAGTACAA	CTTATCTGTG	TTATACTGAG	AGCACTGATG	3250
1068	-S--R--N--	Q--S--T--T	--Y--P--V-	-Y--T--E--	S--T--D--D	1084
3251	ATAAACACCT	CAAGTTCCAA	CCACATTTTG	GACAGCAGGA	ATGTGTTTCT	3300
1085	--K--H--L-	-K--F--Q--	P--H--F--G	--Q--Q--E-	-C--V--S--	1100

3301	CCATACAGGT	CACGGGGAGC	CAATGGTTCA	GAAACAAATC	GAGTGGGTTC	3350
1101	P--Y--R--S	--R--G--A-	-N--G--S--	E--T--N--R	--V--G--S-	1117
3351	TAATCATGGA	ATTAATCAAA	ATGTAAGCCA	GTCTTTGTGT	CAAGAAGATG	3400
1118	-N--H--G--	I--N--Q--N	--V--S--Q-	-S--L--C--	Q--E--D--D	1134
3401	ACTATGAAGA	TGATAAGCCT	ACCAATTATA	GTGAACGTTA	CTCTGAAGAA	3450
1135	--Y--E--D-	-D--K--P--	T--N--Y--S	--E--R--Y-	-S--E--E--	1150
3451	GAACAGCATG	AAGAAGAAGA	GAGACCAACA	AATTATAGCA	TAAAATATAA	3500
1151	E--Q--H--E	--E--E--E-	-R--P--T--	N--Y--S--I	--K--Y--N-	1167
3501	TGAAGAGAAA	CGTCATGTGG	ATCAGCCTAT	TGATTATAGT	TTAAAATATG	3550
1168	-E--E--K--	R--H--V--D	--Q--P--I-	-D--Y--S--	L--K--Y--A	1184
3551	CCACAGATAT	TCCTTCATCA	CAGAAACAGT	CATTTTCATT	CTCAAAGAGT	3600
1185	--T--D--I-	-P--S--S--	Q--K--Q--S	--F--S--F-	-S--K--S--	1200
3601	TCATCTGGAC	AAAGCAGTAA	AACCGAACAT	ATGTCCTCAA	GCAGTGAGAA	3650
1201	S--S--G--Q	--S--S--K-	-T--E--H--	M--S--S--S	--S--E--N-	1217
3651	TACGTCCACA	CCTTCATCTA	ATGCCAAGAG	GCAGAATCAG	CTCCATCCAA	3700
1218	-T--S--T--	P--S--S--N	--A--K--R-	-Q--N--Q--	L--H--P--S	1234
3701	GTTCTGCACA	GAGTAGAAGT	GGTCAGCCTC	AAAAGGCTGC	CACTTGCAAA	3750
1235	--S--A--Q-	-S--R--S--	G--Q--P--Q	--K--A--A-	-T--C--K--	1250
3751	GTTTCTTCTA	TTAACCAAGA	AACAATACAG	ACTTATTGTG	TAGAAGATAC	3800
1251	V--S--S--I	--N--Q--E-	-T--I--Q--	T--Y--C--V	--E--D--T-	1267
3801	TCCAATATGT	TTTTCAAGAT	GTAGTTCATT	ATCATCTTTG	TCATCAGCTG	3850
1268	-P--I--C--	F--S--R--C	--S--S--L-	-S--S--L--	S--S--A--E	1284
3851	AAGATGAAAT	AGGATGTAAT	CAGACGACAC	AGGAAGCAGA	TTCTGCTAAT	3900
1285	--D--E--I-	-G--C--N--	Q--T--T--Q	--E--A--D-	-S--A--N--	1300
3901	ACCCTGCAAA	TAGCAGAAAT	AAAAGAAAAG	ATTGGAACTA	GGTCAGCTGA	3950
1301	T--L--Q--I	--A--E--I-	-K--E--K--	I--G--T--R	--S--A--E-	1317
3951	AGATCCTGTG	AGCGAAGTTC	CAGCAGTGTC	ACAGCACCCCT	AGAACCAAAT	4000
1318	-D--P--V--	S--E--V--P	--A--V--S-	-Q--H--P--	R--T--K--S	1334
4001	CCAGCAGACT	GCAGGGTTCT	AGTTTATCTT	CAGAATCAGC	CAGGCACAAA	4050
1335	--S--R--L-	-Q--G--S--	S--L--S--S	--E--S--A-	-R--H--K--	1350
4051	GCTGTGAAT	TTTCTTCAGG	AGCGAAATCT	CCCTCCAAAA	GTGGTGCTCA	4100
1351	A--V--E--F	--S--S--G-	-A--K--S--	P--S--K--S	--G--A--Q-	1367
4101	GACACCCAAA	AGTCCACCTG	AACACTATGT	TCAGGAGACC	CCACTCATGT	4150
1368	-T--P--K--	S--P--P--E	--H--Y--V-	-Q--E--T--	P--L--M--F	1384
4151	TTAGCAGATG	TACTTCTGTC	AGTTCACTTG	ATAGTTTTGA	GAGTCGTTCTG	4200
1385	--S--R--C-	-T--S--V--	S--S--L--D	--S--F--E-	-S--R--S--	1400
4201	ATTGCCAGCT	CCGTTTCAGAG	TGAACCATGC	AGTGGAATGG	TAAGTGGCAT	4250
1401	I--A--S--S	--V--Q--S-	-E--P--C--	S--G--M--V	--S--G--I-	1417
4251	TATAAGCCCC	AGTGATCTTC	CAGATAGCCC	TGACAAACC	ATGCCACCAA	4300
1418	-I--S--P--	S--D--L--P	--D--S--P-	-G--Q--T--	M--P--P--S	1434
4301	GCAGAAGTAA	AACACCTCCA	CCACCTCCTC	AAACAGCTCA	AACCAAGCGA	4350
1435	--R--S--K-	-T--P--P--	P--P--P--Q	--T--A--Q-	-T--K--R--	1450
4351	GAAGTACCTA	AAAATAAAGC	ACCTACTGCT	GAAAAGAGAG	AGAGTGGACC	4400
1451	E--V--P--K	--N--K--A-	-P--T--A--	E--K--R--E	--S--G--P-	1467
4401	TAAGCAAGCT	GCAGTAAATG	CTGCAGTTCA	GAGGGTCCAG	GTTCTTCCAG	4450
1468	-K--Q--A--	A--V--N--A	--A--V--Q-	-R--V--Q--	V--L--P--D	1484
4451	ATGCTGATAC	TTTATTACAT	TTGCCACCGG	AAAGTACTCC	AGATGGATT	4500
1485	--A--D--T-	-L--L--H--	F--A--T--E	--S--T--P-	-D--G--F--	1500
4501	TCTTGTTTCA	CCAGCCTGAG	TGCTCTGAGC	CTCGATGAGC	CATTTATACA	4550
1501	S--C--S--S	--S--L--S-	-A--L--S--	L--D--E--P	--F--I--Q-	1517

4551	GAAAGATGTG	GAATTAAGAA	TAATGCCTCC	AGTTCAGGAA	AATGACAATG	4600
1518	-K--D--V--	E--L--R--I	--M--P--P-	-V--Q--E--	N--D--N--G	1534
4601	GGAATGAAAC	AGAATCAGAG	CAGCCTAAAG	AATCAAATGA	AAACCAAGAG	4650
1535	--N--E--T-	-E--S--E--	Q--P--K--E	--S--N--E-	-N--Q--E--	1550
4651	AAAGAGGCAG	AAAAAACTAT	TGATTCTGAA	AAGGACCTAT	TAGATGATTC	4700
1551	K--E--A--E	--K--T--I-	-D--S--E--	K--D--L--L	--D--D--S-	1567
4701	AGATGATGAT	GATATTGAAA	TACTAGAAGA	ATGTATTATT	TCIGCCATGC	4750
1568	-D--D--D--	D--I--E--I	--L--E--E-	-C--I--I--	S--A--M--P	1584
4751	CAACAAAGTC	ATCACGTAAA	GCAAAAAAGC	CAGCCCAGAC	TGCTTCAAAA	4800
1585	--T--K--S-	-S--R--K--	A--K--K--P	--A--Q--T-	-A--S--K--	1600
4801	TTACCTCCAC	CTGTGGCAAG	GAAACCAAGT	CAGCTGCCTG	TGTACAAACT	4850
1601	L--P--P--P	--V--A--R-	-K--P--S--	Q--L--P--V	--Y--K--L-	1617
4851	TCTACCATCA	CAAAACAGGT	TGCAACCCCA	AAAGCATGTT	AGTTTTACAC	4900
1618	-L--P--S--	Q--N--R--L	--Q--P--Q-	-K--H--V--	S--F--T--P	1634
4901	CGGGGATGA	TATGCCACGG	GTGTATTGTG	TTGAAGGGAC	ACCTATAAAC	4950
1635	--G--D--D-	-M--P--R--	V--Y--C--V	--E--G--T-	-P--I--N--	1650
4951	TTTTCCACAG	CTACATCTCT	AAGTGATCTA	ACAATCGAAT	CCCCTCCAAA	5000
1651	F--S--T--A	--T--S--L-	-S--D--L--	T--I--E--S	--P--P--N-	1667
5001	TGAGTTAGCT	GCTGGAGAAG	GAGTTAGAGG	AGGAGCACAG	TCAGGTGAAT	5050
1668	-E--L--A--	A--G--E--G	--V--R--G-	-G--A--Q--	S--G--E--F	1684
5051	TTGAAAAACG	AGATAACCATT	CCTACAGAAG	GCAGAAGTAC	AGATGAGGCT	5100
1685	--E--K--R-	-D--T--I--	P--T--E--G	--R--S--T-	-D--E--A--	1700
5101	CAAGGAGGAA	AAACCTCATC	TGTAACCATA	CCTGAATTGG	ATGACAATAA	5150
1701	Q--G--G--K	--T--S--S-	-V--T--I--	P--E--L--D	--D--N--K-	1717
5151	AGCAGAGGAA	GGTGATATTC	TTGCAGAATG	CATTAATCTC	GCTATGCCCA	5200
1718	-A--E--E--	G--D--I--L	--A--E--C-	-I--N--S--	A--M--P--K	1734
5201	AAGGGAAAAG	TCACAAGCCT	TTCCGTGTGA	AAAAGATAAT	GGACCAGGTC	5250
1735	--G--K--S-	-H--K--P--	F--R--V--K	--K--I--M-	-D--Q--V--	1750
5251	CAGCAAGCAT	CTGCGTCGTC	TTCTGCACCC	AACAAAAATC	AGTTAGATGG	5300
1751	Q--Q--A--S	--A--S--S-	-S--A--P--	N--K--N--Q	--L--D--G-	1767
5301	TAAGAAAAAG	AAACCAACTT	CACCAGTAAA	ACCTATACCA	CAAATACTG	5350
1768	-K--K--K--	K--P--T--S	--P--V--K-	-P--I--P--	Q--N--T--E	1784
5351	AATATAGGAC	ACGTGTAAGA	AAAAATGCAG	ACTCAAAAAA	TAATTTAAAT	5400
1785	--Y--R--T-	-R--V--R--	K--N--A--D	--S--K--N-	-N--L--N--	1800
5401	GCTGAGAGAG	TTTTCTCAGA	CAACAAAGAT	TCAAAGAAAC	AGAATTTGAA	5450
1801	A--E--R--V	--F--S--D-	-N--K--D--	S--K--K--Q	--N--L--K-	1817
5451	AAATAATTC	AAGGACTTCA	ATGATAAGCT	CCCAAATAAT	GAAGATAGAG	5500
1818	-N--N--S--	K--D--F--N	--D--K--L-	-P--N--N--	E--D--R--V	1834
5501	TCAGAGGAAG	TTTTGCTTTT	GATTACCTC	ATCATTACAC	GCCTATTGAA	5550
1835	--R--G--S-	-F--A--F--	D--S--P--H	--H--Y--T-	-P--I--E--	1850
5551	GGAACTCCTT	ACTGTTTTTC	ACGAAATGAT	TCTTTGAGTT	CTCTAGATTT	5600
1851	G--T--P--Y	--C--F--S-	-R--N--D--	S--L--S--S	--L--D--F-	1867
5601	TGATGATGAT	GATGTTGACC	TTCCAGGGA	AAAGGCTGAA	TTAAGAAAAG	5650
1868	-D--D--D--	D--V--D--L	--S--R--E-	-K--A--E--	L--R--K--A	1884
5651	CAAAAGAAAA	TAAGGAATCA	GAGGCTAAAG	TTACCAGCCA	CACAGAACTA	5700
1885	--K--E--N-	-K--E--S--	E--A--K--V	--T--S--H-	-T--E--L--	1900
5701	ACCTCCAACC	AACAATCAGC	TAATAAGACA	CAAGCTATTG	CAAAGCAGCC	5750
1901	T--S--N--Q	--Q--S--A-	-N--K--T--	Q--A--I--A	--K--Q--P-	1917
5751	AATAAATCGA	GGTCAGCCTA	AACCCATACT	TCAGAAACAA	TCCACTTTTC	5800
1918	-I--N--R--	G--Q--P--K	--P--I--L-	-Q--K--Q--	S--T--F--P	1934

5801	CCCAGTCATC	CAAAGACATA	CCAGACAGAG	GGGCAGCAAC	TGATGAAAAG	5850
1935	--Q--S--S-	-K--D--I--	P--D--R--G	--A--A--T-	-D--E--K--	1950
5851	TTACAGAATT	TTGCTATTGA	AAATACTCCA	GTTTGCTTTT	CTCATAATTC	5900
1951	L--Q--N--F	--A--I--E-	-N--T--P--	V--C--F--S	--H--N--S-	1967
5901	CTCTCTGAGT	TCTCTCAGTG	ACATTGACCA	AGAAAACAAC	AATAAAGAAA	5950
1968	-S--L--S--	S--L--S--D	--I--D--Q-	-E--N--N--	N--K--E--N	1984
5951	ATGAACCTAT	CAAAGAGACT	GAGCCCCCTG	ACTCACAGGG	AGAACCAAGT	6000
1985	--E--P--I-	-K--E--T--	E--P--P--D	--S--Q--G-	-E--P--S--	2000
6001	AAACCTCAAG	CATCAGGCTA	TGCTCCTAAA	TCATTTTCATG	TTGAAGATAC	6050
2001	K--P--Q--A	--S--G--Y-	-A--P--K--	S--F--H--V	--E--D--T-	2017
6051	CCCAGTTTGT	TTCTCAAGAA	ACAGTTCTCT	CAGTTCTCTT	AGTATTGACT	6100
2018	-P--V--C--	F--S--R--N	--S--S--L-	-S--S--L--	S--I--D--S	2034
6101	CTGAAGATGA	CCTGTTGCAG	GAATGTATAA	GCTCCGCAAT	GCCAAAAAAG	6150
2035	--E--D--D-	-L--L--Q--	E--C--I--S	--S--A--M-	-P--K--K--	2050
6151	AAAAAGCCTT	CAAGACTCAA	GGGTGATAAT	GAAAAACATA	GTCCCAGAAA	6200
2051	K--K--P--S	--R--L--K-	-G--D--N--	E--K--H--S	--P--R--N-	2067
6201	TATGGGTGGC	ATATTAGGTG	AAGATCTGAC	ACTTGATTGG	AAAGATATAC	6250
2068	-M--G--G--	I--L--G--E	--D--L--T-	-L--D--L--	K--D--I--Q	2084
6251	AGAGACCAGA	TTCAGAACAT	GGTCTATCCC	CTGATTGAGA	AAATTTTGAT	6300
2085	--R--P--D-	-S--E--H--	G--L--S--P	--D--S--E-	-N--F--D--	2100
6301	TGGAAGCTA	TTCAGGAAGG	TGCAAATTCC	ATAGTAAGTA	GTTTACATCA	6350
2101	W--K--A--I	--Q--E--G-	-A--N--S--	I--V--S--S	--L--H--Q-	2117
6351	AGCTGCTGCT	GCTGCATGTT	TATCTAGACA	AGCTTCGCTC	GATTGAGATT	6400
2118	-A--A--A--	A--A--C--L	--S--R--Q-	-A--S--S--	D--S--D--S	2134
6401	CCATCCTTTC	CCTGAAATCA	GGAATCTCTC	TGGGATCACC	ATTTATCTCT	6450
2135	--I--L--S-	-L--K--S--	G--I--S--L	--G--S--P-	-F--H--L--	2150
6451	ACACCTGATC	AAGAAGAAAA	ACCCTTTACA	AGTAATAAAG	GCCCACGAAT	6500
2151	T--P--D--Q	--E--E--K-	-P--F--T--	S--N--K--G	--P--R--I-	2167
6501	TCTAAAACCA	GGGGAGAAAA	GTACATTGGA	AACTAAAAAG	ATAGAATCTG	6550
2168	-L--K--P--	G--E--K--S	--T--L--E-	-T--K--K--	I--E--S--E	2184
6551	AAAGTAAAGG	AATCAAAGGA	GGAAAAAAG	TTTATAAAG	TTTGATTACT	6600
2185	--S--K--G-	-I--K--G--	G--K--K--V	--Y--K--S-	-L--I--T--	2200
6601	GGAAAAGTTC	GATCTAATTC	AGAAAATTCA	GGCCAAATGA	AACAGCCCCT	6650
2201	G--K--V--R	--S--N--S-	-E--I--S--	G--Q--M--K	--Q--P--L-	2217
6651	TCAAGCAAAC	ATGCCTTCAA	TCTCTCGAGG	CAGGACAATG	ATTCATATTC	6700
2218	-Q--A--N--	M--P--S--I	--S--R--G-	-R--T--M--	I--H--I--P	2234
6701	CAGGAGTTCG	AAATAGCTCC	TCAAGTACAA	GTCCGTGTTT	TAAAAAAGGC	6750
2235	--G--V--R-	-N--S--S--	S--S--T--S	--P--V--S-	-K--K--G--	2250
6751	CCACCCCTTA	AGACTCCAGC	CTCCAAAAGC	CCTAGTGAAG	GTCAAACAGC	6800
2251	P--P--L--K	--T--P--A-	-S--K--S--	P--S--E--G	--Q--T--A-	2267
6801	CACCCTTCT	CCTAGAGGAG	CCAAGCCATC	TGTGAAATCA	GAATTAAGCC	6850
2268	-T--T--S--	P--R--G--A	--K--P--S-	-V--K--S--	E--L--S--P	2284
6851	CTGTTGCCAG	GCAGACATCC	CAAATAGGTG	GGTCAAGTAA	AGCACCTTCT	6900
2285	--V--A--R-	-Q--T--S--	Q--I--G--G	--S--S--K-	-A--P--S--	2300
6901	AGATCAGGAT	CTAGAGATTC	GACCCCTTCA	AGACCTGCCC	AGCAACCATT	6950
2301	R--S--G--S	--R--D--S-	-T--P--S--	R--P--A--Q	--Q--P--L-	2317
6951	AAGTAGACCT	ATACAGTCTC	CTGGCCGAAA	CTCAATTTC	CCTGGTAGAA	7000
2318	-S--R--P--	I--Q--S--P	--G--R--N-	-S--I--S--	P--G--R--N	2334
7001	ATGGAATAAG	TCCTCCTAAC	AAATTATCTC	AACTTCCAAG	GACATCATCC	7050
2335	--G--I--S-	-P--P--N--	K--L--S--Q	--L--P--R-	-T--S--S--	2350

7051	CCTAGTACTG	CTTCAACTAA	GTCCTCAGGT	TCTGAAAAA	TGTCATATAC	7100
2351	P--S--T--A	--S--T--K-	-S--S--G--	S--G--K--M	--S--Y--T-	2367
7101	ATCTCCAGGT	AGACAGATGA	GCCAACAGAA	CCTTACCAA	CAAACAGGTT	7150
2368	-S--P--G--	R--Q--M--S	--Q--Q--N-	-L--T--K--	Q--T--G--L	2384
7151	TATCCAAGAA	TGCCAGTAGT	ATTCCAAGAA	GTGAGTCTGC	CTCCAAGGA	7200
2385	--S--K--N-	-A--S--S--	I--P--R--S	--E--S--A-	-S--K--G--	2400
7201	CTAAATCAGA	TGAATAATGG	TAATGGAGCC	AATAAAAAGG	TAGAACTTTC	7250
2401	L--N--Q--M	--N--N--G-	-N--G--A--	N--K--K--V	--E--L--S-	2417
7251	TAGAATGTCT	TCAACTAAAT	CAAGTGAAG	TGAATCTGAT	AGATCAGAAA	7300
2418	-R--M--S--	S--T--K--S	--S--G--S-	-E--S--D--	R--S--E--R	2434
7301	GACCTGTATT	AGTACGCCAG	TCAACTTTCA	TCAAAGAAGC	TCCAAGCCCA	7350
2435	--P--V--L-	-V--R--Q--	S--T--F--I	--K--E--A-	-P--S--P--	2450
7351	ACCTTAAGAA	GAAAATTGGA	GGAATCTGCT	TCATTTGAAT	CTCTTTCTCC	7400
2451	T--L--R--R	--K--L--E-	-E--S--A--	S--F--E--S	--L--S--P-	2467
7401	ATCATCTAGA	CCAGCTTCTC	CCACTAGGTC	CCAGGCACAA	ACTCCAGTTT	7450
2468	-S--S--R--	P--A--S--P	--T--R--S-	-Q--A--Q--	T--P--V--L	2484
7451	TAAGTCTTTC	CCTTCCTGAT	ATGTCTCTAT	CCACACATTC	GTCTGTTCAG	7500
2485	--S--P--S-	-L--P--D--	M--S--L--S	--T--H--S-	-S--V--Q--	2500
7501	GCTGGTGGAT	GGCGAAAAC	CCCACCTAAT	CTCAGTCCCA	CTATAGAGTA	7550
2501	A--G--G--W	--R--K--L-	-P--P--N--	L--S--P--T	--I--E--Y-	2517
7551	TAATGATGGA	AGACCAGCAA	AGCGCCATGA	TATTGCACGG	TCTCATTCTG	7600
2518	-N--D--G--	R--P--A--K	--R--H--D-	-I--A--R--	S--H--S--E	2534
7601	AAAGTCCITC	TAGACTTCCA	ATCAATAGGT	CAGGAACCTG	GAAACGTGAG	7650
2535	--S--P--S-	-R--L--P--	I--N--R--S	--G--T--W-	-K--R--E--	2550
7651	CACAGCAAAC	ATTCAATC	CCTTCCTCGA	GTAAGCACTT	GGAGAAGAAC	7700
2551	H--S--K--H	--S--S--S-	-L--P--R--	V--S--T--W	--R--R--T-	2567
7701	TGGAAGTTCA	TCTTCAATTC	TTTCTGCTTC	ATCAGAATCC	AGTGAAAAAG	7750
2568	-G--S--S--	S--S--I--L	--S--A--S-	-S--E--S--	S--E--K--A	2584
7751	CAAAAAGTGA	GGATGAAAA	CATGTGAACT	CTATTTTCAGG	AACCAAACAA	7800
2585	--K--S--E-	-D--E--K--	H--V--N--S	--I--S--G-	-T--K--Q--	2600
7801	AGTAAAGAAA	ACCAAGTATC	CGCAAAAGGA	ACATGGAGAA	AAATAAAAAGA	7850
2601	S--K--E--N	--Q--V--S-	-A--K--G--	T--W--R--K	--I--K--E-	2617
7851	AAATGAATTT	TCTCCCACAA	ATAGTACTTC	TCAGACCGTT	TCCTCAGGTG	7900
2618	-N--E--F--	S--P--T--N	--S--T--S-	-Q--T--V--	S--S--G--A	2634
7901	CTACAAATGG	TGCTGAATCA	AAGACTCTAA	TTTATCAAAT	GGCACCTGCT	7950
2635	--T--N--G-	-A--E--S--	K--T--L--I	--Y--Q--M-	-A--P--A--	2650
7951	GTTTCTAAAA	CAGAGGATGT	TTGGGTGAGA	ATTGAGGACT	GTCCCATTA	8000
2651	V--S--K--T	--E--D--V-	-W--V--R--	I--E--D--C	--P--I--N-	2667
8001	CAATCCTAGA	TCTGGAAGAT	CTCCCACAGG	TAATACTCCC	CCGGTGATTG	8050
2668	-N--P--R--	S--G--R--S	--P--T--G-	-N--T--P--	P--V--I--D	2684
8051	ACAGTGTTC	AGAAAAGGCA	AATCCAAACA	TTAAAGATTC	AAAAGATAAT	8100
2685	--S--V--S-	-E--K--A--	N--P--N--I	--K--D--S-	-K--D--N--	2700
8101	CAGGCAAAAC	AAAATGTGGG	TAATGGCAGT	GTTCCCATGC	GTACCGTGGG	8150
2701	Q--A--K--Q	--N--V--G-	-N--G--S--	V--P--M--R	--T--V--G-	2717
8151	TTTGGAAAAT	CGCCTGAACT	CCTTTATTCA	GGTGGATGCC	CCTGACCAAA	8200
2718	-L--E--N--	R--L--N--S	--F--I--Q-	-V--D--A--	P--D--Q--K	2734
8201	AAGGAAGTGA	GATAAACCA	GGACAAAATA	ATCTGTCTCC	TGTATCAGAG	8250
2735	--G--T--E-	-I--K--P--	G--Q--N--N	--P--V--P-	-V--S--E--	2750
8251	ACTAATGAAA	GTTCTATAGT	GGAACGTACC	CCATTCAGTT	CTAGCAGCTC	8300
2751	T--N--E--S	--S--I--V-	-E--R--T--	P--F--S--S	--S--S--S-	2767

8301	AAGCAAACAC	AGTTCACCTA	GTGGGACTGT	TGCTGCCAGA	GTGACTCCTT	8350
2768	-S--K--H--	S--S--P--S	--G--T--V-	-A--A--R--	V--T--P--F	2784
8351	TTAATTACAA	CCCAAGCCCT	AGGAAAAGCA	GCGCAGATAG	CACTTCAGCT	8400
2785	--N--Y--N-	-P--S--P--	R--K--S--S	--A--D--S-	-T--S--A--	2800
8401	CGGCCATCTC	AGATCCCAAC	TCCAGTGAAT	AACAACACAA	AGAAGCGAGA	8450
2801	R--P--S--Q	--I--P--T-	-P--V--N--	N--N--T--K	--K--R--D-	2817
8451	TTCCAAAAC	GACAGCACAG	AATCCAGTGG	AACCCAAAGT	CCTAAGCGCC	8500
2818	-S--K--T--	D--S--T--E	--S--S--G-	-T--Q--S--	P--K--R--H	2834
8501	ATTCTGGGTC	TTACCTTGTG	ACATCTGT	TT	AA	
2835	--S--G--S-	-Y--L--V--	T--S--V--*	--		

8.5. Homologien von APC-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies

Die folgende Tabelle zeigt die Homologien der Aminosäuresequenz zwischen Mensch (homoAS), Maus (musAS) und Xenopus (xenoAS). Die graue Unterlegung indiziert die homologen Aminosäuren.

	1				50
homoAS	MAAASYDQLL	KQVEALKMEN	SNLRQELEDN	SNHLTKLETE	ASNMKVELKQ
musAS	MAAASYDQLL	KQVEALKMEN	SNLRQELEDN	SNHLTKLETE	ASNMKVELKQ
xenoAS	MAAASYDQLV	KQVEALTMEN	TNLRQELEDN	SNHLTKLETE	ATNMKVELKQ
	51				100
homoAS	LQGSIEDEAM	ASSGQIDLLE	RLKELNLDSS	NFPGVKLRSK	MSLSYSGSRE
musAS	LQGSIEDETM	TS.GQIDLLE	RLKEFNLDSS	NFPGVKLRSK	MSLSYSGSRE
xenoAS	LQGSIEDEAM	ASSGPIDLLE	RFKDLNLDSS	NIPAGKARPK	MMSRSYSGSRE
	101				150
homoAS	GSVSSRSGEC	SPVPMGSFPR	RGFVNGSRES	TGYLEELEKE	RSLLLADLDK
musAS	GSVSSRSGEC	SPVPMGSFPR	RTFVNGSRES	TGYLEELEKE	RSLLLADLDK
xenoAS	GSLSGHSGEC	SPVPVGSFOR	RGLLNGSRES	AGYMEELEKE	RLLLIAEHEK
	151				200
homoAS	EEKEKDWYYA	QLQNLTKRID	SLPLTENFSL	QTMTRRQLE	YEARQIRVAM
musAS	EEKEKDWYYA	QLQNLTKRID	SLPLTENFSL	QTMTRRQLE	YEARQIRAAAM
xenoAS	EEKEKRWYYA	QLQNLTKRID	SLPLTENFSM	QTMTRRQLE	YEARQIRAAAM
	201				250
homoAS	EEQLGTCQDM	EKRAQRRIAR	IQQIEKDILR	IRQLLQSQAT	EA.ERSSQNK
musAS	EEQLGTCQDM	EKRAQRRIAR	IQQIEKDILR	VRQLLQSQAA	EA.ERSSQSR
xenoAS	EEQLGTCQDM	EKRVTQTRVGK	IHQIEEEILR	IRQLLQSQVA	EAAERTPQSK
	251				300
homoAS	HETGSHDAER	QNEGQGVGEI	NMATSG.NGO	GSTRMDHET	ASVLSSSSTH
musAS	HDAASHEAGR	QHEGHGVAES	NTAASS.SGO	SPATRVDHET	ASVLSSSGTH
xenoAS	HDAGSRDAEK	LPDGGQTSEI	TASGNVGSQ	GSSSRADHDT	TSMSSNSTY
	301				350
homoAS	SAPRRLTSHL	GTKVEMVYSL	LSMLGTHDKD	DMSRTLLAMS	SSQDSCISMR
musAS	SAPRRLTSHL	GTKVEMVYSL	LSMLGTHDKD	DMSRTLLAMS	SSQDSCISMR
xenoAS	SVPRRLTSHL	GTKVEMVYSL	LSMLGTHDKD	DMSRTLLAMS	SSQDSCIAMR
	351				400
homoAS	QSGCLPLLIQ	LLHGNDKDSV	LLGNSRGSKE	ARARASAALH	NIIHSQPDDK
musAS	QSGCLPLLIQ	LLHGNDKDSV	LLGNSRGSKE	ARARASAALH	NIIHSQPDDK
xenoAS	QSGCLPLLIQ	LLHGNDKDSV	LLGNSRGSKE	ARASGSAALD	NIIHSQPDDK
	401				450
homoAS	RGRREIRVLH	LLEQIRAYCE	TCWEWQEAHE	PGMDQDKNPM	PAPVEHQICP
musAS	RGRREIRVLH	LLEQIRAYCE	TCWEWQEAHE	QGMDQDKNPM	PAPVEHQICP
xenoAS	RGRREIRVLH	LLEQIRAYCE	TCWEWQEAHE	QGMDQDKNPM	PAPVDHQICP
	451				500
homoAS	AVCVLMKLSF	DEEHRHAMNE	LGGLQAI AEL	LQVDCEMYGL	TNDHYSITLR
musAS	AVCVLMKLSF	DEEHRHAMNE	LGGLQAI AEL	LQVDCEMYGL	TNDHYSVTLR
xenoAS	AVCVLMKLSF	DEEHRHAMNE	LGGLQAI AEL	LQVDCEMYGL	INDHYSVTLR

	501				550
homoAS	RYAGMALTNL	TFGDVANKAT	LCSMKGCMRA	LVAQLKSESE	DLQQVIASVL
musAS	RYAGMALTNL	TFGDVANKAT	LCSMKGCMRA	LVAQLKSESE	DLQQVIASVL
xenoAS	RYAGMALTNL	TFGDVANKAT	LCSMKSCMRA	LVAQLKSESE	DLQQVIASVL
	551				600
homoAS	RNLSWRADV	SKKTLREVGS	VKALMECALE	VKKESTLKS	LSALWNLSAH
musAS	RNLSWRADV	SKKTLREVGS	VKALMECALE	VKKESTLKS	LSALWNLSAH
xenoAS	RNLSWRADV	SKKTLREVGS	VKALMECALD	VKKESTLKS	LSALWNLSAH
	601				650
homoAS	CTENKADICA	VDGALAFVVG	TLTYRSQTNT	LAIIESGGGI	LRNVSSLIAT
musAS	CTENKADICA	VDGALAFVVG	TLTYRSQTNT	LAIIESGGGI	LRNVSSLIAT
xenoAS	CTENKADICS	VDGALAFVVS	TLTYRSQTNT	LAIIESGGGI	LRNVSSLIAT
	651				700
homoAS	NEDHRQILRE	NNCLQTLLOH	LKSHSLTIVS	NACGTLWNLS	ARNPKDQEAL
musAS	NEDHRQILRE	NNCLQTLLOH	LKSHSLTIVS	NACGTLWNLS	ARNPKDQEAL
xenoAS	NEDHRQILRE	NNCLQTLLOH	LKSHSLTIVS	NACGTLWNLS	ARNAKDQEG
	701				750
homoAS	WDMGAVSMK	NLIHSHKHKMI	AMGSAAALRN	LMANRPAYK	DANIMSPGSS
musAS	WDMGAVSMK	NLIHSHKHKMI	AMGSAAALRN	LMANRPAYK	DANIMSPGSS
xenoAS	WDMGAVSMK	NLIHSHKHKMI	AMGSAAALRN	LMANRPAYK	DANIMSPGSS
	751				800
homoAS	LPSLHVRKQK	ALEAELDAQH	LSETFDNIDN	LSPKASHRSK	QRHKQSLYGD
musAS	LPSLHVRKQK	ALEAELDAQH	LSETFDNIDN	LSPKASHRSK	QRHKQSLYGD
xenoAS	VPSLHVRKQK	ALEAELDAQH	LSETFDNIDN	LSPKTTHRNK	QRHKQNLCS
	801				850
homoAS	YVFDITNRHDD	..NRSDNFNT	GNMTVLSPYL	NTTVLPSSSS	SRGSLDSSRS
musAS	YAFDANRHDD	..SRSDNFNT	GNMTVLSPYL	NTTVLPSSSS	SRGSLDSSRS
xenoAS	YALDSSRHDD	SICRSDFNSI	GNLTVLSPYI	NTTVLPSSSS	PRPTMDGSRP
	851				900
homoAS	EKDRSLERER	GIGLGNYHPA	TENPGTSSKR	GLQISTTAAQ	IAKVMEEVSA
musAS	EKDRSLERER	GIGLSAYHPT	TENAGTSSKR	GLQITTTAAQ	IAKVMEEVSA
xenoAS	EKDR.....ER	TAGLGNYHST	TSSSGNSSKR	IGIQLSTTAAQ	ISKVMDEVSN
	901				950
homoAS	IHTSQEDRSS	GSTTELHCVT	DERNALRRSS	AAHTHSNTYN	FTKSENSNRT
musAS	IHTSQDDRSS	ASTTEFHCV	DDRSAARRSS	ASHTHSNTYN	FTKSENSNRT
xenoAS	IHLVQENRSS	GSASEMHCMS	DERNSORKPS	SNHPQSNPFT	FTKAESSSTRG
	951				1000
homoAS	CSMPYAKLEY	KRSSNDSLNS	VSSSDGYGKR	GQMKPSIESY	SEDESKEFCS
musAS	CSMPYAKVEY	KRSSNDSLNS	VTSSDGYGKR	GQMKPSVESY	SEDESKEFCS
xenoAS	CPVAFMKMEY	KMASNDSLNS	VSSTEGYGKR	GQVKPSVESY	SEDESKEFFS
	1001				1050
homoAS	YGQYPADLAH	KIHSANHMDD	NDGELDTPIN	YSLKYSDEQL	NSGRQSPSQN
musAS	YGQYPADLAH	KIHSANHMDD	NDGELDTPIN	YSLKYSDEQL	NSGRQSPSQN
xenoAS	YGQYPAGLAH	KIQSANHMDD	NDTELDTPIN	YSLKYSDEQL	NSGRQSPSQN
	1051				1100
homoAS	ERWARPKHII	EDEIKQSEQR	QSRNQSTTYP	VYTESTDDKH	LKFQPHFGQQ
musAS	ERWARPKHVI	EDEIKQNEQR	QARSQNTSYP	VYSENTDDKH	LKFQPHFGQQ
xenoAS	ERWSRPKHII	DSEMKQSEQR	QPRTTKITYS	SYTENKEEKH	KKFPPHFNQS
	1101				1150
homoAS	ECVSPYR.SR	GANGSE.TNR	VGSNHGINQN	VSQSLCQEDD	YEDDKPTNYS
musAS	ECVSPYR.SR	GTSGSE.TNR	MGSSHAINQN	VNQSQCQEDD	YEDDKPTNYS
xenoAS	ENVPAYTRSR	GANNQVDQSR	VSSNLSNNSK	ASKPHCQVDD	YDDDKTTNFS
	1151				1200
homoAS	ERYSEEEQHE	EEE.RPTNYS	IKYNE.EKRH	VDQPIDYSLK	YATDIPSSQ.
musAS	ERYSEEEQHE	EEEEERPTNYS	IKYNE.EKHH	VDQPIDYSLK	YATDISSSQ.
xenoAS	ERYSEEEQHE	DETERQNKYN	IKAYASEEHH	GEQPIDYSRK	YSTDVPSSAQ
	1201				1250
homoAS	KQSFQSKSS	SGQSSKTEHM	SSSENTSTP	SSNAKRONQL	HPSSAQSRSG
musAS	KPSFQSKSNS	SAQSTKPEHL	SPSSENTAVP	PSNAKRONQL	RPSSAQ.RNG
xenoAS	KPSEFPYNS	SKQPKKEQV	SSNS.NTPP	SPNSNRQNL	HPNSAQSRPG

	1251				1300
homoAS	QPQ.KAATCK	VSSINQETIQ	TYCVEDTPIC	FSRCSLSSL	SSAEDEI.GC
musAS	QTQ.KGITCK	VPSINQETIQ	TYCVEDTPIC	FSRCSLSSL	SSADDEI.GC
xenoAS	LNRPKQIPNK	PPSINQETIQ	TYCVEDTPIC	FSRGSLSLSSL	SSAEDEIEGR
	1301				1350
homoAS	NQTTQEADSA	NTLQIAEIKE	KTGTRSAEDP	VSEVPAVSQH	PRTKSSRLQG
musAS	DQTTQEADSA	NTLQTAEVKE	NDVTRSAEDP	ATEVPAVSQN	ARAKPSRLQA
xenoAS	ERNRSGQESN	NTLQITEPKE	.TSAVSKDGA	VNETRSSVHH	TRTKNNRLQT
	1351				1400
homoAS	SSLS.SESAR	H.KAVEFSSG	AKSPSKSGAQ	TPKSPPEHYV	QETPLMFSRC
musAS	SGLS.SESTR	HNKAVEFSSG	AKSPSKSGAQ	TPKSPPEHYV	VFSRC
xenoAS	SNISPSDSSR	H.KSVEFSSG	AKSPSKSGAQ	TPKSPPEHYV	QETPLMFSRC
	1401				1450
homoAS	TSVSSLDSFE	SRSIASSVQS	.EPCSGMVSG	IISPDLPDS	PGQTMPPSRS
musAS	TSVSSLDSFE	SRSIASSVQS	.EPCSGMVSG	IISPDLPDS	PGQTMPPSRS
xenoAS	TSGSSLDSFE	SHSIASSIAS	SVASEHMISG	IISPDLPDS	PGQTMPPSRS
	1451				1500
homoAS	KTPPPPPQTA	QTKREVPKNK	APTAEKRESG	PKQAAVNAAV	QRVQVLPDAD
musAS	KTPPPPPQTV	QAKREVPKSK	VPAAEKRESG	PKQTAVNAAV	QRVQVLPDAD
xenoAS	KTPPPP.QTV	QAKKDGSKPI	VPDEERK..	VAKTAVHSAI	QRVQVLPQAD
	1501				1550
homoAS	TLHFATEST	PDGFSCSSSL	SALSLEPFI	QKDVELRIMP	PVQENDNGNE
musAS	TLHFATEST	PDGFSCSSSL	SALSLEPFI	QKDVELRIMP	PVQENDNGNE
xenoAS	TLHFATEST	PDGFSCASSL	SALSLEPYI	QKDVQLKIMP	PVLENDQGNK
	1551				1600
homoAS	TESEQPKESN	ENQEKAEKT	IDSEKDLLDD	SDDDDIEILE	ECIISAMPTK
musAS	TESEQPEESN	ENQDKEVEK.	PDSEKDLLDD	SDDDDIEILE	ECIISAMPTK
xenoAS	AEP.E..KEFI	DNKAKKEDKR	SEQEKDMLDD	T.DDDIDILE	ECIISAMPRK
	1601				1650
homoAS	SSRKAKKPAQ	TAS.KLPPPV	ARKPSQLPVY	KLLPSQNRLQ	PQKHVSFTPG
musAS	SSRKAKKLAQ	TAS.KLPPPV	ARKPSQLPVY	KLLPAQNRLQ	AQKHVSFTPG
xenoAS	PSRKNKVPQ	PTPGKPPPV	ARKPSQLPVY	KLLSSQNRLQ	TQKHVNFTHS
	1651				1700
homoAS	DDMPRVYCVE	GTPINFSTAT	SLSDLTIESP	PNELAAGEGV	RGGAQSSEFE
musAS	DDVPRVYCVE	GTPINFSTAT	SLSDLTIESP	PNELATGDGV	RAGIQSSEFE
xenoAS	DDMPRVYCVE	GTPINFSTAT	SLSDLTIESP	PSEPTN.DQP	NTDSLSTDLE
	1701				1750
homoAS	KRDTIPTEGR	STDEAQGGKT	SSVTIPELDD	NKAEEDGILA	ECINSAMPKG
musAS	KRDTIPTEGR	STDDAQRGKI	SSIVTPDLDD	NKAEEDGILA	ECINSAMPKG
xenoAS	KRDTIPTEGR	STDDTDASKP	LNPTT.VLDE	DKAEEDGILA	ECIHSAMPKG
	1751				1800
homoAS	KSHKPFVRVK	IMDQVQASA	SSSAPN.KNQ	LDGKKKPTS	PVKPIPQNT
musAS	KSHKPFVRVK	IMDQVQASS	TSSGAN.KNQ	VDTKKKKPTS	PVKPMPQNT
xenoAS	KSHKPYRVK	IMDQINHTSA	ATSSGNSRSM	QETDKNKPTS	PVKPMPQSIG
	1801				1850
homoAS	YRTRVRKNAD	SKNNLNAERV	FSDNKDSKKQ	NLKNNSKDFN	DKLPNNEDRV
musAS	YRTRVRKNAD	SKVNVNTEET	FSDNKDSKKP	SLQTNAKAFN	EKLPNNEDRV
xenoAS	FKERLKKNTE	LKLNPNSENO	YCD...PRKE	SSKKPSKVAN	EKIPNNEERT
	1851				1900
homoAS	RGSFADFSPH	HYTPIEGTPY	CFSRNDLSLSS	LDFFDDDDVDL	SREKAELRKA
musAS	RGTFALDSPH	HYTPIEGTPY	CFSRNDLSLSS	LDFFDDDDVDL	SREKAELRKG
xenoAS	KG.FADFSPH	HYTPIEGTPY	CFSRNDLSLSS	LDFFEDDDIDL	SKEKAELRKE
	1901				1950
homoAS	KENKSEAKV	TSHTELTSNQ	QSANKTQAI	KQPINRGQPK	PILOKQSTFP
musAS	KESKDSEAKV	TCRPEPNSSQ	QAASKSQASI	KHPANRAQSK	PVLQKQPTFP
xenoAS	KGTKDTQKV	KYKHENRAIN	PMGKQDQTP	KSLGGRDQPK	ALVQKPTSEFS
	1951				2000
homoAS	QSSKDIIDPRG	AATDEKLQNF	AIENTPVCF	HNSSLSSLSD	IDQENNN.KE
musAS	QSSKDGIDPRG	AATDEKLQNL	AIENTPVCF	RNSSLSSLSD	IDQENNNKE
xenoAS	SAAKGTQDRG	GATDEKMENF	AIENTPVCF	RNSSLSSLSD	IDQENNN.KE

	2001				2050
homoAS	NEPIKETEP	DSQGEPSKPQ	ASGYAPKSFH	VEDTPVCFSR	NSSLSSLSID
musAS	SEPIKEAEP	NSQGEPSKPQ	ASGYAPKSFH	VEDTPVCFSR	NSSLSSLSID
xenoAS	TEPLKQTGTS	ETQLGLRRPQ	TSGYAPKSFH	VEDTPVCFSR	NSSLSSLSID
	2051				2100
homoAS	SEDDLQECI	SSAMPKKKRP	SRLKGDNEKH	SPRNMGGILG	E...DLTLDLK
musAS	SEDDLQECI	SSAMPKKKRP	SRLKSESEKQ	SPRKVGGILA	E...DLTLDLK
xenoAS	SEDDLQECI	SSAMPKKKRP	SKIKNEVVGKS	RSNSVGGILA	EEDLTLDLR
	2101				2150
homoAS	DIQRPDSEHG	LSPDSENFWD	KAIQEGANSI	VSSLHQ.AAA	AACLSRQASS
musAS	DLQRPDSEHA	FSPGSENFWD	KAIQEGANSI	VSSLHQAAA	AACLSRQASS
xenoAS	DIQSPDSENA	FSPDSENFWD	KAIQEGANSI	VSRLHQ.AAA	AGLSRQGSS
	2151				2200
homoAS	DSDSILSLKS	GISLGSPPHL	TPDQEEKPFT	SNKGPRIKLP	GEKSTLETKK
musAS	DSDSILSLKS	GISLGSPPHL	TPDQEEKPFT	SNKGPRIKLP	GEKSTLEAKK
xenoAS	DSDSILSLKS	GISLGSPPHL	TLDKEEKTIT	SNKGPRIKLP	AEKSALENKK
	2201				2250
homoAS	IESESCKGK	GKKVYKSLIT	GKVRNSSEIS	GQMKOPLQAN	MPSISRGRM
musAS	IESENKGIK	GKKVYKSLIT	GKIRNSSEIS	SQMKOPLPTN	MPSISRGRM
xenoAS	TEEPKGIK	GKKVYKSLIT	GKSRSSDF	SHCKQSVQTN	MPSISRGRM
	2251				2300
homoAS	IHIPGVRNSS	SSTSPVSKKG	PPLKTPASKS	PSEGQTATTS	PRGAKPSVKS
musAS	IHIPGLRNSS	SSTSPVSKKG	PPLKTPASKS	PSEGGATTS	PRGKTPAGKS
xenoAS	IHIPGVRASS	PSTSPVSKKG	PVFKNVPSKG	SNENPSSSSS	PKGTKPL.KS
	2301				2350
homoAS	ELSPVARQTS	QIGGSSKAPS	RSGSRDSTPS	RPAQOPLSRP	IQSPGRNSIS
musAS	ELSPITRQTS	QISGSSKGS	RSGSRDSTPS	RPTQOPLSRP	MQSPGRNSIS
xenoAS	ELVYGRPSS	TPGGSSKGN	RSGSRDSASS	RPSPOPLSRP	LQSPGRNSIS
	2351				2400
homoAS	PGRNGISPPN	KLSQLPRTSS	PSTASTKSSG	SGKMSYTPSG	RQMSQQNLTK
musAS	PGRNGISPPN	KLSQLPRTSS	PSTASTKSSG	SGKMSYTPSG	RQLSQQNLTK
xenoAS	PGKNGISPPN	KFSQLPRTTS	PSTASTKSSG	SGRMSYTPSG	RQLSQPNLSK
	2401				2450
homoAS	QTGLSKNASS	IPRSESASKG	LNQMNNGNGA	NKKVELSRMS	STKSSGSESD
musAS	QASLSKNASS	IPRSESASKG	LNQMSNNGNS	NKKVELSRMS	STKSSGSESD
xenoAS	QSGLPKTHSS	IPRSESASKS	LNQNVN.TGS	NKKVELSRMS	STKSSGSESD
	2451				2500
homoAS	RSERPVLVRQ	STFIKEAPSP	TLRRKLEESA	SFESLSPSSR	PASPTRSQAQ
musAS	SSERPALVRQ	STFIKEAPSP	TLRRKLEESA	SFESLSPSSR	PDSPTRSQAQ
xenoAS	RSERPALVRQ	STFIKEAPSP	TLRRKLEESA	SFESLSSSSR	ADSPFRSQIQ
	2501				2550
homoAS	TPVLSPLPD	MSLSTHSSVQ	AGGWRKLPPN	LSPTIEYNDG	RPAKRHDIAI
musAS	TPVLSPLPD	MSLSTHPSVQ	AGGWRKLPPN	LSPTIEYNDG	RPTKRHDIAI
xenoAS	TPALSPLPD	MALSTH.SIQ	AGGWRKMPPN	LNPAAEHGDS	R...RRHDIAR
	2551				2600
homoAS	SHSESPSRLP	INRSGTWKRE	HSKHSSSLPR	VSTWRRTGSS	SSILSASSES
musAS	SHSESPSRLP	INRAGTWKRE	HSKHSSSLPR	VSTWRRTGSS	SSILSASSES
xenoAS	SHSESPSRLP	ITRSGTWKRE	HSKHSSSLPR	VSTWRRTGSS	SSILSASSES
	2601				2650
homoAS	SEKAKSEDEK	.HVNSISGK	QSKENQVSAK	GTWRKIKENE	FSP.TN.STSQ
musAS	SEKAKSEDER	.HVSMPAPR	QMKENQVPTK	GTWRKIKESD	ISPTG.MASQ
xenoAS	SEKAKSEDEK	QQVCSFPGPR	S...ECSSAK	GTWRKIKESE	ILETPSNGSS
	2651				2700
homoAS	TVSSGATNGA	ESKTLIYQMA	PAVSKTEDVW	VRIEDCPINN	PRSGRSPTGN
musAS	SASSGAASGA	ESKPLIYQMA	PPVSKTEDVW	VRIEDCPINN	PRSGRSPTGN
xenoAS	STIAESNCSL	ESKTLVYQMA	PAVSKTEDVW	VRIEDCPINN	PRSGRSPTGN
	2701				2750
homoAS	TPPVIDSVSE	KANPNIKDSK	DNQ...AKQN	VGNGSVPMRT	VGLENRNLSF
musAS	TPPVIDSVSE	KGSSSIKDSK	DSKDHGKQS	VGSG.SPVTI	VGLETRLNSF
xenoAS	SPPVIDNVLD	QQQ.KEEAAK	DCH...TRHN	SGNG...NV	PLENRQKSF

	2751				2800
homoAS	IQVDAPDQKG	TEIKPGQNNP	VPVSETNESS	IVERTPFSSS	SSSKHSSPSG
musAS	VQVEAPEQKG	TEAKPGQSNP	VSIAETAETC	IAERTPFSSS	SSSKHSSPSG
xenoAS	LKVDGLDTKG	TDPKSLINN.	..QQETNENT	VAERTAFSSS	SSSKHSSPSG
	2801				2850
homoAS	TVAARVTPFN	YNPSPRKSSA	DSTSARPSQI	PTPVNNNTKK	RDSKTDSTES
musAS	TVAARVTPFN	YNPSPRKSSA	DSTSARPSQI	PTPVSTNTKK	RDSKTDITES
xenoAS	TVAARVTPFN	YNPSPRKSNP	ENSTSARPSQI	PTPVTNSTKK	RDSKTETIDS
	2851		2868		
homoAS	SGTQSPKRHS	GSYLVTSV			
musAS	SGAQSPKRHS	GSYLVTSV			
xenoAS	SGSQSPKRHS	GSYLVTSV			

8.6. Absolutwerte

h57JDH

1. Ansatz nach 24 Zyklen		h5	7	15J	15D	15H
Kontrollen	K1	472284	583531	367828	351393	265297
	K2	555398	652524	486308	375380	290269
	K3	424618	536993	340460	337396	235644
	K4	241087	372413	161810	207759	132814
	K5	511611	654172	402832	420063	280553
Patienten	Pat.A	481463	591822	408013	394794	300734
	Pat.B	311060	535357	278596	330530	253275
	Pat.C	197290	304778	141760	182288	135268
	Pat.D	448033	298742	173922	170592	133587
	Pat.E	1031320	660885	465820	374427	254807
	Pat.F	520167	695318	437331	418940	268613
	Pat.G	472186	537716	384764	351974	262760
2. Ansatz nach 24 Zyklen						
Kontrollen	K6	192783	614354	424483	306303	237432
	K7	94304	361596	175241	183518	117763
	K1	103286	348827	171341	176084	135699
	K8	91389	240544	104920	123156	74275
	K9	277177	491558	475572	233083	212155
Patienten	Pat.H	175769	512263	132276	120821	108237
	Pat.I	131956	419758	143157	104673	90210
	Pat.K	139896	419243	236633	236011	167819
	Pat.L	143962	440656	242333	242812	181903
	Pat.M	163046	503700	270149	253073	180343

1. Ansatz nach 30 Zyklen		H5	7	J	D	H
Kontrollen	K1	2379762	1371660	1434660	659702	634078
	K3	2199402	1243940	1337659	625185	566840
	K4	1971901	1087920	961902	508825	433417
	K8	2523688	1414907	1267628	781079	597217
	K10	3085918	1414998	1812575	716184	662726
Patienten	Pat.A	2631382	1526969	1776133	887487	798421
	Pat.B	2409317	1569901	1593897	827293	747330
	Pat.C	2090588	1364161	1315737	682283	623424
	Pat.D	2943680	815731	824701	319622	297687
	Pat.E	2099516	665961	697458	307433	285935
	Pat.F	2394578	1595976	1587349	869995	638207
	Pat.G	2080569	1146787	1187919	689408	505120
2. Ansatz nach 30 Zyklen						
Kontrollen	K6	2664791	1147501	1717743	707577	509997
	K7	2334846	1141539	1442166	671470	427334
	K1	2185155	1028361	1278398	574017	418449
	K8	2380378	1040894	1211459	681862	442389

	K9	2468272	1070017	1601292	729833	493666
Patienten	Pat.H	3355722	1585496	963782	377051	291134
	Pat.I	3056417	1210194	834941	271846	214426
	Pat.K	2339717	1107283	1494479	727705	509791
	Pat.L	2430343	1173139	1626712	769354	513417
	Pat.M	2506945	1280177	1618538	788189	493786

45h1914

1. Ansatz nach 22 Zyklen		4	5	h19	14
Kontrollen	K1	268697	171326	203194	152007
	K2	283810	162785	194255	148953
	K3	272378	166045	212929	144766
	K11	352215	202704	242656	161340
	K10	562054	282369	318268	168060
Patienten	Pat.A	362707	176354	204173	130232
	Pat.B	100969	80128	97595	60629
	Pat.C	81966	47285	55749	52635
	Pat.D	101564	45415	129288	54341
	Pat.E	33061	16257	46241	18852
	Pat.F	352215	202704	242656	161340
	Pat.G	198902	91659	137696	51200
2. Ansatz nach 22 Zyklen					
Kontrollen	K6	321867	331997	142264	412516
	K7	240132	238914	103381	301865
	K1	357355	363752	144046	449481
	K12	280011	295138	102862	350817
	K9	223202	205847	108457	234368
Patienten	Pat.H	556345	539102	236979	255243
	Pat.I	319517	349378	125003	171870
	Pat.K	220782	232418	38328	299146
	Pat.L	167381	195793	79115	261275
	Pat.M	280011	295138	102862	350817
	Pat.E	411079	429875	359287	480422

1. Ansatz nach 30 Zyklen		4	5	h19	14
Kontrollen	K1	855310	210554	604700	106216
	K2	833116	151327	523015	99941
	K4	1379105	312696	1053245	328025
	K11	1624148	384040	1196268	384092
	K10	1853902	466491	1351291	392977
Patienten	Pat.A	1239706	263561	1030022	241917
	Pat.B	1511691	316557	904048	239222
	Pat.C	1283070	322362	890269	233333
	Pat.D	961470	241534	1379293	213190
	Pat.E	662048	211693	1185584	206064
	Pat.F	1624148	384040	1196268	384092
	Pat.G	1034232	262503	968068	141004
2. Ansatz nach 30 Zyklen					
Kontrolle	K12	1607091	559002	1454802	582869
	K7	1824297	766548	1712064	724319
	K1	1598507	596800	1456583	642775
	K13	1700744	592401	1749841	645450
	K9	753719	231613	573422	162271
Patienten	Pat.H	1732678	691569	1679105	306604
	Pat.I	1464992	562720	1375240	164210
	Pat.K	1847496	777466	899185	770573
	Pat.L	1700744	592401	1749841	645450
	Pat.M	1607091	559002	1454802	582869

11h1ALI

1. Ansatz nach 22 Zyklen		11	h1	15A	15L	15I
Kontrollen	K1	199821	318922	172278	179692	300179
	K2	252618	329510	186918	185160	304000
	K3	101009	193900	117725	151803	213463
	K4	59334	110000	63612	90919	108289
	K11	68110	129251	80978	104717	128011
Patienten	Pat.A	77750	154372	92365	131801	173396
	Pat.B	40998	88157	46004	74114	96460
	Pat.C	25926	47244	20745	38714	46981
	Pat.D	26603	89089	27525	31380	41077
	Pat.E	192318	516989	169707	191840	288003
	Pat.F	68110	129251	80978	104717	128011
	Pat.G	146086	281535	155200	184077	281256
2. Ansatz nach 22 Zyklen						
Kontrollen	K12	51591	135554	94825	119837	143297
	K7	161796	333629	176518	189954	291606
	K1	68801	181158	113205	132048	183630
	K8	16780	40418	25095	28839	32805
	K13	40191	133382	64390	99533	122374
Patienten	Pat.H	14694	95480	26385	50635	60837
	Pat.I	42808	126880	31717	54110	70136
	Pat.K	30080	112465	57077	83819	98239
	Pat.L	40191	133382	64390	99533	122374
	Pat.M	51591	135554	94825	119837	143297

1. Ansatz nach 28 Zyklen		11	h1	15A	15L	15I
Kontrollen	K1	1553131	995719	440785	247699	407716
	K2	1761272	787181	433881	189930	328139
	K3	1601387	737669	451059	296689	447914
	K4	1199626	651497	433744	313756	456340
	K5	2043252	429313	563007	337722	526535
Patienten	Pat.A	1925776	953943	499746	256714	425445
	Pat.B	1474456	835949	477931	282835	450194
	Pat.C	1220672	735948	389721	277454	412885
	Pat.D	1352266	899781	308717	186430	275863
	Pat.E	1300518	995785	466484	316101	468489
	Pat.F	2572110	1038015	614030	345276	511050
	Pat.G	1769225	1067257	481834	246726	412939
2. Ansatz nach 28 Zyklen						
Kontrollen	K6	2371589	994071	539282	251942	395849
	K7	1668903	861441	515413	316213	479200
	K1	1853420	997433	484227	249337	391481
	K8	1382305	669178	474587	306432	436049
	K9	2560378	871768	618408	295603	470328
Patienten	Pat.H	1575836	910840	454929	330223	452085
	Pat.I	2059181	917396	193690	103054	162618
	Pat.K	1558650	858214	479848	300251	436459
	Pat.L	1209082	563610	298407	110902	202219
	Pat.M	1971669	1013575	592898	345070	508922

2Mh1T

1. Ansatz nach 22 Zyklen		2	15M	h1	15T
Kontrollen	K2	222954	178034	172344	99969
	K3	236108	166928	172929	113890
	K4	284624	209201	215481	145616
	K12	332355	270343	207303	161033
	K10	609657	518843	338742	330016
Patienten	Pat.A	365552	283653	245598	191306
	Pat.B	208125	151840	133356	97424

	Pat.C	112021	89147	83440	58777
	Pat.D	116064	107128	156126	65965
	Pat.E	58851	48145	70362	29522
	Pat.F	177028	145994	139378	88856
	Pat.G	523897	937768	642389	714318
	Pat.M	332355	270343	207303	161033
2. Ansatz nach 22 Zyklen					
Kontrollen	K6	576597	578489	344049	392022
	K7	247506	182608	130808	132459
	K1	198716	142791	135453	94339
	K8	310120	426576	162537	309994
	K13	269640	216980	171656	152601
Patienten	Pat.H	304032	123304	129366	81290
	Pat.I	381749	135673	241844	112845
	Pat.K	295146	235397	179875	165956
	Pat.L	269640	216980	171656	152601

1. Ansatz nach 28 Zyklen		2	15M	h1	15T
Kontrollen	K1	430547	1379369	760294	623876
	K2	326631	1181649	632694	550152
	K3	380713	1728227	781118	738154
	K4	399877	1543835	767836	721407
	K5	315811	1422407	461165	659027
Patienten	Pat.A	430035	1898665	917774	862594
	Pat.B	512543	1665744	762379	750825
	Pat.C	415122	1290765	651564	602617
	Pat.D	250806	955106	749871	438431
	Pat.E	313613	1593195	1377426	694657
	Pat.F	435889	1694715	825753	724370
	Pat.G	302442	1675658	790927	792499
2. Ansatz nach 28 Zyklen					
Kontrollen	K6	353603	1615970	605692	719073
	K7	521468	1464731	700605	682840
	K1	413815	1496973	707210	686531
	K8	512388	1268047	551275	643420
	K9	489746	1301533	435086	621844
Patienten	Pat.H	833736	1131021	765453	514681
	Pat.I	633705	993565	860948	433476
	Pat.K	546490	1662592	831719	806362
	Pat.L	545024	1706288	851203	760399
	Pat.M	505212	1716622	775635	758850

Kontrollen

Kontrollen A1-11 nach 24Zyklen	h5	7	15J	15D	15H
A1	532173	430382	332321	124494	120823
A2	513652	422898	328992	122243	118908
A3	510978	417736	327840	121268	118404
A4	502758	409151	319999	118091	116639
A5	483342	405448	314260	117403	116337
A6	476810	387597	310952	116153	114332
A7	457796	386382	310292	114762	114219
A8	455782	384149	307852	112457	105670
A9	452860	384069	302800	112091	105495
A10	452240	378210	298280	108534	104935
A11	423500	363155	290515	103644	102331
Kontrollen A1-11 nach 30 Zyklen					
A1	2689835	1550827	1450033	430262	352017
A2	2372350	1337438	1187513	307803	244221
A3	2391198	1369517	1241249	362948	277556
A4	2558380	1502960	1312252	338896	257950
A5	2242512	1516778	1358492	371656	296734
A6	2577659	1589379	1381645	392575	320485
A7	2184413	1380415	1217713	320603	246581

A8	1918654	1086442	898821	217117	165955
A9	2035522	1204741	976881	244762	181680
A10	1472225	996012	841845	210525	165750
A11	1387859	902329	751606	170964	141489

Kontrollen K11 nach 22 Zyklen	4	5	h19	14
K1	252418	180516	160486	78714
K2	375857	236370	182063	99260
K3	177129	137682	125582	86170
K4	287748	207436	177501	103923
K5	226399	151502	122175	86585
K6	218006	156429	131146	108129
K7	154798	121476	101864	76623
K8	217938	139128	128462	67020
K9	300508	202846	183343	138676
K10	91411	68660	40385	51113
K11	91958	74723	58977	51628
Kontrollen A1-11 nach 30 Zyklen				
K1	2108549	943213	1067832	621461
K2	2033535	869443	883985	523130
K3	1586204	725529	844459	480963
K4	1878548	889054	956731	619473
K5	1542294	714295	665936	421140
K6	1806936	869945	833537	532594
K7	1308670	730242	618747	447474
K8	1561342	798522	873139	526490
K9	1847424	849860	855850	531078
K10	1877860	937861	1018918	610344
K11	1177248	642948	624562	355050

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Schritte der kolorektalen Karzinomentwicklung	8
Abb. 2: Chromosom 5 mit Lokalisation der Bande 5q21-22 und dem APC-Gen.....	11
Abb. 3: Darstellung der genomischen Intron-Exon-Struktur des APC-Gens (Exons 1-15).....	11
Abb. 4: Reihenfolge der 5'Exons im Genom	12
Abb. 5.: Schematische Darstellung von acht der neun alternativen Isoformen von APC.....	12
Abb. 6: Verteilung der Keimbahnmutationen im APC-Gen	13
Abb. 7: Verteilung der somatischen Mutationen im APC-Gen in kolorektalen Tumoren	13
Abb. 8: Position und Typ der zweiten Mutation in FAP-Polypen	15
Abb. 9: APC-Protein mit funktionellen Domänen	18
Abb. 10: Wnt-Signalweg	19
Abb. 11: Die mitotischen Spindeln im Verhältnis zu APC.....	20
Abb. 12: Schematische Darstellung unterschiedlicher APC-Proteine.....	21
Abb. 13: Wnt-Signalweg	22
Abb. 14: Möglicher Mechanismus der Tumorentstehung durch APC-Mutationen	24
Abb. 15: Auftrennung von PCR-Produkten auf einem Agarosegel.	38
Abb. 16: Darstellung der HPLC-Analyse des Ansatzes h57JDH.....	41
Abb. 17: Darstellung der Multiplex-Ansätze auf einem Agarose-Gel	42
Abb. 18: Reihe von h57JDH	43
Abb. 19: Reihe von 45h1914.....	44
Abb. 20: Reihe von 11h1ALI	44
Abb. 21: Reihe von 2Mh1T.....	45
Abb. 22: Boxplots aus den Absolutwerten der Kurvenflächen nach 24 Zyklen	46
Abb. 23: Boxplots aus den Absolutwerten der Kurvenflächen nach 30 Zyklen	47
Abb. 24: Boxplots aus den Exonverhältnissen von h57JDH nach 24 Zyklen	48
Abb. 25: Boxplots aus den Exonverhältnissen von h57JDH nach 30 Zyklen	49
Abb. 26: Boxplots aus den Exonrelationen des Multiplex-Ansatzes 45h1914 nach 22 Zyklen.....	50
Abb. 27: Boxplots aus den Exonrelationen des Multiplex-Ansatzes 45h1914 nach 24 Zyklen.....	51
Abb. 28: Graphische Darstellung der Exondeletionen von h57JDH nach 24 Zyklen.....	54
Abb. 29: Graphische Darstellung der Exondeletionen von h57JDH nach 30 Zyklen.....	55
Abb. 30: Graphische Darstellung der Exondeletionen von 45h1914 nach 22 Zyklen	56
Abb. 31: Graphische Darstellung der Exondeletionen von 45h1914 nach 30 Zyklen	58
Abb. 32: Graphische Darstellung der Exondeletionen von 11h1ALI nach 22 Zyklen.....	59
Abb. 33: Graphische Darstellung der Exondeletionen von 11h1ALI nach 28 Zyklen.....	61
Abb. 34: Graphische Darstellung der Exondeletionen von 2h1MT nach 22 Zyklen	62
Abb. 35: Graphische Darstellung der Exondeletionen von 2h1MT nach 28 Zyklen	63
Abb. 36: Darstellung der Multiplex-Ansätze auf einem Agarose-Gel	67
Abb. 37: Alle Reihen der vier Multiplex-Ansätze.....	68
Abb. 38: Boxplots aus den Integralen der Kurvenflächen nach 24 Zyklen.....	71
Abb. 39: Boxplots aus den Integralen der Kurvenflächen nach 30 Zyklen.....	71
Abb. 40: Boxplots aus den Exonverhältnissen von h57JDH nach 24 Zyklen	72
Abb. 41: Boxplots aus den Exonverhältnissen von h57JDH nach 30 Zyklen	72
Abb. 42: Boxplots aus den Exonrelationen des Multiplex-Ansatzes 45h1914 nach 22 Zyklen.....	73
Abb. 43: Boxplots aus den Exonrelationen des Multiplex-Ansatzes 45h1914 nach 30 Zyklen.....	74
Abb. 44: APC-Gen mit Mutationsspektrum, klinischer Korrelation und Protein-Struktur.....	80

9.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Erblich bedingte Krebsformen	3
Tab. 2: FAP-Formen und Charakteristika von FAP	9
Tab. 3: Vorsorgeplan bei Verdacht auf FAP	10
Tab. 4: Formen von FAP mit typischer Mutationslokalisierung	15
Tab. 5: Zusammensetzung der Multiplex-Ansätze.....	42
Tab. 6: Weitere Multiplex-Ansätze	42
Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse nach 22 bzw. 24 Zyklen.....	64
Tab. 8: Zusammenfassung der Ergebnisse nach 28 bzw. 30 Zyklen.....	64
Tab. 9 Übersicht über die Analysezyklen der Multiplex-Ansätze.....	69
Tab. 10: Zusammenfassung der Ergebnisse nach 22 bzw. 24 Zyklen.....	76
Tab. 11: Zusammenfassung der Ergebnisse nach 28 bzw. 30 Zyklen.....	77
Tab. 12: Gegenüberstellung der Ergebnisse des frühen und späten Zyklus.	78
Tab. 13: Zusammenfassung der bisher in der Literatur beschriebenen APC-Deletionen	81
Tab. 14: Vergleich HPLC mit Fragmentgelanalyse	82

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Murken und Frau PD Dr. Holinski-Feder für die gute Betreuung.

Ich danke Frau PD Dr. Holinski-Feder für die hervorragende Zusammenarbeit und alle ihre produktiven Denkanstöße.

Ich danke Brigitte, die mir immer zur Seite stand, wenn es Probleme gab und mich in die Mysterien der HPLC-Analyse einweihte.

Ich danke Birgit, Maria und Christa für die anregenden Diskussionen, die mich dem Ziel immer ein Stück näher gebracht haben.

Ich danke allen Mitarbeitern am Institut für Humangenetik für jeden guten Rat und alle aufbauenden Worte. Jede noch so dumme Frage wurde mir mit endloser Geduld beantwortet.

Ich danke meinen Eltern, die mir meine Studien ermöglicht haben und mir immer tatkräftig zur Seite stehen.

Ich danke Kay, der unendliche Geduld mit mir und meinen Launen hatte und immer aufbauende Worte fand.

Ich danke Felix für die computertechnischen Ratschläge, ohne die ich noch in drei Jahren formatieren würde.

Ich danke allen, die mich seelisch, physisch und moralisch unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am Institut der Humangenetik am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

München, den 31.07.2004

Anne Ostendorf

Lebenslauf

Anne Ostendorf
Winthirstr. 18
80639 München

Tel.: 089/13013113
Handy: 0179/5023393
e-mail: anne.ostendorf@gmx.de

geboren am 10.12.1973 in München

1980-84 Grundschule Ismaning (Landkreis München)
1984-94 humanistisches Maximiliansgymnasium München
1991 dreimonatiger USA-Aufenthalt als Austauschschülerin
1994 Abitur (Note 1,8)

Biologie-Studium

10/94 Beginn des Biologie-Studiums an der Albert-Ludwig-Universität Freiburg
10/96 Vordiplom (Note 2,4)
 Wechsel an die Ludwig-Maximilian-Universität München
1-9/99 Diplomarbeit (Thema: Kopplungsanalyse bei Familien mit X-gekoppelter menta-
 ler Retardierung)
11/99 Diplom (Note 1,2)

Medizin-Studium

11/97 Beginn des Medizin-Studiums an der Ludwig-Maximilian-Universität München
3/99 Physikum (Note 2,3)
3/00 Erstes Staatsexamen (Note 2,0)
4/00 Famulatur im Krankenhaus Neuwittelsbach in München (Innere Medizin)
8/00 Famulatur im Kreiskrankenhaus Starnberg (Pädiatrie)
9-10/00 Famulatur im Medizinisch Genetischen Zentrum (Humangenetische Praxis)
3/01 Famulatur im Royal Prince Alfred's Hospital in Sydney/Australien (Anästhesie)
3/02 Zweites Staatsexamen (Note 2,0)
4/02-3/03 Praktisches Jahr
 1. Terial: Chirurgie im Krankenhaus Neuperlach
 2. Terial: Innere Medizin in der Poliklinik der LMU München
 3. Terial: Pädiatrie im Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München
4/03 Drittes Staatsexamen (Note 1,0)
10/03 Beginn als ÄiP im Medizinisch Genetischen Zentrum München (derzeit tätig am
 Kinderkrankenhaus St. Marien in Landshut)

Seit Januar 2000 Doktorarbeit mit dem Thema "*Etablierung und Evaluierung eines PCR-basierten Deletionsscreenings zum Nachweis genomischer Deletionen am Beispiel des APC-Gens*" am Institut für Humangenetik am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München.