

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

**Untersuchung der Gene *OGG1*, *MTH1* und *MUTYH* und  
ihrer Rolle in der Entstehung von hyperplastischen  
Polypen und kolorektalen Karzinomen**

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

vorgelegt von  
Helena Sykora  
aus  
Karpogori

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl. chem., Elke Holinski-Feder

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Susanna Müller  
Priv. Doz. Dr. Astrid Konrad-Zerna

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Fr. Dr. rer.nat. M. Morak

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

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2013

meinen lieben Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 DNA-Reparaturmechanismen	13
1.1.1 MMR	15
1.1.2 BER	16
1.2 Komponenten der 8-oxo-G Reparatur und der BER	19
1.2.1 MUTYH	19
1.2.2 OGG1	21
1.2.3 MTH1 oder NUDT1	24
2 Ziel der Arbeit	26
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Patientenkollektiv	28
3.1.2 Patientenmaterial	28
3.1.3 Chemikalien und andere Materialien	28
3.1.4 Kits	29
3.1.5 Längenstandards	29
3.1.6 Puffer und Lösungen	29
3.2 Methoden	30
3.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut	30
3.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	31
3.2.3 DNA-Verdünnung	31
3.2.4 DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.2.5 Gelelektrophorese	35
3.2.6 Reinigung und Extraktion von PCR-Produkten	35
3.2.7 DNA-Sequenzierung	35
3.2.8 Sequenzanalyse	36
3.2.9 Bestätigung	36
3.2.10 in silico Analysen und Web-basierte Datenbanken	37

4 Ergebnisse	38
4.1 OGG1-Gen Analyse	39
4.1.1 Exon 1	40
4.1.2 Exon 2	42
4.1.3 Exon 3	42
4.1.4 Exon 4	44
4.1.5 Exon 5	44
4.1.6 Exon 6	45
4.1.7 Exon 7	47
4.1.8 Kontrollgruppe I und II	49
4.1.9 Exon 7a (alternativ)	50
4.1.10 Exon 8	50
4.2 MTH1	51
4.2.1 Exon 1	51
4.2.2 Exon 2	51
4.2.3 Exon 3	53
4.2.4 Exon 4	53
4.3 Alle Einzelergebnisse für das gesamte Patientenkollektiv	56
5 Diskussion	57
5.1 Mutationsbewertung in OGG1	59
5.1.1 Mutationslokalisierung	59
5.1.2 Bewertung der Mutation c.29G>T; p.Arg10Leu	59
5.1.3 Bewertung der Mutation c.923G>A; p.Gly308Glu	60
5.1.4 Bewertung der Mutation c.137G>C; p.Arg46Gln	61
5.1.5 Sequenzvergleiche mit anderen Spezies	64
5.1.6 Bewertung der Mutation c.386-31C>T	65
5.1.7 Bewertung der Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys	66
5.1.8 Zusammenfassung der OGG1-Mutationen	68
5.2 Mutationsbewertung in MTH1	69
5.2.1 Mutationslokalisierung	69
5.2.2 Bewertung der Mutation c.102C>T; p.Gly34Gly und c.111C>T; p.Gly37Gly	70
5.2.3 Bewertung der Mutation c.346A>T; p.Met116Leu	70

5.2.4 Sequenzvergleiche mit anderen Spezies	71
5.2.5 Zusammenfassung	73
5.3 Literaturübersicht bisher veröffentlichter Mutationen	73
6 Zusammenfassung	77
Anhang	79
Anhang 1: Untersuchungsergebnisse der OGG1 Sequenzierung	79
Anhang 2: Untersuchungsergebnisse der MTH1 Sequenzierung	81
Anhang 3: Untersuchungsergebnisse der Kontrollgruppen I und II	84
Anhang 4: Primer	86
Anhang 5: Veröffentlichung der Dissertationsergebnisse	87
Literaturverzeichnis	88
Danksagung	100

# Abkürzungsverzeichnis

8-oxo-G	7,8-Dihydro-8-oxo-2-Desoxyguanin/(8-Hydroxyguanin)
A.	Aspergillus
AP-Läsion	apurinische/apyrimidinische Stelle in der DNA
AS	Aminosäure
ascend.	ascendens
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
C.	Candida
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>D.r.</i>	<i>Dario rerio</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
Endo	Endonuklease
Exo	Exonuklease
FA	Familienanamnese
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
h	Stunde(n)
hetero	heterozygot
<i>HGMD</i>	<i>Human Gene Mutation Database</i>
<i>HhH</i>	<i>Helix-hairpin-Helix</i>
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom
homo	homozygot
kb	Kilobasen
K.E.	Koliektomie
KRK	Kolorektales Karzinom
li.	links
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
MAP	MUTYH assoziierte familiäre adenomatöse Polyposis
MCRA	Multiple kolorektale Adenome

MGZ	Medizinisch Genetisches Zentrum München
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mult.	multiple
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
min	Minute(n)
<i>M.m.</i>	<i>Mus musculus</i>
MMR	Mismatch-Reparatur
neg.	negativ
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
o.B.	ohne Befund
OGG1	8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase 1
pat.	pathologisch
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSIC	<i>Position-Specific Independent Counts</i>
re.	rechts
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
<i>R. n.</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sec	Sekunde(n)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
tub.	tubuläres
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
U / min	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp
<i>X. tr.</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>



# 1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt mit jährlich mehr als 70.000 Neuerkrankungen in Deutschland die zweithäufigste bösartige Tumorerkrankung dar. Etwa 30.000 Menschen versterben jährlich an den Folgen der Erkrankung (Schmiegel et al., 2009). Kolon- oder Rektumkarzinome sind etwa die Hälfte dieser Erkrankungen. Männer sind ca. 1,4-fach häufiger betroffen als Frauen (Holinski-Feder et al., 2006; Holinski-Feder et al., 2008).

Nicht erblich bedingte sporadisch auftretende Tumore werden durch eine Anhäufung von Mutationen in Genen verursacht, die eine Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus haben oder an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind. Genetische Veränderungen liegen bei sporadischer Tumorgenese in den übrigen Körperzellen nicht vor (Rahner et al., 2008).

Etwa 5% aller auftretenden kolorektalen Karzinome sind erblich bedingt (Harper, 2004; Rahner et al., 2008), 20% folgen polygenen Erbgängen oder sind durch exogene Einflüsse bedingt, die Übrigen sind vermutlich sporadisch entstanden.

Monogen erbliche Erkrankungen sind durch eine Keimbahnmutation in einem Gen bedingt und stellen eine Prädisposition für viele bekannte erbliche Tumorsyndrome dar. Die betroffenen Gene sind in der Regel an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt oder haben eine Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus (Rahner et al., 2008).

Bei den genetisch bedingten KRK sind verschiedene Entstehungsmechanismen bekannt. Die am besten charakterisierten erblichen Kolonkarzinomerkrankungen sind die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), das auch die Häufigste ist.

Die FAP ist die häufigste kolorektale Polyposis mit vielen 100-1.000 Polypen. Unbehandelt beträgt das KRK-Risiko nahezu 100% (Friedl et al., 2001; Galiatsatos et al., 2006).

Im Kontrast zu HNPCC ist FAP charakterisiert durch die Entwicklung von einer Vielzahl von Polypen im Kolon der Patienten. Die Polypen können bereits im Kindesalter gefunden werden, wobei im Alter von 30 Jahren die Zahl der Polypen dann bereits zwischen 100 und 1.000 liegt.

Die familiäre adenomatöse Polyposis kann vom Phänotyp her unterteilt werden in die klassische Form, die attenuierte Form und die atypische FAP (Aretz, 2010; Holinski-Feder et al., 2010).

Die drei Formen werden dabei wie folgt charakterisiert (Sieber et al., 2003; Aretz et al., 2006; Morak et al., 2010a).

**Klassische familiäre adenomatöse Polyposis (FAP):**

- Über 100 Adenome, vor dem 35. Lebensjahr
- Phänotyp bei *APC*-Mutation: extraintestinale Manifestationen (Osteome, Desmoide, Kongenitale Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels).

**Attenuierte FAP (aFAP):**

- Über 100 kolorektale Adenome nach dem 45. Lebensjahr.
- 10-100 Adenome nach dem 25. Lebensjahr.

**Atypische FAP (atFAP):**

- Patienten mit über 100 Adenomen zwischen dem 35. und 40. Lebensjahr.
- Patienten mit über 1000 Adenomen im hohen Lebensalter.
- Patienten mit weniger als 10 Adenomen.

Wie der Abbildung 1 zu entnehmen ist, besteht auch ein Zusammenhang zwischen der *MUTYH*-assoziierten Polyposis (MAP) und den verschiedenen Formen der FAP.

***MUTYH*-assoziierte Polyposis (MAP):**

- Es liegt auf beiden Allelen des *MUTYH*-Gens eine Kombination vor.
- Biallelische *MUTYH*-Mutationen homozygot oder *compound*-heterozygot
- klinische Manifestation ist sehr variabel (Morak et al., 2010a).
- Die Vererbung erfolgt autosomal-rezessiv (Betroffene in einer Generation).

In den klassischen FAP-Fällen sind Keimbahnmutationen im Tumorsupressor-Gen *APC* (Adenomatöse Polyposis Coli) in 80% verantwortlich für die Entwicklung des Phänotyps. Die Mehrzahl dieser Mutationen sind Nonsense- oder Frameshift-Mutationen und führen zu einem trunkierten Genprodukt. Bei den Patienten mit attenuierter Polyposis (aFAP) findet man in ca 5% der Fälle Mutationen im *APC*-Gen und in ca. 30% der Fälle Keimbahnmutationen auf beiden Allelen des *MUTYH*-Gens (Jones et al., 2002; Sieber et al., 2003; Aceto et al., 2005; Holinski-Feder et al., 2010).

Der Erbgang von Mutationen im *APC*-Gen erfolgt nach dem autosomal dominanten Schema. Es gibt zudem eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen der Position der Mutation im Gen und der Schwere der Erkrankung bzw. der Entwicklung von zusätzlichen Tumoren in anderen Organen (Spirio et al., 1993; Ficari et al., 2000).

Das *APC*-Genprodukt hat eine „Türsteher“-Funktion bei der Kontrolle des Zellwachstums. Die Inaktivierung des Proteins führt zu einer unregulierten Zellteilung der Kolonwandzellen und damit letztendlich zur Entstehung des Tumors (Kinzler et al., 1996).

Die Beteiligung eines weiteren Pfades bei der Entwicklung von FAP wurde durch die Mutationsanalyse des *APC*-Gens in Tumoren entdeckt (Al-Tassan et al., 2002). Es zeigte sich, dass die im *APC*-Gen vorliegenden somatischen Mutationen zum Großteil C:G-A:T Transversionen waren. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass der 7,8-dihydro-8-oxo-2-Desoxyguanosin (8-oxo-G)-Reparaturmechanismus gestört ist.

Dieser Reparaturmechanismus heißt *BER* (*base excision repair*), und es sind drei Genprodukte (*MUTYH*, *MTH1* und *OGG1*) bereits bekannt, die an diesem Mechanismus beteiligt sind.

Hinsichtlich der genetischen Ursachen sind FAP-Patienten in drei Gruppen zu unterscheiden (Holinski-Feder et al., 2010):

- Patienten mit einer Keimbahnmutation im *APC*-Gen.
- Patienten mit Keimbahnmutationen in beiden Allelen des *MUTYH*-Gens.
- Patienten ohne nachweisbare Mutation in diesen Genen.

Das HNPCC-Syndrom mit wenigen Polypen betrifft Patienten mit einer autosomal dominanten erblichen Prädisposition für kolorektale Karzinome. Eine Prädisposition liegt bei etwa 5% aller kolorektalen Karzinome in unserer Bevölkerung vor und führt zu einer familiären Häufung von KRK, assoziierten Tumorerkrankungen und früherem Erkrankungsalter. Für HNPCC ist eine Verbindung zwischen der Erkrankung und Mutationen in denjenigen Genen gezeigt, die am DNA-Mismatch-Reparaturmechanismus (MMR) beteiligt sind. Keimbahnmutationen sind hierbei in den Genen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* nachgewiesen worden und stellen die molekulare Diagnostik des Lynch-Syndroms (Mangold et al., 2005; Holinski-Feder et al., 2006) dar. Die MMR-defizienten Tumorzellen zeigen zum einen eine erhöhte Mutationsrate - die sogenannte Mikrosatelliteninstabilität - und häufig auch einen Expressionsausfall des mutierten MMR-Proteins.

Die nachfolgenden Amsterdam-Kriterien und weniger selektierten Bethesda-Kriterien wurden als klinische Aufgreifkriterien für erbliche KRK definiert:

**Amsterdam-I-Kriterien:** Alle Kriterien müssen erfüllt sein (Vasen et al., 1991).

- Mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem KRK.
- Einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen.
- Erkrankungen in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen.
- Mindestens ein Patient mit Kolon-/Rektumkarzinomdiagnose vor dem 50. Lebensjahr.
- Ausschluß einer familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP).

**Amsterdam-II-Kriterien:** Alle Kriterien müssen erfüllt sein (Vasen et al., 1999).

- Mindestens drei Familienangehörige mit KRK oder HNPCC-assoziiertem Karzinom (Endometrium-, Dünndarm-, Urothel-Karzinom der ableitenden Harnwege).
- Einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen.
- Erkrankungen in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen.
- Mindestens ein Patient mit der Diagnose eines Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr.

**Bethesda-Kriterien:** Mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein (Umar et al., 2004).

- Kolorektales Karzinom vor dem 50. Lebensjahr.
- Synchrone/metachrone Kolon-, Rektumkarzinome oder HNPCC-assoziierte Tumorerkrankungen (ableitende Harnwege, Endometrium, Dünndarm, Magen, Ovar, ZNS, Haut, Pankreas, hepatobiliäres Karzinom).
- Zwei oder mehr betroffene Familienmitglieder erstgradig verwandt mit Kolon-, Rektumkarzinomen und/oder HNPCC-assoziiierter Tumorerkrankung (einer < 50 Jahre).
- Zwei oder mehr betroffene Familienmitglieder erstgradig oder zweitgradig verwandt mit Kolon-, Rektumkarzinomen und/oder HNPCC-assoziiierter Tumorerkrankung, altersunabhängig.
- Kolon- bzw. Rektumkarzinom mit hochgradiger Mikrosatelliteninstabilität vor dem 60. Lebensjahr.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Diagnosekriterien von HNPCC oder FAP Erkrankungen.

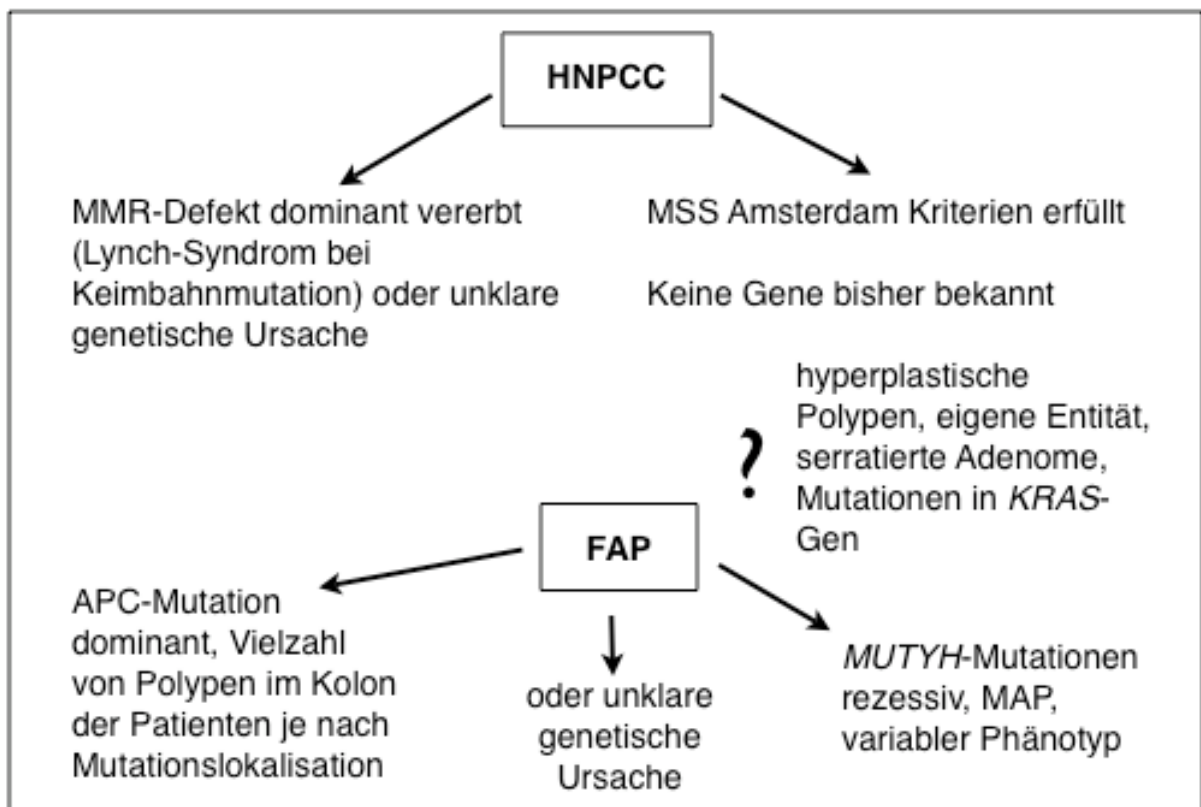


Abbildung 1: Diagnosekriterien von HNPCC und FAP Erkrankungen.

Im Vergleich zum sporadischen KRK ist für beide Formen von HNPCC mit MMR-Defekt das frühere Diagnosealter charakteristisch. Bei Lynch-Syndrom liegt dieses bei ca. 40 Jahren hat aber je nach beteiligtem Gen eine enorme Schwankungsbreite und eine Penetranz von nur ca. 60-80%.

## 1.1 DNA-Reparaturmechanismen

Über die absolute Menge an DNA-Schäden, die täglich in menschlichen Zellen entstehen, gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Die Zahlen variieren je nach Schaden von etwa 10.000 (Seeberg et al.,1995) über 20.000 (Lindahl, 1993) bis hin zu 500.000 Läsionen pro Replikation (Siehe Abb. 2 in Kapitel 1.1.1). Dieses macht deutlich, dass es ausgereifte DNA-Reparaturmechanismen zur Bewahrung der genomischen Integrität geben muss.

Folgendes Rechenbeispiel soll die Leistungsfähigkeit der DNA-Reparatur verdeutlichen. In jeder menschlichen Körperzelle existieren  $6 \times 10^9$  Basenpaare (verteilt auf 46 Chromosomen). Ein Mensch besteht aus durchschnittlich  $6 \times 10^{13}$  Zellen, davon sind die

meisten teilungsfähig und erneuern sich je nach Gewebe unterschiedlich schnell, wobei die Darmschleimhaut eines der schnell replizierenden Gewebe ist. Das entspricht somit einer Gesamtzahl von  $10^{22}$  Basenpaaren, die von der DNA-Reparatur im gesamten Mechanismus in ihrer Original-Basensequenz zu erhalten sind (Loeb, 2001).

Bis heute wurden bereits mehr als 150 an DNA-Reparaturvorgängen beteiligte und evolutionär zum Teil hochkonservierte Gene beschrieben (Wood et al., 2005). Die Identifizierung dieser Gene erfolgte in vielen Fällen durch Homologiesuche aus einfacher strukturierten Organismen wie Hefen oder *E. coli*-Bakterien (Yu et al., 1999). Um die Integrität der DNA zu bewahren müssen die DNA-Reparaturmechanismen den Schaden behoben haben bevor sich die Zelle teilt, da sonst der DNA-Schaden in Form einer Mutation in der Tochterzelle manifestiert ist.

Es lassen sich sechs bereits bekannte grundsätzlich verschiedene DNA Reparaturwege unterscheiden (Wood et al., 2001):

1. Basenexzisionsreparatur (BER): Sie schneidet, ersetzt und repariert veränderte DNA-Basen, auch Einzelstrangbrüche (siehe Abbildung 3b).
2. Nukleotidexzisionsreparatur (NER): Sie repariert großräumige, Helix-deformierende, meist exogen induzierte Addukte.
3. Postreplikative Mismatch-Reparatur (MMR): Sie repariert fehlgepaarte Basen (siehe Abbildung 2) wie Mismatches oder Insertionen/Deletionen von 1-8 Basen Loops.
4. Reversionsreparatur (RER): Sie konvertiert eine modifizierte Base in einem Schritt in die Ursprungsform zurück.
5. Rekombinations-Reparatur (RR): Sie ist verantwortlich für eine Beseitigung von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination (HR) oder durch die nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ).
6. Sonderform der transkriptionsgekoppelten Reparatur (NER): Sie ist für eine wesentlich schnellere Reparatur des transkribierten Stranges verglichen mit dem nicht-transkribierten Strang verantwortlich. Sie repariert auch oxidative Schäden.

In den Kapiteln 1.1.1 und 1.1.2 werden die Mechanismen MMR und BER nun im Einzelnen beschrieben.

### 1.1.1 MMR

Eine der Hauptaufgaben der DNA Mismatch-Reparatur (MMR) ist die Korrektur der Basenfehlpaarungen (siehe Abbildung 2). Werden diese Mismatches nicht repariert, kommt es zu Transversionen oder Transitionen. Eukaryotische Mismatch-Reparatur-Systeme erkennen und entfernen auch Loops durch Deletionen/Insertionen einer Länge von ein bis zu 16 Nukleotiden, die z.B. als Replikationsfehler repetitiver Mikrosatelliten im menschlichen Genom sehr häufig sind. (Ebenso werden Fehlpaarungen in Heteroduplex-Bereichen erkannt und beseitigt, die bei der Rekombination auftreten können).

In menschlichen Zellen wird die MMR durch eine Reihe von Proteinen bewerkstelligt:

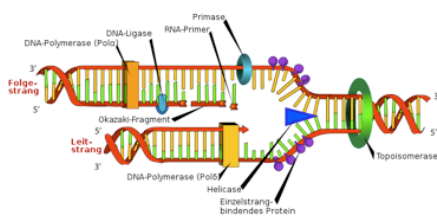
- Das Heterodimer (hauptsächlich MSH2 + MSH6, seltener MSH2 + MSH3) erkennt eine Basenfehlpaarung/einen Loop in der DNA und rekrutiert das Heterodimer (hauptsächlich MLH1 und PMS2, seltener MLH1 + PMS1 oder MLH1 + MLH3) und entfernt die Fehlpaarung über die fehlerhafte Stelle hinaus mit der Exonuklease I.
- Die Neusynthese der entfernten Nukleotide erfolgt über die DNA-Polymerase  $\delta$  und das Schließen des DNA-Strangs über die DNA-Ligase.

Keimbahn-Defekte in einem der Mismatch-Reparatur-Gene MLH1, MSH2, MSH6 oder PMS2 manifestieren sich mit einer Prädisposition und stark erhöhtem Risiko für nicht-polypösen Darmkrebs, (HNPCC bzw Lynch-Syndrom), (Mangold et al., 2005; Holinski-Feder et al., 2006).

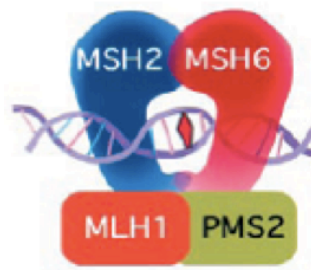
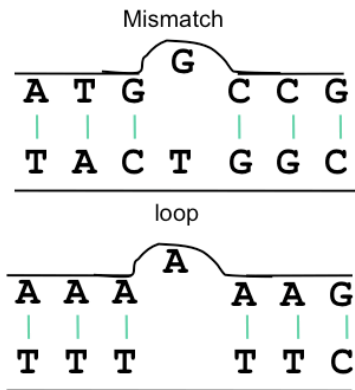
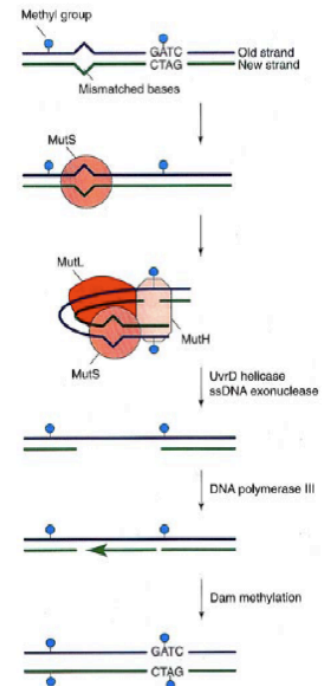
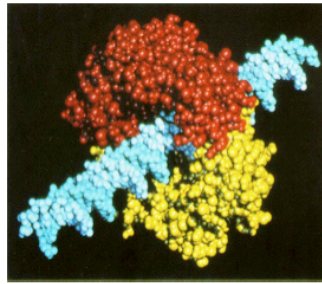
Die MMR-defizienten Tumorzellen zeigen eine erhöhte Mutationsrate, die sogenannte Mikrosatelliteninstabilität, die auch über 5 definierte Marker detektiert werden kann.

In der Literatur sind die Grundlagen für Wechselwirkung zwischen dem MMR-Komplex und dem BER-Protein MUTYH berichtet worden. Es wurde vermutet, dass heterozygote *MUTYH*-Mutationen als Phänotypveränderer (im *MSH6*-Trägern) in HNPCC-Familie fungieren. Steinke et al., 2008 unterstützt diese Hypothese nicht, weil in ihrer Arbeitsgruppe von 64 *MSH6*-Mutationsträgern keine biallelische *MUTYH*-Mutation gefunden wurde.

# DNA-Mismatch-Reparatur



Ca. 500.000 Fehler/Replikation



Basenfehlpaarungen  
Einzelnukleotid-Del/-Ins  
größere Repeat-Loops

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Mechanismus der Mismatch-Reparatur (MMR) beim Menschen.

## 1.1.2 BER

Die Basenexzisionsreparatur (BER) ist der Hauptreparaturweg für Basenveränderungen, welche die Helix-Struktur der DNA kaum bzw. nicht verändern (Schlupphaug et al., 2003), (siehe hierzu auch Abbildung 3b). Die substratspezifischen DNA-Glykosylasen erkennen die veränderten Basen und schneiden sie heraus. Dadurch entsteht eine abasische Stelle (AP-Läsion) in der DNA, die in nachfolgenden Schritten weiter prozessiert wird, so dass am Ende wieder eine korrekte Basensequenz vorliegt (Krokan et al., 2000; Lindahl und Wood, 1999).

Es gibt zwei Arten von Glykosylasen, die mono- und die bifunktionellen. Monofunktionelle Glykosylasen wie z.B. die Uracil-DNA-Glykosylase lösen die N-glykosidische Bindung zwischen der modifizierten Base und der Desoxyribose, so dass die modifizierte Base freigesetzt wird und dadurch eine AP-Läsion entsteht. Diese AP-Läsion wird von einer 5'-AP-Endonuklease erkannt und prozessiert (Laval, 1977). Bifunktionelle Glykosylasen



trennen ebenfalls die N-glykosidische Bindung und setzen die modifizierte Base frei. Im Anschluß daran löst sie die Phosphodiesterbindung, die 3` von der gebildeten AP-Läsion liegt, durch  $\beta$ - bzw.  $\beta$ - $\delta$ -Elimination ( $\beta$ -Lyase-Aktivität). Es bleibt ein Einzelstrangbruch mit einem durch einen Zuckerphosphatrest blockierten 3`-Ende und 5`-Phosphatrest zurück. Im nächsten Schritt wird der Zuckerphosphatrest durch eine AP-Endonuklease entfernt, damit die DNA-Polymerase  $\beta$  die entstandene Lücke (3`-Hydroxylrest und 5`-Phosphatrest) auffüllen kann, bevor die DNA-Ligase die Lücke im DNA-Strang wieder schließt.

In menschlichen Zellen kann die Basenexzisionsreparatur in zwei alternativen Wegen verlaufen, entweder als *short-patch* oder als *long-patch* BER. Siehe Abbildung 3a.

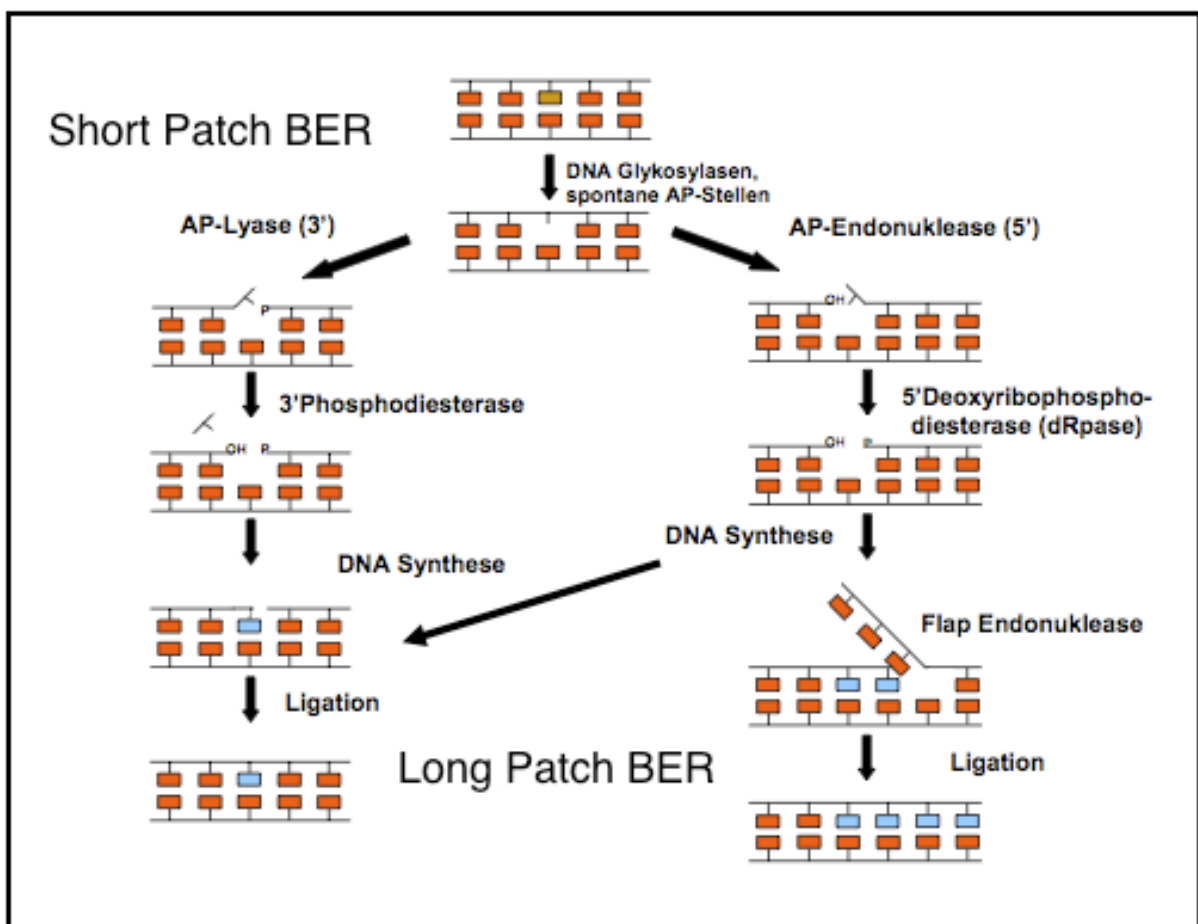


Abbildung 3a: Schematische Darstellung short-patch und long-patch BER.

Bei der *short-patch* BER wird der verbliebene 5`-Phosphatrest durch die Lyase-Aktivität der DNA-Polymerase  $\beta$  entfernt und die Ein-Nucleotid-Lücke aufgefüllt. Der DNA-Strang wird dann durch den DNA-Ligase III/XRCC1-Komplex verschlossen. XRCC1 stellt dabei die Verbindung zwischen der DNA-Polymerase  $\beta$  und der DNA-Ligase III her, wodurch deren Aktivität gesteigert wird (Bhattacharyya und Banerjee, 2001).

Alternativ zur *short-patch* BER kann die Reparatur einer modifizierten Base auch über den anderen Mechanismus der *long-patch* BER erfolgen. Dieser Reparaturweg wird meist dann genutzt, wenn das entstandene 5`-Ende durch einen Zuckerrest blockiert ist und die DNA-Polymerase  $\beta$  deshalb nicht einschneiden kann (Nilsen und Krokan, 2001; Gary et al., 1999). Unter Veränderung des alten Stranges erfolgt dann eine Neusynthese von zwei bis acht Nukleotiden entweder durch die DNA-Polymerase  $\beta$  oder wesentlich häufiger durch die DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$ . Im letzteren Fall sind zusätzliche Faktoren wie RFC (Replikations-faktor C) und *PCNA Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)* beteiligt (Stucki et al., 1998). *PCNA* aktiviert die flap-Endonuklease (FEN1), was ein Abschneiden des veränderten Stranges bewirkt (Nilsen und Krokan, 2001; Gary et al., 1999) und so erlaubt, dass die DNA-Ligase I die Reparatur durch Verschließen des verbliebenen Strangbruchs beenden kann. Die *long-patch* BER läuft parallel mit der Replikation ab (Otterlei et al., 1999).

Die BER ist zuständig für die Reparatur alkylierter oder deaminierter Basen sowie durch reaktive Sauerstoffspezies oder ionisierende Strahlung oxidiertes, reduziertes oder fragmentiertes Basen (Krokan et al., 2000).

Neben oxidativen DNA-Schäden werden von der BER auch DNA-Einzelstrangbrüche repariert, die eine 3`-blockierende Gruppe (wie Phosphoglykolaldehyde und Phosphoglykolate) haben (von Sonntag, 1987; Demple und DeMott, 2002). Die intrinsische 3`-Phosphodiesteraseaktivität von APE1 ist dabei in der Lage die 3`-blockierende Gruppe der AP-Stelle zu entfernen.

Die Proteine OGG1, MTH1 und MUTYH arbeiten in der BER wie folgt zusammen. Siehe Abbildung 3b. MTH1 hydrolysiert 8-oxo-Guanin-Triphosphat zu 8-oxo-Guanin-Monophosphat, um den Einbau der Base in die DNA bei Replikation zu verhindern. OGG1 entfernt die oxidierte 8-oxo-Guanin-Base von 8-oxo-G Mismatches in doppelsträngiger DNA und ersetzt sie durch ein reguläres Guanin. Während der Replikation baut die DNA-Polymerase an nicht korrigierten 8-oxo-G Mismatches Adenin gegenüber 8-oxo-Guanin ein, dadurch entsteht ein 8-oxo-G Mismatch (Siehe Abbildung 3b).

# BER (base excision repair)

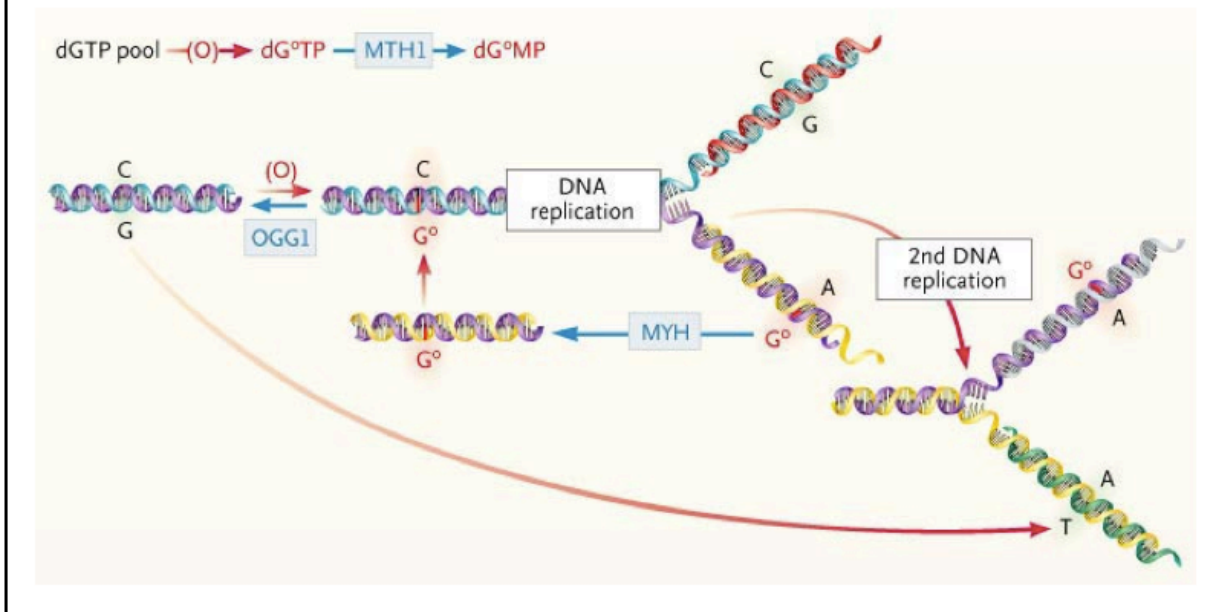


Abbildung 3b : Schematische Darstellung des Mechanismus der Basenexzisionsreparatur beim Menschen.

MUTYH entfernt das falsch eingebaute Adenin gegenüber 8-oxo-Guanin und fügt ein Cytosin ein, anschliessend kann von OGG1 dann 8-oxo-G zu Guanin repariert werden. Wird der Fehler 8-oxo-G:A nicht repariert, kommt es nach einer weiteren Replikation zu einer Transversion: aus G:C wird durch Einbau von 8-oxo-G ein T:A. Diese somatischen Mutationen sind charakteristisch für Tumore von Patienten mit BER-Defekt aufgrund biallelischer *MUTYH*-Mutationen (MAP), siehe Abbildung 3b.

Die Spezifität des Enzyms 8-oxo-G wird durch den carboxyterminalen Teil bestimmt (Chmiel et al., 2001). Ein Ablösen des Enzyms vom Substrat wird durch die Abwesenheit der AP-Endonukleasen Nfo und Xth stark gesteigert (Pope et al., 2002).

## 1.2 Komponenten der 8-oxo-G Reparatur und der BER

### 1.2.1 *MUTYH*

Das *MUTYH*-Gen (MutY Homolog von *E. coli*) weist eine Homologie von 41% zu *E. coli* auf und wurde erstmals von Michaels et al., 1992 beschrieben. Das *MUTYH*-Gen befindet sich

auf Chromosom 1p34.3-p32.1 und besteht aus 16 Exons (siehe Abbildung 4). Das MUTYH-Protein besteht aus 535 Aminosäuren und ist eine monofunktionelle Glykolase, die Adenin aus der DNA entfernt falls diese fälschlicherweise mit 8-oxo-G gepaart vorliegt und durch Cytosin ersetzt. Das Enzym ist sowohl im Zellkern als auch in den Mitochondrien lokalisiert (Ohtsubo et al., 2000; Nakabeppu, 2001). Das MUTYH-Protein hat zusammen mit OGG1 die Aufgabe, die Auswirkung von oxidativen Schäden an der DNA zu korrigieren. Eine nicht korrigierte Fehlpaarung des Oxidationsprodukts 8-Oxo-Guanosin mit Adenin führt bei einer weiteren Replikation in der DNA zu Transversionen von G:C zu T:A. Von diesen Transversionen ist unter anderem das *APC*-Gen, aber auch das *KRAS*-Gen betroffen. Ersteres führt zur Entstehung von Adenomen, zweiteres zu hyperplastischen Polypen und serratierten Adenomen. So soll der BER-Defekt als Ursache des Polypenwachstums bei der MAP anzusehen sein (Holinski-Feder et al., 2010).

Autosomal-rezessiv vererbte Mutationen in *MUTYH* (*MUTYH*-assoziierte Polyposis, MAP) führen häufig zu einer aFAP. Die Nachkommen von MAP-Patienten haben ein Risiko von unter 1%.

Für die europäische Bevölkerung sind die pathogenen Mutationen p.Tyr165Cys in *MUTYH* Exon 7 und p.Gly382Asp in *MUTYH* Exon 13 als häufigste Mutationen beschrieben (Holinski-Feder et al., 2010), wobei etwa 80% aller MAP-Patienten mindestens eine dieser Mutationen aufweisen.

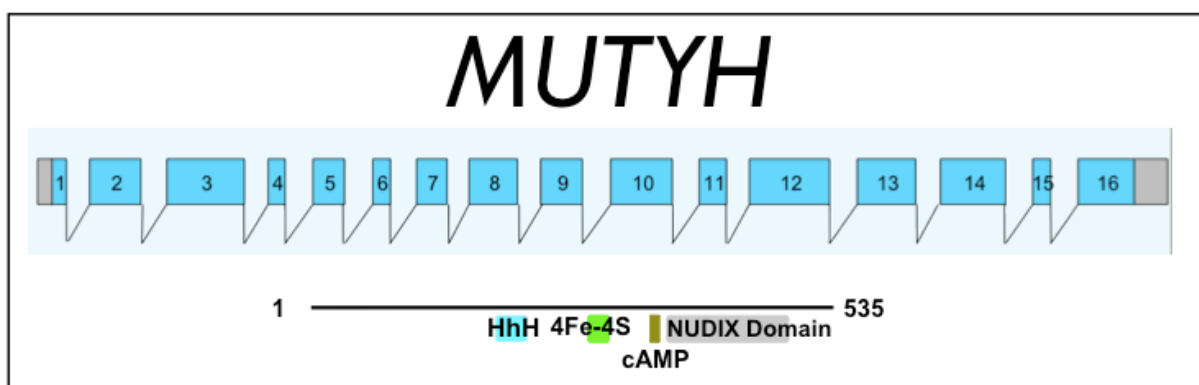


Abbildung 4: Schematische Darstellung des humanen *MUTYH*-Gens und seiner Protein-Domänen. Das *MUTYH*-Gen kodiert auf 16 Exons (blau) für ein Protein von 535 Aminosäuren Länge und liegt auf Chromosom 1p34.3-p32.1. HhH-Helix-hairpin-Helix, 4Fe-4S- Ferredoxin, NUDIX - Nucleoside Diphosphate linked to some other moiety X, cAMP- dependent protein kinase phosphorelation site.

## 1.2.2 OGG1

Das humane *OGG1*-Gen (8-oxo-Guanin DNA Glykosylase) ist auf Chromosom 3p26.2 lokalisiert, besitzt 8 Exons sowie ein alternatives Exon 7 (siehe Abbildungen 5 und 6) und wird in vielen unterschiedlichen Isoformen (1a-c, 2a-e) exprimiert. Die beiden häufigsten Spleißvarianten kodieren für zwei verschiedene Proteine: das  $\alpha$ -OGG1 Protein mit 345 Aminosäuren Länge als Isoform 1a sowie das  $\beta$ -OGG1 Protein mit 424 Aminosäuren Länge als Isoform 2d, (siehe Abbildung 5).

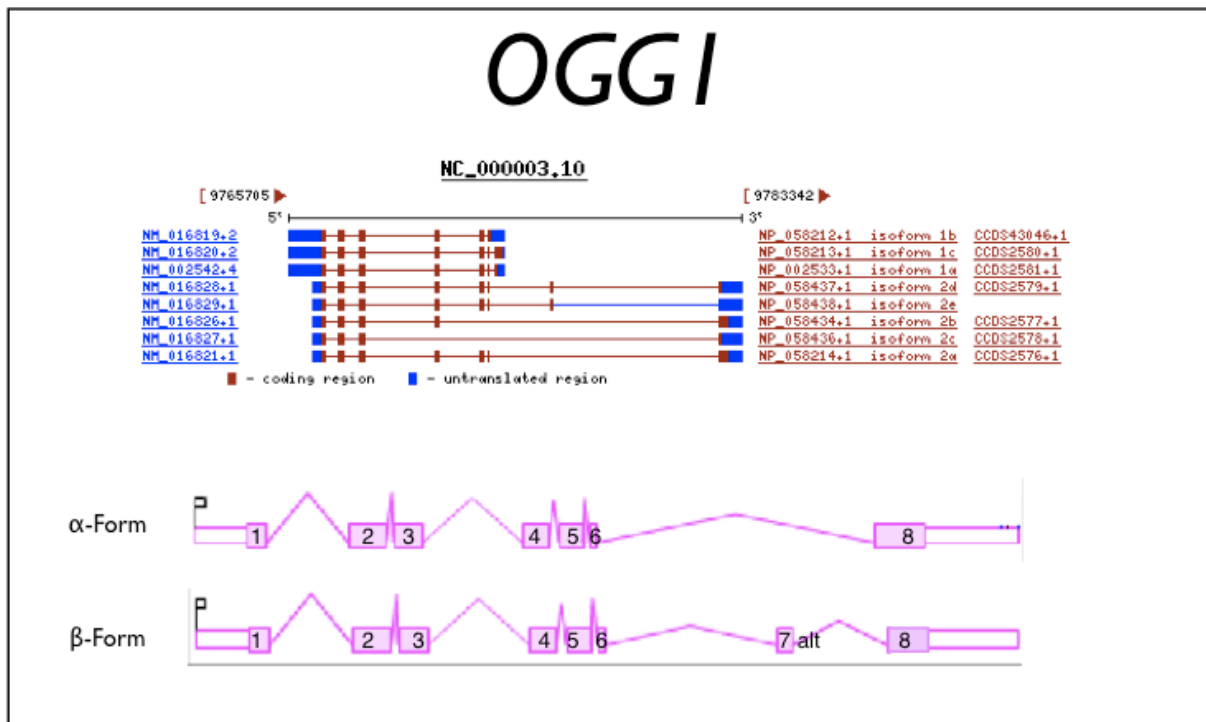


Abbildung 5: Schematische Darstellung des humanen *OGG1*-Gens und seiner unterschiedlichen Spleißvarianten. Im Genscreening wurden alle Exons untersucht. In der Abbildung unten sind die zwei Spleißvarianten  $\alpha$  und  $\beta$  zu sehen, die in unserer Arbeit verwendet wurden.

Wie Abbildung 6 zeigt, sind in den beiden Formen  $\alpha$ -OGG1 mit  $\beta$ -OGG1 die ersten 316 Aminosäuren kodiert von Exon 1-6 gleich, das carboxyterminale Ende dagegen ist völlig unterschiedlich (Boiteux und Radicella, 2000; Boiteux und Radicella, 1999).

Mit einem immunohistochemischen Verfahren wurde gezeigt, dass die  $\alpha$ -Form der *OGG1*-Spleißvariante aufgrund des NLS (Nucleäres Lokalisationssignal) ihres carboxyterminalen Endes in den Zellkern transportiert wird, während die  $\beta$ -Form der Spleißvariante für die Mitochondrien bestimmt ist (Boiteux und Radicella, 1999; Takao et al., 1998).

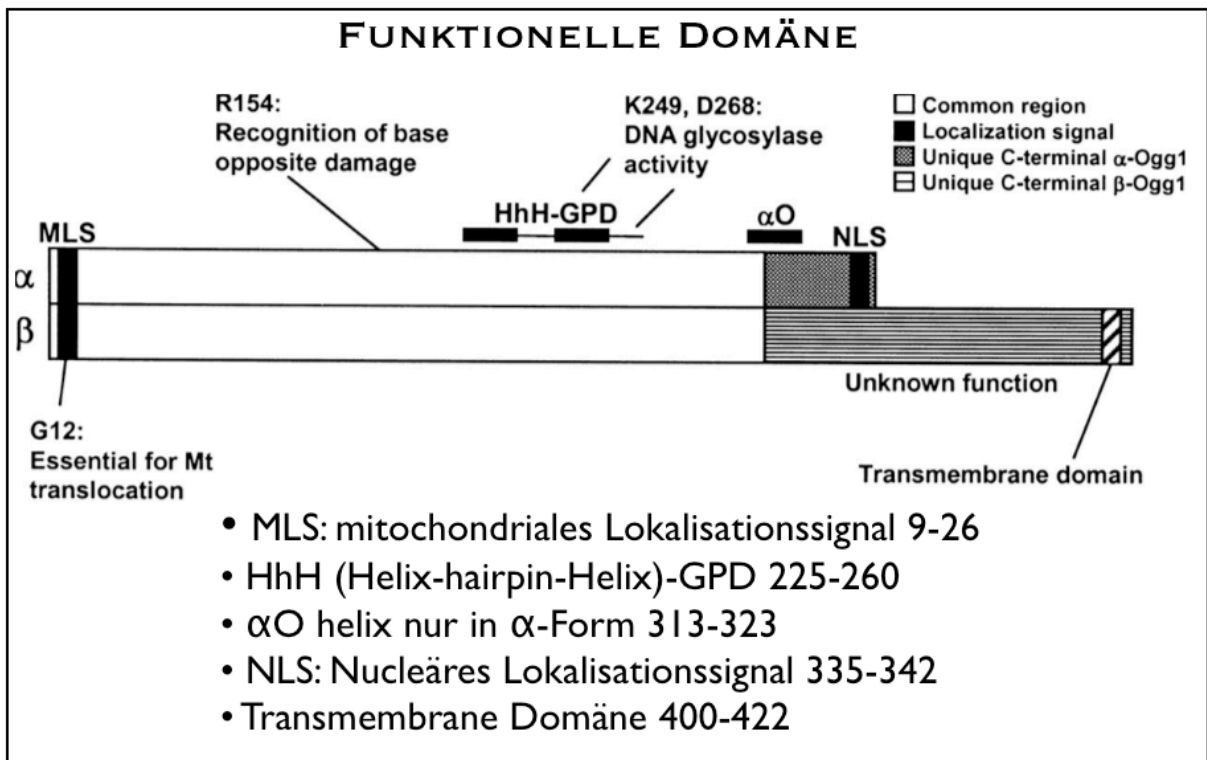


Abbildung 6: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen und relevanten Aminosäure-Positionen der Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  im OGG1-Protein (Bildquelle: Hashiguchi et al., 2004).  $\alpha$ -Form für den Zellkern und  $\beta$ -Form für die Mitochondrien.

Das menschliche OGG1-Protein besitzt in beiden Isoformen ein hoch konserviertes Helix-hairpin-Helix-Motiv, was charakteristisch für das aktive Zentrum der DNA-Glykosylasen und AP-Lyasen der Endonuklease-III-Familie ist (Dhénaut et al., 2000).

Im Übrigen finden sich etwa 100.000 Moleküle *OGG1* in einer einzigen menschlichen Fibroblastenzelle (Capelli et al., 2001).

Im Jahr 1997 gelang mehreren Arbeitsgruppen gleichzeitig die Klonierung des humanen Homologs der 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase (Arai et al., 1997; Radicella et al., 1997; Tani et al., 1998). OGG1 ist eine bifunktionelle Glykosylase (Boiteux und Radicella, 2000; Brunner et al., 2000; Krokan, 2000). Das Enzym OGG1 schneidet vorwiegend an 8-oxo-G und AP-Läsionen. Die Erkennung kann jedoch nur stattfinden, solange die modifizierte Base noch mit Cytosin gepaart ist. Während des Einschnitts durch OGG1 an diesem Substrat kommt es zur Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen der Aminogruppe des Lysins 249 im aktiven Zentrum des Enzyms und dem C1 der Desoxyribose, die das 8-oxo-G trägt. Die modifizierte Base kann dann abgespalten und ersetzt werden (Brunner et al., 2000).

Findet eine Replikation der DNA und Teilung der Zelle statt bevor *OGG1* den Schaden reparieren konnte wird gegenüber 8-oxo-G bevorzugt Adenin oder Guanin eingebaut. Diese Fehlpaarung kann dann entweder vom MUTYH-Protein korrigiert werden oder von den Enzymen der Mismatch-Reparatur behoben werden (Auffret van der Kemp et al., 1996). Das kann aber zu Mutationen in der DNA-Sequenz führen, da gegebenenfalls der falsche Strang korrigiert wird.

8-oxo-G, Uracil und AP-Läsionen werden mit unterschiedlicher Schnelligkeit in humanen Zellextrakten repariert. AP-Stellen werden am schnellsten, 8-oxo-G am langsamsten repariert, Uracil nimmt eine Mittelstellung ein. Titrationsversuche konnten zeigen, dass zugesetzte Mengen an Reparaturenzym die Reparatur zwar beschleunigten, aber nicht proportional zur zugefügten Menge. Die Rate der Basenexzision hängt also nicht allein von der Menge der Glykosylasen ab, sondern auch von deren Funktionsfähigkeit (Capelli et al., 2001).

In Tabelle 15 in Kapitel 5.3 werden die in der Literatur gefundenen *OGG1*-Mutationen aufgeführt. So wird zum Beispiel die somatische Missense-Mutation unklarer Pathogenität p.Ser326Cys im Zusammenhang mit Ösophaguskarzinomen (Bradbury et al., 2007) oder Magenkarzinomen (Goto et al., 2008) oder als Keimbahnmutation mit multiplen Adenomen (Sieber et al., 2003) beschrieben. Nach Kim et al., 2004 deutet die Missense-Mutation p.Arg154His in *OGG1* auf die Entstehung von sporadischem KRK hin, ohne Segregation. In der Studie von Farrington et al., 2005 wurde der bis dato stärkste Nachweis gefunden, dass BER-Defekte in Kombination mit heterozygoten *MUTYH*-Mutationen c.1145G>A; p.Gly382Asp die Entstehung von KRK bewirken. Die Studie benennt drei Patienten mit solchen Kombinationen: zweimal die Keimbahn Missense-Mutation in *MTH1* p.Arg31Gln mit jeweils einer pathogenen Keimbahn *MUTYH*-Mutation und einmal in *MTH1* p.Arg31Gln mit einer unklaren Variante (Missense-Mutation) in *MUTYH*. Alle drei Patienten hatten kolorektale Karzinome.

Dazu konnte man in der Literatur monoallelische Missense-Mutationen im Tumor als auch Keimbahnmutationen in *OGG1* und *MTH1* bei Patienten mit sporadischen KRK, HNPCC-assoziierten KRK und FAP finden (siehe zum Beispiel Al-Tassan et al., 2002; Kimura et al., 2004; Kim et al., 2004; Sieber et al., 2003), jedoch ohne Nachweis einer expliziten pathogenen Mutation. Haigiwara et al., 2005 beschreibt menschliche Ösophaguskarzinome, Shinmura et al., 1998 Magentumore, Chevillard et al., 1998 sowie

Audebert et al., 2000 Lungen- und Nierentumore mit einem somatischen Funktionsverlust der humanen 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase.

Es wird daher vermutet, dass Defekte des *OGG1*-Gens eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielen und möglicherweise auch bei erblicher Tumoprädisposition beteiligt sind.

Die Missense-Mutation p.Arg46Gln in *OGG1* wurde mit der Reduktion der Enzymaktivität für das Ausschneiden von 8-oxo-G beschrieben (Kim et al., 2005).

### **1.2.3 *MTH1* oder *NUDT1***

Das *MTH1*-Gen erstreckt sich über 9 kb auf der genomischen DNA des Chromosoms 7p22. Das humane *MTH1*-Gen hat zwei Spleißvarianten, p18 und p22 (siehe Abbildung 7). Untersucht wurden alle 5 möglichen Exons. Die erste Form (p18) hat kein kodierendes Exon 1 und kodiert für ein Protein von 197 Aminosäuren Länge. Die Isoform (p22) ist 220 Aminosäuren lang, mit gleichem Leserahmen wie p18, der Translationsstart beginnt jedoch früher.

*MTH1* ist eine Nukleosidtriphosphatase (Wallace, 2002) und ist im Kern und in den Mitochondrien lokalisiert (Kang et al., 1995) und hydrolysiert dort die im freien Nukleotidpool (Wallace, 2002) oxidierte Purinnukleotidtriphosphate wie 8-oxo-G, 8-oxo-A und 2-Hydroxyadenin (Nakabeppu, 2001), so dass 8-oxo-G während der Replikation oder Reparatur nicht gegenüber von Adenin eingebaut werden kann (Wallace, 2002). Siehe hierzu auch Abbildung 1 im Kapitel 1.

Auf diese Weise entfernt *MTH1* 8-oxo-GTP aus dem Nukleotid-Pool der Zelle und verhindert damit dessen Einbau in die DNA durch DNA-Polymerasen während der Replikation (Epe, 2002; Klungland et al., 1999).

*MTH1* hat daher ebenfalls eine grosse Bedeutung für die Wahrung der genomischen Integrität (Tsuzuki et al., 2001).

Bei einem Defekt von *MTH1* wird erwartet, dass Oxidationsprodukte wie 8-oxo-G vermehrt während der Replikation eingebaut werden und somit zu Transversionen von G:C zu T:A in der DNA führen. Es wird daher vermutet, dass ein *MTH1* Defekt eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt und möglicherweise auch bei erblicher Tumoprädisposition, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Genen. In der Literatur sind Fälle von



Missense-Mutationen unklarer Pathogenität in *MTH1* in Kombinationen beschrieben, mit möglicher Entstehung von kolorektalen Karzinomen (siehe Tabelle 15 in Kapitel 5.3). Farrington et al., 2005 beschreibt drei Patienten mit solchen Kombinationen; zweimal die Keimbahn Missense-Mutation in *MTH1* p.Arg31Gln mit jeweils einer pathogenen Keimbahn *MUTYH*-Mutation und einmal in *MTH1* p.Arg31Gln mit einer unklaren Variante (Missense-Mutation) in *MUTYH*. Alle drei Patienten hatten kolorektale Karzinome.

Kimura et al., 2004 beschreibt, dass die somatische Missense-Mutation c.247G>A; p.Val83Met in *MTH1* bei KRK-Patienten signifikant häufiger auftritt als bei gesunden Patienten und mit der Mutation im p53 Tumor-Suppressor-Gen korreliert. Die somatische Missense-Mutation c.247G>A; p.Val83Met in *MTH1* wurde von Goto et al., 2008 in Zusammenhang mit einer erhöhten Anhäufung von 8-OHdG in Tumorzellen eines Magenkarzinoms beschrieben.

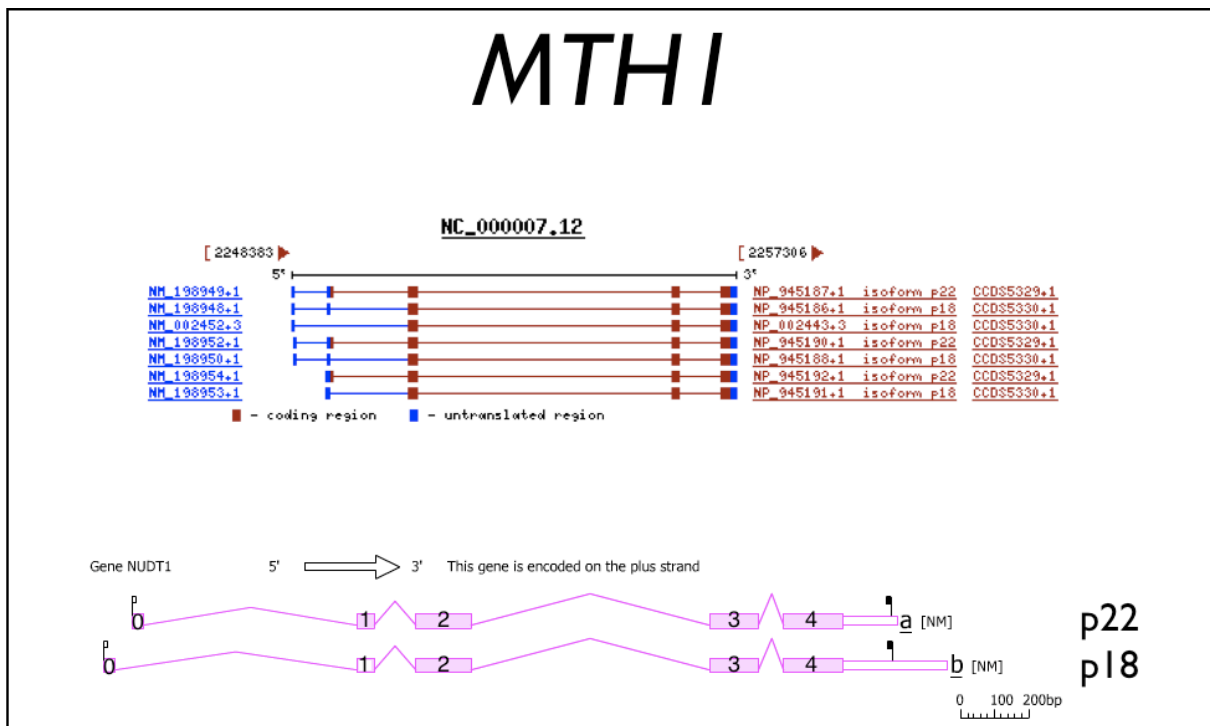


Abbildung 7: Schematische Darstellung des humanen *MTH1*-Gens und seiner unterschiedlichen Spleißvarianten. Das (*NUDT1*) *MTH1*-Gen auf Chromosom 7p22 weist fünf Exons auf und kodiert auf drei bzw. vier Exons für verschiedene Proteine von 197 Aminosäuren und 220 Aminosäuren. Es gibt verschiedene Spleißvarianten und zwei Isoformen p18 und p22. Isoform p22 unterscheidet sich über ein alternatives Exon 1 bestehend aus 23 Aminosäuren. Der kodierte Bereich ist rot und der nicht kodierende Bereich ist blau gezeichnet.

## 2 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die Gene *MUTYH*, *OGG1* und *MTH1* hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Entstehung von hyperplastischen Darmpolypen beziehungsweise erblich bedingten kolorektalen Karzinomen untersucht werden. Pathogene Mutationen in *MTH1* wurden bisher nicht beschrieben. In *OGG1* ist bislang eine pathogene Spleißmutation heterozygot beschrieben. Es wurde in einigen Studien bereits die Hypothese untersucht, dass eine Kombination von heterozygoten Mutationen in *MUTYH*, *OGG1* und *MTH1* eine Prädisposition für KRK darstellt, was bisher noch nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Zunächst sollte geklärt werden, ob Mutationen in den an der BER beteiligten Genen *MUTYH*, *OGG1*, *MTH1* in unserem Kollektiv von 39 Patienten vorliegen.

Für die vorliegende Arbeit war ein Patientenkollektiv mit Darmpolypen zu untersuchen, die keine nachgewiesene Mutation im *APC*-Gen und keine biallelische Mutation in *MUTYH*-Gen hatten. Alle Patienten sollten mindestens einen hyperplastischen Darmpolypen aufweisen, einige Patienten hatten multiple Polypen im gesamten Kolon, andere auch die Diagnose eines KRK.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine junge Patientin mit bifokalem Kolonkarzinom im Alter von 36 Jahren und zwei heterozygoten Mutationen (Spleiß-Mutation p.Arg46Gln in *OGG1* Exon 1 und Missense Mutation unklarer Pathogenität p.Ile209Val in *MUTYH* Exon 8) bekannt (Morak et al., 2010b). Um die Ursächlichkeit der beiden Mutationen auf ihr Krankheitsbild besser zu verstehen, wurde von vorliegender Arbeit erwartet, weitere Patienten mit demselben Krankheitsbild sowie eindeutig pathogenen Mutationen (letztere gegebenenfalls in Kombination) zu finden.

Im Falle des Nachweises von Sequenzveränderungen in diesen Genen bei unklarer Pathogenität sollte die Segregation der Erkrankungen mit der gefundenen Mutation sowie der Erbgang der Tumorerkrankung im Stammbaum (familiär= dominant) untersucht werden.

In Verbindung mit diesen Erkenntnissen sollten Abschätzungen ermöglicht werden, in welchem Maße Veränderungen in den BER Genen zu einer Prädisposition des kolorektalen Karzinoms beitragen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Untersuchung des Einflusses der Missense-Mutation unklarer Pathogenität c.977C>G; p.Ser326Cys in *OGG1* auf die

Kolonkarzinomentstehung sein, da diese Mutation wiederholt als somatische Mutation bei Patienten mit Adenomen nachgewiesen werden konnte. Dazu sollten zwei unterschiedliche Kontrollgruppen von je 60 Personen auf die Variante c.977C>G; p.Ser326Cys hin untersucht werden, um die Allelfrequenz in den Kollektiven zu bestimmen. Es sollten Erkenntnisse gewonnen werden, inwieweit die Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys zu einer Erhöhung des Krebsrisikos im Vergleich zur Normalbevölkerung führt.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Patientenkollektiv**

Für die vorliegende Arbeit wurden Patienten mit Darmpolypen ausgewählt (FAP, aFAP, atFAP, hyperplastische Polypen) oder KRK, bei denen keine pathogene oder unklare Mutation im *APC*-Gen und keine biallelische Mutation in *MUTYH*-Gen nachweisbar war. Deletionen im *APC* und *MUTYH* wurden über *MLPA* soweit möglich ausgeschlossen. Fast alle Patienten hatten mindestens einen hyperplastischen Darmpolypen, einige hatten multiple Polypen im gesamten Kolon. Bei mehreren Patienten wurde zusätzlich die Diagnose einer Darmneoplasie gestellt. Insgesamt schließt diese Studie 39 Patienten ein. Davon waren 15 Frauen und 24 Männer. Die jüngste Patientin war 23 Jahre alt, der älteste Patient 77. Das Durchschnittsalter des gesamten Patientenkollektivs lag bei 50 Jahren.

Angaben zu Diagnose, Histologie, Familienanamnese, Alter und Tumorbefund konnten aus den bereits vorhandenen Patientenakten entnommen werden.

Für die Häufigkeitsuntersuchungen von Missense-Mutationen wurden zwei Kontrollgruppen mit jeweils 60 Fällen ausgesucht. Die erste Gruppe beinhaltete Lynch-Syndrom Patienten mit einer gesicherten Mutation in einem der *MMR*-Gene (*MLH1* oder *MSH2*). Die zweite Kontrollgruppe bestand aus Patienten mit einem Alter von über 80 Jahren, die auf Morbus Alzheimer getestet wurden und bei denen keine Tumorerkrankung vorlag.

Warum die beiden Kontrollgruppen so gewählt wurden wird im Kapitel 4.1.8 erklärt.

#### **3.1.2 Patientenmaterial**

Die für die Arbeit verwendete genomische DNA stammte aus der DNA-Datenbank des HNPCC-Forschungslabors der Ludwig-Maximilians-Universität München, entsprechende Einverständniserklärungen liegen vor.

#### **3.1.3 Chemikalien und andere Materialien**

Anorganische und organische Grundchemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad „p.a“ und wurden von den angegebenen Firmen bezogen.

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym
Oligonukleotide	Eurofins MWG Operon
dNTPs (2mM)	GE Healthcare
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Applied Biosystems
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma

*Tabelle 1: Verwendete anorganische und organische Grundchemikalien.*

### 3.1.4 Kits

Die verwendeten Kits werden in der Tabelle 2 beschrieben.

Produkt	Hersteller
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion v 2.0	Applied Biosystems
Exo-SAP-IT	usb

*Tabelle 2: Verwendete Kits.*

### 3.1.5 Längenstandards

Die relevanten Längenstandards werden in der Tabelle 3 beschrieben.

Produkt	Hersteller
Längenstandard V (LS V)	Roche Diagnostics
Längenstandard Fast Ruler™ Low Range	Fermentas

*Tabelle 3: Relevante Längenstandards.*

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen werden in der Tabelle 4 beschrieben.

Produkt	Hersteller
<b>Orange G Auftragspuffer:</b>	
0,05% Orange G	Merck

Produkt	Hersteller
In 25%Ficoll™ PM400	Amersham Biosciences
In destilliertem Wasser	
<b>TBE-Puffer:</b>	
10,2% TRIS	Roth
5,5% Borsäure	Calbiochem
0,75% Titriplex	Merck
in destilliertem Wasser 1:10 verdünnen	
GeneAmp PCR-Puffer (10x mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	Applied Biosystems

*Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen und deren Hersteller.*

Spezielle Lösungen und Puffer sind in den entsprechenden Abschnitten des Methodenteils in Kapitel 3.2 gesondert aufgeführt.

## 3.2 Methoden

Im vorliegenden Kapitel sind alle Arbeitsschritte beschrieben, die für Gewinn, Bearbeitung und Analyse der DNA nötig waren.

### 3.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Das für die Extraktion von DNA aus Vollblut nötige Material war Ery-Lyse-Puffer, SE-Puffer, SDS, Pronase E, NaCl, Ethanol 100%, Ethanol 70% und TE-Puffer.

Die Isolierung der DNA aus EDTA-Vollblut wurde nach dem Protokoll von Miller et al., 1988 durchgeführt.

Für die DNA-Extraktion werden die Erythrozyten durch Lyse mit Ery-Lyse-Puffer bei 4°C entfernt und das restliche Blut zentrifugiert (100 rpm, 7°C, 10 min). Der Überstand wird dekantiert. Das Pellet wird zur Entfernung der letzten Erythrozytenreste nochmals lysiert, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wird das Sediment gelockert. Für den folgenden Zellverdau werden dem Pellet 5 ml SE-Puffer (0,25 ml SDS und 25 µl Pronase E) hinzugefügt. Der Ansatz wird über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Zur Ausfällung der Proteine werden 2 ml 5 M NaCl zugegeben, der Ansatz dann gevortext und anschließend zentrifugiert (3000 rpm, bei Raumtemperatur, 10 min). Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und die DNA dort mit 2,5 Vol.% kaltem Ethanol (100%) gefällt. Nach einem Waschschrift in 5 ml Ethanol (70%) wird die DNA in ein 1,5 ml grosses Reaktionsgefäß überführt. Nach Verdunstung des Ethanols wird die DNA in TE-Puffer gelöst. Die Aufbewahrung der extrahierten DNA erfolgt bei 4°C.

### **3.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die optische Dichte (OD) ist definiert als die durch eine Lösung absorbierte Lichtmenge. Mit Hilfe eines Spektralphotometers (Gene Quant der Firma 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 vermessenen Substanz bestimmt die Wellenlänge, mit der die Messung durchgeführt wird. Für Desoxyribonukleinsäuren liegt das Absorptionsmaximum bei 260 nm. Vor der ersten Messung wird das Gerät mit destilliertem H<sub>2</sub>O als Referenz geeicht. Die gelöste DNA wird 1:100 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend zur Messung eingesetzt. Für ein genaueres Ergebnis wird eine 200 µl-Verdünnung angesetzt, gut gemischt und die OD zweimal gemessen. Der Mittelwert der beiden Messungen wird in die unten genannte Formel eingesetzt. Eine OD, gemessen bei 260 nm, entspricht einer DNA-Konzentration von etwa 50 µg/ml. Die tatsächlich vorliegende Konzentration wird mit folgender Formel berechnet: Gemessene OD x 5 = µg/µl DNA.

### **3.2.3 DNA-Verdünnung**

Alle DNAs wurden für PCR-Amplifikationen auf eine Konzentration von ca. 100 ng in 1µl mit destilliertem Wasser verdünnt.

### **3.2.4 DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)**

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

→ Denaturierungsphase: doppelsträngige DNA wird bei 95°C denaturiert.

- Anlagerungsphase: an die DNA hybridisiert ein Primer. Für jedes Primerpaar muß die optimale Temperatur gefunden werden, die sich an der Basenzusammensetzung und Länge der Primer orientiert. Als Anhaltspunkt für die Primer-Schmelztemperatur kann für die Basen G und C jeweils mit 4°C und für die Basen A und T jeweils mit 2°C gerechnet werden.
- Synthesephase: Um die größtmögliche Leistung zu erzielen, erfolgt die Synthese bei der Temperatur der optimalen Enzymaktivität unter Verwendung einer hitzebeständigen DNA-Polymerase, für Ampli-Taq Gold bei 72°C.

Die Polymerase verlängert vom Primer-Oligonukleotid nach Vorlage der genomischen DNA die Nukleinsäure in 5`-3`-Richtung und benötigt im Fall der Ampli-Taq Gold für 1.000 Basen etwa 1 Minute Zeit. Je nach Länge des erwarteten PCR-Fragments wird die Zeit für die Synthese angeglichen.

Jeder Amplifikationszyklus führt zur Verdoppelung des Ausgangssubstrats. Bei einer symmetrisch ablaufenden PCR vermehren sich die kopierten DNA-Fragmente exponentiell. Die optimale Zykluszahl ist abhängig von Spezifität und Basenabfolge der Primer und liegt zwischen 30 und 40.

Detaillierte Beschreibungen der Primersequenzen, und der amplifizierten Fragmentgrößen finden sich in Anhang 4.

Ausgangsmaterial für die Amplifikation einzelner Exons in einem Reaktionsansatz von 25 µl in 1x PCR-Puffer (mit MgCl<sub>2</sub>) mit 4 mM dNTPs, je 10 pmol Oligonukleotidprimer F für „Forward“ und R für „Reverse“ und 0,6 U (Units) DNA-Polymerase sind ca. 100-200 ng genomische DNA. Die Oligonukleotide werden von der Firma MWG synthetisiert und lyophilisiert geliefert.

Als Standard PCR-Protokoll wird der Ansatz der Ampli-Taq Gold verwendet.

<b>Reagenzien für Ampli-Taq Gold</b>	<b>µl für 1x PCR-Ansatz</b>
PCR-Puffer (10x, mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> Roche/Applied Biosystems)	2,5
dNTPs (2 mM)	2
Primer F (20 pmol/µl)	0,5
Primer R (20 pmol/µl)	0,5



<b>Reagenzien für Ampli-Taq Gold</b>	<b>µl für 1x PCR-Ansatz</b>
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase (5 U/µl, Roche/Applied Biosystems)	0,125
100 - 200 ng genomische DNA	1-2
ddH <sub>2</sub> O ad 25 µl	ad 25 µl Gesamtvolumen

Tabelle 5: Standard PCR-Protokoll mit Ampli-Taq Gold.

Für problematische PCR's von *MTH1* Exon 3 wird eine Taq-Polymerase von QIAGEN mit Q-Solution verwendet, die sich speziell zur Amplifikation GC-reicher Sequenzen eignet:

<b>Reagenzien für QIAGEN Taq Polymerase</b>	<b>µl für 1x PCR-Ansatz</b>
PCR-Puffer (10x, + MgCl <sub>2</sub> , QIAGEN)	2,5
dNTPs (2 mM)	2,5
Q-Solution	5
Primer F (20 pmol/µl)	0,5
Primer R (20 pmol/µl)	0,5
Taq-Polymerase (5 U/µl; QIAGEN)	0,1
100 - 200 ng genomische DNA	1-2
ddH <sub>2</sub> O ad 25 µl	ad 25 µl Gesamtvolumen

Tabelle 6: PCR-Protokoll für Taq-Polymerase und Q-Solution für GC-reiche Sequenzen.

Für eine standardisierte PCR werden 25 µl Gesamtvolumen der oben genannten Komponenten zusammenpipettiert. Für Tests auf Kontamination der Proben werden Negativ- Kontrollen ohne DNA durchgeführt. Das jeweilige PCR-Programm richtet sich nach den Primer-Bedingungen, der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Spezifität. Die PCR erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler (MJ Research PTC-200) entweder mit einem spezifischen PCR-Programm (Tabelle 7) oder als Touch-Down-Programm (Tabelle 8).

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	30 sec

Vorgang	Temperatur	Dauer
3. Primeranlagerung	56°C-60°C	30 sec
4. Synthese	72°C	40 sec
Die Schritte 2-4 wurden in 39 Zyklen wiederholt		
5. Finale Elongation	72°C	5 min
6. Abschluß	95°C	2 min

*Tabelle 7: Spezifisches PCR-Programm mit Primeranlagerungstemperaturen abhängig von Primer zwischen 56° und 60°C.*

Die Touch-Down PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen nach der Methode von Don et al., 1991 und senkt die Temperatur von einer hohen Primeranlagerungstemperatur (64°C) ausgehend um 1°C je Zyklus auf bis zu 54°C oder 50°C ab. Die weiteren 24-29 Zyklen erfolgen dann bei 54°C beziehungsweise 50°C.

Vorgang	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	10 min
2. Denaturierung	94°C	30 sec
3. Primeranlagerung	64°C-1°C/Zyklus	30 sec
4. Synthese	72°C	30 sec
5. Die Schritte 2-4 wurden in 9-13 Zyklen wiederholt, dabei wird die Anlagerungstemperatur pro Zyklus um 1°C abgesenkt.		
6. Denaturierung	94°C	30 sec
7. Primeranlagerung	54°C oder 50°C	30 sec
8. Synthese	72°C	30 sec
9. Die Schritte 6-8 wurden in 24-29 Zyklen wiederholt		
10. Finale Elongation	72°C	7 min
11. Erhaltung	4°C	10 min

*Tabelle 8: Das Touch-Down PCR-Programm nach der Methode von Don et al., 1991.*

### **3.2.5 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese dient dazu, die Länge eines Amplikons zu bestimmen.

Für die horizontale Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von PCR-Produkten werden einprozentige und zweiprozentige Agarosegele genutzt. Die Zusammensetzung des Gels wird je nach Länge der aufzutragenden DNA-Fragmente gewählt. Längere Fragmente erfordern niederprozentigere Gele. Für die Auftrennung von kleinen PCR-Produkten zwischen 100-800 bp 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 ist. Nach Abkühlung auf etwa 50°C wird Ethidiumbromid (2 µl / 100 ml Gel) zugegeben und die Lösung in die vorbereitete Schale gegossen. Nach etwa 20 min ist das Gel fest. Die Kämme werden entfernt und das Gel wird in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Die vorbereiteten PCR-Proben (4 µl PCR-Produkt + 4 µl Auftragspuffer) und der Längenstandard können dann in die Geltaschen aufgetragen werden. Ein mitgeführter Längenstandard (Low Range oder LS V) dient zur Interpretation der Ergebnisse. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgt unter einem UV-Transilluminator (Herolab) bei 300 nm Wellenlänge und wird mit einer Kamera dokumentiert.

### **3.2.6 Reinigung und Extraktion von PCR-Produkten**

Um die amplifizierten Fragmente aus der PCR-Reaktion für eine nachfolgende Sequenzierung von Primern zu reinigen, wird eine PCR-Reinigung mit Exo-SAP nach dem Protokoll des Herstellers (USB) durchgeführt.

Entstehen bei einer PCR mehrere Banden, so wird das gesamte PCR-Volumen mit Auftragspuffer Orange G im Verhältnis 1:5 gemischt und vollständig auf das Gel aufgetragen. Die gewünschte Bande kann nach Beurteilung der Fragmentlänge aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktionskits (QIAGEN) nach Herstellerangaben gereinigt werden.

### **3.2.7 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der von Sanger 1977 beschriebenen Kettenabbruchsmethode. Diese Methode funktioniert nach einem der PCR verwandten Prinzip, bei der jedoch nur ein Primer zum Einsatz kommt. An diesem wird mittels Taq-

Polymerase und Nukleotiden die Kettenverlängerung durchgeführt. Dies geschieht so lange, bis zufällig ein in bestimmter Konzentration im Ansatz vorhandenes fluoreszenzmarkiertes Desoxyribonukleotid eingebaut wird, so dass es nach erfolgtem Einbau zum DNA-Syntheseabbruch kommt. Für die vier Nukleotide wird jeweils ein unterschiedlicher Farbstoff eingesetzt, so dass sich je nach Nukleotid an dem der Abbruch stattfindet die Fragmente mit entsprechender Farbmarkierung unterscheiden lassen. Eine Sequenzierungsreaktion geschieht analog zur PCR zyklisch und zwar mit je einem Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Elongationsschnitt. Der Sequenzproduktzuwachs findet aufgrund des Einsatzes nur eines einzelnen Primers linear statt. Die Sequenzreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

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

In die Sequenzreaktion werden 50-100 ng gereinigtes PCR-Produkt, 1  $\mu$ l BigDye Terminator Mix und 3 pmol Primer eingesetzt.

### **3.2.8 Sequenzanalyse**

Die automatisierte Sequenzbestimmung erfolgt auf dem Sequenziergerät 3730 DNA-Analyzer (Applied Biosystems) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen auf Pop 4. Die Matrix Sequenzrohdaten werden mit dem Softwarepaket 3100 Data Collection Software Version 3.0 erfasst und im Programmpaket Analyses 3.7 (Applied Biosystems) als Elektropherogramme dargestellt und analysiert. Die Auswertung der ausgedruckten Elektropherogramme erfolgt manuell unter Vergleich der Wildtyp-Sequenz aus Datenbanken.

### **3.2.9 Bestätigung**

Alle pathologischen Ergebnisse werden grundsätzlich in einer zweiten unabhängigen PCR und Sequenzreaktion bestätigt.

### 3.2.10 *in silico* Analysen und Web-basierte Datenbanken

Für vorliegende Arbeit wurden die Datenbanken <http://www.umd.be>, <http://www.cbs.dtu.dk>, <http://www.tigr.org>, <http://www.fruitfly.org> und <http://www.hgmd.cf.ac.uk> genutzt. Das Programm zur Vorhersage der Pathogenität von Aminosäureaustausch ist SIFT (<http://www.ngri.org.uk/Manchester/page/sift-sorting-intolerant-tolerant>) und PolyPhen(<http://coot.embl.de/PolyPhen/>). Für die Vorhersage der Pathogenität von Spleißstellen wird das Programm *Human splice finder* verwendet (Berkeley Drosophila Genome Project [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) mit ESEFinder).

## 4 Ergebnisse

Für die Mutationssuche in den Kandidatgenen wurde genomische DNA von 39 Indexpatienten aus dem MGZ München bzw. der LMU München verwendet. Mit Hilfe von intronischen Primern wurden alle Exons der Gene *OGG1* und *MTH1* inklusive der Spleißsequenzen am 5`- und 3`-Ende des Exons amplifiziert und auf dem Vorwärts- und Rückwärtsstrang vollständig sequenziert. Die Analysen des *MUTYH*-Gens wurden bereits zuvor im Rahmen der Routinediagnostik erbracht.

Während des Mutationsscreenings von *OGG1* und *MTH1* wurden in unserer Arbeit die in nachfolgender Abbildung 8 dargestellten Mutationen gefunden.

	Protein	Gen	Art der Mutation	Wildtyp AS	mut. AS	Konservierung
<b>c.29G&gt;T</b>	p.Arg10Leu	<i>OGG1</i>	Missense-Mutation	Arg →polar →basisch →stark hydrophil	Leu →unpolar →neutral →hydrophob	evolutionär nicht konserviert in <i>Mus musculus</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <b>Konserviert in <i>Xenopus levis</i></b>
<b>c.137G&gt;C</b>	p.Arg46Gln	<i>OGG1</i>	Spleiß-Mutation	Arg →polar →basisch →stark hydrophil	Gln →polar →neutral →hydrophil	evolutionär konserviert zu 73%.
<b>c.923G&gt;A</b>	p.Gly308Glu	<i>OGG1</i>	Missense-Mutation	Gly →unpolar →neutral →hydrophob	Glu →polar →sauer →stark hydrophob	<b>evolutionär konserviert in <i>Mus musculus</i>, <i>Arabidopsis thaliana</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Candida</i>, <i>Rattus norvegicus</i> und anderen Spezies;</b>
<b>c.977C&gt;G</b>	p.Ser326Cys	<i>OGG1</i>	SNP	Ser →polar →neutral →hydrophil	Cys →polar →neutral →hydrophil	evolutionär nicht konserviert in <i>Mus musculus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Rattus norvegicus</i> .
<b>c.346A&gt;T</b>	p.Met116Leu	<i>MTH1</i>	Missense-Mutation	Met →unpolar →neutral →hydrophob	Leu →unpolar →neutral →hydrophob	evolutionär nicht konserviert in <i>Mus musculus</i> , <b>Konserviert: in <i>Xenopus tropicalis</i>, <i>Arabidopsis thaliana</i>, <i>Dario rerio</i>, <i>Gallus gallus</i></b>
<b>c.625A&gt;G</b>	p.Ile209Val	<i>MUTYH</i>	Missense-Mutation	Ile →unpolar →neutral →hydrophob	Val →unpolar →neutral →hydrophob	evolutionär wenig konserviert
<b>c.102C&gt;T</b>	p.Gly34Gly	<i>MTH1</i>	stille Mutation	Gly →unpolar →neutral →hydrophob		
<b>c.111C&gt;T</b>	p.Gly37Gly	<i>MTH1</i>	stille Mutation	Gly →unpolar →neutral →hydrophob		
<b>c.386-31 C&gt;T</b>		<i>OGG1</i>	SNP			

Abbildung 8: Mutationen in den an der BER beteiligten Genen *OGG1*, *MTH1*, *MUTYH* in ausgewählten Patienten mit Angabe von cDNA Position, Proteinposition, Gen, Art der

*Mutation, Vergleich der chemischen Aminosäurecharaktere und Aussage zur evolutionären Konservierung.*

Die Nummerierung der Basen erfolgte ausgehend vom Start-Codon ATG. Benutzt wurden die Isoform 1a für *OGG1* (NM\_002542), p 18 für *MTH1* (NM\_198953) und langes Transkript NM\_001128425 für *MUTYH*. Die häufigsten *MUTYH*-Mutationen sind p.Tyr179Cys und p.Gly396Asp in Exon 7 und Exon 13, früher berichtet als p.T165Cys und p.Gly382Asp, was p.Tyr176Cys und p.Gly393Asp in anderen *MUTYH*-Transkriptionen entspricht.

#### **4.1 *OGG1*-Gen Analyse**

Im *OGG1*-Gen wurden die Exons aller bekannten Spleißvarianten analysiert, das heißt Exon 1, 2, 3, 4, 5, Intron 6, 7, das alternative Exon 7 sowie Exon 8.

Gefunden wurde im Exon 1 die Missense-Mutation c.29G>T; p.Arg10Leu bei einer Frau mit mehreren hyperplastischen Polypen und einem Kolonkarzinom im Alter von 53 Jahren (siehe Abbildung 9). In Intron 2 vor Exon 3 wurde die Sequenzveränderung c.386-31C>T bei einer Frau mit hyperplastischen Polypen im Alter von 37 Jahren gefunden, in Intron 3 c.565+102C>A bei drei Männern und einer Frau, c.565+104T>A bei zwei Männern und drei Frauen, c.565+105C>A bei zwei Frauen, c.565+106C>A bei sechs Männern und einer Frau, c.565+107C>A bei vier Männern, c.565+108C>A bei zwei Männern und zwei Frauen vorgefunden (siehe Abbildung 11). In Intron 3 vor dem Exon 4 wurde c.566-4G>A bei drei Männern und drei Frauen an der nicht konservierten Base vor der Spleißstelle gefunden (siehe Abbildung 13). In Intron 4 vor dem Exon 5 wurde die Sequenzveränderung c.748-15C>G heterozygot bei fünf Männern und fünf Frauen, homozygot bei zwei Männern gefunden (siehe Abbildung 14). Im Exon 6 wurde die Missense-Mutation c.923G>A; p.Gly308Glu bei Mutter und Sohn heterozygot gefunden (siehe Abbildung 15). Im Exon 7 wurde die Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys heterozygot bei acht Männern und vier Frauen, homozygot bei zwei Männern und einer Frau gefunden (siehe Abbildung 17). Im Exon 8 der Isoform 2d wurde nach dem Stopp c.1071\*370A>G bei einem Mann und einer Frau gefunden (siehe Abbildung 20).

#### 4.1.1 Exon 1

Im Exon 1 wurde in einer Patienten-DNA eine heterozygote Sequenzveränderung c.29G>T; p.Arg10Leu entdeckt (Abbildung 9 zeigt den Sequenzabschnitt). In der Datenbank HGMD war diese Mutation bis jetzt nicht beschrieben, deswegen wurde sie zunächst als Missense-Mutation mit unklarer Pathogenität bezeichnet.

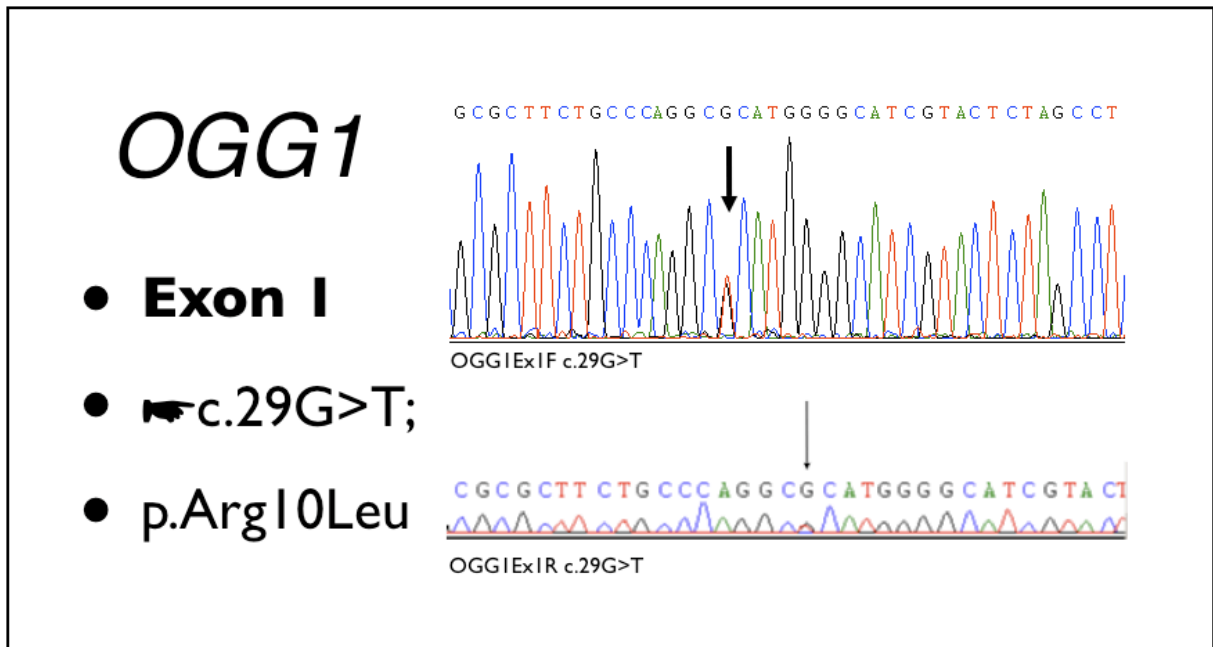


Abbildung 9: Sequenzausschnitt der Mutation c.29G>T in OGG1 Exon 1 (oben vorwärts, unten rückwärts).

Die Patientin ist 1947 geboren und hat mehrere hyperplastische Darmpolypen. Mit 53 Jahren entwickelte diese Frau ein Kolonkarzinom. Die Familienanamnese von der Patientin ist belastet. Ihr Vater wurde mit 82 Jahren koloskopiert und hatte multiple Polypen und Adenome, mit 84 Jahren ist er wegen eines Lungenkarzinoms verstorben. Zwei Tanten (Schwestern des Vaters) hatten im Alter von 60-65 Jahren Kolonkarzinome, wobei eine von ihnen im Alter von 65 Jahren daran verstorben ist (siehe Stammbaumanalyse in Abbildung 10). DNA-Proben der Tanten und des Vaters waren nicht verfügbar.

Drei weitere Familienmitglieder (zwei Schwestern und ein Bruder) wurden ebenfalls auf diese Sequenzvariante hin untersucht. Der Bruder der Patientin hatte ebenfalls die Missense-Mutation unklarer Pathogenität, wobei bei ihm mit 50 Jahren mehrere hyperplastische Polypen festgestellt wurden. Auch die jüngere Schwester (geb. 1938) hatte in der Sequenz die c.29G>T; p.Arg10Leu Variante und auch bei ihr wurden mit 50 Jahren



hyperplastische Polypen diagnostiziert. Die älteste Schwester (geb. 1928) hingegen hatte eine normale Sequenz und eine unauffällige Koloskopie im Alter von 75 Jahren.

Über den weiteren Bruder gibt es keine Informationen. Eine dritte Schwester hatte eine unauffällige Koloskopie, eine DNA-Untersuchung war nicht möglich.

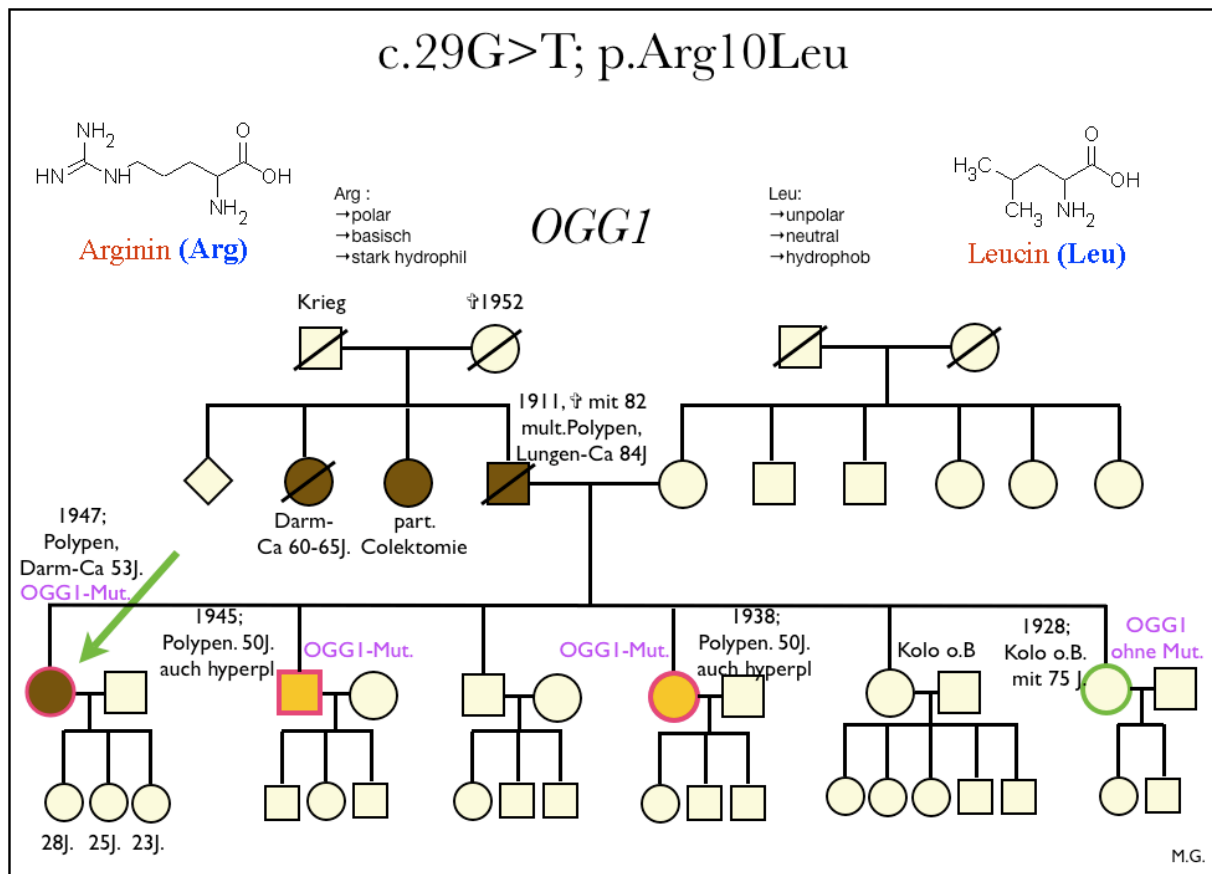


Abbildung 10: Familienstammbaum und Segregationsanalyse von Patientin mit c.29G>T; p.Arg10Leu in OGG1 Exon 1 (Indexpatientin ist mit grünem Pfeil markiert). Rot umrandet sind Patienten mit der Missense-Mutation unklarer Pathogenität, grün umrandet Patienten mit Wildtyp Sequenz, braun markiert sind Patienten mit Kolonkarzinom und Vater der Indexpatientin mit Lungenkarzinom, orange markiert Patienten mit Adenomen und hyperplastischen Polypen.

Alle weiteren Patienten hatten keine Veränderungen im Exon 1.

## 4.1.2 Exon 2

Im Exon 2 von *OGG1* wurden in allen 39 Patienten keine Veränderungen gefunden.

## 4.1.3 Exon 3

In *OGG1* Exon 3 wurden nur intronische Sequenzveränderungen identifiziert, eine davon mit unklarer Pathogenität (siehe Abbildung 11).

Die intronischen Veränderungen c.565+102C>A, c.565+104T>A, c.565+105C>A, c.565+106C>A, c.565+107C>A und c.565+108C>A wurden bei der Sequenzierung von *OGG1* Exon 3 sehr häufig heterozygot, aber in sehr geringer Intensität gefunden, so dass ein technisch bedingtes Artefakt bzw. ein Hintergrundpeak eines Adenins denkbar wäre. (Abbildung 11). Die Stelle liegt direkt vor dem R-Primer, weshalb sie nur in F-Richtung analysierbar war.

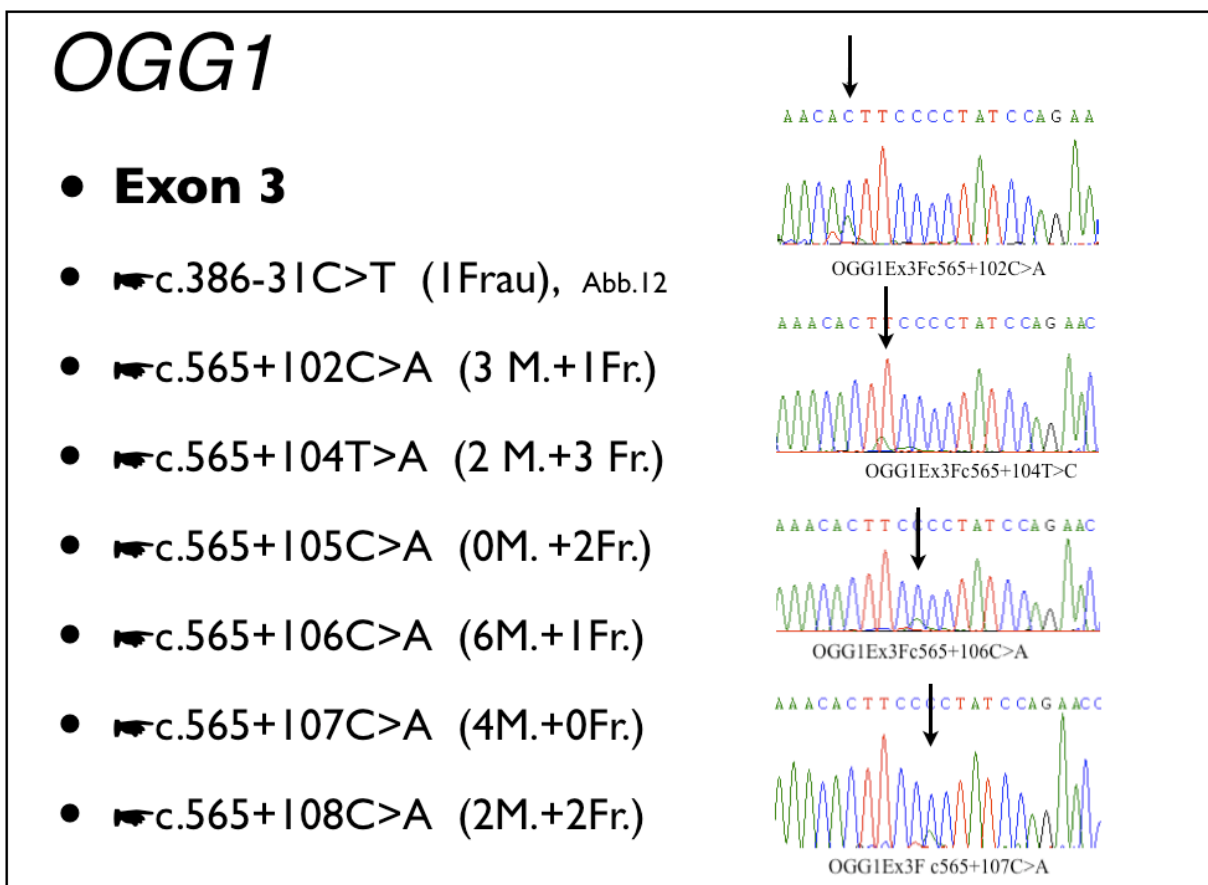


Abbildung 11: Sequenzausschnitte häufig gefundener Veränderungen in *OGG1* Exon 3. Kein Dosisverlust eines Allels, sondern Sequenzartefakte.

Die intronische Veränderung c.386-31C>T in Intron 2 wurde in einer einzigen Patientin heterozygot gefunden. Die Sequenzveränderung betrifft weder die Spleißstelle von Exon 3 noch die Branch-site (Verzweigungsstelle), die üblicherweise etwa 20-50 bp vor dem Exonstart lokalisiert ist und ein konserviertes Adenin beinhaltet ( $CT^A_G A^C_T C_T$ ). Die Überprüfung mittels *human splice finder* ergab einen Index von 62, was auf eine geringe Pathogenität schließen lässt. Weil diese Variante c.386-31C>T nur einmal vorkam wurde sie auch als „unklare“ Sequenzveränderung bezeichnet.

Die Patientin mit Sequenzveränderung c.386-31C>T hatte mit 37 Jahren hyperplastische Polypen. Ihre Familienanamnese ist positiv (siehe Stammbaumanalyse in Abbildung 12). Der Vater der Patientin erkrankte mit 57 Jahren an einem Darmkarzinom. Ihre Tante väterlicherseits ist mit 42 Jahren an Darmkrebs erkrankt und daran rasch verstorben. Von dem Onkel väterlicherseits gibt es keine Informationen.

Auch mütterlicherseits gibt es einen Onkel (Bruder der Mutter), bei dem mit ca. 60 Jahren Darmkrebs diagnostiziert wurde. Unsere Indexpatientin ist ein Einzelkind in der Familie und weitere DNA-Untersuchungen gab es nicht.

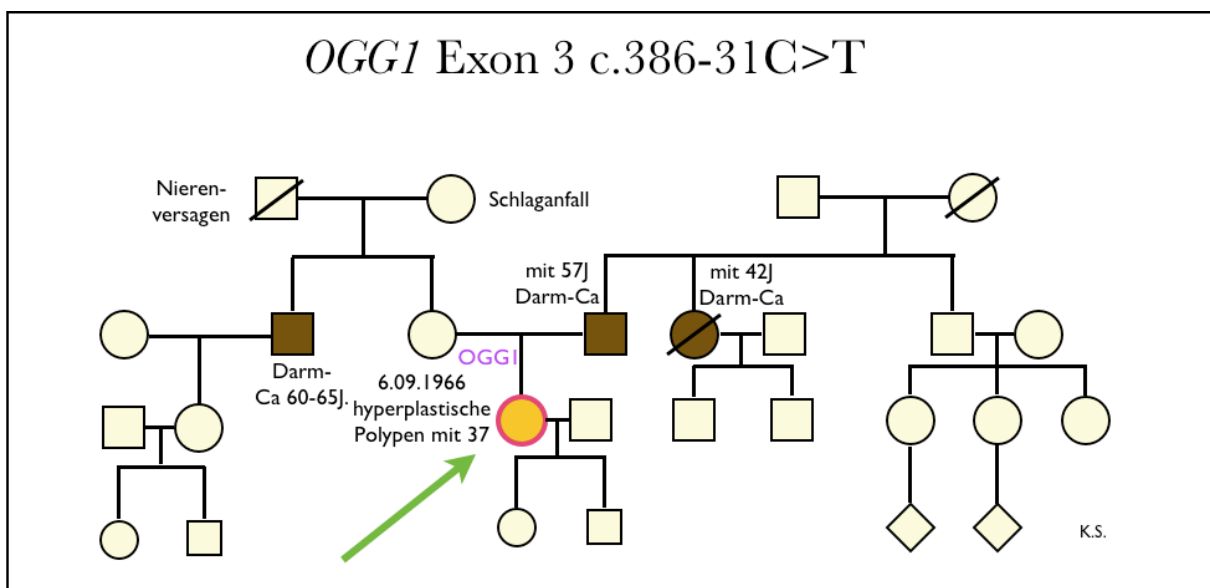


Abbildung 12: Familienstammbaum und Segregationsanalyse von der Patientin mit der Sequenzvariante c.386-31C>T in *OGGI* Exon 3 (Indexpatientin ist mit grünem Pfeil markiert). Rote Umrandung bezeichnet Patientin mit unklarer Sequenzvariante (in dem Fall nur unsere Indexpatientin). Braun markiert sind Patienten mit Kolonkarzinomen, orange markiert Patienten mit Adenomen und hyperplastischen Polypen.

#### 4.1.4 Exon 4

Bei der Analyse von *OGG1* Exon 4 wurde in sechs Patienten (siehe Abbildung 13) die heterozygote intronische Veränderung c.566-4G>A in einer evolutionär nichtkonservierten Sequenz gefunden, die keine Spleiß-Stelle darstellt. Aufgrund des relativ häufigen Vorkommens in sechs von 39 Patienten wurden sie als nicht pathologisch gedeutet.

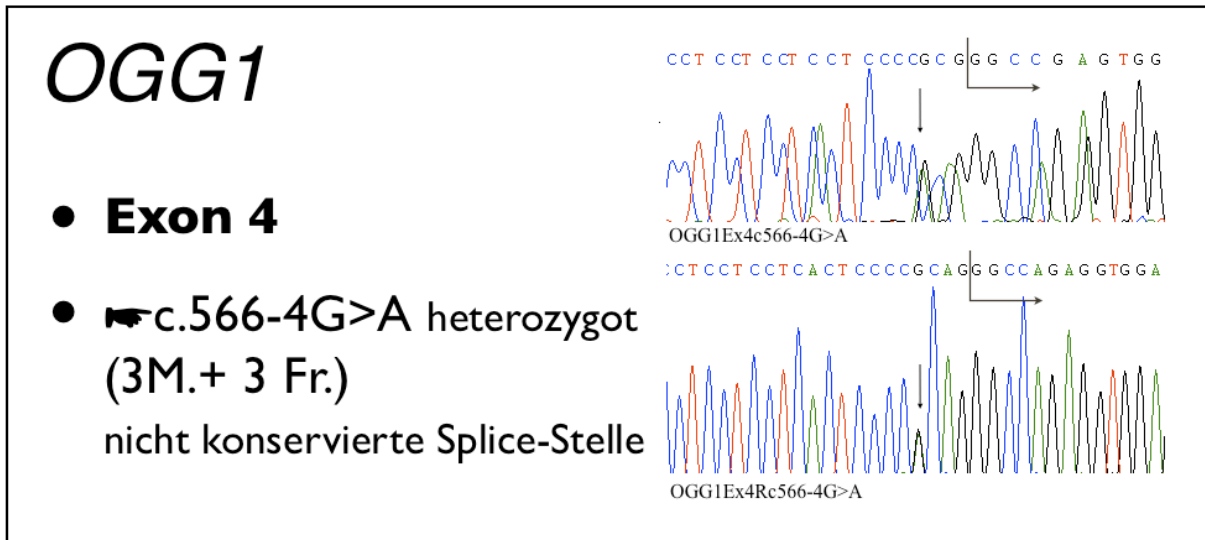


Abbildung 13: Sequenzausschnitte der häufig gefundenen heterozygoten Veränderung c.566-4G>A in *OGG1* Exon 4.

#### 4.1.5 Exon 5

Bei der Sequenzanalyse von *OGG1* Exon 5 kam die intronische Sequenzveränderung c.748-15C>G zwölfmal vor, zehnmal hetero- und zweimal homozygot (siehe Abbildung 14). Nach Ausschluss einer konservierten Branch-Site Sequenz über den *human splice finder* wurde sie, auch aufgrund ihrer Häufigkeit, als nicht pathogener Polymorphismus gewertet.

# OGG1

## Exon 5

☛ c.748-15C>G

(5 Männer+ 5Frauen)

☛ c.748-15C>G

(2 Männer + 0Frauen)

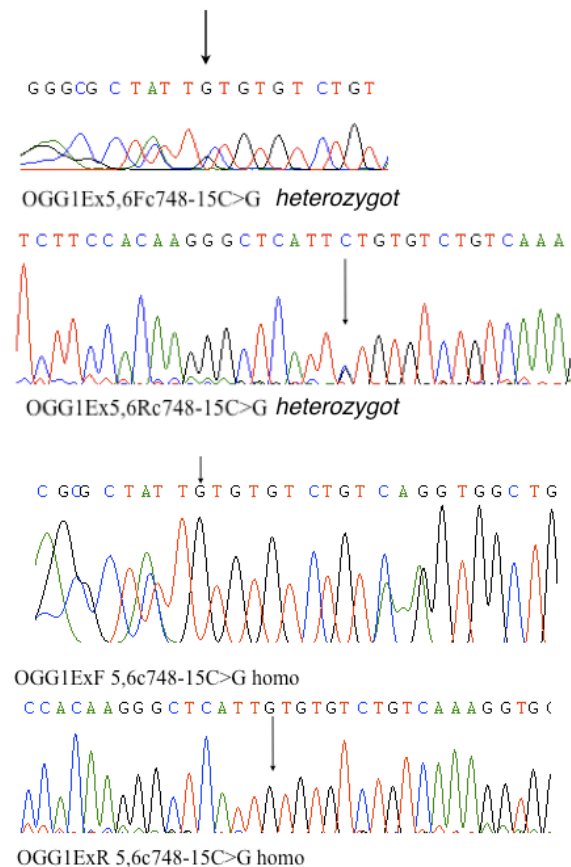


Abbildung 14: Sequenzausschnitte von c.748-15C>G vor OGG1 Exon 5, der häufig gefundenen Veränderungen und Verteilungsmuster zwischen Frauen und Männern, in hetero- und homozygoten Varianten.

### 4.1.6 Exon 6

Im Exon 6 von OGG1 wurde eine heterozygote Missense-Mutation c.923G>A; p.Gly308Glu bei zwei verwandten Patienten gefunden (siehe Abbildung 15). In der Datenbank HGMD wurde diese Mutation bis jetzt nicht beschrieben, deswegen wurde sie zunächst als Missense-Mutation mit unklarer Pathogenität bezeichnet. In weiteren Vorhersagen wurde versucht, die mögliche Pathogenität dieser kodierenden Sequenzveränderung näher zu bestimmen.

# OGG1

- **Exon 6**

- **c.923G>A;**

- **p.Gly308Glu**  
(Mutter + Sohn)

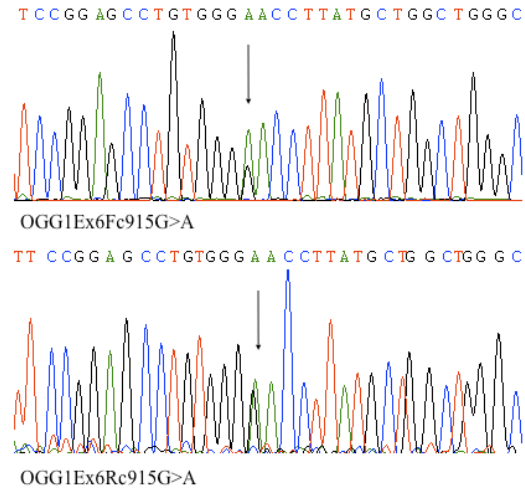


Abbildung 15: Sequenzausschnitt der heterozygoten Mutation in *OGG1* Exon 6 c.923G>A; p. Gly308Glu (oben vorwärts, unten rückwärts).

Die Indexpatientin ist 1949 geboren, hatte 250 Polypen und entwickelte mit 54 Jahren ein Kolonkarzinom. Ihr jüngster Sohn (1982 geboren) hatte bereits mit 26 Jahren multiple Darmpolypen, zum Teil auch hyperplastische. Der Sohn wurde wegen des ausgeprägten Phänotyps als separater Indexpatient in die Studie aufgenommen um eine vollständige Analyse beider Gene zu erhalten.

Die Familienanamnese von Mutter und Sohn ist stark belastet (siehe Stammbaum in Abbildung 16). Der Vater der Patientin ist mit 52 Jahren an einem Leberkarzinom verstorben. Die Mutter der Patientin ist mit 58 Jahren an Darmkrebs und Uteruskarzinom gestorben. Die Großmutter der Patientin starb ebenfalls an Darmkarzinom, zwei Onkel mütterlicherseits erhielten jeweils die Diagnose von Darm- bzw. Magenkarzinom.

Zur Zeit der Dissertationserstellung wurden aus der Familie Mutter, jüngster Sohn und Tochter auf die Sequenzvariante hin untersucht. Der Sohn, wie oben bereits beschrieben, hatte die Sequenz c.923G>A; p.Gly308Glu in *OGG1* Exon 6 und hatte einen ausgeprägten Phänotyp.

Die Tochter der Patientin war zu dem Zeitpunkt der Untersuchung 41 Jahre alt, hatte eine unauffällige Koloskopie und trug die Wildtypsequenz in *OGG1* Exon 6.

Alle weiteren Patienten des Kollektivs zeigten keine Veränderungen im Exon 6.

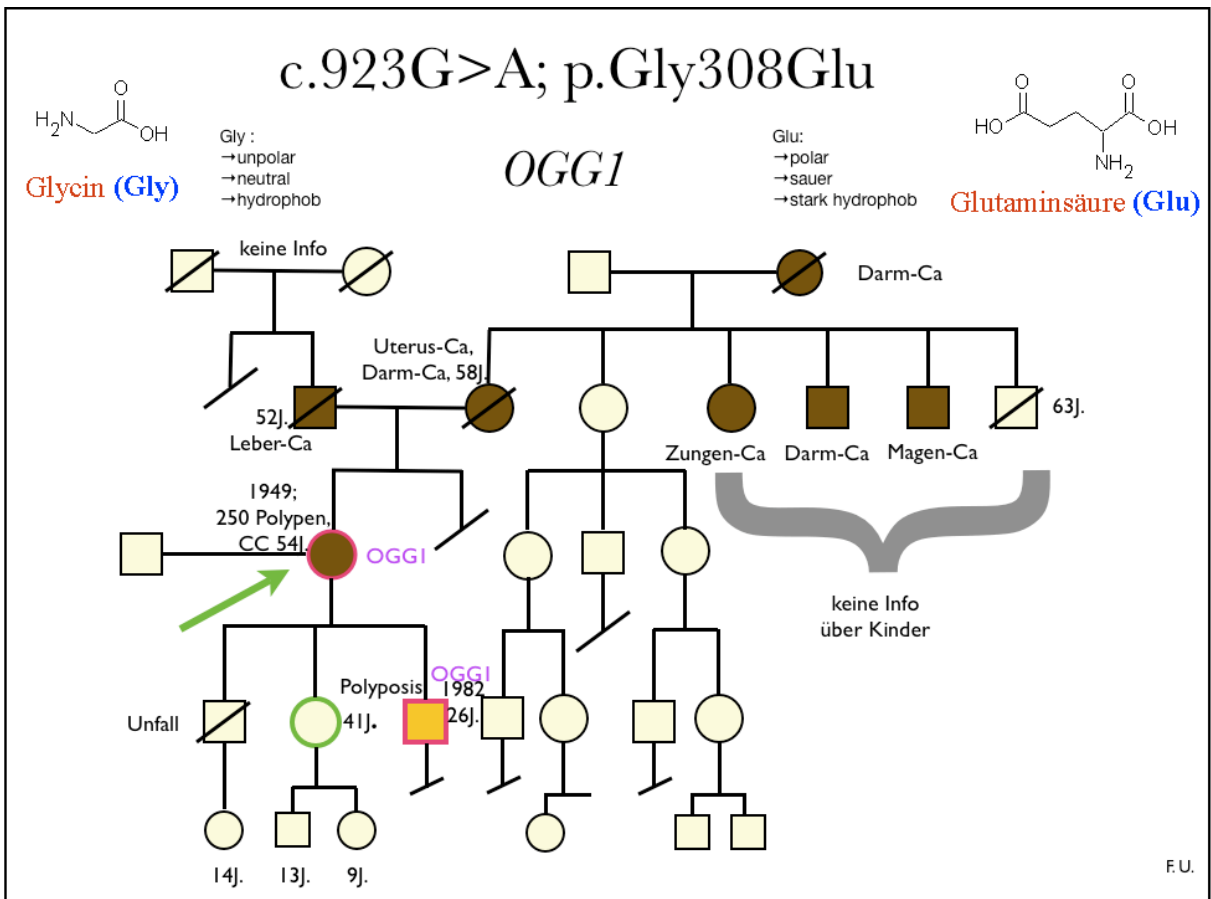


Abbildung 16: Familienstammbaum und Segregationsanalyse von Patientin mit c.923G>A; p.Gly308Glu in OGG1 Exon 6 (Indexpatientin ist mit grünem Pfeil markiert). Rot umrandet sind Patienten mit einer Missense-Mutation unklarer Pathogenität, grün umrandet Patienten mit Wildtypsequenz, braun markiert sind Patienten mit Karzinomen, orange markiert Patienten mit Adenomen und hyperplastischen Polypen.

#### 4.1.7 Exon 7

Die Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys in OGG1 Exon 7 war in unserem Patientenkollektiv insgesamt mit 15 Fällen vertreten (siehe Abbildung 17): in zwölf Patienten (acht Männern und vier Frauen) heterozygot und in drei Patienten (zwei Männern und einer Frau) homozygot.

Die Beurteilung der Ergebnisse in OGG1 Exon 7 war eine besondere Herausforderung, da zu der Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys hinsichtlich ihrer Pathogenität sehr viele widersprüchliche Beurteilungen in Literaturangaben existieren.

Um die Allelhäufigkeit dieser Missense-Mutation in einer gesunden Normalbevölkerung ermitteln zu können, wurden zwei Kontrollgruppen definiert, die ebenso auf die besagte Sequenzveränderung c.977C>G; p.Ser326Cys getestet wurden.

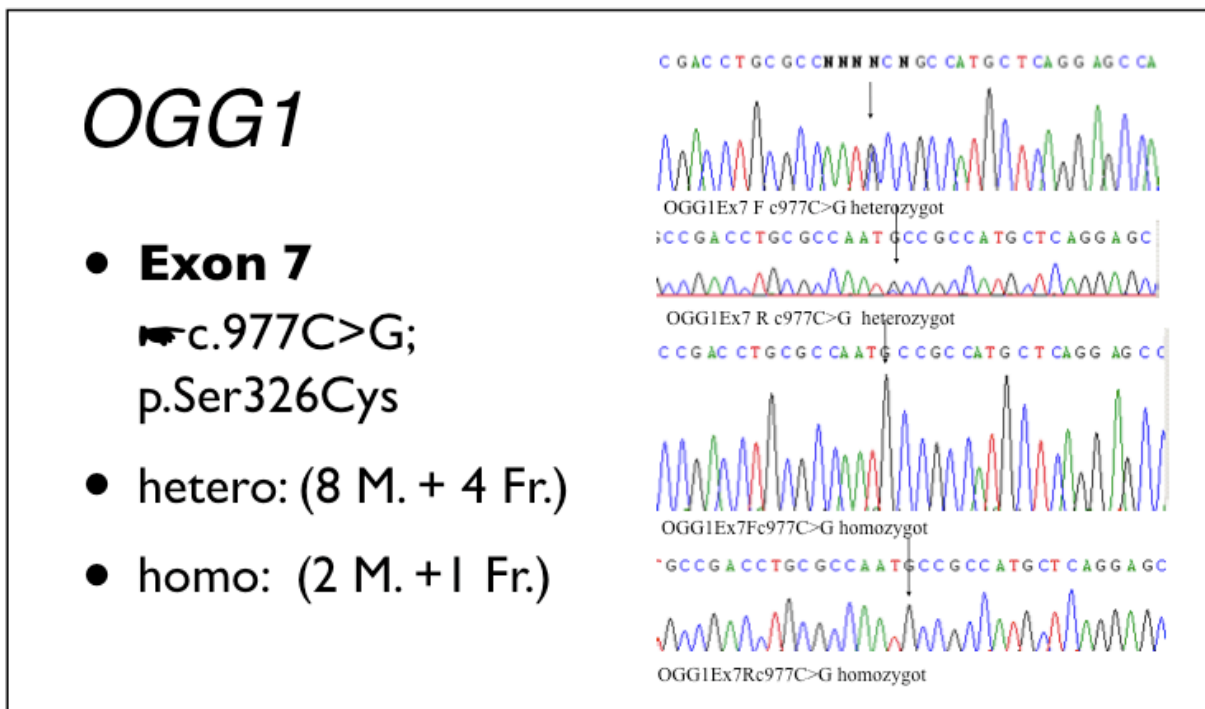


Abbildung 17: Sequenzausschnitt der Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys in OGG1 Exon 7 (vorwärts und rückwärts heterozygot, vorwärts und rückwärts homozygot).

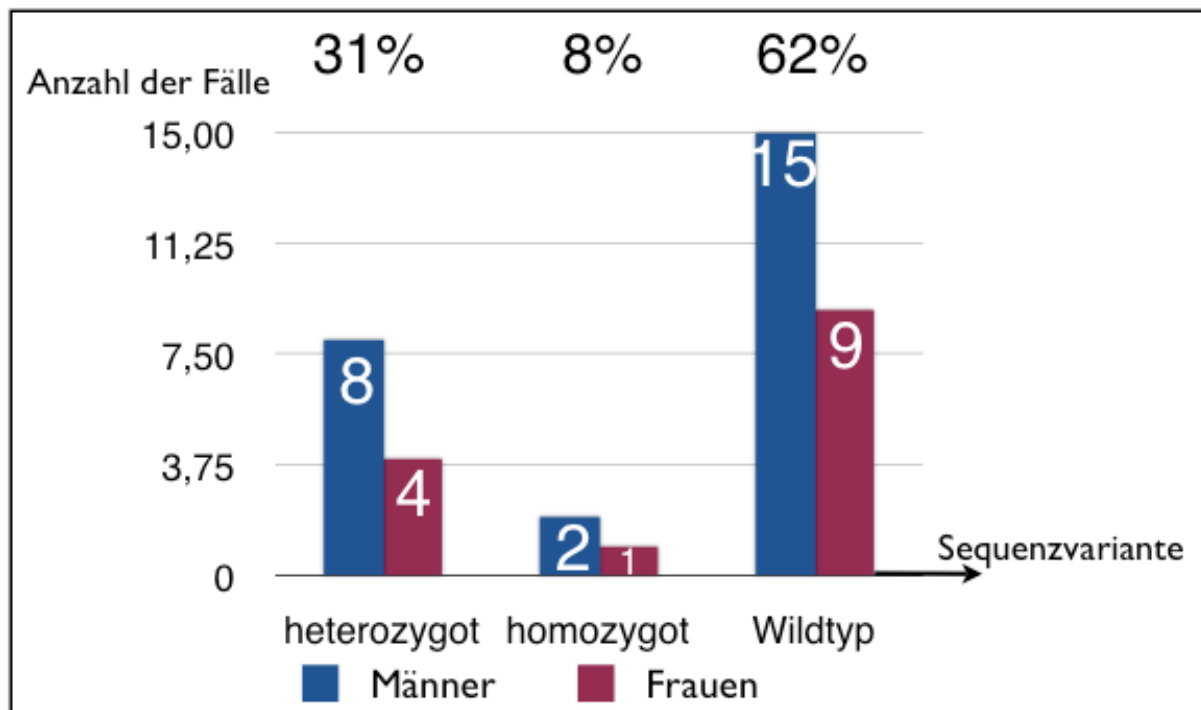


Abbildung 18: Prozentuale Allelfrequenz der Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys in OGG1 Exon 7 bei Frauen und Männern in unserem Patientenkollektiv von 39 heterozygoten



bzw. homozygoten Sequenzveränderungen und Wildtypsequenz. Die Y-Achse zeigt Anzahl der Indexfälle mit Patienten.

#### **4.1.8 Kontrollgruppe I und II**

Beide Kontrollgruppen beinhalteten jeweils 60 Patienten. In die erste Gruppe wurden Patienten mit Lynch-Syndrom und sicher pathogener Keimbahnmutation in einem der Mismatch-Reparaturgene *MLH1*, *MSH2* oder *MSH6* aufgenommen. Die zweite Kontrollgruppe bestand aus Patienten mit einem Alter von über 80 Jahren ohne einer bekannten Tumorerkrankung, bei denen auf Morbus Alzheimer Prädisposition getestet wurde.

Die erste Kontrollgruppe bestand aus 26 Männern und 34 Frauen mit Lynch-Syndrom. Die Sequenzveränderung c.977C>G; p.Ser326Cys war in diesem Kontrollkollektiv I insgesamt 25 Mal vertreten. Die 18 heterozygoten Träger der unklaren Variante teilten sich in acht Männer und zehn Frauen auf. Die sieben homozygoten Träger der Missense-Mutation setzten sich aus fünf Männern und zwei Frauen zusammen (siehe Abbildung 19).

Da sich diese Ergebnisse kaum von denen unseres Patientenkollektivs unterscheiden, wurde beschlossen, eine weitere Kontrollgruppe mit möglichst alten Probanden ohne bekannte Magen-Darm-Trakt-Erkrankungen und Neoplasien zu untersuchen. In dieser Kontrollgruppe II wurden 22 Männer und 38 Frauen eingeschlossen, die alle über 80 Jahre alt und ohne eine bekannte Tumorerkrankung waren und zuvor auf Prädisposition für Morbus Alzheimer getestet wurden. In der Kontrollgruppe II war die Sequenz c.977C>G; p.Ser326Cys insgesamt mit 22 Fällen vertreten. Die 17 heterozygoten Träger teilten sich in sieben Männer und zehn Frauen auf. Die fünf homozygoten Träger bestanden aus zwei Männern und drei Frauen (siehe Abbildung 19).

# Kontrollgruppe I+II

## OGG1 c.977C>G; p.Ser326Cys

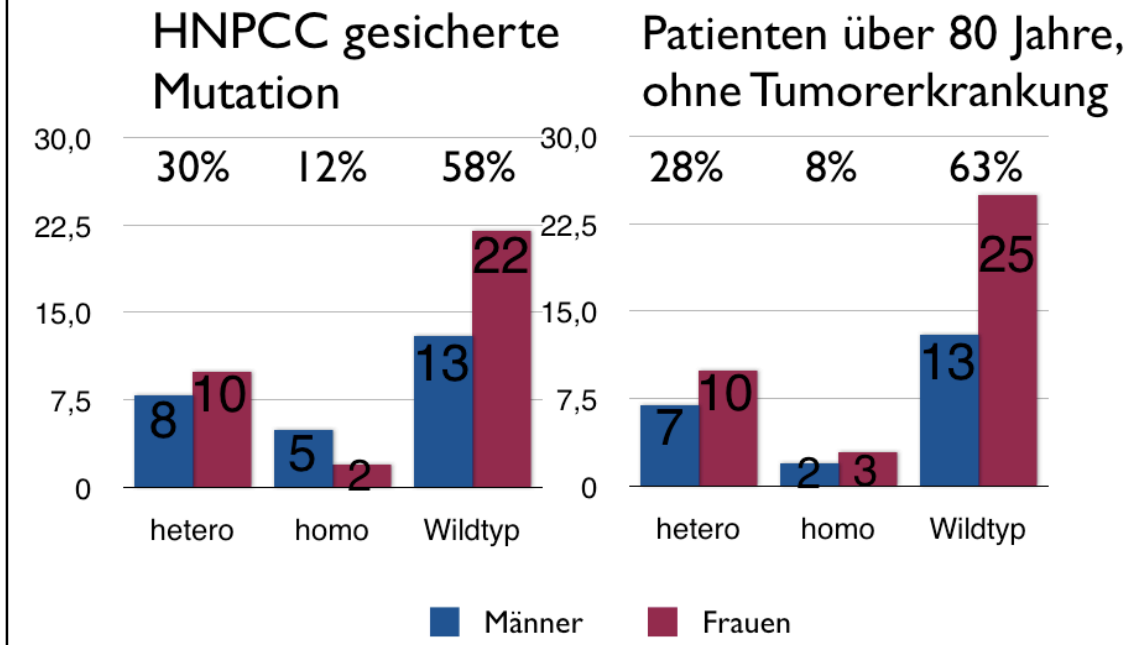


Abbildung 19: Vergleich und Verteilungsmuster von c.977C>G; p.Ser326Cys in den beiden Kontrollgruppen hinsichtlich hetero-, homozygoten Varianten und Wildtypsequenz. Die Y-Achse zeigt Anzahl der Männer und Frauen.

### 4.1.9 Exon 7a (alternativ)

Im alternativen Exon 7a wurde keine Veränderung gefunden.

### 4.1.10 Exon 8

Im Exon 8 wurde im 3'-untranslatierten Bereich sowohl nach dem Stopp-Codon der Transkripte 2c und 2d als auch nach dem Stopp-Codon der Transkripte 2a und 2b die Sequenzveränderung \*66A>G bei einer Frau und einem Mann heterozygot vorgefunden (siehe Abbildung 20). Weil diese nach dem zweiten TGA und weit vor der Poly-Adenylierungsstelle positioniert ist, wurde sie als nicht pathogener Polymorphismus gewertet, und nicht weiter untersucht.

# OGG1

- **Exon 8**
- nach  
2TGA\*66A>G  
(IM. +I Fr.)

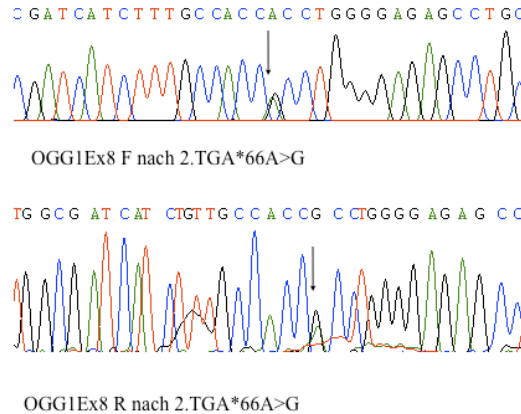


Abbildung 20: Sequenzausschnitte der in zwei Patienten gefundenen Veränderungen in OGG1 Exon 8 (oben vorwärts, unten rückwärts).

## 4.2 MTH1

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isoform p22 von *MTH1* mit alternativem Exon 1 untersucht (siehe Abbildung 7 in Kapitel 1.2.3). Untersucht wurden Exon 1, 2, 3, 4 und das alternative Exon 1, wobei das nicht kodierende Exon 0 nicht analysiert wurde.

### 4.2.1 Exon 1

Im Exon 1 von *MTH1* wurden keine Veränderungen in unserem Patientenkollektiv gefunden.

### 4.2.2 Exon 2

Im Exon 2 von *MTH1* wurden die zwei heterozygoten stillen Mutationen c.102C>T; p.Gly34Gly und c.111C>T; p.Gly37Gly zusammen mit einer heterozygoten intronischen Veränderung c.152+11G>A in einem männlichen Patienten gefunden (siehe Sequenzausschnitte in Abbildung 21).

# MTH1

- **Exon 2**
- **☞ c.102C>T;p.Gly34Gly**
- **☞ c.111C>T;p.Gly37Gly**
- **☞ c.152+11G>A**

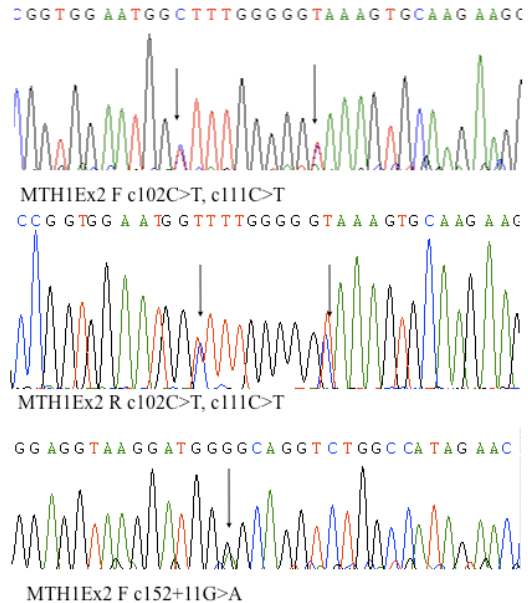


Abbildung 21: Sequenzausschnitt der stillen Mutationen c.102C>T; p.Gly34Gly und c.111C>T; p.Gly37Gly und der intronischen Veränderung c.152+11G>A in MTH1 Exon 2, alle in einem Patienten.

Der Indexpatient wurde im Jahr 1954 geboren, mit 52 Jahren wurden bei ihm 16 hyperplastische Polypen in der rechten Flexur und ein Sigmaadenom diagnostiziert.

Auch in diesem Fall wurde die Stammbaumanalyse des Patienten durchgeführt (siehe Abbildung 22). Die Mutter des Patienten hatte mit 44 Jahren die Diagnose eines Darmkarzinoms und ist mit 71 Jahren an „Unterleibskrebs“ verstorben. Ihre auch verstorbene Schwester (Tante des Indexpatienten) hatte mit 30 Jahren Brustkrebs. Über zwei jüngere Schwestern (Tanten des Patienten) gibt es keine weiteren Informationen. Auch der Bruder unseres Indexpatienten hatte im Alter von 52 Jahren ein Sigmaadenom und einen hyperplastischen Polypen. Von keinem Familienangehörigen war DNA zum Test auf Segregation verfügbar.

Diese drei Sequenzveränderungen wurden als nicht pathologisch klassifiziert, da die beiden stillen Mutationen keine Aminosäureveränderungen im Protein bewirken und die intronische Veränderung nicht in einem konservierten Bereich für das Spleißen der mRNA liegt. Es konnte nicht geklärt werden, ob die Sequenzveränderungen *in cis* oder *in trans* vorliegen.

Alle weiteren Patienten zeigten keine Veränderung in Exon 2.

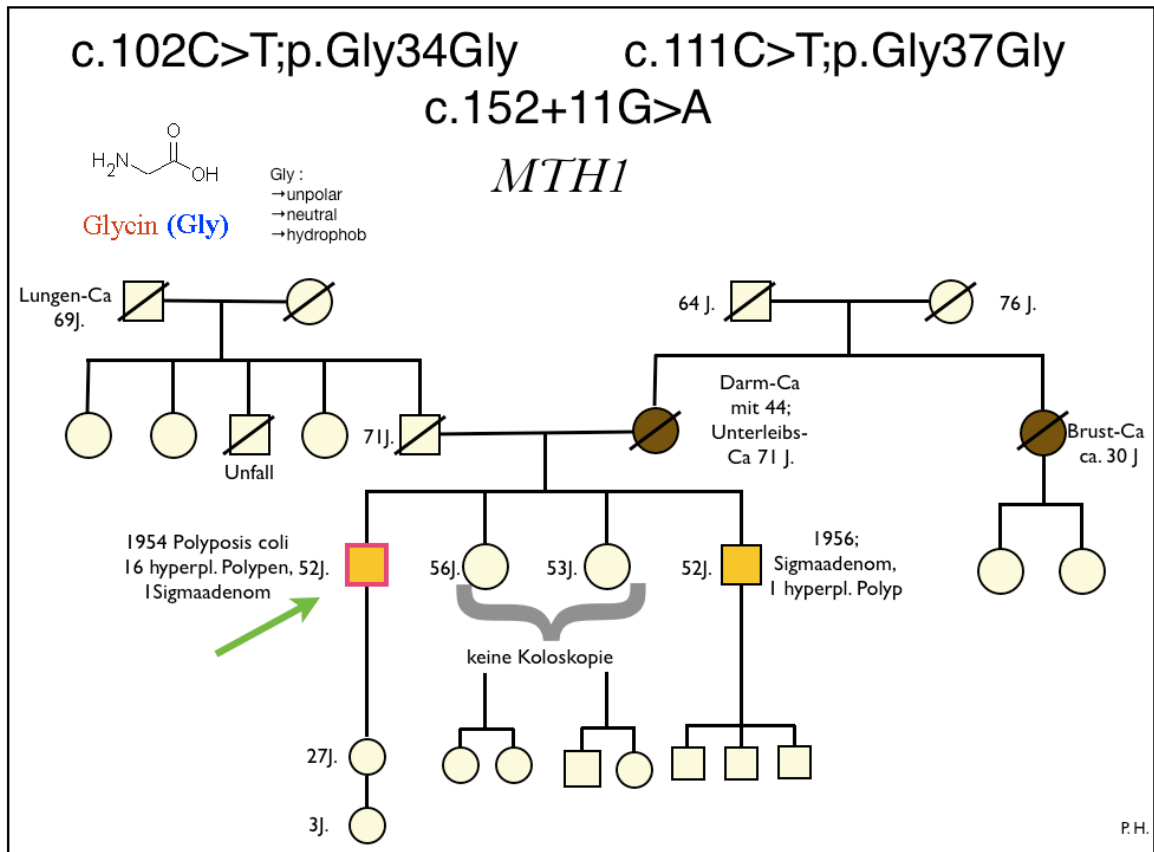


Abbildung 22: Familienstammbaum von einem Patienten mit zwei stillen Mutationen (c. 102C>T; p.Gly34Gly und c.111C>T; p.Gly37Gly) in *MTH1* Exon 2 und der intronischen Sequenzveränderung c.152+11G>A in *MTH1* Exon 2 (Indexpatient ist mit grünem Pfeil markiert). Rote Umrandung bezeichnet Patienten mit einer unklaren Sequenzvariante (in dem Fall nur unseren Indexpatienten). Braun markiert sind die Mutter mit Kolonkarzinom und Tante des Patienten mit Brustkrebs, orange markiert Patienten mit Adenomen und hyperplastischen Polypen.

#### 4.2.3 Exon 3

In Exon 3 von *MTH1* wurden keine Veränderungen gefunden.

#### 4.2.4 Exon 4

In Exon 4 von *MTH1* wurde mit c.346A>T; p.Met116Leu in einem männlichen Patienten eine heterozygote Sequenzveränderung gefunden. Abbildung (23) zeigt den entsprechenden Sequenzabschnitt. In der Datenbank HGMD war diese Mutation bis jetzt

nicht beschrieben, weshalb sie bis auf Weiteres als Missense-Mutation mit unklarer Pathogenität bezeichnet wurde.

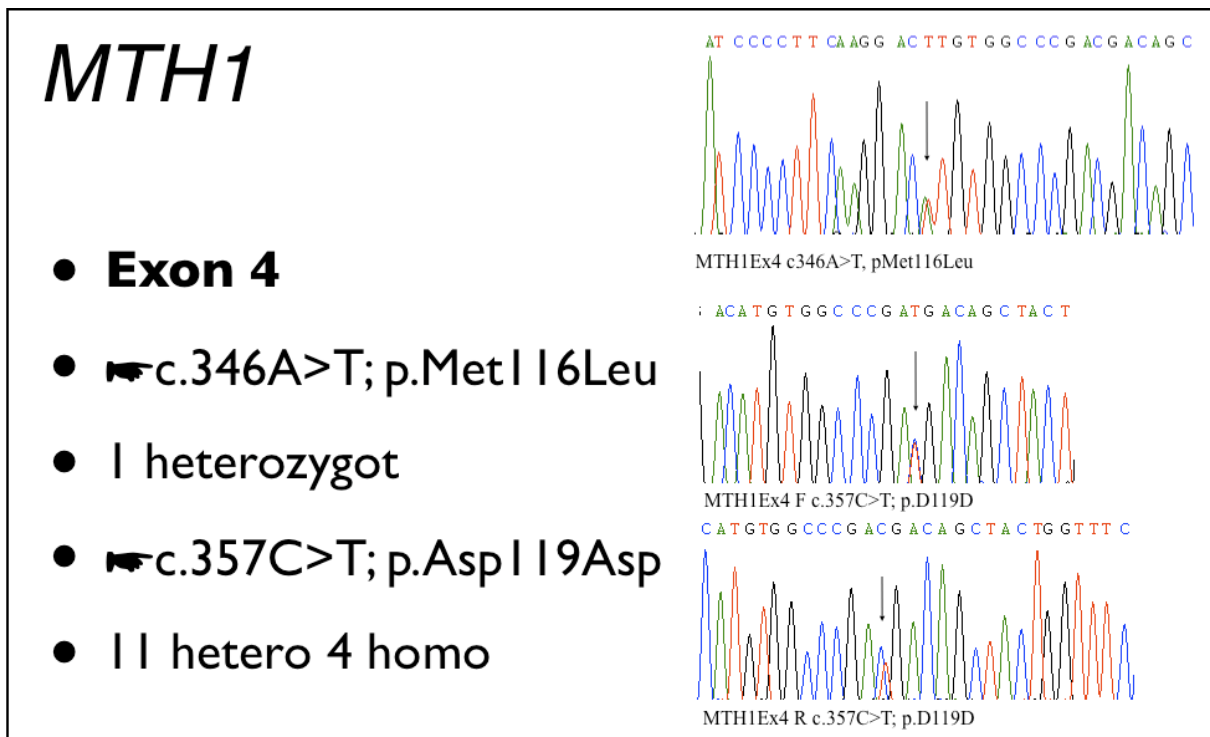


Abbildung 23: Sequenzausschnitte der Missense-Mutation c.346A>T; p.Met116Leu in MTH1 Exon 4 bzw. der stillen Mutation c.357C>T; p.Asp119Asp in MTH1 Exon 4 und Häufigkeit von hetero- und homozygoten Varianten im Kollektiv.

Der Indexpatient mit dieser Missense-Mutation c.346A>T; p.Met116Leu wurde 1958 geboren und hatte mit 46 Jahren die Diagnose einer atypischen FAP. In seiner Koloskopie konnten 30 hyperplastische Polypen und ca. 80 Adenome festgestellt werden.

Die Eltern des Patienten sind gesund, womit die Familienanamnese negativ ist. Der Stammbaum des Patienten wurde analysiert (siehe Abbildung 24). Väterlicherseits ist eine Tante des Patienten mit 45 Jahren an Brustkrebs verstorben. Der Großvater verstarb an Krebs ohne genaue Angaben. Mütterlicherseits ist bekannt, dass eine Tante des Patienten mit 60 Jahren an Darmkrebs verstarb.

Der Bruder unseres Indexpatienten hatte im Alter von 45 Jahren eine unauffällige Koloskopie. Von den zahlreichen Cousins und Cousinen ist bekannt, dass eine Cousine mit 45 Jahren an Brustkrebs verstarb. Für die Untersuchung auf Segregation war leider von keinem Familienangehörigen DNA verfügbar.

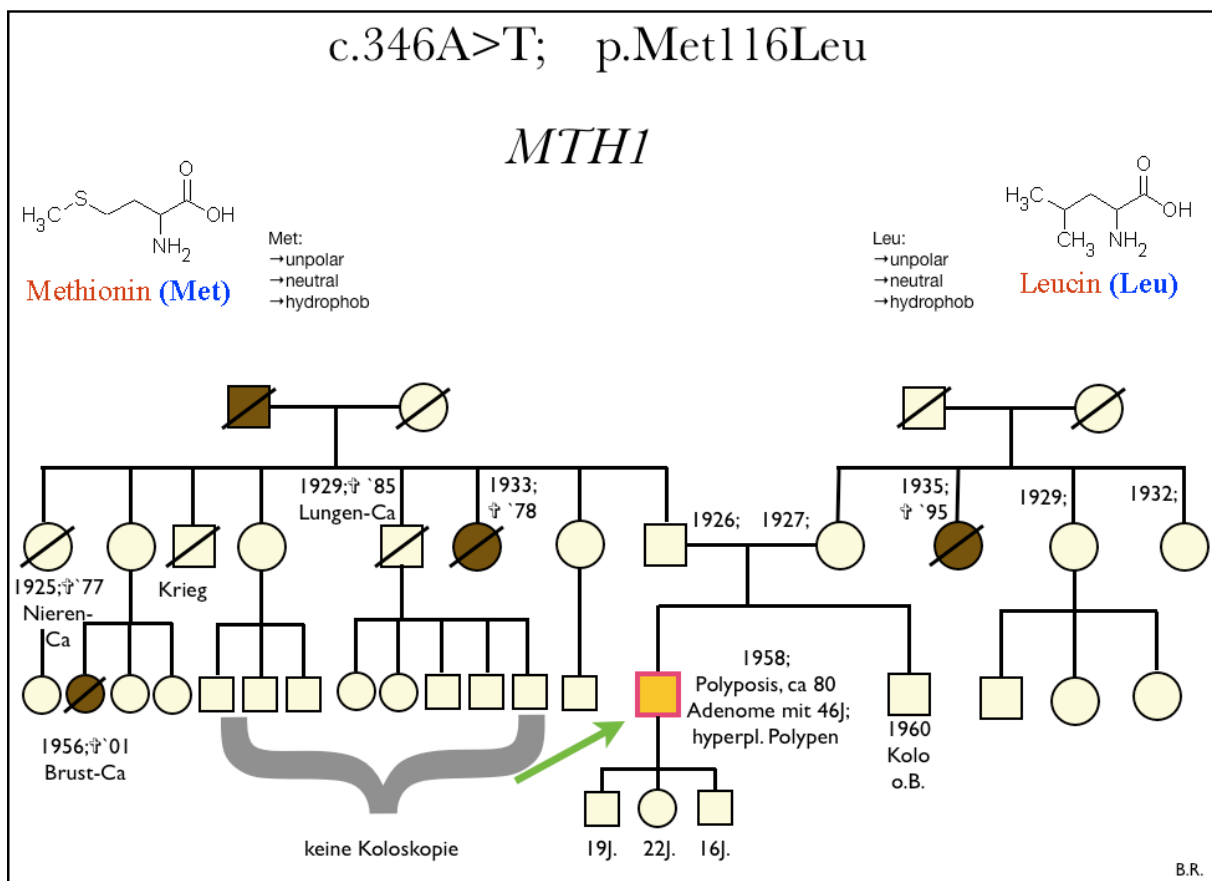


Abbildung 24: Familienstammbaum von einem Patienten mit der Missense-Mutation c.346A>T; p.Met116Leu in *MTH1* Exon 4 (Indexpatient ist mit grünem Pfeil markiert). Rote Umrandung bezeichnet Patienten mit einer unklaren Sequenzvariante (in dem Fall nur unseren Indexpatienten). Braun markiert sind Verwandte mit Karzinom, orange markiert Patienten mit Adenomen und hyperplastischen Polypen.

Die stille Mutation c.357C>T; pAsp119Asp kam im Exon 4 von *MTH1* insgesamt 15 mal vor, elfmal heterozygot und viermal homozygot. Aufgrund der Häufigkeit und der konstanten Aminosäure wurde die stille Mutation als nicht pathogener Polymorphismus gewertet.

Die intronische Sequenzveränderung in *MTH1* in Intron 3 vor Exon 4 c.299-31C>T wurde bei elf Patienten identifiziert, wovon sieben Patienten männlich und vier Patienten weiblich waren (siehe Sequenzausschnitt in Abbildung 25).

Im 3'-untranslatierten Bereich von *MTH1* Exon 4 wurde die Sequenzveränderung c.468\*49C>T in 14 Patienten (zehn männlichen und vier weiblichen) gefunden (siehe Abbildung 25). Die Sequenzveränderung liegt vor der Poly-Adenylierungsstelle und wird als häufiger nicht pathogener Polymorphismus eingestuft.

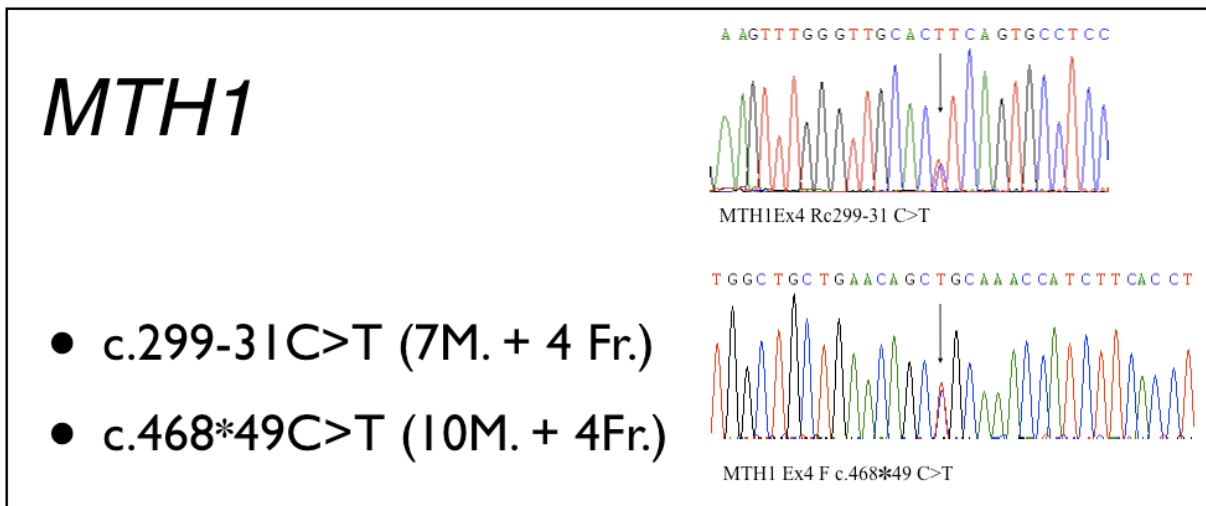


Abbildung 25: Sequenzausschnitte *MTH1* vor und nach Exon 4 der heterozygoten Veränderungen c.299-31C>T und c.468\*49C>T.

### 4.3 Alle Einzelergebnisse für das gesamte Patientenkollektiv

Die detaillierten Ergebnisse aller durchgeführten Genanalysen von *OGG1* und *MTH1* für das gesamte Patientenkollektiv sowie für alle Patienten aus den beiden Kontrollgruppen sind im Anhang 1, 2 und 3 in den Tabellen 17, 18 und 19 dargestellt. Dort wird für jeden einzelnen Patienten ersichtlich, welche Polymorphismen bzw. unklaren Sequenzveränderungen gefunden wurden.

Als Sequenzveränderungen mit möglicher Pathogenität können zusammenfassend in *OGG1* genannt werden:

Exon 1 c.29G>T; p.Arg10Leu, Intron 3 vor Exon 4 c.386-31C>T, Exon 6 c.923G>A; p.Gly308Glu.

In *MTH1* sind das: Exon 2 c.102C>T; p.Gly34Gly, c.111C>T; p.Gly37Gly, c.152+11G>A, Exon 4 c.346A>T; p.Met116Leu.

Die Missense-Mutationen unklarer Pathogenität werden in der Diskussion näher charakterisiert.



## 5 Diskussion

Patienten mit klassischer FAP (familiärer adenomatöser Polyposis coli) weisen in etwa 80% der Fälle Mutationen im *APC*-Gen auf. Bei etwa 20% der Patienten mit adenomatöser Polyposis coli ohne Veränderungen im *APC*-Gen werden biallelische Mutationen in *MUTYH*-Gen gefunden, die auch zu atypischer oder attenuierter FAP mit variablem Phänotyp führen können (Morak et al., 2010a). Biallelische Mutationen im *MUTYH*-Gen führen zu einer mehr als 50-fachen Risikoerhöhung für ein kolorektales Karzinom. Autosomal-rezessiv vererbte Mutationen in *MUTYH* führen häufig zu einer aFAP. Bei der *MUTYH*-assoziierten Polyposis (MAP), können neben Adenomen auch hyperplastische Polypen oder serratierte Adenomen vorliegen. Die Nachkommen von FAP-Patienten mit *APC*-Mutationen haben ein Risiko von 50% die Prädisposition geerbt zu haben, was bei der MAP wegen des rezessiven Erbgangs unter 1% liegt. Auch hyperplastische Polyposissyndrome können familiär gehäuft auftreten. Die kausale Genetik dafür ist noch relativ unklar, wobei für Verwandte ersten Grades eine Risikoerhöhung ausgesprochen wird (Holinski-Feder et al., 2010) aber noch kein Gen dafür verantwortlich gemacht werden konnte.

Morak et al., 2010a beschreibt einen variablen Phänotyp von 33 MAP-Patienten mit biallelischen *MUTYH*-Mutationen aus einem Kollektiv von 215 Patienten mit negativer *APC*-Mutation mit kolorektalen Neoplasien, klassischer, attenuierter und atypischer familiärer adenomatöser Polyposis coli.

Eine vermutete leichte Risikoerhöhung für KRK bei heterozygoten *MUTYH*-Anlageträgern wird aufgrund der Heterozygotenfrequenz der beiden *MUTYH*-Hotspotmutationen kontrovers diskutiert (Jenkins et al., 2006). Patienten mit adenomatöser Polyposis und nur einer Mutation im *MUTYH*-Gen sind in etwa 2-3% aller FAP-Fälle zu erwarten und zwar aufgrund der Allelfrequenz der häufigen Hotspotmutationen in Exon 7 bzw. 13 (Nielsen et al., 2005).

*MUTYH* hat im Zusammenspiel mit *OGG1* und *MTH1* bei der DNA-Reparatur eine führende Rolle (wie unter Kapitel 1.1.2 BER ausgeführt). Dabei werden infolge oxidativer Schädigung entstandene 8-Oxo-Guanine (8-Oxo-G) identifiziert, aus dem Nukleotid-Pool entfernt und eingebaute 8-Oxo-Guanine bzw. fehlerhaft gepaarte Basen aus der DNA ausgeschnitten. Als weiterer Pathomechanismus wird vermutet, dass es einen Summeneffekt von heterozygoten Mutationen in verschiedenen an der BER beteiligten

Genen geben könnte, der für die Entstehung von KRK und Polyposis coli prädisponiert (Morak et al., 2010b).

In der Literatur sind monoallelische Missense-Mutationen als auch Keimbahnmutationen in *OGG1* und *MTH1* bei Patienten mit sporadischen KRK, HNPCC-assoziierten KRK und FAP gefunden worden (siehe zum Beispiel Al-Tassan et al., 2002; Kimura et al., 2004; Kim et al., 2004; Sieber et al., 2003), jedoch ohne eine explizit pathogene Mutation zu finden. In 89% aller MAP-Patienten ist eine der beiden pathogenen Mutationen p.Tyr165Cys in *MUTYH* Exon 7 und p.Gly382Asp in *MUTYH* Exon 13 zu finden (Morak et al., 2010b).

In einer Studie aus 45 Patienten mit KRK ohne heterozygoter *MUTYH*-Mutation wurden mit p.Arg31Gln in *MTH1* (dreimal) und mit p.Arg197Trp in *OGG1* (einmal) Missense-Mutationen unklarer Pathogenität gefunden (Farrington et al., 2005). Das diente uns als erster Hinweis darauf, dass die Kombination von zwei Mutationen in BER-Genen ebenfalls zu einem BER-Defekt führen und zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen prädisponieren.

In unserer Arbeitsgruppe wurde in einer 36-jährigen Patientin mit einem synchronen KRK die erste pathologische Keimbahnmutation c.137G>C; p.Arg46Gln (Spleißmutation) in *OGG1* in Kombination mit einer unklar pathologischen *MUTYH*-Missense-Mutation gefunden (Morak et al., 2010a). Die Segregationsanalyse und der Stammbaum werden in Kapitel 5.1.4 und in Abbildung 27 beschrieben.

Diese pathogene Mutation in *OGG1* wurde zuvor bei Patienten mit Lungenkrebs (Kohno et al., 1998) und Nierentumoren (Audebert et al., 2000) als somatische Mutation beschrieben.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde erwartet, dass wir in unserem Patientenkollektiv von 39 Patienten mit Darmpolypen (FAP, aFAP, atFAP, hyperplastische Polypen oder KRK, bei denen keine pathogene oder unklare Mutation im *APC*-Gen und keine biallelische Mutation im *MUTYH*-Gen nachweisbar war) entweder zwei Mutationen im gleichen BER-Gen oder Mutationen in zwei unterschiedlichen an der BER beteiligten Genen finden.

## 5.1 Mutationsbewertung in OGG1

Bestandteil dieses Kapitels ist die funktionelle Charakterisierung und Bewertung der gefundenen Mutationen in *OGG1* und der zugehörigen Phänotypen. Die Analyse umfasst dabei die Segregationsanalyse, die Analyse der Vererbungsmuster sowie die evolutionäre Konservierung durch Sequenzvergleiche mit anderen Spezies.

### 5.1.1 Mutationslokalisierung

In Abbildung 26 werden die in *OGG1* gefundenen Missense-Mutationen mit möglicher Pathogenität in ihrer Lokalisation auf den einzelnen Exons des Gens dargestellt. Zudem ist eine schematische Darstellung der Domänen im OGG1-Protein zu sehen.

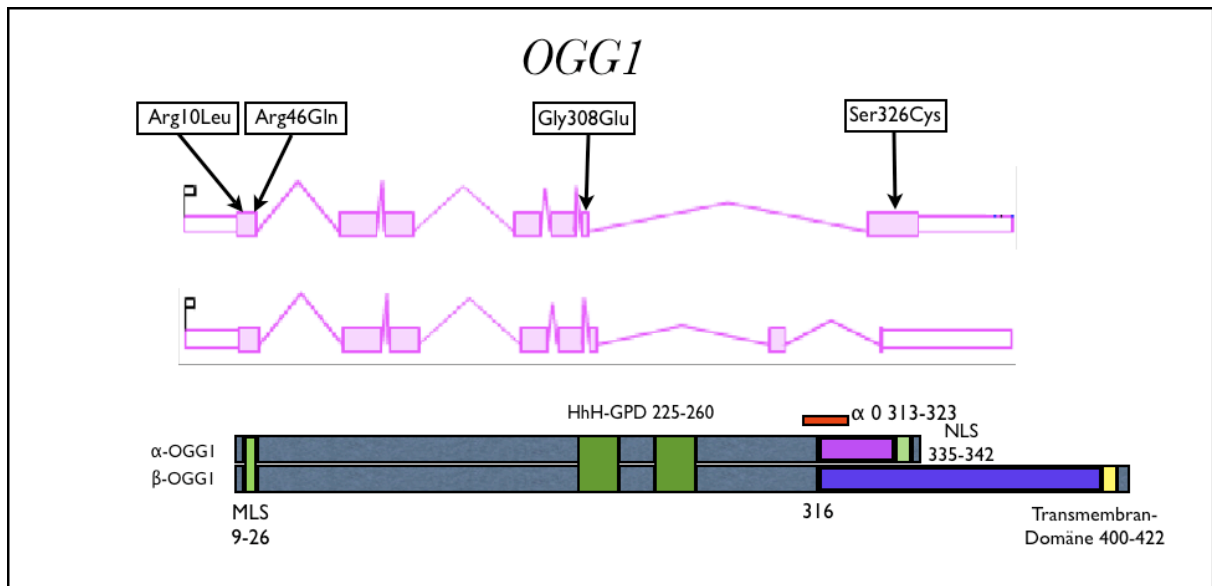


Abbildung 26: Lokalisation der gefundenen Mutationen im *OGG1*-Gen. Unten schematische Darstellung der funktionellen Domänen der beiden Proteine von *OGG1* mit Angabe der Aminosäure-Positionen. MLS (Mitochondrial localization signal)-Bereich; Helix-hairpin-Helix-Motiv (HhH-GDP);  $\alpha$  0 Helix; NLS (nuclear localization signal); transmembrane Domäne. Das carboxyterminale Ende beider Spleißvarianten unterscheidet sich ab der 317. Aminosäure: in lila gekennzeichnet das C-terminale Ende der  $\alpha$ -Form und in blau das C-terminale Ende der  $\beta$ -Form.

### 5.1.2 Bewertung der Mutation c.29G>T; p.Arg10Leu

Die Missense-Mutation in *OGG1* c.29G>T; p.Arg10Leu liegt im MLS (mitochondrial localization signal)-Bereich des Proteins, welches sich von Aminosäure 9 bis 26 erstreckt (siehe Abbildung 26).

In der PolyPhen-Vorhersage, der Version *PSIC (Position-Specific Independent Counts) Software*, wurde dieser Aminosäureaustausch als möglicherweise pathogen (*possibly damaging*) eingestuft. Der Index-Score (*PSIC*) lag bei 1.955. Die Aminosäuren Arginin und Leucin haben sehr unterschiedliche chemische Charaktere; Arginin ist polar, basisch und stark hydrophil, Leucin ist dagegen unpolar, neutral und hydrophob (siehe Abbildung 10 in Kapitel 4.1.1). Die Aminosäure Arg10 ist evolutionär wenig konserviert. Es besteht eine Konservierung im Frosch *Xenopus levis*, aber keine Konservierung dieser Aminosäuren in der Maus *Mus musculus*, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Fliege *Arabidopsis thaliana*. (Siehe Tabelle 9 und 10 in Kapitel 5.1.5).

In der Datenbank HGMD war die Mutation c.29G>T;p.Arg10Leu bis jetzt nicht beschrieben.

In der Stammbaumanalyse (siehe Abbildung 10 in Kapitel 4.1.1) sieht man eine eindeutige Segregation zwischen der Mutation und hyperplastischen Polypen bei zwei Geschwistern jeweils im Alter von 50 Jahren. Unsere Indexpatientin mit beschriebener Mutation hatte im Alter von 53 Jahren schon Darmkrebs. Die *MUTYH*-Genanalyse ergab mit IVS6+35G>A, IVS14-40C>G und c.972G>C; p.Gln324His den Nachweis von 3 nicht pathogenen Polymorphismen. In der *MTH1*-Analyse wurden keine Veränderungen festgestellt. Dieses Ergebnis erlaubt verschiedene Interpretationen: entweder dass die Missense-Mutation c. 29G>T; p.Arg10Leu in *OGG1* den Phänotyp der Patientin alleine verursacht, oder in Kombination mit einem anderen Gen, oder selbst keine funktionelle Relevanz hat.

Als Fazit lässt sich ein dominanter Erbgang und eine Segregation von Missense-Mutation und hyperplastischen Polypen in drei Familienangehörigen zusammenfassen, die Pathogenität der Missense-Mutation bleibt jedoch unklar.

### **5.1.3 Bewertung der Mutation c.923G>A; p.Gly308Glu**

Die Missense-Mutation in *OGG1* c.923G>A; p.Gly308Glu liegt in keiner vorhergesagten Proteindomäne. In der PolyPhen-Vorhersage wurde dieser Aminosäureaustausch als wahrscheinlich pathogen (*probably damaging*) eingestuft. Der Index-Score (*PSIC*) lag bei 2.739. Die Aminosäuren Glycin und Glutaminsäure haben unterschiedliche chemische Charaktere; Glycin ist unpolar, neutral und hydrophob, Glutaminsäure dagegen ist polar, sauer und stark hydrophob.

Evolutionär besteht eine starke Konservierung von Glu308 in Maus, Hefe, *Candida*, Ratte, der Fliege und anderen Spezies. In den Tabellen 9 und 10 in Kapitel 5.1.5 sind die Aminosäurekonservierungen von *OGG1* in Maus und Hefe ausgeführt.

Die Mutation war in der HGMD Datenbank nicht beschrieben.

In der Stammbaumanalyse (siehe Abbildung 16 in Kapitel 4.1.6) sieht man eine Segregation zwischen der Missense-Mutation c.923G>A; p.Gly308Glu in *OGG1* und Polypen in zwei Patienten, nämlich bei Mutter (FAP) und Sohn (juvenile Polyposis). Der Stammbaum erfüllt die Amsterdamkriterien, aber nicht die Altersbeschränkung von unter 50 Jahren. Die Mutter entwickelte mit 54 Jahren ein Kolonkarzinom mit stabilen Mikrosatelliten und erhielt eine 80%-ige Kolektomie nach Diagnose von über 250 Polypen. Aus ihrer Generation gab es keine weiteren Geschwister, die Tumorergebnisse zeigten. Zusätzlich trägt unsere Indexpatientin den heterozygoten *MUTYH*-Polymorphismus c.1005G>C; p.Gln335His, der nicht pathogen ist. In der *MTH1*-Analyse wurden im Exon 4 eine stille Mutation c.357C>T; p.Asp119Asp und ein nicht pathogener Polymorphismus c.468+52C>T gefunden.

Der Sohn der Patientin hatte mit 23 Jahren juvenile Polyposis im gesamten Kolon und 16 hyperplastische Polypen in der rechten Flexur und im sigmoiden Kolon. Auch bei ihm wurde zusätzlich nur ein „harmloser“ *MUTYH*-Polymorphismus c.972G>C; p.Gln324His gefunden. Auch beim Sohn wurden in der *MTH1*-Analyse im Exon 4 eine stille Mutation c.357C>T; p.Asp119Asp und ein nicht pathogener Polymorphismus c.468+52C>T gefunden.

Als Fazit sieht die Stammbaumanalyse eher nach einem dominanten Erbgang aus. Die Mutation segregiert mit Erkrankung in zwei Patienten bzw. liegt in einer gesunden Familienangehörigen nicht vor.

#### **5.1.4 Bewertung der Mutation c.137G>C; p.Arg46Gln**

Die Mutationen c.137G>C; p.Arg46Gln in *OGG1* und c.625A>G; p.Ile209Val in *MUTYH* wurden in einer Patientin gefunden.

Die Aminosäure Arg46 ist in Hefe (siehe Tabelle 9) und Maus (siehe Tabelle 10) konserviert. In der PolyPhen-Vorhersage wurde die Missense-Mutation c.137G>C; p.Arg46Gln in *OGG1* Exon 1 als wahrscheinlich pathogen (probably damaging) eingestuft, wobei der Index-Score (*PSIC*) bei 2.327 lag. Die Aminosäuren Arginin und Glutamin haben

unterschiedliche chemische Charaktere; Arginin ist polar, basisch und stark hydrophil, Glutamin dagegen ist polar, neutral und hydrophil (siehe Abbildung 27 links oben und rechts oben). Da die Missense-Mutation c.137G>C; p.Arg46Gln in Exon 1 ist und als Spleißsequenz zu 73% konserviert ist, liegt der Pathomechanismus dieser Mutation in einem Spleißdefekt der mRNA, so dass die vorhergesagte Missense-Mutation auf Proteinebene gar nicht entsteht (Morak et al., 2010b).

Die Indexpatientin (siehe Abbildung 27) wurde 1969 geboren und erhielt mit 36 Jahren die Diagnose eines doppelseitigen Kolonkarzinoms. Mit 37 Jahren war sie bereits verstorben. Der Vater der Patientin hatte ebenfalls eine Spleiß-Mutation c.137G>C; p.Arg46Gln in *OGG1*. Er ist 1940 geboren und hatte mit 65 Jahren einen benignen Polyp. Eine Kontrollkoloskopie mit 68 Jahren war ohne pathologischen Befund.

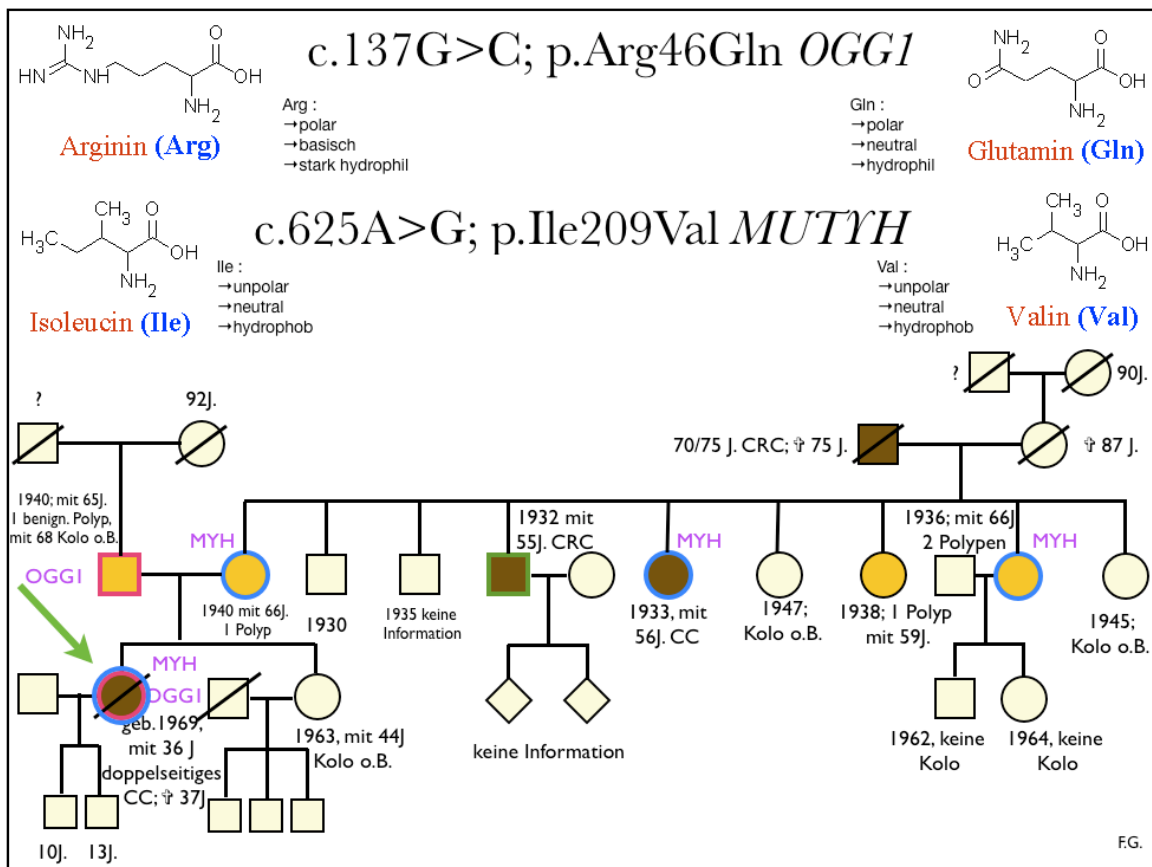


Abbildung 27: Familienstammbaum und Segregationsanalyse von einer Patientin mit zwei Mutationen, einer Spleiß-Mutation c.137G>C; p.Arg46Gln in *OGG1* Exon 1 und einer Missense-Mutation c.625A>G; p.Ile209Val in *MUTYH*. Indexpatientin ist mit grünem Pfeil markiert. Rot umrandet sind Patienten mit einer c.137G>C; p.Arg46Gln Mutation in *OGG1* Exon 1, grün umrandet Patienten mit gesunder Sequenzvariante, blau umrandet Patienten mit c.625A>G; p.Ile209Val in *MUTYH*. Braun markiert sind Patienten mit Karzinomen im Magen-Darmtrakt, orange markiert Patienten mit Adenomen und hyperplastischen Polypen.

Die Schwester der Patientin hatte eine unauffällige Koloskopie und eine Sequenzvariante in *OGG1*- und *MUTYH*-Genen ohne Mutationen und gilt daher als gesund.

In der Stammbaumanalyse zeigt sich keine eindeutige Segregation der c.137G>C; p.Arg46Gln Mutation in *OGG1* und einer konkreten Erkrankung. Beim Vater der Patientin ist diese Mutation mit einem harmlosen Polypen im Alter von 65 verbunden (eine Kontrollkoloskopie mit 68 Jahren war unauffällig). Bei unserer Patientin mit schwerstem Phänotyp (synchrones KRK im Alter von 36 Jahren) liegt die Spleißmutation jedoch in Kombination mit einer *MUTYH*-Mutation vor. Kim et al., 2005 beschreibt p.Arg46Gln als zusammenhängend mit einer Reduktion der Enzymaktivität für das Ausschneiden von 8-oxo-G.

Die Missense-Mutation c.625A>G; p.Ile209Val in *MUTYH* Exon 8 liegt in der Helix-hairpin-Helix Proteindomäne und ist evolutionär wenig konserviert.

In der PolyPhen-Vorhersage wurde der Aminosäureaustausch als gutartig *benign* eingestuft, der Index-Score (*PSIC*) lag bei 0,75. Es besteht keine Konservierung in Maus, Hefe und Ratte.

Die Mutter der verstorbenen Patientin (siehe Abbildung 27) trägt die Missense-Mutation c.625A>G; p.Ile209Val in *MUTYH*. Sie ist 1940 geboren und hatte mit 66 Jahren einen Polypen. Mütterlicherseits existieren acht Geschwister, wobei zwei auf diese Mutation getesteten Schwestern der Mutter ebenfalls die Mutation c.625A>G; p.Ile209Val in *MUTYH* haben, dazu aber sehr unterschiedliche Phänotypen. Eine der Schwestern der Mutter ist 1933 geboren und hatte mit 56 Jahren ein kolorektales Karzinom, wohingegen die andere Schwester 1936 geboren ist und mit 66 Jahren nur zwei Polypen hatte.

Russell et al., 2006 beschreibt die Missense-Mutation c.625A>G; p.Ile209Val in *MUTYH* bei einem Patienten mit 100-1.000 Adenomen im Alter von 54 Jahren und KRK in der Familienanamnese.

In der Stammbaumanalyse sieht man eine Segregation zwischen der Missense-Mutation c.625A>G; p.Ile209Val in *MUTYH* und Adenomen in drei weiteren Familienangehörigen, wobei hier allerdings die Schwere des Phänotyps unterschiedlich ist. Zwei der Angehörigen haben nur Polypen, die dritte von ihnen hatte bereits mit 56 ein KRK.

Dies erlaubt folgendes Fazit. Anhand des Stammbaums ist ein besonders schwerer Phänotyp bei Kombination aus zwei heterozygoten Mutationen in den an der BER





QUERY 4	R	A	L	L	P	R	R	M	G	H	R	T	L	A	S	T	P	A	L	W	A	S	I	P	C	P	R	S	E	L	R	L	D	L	V	L	P	S	G	Q	S	F	R	W	R	E	Q	S	P	A	H	W	S	G	V	L	A	D	Q	V	63
SEQUENZ 4 (2)	R		L	P		M		H	R	T	L	S		P	A	L	W	A	S	I	P	C	P	R	S	E	L	R	L	D	L	V	L		S	G	Q	S	F	R	W		E	Q	S	P	A	H	W	S	G	V	L	A	D	Q	V	63			
QUERY 64	W	T	L	T	Q	T	E	E	Q	L	H	C	T	V	Y	R	G	D	K	S	Q	A	S	R	P	T	P	D	E	L	E	A	V	R	K	Y	F	Q	L	D	V	T	L	A	Q	L	Y	H	H	W	G	S	V	D	S	H	F	Q	E	V	123
SEQUENZ 64 (2)	W	T	L	T	Q	T	E	Q	L		C	T	V	Y	R	G	D	S	Q		S	R	P	T		E	L	E		K	Y	F	Q	L	D	V		L	A	Q	L	Y		H	W		S	V	D	S	H	F	Q		V	123					
QUERY 124	A	Q	K	F	Q	G	V	R	L	L	R	Q	D	P	I	E	C	L	F	S	F	I	C	S	S	N	N	N	I	A	R	I	T	G	M	V	E	R	L	C	Q	A	F	G	P	R	L	I	Q	L	D	D	V	T	Y	H	G	F	P	S	183
SEQUENZ 124 (2)	A	Q	K	F	Q	G	V	R	L	L	R	Q	D	P	T	E	C	L	F	S	F	I	C	S	S	N	N	N	I	A	R	I	T	G	M	V	E	R	L	C	Q	A	F	G	P	R	L	I	Q	L	D	D	V	T	Y	H	G	F	P	N	183
QUERY 184	L	Q	A	L	A	G	P	E	V	E	A	H	L	R	K	L	G	L	G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	I	L	E	E	Q	G	G	L	A	W	L	Q	Q	L	R	E	S	S	Y	E	E	A	H	K	A	L	C	I	L	243
SEQUENZ 184 (2)	L		A	L	A	G	P	E		E		H	L	R	K	L	G	L	G												I	L	E	E	Q	G	G		A	W	L	Q	Q	L	R		Y	E	E	A	H	K	A	L	C		L	243			
QUERY 244	P	G	V	G	T	K	V	A	D	C	E	C	L	M	A	L	D	K	P	Q	A	V	P	V	D	V	H	M	W	H	I	A	Q	R	D	Y	S	W	H	P	T	T	S	O	A	K	G	P	S	P	O	T	N	K	E	L	G	N	F	F	303
SEQUENZ 244 (2)	P	G	V	G		K	V	A	D	C	E	C	L	M	A	L	D	K	P	Q	A	V	P	V	D	V	H		W	I	A		R	D	Y		W	H	P		T	S	O	A	K	G	P	S	P		N	K	E	L	G	N	F	F	303		
QUERY 304	R	S	L	W	G	P	Y	A	G	W	A	Q	A	V	L	F	S	A	D	L	R	O	S	R	H	A	Q	E	P	P	A	K	R	R	K	G	S	K	G	P	E	G	345																		
SEQUENZ 304 (2)	R		L	W	G	P	Y	A	G	W	A	Q	A	V	L	F	S	A	D	L	R	Q						E	P	P	A	K	R		K	G	S	K	P	E	G	345																			

Tabelle 10: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von OGG1 des Menschen *Homo sapiens* (Sequenz 1 Query) und der Maus *Mus musculus* Sequenz 2. Rot sind die Aminosäuren Arg46 und Gly308 gezeichnet.

### 5.1.6 Bewertung der Mutation c.386-31C>T

Die intronische Sequenzveränderung c.386-31C>T im Intron vor Exon 3 von *OGG1* wurde in einer einzigen Patientin heterozygot gefunden. Die Sequenzveränderung betrifft weder die Spleißstelle von Exon 3 noch die Branch-site (Verzweigungsstelle), die üblicherweise etwa 20-50 bp vor dem Exonstart lokalisiert ist und ein konserviertes Adenin beinhaltet ( $CT^A_G A^C_T C_T$ ). Die Überprüfung mittels *human splice finder* ergab einen Index von 62, was eine geringe Pathogenität vermuten lässt. Die Suche in unterschiedlichen Datenbanken mit Mutationsvorhersage führte zu einer Einstufung als nicht pathogen. Die *MUTYH*-Sequenzanalyse in unserer Patientin war unauffällig. Im *OGG1*-Gen präsentierte die Patientin zusätzlich die heterozygote c.977C>G; p.Ser326Cys Variante und eine Sequenzveränderung c.748-15C>G im Intron 4 vor Exon 5, die beide als Polymorphismen gedeutet wurden (siehe Abbildung 11 im Kapitel 4.1.3). In *MTH1* Intron 3 vor Exon 4 hatte die Patientin die häufigste Variante c.299-31C>G, die insgesamt elfmal vorkam und als nicht pathogen eingestuft wurde. Somit lag neben der intronischen Variante keine weitere Mutation in *MTH1*, *OGG1* oder *MUTYH* vor.

Eine Segregationanalyse war leider wegen fehlender Angehörigen-DNA nicht möglich.

Als Fazit bleibt die Sequenzveränderung c.386-31C>T in *OGG1* Intron 2 vorerst unklar bis Material der Patientin für eine cDNA-Analyse vorliegt. Eine eindeutig pathogene Mutation wurde bei der Patientin nicht gefunden, jedoch hat sie einen ausgeprägten Phänotyp und eine positive Familienanamnese. Bei der Betrachtung dieser Aspekte sollte man entweder die Kombination von mehreren Mutationen als Ursache der Erkrankung sehen oder aber einen Defekt in einem anderen Gen in Erwägung ziehen.

### **5.1.7 Bewertung der Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys**

Die Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys in *OGG1* Exon 7 trat in verschiedenen Patienten 12 mal heterozygot und drei mal homozygot auf und wurde in der Literatur widersprüchlich bezüglich ihrer Pathogenitätseinstufung diskutiert und wurde deshalb in zwei Kontrollgruppen je 60 Patienten auf ihre Allelfrequenz hin untersucht. In der Kontrollgruppe I bei Patienten mit gesicherten HNPCC Mutationen konnte die Missense-Mutation 18 mal heterozygot und 7 mal homozygot nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe II bei Patienten im Alter über 80 Jahre kam die Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys 17 mal heterozygot und 5 mal homozygot vor. (Siehe Abbildung 28).

In der Literatur werden Daten genannt wonach durch Beobachtungen am Menschen Sequenzveränderungen des *OGG1*-Gens mit einem höheren Krebsrisiko verbunden sind. Die Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys im *OGG1*-Gen Exon 7 wird mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko verbunden (Le Marchand et al., 2002; Sugimura et al., 1999). In Tumoren aus Niere und Lunge wurden somatische Mutationen im *OGG1*-Gen gefunden, die möglicherweise ursächlich an der malignen Entartung beteiligt waren (Chevillard et al., 1998). Zudem ist c.977C>G; p.Ser326Cys im Zusammenhang mit Magenkarzinom als somatische Mutation (Goto et al., 2008) oder mit multiplen Adenomen als Keimbahnmutation (Sieber et al., 2003) beschrieben worden.

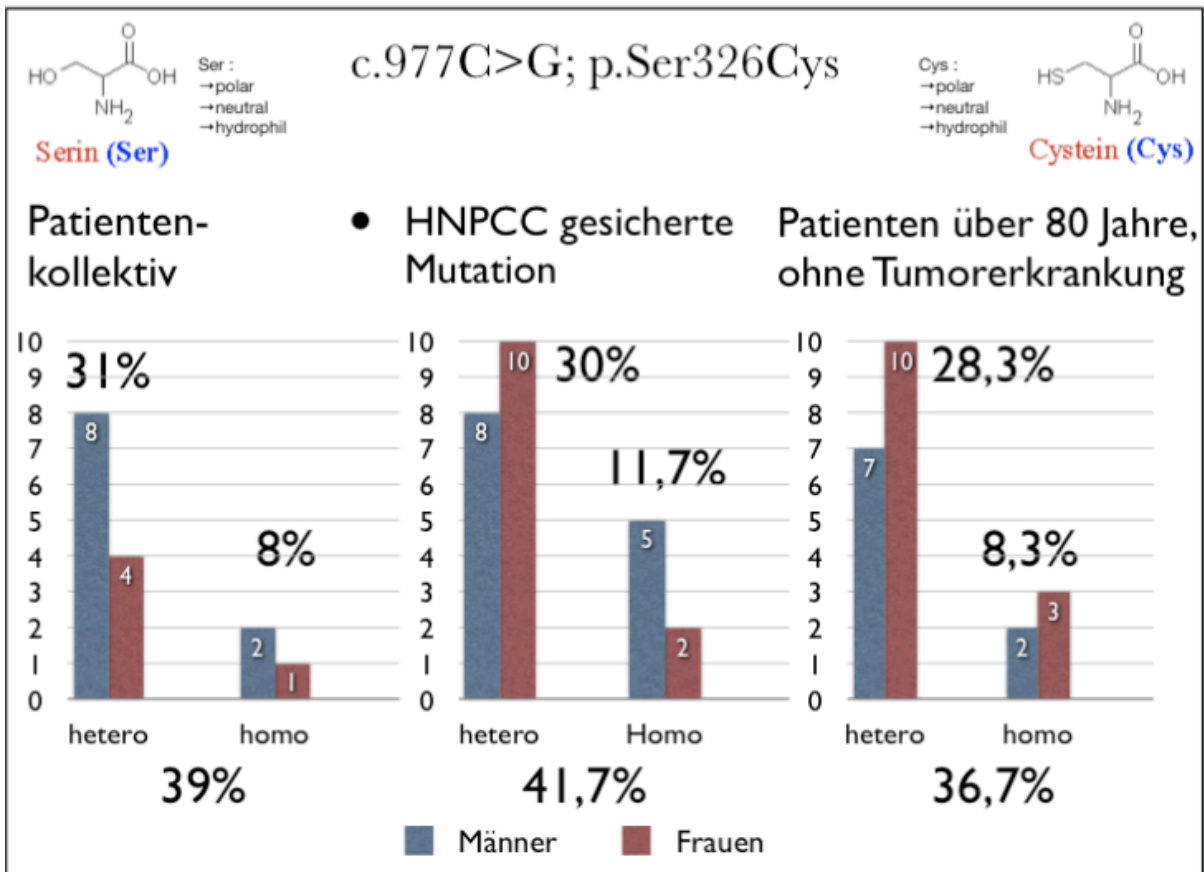


Abbildung 28: Prozentualer Vergleich der Ergebnisse der Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys an Indexpatienten und zwei Kontrollgruppen. Die Y-Achse bezeichnet die Anzahl an betroffenen Patienten bzw. betroffenen Personen der Kontrollgruppen.

Das Protein mit c.977C>G; p.Ser326Cys in OGG1 Exon 7 hat nach Literaturangaben eine reduzierte Enzymaktivität (Goto et al., 2008). Hill et al., 2006 beschreibt funktionale Defekte im c.977C>G; p.Ser326Cys OGG1-Enzym, sowie eine deutlich reduzierte Enzymaktivität. Die Cystein-Variante schneidet sechsmal langsamer als die Serin-Variante. Goto et al., 2008 untersuchte Tumorgewebe von Patienten mit Magenkarzinom. Er beschreibt bei c.977C>G; p.Ser326Cys in OGG1 und c.247G>A; p.Val83Met eine erhöhte Anhäufung von 8-OHdG in Tumorzellen eines Magenkarzinoms. Sieber et al., 2003 untersuchte Patienten mit multiplen Adenomen, nach seinen Aussagen konnte man keine eindeutige Pathogenität und keine Segregation bestätigen. Auch weitere Literaturquellen (Bradbury et al., 2007; Figueroa et al., 2007) beschreiben c.977C>G; p.Ser326Cys als nicht krankheitsverursachend.

In unserem Patientenkollektiv war die Sequenzvariante c.977C>G; p.Ser326Cys in 15 Fällen vertreten. Die Zusammenstellung unserer beiden Kontrollgruppen I und II ist bereits in Kapitel 4.1.8 beschrieben. Die Häufigkeit von c.977C>G; p.Ser326Cys war in den

Kontrollgruppen vergleichbar mit der im Patientenkollektiv. Beim Patientenkollektiv mit hyperplastischen Polypen betrug sie 39%, in der Kontrollgruppe I (Patienten mit Lynch-Syndrom) 41,7% und in der Kontrollgruppe II (Patienten mit Verdacht auf Alzheimer Demenz, alle über 80 Jahre alt) 36,7%. Wie in Abbildung 28 dargestellt ähneln sich die Häufigkeiten von Patientenkollektiv und Kontrollgruppen sowohl für heterozygote als auch homozygote Sequenzvarianten, für Männer und Frauen.

Die Aminosäuren Serin und Cystein haben ähnliche chemische Qualitäten; beide sind polar und neutral. In der PolyPhen-Vorhersage wurde dieser Aminosäureaustausch als gutartig (benign) eingestuft. Der Index-Score (*PSIC*) lag bei 1.205. Evolutionär besteht in Maus, Hefe und Ratte keine Konservierung.

Dies erlaubt folgendes Fazit: Nach dem Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur ergibt sich, dass die Missense-Mutation c.977C>G; p.Ser326Cys, trotz seiner nachgewiesenen Wirkung auf die Enzymaktivität, für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen nicht alleine verantwortlich gemacht werden kann und wird bei uns daher als Polymorphismus eingestuft.

### **5.1.8 Zusammenfassung der *OGG1*-Mutationen**

p.Arg10Leu: unklar pathogene Missense-Mutation, die in einer Familie zwei mal mit hyperplastischen Polypen segregiert, ohne zweite Mutation in *OGG1*, *MTH1*, *MUTYH* und somit möglicherweise dominant wirksam.

p.Gly308Glu: unklar pathogene Missense-Mutation, die in einer Familie einmal mit Adenomen segregiert, ohne zweite Mutation in *OGG1*, *MTH1*, *MUTYH* und somit möglicherweise dominant wirksam.

p.Arg46Gln: ist die einzige sicher pathogene Mutation in *OGG1*, weil sie einen Spleißdefekt verursacht (Morak et al., 2010b). Diese Mutation wurde in einer Indexpatientin mit schwerem Phänotyp heterozygot in Kombination mit heterozygoter *MUTYH*-Missense-Mutation p.Ile209Val vorgefunden. Der Phänotyp der einzelnen heterozygoten Mutationen in Mutter und deren Geschwistern und im Vater ist nur schwach sichtbar und stellt möglicherweise eine leichte Prädisposition für Adenome bzw. hyperplastische Polypen dar.

Dieser Fall bestätigt unsere Hypothese, dass die Kombination aus zwei heterozygoten Mutationen in Genen die an der BER beteiligt sind eine Prädisposition für KRK begünstigen können.

p.Ser326Cys wird in der Literatur kontrovers diskutiert und soll eine geringere Enzymaktivität bewirken. Auf Grund der hohen Allelfrequenz in unseren Kontrollkollektiven von 41,7% und 36,7% gegenüber 39% im Patientenkollektiv haben wir diese als Polymorphismus eingestuft.

c.386-31C>T hat als intronische Sequenzveränderung eine noch bislang unklare Auswirkung auf das Spleißverhalten der mRNA.

## 5.2 Mutationsbewertung in *MTH1*

In diesem Kapitel werden die gefundenen Mutationen in *MTH1* hinsichtlich ihrer Pathogenität untersucht mit den zugehörigen Phänotypen. Es werden Segregationsanalyse, Vererbungsmuster sowie Sequenzvergleiche mit anderen Spezies und Literaturrecherchen durchgeführt.

### 5.2.1 Mutationslokalisierung

In der Abbildung 29 werden die in *MTH1* gefundenen Missense-Mutationen möglicher Pathogenität auf die verschiedenen Exons abgebildet.

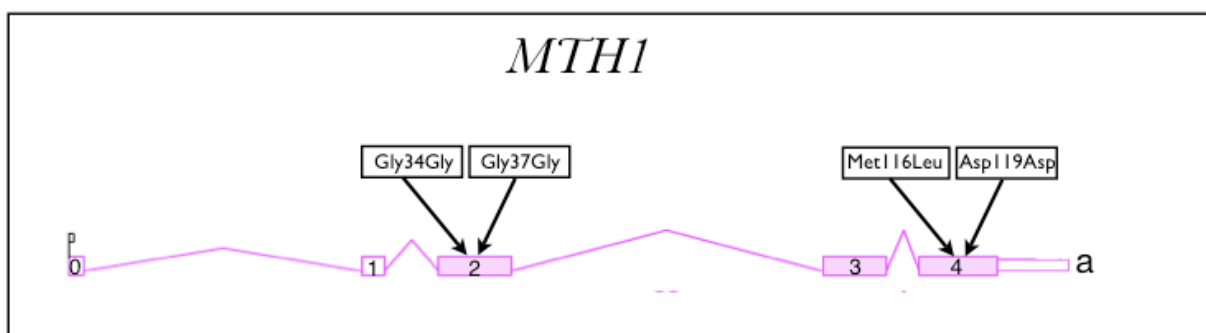


Abbildung 29: Lokalisation der gefundenen Mutationen im *MTH1*-Gen.

### **5.2.2 Bewertung der Mutation c.102C>T; p.Gly34Gly und c.111C>T; p.Gly37Gly**

In *MTH1* Exon 2 wurden bei einem männlichen Patienten mit aFAP zwei stille Mutationen c.102C>T; p.Gly34Gly und c.111C>T; p.Gly37Gly sowie eine intronische Veränderung c.152+11G>A heterozygot gefunden.

Die Mutationen c.102C>T; p.Gly34Gly und c.111C>T; p.Gly37Gly führen zu keinem Austausch der Aminosäuren und liegen im Exon, so dass sie keine konservierte Spleißstelle betreffen. Ihre Auswirkung auf mögliche exonische Spleißenhancer oder Spleißsilencer bleibt unklar.

In der Datenbank HGMD waren diese Mutationen bis jetzt nicht beschrieben.

Die intronische Veränderung c.152+11G>A betrifft weder die Spleißstelle von Exon 2 noch die Branch-site-Stelle. Die Familienanamnese des Patienten, der im Alter von 52 Jahren 1 Adenom und 16 hyperplastischen Polypen hatte ist positiv. In der Stammbaumanalyse (siehe Abbildung 22 in Kapitel 4.2.2) kann keine Aussage zur Segregation getroffen werden. Eine Segregationsanalyse der verstorbenen Mutter und Tante war nicht möglich, auch die DNA vom Bruder des Patienten stand zur Zeit dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Außer den vorliegend beschriebenen c.102C>T; p.Gly34Gly und c.111C>T; p.Gly37Gly stillen Mutationen, die keine Veränderungen der Aminosäuren aufwiesen, und der intronischen Veränderung c.152+11G>A hatte unser Patient in *OGG1* eine heterozygote c.977C>G; p.Ser326Cys Variante. Die durchgeführten *MUTYH*-Untersuchungen erbrachten den Nachweis von zwei Polymorphismen (IVS157+30A>G und c.972G>C; p.Gln324His).

Als Fazit kann aufgrund des Fehlens einer weiteren Mutation in der Stammbaumanalyse ein dominanter Erbgang der Erkrankung vermutet werden. Die stillen Mutationen können jedoch vermutlich nicht für das beobachtete Krankheitsbild verantwortlich gemacht werden.

### **5.2.3 Bewertung der Mutation c.346A>T; p.Met116Leu**

Im Exon 4 wurde die Missense-Mutation c.346A>T; p.Met116Leu bei einem männlichen Patienten mit 30 hyperplastischen Polypen und ca. 80 Adenomen gefunden (siehe Abbildung 23 im Kapitel 4.2.3).

In der PolyPhen-Vorhersage wurde dieser Aminosäureaustausch als gutartig *benign* eingestuft, obwohl er in der Nudix-Proteindomäne liegt (Morak et al., 2010b). Der Index-Score (*PSIC*) lag bei 1.442. Die Aminosäuren Methionin und Leucin haben ähnliche chemische Charaktere; beide sind unpolar, neutral und hydrophob.

Evolutionär besteht keine Konservierung in Fliege (siehe Tabelle 11) sowie Maus (siehe Tabelle 12). In Frosch (siehe Tabelle 11), Fisch (siehe Tabelle 13), Hahn (siehe Tabelle 14) und anderen Spezies ist aber die Aminosäureposition konserviert.

In *OGG1* hatte der Patient zudem die c.565+106C>A Variante und in *MUTYH* zwei Polymorphismen (c.8C>T; p.Pro3Leu heterozygot und c.64G>A; p.Val22Met homozygot). Die Stammbaumanalyse des Patienten mit einer negativen Familienanamnese ist in Abbildung 24 im Kapitel 4.2.4 beschrieben.

Auch hier liegt keine eindeutig pathologische Mutation vor, sondern eine Missense-Mutation unklarer Funktion und keine weiteren Mutationen in *OGG1*, *MTH1* oder *MUTYH*. Ein dominanter Erbgang ist aufgrund der negativen Familienanamnese unwahrscheinlich. Die Missense-Mutation könnte entweder keinen Effekt haben oder den Phänotyp in Kombination mit einer Mutation eines anderen Gens verursacht haben.

#### **5.2.4 Sequenzvergleiche mit anderen Spezies**

Für die Mutation c.346A>T; p.Met116Leu wurde ein Vergleich der Sequenzen mit denen anderer Spezies durchgeführt. Dafür wurde das Programm Blast 2 zur Ermittlung der evolutionären Konservierung einzelner Aminosäuren verwendet.

Es wurden Sequenzvergleiche von *MTH1* auf Aminosäurenebene zwischen Mensch *Homo sapiens* und Frosch *Xenopus tropicalis* (siehe Tabelle 11), Fliege *Arabidopsis thaliana* (siehe Tabelle 11), Maus *Mus musculus* (siehe Tabelle 12), Fisch *Dario rerio* (siehe Tabelle 13) sowie Hahn *Gallus gallus* (siehe Tabelle 14) erstellt. Es ergab sich dabei bei allen fünf Spezies eine evolutionäre Konservierung mit vielen Übereinstimmungen auf Aminosäurenebene zwischen unterschiedlichen Spezies.







Referenz	Patientenkollektiv	Kontrollgruppe	Phänotyp	Mutation im OGG1	Mutation im MUTYH	Mutation im MTH1	Ergebnis/Fazit
Farrington et al., 2005	2239	1845	KRK, nicht genauer beschrieben	c.589A>T; p.Arg197Trp (UV) konserviert in <i>S.c.</i> , <i>M.m.</i> , in <i>HhH</i>	c.1145G>A; p.Gly382Asp (P)		bis dato stärkster Nachweis, dass BER-Defekte die Entstehung von KRK bewirken. Heterozygote <i>MUTYH</i> -Mutationen prädisponieren zu KRK in fortgeschrittenem Alter.  (P): pathogen (UV): unklare Variante
					c.1145G>A; p.Gly382Asp (P)	c.92G>A; p.Arg31Gln (UV), konserviert in <i>X.tr.</i> und nicht in <i>D.r.</i> , <i>A.th.</i> , <i>E.c.</i> ,	
					c.494A>G; p.Tyr165Cys (P)	c.92G>A; p.Arg31Gln (UV), konserviert in <i>X.tr.</i> und nicht in <i>D.r.</i> , <i>A.th.</i> , <i>E.c.</i> ,	
					c.1172C>T; p.Pro391Leu (UV), konserviert in <i>E.c.</i> , <i>M.m.</i> , in Nudix domain	c.92G>A; p.Arg31Gln (UV), konserviert in <i>X.tr.</i> und nicht in <i>D.r.</i> , <i>A.th.</i> , <i>E.c.</i> ,	
Sieber et al., 2003	152	107 (APC-negative Patienten mit FAP mit >100 Adenomen)	multiple Adenomen (3-100)	p.Ser326Cys	p.Tyr165Cys, p.Gly382Asp, p.Arg83X, p.Arg295Cys, p.Ile209Val, p.Val232Phe	p.Arg31Gln	keine eindeutig pathogenen <i>MTH1</i> und <i>OGG1</i> -Mutationen wurden gefunden. Germline <i>MUTYH</i> -Mutationen prädisponieren zu rezessiven Phänotypen, multiple Adenomen oder Polyposis coli. Keine Segregation.
Kim et al., 2007	143	keine	KRK, nicht genauer beschrieben	c.1-18G>T c.1-23A>G	c.509G>A; p.Arg170Gln, c.1076C>T, p.Ala359Val	keine	2 <i>MUTYH</i> -Mutationen und <i>SNP</i> im <i>OGG1</i> (c.1-18G>T) scheinen mit multiplen kolorektalen Adenomen assoziierbar zu sein.

Referenz	Patientenkollektiv	Kontrollgruppe	Phänotyp	Mutation im OGG1	Mutation im MUTYH	Mutation im MTH1	Ergebnis/Fazit
Kim et al., 2004	85 FAP-Familien, da von 20 Pat APC negativ. In Summe 19 HNPCC, 86 vermutete HNPCC und 246 sporadische KRK	625 hereditäre oder sporadische KRK und 527 gesunde Kontrollpatienten		p.Arg154His, p.Ser326Cys, 5'UTR-18, 5'UTR-23, und p.Lys98 Lys,	p.Gln324 His	p.Val106Met	p.Arg154His deutet schwach auf sporadische KRK hin, aber segregiert nicht. (V.a. rezessiven Erbgang)
Kimura et al., 2004	72	400	Magen-Darm-Trakt-Tumoren	kene	keine	p.Val83Met	p.Val83Met in <i>MTH1</i> tritt bei KRK-Patienten signifikant häufiger auf als bei gesunden Patienten und korreliert mit Mutation im p53 Tumor Suppressor Gen.
Thirlwell et al., 2007	25 MCRA-Patienten mit jeweils 10 bis 100 Polypen und 241 Polypen. Untersucht wurden DNA aus Blut und Tumorgewebe. aFAP-Gruppe und MAP-Gruppe	56 Polypen von 29 Patienten mit sporadischen Adenomen. Untersucht wurden DNA aus Blut und Tumorgewebe.	MCRA-Patienten. Im Stammbaum isolierte Patienten. Patienten hatten keine weiteren Tumore außer im Darm.	keine	keine	MAP-Gruppe ohne Nennung der konkreten <i>MUTYH</i> -Mutationen.	Analyse lässt Vermuten, das Tumorentstehung in MCRA (multiple kolorektale Adenome) ähnlich abläuft zu sporadischen kolorektalen Adenomen. Anzahl KRK-Fälle in diesen 3 Gruppen war vergleichbar.
Hill et al., 2006	Zellkultur. Keine Patienten Angaben	keine Patienten-gruppe.	keine Angaben	p.Ser326Cys	keine	keine	funktionale Defekte im p.Ser326Cys OGG1-Enzym. Schneidet bis 6 mal langsamer als WT. Deutlich reduzierte Aktivität. Stimuliert AP-Endonuklease weniger.
Broderick et al., 2006	94 familiäre KRK, bei denen Einfluß durch die bekannten Gene ausgeschlossen werden konnte.	188 Patienten					Die anderen Gene spielen eine untergeordnete Rolle für Entstehung des Krebs.

*Tabelle 15: Literaturübersicht veröffentlichter Mutationen mit Angabe der Relevanz auf den entsprechenden Phänotyp in der letzten Spalte.*

Die nachfolgende Tabelle 16 zeigt die bekanntesten Sequenzveränderungen in *OGG1*, *MUTYH* und *MTH1* wie von Kim et al., 2005 beschrieben.

<b>Gen</b>	<b>Allel</b>	<b>Charakteristika</b>
<i>OGG1</i>	p.Ser326Cys	Häufigster Polymorphismus in <i>OGG1</i> , reduzierte Enzymaktivität für das Ausschneiden von 8-OH-G. Kann als modifizierender Risikofaktor für verschiedene Karzinome wirken.
	p.Arg46Gln	Spleiß-Mutation in Exon 1, pathogen in Analyse; Reduzierte Enzymaktivität für das Ausschneiden von 8-OH-G.
	p.Arg154His	Weniger effektiv als p.Ser326Cys für Ausschneiden von 8-OH-G und Fapy.
<i>MUTYH</i>	p.Gln324His (type1)	Typ 1 <i>MUTYH</i> wird zu Mitochondrien transferiert. Aminosäureaustausch reduziert die Reparaturaktivität nicht signifikant.
	p.Gln310His (type2)	Typ 2 <i>MUTYH</i> wird zum Nukleus transferiert. Der Aminosäureaustausch beeinflusst die Reparaturaktivität nicht signifikant.
	G>C Intron1	Es löst ein alternatives Splicing aus und reduziert Übersetzungseffizienz.
	A>G Intron10	Es löst die Produktion von abgeschnittenen Proteinen aus, die nicht im Nukleus lokalisiert sind.
	p.Gly382Asp	Aminosäureaustausch reduziert die Glykosylaseaktivität gegenüber 8-OH-G:A. Ein Risikofaktor für die Entstehung von KRK, häufige Mutation.
	p.Tyr165Cys	Der Wechsel von Tyr165 zu Cys reduziert Glykosylaseaktivität gegenüber 8-OH-G:A. Darmtumor-Risikofaktor, häufige Mutation.
	p.Tyr90X	Ein möglicher Darmtumor-Risikofaktor.
	Glu466X	Möglicherweise Risikofaktor für kolorektale Tumore.
<i>MTH1</i>	p.Val83Met	<i>MTH1</i> -Met83 ist thermisch labiler als <i>MTH1</i> -Val83.

*Tabelle 16: Bekannteste Sequenzveränderungen in OGG1, MUTYH und MTH1 wie von Kim et al., 2005 berichtet.*

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Rolle der Gene *OGG1*, *MTH1* und *MUTYH* in der Entstehung von kolorektalen Karzinomen und hyperplastische Polypen durch Funktionsverlust untersucht. Mutationen in den an der BER beteiligten Genen sind teilweise als Ursache für KRK anzusehen.

Alle im Patientenkollektiv gefundenen Mutationen und unklaren Varianten wurden auf die Vererbung des Phänotyps, auf Segregation der Mutation sowie auf Konservierung der Aminosäuren in anderen Spezies hin untersucht. Für Patienten mit unklaren Varianten wurde als Grundlage für die Analysen ein Stammbaum erstellt. Nachfolgende Tabelle zeigt den Überblick über alle diese Analyseergebnisse.

Gen	Art der Mutation	Konservierung	Segregationsanalyse	Erbgang aus der Stammbaumanalyse
<i>OGG1</i>	Missense-Mutation c. 29G>T; p.Arg10Leu	Evolutionär wenig konserviert	Eindeutige Segregation zwischen Mutation und hyperplastischen Polypen bei drei Geschwistern	Dominanter Erbgang, funktionell unklare Mutation
<i>OGG1</i>	Spleiß-Mutation c.137G>C; p.Arg46Gln	Evolutionär konserviert zu 73%	Segregiert mit schwachen Phänotypen im Vater und schwerem Phänotypen bei Tochter mit einer zusätzlichen heterozygoten Mutation im <i>MUTYH</i> -Gen	Vermutlich co-dominanter oder biallelischer Erbgang. Wahrscheinlich führt die Kombination von zwei heterozygoten Mutationen in <i>OGG1</i> und <i>MUTYH</i> zum schweren Phänotyp der Tochter.
<i>OGG1</i>	Missense-Mutation c.923G>A; p.Gly308Glu	Evolutionär hoch konserviert	Mutation segregiert in zwei Patienten mit unterschiedlichen Phänotypen und liegt bei den gesunden Familienangehörigen nicht vor	Dominanter Erbgang
<i>OGG1</i>	SNP c.977C>G; p.Ser326Cys	Evolutionär wenig konserviert	Keine Aussage treffbar	Keine Aussage möglich
<i>MTH1</i>	Missense-Mutation c.346A>T; p.Met116Leu	Evolutionär wenig konserviert	Keine Segregationsanalyse möglich wegen negativer Familienanamnese und fehlender Angehörigen DNA	Wegen fehlender Angehörigen DNA keine Aussage möglich
<i>MUTYH</i>	Missense-Mutation c.625A>G; p.Ile209Val	Evolutionär wenig konserviert	Segregiert in vier Familienangehörigen (davon drei Geschwistern) mit unterschiedlich schweren Phänotypen	Aus Literatur bekannter rezessiver Erbgang (mit unseren Ergebnissen deckungsgleich)
<i>MTH1</i>	Stille Mutation c.102C>T; p.Gly34Gly	Nicht relevant	Keine Segregationsanalyse möglich wegen fehlender Angehörigen DNA; Familienanamnese positiv	Keine Aussage möglich
<i>MTH1</i>	Stille Mutation c.111C>T; p.Gly37Gly	Nicht relevant	Keine Segregationsanalyse möglich wegen fehlender Angehörigen DNA; Familienanamnese positiv	Keine Aussage möglich

Abbildung 30: Zusammenfassung aller Analyseergebnisse der in unserem Patientenkollektiv gefundenen Mutationen. Spalte 2 beschreibt die Art der Mutation, Spalte 3 zeigt die aus

*Sequenzvergleichen mit anderen Spezies ermittelte evolutionäre Konservierung, Spalte 4 zeigt die Ergebnisse der Segregationsanalyse und die letzte Spalte zeigt die Schlußfolgerungen auf die Vererbbarkeit der Mutationen.*

Die in *OGG1* gefundenen beiden Missense-Mutationen: c. 29G>T; p.Arg10Leu und c. 923G>A; p.Gly308Glu wurden mit Hilfe von Segregationsanalysen in je einer Familie in einem autosomal dominanten Vererbungsmodus vorgefunden. Zwar hatten nicht alle Mutationsträger eine Tumorerkrankung aber alle waren von hyperplastischen Polypen betroffen.

Als einzige sicher pathogene Mutation wurde die Spleißmutation c.137G>C; p.Arg46Gln in *OGG1* Exon 1 vorgefunden, die heterozygot in Kombination mit einer *MUTYH* Missense-Mutation p.Ile209Val unklarer Pathogenität in einer jungen Patientin mit bifokalem kolorektalem Karzinom vorlag. Die einzelnen Mutationen bedingen eventuell eine leichte Prädisposition für kolorektale Neoplasien und verursachen erst in Kombination einen schweren Phänotyp der Indexpatientin. Eine solche Kombination von zwei Mutationen in den BER-Genen *OGG1*, *MTH1* und *MUTYH* wurde jedoch in keinem weiteren unserer 39 Patienten mit hyperplastischen Polypen oder KRK vorgefunden. Auch zwei Mutationen im gleichen Gen wurden nicht gefunden, die den Verdacht von Kim et al. 2004 auf einen rezessiven Erbgang von *OGG1* bestätigt hätten.

In *OGG1* und *MTH1* wurden Missens-Mutationen unklarer Pathogenität heterozygot vorgefunden, ohne weitere Mutationsnachweise in *OGG1*, *MTH1* oder *MUTYH*.

Der Polymorphismus p.Ser327Cys in *OGG1* Exon 7 kann aufgrund seiner Allelfrequenz von 41,7% und 36,7% in den beiden Kontrollkollektiven im Vergleich zu 39% im Patientenkollektiv für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen nicht verantwortlich gemacht werden.

Die einzige Missense-Mutation p.Met116Leu in *MTH1* war heterozygot in einem Patienten ohne familiäre Tumorrhäufung vorgefunden worden, ohne weiteren Mutationsnachweis in *MUTYH*, *MTH1* oder *OGG1*, was gegen eine dominante Vererbung spricht.

Die Gene *MUTYH*, *MTH1* und *OGG1* scheinen bei der Prädisposition für hyperplastische Polypen und kolorektale Karzinome nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die in diesem Kapitel 6 zusammengefassten Ergebnisse wurden zum Teil in Morak et al., 2010b veröffentlicht (siehe Anlage 5).

# Anhang

## Anhang 1: Untersuchungsergebnisse der *OGG1* Sequenzierung

#	W/M	geboren	DNA	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5/6	Exon 7	Exon 7a	Exon 8
1	m	07.03.1952	4757	o.B.	o.B.				o.B.	o.B.	o.B.
2	m	07.01.1942	22376	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
3	m	08.08.1943	8381	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
4	m	08.01.1931	8745	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	
5	w	09.11.1952	13523	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
6	w	06.02.1949	34300	o.B.	o.B.	o.B.				o.B.	o.B.
7	w	01.12.1969	25994	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.			o.B.	o.B.
8	w	08.01.1975	3706	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
9	w	25.05.1935	12096	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
10	m	11.08.1973	14634	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.			o.B.	o.B.
11	w	16.02.1960	38045	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
12	w	14.04.1946	15134	o.B.	o.B.					o.B.	o.B.
13	m	09.08.1982	26305	o.B.	o.B.					o.B.	o.B.
14	m	07.06.1954	37352	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.
15	m	26.03.1966	25077	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
16	m	09.08.1958	23382	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
17	m	20.10.1964	36278	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.			o.B.	o.B.
18	m	26.03.1959	34052	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
19	w	27.04.1967	31991	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
20	m	11.08.1934	34359	o.B.	o.B.		o.B.			o.B.	o.B.
21	m	27.01.1966	33818	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
22	m	19.08.1959	39349	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
23	m	12.06.1942	25408	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
24	m	18.10.1965	39350	o.B.	o.B.			o.B.		o.B.	o.B.
25	m	11.11.1955	38886	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
26	m	13.10.1943	30896	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
27	w	15.12.1947	22100		o.B.	o.B.	o.B.			o.B.	
28	w	03.12.1985	11267	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
29	w	31.10.1957	32690	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
30	m	09.04.1955	23105	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
31	w	15.06.1975	31811	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.			o.B.	o.B.
32	m	22.06.1961	19170	o.B.	o.B.					o.B.	o.B.
33	w	02.04.1976	20585	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
34	m	25.02.1931	12622	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
35	m	04.08.1952	20457	o.B.	o.B.		o.B.			o.B.	o.B.
36	m	10.11.1944	25604	o.B.	o.B.		o.B.			o.B.	o.B.
37	w	06.09.1966	25530	o.B.	o.B.	c386-31c<t	o.B.			o.B.	o.B.
38	w	04.11.1975	26731	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
39	m	24.02.1977	39331	o.B.	o.B.		o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.

Farbkodierung		
		c.29G>T; p.Arg10L eu;
		c.565+ 102C>A
		c.566- 4G>A
		c.748-15 C>G + c.923 G>A; p.Gly308 Glu
		c. 977 C>G; p.Ser 326Cys
		nach 2.TGA:*66 A>G

						c.565+ 106C>A		c.748- 15C>G	c. 977C >G; p.Ser 326Cys homo,	
						c.565+ 107C>A		c.748-15 C>G homo		
						c.565+ 104T>A				
						c.565+ 108C>A				
						c.565+ 105C>A				

*Tabelle 17: Ergebnisse der OGG1-Untersuchungen an Indexpatienten. Die Legende der Farbkodierung ist unten zu entnehmen. Sequenzveränderungen wurden -sofern nicht anders angegeben- heterozygot vorgefunden.*



## Anhang 2: Untersuchungsergebnisse der *MTH1* Sequenzierung

#	W/M	geboren	DNA	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Info	Geno-Dat
1	m	07.03.1952	4757	o.B.	o.B.	o.B.		<i>MUTYH</i> -sichere FAP; mit 47 KRK, mehrere Adenome, hyperpl. Polypen. FA negativ	<i>MUTYH</i> -Polymorph. c.1005G>C; p.Gln335His heteroz., c.1535C>T; p.Ser512Phe
2	m	07.01.1942	22376	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	sichere FAP, V.a. HNPCC; Ca mit 35 J. >12 Polypen. FA positiv	<i>MUTYH</i> -Polymorph. c.495+35G>A homozygot,
3	m	08.08.1943	8381	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	sichere FAP, V.a. HNPCC od. atten. FAP; mult Polypen. KRK mit 59. Kinder 32/36 Jahre	<i>MUTYH</i> -Polymorph. c.8C>T hetero in Exon 1 UTR, nicht pathogen
4	m	08.01.1931	8745	o.B.	o.B.	o.B.		sichere FAP, rezidivierende Kolonpolypen, Magen Ca 74, mit 75 V.a. KRK	<i>MUTYH</i> -Polymorph. c.8C>T hetero in Exon 1 UTR, nicht pathogen, APC + <i>MUTYH</i> o.B
5	w	09.11.1952	13523	o.B.	o.B.	o.B.		<i>MUTYH</i> -sich FAP, / Polyposis, BC 48, FA negativ	<i>MUTYH</i> -Polymorph. c.64G>A; p.Val22Met hetero, APC+ <i>MUTYH</i> o.B
6	w	06.02.1949	34300	o.B.	o.B.	o.B.		sichere FAP, 80% K.E., mit 54 KRK im Sigma, mit 51 Endom-Ca. alte Amsterdam-Familie	<i>MUTYH</i> -Polymorph. c.1005G>C; p.Gln335His hetero, APC+ <i>MUTYH</i> o.B, HNPCC o.B, MSS Amsterdam +
7	w	01.12.1969	25994	o.B.	o.B.	o.B.		sichere FAP, aFAP mit 36J Polypen, Bruder 3 Polypen	<i>MUTYH</i> -Polymorph. c.972G>C; p.Gln324His c.1502C>T; p.Ser501Phe, APC + <i>MUTYH</i> o.B
8	w	08.01.1975	3706	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	Sichere FAP, mit 18 Juvenile Polypen	<i>MUTYH</i> positiv c.379+56G>A heterozygot c.495+35G>A homo. c.1005G>A; p.Gln335His c.1426G>A; p.Glu476Lys, Ex14 heterozygot
9	w	25.05.1935	12096	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	62 J Adeno-ca im Rectum +2 Adenome, Amsterdam-Familie, FA positiv	<i>MUTYH</i> -positiv. c.157+30A>G(IVS2) heteroz, c.972G>C; p.Glu324His, c.502C>T; p.Arg168Cys heteroz.
10	m	11.08.1973	14634	o.B.	o.B.	o.B.		27J. hyperpl. Polypen, hyperpl. Polyposis Syndr., Onkel mit 50 KRK, Oma mit 70 KRK	APC o.B., <i>MUTYH</i> -Polymorph: c.64G>A, p.Val22Met
11	w	16.02.1960	38045	o.B.	o.B.	o.B.		ca 80-90 hyperpl. Polypen Rectum bis Kolon transver. mit 47	<i>MUTYH</i> negativ, PTEN o.B
12	w	14.04.1946	15134	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	53 J mult. Hyperpl. Polypen mit Metaplasie, Kolon ascend.,li Flexur;	<i>MUTYH</i> -Polymorph. c.495+35G>A homo, c.1005G>C; p.Gln335His hetero, APC + <i>MUTYH</i> o.B

13	m	09.08.1982	26305	o.B.	o.B.	o.B.		23 Jahren juvenile Polyposis gesamt. Kolon, 16 hyperplastische Polypen re Flexur und Sigma	MUTYH-Polymorphismus: c.972G>C; p.Gln324His. PTEN: keine pat. Mutat. IVS8+32T>G heterozygot
14	m	07.06.1954	37352	o.B.		o.B.	o.B.	52 Jahren 16 hyperplastische Polypen re Flexur und Sigma, 1 Sigmaadenom Mutter mit 44 KRK	PTEN unklare Sequenzvariante IVS7+23G>A heterozygot, MUTYH-Polymorph: IVS157+30A>G, c.972G>C; p.Gln324His
15	m	26.03.1966	25077	o.B.	o.B.	o.B.	homo	atten. Polyposis coli, hyperpl. Polypen, tub. Adenome mit 38	MUTYH negativ
16	m	09.08.1958	23382	o.B.	o.B.	o.B.		ca 30 Polypen, linkes Kolon tub. Adenome+ hyperplast. Polypen mit 46 Jahren, aFAP; FA negativ	MUTYH-Polymorph. c.8C>T hetero, c.64G>A; p.Val22Met homo, APC+MUTYH o.B
17	m	20.10.1964	36278	o.B.	o.B.	o.B.		>15 hyperpl. Polypen im Sigma und 3 hyperpl Polypen im Rectum mit 39 J., Mutter mit 53 + (Metast), Primärtu unklar	PTEN o.B, MUTYH-Polymorphism: c.972G>C; p.Gln324His
18	m	26.03.1959	34052	o.B.	o.B.	o.B.		adenomat. Polyposis coli, mit 47 J. 60 hyper. Polypen; serr. tub. Adenome, FA leer	MUTYH negativ, APC+ PTEN o.B.
19	w	27.04.1967	31991	o.B.	o.B.	o.B.	homo	1 tub. Adenom, >100 hyperpl. Polypen mit 39 J., Bruder mit 31 J. Polyp, Mutter mit 46 Adeno-Ca im Sigma	PTEN, MUTYH o.B.
20	m	11.08.1934	34359	o.B.	o.B.	o.B.		ca 15 Polypen teils hyperpl. Adenom, serr. Adenom mit 72 J. hamartomatösen Caecum, Histiocytom re. Schulter	MUTYH-Polymorphismen c.972G>C; p.Gln324His hetero; MUTYH+PTEN o.B
21	m	27.01.1966	33818	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	34 J. Rectum-Ca, Hodkin IIIb; mehr. Kleine Adenome u hyperp. Polypen im Kolon und Oesophagus, FA neg	MUTYH-Polymorp. IVS14-40 G>C heterozygot, IVS6+35G>A heterozygot, APC o.B,
22	m	19.08.1959	39349	o.B.	o.B.	o.B.		mehrfache Polypektomien, Histo unbekannt.	MUTYH-Polymorphismus: c.972G>C; p.Gln324His
23	m	12.06.1942	25408	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	FAP, Polypen mit 63 J. Keine Tumorekrankung.	MUTYH negativ
24	m	18.10.1965	39350	o.B.	o.B.	o.B.		aFAP, V.a. Cowden-Syndrom. Kolonsituation unbekannt, hartnäckige und beständige Verweigerung Diagnostik.	PTEN o.B. MUTYH-Polymorphismus: c.972G>C; p.Gln324His
25	m	11.11.1955	38886	o.B.	o.B.	o.B.		aFAP, Polypen mit 52 Jahren.	.

26	m	13.10.1943	30896	o.B.	o.B.	o.B.		FAP, Polypen mit 63 Jahren. Keine Tumorekrankung.	MUTYH-Polymorp.: c.972G>C; p.Gln324His hetero
27	w	15.12.1947	22100	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	FAP+HNPCC, mehrere Adenome tubul. Tub.-vill. Carcinoma im Situ mit 54 J.	MUTYH-Polymorph. IVS6+35 G>A c.972G>C; p.Gln324His IVS14-40 C>G
28	w	03.12.1985	11267	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	40 J. 2 Polyp., hyperpl. Kolonpolypen-15+20 cm ab ano; FA positiv (Vater, Schwester)	MUTYH o.B.
29	w	31.10.1957	32690	o.B.	o.B.	o.B.		mit 48 J. hyperpl. Kolonpolyp. Entfernt	MUTYH-Polymorp.: c.972G<C; p.Gln324His
30	m	09.04.1955	23105	o.B.	o.B.	o.B.		hyperpl. Polyp mit 40 Jahren	MUTYH-Polymorp.: IVS462+35G>A; IVS1435-40G>C
31	w	15.06.1985	31811	o.B.	o.B.	o.B.		31 J. hyperpl. Polyp im Rectum	MSH6 o.B. MUTYH o.B.
32	m	22.06.1961	19170	o.B.	o.B.	o.B.		43 J. Polyp im Col. Asc +1 hyperpl. Sigmapolyp	MSS, MUTYH-Polymorphismen: c.972G>C; p.Gln324His; IVS462+35G>A
33	w	02.04.1976	20585	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	mit 27 Jahren 2 Sigmapolypen	MUTYH-Polymorp. IVS6+35 G>A heterozygot IVS14-40C>G heterozygot
34	m	25.02.1931	12622	o.B.	o.B.	o.B.		70 J. Rectum-Ca, hyperpl. Polyp	MUTYH o.B c.64G>A;Val22Met heterozygot
35	m	04.08.1952	20457	o.B.	o.B.	o.B.		48 J. 40 Adenome	MUTYH negativ
36	m	10.11.1944	25604	o.B.	o.B.	o.B.		57 J. Sigma-Ca T3, pN2, M1(Hep), G2-3	MSS, MUTYH-Polymorphismen: IVS462+35G>A; IVS1435-40G>C
37	w	06.09.1966	25530	o.B.	o.B.	o.B.		38 J. hyperpl. Polyp	MUTYH o.B.
38	w	04.11.1975	26731	o.B.	o.B.	o.B.		29 J. 1 breitbas. hyperpl. Polyp im Kolon ascendens belassen, 8 weitere entfernt	MUTYH-Polymorp.: c.64G>A; p.Val22Met+ c.972G>C; p.Gln324His
39	m	24.02.1977	39331	o.B.	o.B.	o.B.		mit 30 J. KRK und hyperpl. Polypen	MUTYH-Polymorp.: IVS 462+35G>A + IVS1435-40G>C
									c.299-31C>T homo,
									c.346A>T; p.Met116Leu
									c.357C>T; p.Asp119Asp
									c.299-31C>T
									c.357C>T; p.Asp119Asp; c.468+52C>T hetero
									c. 357C>T; p.Asp119Asp; + c.468+52 ci.C>T homo
									c.299-31C>T hetero + c.357C>T; p.Asp119Asp;+c.468+52C>T hetero
									c.102C>T; p.Gly34Gly c.111C>T; p.Gly37Gly; c152+11G>A

Tabelle 18: Ergebnisse der MTH1-Untersuchungen an Indexpatienten. Die Legende der Farben ist den letzten Zeilen zu entnehmen.

## Anhang 3: Untersuchungsergebnisse der Kontrollgruppen I und II

OGG 1, Kontrollgruppe I				OGG1, Kontrollgruppe II				
HNPPC gesicherte Mutation				Patienten mit Alzheimerdemenz, über 80 Jahre alt				
<b>Farbkodierung</b>				<b>Farbkodierung</b>				
c. 977C>G; p.Ser326Cys homozygot				c. 977C>G; p.Ser326Cys homozygot				
c. 977C>G; p.Ser326Cys heterozygot				c. 977C>G; p.Ser326Cys heterozygot				
#	W/M	DNA	Exon 7	#	W/M	geboren	DNA	Exon 7
1	m	33698	o.B.	1	m	27.03.1931	21800	o.B
2	w	34978		2	w	01.04.1927	22839	o.B
3	m	29102		3	w	16.06.1932	23138	o.B
4	m	30726		4	w	16.07.1920	23140	o.B
5	m	29851		5	m	31.01.1921	23980	
6	w	29169	o.B.	6	w	22.02.1924	24407	o.B
7	m	29319	o.B.	7	m	04.04.1912	24611	
8	m	32908		8	m	04.07.1929	24885	
9	m	33954	o.B.	9	m	04.11.1925	24922	o.B
10	w	10013	o.B.	10	m	09.02.1924	24978	o.B
11	w	18005	o.B.	11	w	08.01.1936	25106	
12	w	18003	o.B.	12	w	13.01.1923	25152	o.B
13	m	19350	o.B.	13	w	10.02.1936	25438	
14	w	30543		14	w	12.12.1916	25106	
15	m	29421		15	w	20.01.1937	25379	o.B
16	w	31122		16	m	11.03.1930	25896	o.B
17	m	32184		17	w	29.04.1936	25922	o.B
18	w	33354	o.B.	18	m	06.01.1929	26278	
19	w	19365	o.B.	19	m	09.07.1927	26353	
20	m	32196	o.B.	20	w	22.05.1926	26483	o.B
21	m	32197	o.B.	21	w	12.11.1933	26559	
22	m	32198	o.B.	22	w	10.01.1932	26769	o.B
23	m	35230	o.B.	23	w	11.08.1932	27092	o.B
24	w	35152	o.B.	24	m	02.06.1931	27192	o.B
25	w	35149	o.B.	25	m	12.03.1935	27524	
26	m	29296	o.B.	26	w	26.10.1930	27733	o.B
27	w	35656	o.B.	27	w	19.09.1933	27974	o.B
28	w	16855	o.B.	28	w	26.07.1935	28628	o.B
29	m	11604		29	w	02.05.1928	28743	o.B
30	w	18358		30	m	05.05.1937	28832	
31	m	18006		31	w	13.12.1929	28849	
32	w	25868		32	m	25.12.1937	28978	o.B
33	m	9408		33	w	30.12.1923	29195	o.B
34	w	18020	o.B.	34	w	05.03.1933	29385	
35	w	13401	o.B.	35	w	29.08.1921	29573	
36	w	34006		36	m	20.03.1929	29750	
37	w	35342	o.B.	37	m	29.03.1930	30269	o.B
38	m	36377	o.B.	38	w	12.08.1929	30737	o.B
39	w	36136		39	m	31.08.1937	30782	o.B
40	w	29520	o.B.	40	m	25.02.1932	30813	
41	m	8572		41	w	31.10.1924	30941	
42	w	12809		42	m	11.07.1936	30958	o.B
43	w	16258	o.B.	43	w	06.10.1926	31193	o.B



## Anhang 4: Primer

### Verwendete intronische Primer für die Mutationsanalyse der *OGG1*-Exons:

Exon 1:	F 5'-CAG CAC CGT GTG GGC GAG-3'; R 5'-GGC AGG AGC CAG TCC GAG -3';	304 bp
Exon 2:	F 5'-TGT AGG ATA GGA GGG ACC C-3'; R 5'-TGA CTT ATG TCC AAG AAC CC-3';	370 bp
Exon 3:	F 5'-ACA CCC AAC AGC AGG TAC C -3'; R 5'-AGG GCG GTT CTG GAT AGG -3';	353 bp
Exon 4:	F 5'-AGC CTA AGG ACA GGA AGA AC-3'; R 5'-TCT CCT CTT AGT GTC AGT AG-3';	295 bp
Exon 5:	F 5'-CCA CAT GCT GCC CTT CTT C -3';	
Exon 6:	R 5'-GAA GAG TCC ACT GGG TCT G -3'	458 bp
Exon 7:	F 5'-ACT GTC ACT AGT CTC ACC AG -3'; R 5'-TCC CTA CCA CTC CTC ACT G -3';	438 bp
Exon 8:	F 5'GGC CAA GGC AGG GTC AGC -3'; R 5'-ATT TGG CCA TTT CTC AGG TTG -3';	558 bp
Exon 7 alternativ:	F 5'-TTG CAC TTC CCG GAA TGG C -3'; R 5'-TCT TTC ATT CAA CAAACA CTC C-3';	223 bp

### Verwendete intronische Primer für die Mutationsanalyse der *MTH1*-Exons:

Exon(pub) 1:	F 5'-GCA AGG ACA GAG GGC TTT CTG -3'; R 5'CCA GCA GGC CAT CAA CTG AT-3';	249 bp
Exon 2:	F 5'-TTC CTC CAC GCA CGT CAT G -3'; R 5'-GGA AAG CCG GTT CTA TGG C -3';	252 bp
Exon 3:	F 5'-GTG TGG GCA TGG CAC CAT G-3'; R 5'-AGA TGG GAC CCG CAT AGT G-3';	253 bp
Exon 4:	F 5'-GCA TGA AGT TTG GGT TGC AC-3'; R 5'-CCC AGG TGA AGA TGG TTT GC-3';	293 bp

## **Anhang 5: Veröffentlichung der Dissertationsergebnisse**

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden in Morak et al., 2010b veröffentlicht. Es folgt ein Abdruck dieser Publikation am Ende der Arbeit.

# Literaturverzeichnis

(Aceto et al., 2005)

Aceto, G., Curia, C. M., Veschi, S.: Mutations of APC and MYH in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum Mutat* 26(4) (2005) 394.

(Al-Tassan et al., 2002)

Al-Tassan, N., Chmiel, N. H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A. L., Williams, G. T., Hodges, A. K., Davies, D. R., David, S. S., Sampson, J. R., Cheadle, J. P.: Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nature genetics*, Vol. 30 (2002) 227-232.

(Arai et al., 1997)

Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S. R., Nohmi, T., Taniwaki, M., Ohwada, S., Yokota, J.: Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 14 (1997) 2857-61.

(Aretz et al., 2006)

Aretz, S., Uhlhaas, S., Goergens, H.: MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 119(4) (2006) 807-14.

(Aretz, 2010)

Aretz, S.: Differenzialdiagnostik und Früherkennung hereditärer gastrointestinaler Polyposis-Syndrome. *Deutsches Ärzteblatt* 107(10) (2010) 163-73.

(Audebert et al., 2000)

Audebert M., Radicella J. P., Dizdaroglu M.: Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 2672-8.

(Auffret van der Kemp et al., 1996)

Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., Barbey, R., DeOliveira, R., Boiteux, S.: Cloning and expression in *E. coli* of the OGG1 gene of *S. cerevisiae* which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 5197-5202.



(Beckman und Ames, 1997)

Beckman K.B., Ames B.N.: Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272 (1997) 19633-6.

(Bhattacharyya und Banerjee, 2001)

Bhattacharyya, N., Banerjee, S.: A novel role of XRCC1 in the functions of a DNA polymerase beta variant. *Biochemistry* 40 (2001) 9005-9013.

(Boiteux und Radicella, 1999)

Boiteux, S., Radicella, J. P.: Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 81 (1999) 59-67.

(Boiteux und Radicella, 2000)

Boiteux, S., Radicella, J. P. : The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 377 (2000) 1-8.

(Bradbury et al., 2007)

Bradbury, P., Marshall, A., Kulke, M., Zhou, W., Heist, R., Su, L., Lynch, T. Jr., Shepherd, F., Christiani, D., Liu, G.: Prognostic significance of nuclear excision (NER) and base excision (BER) DNA repair gene polymorphisms in esophageal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25 (2007) 2511.

(Broderick et al., 2006)

Broderick, P., Bagratuni, T., Vijayakrishnan, J., Lubbe, S., Chandler, I., Houlston, R.: Evaluation of NTHL I, NEIL II, NEIL 2, MPG, TDG, UNG and SMUGI genes in familial colorectal cancer predisposition. *BMC Cancer* 6 (2006) 243.

(Brunner et al., 2000)

Brunner, S. D., Norman, D. P. G., Verdine, G. L.: Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403 (2000) 859-866.

(Capelli et al., 2001)

Capelli, E., Hazra, T., Hill, J. W., Slupphaug, G., Bogliolo, M., Frosina, G.: Rates of excision repair are not solely dependent on levels of initiating enzymes. *Carcinogenesis* 22 (2001) 387-393.

(Chevallard et al., 1998)

Chevillard S., Radicella J. P., Levalois C., Lebeau J., Poupon M. F., Oudard S., Dutriallaux B., Boiteux S.: Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumors. *Oncogene* 16 (1998) 3083-6.

(Chmiel et al., 2001)

Chmiel N. H., Golinelli M. P., Francis A. W., David S. S.: Efficient recognition of substrates and substrate analogs by the adenine glycosylase MutY requires the c-terminal domain. *Nucleic Acid Res* 29 (2001) 553-64.

(Demple und DeMott, 2002)

Demple, B., DeMott, M.: Dynamics and diversions in base excision repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* 21 (2002) 8926-8934.

(Dhénaut et al., 2000)

Dhenaut, A., Boiteux, S., Radicella, J. P.: Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. *Mutat Res* 461 (2000) 109-18.

(Don et al., 1991)

Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., Mattick, J. S.: "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 4008.

(Epe, 2002)

Epe, B.: Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol. Chem.* 383 (2002) 467-475.

(Farrington et al., 2005)

Farrington, S. M., Tenesa, A., Barnetson, R., Wiltshire, A., Prendergast, J., Porteous, M., Campbell, H., Dunlop, M. G.: Germline Susceptibility to Colorectal Cancer Due to Base-Excision Repair Gene Defects. *J. Hum. Genet.* 77 (2005) 112-119.

(Ficari et al., 2000)

Ficari, F., Cama, A., Valanzano, R., Curia, M., Palmirotta, R., Aceto, G., Esposito, D., Crognale, S., Lombardi, A., Messerini, L., Mariani-Costantini, R., Tonelli, F., Battista, P.: APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Br J Cancer* 82 (2000) 348-353.

(Friedl et al., 2001)

Friedl, W., Lamerti, C.: Familiäre Adenomatöse Polyposis. Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen. Berlin, Heidelberg, New York: Springer (2001) 303-29.

(Figueroa et al., 2007)

Figueroa, J., Malats, N., Real, F., Silvermann, D., Kogevinas, M., Chanok, S., Welch, R., Dosemeci, M., Tardon, A., Serra, C., Carrato, A., Garcia-Closas, R., Castano-Vinyals, G., Rotmann, N., Garcia-Closas, M.: Genetic variation in the base excision repair pathway and bladder cancer risk. *Human Genetic* 121 (2007) 233-242.

(Galiatsatos et al., 2006)

Galiatsatos, P., Foulkes, W.: Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101 (2006) 385-98.

(Gary et al., 1999)

Gary, K., Kim, K., Cornelius, H. L., Park, S. M., Matsumoto, Y. : Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 4354-4363.

(Goto et al., 2008)

Goto, M., Shinmura, K., Yamada, H., Tsuneyoshi, T., Sugimura, H.: OGG1, MYH and MTH1 gene variants identified in gastric cancer patients exhibiting both 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine accumulation and low inflammatory cell infiltration in their gastric mucosa. *Journal of Genetics* 87 (2008) 181-186.

(Haigiwara et al., 2005)

Haigiwara A., Kitajima Y., Sato S., Miyazaki K.: Allelic loss of the DNA repair gene OGG1 against oxidative damage in esophageal squamous cellcarcinoma. *Oncol Rep* 13 (2005) 1009-16.

(Harper, 2004)

Harper, P.: *Practical Genetic Counselling*. Hodder Arnold, London, Sixth Edition (2004) 331.

(Hashiguchi et al., 2004)

Hashiguchi, K., Stuart, J. A., de Souza-Pinto N. C., Bohr, V. A.: The C-terminal  $\alpha 0$  helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial  $\beta$ -Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic Acid Research* Vol. 32, No. 18 (2004) 5596-5608.

(Hill et al., 2006)

Hill, J., Evans, M.: Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucleic Acids Reseach* 34(5) (2006) 1620-1632.

(Holinski-Feder, et al., 2006)

Holinski-Feder, E., Grabowski, M.: Erbliches nicht polypöses kolorektales Karzinom - HNPCC. Daten des HNPCC - Konsortiums der deutschen Krebshilfe. *Medgen* 18 (2006) 1-8.

(Holinski-Feder, et al., 2008)

Holinski-Feder, E., Morak, M.: Hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome. Aktueller Stand. *Dtsch Med Wochenschr* 133 (2008) 22-27.

(Holinski-Feder et al., 2010)

Holinski-Feder, E., Morak, M.: Familiäre adenomatöse Polyposis und andere Polyposissyndrome. *Gastroenterologe* 5 (2010) 7-15.

(Jenkins et al., 2006)

Jenkins, M., Croitoru, M., Monga, N., Cleary, S., Cotterchio, M., Hopper, J., Gallinger, S.: Risk of Colorectal Cancer in Monoallelic and Biallelic Carriers of MYH Mutations: A Population-Based Case-Family Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 15, (2006) 312-314.

(Jones et al., 2002)

Jones, S., Emmerson, P., Maynard, J.: Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet* 11(23) (2002) 2961-7.

(Kang et al., 1995)

Kang D., Nishida J., Lyama A., Nakabeppu Y., Furuichi M., Fujiwara T., Sekiguchi M., Takeshigi K.: Intracellular localization of 8-oxodGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J Biol Chem* 270 (1995) 14659-65.

(Kim et al., 2004)

Kim, I.-J., Ku, J.-L., Kang, H. C., Park, J.-H., Yoon, K.-A., Shin, Y., Park, H.-W., Jang, S. G., Lim, S.-K., Han, S. Y., Shin, Y.-K., Lee, M. R., Jeong, S.-Y., Shin, H.-R., Lee, J. S., Kim, W.-H., Park, J.-G.: Mutational analysis of OGG1, MYH, MTH1 in FAP, HNPCC and sporadic colorectal cancer patients: R154H OGG1 polymorphism is associated with sporadic colorectal cancer patients. *Hum. Genet.* 115 (2004) 498-503.

(Kim et al., 2007)

Kim, Jin C., Ka, In H., Lee, Yoo M., Koo, Kum, H., Kim, Hee C., Yu, Chang, S., Jang, Se J., Kim, S., Lee, Han, I., Lee, Kang, H.: MYH, OGG1, MTH 1 and APC alterations involved in the colorectal tumorigenesis of Korean patients with multiple adenomas. *Virchows Arch.* 450 (2007) 311-319.

(Kim et al., 2005)

Kim, S.-R., Nohmi, T., Yamada, M.: Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutations Research* 591 (2005) 60-73.

(Kimura et al., 2004)

Kimura, Y., Oda, S., Egashira, A., Kakeji, Y., Baba, H., Nakabeppu, Y., Maehara, Y.: A variant from of hMTH1, a human homologue of the E coli mutT gene, correlates with somatic mutation in the p53 tumor suppressor gene in gastric cancer patients. *J Med Genetic* 41(5) (2004) e57.

(Kinzler et al., 1996)

Kinzler, K., Vogelstein, B.: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 87(2) (1996-10-18) 159-170.

(Klungland et al., 1999)

Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., Barnes, D. E.: Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 13300-13305.

(Kohno et al., 1998)

Kohno, T., Shinmura, K., Tosaka, M., Tani, M., Kim, S.-R., Sugimura, H., Nohmi, T., Kasai, H., Yokota, J.: Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 16 (1998) 3219-3225.

(Krokan et al., 2000)

Krokan H. E., Nilsen H., Skorpen F., Otterlei M., Slupphaug G.: Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476(2000) 73-7.

(Laval, 1977)

Laval, J.: Two enzymes are required from strand incision in repair of alkylated DNA. *Nature* 269 (1977) 829-832.

(Le Marchand et al., 2002)

Le Marchand, L., Donlon, T., Lum-Jones, A., Seifried, A., Wilkens, R. L.: Red meat intake, CYP2E1 genetic polymorphisms and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 11 (2002) 409-412.

(Lindahl, 1993)

Lindahl T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (1993) 709-15.

(Lindahl und Wood, 1999)

Lindahl, T., Wood, R.: Quality control by DNA repair. *Science*. 286(5446) (1999-12-03)1897-1905.

(Loeb, 2001)

Loeb, L. A.: A mutator phenotype in cancer. *Cancer Research* 61 (2001) 3230-3239.

(Mangold et al., 2005)

Mangold, E., Pagenstecher, C., Friedl, W., Mathiak, M., Buettner, R., Engel, C., Loeffler, M., Holinski-Feder, E., Müller-Koch, Y., Keller, G., Schackert, H. K., Krüger, S., Goecke, T., Moeslein, G., Gebert, J., Kunstmann, E., Schulmann, K., Rüschoff, J., Propping, P.: Spectrum and frequencies of mutations in MSH2 and MLH1 identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 116(5) (2005-09-20) 692-702.

(Michaels et al., 1992)

Michaels, M. L., Tchou J., Grollman A. P., Miller J. H.: A repair for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* 31 (1992) 10964-8.

(Miller et al., 1988)

Miller, S., Dykes, D., Polesky, H.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3) (1988-02-11) 1215.

(Morak et al., 2010a)

Morak, M., Laner, A., Bacher, U., Keiling, C., Holinski-Feder, E.: MUTYH associated polyposis-Variability of the clinical phenotype in Patients with biallelic and monoallelic MUTYH mutation and report on novel mutations. *Clinical Genetics* 78 (2010) 353-363.

(Morak et al., 2010b)

Morak, M., Massdorf, T., Sykora, H., Kerscher, M., Holinski-Feder, E.: First evidence for digenic inheritance in hereditary colorectal cancer by mutations in the base excision repair genes. *European Journal of Cancer* 47 (2010) 1046-1055.

(Nakabeppu, 2001)

Nakabeppu Y.: Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1 and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68 (2001) 75-94.

(Nielsen et al., 2005)

Nielsen, M., Franken, P., Reinards, T., Weiss, M., Wagner, A., van der Klift, H., Kloosterman, S., Houwing-Duistermaat, J., Aalfs, C., Ausens, M., Bröcker-Vriends, A., Gomez, G., Hoogerbrugge, N., Menko, F., Sijmons, R., Verhoef, S., Kuipers, E., Morreau, H., Breuning, M., Tops, C., Wijnen, J., Vasen, H., Fodde, R., Hes, F.: Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *Journal of medical Genetics* 42, (2005) 54-61.

(Nilsen und Krokan, 2001)

Nilsen, H., Krokan, H. E.: Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis*, 22 (2001) 987-998.

(Ohtsubo et al., 2000)

Ohtsubo T., Nishioka K., Imaiso Y., Iwai S., Shimokawa H., Oda H., Fujiwara T., Nakabeppu Y.: Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acid Res* 28 (2000) 1355-64.

(Otterlei et al., 1999)

Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T. A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M, Aas, P. A., Steinsbekk, K., Bakke, O., Krokan, H. E.: Post-replication base excision repair in replication foci. *EMBO J.*, 18 (1999) 3834-3844.

(Pope et al., 2002)

Pope M. A., Porello S. L., David S. S.: *Escherichia coli* apurinic-aprimidinic endonucleases enhance the turnover of the adenine glycosylase MutY with G:A substrates. *J Biol Chem* 277 (2002) 22605-15.

(Radicella et al., 1997)

Radicella J. P., Dherin C., Desmaze C., Fox M. S., Boiteux S.: Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* Vol.94, (1997) 8010-8015.

(Rahner et al., 2008)

Rahner, N., Steinke, V.: Erbliche Krebserkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 41 (2008) 706-713.

(Russell et al., 2006)

Russell, A., Zhang, J., Luz, J., Hutter, P., Chappuis, P., Berthod, C., Maillet, P., Mueller, H., Heinimann, K.: Prevalence of MYH germline mutations in Swiss APC mutation-negative polyposis patients. *International Journal of Cancer* 118(8) (2006) 1937-1940.

(Saiki et al., 1988)

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988) 487-491.

(Schmiegel et al., 2009)

Schmiegel, W., Pox, C., Arnold, D., Porschen, R., Rödel, C., Reinacher-Schick, A.: Kolorektales Karzinom. Polypenmanagement, (neo)adjuvante Therapie, Therapie im metastasierten Stadium. *Deutsches Ärzteblatt* 106 (51-52) (2009) 843-8.

(Seeberg et al., 1995)

Seeberg E., Eide L., Bjoras M.: The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 20 (1995) 391-7.



(Shinmura et al., 1998)

Shinmura K., Kohno T., Kasai H., Koda K., Sugimura H., Yokota J.: Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 89 (1998) 825-8.

(Sieber et al., 2003)

Sieber, O., Lipton L., Crabtree, M., Heinemann, K., Fidalgo, P., Philips, R., Bisgaard, M.-L., Orntoft, T., Aaltonen, L., Hodgson, S., Thomas, H., Tomlinson, I.: Multiple Colorectal Adenomas, Classic Adenomatous Polyposis, and Germ-Line Mutations in MYH. *The New England Journal of Medicine* 348 (2003-02-27) 791-799.

(Slupphaug et al., 2003)

Slupphaug, G., Kavil, B., Krokan, H. E.: The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531 (2003) 231-51.

(Spirio et al., 1993)

Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B.: Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75 (1993) 951-957.

(Stucki et al., 1998)

Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S. H., Hübscher, U., Dogliotti, E.: Mammalian base excision repair by DNA polymerases  $\delta$  and  $\epsilon$ . *Oncogene*, 17 (1998) 835-843.

(Sugimura et al., 1999)

Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B. J., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C., Li, Z., Wang, J., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J. K., Martison, J. J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K., Yokota, J.: hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8 (1999) 669-674.

(Takao et al., 1998)

Takao, M., Aburantani, H., Kobayashi, K., Yasui, A.: Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acid Research* 26 (1998) 2917-2922.

(Tani et al., 1998)

Tani, M., Shinmura, K., Kohno, T., Shiroishi, T., Wakana, S., Kim, S. R., Nohmi, T., Kasai, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Yokota, J.: Genomic structure and chromosomal localization of the mouse Ogg1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in DNA damage. *Mamm Genome* 9 (1998) 32-7.

(Thirlwell et al., 2007)

Thirlwell, C., Howarth, K., Segditsas, S., Guerra, G., Thomas, H., Philips, R., Talbot, I., Gorman, M., Novelli, M., Sieber, O., Tomlinson, I.: Investigation of pathogenic mechanisms in multiple colorectal adenoma patients without germline APC or MYH/MUTYH mutations. *British Journal of Cancer* 96 (2007) 1729-1734.

(Tsuzuki et al., 2001)

Tsuzuki, T., Egashira, A., Igarashi, H., Iwakuma, T., Nakatsuru, Y., Tominaga, Y., Kawate, H., Nakao, K., Nakamura, K., Ide, F., Kura, S., Nakabeppu, Y., Katsuki, M., Ishikawa, T., Sekiguchi, M.: Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 11456-61.

(Umar et al., 2004)

Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P.: Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96 (2004) 261-268.

(Vasen et al., 1991)

Vasen, H. F., Mecklin, J. P., Khan, P. M., Lynch, H. T.: The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34 (1991) 424-425.

(Vasen et al., 1999)

Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P., Lynch, H.T.: New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116 (1999) 1453-1456.

(von Sonntag, 1987)

von Sonntag, C.: *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis, London (1987).

(Wallace, 2002)

Wallace S. S.: Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 33 (2002) 1-14.

(Wood et al., 2005)

Wood R. D., Mitchell M., Lindahl T.: Human DNA repair genes. *Mutat Res* 577 (2005) 275-83.

(Yu et al ., 1999)

Yu Z., Chen J., Ford B. N., Brackley M. E., Glickman B. W.: Human DNA repair systems - an overview. *Environ Mol Mutagen* 33 (1999) 3-20.

# Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Dipl. chem. Elke Holinski-Feder möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Betreuung und Durchsicht der Arbeit meinen aufrichtigsten Dank aussprechen.

Frau Dr. rer. nat. Monika Morak, deren fachkundige und freundliche Unterstützung diese Arbeit maßgeblich gefördert hat, möchte ich besonders herzlich danken.

Frau Sari Maßdorf, die mich bei der Einarbeitung in das Laborleben mit ihren wertvollen Ratschlägen unterstützt hat, danke ich sehr.

Meinem lieben Mann Thomas, der immer an mich geglaubt hat und mich während der gesamten Zeit unaufhörlich motiviert und unterstützt hat, möchte ich sehr danken.