

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

**Mutationsscreening des *MSH3*-Gens  
bei Kolonkarzinom-Patienten zur Untersuchung  
seiner Beteiligung an der Prädisposition  
für das Lynch-Syndrom**

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

vorgelegt von  
Sarah Käsbaier  
aus  
Würzburg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Dipl. chem. E. Holinski-Feder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. David Horst, Prof. Dr. Roland Kappler

Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. M. Morak

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2017

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das kolorektale Karzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Das hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC)	1
1.1.2.1 Definition	1
1.1.2.2 Diagnose	2
1.1.2.3 Tumorgenese und Mismatch-Repair-Gene	4
1.1.2.4 Klinik	7
1.1.2.5 Vorsorge	9
<b>1.2 Das <i>MSH3</i>-Gen und das DNA-Mismatch-Repair-Protein MSH3</b>	<b>11</b>
1.2.1 Das <i>MSH3</i> -Gen	11
1.2.2 Das DNA-Mismatch-Repair-Protein MSH3	12
1.2.2.1 Aufbau	12
1.2.2.2 Funktion	14
1.2.2.3 Die Rolle des MSH3-Proteins in der Tumorgenese	15
1.2.2.4 <i>MSH3</i> und EMAST	16
<b>1.3 Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Patientenkollektiv</b>	<b>20</b>
2.1.1 Voruntersuchungen	20
2.1.2 Auswahl der Patienten	21
<b>2.2 Chemikalien und andere Materialien</b>	<b>24</b>
<b>2.3 DNA-Isolation</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Messung der DNA-Konzentration</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Verdünnungen</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR=Polymerase chain reaction)</b>	<b>26</b>
2.6.1 Durchführung der PCR für die Exons 2-24 des <i>MSH3</i> -Gens	26
2.6.2 Durchführung der PCR für Exon 1 des <i>MSH3</i> -Gens	28
2.6.3 Durchführung der PCR für das <i>MSH3</i> -, <i>MSH6</i> - und <i>MSH2</i> -Gen aus Tumor-DNA	29
<b>2.7 Gelelektrophorese</b>	<b>29</b>
<b>2.8 Reinigung der PCR-Produkte</b>	<b>30</b>
<b>2.9 DNA-Sequenzierung</b>	<b>31</b>

<b>2.10 Bestätigung.....</b>	<b>32</b>
<b>2.11 <i>In Silico</i>-Analysen und Webbasierte Datenbanken.....</b>	<b>32</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Analyse des <i>MSH3</i>-Gens auf Keimbahnmutationen.....</b>	<b>33</b>
3.1.1 Exonische Sequenzveränderungen.....	33
3.1.1.1 c.1035delT (p.Leu347*).....	34
3.1.1.2 c.1258A>G (p.Ser420Gly).....	35
3.1.1.3 c.2732T>G (p.Leu911Trp).....	36
3.1.1.4 Tabellarische Zusammenfassung der gefundenen exonischen Keimbahnveränderungen.....	37
3.1.2 Intronische Sequenzveränderungen.....	39
3.1.3 Sequenzveränderungen im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1.....	40
3.1.4 Zusammenfassende grafische Darstellung der nachgewiesenen Keimbahnveränderungen im <i>MSH3</i> -Gen.....	41
3.1.5 Zusammenfassende tabellarische Darstellung der bei den Indexpatienten gefundenen Keimbahnveränderungen im <i>MSH3</i> -Gen.....	42
<b>3.2 Analyse von Tumor-DNA.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 Darstellung der relevanten nachgewiesenen somatischen Sequenzveränderungen.....	46
3.2.1.1 <i>MSH3</i> .....	46
3.2.1.2 <i>MSH6</i> .....	47
3.2.1.3 <i>MSH2</i> .....	48
3.2.2 Übersicht über die gesamten gefundenen somatischen Sequenzveränderungen.....	48
3.2.3 Patientenbezogene tabellarische Darstellung der nachgewiesenen Sequenzveränderungen in <i>MSH3</i> und <i>MSH6</i> im Tumor und in der Keimbahn.....	49
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Diskussion der im <i>MSH3</i>-Gen gefundenen Keimbahnveränderungen.....</b>	<b>51</b>
4.1.1 Pathogene Mutation c.1035delT (p.Leu347*).....	51
4.1.2 Missense-Mutationen unklarer Pathogenität.....	59
4.1.2.1 c.1258A>G (p.Ser420Gly) (rs55660516).....	59
4.1.2.2 c.2732T>G (p.Leu911Trp) (rs41545019).....	61
4.1.3 Deletionen und Insertionen unklarer Signifikanz in Exon 1.....	64
4.1.4 Benigne Polymorphismen (SNPs).....	66
4.1.5 Stille Sequenzveränderungen.....	67
4.1.6 Intronische Sequenzveränderungen.....	68
4.1.7 Sequenzveränderungen im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1.....	69
<b>4.2 Diskussion der im <i>MSH3</i>- und <i>MSH6</i>-Gen gefundenen somatischen     Sequenzveränderungen.....</b>	<b>71</b>

4.2.1 Pathogene Mutationen.....	72
4.2.1.1 c.1148delA (p.Lys383Argfs*32).....	72
4.2.1.2 c.3261delC (p.Phe1088Serfs*1) (rs267608078).....	74
4.2.1.3 c.1035delT (p.Leu347*).....	75
4.2.2 Missense-Mutation unklarer Pathogenität c.3413G>A (p.Gly1138Glu)..	77
<b>4.3 Hypothesen für den unklaren immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins.....</b>	<b>78</b>
4.3.1 Pathogene Keimbahnmutation im <i>MSH6</i> - und <i>MSH3</i> -Gen und jeweilige somatische Second Hit-Mutation im Tumor als Ursache für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall.....	80
4.3.2 Zwei pathogene somatische Mutationen im <i>MSH2</i> -Gen als Ursache für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall.....	84
4.3.3 Dominant-negativer Effekt einer unklaren Sequenzveränderung im <i>MSH3</i> -Gen als Ursache für den immunhistochemischen MSH2- Ausfall.....	85
4.3.4 Zwei pathogene somatische Mutationen im <i>MSH3</i> -Gen als Ursache für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall.....	87
4.3.5 Falsches Ergebnis der immunhistochemischen Analyse als Ursache für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall.....	88
4.3.6 Hypothesen für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall bei den übrigen Patienten.....	88
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>94</b>
<b>6. QUELLENVERZEICHNIS</b>	<b>97</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>106</b>
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>108</b>
<b>9. TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>109</b>
<b>10. ANHANG</b>	<b>111</b>

# **1. Einleitung**

Einleitend werden zunächst allgemeine Informationen zum kolorektalen Karzinom sowie zum *MSH3*-Gen und DNA-Mismatch-Repair-Protein MSH3 gegeben.

## **1.1 Das kolorektale Karzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Mit etwa 62.000 Neuerkrankungen pro Jahr machen Karzinome des Darms beinahe ein Drittel aller Tumorerkrankungen aus. Sie stellen damit die zweit- bzw. dritthäufigste Krebsdiagnose dar (nach Karzinomen der Brustdrüse bei Frauen bzw. nach Karzinomen der Prostata und der Lunge bei Männern). Knapp zwei Drittel dieser Krebserkrankungen betreffen das Kolon, ca. 30% sind im Rektum lokalisiert. Männer sind dabei durchschnittlich 1,4 mal häufiger betroffen als Frauen, wobei das mittlere Lebenszeitrisko für einen solchen Tumor in Deutschland bei ca. 6% liegt. Betrachtet man die Familienanamnese betroffener Patienten, so findet sich in 4-5% der Fälle eine Häufung von Tumoren bei mehreren erstgradig verwandten Angehörigen. In diesen Fällen wird von einer genetischen Prädisposition ausgegangen, wie sie beispielsweise beim hereditären nicht polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) sowie bei verschiedenen polypösen Syndromen zu finden ist (Geissler und Graeven, 2005; Holinski-Feder und Grabowski, 2006; Holinski-Feder und Morak, 2008; RKI, 2015).

### **1.1.2 Das hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC)**

#### **1.1.2.1 Definition**

Das hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) stellt mit einer Prävalenz von 1:500 die häufigste genetische Krebsprädisposition dar. Es definiert sich durch die Erfüllung der Amsterdam- oder Bethesda-Kriterien (siehe unten). In Kombination mit einem Mismatch-Repair-defizienten Tumor wird der Verdacht auf Lynch-Syndrom gestellt

(Steinke et al., 2013). Ursächlich ist in der Regel eine pathogene Keimbahnmutation in einem der Mismatch-Repair-Gene (MMR-Gene) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2*, die autosomal-dominant weitervererbt wird. Kann diese molekulargenetisch nachgewiesen werden, bezeichnet man die Erkrankung gemäß des Erstbeschreibers Henry Lynch auch als Lynch-Syndrom. Dieses kennzeichnet sich durch eine schnellere Tumorgenese und ein deutlich früheres Erkrankungsalter von durchschnittlich 45 Jahren im Vergleich zu sporadisch auftretenden Tumoren. Klinisch fällt eine vorwiegend rechtsseitige Lokalisation der Karzinome auf. Auch ist das Risiko für das Auftreten bestimmter HNPCC-assoziiierter Zweittumoren erhöht (Holinski-Feder und Grabowski, 2006; Lynch et al., 2009).

#### 1.1.2.2 Diagnose

Die Diagnosestellung von HNPCC folgt derzeit einem Stufenprozess. Eine erste Verdachtsäußerung gelingt mit Hilfe klinischer Kriterien.

So wurden bereits 1991 die Amsterdam-I-Kriterien formuliert, mittels derer die Diagnosestellung auf HNPCC erleichtert werden sollte. Diese Kriterien beziehen sich dabei ausschließlich auf das Vorliegen von Kolon- bzw. Rektumkarzinomen und deren gehäuftem Auftreten in Familien.

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

- mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem Kolon- bzw. Rektumkarzinom
- einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen
- wenigstens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen
- mindestens ein Patient mit Kolon- bzw. Rektumkarzinom vor dem 50. Lebensjahr
- Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP)

Im Jahr 1999 wurden oben aufgeführte Kriterien überarbeitet und in aktualisierter Form als Amsterdam-II-Kriterien veröffentlicht. Diese berücksichtigen neben kolorektalen Karzinomen zusätzlich das Vorliegen anderer HNPCC-assoziiierter Tumoren.

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

- mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem HNPCC-

assoziierten Karzinom (Kolon, Rektum, Endometrium, Dünndarm, Urothel, hepatobiliäres Karzinom)

- einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen
- wenigstens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen
- mindestens ein Patient mit Diagnosestellung vor dem 50. Lebensjahr
- Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP)

Neben den sehr selektiven Amsterdam-Kriterien wurden 1996 erstmals die Bethesda-Kriterien entwickelt. Diese wurden 2003 überarbeitet und stellen in der aktuellen Form schwächere Diagnosekriterien dar, die hinsichtlich eines Mutationsnachweises in einem der MMR-Gene eine höhere Sensitivität, aber eine geringere Spezifität als die Amsterdam-Kriterien haben (Steinke et al., 2013).

**Bethesda-Kriterien:** mindestens ein Kriterium muss zutreffen (Umar et al., 2004)

- Patient mit Diagnosestellung eines kolorektalen Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr
- Patient mit synchronen oder metachronen kolorektalen Karzinomen oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren unabhängig vom Alter  
(Kolon, Rektum, Endometrium, Magen, Ovarien, Pankreas, Urothel, Gallengang, Dünndarm, Gehirn [meist Glioblastome wie bei Turcot-Syndrom], Talgdrüsenadenome und Keratoakanthome [bei Muir-Torre-Syndrom])
- Patient mit MSI-H Histologie vor dem 60. Lebensjahr  
(Vorliegen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, Crohn-ähnlicher lymphozytärer Reaktion, muzinöser/Siegelring-Differenzierung oder medullärem Wachstumsmuster)
- Patient mit kolorektalem Karzinom und mindestens ein erstgradig Verwandter mit HNPCC-assoziiertem Tumor und Diagnosestellung (bei einem der Karzinome) vor dem 50. Lebensjahr
- Patient mit kolorektalem Karzinom und mindestens zwei erst- oder zweitgradig Verwandte mit HNPCC-assoziiertem Tumor unabhängig vom Alter

Erweisen sich die Amsterdam- oder Bethesda-Kriterien als positiv, folgen zur weiteren Abklärung molekularpathologische Untersuchungen des Tumorgewebes in Form einer Mikrosatellitenanalyse (MSA) und immunhistochemischen Darstellung der MMR-Proteine



(IHC) (Engel et al., 2006; Steinke et al., 2013).

Zum Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI), wie sie für das Lynch-Syndrom charakteristisch ist, erfolgt die Analyse von insgesamt fünf Mikrosatelliten; zwei Mononukleotidruns (*BAT25* und *BAT26*) sowie drei repetitiven Dinukleotiden (*D5S346*, *D2S123* und *DI7S250*) (Boland et al., 1998; Dietmaier et al., 1997). Dabei werden die unterschiedlichen Befunde wie folgt definiert (Boland et al., 1998):

**MSI:** Längenveränderung von repetitiven Abschnitten innerhalb eines Mikrosatelliten aufgrund von Insertionen oder Deletionen im Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe

**MSI-H** (hohe Mikrosatelliteninstabilität): Längenveränderung in mindestens zwei der fünf untersuchten Mikrosatelliten

**MSI-L** (niedrige Mikrosatelliteninstabilität): Längenveränderung in einem der fünf untersuchten Mikrosatelliten

**MSS** (Mikrosatellitenstabilität): Längenveränderung in keinem der fünf untersuchten Mikrosatelliten

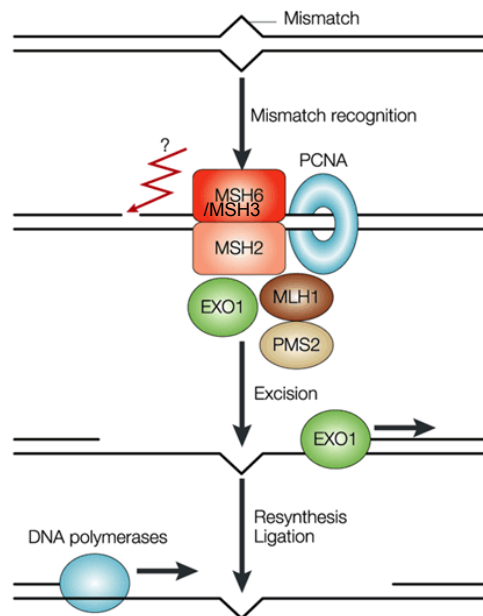
Studien konnten zeigen, dass Patienten, die die Amsterdam- bzw. die Bethesda-Kriterien erfüllen, nur in etwa 35% eine Mikrosatelliteninstabilität im Tumor aufweisen. Liegt dagegen eine MSI vor, so kann in 53% der Fälle eine ursächliche MMR-Mutation gefunden werden (Steinke et al., 2013).

Erweist sich ein Tumor als MSI-H und/oder konnte mittels der Immunhistochemie der Ausfall eines MMR-Proteins festgestellt werden, erfolgen in einem nächsten Diagnoseschritt zum Mutationsnachweis molekulargenetische Untersuchungen der entsprechenden MMR-Gene (Steinke et al., 2013).

#### 1.1.2.3 Tumorgenese und Mismatch-Repair-Gene

Dem Mismatch-Repair-System kommt unter Interaktion verschiedener Proteine und Enzyme die Aufgabe der postreplikativen DNA-Reparatur zu. Für die Erkennung entsprechender Fehler, wie z.B. Basenfehlpaarungen, sind die MMR-Proteine MSH2 und MSH6 in Kombination mit MLH1 und PMS2 zuständig, anschließend werden die falschen Basen durch das Enzym Exonuklease I entfernt. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer

Neusynthese der nun richtigen Nukleotide durch die DNA-Polymerase  $\delta$  und abschließend erfolgt eine Verknüpfung der eingebauten Basen durch die DNA-Ligase (Murken et al., 2006).



**Abb.1: Das Mismatch-Repair-System** (leicht modifiziert aus Martin und Scharff, 2002)

Zu den MMR-Genen zählen *MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5*, *MSH6*, *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* und *PMS2*, wobei bislang nur Mutationen in den Genen *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* und *PMS2* mit dem Lynch-Syndrom assoziiert sind (Peltomäki, 2005). Die MMR-Proteine haben die spezifische Funktion, Fehler, wie Basenfehlpaarungen oder Insertions-Deletionsschleifen (IDLs), die während der DNA-Replikation entstanden und vor allem in repetitiven DNA-Abschnitten (= Mikrosatelliten) zu finden sind, zu erkennen und somit die genetische Stabilität zu gewährleisten. Dabei agieren die Proteine jeweils als heterodimere Komplexe (Jiricny und Nyström-Lahti, 2000). MutS $\alpha$ , bestehend aus MSH2 und MSH6, ist dabei für die Erkennung von Basenfehlpaarungen und von 1-Basenpaar-Insertions-Deletionsschleifen verantwortlich (Genschel et al., 1998). Ein weiteres Heterodimer, MutS $\beta$ , bestehend aus MSH2 und MSH3, ist in der Lage, Insertions-Deletionsschleifen von zwei bis acht ungepaarten Nukleotiden zu erkennen (Genschel et al., 1998; Jiricny und Nyström-Lahti, 2000). MLH1 formt mit PMS2 das Heterodimer MutL $\alpha$ , welches mit MutS $\alpha$  bzw. MutS $\beta$  einen ternären Komplex bildet, und so ebenfalls maßgeblich an der Initiierung der DNA-Reparatur und der DNA-Korrektur beteiligt ist. Auch für MLH1

scheint es, ähnlich wie bei *MSH2*, neben *PMS2* redundante Bindungspartner (*PMS1* und *MLH3*) zu geben, die bislang aber nicht mit HNPCC assoziiert sind (Jiricny und Nyström-Lahti, 2000; Peltomäki, 2005).

Mutationen in den MMR-Genen *MSH2* bzw. *MLH1* resultieren somit in einer eklatanten Beeinträchtigung des Reparatursystems mit der Folge einer hohen Mikrosatelliteninstabilität und eines ausgeprägten Phänotyps (Jiricny und Nyström-Lahti, 2000). Des Weiteren folgt aus dem Funktionsverlust dieser Proteine eine Instabilität ihrer Bindungspartner (*MSH3* und *MSH6* für *MSH2* bzw. *PMS2* für *MLH1*), was vor allem im Rahmen der immunhistochemischen Diagnostik berücksichtigt werden muss (Chang et al., 2000; Peltomäki, 2005; Plaschke et al., 2004a). Liegt dagegen eine Mutation des *MSH6*-Gens vor, so kann die Funktion des Proteins partiell durch *MSH3*, den, bezogen auf die Reparatur von IDLs redundanten Bindungspartner von *MSH2*, im Heterodimer MutSβ kompensiert werden, was meist in einer geringeren Mikrosatelliteninstabilität und einem weniger ausgeprägten Phänotyp resultiert. Ein Funktionsverlust des *MSH3*-Proteins kann dementsprechend größtenteils von MutSα ausgeglichen werden. Inwiefern in diesem Fall ein mutierter Phänotyp entsteht bleibt offen, da bis heute keine kausale *MSH3*-Mutation für das Lynch-Syndrom beschrieben ist (Jiricny und Nyström-Lahti, 2000).

Mutationen in den MMR-Genen *MLH1*, *MSH2* und *MSH6* machen mehr als 95% aller mit dem Lynch-Syndrom assoziierten Genveränderungen aus, dabei stellen Mutationen in *MLH1* mit 40-50% (je nach Studie) und Veränderungen in *MSH2* mit 32-50% die häufigsten Prädispositionen für das Lynch-Syndrom dar. Mutationen in *MSH6* treten in circa 7-18% der Fälle auf, wohingegen solche in *PMS2* mit etwa 1-7% verhältnismäßig selten vertreten sind (Holinski-Feder und Grabowski, 2006; Peltomäki und Vasen, 2004; Plazzer et al., 2013; Steinke et al., 2014).

Auch Deletionen am 3'-Ende von *EPCAM*, einem Gen, das vor *MSH2* gelegen ist, werden mit dem Lynch-Syndrom assoziiert. Durch diese Deletionen kommt es teilweise auf dem entsprechenden Allel zu einer epigenetischen Inaktivierung des *MSH2*-Gens durch Promotormethylierung. Diese Promotormethylierung konnte dabei sowohl im Tumor von betroffenen Patienten, als auch partiell in deren Keimbahn gefunden werden (Kovacs et al., 2009; Ligtenberg et al., 2009; Niessen et al., 2009; Steinke et al., 2013). Bei ca. 13% der Patienten mit klinischem Verdacht auf ein Lynch-Syndrom kann bei hoher Mikrosatelliteninstabilität und immunhistochemischem Ausfall des *MLH1*-Proteins sowie meist unauffälliger Familienanamnese eine epigenetische Promotormethylierung von

*MLH1* als Ursache nachgewiesen werden (Holinski-Feder und Morak, 2008).

Durch das Vorliegen einer heterozygoten Keimbahnmutation in einem der MMR-Gene und der daraus folgenden Beeinträchtigung des DNA-Reparatursystems ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer zweiten somatischen Mutation im Tumor deutlich erhöht, sodass mit dem Ausfall des zweiten Allels die Tumorgenese entsprechend der „Second Hit-Hypothese“ nach Knudson initiiert werden kann (Alfred und Knudson, 1971). Auch scheinen die MMR-Gene eine Rolle bei der Apoptose zu spielen, wobei ein Ausfall eines dieser Gene in einem Wachstumsvorteil der betroffenen Zelle resultiert, der die Tumorgenese ebenfalls begünstigt (Fishel, 2001).

#### 1.1.2.4 Klinik

Das Lynch-Syndrom kennzeichnet sich klinisch durch eine frühe Erstmanifestation eines kolorektalen Karzinoms mit einem durchschnittlichen Alter von circa 45 Jahren (für *MSH2*- bzw. *MLH1*-Mutationsträger) im Vergleich zu 69 Jahren bei sporadischen Tumoren, bei einem insgesamt Lebenszeitrisiko von 60-80% (Aarnio et al., 1999; Lynch et al., 2009; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). Anlageträger von *MSH6*-Mutationen zeigen dagegen meist einen retardierten Krankheitsverlauf mit einer durchschnittlich zehn Jahre späteren Tumorerstmanifestation im mittleren Alter von 55 Jahren (Pérez-Cabornero et al., 2013; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). Die frühere Erkrankung resultiert aus dem bereits oben aufgeführten defekten MMR-System, sodass es bei Lynch-Syndrom-Patienten unter anderem zu vermehrten Mutationen in Onkogenen kommt und somit die Adenom-Karzinom-Sequenz mit etwa zwei bis drei Jahren wesentlich schneller durchlaufen wird, als bei Patienten mit sporadischen Kolonkarzinomen (8-10 Jahre). Auch zeichnet sich die erbliche Form durch eine präferentielle rechtsseitige Lokalisation des Tumors aus, wobei etwa 70% der Karzinome proximal der splenischen Flexur gelegen sind. Männer erkranken dabei häufiger an kolorektalen Karzinomen als Frauen (Aarnio et al., 1999; Holinski-Feder und Grabowski, 2006; Lynch et al., 2009; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001).

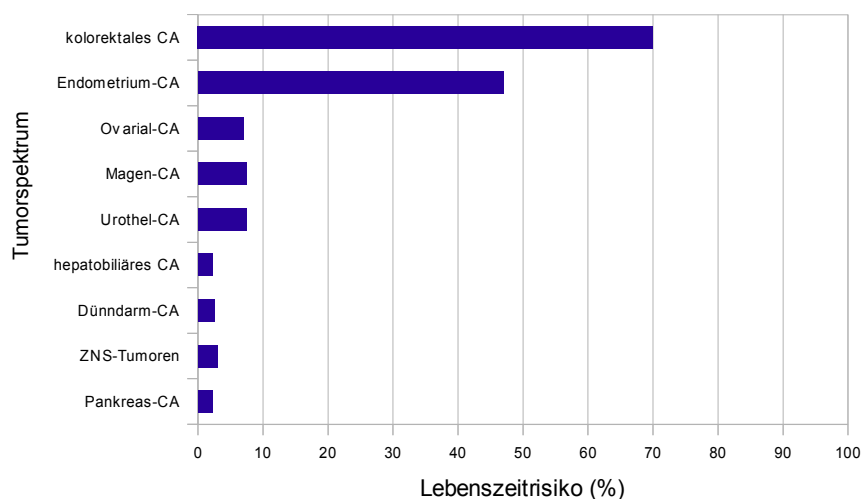
Pathologisch dominieren gering differenzierte, muzinöse Adenokarzinome. Neben dem Nachweis einer MSI fallen im Tumorgewebe des Weiteren vermehrt lymphozytäre Infiltrate auf, die auf eine Invasion von Immunzellen zurückzuführen sind. Diese Immunreaktion kommt dadurch zustande, dass es durch verstärkte Mutationen in Genen

für Oberflächenproteine zu einer höheren Immunogenität der Tumorzellen kommt. Die dabei stattfindende Entzündungsreaktion wird häufig mit dem Begriff „Crohn-ähnliche Läsionen“ beschrieben (Holinski-Feder und Grabowski, 2006; Lynch et al., 2009; Steinke et al., 2013). Diese Immunreaktion ist möglicherweise auch die Ursache für ein geringeres Metastasierungsrisiko, was wiederum erklären könnte, warum in Studien das 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit MSI-Nachweis höher ist, als bei Patienten ohne Mikrosatelliteninstabilität im Tumor (Holinski-Feder und Grabowski, 2006; Ribic et al., 2003).

Lynch-Syndrom-Patienten weisen ein deutlich erhöhtes Risiko für Zweittumoren, u.a. des Kolorektums auf, die sowohl synchron, als auch metachron auftreten können. So manifestiert sich bei 20-25% der Patienten innerhalb von 10 Jahren nach Auftreten des Ersttumors ein weiteres kolorektales Karzinom (Goecke et al., 2006; Lynch et al., 2009). Daneben ist das Lynch-Syndrom mit einer Reihe weiterer Tumorerkrankungen assoziiert, die sich bei betroffenen Patienten mit einem höheren Risiko manifestieren als in der Normalbevölkerung (s. Abb.2). Zu diesen zählen Tumoren von Endometrium, Magen, Ovarien, Pankreas, Urothel, Gallengang, Dünndarm und Gehirn sowie Talgdrüsenadenome und Keratoakanthome (Lin et al., 1998; Umar et al., 2004). So beträgt das kumulative Risiko für das Auftreten eines extraintestinalen Tumors bis zum 70. Lebensjahr etwa 37,5% (Barrow et al., 2009).

Gerade für Frauen ist das Lebenszeitrisko, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken, je nach Studie, mit 34-60% deutlich erhöht, wobei es hinsichtlich des häufigeren Vorkommens bei *MSH2*- oder *MLH1*-Mutationsträgern widersprüchliche Studienergebnisse gibt (Aarnio et al., 1999; Bonadona et al., 2011; Stoffel et al., 2009; Vasen et al., 2001). Auch Ovarial- und Urothelkarzinome treten mit einem Lebenszeitrisko von 6-8 bzw. 7-8% vermehrt auf, wobei das Risiko für *MSH2*-Mutationsträger höher zu sein scheint als für Träger von *MLH1*-Mutationen (Barrow et al., 2009; Bonadona et al., 2011; Joost et al., 2015; Vasen et al., 2001; Watson et al., 2008). Goecke et al., 2006 konnten für diese Tumoren dagegen keine signifikante Genotyp-Phänotyp-Korrelation herstellen. Für Magenkarzinome, die mit einem Risiko von ca. 6-9% auftreten, lässt sich vermutlich keine Assoziation zum mutierten Gen ableiten (Barrow et al., 2009; Goecke et al., 2006; Watson et al., 2008). Das Auftreten von Hauttumoren, wie Talgdrüsenadenomen, die sich häufig zusammen mit anderen HNPCC-typischen Tumoren manifestieren und in dieser Konstellation als Muir-Torre-Syndrom bezeichnet werden, zeigt sich ebenfalls

vorrangig bei *MSH2*-Mutationsträgern (Goecke et al., 2006; Mangold et al., 2005). Grundsätzlich treten damit assoziierte extraintestinale Tumoren bei *MSH2*-Mutationen häufiger auf als bei *MLH1*-Mutationen (Goecke et al., 2006; Pérez-Cabornero et al., 2013). Anlageträger von *MSH6*-Mutationen zeigen im Vergleich zu *MSH2* und *MLH1* dagegen allgemein eine geringere Prädisposition für Krebserkrankungen (Bonadona et al., 2011; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). So finden sich bei *MSH6*-Mutationsträgern weniger kolorektale Karzinome als bei Patienten mit *MSH2*- oder *MLH1*-Mutationen. Interessanterweise zeigen diese Patienten aber ein gehäuftes Auftreten von atypischen, nicht HNPCC-assoziierten Tumoren, wie beispielsweise Lungen- oder Prostatakarzinomen sowie Leukämien (Plaschke et al., 2004a). Auch scheinen sich bei *MSH6*-Mutationen Karzinome des Endometriums sogar öfter zu manifestieren, als bei Mutationen im *MSH2*- und *MLH1*-Gen (Barrow et al., 2009; Plaschke et al., 2004a; Stoffel et al., 2009; Wijnen et al., 1999).



**Abb.2: Tumorspektrum und Lebenszeitrisiko von Lynch-Syndrom-Patienten** (mittlere Durchschnittswerte für kolorektales CA (60-80%), Endometrium-CA (34-60%), Ovarial-CA (6-8%), Magen-CA (6-9%), Urothel-CA (7-8%), hepatobiliäres CA (0,6-4%), Dünndarm-CA (1-4%), ZNS-Tumoren (2-4%) und Pankreas-CA (0,4-4%) ) (CA=Karzinom; ZNS=zentrales Nervensystem) (Aarnio et al., 1999; Barrow et al., 2009; Bonadona et al., 2011; Joost et al., 2015; Stoffel et al., 2009; Vasen et al., 2001; Watson et al., 2008)

#### 1.1.2.5 Vorsorge

Für Lynch-Syndrom-Patienten mit nachgewiesener pathogener Mutation in einem der

MMR-Gene sowie für Risikopersonen gelten spezielle Vorsorgeempfehlungen, die in der S3-Leitlinie *Kolorektales Karzinom* der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) festgehalten sind und nachfolgend aufgeführt werden. Als Risikopersonen sind dabei Patienten und deren Angehörige definiert, die die Amsterdam-Kriterien bzw. mindestens eines der Bethesda-Kriterien erfüllen und gleichzeitig eine Mikrosatelliteninstabilität im Tumorgewebe aufweisen.

- Ab dem 25. Lebensjahr jährlich:
- Anamnese und körperliche Untersuchung
  - Abdomensonographie
  - Koloskopie
  - gynäkologische Untersuchung mit transvaginalem Ultraschall
- Ab dem 35. Lebensjahr jährlich:
- Ösophagogastroduodenoskopie
  - Endometriumbiopsie

Eine prophylaktische Kolektomie bzw. Proktokolektomie sollte entsprechend der Leitlinie nicht durchgeführt werden, auch wird eine subtotale Kolektomie bei Vorliegen eines Karzinoms nicht generell empfohlen. Letztere muss aber mit dem Patienten individuell besprochen werden. Ähnliches gilt für Patientinnen ab dem 40. Lebensjahr, bzw. fünf Jahre vor dem frühesten Erkrankungsalter in der Familie, hinsichtlich einer prophylaktischen Hyster- bzw. Ovariectomie.

Angehörige von Lynch-Syndrom-Patienten sollten gemäß der Leitlinie über eine prädiktive Testung informiert werden. Im Falle eines negativen Mutationsnachweises in einer prädiktiven Diagnostik haben die allgemeinen Krebsvorsorgeempfehlungen Gültigkeit, eine intensiverte Vorsorge ist nicht notwendig.

Die in Deutschland geltenden Empfehlungen ähneln den europäischen. So erachten auch Vasen et al., 2013 ein Koloskopie-Intervall von ein bis zwei Jahren sowie eine gynäkologische Untersuchung einschließlich transvaginalem Ultraschall und Biopsie ab dem 35. Lebensjahr als sinnvoll. Auch Engel et al., 2010 konnten in ihrer Studie nachweisen, dass sich eine jährliche Koloskopie in der Karzinom-Früherkennung als sehr effektiv erweist.

## 1.2 Das *MSH3*-Gen und das DNA-Mismatch-Repair-Protein MSH3

### 1.2.1 Das *MSH3*-Gen

Das mutS homolog 3 (E.coli)-Gen (*MSH3*) konnte erstmals von Fujii und Shimada, 1989 mittels cDNA-Analysen in unmittelbarer Nähe des *DHFR*-Gens detektiert und von Anagnou et al., 1988 auf Chromosom 5q11-12 lokalisiert werden (s. Abb.3).



**Abb.3: Lokalisation des *MSH3*-Gens auf Chromosom 5q11-12** (aus: <http://ncbi.nlm.nih.gov/gene/4437>)

Es besteht aus 24 Exons und 23 Introns, die Länge der Exons rangiert dabei von 65 (Exon 16) bis 237 Basenpaaren (kodierender Bereich von Exon 1) bei einer insgesamt Exongröße von 4092 Basenpaaren (s. Abb.4). Die Spleißstelle an den jeweiligen Exon-Intron-Grenzen entspricht dabei mit Ausnahme von Intron 6 der von Lewin, 1997 beschriebenen Konsensus-Sequenz (s.Tab.1) (Watanabe et al., 1996).



**Abb.4: Das *MSH3*-Gen** (blau=Exon 1-24; schwarz=Intron 1-23; rote Linie=Startcodon)

← Intron 3'	Exon	5' Intron →
... C A G	... A G	G T A A G T ...
65 100 100	64 73	100 100 62 68 84 63

**Tab.1: Prozentuale Konservierung der Basenabfolge beim Spleißvorgang** (grau hinterlegt=Konsensus-Sequenzen=hochkonservierte Basenabfolgen; 3'=Spleiß-Akzeptor-Stelle; 5'=Spleiß-Donor-Sequenz) (modifiziert aus Lewin, 1997)



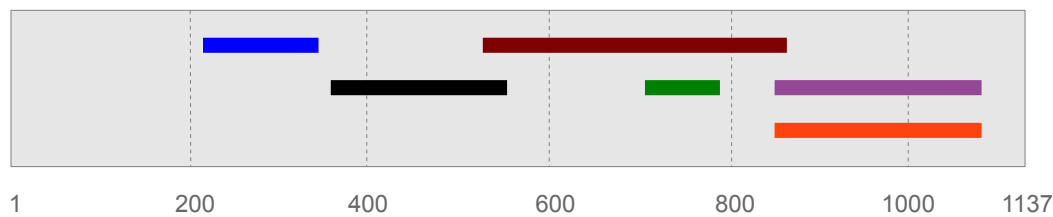
Die Regulation der Transkription erfolgt durch einen bidirektionalen Promotor, den sich das *MSH3*-Gen mit dem in Kopf-an-Kopf-Konfiguration befindlichen *DHFR*-Gen teilt. Dieser Promotor ist reich an cytosin- und guaninhaltigen Basenabfolgen, außerdem enthält er vier GC-Boxen, die klassische TATA-Box fehlt (Shimada et al., 1989). Die Initiierung der Transkription scheint durch die Interaktion der mittleren GC-Boxen mit zwei Initiator-Elementen zu erfolgen (Shinya und Shimada, 1994).

Für das *MSH3*-Gen existieren laut Watanabe et al., 1996 zwei verschiedene spezifische Transkripte bzw. Spleißvarianten, die eine Größe von 5,0 bzw. 3,8 Kilobasen haben. Als Ursache für diese Varianten konnte eine Heterogenität der Poly-A-Site (Polyadenylierungsstelle) nachgewiesen werden. Während das 5,0kb umfassende Transkript ein klassisches Poly-A-Signal aufweist (AATAAA), ist bei der 3,8kb großen Variante ein atypisches Poly-A-Signal (ATTAAA) zu finden. Beide Transkripte starten dabei an der selben Stelle in unmittelbarer Nähe des *DHFR*-Gens. Die Wissenschaftler fanden des Weiteren heraus, dass das *MSH3*-Transkript in allen von ihnen untersuchten Geweben nachweisbar war. Daraus schlossen sie auf die Bedeutung eines Housekeeping-Gens, das in allen Zellen in niedriger Konzentration vorhanden ist (Watanabe et al., 1996).

## 1.2.2 Das DNA-Mismatch-Repair-Protein MSH3

### 1.2.2.1 Aufbau

Das DNA-Mismatch-Repair-Protein MSH3, das synonym auch als Divergent Upstream Protein (DUP) und Mismatch-Repair-Protein-1 (MRP1) bezeichnet wird, umfasst 1137 Aminosäuren und setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen (s. Abb.5) (HGNC; UniProt).



**Abb.5: Domänen des MSH3-Proteins und entsprechende Aminosäure-Position** (N-terminale Domäne 217-343; Verbindungsdomäne 355-551; Kerndomäne 538-870; Clamp-Domäne 712-794; C-terminale Domäne 846-1094; P-Loop 846-1095) (modifiziert aus <http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/P20585>)

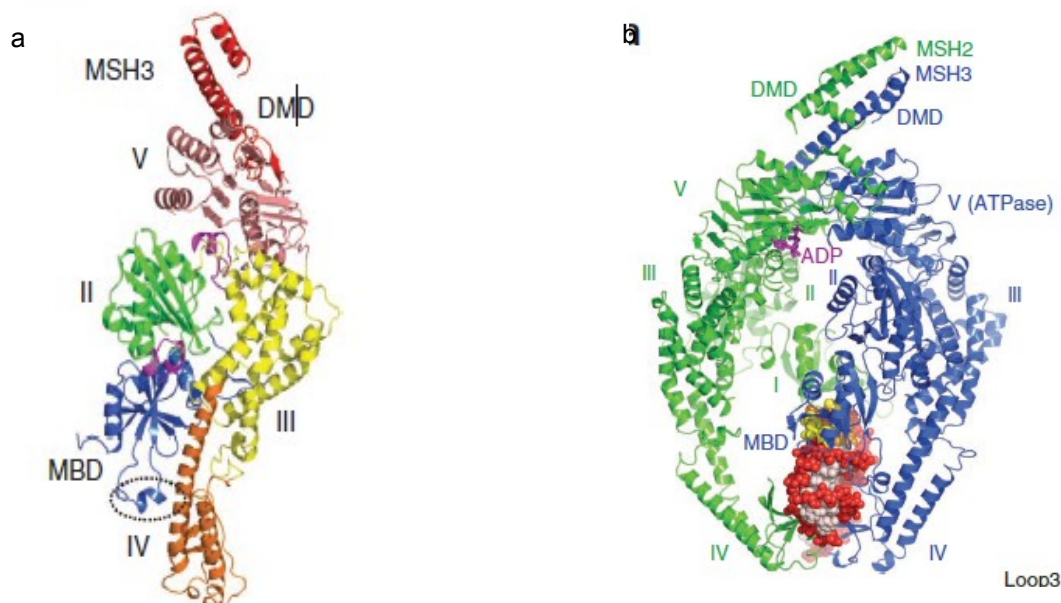
Die N-terminale Domäne (AS 217-343) hat die Aufgabe, im Rahmen der postreplikativen DNA-Reparatur Basenfehlpaarungen zu erkennen. Strukturell setzt sie sich aus einer sechssträngigen, gemischten  $\beta$ -Faltblattstruktur zusammen, welche von drei  $\alpha$ -Helices umgeben ist (InterPro). Nach Schmutte et al., 2001 kommt der N-terminalen Domäne, der die Wissenschaftler die AS-Positionen 75-297 zuordneten, zusätzlich die Funktion der Interaktion mit dem Enzym Exonuklease I zu.

Die sich daran anschließende Verbindungsdomäne (AS 355-551) besteht aus einem parallelen  $\beta$ -Faltblatt, das von vier  $\alpha$ -Helices umwunden wird (InterPro). Die Kerndomäne (AS 538-870) bildet den größten Anteil des Proteins und kann in zwei unabhängige Subdomänen unterteilt werden. Sie erstreckt sich in Form einer multihelikalen Struktur, wobei zweien dieser Helices eine Art Hebelfunktion zukommt, mit Hilfe derer die Bewegung zur DNA hin erfolgt.

Zwischen den zwei Subdomänen an der Spitze der Hebel-Helices ist die Clamp-Domäne (übersetzt: Haken-Domäne) (AS 712-794) lokalisiert. Diese besteht erneut aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur. Den Abschluss bildet die C-terminale Domäne (AS 846-1094), die sich in die ATPase- und die Helix-turn-Helix (HTH)-Domäne gliedern lässt. Erstere ist im P-Loop lokalisiert, mit der Kerndomäne verbunden und besteht aus einem klassischen Walker A Motiv. Die HTH-Domäne wiederum ist für die Kontaktbildung mit dem Dimer zuständig. Grundsätzlich besteht diese Domäne aus zwei  $\alpha$ -Helices, die durch drei bis vier Aminosäuren voneinander getrennt sind und die ein Abknicken des Proteins ermöglichen (InterPro; Janning und Knust, 2008).

Die Interaktion des MSH3-Proteins mit MSH2 im Heterodimer MutS $\beta$  geschieht an zwei Regionen. Am N-terminalen Ende von MSH3 sind die Aminosäurepositionen 126-250 betroffen, die mit der N-terminalen Domäne des MSH2-Proteins (AS 378-625) in Kontakt

treten. Die zweite Interaktionsregion ist am C-terminalen Ende von MSH3 lokalisiert und betrifft die Aminosäurepositionen 1050-1128. Dort erfolgt die Verbindung mit der C-terminalen Region von MSH2 (AS 875-934) (Guerrette et al., 1998).



**Abb.6: Dreidimensionale Struktur (a) des MSH3-Proteins und (b) des MutSβ-DNA-Komplexes**

(a): blau=N-terminale Domäne mit MBD=Mismatch binding domain; II(grün)=Verbindungsdomäne; III(gelb)=Kerndomäne; IV(orange)=Clamp-Domäne; V(pink)=C-terminale Domäne mit DMD=Dimerization domain=HTH-Domäne (rot)

(b): grün=MSH2; blau=MSH3; rot=DNA; pink=Basen; gelb/orange=ungepaarte Nukleotide

(aus: Gupta et al., 2012)

#### 1.2.2.2 Funktion

Das MSH3-Protein gehört zur Familie der DNA-Mismatch-Repair-Proteine, die im Rahmen der postreplikativen DNA-Reparatur Basenfehlpaarungen und Insertions-Deletionsschleifen erkennen und reparieren sollen.

Zusammen mit MSH2 bildet das MSH3-Protein das Heterodimer MutSβ, dem bei der DNA-Reparatur die Funktion zukommt, Insertions-Deletionsschleifen, bestehend aus zwei bis acht Nukleotiden, zu erkennen (s.o.) (Acharya et al., 1996; Genschel et al., 1998; Jiricny und Nyström-Lahti, 2000).

### 1.2.2.3 Die Rolle des MSH3-Proteins in der Tumorgenese

Das MSH3-Protein hat im Rahmen der DNA-Reparatur zusammen mit MSH2, wie oben beschrieben, die Aufgabe, Insertions-Deletionsschleifen zu erkennen (Acharya et al., 1996; Genschel et al., 1998; Jiricny und Nyström-Lahti, 2000). Im Gegensatz zu den anderen MMR-Genen ist *MSH3* allerdings bislang noch nicht mit der Entstehung des Lynch-Syndroms assoziiert, da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine pathogene *MSH3*-Keimbahnmutation als Ursache für das Lynch-Syndrom nachgewiesen werden konnte (Jiricny und Nyström-Lahti, 2000). Dennoch scheint dem MSH3-Protein als Teil des DNA-Mismatch-Repair-Systems eine Rolle in der Tumorgenese zuzukommen, die bisher aber weitestgehend unklar ist.

Im Gegensatz zu früheren Studien konnten Tomé et al., 2013 am Mausmodell zeigen, dass die Expression des MSH3-Proteins in einigen Geweben deutlich über der des MSH6-Proteins liegt, welches teilweise nur in sehr niedriger Konzentration gefunden werden konnte oder gar nicht nachweisbar war. Somit scheint dem Heterodimer MutS $\beta$  eine spezifische Rolle in der DNA-Reparatur und in der Sicherung der genomischen Stabilität zuzukommen (Tomé et al., 2013).

Kommt es bei gleichzeitiger Defizienz des Tumorsuppressorgens *p53* zu einem Verlust des MSH3-Proteins, so resultierte im Mausmodell nach van Oers et al., 2014 eine Akkumulation unreparierter DNA-Doppelstrangbrüche sowie ein Wechsel im Tumorspektrum. Somit scheint das MSH3-Protein eine wichtige Rolle in der Tumorsuppression zu spielen, wo es für die Aufrechterhaltung der chromosomalen Stabilität verantwortlich ist. Fehlt dieses Proteins dagegen, kommt es dennoch möglicherweise nicht zu einer Beeinflussung der Tumorinitiierung, sondern vielmehr scheint diese Defizienz eine schnellere Tumorprogression zu bewirken (van Oers et al., 2014).

Inokuchi et al., 1995 fanden heraus, dass es bei hämatologischen Tumoren häufig zu einer verringerten oder fehlenden Expression des MSH3-Proteins im Tumorgewebe kommt. Die Wissenschaftler vermuteten, dass die Inaktivierung von MSH3 somit die Tumorgenese hämatologischer Tumoren fördert und dass durch eine reduzierte Expression dieses Proteins die Rekombinationsrate gesteigert und daraus resultierend die chromosomale Translokation, wie sie für viele hämatologische Tumoren typisch ist, erhöht wird.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sich im Rahmen von somatischen Mutationen

im Tumorgewebe von Lynch-Syndrom-Patienten ein Mononukleotidrun in Exon 7 des *MSH3*-Gens häufig als instabil erweist (Akiyama et al., 1997; Malkhosyan et al., 1996; Plaschke et al., 2004b; Yin et al., 1997).

Duval et al., 2001 nehmen ein Stufenmodell für die Tumorprogression kolorektaler Karzinome mit hoher Mikrosatelliteninstabilität an. Dabei identifizierten sie *MSH3* als eines von verschiedenen Zielgenen, in denen, im Gegensatz zu Veränderungen in sogenannten *Bystander*-Genen, somatische Frameshift-Mutationen (Leseraster-Mutationen) eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese spielen. Die Wissenschaftler gingen davon aus, dass eine somatische Mutation im kodierenden Mononukleotidrun von *MSH3* dabei zu einer Verstärkung der globalen Instabilität in kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen führt, wodurch wiederum weitere Veränderungen resultieren, die zu einem schnelleren Durchlaufen der Adenom-Karzinom-Sequenz führen.

Auch wurden bereits verschiedene per se gutartige Polymorphismen im *MSH3*-Gen mit dem Auftreten von kolorektalen Karzinomen assoziiert (Berndt et al., 2007; Orimo et al., 2000). Hirata et al., 2008 konnten zeigen, dass durch manche dieser Polymorphismen auch ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an einem Prostatakarzinom resultiert.

Diese Forschungsergebnisse verdeutlichen, dass Veränderungen im *MSH3*-Gen möglicherweise durchaus als relevant für die Tumorgenese erachtet werden können, inwiefern diese aber eine Rolle bei der Prädisposition für das Lynch-Syndrom spielen, ist noch nicht hinreichend bekannt.

#### 1.2.2.4 *MSH3* und EMAST

*MSH3* scheint auch bei einer besonderen Form der Mikrosatelliteninstabilität eine wichtige Rolle zu spielen. EMAST (Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides) betrifft, anders als die herkömmliche MSI, nicht Mono- bzw. Dinukleotide, sondern repetitive Tetranukleotide, wobei v.a. den Motiven (AAAG)<sub>n</sub> und (ATAG)<sub>n</sub> eine entscheidende Bedeutung zuzukommen scheint. EMAST konnte bislang in einer Reihe von Tumoren nachgewiesen werden, wie beispielsweise in Karzinomen der Lunge, des Ovars, der Prostata, des Uterus, der Blase oder, am häufigsten, des Kolorektums (Watson et al., 2014). Bei kolorektalen Karzinomen scheint EMAST v.a. in fortgeschrittenen Stadien und bei gering differenzierten Tumoren aufzutreten. Wissenschaftler konnten außerdem zeigen, dass EMAST mit bis zu 60% bei kolorektalen Karzinomen insgesamt viel häufiger zu

finden ist als die klassische MSI mit nur 15-20%. Auch scheint das Auftreten von EMAST mit MSI-L-Status, einer schlechteren Prognose und einem höheren Risiko für Fernmetastasen assoziiert zu sein (Garcia et al., 2012; Lee et al., 2010; Yamada et al., 2010). Die Entstehung von EMAST hängt dabei wohl entscheidend vom MMR-Hintergrund ab. So ist der alleinige Ausfall von *MSH3* in der Lage, EMAST zu triggern, während der Ausfall von *MSH6* nicht zu EMAST zu führen scheint. Als möglicher ursächlicher Faktor für den *MSH3*-Ausfall kommt oxidativer Stress in Frage, der v.a. im Rahmen einer chronischen Inflamationsreaktion in fortgeschrittenen Tumorstadien entsteht (Tseng-Rogenski et al., 2012). Während ein Ausfall des *MSH3*-Gens wohl eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung von EMAST hat, konnte aber auch gezeigt werden, dass der *MSH3*-Ausfall allein nicht als Ursache für die Tumorgenese von kolorektalen Karzinomen angesehen werden kann (Campregher et al., 2012). Nichtsdestotrotz könnte ein *MSH3*-Ausfall und damit ein konsekutives Auftreten von EMAST den häufigsten MMR-Defekt überhaupt in kolorektalen Karzinomen darstellen. Dabei ist bislang aber noch nicht hinreichend geklärt, inwiefern es sich bei EMAST um ein zufälliges Auftreten oder einen aktiven Partner in der Tumorgenese handelt (Watson et al., 2014). Nachdem repetitive Tetranukleotide allerdings in kodierenden Abschnitten des menschlichen Genoms eine Seltenheit darstellen, erscheint es zumindest unwahrscheinlich, dass EMAST im Gegensatz zur klassischen MSI durch geninaktivierende Mutationen einen Einfluss auf die Tumorprogression nimmt (Kloor et al., 2006).

### 1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und inwiefern Keimbahnmutationen im *MSH3*-Gen eine Rolle bei der Prädisposition für das Lynch-Syndrom spielen. Analysiert wurde dies an einem elfköpfigen Patientenkollektiv. Zehn dieser elf Patienten hatten eine pathogene *MSH6*-Keimbahnmutation gemeinsam, die die Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom erklärt. Im Rahmen der Voruntersuchungen zeigten diese zehn Patienten jedoch alle neben einem zu erwartenden immunhistochemischen Ausfall des MSH6-Proteins einen fehlenden immunhistochemischen MSH2-Nachweis im Tumor. Die wiederum im Folgenden durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen schlossen dabei eine

*MSH2*-Keimbahnmutation als Ursache für diesen fehlenden Nachweis aus.

Wie bereits oben näher beschrieben wurde, sind die Gene *MSH2*, *MSH6* und *MSH3* Teil des DNA-Mismatch-Repair-Systems. Dabei interagieren die Proteine MSH2 und MSH6 im heterodimeren Komplex MutS $\alpha$ , während das MSH3-Protein wiederum mit MSH2 den, zum Teil zu MutS $\alpha$  redundanten, Reparaturkomplex MutS $\beta$  bildet. Beide Komplexe haben die Aufgabe, Fehler, die im Rahmen der DNA-Replikation entstanden sind, zu erkennen (Genschel et al., 1998; Jiricny und Nyström-Lahti, 2000).

Grundsätzlich sind somit verschiedene Hypothesen denkbar, die den immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins im Tumor der Patienten erklären könnten:

1. Pathogene Keimbahnmutation im *MSH6*- und im *MSH3*-Gen:

Bei bekannter pathogener *MSH6*-Keimbahnmutation würde eine zusätzliche Keimbahnmutation in *MSH3* in Kombination mit einer zweiten pathogenen Second Hit-Mutation im Tumor dazu führen, dass das MSH2-Protein durch den Funktionsverlust des MSH6- und des MSH3-Proteins keinen Bindungspartner mehr zur Verfügung hat und demzufolge degradiert, was den fehlenden immunhistochemischen Nachweis erklären würde.

2. Zwei pathogene somatische Mutationen im *MSH2*-Gen:

Auch in diesem Fall wäre das MSH2-Protein im Tumorgewebe funktionslos und ein entsprechender immunhistochemischer Nachweis wäre nicht möglich.

3. Dominant-negativer Effekt einer unklaren Sequenzveränderung im *MSH6*- bzw. *MSH3*-Gen: Durch eine sogenannte Gain-of-Function-Mutation wäre unter Umständen eine stärkere Komplexierung des MSH2-Proteins mit dem jeweiligen Bindungspartner möglich, was wiederum in einem Funktionsverlust des MSH2-Proteins resultieren könnte. Auch in dieser Konstellation wäre das MSH2-Protein mitunter immunhistochemisch nicht mehr nachzuweisen.

4. Zwei pathogene somatische Mutationen im *MSH3*-Gen:

Auch diese Variante führt durch den Funktionsverlust des MSH3- und des MSH6-Proteins zu einem fehlenden Bindungspartner für das MSH2-Protein mit der möglichen

Konsequenz der Degradierung.

#### 5. Falsches Ergebnis der immunhistochemischen Analyse:

Da das Resultat der immunhistochemischen Analyse stark untersucherabhängig ist (Steinke et al., 2013), wäre es theoretisch möglich, dass trotz eigentlich vorhandenem MSH2-Protein ein entsprechender Nachweis nicht gelang, mit der Folge eines falsch-negativen Ergebnisses.

Bislang ist noch keine pathogene Keimbahnmutation im *MSH3*-Gen beschrieben, die als Ursache für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms oder eines HNPCC-assoziierten Tumors gilt (Jiricny und Nyström-Lahti, 2000). Dennoch wurden genetische Veränderungen im *MSH3*-Gen von verschiedenen Forschungsgruppen mit dem Auftreten von unterschiedlichen Karzinomen und mit einer Beeinflussung der Tumorgenese assoziiert. Aus diesem Grund erschien uns als Ursache für den immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins die erste formulierte Hypothese als am wahrscheinlichsten. So wurde zur Klärung dieser Frage in einer Art Stufendiagnostik vorgegangen.

Zunächst wurden die 24 Exons des *MSH3*-Gens in der aus Blut extrahierten DNA der elf Patienten mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, anschließend sequenziert und auf Keimbahnmutationen hin analysiert. Konnten entsprechende Sequenzveränderungen nachgewiesen werden, erfolgte im nächsten Schritt unter Zuhilfenahme von *In Silico*-Programmen die Einschätzung ihrer klinischen Relevanz. Im weiteren Verlauf wurde die Tumor-DNA der Indexpatienten auf Second Hit-Mutationen im *MSH6*- und *MSH3*-Gen untersucht. Partiell erfolgte zusätzlich die Analyse des *MSH2*-Gens im Tumorgewebe, um mögliche pathogene somatische Mutationen zu detektieren und somit die zweite aufgestellte Hypothese entweder bestätigen oder widerlegen zu können.

Abschließend wurden die Ergebnisse zusammengetragen und die einzelnen Hypothesen sowie mögliche veränderte Genotyp-Phänotyp-Korrelationen diskutiert.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

#### **2.1.1 Voruntersuchungen**

Dieser Forschungsarbeit zu erblichem Darmkrebs gingen eine Reihe von molekulargenetischen Voruntersuchungen im Rahmen der Routine-Diagnostik voraus. Zunächst wurde mit Hilfe der Bethesda- bzw. der Amsterdam-Kriterien der klinische Verdacht auf erblichen Darmkrebs bzw. HNPCC geäußert. Anschließend führte man eine Mikrosatellitenanalyse zur Detektion einer Mikrosatelliteninstabilität und immunhistochemische Analysen des Tumorgewebes durch. Konnten Auffälligkeiten nachgewiesen werden, wurde das entsprechende Gen molekulargenetisch auf Mutationen untersucht. Die Patienten, die für dieses Projekt ausgewählt wurden, wiesen in den im Folgenden aufgeführten Voruntersuchungen eine bislang unklare Diskrepanz zwischen den Befunden der Immunhistochemie und denen der Molekulargenetik auf.

#### **1. Mikrosatellitenanalyse**

Zum Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) im Tumor als Hinweis auf einen MMR-Defekt wurden fünf Mikrosatelliten als Marker auf Veränderungen untersucht: *BAT25*, *BAT26*, *DSS346*, *D2S123* und *DI7S2SO* (Boland et al., 1998). Die Analyse wurde nach Standardprotokollen durchgeführt.

#### **2. Immunhistochemische Analysen**

Parallel dazu wurden von den jeweiligen pathologischen Instituten aus Paraffinblöcken des Tumorgewebes immunhistochemische Analysen zum Nachweis der Genprodukte von *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* durchgeführt.

#### **3. Molekulargenetische Untersuchungen**

Konnten in den vorausgegangenen Untersuchungen Auffälligkeiten in Form einer MSI oder eines immunhistochemischen Ausfalls eines Genprodukts nachgewiesen werden, wurde das entsprechende Gen und in einem zweiten Schritt ggf. der jeweilige

Interaktionspartner im Folgenden molekulargenetisch analysiert. Zum Nachweis von Sequenzveränderungen wurden alle Exons des Gens mittels PCR und DNA-Sequenzierung untersucht. Um mögliche Deletionen eines oder mehrerer Exons zu detektieren, wurde des Weiteren eine MLPA-Analyse (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) nach Protokollen des Herstellers (MRC-Holland) durchgeführt.

### 2.1.2 Auswahl der Patienten

Für dieses Forschungsprojekt wurden insgesamt zehn Patienten, vier Frauen und sechs Männer mit einem durchschnittlichen Tumor-Erstdiagnosealter von 49,2 Jahren (33-68 Jahre), ausgewählt und untersucht, die nach der Routinediagnostik folgende Befundkonstellation aufwiesen:

1. Nachweis einer hohen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) im Tumor
2. Immunhistochemischer Ausfall des *MSH2*-Genprodukts bzw. stark reduzierte Expression im Tumor
3. Immunhistochemischer Ausfall des *MSH6*-Genprodukts im Tumor
4. Nachweis einer pathogenen Keimbahnmutation in *MSH6* (heterozygot)
5. Fehlender Nachweis einer pathogenen Keimbahnmutation in *MSH2* (einschließlich Promotor-Bereich)
6. Fehlender Nachweis einer Keimbahndeletion in *MSH2* und *EPCAM*

Bei diesen Patienten wurden außerdem die Gene *MLH1* und *PMS2* sowohl immunhistochemisch als auch molekulargenetisch untersucht, wobei keine Auffälligkeiten oder relevanten pathogenen Veränderungen detektiert werden konnten. Neben den zehn Indexpatienten mit pathogener heterozygoter *MSH6*-Keimbahnmutation wurde eine weitere Patientin aus Heidelberg (B964A) untersucht. Diese wies in der Routinediagnostik zwar keinen immunhistochemischen Ausfall eines MMR-Proteins auf, zeigte aber eine Mikrosatelliteninstabilität ausschließlich in den analysierten Dinukleotiden. In der anschließend durchgeführten molekulargenetischen Analyse der MMR-Gene *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* und *PMS2* konnte keine pathogene Mutation nachgewiesen werden, sodass diese Patientin ebenfalls im *MSH3*-Gen untersucht wurde.

Die exakten Vorbefunde können nachfolgender Tabelle entnommen werden.

Pat	Klinik	FA	MSI	IHC MSH2	IHC MSH6	Gen MSH2	Del MSH2	Gen <i>MSH6</i>	Del <i>MSH6</i>	Del <i>EPCAM</i>
42904	39J Sigma-CA	neg	MSI- H (4+)	<5% = Ausf.	neg	c.274C >G, (p.Leu 92Val)	oB	c.2426_2428delTAG (p.Val809Glufs*)	oB	oB
46756	67J Coecum-CA	kA	MSI- H (3+)	70% pos	neg	oB	oB	c.3798_3827del30 (p.His1266GlnMet 1267_Glu1276)	oB	oB
	67J Endom-CA		MSS	neg	neg					
	67J Urothel-CA		MSI- H(2+1 LOH)	neg	neg					
48064	47J Rektum-CA	pos	MSI- H	neg	neg	oB	oB	c.3969_3979delTGA GAAGATGA (p.Phe1323Leufs*13)	oB	oB
51560	58J Coecum-CA	pos	MSI- H (3+)	>80% pos	neg	oB	oB	c.3202C>T (p.Arg1068*)	oB	oB
	58J Colon-CA (re. Flexur)		MSI- H (3+)	>90% pos	neg					
	60J Endom-CA		MSI- H (2+)	neg	neg					
55576	39J Colon asc.- CA	neg	MSI- H (4+)	60% = part. Ausf.	neg	oB	oB	c.1243C>T (p.Gln415*)	oB	oB
58953	40J Colon asc.- CA	neg	MSI- H n.V.	1-10% = Ausf.	neg	oB	oB	c.1805C>A (p.Ser602*)	oB	oB
	40J Appendix- CA		kA	kA	kA					
60406	68J Coecum-CA (Ovarialzyst en bds.)	neg	MSI- H (5+)	neg	neg	oB	oB	c.892C>T (p.Arg298*)	oB	oB
61287	54J Jejunum-CA (tub. Adenome)	neg	MSI- H	1-10% = Ausf.	neg	oB	oB	c.3416delG (p.Gly1139Alafs*6)	oB	oB
61628	47J Colon-CA	kA	MSI- H	neg	neg	oB	oB	c.3037_3041delAAG AA (p.Lys1013Valfs*3)	oB	oB
78712	33J Colon desc.- CA	pos	MSI- H (2+)	neg	neg	oB	oB	c.730C>T (p.Gln244*)	oB	oB
B964 A	kA	kA	MSI- H	pos	pos	oB	oB	oB	oB	oB

**Tab.2: Befundkonstellation des untersuchten Patientenkollektivs**

(angegebenes Alter=Tumordiagnosealter; asc.=ascendens; Ausf.=Ausfall; bds.=beidseits; CA=Karzinom; Del=Deletion; desc.=descendens; Endom=Endometrium; FA=Familienanamnese; fs=frameshift;

IHC=Immunhistochemie; J=Jahre; kA=keine Angabe; LOH=*Loss of Heterozygosity*; MSI=Mikrosatelliteninstabilität; MSI-H=hohe Mikrosatelliteninstabilität; MSS=Mikrosatellitenstabilität; neg=negativ; n.V.=nach Verdünnung; oB=ohne pathologischen Befund; part.=partiell; Pat=Patient; pos=positiv; re.=rechts; tub.=tubulär; (...)=nebenbefundliche Diagnosen)

Die in den elf Patienten gefundenen *MSH3*-Keimbahnveränderungen wurden mit den Analyseergebnissen verschiedener Kontrollkollektive verglichen.

Das erste Kontrollkollektiv wurde für alle *MSH3*-Keimbahnveränderungen untersucht und bestand aus fünf Personen (30890, 35554, 54501, 62259 und 74079) mit immunhistochemischem Ausfall der Genprodukte von *MSH2* und *MSH6* in der Routinediagnostik bei molekulargenetisch nachgewiesener pathogener *MSH2*-Keimbahnmutation. Diese Probanden dienten somit primär als Vergleichsgruppe hinsichtlich der Relevanz und Häufigkeit gefundener Sequenzveränderungen im *MSH3*-Gen. Das zweite Kontrollkollektiv wurde für alle nachgewiesenen Keimbahnveränderungen in Exon 1 von *MSH3* herangezogen und setzte sich aus 58 gesunden Personen zusammen. Exon 1 lies sich, wie unten beschrieben, nur in zweiter Runde amplifizieren und auswerten, was mit einem höheren Risiko für DNA-Polymerase-Fehler einhergeht. Gefundene Sequenzveränderungen in diesem Exon konnten somit mit einer noch größeren Kontrollgruppe verglichen und damit besser eingeschätzt werden.

Das dritte Kontrollkollektiv bestehend aus 60 gesunden Personen wurde zusätzlich auf alle Keimbahnsequenzveränderungen von *MSH3* mit unklarer Pathogenität untersucht. Durch die Häufigkeit des Auftretens in gesunden Personen konnten wiederum bessere Prognosen hinsichtlich der klinischen Relevanz vorgenommen werden.

Im Diskussionsteil wurden zusätzlich insgesamt 40 Personen, die im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit untersucht worden waren, als ein weiteres Kontrollkollektiv für gefundene *MSH3*-Sequenzveränderungen in den Exons 2-24 herangezogen. Diese Personen waren ohne nachweisbare Mutation in einem der MMR-Gene auf Sequenzveränderungen in *MSH3* untersucht worden und somit für diese Arbeit insbesondere für die Häufigkeitseinschätzung von SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) hilfreich.

Des Weiteren wurden acht Familienmitglieder der Patientin 48064 und ein Familienmitglied des Patienten 61287 im Rahmen einer Segregationsanalyse untersucht. Von allen in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten lag eine entsprechende Einverständniserklärung vor.

## 2.2 Chemikalien und andere Materialien

Die verwendeten Chemikalien, Materialien und Kits sowie deren Hersteller sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

<b>Reagens</b>	<b>Hersteller</b>
AmpliTaQ Gold™-DNA Polymerase (1000 Units, 5U/μl)	Roche
10x PCR Buffer 1,5ml (mit 15mM MgCl <sub>2</sub> )	Roche
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	QIAGEN
Q-Solution (5x)	QIAGEN
PCR Buffer 10x (mit 15mM MgCl <sub>2</sub> )	QIAGEN
Oligonukleotidprimer (s. Anhang)	Eurofins MWG
dNTPs (2mM)	Bioline
LE Agarose	Biozym
Ethidiumbromid 1% (10mg/ml)	Roth
5x Green GoTaq® Reaction Buffer 1ml	Promega
6x Mass Ruler DNA Loading Dye 1ml	Thermo Scientific
FastRuler™ Low Range DNA Ladder	Fermentas
TBE-Puffer (10x 0,089mol/l): - Tris: 108,0g - Borsäure: 55,0g - EDTA-2Na-2H <sub>2</sub> O (Titriplex® III): 7,4g - gereinigtes H <sub>2</sub> O zu 1,0l	Apotheke-Innenstadt Uni München
Wasser (double processed tissue culture water)	SIGMA

**Tab.3: Verwendete Reagenzien und deren Hersteller**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
ExoSAP-IT®	usb
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
FlexiGene DNA Kit	QIAGEN
MLPA® (Sonden P003/P008)	MRC-Holland
MagneSil® Genomic Fixed Tissue System	Promega

**Tab.4: Verwendete Kits und deren Hersteller**

## 2.3 DNA-Isolation

Die Isolation der DNA aus EDTA-Blut erfolgte mit Hilfe des *FlexiGene DNA Kits* (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Extraktion der DNA aus Tumorgewebe wurde entweder im Medizinisch Genetischen Zentrum München mit dem Kit *MagneSil® Genomic Fixed Tissue System* von Promega nach Angaben des Herstellers oder von entsprechenden pathologischen Instituten nach deren Protokoll aus Paraffinschnitten durchgeführt.

## 2.4 Messung der DNA-Konzentration

Die Messung der jeweiligen DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch mit dem Gerät *NanoDrop 1000* der Firmen Thermo Scientific und Peqlab.

## 2.5 Verdünnungen

Aus Blut extrahierte DNA, Primer und dNTPs wurden mit didestilliertem Wasser verdünnt, die Konzentration der Verdünnungen kann nachfolgender Tabelle entnommen werden. Die extrahierte Tumor-DNA wurde unverdünnt verwendet.

Reagens	Konzentration der Verdünnung
DNA	50ng/µl
Primer	20pM
dNTPs	2mM

**Tab.5: Verdünnungen von DNA, Primern und dNTPs**

## 2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase chain reaction)

Im Anschluss sind die jeweiligen PCR-Einstellungen für die unterschiedlichen Exons von *MSH3* sowie für die Tumor-DNA aufgeführt.

### 2.6.1 Durchführung der PCR für die Exons 2-24 des *MSH3*-Gens

Die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte wurde nach Saiki et al., 1988 durchgeführt.

Als Reaktionsgefäße dienten *Thermowell<sup>TM</sup> 96 Well-Platten* der Firma Omnilab. Für einen PCR-Ansatz wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Reagenzien verwendet. Die jeweiligen Forward (F)- bzw. Reverse (R)-Primer waren dabei intronisch lokalisiert, sodass das gesamte Exon sowie spleißrelevante im Intron liegende Sequenzabschnitte amplifiziert und sequenziert werden konnten.

Reagens	Menge in [µl] (1x) (insgesamt 25 µl)
H <sub>2</sub> O (didest.)	18,375
dNTPs (2mM)	2,0
PCR-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> )	2,5
Primer (20pM) (je F bzw. R)	0,5
AmpliTa <sup>TM</sup> Gold-DNA-Polymerase (5U/µl)	0,125
DNA	1

**Tab.6: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die AmpliTa<sup>TM</sup> Gold-DNA-Polymerase**

Das in Tabelle 6 aufgeführte Protokoll wurde außer für Exon 1 von *MSH3* grundsätzlich für die Amplifikation aller Exons von *MSH3* eingehalten, mit Ausnahme der Exons 16 und 24, bei deren PCR-Ansatz die doppelte Primermenge (je 1µl) und dafür nur 17,375µl Wasser verwendet wurden.

Neben den jeweiligen Ansätzen für die Untersuchung der Patienten-DNA wurde bei jeder PCR zusätzlich eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Mithilfe ersterer konnte eine Verunreinigung der verwendeten Reagenzien ausgeschlossen werden. Anhand der Positivkontrolle wurde sichergestellt, dass die PCR-Reaktion korrekt abgelaufen war.

Die Durchführung der PCR erfolgte entweder im *C1000Touch<sup>TM</sup> Thermal Cycler* der Firma

Bio-Rad oder im *PTC-200 Peltier Thermal Cycler* der Firma MJ Research. Dabei wurden zwei verschiedene Programme verwendet, ein spezifisches (HNPCC-) Programm oder ein sogenanntes Touch-Down-Programm (TD) (nach Don et al., 1991). Die Temperatureinstellungen und die dabei ablaufenden Prozesse sind in den nachfolgenden zwei Tabellen dargestellt.

Prozess	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. Primer-Hybridisierung	58°C	30 s
4. DNA-Synthese	72°C	40 s
		Wiederholung der Schritte 2.-4. in 39 Zyklen
5. finale DNA-Synthese	72°C	5 min
	12°C	∞

**Tab.7: Einstellungen des HNPCC-Programms**

Prozess	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	10 min
2. Denaturierung	94°C	30 s
3. Primer-Hybridisierung	64°C	30 s
	- 1°C pro Zyklus	
4. DNA-Synthese	72°C	30 s
		Wiederholung der Schritte 2.-4. in 9 bzw. 13 Zyklen
5. Denaturierung	94°C	30 s
6. Primer-Hybridisierung	50°C bzw. 54°C	30 s
7. DNA-Synthese	72°C	30 s
		Wiederholung der Schritte 5.-7. in 29, 35 oder 39 Zyklen
8. finale DNA-Synthese	72°C	7 min
	12°C	∞

**Tab.8: Einstellungen des TD-Programms**

Die Dauer der DNA-Synthese (Schritt 4 beim HNPCC- bzw. Schritte 4 und 7 beim TD-Programm) war grundsätzlich von der jeweiligen Länge des zu amplifizierenden Fragments bzw. Exons abhängig. Für die verwendete AmpliTaq Gold™-DNA-Polymerase galt dabei eine Reaktionsgeschwindigkeit von 1000 Basenpaaren pro Minute. Aufgrund der



ähnlichen Längenverhältnisse der untersuchten Exons des *MSH3*-Gens musste die Synthesedauer nicht variiert werden.

Die genauen PCR-Einstellungen der untersuchten Exons von *MSH3* sind im Anhang aufgelistet. Diese differierten in Abhängigkeit der unterschiedlich hohen Hybridisierungstemperaturen der verwendeten Primer geringfügig.

### 2.6.2 Durchführung der PCR für Exon 1 des *MSH3*-Gens

Für die Amplifikation von Exon 1 des *MSH3*-Gens wurde als einziges ein anderes Vorgehen und andere Reagenzien gewählt. Zunächst erfolgte die Amplifikation des gesamten Exon 1 (insgesamt 666bp) mit einem je intronisch lokalisierten Forward- bzw. Reverse-Primer. Aufgrund der Fragmentlänge, der daraus resultierenden erschwerten Sequenzierungsbedingungen und der Tatsache, dass sich in der Gelelektrophorese neben der eigentlichen Bande z.T. weitere unspezifische Banden zeigten, wurde im Folgenden in zweiter Runde eine *nested PCR* durchgeführt. Dabei wurde je ein Mikroliter des in erster Runde entstandenen PCR-Produkts mittels neuer Primerkombinationen erneut amplifiziert. Nun wurde in einem Ansatz der in erster Runde verwendete F-Primer mit einem in Exon 1 lokalisierten R-Primer kombiniert (Fragmentlänge: 431bp). In einem zweiten parallelen Ansatz erfolgte die Kombination eines überlappenden exonisch gelegenen F-Primers mit dem R-Primer der ersten Runde (Fragmentlänge: 316bp). Das in zweiter Runde entstandene PCR-Produkt wurde anschließend für die Sequenzreaktion herangezogen. Das für die Amplifikation von Exon 1 verwendete PCR-Protokoll kann nachfolgender Tabelle entnommen werden. Dieses wurde sowohl für die erste als auch für die zweite PCR-Runde genutzt.

Reagens	Menge in [µl] (1x) (insgesamt 25 µl)
H <sub>2</sub> O (didest.)	12,375
dNTPs (2mM)	2,0
PCR-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> )	2,5
Q-Solution	5,0
Primer (20pM) (je F bzw. R)	1,0
Taq DNA Polymerase	0,125
DNA	1

**Tab.9: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die Taq DNA Polymerase**

Die Durchführung der PCR erfolgte mit dem bereits aufgeführten HNPCC-Programm. Die initiale Denaturierung bei 95°C erfolgte spezifisch für die Taq DNA Polymerase von QIAGEN nur für eine Dauer von fünf Minuten. Für die Primer-Hybridisierung wurde eine Temperatur von 56°C gewählt, die übrigen Einstellungen unterschieden sich nicht von denen der anderen Exons und können Tabelle 7 entnommen werden.

### 2.6.3 Durchführung der PCR für das *MSH3*-, *MSH6*- und *MSH2*-Gen aus Tumor-DNA

Die Tumor-DNA konnte aufgrund ihrer z.T. schlechten Qualität nicht immer erfolgreich in erster Runde in ausreichender Menge amplifiziert werden. In diesem Fall musste eine zweite PCR mit dem Amplifikationsprodukt der ersten Runde durchgeführt werden. Neben dem *MSH3*-Gen wurden auch bestimmte Prädilektionsstellen in *MSH6* und *MSH2* im Tumorgewebe der Patienten untersucht. Der PCR-Ansatz und die jeweiligen Programmeinstellungen wurden dabei wie für die Exons 2-24 von *MSH3* gewählt, die entsprechenden PCR-Programme für die zusätzlich analysierten Exons von *MSH6* und *MSH2* sind im Anhang aufgeführt.

## 2.7 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde ein 2%-iges Agarosegel, d.h. 2g Agarose (Biozym)/100ml TBE-Puffer verwendet, welches zusätzlich mit je 2µl Ethidiumbromid (1%) (Roth) pro 100ml Gellösung angereichert war. Die Auftragung der PCR-Produkte erfolgte als Gemisch mit den Auftragungspuffern 5x *Green GoTaq® Reaction Buffer* (Promega) oder 6x *Mass Ruler DNA Loading Dye* (Thermo Scientific), die zuvor jeweils im Verhältnis 1:1 mit didestilliertem Wasser verdünnt wurden. Um die Größe der amplifizierten Fragmente als Banden im Gel identifizieren zu können, wurde der Marker *FastRuler™ Low Range DNA Ladder* (Fermentas), bestehend aus fünf Banden bei je 50, 200, 400, 850 und 1500bp, als Größenstandard ebenfalls mit auf das Gel appliziert. Die genauen Mengenangaben der verwendeten Substanzen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Substanz	Menge in [µl]
PCR-Produkt	4
Auftragungspuffer (1:1-Verdünnung mit H <sub>2</sub> O)	4
FastRuler™ Low Range DNA Ladder	8

**Tab.10: In der Gelelektrophorese verwendete Substanzen**

Die Auftrennung der auf das Gel aufgetragenen Proben erfolgte in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentlänge für eine Dauer von 10 bis 15 Minuten bei 120 Volt im Gerät *Power Pac 300* der Firma Bio-Rad. Dabei wanderte die negativ geladene DNA im elektrischen Feld vom Minus- zum Plus-Pol. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht im *Intas Gel Jet Imager* der Firma Intas mithilfe des in die DNA interkalierenden und fluoreszierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht und ausgewertet.

## 2.8 Reinigung der PCR-Produkte

Konnte anhand der Banden im Gel die korrekte Durchführung der PCR bestätigt werden, wurden die PCR-Produkte im Folgenden zur Vorbereitung auf die Sequenzierung mit dem Kit *ExoSAP-IT®* (usb) gereinigt. Die genauen Mengenangaben sowie das verwendete Inkubationsprogramm können den Tabellen 11 und 12 entnommen werden.

Substanz	Menge in [µl] (insgesamt 7 µl)
H <sub>2</sub> O (didest.)	1
ExoSAP-IT®	1
PCR-Produkt	5

**Tab.11: Verwendete Substanzen zur Reinigung der PCR-Produkte**

Temperatur	Dauer
37°C	15 min
80°C	15 min
12°C	∞

**Tab.12: Inkubationsprogramm zur Reinigung der PCR-Produkte**

## 2.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger et al., 1977 beschriebenen Kettenabbruchmethode. Die für die Sequenzreaktion verwendeten Materialien sind in Tabelle 13 aufgeführt. Der BigDye® Terminator (Applied Biosystems) enthielt dabei die DNA-Polymerase sowie fluoreszierende und unmarkierte dNTPs. Dabei wurde je ein gesonderter Reaktionsansatz für den Forward- bzw. den Reverse-Primer hergestellt.

Substanz	Menge in [µl] (insgesamt 10 µl)
H <sub>2</sub> O (didest.)	1,7 – 7,7
Primer (20pM) (je F bzw. R)	0,3
PCR-Produkt (gereinigt)	1 – 7
BigDye® Terminator	1

**Tab.13: Verwendete Substanzen für die Sequenzreaktion**

Die unterschiedlichen Mengenangaben des jeweiligen PCR-Produkts und konsekutiv des Wassers resultierten aus der Stärke der entsprechenden Bande im Gel. Je stärker die Bande, desto weniger PCR-Produkt war für die Sequenzreaktion erforderlich. War die Bande dagegen sehr schwach, wurden 7µl Produkt verwendet, um bei der späteren Auswertung ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen.

Die Sequenzreaktion erfolgte unter den in Tabelle 14 aufgeführten Bedingungen.

Temperatur	Dauer
1. 95°C	30 s
2. 50°C	15 s
3. 60°C	4 min
	Wiederholung der Schritte 1.-3. in 27 Zyklen
4. 12°C	∞

**Tab.14: PCR-Programm für die Sequenzreaktion**

Danach wurden die Produkte der Sequenzreaktion zunächst durch Auftragen auf *Sephadex G-50*-Gelplatten (SIGMA) und anschließendes Zentrifugieren aufgereinigt.

Die darauffolgende Sequenzanalyse der Produkte wurde mit dem Gerät *3730 DNA-*

*Analyzer* der Firma Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers auf POP 7<sup>TM</sup> Polymer durchgeführt und das Ergebnis mithilfe des Softwarepakets *3100 Data Collection* (Software Version 3.0) und des Programmpakets *Sequence Analysis 3.7* als Elektropherogramm dargestellt.

Bei der Auswertung wurden die Sequenzen des Forward- und des Reverse-Primers gleichermaßen berücksichtigt, um Sequenzierungsungenauigkeiten zu Beginn der Reaktion mit der entsprechenden intakten Basenabfolge des jeweils anderen Primers abgleichen zu können. Für die Detektion von Mutationen wurden die Patienten-Sequenzen mit Wildtyp-Sequenzen unter Zuhilfenahme des Programms *BLAST 2 Sequences* verglichen.

## 2.10 Bestätigung

Unklare Sequenzveränderungen bzw. potentiell pathogene Mutationen wurden in einer zweiten unabhängigen PCR und anschließenden DNA-Sequenzierung wiederholt und bestätigt.

## 2.11 In Silico-Analysen und Webbasierte Datenbanken

Für die Analyse und Wertung von detektierten Sequenzveränderungen wurden die Datenbanken *SIFT* und *PolyPhen* verwendet. Außerdem wurde die Software *Alamut 2.6.1* für die nähere Einschätzung mit herangezogen. Insgesamt war es mit Hilfe der Datenbanken möglich, Aussagen über Häufigkeit, Pathogenität und evolutionäre Konservierung der gefundenen Sequenzveränderungen zu gewinnen und somit die Relevanz dieser Veränderungen besser abzuschätzen. Für die Definition der Wildtypbase wurde für nachgewiesene Sequenzveränderungen im *MSH3*-Gen die NM-Nummer NM\_002439.4, die die Basensequenz der mRNA angibt, sowie die OMIM-Nummer 600887 benutzt.

### **3. Ergebnisse**

Im Nachfolgenden sind die Ergebnisse gegliedert nach Keimbahnveränderungen und somatischen Sequenzveränderungen dargestellt.

#### **3.1 Analyse des *MSH3*-Gens auf Keimbahnmutationen**

Die Analyse des *MSH3*-Gens auf Keimbahnmutationen wurde sowohl bei den zehn Indexpatienten mit pathogener *MSH6*-Keimbahnmutation und immunhistochemischem Ausfall des MSH2- und MSH6-Proteins im Tumor, als auch bei der Patientin aus Heidelberg und den jeweiligen Kontrollkollektiven durchgeführt (s. Material und Methoden). Dabei konnten insgesamt 29 Sequenzveränderungen detektiert werden, 13 davon lagen in Exons vor, sieben waren intronische Veränderungen und neun waren im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1 lokalisiert. Bei ersteren wurden sechs Missense-Veränderungen, drei stille Veränderungen, eine Insertion und drei Deletionen gefunden. Bei den sieben intronischen Sequenzveränderungen handelte es sich in sechs Fällen um einen Basenaustausch und in einem Fall um eine Deletion. Im 5'-untranslatierten Bereich wurden siebenmal ein Basenaustausch und zweimal eine Deletion nachgewiesen. Fünf dieser Veränderungen konnten ausschließlich in Patienten nachgewiesen werden, 19 lagen in Patienten und Kontrollen vor und weitere fünf der insgesamt 29 Sequenzveränderungen konnten nur im Kontrollkollektiv detektiert werden. Nicht eindeutig pathogene Missense-Veränderungen wurden mit den *In Silico*-Programmen *SIFT* und *PolyPhen* sowie der Software *Alamut* ausgewertet. Mithilfe von letzterer wurden auch intronische und stille Sequenzveränderungen analysiert.

Mit *PolyPhen* konnten Vorhersagen über die Pathogenität von Missense-Veränderungen unter Zuhilfenahme phylogenetischer, struktureller und sequenzieller Charakteristika eines Aminosäureaustausches getroffen werden.

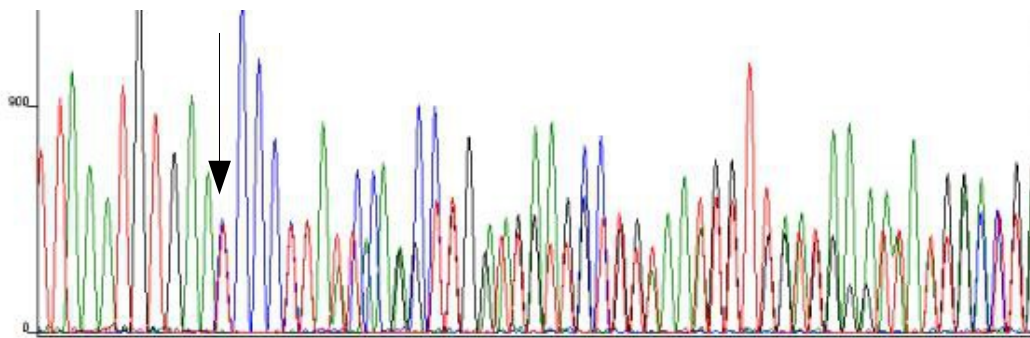
##### **3.1.1 Exonische Sequenzveränderungen**

Nachfolgend sind zunächst die exonischen Sequenzveränderungen im *MSH3*-Gen

dargestellt. Dabei werden nur (potentiell) pathogene Mutationen in Textform aufgeführt, alle weiteren nachgewiesenen benignen Veränderungen sind aufgrund ihrer untergeordneten Bedeutung ausschließlich in Tabelle 15 im Abschnitt 3.1.1.4 zu finden.

#### 3.1.1.1 c.1035delT (p.Leu347\*)

Die in Exon 7 lokalisierte Deletion **c.1035delT (p.Leu347\*)** (s. Abb.7) konnte nur bei der Patientin 48064 heterozygot detektiert werden. Der Verlust der Base Thymin zieht auf Aminosäureebene eine Leserasterverschiebung der übrigen Basenabfolge nach sich, wodurch anstelle der Aminosäure Leucin ein Stoppcodon entsteht und die weitere RNA nicht mehr translatiert werden kann, mit der Folge eines stark verkürzten und somit funktionseingeschränkten Proteins. Um den Verdacht der Pathogenität dieser Mutation zu stärken, wurde ein weiteres Kontrollkollektiv bestehend aus 60 gesunden Personen ebenfalls auf diese Sequenzveränderung hin analysiert. Dabei konnte die Mutation c.1035delT (p.Leu347\*) bei keinem der 60 untersuchten Probanden nachgewiesen werden. Der evolutionäre Vergleich zeigt, dass die Aminosäure Leucin in den verschiedenen Spezies hochkonserviert ist.



**Abb.7: Sequenz der Deletion c.1035delT (p.Leu347\*) in Exon 7 des *MSH3*-Gens der Patientin 48064**

Aufgrund der vermuteten Pathogenität dieser Sequenzveränderung erfolgte bei der Patientin 48064 die Untersuchung mehrerer Familienmitglieder im Sinne einer Segregationsanalyse.

Dabei wurden bereits im Vorhinein im Rahmen einer prädiktiven Diagnostik bei insgesamt acht weiteren Familienmitgliedern zunächst das Vorhandensein der, bei der Patientin 48064

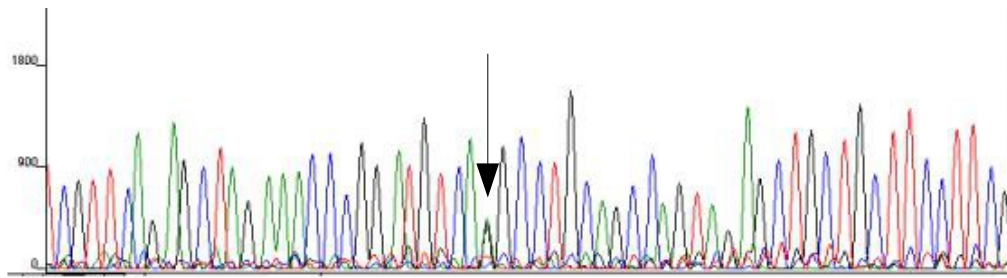
ebenfalls vorliegenden, pathogenen Keimbahnmutation im *MSH6*-Gen überprüft: beim Vater der Indexpatientin (49639), einer Halbschwester (52462), einer Cousine (57037), deren Tochter (66281), zwei Cousins (51659, 51889) sowie der Tochter (62471) und einer Nichte (51337). Dabei konnte lediglich bei der Cousine 57037 die pathogene Mutation c.3969\_3979delTGAGAAGATGA (p.Phe1323Leufs\*13) in Exon 9 des *MSH6*-Gens ebenfalls nachgewiesen werden.

Zur weiteren Einschätzung der Bedeutung der gefundenen Deletion c.1035delT (p.Leu347\*) im *MSH3*-Gen wurden diese acht Familienmitglieder in Exon 7 des *MSH3*-Gens untersucht. Dabei konnte die Nonsense-Mutation bei vier der acht untersuchten Angehörigen jeweils heterozygot nachgewiesen werden: bei der Cousine 57037, die als einzige genau wie die Indexpatientin zusätzlich Trägerin der pathogenen *MSH6*-Mutation ist, deren Tochter 66281, bei der Halbschwester 52462 sowie bei der Tochter 62471 der Indexpatientin.

#### 3.1.1.2 c.1258A>G (p.Ser420Gly)

Die Missense-Veränderung **c.1258A>G (p.Ser420Gly)** (s. Abb.8) wurde bei dem Patienten 42904 in Exon 8 heterozygot gefunden. Das *In Silico*-Programm *PolyPhen* wertet den Basenaustausch mit einem Score von 0,084 als benigne (Sensitivität: 0,91; Spezifität: 0,67). An dieser Stelle im Genom liegt des Weiteren keine evolutionäre Konservierung vor, wobei die Aminosäure Glycin anstelle von Serin dennoch in keiner Spezies zu finden ist. *SIFT* hingegen gibt mit einem Score von 0,03 an, dass der Aminosäureaustausch die Funktion des Proteins beeinträchtigt und sogar als *deleterious*, also schädlich, zu werten ist. In der *Alamut*-Software konnte keine Angabe zur Allelfrequenz für Glycin gefunden werden. Die Veränderung betrifft allerdings keine Spleißstelle. Der Vergleich von Serin und Glycin zeigt, dass es sich bei beiden um neutrale Aminosäuren handelt. Serin ist dabei polar und hydrophil, während Glycin unpolar und hydrophob ist. Aufgrund der widersprüchlichen Vorhersagen von *PolyPhen* und *SIFT* wurden 60 weitere gesunde Personen auf die gefundene Sequenzveränderung hin untersucht, wobei sie im Kontrollkollektiv kein weiteres Mal detektiert werden konnte. Somit wurde zumindest das eher seltene Vorkommen dieser Missense-Veränderung c.1258A>G (p.Ser420Gly) verdeutlicht.

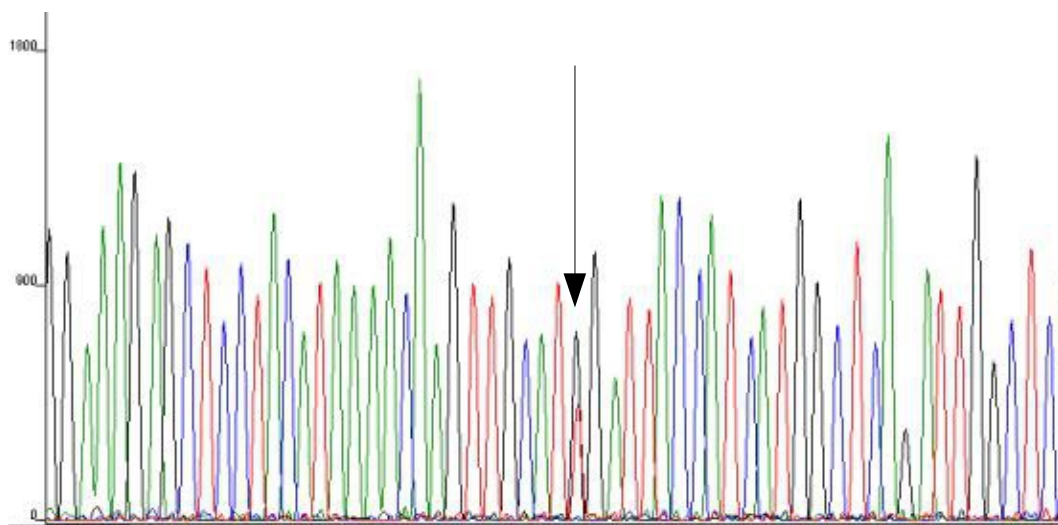




**Abb.8: Sequenz der Missense-Veränderung c.1258A>G (p.Ser420Gly) in Exon 8 des *MSH3*-Gens des Patienten 42904**

### 3.1.1.3 c.2732T>G (p.Leu911Trp)

Die Missense-Veränderung **c.2732T>G (p.Leu911Trp)** (s. Abb.9) war in Exon 20 lokalisiert und lag beim Patienten 61287 heterozygot vor. Diese Sequenzveränderung konnte weder in der primär untersuchten Kontrollgruppe, noch in einem weiteren Kontrollkollektiv aus 60 gesunden Personen gefunden werden. Laut *PolyPhen* ist diese Missense-Veränderung mit einem Score von 0,978 als *probably damaging*, also möglicherweise schadensverursachend, einzustufen (Sensitivität: 0,58; Spezifität: 0,94). Auch *SIFT* gibt an, dass der Aminosäureaustausch mit einem Score von 0,00 als *deleterious* zu werten ist und die Proteinfunktion beeinträchtigt, obwohl der Vergleich von Leucin und Tryptophan zeigt, dass es sich bei beiden um neutrale, unpolare, hydrophobe Aminosäuren handelt. An dieser Stelle im Genom zeigt sich eine hohe evolutionäre Konservierung. *Alamut* gibt für Guanin eine Allelfrequenz von 0,4% an, die Sequenzveränderung liegt in keiner Spleißstelle.



**Abb.9: Sequenz der Missense-Veränderung c.2732T>G (p.Leu911Trp) in Exon 20 des *MSH3*-Gens des Patienten 61287**

Bei dem Patienten 61287 ist zusätzlich die krankheitsverursachende Mutation c.3416delG (p.Gly1139Alafs\*6) im *MSH6*-Gen bekannt.

Bei der Cousine 80579 des Indexpatienten (Jahrgang 1949), die sich als einziges Familienmitglied prädiktiv testen ließ, konnte die bekannte krankheitsverursachende *MSH6*-Mutation nicht nachgewiesen werden. Diese Patientin wurde anschließend ebenfalls auf die gefundene *MSH3*-Veränderung c.2732T>G (p.Leu911Trp) untersucht, wobei das Ergebnis ebenfalls negativ war.

#### 3.1.1.4 Tabellarische Zusammenfassung der gefundenen exonischen Keimbahnveränderungen

In Tabelle 15 findet sich eine zusammenfassende Darstellung aller gefundenen exonischen Sequenzveränderungen in der Keimbahn des *MSH3*-Gens einschließlich Angaben zur evolutionären Konservierung und zu den Ergebnissen der *In Silico*-Programme *PolyPhen* und *SIFT*, der Software *Alamut* sowie deren Vorkommen in den Kontrollkollektiven.

SV (cDNA)	SV (Protein)	E	Art SV	Evol Kons	WT AS	Mut AS	PolyPhen / SIFT	Alamut	Anzahl Pat	Anzahl Ko
c.162_179 del18bp	p.Ala57_Ala62del	1	Deletion	kA	-	-	-	MAF 21,4 SS kA	3 het	1. 2/5 1het 2. 8/58 8het Σ 10/63
c.165A>G	p.Ala55Ala	1	Still	kA	n up ho	n up ho	kA	MAF kA SS oB	1 het	1. 0/5 2. 0/58 Σ 0/63
c.178G>C	p.Ala60Pro	1	Missense	kA	n up ho	n up hi	PP benigne S tolerabel	MAF 17,6 SS oB	1 het	1. 0/5 2. 25/58 17het 8hz Σ 25/63
c.186_187 ins18bp	p.Ala62_Pro63ins	1	Insertion	kA	-	-	-	MAF kA SS oB	2 het 2 hz	1. 1/5 1het 2. 0/58 Σ 1/63
c.196_204 del9bp	p.Pro67_Pro69del	1	Deletion	kA	-	-	-	MAF kA SS oB	3 het	1. 2/5 1het 1hz 2. 2/58 2hz Σ 4/63
c.204T>G	p.Ala68Ala	1	Still	ja	n up ho	n up ho	S tolerabel	MAF kA SS oB	2 het 1 hz	1. 2/5 1het 1hz 2. 0/58 Σ 2/63
c.235A>G	p.Ile79Val	1	Missense	nein	n up ho	n up ho	PP benigne S tolerabel	MAF 20-50 SS oB	5 het 5 hz	1. 3/5 1het 2hz 2. 43/58 9het 34hz Σ 46/63
c.693G>A	p.Pro231Pro	4	Still	ja	n up hi	n up hi	S tolerabel	MAF 19,4 SS oB	-	1. 1/5 1het
c.1035delT	p.Leu347*	7	Deletion/ Nonsense	ja	-	-	-	kA	1 het	1. 0/5 3. 0/60 Σ 0/65
c.1258A>G	p.Ser420Gly	8	Missense	nein	n p hi	n up ho	PP benigne S deleterious	MAF kA SS oB	1 het	1. 0/5 3. 0/60 Σ 0/65
c.2732T>G	p.Leu911Trp	20	Missense	ja	n up ho	n up ho	PP probably damaging S deleterious	MAF 0,4-0,5 SS oB	1 het	1. 0/5 3. 0/60 Σ 0/65
c.2846A>G	p.Gln949Arg	21	Missense	nein	n p hi	b p hi	PP benigne S tolerabel	MAF 16 SS oB	4 het 5 hz	1. 5/5 1het 4hz
c.3133G>A	p.Ala1045Thr	23	Missense	nein	n up ho	n p hi	PP benigne S tolerabel	MAF 29 SS oB	4 het 5 hz	1. 5/5 2het 3hz

**Tab.15: Nachgewiesene exonische Keimbahnveränderungen im *MSH3*-Gen** (rot=pathogen; lila=potentiell pathogen; AS=Aminosäure; b=basisch; E=Exon; Evol Kons=Evolutionäre Konservierung; het=heterozygot; hi=hydrophil; ho=hydrophob; hz=homozygot; kA=keine Angabe; Ko=Kontrollkollektiv; MAF=Minor Allele Frequency (in %); Mut=mutiert; oB=ohne pathologischen Befund; n=neutral; p=polar; Pat=Patientenkollektiv; PP=PolyPhen; S=SIFT; SS=SpliceSite; SV=Sequenzveränderung; up=unpolar;

WT=Wildtyp; 1.=erstes Kontrollkollektiv aus fünf Personen für alle gefundenen Sequenzveränderungen; 2.=zweites Kontrollkollektiv aus 58 Personen für alle gefundenen Sequenzveränderungen in Exon 1; 3.=drittes Kontrollkollektiv aus 60 Personen für (potentiell) pathogene Sequenzveränderungen (s.auch Material und Methoden-Teil);  $\Sigma$ = insgesamt Anzahl der gefundenen Sequenzveränderung aus allen Kontrollkollektiven)

### 3.1.2 Intronische Sequenzveränderungen

Im Folgenden werden die in der Keimbahn des *MSH3*-Gens nachgewiesenen intronischen Sequenzveränderungen aufgrund ihrer untergeordneten Bedeutung ausschließlich in tabellarischer Form zusammengefasst aufgeführt. Diese wurden jeweils mit der Software *Alamut* hinsichtlich der Allelfrequenz und potentieller Veränderungen von Spleißstellen analysiert.

SV (cDNA)	I	Art SV	Alamut	Anzahl Pat	Anzahl Ko
c.237+40G>T	1	Basenaustausch	MAF kA SS oB	-	1. 1/5 1hz 2. 0/58 $\Sigma$ 1/63
c.237+41G>A	1	Basenaustausch	MAF kA SS oB	1 het	1. 2/5 2het 2. 2/58 2het $\Sigma$ 4/63
c.237+48G>A	1	Basenaustausch	MAF kA SS oB	-	1. 1/5 1hz 2. 0/58 $\Sigma$ 1/63
c.359-7G>A	2	Basenaustausch	MAF 21,8 SS oB	5 het	1. 3/5 3het
c.1453+61A>C	9	Basenaustausch	MAF 33 SS oB	8 het	-
c.3001-30_33delTGAA	21	Deletion	kA	6 het 3 hz	1. 4/5 2het 2het
c.3001-22T>A	21	Basenaustausch	MAF 6,7 SS oB	2 het	1. 2/5 2het

**Tab.16: Nachgewiesene intronische Keimbahnveränderungen im *MSH3*-Gen** (het=heterozygot; hz=homozygot; I=Intron; kA=keine Angabe; Ko=Kontrollkollektiv; MAF=Minor Allele Frequency (in %); oB=ohne pathologischen Befund; Pat=Patientenkollektiv; SS=Spleißstelle; SV=Sequenzveränderung; 1.=erstes Kontrollkollektiv aus 5 Personen für alle gefundenen Sequenzveränderungen; 2.=zweites Kontrollkollektiv aus 58 Personen für alle gefundenen Sequenzveränderungen in Intron 1;  $\Sigma$ = insgesamt Anzahl der gefundenen Sequenzveränderung aus allen Kontrollkollektiven)

### 3.1.3 Sequenzveränderungen im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1

Die im Folgenden tabellarisch aufgeführten Sequenzveränderungen wurden alle vor dem Startcodon von Exon 1 im 5'-untranslatierten Bereich gefunden. Für diese Veränderungen konnten keine *In Silico*-Programme für die nähere Einschätzung herangezogen werden. Um dennoch Aussagen treffen zu können, wurden die Untersuchungsergebnisse von 58 gesunden Kontrollpersonen miteinbezogen.

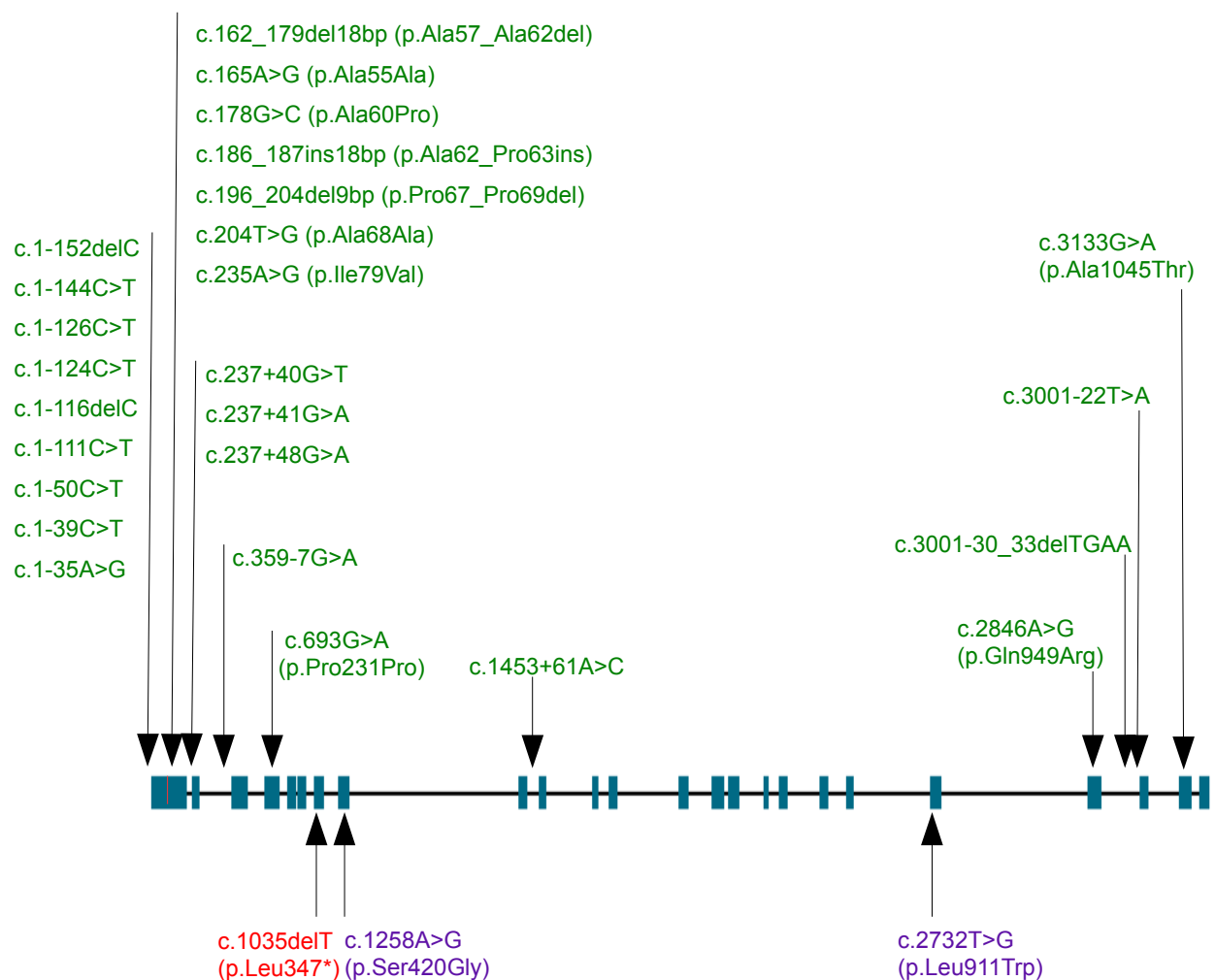
SV (cDNA)	Art SV	Anzahl Pat	Anzahl Ko
c.1-152delC	Deletion	5 het	1. 4/5    4het 2. 17/58    8het 9hz Σ 21/63
c.1-144C>T	Basenaustausch	5 het	1. 1/5    1het 2. 17/58    8het 9hz Σ 21/63
c.1-126C>T	Basenaustausch	2 het	1. 0/5 2. 1/58    1het Σ 1/63
c.1-124C>T	Basenaustausch	-	1. 1/5    1het 2. 3/58    3het Σ 4/63
c.1-116delC	Deletion	3 het	1. 4/5    4het 2. 0/58 Σ 4/63
c.1-111C>T	Basenaustausch	-	1. 1/5    1het 2. 0/58 Σ 1/63
c.1-50C>T	Basenaustausch	4 het	1. 3/5    2het 1hz 2. 18/58    10het 8hz Σ 21/63
c.1-39C>T	Basenaustausch	2 het	1. 2/5    2het 2. 11/58    7het 4hz Σ 13/63
c.1-35A>G	Basenaustausch	7 het 4 hz	1. 5/5    3het 2hz 2. 43/58    23het 20hz Σ 48/63

**Tab.17: Nachgewiesene Keimbahnveränderungen im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1 des *MSH3*-Gens** (het=heterozygot; hz=homozygot; Ko=Kontrollkollektiv; Pat=Patientenkollektiv;

SV=Sequenzveränderung; 1.=erstes Kontrollkollektiv aus 5 Personen; 2.=zweites Kontrollkollektiv aus 58 Personen;  $\Sigma$ =insgesamte Anzahl der gefundenen Sequenzveränderung aus allen Kontrollkollektiven)

### 3.1.4 Zusammenfassende grafische Darstellung der nachgewiesenen Keimbahnveränderungen im *MSH3*-Gen

In nachfolgender Abbildung sind die im *MSH3*-Gen nachgewiesenen Keimbahnveränderungen zusammenfassend grafisch dargestellt.



**Abb.10: Grafische Darstellung des *MSH3*-Gens und der nachgewiesenen Keimbahnveränderungen**  
(blau=Exon 1-24; schwarz=Intron 1-23; rote Linie=Startcodon; grün=vermuteter Polymorphismus; lila=potentiell pathogen; rot=pathogen)

### 3.1.5 Zusammenfassende tabellarische Darstellung der bei den Indexpatienten gefundenen Keimbahnveränderungen im *MSH3*-Gen

In nachfolgender Tabelle sind für die zehn untersuchten Indexpatienten und die Patientin aus Heidelberg neben den gefundenen *MSH3*-Keimbahnveränderungen zusätzlich die jeweilige bekannte pathogene *MSH6*-Keimbahnmutation, die Informationen hinsichtlich Mikrosatelliteninstabilität und Immunhistochemie im Tumor sowie die entsprechende Diagnose dargestellt.

Pat	Pathogene Mutation <i>MSH6</i>	Exonische SV <i>MSH3</i>	Intronische SV <i>MSH3</i>	SV im 5'-UTR-Bereich von <i>MSH3</i>	MSI	IHC MSH2	IHC MSH6	Diagnose
42904	c.2426_2428 delTAG (p.Val809Glu fs*)	c.235A>G (p.Ile79Val) c.1258A>G (p.Ser420Gly) c.3133G>A (p.Ala1045Thr) (hz)	c.1453+61A>C c.3001-30_33delTGA A (hz)	c.1-126C>T c.1-39C>T c.1-35A>G	MSI-H (4+)	<5% = Ausf.	neg	39J Sigma-CA
46756	c.3798_3827 del30bp (p.His1266Gln delMet1267_Glu1276)	c.162_179del18bp (p.Ala57_Ala62del) c.196_204del9bp (p.Pro67_Pro69del) c.204T>G (p.Ala68Ala) (hz) c.235A>G (p.Ile79Val) (hz) c.2846A>G (p.Gln949Arg) c.3133G>A (p.Ala1045Thr)	c.359-7G>A c.1453+61A>C c.3001-30_33delTGA A	c.1-152delC c.1-144C>T c.1-50C>T c.1-35A>G	MSI-H (3+)	70% pos	neg	67J Coecum-CA
					MSS	neg	neg	67J Endom-CA
					MSI-H (2+1L OH)	neg	neg	67J Urothel-CA
48064	c.3969_3979 delTGAGAA GATGA (p.Phe1323Leufs*13)	c.186_187ins18bp (p.Ala62_Pro63ins) (hz) c.235A>G (p.Ile79Val) c.1035delT (p.Leu347*)	-	c.1-35A>G (hz)	MSI-H	neg	neg	47J Rektum-CA
51560	c.3202C>T (p.Arg1068*)	c.162_179del18bp (p.Ala57_Ala62del) c.196_204del9bp (p.Pro67_Pro69del) c.204T>G (p.Ala68Ala) c.235A>G (p.Ile79Val) (hz) c.2846A>G (p.Gln949Arg) c.3133G>A (p.Ala1045Thr)	c.359-7G>A c.3001-30_33delTGA A	c.1-152delC c.1-144C>T c.1-50C>T c.1-35A>G	MSI-H (3+)	>80% pos	neg	58J Coecum-CA
					MSI-H (3+)	> 90% pos	neg	58J Colon-CA (re. Flexur) (synchr.)
					MSI-H (2+)	neg	neg	60J Endom-CA

55576	c.1243C>T (p.Gln415*)	c.186_187ins18bp (p.Ala62_Pro63ins c.235A>G (p.Ile79Val) c.3133G>A (p.Ala1045Thr) (hz)	c.1453+61A>C c.3001- 30_33delTGA A c.3001-22T>A	c.1-35A>G	MSI- H (4+)	60% = part. Ausf.	neg	39J Colon- asc.-CA
58953	c.1805C>A (p.Ser602*)	c.235A>G (p.Ile79Val) (hz) c.3133G>A (p.Ala1045Thr) (hz)	c.359-7G>A c.1453+61A>C c.3001- 30_33delTGA A c.3001-22T>A	c.1-152delC c.1-144C>T c.1-116delC c.1-50C>T c.1-35A>G (hz)	MSI- H n.V.	1-10% = Ausf.	neg	40J Colon asc.-CA
					kA	kA	kA	40J Appendix -CA
60406	c.892C>T (p.Arg298*)	c.162_179del18bp (p.Ala57_Ala62del) c.196_204del9bp (p.Pro67_Pro69del) c.204T>G (p.Ala68Ala) c.235A>G (p.Ile79Val) (hz) c.2846A>G (p.Gln949Arg) c.3133G>A (p.Ala1045Thr)	c.359-7G>A c.1453+61A>C c.3001- 30_33delTGA A	c.1-152delC c.1-144C>T c.1-116delC c.1-50C>T c.1-35A>G	MSI- H (5+)	neg	neg	68J Coecum- CA  (Ovarial zysten bds.)
61287	c.3416delG (p.Gly1139Ala fs*6)	c.186_187ins18bp (p.Ala62_Pro63ins (hz) c.2732T>G (p.Leu911Trp) c.2846A>G (p.Gln949Arg)	c.359-7G>A	c.1-152delC c.1-144C>T c.1-35A>G (hz)	MSI- H	1-10% = Ausf.	neg	54J Jejunum- CA  (tub. Aden.)
61628	c.3037_3041 delAAGAA (p.Lys1013Val fs*3)	c.235A>G (p.Ile79Val) (hz) c.3133G>A (p.Ala1045Thr) (hz)	c.237+41G>A c.3001- 30_33delTGA A (hz)	c.1-126C>T c.1-39C>T c.1-35A>G	MSI- H	neg	neg	47J Colon- CA
78712	c.730C>T (p.Gln244*)	c.186_187ins18bp (p.Ala62_Pro63ins c.235A>G (p.Ile79Val) c.3133G>A (p.Ala1045Thr)	c.1453+61A>C c.3001- 30_33delTGA A	c.1-116delC c.1-35A>G (hz)	MSI- H (2+)	neg	neg	33J Colon desc.-CA
B964 A	-	c.165A>G (p.Ala55Ala) c.178G>C (p.Ala60Pro) c.235A>G (p.Ile79Val) c.3133G>A (p.Ala1045Thr) (hz)	c.1453+61A>C c.3001- 30_33delTGA A (hz)	c.1-35A>G	MSI- H	pos	pos	kA



**Tab.18: Zusammenfassende Darstellung der bei den Patienten gefundenen *MSH3*-Keimbahnveränderungen, der jeweiligen pathogenen *MSH6*-Mutation und der entsprechenden Diagnose** (grün=vermuteter Polymorphismus; lila=potentiell pathogen; rot=pathogen; angegebenes Alter=Tumordiagnosesalter; Mutationen immer heterozygot, außer „hz“=homozygot; Aden.=Adenome; asc.=ascendens; Ausf.=Ausfall; CA=Karzinom; desc.=descendens; Endom=Endometrium; fs=Frameshift; IHC=Immunhistochemie; J=Jahre; kA=keine Angabe; MSI=Mikrosatelliteninstabilität; MSI-H=Hohe Mikrosatelliteninstabilität; MSS=Mikrosatellitenstabilität; neg=negativ; n.V.=nach Verdünnung; part.=partiell; Pat=Patient; pos=positiv; re.=rechts; SV=Sequenzveränderung; synchr.=synchron; tub.=tubulär; (...)=nebenbefundliche Diagnose)

### 3.2 Analyse von Tumor-DNA

Die Analyse von Tumor-DNA wurde bei neun der zehn Indexpatienten durchgeführt, um das Vorhandensein somatischer Mutationen in den Genen *MSH3*, *MSH6* und *MSH2* zu untersuchen. Von dem Patienten 61628 lag keine Tumor-DNA vor, ebenso wie von der Patientin B964A aus Heidelberg. Die Patientinnen 46756 und 51560 erkrankten jeweils an multiplen Tumoren. Dabei konnte bei der Patientin 46756 nur im Endometrium- und Urothel-Karzinom, bei der Patientin 51560 nur im Endometriumkarzinom ein immunhistochemischer Ausfall des MSH2-Proteins nachgewiesen werden (s. Tab.2), insofern wurde in diesen Fällen nur die Tumor-DNA der MSH2-negativen Tumoren analysiert. Beim Patienten 58953 wurde lediglich eine Tumoranalyse des Colon ascendens-Karzinoms durchgeführt, da kein Tumorgewebe des Appendix-Karzinoms zur Verfügung stand. Grundsätzliches Ziel war es, neben der jeweiligen heterozygoten (potentiell) pathogenen Keimbahnmutation im *MSH6*- und teilweise auch im *MSH3*-Gen, für beide Gene eine zweite pathogene somatische Mutation im Tumorgewebe nachzuweisen, die den Funktionsverlust und somit auch den immunhistochemischen Ausfall des entsprechenden Proteins und bezogen auf *MSH6* nach der Second Hit-Hypothese nach Knudson auch die Tumorgenese erklären würde. Schlussendlich trug diese Untersuchung auch dazu bei, die anfängliche Frage des unklaren immunhistochemischen Ausfalls des MSH2-Proteins im Tumor der Indexpatienten zu beantworten. Gefundene somatische Sequenzveränderungen wurden analog zur Analyse der Keimbahnveränderungen mit den *In Silico*-Programmen *PolyPhen* und *SIFT* (für unklare Missense-Veränderungen) sowie der Software *Alamut* ausgewertet. Die Analyse beschränkte sich dabei wegen limitierter Tumor-DNA-Mengen

auf folgende Untersuchungen:

1. Analyse der Mononukleotidrepeats in Exon 7 des *MSH3*-Gens ((A)<sub>8</sub>), Exon 5 des *MSH6*-Gens ((C)<sub>8</sub>) und z.T. Exon 4 des *MSH2*-Gens ((A)<sub>7</sub>)

Diese repetitiven Mononukleotidabfolgen erweisen sich aufgrund erschwerter Bedingungen für die DNA-Polymerase im Rahmen häufiger DNA-Replikationen im Tumorgewebe oft als instabil im Sinne einer Deletion bzw. Duplikation einer oder mehrerer Basen. Insofern ist die Wahrscheinlichkeit für den Nachweis einer somatischen Mutation in diesen Abschnitten im Vergleich zu Sequenzen mit normaler Basenabfolge höher. Die Analyse des Mononukleotidruns im *MSH2*-Gen wurde durchgeführt, da der immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins auch durch das Vorliegen zweier somatischer Mutationen in *MSH2* im Tumor erklärt werden könnte und der (A)<sub>7</sub>-Repeat in diesem Gen eine entsprechende Prädispositionsstelle darstellt.

2. Untersuchung der jeweiligen pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation im Tumor zum möglichen Nachweis eines *Loss of Heterozygosity* (LOH)
3. Untersuchung der (potentiell) pathogenen *MSH3*-Keimbahnmutation im Tumor der Patienten 42904, 48064 und 61287 zum möglichen Nachweis eines LOH

Ein LOH bezeichnet den Verlust der Heterozygotie der Keimbahnmutation im Tumorgewebe und ist vermutlich auf einen Allelverlust zurückzuführen, der als zusätzlicher Hit in der Tumorgenese auftreten kann. Er führt zu einem homozygoten Vorliegen der entsprechenden pathogenen Keimbahnmutation und würde damit wiederum dem Second Hit entsprechen und den Funktionsausfall des jeweiligen Proteins im Tumor erklären. Zum möglichen Nachweis eines LOH wurde somit das jeweilige Exon mit Lokalisation der pathogenen *MSH6*- bzw. *MSH3*-Keimbahnmutation in der Tumor-DNA amplifiziert und auf ein heterozygotes oder homozygotes Vorliegen dieser Keimbahnmutation ausgewertet. Bei den Patienten 46756 (Endom-CA), 55576 und 60406 konnte die LOH-Analyse in *MSH6* wegen fehlender Tumor-DNA nicht durchgeführt werden.

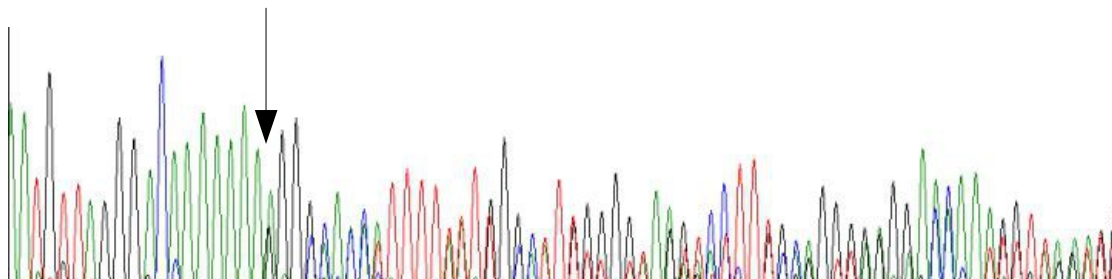
### 3.2.1 Darstellung der relevanten nachgewiesenen somatischen Sequenzveränderungen

Im Folgenden werden die relevanten nachgewiesenen somatischen Sequenzveränderungen im *MSH3*-, *MSH6*- und *MSH2*-Gen aufgeführt. Nebenfundliche Resultate sind in Tabelle 19 zu finden.

#### 3.2.1.1 *MSH3*

##### **1. c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32)**

Die Hotspot-Deletionsmutation c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) (s. Abb.11) im (A)<sub>8</sub>-Repeat von Exon 7 des *MSH3*-Gens konnte im Tumorgewebe von drei Patienten (42904, 48064 und 60406) heterozygot nachgewiesen werden. Die Deletion eines Adenins führt auf Aminosäureebene zu einem Frameshift und damit zu einer völlig anderen Abfolge von Aminosäuren mit dem Resultat eines verfrüht auftretenden Stoppcodons und somit zumindest funktionseingeschränkten MSH3-Proteins.



**Abb.11: Exemplarische Sequenz der Hotspot-Mutation c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) in Exon 7 des *MSH3*-Gens im Tumorgewebe der Patientin 48064**

##### **2. c.1035delT (p.Leu347\*)**

Die bekannte pathogene Keimbahnmutation c.1035delT (p.Leu347\*) der Patientin 48064, die in der aus Blut extrahierten DNA noch heterozygot zu finden war, konnte nun im Tumor homozygot nachgewiesen werden mit dem starken Verdacht eines Verlusts des zweiten, funktionellen Allels im Sinne eines LOH.

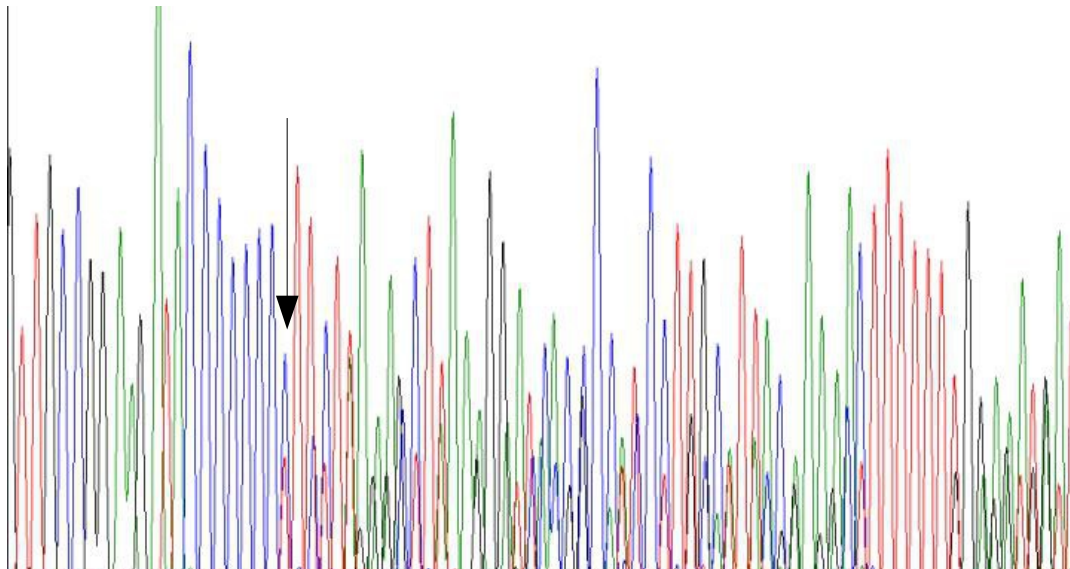
Bei den Patienten 42904 und 61287 wurde die jeweilige heterozygot in der Keimbahn gefundene, potentiell pathogene Mutation ebenfalls heterozygot im Tumorgewebe

nachgewiesen und somit ein LOH dieser Veränderung im Tumor ausgeschlossen.

### 3.2.1.2 MSH6

#### **c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*1)**

In Exon 5 des *MSH6*-Gens konnte die Hotspot-Deletionsmutation c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*1) (s. Abb.12) bei zwei Patientinnen (48064 und 51560) heterozygot nachgewiesen werden. Durch den Wegfall einer Base kommt es zu einer Leserasterverschiebung, die durch den vorzeitigen Einbau eines Stoppcodons zu einem deutlich verkürzten und somit zu einem zumindest vermindert funktionsfähigen Protein führt.



**Abb.12: Exemplarische Sequenz der Hotspot-Mutation c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*1) in Exon 5 des *MSH6*-Gens im Tumorgewebe der Patientin 48064**

Die Analyse der jeweiligen pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation im Tumorgewebe hinsichtlich eines möglichen LOH erbrachte bei allen untersuchten Patienten ein unauffälliges Ergebnis.

### 3.2.1.3 MSH2

Die Analyse des (A)<sub>7</sub>-Mononukleotidruns in Exon 4 des *MSH2*-Gens konnte nur bei den Patienten 46756 (Urothel-CA), 48064, 61287 und 78712 durchgeführt werden. Dabei waren keine Sequenzveränderungen zu finden. In den anderen Fällen war die Tumor-DNA aufgebraucht oder die Amplifikation auch in der Wiederholung nicht möglich.

### 3.2.2 Übersicht über die gesamten gefundenen somatischen Sequenzveränderungen

Als Übersicht sind in der nachfolgenden Tabelle die in der Tumor-DNA gefundenen Sequenzveränderungen einschließlich der Vorhersagen der *In Silico*-Programme *PolyPhen* und *SIFT* sowie von *Alamut* aufgeführt. Dabei sind nur Veränderungen beschrieben, die in der Keimbahn nicht gefunden werden konnten bzw. Mutationen, die im Tumor im Gegensatz zur Keimbahn homozygot statt heterozygot nachgewiesen wurden.

Gen-E	SV (cDNA)	SV (Protein)	Evol Kons	Art SV	WT AS	Mut AS	<i>PolyPhen</i> / <i>SIFT</i>	<i>Alamut</i>	Patient
<i>MSH3</i> -E7	c.1-1148delA	p.Lys383Argfs*32	kA	Deletion / Fs	-	-	-	kA	42904 het 48064 het 60406 het
<i>MSH3</i> -E7	c.1035delT	p.Leu347*	kA	Deletion / Nonsense	-	-	-	kA	48064 hz
<i>MSH6</i> -E5	c.3261delC	p.Phe1088Serfs*1	kA	Deletion / Fs	-	-	-	kA	48064 het 51560 het
<i>MSH6</i> -E5	c.3438+14A>T	-	kA	Intronisch	-	-	-	MAF 39,7 SS oB	46756 het 55576 het 58953 hz 60406 het 78712 hz
<i>MSH6</i> -E5	c.3208G>A	p.Gly1070Ser	nein	Missense	n up ho	n p hi	<i>PP</i> benigne <i>S</i> tolerabel	MAF kA SS oB	60406 het
<i>MSH6</i> -E5	c.3303G>A	p.Lys1101Lys	nein	Still	b p hi	b p hi	<i>S</i> tolerabel	MAF kA SS oB	60406 het
<i>MSH6</i> -E5	c.3413G>A	p.Gly1138Glu	ja	Missense	n up ho	s p hi	<i>PP</i> probably damaging <i>S</i> deleterious	MAF kA SS oB	60406 het
<i>MSH6</i> -E9	c.3891C>T	p.Ser1297Ser	ja	Still	n p hi	n p hi	<i>S</i> tolerabel	MAF kA SS unklar	48064 het

**Tab.19: Nachgewiesene somatische Sequenzveränderungen im *MSH6*- und *MSH3*-Gen und jeweilige Analyse** (rot=pathogen; lila=potentiell pathogen; AS=Aminosäure; b=basisch; E=Exon; Evol Kons=Evolutionäre Konservierung; Fs=Frameshift; het=heterozygot; hi=hydrophil; ho=hydrophob; hz=homozygot; kA=keine Angabe; MAF=Minor Allele Frequency (in %); Mut=mutiert; n=neutral; oB=ohne pathologischen Befund; p=polar; PP=PolyPhen; S=SIFT; s=sauer; SS=Splice-Stelle; SV=Sequenzveränderung; up=unpolar; WT=Wildtyp)

### 3.2.3 Patientenbezogene tabellarische Darstellung der nachgewiesenen Sequenzveränderungen in *MSH3* und *MSH6* im Tumor und in der Keimbahn

In Tabelle 20 sind für die jeweiligen Patienten die entsprechenden gefundenen Sequenzveränderungen in der Keimbahn sowie im Tumorgewebe des *MSH6*- und des *MSH3*-Gens aufgeführt. In der Darstellung wurden jedoch nur Keimbahnmutationen mit (potentiell) pathogenem Charakter berücksichtigt, während alle neu aufgetretenen somatischen Veränderungen aufgeführt sind. Sofern nicht anders beschrieben, ist dabei immer von einem heterozygoten Vorliegen der jeweiligen Veränderung auszugehen.

Patient	KB-Mutation <i>MSH6</i>	Tu-SV <i>MSH6</i>	KB-Mutation <i>MSH3</i>	Tu-SV <i>MSH3</i>	MSI	IHC <i>MSH2</i>	IHC <i>MSH6</i>	Diagnose
42904	c.2426_2428delTAG (p.Val809Glu fs*)	-	c.1258A>G (p.Ser420Gly)	c.1148delA (p.Lys383Arg fs*32)	MSI-H (4+)	<5% = Ausf.	neg	39J Sigma-CA
46756	c.3798_3827del30 (p.His1266Gln delMet1267_ Glu1276)	n.u.	-	n.u.	MSI-H (3+)	70% pos	neg	67J Coecum-CA
		c.3438+14A>T		-	MSS	neg	neg	67J Endom-CA
		c.3438+14A>T		-	MSI-H (2+1L OH)	neg	neg	67J Urothel-CA
48064	c.3969_3979delTGAGAAG ATGA (p.Phe1323Leu fs*13)	c.3261delC (p.Phe1088Ser fs*1)	c.1035delT (p.Leu347*)	c.1148delA (p.Lys383Arg fs*32) c.1035delT (p.Leu347*) (hz)	MSI-H	neg	neg	47J Rektum-CA
51560	c.3202C>T (p.Arg1068*)	n.u.	-	n.u.	MSI-H (3+)	>80% pos	neg	58J Coecum-CA

		n.u.		n.u.	MSI-H (3+)	>90% pos	neg	58J Colon-CA (re. Flexur) (synchr.)
		c.3261delC (p.Phe1088Serfs*1)		-	MSI-H (2+)	neg	neg	60J Endom-CA
55576	c.1243C>T (p.Gln415*)	c.3438+14A>T	-	-	MSI-H (4+)	60% = part. Ausf.	neg	39J Colon-asc-CA
58953	c.1805C>A (p.Ser602*)	-	-	-	MSI-H n.V.	1-10% = Ausf.	neg	40J Colon asc.-CA
		n.u.		n.u.	kA	kA	kA	40J Appendix-CA
60406	c.892C>T (p.Arg298*)	c.3208G>A (p.Gly1070Ser) c.3303G>A (p.Lys1101Lys) c.3413G>A (p.Gly1138Glu) c.3438+14A>T	-	c.1148delA (p.Lys383Argfs*32)	MSI-H (5+)	neg	neg	68J Coecum-CA (Ovarialzysten bds)
61287*	c.3416delG (p.Gly1139Alafs*6)	-	c.2732T>G (p.Leu911Trp)	-	MSI-H	1-10% = Ausf.	neg	54J Jejunum-CA (tub. Adenome)
61628	c.3037_3041delAAGAA (p.Lys1013Valfs*3)	?	-	?	MSI-H	neg	neg	47J Colon-CA
78712	c.730C>T (p.Gln244*)	-	-	-	MSI-H (2+)	neg	neg	33J Colon desc.-CA
B964A	-	?	-	?	MSI-H	pos	pos	kA

**Tab.20: Nachgewiesene Sequenzveränderungen in Tumor und Keimbahn der einzelnen Patienten**

(rot=pathogen; lila=potentiell pathogen; grün=vermuteter Polymorphismus; angegebenes Alter=Tumordiagnosealter; asc.=ascendens; Ausf.=Ausfall; bds=beidseits; CA=Karzinom; desc.=descendens; Endom=Endometrium; hz=homozygot; IHC=Immunhistochemie; J=Jahre; kA=keine Angabe; KB=Keimbahn; MSI=Mikrosatelliteninstabilität; MSI-H=hohe Mikrosatelliteninstabilität; MSS=Mikrosatellitenstabilität; neg=negativ; n.u.=nicht untersucht; n.V.=nach Verdünnung; part.=partiell; pos=positiv; re.=rechts; SV=Sequenzveränderung; synchr=synchron; Tu=Tumor; tub.=tubulär; (...)=nebenbefundliche Diagnosen; ?=keine Tumor-Analyse durchführbar; \*=wegen ausreichender Menge an Tumor-DNA vollständige Analyse des *MSH3*- und *MSH2*-Gens durchgeführt)

## **4. Diskussion**

Nachfolgend werden die nachgewiesenen Sequenzveränderungen aus Keimbahn- und Tumor-DNA auf ihre Pathogenität und klinische Relevanz hin diskutiert. Für diese Arbeit war dabei insbesondere das *MSH3*-Gen von Bedeutung. Die Konstellation an molekulargenetischen und immunhistochemischen Befunden des hier untersuchten Patientenkollektivs lies den Verdacht aufkommen, dass dem *MSH3*-Gen eine größere Rolle in der Tumorgenese bei HNPCC-Patienten zukommt, als bislang angenommen.

### **4.1 Diskussion der im *MSH3*-Gen gefundenen Keimbahnveränderungen**

Insgesamt konnten in der Keimbahn 29 verschiedene Sequenzveränderungen im *MSH3*-Gen nachgewiesen werden, unter anderem die nach unserem Wissen erste pathogene *MSH3*-Stopppmutation sowie zwei Missense-Mutationen mit potentiell pathogenem Charakter. Von allen gefundenen Sequenzveränderungen sind bislang nur zwei in der Datenbank HGMD beschrieben.

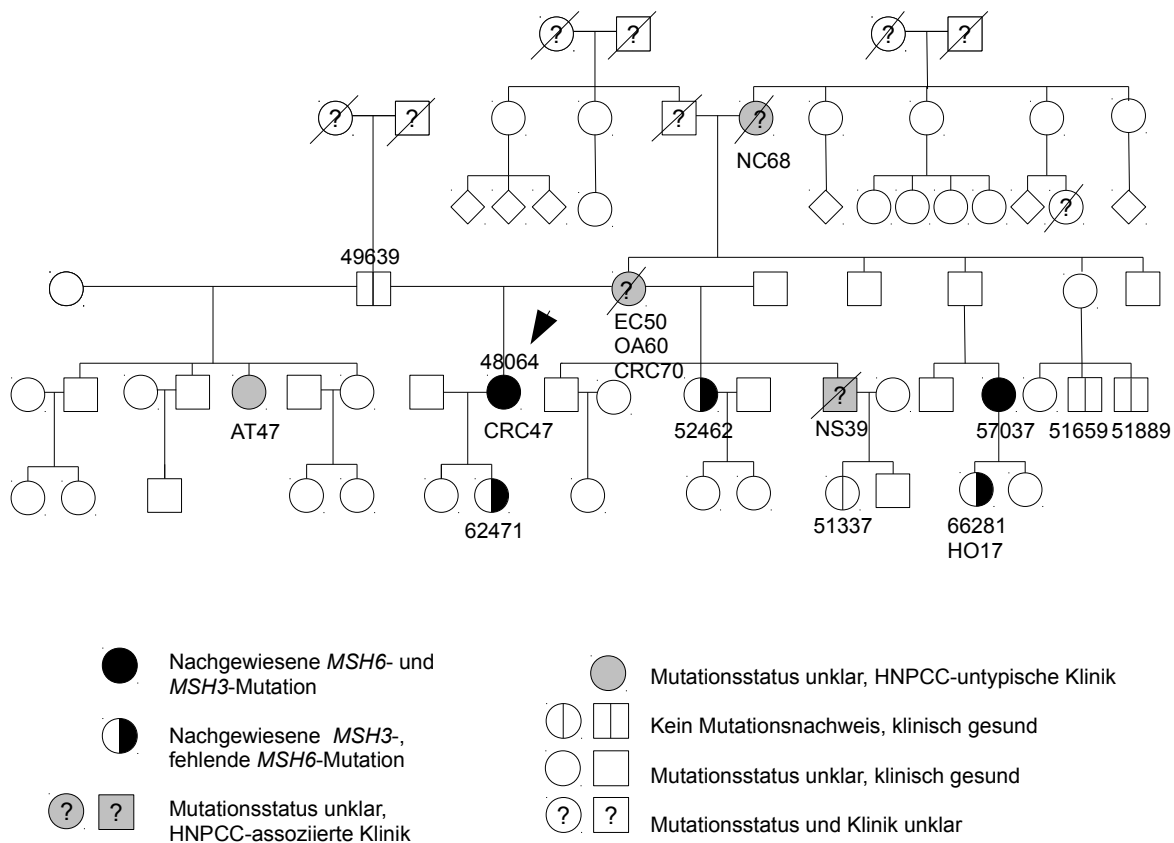
Im Folgenden werden die gefundenen *MSH3*-Keimbahnveränderungen auf ihre Pathogenität und klinische Relevanz hin diskutiert. Dabei wurden jeweils die Vorhersagen der *In Silico*-Programme *PolyPhen* und *SIFT* sowie die von *Alamut* berücksichtigt (s. Ergebnisteil). Daneben wurden die Datenbanken HGMD, dbSNP, UCSC Genome Browser und ExAC Browser für die nähere Einschätzung verwendet sowie entsprechende Ergebnisse anderer Forschungsgruppen und die einer vorangegangenen Arbeit miteinbezogen.

#### **4.1.1 Pathogene Mutation c.1035delT (p.Leu347\*)**

Die Deletion c.1035delT (p.Leu347\*) in Exon 7 konnte bei der Patientin 48064 heterozygot in der Keimbahn detektiert werden. Sie stellt die nach unserem Wissen bislang erste mit dem Lynch-Syndrom assoziierte pathogene Keimbahnmutation im *MSH3*-Gen dar. In der Literatur sowie in den Datenbanken HGMD, dbSNP, UCSC Genome Browser und ExAC Browser ist sie nicht beschrieben. Auch wurde sie in 40 Personen einer vorangegangenen Arbeit nicht gefunden.



Bei der Patientin 48064 zeigt sich unter Erfüllung der Bethesda-Kriterien eine positive Familienanamnese für die pathogene Mutation c.3969\_3979delTGAGAAGATGA (p.Phe1323Leufs\*13) in Exon 9 des *MSH6*-Gens (s. Abb.13).



**Abb.13: Stammbaum der Familie der Indexpatientin 48064** (AT=Augentumor; CRC=kolorektales Karzinom; EC=Endometriumkarzinom; HO=hämatoonkologischer Tumor, hier Lymphom; NC=Nierenkarzinom; NS=Tumor des Nervensystems, hier Tumor des thorakalen Nervenstrangs; OA=Tumor der oberen Atemwege, hier Adenokarzinom der Nasenschleimhaut; Zahl=Erstmanifestationsalter)

Weitere Sequenzveränderungen, die sich in Keimbahn und Tumor der Patientin 48064 nachweisen ließen, sind den Tabellen 18 und 20 im Ergebnisteil zu entnehmen und werden unten auf ihre klinische Relevanz hin diskutiert.

Betrachtet man den Stammbaum der Patientin 48064, so ist erkennbar, dass die gefundene pathogene *MSH3*-Mutation entweder in Kombination mit der bekannten *MSH6*-Mutation oder für sich alleine auftritt. Nachdem die Gene *MSH3* und *MSH6* auf verschiedenen Chromosomen liegen, müssen sie unabhängig voneinander vererbt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass die *MSH3*-Mutation einem dominanten Erbgang folgt, kann aber aufgrund

mangelnder Daten, die zum Teil auf einer fehlenden prädiktiven Testung der Familienmitglieder beruhen, nicht eindeutig bestätigt werden.

Die Indexpatientin 48064, die Trägerin beider pathogener Mutationen ist, erkrankte im Alter von 47 Jahren an einem Rektumkarzinom. Dieses Tumormanifestationsalter ist für *MSH6*-Mutationsträger überdurchschnittlich früh, geht man doch von einem mittleren Erkrankungsalter von 55 Jahren aus. Vielmehr entspricht dieses Erstmanifestationsalter dem mittleren Erkrankungsalter für *MSH2*- und *MLH1*-Mutationsträger, welches mit etwa 45 Jahren angegeben wird (Aarnio et al., 1999; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). Diese veränderte Genotyp-Phänotyp-Korrelation legt den Verdacht nahe, dass die zusätzliche pathogene *MSH3*-Mutation die Tumorgenese beschleunigt. Durch den Verlust der Mismatch-Repair-Proteine MSH6 und MSH3 bei dieser Patientin ist die postreplikative DNA-Reparatur eklatant beeinträchtigt, da vermutlich sowohl das Heterodimer MutS $\alpha$ , als auch MutS $\beta$  degradieren und somit keine Basenfehlpaarungen und Insertions-Deletions-Schleifen mehr erkannt werden können. Daraus ergibt sich im Vergleich zu einem isolierten Ausfall des MSH6-Proteins eine noch stärkere Akkumulation von DNA-Fehlern und ein schnelleres Durchlaufen der Adenom-Karzinom-Sequenz, vergleichbar mit *MSH2*-Mutationsträgern.

Edelmann et al., 2000 kombinierten im Mausmodell einen jeweils biallelischen *MSH3*- und *MSH6*-Verlust. Dabei konnten sie im Vergleich zu den Ergebnissen einer einzelnen Gen-Inaktivierung einen rapiden Abfall der Überlebensrate nachweisen, die mit einer zusätzlichen hohen MSI-Rate einherging. Beide Resultate waren mit den Ergebnissen einer *MSH2*- bzw. *MLH1*-Defizienz der Mäuse vergleichbar. Daraus konnte abgeleitet werden, dass MSH3 und MSH6 in der Aufgabe der Tumorsuppression kooperieren und dass ein Verlust beider Proteine den selben Phänotyp hervorzurufen scheint, wie eine pathogene *MSH2*- oder *MLH1*-Mutation, vergleichbar mit der hier untersuchten Patientin 48064.

Die Patientin 66281 (Jahrgang 1994) erkrankte vor kurzem im Alter von 17 Jahren an einem Lymphom. Zur weiteren Einschätzung dieser Lymphomerkrankung wurde diese Patientin im gesamten *MSH3*-Gen auf Keimbahnmutationen hin untersucht. Neben der pathogenen Deletionsmutation c.1035delT (p.Leu347\*) konnten eine Reihe von Polymorphismen detektiert werden, denen, wie in diesem Kapitel diskutiert wird, höchstwahrscheinlich keine klinische Bedeutung zukommt (c.1-35A>G homozygot; c.1-

116delC heterozygot; c.186\_187ins18bp (p.Ala62\_Pro63ins) homozygot; c.235A>G (p.Ile79Val) heterozygot; c.1453+61A>C heterozygot; c.3001-30\_33delTGAA heterozygot und c.3133G>A (p.Ala1045Thr) heterozygot).

Für *MSH6*-Mutationen konnte eine Assoziation mit atypischen, nicht HNPCC-assoziierten Tumorerkrankungen, wie z.B. Leukämien, nachgewiesen werden (Plaschke et al., 2004a), allerdings trägt die Patientin 66281 die pathogene familiäre *MSH6*-Mutation nicht. Trotzdem kann man darüber spekulieren, ob und inwiefern die Lymphomkrankung, besonders weil sie mit einem so frühen Manifestationsalter auftrat, in Zusammenhang mit der gefundenen pathogenen *MSH3*-Mutation steht.

Es konnten hämatologische Tumoren zusammen mit Neurofibromatose im Rahmen eines Lynch-Syndroms bei Kindern mit konstitutivem MMR-Defekt und einer pathogenen *MLH1*-Keimbahnmutation beobachtet werden (Ricciardone et al., 1999; Wang et al., 1999).

Bereits 1995 konnten Reitmair et al., 1995 außerdem am Mausmodell zeigen, dass ein biallelischer *MSH2*-Ausfall zu einer Prädisposition für Lymphomkrankungen bei Mäusen führt.

Rosty et al., 2000 beschrieben einen Patienten mit nachgewiesener pathogener *MLH1*-Keimbahnmutation, der die Amsterdam-Kriterien erfüllte und der neben zwei metachronen kolorektalen Karzinomen zusätzlich an einem duodenalen follikulären Lymphom erkrankt war. In den Tumorzellen des Lymphoms lag allerdings eine Mikrosatellitenstabilität vor, auch war die Immunhistochemie des MLH1-Proteins im Lymphom positiv, sodass von einer Pathogenese unabhängig vom MMR-System ausgegangen wurde.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Teruya-Feldstein et al., 2002, die ebenfalls eine Assoziation von mikrosatellitenstabilen Lymphomen mit Lynch-Syndrom herstellen konnten.

Inokuchi et al., 1995 untersuchten die Expression von *MSH3* in Knochenmarkszellen von Patienten mit hämatologischen Tumoren. Während sie in gesunden Probanden normale Mengen an RNA detektieren konnten, war die Expression von *MSH3* in erkrankten Patienten sehr variabel, wobei in 60% der Fälle eine verringerte oder fehlende Expression von *MSH3* beobachtet werden konnte. Die Wissenschaftler vermuteten, dass die Inaktivierung von *MSH3* somit die Tumorgenese hämatologischer Tumoren fördert und dass durch eine reduzierte Expression dieses Proteins die Rekombinationsrate gesteigert und daraus resultierend die chromosomale Translokation, wie sie für viele hämatologische

Tumoren typisch ist, erhöht wird.

Die pathogene *MSH3*-Keimbahnmutation der Patientin 66281 dürfte ebenfalls zu einer verminderten Expression von *MSH3* führen. Kommt es in den Lymphomzellen zusätzlich zu einer zweiten somatischen Mutation in diesem Gen, so würde eine fehlende Expression von *MSH3* resultieren, wie sie auch Inokuchi et al., 1995 nachweisen konnten. Dadurch könnte die Tumorgenese des Lymphoms durch Beeinträchtigung der DNA-Reparatur gefördert werden. Leider war das Tumorgewebe der Patientin 66281 nicht zu bekommen, um diese Vermutung mithilfe molekulargenetischer Analysen (MSA, IHC) verifizieren zu können.

Die Patientinnen 52462 (Halbschwester, Jahrgang 1965) und 62471 (Tochter, Jahrgang nicht bekannt), die genau wie die Patientin 66281 nur Trägerinnen der pathogenen *MSH3*-Mutation sind, sind bislang klinisch gesund. Bei diesen Patientinnen ist ein möglicher Einfluss der *MSH3*-Mutation auf die Tumorprädisposition aufgrund des unauffälligen Phänotyps und bei der Tochter der Indexpatientin zusätzlich aufgrund des jungen Alters momentan (noch) nicht abzuleiten.

Durauto et al., 2011 formulierten die Hypothese, dass eine alleinige Mutation im *MSH3*-Gen nicht ausreiche, um die Krebsentstehung auszulösen, was möglicherweise daran liegt, dass die Funktion des Heterodimers MutSβ aufgrund der partiellen Redundanz teilweise von MutSα übernommen werden kann (s. Einleitung). Die Kombination einer (potentiell) pathogenen Keimbahnmutation im *MSH3*-Gen und einer schwachen Sequenzveränderung im *MSH2*- oder *MLH1*-Gen könnte dagegen zu einer Initiierung der Tumorgenese kolorektaler Karzinome führen. In dieser Studie konnten allerdings nur *MSH3*-Mutationen identifiziert werden, deren Pathogenität nicht eindeutig zu klären war. Bei den beiden Patientinnen ist keine solche schwache Sequenzveränderung im *MSH2*- oder *MLH1*-Gen vorbekannt. Nachdem die beiden Gene in dieser Arbeit allerdings nicht explizit analysiert wurden, kann eine solche auch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Weiterhin ist mit der nachgewiesenen Deletion c.1035delT (p.Leu347\*) die nach unserem Wissen bislang erste mit dem Lynch-Syndrom assoziierte pathogene Keimbahnmutation im *MSH3*-Gen identifiziert worden, der aufgrund ihrer eindeutigen Pathogenität womöglich eine doch größere Bedeutung in der Tumorentstehung zukommt, als von Durauto et al., 2011 statuiert.

Edelmann et al., 2000 untersuchten im Mausmodell die Rolle von *MSH3* in der

Tumorgenese. Dabei konnten sie feststellen, dass Mäuse mit biallelischem *MSH3*-Ausfall erst sehr spät Tumoren entwickelten. Die Wissenschaftler übertrugen diese Daten auf den Menschen und mutmaßten, dass pathogene *MSH3*-Mutationen bei niedriger Tumorzinzidenz zu einem relativ späten Erkrankungsalter führen, was die Identifizierung solcher Patienten und die Abgrenzung zu sporadisch auftretenden Karzinomen schwer machen dürfte. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Adam et al., 2016, die bei zwei Patienten mit jeweils biallelischen pathogenen Keimbahnmutationen in *MSH3* einen ähnlichen Phänotyp beobachteten. Sie identifizierten diesen biallelischen *MSH3*-Ausfall dabei als einen neuen rezessiven Subtyp der kolorektalen adenomatösen Polyposis, deren Genese bei den untersuchten Patienten bislang unklar war. Als Grund für das späte Manifestationsalter im Vergleich zu pathogenen *MSH6*-Mutationen führten Edelmann et al., 2000 die jeweilige Aufgabe der Proteine an. Dabei gingen sie davon aus, dass Insertions-Deletions-Schleifen (IDLs) von zwei oder mehr Nukleotiden, wie sie primär vom Heterodimer MutS $\beta$  (MSH2 und MSH3) registriert werden, wesentlich seltener in kodierenden Sequenzen auftreten, als Ein-Basenpaar-IDLs bzw. Basen-Basen-Fehlpaarungen, die vom Heterodimer MutS $\alpha$  (MSH2 und MSH6) erkannt werden.

Überträgt man diese Ergebnisse auf die Patientinnen 52462 und 62471, so ist bei isoliertem Vorliegen der pathogenen *MSH3*-Keimbahnmutation möglicherweise mit dem Auftreten einer Tumorerkrankung im höheren Lebensalter zu rechnen. Eine weitere Verlaufsbeobachtung dieser Patientinnen bis ins höhere Alter wäre somit für die Einschätzung der klinischen Relevanz der gefundenen *MSH3*-Mutation hilfreich und wünschenswert.

Die Cousine 57037 (Jahrgang 1970) ist genau wie die Indexpatientin Trägerin beider pathogener MMR-Mutationen. Würde sich der oben geschilderte Zusammenhang der Forschungsergebnisse von Edelmann et al., 2000 als zutreffend erweisen, so wäre ein ebenfalls frühes Manifestationsalter für das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms bei der Patientin 57037 zu erwarten. Diese Patientin ist mittlerweile 45 Jahre alt und klinisch gesund, die letzte Koloskopie erfolgte unseres Wissens allerdings im Jahr 2010, sodass Ergebnisse neuerer Untersuchungen und eine engmaschige Kontrolle dieser Patientin erstrebenswert wären.

Die restlichen untersuchten Familienmitglieder, der Vater der Indexpatientin (49639), die

Nichte (51337) sowie die beiden Cousins (51659 und 51889) tragen keine der beiden pathogenen Mutationen und sind hinsichtlich HNPCC klinisch unauffällig.

Drei bereits verstorbene und damit molekulargenetisch nicht mehr zu analysierende Familienmitglieder wiesen eine HNPCC-assoziierte Klinik auf: die Mutter und die Großmutter der Indexpatientin sowie ein Halbbruder mütterlicherseits. Wie im Stammbaum zu erkennen ist, sind beide pathogenen Mutationen auf mütterlicher Seite nachzuweisen. Nachdem neben der Indexpatientin 48064 auch die Cousine 57037 beide pathogenen Mutationen trägt und für einen autosomal-dominanten Erbgang eine Manifestation der Erkrankung in jeder Generation als charakteristisch gilt, kann das Vorliegen beider pathogener Mutationen zumindest bei der Mutter als wahrscheinlich angenommen werden, in jedem Fall war sie obligate Anlageträgerin der pathogenen *MSH6*-Mutation.

Die Mutter erkrankte an drei verschiedenen Karzinomen, von denen mindestens zwei, das Endometrium- und das Kolonkarzinom, in Zusammenhang mit HNPCC stehen. Das Endometriumkarzinom im Alter von 50 Jahren lässt an einen zugrundeliegenden MMR-Defekt denken und würde sich durch das Vorliegen der pathogenen *MSH6*-Mutation erklären lassen, wo das Erstmanifestationsalter bei durchschnittlich 55 Jahren liegt und wo man ein gehäuftes Auftreten dieses Karzinoms beobachten kann (Pérez-Cabornero et al., 2013; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001; Wijnen et al., 1999). Die Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom im Alter von 70 Jahren entspricht jedoch vielmehr dem Manifestationsalter bei sporadisch auftretenden Tumoren, kann aber auch auf *MSH6*-Anlageträger zutreffen (Aarnio et al., 1999; Lynch et al., 2009; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). Andererseits ist nicht bekannt, in welchem klinischen Stadium das kolorektale Karzinom erstdiagnostiziert wurde. Geht man davon aus, dass dieses in einem schon fortgeschrittenen Stadium detektiert wurde und entsprechende Vorsorgemaßnahmen zur Früherkennung nicht möglich waren oder nicht wahrgenommen wurden, so muss das Erstmanifestationsalter womöglich nach unten korrigiert werden und würde damit wiederum besser mit einer vorliegenden *MSH6*-Mutation in Einklang zu bringen sein. Das Adenokarzinom der Nasenschleimhaut passt eher nicht in das übliche Spektrum HNPCC-assoziiierter Tumoren, jedoch kann für *MSH6*-Mutationsträger ein vermehrtes Vorkommen von atypischen Tumoren, wie z.B. Lungenkarzinomen beobachtet werden (Plaschke et al., 2004a). Inwieweit die wahrscheinlich ebenfalls vorliegende pathogene *MSH3*-Mutation die

Tumorgenese beeinflusst hat, kann aufgrund mangelnder klinischer Daten nicht abschließend geklärt werden.

Die Großmutter erkrankte im Alter von 68 Jahren an einem Nierenkarzinom. Dabei ist unklar, ob es sich um ein klassisches Nierenzellkarzinom oder um ein Urothelkarzinom des Nierenbeckens gehandelt hat. Während für ersteres keine Assoziation mit HNPCC beschrieben ist, ist das Risiko für das Auftreten eines Urothelkarzinoms bei HNPCC-Patienten erhöht (Lin et al., 1998; Umar et al., 2004). Auch ist die Möglichkeit eines sporadischen Auftretens dieses Karzinoms in Erwägung zu ziehen. Somit kann ab der Großeltern-Generation aufgrund mangelnder Daten nicht schlüssig nachverfolgt werden, ob die pathogenen MMR-Mutationen von Seiten der Großmutter oder des Großvaters stammen.

Ein Halbbruder der Indexpatientin verstarb im Alter von 39 Jahren an einem nicht näher bekannten Tumor des thorakalen Nervenstrangs, also einem Tumor des Nervensystems. Wenn man, wie oben geschildert, von einem Vorliegen der pathogenen Mutationen bei der verstorbenen Mutter der Indexpatientin ausgeht, so erscheint es ebenfalls naheliegend, dass auch der Halbbruder Träger dieser war, immerhin besteht bei HNPCC-Patienten ein erhöhtes Risiko für Tumoren des ZNS (Lin et al., 1998; Umar et al., 2004). Auch kann in dieser Konstellation über eine wie von Engelmann et al., 2000 statuierte Progression der Tumorgenese durch die möglicherweise zusätzlich vorliegende *MSH3*-Mutation spekuliert werden. Endgültige Schlussfolgerungen lassen sich aufgrund des unklaren Genotyps dennoch nicht ziehen.

Das Auftreten des Augentumors einer Halbschwester väterlicherseits kann als unabhängig von HNPCC gewertet werden, da diese Art von Tumor nicht zum typischen Spektrum assoziierter Krankheitsbilder zählt und des Weiteren auf väterlicher Seite kein Hinweis für ein Lynch-Syndrom besteht.

Der Onkel der Indexpatientin (Vater von 57037) ist aufgrund des autosomal-dominanten Erbgangs obligater Anlageträger für die pathogene *MSH6*- und möglicherweise auch für die nachgewiesene *MSH3*-Mutation. Diesbezüglich lagen uns keine genaueren Informationen zu molekulargenetischem Status und Klinik vor.

#### 4.1.2 Missense-Mutationen unklarer Pathogenität

##### 4.1.2.1 c.1258A>G (p.Ser420Gly) (rs55660516)

Der Basenaustausch c.1258A>G (p.Ser420Gly) wurde bei dem Patienten 42904 heterozygot gefunden.

Die Sequenzveränderung ist bisher noch nicht in der Datenbank HGMD registriert, konnte aber bei dbSNP und dem UCSC Genome Browser gefunden werden, allerdings ohne Angaben zu Heterozygoten- und Allelfrequenz. Im ExAC Browser findet sich eine *Minor Allele Frequency* (MAF) von 0,11%. In der *MSH3*-Analyse einer vorangegangenen Arbeit konnte diese Veränderung bei 40 untersuchten Personen nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der Datenlage scheint es sich bei der Veränderung c.1258A>G (p.Ser420Gly) um eine Missense-Mutation unklarer Pathogenität zu handeln. Diese wäre sowohl auf Spleißebene denkbar, was sich durch zusätzliche cDNA-Analysen weiter verfolgen ließe, wie auch auf Proteinebene, wo es durch den Einbau der in den biochemischen Eigenschaften zu Serin unterschiedlichen Aminosäure Glycin zu einer veränderten und funktionseinschränkenden Tertiärstruktur kommen könnte.

Auf Proteinebene lässt sich die Missense-Veränderung der Verbindungsdomäne von MSH3 zuordnen, die die Aminosäurepositionen 355 bis 551 umfasst (s. Einleitung).

Bei dem Patienten 42904 konnten zusätzliche Keimbahnveränderungen im *MSH3*-Gen nachgewiesen werden (s. Tab.18), deren klinische Relevanz unten diskutiert wird. Im Tumor des Patienten konnte die somatische pathogene Hotspotmutation c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) im *MSH3*-Gen heterozygot detektiert werden, welche ebenfalls später diskutiert wird. Diese könnte bei möglicher Pathogenität der gefundenen Keimbahnveränderung den Second Hit darstellen und zu einem Funktionsausfall des MSH3-Proteins im Tumor führen. Bekannt ist bei dem Patienten weiterhin die pathogene Keimbahnmutation c.2426\_2428delTAG (p.Val809Glufs\*) im *MSH6*-Gen sowie die unklare Missense-Veränderung c.274C>G (p.Leu92Val) (rs587779154) im *MSH2*-Gen. Bei sehr hoher evolutionärer Konservierung wurde letztere von *PolyPhen* als *probably damaging* eingestuft (Score: 0,973; Sensitivität: 0,60; Spezifität: 0,93). *SIFT* dagegen tolerierte den Aminosäureaustausch mit einem Score von 0,19. Laut *Alamut* ist keine Spleißstelle von der Veränderung betroffen. Im UCSC Genome Browser wird für diese



Veränderung eine Heterozygotenfrequenz von 0,0% aufgeführt, die MAF wird vom UCSC Genome Browser, dbSNP und ExAC gleichermaßen mit 0,007% angegeben. Somit wird die Sequenzveränderung c.274C>G (p.Leu92Val) zu diesem Zeitpunkt als Missense-Mutation unklarer Pathogenität klassifiziert. Aufgrund limitierter Tumor-DNA-Menge war es nicht möglich, das *MSH2*-Gen im Tumor des Patienten 42904 auf somatische pathogene Mutationen zu untersuchen, die bei möglicher Pathogenität der *MSH2*-Keimbahnveränderung einen potentiellen Second Hit darstellen würden.

Der Patient 42904 erkrankte im Alter von 39 Jahren an einem Sigmakarzinom. Für eine pathogene *MSH6*-Mutation ist dieses Erstmanifestationsalter äußerst früh und entspricht nicht der bisher bekannten Genotyp-Phänotyp-Korrelation mit einem mittleren Erkrankungsalter von 55 Jahren (Aarnio et al., 1999; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). Damit liegt in diesem Fall der Verdacht nahe, dass die Tumorgenese neben der krankheitsverursachenden *MSH6*-Mutation von einer zusätzlichen Variable beeinflusst wird. Der Patient 42904 weist mit den Missense-Veränderungen c.1258A>G (p.Ser420Gly) in *MSH3* und c.274C>G (p.Leu92Val) in *MSH2* gleich zwei Sequenzveränderungen unklarer Pathogenität auf, die beide als diese zusätzliche Variable in Frage kommen könnten. In beiden Fällen würde ein pathogener Charakter zu einer weiteren Funktionsbeeinträchtigung des MMR-Systems führen und die verstärkte Akkumulation postreplikativer DNA-Fehler ermöglichen, was, ähnlich der Ergebnisse von Edelmann et al., 2000 (s.o.), wiederum in ein schnelleres Fortschreiten der Tumorgenese münden würde. Duraturo et al., 2011 stellten, wie bereits oben beschrieben, die Hypothese auf, dass eine Mutation im *MSH3*-Gen nicht ausreicht, um die Tumorgenese zu initiieren, dass es aber durch die Kombination mit einer schwachen Variante im *MSH2*- oder *MLH1*-Gen zum Auftreten kolorektaler Karzinome kommt.

Wertet man die *MSH2*-Missense-Veränderung des Patienten 42904 als solch eine schwache Variante, so könnte sie in Kombination mit der Mutation in *MSH6* und ggf. mit der Missense-Veränderung im *MSH3*-Gen ein pathogenes Potential erhalten, was zusätzlichen Einfluss auf die Tumorgenese nimmt und durch die Defizienz der Heterodimere MutS $\alpha$  und MutS $\beta$  in einem früheren Erkrankungsalter resultieren würde. Für *MSH2*- bzw. *MLH1*-Mutationsträger geht man von einem mittleren Erkrankungsalter von 45 Jahren aus (Aarnio et al., 1999; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001) (Schwankungsbreiten: z.B. Vasen et al., 2001: 16-90 Jahre), dieses liegt somit wesentlich näher am Erkrankungsalter des

vorliegenden Patienten.

Abschließend scheint es somit als sehr wahrscheinlich, dass mindestens eine der beiden unklaren Sequenzveränderungen in *MSH2* bzw. *MSH3* neben der pathogenen *MSH6*-Mutation Einfluss auf die Tumorentstehung nimmt. Hinsichtlich der Familienanamnese des Patienten 42904 lagen keine näheren Informationen vor.

#### 4.1.2.2 c.2732T>G (p.Leu911Trp) (rs41545019)

Der Basenaustausch c.2732T>G (p.Leu911Trp) lag in Exon 20 beim Patienten 61287 heterozygot vor. In der Datenbank HGMD ist diese Sequenzveränderung bislang nicht registriert. dbSNP gibt eine MAF von 0,3% an. Laut UCSC Genome Browser ist die Base Thymin mit einer Allelfrequenz von 99,674% vertreten, Guanin dagegen nur mit 0,326%, die Heterozygotenfrequenz wird mit 0,3% angegeben. Im ExAC Browser ist eine MAF von 0,2% aufgeführt. Die Veränderung konnte bei keiner der untersuchten 40 Personen der vorangegangenen Arbeit gefunden werden.

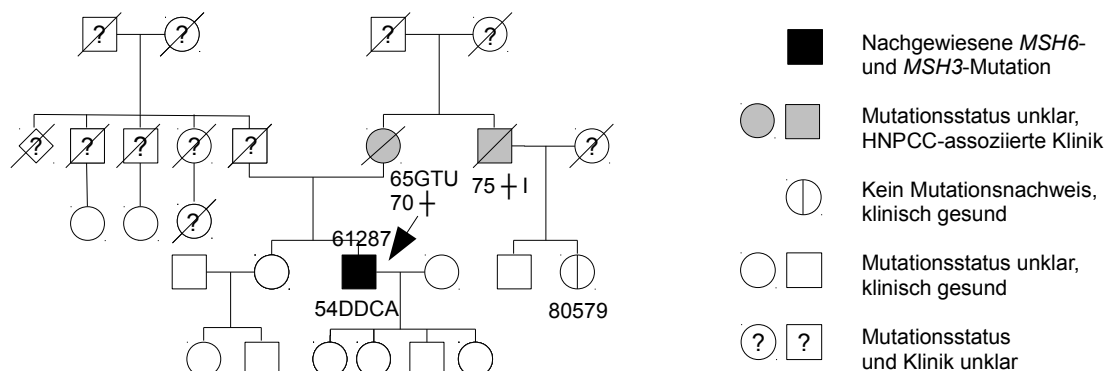
Die Vorhersagen der *In Silico*-Programme (s. Ergebnisteil), die evolutionäre Konservierung sowie die außerordentlich niedrige Heterozygoten- und Allelfrequenz für Guanin lassen vermuten, dass es sich bei der Missense-Mutation c.2732T>G (p.Leu911Trp) in jedem Fall um eine Sequenzveränderung unklarer klinischer Signifikanz handelt, die mit großer Wahrscheinlichkeit ein pathogenes Potential in sich birgt, welches wiederum auf Spleiß- oder Proteinebene existieren könnte. Auf Proteinebene fällt die Missense-Mutation in die C-terminale Domäne, die die Aminosäurepositionen 846 bis 1094 umfasst. Diese Domäne kann in zwei verschiedene Subdomänen untergliedert werden, die ATPase-Domäne und die Helix-turn-helix-Domäne. Letztere ist für die Kontaktbildung mit MSH2 im Heterodimer MutSβ von Bedeutung (s. Einleitung). Durch die Lokalisation der Missense-Veränderung c.2732T>G (p.Leu911Trp) in einer für die Proteinfunktion bedeutenden Domäne würde ein pathogener Charakter der Mutation möglicherweise zu einer entscheidenden Beeinträchtigung der Proteinfunktion führen.

Diese Hypothese deckt sich auch mit den Ergebnissen von Duraturo et al., 2011, die diese Sequenzveränderung bei zwei von 79 untersuchten Familien mit Lynch-Syndrom nachweisen konnten. Eine Indexpatientin erkrankte dabei im Alter von 63 Jahren an einem Endometriumkarzinom und im Alter von 68 Jahren an einem Kolonkarzinom. Beim anderen Indexpatienten manifestierte sich im Alter von 34 Jahren ein tubulo-villöses

Kolonadenom, im Alter von 42 Jahren ein Adenokarzinom des rechten Kolons und im Alter von 59 Jahren ein metachrones Kolonkarzinom. Wie bereits oben beschrieben mutmaßten die Forscher, dass die Kombination einer (potentiell) pathogenen Keimbahnmutation im *MSH3*-Gen und einer schwachen Sequenzveränderung im *MSH2*- oder *MLH1*-Gen zu einer Initiierung der Tumorgenese kolorektaler Karzinome führt. Genau wie in dieser Arbeit konnte die Sequenzveränderung bei keiner der 52 untersuchten Personen aus dem Kontrollkollektiv nachgewiesen werden.

Der Patient 61287 wies in der Keimbahn zusätzlich die *MSH3*-Varianten c.186\_187ins18bp (p.Ala62\_Pro63ins), c.359-7G>A und c.2846A>G (p.Gln949Arg) sowie im 5'-UTR-Bereich die Veränderungen c.1-152delC, c.1-144C>T und c.1-35A>G auf, die später diskutiert werden aber vermutlich als benigne einzustufen sind.

Bei diesem Patient ist außerdem die im *MSH6*-Gen lokalisierte, krankheitsverursachende Mutation c.3416delG (p.Gly1139Alafs\*6) bekannt. Im Tumor des Patienten konnten, mit Ausnahme der Keimbahnmutationen, weder im *MSH3*-Gen, noch im *MSH6*-Gen zusätzliche somatische Veränderungen nachgewiesen werden.



**Abb.14: Stammbaum der Familie des Indexpatienten 61287** (†=verstorben; DDCA=Dünndarmkarzinom, hier Jejunumkarzinom; GTU=gynäkologischer Tumor, nicht näher bekannt; I=Ileus; Zahl=Erstmanifestationsalter)

Der Indexpatient 61287 erkrankte im Alter von 54 Jahren an einem Dünndarmkarzinom, was etwa dem durchschnittlichen Erstmanifestationsalter für *MSH6*-Mutationsträger entspricht (Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). Allerdings wurde bei diesem Patienten bislang kein Karzinom des Kolorektums, sondern ein Jejunumkarzinom diagnostiziert. Die Auftretenswahrscheinlichkeit für Dünndarmtumoren ist zwar bei

HNPCC-Patienten erhöht, das gemittelte Lebenszeitrisko ist jedoch je nach Studie mit 1-4% relativ gering, dabei ist es für *MSH2*-Mutationen deutlich höher als für *MSH6*-Mutationsträger (Barrow et al., 2009; Bonadona et al., 2011).

Schulmann et al., 2005 untersuchten in ihrer Studie Patienten mit Dünndarmkarzinom und HNPCC. Bei den Patienten, die an einem Dünndarmkarzinom erkrankt waren, konnten sie dabei zeigen, dass dieses in 45% der Fälle als eine der ersten Tumormanifestationen auftrat, in der Mehrzahl etablierte sich dabei syn- oder metachron ein weiteres Karzinom. In 81% der Fälle konnte eine ursächliche MMR-Keimbahnmutation nachgewiesen werden, dabei in 37% im *MSH2*- und in 4% im *MSH6*-Gen.

Eine Assoziation von Dünndarmtumoren und Sequenzveränderungen im *MSH3*-Gen ist bislang nicht beschrieben.

Die beim Indexpatienten zusätzlich zur krankheitsverursachenden *MSH6*-Mutation gefundene *MSH3*-Missense-Mutation unklarer klinischer Signifikanz scheint somit zunächst keine eklatante Veränderung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu bewirken.

Geht man dennoch von einem pathogenen Charakter dieser Sequenzveränderung aus, so dürfte sie mindestens in einer Funktionseinschränkung oder sogar in einem Ausfall des MSH3-Proteins resultieren und daraus folgend zusammen mit dem fehlenden MSH6-Protein zu einem immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins führen, ähnlich dem Vorliegen einer pathogenen *MSH2*-Keimbahnmutation. Betrachtet man nun die Auftretenswahrscheinlichkeit von Dünndarmtumoren bei *MSH2*- und *MSH6*-Keimbahnmutationen, so kann man, wie exemplarisch an dem Patienten 61287 ersichtlich, darüber mutmaßen, inwiefern eine Kombination von zwei pathogenen Keimbahnmutationen in *MSH6* und *MSH3* nicht nur zu einem früheren Manifestationsalter (s.o.), sondern auch zu einer Veränderung des Tumorspektrums mit höherem Risiko für Karzinome außerhalb des Kolorektums hin zu demjenigen von *MSH2*-Mutationsträgern führt.

Zur möglichen Verifizierung dieser Theorie sind jedoch weitere Studien erforderlich, sodass die endgültige Rolle der potentiell pathogenen *MSH3*-Mutation c.2732T>G (p.Leu911Trp) bis auf weiteres ungeklärt bleibt.

Die verstorbene Mutter des Indexpatienten erkrankte im Alter von 65 Jahren an einem nicht näher bezeichneten gynäkologischen Tumor. Deren Bruder verstarb im Alter von 75 Jahren an einem Ileus. In beiden Fällen handelt es sich um HNPCC-assoziierte

Krankheitsbilder, das Manifestationsalter entspricht jedoch eher dem von sporadisch auftretenden Tumoren, welches mit ca. 69 Jahren angegeben wird (Aarnio et al., 1999; Lynch et al., 2009; Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). Dennoch erscheint es wahrscheinlich, dass der Indexpatient die krankheitsverursachende *MSH6*-Mutation mütterlicherseits geerbt hat und die Mutter und der Onkel entsprechend eines autosomal-dominanten Erbgangs ebenfalls Träger dieser Mutation waren. Man kann darüber spekulieren, inwiefern aufgrund mangelnder Vorsorgeuntersuchungen das Erstmanifestationsalter nach unten korrigiert werden muss, insbesondere wenn man als Ursache des Ileus beim Onkel ein fortgeschrittenes kolorektales Karzinom ansieht, und damit wieder näher am mittleren Erkrankungsalter für *MSH6*-Mutationsträger liegt. Dass die Mutter und der Onkel des Indexpatienten auch Träger der potentiell pathogenen *MSH3*-Mutation waren, erscheint zwar wahrscheinlich, kann aber aufgrund mangelnder Daten nicht eindeutig geklärt werden, falls dem so wäre, so scheint diese Veränderung, genauso wie beim Indexpatienten selbst, zumindest nicht in einer früheren Tumormanifestation zu resultieren.

Die Cousine 80579 lies sich als einziges Familienmitglied prädiktiv testen, bei ihr konnte keine der beiden Mutationen nachgewiesen werden, somit besteht kein erkennbar erhöhtes Darmkrebsrisiko.

Bei allen anderen Familienmitgliedern, insbesondere den Nachkommen des Indexpatienten, wäre eine diesbezügliche Diagnostik wünschenswert um einerseits die Vorsorgeuntersuchungen wenn nötig zu intensivieren und um andererseits eine bessere Einschätzung der gefundenen potentiell pathogenen *MSH3*-Keimbahnmutation treffen zu können.

#### 4.1.3 Deletionen und Insertionen unklarer Signifikanz in Exon 1

Die im Folgenden tabellarisch aufgeführten Deletionen und Insertionen wurden alle in Exon 1 des *MSH3*-Gens nachgewiesen. Sie beruhen jeweils auf einer Abwandlung eines sich wiederholenden Motivs mit der Basensequenz GSCYSCAGC (s. Abb.15). Wie nachfolgend dargestellt, sind auch in der Literatur diverse Veränderungen in Form von

Deletionen oder Insertionen in diesem Abschnitt zu finden, sodass bei unten aufgeführten Veränderungen von benignen Polymorphismen ausgegangen wird. Diese Tatsache erscheint mitunter insofern wahrscheinlich, als dass alle nachgewiesenen Deletionen und Insertionen auch in gesunden Kontrollprobanden und diversen Datenbanken gefunden werden konnten und als dass sie auf Proteinebene in keiner funktionellen Domäne lokalisiert sind, da die N-terminale Domäne des MSH3-Proteins erst ab AS-Position 217 beginnt.

Aufgrund der Tatsache, dass sich das Exon 1 des *MSH3*-Gens allerdings nur in zweiter Runde amplifizieren und auswerten lies, kann ein DNA-Polymerasefehler als Ursache für die unterschiedliche Abwandlung der repetitiven Motive jedoch letzten Endes nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

```

ATGTCTCGCCGGAAGCCTGCGTCGGGCGGCCTCGCTGCCTCCAGCTCAGC
M--S--R--R--K--P--A--S--G--G--L--A--A--S--S--S--A--
CCCTGCGAGGCAAGCGGTTTTGAGCCGATTCTTCCAGTCTACGGGAAGCC
-P--A--R--Q--A--V--L--S--R--F--F--Q--S--T--G--S--L
TGAAATCCACCTCCTCCTCCACAGGTGCAGCCGACCAGGTGGACCTGGC
--K--S--T--S--S--S--T--G--A--A--D--Q--V--D--P--G--
GCTGCAGCGGCTGCAGCGGCCGCAGCGGCCGCAGCGCCCCAGCGCCCC
A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--A--P--P--A--P--P--
AGCTCCCGCCTTCCCGCCCCAGCTGCCGCCGCACATA
-A-P--A--F--P--P--Q--L--P--P--H--I--

```

**Abb.15: Basen- und Aminosäuresequenz von Exon 1** (Motiv 1, Motiv 2, Motiv 3, Motiv 4, Motiv 5, Motiv 6, Motiv 7)

SV (cDNA)	SV (Protein)	rs-Nummer	Datenbanken	Literatur
c.162_179del 18bp	p.Ala57_Ala62del	rs201874762	dbSNP: MAF27,9 UCSC: HF32,0, MAF20,0 ExAC: kA	<u>Acharya et al., 1996:</u> 27bp-Deletion (Nukl229-255) → Verlust von 3/10 Motiven → Rekomb-/Replikationsfehler → keine funktionelle Konsequenz
c.186_187ins 18bp	p.Ala62_Pro63ins	rs70991168	dbSNP: kA UCSC: kA ExAC: MAF0,2	→ Nachweis auch in Ko → Polymorphismus
c.196_204del 9bp	p.Pro67_Pro69del	rs144629981	dbSNP: MAF31,0 UCSC: HF33,7, MAF21,4 ExAC: MAF41,4	<u>Nakajima et al., 1995:</u> 9bp-repetitiver Polymorphismus whd Motiv, 151Nukl nach ATG → variable Anzahl (3-7) HF57 → Proteinstruktur abh von Whd

**Tab.21: Tabellarische Darstellung der Deletionen und Insertionen unklarer Signifikanz in Exon 1**

(abh=abhängig; bp=Basenpaare; HF=Heterozygotenfrequenz (in %); kA=keine Angabe; Ko=Kontrollkollektiv; MAF=Minor Allele Frequency (in %); Nukl=Nukleotide; Pat=Patientenkollektiv; Rekomb-=Rekombinations-; SV=Sequenzveränderung; whd=wiederholendes; Whd=Wiederholung)

#### 4.1.4 Benigne Polymorphismen (SNPs)

In nachfolgender Tabelle sind alle exonischen Sequenzveränderungen in *MSH3* aufgeführt, die durch die hier vorliegenden Ergebnisse (s. Ergebnisteil), mittels Recherchen in den Datenbanken HGMD, dbSNP, UCSC Genome Browser und ExAC Browser sowie im Vergleich mit anderen Publikationen als benigne Polymorphismen (SNPs) zu werten sind und somit keine klinische Relevanz haben.

SV (cDNA)	SV (Protein)	rs-Nummer	Datenbanken	Vorh. Prom.	Literatur
c.178G>C	p.Ala60Pro	rs2001675	dbSNP: MAF2,1 UCSC: HF29, MAF17,6 ExAC: MAF4,2	-	-
c.235A>G	p.Ile79Val	rs1650697	HGMD (CM003459): NA Val dbSNP: MAF23,1, NA Ile UCSC: kA ExAC: MAF9,7	-	<u>Orimo et al., 2000:</u> NA Val, Assoz spor CRC m MSI, HF32 → SNP
c.2846A>G	p.Gln949Arg	rs184967	HGMD (CM076322) dbSNP: MAF14,5 UCSC: HF19, MAF13,2 ExAC: MAF12,7	29/40hz 11/40het Σ 40/40	<u>Berndt et al., 2007:</u> NA Arg, CRC-Risiko ↑ → SNP <u>Conde et al., 2009:</u> HF33,6(P), 29(Ko) MAF20(P), 17(Ko) → SNP
c.3133G>A	p.Ala1045Thr	rs26279	HGMD (CM076321): NA Thr dbSNP: MAF30,9 UCSC: HF42,9, MAF30,9 ExAC: MAF26,9	Σ 36/40	<u>Acharya et al., 1996:</u> NA Thr → SNP <u>Orimo et al., 2000:</u> NA Thr, HF34 → SNP <u>Conde et al., 2009:</u> HF45,1(P), 44,1(Ko), MAF35(P), 33(Ko) → SNP

**Tab.22: Tabellarische Darstellung der benignen Polymorphismen (SNPs)** (Assoz=Assoziation; CRC=Kolorektales Karzinom; HF=Heterozygotenfrequenz (in %); Ko=Kontrollkollektiv; MAF=*Minor Allele Frequency* (in %); MSI=Mikrosatelliteninstabilität; NA=native Aminosäure; P=Patientenkollektiv; Prom.=Promotion; SNP=*Single Nucleotide Polymorphism*; spor=sporadisch; SV=Sequenzveränderung; vorh.=vorherige; -=nicht vorhanden)

#### 4.1.5 Stille Sequenzveränderungen

In Tabelle 23 erfolgt eine Einschätzung der nachgewiesenen stillen Sequenzveränderungen. In Zusammenschau aller Befunde (vgl. auch Tab.15) ist von einer Benignität auszugehen. Ein pathogenes Potential, welches sich ausschließlich innerhalb des Spleißvorgangs manifestieren könnte, ist aufgrund der hohen Prävalenz auch bei gesunden Personen, der Vorhersagen von *Alamut* und der Ergebnisse anderer Forschungsgruppen als unwahrscheinlich anzusehen. Bei der stillen Sequenzveränderung c.165A>G (p.Ala55Ala) in Exon 1 kann wegen der nur möglichen Amplifikation in zweiter Runde auch ein DNA-Polymerasefehler nicht endgültig ausgeschlossen werden.



SV (cDNA)	SV (Protein)	rs-Nummer	Datenbanken	Vorherige Promotion	Literatur
c.165A>G	p.Ala55Ala	-	-	-	-
c.204T>G	p.Ala68Ala	rs1047489	dbSNP: MAF0,5 UCSC: kA ExAC: MAF0,5	-	<u>Acharya et al., 1996:</u> spleiß-neutral → SNP
c.693G>A	p.Pro231Pro	rs1805355	dbSNP: MAF10,2 UCSC: HF31,3, MAF18,3 ExAC: MAF12,6	Σ4/40	<u>Duraturio et al., 2011:</u> nur Pat m CRC <u>Hirata et al., 2008:</u> Assoz m Prostata-CA → SNP <u>Orimo et al., 2000:</u> Assoz m spor CRC m MSI HF49 → SNP

**Tab.23: Tabellarische Darstellung der stillen Sequenzveränderungen** (Assoz=Assoziation; CA=Karzinom; CRC=Kolorektales Karzinom; HF=Heterozygotenfrequenz (in %); m=mit; MAF=Minor Allele Frequency (in %); MSI=Mikrosatelliteninstabilität; Pat=Patienten; Pathol=Pathologien; SNP=Single Nucleotide Polymorphism; spleißassoz=spleißassoziierten; spor=sporadisch; SV=Sequenzveränderung; -=nicht vorhanden)

#### 4.1.6 Intronische Sequenzveränderungen

Im Folgenden werden die nachgewiesenen intronischen Keimbahnveränderungen im *MSH3*-Gen tabellarisch diskutiert. Grundsätzlich können intronische Sequenzveränderungen nur dann als pathogen betrachtet werden, wenn sie durch Veränderung bestimmter Spleißmotive den Spleißprozess der mRNA beeinflussen, was durch entsprechende cDNA-Analysen überprüft werden kann. Auch wenn für die in dieser Arbeit untersuchten Patienten keine cDNAs zur Verfügung standen, kann aufgrund der Angaben von *Alamut* (s. Tab.16), der Datenbanken und diverser Literatur sowie der Auftretenshäufigkeit der gefundenen intronischen Sequenzveränderungen am ehesten von benignen Varianten ausgegangen werden. Für die im intronischen Bereich von Exon 1 gefundenen Polymorphismen kann auch ein etwaiger Polymerasefehler nicht definitiv ausgeschlossen werden, da eine Amplifikation erst in zweiter Runde gelang.

SV (cDNA)	rs-Nummer	Datenbanken	Vorherige Promotion	Literatur
c.237+40G>T	-	kA	-	-
c.237+41G>A	-	kA	-	-
c.237+48G>A	-	kA	-	-
c.359-7G>A	rs1382543	dbSNP: MAF30,5 UCSC: HF34,1, MAF23,8 ExAC: MAF26,5	-	-
c.1453+61A>C	rs32952	dbSNP: MAF31,6 UCSC: HF44,4, MAF32,6 ExAC: -	$\Sigma 27/40$	-
c.3001-30_33delTGA	rs34486413	dbSNP: kA UCSC: kA ExAC: -	$\Sigma 21/40$	<u>Duraturio et al., 2011:</u> $\Sigma 44/79$ (Pat) $\Sigma 17/52$ (Ko)
c.3001-22T>A	rs1805353	dbSNP: MAF9,5 UCSC: HF12,1, MAF7,0 ExAC: MAF8,8	$\Sigma 6/40$	<u>Duraturio et al., 2011:</u> $\Sigma 9/79$ (Pat) (11,4%) $\Sigma 7/52$ (Ko) (13%)

**Tab.24: Tabellarische Darstellung der intronischen Sequenzveränderungen** (HF=Heterozygotenfrequenz (in %); kA=keine Angabe; Ko=Kontrollkollektiv; MAF=Minor Allele Frequency (in %); Pat=Patientenkollektiv; SV=Sequenzveränderung; - =nicht vorhanden)

#### 4.1.7 Sequenzveränderungen im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1

Im Folgenden werden die im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1 gefundenen Sequenzveränderungen graphisch dargestellt. Diese haben zwar hinsichtlich des Spleißvorgangs keine klinische Relevanz, da sie vor dem Startcodon lokalisiert sind, allerdings könnten sie theoretisch als regulierende Promotormutationen fungieren und somit die Genexpression von *MSH3* beeinflussen. Um eine solche potentielle Beeinflussung verifizieren zu können, wären weiterführende cDNA-Analysen nötig, welche in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Der Aufbau des *MSH3*-Promotors wurde in der Einleitung beschrieben, die Promotorsequenz ist in nachfolgender Abbildung dargestellt (nach Shimada et al., 1989). Sie enthält vier GC-Boxen, wobei die beiden mittleren in Interaktion mit zwei Initiatorelementen für den Transkriptionsstart verantwortlich sind (Shinya und Shimada, 1994).

TAGCGAACCAACCATGACAGCAGCGGGAGGACCTCCGAGCCCGCTCGTTACAGCAG  
 AACGCGCGGTCAAGTTTGGCGCGAAATTG**TGGCGGC****CGCCCC****CTCGTCCC****CAT**  
**TTGTGCAGGCGAGGC****CGCCCC****CGCCC****GGC****CACGCAGGGTCGCGGCGTGCT**  
**CGCGCCCG**CAGACGCCTGGGAACTGCGGCCGCGGG**CT**CGCGCTCCT**CGCC****AGGCCC**  
 TGCCGCCGGGCTGCCATCCTTGCCCTGCC**ATG**TCTCGCCGGA

**Abb.16: MSH3-Promotorsequenz innerhalb des nicht-kodierenden Bereichs von Exon 1 und Lokalisation der gefundenen Sequenzveränderungen im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1**  
 (fett=Promotorsequenz; lila=GC-Box 1; lila=GC-Boxen 2-4; ATG=Startcodon; gelb=abweichende Basen der mRNA unter NM: 002439.4 im Vgl. zu Shimada et al., 1989; **C**=c.1-152delC; **C**=c.1-144C>T; **C**=c.1-126C>T; **C**=c.1-124C>T; **C**=c.1-116delC; **C**=c.1-111C>T; **C**=c.1-50C>T; **C**=c.1-39C>T; **A**=c.1-35A>G)

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, sind zwei der gefundenen Veränderungen innerhalb der funktionell wichtigen GC-Boxen lokalisiert, wodurch eine mögliche Beeinflussung der Transkription resultieren könnte. Nachdem aber die meisten Sequenzveränderungen, insbesondere auch diese, sowohl bei Patienten, als auch bei gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden konnten (s. Tab.17), ist primär von benignen Polymorphismen auszugehen. Auch sind einige der Veränderungen in den herangezogenen Datenbanken aufgeführt (s. Tab.25).

SV (cDNA)	rs-Nummer	Datenbanken
c.1-152delC	-	-
c.1-144C>T	rs10168	dbSNP: MAF22,8 USCS: kA ExAC: MAF26,7
c.1-126C>T	-	-
c.1-124C>T	-	-
c.1-116delC	-	-
c.1-111C>T	-	-
c.1-50C>T	rs2250063	dbSNP: MAF26,3 UCSC: HF32,2, MAF19,9 ExAC: MAF34,3
c.1-39C>T	rs1105525	dbSNP: MAF12,1 UCSC: kA ExAC: MAF20,0
c.1-35A>G	rs1105524	dbSNP: MAF23,9 UCSC: kA ExAC: MAF32,6

**Tab.25: Tabellarische Darstellung der Sequenzveränderungen im 5'-UTR-Bereich von Exon 1**  
(HF=Heterozygotenfrequenz (in %); kA=keine Angabe; MAF=Minor Allele Frequency (in %);  
SV=Sequenzveränderung; - =nicht vorhanden)

#### 4.2 Diskussion der im *MSH3*- und *MSH6*-Gen gefundenen somatischen Sequenzveränderungen

Im Folgenden werden die im Tumorgewebe gefundenen Sequenzveränderungen auf ihre klinische Relevanz hin diskutiert. Dabei wurde, wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, aufgrund limitierter Tumor-DNA-Mengen der Indexpatienten eine gewisse Selektion der Untersuchungen vorgenommen. Primär wurden zum einen die entsprechenden Exons von *MSH3* und *MSH6* analysiert, wo in der Keimbahn eine (potentiell) pathogene Mutation detektiert werden konnte. Ziel hierbei war der Nachweis eines möglichen *Loss of Heterozygosity* (LOH) im Tumorgewebe. Zum anderen wurden die Exons beider Gene mit repetitiven Sequenzmotiven (in Form von Mononukleotidruns) untersucht, die bei einem MMR-Defekt als Prädilektionsstellen für somatische Mutationen gelten. Vorrangiges Ziel der Tumoranalysen war der Nachweis einer jeweiligen Second Hit-Mutation mit resultierendem Funktionsausfalls des entsprechenden Proteins im Tumor.

Grundsätzlich können somatische Second Hit-Mutationen hinsichtlich einer zusätzlichen Keimbahnmutation *in cis*, d.h. auf dem selben Allel oder *in trans*, d.h. auf verschiedenen Allelen lokalisiert sein. Zu einem Ausfall des entsprechenden Proteins käme es dabei nur in Folge einer *in trans*-Verteilung zweier pathogener Mutationen, weil nur in dieser Konstellation beide Allele pathogen verändert sind und somit ein Funktionsverlust des entsprechenden Proteins resultiert (Lewin, 1997). In Tumor-DNAs sind aufgrund der starken Fragmentierung nur PCRs von einer Größe bis maximal 500bp möglich. Aufgrund dieser Tatsache kann die Allelverteilung von Second Hit-Mutationen im Tumor nur dann spezifiziert werden, wenn sowohl die Keimbahn-, als auch die somatische Mutation im selben Exon lokalisiert sind. Nachdem dies in den hier untersuchten Patienten allerdings nicht der Fall war, konnte die Allelverteilung von gefundenen somatischen Mutationen im Tumor somit nicht hinreichend geklärt werden.

Diskutiert werden im Folgenden nur (potentiell) pathogene Mutationen, bei allen anderen nachgewiesenen Sequenzveränderungen (s. Tab.19) ist von benignen Polymorphismen auszugehen, denen keine klinische Relevanz zukommt und die deshalb hier nicht speziell aufgeführt sind.

#### 4.2.1 Pathogene Mutationen

##### 4.2.1.1 c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32)

Die somatische Deletionsmutation c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32), die bei den Patienten 42904, 48064 und 60406 im *MSH3*-Gen nachgewiesen werden konnte, ist aufgrund des Frameshifts als pathogen einzustufen und dürfte in Kombination mit einer weiteren pathogenen Keimbahnmutation im *MSH3*-Gen zu einem Funktionsausfall des MSH3-Proteins im Tumor führen.

Während bei der Patientin 60406 keine relevante Keimbahnmutation im *MSH3*-Gen detektiert werden konnte, wies der Patient 42904 die Missense-Veränderung c.1258A>G (p.Ser420Gly) in Exon 8 des *MSH3*-Gens auf, die oben als Veränderung unklarer klinischer Signifikanz mit potentiell pathogenem Charakter eingestuft wurde. Bei der Patientin 48064 konnte die als pathogen anzusehende Deletionsmutation c.1035delT (p.Leu347\*) in der Keimbahn im *MSH3*-Gen nachgewiesen werden. Für die Patientin 48064 bedeutet das

Vorliegen von insgesamt zwei pathogenen Mutationen im *MSH3*-Gen im Tumorgewebe somit unter Voraussetzung einer Allelverteilung *in trans* einen Funktionsausfall des MSH3-Proteins im Tumor. Geht man von einer Pathogenität der *MSH3*-Keimbahnveränderung des Patienten 42904 aus, so gilt dieselbe Annahme, wie bei Patientin 48064. Nachdem bei Patientin 60406 keine pathogene *MSH3*-Keimbahnmutation gefunden werden konnte, liegt bei dieser Patientin mit der somatischen Deletion nur eine nachgewiesene krankhafte Veränderung im Tumor vor, wodurch die MSH3-Proteinfunktion zumindest noch zur Hälfte erhalten sein dürfte. In allen Fällen weist die gefundene Hotspot-Mutation allerdings auf eine genetische Instabilität hin, die durch den bestehenden MMR-Defekt aufgrund der ursächlich bestehenden pathogenen *MSH6*-Mutation verursacht wird.

Malkhosyan et al., 1996 konnten detektieren, dass diese Mutation im (A)<sub>8</sub>-Trakt des *MSH3*-Gens einem Hotspot für die Manifestation von Frameshift-Mutationen in MSI-Tumoren entspricht. Dabei konnten die Wissenschaftler nur Deletionen von einer Base in diesem Trakt nachweisen, was sich mit den Befunden dieser Arbeit deckt. Diese Sequenzveränderung konnte nicht nur in kolorektalen Karzinomen gefunden werden, sondern auch in MSI-Tumoren von Magen, Pankreas, Uterus und Prostata. Demzufolge wurde diskutiert, dass dieses häufige Event spezifisch mit MSI-Tumoren assoziiert ist und dass Mutationen in dieser repetitiven Basenabfolge bei einem MMR-Defekt zur genomischen Instabilität von Tumor-Zellen beitragen, mit dem Resultat einer stärkeren Akkumulation von weiteren Mutationen.

Risinger et al., 1996 konnten die somatische Frameshift-Mutation in Endometriumkarzinomen nachweisen, wobei sie ebenfalls der Meinung waren, dass *MSH3* eine gewisse Rolle in der Kontrolle der Mikrosatelliteninstabilität in menschlichen Tumoren spielt.

Die Deletionsmutation wurde auch von Akiyama et al., 1997 gefunden. Der Nachweis gelang dabei nur in Tumoren mit MSI, in mikrosatellitenstabilen Karzinomen konnte die Veränderung nicht entdeckt werden. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit des (A)<sub>8</sub>-Trakts in Exon 7 des *MSH3*-Gens mit einem Mikrosatelliten und dem gleichzeitigen Vorliegen einer Keimbahnmutation im *MLH1*- oder *MSH2*-Gen bei den untersuchten Patienten, schlossen die Forscher als Ursache der Deletion ebenfalls auf eine genetische Instabilität. Auch Yin et al., 1997 screenen den (A)<sub>8</sub>-Trakt des *MSH3*-Gens in gastrointestinalen Tumoren mit MSI im Vergleich zu mikrosatellitenstabilen Tumoren. Dabei gelang der

Nachweis von Frameshift-Mutationen primär bei sporadischen Kolon- und Magenkarzinomen mit MSI; die Hälfte der untersuchten HNPCC-Tumoren mit MSI wies dabei Veränderungen in diesem oder dem weiter unten aufgeführten (C)<sub>8</sub>-Trakt des *MSH6*-Gens auf. Somit vermuteten Yin et al., 1997, dass diese Mutationen auch eine wichtige Rolle bei mikrosatelliteninstabilen sporadischen Tumoren des Gastrointestinaltrakts spielen und dass diese Hotspot-Mutationen durch den Frameshift die Proteinfunktion beeinträchtigen.

Plaschke et al., 2004b untersuchten das Auftreten dieser und anderer somatischer *MSH3*-Mutationen bei *MLH1*-defizienten kolorektalen Karzinomen, wobei sie in 50% einen *MSH3*-Verlust feststellen konnten, den sie mit einer Progression der Tumorgenese assoziierten.

Diese Forschungsergebnisse decken sich mit den Befunden der hier untersuchten Patienten: sie weisen aufgrund der pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation eine MSI, wie sie für das Lynch-Syndrom typisch ist, im Tumor auf, auch kann über eine Progression der Tumorgenese durch die gefundene Hotspot-Mutation spekuliert werden.

#### 4.2.1.2 c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*1) (rs267608078)

Die pathogene Nonsense-Deletion c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*1) im *MSH6*-Gen konnte in den Datenbanken dbSNP und ExAC Browser gefunden werden.

Für die Patientinnen 48064 und 51560 (Endom-CA) wurde mit dieser pathogenen somatischen Hotspot-Mutation im *MSH6*-Gen unter Voraussetzung einer *in trans*-Lokalisation der Second Hit im Tumor gefunden, der in Kombination mit der jeweils bekannten krankheitsverursachenden *MSH6*-Keimbahnmutation den Funktionsverlust und immunhistochemischen Ausfall des MSH6-Proteins im Tumorgewebe erklärt.

Während bei der Patientin 51560 in der Keimbahn keine relevante *MSH3*-Mutation nachgewiesen wurde, kommt es bei der Patientin 48064 zusätzlich zu einem Funktionsausfall des MSH3-Proteins (s.o.). Der Funktionsverlust beider MMR-Proteine führt nicht nur zu einer vermutlich erheblichen Beeinträchtigung der postreplikativen DNA-Reparatur, zusätzlich hat das MSH2-Protein, das sowohl mit MSH6 im Heterodimer MutS $\alpha$ , wie auch mit MSH3 im Komplex MutS $\beta$  interagieren kann (Jiricny und Nyström-Lahti, 2000), keinen Bindungspartner mehr, was zu einem Zugrundegehen dieses Proteins

führt und dessen fehlenden immunhistochemischen Nachweis erklärt (s. Abschnitt 4.3).

Die somatische Deletionsmutation c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*1) im *MSH6*-Gen wurde von verschiedenen Wissenschaftlern in unterschiedlichem Zusammenhang beschrieben.

Malkhosyan et al., 1996 detektierten mit dieser Frameshift-Mutation, genauso wie mit der bereits oben beschriebenen (A)<sub>8</sub>-Trakt-Veränderung im *MSH3*-Gen, eine Hotspot-Mutation in MSI-Tumoren. Im (C)<sub>8</sub>-Trakt des *MSH6*-Gens konnten die Wissenschaftler dabei sowohl Insertionen wie auch Deletionen von einer Base nachweisen und genauso wie oben eine spezifische Assoziation dieser Veränderungen mit MSI-Tumoren mit Beitrag zu einer zunehmenden genomischen Instabilität herstellen.

Akiyama et al., 1997 konnten die Instabilität im (C)<sub>8</sub>-Trakt teilweise in mikrosatelliteninstabilen Tumoren nachweisen, während sie in Karzinomen mit Mikrosatellitenstabilität nicht zu finden war. Interessanterweise wurde diese *MSH6*-Mutation aber nur etwa halb so häufig gefunden, wie die ebenfalls untersuchte *MSH3*-Mutation, die oben beschrieben ist.

Auch von Yin et al., 1997 wurde das Auftreten dieser beiden Hotspot-Mutationen in sporadischen MSI- und MSS-Tumoren des Gastrointestinaltrakts erforscht, hierbei konnten, wie ebenfalls oben aufgeführt, die Hotspot-Mutationen in beiden Genen gleichermaßen bei MSI-Tumoren gefunden werden.

Schließlich untersuchten Plaschke et al., 2004b das Vorliegen dieser Mutationen in *MLH1*-defizienten kolorektalen Karzinomen. Im Unterschied zu den oben dargestellten Ergebnissen für das *MSH3*-Gen konnten Sequenzveränderungen im (C)<sub>8</sub>-Trakt des *MSH6*-Gens dabei nicht häufiger gefunden werden, als in einer Vergleichsgruppe von *MSH2*-defizienten Tumoren.

Alle Forschungsergebnisse implizieren einen Zusammenhang der *MSH6*-Hotspot-Mutation mit dem Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität im Tumor, wie es auch bei den Patientinnen 48064 und 51560 der Fall ist.

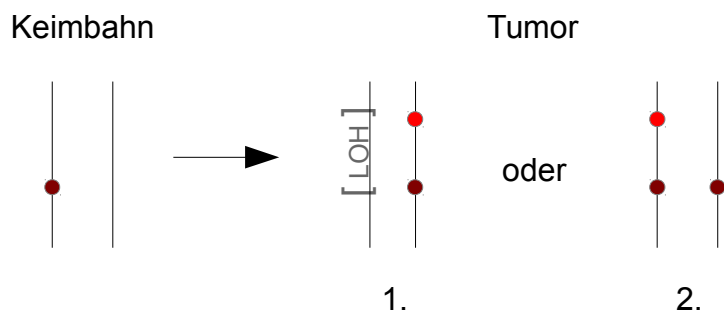
#### 4.2.1.3 c.1035delT (p.Leu347\*)

Die heterozygote Keimbahnmutation c.1035delT (p.Leu347\*) der Patientin 48064 in Exon 7 des *MSH3*-Gens wurde in deren Tumorgewebe homozygot im Sinne eines LOH, der vermutlich auf einen Allelverlust zurückzuführen ist, nachgewiesen, da eine zweite



somatische Mutation an gleicher Stelle als unwahrscheinlicher anzusehen ist (s. Abb.17 1.). Die zusätzlich im gleichen Exon vorhandene somatische Hotspot-Mutation c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) (s.o.) ist bei Vorliegen eines Allelverlusts nur in einem Teil der Tumorzellen vorhanden, wodurch ihr Auftreten als Mosaik erscheint. Theoretisch, wenn auch unwahrscheinlich, wäre denkbar, dass sich die bekannte Keimbahnmutation ohne das Vorliegen eines Allelverlusts im Tumor auf dem zweiten Allel in Form einer somatischen Mutation erneut manifestiert, was das homozygote Vorliegen der Mutation c.1035delT (p.Leu347\*) im Tumor ebenfalls erklären würde (s. Abb.17 2.).

Die Mutation c.1035delT (p.Leu347\*) ist, wie oben diskutiert, als pathogen anzusehen; deren nun homozygotes Vorliegen im Tumor bedeutet einen Funktionsausfall des MSH3-Proteins. Somit weist die Patientin 48064 neben der pathogenen Keimbahnmutation zwei krankhafte somatische Sequenzveränderungen im *MSH3*-Gen auf, wobei jede für sich allein schon den Funktionsverlust von MSH3 erklären würde. In jedem Fall scheint bei dieser Patientin das MMR-System stark beeinträchtigt zu sein, was sich vermutlich, wie oben diskutiert, durch die neben der pathogenen *MSH6*-Mutation vorliegende zusätzliche pathogene *MSH3*-Keimbahnmutation erklären lässt.



- Pathogene Keimbahnmutation c.1035delT (p.Leu347\*) der Patientin 48064 im *MSH3*-Gen
- Pathogene somatische Mutation c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) der Patientin 48064 im *MSH3*-Gen

**Abb.17: Darstellung der möglichen Mutationsverhältnisse der Patientin 48064**

Plaschke et al., 2004b konnten neben der oben beschriebenen Frameshift-Mutation c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) einen LOH im *MSH3*-Gen als zweiten pathogenen Mutationstyp in Geweben von *MLH1*-defizienten kolorektalen Karzinomen nachweisen,

der mitunter zu einer biallelischen Inaktivierung des *MSH3*-Gens führte, was ihrer Ansicht nach wiederum für eine Progression der Tumorgenese sorgt und sich mit den Befunden der vorliegenden Patientin 48064 deckt.

#### 4.2.2 Missense-Mutation unklarer Pathogenität c.3413G>A (p.Gly1138Glu)

Die somatische Missense-Veränderung c.3413G>A (p.Gly1138Glu) in *MSH6* konnte ausschließlich bei der Patientin 60406 heterozygot detektiert werden.

In den Datenbanken HGMD, dbSNP, UCSC Genome Browser und ExAC Browser ist sie nicht aufgeführt. Der Aminosäureaustausch ist innerhalb der C-terminalen Domäne des MSH6-Proteins und dort genauer im P-Loop mit ATPase-Aktivität lokalisiert (InterPro), wodurch eine funktionelle Beeinträchtigung der Proteinfunktion, besonders unter Berücksichtigung der Analysen von *PolyPhen* und *SIFT* (s. Tab.19), zu vermuten ist.

Bei der Missense-Mutation c.3413G>A (p.Gly1138Glu) handelt es sich somit in jedem Fall um eine somatische Veränderung unklarer klinischer Signifikanz mit möglichem pathogenen Potential. Geht man von einem solchen aus, so würde diese Veränderung bei der Patientin 60406, unter der Voraussetzung einer *in trans*-Allelverteilung, dem Second Hit im Tumor entsprechen, der zusammen mit der bekannten krankheitsverursachenden *MSH6*-Keimbahnmutation den Funktionsverlust und immunhistochemischen Ausfall des MSH6-Proteins erklärt.

Zusammenfassend konnte bei der Patientin 60406 zwar die für MSI-H-Tumoren übliche somatische *MSH6*-Hotspot-Mutation c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*1) nicht gefunden werden, dafür wies die Patientin im Tumor jeweils heterozygot zwei Missense-Veränderungen (c.3208G>A (p.Gly1070Ser) und c.3413G>A (p.Gly1138Glu)) und einen stillen Basenaustausch (c.3303G>A (p.Lys1101Lys)) im *MSH6*-Gen auf. Diese Veränderungen zeugen von einer starken Beeinträchtigung des MMR-Systems mit der fehlenden Fähigkeit, Basen-Basen-Fehlpaarungen zu erkennen und zu reparieren.

Es muss allerdings betont werden, dass sich die Tumor-DNA dieser Patientin erst in zweiter Runde amplifizieren ließ und auch die Bestätigungs-PCR nur aus der schon bestehenden ersten Runde möglich war, sodass nicht 100%ig ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei den gefundenen Veränderungen um DNA-Polymerasefehler der ersten Amplifikationsrunde handelt; auf der anderen Seite ist es als eher unwahrscheinlich

anzusehen, dass dabei gleich drei Fehler zu verzeichnen sind.

#### 4.3 Hypothesen für den unklaren immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins

In dieser Arbeit wurden zehn verschiedene Patienten näher untersucht, die bei einer bekannten pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation und des daraus resultierenden immunhistochemischen Ausfalls des MSH6-Proteins im Tumor zusätzlich, trotz Ausschluss einer pathogenen *MSH2*-Keimbahnmutation, einen reduzierten oder fehlenden immunhistochemischen Nachweis des MSH2-Proteins zeigten (s. Tab.26). Als Ursache für diesen MSH2-Ausfall sind verschiedene Hypothesen denkbar, die im Folgenden unter Berücksichtigung der oben beschriebenen gefundenen Mutationen diskutiert werden.

Patient	Klinik	MSI	IHC MSH2	IHC MSH6
42904	39J Sigma-CA	MSI-H (4+)	<5% = Ausf.	neg
46756	67J Coecum-CA	MSI-H (3+)	70% pos	neg
	67J Endom-CA	MSS	neg	neg
	67J Urothel-CA	MSI-H (2+1LOH)	neg	neg
48064	47J Rektum-CA	MSI-H	neg	neg
51560	58J Coecum-CA	MSI-H (3+)	>80% pos	neg
	58J Colon-CA (re. Flexur)	MSI-H (3+)	>90% pos	neg
	60J Endom-CA	MSI-H (2+)	neg	neg
55576	39J Colon asc.-CA	MSI-H (4+)	60% = part. Ausf.	neg
58953	40J Colon asc.-CA	MSI-H n.V.	1-10% = Ausf.	neg
	40J Appendix-CA	kA	kA	kA
60406	68J Coecum-CA	MSI-H (5+)	neg	neg
61287	54J Jejunum-CA	MSI-H	1-10% = Ausf.	neg
61628	47J Colon-CA	MSI-H	neg	neg
78712	33J Colon desc.-CA	MSI-H (2+)	neg	neg
B964A	kA	MSI-H	pos	pos

**Tab.26: Befundkonstellation der untersuchten Patienten** (angegebenes Alter=Tumordiagnosealter; asc.=ascendens; Ausf.=Ausfall; CA=Karzinom; desc.=descendens; Endom=Endometrium; IHC=Immunhistochemie; kA=keine Angabe; LOH=Loss of Heterozygosity; J=Jahre; MSI=Mikrosatelliteninstabilität; MSI-H=hohe Mikrosatelliteninstabilität; MSS=Mikrosatellitenstabilität; neg=negativ; n.V.=nach Verdünnung; part.=partiell; pos=positiv; re.=rechts)

Wie aus Tabelle 26 ersichtlich ist, erkrankten die Patientinnen 46756 und 51560 jeweils an multiplen Karzinomen, von denen aber nicht alle einen immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins zeigten. So fehlte der entsprechende Nachweis im Endometrium- und Urothelkarzinom der Patientin 46756, in deren Coecumkarzinom war die Immunhistochemie des MSH2-Proteins jedoch zu 70% positiv. In allen drei Karzinomen dieser Patientin war der immunhistochemische Nachweis des MSH6-Proteins negativ. Ähnliches galt für die Patientin 51560. Hier fehlte der MSH2-Nachweis im Endometriumkarzinom, in den beiden Kolonkarzinomen war er jedoch zu 80 bzw. 90% positiv. In allen drei Tumoren fehlte wiederum der immunhistochemische Nachweis des MSH6-Proteins. Diese unterschiedlichen Befundkonstellationen in den verschiedenen Tumoren derselben Patientinnen lassen eine somatische Ursache für den partiellen

immunhistochemischen MSH2-Ausfall vermuten, da bei einem pathogenen Keimbahnereignis alle drei Tumoren dieselbe Befundkonstellation aufweisen müssten. Insofern erscheint es auch als nicht überraschend, dass in der Keimbahn der Patientinnen 46756 und 51560 im *MSH3*-Gen keine pathogene Mutation als Erklärung für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall gefunden werden konnte. Interessanterweise zeigte sich bei der Patientin 46756 im Endometriumkarzinom ein immunhistochemisches Fehlen des MSH2-Proteins, obwohl in diesem Tumor keine Mikrosatelliteninstabilität vorlag. Ferner konnte im Urothelkarzinom der Patientin 46756, wie aus Tabelle 26 ersichtlich, extern ein LOH unbekannter Lokalisation nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den zehn Indexpatienten wurde die Patientin B964A aus Heidelberg in der Keimbahn des *MSH3*-Gens untersucht. Diese wies ohne Mutationsnachweis in einem der MMR-Gene sowie ohne immunhistochemischen Ausfall eines MMR-Proteins im Tumor, eine Mikrosatelliteninstabilität in den analysierten Dinukleotiden auf. Als mögliche Ursache für diese MSI erschien eine pathogene *MSH3*-Keimbahnmutation denkbar. Diese konnte allerdings nicht bestätigt werden.

#### 4.3.1 Pathogene Keimbahnmutation im *MSH6*- und *MSH3*-Gen und jeweilige somatische Second Hit-Mutation im Tumor als Ursache für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall

Das MSH2-Protein bildet im Rahmen der postreplikativen DNA-Reparatur jeweils einen heterodimeren Komplex mit dem MSH6-, wie auch zu einem geringeren Anteil mit dem MSH3-Protein. MutS $\alpha$ , bestehend aus MSH2 und MSH6, ist dabei für die Erkennung von Basenfehlpaarungen und von 1-Basenpaar-Insertions-Deletionsschleifen verantwortlich. Das Heterodimer MutS $\beta$  aus MSH2 und MSH3 ist in der Lage, Insertions-Deletionsschleifen aus zwei bis acht ungepaarten Nukleotiden zu erkennen (Genschel et al., 1998; Jiricny und Nyström-Lahti, 2000).

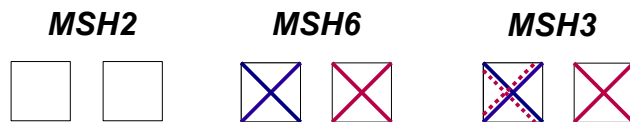
Unter normalen Bedingungen scheint das MSH2-Protein präferentiell mit MSH6 zu interagieren, während MSH3 in geringerer Menge exprimiert wird. Kommt es dagegen zu einem Funktionsverlust des MSH6-Proteins, so ist das zu MutS $\alpha$  z.T. redundante Heterodimer MutS $\beta$  stärker ausgeprägt (Marra et al., 1998).

Liegt neben einer pathogenen Keimbahnmutation im *MSH6*-Gen nun zusätzlich eine ebenfalls pathogene *MSH3*-Keimbahnmutation vor, so kommt es, unter der Voraussetzung

eines jeweiligen Second Hits im Tumorgewebe, zu einem Funktionsverlust und fehlenden immunhistochemischen Nachweis des MSH6- und des MSH3-Proteins. Aufgrund des Wegfalls seiner beiden Bindungspartner liegt das MSH2-Protein nun alleine vor, es kann seine Funktion nicht mehr erfüllen und degradiert. In dieser Konstellation würde sich der immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins im Tumorgewebe der untersuchten Patienten erklären lassen.

Diese Hypothese erschien uns dabei am wahrscheinlichsten, sodass sich die durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen primär auf eine Mutationsanalyse des *MSH3*-Gens fokussierten.

Die Patientin 48064 wies neben der bekannten pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation c.3969\_3979delTGAGAAGATGA (p.Phe1323Leufs\*13) die nach unserem Wissen erste mit dem Lynch-Syndrom assoziierte pathogene *MSH3*-Keimbahnmutation c.1035delT (p.Leu347\*) auf. Zusätzlich konnten im Tumor dieser Patientin mit der Hotspotdeletion c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*1) in Exon 7 und dem homozygoten Vorliegen der Keimbahnmutation c.1035delT (p.Leu347\*) ebenfalls in Exon 7 im Sinne eines LOH zwei pathogene somatische *MSH3*-Mutationen und mit der Hotspotdeletion c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) in Exon 5 eine pathogene somatische *MSH6*-Mutation nachgewiesen werden. Aufgrund der starken Fragmentierung in Tumor-DNAs war es wegen der großen Entfernung zwischen der bekannten *MSH6*-Keimbahnmutation und der gefundenen somatischen *MSH6*-Hotspotdeletion nicht möglich, die Allelverteilung der beiden Mutationen zu definieren (*in cis* bzw. *in trans*). Somit kann nur vermutet werden, dass die *MSH6*-Hotspotdeletion im Tumor gegenüber der bekannten Keimbahnmutation *in trans* lokalisiert ist und somit den Second Hit im Tumorgewebe darstellt. Dieser könnte sich aber ebenso an anderer Stelle im *MSH6*-Gen befinden, was aufgrund der in dieser Arbeit limitierten Analysen des Tumorgewebes nicht verifiziert werden konnte. Für das *MSH3*-Gen wurde allerdings in jedem Fall, unabhängig von der Konstellation der nachgewiesenen somatischen *MSH3*-Mutationen, der Second Hit im Tumor der Patientin 48064 gefunden (s. Abb.18).



**Abb.18: Mutationskonstellation der Patientin 48064** (Vierecke=Allele; **blau**=pathogene Keimbahnmutation; **rot**=pathogene somatische Mutation; **rot gestrichelt**=Mosaik der Hotspotdeletion wegen LOH von Exon 7)

Somit resultiert ein jeweils biallelischer Funktionsverlust des MSH3- und MSH6-Proteins im Rektumkarzinom der Patientin 48064 und führt dadurch aufgrund eines fehlenden Bindungspartners höchstwahrscheinlich zu einem Zugrundegehen des MSH2-Proteins, was dessen negatives immunhistochemisches Ergebnis im Tumor dieser Patientin erklärt.

Bei dem Patienten 42904 konnte zusätzlich zu der pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation c.2426\_2428delTAG (p.Val809Glufs\*) die potentiell pathogene Missense-Mutation c.1258A>G (p.Ser420Gly) in Exon 8 in der Keimbahn des *MSH3*-Gens gefunden werden, welche von *SIFT* als *deleterious* und proteinfunktionsbeeinflussend eingestuft wurde (s. Ergebnisse). Auch dieser Patient zeigte im Tumor zusätzlich die pathogene somatische *MSH3*-Hotspot-Mutation c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) in Exon 7 (s. Abb.19). In diesem Fall konnte ebenfalls die Allelverteilung beider Mutationen im Tumor aufgrund der großen Entfernung nicht bestimmt werden. Unter der Annahme eines pathogenen Charakters der Keimbahnmutation und einer *in trans*-lokalisierten somatischen Hotspot-Mutation würde wiederum der biallelische Funktionsverlust des MSH3-Proteins im Tumor resultieren. Der somatische Second Hit im *MSH6*-Gen konnte bei diesem Patienten zwar nicht gefunden werden, nachdem aber aufgrund limitierter Tumor-DNA-Menge nur wenige Prädispositionsstellen in diesem Gen analysiert wurden, ist davon auszugehen, dass dieser an einer anderen, in dieser Arbeit nicht untersuchten Stelle im *MSH6*-Gen lokalisiert ist.

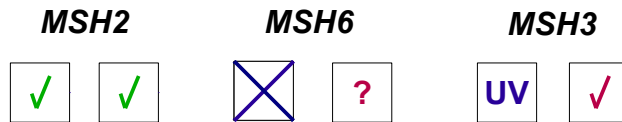


**Abb.19: Mutationskonstellation des Patienten 42904** (Vierecke=Allele; blau=pathogene Keimbahnmutation; rot=pathogene somatische Mutation; UV=unklare potentiell pathogene Keimbahnveränderung; LOH E7=somatischer *Loss of Heterozygosity* von Exon 7 im Tumor; ?=somatischer Mutationsstatus unklar)

In oben beschriebener Konstellation würde sich somit auch im Sigmakarzinom des Patienten 42904 der immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins im Tumor erklären lassen. Der Patient wies des Weiteren eine Keimbahnsequenzveränderung unklarer Pathogenität sowie einen somatischen LOH von Exon 7 im *MSH2*-Gen auf, sodass auch dadurch möglicherweise der immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins im Tumor erklärt werden könnte (s.u.).

Schließlich wurde bei dem Patienten 61287 neben der bekannten pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation c.3416delG (p.Gly1139Alafs\*6) die als Veränderung unklarer Pathogenität einzustufende *MSH3*-Keimbahnmutation c.2732T>G (p.Leu911Trp) in Exon 20 nachgewiesen. Diese wurde von *SIFT* als *deleterious*, also schädlich, und von *PolyPhen* als *probably damaging* gewertet. Im Tumor des Patienten konnte allerdings keine zweite pathogene somatische *MSH3*-Mutation gefunden werden, obwohl das gesamte *MSH3*-Gen im Tumor sequenziert und ausgewertet wurde. Dennoch besteht bei dem Patienten die Möglichkeit des Vorliegens eines Second Hits in Form einer größeren Deletion von einem oder mehreren Exons im Tumor, die mittels Sequenzierung nicht erfasst werden würde. Hierfür müsste man eine MLPA-Analyse durchführen. Allerdings existieren für das *MSH3*-Gen zur Zeit nur entsprechende Kits für die Auswertung dreier Exons, was bedeutet, dass diese Art von Mutationen im *MSH3*-Gen momentan generell noch nicht nachgewiesen werden können. Auch fehlte bei diesem Patienten der Nachweis des Second Hits in den untersuchten Prädilektionsstellen im *MSH6*-Gen, der aber sehr wahrscheinlich auch an einer anderen Position im Gen lokalisiert zu sein scheint. Da die Tumor-DNA des Patienten 61287 in ausreichender Menge vorhanden war, wurde auch das *MSH2*-Gen im Tumor komplett analysiert und ausgewertet, wobei keine somatischen pathogenen Veränderungen gefunden werden konnten.





**Abb.20: Mutationskonstellation des Patienten 61287** (Vierecke=Allele; **blau**=pathogene Keimbahnmutation; **grüner Haken**=ohne pathologischen Befund; **roter Haken**=somatisch ohne pathologischen Befund; **UV**=unklare potentiell pathogene Keimbahnveränderung; **?**=somatischer Mutationsstatus unklar)

Für den Patienten 61287 kann somit der immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins im Tumor mit der hier geschilderten Hypothese nicht eindeutig bestätigt werden. Bei dem Patienten konnte extern zusätzlich eine somatische *Kras*-Mutation im Tumor nachgewiesen werden. Eine solche ist typischerweise entweder mit einer pathogenen *MUTYH*-Mutation assoziiert, welche bei dem Patienten 61287 ausgeschlossen wurde, oder mit dem *CIMP*-Phänotyp, was nicht näher untersucht wurde (Issa et al., 2005; van Puijbroeck et al., 2008; Weisenberger et al., 2006). In jedem Fall nimmt diese Veränderung keinen Einfluss auf die in dieser Arbeit untersuchte unklare Befundkonstellation des Patienten und ist somit diesbezüglich zu vernachlässigen.

Bei den restlichen untersuchten sieben Patienten konnte außer diverser Polymorphismen keine relevante *MSH3*-Keimbahnmutation identifiziert werden, sodass entsprechend der momentanen Ergebnislage der immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins durch die hier aufgeführte Hypothese nicht erklärt werden kann.

#### 4.3.2 Zwei pathogene somatische Mutationen im *MSH2*-Gen als Ursache für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall

Eine weitere denkbare Hypothese betrifft das *MSH2*-Gen selbst. Durch die Manifestation von zwei, auf unterschiedlichen Allelen lokalisierten, somatischen pathogenen Mutationen in diesem Gen würde ebenfalls der Funktionsverlust und immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins im Tumorgewebe resultieren.

Grundsätzlich ist das Auftreten zweier somatischer Mutationen innerhalb eines Gen in ein und derselben Zelle relativ unwahrscheinlich, berücksichtigt man allerdings den genetischen Hintergrund mit einem MMR-Defekt der untersuchten Patienten, so erscheint

diese Hypothese durchaus möglich. Durch den *MSH6*-Ausfall ist das MMR-System partiell funktionsunfähig, v.a. Basenfehlpaarungen können nicht mehr erkannt und repariert werden, die Wahrscheinlichkeit weiterer Sequenzveränderungen steigt.

Zur Bestätigung bzw. zum Ausschluss dieser Hypothese wäre ein komplettes *MSH2*-Mutationsscreening in der Tumor-DNA der untersuchten Patienten nötig. Aufgrund limitierter Tumor-DNA-Mengen konnte die Untersuchung allerdings nicht hinreichend durchgeführt werden. Lediglich bei dem Patienten 61287, von dem ausreichend Tumormaterial vorhanden war, konnte das *MSH2*-Gen vollständig sequenziert werden, wobei keine pathogene Sequenzveränderung detektiert und die vorliegende Hypothese somit zumindest in diesem Fall ausgeschlossen werden konnte.

Eine leicht abgeänderte Hypothese könnte auf den Patienten 42904 zutreffen. Dieser wies, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Patienten, neben der pathogenen *MSH6*-Mutation und der unklaren *MSH3*-Veränderung (s.o.) in der Keimbahn eine zusätzliche *MSH2*-Missense-Mutation unklarer klinischer Signifikanz auf (c.274C>G (p.Leu92Val)). Diese wurde von *PolyPhen* als *probably damaging* eingestuft, *SIFT* dagegen tolerierte den Aminosäureaustausch. Außerdem konnte in vorangegangenen Tumoranalysen bei diesem Patienten ein LOH von Exon 7 des *MSH2*-Gens im Tumor nachgewiesen werden (s. Abb.19 oben). Dieser somatische Verlust eines kompletten Exons ist in jedem Fall als pathogen zu werten. Geht man nun von einem ebenfalls pathogenen Potential der gefundenen *MSH2*-Keimbahnveränderung sowie einer biallelischen Konstellation der beiden Mutationen aus, so ließe sich der immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins im Tumor des Patienten 42904 neben der oben diskutierten ersten Hypothese dadurch ebenso erklären.

#### 4.3.3 Dominant-negativer Effekt einer unklaren Sequenzveränderung im *MSH3*-Gen als Ursache für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall

Im Falle eines Vorliegens einer Missense-Mutation mit unklarer Pathogenität steht als dritte Hypothese ein möglicher dominant-negativer Effekt im Raum. Unter einer dominant-negativen Mutation versteht man eine Sequenzveränderung auf einem Allel, die durch Wechselwirkung mit dem Genprodukt des anderen Allels oder mit dem eines anderen Gens zu einer Funktionseinschränkung oder zu einem Funktionsverlust des, von diesem Effekt

betroffenen, Genprodukts führt. Am wahrscheinlichsten würde dabei eine *Gain of Function*-Mutation erscheinen, bei der das Genprodukt eine neue oder zusätzliche Funktion erhält (Murken et al., 2006).

Übertragen auf das *MSH3*-Gen könnte dies bedeuten, dass eine heterozygote Keimbahnmutation unklarer Pathogenität in diesem Gen entweder durch Wechselwirkung mit dem MSH3-Protein des zweiten Allels so interagiert, dass ein Funktionsverlust dieses Proteins resultiert, oder dass sich diese Interaktion mit dem MSH2-Protein im Heterodimer MutSβ im Sinne einer stärkeren Komplexierungsfähigkeit manifestiert. Im ersten Fall würde der dominant-negative Effekt dazu führen, dass durch den Funktionsverlust des MSH3-Proteins und des sowieso fehlenden MSH6-Proteins kein Bindungspartner für MSH2 zur Verfügung steht, was in einem Zugrundegehen und somit fehlenden immunhistochemischen Nachweis des MSH2-Proteins resultieren könnte. Eine stärkere Komplexierung im Heterodimer MutSβ, wie sie als *Gain of Function* andererseits ebenfalls denkbar wäre, würde wiederum einen Funktionsverlust dieses Dimers bedeuten und erneut zu einer möglichen Degradierung des MSH2-Proteins führen.

Prinzipiell könnte dasselbe Szenario auch durch eine unklare Sequenzveränderung im *MSH6*-Gen hervorgerufen werden. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten ist Letzteres allerdings ausgeschlossen, da hier keine Missense-Mutationen unklarer Signifikanz, sondern jeweils eindeutig pathogene *MSH6*-Keimbahnmutationen vorlagen.

Die Patienten 42904 und 61287 wiesen im *MSH3*-Gen jedoch mit den Sequenzveränderungen c.1258A>G (p.Ser420Gly) bzw. c.2732T>G (p.Leu911Trp) jeweils eine heterozygote Missense-Mutation unklarer Pathogenität in der Keimbahn auf (s.o.). Wird diese per se nicht als pathogen eingestuft, sondern handelt es sich bei dieser jeweils um eine dominant-negative Mutation, so wäre diese für die Patienten 42904 und 61287 eine weitere potentielle Erklärung für den immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins. Würde die Wechselwirkung dabei mit dem MSH3-Protein des zweiten Allels stattfinden, so wäre in dieser Konstellation nicht einmal mehr eine zweite somatische Mutation im Tumor nötig, um einen Funktionsverlust des MSH3-Proteins zu bewirken. So könnte man mutmaßen, dass diese Hypothese ursächlich für den immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins bei dem Patienten 61287 ist, bei dem weder im *MSH3*-, noch im *MSH2*-Gen weitere relevante somatische Mutationen gefunden werden konnten, die für die schlüssige Erklärung der ersten beiden Hypothesen nötig

gewesen wären.

#### 4.3.4 Zwei pathogene somatische Mutationen im *MSH3*-Gen als Ursache für den immunhistochemischen *MSH2*-Ausfall

Eine weitere theoretisch denkbare Möglichkeit für den immunhistochemischen *MSH2*-Ausfall betrifft erneut das *MSH3*-Gen. In Kombination mit der jeweiligen bekannten pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation und einer entsprechenden somatischen *MSH6*-Second Hit-Mutation im Tumor, würde nicht nur das Auftreten einer pathogenen Keimbahnmutation in *MSH3* zusammen mit einer weiteren pathogenen somatischen *MSH3*-Sequenzveränderung im Tumor (s.o.), sondern auch das Vorliegen von zwei, auf unterschiedlichen Allelen lokalisierten, pathogenen somatischen *MSH3*-Mutationen im Tumorgewebe den immunhistochemischen *MSH2*-Ausfall im Tumor erklären. Grundsätzlich gilt hier erneut, wie bereits oben beschrieben, dass die Manifestation zweier biallelischer, pathogener, somatischer Mutationen in einem Gen in einer Zelle sehr unwahrscheinlich erscheint, nicht aber mit dem Hintergrund des *MSH6*-Gendefekts der untersuchten Patienten.

Bei den vorliegenden Patienten beschränkte sich die *MSH3*-Mutationssuche im Tumor aufgrund limitierter Tumor-DNA-Mengen auf bestimmte Prädilektionsstellen (s. Ergebnisteil). So wurde primär der (A)<sub>8</sub>-Trakt in Exon 7 sowie das jeweilige Exon mit Lokalisation der (potentiell) pathogenen Keimbahnmutation analysiert. Dabei zeigte sich bei den Patienten 42904, 48064 und 60406 die somatische Hotspot-Mutation im (A)<sub>8</sub>-Trakt (c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32)), die Patientin 48064 wies zusätzlich ein homozygotes Vorliegen der pathogenen Keimbahnmutation im Sinne eines LOH und somit zwei pathogene somatische Veränderungen im *MSH3*-Gen auf. Wie bereits oben geschildert, lässt sich für die Patienten 42904 und 48064 der immunhistochemische *MSH2*-Ausfall gut erklären.

Bei der Patientin 60406 ist die Ursache für diesen immunhistochemischen *MSH2*-Ausfall bislang aber offen. Mit dem Vorliegen einer zweiten somatischen *MSH3*-Mutation würde sich der *MSH2*-Ausfall im Tumor ebenfalls nachvollziehen lassen. Die Patientin 60406 zeigte im *MSH6*-Gen im Tumor in nur einem Exon drei Sequenzveränderungen (c.3208G>A (p.Gly1070Ser), c.3303G>A (p.Lys1101Lys), c.3413G>A (p.Gly1138Glu)),

wobei v.a. letztere als potentiell pathogen einzustufen ist (s. Ergebnisse). Dies veranschaulicht die erhebliche Beeinträchtigung des MMR-Systems bei dieser Patientin und lässt mutmaßen, dass neben der gefundenen somatischen *MSH3*-Hotspotmutation möglicherweise eine weitere pathogene somatische *MSH3*-Sequenzveränderung im Tumor der Patientin 60406 existiert, was aufgrund limitierter Tumor-DNA-Menge in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, was dann aber den immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins im Tumor der Patientin erklären würde.

#### 4.3.5 Falsches Ergebnis der immunhistochemischen Analyse als Ursache für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall

Da das Resultat der immunhistochemischen Analyse stark untersucherabhängig ist (Steinke et al., 2013) wäre es theoretisch denkbar, dass trotz eigentlich vorhandenem MSH2-Protein im Tumor ein entsprechender Nachweis nicht gelingt, mit der Folge eines falsch-negativen Ergebnisses. Diese Möglichkeit könnte man durch mehrmalige unabhängige immunhistochemische Testung am Tumor desselben Patienten ausschließen. Es handelt sich in dieser Arbeit um zehn verschiedene Patienten, die jeweils an unterschiedlichen pathologischen Instituten immunhistochemisch analysiert wurden und dabei einen immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins aufwiesen. Prinzipiell sollte diese Möglichkeit, die den immunhistochemischen MSH2-Ausfall im Tumor im Sinne eines falsch-negativen immunhistochemischen Ergebnisses ebenfalls erklären würde, in jedem Fall in Betracht gezogen werden.

#### 4.3.6 Hypothesen für den immunhistochemischen MSH2-Ausfall bei den übrigen Patienten

Bei den übrigen Patienten, wo keine pathogenen Sequenzveränderungen nachweisbar waren und der immunhistochemische Ausfall des MSH2-Proteins im Tumor mittels oben aufgeführter Hypothesen somit nicht hinreichend erklärt werden kann, können dennoch, wie bereits z.T. oben erwähnt, einige Vermutungen für eben diesen MSH2-Ausfall im Tumorgewebe aufgestellt werden.

## **1. Bislang unbekanntes pathogenes Potential einer stillen, intronischen oder im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1 lokalisierten *MSH3*-Sequenzveränderung**

Nachdem in dieser Arbeit keine cDNAs der untersuchten Patienten zur Verfügung standen, konnten die potentiellen Auswirkungen von nachgewiesenen stillen und intronischen *MSH3*-Sequenzveränderungen auf den Spleißprozess nur mittels Vorhersagen von *Alamut* und Angaben aus der Literatur beantwortet werden. Eine Analyse dieser cDNAs wäre wünschenswert, um einen etwaigen, bislang unerkannten spleißverändernden Effekt solcher, insbesondere selten auftretender, Sequenzveränderungen zukünftig verlässlich identifizieren zu können. Ähnliches gilt für die im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1 nachgewiesenen Sequenzveränderungen. Diese könnten, wie unter 4.1.7 beschrieben, als regulierende Promotormutationen Einfluss auf die Genexpression von *MSH3* nehmen und so möglicherweise zu einer reduzierten *MSH3*-Proteinmenge in den Tumorzellen führen, was bei Wegfall des *MSH6*-Proteins potentiell ebenfalls in einem reduzierten oder fehlenden immunhistochemischen *MSH2*-Nachweis aufgrund fehlender Bindungspartner resultieren könnte. Im Fall eines pathogenen Potentials solcher Veränderungen ließe sich der immunhistochemische Ausfall des *MSH2*-Proteins im Tumor wiederum mit der unter 4.3.1 beschriebenen Hypothese erklären.

## **2. Vorliegen einer größeren, nicht nachweisbaren Deletion im *MSH3*-Gen**

Bislang stehen für das *MSH3*-Gen nur MLPA-Kits für drei Exons zur Verfügung, mit denen bei den vorliegenden Patienten eine größere Keimbahn-deletion zumindest für diese drei Exons von *MSH3* ausgeschlossen werden konnte. Für die restlichen 21 Exons existieren dagegen noch keine derartigen Analyse-Kits. Somit können größere Deletionen im *MSH3*-Gen momentan nicht identifiziert werden. Negiert werden konnten solche größeren Deletionen teilweise nur indirekt durch den Nachweis von benignen Polymorphismen. In den wenigen Exons, wo solche heterozygot in der Keimbahn von *MSH3* gefunden wurden, konnte durch Vorhandensein des Wildtyp-Allels eine entsprechende Exon-Deletion ausgeschlossen werden. Bei den Patienten, für die im *MSH3*-Gen mit Hilfe der in dieser Arbeit angewendeten Methoden keine pathogene Mutation in der Keimbahn und/oder im Tumorgewebe gefunden werden konnte, ist demnach eine Deletion eines oder mehrerer Exons im *MSH3*-Gen nicht auszuschließen. Bei Vorliegen einer solchen pathogenen

Veränderung, entweder in der Keimbahn, oder aufgrund des geschwächten MMR-Systems möglicherweise auch in Form einer biallelischen somatischen Mutation im Tumor, würde sich der immunhistochemische MSH2-Ausfall wiederum mit den unter 4.3.1 bzw. 4.3.4 aufgeführten Hypothesen erklären lassen.

### **3. Biallelisches Vorliegen zweier somatischer Mutationen im *MSH3*- oder *MSH2*-Gen in nicht analysierten Sequenzen**

In dieser Arbeit konnten wegen limitierter Tumor-DNA-Mengen nur selektive Untersuchungen im Tumorgewebe der Patienten durchgeführt werden (s. Ergebnisse). Grundsätzlich erscheint die Manifestation zweier biallelischer somatischer Mutationen in ein und derselben Zelle als relativ unwahrscheinlich, nachdem aber, wie bereits oben aufgeführt, bei den hier untersuchten Patienten ein vorherrschender *MSH6*-Defekt das MMR-System stark beeinträchtigt, ist diese Form der Mutationsausprägung nicht auszuschließen. So könnten sich entsprechende somatische *MSH3*- bzw. *MSH2*-Mutationen auch in nicht analysierten Abschnitten des jeweiligen Gens manifestiert haben und so den immunhistochemischen MSH2-Ausfall durch die Hypothesen unter 4.3.2 bzw. 4.3.4 erklären. Im Tumor der Patientin 60406 konnte beispielsweise die somatische Hotspotdeletion c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) in Exon 7 von *MSH3* nachgewiesen werden. Bei dieser Patientin lagen außerdem im *MSH6*-Gen in nur einem Exon drei somatische Veränderungen vor, von denen eine Missense-Mutation als vermutlich pathogen anzusehen ist (s.o.). Diese hohe Mutationsrate im Tumor der Patientin 60406 deutet auf eine erhebliche Beeinträchtigung des postreplikativen MMR-Systems hin und lässt mutmaßen, dass sich neben der pathogenen somatischen Hotspotdeletion eine weitere pathogene Mutation in *MSH3* in nicht analysierten Abschnitten dieses Gens manifestiert hat, was als Ursache für den immunhistochemischen Ausfall von MSH2 angesehen werden kann.

Diese Erklärung wäre auch besonders für die Patientinnen 46756 und 51560 denkbar, die beide an multiplen Tumoren mit unterschiedlichen Befundkonstellationen erkrankt sind (s. Tab.26), was ein ursächliches somatisches Ereignis als am plausibelsten erscheinen lässt.

#### **4. Promotormethylierung des *MSH2*-Gens als Ursache für den immunhistochemischen Ausfall des *MSH2*-Proteins**

Prinzipiell erfolgt eine Methylierung des Promotors an Cytosinresten von CpG-Inseln, dient normalerweise der Regulation der Transkription und somit der Genexpression und kann mittels MS-MLPA-Analysen molekulargenetisch nachgewiesen werden (Murken et al., 2006). Für sporadisch auftretende kolorektale Karzinome mit MSI, die in ca. 15% der Fälle beobachtet werden können, gilt eine epigenetische biallelische aberrante Promotormethylierung des *MLH1*-Gens als Ursache (Holinski-Feder und Morak, 2008). Neuere Studien konnten zeigen, dass auch eine primär somatische Promotormethylierung des *MSH2*-Gens in Karzinomen unterschiedlicher Organe zu finden ist. Eine solche aberrante Methylierung konnte beispielsweise in Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge sowie v.a. bei fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen detektiert werden (Gomes et al., 2014; Hinrichsen et al., 2014). Auch in kolorektalen Karzinomen konnte eine somatische Methylierung des *MSH2*-Promotors nachgewiesen werden. Diese scheint dabei krankheitsspezifisch zu sein, da sie ausschließlich bei *MSH2*-defizienten kolorektalen Karzinomen zu finden war, nicht aber in der zusätzlich analysierten Normalschleimhaut der Patienten oder in sporadischen kolorektalen Tumoren (Nagasaka et al., 2010). Lee et al., 2011 untersuchten die Rolle von MMR-Gen-Promotormethylierungen in kolorektalen Karzinomen mit klassischer Adenom-Karzinom-Sequenz und konnten dabei sowohl in Adenomen, wie auch in Karzinomen eine abnormale *MSH2*-Promotormethylierung nachweisen. Diese war nicht mit Geschlecht, Tumorlokalisation, -differenzierung und -stadium assoziiert, es zeigte sich jedoch ein vermehrtes, wenn auch nicht statistisch signifikantes Auftreten im Alter. Verschiedene Wissenschaftler konnten zeigen, dass eine solche, eigentlich epigenetische *MSH2*-Promotormethylierung u.U. auch vererbbar ist, mitunter auch dann, wenn eine für die Methylierung ursächliche Deletion am 3'-Ende von *EPCAM* zu finden war (Chan et al., 2006; Ligtenberg et al., 2009; Niessen et al., 2009).

In dieser Arbeit konnte mittels MS-MLPA-Analysen eine *MSH2*-Promotormethylierung für die Patienten 42904 und 55576 im Tumor ausgeschlossen werden, ebenso für die Patientin 48064 in der Keimbahn von *MSH2*. Bei den restlichen Patienten wurde die entsprechende Untersuchung nicht durchgeführt. Somit kann bei diesen keine Aussage über eine mögliche



aberrante *MSH2*-Promotormethylierung, wie sie oben beschrieben wurde, getroffen werden. Würde eine solche Methylierung als somatische epigenetische Veränderung im Tumor der analysierten Patienten auftreten und läge eine zusätzliche zweite, *in trans* lokalisierte pathogene *MSH2*-Second Hit-Mutation im Tumor vor, so ließe sich der bislang unklare immunhistochemische Ausfall des *MSH2*-Proteins auch so erklären. Theoretisch denkbar, wenn auch unwahrscheinlich, wäre ein biallelisches Auftreten einer somatischen *MSH2*-Promotormethylierung, welches bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Eine Keimbahnmethylierung, wie sie für *MSH2* in besonderer Fallkonstellation von einigen Wissenschaftlern ebenfalls nachgewiesen werden konnte, scheint für die in dieser Arbeit untersuchten Patienten als unwahrscheinlich, weil die entsprechende Ursache, eine Deletion im 3'-Bereich von *EPCAM*, bei den Patienten dieser Arbeit ausgeschlossen wurde. Im Tumor des Patienten 42904 konnte beispielsweise neben mehreren anderen (potentiell) pathogenen Mutationen (s.o.) extern ein somatischer LOH von Exon 7 des *MSH2*-Gens nachgewiesen werden, welcher als pathogen zu werten ist. Neben den bereits oben diskutierten anderen Hypothesen könnte auch eine somatische *MSH2*-Promotormethylierung auf dem anderen Allel zu einem immunhistochemischen Ausfall des *MSH2*-Proteins im Tumor führen.

## **5. Promotormethylierung des *MSH3*-Gens als Ursache für den immunhistochemischen Ausfall des *MSH2*-Proteins**

Beggs et al., 2013 untersuchten das Vorhandensein und die Rate von MSI in isolierten kolorektalen Krypten. In hyperplastischen Krypten konnte dabei eine starke Promotormethylierung in den CpG-Inseln von *PMS2*, *MLH3* und am meisten von *MSH3* nachgewiesen werden. Es wurde daraufhin ein klarer Zusammenhang zwischen MMR-Promotormethylierung und MSI-Status postuliert, wobei aber bislang mit Ausnahme von *MLH1* unklar ist, welche Promotormethylierung in welchem MMR-Gen zu MSI führt.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten erklärt sich der MSI-Status durch die pathogene *MSH6*-Keimbahnmutation. Durch den prinzipiellen Nachweis einer *MSH3*-Promotormethylierung durch Beggs et al., 2013 in hyperplastischen kolorektalen Krypten kann darüber spekuliert werden, inwiefern eine solche somatische *MSH3*-Methylierung neben der zunehmend beforschten *MSH2*-Promotormethylierung auch in kolorektalen Karzinomen von Lynch-Syndrom-Patienten auftritt bzw. möglich ist. Ein solches Auftreten

könnte wiederum bedeuten, dass eine *MSH3*-Promotormethylierung als potentieller somatischer Second Hit im Tumor bei Vorliegen einer unklaren oder pathogenen Keimbahnveränderung bzw. bei Vorhandensein einer weiteren somatischen pathogenen Mutation in diesem Gen, eine Erklärung für einen immunhistochemischen MSH3- und konsekutiv für einen MSH2-Ausfall wäre.

In jedem Fall scheint auch bei den Patienten, wo die Ursache für den immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins im jeweiligen Tumor mit den hier postulierten Hypothesen nicht endgültig geklärt werden konnte (55576, 58953, 61628 und 78712), neben der bekannten pathogenen *MSH6*-Keimbahnmutation ein weiterer Faktor die Tumorgenese entscheidend zu beeinflussen. Viele der untersuchten Patienten erkrankten für *MSH6*-Mutationsträger überdurchschnittlich früh, mitunter sogar schon mit 33 (Patient 78712) bzw. 39 Jahren (Patienten 42904 und 55576) (s. Tab.26). Das durchschnittliche Erstmanifestationsalter für *MSH6*-Mutationen liegt bei 55 Jahren (Plaschke et al., 2004a; Vasen et al., 2001). Natürlich wäre es denkbar, dass das Erkrankungsalter der hier untersuchten Patienten innerhalb der doch großen Schwankungsbreiten liegt, in Zusammenhang mit dem fehlenden immunhistochemischen MSH2-Nachweis im Tumor liegt jedoch der Verdacht nahe, dass durch eine Inaktivierung des MSH2-Proteins welcher Art auch immer, eine noch stärkere Akquirierung von DNA-Fehlern erfolgt, wodurch es zu einem schnelleren Durchlaufen der Adenom-Karzinom-Sequenz kommt, was wiederum in einem früheren Tumorerstmanifestationsalter resultiert. Um diese Vermutungen hinreichend bestätigen zu können, sind zukünftig wohl weitere Untersuchungen zu diesem Thema notwendig.

## **5. Zusammenfassung und Ausblick**

In dieser Doktorarbeit wurden insgesamt elf Indexpatienten, zehn davon mit bekannter pathogener *MSH6*-Keimbahnmutation und bislang ungeklärtem fehlenden oder deutlich reduzierten immunhistochemischen Nachweis des MSH2-Proteins auf pathogene Keimbahnmutationen im Mismatch-Repair-Gen *MSH3* untersucht, um dessen Rolle bei der Prädisposition für das Lynch-Syndrom zu analysieren.

In der Untersuchung des *MSH3*-Gens auf Keimbahnmutationen konnten dabei insgesamt 29 Sequenzveränderungen nachgewiesen werden.

Mit der Deletion c.1035delT (p.Leu347\*) in Exon 7 konnte die nach unserem Wissen erste mit dem Lynch-Syndrom assoziierte pathogene *MSH3*-Keimbahnmutation identifiziert werden. Bei der entsprechenden Patientin lag im Tumor mit der Hotspot-Deletion c.1148delA (p.Lys383Argfs\*32) eine weitere pathogene somatische Mutation im *MSH3*-Gen vor. Die pathogene Keimbahnmutation c.1035delT (p.Leu347\*) der Patientin konnte zusätzlich in deren Tumorgewebe homozygot detektiert werden, was unserer Meinung nach am ehesten auf einen LOH zurückzuführen ist. Somit resultiert bei dieser Patientin nicht nur ein Ausfall des MSH6-Proteins, sondern auch ein Funktionsverlust des MSH3-Proteins im Tumor, wodurch der fehlende immunhistochemische Nachweis des MSH2-Proteins im Tumorgewebe erklärt werden konnte. Nachdem diese Patientin bei hochgradig auffälliger Familienanamnese im Alter von 47 Jahren an einem Rektumkarzinom erkrankte, was für *MSH6*-Mutationsträger überdurchschnittlich früh ist, nahmen wir einen entscheidenden Einfluss bislang unbekannter Art des MSH3-Proteins auf die Tumorgenese an, was sich mit den Ergebnissen verschiedener anderer Wissenschaftler deckt.

Weiterhin wurden bei der *MSH3*-Analyse mit den Missense-Mutationen c.1258A>G (p.Ser420Gly) in Exon 9 und c.2732T>G (p.Leu911Trp) in Exon 20 zwei Sequenzveränderungen unklarer Pathogenität und klinischer Relevanz gefunden. Der Patient mit der *MSH3*-Mutation c.1258A>G (p.Ser420Gly) wies in der Keimbahn zusätzlich die *MSH2*-Mutation c.274C>G (p.Leu92Val) mit ebenfalls unklarer Pathogenität auf. Er erkrankte im Alter von 39 Jahren an einem Sigmakarzinom, was für *MSH6*-Mutationen wiederum äußerst früh erscheint. Somit gingen wir davon aus, dass mindestens eine der beiden unklaren Veränderungen als pathogen zu werten ist und dadurch eine Progression der Tumorgenese entsteht, welche in einer früheren Tumorerstmanifestation gipfelt.

Der Patient mit der *MSH3*-Keimbahnveränderung c.2732T>G (p.Leu911Trp) erkrankte dagegen in einem für *MSH6*-Mutationen durchschnittlichen Alter von 54 Jahren an einem Jejunumkarzinom, dabei mutmaßten wir über eine mögliche Veränderung des Tumorspektrums durch die zusätzliche *MSH3*-Mutation.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das *MSH3*-Gen mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige beteiligende Rolle bei der Prädisposition für das Lynch-Syndrom zu spielen scheint und dass pathogene Keimbahnveränderungen in diesem Gen in Kombination mit einer pathogenen *MSH6*-Mutation zu einer deutlich stärkeren Beeinträchtigung des MMR-Systems und möglicherweise auch zu einer schnelleren Progression der Tumorgenese und damit einem früheren Erkrankungsalter, sogar ähnlich früh wie für *MSH2*- bzw. *MLH1*-Mutationsträger, führen. Für einen Teil der in dieser Arbeit untersuchten Patienten konnte durch eine zusätzliche *MSH3*-Veränderung gezeigt werden, dass der daraus entstehende Ausfall des MSH3-Proteins wiederum in einem immunhistochemischen Ausfall des MSH2-Proteins resultiert, wodurch sowohl die Reparaturkomplexe MutS $\alpha$  wie auch MutS $\beta$  degradieren, was in eine eklatante Beeinträchtigung des MMR-Systems mündet.

Nichtsdestotrotz bleiben nach dieser Arbeit einige Fragestellungen offen. Einige in dieser Arbeit gefundenen Sequenzveränderungen konnten hinsichtlich ihrer Pathogenität, gerade bezogen auf potentielle Beeinträchtigungen des Spleißvorgangs, nicht eindeutig analysiert und bewertet werden, hierfür wären weitere cDNA-Analysen wünschenswert. Auch die Analyse der Tumor-DNAs konnte aufgrund der zur Verfügung stehenden Mengen nur partiell durchgeführt werden. Bei ausführlichen Untersuchungen ließen sich u.U. noch mehr somatische pathogene Mutationen finden. Auch ist es bislang nur für drei Exons von *MSH3* möglich, größere Deletionen oder Insertionen mittels MLPA-Analyse nachzuweisen. Eine entsprechende Etablierung dieser Methode wäre zukünftig ebenfalls erstrebenswert, um den Einfluss des *MSH3*-Gens auf die Tumorgenese besser abschätzen zu können.

Sollte sich der in dieser Arbeit vermutete Einfluss von *MSH3* auf die Prädisposition für das Lynch-Syndrom in der Zukunft von anderen Wissenschaftlern bestätigen, so hätte dies auch Auswirkungen auf die Diagnostik und Vorsorge. Bislang steht keine verlässliche Methode für den immunhistochemischen Nachweis des MSH3-Proteins zur Verfügung. Auch konnte bislang noch keine Mutation in *MSH3* als Ursache für das Lynch-Syndrom festgestellt werden. Unter der Annahme, dass eine zusätzliche *MSH3*-Mutation bei Trägern

einer pathogenen *MSH6*-Mutation allerdings zu einer schnelleren Tumorprogression führt, stellt sich bei Nachweis einer pathogenen *MSH6*-Mutation die Frage einer zusätzlichen molekulargenetischen Analyse des *MSH3*-Gens. Sollte dabei eine entsprechende pathogene Sequenzveränderung imponieren, so wäre es mitunter sinnvoll, die vorherrschenden Vorsorgeempfehlungen zu intensivieren, um eine potentiell frühere Manifestation des Lynch-Syndroms rechtzeitig erkennen und therapieren zu können.

## **6. Quellenverzeichnis**

### **Literatur**

Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen HJ (1999). Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 81(2): 214-8.

Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R (1996). hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13629-34.

Adam R, Spier I, Zhao B, Kloth M, Marquez J, Hinrichsen I, Kirfel J, Tafazzoli A, Horpaopan S, Uhlhaas S, Stienen D, Friedrichs N, Altmüller J, Laner A, Holzapfel S, Peters S, Kayser K, Thiele H, Holinski-Feder E, Marra G, Kristiansen G, Nöthen MM, Büttner R, Möslin G, Betz RC, Brieger A, Lifton RP und Aretz S (2016). Exome Sequencing Identifies Biallelic *MSH3* Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *Am J Hum Genet* 99(2): 337-51.

Akiyama Y, Tsubouchi N, Yuasa Y (1997). Frequent Somatic Mutations of *hMSH3* with Reference to Microsatellite Instability in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 236(2): 248-52.

Alfred G and Knudson JR (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 68(4): 820-23.

Anagnou NP, Antonarakis SE, O'Brien SJ, Modi WS, Nienhuis AW (1988). Chromosomal localization and racial distribution of the polymorphic human dihydrofolate reductase pseudogene (DHFRP1). *Am J Hum Genet* 42(2): 345-52.

Barrow E, Robinson L, Alduaij W, Shenton A, Clancy T, Laloo F, Hill J, Evans DG (2009). Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet* 75(2): 141-9.

Beggs AD, Domingo E, Abulafi M, Hodgson SV and Tomlinson IPM (2013). A study of genomic instability in early preneoplastic colonic lesions. *Oncogene* 32(46): 5333-7.

Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, Thuita LW, Hoffman SC, Helzlsouer KJ (2007). Mismatch repair polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer* 120(7): 1548-54.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani N, Srivastava S (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 58(22): 5248-57.

Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, Guimbaud R, Buecher B, Bignon JY, Caron O, Colas C, Noguès C, Lejeune-Dumoulin S, Olivier-Faivre L, Polycarpe-Osaer F, Nguyen TD, Desseigne F, Saurin JC, Berthet P, Leroux D, Duffour J,

Manouvrier S, Frébourg T, Sobol H, Lasset C, Bonaïti-Pellié C (2011). Cancer Risks Associated With Germline Mutations in *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* Genes in Lynch Syndrome. *JAMA* 305(22): 2304-10.

Campregher C, Schmid G, Ferk F, Knasmüller S, Khare V, Kortüm B, Dammann K, Lang M, Scharl T, Spittler A, Roig AI, Shay JW, Gerner C, Gasche C (2012). MSH3-Deficiency Initiates EMASST without Oncogenetic Transformation of Human Colon Epithelial Cells. *PLoS ONE* 7(11): e50541.

Chan TL, Yuen ST, Kong CK, Chan YW, Chan ASY, Ng WF, Tsui WY, Lo MWS, Tam WY, Li VSW and Leung SY (2006). Heritable germline epimutation of *MSH2* in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 38(10): 1178-83.

Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, Chang CL, Boland CR (2000). Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J Biol Chem* 275(37): 29178.

Conde J, Silva SN, Azevedo AP, Teixeira V, Pina JE, Rueff J, Gaspar JF (2009). Association of common variants in mismatch repair genes and breast cancer susceptibility: a multigene study. *BMC Cancer* 25(9): 344.

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J (1997). Diagnostic Microsatellite Instability: Definition and Correlation with Mismatch Repair Protein Expression. *Cancer Res* 57(21): 4749-56.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19(14): 4008.

Durauto F, Liccardo R, Cavallo A, De Rosa M, Grosso M, Izzo P (2011). Association of low-risk MSH3 and MSH2 variant alleles with Lynch syndrome: probability of synergistic effects. *Int J Cancer* 129(7): 1643-50.

Duval A, Rolland S, Compoint A, Tubacher E, Iacopetta B, Thomas G and Hamelin R (2001). Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum Mol Genet* 10(5): 513-8.

Edelmann W, Umar A, Yang K, Heyer J, Kucherlapati M, Lia M, Kneitz B, Avdievich E, Fan K, Wong E, Crouse G, Kunkel T, Lipkin M, Kolodner RD, Kucherlapati R (2000). The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Res* 60(4): 803-7.

Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Plaschke J, Kloor M, Poremba C, Pox CP, Rüschoff J, Keller G, Dietmaier W, Rümmele P, Friedrichs N, Mangold E, Buettner R, Schackert HK, Kienle P, Stemmler S, Moeslein G, Loeffler M and the German HNPCC Consortium (2006). Novel strategy of optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 118(1): 115-22.

Engel C, Rahner N, Schulmann K, Holinski-Feder E, Goecke TO, Schackert HK, Kloor M, Steinke V, Vogelsang H, Möslein G, Görgens H, Dechant S, von Knebel Doeberitz M,

Rüschhoff J, Friedrichs N, Büttner R, Loeffler M, Propping P, Schmiegeler W; German HNPCC Consortium (2010). Efficacy of annual colonoscopic surveillance in individuals with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8(2): 174-82.

Fishel R (2001). The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res* 61(20): 7369-74.

Fujii H and Shimada T (1989). Isolation and characterization of cDNA clones derived from the divergently transcribed gene in the region upstream from the human dihydrofolate reductase gene. *J Biol Chem* 264(17): 10057-64.

Garcia M, Choi C, Kim HR, Daoud Y, Toiyama Y, Takahashi M, Goel A, Boland CR, Koi M (2012). Association between recurrent metastasis from stage II and III primary colorectal tumors and moderate microsatellite instability. *Gastroenterology* 143(1): 48-50.

Geissler M und Graeven U (2005). Das kolorektale Karzinom. Evidenzbasierte Leitlinien. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, Modrich P (1998). Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem* 273(31): 19895-901.

Goecke T, Schulmann K, Engel C, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Schackert HG, Kloor M, Kunstmann E, Vogelsang H, Keller G, Dietmaier W, Mangold E, Friedrichs N, Propping P, Krüger S, Gebert J, Schmiegeler W, Rueschoff J, Loeffler M, Moeslein G (2006). Genotyp-Phenotype Comparison of German *MLH1* and *MSH2* Mutation Carriers Clinically Affected With Lynch Syndrome: A Report by the German HNPCC Consortium. *J Clin Oncol* 24(26): 4285-92.

Gomes A, Reis-Silva M, Alarcão A, Couceiro P, Sousa V, Carvalho L (2014). Promoter hypermethylation of DNA repair genes *MLH1* and *MSH2* in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the lung. *Rev Port Pneumol* 20(1): 20-30.

Guerrette S, Wilson T, Gradia S and Fishel R (1998). Interactions of Human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: Examination of Mutations Found in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Mol Cell Biol* 18(11): 6616-23.

Gupta S, Gellert M und Yang W (2012): Mechanism of mismatch recognition revealed by human MutSβ bound to unpaired DNA loops. *Nat Struct Mol Biol* 19(1): 72-9.

Hinrichsen I, Kemp M, Peveling-Oberhag J, Passmann S, Plotz G, Zeuzem S, Bieger A (2014). Promoter Methylation of *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* and *p16* Is a Phenomenon of Advanced-Stage HCCs. *PLoS ONE* 9(1): e84453.

Hirata H, Hinoda Y, Kawamoto K, Kikuno N, Suehiro Y, Okayama N, Tanaka Y, Dahiya R (2008). Mismatch repair gene *MSH3* polymorphism is associated with the risk of sporadic prostate cancer. *J Urol* 179(5): 2020-4.

Holinski-Feder E und Grabowski M (2006). Erblisches nicht polypöses kolorektales Karzinom – HNPCC. *Medgen* 18: 246-53.



Holinski-Feder E und Morak M (2008). Hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome Aktueller Stand. Dtsch Med Wochenschr 133(33): 1690-5.

Inokuchi K, Ikejima M, Watanabe A, Nakaijima E, Orimo H, Nomura T, Shimada T (1995). Loss of expression of the human MSH3 gene in hematological malignancies. Biochem Biophys Res Commun 214(1): 171-9.

Issa, J-P J, Shen L, Toyota M (2005). CIMP, at last. Gastroenterology 129(3): 1121-4.

Janning W und Knust E (2008). Genetik. Allgemeine Genetik – Molekulare Genetik – Entwicklungs-genetik. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Jiricny J and Nyström-Lahti M (2000). Mismatch repair defects in cancer. Curr Opin Genet Dev 10(2): 157-61.

Joost P, Therkildsen C, Dominguez-Valentin M, Jönsson M und Nilbert M (2015): Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of *MSH2* Mutations. Urology 86(6): 1212-7.

Kloor M, Schwitalle Y, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N (2006). Tetranucleotide repeats in coding regions: no evidence for involvement in E6A1 carcinogenesis. J Mol Med 84(4): 329-33.

Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S and Olah E (2009). Deletions Removing the Last Exon of *TACSTD1* Constitute a Distinct Class of Mutations Predisposing to Lynch Syndrome. Hum Mutat 30(2): 197-203.

Lee KW, Lee JS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Lee JH (2011). Promoter methylation status of *hMLH1*, *hMSH2*, and *MGMT* genes in colorectal cancer associated with adenoma-carcinoma sequence. Langenbecks Arch Surg 396(7): 1017-26.

Lee SY, Chung H, Devaraj B, Iwaizumi M, Han HS, Hwang DY, Seong MK, Jung BH, Carethers JM (2010). Microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats are associated with morphologies of colorectal neoplasias. Gastroenterology 139(5): 1519-25.

Lewin B (1997). Genes VI. Oxford University Press New York.

Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TYH, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJB, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, van Kessel AG, Yuen ST, van Krieken JHJM, Leung SY and Hoogerbrugge N (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of *MSH2* in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of *TACSTD1*. Nat Genet 41(1): 112-7.

Lin KM, Shashidharan M, Thorson AG, Ternent CA, Blatchford GJ, Christensen MA, Watson P, Lemon SJ, Franklin B, Karr B, Lynch J, Lynch HT (1998). Cumulative incidence of colorectal and extracolonic cancers in *MLH1* and *MSH2* mutation carriers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. J Gastroint Surg 2(1): 67-71.

Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 76(1): 1-18.

Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M (1996). Frameshift mutator mutations. *Nature* 382(6591): 499-500.

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

Marra G, Iaccarino I, Lettieri T, Roscilli G, Delmastro P, Jiricny J (1998). Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the *MSH3* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8568-73.

Martin A and Scharff MD (2002). AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat Rev Immunol* 2(8): 605-14.

Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E (2006). *Humangenetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Nagasaka T, Rhee J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland R and Goel A (2010). Somatic hypermethylation of *MSH2* is a frequent event in Lynch Syndrome colorectal cancer. *Cancer Res* 70(8): 3098-108.

Nakajima E, Orimo H, Ikejima M, Shimada T (1995). Nine-bp repeat polymorphism in exon 1 of the hMSH3 gene. *Jpn J Hum Genet* 40(4): 343-5.

Niessen RC, Hofstra RMW, Westers H, Ligtenberg MJL, Kooi K, Jager POJ, de Groote ML, Dijkhuizen T, Olderode-Berends MJW, Hollema H, Kleibeuker JH and Sijmons RH (2009). Germline Hypermethylation of *MLH1* and *EPCAM* Deletions Are a Frequent Cause of Lynch Syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 48(8): 737-44.

Orimo H, Nakajima E, Yamanoto M, Ikejima M, Emi M, Shimada T (2000). Association between single nucleotide polymorphisms in the hMSH3 gene and sporadic colon cancer with microsatellite instability. *J Hum Genet* 45(4): 228-30.

Peltomäki P (2005). Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 4(3): 227-32.

Peltomäki P and Vasen H (2004). Mutations associated with HNPCC predisposition – Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 20(4-5): 269-76.

Pérez-Cabornero L, Infante M, Velasco E, Lastra E, Miner C, Durán M (2013). Genotype-phenotype correlation in MMR mutation-positive families with Lynch syndrome. *Int J Colorectal Dis* 28(9): 1195-201.

Plaschke J, Engel C, Krüger S, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Mangold E, Moeslein G, Schulmann K, Gebert J, von Knebel Doeberitz M, Rüschhoff J, Loeffler M, Schackert HK (2004a). Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MSH2 mutations: the German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium. *J Clin Oncol* 22(22): 4486-94.

Plaschke J, Krüger S, Jeske B, Theissig F, Kreuz FR, Pistorius S, Saeger HD, Iaccarino I, Marra G, Schackert HK (2004b). Loss of MSH3 protein expression is frequent in MLH1-deficient colorectal cancer and is associated with disease progression. *Cancer Res* 64(3): 864-70.

Plazzer JP, Sijmons RH, Woods MO, Peltomäki P, Thompson B, Den Dunnen JT, Macrae F (2013). The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch Syndrome. *Fam Cancer* 12(2): 175-80.

Reitmair AH, Schmits R, Ewel A, Barpat B, Redston M, Mitri A, Waterhouse P, Mittrücker HW, Wakeham A, Liu B, et al. (1995). MSH2 deficient mice are viable and susceptible to lymphoid tumours. *Nat Genet* 11(1): 64-70.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MF, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S (2003). Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349(3): 247-57.

Ricciardone MD, Ozçelik T, Cevher B, Ozdağ H, Tuncer M, Gürgey A, Uzunalimoğlu O, Cetinkaya H, Tanyeli A, Erken E, Oztürk M (1999). Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res* 59(2): 290-3.

Risinger JI, Umar A, Boyd J, Berchuck A, Kunkel TA and Barrett JC (1996). Mutation of *MSH3* in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. *Nat Genet* 14(1): 102-5.

Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Ausgabe, Berlin.

Rosty C, Brière J, Cellier C, Delabesse E, Carnot F, Barbier JP, Laurent-Puig P (2000). Association of a duodenal follicular lymphoma and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Mod Pathol* 13(5): 586-90.

S3-Leitlinie *Kolorektales Karzinom* der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-91.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.

Schmutte C, Sadoff MM, Shim KS, Acharya S, Fishel R (2001). The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease I. *J Biol Chem* 276(35): 33011-8.

Schulmann K, Brasch FE, Kunstmann E, Engel C, Pagenstecher C, Vogelsang H, Krüger S, Vogel T, Knaebel HP, Rüschhoff J, Hahn SA, von Knebel-Doeberitz M, Moeslein G, Meltzer SJ, Schackert HK, Tympner C, Mangold E und Schmiegeler W (2005): HNPCC-Associated Small Bowel Cancer: Clinical and Molecular Characteristics. *Gastroenterology* 128(3): 590-9.

Shimada T, Fujii H, Lin H (1989). A 165-base pair sequence between the dihydrofolate reductase gene and the divergently transcribed upstream gene is sufficient for bidirectional transcriptional activity. *J Biol Chem* 264(34): 20171-4.

Shinya E and Shimada T (1994). Identification of two initiator elements in the bidirectional promoter of the human dihydrofolate reductase and mismatch repair protein 1 genes. *Nucleic Acids Res* 22(11): 2143-9.

Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegeler WH, Propping P (2013). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) / Lynch Syndrome. *Dtsch Ärztebl Int* 110(3): 32-8.

Steinke V, Holzapfel S, Loeffler M, Holinski-Feder E, Morak M, Schackert HK, Görgen H, Pox C, Royer-Pokora B, von Knebel-Doeberitz M, Büttner R, Propping P, Engel C (2014). Evaluating the performance of clinical criteria for predicting mismatch repair gene mutations in Lynch syndrome: A comprehensive analysis of 3.671 families. *IJC* 135(1): 69-77.

Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, Wang F, Bandipalliam P, Syngal S, Gruber SB (2009). Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* 137(5): 1621-7.

Teruya-Feldstein J, Greene J, Cohen L, Popplewell L, Ellis NA, Offit K (2002). Analysis of mismatch repair defects in the familial occurrence of lymphoma and colorectal cancer. *Leuk Lymphoma* 43(8): 1619-26.

Tomé S, Simard JP, Slean MM, Holt I, Morris GE, Wojciechowski K, te Riele H, Pearson CE (2013). Tissue-specific mismatch repair protein expression: MSH3 is higher than MSH6 in multiple mouse tissues. *DNA Repair (Amst)* 12(1): 46-52.

Tseng-Rogenski SS, Chung H, Wilk MB, Zhang S, Iwaizumi M, Carethers JM (2012). Oxidative Stress Induces Nuclear-to-Cytosol Shift of hMSH3, a Potential Mechanism for EMAT in Colorectal Cancer Cells. *PloS ONE* 7(11): e50616.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschhoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodríguez-Bigas MA, Vasen HFA, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S (2004). Revised Bethesda Guidelines for Hereditary

Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst* 96(4): 261-8.

van Oers JM, Edwards Y, Chahwan R, Zhang W, Smith C, Pechuan X, Schaetzlein S, Jin B, Wang Y, Bergman A, Scharff MD, Edelmann W (2014). The MutS $\beta$  complex is a modulator of p53-driven tumorigenesis through its functions in both DNA double-strand break repair and mismatch repair. *Oncogene* 33(30): 3939-46.

van Puijenbroek M, Nielsen M, Tops CM, Halfwerk H, Vasen HF, Weiss MM, van Wezel T, Hes FJ, Morreau H (2008). Identification of patients with (atypical) MUTYH-associated polyposis by KRAS2 c.34G > T prescreening followed by MUTYH hotspot analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin Cancer Res* 14(1): 139-42.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34(5): 424-5.

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

Vasen HF, Stormorken A, Menko FH, Nagengast FM, Kleibeuker JH, Griffioen G, Taal BG, Moller P, Wijnen JT (2001). MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol* 19(20): 4074-80.

Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, Burn J, Capella G, Colas C, Engel C, Frayling IM, Genuardi M, Heinemann K, Hes FJ, Hodgson SV, Karagiannis JA, Lalloo F, Lindblom A, Mecklin JP, Møller P, Myrholm T, Nagengast FM, Parc Y, de Leon MP, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Sijmons RH, Tejpar S, Thomas HJW, Rahner N, Wijnen JT, Järvinen HJ, Möslein G, (the Mallorca group) (2013). Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 62(2): 812-23.

Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Frappaz D, Bergeron C, Navarro C, Ruano E, Puisieux A (1999). Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer Res* 59(2): 294-7.

Watanabe A, Ikejima M, Suzuki N, Shimada T (1996). Genomic organization and expression of the human MSH3 gene. *Genomics* 31(3): 311-8.

Watson MMC, Berg M, Søreide K (2014). Prevalence and implications of elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in cancer. *Br J Cancer* 111(5): 823-7.

Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Järvinen HJ, Myrholm T, Sunde L, Wijnen JT, Lynch HT (2008). The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer* 123(2): 444-9.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genet* 38(7): 787-93.

Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Møller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S, Möslein G, Tops C, Bröcker-Vriends A, Wu Y, Hofstra R, Sijmons R, Cornelisse C, Morreau H, Fodde R (1999). Familial endometrial cancer in female carriers of *MSH6* germline mutations. *Nature Genet* 23(2): 142-4.

Yamada K, Kanazawa S, Koike J, Sugiyama H, Xu C, Funahashi K, Boland CR, Koi M, Hemmi H (2010). Microsatellite instability at tetranucleotide repeats in sporadic colorectal cancer in Japan. *Oncol Rep* 23(2): 551-61.

Yin J, Kong D, Wang S, Zou TT, Souza RF, Smolinski KN, Lynch PM, Hamilton SR, Sugimura H, Powell SM, Young J, Abraham JM, Meltzer SJ (1997). Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas. *Hum Mutat* 10(6): 474-8.

## Online-Quellen und Datenbanken

*Alamut* 2.6.1

*BLAST 2 Sequences*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

dbSNP: <http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

ExAC Browser: <http://exac.broadinstitute.org/>

HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>

HGNC: <http://genenames.org>

InterPro: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/P20585>

NCBI: <http://ncbi.nlm.nih.gov/gene/4437>

*PolyPhen*: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

*SIFT*: [http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT\\_BLink\\_submit.html](http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_BLink_submit.html)

UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu>

UniProt: <http://uniprot.org/uniprot/P20585>

## **7. Abkürzungsverzeichnis**

5'-UTR	5'-untranslatierter Bereich
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AF	Allelfrequenz
AS	Aminosäure
asc.	ascendens
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CA	Karzinom
CC	Kolonkarzinom
cDNA	komplementäre DNA
CRC	Kolorektales Karzinom
del	Deletion
desc.	descendens
dest.	destilliert
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
<i>DHFR</i>	<i>Dihydrofolat Reduktase</i>
didest.	didestilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DUP	Divergent Upstream Protein
E	Exon
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMAST	Elevated microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats
Endom	Endometrium
<i>EPCAM</i>	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
F	Forward
FA	Familienanamnese
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
fs	<i>Frameshift</i>
G	Guanin
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
H <sub>2</sub> O	Wasser
HNPCC	hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom
HTH	Helix-turn-helix
IDL	Insertions-Deletions-Schleife
IHC	Immunhistochemie
ins	Insertion
J	Jahre
LE	low Electroendosmosis
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGZ	Medizinisch Genetisches Zentrum München
min	Minuten
ml	Milliliter
<i>MLH1</i>	<i>Mut L homolog 1</i>

MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mM	Millimolar
MMR	Mismatch-Repair
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MRP1	Mismatch Repair Protein 1
MSA	Mikrosatellitenanalyse
<i>MSH2</i>	<i>Mut S homolog 2</i>
<i>MSH3</i>	<i>Mut S homolog 3</i>
<i>MSH6</i>	<i>Mut S homolog 6</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	hohe Mikrosatelliteninstabilität
MSI-L	niedrige Mikrosatelliteninstabilität
MS-MLPA	Methylation-specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MSS	Mikrosatellitenstabilität
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neg	negativ
ng	Nanogramm
µl	Mikroliter
oB	ohne pathologischen Befund
<i>p53</i>	<i>p53</i> Tumorsuppressorgen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pM	Picomolar
pos	positiv
<i>PMS1</i>	<i>Postmeiotic segregation increased 1</i>
<i>PMS2</i>	<i>Postmeiotic segregation increased 2</i>
<i>PolyPhen</i>	Polymorphism Phenotyping v2
R	Reverse
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
s.	siehe
<i>SIFT</i>	<i>Sorting Intolerant from Tolerant</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
snRNA	<i>small nuclear</i> RNA
SS	Spleißstelle
syn.	synchron
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TD	Touch-Down-Programm
U	Unit
u.U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
x	mal
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil
α	alpha
β	beta
∞	unendlich



## **8. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Das Mismatch-Repair-System.....	5
Abbildung 2:	Tumorspektrum und Lebenszeitrisko von Lynch-Syndrom-Patienten.....	9
Abbildung 3:	Lokalisation des <i>MSH3</i> -Gens auf Chromosom 5q11-12.....	11
Abbildung 4:	Das <i>MSH3</i> -Gen.....	11
Abbildung 5:	Domänen des MSH3-Proteins und entsprechende Aminosäure-Position...	13
Abbildung 6:	Dreidimensionale Struktur (a) des MSH3-Proteins und (b) des MutSβ-DNA-Komplexes.....	14
Abbildung 7:	Sequenz der Deletion c.1035delT (p.Leu347*) in Exon 7 des <i>MSH3</i> -Gens der Patientin 48064.....	34
Abbildung 8:	Sequenz der Missense-Veränderung c.1258A>G (p.Ser420Gly) in Exon 8 des <i>MSH3</i> -Gens des Patienten 42904.....	36
Abbildung 9:	Sequenz der Missense-Veränderung c.2732T>G (p.Leu911Trp) in Exon 20 des <i>MSH3</i> -Gens des Patienten 61287.....	36
Abbildung 10:	Grafische Darstellung des <i>MSH3</i> -Gens und der nachgewiesenen Keimbahnveränderungen.....	41
Abbildung 11:	Exemplarische Sequenz der Hotspot-Mutation c.1148delA (p.Lys383Argfs*32) in Exon 7 des <i>MSH3</i> -Gens im Tumorgewebe der Patientin 48064.....	46
Abbildung 12:	Exemplarische Sequenz der Hotspot-Mutation c.3261delC (p.Phe1088Serfs*1) in Exon 5 des <i>MSH6</i> -Gens im Tumorgewebe der Patientin 48064.....	47
Abbildung 13:	Stammbaum der Familie der Indexpatientin 48064.....	52
Abbildung 14:	Stammbaum der Familie des Indexpatienten 61287.....	62
Abbildung 15:	Basen- und Aminosäuresequenz von Exon 1.....	65
Abbildung 16:	<i>MSH3</i> -Promotorsequenz innerhalb des nicht-kodierenden Bereichs von Exon 1 und Lokalisation der gefundenen Sequenzveränderungen im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1.....	70
Abbildung 17:	Darstellung der möglichen Mutationsverhältnisse der Patientin 48064.....	76
Abbildung 18:	Mutationskonstellation der Patientin 48064.....	82
Abbildung 19:	Mutationskonstellation des Patienten 42904.....	83
Abbildung 20:	Mutationskonstellation des Patienten 61287.....	84

## **9. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Prozentuale Konservierung der Basenabfolge beim Spleißvorgang.....	11
Tabelle 2:	Befundkonstellation des untersuchten Patientenkollektivs.....	22
Tabelle 3:	Verwendete Reagenzien und deren Hersteller.....	24
Tabelle 4:	Verwendete Kits und deren Hersteller.....	24
Tabelle 5:	Verdünnungen von DNA, Primern und dNTPs.....	25
Tabelle 6:	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die AmpliTaq Gold™-DNA-Polymerase.....	26
Tabelle 7:	Einstellungen des HNPCC-Programms.....	27
Tabelle 8:	Einstellungen des TD-Programms.....	27
Tabelle 9:	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die Taq DNA Polymerase ....	28
Tabelle 10:	In der Gelelektrophorese verwendete Substanzen.....	30
Tabelle 11:	Verwendete Substanzen zur Reinigung der PCR-Produkte.....	30
Tabelle 12:	Inkubationsprogramm zur Reinigung der PCR-Produkte.....	30
Tabelle 13:	Verwendete Substanzen für die Sequenzreaktion.....	31
Tabelle 14:	PCR-Programm für die Sequenzreaktion.....	31
Tabelle 15:	Nachgewiesene exonische Keimbahnveränderungen im <i>MSH3</i> -Gen.....	38
Tabelle 16:	Nachgewiesene intronische Keimbahnveränderungen im <i>MSH3</i> -Gen.....	39
Tabelle 17:	Nachgewiesene Keimbahnveränderungen im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1 des <i>MSH3</i> -Gens.....	40
Tabelle 18:	Zusammenfassende Darstellung der bei den Patienten gefundenen <i>MSH3</i> -Keimbahnveränderungen, der jeweiligen pathogenen <i>MSH6</i> -Mutation und der entsprechenden Diagnose.....	42
Tabelle 19:	Nachgewiesene somatische Sequenzveränderungen im <i>MSH6</i> - und <i>MSH3</i> -Gen und jeweilige Analyse.....	48
Tabelle 20:	Nachgewiesene Sequenzveränderungen in Tumor und Keimbahn der einzelnen Patienten.....	49
Tabelle 21:	Tabellarische Darstellung der Deletionen und Insertionen unklarer Signifikanz in Exon 1.....	66
Tabelle 22:	Tabellarische Darstellung der benignen Polymorphismen (SNPs).....	67

Tabelle 23:	Tabellarische Darstellung der stillen Sequenzveränderungen.....	68
Tabelle 24:	Tabellarische Darstellung der intronischen Sequenzveränderungen.....	69
Tabelle 25:	Tabellarische Darstellung der Sequenzveränderungen im 5'-UTR- Bereich von Exon 1.....	71
Tabelle 26:	Befundkonstellation der untersuchten Patienten.....	79

## 10. Anhang

### Primersequenzen und PCR-Programme der einzelnen Exons

#### *MSH3*

MSH3_E1AFneu:	5'-GCCCCGTTTGGGTCCCATC-3'	HNPCC 56°, 39 Zyklen
MSH3_E1BF:	5'-CTTGCCCTGCCATGTCTC-3'	
MSH3_E1AR:	5'-AAACCGCTTGCCTCGCAG-3'	
MSH3_E1B_Rneu:	5'-GCCCCGCCTTACCCACAAG-3'	
MSH3_E2F:	5'-TCAGTTGTAAGGTTTAAATTGC-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E2R:	5'-AATTCCAGAATACCAGAGCC-3'	
MSH3_E3F:	5'-ATGCTGGTTATGAATTGACATA-3'	TD 64°C-54°C, 35 Zyklen
MSH3_E3R:	5'-GTACTTCAGAACCCACTATTC-3'	
MSH3_E4F:	5'-TGCATTTTCCGTCTCTGGG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E4R:	5'-AAAATATCTAAGGCTAGACAAG-3'	
MSH3_E5F:	5'-TAATAAAGTGAACCAACATCAC-3'	TD 64°C-54°C, 35/39 Zyklen
MSH3_E5R:	5'-ACTCTCTGGAGGAGAATCC-3'	
MSH3_E6F:	5'-CGTTTAAACATTTTCGAAATGAG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E6R:	5'-GCCAACAAGCCCTTGTATC-3'	
MSH3_E7F:	5'-GCTGTGAACCATTATTTTAAAG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E7R:	5'-CATATTTAGAGATACCATGAAC-3'	
MSH3_E8F:	5'-TGTTTATGCTGTGTTATAGCC-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E8R:	5'-GGAACTAAACCTAAGTTTCAG-3'	
MSH3_E9F:	5'-GGCCAAGACCTAAATACCAG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E9R:	5'-ACAACAACAGTGAGCTCTTC-3'	
MSH3_E10F:	5'-GCTAACAAGTTAATGGTTCTG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E10R:	5'-AATGTTTCATAATATAAGCTCCC-3'	
MSH3_E11F:	5'-ATGTTTCTAGTTCCTGAATTAG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E11R:	5'-CTGCTGCCTTACTCAGAAG-3'	
MSH3_E12F:	5'-GAATCGGGGTATATGAAATAAC-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E12R:	5'-GTAACCTTGGTTTTAAATGCC-3'	
MSH3_E13F:	5'-GGGCATTAGAGTGGGAAATG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E13R:	5'-GTCCTCAAGCTGAAGAACAC-3'	
MSH3_E14F:	5'-TTTCCTCAATTCTGATTCTAAC-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E14R:	5'-GCACTGAATTATACTGACTGG-3'	
MSH3_E15F:	5'-TTTCCTCTTTTATCACACTATG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E15R:	5'-ACATATCCTATCCTCAGATTTC-3'	
MSH3_E16F:	5'-TATACCACAATTTGGGGAAAG-3'	TD 64°C-54°C, 39 Zyklen
MSH3_E16R:	5'-TATACAGATGTCATCATAATGC-3'	
MSH3_E17F:	5'-TTCTAAAGTGATGGCATTTTCG-3'	HNPCC 58°C, 39 Zyklen
MSH3_E17R:	5'-TCCAGTCTGTTTCTGATAGC-3'	
MSH3_E18F:	5'-GCTTGTTGTAGAGCTATTATAG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E18R:	5'-AATGTCATCTTATCTAAAGCAC-3'	
MSH3_E19F:	5'-GTCGTACAAACAGAGTACTG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E19R:	5'-AAGTTTGGGATGTTATCATCG-3'	
MSH3_E20F:	5'-CCACTTATGAGATAAATTGTGG-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E20R:	5'-GCGATAATGTGGGCTTGAC-3'	
MSH3_E21F:	5'-CATAAAATAATGTTTCGGCTTCC-3'	TD 64°C-50°C, 39 Zyklen
MSH3_E21R:	5'-TATGGCACAATTATGACTGTC-3'	
MSH3_E22F:	5'-TCAAAAGAAAGTGGAAGACAG-3'	HNPCC 58°C, 39 Zyklen
MSH3_E22R:	5'-TAAGCAGTAAGTTCATGTTCC-3'	
MSH3_E23F:	5'-GTTATGAGAACTTACATGTCC-3'	TD 64°C-50°C,

MSH3_E23R:	5'-TTGGACAACCTAGAAAGGTTTC-3'	39 Zyklen
MSH3_E24F:	5'-TCATAGCTTCTGATGAGACG-3'	TD 64°C-54°C,
MSH3_E24R:	5'-CTTTACTGGACTTACTGTCC-3'	39 Zyklen

## ***MSH6***

MSH6_E4F:	5'-GGCTGCACGGGTACCATTAT-3'	TD 64°C-50°C,
MSH6_E4R:	5'-CAGCTGGCAAACAGCACTAC-3'	29 Zyklen
MSH6_E5F:	5'-AAAACCCCCAAACGATGAAG-3'	TD 64°C-50°C,
MSH6_E5R:	5'-TCACCTAAGTATGTTATTCC-3'	29 Zyklen
MSH6_E8F:	5'-GTTTAAATTCCTTTGAGTTACTTCC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH6_E9R:	5'-CTTAAGGTCAGTTAGTTATAATTCC-3'	29 Zyklen

## ***MSH2***

MSH2_E1F:	5'-GTCGCGCATTTTCTTCAACC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E1R:	5'-GTCCCTCCCCAGCACGC-3'	29 Zyklen
MSH2_E2F:	5'-GAAGTCCAGCTAATACAGTGC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E2R:	5'-CTTCACATTTTATTTTCTACTC-3'	29 Zyklen
MSH2_E3F:	5'-GCTTATAAAATTTTAAAGTATGTTTC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E3R:	5'-GCCTTTCCTAGGCCTGGAATCTCC-3'	29 Zyklen
MSH2_E4F:	5'-CTGTTATCACTATAGTTATCAATG-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E4R:	5'-ATAAATATGACAGAAATATCCTTC-3'	29 Zyklen
MSH2_E5F:	5'-CCAGTGGTATAGAAATCTTCG-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E5R:	5'-CCATTCAACATTTTAAACCC-3'	29 Zyklen
MSH2_E6F:	5'-GTTTTCACTAATGAGCTTGCC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E6R:	5'-GTGGTATAATCATGTGGG-3'	29 Zyklen
MSH2_E7F:	5'-GACTTACGTGCTTAGTTG-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E7R:	5'-GTATATATTGTATGAGTTGAAGG-3'	29 Zyklen
MSH2_E8F:	5'-GATTTGTATTCTGTAAAATGAGATC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E8R:	5'-GGCCTTTGCTTTTAAAAATAAC-3'	29 Zyklen
MSH2_E9F:	5'-GTCTTTACCCATTATTTATAGG-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E9R:	5'-GTATAGACAAAAGAATTATTCC-3'	29 Zyklen
MSH2_E10F:	5'-GGTAGTAGGTATTTATGGAATAC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E10R:	5'-CATGTTAGAGCATTTAGGG-3'	29 Zyklen
MSH2_E11F:	5'-ACATTGCTTCTAGTACAC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E11R:	5'-CCAGGTGACATTCAGAACAT-3'	29 Zyklen
MSH2_E12F:	5'-ATTCAGTATTCCTGTGTAC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E12R:	5'-CGTTACCCCCACAAAGC-3'	29 Zyklen
MSH2_E13F:	5'-CGCGATTAATCATCAGTG-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E13R:	5'-GGACAGAGACATACATTTCTATC-3'	29 Zyklen
MSH2_E14F:	5'-TACCACATTTTATGTGATGG-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E14R:	5'-GGGTAGTAAGTTTCCC-3'	29 Zyklen
MSH2_E15F:	5'-CTCTTCTCATGCTGTCCC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E15R:	5'-ATAGAGAAGCTAAGTTAAAC-3'	29 Zyklen
MSH2_E16F:	5'-TTTAATTACTAATGGGACATTC-3'	TD 64°C-50°C,
MSH2_E16R:	5'-AAGTTGATAGCCCATGGGC-3'	29 Zyklen

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. med. Dipl. chem. Elke Holinski-Feder danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, in der HNPCC-Arbeitsgruppe promovieren und erste Laborerfahrungen sammeln zu dürfen. Vielen Dank für die Bereitstellung des Themas, das Interesse und die konstruktiven Anregungen.

Mein Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Monika Morak für die fachkundige Betreuung, insbesondere für die stets ausführliche Diskussion meiner Ergebnisse, die hilfreiche Kritik und die Mühe und Sorgfalt bei der Korrektur meiner Arbeit.

Frau Sari Maßdorf möchte ich für die Einarbeitung in das Laborleben danken. Durch ihre herzliche und geduldige Art war die Arbeitsatmosphäre immer äußerst angenehm.

Meinem Freund Mathias und meinen Eltern danke ich für ihre moralische Unterstützung und konstruktive Kritik.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Mutationsscreening des *MSH3*-Gens bei Kolonkarzinom-Patienten zur Untersuchung seiner Beteiligung an der Prädisposition für das Lynch-Syndrom“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 08.11.2016

Sarah Käsbauer