

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Analyse von Patienten
mit Verdacht auf HNPCC-Syndrom
auf *MSH3*-Sequenzveränderungen, CNV's und
Methylierung in der Keimbahn und in Tumoren

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

vorgelegt von

Martina Spies, geb. Kerscher

aus

Landshut

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Joachim-Ulrich Walther
Prof. Dr. Roland Kappler

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2018

meinen Eltern

Herr, unser Gott, du bist allen nahe,
die zu dir rufen.
Gib uns die Kraft deiner Liebe,
die stärker ist als der Tod.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Entdeckung der DNA.....	1
1.2 Die Entdeckung der erblichen Tumorentitäten.....	1
1.3 Allgemeines und Wissenswertes zum HNPCC-Syndrom.....	3
1.4 Viele Wege führen zum Tumor: Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms.....	8
1.4.1 „CIN-Pathway“.....	8
1.4.2 „MSI-Pathway“.....	9
1.4.2.1 Grundlagen des „MSI-Pathways“.....	9
1.4.2.1.1 Sporadische Tumore mit MSI.....	9
1.4.2.1.2 Hereditäre Tumore mit MSI - Lynch-Syndrom.....	10
1.4.2.1.2.1 MSI und MMR.....	10
1.4.2.1.2.2 Zusammenspiel der <i>Mismatch</i> -Reparatur-Gene.....	11
1.4.2.2 Aufgaben von MutS α und MutS β	14
1.4.3 Promotor-Methylierungen und „ <i>Methylator-Pathway</i> “ des Tumor-Gewebes ...	14
1.4.4 „ <i>Serrated-Pathway</i> “.....	16
1.5 Verknüpfungen und Verbindungen zwischen den einzelnen <i>Pathways</i>	19
1.6 MS-MLPA	21
1.7 Charakterisierung des <i>MSH3</i> -Gens.....	23
1.7.1 Entdeckung und Einordnung des <i>MSH3</i> -Gens.....	23
1.7.2 Organisation des <i>MSH3</i> -Gens.....	23
1.7.3 Expression und Regulation des <i>MSH3</i> -Gens.....	24
1.7.4 Aufbau und Funktion des <i>MSH3</i> -Gens.....	24
1.7.5 Bekannte Sequenzveränderungen und Polymorphismen.....	26
1.8 Patientenkollektiv und Zielsetzung der Arbeit.....	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Patientenmaterial (gDNA und Tumor-DNA).....	29
2.1.1 Voruntersuchungen.....	29
2.1.2 Mikrosatellitenanalyse.....	29
2.1.3 Immunhistochemie.....	29
2.2 Chemikalien.....	30
2.3 Kits.....	30
2.4 Puffer und Lösungen.....	30
2.5 DNA-Isolation.....	31
2.6 PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	31
2.6.1 Standard-PCR.....	31
2.6.2 <i>Touchdown</i> -PCR.....	32
2.6.3 <i>Nested</i> -PCR.....	33
2.7 Gelelektrophorese.....	33
2.8 Reinigung von PCR-Produkten.....	33
2.9 Gelextraktion.....	34
2.10 DNA-Sequenzierung.....	34
2.10.1 Sequenzreaktion.....	34
2.10.2 Sequenzanalyse.....	34
2.11 Bestätigung.....	35
2.12 MS-MLPA.....	35
2.12.1 DNA-Denaturation und Hybridisierung der SALSA-Proben.....	36
2.12.2 Ligation und Verdau.....	36
2.12.3 PCR-Reaktion.....	36

2.12.4 MS-MLPA - Auswertung	36
2.13 Geräte.....	37
2.14 Datenbanken und Computerprogramme.....	37
3 Ergebnisse.....	39
3.1 MS-MLPA.....	39
3.1.1 MS-MLPA - Ergebnisse in genomischer DNA	39
3.1.1.1 Gruppe 1: MSI-H + IHC-MLH1-Ausfall	40
3.1.1.2 Gruppe 2: MSS + IHC-MLH1- Ausfall	42
3.1.1.3 Gruppe 3: MSI-H + IHC-MSH2/MSH6 - Ausfall	42
3.1.1.4 Kontrollen	43
3.1.1.5 Zusammenfassung.....	47
3.1.2 MS-MLPA - Ergebnisse in Tumor-DNA.....	47
3.1.2.1 Ergebnisse.....	47
3.1.2.2 Korrelation zwischen Tumor- und gDNA.....	48
3.1.2.3 Zusammenfassung Tumor-DNA	49
3.2 Ergebnisse des <i>MSH3</i> -Screenings auf Keimbahn-Sequenzveränderungen.....	49
3.2.1 Etablierung des <i>MSH3</i> -Gens.....	50
3.2.2 Gesamtübersicht Patiententabelle	51
3.2.3 Aufgetretene Sequenzveränderungen.....	54
3.2.3.1 Sequenzveränderungen vor dem ATG in der 5'UTR-Region.....	54
3.2.3.2 Sequenzveränderungen im Exon 1.....	54
3.2.3.3 Exon 3.....	56
3.2.3.4 Exon 4.....	57
3.2.3.5 Exon 9.....	57
3.2.3.6 Exon 14.....	57
3.2.3.7 Exon 16.....	58
3.2.3.8 Exon 21.....	58
3.2.3.9 Exon 22.....	59
3.2.3.10 Exon 23.....	59
3.2.3.11 Exon 24.....	60
3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	60
4 Diskussion.....	61
4.1. MS-MLPA.....	61
4.1.1 Genomische DNA und <i>Pathway</i> -Zuordnung.....	61
4.1.1.1 Gruppe 1: MSI-H + IHC-MLH1/PMS2-Ausfall oder <i>MLH1</i> - Keimbahnmethylierer.....	61
4.1.1.1.1 Patienten #1 M.H., #2 S.W. und #3 R.G.....	61
4.1.1.1.2 Patientin #21 K.Ma.....	62
4.1.1.2 Gruppe 2: MSS + IHC-MLH1-Ausfall	63
4.1.1.3 Gruppe 3: MSI-H + IHC-MSH2/MSH6-Ausfall.....	63
4.1.1.4 Keimbahn-Methylierung von <i>MSH2</i> im Promotor-Bereich.....	64
4.1.1.5 Qualität, Methylierungsabhängigkeit und Vergleichbarkeit der Kontrollen.....	65
4.1.2 Tumor-DNA.....	66
4.1.2.1 <i>Pathway</i> -Zuordnung.....	66
4.1.2.2 Einteilung <i>CIMP-Pathway</i>	67
4.1.2.3 Einordnung der restlichen Patienten.....	67
4.1.2.4 Zusammenfassung.....	68
4.1.3 Bedeutung des <i>MGMT</i> -Gens.....	69
4.1.4 Qualität der Ergebnisse.....	70
4.1.5 Das Programm „ <i>Coffalyser</i> “ und Auswertung der MS-MLPA.....	70

4.2 Das <i>MSH3</i> -Gen.....	71
4.2.1 Beurteilung der gefundenen Sequenzveränderungen.....	71
4.2.2 Detaillierte Analyse der <i>MSH3</i> -Sequenzveränderung bei Patientin #19 S.U... ..	73
4.2.2.1 Exon 1: c.190C>G p.(Pro64Ala).....	73
4.2.2.2 Exon 1: c.195_203dup p.(Pro67_Pro69dup).....	74
4.2.2.3 Segregationsanalyse und Diskussion der Patientin #19 S.U.....	74
4.2.3 Genauere Analyse der <i>MSH3</i> -Sequenzveränderung des Patienten #31 B.K..	75
4.2.4 Einordnung von <i>MSH3</i> -Varianten in den Gesamtzusammenhang.....	78
4.2.5 Exon 1.....	79
5 Schluss: Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick	80
5.1 Zusammenfassung der Arbeit.....	80
5.2 Ausblick.....	81
6 Anhang.....	83
6.1 Literaturverzeichnis.....	83
6.2 Primer.....	91
6.2.1 Primer für <i>KRAS</i>	91
6.2.2 Primer für <i>BRAF</i>	91
6.2.3 Primer für <i>MGMT</i>	91
6.2.4 Primer für <i>MSH3</i>	91
6.3 PCR-Bedingungen für das <i>MSH3</i> -Gen.....	93
6.3.1 Exon 1.....	93
6.3.2 Alle anderen Exons.....	93
6.4 <i>MSH3</i> -Gen.....	93
6.4.1 Gen-Sequenz (BLAT).....	93
6.4.2 Aminosäuren-Sequenz.....	97
6.5 Beispiel für MS-MLPA - Sonden in den jeweiligen Genen.....	98
6.6 Abkürzungsliste.....	98
6.7 Code-Sonne.....	99
7 Publikationsliste.....	100
8 Danksagung.....	101
9 Eidesstattliche Versicherung	102

1 Einleitung

1.1 Entdeckung der DNA

Im Jahre 1951 trafen an der Universität Cambridge zwei Forscher zusammen: der Brite Francis Crick und der Amerikaner James Watson. Sie beide legten zwei Jahre später den Grundstein für die Entdeckung der Genstruktur des Menschen.

Beide strebten aus persönlichem Prestige ihrem großen Ziel nach: der Verleihung des Nobel-Preises. Konkurrenten gab es viele, denn die chemischen Bestandteile des DNA-Moleküls waren durchaus bekannt. Schließlich bekamen sie Zugang zu Daten der Physikerin Rosalind Franklin ohne deren Wissen und Zustimmung. Erst durch ihre Röntgenstrukturanalyse verstanden Watson und Crick, dass die DNA durch eine Helix-Struktur zusammengehalten wird. Aus Büromaterial bauten sie ihr erstes Modell (s. Abb. 1) und sandten einen Artikel an das „*Nature*“-Journal, das die Arbeitsergebnisse im April 1953 veröffentlichte (Watson and Crick 1953). Das Potenzial ihrer Publikation wurde erst später erkannt, als sich zeigte, dass sie mit ihren Annahmen richtig lagen. Dies war der Beginn der molekulargenetischen Wissenschaften. 1962 schließlich wurde Watson und Crick der Nobelpreis für Medizin überreicht.

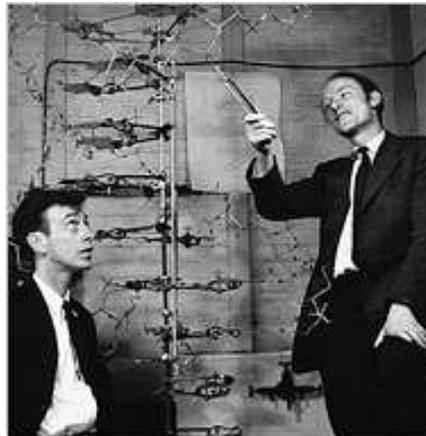


Abbildung 1: Watson und Crick mit ihrem ersten selbstgebastelten DNA-Molekül
(<http://graphics8.nytimes.com/images/2006/07/11/science/11book.1.190.jpg>)

1.2 Die Entdeckung der erblichen Tumorentitäten

In den „*Archives of Internal Medicine*“ veröffentlichte Aldred Scott Warthin 1913 seine Studie, in der er verschiedene Familien, sog. „*cancerous fraternities*“, und seinen Standpunkt zu erblichen Karzinom-Erkrankungen beschrieb.

Unter anderem berichtet er in dem Artikel von „Family G.“ (s. Abb. 2).

Der Großvater dieser Familie, von dessen Seite die kanzerogene Linie stammte, hatte 48 Nachkommen. Davon erkrankten 17 Familienmitglieder (35%) an Krebs (10 Uterus-Karzinom, 7 Magen/Darm-Karzinom). Bis auf zwei Frauen (Magen/Leber- und Darm-Karzinom) waren alle weiblichen Personen vom Uterus-Karzinom betroffen. Bei allen männlichen erkrankten Mitgliedern überwog das Magen-/Darm-Karzinom.

Als Fazit seiner Studien führte er eine gewisse „*susceptibility to carcinoma*“ (Prädisposition) mancher Familien auf und konstatierte bei familiärer Häufung einer Tumorentität ein gewisses vererbliches Risiko.

Des weiteren fiel ihm auf, dass Neoplasien in den jüngsten Generationen in früherem Alter und mit erhöhter Malignität auftraten. Außerdem liege eine Tendenz zum gastrointestinalen Karzinom bei Männern und zum Uterus-Karzinom bei Frauen vor.

Bezüglich des Erbgangs diskutierte Warthin verschiedene Möglichkeiten, von einem rezessiven Erbgang bis hin zu der Überlegung, dass die „Widerstandsfähigkeit gegen Krebs ein dominanten Merkmal sei, bei deren Abwesenheit die o.g. Prädisposition auftrete.“ (Warthin, 1913).

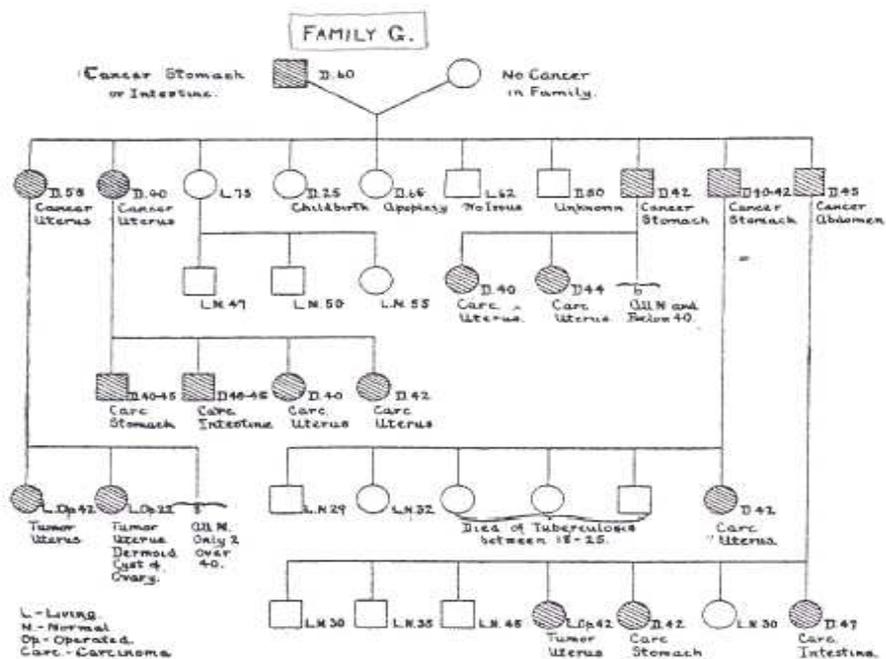


Abbildung 2: Stammbaum der Family G. (Warthin, 1913)

H.T. Lynch griff in seinem Artikel 1966 (Lynch, Shaw et al. 1966) die Ergebnisse des Vorgängers auf und publizierte seinerseits zwei Familien, die denen Warthins sehr ähnlich

waren. Auch er fand ein erhöhtes Auftreten von Karzinomen, die Kolon, Endometrium, Ovar und Brust betreffen. Hier wird bereits vom autosomal-dominanten Vererbungsmuster gesprochen. Beide wollten erforschen, was hinter dem genetischen Phänomen steckt, das sie beschrieben haben.

1971 folgte, ebenfalls von H.T. Lynch, ein Artikel, der über den weiteren Entwicklungsverlauf der „*Family G.*“ berichtete (Lynch and Krush 1971). Dies war als Ergänzung und Vervollständigung zu den bereits vorliegenden Daten von Warthin nach einem Beobachtungszeitraum von 75 Jahren gedacht. Bis dahin hatte der ursprüngliche Stammvater bereits 650 Nachkommen. Insgesamt waren 113 Karzinome (17,4%) aufgetreten, davon 52 Kolon- (46%), 18 Endometrium- (16%), 8 Magen- (7%), 4 Mamma-Karzinome (3,4%) und etliche andere Tumorentitäten.

Durch die nun größere Anzahl an untersuchten Personen und der dadurch besseren Nachvollziehbarkeit des Vererbungsmusters und der Merkmalsträger konnte man sich auf einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus festlegen.

Zudem wurden erstmalig – ausgehend von den oben errechneten Wahrscheinlichkeiten – Vorsorgeuntersuchungen bei wahrscheinlich betroffenen Familienmitgliedern empfohlen.

1.3 Allgemeines und Wissenswertes zum HNPCC-Syndrom

Das kolorektale Karzinom (CRC) steht als eine der häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland an dritter Stelle. Dies bedeutet etwa 71000 Neuerkrankungen pro Jahr. Der Häufigkeitsgipfel liegt ca. bei 70 Jahren, wobei eine exponentielle Zunahme des Auftretens nach dem 50. Lebensjahr besteht. Männer sind dabei etwas öfter betroffen als Frauen ($\text{♂}1,5 : 1\text{♀}$). Obwohl für die Entstehung gastrointestinaler Tumore hauptsächlich Lebens- und Umweltbedingungen verantwortlich gemacht werden, misst man bei ca. 10-30% der Patienten mit familiärer Häufung genetischen Prädispositionen eine immer größere Bedeutung zu (s. Abb. 3). Zu den erblichen CRC-Erkrankungen zählen als häufigste das HNPCC-Syndrom (~3%), die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP, ~1%), das Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS) und die Familiäre Juvenile Polyposis (FJP).

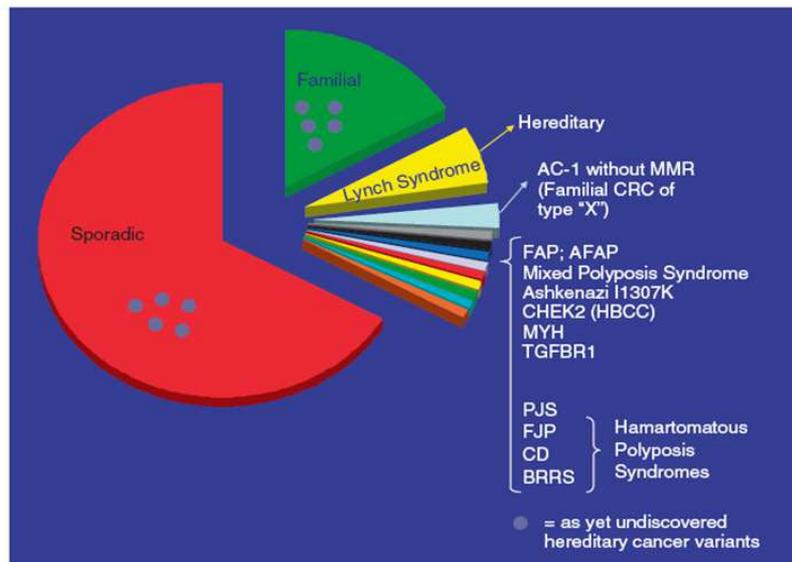


Abbildung 3: Häufigkeit hereditärer Krebserkrankungen beim CRC (HT Lynch, 2009)

Das HNPCC („Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“) – Syndrom ist eine klinische Diagnose. Bei den Patienten finden sich (im Gegensatz zur FAP) meist nur einzelne kolorektale Adenome oder Karzinome, bei denen eine rein klinische Unterscheidung von sporadischen Tumoren nicht möglich ist (Steinke 2013). Aus diesem Grund wurden klare Kriterien definiert, um HNPCC-Patienten zu erkennen. Zu erwähnen sind hier die Amsterdam- und die Bethesda-Kriterien (s. Tab. 1-3):

Amsterdam-I-Kriterien (umfassen nur kolorektale Karzinome, 1991):

-alle Kriterien müssen erfüllt sein-

a) Mind. 3 Familienangehörige mit histologisch gesichertem Kolon-/Rektumkarzinom
b) Einer davon Verwandter 1. Grades der beiden anderen
c) Erkrankungen in mind. 2 aufeinanderfolgenden Generationen
d) Mind. 1 Patient mit Kolon-/Rektumkarzinom vor dem 50. Lebensjahr
e) Ausschluss einer FAP (familiäre adenomatöse Polyposis coli)

Tabelle 1: Amsterdam I – Kriterien (Vasen, Mecklin et al. 1991)

Amsterdam-II-Kriterien (umfassen auch extrakolonische Tumormanifestationen,1999):

-alle Kriterien müssen erfüllt sein-

a) Mind. 3 Familienangehörige mit HNPCC-assoziiertem Karzinom (Kolon/Rektum, Endometrium, Dünndarm, Urothel, hepatobiliäres Karzinom)
b) Einer davon Verwandter 1. Grades der beiden anderen
c) Erkrankungen in mind. 2 aufeinanderfolgenden Generationen
d) Mind. 1 Patient mit der Diagnose eines Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr
e) Ausschluss einer FAP

Tabelle 2: Amsterdam II – Kriterien (Vasen, Watson et al. 1999)

Die Bethesda-Kriterien (s. Tab. 3) wurden eingeführt, da nicht alle Familien mit nachgewiesener Keimbahn-Sequenzveränderung die typischen Amsterdam-Kriterien erfüllen.

Revidierte Bethesda-Kriterien (2004):

-mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein-

a) Kolorektales Karzinom vor dem 50. Lebensjahr
b) synchrone/metachrone Kolon-/Rektumkarzinome oder HNPCC-assoziierte Tumorerkrankungen (ableitende Harnwege, Dünndarm, Magen, Ovar, ZNS, Haut)
c) 2 oder mehr betroffene Familienmitglieder, erstgradig verwandt, mit Kolon-/Rektumkarzinomen und/oder HNPCC-assoziiierter Tumorerkrankung (einer < 50 Jahre)
d) 2 oder mehr betroffene Familienmitglieder, erstgradig oder zweitgradig verwandt, mit Kolon-/Rektumkarzinomen und/oder HNPCC-assoziiierter Tumorerkrankung, altersunabhängig
e) Kolon- bzw. Rektumkarzinom mit hochgradiger Mikrosatelliteninstabilität vor dem 60. Lebensjahr

Tabelle 3: Revidierte Bethesda – Kriterien (Umar, Boland et al. 2004)

Sind die Amsterdam-Kriterien erfüllt, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine erbliche Tumorerkrankung vor. In der weiteren Differenzierung des Krankheitsbildes kann es sich um ein Lynch-Syndrom handeln. Im Tumor liegt dann eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität vor und der Patient weist eine Keimbahn-Sequenzveränderung in einem der DNA-Reparaturgene („*Mismatch repair genes*“ MMR) auf. Ca. 40% der Patienten zeigen keine Mikrosatelliteninstabilität im Tumorgewebe. Ein Lynch-Syndrom liegt auch bei erfüllten Amsterdam-Kriterien nicht vor, wenn keine Keimbahn-Sequenzveränderung in einem der MMR Gene nachweisbar ist. Die genetischen

Ursachen dieser erblichen kolorektalen Karzinomerkrankung sind bislang nicht bekannt. Sind die Bethesda-Kriterien erfüllt, ist zumindest der Verdacht auf das Vorliegen eines Lynch-Syndroms auszusprechen (s. Abb. 4) und es ist eine Analyse des jeweiligen Tumormaterials indiziert. Wenn dabei eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen wird, erfolgt eine Analyse der MMR-Gene. Wird dabei eine krankheitsverursachende Keimbahn-Sequenzveränderung in einem MMR-Gen nachgewiesen (wie bei 50% der HNPCC-Patienten), so wird der Begriff „Lynch-Syndrom“ verwendet (Steinke 2013).

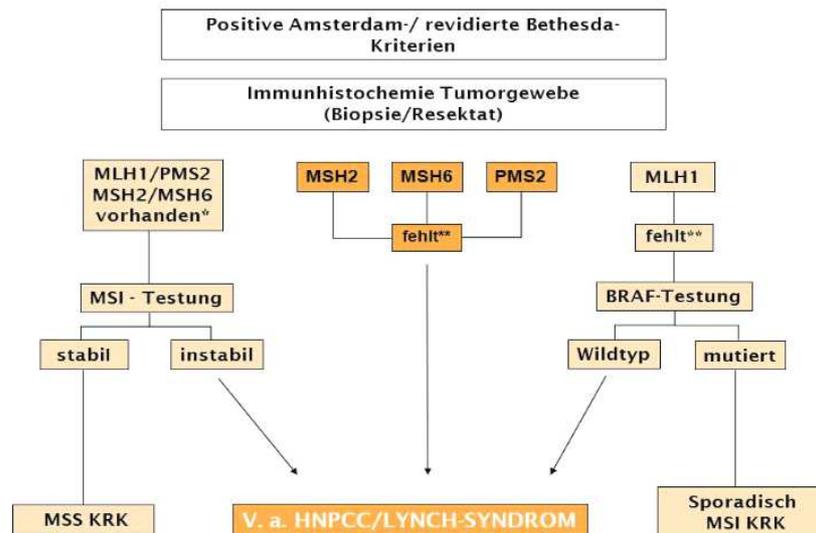


Abbildung 4: Algorithmus zum Ablauf der molekularpathologischen Abklärung eines MMR-Defektes bei positiven Amsterdam/Bethesda-Kriterien (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF. Registrierungsnummer: 021-007OL, <http://leitlinienprogramm.onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>. [Stand: 07.09.2015])

Typische Charakteristika für das HNPCC-Syndrom sind weiterhin das frühe Manifestationsalter mit durchschnittlich 45 Jahren, häufig synchrone oder metachrone Zweitkarzinome und die typische Lokalisation v.a. im rechten Hemikolon (Oberhuber and Rüschoff 2004) und seltener im Rektum (ca. 1/3). Es umfasst eine autosomal-dominant vererbliche Prädisposition für Tumorerkrankungen des Dickdarms und des Rektums mit einer Penetranz von 80% bis zum 70. Lebensjahr. Histopathologisch finden sich oft muzinöse Kolonkarzinome im rechten Hemikolon (Steinke 2013). Beobachtet wurden außerdem assoziierte Tumorerkrankungen außerhalb des Kolons, so z.B. im Endometrium, Ovar, Dünndarm, Magen, Gehirn, dem Urothel sowie dem hepatobiliären System. Die operative Therapie entspricht der eines jeden anderen CRC. Die Mikrosatelliten-Analyse kann im Rahmen der Tumorerkrankung veranlasst werden. Bei Erfüllung der Amsterdam/Bethesda-Kriterien sollte der Patient zu einem Facharzt für

Humangenetik überwiesen werden, der den Betroffenen über seine Erkrankungsrisiken sowie über die Möglichkeit, sich molekulargenetisch testen zu lassen, aufklärt (s. Abb. 5). Zudem wird eine umfassende Familienanamnese mit Stammbaum erstellt. Entsprechend dem Gendiagnostik-Gesetz kann die humangenetische Beratung auch von einem Facharzt mit der fachspezifischen Weiterbildung zur humangenetischen Beratung durchgeführt werden.

Nach Abschluss der Untersuchungen wird erneut ein Beratungsgespräch mit dem Betroffenen durchgeführt, um die Ergebnisse und die daraus resultierenden Folgen bezüglich Tumorvor- und -nachsorge zu besprechen. Zudem können auch Anfragen der Familienmitglieder geklärt werden, die sich ebenfalls testen lassen wollen. Des weiteren sollte dem Patienten ein psychoonkologisches Beratungsgespräch angeboten werden. Auch für die positiv-getesteten Familienmitglieder ist eine Aufklärung hinsichtlich des erhöhten Erkrankungsrisikos wichtig. Die Kinder eines Betroffenen haben eine Wahrscheinlichkeit von 50%, ebenfalls die Anlage in sich zu tragen. Eine prädiktive Genanalyse ist ab dem 18. Lebensjahr möglich.

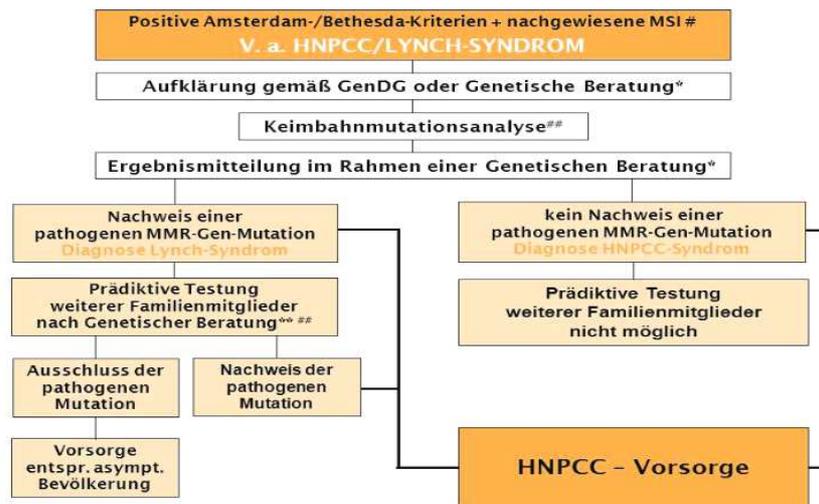


Abbildung 5: Algorithmus zum Ablauf der genetischen Diagnostik bei Patienten mit V.a. ein hereditäres Tumordispositions-Syndrom (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF. Registrierungsnummer: 021-0070L, <http://leitlinienprogramm.onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>. [Stand: 07.09.2015])

Da die Träger einer Sequenzveränderung ein erhöhtes Risiko für kolorektale Tumore und weitere Neoplasien haben, werden diesen dem Risiko angepasste Vorsorgemaßnahmen und Früherkennungsprogramme angeboten. Dies umfasst folgende Untersuchungen (s. Tab. 4):

Altersangabe	Untersuchung	Intervall
Ab dem 25. Lebensjahr	Körperliche Untersuchung	jährlich
	Koloskopie	jährlich
	Gynäkologische Untersuchung incl. transvaginaler Sonographie	jährlich
Ab dem 35. Lebensjahr	ÖGD	regelmäßig
	Endometriumbiopsie mit der Pipelle	jährlich

Tabelle 4: Vorsorgeempfehlungen

(Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF. Registrierungsnummer: 021-007OL, <http://leitlinienprogramm.onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>. [Stand: 07.09.2015])

Gemäß der aktuellen Lage prospektiver Studien ist davon auszugehen, dass durch die Entfernung von kolorektalen Adenomen im Rahmen der jährlichen Koloskopien das Krebsrisiko von HNPCC-Patienten gesenkt werden kann. Die in den Koloskopien entdeckten Karzinome hatten eine signifikant günstigere Stadienverteilung als diejenigen Malignome, die erst beim Auftreten von Symptomen entdeckt wurden (Engel et al, 2010).

1.4 Viele Wege führen zum Tumor: Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms

1.4.1 „CIN-Pathway“

Der „CIN-Pathway“ („*Chromosomal INstability*“) wird auch als der „traditionelle Weg“ der CRC-Entwicklung bezeichnet. 60% der Karzinome entstehen auf diese Art und Weise (Snover 2011).

Dabei steht am Anfang meist eine Sequenzveränderung oder Deletion im *APC*-Gen (Chromosom 5q), dann folgen eine *KRAS*-Sequenzveränderung, der Verlust von Chromosom 18q und schließlich eine Deletion auf Chromosom 17q im Bereich des Tumor-Suppressor-Gens *p53*. Aus diesem Grund wird der *CIN-Pathway* oft auch „*Suppressor-Pathway*“ genannt (s. Abb. 6 oben) (Grady 2004).

Jedoch müssen nicht immer alle Gendefekte auftreten und sich genau in dieser Reihenfolge ereignen, um zur Tumorgenese eines CRCs zu führen (Smith, Carey et al. 2002 und Buch von Young et al. 2002).

Klinisch gesehen entspricht den genetischen Veränderungen zunächst eine Mucosa-Veränderung im Gewebe (der sog. „*dysplastic aberrant crypt focus*“ - ACF), später entwickelt sich das makroskopisch sichtbare Adenom (Takayama, Ohi et al. 2001).

Mit zum *CIN-Pathway* zählt Grady auch die Gruppe der numerischen

Chromosomenaberrationen sowie das Kollektiv der von *Loss of Heterozygosity* (LOH) betroffenen Gene. LOH bedeutet, dass durch die genetischen Veränderungen bereits eines Allels die Gesamtfunktionalität massiv herabgesetzt ist. Letzteres betrifft vor allem DNA-Replikations- und Mitose-Kontrollstellen (z.B. BUB1) (Grady 2004).

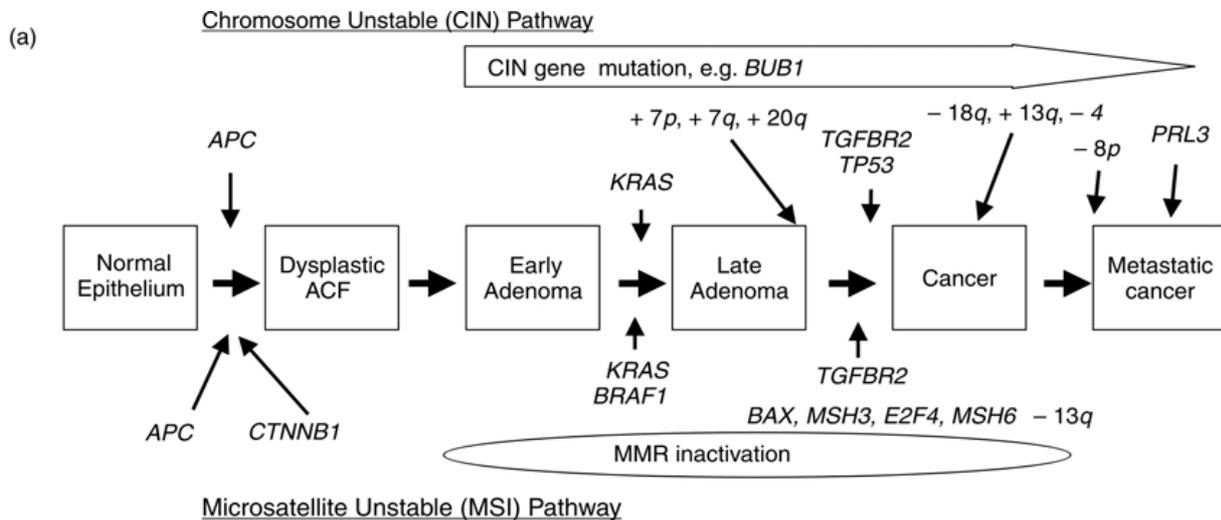


Abbildung 6 oben: CIN-Pathway – Abfolge. Abbildung 6 unten: MSI-Pathway – Abfolge (Grady 2004, figure 1a)

1.4.2 „MSI-Pathway“

1.4.2.1 Grundlagen des „MSI-Pathways“

Der „MSI-Pathway“ („MicroSatellite Instability“) ist der zweite wichtige Entstehungsmechanismus. Ca. 20% der CRCs bilden sich dementsprechend. Dabei konnte festgestellt werden, dass sporadische MSI-CRCs meist entweder durch eine sporadische somatische *MLH1*-Promotor-Methylierung im Tumor oder durch eine Keimbahn-Sequenzveränderung der MMR-Gene verursacht sind (Parsons et al, 2012).

1.4.2.1.1 Sporadische Tumore mit MSI

Von den 20% der MSI-CRCs ist der Großteil auf sporadisch entstandene Tumore, die mit einer *BRAF*-Sequenzveränderung (c.1799T>A p.(Val600Glu)) und einer *MLH1*-Promotor-Methylierung (auch *MGMT*) im Tumor einhergehen, zurückzuführen (Jass 2004). In der Studie von Thiel (Thiel 2013) z.B. konnte gezeigt werden, dass die o.g. *BRAF*-Sequenzveränderung in drei Viertel der Fälle in der Gruppe der MSI-Tumore vorkam, viel seltener jedoch in der Gruppe der MSS-Tumore. Alle detektierten Tumore mit einer *BRAF*-

Sequenzveränderung der MSI-H-Gruppe dieser Studie zeigten zudem eine *MLH1*-Promotor-Methylierung. In den Fällen mit *BRAF*-Wildtyp und MSI-Status konnte in einer konsekutiven Analyse oftmals ein Lynch-Syndrom diagnostiziert werden. Andersherum wurde in allen getesteten Fällen mit zuvor bestätigtem Lynch-Syndrom nie die *BRAF*-Sequenzveränderung gefunden werden, sondern stets der Wildtyp. Darauf aufbauend wurde eine *BRAF*-Analyse bei MSI-H-Status und *MLH1*-Ausfall im Tumor in die Diagnostik-Richtlinien mit aufgenommen (s. Abb. 7).

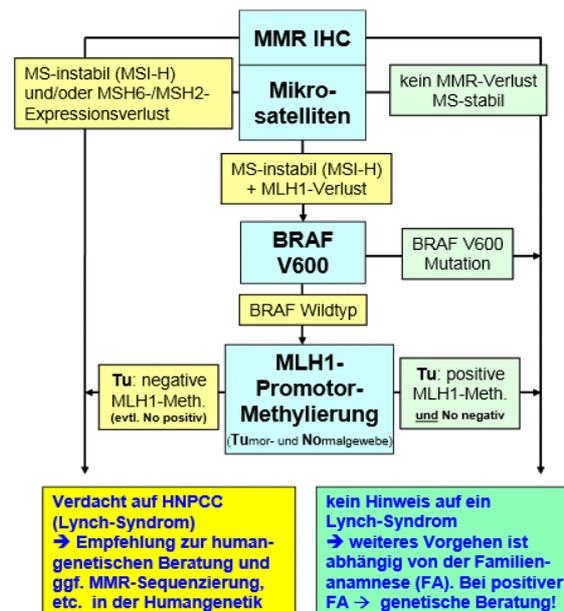


Abbildung 7: Flussdiagramm der Diagnostik bei MSI-H-Status

(www.molekularpathologie-suedbaern.de gemäß des Leitlinienprogramms Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF. Registrierungsnummer: 021-007OL, <http://leitlinienprogrammonkologie.de/Leitlinien.7.0.html>. [Stand: 07.09.2015])

1.4.2.1.2 Hereditäre Tumore mit MSI - Lynch-Syndrom

1.4.2.1.2.1 MSI und MMR

Bei den hereditären Formen kommt es zu einem Defekt im MMR („*MisMatch Repair*“) - System durch Sequenzveränderungen in mindestens einem der folgenden vier Gene: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* (dominante Tumoprädisposition). Aber auch *MLH3*, *MSH3* und *PMS1* können betroffen sein. Dies hat zur Folge, dass bei der DNA-Replikation die Fehlererkennung und -reparatur mangelhaft funktioniert, weshalb es zur Anhäufung von *Mismatch*-Sequenzveränderungen v.a. in Mikrosatelliten-Regionen kommt. Dies kann pathohistologisch in Tumor-Gewebe nachgewiesen werden. Deshalb wird dieser Weg

auch „*Mutator-Pathway*“ genannt (Worthley, Whitehall et al. 2007). Es werden fünf Markersysteme getestet. Dabei liegt folgende Einteilung vor: MSS („*Microsatellite-Stable*“) wird ein Tumor bezeichnet, wenn keine Mikrosatelliten-Instabilität festgestellt werden kann, MSI-L („*MicroSatellite-Instable Low*“) bei Sequenzveränderung an einer der spezifischen Stellen und MSI-H („*MicroSatellite-Instable High*“), wenn zwei (= 40%) oder mehr der insgesamt fünf *Loci* betroffen sind (Dietmaier, Wallinger et al. 1997; Boland, Thibodeau et al. 1998). Beim „*MSI-Pathway*“ ist also oft ein MSI-H – Status zu finden.

Gemäß der „*Two-Hit-Theorie*“ von Knudson (s. Abb. 8) ist der „*First Hit*“ bereits durch die Keimbahnveränderung erfolgt (Ausschaltung des einen Allels), so dass durch den „*Second Hit*“ (Ausschaltung auch des zweiten Allels), der jederzeit im Laufe des Lebens auftreten kann, der Prozess der Tumorentstehung beginnt (Knudson 1971; Ruschoff, Dietmaier et al. 1998).

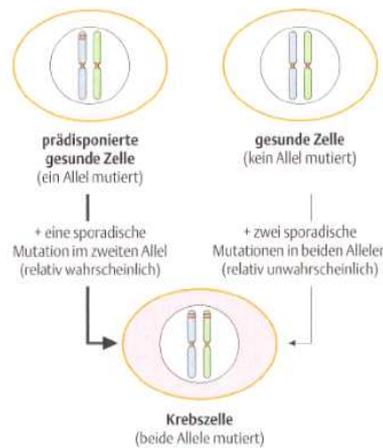


Abbildung 8: Knudsons Two-Hit-Theorie (Murken, Grimm, Holinski-Feder, 2006)

1.4.2.1.2.2 Zusammenspiel der *Mismatch*-Reparatur-Gene

Das MMR-System sorgt für „Wiedergabestabilität“ bei der Replikation und erhöht dabei den Sicherheitsfaktor um das 100-1000-fache, so dass die Anzahl falsch synthetisierter Nukleotide lediglich noch bei 1 zu 10^{10} liegt (bei einer geschätzten Fehlerrate von 1 zu 10^6 - 10^7 Basenpaaren) (Bellacosa 2001).

Der normale Reparaturablauf sieht vor, dass der neusynthetisierte Strang mit der falschen Base detektiert (MutS), alle zur Reparatur nötigen Enzyme und Proteine an Ort und Stelle gebracht (MutL, MutH), die Abschnitte um den „*Mismatch*“ an der nächsten „*GATC-site*“ ausgeschnitten (Endonuklease), resynthetisiert (DNA Polymerase III) und ligiert (Ligase)

werden. Dabei kann je nach Größe des Fehlers vom System eine Folgereaktion eingeleitet werden, z.B. das Auslösen der Apoptose (Bellacosa 2001).

Um dieses System aufrechtzuerhalten ist eine Kaskade von Genen und Prozessen nötig. Nachfolgend werden die zur Fehlererkennung benötigten Gene näher betrachtet. Das ursprüngliche Konzept der MMR wurde in E.coli-Bakterien entdeckt, lässt sich aber aufgrund der hohen Übereinstimmung auf Eukaryoten übertragen.

In menschlichen Zellen sind bisher fünf mutS-Homologe bekannt: MSH2 und MSH6 (auch MSH3) für die MMR, sowie MSH4 und MSH5, die eine Rolle in der meiotischen Rekombination spielen (Bellacosa 2001).

Desweiteren kennt man vier mutL-Homologe: MLH1 und PMS2 (auch MLH3 und PMS1) (PMS1 und PMS2 sind nach Hefe-Homologen benannt) (Bellacosa 2001).

In Abbildung 9 sind die einzelnen Gene ihren analogen Bakterienstämmen und den jeweiligen humanen Chromosomenabschnitten zugeordnet. Wichtig ist auch die Zuordnung, dass in *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* und *PMS2* erbliche Keimbahn-Sequenzveränderungen auftreten können, in anderen (*MLH3*, *MSH3*) hauptsächlich sporadische Sequenzveränderungen im Tumorgewebe.

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Chromosome location	Mutations in human cancer	
				Hereditary (germline)	Sporadic (somatic)
<i>mutS</i>	<i>Msh2</i>	<i>MSH2</i>	2p22-p21	✓	✓
	<i>Msh3</i>	<i>MSH3</i>	5q11-q12		✓
	<i>Msh6</i>	<i>MSH6</i>	2p16	✓	✓
	<i>Msh4</i>	<i>MSH4</i>	1p31		
	<i>Msh5</i>	<i>MSH5</i>	6p21.3		
	<i>Msh1</i>	^a	–		
<i>mutL</i>	<i>Mlh1</i>	<i>MLH1</i>	3p21.3	✓	✓ ^b
	<i>Pms1</i>	<i>PMS2</i>	7p22	✓	✓
	<i>Mlh2</i>	<i>PMS1</i>	2q31-q33	✓	
	<i>Mlh3</i>	<i>MLH3</i>	14q24.3		✓
<i>mutH</i>	^a	^a	–		
<i>mutU (uvrD)</i>	^a	^a	–		

^aNot identified. ^bUsually, loss of expression by promoter hypermethylation

Abbildung 9: Bakterielle *mut*-Gene und ihre eukaryotischen Entsprechungen (Bellacosa 2001, Tabelle 1)

Im Gegensatz zum Reparatur-Ablauf in Bakterien agieren die eukaryoten MMR-Gene in Heterodimeren. So entstehen folgende Komplexe mit sich ergänzenden Funktionen (s. Abb. 10):

- MSH2+MSH6=MutS α , auch bekannt als „G:T-binding protein“ (GTBP) (Drummond, Li et al. 1995) (in 80% favorisierte Komplexbildung)
- MSH2+MSH3=MutS β (Palombo, Iaccarino et al. 1996)

- MSH4+MSH5 (Meiose) (Bocker, Barusevicius et al. 1999)
- MLH1+PMS2=MutL α (Li and Modrich 1995) (in 80% favorisierte Komplexbildung)
- MLH1+PMS1=MutL β (Raschle, Marra et al. 1999)
- MLH1+MLH3 (Lipkin, Wang et al. 2000).

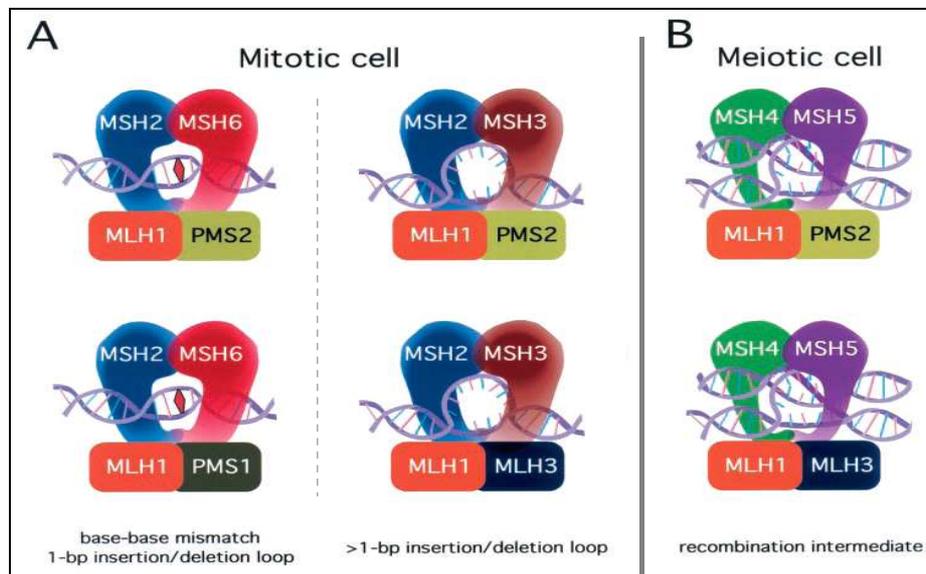


Abbildung 10: Funktionsschema der MMR-Protein-Komplexbildung in Mitose und Meiose (Bellacosa 2001, Figure 1)

Die verschiedenen Komplexe erkennen dabei auch unterschiedliche Fehlerarten.

MutS α detektiert Basen-Basen-*Mismatch* oder 1bp-IDL (*insertion/deletion-loop*).

MutS β hingegen erfasst IDLs, die > 1bp, aber < 12 bp's groß sind (Bellacosa 2001).

Bei IDLs >12 bis 216 bp's erfolgt eine MMR-unabhängige Reparatur (Littman, Fang et al. 1999).

MutL α ist assoziiert mit MutS α und MutS β und trägt zur Reparatur von sowohl *Mismatch*-Sequenzveränderungen als auch IDL's bei. Zusätzlich hilft es bei der Sequenzveränderungsvermeidung, wobei die anderen beiden MLH1-Komplexe eher eine untergeordnete Rolle spielen (Buermeyer, Deschenes et al. 1999). Der Aufgabenbereich von MutL β ist bisher nicht genau geklärt. Der MLH1+MLH3-Komplex identifiziert ebenfalls IDL's und ist eventuell auch in der Meiose aktiv (Lipkin, Wang et al. 2000; Wang, Kleckner et al. 1999).

1.4.2.2 Aufgaben von MutS α und MutS β

MutS α (=MSH2+MSH6) identifiziert Insertionen von „+T“ und „+G“, aber auch „G:T-Mismatches“ (Acharya, Wilson et al. 1996). In der Literatur wird zudem eine Erkennung von „+(T)₃“ beschrieben (Drummond, Li et al. 1995). MutS β erfasst Insertionen von „+G“, „+CA“ und „+(CA)₅“. Somit besitzen die beiden Komplexe überlappende Aufgabenbereiche. MSH2 nimmt eine zentrale Stelle im MMR ein. Es bildet zu 80% mit MSH6 ein Heterodimer, alternativ mit MSH3. Wenn keiner dieser beiden Bindungspartner verfügbar ist, wird in seltenen Fällen auch eine Homodimerisation beobachtet. MSH3 und MSH6 homodimerisieren nicht. Jedes der drei Gene alleine ist unfähig, eine Aufgabe im MMR erfüllen. Da in-vitro- und tierexperimentelle Hinweise hinsichtlich Morbidität, Erkrankungsalter/-schwere und Reparaturfähigkeitsspektrum existieren, die zeigen, dass MSH6 einen Ausfall von MSH3 kompensieren kann, andersherum aber nicht, wird dem MSH3-Gen eine eher untergeordnete Position zugeteilt (Edelmann, Yang et al. 1997; Edelmann, Umar et al. 2000).

Aus diesem Grunde ist die Rolle von MSH3 hinsichtlich des Auftretens von Keimbahn-Sequenzveränderungen beim Lynch-Syndrom bisher ungeklärt (Liu, Parsons et al. 1996).

1.4.3 Promotor-Methylierungen und „Methylator-Pathway“ des Tumor-Gewebes (CIMP+)

Der „Methylator-Pathway“ basiert auf epigenetischen Veränderungen. Er macht 35% der Entstehungswege für kolorektale Tumore aus (Snover 2011). Epigenetik bedeutet, dass die Veränderungen nicht die eigentliche Gensequenz an sich betreffen, sondern vielmehr zu einer Modifikation der Basen führen. Dies zeigt sich in einer Änderung deren Chromatinkonfiguration oder Aktivität, z.B. durch Regulierung der Transkription. Im menschlichen Genom tritt Methylierung an 5-m-C in CpG-Positionen von Promotorbereichen auf. Gehäufte CpG-Vorkommen ergeben sog. CpG-Inseln (Cytosinphosphatidyl-Guanin) (Worthley, Whitehall et al. 2007), an denen der C- und G- Gehalt wesentlich höher als in der üblichen DNA-Abfolge (60% vs. 40%) ist. DNA-Promotor-Methylierung findet sich überall über das Genom verteilt, z.B. zum *Silencing* viraler DNA-Transposons (Doerfler 2006) oder zur Regulation bei geprägten Genen (*Imprinting* z.B.: Court, Martin-Trujillo et al., 2013). Jedoch findet man Promotorsequenzen vor Genen meist unmethyliert vor (Weisenberger, Siegmund et al. 2006). Im Falle einer Methylierung erfolgt üblicherweise die Stilllegung des jeweiligen Gens (z.B. X-Chromosom-Inaktivierung

(Latham 1996)). Eine abnormale Methylierung von Genen im Promotorbereich im Sinne von potentiell pathologischen Veränderungen wird unter anderem bei der Zellalterung (Issa, Ottaviano et al. 1994) und bei Neoplasien (Baylin, Herman et al. 1998) beobachtet. Sind in Tumorgewebe Tumor-Suppressor-Gene methyliert, so führt dies zu einem zum Verlust der Transkription des jeweiligen Gens (Toyota, Ahuja et al. 1999). Die Arbeitsgruppe um Toyota (Toyota, Ahuja et al. 1999) zeigt, dass der Großteil der CpG-Promotor-Methylierungen im Tumor-Material mit der zunehmenden Hypermethylierung als altersbezogene Erscheinung der Dickdarmzellen zusammenhängt. Der übrige Anteil ist für die Gruppe von kolorektalen Karzinomen und Adenomen vorbehalten, die über den CIMP(+)-Weg („*CpG Island Methylation Pathway*“) entstehen (s. Abb. 11).

In Anlehnung an die oben genannte Aufteilung werden zwei Typen von Methylierung unterschieden: A-Methylierung („*aging-specific methylation*“) und C-Methylierung („*cancer-specific*“) (Toyota, Ahuja et al. 1999). Erstere findet sich häufiger (75%) und - bezogen auf die Lokalität - in normaler Darm-Mucosa und in Tumoren. Zweitere wurde nur in Tumorgewebe gefunden: Hier erfolgt nochmals eine Unterscheidung zwischen Tumoren mit geringem (unter drei methylierten Loci) und anderen mit hohem Promotor-Methylierungsgrad (drei oder mehr gleichzeitig methylierte Loci). Weitere Charakteristika dieser Klasse sind die Unabhängigkeit von Alter, Geschlecht oder Stadium des CRC.

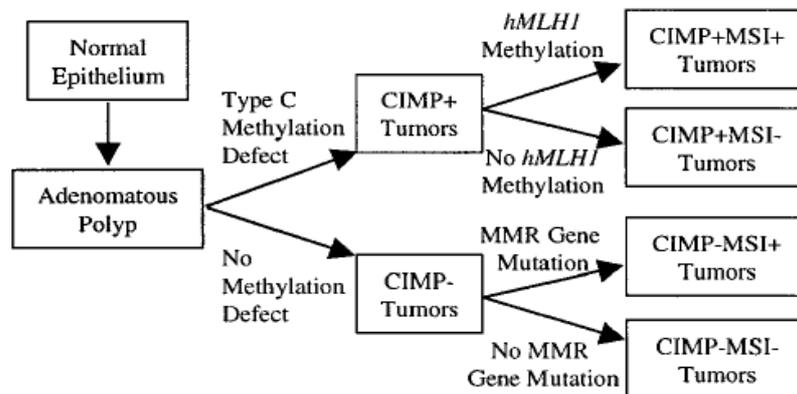


Abbildung 11: Entstehung des CIMP+ Pathway (Toyota, Ahuja et al. 1999)

Ein weiteres Gen des „*CIMP-Pathway*“ am Ende der Kaskade ist *MLH1* (auch Bestandteil des MMR-Systems). Sind beide Allele somatisch im Promotor-Bereich methyliert, kommt es zu einer Stilllegung des Gens, was zu einer deutlich erhöhten Anzahl an Sequenzveränderungen führt und den MSI-Status erklärt. Der Großteil (bis zu 75%) der sporadischen kolorektalen Karzinome mit MSI soll auf diesem Wege entstehen (Herman, Umar et al. 1998; Toyota, Ahuja et al. 1999).

1.4.4 „*Serrated-Pathway*“

Der „*Serrated-Pathway*“ ist ein erst kürzlich entdeckter Weg zur Krebsentstehung (Jass 2005).

Studien haben ergeben, dass zu Beginn des „*Serrated-Pathway*“ meist eine *BRAF*-Sequenzveränderung steht (typischerweise c.1799T>A p.(Val600Glu)) (Steinke 2013). Aufgrund dieser Sequenzveränderung wird die Einleitung einer Apoptose einer Zelle verhindert. Kolonzellen mit einer solchen *BRAF*-Sequenzveränderung entwickeln sich zu sägeblattartig veränderten Läsionen („*serrated lesions*“) vom MVHP (mikrovesikulärer hyperplastischer Polyp)- oder SSA/P (serratierte Adenome/Polypen)- Typ (s. Abb. 12). Diese Läsionen neigen zur Methylierung von CpG-Inseln im Promotor-Bereich verschiedenster Gene und erreichen dadurch deren Stilllegung (Snover 2011). Es wird vermutet, dass die Auswahl der stillgelegten Gene durch das Zufallsprinzip geschieht (Snover 2011). Das stillgelegte Gen jedoch bestimmt den weiteren Verlauf der Läsion. Das dabei bekannteste Gen ist das *MLH1*-Gen, das in sporadisch entstandenen MSI-Kolonkarzinomen betroffen ist. Da es zur Gruppe der MMR-Gene gehört, entstehen in der Folge in kurzer Zeit viele weitere Sequenzveränderungen (MSI-Status), ähnlich zu Patienten mit Lynch-Syndrom. Man nimmt an, dass die *MLH1*-Veränderungen in einem späten Stadium auftreten (viele Jahre nach Beginn einer Veränderung), danach aber die Entwicklung zu einer malignen Veränderung sehr schnell geht. Die auf diesem Weg entstandenen Karzinome sind vom CIMP(+) MSI-Typ.

Die genauen molekularen Veränderungen, die zu CIMP(+) MSS-Karzinomen führen, sind noch nicht so gut bekannt. Man vermutet jedoch, dass andere Gene von der Stilllegung betroffen sind, wodurch sich der „*Pathway*“ ändert.

Zudem gibt es einige andere Umwege zum „*Serrated-Pathway*“, die nicht mit einer *BRAF*-, sondern mit einer *KRAS*-Sequenzveränderung beginnen. Diese sind histopathologisch v.a. GCHP (Becherzell-haltige hyperplastische Polypen) und TSA (traditionelle filiforme Adenome) (s. Abb. 13). Einige Forscher vermuten, dass in diesen Veränderungen *MGMT*-Promotor-Methylierungen stattgefunden haben, die zu MSI-L-Karzinomen führen (Snover 2011).

Des Weiteren sind einige Fälle mit „*serrated lesions*“ bei Patienten beschrieben, die *MUTYH*-Sequenzveränderungen tragen (Boparai 2008). Dieses Gebiet bedarf jedoch noch intensiverer Forschung.

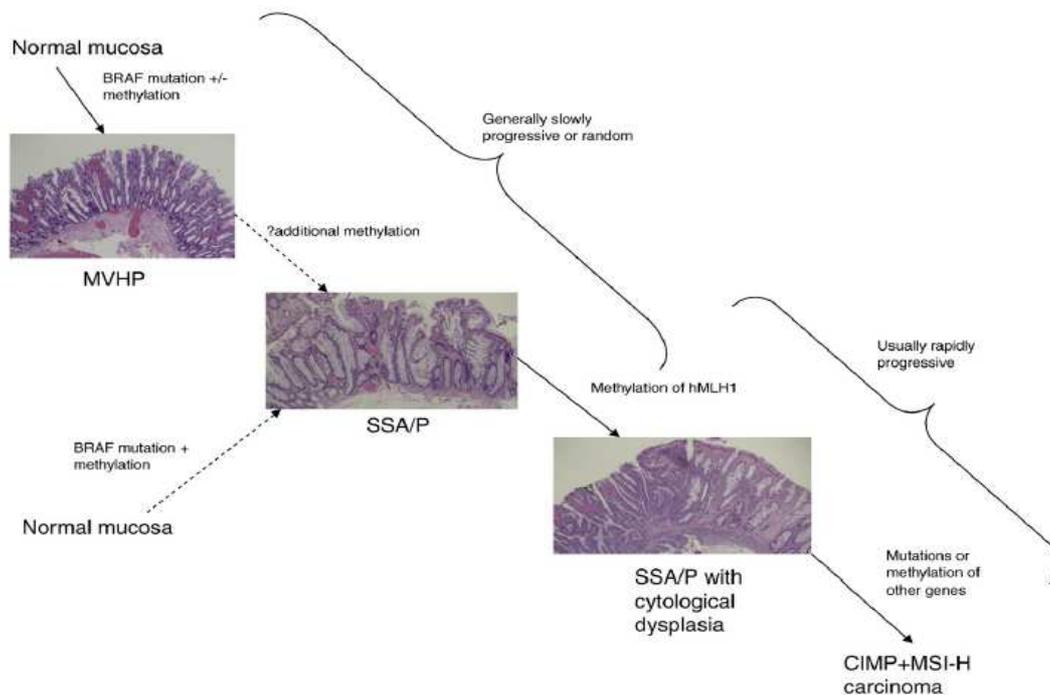


Fig. 2 Representation of the serrated pathway to MSI-H carcinoma. This sequential pathway involves slow and rapid steps. The origin of SSA/P remains debatable. It is possible that SSA/P arises directly from normal mucosa or SSA/P might develop from a preexisting MVHP; hence, the arrows for these steps are dotted.

Abbildung 12: Abbildung des Entstehungsmechanismus des "Serrated Pathway" (Snover 2011)

Folgende kolorektale Polypen können unterschieden werden und wurden bei Bekanntwerden des „Serrated-Pathway“ in vier verschiedene Formen unterteilt (s. Tab. 5).

Abkürzung Name	HP	SSA	TSA	<i>mixed type</i>
	<i>classic hyperplastic polyp</i>	<i>sessile serrated adenoma</i>	<i>traditional serrated adenoma</i>	<i>SSA&TA&TSA selten: HP&TA</i>
Häufigkeit	80-90 %	15-25 %	1 (-6) %	
Lage	links > rechts	rechts > links	links(60%)>rechts	
Größe	< 5 mm	>> 5 mm	> 5 mm	
Form	protuberant	flach-sessil	gestielt, villös	
Krypten-Architektur: Serration:	oberes 1/3	basal dazu:basal Dilatation, invertierte Krypten, Verzweigungen	ausgeprägt	
Zytologie:				
Mitosen:	unteres 1/3	mittleres 1/3	bis oberes 1/3	
Eosinophilie:	- / +	++ / fokal	+++ / diffus	
Dysplasie:	-	-/+	+++	
Karzinom-Risiko:	kein	90% > 3 J, 55% > 5 J FAP: hoch	wie klassisches Adenom	je nach Dysplasiegrad

Tabelle 5: Serratierte Polypen, Kriterien und Klinik
(adaptiert nach Ruschoff, Aust et al. 2007, Abbildung 12 und Tabelle 5)

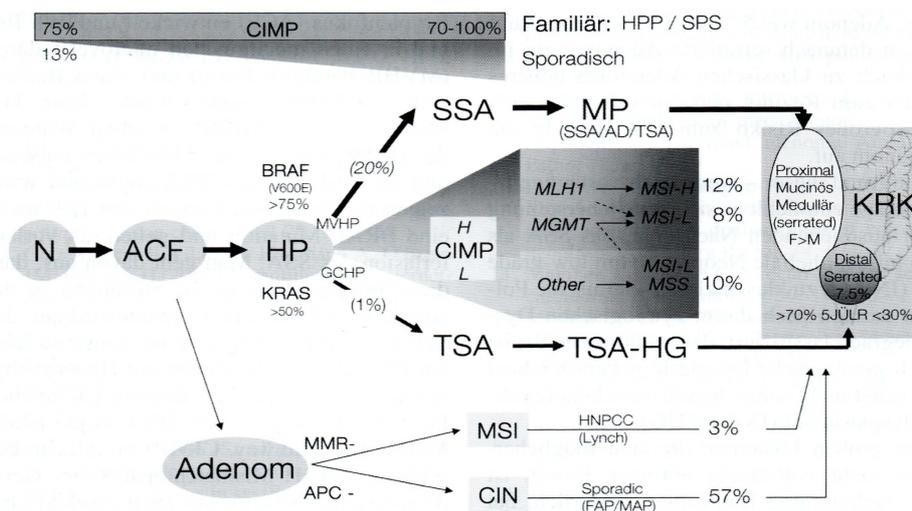


Abb. 3: Molekulares Karzinogenese-Konzept kolorektaler Karzinome.
N: normale Schleimhaut; **ACF:** Aberrant Crypt Focus; **HP:** hyperplastischer Polyp – Goblet-cell Typ (**GCHP**) u. microvesikulärer Typ (**MVHP**); **CIMP:** CpG-Insel Methylation Pathway (H: hochgradige und L: niedriggradige Methylierung); **MMR:** Mismatch repair genes; **MSI:** Mikrosatelliteninstabilität (H: hochgradig, L: niedriggradig); **MSS:** Mikrosatellitenstabilität; **CIN:** Chromosomale Instabilität; **HNPCC:** hereditäres nicht Polyposis assoziiertes Colon Carcinom (Lynch) Syndrom; **FAP:** familiäre adenomatöse Polyposis; **MAP:** MYH assoziierte Polyposis; **HPP:** hyperplastisches Polyposis Syndrom; **SPS:** serratiertes Pathway Syndrom; **SSA:** sessiles serratiertes Adenom; **TSA:** traditionelles serratiertes Adenom; **AD:** klassisches Adenom (t: tubulär, tv: tubulovillös, v: villös); **KRK:** kolorektales Karzinom.

Abbildung 13: Molekulares Karzinogenese-Konzept kolorektaler Karzinome (Ruschoff, Aust et al. 2007)

Aktuell wird versucht, die neuen molekularpathologischen Veränderungen mit den histopathologischen Auffälligkeiten in Verbindung zu bringen. Folgende Einteilung wird vorgeschlagen (s. Tab. 6):

Aktuelle Nomenklatur	Vorgeschlagene zukünftige Nomenklatur
„Konventionelle Adenome“ - tubulös - tubulovillös - villös	APC-bezogene neoplastische Polypen - nicht serratiert ohne villöse Komponente - nicht serratiert mit villöser Komponente - nicht serratiert mit villöser Komponente
Serratierte Adenome - SSA/P ohne zytolog. Dysplasie - SSA/P mit zytolog. Dysplasie - TSA ohne konventionelle Dysplasie - TSA mit konventioneller Dysplasie	CIMP-Adenome, <i>BRAF</i> -Typ - neoplastischer sägezahn-Polyp ohne Dysplasie - neoplastischer sägezahn-Polyp mit Dysplasie CIMP-Adenome, <i>KRAS</i> -Typ - neoplastischer filiformer Polyp ohne Dysplasie - neoplastischer filiformer Polyp mit Dysplasie
Hyperplastischer Polyp - MVHP (microrvesiculär) - GCHP („ <i>goblet cell</i> “=Becherzelle) - Mucin-armer HP	- Hyperplastischer Polyp, <i>BRAF</i> -Typ Mikrovesikulärer hyperplastischer Polyp - Hyperplastischer Polyp, <i>KRAS</i> -Typ hyperplastischer Polyp vom Becherzelltyp - Hyperplastischer Polyp, übrige Mucin-armer hyperplastischer Polyp

Tabelle 6: Semimolekulare Terminologie kolorektaler Polypen (Snover 2011)

In der Literatur wird SSA („*sessile serrated adenoma*“) und SSP („*sessile serrated polyp*“) synonym gebraucht. Die initiale Bezeichnung für die gemeinte Läsion war SSA. Jedoch kann Unklarheit entstehen hinsichtlich der Unterscheidung zu konventionellen APC-bezogenen Adenomen. Andererseits repräsentiert der Begriff SSA am besten das prämaligne Potenzial der Läsion, die immer dann gegeben ist, wenn eine aberrante Zellteilung vorliegt. Dies ist bei SSA der Fall. Hier weisen die Zellen der Krypten eine vermehrte bzw. unkontrollierte Zellteilung auf. Bei hyperplastischen Polypen hingegen liegt eine verminderte Apoptose vor, die Zellen leben zu lange und werden nicht abgeschilfert. Zur Vermeidung von Unklarheiten verwendet der Autor der o.g. Tabelle den Begriff SSA/P (Snover 2011).

Der Begriff TSA als „*traditional serrated adenoma*“ wird kontrovers diskutiert, da er nicht genau definiert ist und auch die histopathologischen Kriterien voneinander abweichen. Zum aktuellen Zeitpunkt scheint das Vorhandensein von ektopen Krypten die beste Definition zu sein, auch wenn zudem oft metaplastische eosinophile Zellen gefunden werden können. Die als „*filiform*“ beschriebene Läsion ist wohl das beste Synonym für TSA (Snover 2011).

1.5 Verknüpfungen und Verbindungen zwischen den einzelnen *Pathways*

Die oben aufgeführten einzelnen Wege folgen nicht starren Mustern, sondern stellen ein ineinander übergreifendes Netzwerk der verschiedenen Mechanismen dar (s. Abb. 14) (Jass 2007).

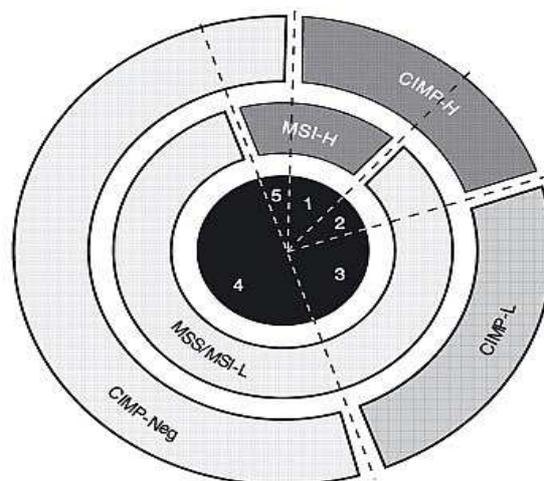


Figure 1. Derivation of molecular colorectal cancer groups 1-5 based on CpG island methylator phenotype (CIMP) status (H, high; L, low; Neg, negative) and DNA microsatellite instability (MSI) status (H, high; L, low; S, stable).

Abbildung 14: Typisierung der einzelnen Karzinogenesemodelle (Jass 2007)

Im Großen und Ganzen können bei der Klassifikation fünf Gruppen unterschieden werden (s. Tab. 7):

	CIMP-Status	Sequenzveränderung	Methylierung	Chromosomaler Status	MSI-Status	Zuordnung	Anteil in %
1	hoch	<i>BRAF</i>	<i>MLH1</i>	stabil	hoch	sporadisch	12
2	hoch	<i>BRAF</i>	teilw. <i>MLH1</i>	stabil	stabil/niedrig		8
3	niedrig	<i>KRAS</i>	<i>MGMT</i>	instabil	stabil/niedrig		20
4	negativ	---	---	instabil	meist stabil		57
5	negativ	---	---	stabil	hoch	Lynch	3

Tabelle 7: molekulares Einteilungsmodell der kolorektalen Karzinome (nach Jass 2007)

Ihren Ursprung nimmt Gruppe 1 in den hyperplastischen Polypen und sie stellt eine sehr homogene Gruppe bezüglich aller Merkmale dar. Ihr werden die sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome mit MSI-H zugeteilt. Gruppe 2 entspringt ebenfalls aus serratierten Polypen. Bei Gruppe 3 ist zusätzlich noch eine Abstammung aus einem klassischen Adenom möglich. In Gruppe 4 befindet sich die Mehrzahl der sporadischen Karzinome, sowie FAP und *MUTYH*-assoziierte Polyposis. Gruppe 5 schließlich entsteht wiederum aus einem Adenom und beinhaltet das Lynch-Syndrom mit MMR-Sequenzveränderung (Jass 2007).

Eine Zusammenfassung aller bisher bekannten „*Pathways*“ stellt Snover in einer aktualisierten Publikation im Jahr 2011 dar (s. Abb. 15):

Der konventionelle Weg mit einer initialen APC-Sequenzveränderung kann zur FAP und zum sporadischen CIMP(-) kolorektalen Karzinomen über den „*Suppressor-Pathway*“ führen, ebenso wie der „*Mutator-Pathway*“ zum Lynch-Syndrom führt.

Zu den Mikrosatelliten-stabilen Karzinomen gehören ca. 60% der CIMP(+)-Karzinome, die über den „*Serrated-Pathway*“ entstehen, ebenso wie Karzinome, die über den „*Suppressor-Pathway*“ entstehen.

Zu den Mikrosatelliten-instabilen Karzinomen gehören ca. 40% der sporadischen auftretenden CIMP(+)-Karzinome, ebenso wie Karzinome des „*Mutator-Pathways*“ beim Lynch-Syndrom.

Der „*Serrated-Pathway*“ ergibt einen CIMP(+)-Status, der entweder über den „*Mutator-Pathway*“ zu MSI(+)-CIMP(+)-Karzinomen führt oder über einen noch unbekanntem Weg zu MSS CIMP(+)-Karzinomen.

Weitere Entstehungswege werden noch diskutiert, so z.B. MSI-L - Karzinome und Karzinome mit Sequenzveränderungen in den *MUTYH*-Genen, die eventuell eine

Verbindung mit dem „*Serrated-Pathway*“ haben können.

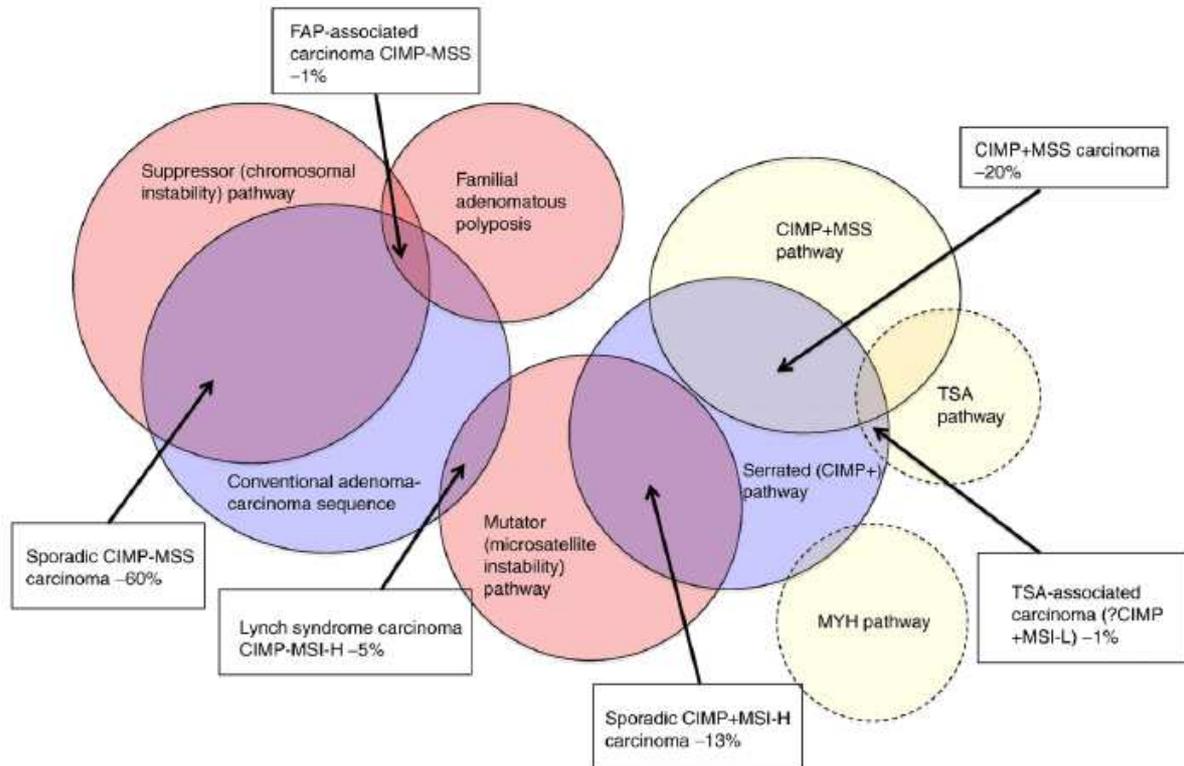


Abbildung 15: Überlappende Entstehungswege des kolorektalen Karzinoms (Snover, 2011)

Die molekulare Grundlagenforschung ist in den letzten Jahren immer wichtiger geworden. So werden unter anderem Therapie-Optionen vom genetischen Ergebnis abhängig gemacht: bei der Chemotherapie mit Cisplatin zum Beispiel nutzt man den Effekt, dass dieser Wirkstoff vor allem Zellen mit hypermethyliertem *MLH1*-Promotor angreift und dort am besten seine Wirkung entfalten kann (Jiricny and Nystrom-Lahti 2000).

1.6 MS-MLPA

Seit 2005 gibt es ein Verfahren, das als Erweiterung zur bereits etablierten MLPA aufwändige Methoden wie z.B. die Bisulfit-Behandlung ablösen könnte: die MS-MLPA („*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*“) (Nygren, Ameziane et al. 2005, Homepage MRC Holland). Sie stellt eine Erweiterung der MLPA dar, mit der nicht mehr nur Duplikationen und Deletionen detektiert, sondern auch epigenetische Veränderungen wie Promotor-Methylierungen dargestellt werden können (s. Abb. 16).

In den Kits von MRC-Holland befinden sich Methylierungs-sensible Enzyme. Diese binden an die spezifischen Sonden CpG-reicher Promotor-Stellen. Es kann die Ligation

(„Ligation“) stattfinden und die PCR ablaufen. Danach erfolgt der Verdau („Digest“) mit dem Enzym HhaI. Methylierte Sonden werden nicht verdaut, im Ergebnis-Protokoll finden sich an dieser Stelle ein *Peak*. Unmethylierte Sonden werden verdaut und es zeigt sich in der Auswertung kein *Peak* an dieser Stelle.

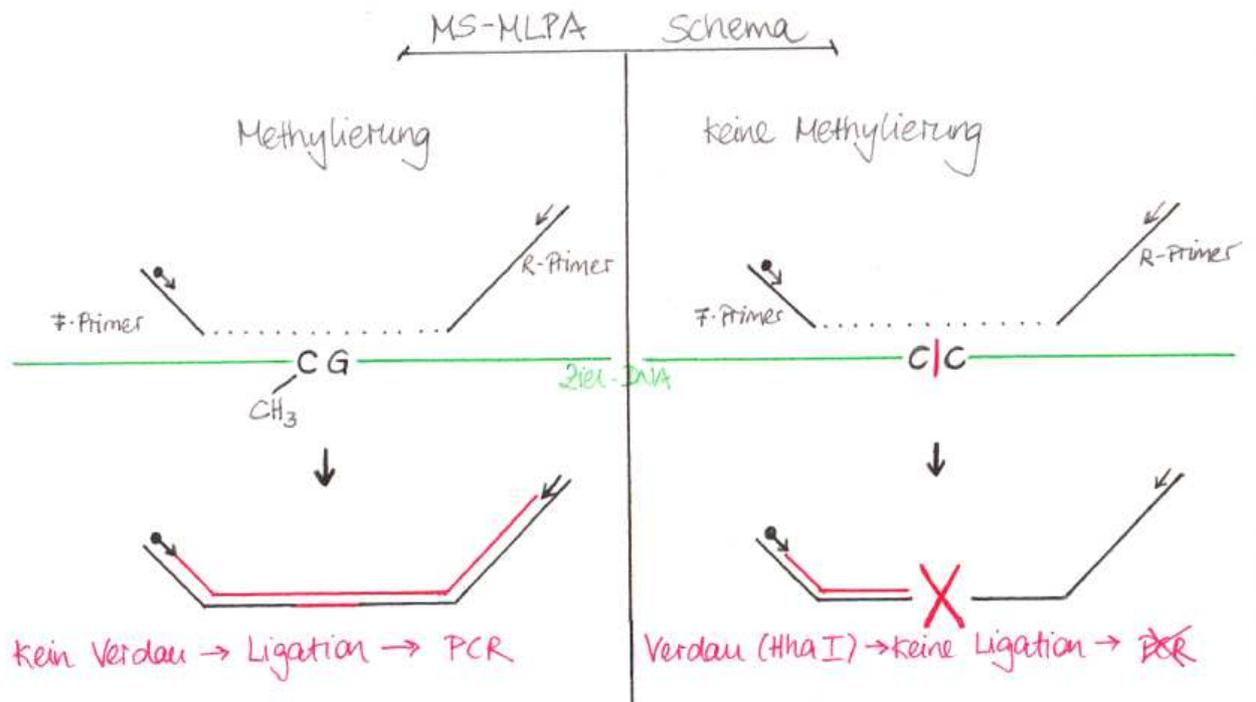


Abbildung 16: Ablauf der MS-MLPA (adaptiert nach Schema der Homepage MRC Holland)

Die Signale der erfolgten PCR mit Fluoreszenz-markierten *Primern* werden in Abbildungen umgesetzt, so dass bei der Auswertung die Stellen der *Peaks* mit den methylierten Gen-Arealen gleichzusetzen sind (s. Abb. 17a+b):

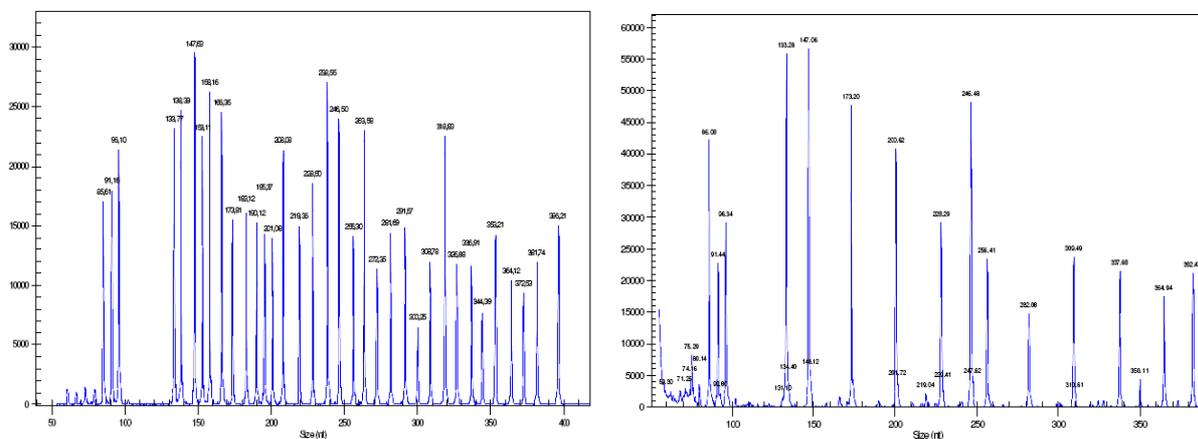


Abbildung 17 a+b: MS-MLPA Ligation&Verdau (nach der Homepage MRC Holland)

1.7 Charakterisierung des *MSH3*-Gens

1.7.1 Entdeckung und Einordnung des *MSH3*-Gens

Im Jahre 1989 entdeckten Forscher ein in einem Gentranskript enthaltenes 3,5-kb großes offenes Leseraster, das 89 Basenpaare stromaufwärts des damals eigentlich untersuchten *DHFR*-Gens (*human Dihydrofolate-Reductase*) auf Chromosom 5 beginnt. Da es vom Gegenstrang transkribiert wird, wurde ursprünglich der Name *DUG* – *Divergently transcribed Upstream Gene* – verwendet (Fujii and Shimada 1989) bzw. aufgrund der Sequenz-Homologie zu bakteriellen MutS-Genen Mrp1 (*mismatch repair protein 1*) (Fujii, Shinya et al. 1992; Shinya and Shimada 1994). Als sich die enge Verwandtschaft mit dem Hefe-Abkömmling MSH3 bestätigte, wurde es zu *MSH3* umbenannt (Watanabe, Ikejima et al. 1996). In folgender Tabelle (s. Abb. 18) ist die Ähnlichkeit von MSH3 mit anderen Mitgliedern der MutS-Familie ersichtlich:

		hMSH3 (human)	
		1 – 1137	856 – 1011
MutS	(<i>E. coli</i>)	31%	55%
HexA	(<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	30%	52%
Swi4	(<i>S. pombe</i>)	37%	53%
MSH1	(<i>S. cerevisiae</i>)	25%	47%
MSH2	(<i>S. cerevisiae</i>)	26%	50%
MSH3	(<i>S. cerevisiae</i>)	36%	54%
MSH4	(<i>S. cerevisiae</i>)	29%	38%
MSH5	(<i>S. cerevisiae</i>)	28%	38%
mMSH2	(Mouse)	30%	49%
Rep-3	(Mouse)	78%	92%
hMSH2	(Human)	30%	50%
GTBP	(Human)	32%	49%

Abbildung 18: Vergleiche zwischen *MSH3* mit anderen Genen der MutS-Familie (Watanabe, Ikejima et al. 1996; Table 1)

Wichtig ist hier vor allem das C-terminale Ende, da dort die Sequenz-Homologie und Konservierung am deutlichsten erkennbar wird (Gorbalenya/Koonin 1990).

1.7.2 Organisation des *MSH3*-Gens

Es gibt zwei Haupttranskripte des *MSH3*-Gens: eines mit einer Größe von 5,0 kb und ein weiteres mit einer Größe von 3,8 kb (Fujii and Shimada 1989). Diese beiden verschiedenen Größen sind die Folge von verschiedenen Polyadenylierungs-Signalen:

Das kürzere Transkript besitzt eine Polyadenylierung (ATTAAA) 19 bp nach einem A-reichem Abschnitt (Watanabe, Ikejima et al. 1996). Die Sequenzierung des längeren Transkripts zeigt in vitro eine typische Polyadenylierungsstelle (AATAAA), 924 bp stromabwärts des Endcodon, was die Entstehung des längeren Transkripts auch in vivo erklärt (Watanabe, Ikejima et al. 1996). Alternatives *Splicing* (Watanabe, Ikejima et al. 1996) oder eine Heterogenität der Initiierungsstelle (Fujii and Shimada 1989) wurden ausgeschlossen.

1.7.3 Expression und Regulation des *MSH3*-Gens

Beide Transkripte (3,8 kb und 5,0 kb) wurden in sämtlichen Geweben des menschlichen Körpers gefunden: Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Ovarien, Dünndarm, Colon, Leukozyten, Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Nieren und Pankreas. Die Expression unterscheidet sich je nach Gewebeart. So sind z.B. die Banden in Hoden, Ovar, Herz, Gehirn, Skelettmuskel, Niere und Pankreas etwas prominenter, wohingegen im Dünndarm, Colon, Lunge und Leber die Intensität geringer ausfällt.

Da jedoch eine Expression in sämtlichen Geweben auftritt, wird dem *MSH3*-Gen eine konstitutive Bedeutung als „*housekeeping gene*“ (Watanabe, Ikejima et al. 1996) zugeschrieben.

Die Regulation von *MSH3* erfolgt zusammen („*coamplification*“) mit *DHFR* mittels eines bidirektionalen Promotors, der aus mehreren GC-Elementen (nicht wie üblich z.B. TATA-Box) und aus zwei Initiator-Domänen besteht (Shimada, Fujii et al. 1989; Fujii, Shinya et al. 1992; Shinya and Shimada 1994).

1.7.4 Aufbau und Funktion des *MSH3*-Gens

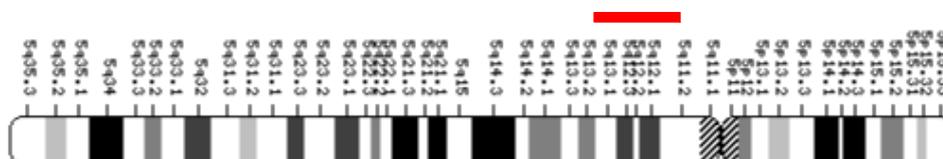


Abbildung 19: Chromosom 5, Markierung: 5q11.2-q13.2

Das *MSH3*-Gen ist auf Chromosom 5q11.2-q13.2 lokalisiert (s. Abb. 19) und besteht insgesamt aus 24 Exons, die zwischen 65 bp (Exon 16) und 298 bp (Exon 1) groß sind (s. Abb. 20). Ihr Beginn und Abschluss erfüllen die Spleißkriterien (GT---AG), lediglich Exon 6 ist eine Ausnahme (AT---AA). Insgesamt umfasst das Gen ca. 160 kb. (Watanabe, Ikejima

et al. 1996). Die genauen Basen- sowie Aminosäurenabfolgen finden sich im Anhang.

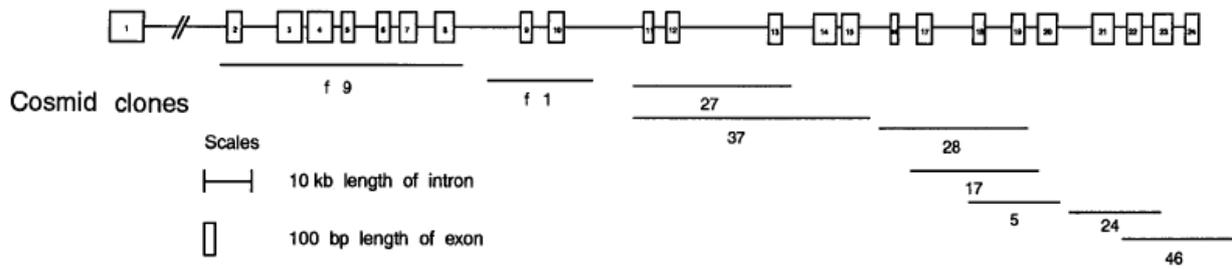


FIG. 4. Genomic organization of the hMSH3 gene. The boxes containing the numbers 1 to 24 represent the individual hMSH3 exons. The exact size of each exon and each intron is shown in Fig. 3, and their organization is drawn according to the scale shown at the left bottom corner. The lines below the gene represent each of the individual cosmid clones. The position of each cosmid clone was determined by PCR with the exon-specific primers.

Abbildung 20: Aufbau des MSH3-Gens (Watanabe, Ikejima et al. 1996, Figure 4)

Verschiedene Experimente lassen vermuten, dass die vier mutmaßlichen Nucleotid-Bindungs-Domänen (codons 891-908, 945-956, 970-982, 1006-1010) in den Exons 20, 21 und 22 lokalisiert sind (Gorbalenya and Koonin 1990; Haber and Walker 1991; Fleck, Michael et al. 1992). Die *helix-hairpin-helix* – DNA-Bindungsstelle (codon 1069-1088) (Ross-Macdonald and Roeder 1994) liegt in Exon 23 (Watanabe, Ikejima et al. 1996). Die genaue Sekundär-Struktur sieht folgendermaßen aus (s. Abb. 21+22):

Secondary structure



Abbildung 21: Sekundär-Struktur des Proteins MSH3 (Datenbank: <http://www.uniprot.org/uniprot/P20585>)

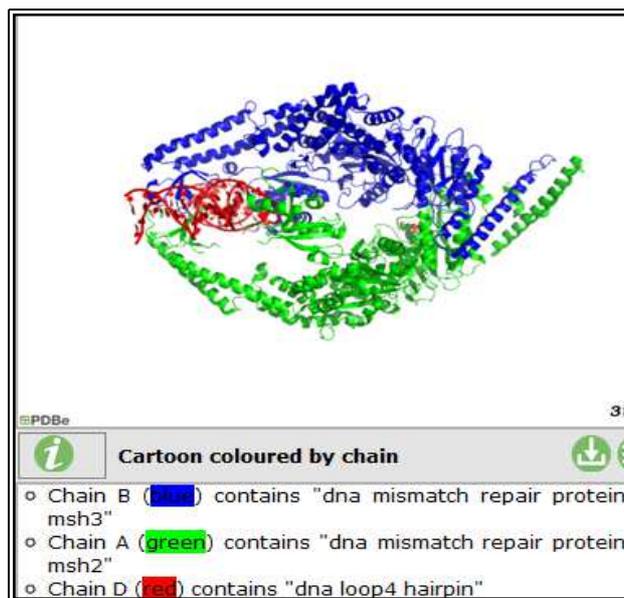


Abbildung 22: 3D-Struktur von MSH3 (blau) (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/3thw/visualisation.html>)

Die genaue Rolle von MSH3 im *Mismatch-Repair*-Netzwerk wird unter 1.4.2.2 genauer erläutert. Da die exakte Funktion von MSH3 im Gesamtzusammenhang bisher trotz aller Untersuchungen noch immer etwas unklar bleibt (New, Liu et al. 1993), folgen nun einige Beobachtungen verschiedener Publikationen:

- a) Bei Inaktivierung von *MSH3* entsteht eine leicht erhöhte Sequenzveränderungsrate (New, Liu et al. 1993).
- b) Auftretende Sequenzveränderungen sind bisher meist von somatischer Natur in Tumor-DNA, so z.B. oft bei HNPCC-Patienten (Akiyama, Tsubouchi et al. 1997). Auffällig sind dabei (A)₈ und (C)₈ – *repeats* in Mikrosatellitenabschnitten von *MSH3* (keine redundante Funktion mit MSH6) (Yin, Kong et al. 1997).
- c) Keimbahn-Sequenzveränderungen sind bisher selten beschrieben, und wenn dann werden sie bisher als unklare Veränderungen bisher ohne Pathologie eingestuft (Orimo, Nakajima et al. 2000).

1.7.5 Bekannte Sequenzveränderungen und Polymorphismen

- Exon 1: „9-bp-repeat (GC)CPy-(GC)CAGCG[5-7]“ (Nakajima, Orimo et al. 1995), entsprechend rs70991168, Polymorphismus.
Häufigkeiten: 3x: 24,4%, 4x: 0,8%, 5x: 1,3%, 6x: 65,6%, 7x: 8,0%. Die Proteinstruktur verändert sich in Abhängigkeit der *Repeats*, der Leserahmen war in allen Fällen davon unbeeinträchtigt. Die genauen Auswirkungen auf die Funktion des Proteins ist unklar (Ohmiya, Matsumoto et al. 2001).
- Exon 1: c.169_195del p.(Ala57_Ala65del), Keimbahn.
Einen Hinweis auf funktionelle Konsequenzen dieser Deletion gibt es zur Zeit nicht. Aufgrund der Häufigkeit wird angenommen, dass es sich dabei um einen Sequenz-Polymorphismus handelt (Acharya, Wilson et al. 1996).
- c.235A>G p.(Ile79Val), Keimbahn+Tumor: Unklare Veränderung im Exon 1, in Tumor-DNA signifikant höher als in nicht-kanzerösem Gewebematerial (Orimo, Nakajima et al. 2000)
- c.231G>T p.(Pro77Pro), Keimbahn+Tumor: SNP, Exon 4 (Orimo, Nakajima et al. 2000)
- c.2162G>C p.(Gly721Ala), Keimbahn: unklare Veränderung, Exon 4 (Ohmiya, Matsumoto et al. 2001)

- c.2041C>T p.(Pro681Ser), Keimbahn: *missense*-Sequenzveränderung, unklare Veränderung, Exon 14 (Ohmiya, Matsumoto et al. 2001)
- c.2846A>G p.(Gln949Arg), Keimbahn: unklare Veränderung, Exon 21 (Benachhou, Guiral et al. 1998)
- c.3133G>A p.(Ala1045Thr), Keimbahn+Tumor: unklare Veränderung, Exon 23 (Benachhou, Guiral et al. 1998)
- Sequenzanalogien zu Exon 1 liegen auf mehreren Chromosomen vor, u.a. Chromosom 3 (99%), Chromosom 5 (97%), Chromosom 5 weiterer Locus (93%), Chromosom 6 (85%) Chromosom 18 (100%), etc. (BLAST vom 13.11.2009)

1.8. Patientenkollektiv und Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Abschnitt wurde die MS-MLPA als neue Methode etabliert (MRC Holland, Kit ME 011-HNPCC). Das Patientenkollektiv war bereits hinsichtlich *BRAF*- und *KRAS*-Sequenzveränderungen sowie immunhistochemischen (IHC-) Ausfällen in *MLH1/MSH2/MSH6/PMS2* ohne nachweisbare Sequenzveränderungen in diesen Genen gescreent und die Patienten in drei verschiedene Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: MSI-H + IHC-Ausfall *MLH1/PMS2*

Gruppe 2: MSS + IHC-Ausfall *MLH1*

Gruppe 3: MSI-H + IHC-Ausfall *MSH2/MSH6*.

Hierbei war die Fragestellung, ob bei IHC-Ausfall (aber fehlenden Sequenzveränderungen) im jeweiligen Gen epigenetische Veränderungen im Sinne von Promotor-Methylierungen vorliegen und welchen Einfluss diese auf die Tumorgenese haben könnten. Hierfür wurden von jedem Patienten gDNA und - soweit vorhanden - Tumormaterial untersucht.

Bei der Untersuchung von Tumor-Material war zudem die Frage, ob aufgrund des Promotor-Methylierungsmusters die Einteilung in den *CIMP-Pathway* möglich ist und somit eine Umgruppierung des Patientenkollektivs erfolgen muss.

Im zweiten Abschnitt wurde die Rolle des *MSH3*-Gens im MMR-System untersucht. Das Kollektiv beinhaltet Patienten mit Verdacht auf Lynch-Syndrom bei MSI-Status und immunhistochemischem Ausfall von *MSH2* und *MSH6*, ohne dass eine Sequenzveränderung gefunden werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzanalyse des *MSH3*-Gens etabliert und auf Keimbahn-Sequenzveränderungen untersucht. Ziel war zunächst, eine Übersicht über alle gefundenen Veränderungen zu erstellen und diese auf ihre Pathogenität hin zu untersuchen.

Eine Interaktion zwischen *MSH2* - *MSH6* - *MSH3* ist bekannt. In einem weiteren Schritt sollte nun überlegt werden, ob eine Verbindung zwischen einer pathogenen Keimbahn-Sequenzveränderung in *MSH3* und dem IHC-*MSH2/MSH6* - Ausfall im Tumormaterial hergestellt werden kann und ob dies die Tumorgenese des Patientenkollektiv wesentlich beeinflusst haben könnte.

2 Material und Methoden

(angelehnt an die Dissertation von Susanne Keinath, „cDNA-Analysen bei Patienten mit Lynch-Syndrom“, HNPCC-Arbeitsgruppe, Medizinische Fakultät, LMU München)

2.1 Patientenmaterial (gDNA und Tumor-DNA)

Das verwendete Material an genomischer (gDNA) und Tumor-DNA wurde von der Ludwig-Maximilians-Universität München, dem Medizinisch Genetischen Zentrum München bzw. deren Kooperationspartnern (u.a. HNPCC-Konsortium) zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Voruntersuchungen

Das Patientenkollektiv zur Untersuchung der gDNA wurde in mehreren Schritten zusammengestellt: Die bekannten HNPCC-Familien wurden je nach Amsterdam- bzw. Bethesda-Kriterien aufgegliedert. Für die Indexpatienten der beiden Gruppen wurden in einem ersten Schritt Mikrosatelliten- und immunhistochemische Analysen des Tumorgewebes durchgeführt. Wenn sich in dieser Untersuchung pathologische Ergebnisse zeigten, wurde in einem zweiten Schritt eine Analyse des jeweiligen DNA-Reparaturgenes angefertigt. War in einer Familie, die die Amsterdam-Kriterien erfüllte, keinerlei Tumormaterial verfügbar, erfolgte eine Analyse aller vier DNA-Reparaturgene.

2.1.2 Mikrosatellitenanalyse

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

2.1.3 Immunhistochemie

Parallel dazu wurden Schnitte aus Paraffin-Blöckchen des Tumors immunhistochemisch auf die Präsenz der Genprodukte von MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 hin untersucht.

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

2.2 Chemikalien

Produkt	Firma
Agarose	Biozym
Amplitaq Gold (2,5 U/μl)	Perkin Elmer
Amplitaq Gold Puffer (10xPuffer)	Perkin Elmer
DNA-Polymerisation Mix (20mM/dNTP)	Pharma
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll	Seromed
1kb-Ladder	Fermentas
Längenstandard LS V (10μl/ml)	Roche
Längenstandard <i>Hyperladder</i> II	Bioline
<i>OrangeG</i>	Merck
TBE	Serva
<i>Primer</i>	Eurofins MWG Oligo Systems
EDTA	Merck
Ethanol	Merck

2.3 Kits

Kits	Firma
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	Applied Biosystems
MS-MLPA-Kit Lynch-Syndrome ME011	MRC-Holland
MS-MLPA-Kit Tumor-Suppressor ME001B	MRC-Holland

2.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden Standardlösungen nach Sambrook et al. (1989) mit bidestilliertem Wasser angesetzt und bedarfsweise autoklaviert. Danach erfolgte falls notwendig die Einstellung des pH-Werts.

Häufig verwendete Standardlösungen sind: EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0), 10x TBE (pH 8), 1x TE-Puffer (pH 7,2; 7,4 oder 8).

2.5 DNA-Isolation

Die DNA der Indexpatienten wurde aus EDTA-Vollblut nach einem modifizierten Protokoll von Miller et al. (1988) aus peripheren Blutleukozyten isoliert.

Die DNA-Konzentration wurde mittels einer Extinktionsmessung bei 260 nm ($1OD_{260}$ entspricht 50 μ g DNA/ml) festgestellt. Die Reinheit wurde über das Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} gemessen und lag im Bereich von 1,7 - 1,9.

2.6 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

2.6.1 Standard-PCR

Eine DNA-Amplifikation mit Hilfe der Standard-PCR erfolgte nach der Methode von Saiki et al. (1988). Die Reaktionsansätze variierten abhängig von der verwendeten Ausgangs-DNA (genomische DNA). Detaillierte Beschreibungen der Primersequenzen, Anlagerungstemperaturen und amplifizierte Fragmentgrößen finden sich im Anhang.

Ausgangsmaterial für die Amplifikation einzelner Exons in einem Reaktionsansatz von 25 μ l in 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs (Amersham Biosciences), je 0,4 pmol/ μ l (10 pmol) Oligonukleotidprimer (F für *forward* und R für *reverse*) und 0,625 U Taq-DNA-Polymerase waren ca. 50 - 200 ng genomische DNA. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert und lyophilisiert geliefert.

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

Reagenzien für Ampli-Taq Gold PCR-Ansatz	μl für 1x
GeneAmp PCR-Puffer (10x, mit 15 mM $MgCl_2$ Roche/Applied Biosystems)	2,5
dNTPs (2mM)	2
Primer F (20pmol/ μ l)	0,5
Primer R (20pmol/ μ l)	0,5
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase (5U/ μ l, Roche/Applied Biosystems)	0,13
100-200 ng genomische DNA	1,2
ddH ₂ O zu 25 μ l Gesamtreaktionsvolumen	ad 25 μ l

Die PCR-Reaktion erfolgte in 0,5 ml Reaktionsgefäßen in einem programmierbaren Thermocycler (MJ Research PTC-200) entweder als spezifische PCR oder mit einem *Touchdown-PCR*-Programm. Für die spezifische PCR wurden folgende Bedingungen eingehalten:

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

2.6.2 *Touchdown-PCR*

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

1. Initiale Denaturierung	94°C	10 min
2. Denaturierung	94°C	30 sec
3. Primeranlagerung	64°C	30 sec
4. Synthese	72°C	30 sec - 1min
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4 in 9 Zyklen, dabei wird die Anlagerungstemperatur pro Zyklus um 1°C abgesenkt		
6. Denaturierung	95°C	30 sec
7. Primeranlagerung	54°C	30 sec
8. Synthese	72°C	30 sec - 1 min
9. Wiederholung der Schritte 6-8 in 29-39 Zyklen		
10. finale Elongation	72°C	7 min
11.	4°C	10 min

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

2.6.3 *Nested*-PCR

Abhängig davon, wie die Ausgangsmenge des amplifizierbaren Materials oder die Amplifikationsstärke war, musste an die erste PCR eine zweite, sog. „*nested*“ PCR-Reaktion angeschlossen werden. Das Primerpaar der *nested*-PCR oder zumindest einer der beiden Primer (*semi-nested* PCR) liegt versetzt innerhalb des ersten PCR-amplifizierten Fragments. Ein Aliquot der entstandenen DNA-Fragmente der ersten PCR-Runde dient hierbei als Matrize für die zweite Runde.

2.7 Gelelektrophorese

- LE Agarose (Biozym)
- Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma)
- Längenstandard V und XIV (Roche Diagnostics) und Längenstandard Fast Ruler™, Low Range (Fermentas)
- Orange G Probenauftragspuffer: 0,05 % (w/v) Orange G (Sigma) in 25 % (w/v)
- Ficoll™PM400 (Amersham Biosciences) in TE-Puffer (pH 7,4); 1:1 zur aufzutragenden Probe zugemischt

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

2 % -ige Agarose-Gele mit 6 - 8 mm Geldicke und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid-Endkonzentration in 1x TBE-Puffer wurden bei 2 - 5 V/cm Elektrodenabstand in TBE-Puffer betrieben. Ein mitgeführter Längenstandard ermöglichte die Interpretation der Ergebnisse. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte unter einem UV-Transilluminator (Herolab) bei 300 nm Wellenlänge. Bei Vorliegen einer einzelnen Bande konnte das PCR-Produkt direkt gereinigt werden.

2.8 Reinigung von PCR-Produkten

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

2.9 Gelextraktion

Zeigten sich in der Gelelektrophorese mehrere Banden, wurde das verbliebene Produkt nach Zumischung von Orange G Probenauftragspuffer im Verhältnis 1:5 vollständig auf Gel aufgetragen. Nach Beurteilung der Fragmentlänge wurden die Banden ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt.

2.10 DNA-Sequenzierung

2.10.1 Sequenzreaktion

- BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v2.0 (Applied Biosystems)

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode. In die Sequenzreaktion wurden 50 - 100 ng gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Zur doppelsträngigen DNA-Matrize wurden 1,7 µl BigDye™ Terminator Mix, 4 pmol *Primer* und ddH₂O bis auf ein Gesamtvolumen von 10 µl zugegeben. Der Sequenzansatz wurde für Vorwärts- (F) und Rückwärts- (R) *Primer* jeweils getrennt angesetzt. Bei PCR-Fragmenten wurden die zur Amplifikation verwendeten *Primer* oder *nested Primer* in die Sequenzreaktion eingesetzt.

Die Sequenzreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

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

2.10.2 Sequenzanalyse

Die automatisierte Sequenzbestimmung wurde auf dem Sequenziergerät ABI PRISM™-System 3100 (Applied Biosystems) mit POP6-Matrix (Applied Biosystems) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Je 25 µl der gereinigten DNA-Sequenzreaktion wurden auf die Sequenzplatte aufgetragen. Die Sequenzrohdaten werden mit dem Softwarepaket 3100 Data Collection Software Version 1.1 erfasst und im Programmpaket *Staden Package* als Elektropherogramme dargestellt und analysiert.

2.11 Bestätigung

Alle pathologischen Ergebnisse wurden grundsätzlich in einer zweiten unabhängigen PCR bestätigt.

2.12 MS-MLPA (www.mrc-holland.com)

Die MS-MLPA wurde stets nach den Protokoll-Vorgaben von MRC-Holland durchgeführt.

Genauer Ablauf einer MS-MLPA:

Es wurden von jedem Patienten (soweit vorhanden) jeweils eine gDNA- und eine Tumor-DNA - Probe untersucht. Der Ablauf ist im Protokoll von MRC-Holland vorgegeben.

Zunächst erfolgt die Denaturation der DNA und die Hybridisierung mit den spezifischen Sonden des jeweiligen Kits (hier v.a. ME011). Im Folgenden wird jede Probe geteilt:

Für die CNV („*Copy Number Variation*“) - Variante werden eine Ligase sowie ein Polymerase-Mix mit Primern dazugegeben und die an die Sonden gebundenen DNA-Abschnitte werden ligiert und dann amplifiziert. Nach einer elektrophoretischen Trennung erfolgt die Auswertung der Daten. Dabei ist jeder Gen-Sonde ein *Peak* zugewiesen. Im Vergleich (z.B. gDNA und Tumor-DNA) kann bei Halbierung oder Erhöhung des *Peaks* in Zusammenhang mit Auswertung der technischen Daten bei Reduktion der *Copy Number* um 0,5 oder Erhöhung auf 1,5 von einer Deletion bzw. Duplikation ausgegangen werden (bei einem vorausgesetzten Grundwert von 1,0 bestehend aus 0,5 mütterlichem und 0,5 väterlichem Allel).

Für die Promotor-Methylierungs - Variante („*Methylation*“) ist ausschlaggebend, dass die Sequenz der MLPA-Proben eine Schnittstelle für das Methylierungs-sensitive Endonuclease-Enzym HhaI hat. Zu den Proben werden eine Ligase sowie ein Verdauungsenzym hinzugegeben (hier: HhaI), dazu der Polymerase-Mix sowie die *Primer*. Die Verbindung aus Probe und unmethylierter Patienten-DNA wird durch das Enzym HhaI verdaut und kann nicht in der PCR amplifiziert werden. Aus diesem Grund erscheint kein Signal bei der Elektrophorese und kein *Peak* in der Auswertung. Wenn dagegen die Patienten-DNA methyliert ist, sind die Hybride gegen den HhaI-Verdau geschützt. Die PCR kann normal ablaufen, die amplifizierten Produkte in der Elektrophorese ein Signal abgeben und es erscheint bei der Auswertung ein *Peak*.

2.12.1 DNA-Denaturation und Hybridisierung der SALSA-Proben

1.) Verdünnen von 50-200ng DNA mit TE auf 5µl
2.) 98°C für 10 min. Herunterkühlen auf 25°C vor Öffnen des <i>Cyclers</i>
3.) Hinzufügen von 1,5µl SALSA-Probemix und 1,5µl MLPA-Buffer zu jeder Probe
4.) 95°C für 1 min. Dann 60°C über 16 Stunden

2.12.2 Ligation und Verdau

5.) Hinzufügen von 3µl Ligase-Puffer und 10µl H ₂ O zu jeder Probe bei Raumtemperatur
6.) Aufteilen der Proben: Pipettieren von 10µl in ein neues <i>Tube</i> (ergibt 2 <i>Tubes</i> à ~10µl)
7.) 49°C für 1 min (beide <i>Tubes</i>)
8.) Bei 49°C: Hinzufügen von 10µl Ligase-65-Mix zum ersten <i>Tube</i> (für CNV)
9.) Bei 49°C: Hinzufügen von 10µl Ligase-Digestion-Mix zum zweiten <i>Tube</i> (Methylierung)
10.) 49°C für 30 min, dann 98°C für 5 min

2.12.3 PCR-Reaktion

11.) Neue <i>Tubes</i> : je 13µl H ₂ O, 2µl SALSA-PCR-Puffer, 5µl MLPA Ligation ODER Digest
12.) Auf Eis: Hinzufügen von 5µl Polymerase-Mix, Thermocycler vorheizen auf 72°C
13.) Sofortiger Start der PCR-Reaktion mit folgenden Bedingungen: <ul style="list-style-type: none">- 95°C - 30 sec- 60°C - 30 sec- 72°C - 60 sec davon 35 Zyklen Ende: 72°C - 20 min

2.12.4 MS-MLPA - Auswertung

Für die Auswertung der MS-MLPA wird von MRC-Holland eine spezifische Auswertungssoftware zur Verfügung gestellt (*Coffalyser*). Parallel dazu erfolgte die Auswertung „per Hand“ über ein *Excel-Sheet*, in dem die jeweiligen Werte und Sonden zueinander in Relation gesetzt wurden, um eine CNV oder eine Promotor-Methylierung zu erkennen.

2.13 Geräte

Sequenzierung	ABI-Prism 3730 Applied Biosystems
Sequenzier-Platte	Thermo Scientific ABgene®
MS-MLPA	ABI-Prism 310 Applied Biosystems

2.14 Datenbanken und Computerprogramme

Unter der Internetseite der „*Human Genome Resources*“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human>) finden sich diverse Programme, Suchmaschinen und Datenbanken zur Untersuchung von Nukleotid- und Proteinsequenzen.

Swissprot listet unter <http://www.expasy.org> vor allem Programme für die Analyse und den Vergleich von Proteinsequenzen auf.

In OMIM („*Online Mendelian Inheritance in Man*“) werden Krankheiten symptomatisch und, falls bekannt, auch mit Kopplungsanalyse und krankheitsverursachenden Genen beschrieben. Weitere Datenbanken wie RefSeq und Uni Gene wurden ebenfalls als Informationsquellen verwendet.

Mit BLAST/N („*Basic Local Alignment Search Tool*“) (Altschul et al. 1990) kann eine Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Datenbank verglichen werden.

Das Programm BLAT (<http://genome.ucsc.edu/>) kann dazu verwendet werden, die DNA-Sequenz eines Gens mit seiner genomischen Sequenz zu vergleichen und damit die Exon-Intronstruktur darzustellen.

Der Vergleich einer Sequenz mit der SNP Datenbank (dbSNP) ist möglich, um das Vorhandensein mehrerer Genvarianten am eines bestimmten Gens am gleichen Genort abzufragen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>).

Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) kann die Pathogenität einer Sequenzveränderung anhand der Veränderung der Struktur, Größe, Ladung etc. vorhersagen.

Pubmed (www.pubmed.org) ist eine der größten Such- und Datenbanken hinsichtlich medizinischer Publikationen.

Uniprot (www.uniprot.org) bietet Zugang zu Proteinsequenzen und -funktion.

The European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>) kann Proteine in 3D-Sicht darstellen.

Der *Coffalyser* von MRC-Holland (www.mlpa.com) ist eine Auswertungssoftware für (MS-)MLPA-Untersuchungen.

Die Human Gene Mutation Database (HGMD[®]) ist eine umfassende Kollektion von Keimbahn-Mutationen in nukleären Genen, die Erkrankungen des Menschen verursachen oder damit assoziiert sind (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/introduction.php?lang=german>). Mittels des ExAC-Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>) stellt das *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) Sequenzierungsdaten von vielen verschiedenen Sequenzprojekten zusammen und der wissenschaftliche Gemeinschaft zur Verfügung.

3 Ergebnisse

3.1 MS-MLPA

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob bei immunhistochemischem Ausfall (aber fehlender Sequenzveränderungen) im jeweiligen Gen epigenetische Veränderungen im Sinne von Promotor-Methylierungen vorliegen und welchen Einfluss diese auf die Tumorgenese haben könnten.

Die MS-MLPA wurde zur Untersuchung von epigenetischen Alterationen in den Genen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MSH3*, *MLH3* und *MGMT* als neue Methode etabliert (MRC Holland, Kit ME 011-HNPCC). Von jedem Patienten wurden gDNA und -soweit vorhanden- Tumormaterial untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Das Patientenkollektiv war bereits hinsichtlich *BRAF*- und *KRAS*- Sequenzveränderungen sowie IHC-Ausfällen in *MLH1/MSH2/MSH6/PMS2* ohne nachweisbare Sequenzveränderungen in diesen Genen voruntersucht und die Patienten wurden anhand des Musters in drei verschiedene Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: MSI-H + IHC-Ausfall *MLH1/PMS2*

Gruppe 2: MSS + IHC-Ausfall *MLH1*

Gruppe 3: MSI-H + IHC-Ausfall *MSH2/MSH6*

3.1.1 MS-MLPA - Ergebnisse in genomischer DNA

Mit der MS-MLPA – Methode wurde die genomische DNA verschiedener Patientengruppen betrachtet. Es lassen sich durch die bereits im Vorfeld durchgeführten Mikrosatelliten- und immunhistochemischen Untersuchungen unterschiedliche Gruppen bilden: Patienten mit MSI-H – und MSS – Status, sowie Personen mit immunhistochemischem Ausfall von *MLH1* bzw. *MSH2* und/oder *MSH6*.

Betrachtet wurden sowohl die *Copy Number Variations*, d.h. Deletionen oder Duplikationen (Fragestellung: sind Gensonden-*Peaks* kumulativ in der Ausprägung 0,5 oder 1,5 vorhanden?) als auch der Promotor-Methylierungs-Status (Fragestellung: welche Sonden wurden nicht verdaut und erscheinen als *Peaks* in der Auswertung - sind also methyliert?).

Verwendet wurde wie im Kapitel 2 beschrieben der MS-MLPA-Kit ME011 „*Mismatch Repair Genes Probemix*“ von MRC-Holland mit folgenden Genen (s. Tab. 8):

Gen	Sonden insgesamt	Sonden mit Hhal-Schnittstelle	Lokalisation der Sonden in der Region bekannter Methylierungs-Hotspots
<i>MLH1</i>	6	5	460nt vor Ex1, 319nt vor Ex.1, 183nt vor Ex.1, 47nt vor Ex.1, Exon 1, Intron 1
<i>MSH2</i>	4	3	143nt vor Ex.1, 67nt vor Ex.1, Exon 1, Exon 7
<i>MSH6</i>	3	3	165nt vor Ex.1, 2 x Exon 1
<i>PMS2</i>	3	3	219nt vor Ex.1, Exon 1, Intron 1
<i>MGMT</i>	6	6	405nt vor Ex.1, 319nt vor Ex.1, 66nt vor Ex.1, 3xIntron 1
<i>MSH3</i>	2	1	404nt vor Ex.1, Exon 1
<i>MLH3</i>	1	1	Exon 1

Tabelle 8: Gen-Sonden MS-MLPA-Kit ME011

Erklärung zu den folgenden Auswertungs-Tabellen (s. Tab. 9+10+11): Ist eine Sonde im Promotorbereich eines bestimmten Gens in der Promotor-Methylierungsanalyse auffällig, so wird sie in der Tabelle erwähnt. Sind mehr als 50% der Sonden betroffen, erfolgt eine rote Hinterlegung des Feldes. Bei einer hochgradigen Auffälligkeit zeigt sich dies in Änderung der Schriftdicke (fett gedruckt) auf rotem Hintergrund.

3.1.1.1 Gruppe 1: MSI-H + IHC-MLH1-Ausfall

Gruppe 1 (s. Tab. 9) betrifft 23 Patienten mit MSI-H – Status und IHC-MLH1-Ausfall, bei 10 zusätzlich mit PMS2-Ausfall.

Von drei Personen dieser Gruppe ist ein MSI- und IHC-Status nicht bekannt, da sie als prädiktive (ratsuchende, noch gesunde) Patienten von Angehörigen, die bereits erkrankt sind, aufgenommen wurden. Davon besitzt bei Patient #21 K.Ma. und #22 K.Mi. der Indexpatient MSI-H-Status und IHC-MLH1-Ausfall. Bei Patient #23 R.P. ist der Indexpatient ein *MLH1*-Keimbahn-Methylierer.

MS-MLPA Auswertung (gDNA)

Gruppe 1) MSI-H + IHC-MLH1/PMS2 Ausfall (=23 Patienten)

#	Patient	Tumorgewebe			genomische DNA	
		IHC-Ausfall	<i>BRAF</i> -SV	<i>KRAS</i> -SV	CNV (Copy Number Variation)	Methylierung
1	M. H.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MLH1</i> -Methylierung (47-57%)
2	S. W.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MLH1</i> -Methylierung (ca. 50%)
3	R. G.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MLH1</i> -Methylierung (19-36%)
4	H. B.	MLH1/PMS2	[Veränderung/Mutation]	o.B.	o.B.	o.B.
5	S. L.	MLH1/PMS2	o.B.	[Veränderung/Mutation]	<i>MSH2</i> ↑	o.B.
6	G. B.	MLH1	o.B.	[Veränderung/Mutation]	o.B.	<i>MGMT</i>
7	T. E.	MLH1	o.B.	o.B.	<i>MGMT</i> ↑	o.B.
8	S. E.	MLH1	o.B.	o.B.	<i>MSH2</i> ↑	o.B.
9	D. J.	MLH1	o.B.	o.B.	<i>MGMT</i> ↑, <i>MSH2</i> ↑	<i>MGMT</i>
10	H. O.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
11	B. G.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
12	R. H.	MLH1/PMS2	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MLH1</i>
13	S. S.	MLH1/PMS2	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
14	H. K.	MLH1/PMS2	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
15	B. M.	MLH1/PMS2	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
16	A. O.	MLH1/PMS2	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
17	Z. K.	MLH1/PMS2	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
18	S. B.	MLH1/PMS2	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
19	D. A.	MLH1/PMS2	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
20	S. R.	MLH1/MSH6	o.B.	o.B.	<i>MGMT</i> ↑	<i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> , <i>MGMT</i>

Prädiktive: (ohne MSI/IHC-Angabe; Einteilung durch Verwandtschaft)						
21	K. Ma.	MLH1	o.B.	o.B.	<i>MLH1</i> -Duplikation (alle Sonden)	<i>MLH1</i> (7-26%), <i>MGMT</i>
22	K. Mi.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MGMT</i> , <i>PMS2</i>
23	R. P.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.

Tabelle 9: gDNA: MS-MLPA – Auswertung, Gruppe 1: MSI-H und IHC-MLH1 - Ausfall
SV=Sequenzveränderung

■ alles o.B.
■ Veränderung/Mutation
■ MSH2-IHC-Ausfall
■ MSH6-IHC-Ausfall
■ MSH2/MSH6-IHC-Ausfall
■ MLH1/MSH6-Ausfall
■ MLH1-Methylierung in der Keimbahn

Bei drei Patienten (#1 M.H., #2 S.W., #3 R.G.) wurde bei bereits bekanntem IHC-MLH1-Ausfall eine Keimbahn-Promotor-Methylierung jeweils aller *MLH1*-Promotor-Sonden entdeckt (Spannweite: 19-57%). Dieses Ergebnis ist insofern interessant, da keine Sequenzveränderung im *MLH1*-Gen vorliegt. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Keimbahn-Methylierung im Promotorbereich zu einer Stilllegung des Gens geführt hat und sowohl für den immunhistochemischen Ausfall wie auch für die Tumorentstehung ursächlich war. Die Promotor-Methylierungen entsprechen meist ca. 50%, was bedeuten könnte, dass nur ein Allel betroffen sein könnte (bei beiden Allelen wären es ca. 100%). Eine Person (#4 H.B.) mit bekannter *BRAF*-Sequenzveränderung und IHC-MLH1-Ausfall war methylierungsunauffällig. Zwei weitere Patienten (#5 S.L., #6 G.B.) mit IHC-MLH1 (+*PMS2*) – Ausfall und bekannter *KRAS*-Sequenzveränderung wiesen geringfügige Veränderungen in verschiedenen Sonden auf. Ein Patient (#20 S.R.) fiel durch die besondere Kombination IHC-MLH1+MSH6 – Ausfall auf. Die MS-MLPA ergab hier leichte

Abweichungen bei CNV und Promotor-Methylierung, jedoch keine spezifischen Auffälligkeiten.

Einer der prädiktiven Patienten (#21 K.Ma.) wies eine *MLH1*-Duplikation in allen Sonden auf, sowie eine *MLH1*-Promotor-Methylierung (7-26%). Es erfolgte eine Einzel-Allel-Analyse, um herauszufinden, ob beide Auffälligkeiten auf demselben Allel liegen. Hierbei zeigte sich eine geringgradige Promotor-Methylierung, kein Hinweis für einen Polymorphismus oder SNP (Daten hier nicht dargestellt, Durchführung im MGZ München). Auf diese Besonderheit wird in der Diskussion genauer eingegangen.

Bei den übrigen 13 Patienten zeigten sich nur geringfügige Veränderungen in CNV und Promotor-Methylierung bzw. keinerlei Auffälligkeiten.

3.1.1.2 Gruppe 2: MSS + IHC-MLH1-Ausfall

In Gruppe 2 (s. Tab. 10) werden sechs Patienten mit MSS – Status und IHC-MLH1-Ausfall zusammengefasst. Zwei der Patienten (#24 S.A., #25 F.K.) haben eine bekannte *BRAF*-Sequenzveränderung, in CNV und Promotor-Methylierung ergaben sich jedoch keinerlei Auffälligkeiten. Bei einem Patienten (#27 T.S.) zeigten sich bei der Analyse in vier Genen unspezifische Promotor-Methylierungen (*MLH1*, *PMS2*, *MGMT*, *MSH6*). Die übrigen drei Patienten wiesen nur wenige Veränderungen auf.

Gruppe 2) MSS + IHC-MLH1-Ausfall (=6 Patienten)

#	Patient	IHC-Ausfall	<i>BRAF</i> -SV	<i>KRAS</i> -SV	CNV (Copy Number Variation)	Methylierung	
24	S.A.	MLH1		o.B.	o.B.	o.B.	alles o.B.
25	F.K.	MLH1		o.B.	o.B.	o.B.	Veränderung/Mutation
26	K.G.	MLH1	o.B.	o.B.	<i>MSH2</i> ↑	<i>MGMT</i>	MSH2-IHC-Ausfall
27	T.S.	MLH1	o.B.	o.B.	<i>MSH6</i> ↓, <i>MGMT</i> ↓ (je alle Sonden)	<i>MLH1</i> , <i>PMS2</i> , <i>MGMT</i> , <i>MSH6</i>	MSH6-IHC-Ausfall
28	W.A.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MGMT</i>	MSH2/MSH6-IHC-Ausfall
29	W.H.	MLH1	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MGMT</i>	MLH1/MSH6-Ausfall
							MLH1-Methylierung in der Keimbahn

Tabelle 10: gDNA: MS-MLPA – Auswertung, Gruppe 2: MSS und IHC-MLH1 – Ausfall

3.1.1.3 Gruppe 3: MSI-H + IHC-MSH2/MSH6 – Ausfall

Gruppe 3 (s. Tab. 11) umfasst 18 Patienten mit MSI-H – Status und IHC-MLH2/MSH6 – Ausfall. Darunter verfügen (a) sechs über einen MSH2-Ausfall, (b) fünf über alleinigen MSH6-Ausfall und (c) sieben über einen kombinierten MSH2/MSH6 – Ausfall.

Bei Untergruppe (a) fallen zwei Patienten auf (#33 G.K., #34 P.B.), die in der CNV bezüglich *MSH2*, *PMS2* und *MGMT* auffällig sind sowie Person #34 P.B. in der Promotor-Methylierung (*MLH1*, *MSH6*, *MGMT*).

In Untergruppe (b) zeigt nur ein Patient (#38 B.I.) vermehrte CNV in *MSH2*, *PMS2* und *MGMT*.

In der Untergruppe (c) verfügt ein Patient (#41 V.S.) über eine *BRAF*-Sequenzveränderung – der einzige dieser Gruppe. Darauf wird in der Diskussion genauer eingegangen.

Bis auf kleinere Veränderungen sind aber dessen Ergebnisse in der MS-MLPA hinsichtlich CNV und Promotor-Methylierung unauffällig.

Auffällig ist das Resultat eines weiteren Patienten dieser Gruppe (#42 H.H.), der CNV in *MGMT* und *MLH1* vorweist, sowie eine hundertprozentige *MGMT*- und auch eine *MLH1*-Promotor-Methylierung in allen Sonden. Welchen Einfluss die *MGMT*-Promotor-Methylierung mit sich bringt, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht bearbeitet werden. Die übrigen Patienten haben unauffällige CNV- und Promotor-Methylierungs-Befunde.

Gruppe 3) MSI-H + IHC-MSH2/MSH6-Ausfall (=18 Patienten)

#	Patient	IHC-Ausfall	<i>BRAF</i> -SV	<i>KRAS</i> -SV	CNV (Copy Number Variation)	Methylierung
30	O.H.	MSH2	o.B.	o.B.	<i>PMS2</i> ↓	<i>MLH1</i> (9-57%)
31	F.R.	MSH2	o.B.	o.B.	<i>MSH2</i> ↑, <i>PMS2</i> ↑	<i>MGMT</i>
32	U.A.	MSH2	o.B.	o.B.	<i>PMS2</i> ↑, <i>MGMT</i> ↑	<i>MGMT</i>
33	G.K.	MSH2	o.B.	o.B.	<i>PMS2</i> ↑, <i>MGMT</i> ↑, <i>MSH2</i> ↓	<i>MLH1</i>
34	P.B.	MSH2	o.B.	o.B.	<i>MSH2</i> ↑, <i>PMS2</i> ↑, <i>MGMT</i> ↑	<i>MLH1</i> (0-33%), <i>MSH6</i> , <i>MGMT</i>
35	S.R.	MSH2	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MLH1</i> , <i>MSH 6</i>
36	S.S.	MSH6	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MGMT</i>
38	B.I.	MSH6	o.B.	o.B.	<i>PMS2</i> ↑, <i>MGMT</i> ↑, <i>MSH2</i> ↑	<i>MGMT</i>
37	W.C.	MSH6	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
39	G.M.	MSH6	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
40	B.M.	MSH6	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
41	V.S.	MSH2/MSH6		o.B.	<i>MSH2</i> ↑	o.B.
42	H.H.	MSH2/MSH6	o.B.	o.B.	<i>MGMT</i> ↑, <i>MLH1</i> ↓	<i>MGMT</i> : 100% alle Sonden, <i>MLH1</i>
43	M.C.	MSH2/MSH6	o.B.	o.B.	<i>MSH2</i> ↑	o.B.
44	S.C.I.	MSH2/MSH6	o.B.	o.B.	o.B.	<i>MLH1</i> (5-15%)
45	H.W.R.	MSH2/MSH6	o.B.	o.B.	o.B.	<i>PMS2</i>
46	W.C.	MSH2/MSH6	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.
47	S.L.	MSH2/MSH6	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.

alles o.B.
 Veränderung/Mutation
 MSH2-IHC-Ausfall
 MSH6-IHC-Ausfall
 MSH2/MSH6-IHC-Ausfall
 MLH1/MSH6-Ausfall
 MLH1-Methylierung in der Keimbahn

Tabelle 11: gDNA: MS-MLPA - Auswertung, Gruppe 3: MSI-H und IHC-MSH2 u/o -MSH6 - Ausfall

3.1.1.4 Kontrollen

Um die Ergebnisse in den richtigen Kontext setzen und somit analysieren zu können, wurde ein Kontrollkollektiv erstellt und untersucht. Dieses setzt sich zusammen aus insgesamt 30 gesunden Patienten, die unterschiedlichen Altersgruppen und Geschlechtern angehören: zehn Patienten sind circa 20 Jahre alt, zehn circa 40 Jahre und zehn etwa 60 Jahre. Somit kann auch überprüft werden, ob und welche Rolle der alters- und geschlechtsabhängige Anstieg der Promotor-Methylierung (Frauen>Männer) der in

diesem MS-MLPA – Kit verwendeten Sonden spielt (Esteller 2003). In Tabelle 12 und 13 werden getrennt voneinander (a) die CNV- und (b) die Promotor-Methylierungs-Resultate der Kontrollgruppen dargestellt.

Somit zeichnen sich unter (a-CNV) vor allem die Sonden *MLH1-7187*, *MLH1-6221* und *MLH1-2258*, *MSH2-0911*, *MGMT-5670*, *MSH3-7940*, *MLH3-1245* und unter (b-Promotor-Methylierung) *MLH1-1685*, *MLH1-6221* und *MLH1-2258*, *MSH6-6228*, *MSH6-6230*, alle *MSH2*-Sonden, *PMS2-7935*, *PMS2-4661*, *MGMT-5670*, *MSH3-7939*, sowie *MLH3-1245* und *MLH3-7941* als besonders spezifisch aus.

Als unspezifisch erwiesen sich folgenden Sonden, die in 30% der Fälle Auffälligkeiten zeigten und aufgrund ihrer Schwankungen und Instabilität nicht brauchbar sind: Unter (a-CNV) *MLH1-1685*, *MSH6-6228*, *MSH6-6229*, *MSH2-6142*, *MSH2-6141*, *PMS2-7934*, *MGMT-7188*, *MGMT-2239*, *MSH3-7938*, *MSH3-7939*, *MLH3-7941* und unter (b-Promotor-Methylierung) vor allem *MSH6-6229*, *MGMT-7188*, *MGMT-2239*, *MSH3-7940* und *MSH3-7938*.

Das über alle Altersgruppen hinweg vergleichbare Muster lässt auf die Unabhängigkeit der Sonden von der Alterspromotormethylierung schließen. Abweichungen zeigen sich lediglich in *MSH6-6229* (steigend mit dem Alter) und in *PMS2-7934*, das bei den circa 40-Jährigen methyliert vorliegt.

MS-MLPA - Kontrollen

o.B. ↑ ↓

Patienten Sonden

	MLH1-1685	MLH1-1686	MLH1-6222	MLH1-7187	MLH1-6221	MLH1-2258	MSH6-6228	MSH6-6230	MSH6-6229	MSH2-6227	MSH2-0911	MSH2-6142	MSH2-6141	PMS2-7935	PMS2-4861	PMS2-7934	MGMT-5670	MGMT-7188	MGMT-2239	MSH3-7940	MSH3-7938	MSH3-7939	MLH3-1245	MLH3-7941
T. K. ('86)												↑	↑			↑						↑		↑
S. F. ('86)												↑	↑			↑								↑
B. M. ('86)	↑	↑	↑							↑	↑	↑	↑			↑								↑
L. M. ('87)												↑	↑			↑								↑
Z. F. ('84)												↑	↑			↑								↑
M-K. S. ('89)												↑	↑			↑								↑
G. J. ('89)	↑	↑	↑	↑								↑	↑			↑								↑
D. C. ('81)	↑	↑	↑	↑	↑							↑	↑			↑								↑
R. H. ('82)	↑	↑	↑	↑	↑							↑	↑			↑								↑
B. A. ('82)												↑	↑			↑								↑
D. S. ('67)	↑											↑	↑			↑								↑
W. G. ('66)												↑	↑			↑								↑
W. J. ('63)												↑	↑			↑								↑
M-B. V. ('68)												↑	↑			↑								↑
B. M. ('69)	↑											↑	↑			↑								↑
H. C. ('69)												↑	↑			↑								↑
S. S. ('73)												↑	↑			↑								↑
G. M. ('68)												↑	↑			↑								↑
H. K. ('70)												↑	↑			↑								↑
M-C. E. ('70)												↑	↑			↑								↑
W. M. ('49)		↑										↑	↑			↑								↑
M. H. ('50)												↑	↑			↑								↑
B. U. ('49)												↑	↑			↑								↑
O. Y. ('47)												↑	↑			↑								↑
L. G. ('48)												↑	↑			↑								↑
B. R. ('47)												↑	↑			↑								↑
L. U. ('49)	↑											↑	↑			↑								↑
S. H. ('48)	↑	↑	↑	↑								↑	↑			↑								↑
L. E. ('49)	↑											↑	↑			↑								↑
K. B. ('44)												↑	↑			↑								↑

o.B. ↑ ↓

Tabelle 12: CNV's in der Kontrollgruppe, bestehend aus gesunden 20-/40-/60-Jährigen, aufgeteilt nach Sonden und Genzugehörigkeit

MS-MLPA - Kontrollen

Methylierung: o.B. 10-19% > 20%

Patienten Sonden

	MLH1-1685	MLH1-1686	MLH1-6222	MLH1-7187	MLH1-6221	MLH1-2258	MSH6-6228	MSH6-6230	MSH6-6229	MSH2-6227	MSH2-0911	MSH2-6142	MSH2-6141	PMS2-7935	PMS2-4661	PMS2-7934	MGMT-5670	MGMT-7188	MGMT-2239	MSH3-7940	MSH3-7938	MSH3-7939	MLH3-1245	MLH3-7941	
T. K. ('86)																									
S. F. ('86)																									
B. M. ('86)																									
L. M. ('87)																									
Z. F. ('84)																									
M-K. S. ('89)																									
G. J. ('89)																									
D. C. ('81)																									
R. H. ('82)																									
B. A. ('82)																									
D. S. ('67)																									
W. G. ('66)																									
W. J. ('63)																									
M-B. V. ('68)																									
B. M. ('69)																									
H. C. ('69)																									
S. S. ('73)																									
G. M. ('68)																									
H. K. ('70)																									
M-C. E. ('70)																									
W. M. ('49)																									
M. H. ('50)																									
B. U. ('49)																									
O. Y. ('47)																									
L. G. ('48)																									
B. R. ('47)																									
L. U. ('49)																									
S. H. ('48)																									
L. E. ('49)																									
K. B. ('44)																									

Tabelle 13: Methylierung in der Kontrollgruppe, bestehend aus gesunden 20-40-60-Jährigen, aufgeteilt nach Sonden und Genzugehörigkeit

3.1.1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt sich, dass in beinahe jeder der Gruppen auffällige Ergebnisse hinsichtlich der Promotor-Methylierung in genomischer DNA auftreten.

In Gruppe 1 sind vier Patienten (#1 M.H., #2 S.W., #3 R.G. und #21 K.Ma.), die in *MLH1* eine hochgradige Promotor-Methylierung und zusätzlich eine Duplikation (#21 K.Ma.) aufweisen.

In Gruppe 2 sind drei Patienten (#24 S.A., #25 F.K. und #27 T.S.), die in ihrer Kombination mit anderen Genveränderungen (z.B. *BRAF*-Sequenzveränderungen #24 S.A. und #25 F.K.) oder hochgradigen Promotor-Methylierungsveränderungen (#27 T.S.) interessant sind.

Gruppe 3 zeichnet sich durch IHC-MSH2/MSH6 – Ausfall aus, was die Frage nach Korrelation in CNV und Promotor-Methylierung nahelegt. Hier sind fünf Patienten (#33 G.K., #34 P.B., # 38 B.I., #41 V.S. und #42 H.H.) mit unterschiedlichen Auffälligkeiten zu nennen.

3.1.2 MS-MLPA - Ergebnisse in Tumor-DNA

Nicht nur genomische, sondern auch Tumor-DNA (Tu-DNA) verschiedener Kollektive wurde hinsichtlich Deletion/Duplikation und Promotor-Methylierung mittels MS-MLPA untersucht. In einigen Fällen gelang die Testung beider DNA's (gDNA und Tu-DNA) eines jeweiligen Patienten, so dass ein direkter Vergleich gezogen werden kann (s. Tab.14).

3.1.2.1 Ergebnisse

Insgesamt wurden 14 Tumor-DNA's aus verschiedensten Gruppen untersucht. Sechs davon weisen zahlreiche Auffälligkeiten in der Promotor-Methylierung in sämtlichen Sonden auf (s. Tab. 14). In allen Sonden betroffen, größtenteils mit Promotor-Methylierungs-Werten um die 50%, sind dabei v.a. *MLH1*, *MSH6*, *MGMT* und *PMS2*. Das Ergebnis der CNV dagegen ist ohne größere Auffälligkeiten. Interessant ist, dass bei der CNV-Analyse beinahe die gleichen Gene wie bei der Promotor-Methylierungs-Analyse betroffen sind und ohne nachvollziehbares Muster nach oben bzw. unten abweichen. Die Ergebnisse dieser sechs Patienten werden im nächsten Kapitel spezifiziert.

Bei den restlichen acht Patienten sind zwar einzelne Sonden auffällig, jedoch nicht in der Häufigkeit und Größenordnung wie bei den oben genannten. Die CNV ist bei diesen unauffällig oder nur leicht verändert.

MS-MLPA Auswertung (Tu-DNA) = 14 Patienten

#	Patient	CNV	Methylierung	Anmerkung
15	B.M.	o.B.	L1:42-71%, S6:10-23%, MGMT:≈20%	gDNA o.B.
17	Z.K.	MSH6↓, MSH2↓, MGMT↓	L1:11-31%, S6:7-20%, MGMT: 16%	gDNA o.B.
5	S.L.	MSH6↓	L1:37-50%, S6:6-22%, MGMT:≈30%	K-Ras-Mut
14	H.K.	MGMT↑, MSH2↑, PMS2↑	L1:5-49%, S6:6-16%, MGMT:11-30%, PMS2:8-13%	gDNA o.B.
48	S.E.	MLH1↓, MGMT↑	L1:46-69%, MGMT:40-45%	∅ gDNA untersucht
49	L.M.	o.B.	L1:63-135%, MGMT:11-57%, S6:≈10%	∅ gDNA untersucht
12	R.H.	PMS2↓	L1:25-44%, S6:30%	wie gDNA (+MGMT-Meth)
8	S.E.	MSH2↑, PMS2↑	L1:48-91%, S6:≈10%	gDNA: MSH2+MGMT CNV ↑
13	S.S.	MLH1↑	L1:0-25%, PMS2:37%	gDNA o.B.
11	B.G.	MLH1↑, PMS2↑, MGMT↓, MSH2↓	L1:0-22%, MGMT:≈10%	gDNA o.B.
41	V.S.	MLH1↑	(geschlechtsspezifisch) o.B.	B-Raf-Mut! MSH2/MSH6-IHC!
7	T.E.	o.B.	o.B.	gDNA o.B.
50	F.G.	o.B.	o.B.	gDNA o.B.
6	G.B.	o.B.	o.B.	gDNA: MGMT-Meth

	CIMP-verdächtig
	o.B.
	weitere Veränderungen

Tabelle 14: Tumor-DNA: MS-MLPA – Auswertung. In der rechten Spalte wird beschrieben, ob sich in der zugehörigen gDNA des jeweiligen Patienten ebenfalls Auffälligkeiten in der Untersuchung (z.B. IHC, KRAS/BRAF, CNV/Promotor-Methylierung) ergeben hatten.

3.1.2.2 Korrelation zwischen Tumor- und gDNA (s. Tab. 15)

Die sechs Fälle, die im Tumor starke Promotor-Methylierungsabweichungen zeigten, gehören zum Großteil der Gruppe „MSI-H und MLH1-IHC-Ausfall ohne Keimbahn-Sequenzveränderung“ an. Die gDNA ist bei drei Patienten (#15 B.M., #17 Z.K., #14 H.K.) bezüglich der MS-MLPA unauffällig. Einer (#5 S.L.) weist eine KRAS-Sequenzveränderung auf. Bei den übrigen beiden (#48 S.E., #49 L.M.) war eine Untersuchung der gDNA nicht möglich.

1) CNV

		gDNA	Tu-DNA
#15	B.M.	o.B.	o.B.
#17	Z.K.	o.B.	<i>MSH6</i> ↓, <i>MSH2</i> ↓, <i>MGMT</i> ↓
#5	S.L. (K-Ras-Mut)	<i>MSH2</i> ↑	<i>MSH6</i> ↓
#14	H.K.	o.B.	<i>MGMT</i> ↑, <i>MSH2</i> ↑, <i>PMS2</i> ↑
#48	S.E.	keine gDNA	<i>MLH1</i> ↓, <i>MGMT</i> ↑
#49	L.M.	keine gDNA	o.B.

2) Methylierung

		gDNA	Tu-DNA
#15	B.M.	o.B.	<i>L1</i> :42-71%, <i>S6</i> :10-23%, <i>MGMT</i> ~20%
#17	Z.K.	o.B.	<i>L1</i> :11-31%, <i>S6</i> :7-20%, <i>MGMT</i> :16%
#5	S.L. (K-Ras-Mut)	o.B.	<i>L1</i> :37-50%, <i>S6</i> :6-22%, <i>MGMT</i> ~30%
#14	H.K.	o.B.	<i>L1</i> :5-49%, <i>S6</i> :6-16%, <i>MGMT</i> :11-30%, <i>PMS2</i> :8-13%
#48	S.E.	keine gDNA	<i>L1</i> :46-69%, <i>MGMT</i> :40-45%
#49	L.M.	keine gDNA	<i>L1</i> :63-135%, <i>MGMT</i> :11-57%, <i>S6</i> :~10%

Tabelle 15: MS-MLPA: gDNA vs Tumor-DNA. Der Großteil der Patienten stammen aus der Gruppe MSI-H und MLH1-IHC-Ausfall ohne Keimbahn-Sequenzveränderung

Bei den verbleibenden acht Personen treten kleinere Abweichungen von der Norm auf. Zu erwähnen sind hier u.a. ein Patient (#41 V.S.) mit *BRAF*-Sequenzveränderung und IHC-*MSH2/MSH6*-Ausfall bei später nachgewiesener Keimbahn-Sequenzveränderung in *MSH2*, deren Tumor-DNA bezüglich CNV und Promotor-Methylierung größtenteils unauffällig ist.

3.1.2.3 Zusammenfassung Tumor-DNA

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Ergebnisse der MS-MLPA mit Tumor-DNA sehr inhomogen sind und großen Schwankungen unterliegen. Es ist unklar, ob dies aufgrund der niedrigeren Qualität der Tumor-DNA oder aufgrund der vielen stattgehabten Veränderungen im Tumor-Material auftritt. In der Diskussion wird darauf weiter eingegangen.

3.2 Ergebnisse der *MSH3*-Genanalyse auf Keimbahn-Sequenzveränderungen

Zur Erinnerung: Das *MSH3*-Gen gehört zum *Mismatch-Repair*-System im menschlichen Körper. Das MMR-System sorgt für „Wiedergabestabilität“ bei Replikation. In menschlichen Zellen sind bisher mehrere mutS-Homologe bekannt. Interessant für die vorliegende Arbeit sind vor allem *MSH2* und *MSH6* (auch *MSH3*). *MSH2+MSH6* schließen

sich als MutS α zum „*G:T-binding protein*“ (GTBP) zusammen. MSH2+MSH3 erfassen als MutS β verschiedene Insertionen. Somit besitzen die beiden Komplexe überlappende Aufgabenbereiche. MSH2 nimmt eine zentrale Stelle im MMR ein. Es bildet zu 80% mit MSH6 ein Heterodimer, alternativ mit MSH3. Wenn keiner dieser beiden Bindungspartner verfügbar ist, wird in seltenen Fällen auch eine Homodimerisation beobachtet. MSH3 und MSH6 homodimerisieren nicht. Jedes der drei Gene alleine ist unfähig, eine Aufgabe im MMR erfüllen.

In diesem Kapitel soll die Rolle von *MSH3*-Keimbahnveränderungen in Patienten untersucht werden. Unser Kollektiv beinhaltet Patienten mit Verdacht auf Lynch-Syndrom bei MSI-Status und immunhistochemischem Ausfall von MSH2 und MSH6, ohne dass eine Sequenzveränderung in einem der beiden Gene gefunden werden konnte. In diesem Kollektiv wurde das *MSH3*-Gen auf Keimbahn-Sequenzveränderungen untersucht und deren mögliche Pathogenität ermittelt.

Eine Interaktion zwischen MSH2 - MSH6 - MSH3 ist bekannt. Im nächsten Schritt wird überprüft, ob eine Verbindung zwischen einer pathogenen Keimbahn-Sequenzveränderung in *MSH3* und dem IHC-MSH2/MSH6 - Ausfall im Tumormaterial besteht und ob dies die Tumorgenese im Patientenkollektiv wesentlich beeinflusst haben könnte.

3.2.1 Etablierung der Sequenzanalyse des *MSH3*-Gens

Bei der Etablierung der Sequenzanalyse des *MSH3*-Gens wurden zuerst *Primer* für die PCR an günstige Stellen im Intron um den codierenden Bereich herum gelegt, um eine Amplifikation der Regionen zu ermöglichen (*Primer* siehe Anhang). Das Gelbild des ersten Versuches ist in Abbildung 23 dargestellt:

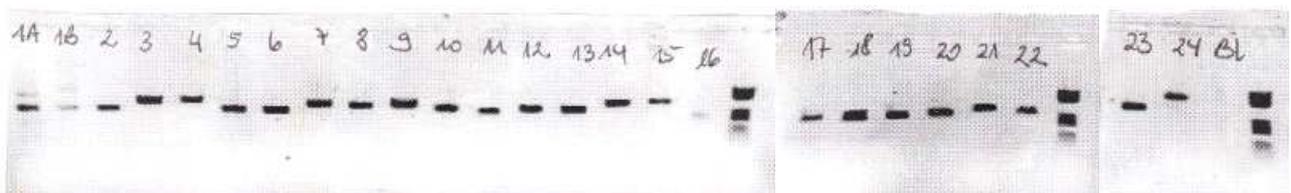


Abbildung 23: Gelbild *MSH3* mit seinen 24 Exons (und Blank); Exon 1 ist - bedingt durch seine Größe - unterteilt in 1A und 1B

Bei beinahe allen Exons (Ausnahme: Exon 1, s.u.) erschien eine spezifische Bande. Durch sowohl Größe der Gelbande als auch Sequenzier-Ergebnis konnte die Richtigkeit jedes Exons bestätigt werden.

Exon 1 bereitet durch seine große Sequenzhomologie mit Genen auf anderen

Chromosomen (teils bis zu über 90%) Schwierigkeiten bei der Etablierung. Auf dem Gelbild sind teilweise zwei oder mehr Banden sichtbar. Schließlich gelang es mit einer *nested-PCR* & *nested-Sequenzierung* (s. Anhang), bei den meisten Patienten spezifisch das Exon 1 von *MSH3* herauszufiltern (s. Abb. 24).

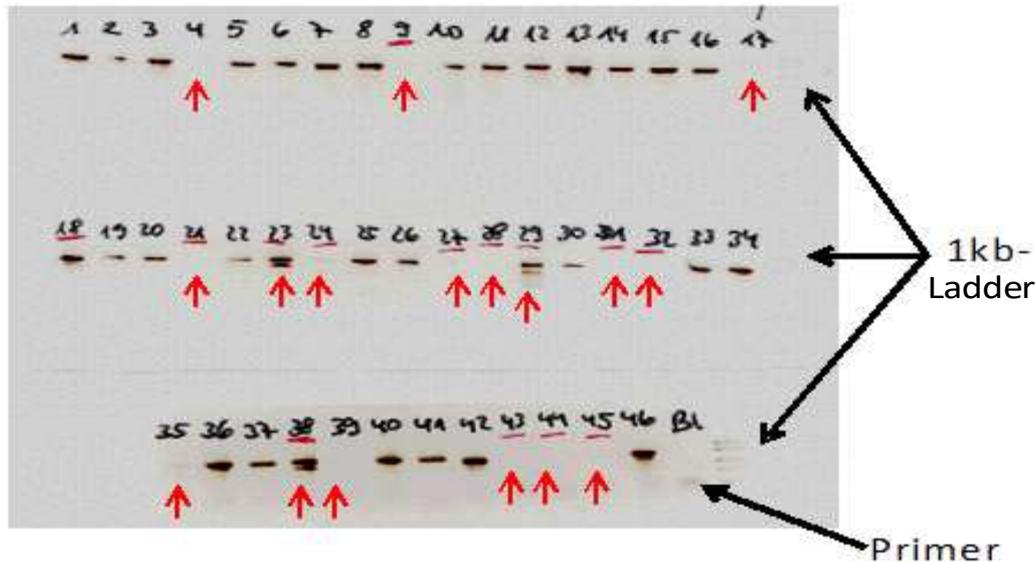


Abbildung 24: Gelbild von Exon 1: 46 Patienten. Die mit roten Pfeilen markierten Patientennummern zeigen Auffälligkeiten wie Doppelbanden oder fehlende Amplifikation

3.2.2 Gesamtübersicht Patiententabelle

In Tabelle 16 sind alle Ergebnisse in einer Übersichtstabelle zusammengefasst (alle 40 Patienten, alle 24 Exons). Dabei fällt auf: Exon 1, 3, 9, 21, 22 und 23 sind am häufigsten von Sequenzveränderungen betroffen. Aufgrund der Größe und Komplexität von Exon 1 sind diese Resultate in einer gesonderten Tabelle (s. Tab. 17) aufgeführt. Aus dieser ist ersichtlich, dass die Sequenzierung trotz mehrerer verschiedener Primer und mehrfacher Versuche (bis zu 5) nicht in jedem Fall funktioniert hat („n.a.“=nicht auswertbar) und dass gehäuft insgesamt sieben verschiedene Sequenzveränderungen auftreten. Die genaue Aufschlüsselung erfolgt weiter unten. Sämtliche aufgetretenen Sequenzveränderungen werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

Auf zwei Patienten (#19 S.U., Sequenzveränderung in Exon 1: c.190C>G p.(Pro64Ala), c.195_203dup (p.Pro67_Pro69dup) und #31 B.K., Sequenzveränderung in Exon 14: c.2041C>T p.(Pro681Ser)) wird in der Diskussion genauer eingegangen.

#	Patient	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10	Exon 11	Exon 12	Exon 13	Exon 14	Exon 15	Exon 16	Exon 17	Exon 18	Exon 19	Exon 20	Exon 21	Exon 22	Exon 23	Exon 24
1	B.G.	n.a.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.								
2	G.H.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
3	S.R.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
4	S.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
5	H.W.	n.a.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.								
6	P.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
7	F.U.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
8	H.A.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
9	U.P.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
10	P.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
11	S.R.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
12	G.M.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
13	S.M.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
14	S.H.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
15	W.L.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
16	P.M.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
17	K.K.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
18	B.I.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
19	S.U.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
20	P.J.J.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
21	K.L.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
22	P.E.	n.a.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.								
23	H.H.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
24	M.E.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
25	F.G.	n.a.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.								
26	S.C.I.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
27	B.M.	n.a.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.								
28	H.R.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
29	S.S.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
30	L.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
31	B.K.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
32	O.H.	n.a.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.								
33	W.C.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
34	A.S.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
35	F.R.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
36	G.K.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
37	S.L.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
38	S.C.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
39	L.R.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.									
40	W.C.	n.a.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.								

Exon 1: gesonderte Aufschlüsselung, Auffälligkeiten:

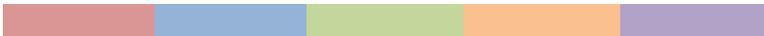
homo	o.B.																								
hetero	o.B.																								

Exon 3: .:358>7G>A
 Exon 4: c.693G>A p.(Pro231Pro)
 Exon 9: c.1453+61A>C
 Exon 14: c.1992G>A p.(Gln664Gln)
 c.2041C>T p.(Pro681Ser)
 Exon 16: c.2254-19T>G
 Exon 21: c.2846A>G p.(Gln949Arg)
 Exon 22: c.3001-32delAAATG
 c.3001-22T>A
 Exon 23: c.3133G>A p(Ala1045Thr)
 Exon 24: c.*50T>C

Tabelle 16: Gesamtübersicht der Sequenzveränderungen in MSH3

MSH3 - Exon 1

#	Patient	c.162T>C p.(Ala54Ala)	c.169_195del p.(Ala57_Ala6del)	c.204T>G p.(Ala68Ala)	c.231G>T p.(Pro77Pro)	c.235A>G p.(Ile79Val)	c.190C>G p.(Pro64Ala) hetero	c.195_203dup p.(Pro67_Pro69dup)
1	B.G.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
2	G.H.							
3	S.R.							
4	S.B.							
5	H.W.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
6	P.B.							
7	F.U.							
8	H.A.							
9	U.P.							
10	P.B.							
11	S.R.							
12	G.M.							
13	S.M.							
14	S.H.							
15	W.L.							
16	P.M.							
17	K.K.							
18	B.I.							
19	S.U.							
20	P.J.J.	Mosaik	Mosaik					
21	K.L.							
22	P.E.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
23	H.H.							
24	M.E.							
25	F.G.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
26	S-C.I.							
27	B.M.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
28	H.R.							
29	S.S.							
30	L.B.							
31	B.K.							
32	O.H.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
33	W.C.							
34	A.S.							
35	F.R.							
36	G.K.							
37	S.I.							
38	S.C.							
39	L.R.							
40	W.C.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		

heterozygot: 

homozygot: 

Tabelle 17: Übersicht MSH3 Exon 1

3.2.3 Aufgetretene Sequenzveränderungen

3.2.3.1 Sequenzveränderungen vor dem ATG in der 5'-UTR-Region

- > c.-152delC 6 x heterozygot
- > c.-144C>T 7 x heterozygot
- > c.-126C>T 1 x heterozygot
- > c.-121C>T 1 x heterozygot
- > c.-118C>T 1 x heterozygot
- > c.-116delC 13 x heterozygot, 1 x homozygot
- > c.-50C>T 14 x heterozygot
- > c.-39C>T 8 x heterozygot
- > c.-35A>G 22 x heterozygot, 1 x homozygot

Auffällig ist hier die hohe Anzahl an Deletionen der Base Cystin bzw. Sequenzveränderungen von Cytosin z.B. nach Thymin. Die Ursache dafür ist die hohe GC-Haltigkeit der Region vor dem ATG und der Anhäufung von Cytosin-*repeats* (z.B. C₈), so dass es leicht zum Polymerasen-*Slippage* (Polymerasenfehler) als Artefakt beim Sequenzieren kommen kann.

3.2.3.2 Sequenzveränderungen im Exon 1

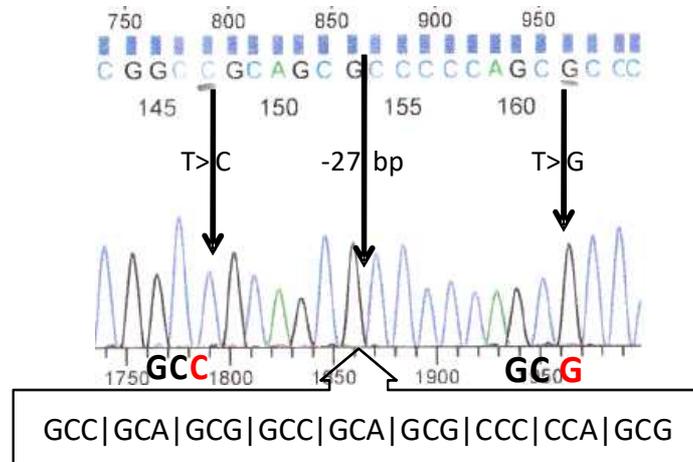


Abbildung 25: drei Sequenzveränderungen im Exon 1: c.162T>C p.(Ala54Ala), c.169_195del p.(Ala57_Ala65del), c.204T>G p.(Ala68Ala)

Erstens c.162T>C p.(Ala54Ala), stumme Sequenzveränderung (Häufigkeit: 17 von 33, 51,5%; 4 x homozygot, 13 x heterozygot) (s. Abb. 25).

Zweitens c.169_195del p.(Ala57_Ala65del) (Häufigkeit: 17 von 33, 51,5%; 5 x homozygot, 12 x heterozygot) (s. Abb. 25).

Drittens c.204T>G p.(Ala68Ala), ebenfalls eine stille Sequenzveränderung (Häufigkeit: 5 von 33, 15,2%; 5 x homozygot) (s. Abb. 25).

Viertens c.231G>T p.(Pro77Pro) (Häufigkeit: 1 von 33, 3%; 1 x heterozygot), wiederum eine stille Sequenzveränderung (s. Abb. 26).

Fünftens c.235A>G p.(Ile79Val) (Häufigkeit: 31 von 33, 93,9%; 25 x homozygot, 6 x heterozygot) (s. Abb. 27).

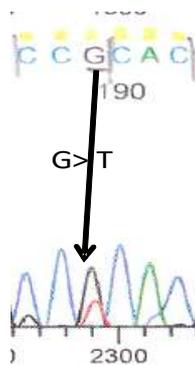


Abbildung 26: Sequenzveränderung
Exon 1: c.231G>T p.(Pro77Pro)

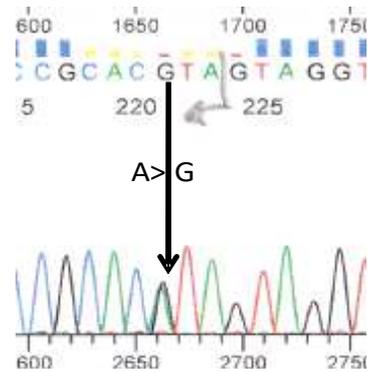


Abbildung 27: Sequenzveränderung
Exon 1: c.235A>G p.(Ile79Val)

Die folgenden beiden Sequenzveränderungen (s. Abb. 28+29+30) traten nur bei einem einzigen Patienten auf (#19 S.U.):

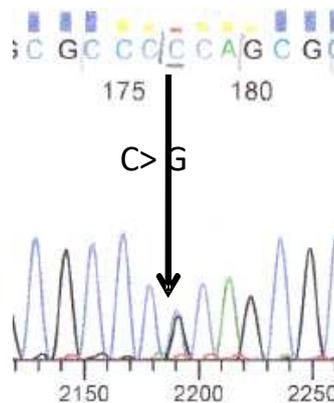


Abbildung 28: c.190C>G p.(Pro64Ala)

Auf die Sequenzveränderung c.190C>G p.(Pro64Ala) wird in der Diskussion genauer eingegangen.

Zudem zeigte sich folgende Insertion von 9 Basenpaaren (s. Abb. 29+30):

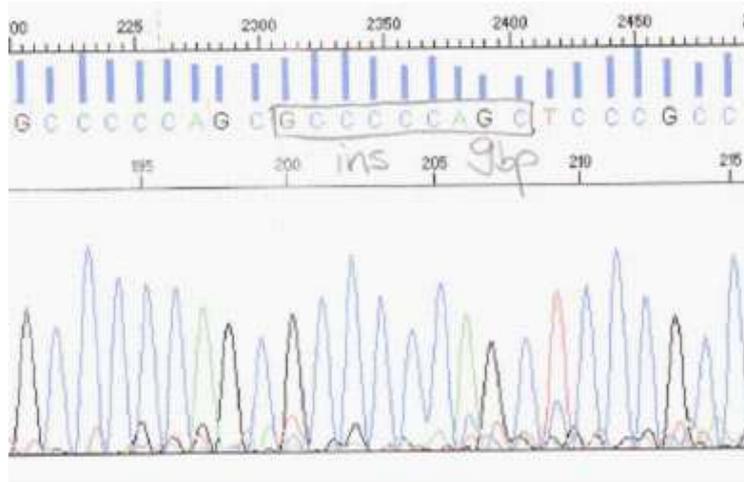


Abbildung 29: c.195_203dup p.(Pro67_Pro69dup)

```

CCA|GCG|CCC|CCA|GCT|CCC|GCC|TTC|CCG|CCC|CAG|CTG|CCG|CCG|CAC|ATA|gta...
CCA|GCG|CCC|CCA|GCG|CCC|CCA|GCT|CCC|GCC|TTC|CCG|CCC|CAG|CTG|CCG|CCG...
    
```

Abbildung 30: Schemabild von c.195_203dup p.(Pro67_Pro69dup)

3.2.3.3 Exon 3

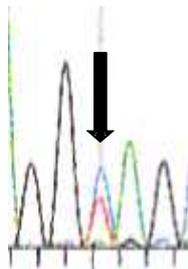


Abbildung 31: Exon 3: c.359-7G>A (hier reverse Sequenz)

Diese Sequenzveränderung c.359-7G>A liegt im intronischen Bereich vor Exon 3. Häufigkeit: 21 von 40, 52,5%; 2 x homozygot, 19 x heterozygot (s. Abb. 31). Die Überlegung, ob hier eine *Branch-Site* betroffen ist, muss aller Wahrscheinlichkeit nach mit „nein“ beantwortet werden, da die Sequenzveränderung erstens zu nahe am Exon liegt und zweitens zu häufig vorkommt.

3.2.3.4 Exon 4

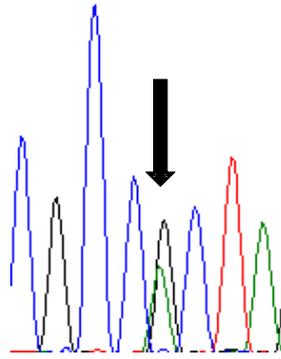


Abbildung 32: Exon 4: c.693G>A p.(Pro231Pro)

In Exon 4 tritt diese stille Sequenzveränderung auf: c.693G>A p.(Pro231Pro). Häufigkeit: 4 von 40, 10%; 4 x heterozygot (s. Abb. 32).

3.2.3.5 Exon 9

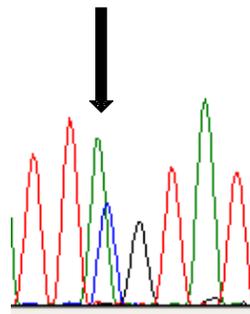


Abbildung 33: Intron 9: c.1453+61A>C

Die Sequenzveränderung c.1453+61A>C im Intron 9 liegt im intronischen Bereich nach Exon 9. Häufigkeit: 28 von 40, 70%; 8 x homozygot, 20 x heterozygot (s. Abb. 33). Aufgrund ihres häufigen Auftretens und der Lage so weit im Intron ist die Sequenzveränderung als Polymorphismus zu werten.

3.2.3.6 Exon 14

Im Exon 14 sind zwei Sequenzveränderungen aufgetreten: Einmal die stille Sequenzveränderung c.1992G>A p.(Gln664Gln). Häufigkeit: 1 von 40, 2,5%; 1 x heterozygot (s. Abb. 34).

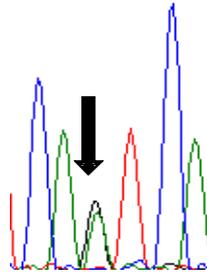


Abbildung 34: Exon 14: c.1992G>A p.(Gln664Gln)

Zum anderen die Sequenzveränderung c.2041C>T p.(Pro681Ser), eine *Missense*-Variante. Häufigkeit: 1 von 40, 2,5%; 1 x heterozygot (s. Abb. 35). Auf diese unklare Veränderung wird in der Diskussion genauer eingegangen.

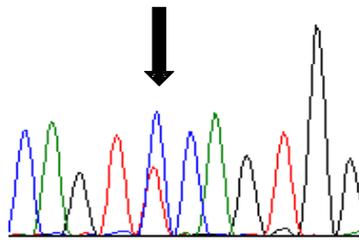


Abbildung 35: Exon 14: c.2041C>T p.(Pro681Ser)

3.2.3.7 Exon 16

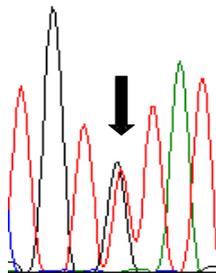


Abbildung 36: Exon 16: c.2254-19T>G

Die Sequenzveränderung c.2254-19T>G ist eine intronische Sequenzveränderung vor Exon 16. Häufigkeit 1 von 40, 2,5%; 1 x heterozygot (s. Abb. 36). Da sie so weit im Intron liegt, gehört sie am ehesten zu den Polymorphismen.

3.2.3.8 Exon 21

Die Sequenzveränderung c.2846A>G p.(Gln949Arg) im Exon 21 ist eine *Missense*-Sequenzveränderung. Häufigkeit: 11 von 40, 27,5%; 11 x heterozygot (s. Abb. 37). Aufgrund ihrer Häufigkeit ist sie als SNP einzuordnen.

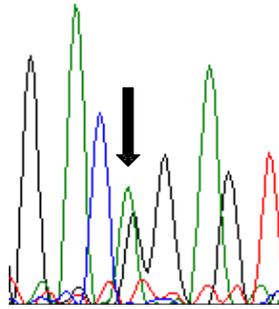


Abbildung 37: Exon 21: c.2846A>G p.(Gln949Arg)

3.2.3.9 Exon 22

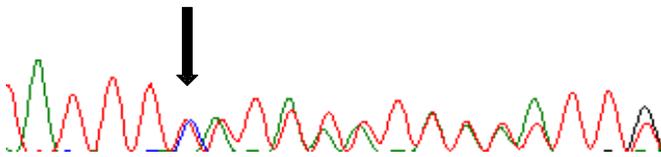


Abbildung 38: Intron 21 vor Exon 22:
c.3001-32delAATG hier in der reverse-Sequenz

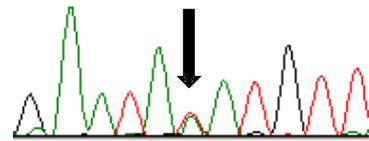


Abbildung 39: Exon 22: c.3001-22T>A
hier in der reverse-Sequenz

Die beiden Sequenzveränderungen liegen jeweils im Intron vor Exon 22. An der Stelle c.3001-32 findet eine Deletion der vier Basen AATG statt. Häufigkeit: 21 von 40, 52,5%; 21 x heterozygot (s. Abb. 38). Bei c.3001-22 erfolgt eine Umwandlung von T>A. Häufigkeit: 7 von 40, 17,5%; 7 x heterozygot (s. Abb. 39). Beide Sequenzveränderungen liegen im weitesten Sinne noch innerhalb der *Branch-Site* (20-50 Basen stromaufwärts), sind jedoch >20 bp vom Exon entfernt und treten in sehr großer Anzahl auf. Aus diesem Grund wurden sie als nicht maligne eingeschätzt.

3.2.3.10 Exon 23

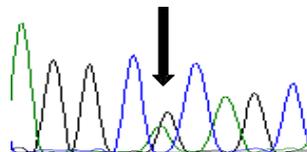


Abbildung 40: Exon 23: c.3133G>A p.(Ala1045Tyr)

Die Sequenzveränderung im Exon 23 liegt bei c.3133G>A p.(Ala1045Tyr). Häufigkeit: 36 von 40, 90%; 22 x homozygot, 14 x heterozygot (s. Abb. 40). Aufgrund ihrer Häufigkeit kann sie als SNP gewertet werden.

3.2.3.11 Exon 24

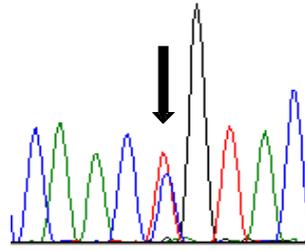


Abbildung 41: Exon 24: c.*50T>C

Die letzte gefundene Sequenzveränderung tritt nach dem Stopp-Codon des Exon 24 und vor der Poly-A-Sequenz auf: c.*50T>C. Häufigkeit: 1 von 40, 2,5%; 1 x heterozygot (s. Abb. 41). Da sie 50 Basen nach Exonende liegt, hat sie aller Wahrscheinlichkeit nach keine Auswirkung auf das Gen-Transkript oder Protein.

3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dem oben beschriebenen Kollektiv 18 verschiedene *MSH3*-Sequenzveränderungen aufgetreten sind, davon keine trunkierende Sequenzvarianten. Drei davon sind Varianten unklarer Pathogenität (Exon 1: c.190C>G p.(Pro64Ala) und c.195_203dup p.(Pro67_Pro69dup), beide bei Patient #19 S.U. aufgetreten; sowie in Exon 14: c.2041C>T p.(Pro681Ser) bei Patient #31 B.K.), die jeweils nur einmal vorgekommen sind und zu einem Aminosäure-Austausch führen. Auf diese Varianten und Patienten wird in der Diskussion näher eingegangen. Es wurden acht *Missense*-Sequenzveränderungen gefunden, von denen fünf so häufig auftreten, dass sie als Polymorphismen zu werten sind, zudem eine Deletion und eine Insertion. Fünf Sequenzvarianten liegen im intronischen Bereich und eine nach dem Stopp-Codon. Außerdem wurden vier stille Sequenzveränderungen beobachtet.

4 Diskussion

4.1 MS-MLPA

4.1.1 Genomische DNA und *Pathway*-Zuordnung

In der Diskussion der MS-MLPA werden die auffälligen Ergebnisse der vier Gruppen genauer erörtert. Da die MLPA an sich schon länger bekannt ist, liegt die Besonderheit im neuen methylierungs-spezifischen MLPA-Kit. Daher wird im folgenden vor allem darauf eingegangen.

In diesem Zusammenhang ist es hinsichtlich der *Pathway*-Zuordnung interessant, dass sich bei einem eindeutig auffälligen Promotor-Methylierungsmuster von z.B. *MLH1* der CIMP- und MSI-*Pathway* überschneiden, bzw. der eine im anderen resultiert.

4.1.1.1 Gruppe 1: MSI-H + IHC-MLH1/PMS2-Ausfall oder *MLH1*-Keimbahnmethylierer (s. Tab. 9)

In Gruppe 1 sind vier Patienten auffällig (#1 M.H., #2 S.W., #3 R.G. und #21 K.Ma.) und zeigen eine Keimbahnmethylierung als einen seltenen Pathomechanismus in Patienten mit Lynch-Syndrom (LS).

4.1.1.1.1 Patienten #1 M.H., #2 S.W. und #3 R.G.

Die ersten drei Patienten (#1 M.H., #2 S.W., #3 R.G.) zeigen einen immunhistochemischen Ausfall von MLH1 im Tumor, während in der genomischen DNA keine Sequenzveränderung in *MLH1* zu finden war. Nun konnte nachgewiesen werden, dass in der genomischen DNA aus Blut eine *MLH1*-Promotor-Methylierung in allen Sonden zu ca. 50% vorliegt. Dies bedeutet, dass ein Allel (beide Allele wären 100%) von *MLH1* epigenetisch ausgeschaltet ist. Dadurch ist die Pathogenese des immunhistochemischen Ausfalls geklärt. Die Patienten erhalten für die Risikoeinschätzung den gleichen Status wie *MLH1*-Keimbahn-Sequenzveränderungs-Träger (=Patienten mit Lynch-Syndrom). Da eine Promotor-Methylierung erblich sein kann, wenn sie durch eine Sequenz-Veränderung bedingt ist, kann den Angehörigen der Patienten eine prädiktive Diagnostik angeboten werden (Morak, Schackert et al. 2008).

Klinisch zeigt der Patient #1 M.H. ein Magen-Karzinom im Alter von 38 Jahren und ein Rektum-Karzinom im Alter von 51 Jahren. Patient #2 S.W. hatte im Alter von 33 Jahren ein Karzinom im Kolon ascendens sowie später ein Doppel-Karzinom im Sigma und Rektum.

Von Patient #3 R.G. ist bekannt, dass im Alter von 46 Jahren ein synchrones Karzinom im Kolon ascendens und Kolon transversum diagnostiziert wurde.

Die ausgeprägten und v.a. frühen Manifestationen zeigen, dass hier die *MLH1*-Promotor-Methylierung eine wesentliche Rolle bei der Tumorentstehung spielt und funktionell einer pathogenen Keimbahn-Variante gleichzusetzen ist.

4.1.1.1.2 Patientin #21 K.Ma.

Diese ist eine prädiktive Patientin, d.h. nicht sie selbst, sondern ein Mitglied in ihrer Verwandtschaft ist erkrankt. Der Familienstammbaum ist in Abbildung 42 ersichtlich. Der Vater entwickelte bereits im Alter von 39 Jahren ein Karzinom im Kolon transversum. Die Großmutter hatte ein Kolon-Karzinom oder malignes Adenom im Alter von 65 Jahren (s. Abb. 42). Als Ursache konnte eine Veränderung im *MLH1*-Gen festgestellt werden. Die Patientin #21.K.Ma. stellt eine Besonderheit dar, da sie nicht nur eine hochgradige Promotor-Methylierung, sondern auch eine Duplikation aller *MLH1*-Sonden aufweist. Dieses Resultat ist einzigartig im gesamten Kollektiv. Welches Ereignis (Promotor-Methylierung oder Duplikation) zuerst aufgetreten ist, ist unklar. Möglicherweise ereignete sich die Duplikation und daraus resultierte die Promotor-Methylierung, um die Gendosis der Duplikation auf die Zelle zu regulieren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte nicht geklärt werden, ob beide Ereignisse auf dem gleichen Allel liegen. Im Stammbaum ist ersichtlich, dass die Auffälligkeit segregiert und weitere Familienmitglieder duplikations- und methylierungspositiv sind (dup+ meth+). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass beide Ereignisse auf dem gleichen Allel liegen.

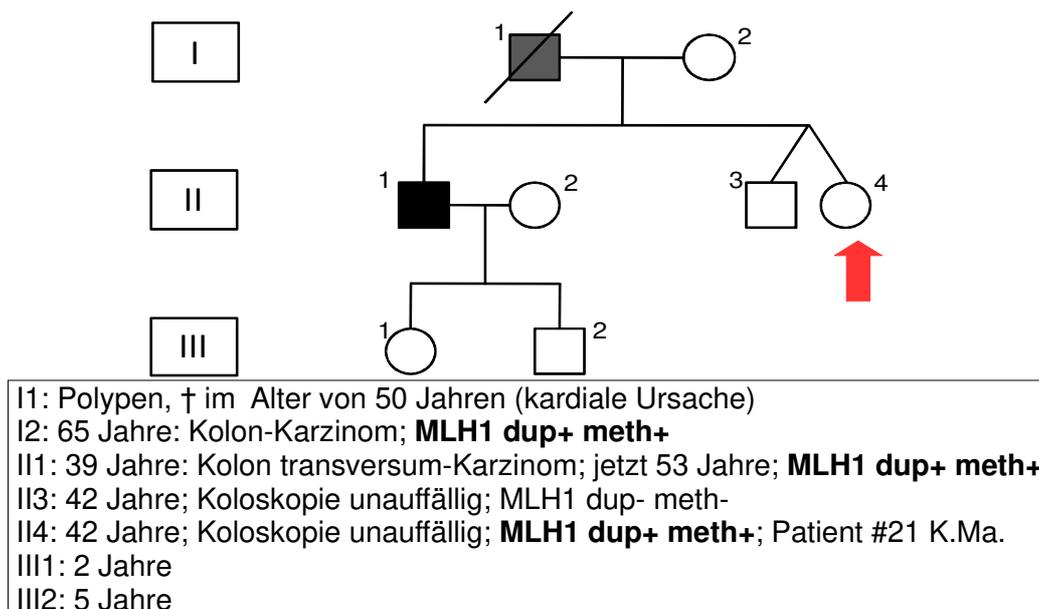


Abbildung 42: Stammbaum der Familie von Patient #21 K. Ma.

Hiermit zeigt sich, dass es möglich ist, dass eine Keimbahn-Promotor-Methylierung als Resultat einer Duplikation innerhalb einer Familie weitergegeben werden kann (Morak, Schackert et al. 2008).

4.1.1.2 Gruppe 2: MSS + IHC-MLH1-Ausfall (s. Tab. 10)

In dieser Gruppe der untersuchten gDNA besteht das Kollektiv aus Patienten mit mikrosatellitenstabilen Tumoren und immunhistochemischem MLH1-Ausfall ohne Sequenzveränderung in *MLH1*. Die Kombination aus Mikrosatelliten-Stabilität im Tumor und MLH1-Ausfall ist ungewöhnlich. Eigentlich müsste bei MLH1-Ausfall ein MSI-H-Status vorliegen. Eine mögliche Ursache hierfür kann sein, dass die MSI-Testung fehlerhaft oder zu unspezifisch ist oder das Ergebnis der IHC falsch-negativ war.

Die Patienten weisen im großen und ganzen ein unauffälliges CNV- und Promotor-Methylierungsmuster auf. Lediglich bei einem Patienten (#27 T.S. - 14 Jahre, Endometrium-Karzinom) liegen unspezifisch erhöhte Promotor-Methylierungsraten und CNV-Veränderungen in mehreren Genen vor. Dieses Muster ist schwer zuzuordnen und am ehesten durch eine mangelhafte Qualität des DNA-Materials zu erklären. Auch eine generell erhöhte Promotor-Methylierung in der Familie von T.S. ist möglich, konnte jedoch nicht überprüft werden (kein Material vorhanden).

Zwei weitere Auffälligkeiten gibt es in Gruppe 2 (#24 S.A., #25 F.K.). Diese beiden Patienten (#24 S.A. - mehrere Adenome im Alter von 44 Jahren, später ein Polyp an der rechten Flexur und #25 F.K. - im Alter von 55 Jahren ein Karzinom im Colon transversum sowie Metastasen) war je eine *BRAF*-Sequenzveränderung (c.1799T>A p.(Val600Glu)) im Tumor vorbeschrieben, was – auch in Hinblick auf den MSS-Status – auf einen sporadischen Tumor hinweist. Ob hier eine serratierte Pathohistologie vorliegt, ist nicht bekannt. Die Unterschiede in der klinischen Ausprägung (einige Adenome vs. Karzinom des Kolon transversum mit Metastasen) lassen keine eindeutigen Schlüsse zu. Eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten *Pathway* kann aufgrund der bisherigen Ergebnisse nicht erfolgen, ebensowenig wie eine Ursache für den immunhistochemischen MLH1-Ausfall gefunden werden konnte.

4.1.1.3 Gruppe 3: MSI-H + IHC-MSH2/MSH6-Ausfall (s. Tab. 11)

Gruppe 3 umfasst Patienten mit hoher Mikrosatelliteninstabilität im Tumor und immunhistochemischem MSH2- und/oder MSH6-Ausfall ohne Mutation in den jeweiligen

Genen. Bei den Personen #33 G.K. (keine Klinik bekannt, familiäre Tumorerkrankung mit Verdacht auf Lynch-Syndrom), #34 P.B. (dreifaches Kolon-Karzinom im Alter von 52 Jahren, Zökum, Sigma, linke Flexur), #38 B.I. (Sigma-Karzinom im Alter von 55 Jahren) und #42 H.H. (Rektumsigmoid-Karzinom im Alter von 64 Jahren) sind generell Schwankungen in *Copy Number Variation* und Promotor-Methylierung sichtbar. Um den Ausfall von MSH2 und MSH6 im Tumor zu erklären, müssten Deletionen oder Promotor-Methylierungen konsistent an mehreren Promotorstellen auftreten, um zu einer Stilllegung des Gens zu führen, was nicht der Fall ist. Somit kann die MS-MLPA hier nicht den MSH2/MSH6-Ausfall im Tumor erklären. Im Vergleich mit den anderen Gruppen zeigt sich, dass die Patienten etwas später erkranken, dafür aber teilweise gravierender. Eine weitere Person (#41 V.S. - Karzinom im Kolon ascendens im Alter von 16 Jahren) zeigte im Vorscreening eine interessante Befundkonstellation (MSH2+MSH6-Ausfall, *BRAF*-Sequenzveränderung). Die MS-MLPA war aber weitgehend unauffällig (nur leichte *MSH2*-CNV – Veränderung in einer Sonde), so dass hier nicht die Ursache liegen kann.

4.1.1.4 Keimbahn-Methylierung im Promotorbereich von *MSH2*

Insgesamt war auffällig, dass das *MSH2*-Gen im vorliegenden Kollektiv keinerlei Promotor-Methylierung in der Keimbahn aufwies. Vermutlich folgt dies aus der Kombination, dass die Sonden hier sehr spezifisch lokalisiert sind und dass *MSH2* - wie auch in der Literatur beschrieben (Chan, Yuen et al. 2006) - nur sehr selten derartige epigenetische Veränderungen erfährt. So ist in der Literatur bisher eine einzige Familie bekannt, bei der eine Keimbahn-Promotor-Methylierung im Mosaik in *MSH2* vorliegt und auch an die Nachkommenschaft weitergegeben wird (Chan, Yuen et al. 2006). In der Publikation wird beschrieben, dass in drei aufeinanderfolgenden Generationen eine allelspezifische Hypermethylierung des *MSH2*-Promotors im Mosaik bei MSI und immunohistochemischem MSH2-Ausfall vorliegt, ohne dass eine Sequenzveränderung in einem MMR-Gen nachgewiesen werden konnte. Die betroffenen Patienten entwickelten in frühem Alter CRC oder Endometriumkarzinome. Als Hintergrund des Entstehungsmechanismus wurde vermutet, dass die Mosaik-Keimbahn-Promotor-Methylierung von *MSH2* als „*first hit*“ wirkt und wird als vererbliche Prädisposition für CRC-assoziierte Erkrankungen angesehen.

4.1.1.5 Qualität, Methylierungsabhängigkeit und Vergleichbarkeit der Kontrollen

Die Kontrollen sind in den Tabellen 12 und 13 zu finden. Die Qualität und Aussagekraft der Sonden ist hauptsächlich davon abhängig, an welcher Stelle im Promotorbereich sie angesiedelt sind. Zum Beispiel gibt es Sonden, die generell einen hohen Promotor-Methylierungs- und auch CNV-Status aufweisen. Hier könnte z.B. ein SNP unter der Sonde liegen oder eine unspezifische Methylierung dieser Sequenz vorliegen. Diese unspezifischen Sonden werden als nicht-aussagekräftig angesehen und dürfen somit bei der Beurteilung eines Gens nicht im selben Maße berücksichtigt werden wie die spezifischen Sonden. Das erschwert die Auswertung und es empfiehlt sich, eben jene Sonden aus dem Kit zu entfernen oder ihre Lokalisation ggf. leicht zu verschieben, um bessere Resultate zu erzielen.

In dieser Arbeit wurde der *Cut-off* der Un-/Spezifität bei 30% angesetzt: wurden bei mehr als 30% der Kontrollpatienten Auffälligkeiten in einer Sonde bemerkt, so wurde diese als unspezifisch bewertet.

Darunter fallen im Kit MRC Holland ME011 für die CNV die Sonden *MLH1-1685*, *MSH6-6228*, *MSH6-6229*, *MSH2-6142*, *MSH2-6141*, *PMS2-7934*, *MGMT-7188*, *MGMT-2239*, *MSH3-7938*, *MSH3-7939*, *MLH3-7941*. Bezüglich der Promotor-Methylierung sind es die Sonden *MSH6-6229*, *MGMT-7188*, *MGMT-2239*, *MSH3-7940*, *MSH3-7938*.

Als besonders spezifisch im Kit MRC Holland ME011 können folgende Sonden bezeichnet werden: Für die CNV *MLH1-7187*, *MLH1-6221*, *MLH1-2258*, *MSH2-0911*, *MGMT-5670*, *MSH3-7940*, *MLH3-1245*. Für die Promotor-Methylierung *MLH1-1685*, *MLH1-6221*, *MLH1-2258*, *MSH6-6228*, *MSH6-5230*, alle *MSH2*-Sonden, *PMS2-7935*, *PMS2-4661*, *MGMT-5670*, *MSH3-7939*, *MLH3-1245*, *MLH3-7941*.

Berücksichtigt man nun die unspezifischen Marker aus der Analyse der Kontrollpatienten bei der Auswertung der Patienten und nimmt diese aus der Auswertung heraus, so werden die Ergebnisse etwas aussagekräftiger. Das „Hintergrundrauschen“, bestehend aus vielen nur wenig erhöhten oder erniedrigten Werten für bestimmte Marker, fällt weg. Trotzdem bleibt die Auswertung schwierig, wenn mehrere Marker gleichzeitig betroffen sind und andere im selben Gen nicht.

Weiter gibt es für die verschiedenen Gene eine unterschiedliche Anzahl an Sonden, weshalb die Wertungen eines jeden Gens unterschiedlich ist. Fallen z.B. zwei auffällige spezifische Marker von insgesamt sechs Markern in *MLH1* mehr ins Gewicht als ein auffälliger spezifischer Marker von insgesamt vier in *MSH2*? Eine Angleichung der Anzahl

der Sonden für jedes Gen könnte zu einer besseren Vergleichbarkeit der genspezifischen Ergebnisse führen. Dies gilt für die CNV- wie für die Methylierungsanalyse gleichermaßen. Diese Erkenntnisse können sowohl auf die Ergebnisse des CNV wie auch auf die der Promotor-Methylierungen übertragen werden.

Zudem wurde mit den Kontrollen auch die Altersabhängigkeit der Promotor-Methylierung im Blut getestet. Die hier im Kit verwendeten Sonden scheinen allerdings bis auf zwei Ausnahmen altersunabhängig zu sein, was die Analyse vereinfacht. Die Ausnahmen sind die Sonden *MSH6-6229* (steigend mit dem Alter, in CNV und Promotor-Methylierung erkennbar) und *PMS2-7934* (in unserem Kollektiv ausschließlich bei den 40-Jährigen Kontrollen in der Promotor-Methylierung auffällig, nicht bei den 20- und 60-Jährigen Kontrollen).

Grundsätzlich fiel bei der Auswertung auf, dass wenige Ergebnisse eindeutig auffällig bzw. unauffällig waren. In vielen Fällen ergaben sich zum Beispiel unspezifische Promotor-Methylierungen und besonders CNV's in mehreren Sonden verschiedener Gene. Diese wiesen weder auf eine stringente Richtung hin noch ergaben sich konkrete Hinweise auf eine pathogenetische Entstehungsweise, so dass man in den meisten Fällen davon ausging, dass die DNA der jeweiligen Zelle bereits multiplen Veränderungen unterlegen war (v.a. bei Tumor-DNA) und eine generelle chromosomale Instabilität vorliegt. Außerdem fiel auf, dass die DNA eine sehr gute Qualität aufweisen muss, um ein aussagekräftiges (und damit nutzbares) Ergebnis zu erhalten.

Im weiteren Vorgehen wäre es sinnvoll, zunächst die CNV- und Promotor-Methylierungsanalyse für die Patienten an Hand von Blut-DNA durchzuführen. Bei der Auswertung sollten die unspezifischen Sonden nicht berücksichtigt werden, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen. So können die wenigen Keimbahnmethylierer erkannt werden. Bei den restlichen Patienten mit unspezifischem Ergebnis muss nach anderen Ursachen für den immunhistochemischen Ausfall eines Gens gesucht werden, z.B. einen biallelischen Keimbahndefekt in *MUTYH*, der zu somatischen Mutationen in den MMR-Genen führt (Morak et al., 2017).

4.1.2 Tumor – DNA (siehe Tabelle 14 und Tabelle 15)

4.1.2.1 *Pathway*-Zuordnung

Bei der Untersuchung der Tumor-DNA mittels MS-MLPA kann das Ergebnis die Einordnung in einen konkreten *Pathway* ermöglichen. Am eindeutigsten ist dabei die

Zuordnung zum CIMP-*Pathway* bei deutlichen Methylierungsauffälligkeiten der Gene *MLH1* und/oder *MGMT* in der Tumor-DNA. Auch möglich ist - je nach Konstellation der weiteren DNA-Auffälligkeiten - die Zuordnung zum CIN-*Pathway* bei z.B. deutlichen Auffälligkeiten in der CNV (Deletionen im Sinne von LOH's).

4.1.2.2 Einteilung CIMP-*Pathway*

In der Einleitung ist erklärt, wie es zum CIMP-*Pathway* kommt: Durch Promotor-Methylierung eines Reparatur-Gens kommt es zu dessen Stilllegung und zu einem erhöhten Auftreten von Sequenzveränderungen, was zur Tumor-Entstehung führen kann. Beim vorliegenden Kollektiv finden sich sechs Patienten (#15 B.M., #17 Z.K., #5 S.L., #14 H.K., #48 S.E. und #49 L.M.), auf die dieser Weg der Tumorentstehung zutreffen könnte. Alle weisen in mehreren Genen (meist *MLH1*, *MSH6*, *MGMT*, aber auch *PMS2*) verschiedenste, aber durchaus hohe Grade von Promotor-Methylierung (8-71%) im Tumor auf. Beim Großteil davon ist auch die CNV nicht gänzlich unauffällig. Bei zwei Patienten war keine gDNA mehr verfügbar (#48 S.E. - Karzinom der rechten Kolon-Flexur im Alter von 77 Jahren, *MLH1*-&*PMS2*-Ausfall im Tumor und #49 L.M. - Endometrium-Polyp im Alter von 39 Jahren sowie Karzinom des Kolon ascendens mit tubulo-villösen Kolon-Adenomen im Alter von 56 Jahren, *MLH1*-&*PMS2*-Ausfall im Tumor). Bei drei weiteren (#15 B.M. - Ileozökal-Karzinom im Alter von 35 Jahren, #17 Z.K. - Duodenal-Karzinom im Alter von 57 Jahren und #14 H.K. - Kolonkarzinom, Dünndarm-Karzinom und Siegelringzell-Magen-Karzinom im Alter von 38 Jahren) war die gDNA unauffällig. Ein Patient (#5 S.L. - Zökum-Karzinom im Alter von 49 Jahren) wies im Tumor zusätzlich eine *KRAS*-Sequenzveränderung (c.38G>A p.(Gly13Asp)) auf. Laut der Einteilung von Jass und Weisenberger (Jass 2007; Weisenberger, Siegmund et al. 2006) ist die Kombination aus CIMP+ und *KRAS*-Sequenzveränderung selten anzutreffen.

4.1.2.3 Einordnung der restlichen Patienten

Die übrigen acht Personen (#12R.H., #8S.E., #13S.S., #11B.G., #41V.S., #7T.E., #50F.G., #6G.B.) sind bezüglich ihrer Tumor – MS-MLPA – Resultate eher unauffällig. Zwar weisen sie geringfügige Veränderungen in CNV und Methylierung auf, diese sind aber nicht richtungsweisend.

Zwei Patienten sind hier gesondert anzusprechen: Zum ersten die Patientin #41 V.S, deren Tumor einen immunhistochemischen Ausfall von *MSH2* und *MSH6* sowie eine

BRAF-Sequenzveränderung zeigte. Die gDNA der Patientin war, genauso wie die Tu-DNA, in der MS-MLPA weitgehend unauffällig, so dass hier ein anderer Mechanismus vermutet werden muss. Nachträglich zeigte sich hier eine pathogene Keimbahn-Sequenzveränderung in *MSH2*, durch die die Diagnose eines Lynch-Syndroms gesichert wurde.

Bei der Patientin #6 G.B. (Kolon-Karzinom im Alter von 48 Jahren, zudem hyperplastischer Polyp mit Sägezahnarchitektur und zwei tubuläre Adenome) weist der Tumor eine *KRAS*-Sequenzveränderung (c.35G>A (p.Gly12Asp)) auf, jedoch keine Veränderungen in der Tumor – MS-MLPA bezüglich CIMP. Dies ist im Gegensatz zu Patient #5 S.L. kompatibel mit dem Schema von Jass und Weisenberger (Jass 2007; Weisenberger, Siegmund et al. 2006). Eine genaue Zuordnung zu entweder einem sporadisch auftretenden CRC oder dem Lynch-Syndrom ist damit jedoch ebenfalls nicht möglich.

Die Patienten #12R.H., #8S.E. und #13S.S. haben einen MSI-H-Status und immunhistochemisch einen *MLH1*/*PMS2*-Ausfall. Der Patient #11B.G. hat einen MSI-H-Status mit IHC-Ausfall in *MLH1*, aber eine *MLH1*-Sequenzveränderung. Der Patient #7T.E. zeigt einen MSI-H-Status mit IHC-*MLH1*-Ausfall ohne Keimbahnmutation in *MLH1* und unauffälliger CNV und Methylierung im Tumor. Patient #50F.G. hat einen MSI-Status und eine monoallelische *MUTYH*-Sequenzveränderung (letzteres ist Bestandteil des Base Excision Repair - Mechanismus).

4.1.2.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Ergebnisse der MS-MLPA mit Tumor-DNA sehr inhomogen sind und großen Schwankungen unterliegen. Eine konkrete Korrelation zwischen Tumor-DNA und gDNA, wie z.B. einheitliche Promotor-Methylierungsmuster sind nicht zu erkennen. Liegt ein immunhistochemischer Ausfall von *MLH1* im Tumor vor, so haben sich zwar in der MS-MLPA-Untersuchung Promotor-Methylierungsauffälligkeiten im Tumor-Material in *MLH1* gezeigt, jedoch in unterschiedlich hoher Ausprägung und zudem noch in mehreren weiteren Genen, meist *MSH6* und *MGMT*. Somit kann nur schwer von Veränderungen im Tumor auf deren Ursachen geschlossen werden. Ebenso schwer fällt es, von Veränderungen im Tumor auf Veränderungen in der gDNA zu schließen.

Im Tumor-Material treten viel häufiger zahlreiche CNV und Promotor-Methylierungen als Zeichen fortgeschrittener Veränderungen auf. Bei Patienten aus der Gruppe 1 „MSI-H und *MLH1*-IHC-Ausfall ohne Keimbahn-Sequenzveränderung“ sind mehr Veränderungen in der Tumor-DNA zu beobachten als bei Patienten aus anderen Gruppen.

4.1.3 Bedeutung des *MGMT*-Gens

Interessant im Zusammenhang mit der Promotor-Methylierungsdetektion bei der MS-MLPA ist vor allem das Gen *MGMT* (O6-methylguanine DNA Methyltransferase). Es gehört nicht zu den für das Lynch/HNPCC-Syndrom typischen Kandidaten-Genen wie *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2*, ist jedoch auch ein Reparatur-Gen. Es besitzt die Fähigkeit, Alkylgruppen von der O6-Position des Guanins zu entfernen, um so die DNA vor mutagenen Einflüssen zu schützen (Minoo 2013). Bei fehlerhafter Funktion des *MGMT* bleiben die O6-Alkyl-Anhänge bestehen und führen zu einer Fehlpaarung mit Thymin während der Replikation, weshalb es zu G:C → A:T - Transitionen kommt (Gerson 2004). Außerdem schützt *MGMT* den Körper vor exogenen Kanzerogenen, z.B. N-Nitroso-Verbindungen, die durch DNA-Promotor-Methylierung CRC's auslösen können (Fahrer and Kaina 2013). Die Expression von *MGMT* selbst ist ebenfalls methylierungsabhängig (Gerson 2004). Aufgrund dessen gehört dieser Komplex am ehesten zum CIMP-*Pathway*. Ein durch CpG-Methylierung im Promotor-Bereich herbeigeführter „*Loss of Heterozygosity*“ von *MGMT* konnte in 40% der CRC's nachgewiesen werden (Esteller, Hamilton et al. 1999). Zudem wurde eine Verbindung zu G>A - Sequenzveränderungen im *KRAS*-Gen dokumentiert (Esteller, Garcia-Foncillas et al. 2000).

Dies kann an dem Patientengut dieser Doktorarbeit aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht nachvollzogen werden. Ein Patient mit *KRAS*-Sequenzveränderung weist in der MS-MLPA eine *MGMT*-Methylierung bis ~30% auf (#3 S.L.), bei dem anderen Patienten mit *KRAS*-Sequenzveränderung (# 14 G.B.) war das Methylierungs-Screening unauffällig. Da *MGMT*-Verlust sowohl in frühen Entartungsstadien verschiedenster Tumorerkrankungen wie auch in gesunden Probanden zu finden war (Minoo 2013), wird der *MGMT*-Promotor-Methylierung am ehesten ein früher Effektorstatus als prädisponierender Faktor bei der Entstehung sporadischer Tumoren zugeschrieben (Shen, Kondo et al. 2005). So kann auch bei den 30 Kontrollpatienten in dieser Arbeit kein stringentes Muster bezüglich *MGMT*-Promotor-Methylierung in der Keimbahn über die Altersgruppen hinweg erkannt werden. In Hinblick auf sporadisch-auftretende Tumoren ist ein Zusammenhang zwischen *BRAF*-Sequenzveränderungen und der *MGMT*-Promotor-Methylierung interessant: Bei dem einzigen Patienten mit *BRAF*-Sequenzveränderung in dem Kollektiv dieser Doktorarbeit (# 11 V.S.) war keine *MGMT*-Promotor-Methylierung nachweisbar. Nachträglich stellte sich heraus, dass bei # 11 V.S. eine *MSH2*-Keimbahn-Sequenzveränderung vorlag. Das zusätzliche Vorliegen der *BRAF*-Variante im Tumor stellt

hier eine sehr ungewöhnliche Konstellation dar.

4.1.4 Qualität der Ergebnisse

Ein nicht zu unterschätzender Faktor für die Verwertbarkeit der MS-MLPA - Ergebnisse ist die Qualität der vorliegenden DNA. Bei der Etablierung der Methode in unserem Labor und Durchführung der Tests fiel auf, dass die Ergebnisse umso genauer, reproduzierbarer und aussagekräftiger sind, je besser die Qualität der verwendeten DNA ist. Zwar wurde zu diesem Zweck bereits aufgereinigte DNA in bestimmten Konzentrationen wie vom Hersteller empfohlen verwendet (50-100ng), jedoch war bei bereits über längerer Zeit konservierter DNA das Ergebnis stets schlechter im Sinne einer größeren Schwankungsbreite der Werte bei der CNV. Vor allem fiel dies bei der Verwendung von Tumor-DNA auf, die nach Aufbereitung in Formalin und Paraffin und teils ohne Kühlung eine erhebliche Beschädigung aufwies. Aus diesem Grund war eine MS-MLPA-Analyse teilweise nicht möglich oder die Auswertung gestaltete sich als schwierig, da nicht klar war, ob die CNV- und Promotor-Methylierungsauffälligkeiten tatsächlich tumorösen Ursprungs sind oder eine Folge der geringeren Qualität der DNA.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist in diesem Zusammenhang die Ergebniskonstellation, dass viele oder alle Promotor-Methylierungssonden Auffälligkeiten zeigen. Hier ist es möglich, dass das in der Versuchsanordnung zugegebene HhaI-Enzym z.B. in zu geringer Konzentration vorlag, so dass der Verdau nur unvollständig stattfinden konnte, und viele Nebenprodukte zu Störsignalen führen.

Aus diesem Grund ist eine gewisse Erfahrung bei der Auswertung und Bewertung der Ergebnisse unbedingt notwendig.

4.1.5 Das Programm „Coffalyser“ und Auswertung der MS-MLPA

Der *Coffalyser* ist eine Auswertungssoftware, die speziell für die MS-MLPA entwickelt wurde. Sie ist auf der MRC-Holland-*Homepage* nach Registrierung frei erhältlich (<https://www.mlpa.com>).

Ihre Anwendung wurde für die Auswertung der hier vorliegenden Ergebnisse zunächst versucht, jedoch aufgrund verschiedener Faktoren wieder verworfen.

Zum einen können die Ergebnisse nur in speziellen Formaten in die Software eingespeist werden (*.FSA, *.AB1, *.ABI). Nach Einfügen der jeweiligen Dateien läuft stets unaufhaltsam das gesamte Programm ab. Der Benutzer hat keine Möglichkeit, in diesen Prozess einzugreifen, sich von der Richtigkeit der gerade ablaufenden Auswertung zu

überzeugen oder auf Zwischenergebnisse zuzugreifen. Somit muss der Verwender auf die Wahrheit der ausgegebenen Enddaten vertrauen. Unspezifische Sonden können nicht außer Acht gelassen werden. Zudem hat man bei einem fraglichen Endergebnis keine Übersicht, ob und bei welchem Schritt dem Programm ggf. ein Fehler unterlaufen ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Auswertung nicht flexibel ist, d.h. dass die Patientendaten nicht beliebig untereinander verglichen werden können, sondern stets die Auswertung neu gestartet werden muss. Zudem ist das Programm komplex gestaltet und es ist eine intensive Einarbeitung nötig.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auf die manuelle Auswertung per Excel-Tabelle vertraut, bei der genau nachvollzogen werden kann, woher die Daten stammen, wo sie eingegeben, welche Daten miteinander verglichen werden und wie genau die Abstufung der Auffälligkeiten sind. Dies erlaubt eine präzise Auswertung der Ergebnisse, was gerade bei einer so neuen Methode wie der MS-MLPA wichtig ist.

4.2 Das *MSH3* – Gen

4.2.1 Beurteilung der gefundenen Sequenzveränderungen

Im Ergebnis-Kapitel sind alle Sequenzveränderungen beschrieben, die im *MSH3*-Gen im oben genannten Kollektiv gefunden wurden. Das Kollektiv umfasst Patienten mit Verdacht auf Lynch-Syndrom bei MSI-Status und immunhistochemischem Ausfall von MSH2 und MSH6, ohne dass eine Sequenzveränderung in einem der beiden Gene gefunden werden konnte. Insgesamt sind es 27 Varianten, davon 9 vor dem Start-Codon und 18 danach.

- 9 verschiedene Sequenzveränderungen lagen in der 5'-UTR-Region vor dem Start-Codon, davon drei im wichtigen Bereich bis zu -50 bp vor dem ATG. Dieser Bereich ist interessant, da hier bei Veränderungen Transkriptionsdefekte auftreten können: Es könnte zu einer Vermehrung oder Verminderung der Transkriptionsrate oder zu der Schaffung eines neuen 5'-UTR-Startcodons kommen, das das Leseraster verschiebt und die Proteinbildung verändert. Bei den hier gefundenen Sequenzveränderungen wurde kein neues Start-Codon gebildet. Eine genaue Aussage über eine Veränderung der Transkriptionsrate kann mit den vorliegenden Ergebnissen zum aktuellen Zeitpunkt nicht getroffen werden.
- Fünf Sequenzveränderungen liegen im intronischen Bereich, so dass sie aller Wahrscheinlichkeit nach keinen Einfluss auf das Exon haben und auch nicht auf das Spleißen des Transkripts, da sie nicht in einer Spleiß-Region liegen (c.359-

- 7G>A; c.1453+61A>C; c.2259-19T>G; c.3001-32delAATG; c.3001-22T>A).
- > Eine Sequenzveränderung befindet sich im Bereich nach dem Stopp-Codon im 3'-UTR-Bereich, die ebenfalls das Genprodukt nicht beeinträchtigt (c.*50T>C).
 - > Außerdem gab es fünf stille Sequenzveränderungen, bei denen zwar ein Basenaustausch vorliegt, der aber die codierende Aminosäure nicht verändert (c.162T>C p.(Ala54Ala); c.204T>G p.(Ala68Ala); c.231G>T p.(Pro77Pro); c.693G>A p.(Pro231Pro); c.1992G>A p.(Gln664Gln)). Aufgrund ihrer Lage mitten im Exon, weit entfernt von Intron-Exon-Übergängen, ist es unwahrscheinlich, dass *Splice*-Stellen betroffen sind.
 - > Schließlich wurden drei *Missense*-Sequenzveränderungen und eine Deletion gefunden, die in einer solchen Häufigkeit vorliegen, dass sie als Polymorphismen zu werten sind (c.169_195del p.(Ala57_Ala65del) - 51,5%; c.235A>G p.(Ile79Val) - 93,9%; c.2846A>G p.(Gln949Arg) - 32,5%; c.3133G>A p.(Ala1045Tyr) - 75%).
 - > Zur genaueren Betrachtung bleiben am Ende drei Sequenzveränderungen: Zwei Sequenzveränderungen im Exon 1: c.190C>G p.(Pro64Ala) und c.195_203dup (p.Pro67_Pro69dup), beide bei Patient #19 S.U. aufgetreten, sowie eine Sequenzveränderung im Exon 14: c.2041C>T p.(Pro681Ser), bei Patient #31 B.K. aufgefallen. Diese drei Sequenzveränderungen werden im Folgenden unter Einbeziehung der Patientendaten näher betrachtet.
 - > Seit Beginn der Arbeit haben sich einige Neuerungen ergeben. Die für den Phänotyp weniger relevanten Sequenzveränderungen in der 5'-UTR-Region sowie im intronischen Bereich zeigen eine eher geringe Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung, d.h. sie kommen selten vor. Von den gefundenen exonischen Varianten ist bei den meisten eine hohe Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung erkennbar. Bei den Veränderungen zur genaueren Betrachtung (siehe Punkt zuvor) zeigen sich bei der Veränderung im Exon 1 c.190C>G p.(Pro64Ala) eine hohe Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung mit einem Homozygotennachweis und bei der Veränderung im Exon 14: c.2041C>T p.(Pro681Ser) eine hohe Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung ohne Homozygotennachweis. Die Veränderung im Exon 1 c.195_203dup (p.Pro67_Pro69dup) zeigt ebenfalls eine hohe Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung mit 2442 Homozygoten (alle Daten aus Exac-Browser). Je häufiger eine Veränderung in der Allgemeinbevölkerung vorhanden ist und je mehr

homozygote Träger es gibt, desto weniger ist von einem krankheitsverursachenden Effekt der Veränderung im Sinne einer Pathogenität auszugehen.

Zudem wurden in Exon 1, 3 (Intron), 9 (Intron), 21, 22 (Intron) und 23 am häufigsten Sequenzveränderungen beobachtet. Wie in der Literatur beschrieben ist, liegen in diesen Exons die Nucleotid-Bindungs-Domänen und die *helix-hairpin-helix* – DNA-Bindungsstelle (v.a. Exon 20, 21, 22 und 23) (Gorbalenya and Koonin 1990; Haber and Walker 1991; Fleck, Michael et al. 1992; Ross-Macdonald and Roeder 1994; Watanabe, Ikejima et al. 1996). Die Helix-Struktur gehört zum Komplex der Sekundärstrukturelemente. Eine Helix bindet sequenzspezifisch an eine DNA-Furche und geht verschiedene molekulare Wechselwirkungen ein. Die zweite Helix positioniert sich im rechten Winkel und dient als Stabilisator (Shao and Grishin 2000). Bei Sequenzveränderungen könnte dieser empfindliche Mechanismus gestört werden.

4.2.2 Detaillierte Analyse der *MSH3*-Sequenzveränderung bei Patient #19 S.U.

4.2.2.1 Exon 1: c.190C>G p.(Pro64Ala)

Bei dieser Sequenzveränderung tritt an Position 190 an die Stelle des Cytosins ein Guanin. Dies führt zu einem Wechsel der Aminosäure von Prolin zu Alanin. Die Analyse mit der Polyphen-*Software* hinsichtlich der Malignitätsbeurteilung der Sequenzveränderung zeigt mit großer Wahrscheinlichkeit eine gutartige Variante (s. Abb. 43).

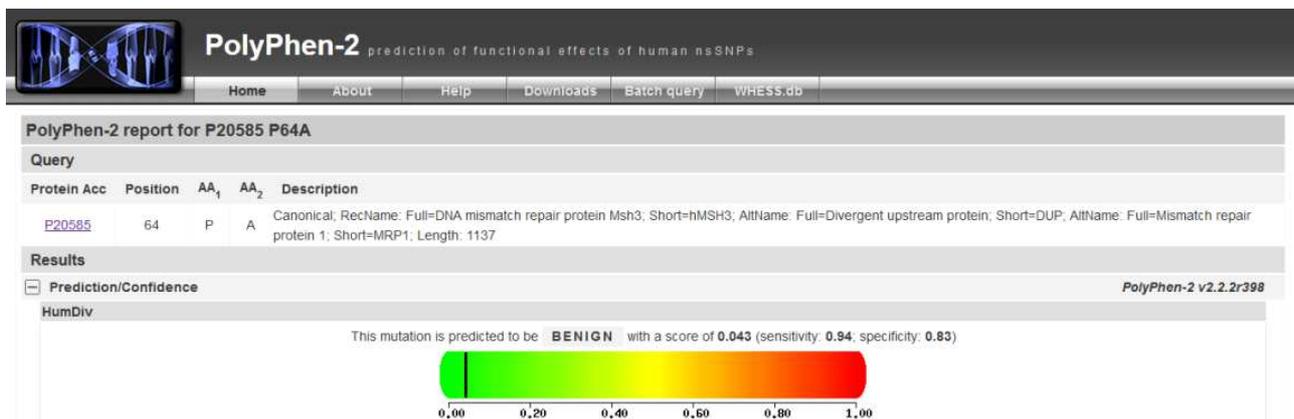


Abbildung 43: Polyphen2-Analyse bezüglich c.190C>G p.(Pro64Ala)

Somit ist die Sequenzveränderung als vermutlich nicht pathogen einzuschätzen. In der *SNP-Database* ist sie zudem bereits aufgeführt. In der Sekundärstruktur ist kein Zusammenhang mit Helix, *Turn* oder *Beta-Strand* detektierbar (<http://www.uniprot.org/uniprot/P20585>), da sie weiter aminoterminal liegt. Sie befindet sich

in regionalem Zusammenhang kurz vor der Interaktionsstelle mit EXO1, hat jedoch als *Missense*-Sequenzveränderung wahrscheinlich keinerlei Auswirkung darauf.

4.2.2.2 Exon 1: c.195_203dup p.(Pro67_Pro69dup)

An dieser Stelle der Sequenz wird ein Abschnitt von neun Basenpaaren (GCCCCAGC) eingeschoben. Diese neun Basen entsprechen genau drei Aminosäuren (AlaProSer), somit ist diese Sequenzveränderung „*in frame*“, d.h. sie führt weder zu einer Leserasterverschiebung der kompletten nachfolgenden Sequenz noch entsteht z.B. ein neues Stopp-Codon. In der Sekundärstruktur ist ebenfalls keine Auswirkung auf Helix, *Turn* oder *Beta-Strand* sichtbar (<http://www.uniprot.org/uniprot/P20585>), da auch diese Sequenzvariante weiter aminoterminal kurz vor der EXO1-Schnittstelle liegt. Durch die Insertion sind Irritationen in der Interaktion möglich.

4.2.2.3 Segregationsanalyse und Diskussion der Patientin #19 S.U.

Bei diesen teils noch nicht beschriebenen und als unklar eingestuften Sequenzveränderungen ist von Interesse, ob sie auch bei anderen erkrankten Familienmitgliedern vorhanden sind, und ob und welche Klinik bei diesen vorliegt. Bei der Patientin #19 S.U. zeigten sich folgende Auffälligkeiten: Immunhistochemischer Ausfall von MSH2 und MSH6 sowie eine Deletion im Exon 4 von *MSH6* (Exon 4 c.3037_3039delAAG p.(Lys1014del)). Dazu kommen nun die Sequenzveränderung c.190C>G p.(Pro64Ala) und die Insertion c.195_203dup p.(Pro67_Pro69dup) im Exon 1 von *MSH3*. Phänotypisch wurde bei der Patientin im Alter von 38 Jahren ein Sigma- und Rektum-Karzinom entdeckt.

Gegebenenfalls führt hier die Kombination aus Veränderungen im *MSH6*- und *MSH3*-Gen in der Keimbahn und nachfolgenden „*second hits*“ im Tumor zum Fehlen aller möglichen Bindungspartner für MSH2, so dass das MMR-System seine Funktion nicht mehr erfüllen kann und es zum immunhistochemisch nachgewiesenen MSH2-Ausfall kommt.

Im Fall der Familie von Patientin #19 S.U. war die Segregationsanalyse nur teilweise möglich: von den Eltern der Patientin erfolgte keinerlei Rückmeldung, vom Bruder war nicht mehr ausreichend DNA verfügbar.

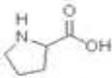
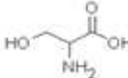
Beim Bruder von #19 S.U. konnte ebenfalls die Deletion im *MSH6*-Gen nachgewiesen werden. Eine Untersuchung auf die o.g. *MSH3*-Sequenzveränderungen wäre ein weiterer wichtiger Schritt, um das Zusammenspiel MSH2-MSH6-MSH3 in diesem Fall genauer zu untersuchen.

4.2.3 Genauere Analyse der *MSH3*-Sequenzveränderung des Patienten #31 B.K.

Die Sequenzveränderung des Patienten #31 B.K. liegt im Exon 14: c.2041C>T p. (Pro681Ser) (Ohmiya, Matsumoto et al. 2001). Dies bedeutet, dass an der Stelle 2041 anstelle des Cytosin ein Thymin erscheint, was zu einer Änderung der Aminosäure Prolin nach Serin führt. In der Sekundärstruktur des Proteins liegt die Sequenzveränderung im Helix-Bereich (<http://www.uniprot.org/uniprot/P20585>). Nach der Klassifizierung gemäß Polyphen (s. Abb. 44a+b) ist die Sequenzveränderung als „benigne“ einzustufen, da sie den Score von 1,5 nicht überschreitet – jedoch ist eine gewisse Grenzwertigkeit nicht auszuschließen (Wert: 1,471). Zudem ist aus der Grafik ersichtlich, dass beide Aminosäuren sich von ihren Strukturen und Eigenschaften (u.a. neutrale Aminosäure) nicht zu stark unterscheiden, was eher für eine gewisse „Benignität“ spricht. Des Weiteren ist im anderen Teil der Abbildung die Konservierung der Aminosäure zu sehen, die nicht stringent durch alle Spezies eingehalten wird. Wäre die Aminosäure in der Evolution durchgängig streng erhalten geblieben, würde dies auf deren Wichtigkeit hinweisen, so dass ihre Sequenzveränderung schwerwiegendere Folgen für die Proteinfunktion erwarten lässt.

Prediction					
This variant is predicted to be benign					
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data	
benign	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 1.471	
Details					
PSIC PROFILE SCORES FOR TWO AMINO ACID VARIANTS					
Score1	Score2	Score1-Score2	Observations	Diagnostics	Multiple alignment around substitution position
+0.828	-0.643	1.471	31	calculated	Sequences: <input type="text" value="all"/> Flanks: <input type="text" value="25"/> <input type="button" value="Show alignment"/>

Angabe: Zwar „benigne“, aber Grenze zur Pathogenität liegt beim Wert 1,5!
 → Benignität nicht eindeutig garantiert!

	Aminosäure	Rest (R)	Molare Masse von R (g/mol)	van-der-Waals-Volumen von R	Polarität von R	Hydrophobizität ^[2] von R	Acidität oder Basizität von R
	Prolin (Pro)	-	-	-	-	-	-
	Serin (Ser)	<u>CH₂CH₂CH₂</u>	42,08	90	unpolar	-1,6	neutral
	<u>Serin</u>	<u>-CH₂OH</u>	31,03	73	polar	-0,8	neutral

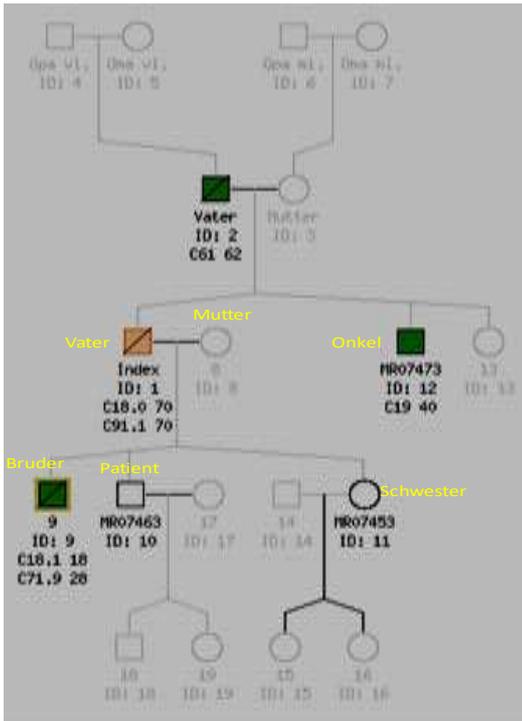
Fragment of multiple alignment around position 681:

0	QUERY:	...IPAVNSHIQSDLLRTVILEIPELLS PVEHYLKIINEQAARKVGDKTELFWDL...
1	ref XP_536307.2 PREDICTED: similar to DNA mismatch repair prote...	...IPAVNSHVQSDLLRTFILEIPELLS PVEHYLRILNEQAARKIGDKTELFWDL...
2	ref INP_034959.2 mutS homolog 3 [Mus musculus]	...MPAVNSHVQSDLLRALIVEAPELLS PVEHYLKVINGPAARKVGDKTELFWDL...
3	ref XP_574830.2 PREDICTED: similar to mutS homolog 3 [Rattus no...	...MPAVNSHVQSDLLRAARVLEVPPELLS PVEPYLKVINEQAARAGDKTELFWDL...
4	ref XP_001389923.1 PREDICTED: similar to novel radial spoke dom...	...IPAINSQVKSDDLKFKLLEIPELLD PVEHYFNILSEQAARKIGDKTELFWDL...
5	ref XP_988485.1 PREDICTED: similar to mutS homolog 3 isoform 2MPAVNSHVQSDLLRALIVEAPELLS PVEHYLKVINGPAARKVGDKTELFWDL...
6	ref XP_873943.2 PREDICTED: similar to hMSH3, partial [Bos taurus]	...IPAVNSHVESELLQTFILEIPGLLS PVEHYLRILNEQAARKIGDKTELFWDL...
7	ref XP_528872.2 PREDICTED: mutS homolog 3, partial [Pan troglod...	...IPAVNSHIQSDLLRTVILEIPELLS PVEHYLKIINEQAARKVGDKTELFWDL...
8	emb CAM15293.1 novel protein similar to vertebrate mutS homolog...	...MPAIQSQVSSPLLHTLLLDTPQLLS PARNFLKVLNEQAARKTGNKTEMFVDE...
9	emb CAG07808.1 unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...LPAIRSQVQASLLQGLLDTPDLA PQQSFLKVLNEQAARKGNKTELFSDL...
10	ref XP_001178701.1 PREDICTED: similar to hMSH3 [Strongylocentro...	...RESVD--IKSVLLLDILIQMPSLLE GIDSFLASINEQAARKVGDKTELFADP...
11	ref XP_001240377.1 hypothetical protein CIMG_07540 [Coccidioides...]	...KSPADAGFDSPVINEAISQLPVVLD D VVSYLNKINLHSAHADDKSFQFQES...
12	ref XP_001273287.1 DNA mismatch repair protein Msh3, putative [...]	...KSPEDNGFSPVLEAVASLPTILK D VVAFLNKINMHAARSDDKYEFFNES...
13	ref XP_749062.1 DNA mismatch repair protein Msh3, putative [Asp...	...KTPQDSGFTSPILGEAIAVPSILG D VVKFLNKNMHAARNDKYEFFNES...
14	emb CAK41506.1 unnamed protein product [Aspergillus niger]	...KSPADTGFASALINEAITCLPTILE D VVAFLDKINMHAARSDDKYAFFNEA...
15	db BAE5245.1 unnamed protein product [Aspergillus oryzae]	...QSPADTGFSSPLISKAVASLPTILE D VVRFLDKINMHAARNDKYEFFNES...
16	ref XP_001213513.1 hypothetical protein ATEG_04335 [Aspergillus...]	...KSPEDSGFTTPIINEAIASLPTILE D VLSFLNKNINLHAAARNDKYEFFNEA...
17	ref XP_661353.1 hypothetical protein AN3749.2 [Aspergillus nidu...	...ESPADTGFSSPAISQAIMS LPTILK D VVFFLNKINMHAARNDKYEFFNEE...
18	ref XP_001220291.1 hypothetical protein CHGG_01070 [Chaetomium ...]	...KTPEDTGFNSSLIVEALYALPGIGT I VVSAFLDKINPEAARSDDKYEFFNDD...
19	ref XP_387288.1 hypothetical protein FG07112.1 [Gibberella zeae...	...KAPSADAFSSPLLSEAIKSLPQLD T VVSYLERINLVAARNDKYEFFNDE...
20	ref XP_393874.1 hypothetical protein [Neurospora crassa OR74A]KSPADTGFSSPLLSTAIMTLPISIP M VTAHLKINPEAARSDDKYAFFNEQ...
21	ref XP_778353.1 hypothetical protein CNBC5700 [Cryptococcus neo...	...--PNMGNVFRSCLLNIPNTLPTILD T SQRFNLNINLQAARNDVANLWADP...
22	ref XP_384481.1 hypothetical protein MG09306.4 [Magnaporthe gri...	...KEPSQTGFNSNLVSEALASLPRIE I VVSYLNKINPEAARSDDKYEFFNDE...
23	ref INP_194284.2 MSH3 [Arabidopsis thaliana] >gi 12644077 sp O65...	...GKQDSEVRSSTLLRRLISVIPVVVD N AGKLLSALNPEAARVGDLLDILITS...
24	ref INP_593952.1 hypothetical protein SPAC8F11.03 [Schizosacchar...	...----NSYFKSALLRRLIQQLPSISS I IDHFLGMFDQAEARENKVMDFYDI...
25	ref XP_001134558.1 DNA mismatch repair protein [Dictyostelium d...]	...NNNNSSYFNFSTLLNSIFKLQKLSK R IRYFLSNINMETAKVGDKSNLWVDE...
26	emb CAE03438.1 OSJNBa0032F06.21 [Oryza sativa (japonica cultiva...	...VSSQHRTVHSPLLRRLINTASSVLAN AATLVVSCINPEAARDQGDMLNLFASV...
27	ref XP_760422.1 hypothetical protein UM04275.1 [Ustilago maydis...]	...DEAATWKTQSSLDITHLSLASCQV VQTYLNQISIEARANNKADLYLDA...
28	ref XP_457536.1 hypothetical protein DEHA0B13673g [Debaryomyces...]	...GHPNTNNSIHSPLLRFIDELMQLAK T VRACLLDMSADANLNDQKIKFFNE...
29	emb CAA18172.1 putative DNA mismatch repair protein [Arabidopsi...	...MEAISATVRSSTLLRRLISVIPVVVD N AGKLLSALNPEAARVGDLLDILITS...
30	emb CAL51618.1 DNA mismatch repair protein MSH3 (ISS) [Ostreoco...	...CENMREGVGDLTSTLLVLELPSLV L AETFMSSALNLDVACVDKIGLFD...
31	ref INP_984265.1 ADR168Cp [Ashbya gossypii ATCC 10895] >gi 44982...	...HYIETNVQSSLLANIFTDLDEYWK P IYFNFLAMINIDAAANPDRPYVYFNE...

Abbildungen 44 a und b: Ergebnis der Polyphen-Vorhersage bzgl. Maglignitätsgrad und evolutionärer Konservierung für die MSH3-Sequenzvariante c.2041C>T p.(Pro681Ser) im Exon 14

Es wurde eine Kontrollgruppe gebildet, die aus 60 Alzheimer-Patienten (Alter: über 80 Jahre) bestand, und bei denen bisher keinerlei Darmtumore festgestellt worden waren. Mit der DHPLC-Methode wurden diese 60 Kontrollpatienten auf die Sequenzveränderung mit unauffälligem Ergebnis gescreent (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Das spricht dafür, dass die Sequenzveränderung selten und eventuell ein modifizierender Faktor beim Lynch-Syndrom sein könnte.

Der Stammbaum des Patienten #31 B.K. sieht folgendermaßen aus (s. Abb. 45):



- C18: Bösartige Neubildung des Kolons
- C91.1: Chronisch-lymphatische Leukämie
- C71.9: Bösartige Neubildung des Gehirns
- C61: Bösartige Neubildung der Prostata
- C19: Bösartige Neubildung am Rektum/Sigmoid

Abbildung 45: Stammbaum Patient #31 B.K.

Der Bruder des Patienten hatte ein Kolon-Karzinom sowie eine bösartige Neubildung des Gehirns. Die Schwester war soweit bekannt gesund. Der Vater des Ratsuchenden hatte ein Kolon-Karzinom und eine CLL, der Onkel ein Rektum-Karzinom. Die Tante ist wohl gesund. Der Großvater hatte ein Prostata-Karzinom.

Eine weitere Abklärung der Segregation war in der Familie leider nicht möglich. Der Vater (Colon-Karzinom im Alter von 70 Jahren, MSH2- und MSH6- Ausfall im Tumor!) war bereits verstorben, ebenso wie der Bruder (Kolon-Karzinom). Abgesehen von deren Erkrankungen waren keine weiteren Informationen über sie bekannt. Die DNA von Mutter, Onkel (Rektum-Karzinom im Alter von 44 Jahren) und Schwester konnten nicht rekrutiert werden, weshalb eine Segregationsanalyse nicht möglich war.

Die positive Familienanamnese für CRC spricht jedoch stark für eine genetische Ursache. Gerade in Anbetracht des immunhistochemischen MSH2- und MSH6-Ausfalls des Vaters im Tumor mit unauffälliger *MSH2*- und *MSH6*-Sequenzanalyse in der Keimbahn bei Bruder und Onkel des Patienten ist - wie bei Patientin #19. S.U. - ein Zusammenhang zwischen MSH2- und MSH6-Ausfall bei zusätzlicher *MSH3*-Sequenzveränderung denkbar.

4.2.4 Einordnung von *MSH3*-Varianten in den Gesamtzusammenhang

Alle Fakten zusammengenommen betrachtet ergibt sich folgender Gesamtzusammenhang: Bei den drei Sequenzveränderungen im *MSH3*-Gen, die möglicherweise pathogen sein könnten, weist einiges darauf hin, dass sie durch ihre allzu „benignen“ Eigenschaften nicht die alleinige genetische Ursache von CRC sind. Außerdem wird ein *MSH3*-Defekt alleine kein Lynch-Syndrom verursachen. Somit kommt dem *MSH3*-Gen im Zuge der Beurteilung weiterhin eine untergeordnete Rolle zu. Trotzdem ist - wie v.a. bei Patientin #19 S.U. gesehen - ein Zusammenhang zwischen *MSH2*, *MSH6* und *MSH3* möglich, nämlich in dem Sinn, dass Keimbahn-Varianten in *MSH6* und *MSH3* und somatische Sequenzveränderungen in beiden Genen durch fehlende Bindungspartner zu einem *MSH2*-Ausfall führen.

Auf einen übergeordneten Gesamtzusammenhang beim Komplex aus *MSH2*-*MSH6* bzw. *MSH2*-*MSH3* weist auch eine aktuelle Publikation von Morak (Morak et al., 2017) hin. Hier werden 11 Patienten mit Lynch-Syndrom beschrieben, die bei einem Tumor mit MSI-H-Status einen *MSH2*- und *MSH6*-IHC-Ausfall zeigen. Der immunhistochemische *MSH6*-Ausfall kann durch trunkierende *MSH6*-Keimbahn-Sequenzveränderungen ausreichend erklärt werden, der immunhistochemische *MSH2*-Ausfall jedoch nicht. In den weiterführenden Tests zeigen sich bei einigen Patienten bei unterschiedlicher klinischer Ausprägung verschiedene Veränderungen im *MSH3*-Gen. Dies führt den Autor zu folgenden Hypothesen:

Der Phänotyp eines Patienten mit Lynch-Syndrom bei trunkierender *MSH6*-Sequenzveränderung kann sich durch eine zusätzliche *MSH3*-Keimbahn-Sequenzveränderung verschlechtern, d.h. erhöhtes Tumorrisiko und früheres Alter bei Diagnosestellung. Heterozygote *MSH3*-Sequenzveränderungen alleine scheinen aber nicht ein Lynch-Syndrom auszulösen.

Keimbahn- plus somatische Sequenzveränderungen oder auch biallelische somatische Sequenzveränderungen in *MSH3* und *MSH6* können zu einem Defizit der jeweiligen Gene führen, immunhistochemisch zeigt sich ein Ausfall. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Mangel an beiden Bindungspartnern, *MSH3* und *MSH6*, zu einem Protein-Zerfall bzw. -Abbau von *MSH2* im Tumor führen kann, was den immunhistochemischen Ausfall von *MSH2* ohne Keimbahn-Sequenzveränderung in *MSH2* erklärt.

4.2.5 Exon 1 (s. Tab. 17)

Die korrekte und ganze Darstellung des Exon 1 von *MSH3* war eine Herausforderung bei der Analyse. Am meisten Probleme bereitete die teils bis zu 97-prozentige Homologie der Sequenz mit anderen Genen. Folgende Versuche wurden unternommen, um eine Amplifikation des richtigen Produkts zu erreichen: Verwendung von sechs verschiedenen *Primern* sowie deren unterschiedlichste Kombination, Verwendung verschiedener PCR-Programme hinsichtlich Temperatur und Länge der Extensionszeit, *nested-PCR*-Programme, *Long-Range-PCR*'s, Ausschneiden der jeweiligen korrekten Banden im Gel und danach weitere Verarbeitung sowie PCR's in 2 Runden mit verschiedenen *Primern*. Letztere zeigte sich als die beste Methode, um bei den meisten Patienten sicher den richtigen Gen-Abschnitt darzustellen. Trotzdem gelang diese selektive Amplifikation bei sieben Patienten (#1, #5, #22, #25, #27, #32, #40) bis zum Schluss nicht. Am ehesten wird im Moment davon ausgegangen, dass gegebenenfalls eine noch öfter wiederholte PCR und Sequenzierung mit weiteren spezifischen *Primern* irgendwann zum gewünschten Erfolg geführt hätte.

5 Schluss: Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick

5.1 Zusammenfassung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Patienten mit Verdacht auf HNPCC-Syndrom auf verschiedene Karzinogenese-Wege hin untersucht.

Im ersten Abschnitt wurde die auf MS-MLPA basierte Methode mit einem Kit einer neuen Sonden-Kombination der Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MGMT*, *MSH3*, *MLH3* von MRC Holland auf seine Anwendbarkeit hin untersucht. Hiermit können CNV's, und im zweiten Ansatz auch die Methylierung im Promotorbereich der Gene, detektiert werden. Das Kollektiv bestand aus Patienten mit immunhistochemischem Ausfall in *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* oder *PMS2*, jedoch ohne nachgewiesene Sequenzveränderungen der Keimbahn in diesen Genen. Die genomische DNA aus Blut und Tumor wurde bei diesen Patienten auf epigenetische Veränderungen im Sinne von Promotor-Methylierungen untersucht.

In der Gruppe mit MSI-H-Status und immunhistochemischem Ausfall von *MLH1*/*PMS2* zeigten sich als seltene Besonderheit vier Patienten mit Keimbahn-Methylierung eines Allels im Promotorbereich von *MLH1*, die eine transkriptionelle Stilllegung verursacht und deren ausgeprägte Klinik bestätigt, dass die *MLH1*-Promotor-Methylierung funktionell einer pathogenen Keimbahn-Variante gleichzusetzen ist.

Bei einer Familie lag ein Sonderfall vor. Hier wurde bei mehreren Familienmitgliedern nicht nur eine hochgradige Promotor-Methylierung, sondern auch eine Duplikation des gesamten Gens von *MLH1* nachgewiesen. Man nimmt an, dass dies die Ursache für die Weitervererbung der Methylierung ist.

Weitere Untersuchungen in anderen Kollektiven (MSS + IHC-*MLH1*-Ausfall, MSI-H + IHC-*MSH2*/*MSH6*-Ausfall) ergaben keine wegweisenden Ergebnisse bezüglich Deletion, Duplikation oder Methylierung.

Zudem wurde mit der MS-MLPA Tumor-DNA untersucht und es gelang die Zuordnung einiger Patienten, v.a. aus der Gruppe MSI-H + IHC-*MLH1*/*PMS2*-Ausfall stammend, zum CIMP+ - *Pathway*.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse muss die MS-MLPA in Tumor-DNA jedoch als teils sehr störungsanfällige Untersuchungsmethode charakterisiert werden (z.B. starke Abhängigkeit der Streubreite der Ergebnisse von der Qualität der DNA aufgrund stark fragmentierter DNA).

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Rolle von Keimbahn-Sequenzveränderungen

des *MSH3*-Gens in Patienten mit Verdacht auf Lynch-Syndrom mit MSI-H - Status und IHC-Ausfall von MSH2 und MSH6 im Tumor ohne nachgewiesener Sequenzveränderung in der Keimbahn-Analyse dieser Gene untersucht. Bei bekannter Interaktion zwischen MSH2 und MSH3 als alternativer Bindungspartner anstelle von MSH6 wurde die Hypothese untersucht, ob eine Verbindung zwischen einer pathogenen Keimbahn-Sequenzveränderung in *MSH3* und dem IHC-MSH2/MSH6-Ausfall im Tumormaterial bestehen könnte. Es erfolgte die Etablierung der Sanger-Sequenzanalyse des *MSH3*-Gens. Drei Varianten bisher unklarer Pathogenität wurden mit Vorhersageprogrammen auf ihre Pathogenität und Segregation hin untersucht. Es ergaben sich jedoch daraus keine Hinweise, dass diese Sequenzveränderungen im *MSH3*-Gen als alleinige Ursache sowohl für den immunhistochemischen Befundes als auch für die Tumorgenese bzw. Klinik der jeweiligen Patienten eine Rolle spielen. Das *MSH3*-Gen hat also eher eine untergeordnete Bedeutung im MMR-System. Es wurde diskutiert, ob bei Keimbahn- und somatischen Veränderungen in *MSH6* und *MSH3* durch das Fehlen eines Bindungspartners für MSH2 dessen Ausfall die Folge sein könnte.

5.2 Ausblick

In der Zusammenschau zeigt sich, dass der untersuchte MS-MLPA – Kit MRC Holland ME011 weder in Blut- noch in Tumor-DNA eine ausreichende Stabilität der Ergebnisse aufweist. So könnten z.B. einige Sonden andernorts lokalisiert oder ganz weggelassen werden, um mehr Stabilität und Vergleichbarkeit in der Auswertung zu erreichen. Außerdem ist eine Verbesserung und Vereinfachung des Auswertungsprogrammes „*Coffalyser*“ dringend notwendig. Dann wäre es möglich, die MS-MLPA und ihr Auswertungssystem in Zukunft auch für die Diagnostik zuzulassen. Dies würde gerade hinsichtlich der *MLH1*-Keimbahn-Promotor-Methylierung und CIMP-Analyse für Tumore einen großen Fortschritt bedeuten.

Im vorliegenden Kollektiv von Patienten ohne Keimbahn-Sequenzveränderung mit immunhistochemischem Ausfall von MSH2 und MSH6 konnte gezeigt werden, dass *MSH3*-Varianten alleine nicht ursächlich für Lynch-Syndrom in diesen Patienten ist. Weitere Untersuchungen diesbezüglich, wie z.B. von Morak et al. (Morak et al, 2017) sind nötig, um das Zusammenwirken des MSH2-MSH6-MSH3-Komplexes besser zu verstehen.

Im Laufe der letzten Jahre wurde das *MSH3*-Gen von Forschern unterschiedlichster Subspezialisierungen untersucht. Es zeigt sich z.B. bei Adam (Adam et al, 2016), dass das *MSH3*-Gen auch bei der FAP eine Rolle zu spielen scheint. Die Arbeitsgruppe beschreibt, dass biallelische *MSH3*-Keimbahn-Sequenzveränderungen, die zu einem Funktionsverlust des Gens führen, in einer Untergruppe der kolorektalen adenomatösen Polyposis mit rezessivem Erbgang zu finden sind. Im konkreten Fall kann man dadurch sogar eine therapeutische Konsequenz hinsichtlich des Outcome des Patientenkollektivs erlangen, da in Versuchen gezeigt werden konnte, dass Zellen mit *MSH3*-Defizienz gegenüber Cisplatin- oder Platin-basierter adjuvanter Therapie empfindlicher reagieren als Zellen mit unauffälliger *MSH3*-Expression.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Acharya, S., et al., *hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13629-34.
2. Adam, R., et al., *Exome Sequencing Identifies Biallelic MSH3 Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis*. Am J Hum Genet, 2016. **99**(2): p. 337-51.
3. Akiyama, Y., N. Tsubouchi, and Y. Yuasa, *Frequent somatic mutations of hMSH3 with reference to microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancers*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(2): p. 248-52.
4. Baylin, S.B., et al., *Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia*. Adv Cancer Res, 1998. **72**: p. 141-96.
5. Bellacosa, A., *Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins*. Cell Death Differ, 2001. **8**(11): p. 1076-92.
6. Benachenhou, N., et al., *High resolution deletion mapping reveals frequent allelic losses at the DNA mismatch repair loci hMLH1 and hMSH3 in non-small cell lung cancer*. Int J Cancer, 1998. **77**(2): p. 173-80.
7. Bittel, D.C., N. Kibiryevea, and M.G. Butler, *Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities*. Genet Test, 2007. **11**(4): p. 467-75.
8. Bocker, T., et al., *hMSH5: a human MutS homologue that forms a novel heterodimer with hMSH4 and is expressed during spermatogenesis*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 816-22.
9. Boland, C.R., et al., *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, 1998. **58**(22): p. 5248-57.
10. Bonadona, V., et al., *Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome*. JAMA, 2011. **305**(22): p. 2304-10.
11. Boparai, K.S., et al., *Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis*. Gastroenterology, 2008. **135**(6): p. 2014-8.
12. Buermeier, A.B., et al., *Mammalian DNA mismatch repair*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 533-64.
13. Burt, R.W., *Colon cancer screening*. Gastroenterology, 2000. **119**(3): p. 837-53.
14. Cawkwell, L., et al., *Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair*. Gut, 1999. **45**(3): p. 409-15.
15. Chan, T.L., et al., *Heritable germline epimutations of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1178-83.
16. Charbonneau, N., et al., *Evidence that hMLH3 functions primarily in meiosis and in*

- hMSH2-hMSH3 mismatch repair*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(14): p. 1411-20.
17. Chubb, D., et al., *Genetic diagnosis of high-penetrance susceptibility for colorectal cancer (CRC) is achievable for a high proportion of familial CRC by exome sequencing*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(5): p. 426-32.
 18. *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. *Nature*, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
 19. Court, F., et al., *Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes*. *Hum Mutat*, 2013. **34**(4): p. 595-602.
 20. de Wind, N., et al., *HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions*. *Nat Genet*, 1999. **23**(3): p. 359-62.
 21. Dietmaier, W., et al., *Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression*. *Cancer Res*, 1997. **57**(21): p. 4749-56.
 22. Dikow, N., et al., *Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA*. *Mol Cell Probes*, 2007. **21**(3): p. 208-15.
 23. Doerfler, W., *De novo methylation, long-term promoter silencing, methylation patterns in the human genome, and consequences of foreign DNA insertion*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **301**: p. 125-75.
 24. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS, 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(14):4008.
 25. Drummond, J.T., et al., *DHFR/MSH3 amplification in methotrexate-resistant cells alters the hMutSalpha/hMutSbeta ratio and reduces the efficiency of base-base mismatch repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(19): p. 10144-9.
 26. Drummond, J.T., et al., *Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells*. *Science*, 1995. **268**(5219): p. 1909-12.
 27. Edelmann, W., et al., *The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression*. *Cancer Res*, 2000. **60**(4): p. 803-7.
 28. Edelmann, W., et al., *Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility*. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 467-77.
 29. Engel, C., et al., *Efficacy of annual colonoscopic surveillance in individuals with hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2010. **8**(2): p. 174-82.
 30. Esteller, M., *Relevance of DNA methylation in the management of cancer*. *Lancet Oncol*, 2003. **4**(6): p. 351-8.
 31. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
 32. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. *Cancer Res*, 1999. **59**(4): p. 793-7.

33. Fahrer, J. and B. Kaina, *O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(11): p. 2435-42.
34. Fleck, O., H. Michael, and L. Heim, *The swi4+ gene of Schizosaccharomyces pombe encodes a homologue of mismatch repair enzymes*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(9): p. 2271-8.
35. Fujii, H. and T. Shimada, *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*, 1989. **264**(17): p. 10057-64.
36. Fujii, H., E. Shinya, and T. Shimada, *A GC box in the bidirectional promoter is essential for expression of the human dihydrofolate reductase and mismatch repair protein 1 genes*. *FEBS Lett*, 1992. **314**(1): p. 33-6.
37. Gardner, E., et al., *Localization of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene to chromosome 10q24.33-qter*. *Genomics*, 1991. **11**(2): p. 475-6.
38. Gazzoli, I., et al., *A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor*. *Cancer Res*, 2002. **62**(14): p. 3925-8.
39. Gerson, S.L., *MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(4): p. 296-307.
40. Gorbalenya, A.E. and E.V. Koonin, *Superfamily of UvrA-related NTP-binding proteins. Implications for rational classification of recombination/repair systems*. *J Mol Biol*, 1990. **213**(4): p. 583-91.
41. Grady, W.M., *Genomic instability and colon cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2004. **23**(1-2): p. 11-27.
42. Gylling, A., et al., *Large genomic rearrangements and germline epimutations in Lynch syndrome*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(10): p. 2333-40.
43. Haber, L.T. and G.C. Walker, *Altering the conserved nucleotide binding motif in the Salmonella typhimurium MutS mismatch repair protein affects both its ATPase and mismatch binding activities*. *EMBO J*, 1991. **10**(9): p. 2707-15.
44. Herman, J.G., et al., *Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(12): p. 6870-5.
45. Hess, C.J., et al., *Concurrent methylation of promoters from tumor associated genes predicts outcome in acute myeloid leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2008. **49**(6): p. 1132-41.
46. Hitchins, M., et al., *MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(5): p. 1392-9.
47. Hitchins, M.P., et al., *Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutations*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(7): p. 697-705.
48. Holinski-Feder, E. and M. Morak, *[Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma: state of the art]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2008. **133**(33): p. 1690-5.

49. Homig-Holzel, C. and S. Savola, *Multiplex ligation-dependent probe amplification (MPA) in tumor diagnostics and prognostics*. *Diagn Mol Pathol*, 2012. **21**(4): p. 189-206.
50. Huang, J., et al., *MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolytopic colon cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1619-23.
51. Iino, H., et al., *DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer?* *J Clin Pathol*, 1999. **52**(1): p. 5-9.
52. Issa, J.P., *CpG island methylator phenotype in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(12): p. 988-93.
53. Issa, J.P., et al., *Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon*. *Nat Genet*, 1994. **7**(4): p. 536-40.
54. Jass, J.R., *Towards a molecular classification of colorectal cancer*. *Int J Colorectal Dis*, 1999. **14**(4-5): p. 194-200.
55. Jass, J.R., *HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences*. *Fam Cancer*, 2004. **3**(2): p. 93-100.
56. Jass, J.R., *Role of the pathologist in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer*. *Dis Markers*, 2004. **20**(4-5): p. 215-24.
57. Jass, J.R., *Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype*. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005. **2**(8): p. 398-405.
58. Jass, J.R., *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. *Histopathology*, 2007. **50**(1): p. 113-30.
59. Jeuken, J.W., et al., *MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas*. *Lab Invest*, 2007. **87**(10): p. 1055-65.
60. Jiricny, J. and M. Nystrom-Lahti, *Mismatch repair defects in cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. **10**(2): p. 157-61.
61. Kim, W.H., et al., *Microsatellite instability in young patients with colorectal cancer*. *Pathol Int*, 1998. **48**(8): p. 586-94.
62. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. **68**(4): p. 820-3.
63. Latham, K.E., *X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo*. *Trends Genet*, 1996. **12**(4): p. 134-8.
64. Leach, F.S., et al., *Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Cell*, 1993. **75**(6): p. 1215-25.
65. Li, G.M. and P. Modrich, *Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(6): p. 1950-4.
66. Lindor, N.M., et al., *Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(4): p. 1043-8.
67. Lipkin, S.M., et al., *MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with*

- mammalian microsatellite instability*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 27-35.
68. Littman, S.J., W.H. Fang, and P. Modrich, *Repair of large insertion/deletion heterologies in human nuclear extracts is directed by a 5' single-strand break and is independent of the mismatch repair system*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7474-81.
 69. Liu, B., et al., *Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients*. Nat Med, 1996. **2**(2): p. 169-74.
 70. Lynch, H.T. and A.J. Krush, *Cancer family "G" revisited: 1895-1970*. Cancer, 1971. **27**(6): p. 1505-11.
 71. Lynch, H.T., et al., *Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds*. Arch Intern Med, 1966. **117**(2): p. 206-12.
 72. Lynch, H.T., T. Smyrk, and J.F. Lynch, *Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome)*. Int J Cancer, 1996. **69**(1): p. 38-43.
 73. Lynch, H.T., et al., *Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications*. Clin Genet, 2009. **76**(1): p. 1-18.
 74. Makinen, M.J., *Colorectal serrated adenocarcinoma*. Histopathology, 2007. **50**(1): p. 131-50.
 75. Marcus, V.A., et al., *Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors*. Am J Surg Pathol, 1999. **23**(10): p. 1248-55.
 76. Marra, G., et al., *Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8568-73.
 77. Mellon, I., et al., *Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes*. Science, 1996. **272**(5261): p. 557-60.
 78. Meyer, C., et al., *An interstitial deletion at 3p21.3 results in the genetic fusion of MLH1 and ITGA9 in a Lynch syndrome family*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(3): p. 762-9.
 79. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
 80. Minoo, P., *Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of MGMT*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 266.
 81. Miyakura, Y., et al., *Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. **2**(2): p. 147-56.
 82. Morak, M., et al., *Further evidence for heritability of an epimutation in one of 12 cases with MLH1 promoter methylation in blood cells clinically displaying HNPCC*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(7): p. 804-11.
 83. Morak, M., et al., *Loss of MSH2 and MSH6 due to heterozygous germline defects in MSH3 and MSH6*. Fam Cancer, 2017. **16**(4): p. 491-500.

84. Morson, B.C., *Precancerous lesions of the colon and rectum. Classification and controversial issues*. JAMA, 1962. **179**: p. 316-21.
85. Muller, A. and R. Fishel, *Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC)*. Cancer Invest, 2002. **20**(1): p. 102-9.
86. Nakajima, E., et al., *Nine-bp repeat polymorphism in exon 1 of the hMSH3 gene*. Jpn J Hum Genet, 1995. **40**(4): p. 343-5.
87. Natarajan, A.T., et al., *Chromosomal localization of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization*. Mutagenesis, 1992. **7**(1): p. 83-5.
88. New, L., K. Liu, and G.F. Crouse, *The yeast gene MSH3 defines a new class of eukaryotic MutS homologues*. Mol Gen Genet, 1993. **239**(1-2): p. 97-108.
89. Nygren, A.O., et al., *Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(14): p. e128.
90. Oberhuber, G., Rüschoff, J., *Diagnostische Kriterien des hereditären, nicht Polypose-assoziierten kolorektalen Karzinoms (HNPCC)*. J Gastroenterol Hepatol Erkr, 2004. **2** (2): 6–10
91. Ohmiya, N., et al., *Germline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype*. Gene, 2001. **272**(1-2): p. 301-13.
92. Orimo, H., et al., *Association between single nucleotide polymorphisms in the hMSH3 gene and sporadic colon cancer with microsatellite instability*. J Hum Genet, 2000. **45**(4): p. 228-30.
93. Palombo, F., et al., *hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA*. Curr Biol, 1996. **6**(9): p. 1181-4.
94. Paraf, F., et al., *MLH1 and MSH2 protein immunohistochemistry is useful for detection of hereditary non-polyposis colorectal cancer in young patients*. Histopathology, 2001. **39**(3): p. 250-8.
95. Parsons, M.T., et al., *Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification*. J Med Genet, 2012. **49**(3): p. 151-7.
96. Procter, M., et al., *Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*. Clin Chem, 2006. **52**(7): p. 1276-83.
97. Qin, X., et al., *An updated meta-analysis on the association of MDM2 SNP309 polymorphism with colorectal cancer risk*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76031.
98. Raschle, M., et al., *Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32368-75.
99. Rashid, A. and J.P. Issa, *CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field*. Gastroenterology, 2004. **127**(5): p. 1578-88.
100. Risinger, J.I., et al., *Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its*

- functional role in heteroduplex repair*. Nat Genet, 1996. **14**(1): p. 102-5.
101. Ross-Macdonald, P. and G.S. Roeder, *Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1069-80.
 102. Ruschoff, J., D. Aust, and A. Hartmann, *[Colorectal serrated adenoma: diagnostic criteria and clinical implications]*. Verh Dtsch Ges Pathol, 2007. **91**: p. 119-25.
 103. Ruschoff, J., et al., *[Molecular cancer disposition diagnosis exemplified by colorectal carcinoma. What is the contribution of pathology?]*. Pathologe, 1998. **19**(4): p. 269-78.
 104. Schmiegel, W., et al., *[Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]*. Z Gastroenterol, 2008. **46**(8): p. 799-840.
 105. Schneider, R., A. Furst, and G. Moslein, *[Lynch syndrome--epidemiology, clinical features, molecular genetics, screening, therapy]*. Z Gastroenterol, 2012. **50**(2): p. 217-25.
 106. Shao, X. and N.V. Grishin, *Common fold in helix-hairpin-helix proteins*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(14): p. 2643-50.
 107. Shen, L., et al., *MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(18): p. 1330-8.
 108. Shimada, T., H. Fujii, and H. Lin, *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, 1989. **264**(34): p. 20171-4.
 109. Shinya, E. and T. Shimada, *Identification of two initiator elements in the bidirectional promoter of the human dihydrofolate reductase and mismatch repair protein 1 genes*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(11): p. 2143-9.
 110. Smith, G., et al., *Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9433-8.
 111. Snover, D.C., et al., *Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept*. Am J Clin Pathol, 2005. **124**(3): p. 380-91.
 112. Snover, D.C., *Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma*. Hum Pathol, 2011. **42**(1): p. 1-10.
 113. Steinke, V., et al., *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) / Lynch syndrome*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(3): 32–8
 114. Suter, C.M., D.I. Martin, and R.L. Ward, *Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 497-501.
 115. Takayama, T., et al., *Analysis of KRAS, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 599-611.
 116. Thiel, A., et al., *BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome*. Virchows Arch, 2013. **463**(5): p. 613-21.
 117. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.

118. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(4): p. 261-8.
119. Valle, L., et al., *MLH1 germline epimutations in selected patients with early-onset non-polyposis colorectal cancer*. Clin Genet, 2007. **71**(3): p. 232-7.
120. Vasen, H.F., et al., *The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)*. Dis Colon Rectum, 1991. **34**(5): p. 424-5.
121. Vasen, H.F., et al., *New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1453-6.
122. Wang, T.F., N. Kleckner, and N. Hunter, *Functional specificity of MutL homologs in yeast: evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13914-9.
123. Warthin, A.S., *Heredity with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the university of Michigan, 1895-1913*. Arch Intern Med, 1913. **XII**(5): 546-555.
124. Watanabe, A., et al., *Genomic organization and expression of the human MSH3 gene*. Genomics, 1996. **31**(3): p. 311-8.
125. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
126. Weisenberger, D.J., et al., *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. Nat Genet, 2006. **38**(7): p. 787-93.
127. Worthley, D.L., et al., *Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(28): p. 3784-91.
128. Yin, J., et al., *Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas*. Hum Mutat, 1997. **10**(6): p. 474-8.
129. Young, J. and J.R. Jass, *The case for a genetic predisposition to serrated neoplasia in the colorectum: hypothesis and review of the literature*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(10): p. 1778-84.
130. Zhang, B., et al., *Loss of Smad4 in colorectal cancer induces resistance to 5-fluorouracil through activating Akt pathway*. Br J Cancer, 2014. **110**(4): p. 946-57.

Bücher/Broschüren:

131. Sambrook J., Fritsch E.F., et al. (1989). "Molecular Cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
132. Young GP, Rozen P, Levin B. How does colorectal cancer develop. Colorectal Cancer in Clinical Practice 1st ed. 2002: 23-37

133. „Familiärer Darmkrebs“, Informationsbroschüre für Ärzte, Verbundprojekt der Deutschen Krebshilfe
134. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, AWMF-Registernummer 021/007OL (August 2014)

Fernsehdokumentation:

135. Dienstag, 25.März 2003, 21.00 – 21.45 Uhr, WDR-Fernsehen, Quarks&Co
http://www.wdr.de/tv/quarks/sendungsbeitraege/2003/0325/003_erbsubstanz.jsp

6.2 Primer

6.2.1 Primer für *KRAS*

Exon 2F: 5'-TTT TTA TTA TAA GGC CTG CTG-3'

Exon 2R: 5'-ATA TTA AAA CAA GAT TTA CCT C-3'

Exon 3F: 5'-GGT GCA CTG TAA TAA TCC AG-3'

Exon 3R: 5'-ACT ATA ATT ACT CCT TAA TGT C-3'

6.2.2 Primer für *BRAF*

Exon 11F: 5'-TCC CTC TCA GGC ATA AGG TAA-3'

Exon 11R: 5'-CGA ACA GTG AAT ATT TCC TTT GAT-3'

6.2.3 Primer für *MGMT*

5UTR-1F: 5'-CTA GGG GAG CGG CAC CAG-3'

5UTR-2R: 5'-CGC TGC CCT GTG CGC CTG-3'

5UTR-3F: 5'-CTC TCT TGC TTT TCT CAG GTC-3'

5UTR-4R: 5'-ACT CGA GGC TGC CAC CGT C-3'

6.2.4 Primer für *MSH3*

Exon 1aF: 5'-AGA TAC CTG AGC GGT GGC-3'

Exon 1aR: 5'-AAA CCG CTT GCC TCG CAG-3'

Exon 1bF: 5'-CTT GCC CTG CCA TGT CTC-3'

Exon 1bR: 5'-TCC TCC AGC CCT ATC ATC G-3'

Exon 1aFneu: 5'-GCC CGT TTG GGT CCC ATC-3'

Exon 2bRneu: 5'-GCC CGC CTT ACC CAC AAG-3'

Exon 2F: 5'-TCA GTT GTA AGG TTT AAA TTG C-3'

Exon 2R: 5'-AAT TCC AGA ATA CCA GAG CC-3'
Exon 3F: 5'-ATG CTG GTT ATG AAT TGA CAT A-3'
Exon 3R: 5'-GT CTT CAG AAC CCA CTA TTC-3'
Exon 4F: 5'-TGC ATT TTC CGT CTC TGG G-3'
Exon 4R: 5'-AAA ATA TCT AAG GCT AGA CAA G-3'
Exon 5F: 5'-TAA TAA AGT GAA CCA ACA TCA C-3'
Exon 5R: 5'-ACT CTC TGG AGG AGA ATC C-3'
Exon 6F: 5'-CGT TTA AAC ATT TCG AAA TGA G-3'
Exon 6R: 5'-GCC AAC AAA GCC CTT GTA TC-3'
Exon 7F: 5'-GCT GTG AAC CAT TAT TTT AAA G-3'
Exon 7R: 5'-CAT ATT TAG AGA TAC CAT GAA C-3'
Exon 8F: 5'-TGT TTA TGC TGT GTT ATA GCC-3'
Exon 8R: 5'-GGA ACT AAA CCT AAG TTT CAG-3'
Exon 9F: 5'-GGC CAA GAC CTA AAT ACC AG-3'
Exon 9R: 5'-ACA ACA ACA GTG AGC TCT TC-3'
Exon 10F: 5'-GCT AAC AAG TTA ATG GTT CTG-3'
Exon 10R: 5'-AAT GTT CAT AAT ATA AGC TCC C-3'
Exon 11F: 5'-ATG TTT CTA GTT CCT GAA TTA G-3'
Exon 11R: 5'-CTG CTG CCT TAC TCA GAA G-3'
Exon 12F: 5'-GAA TCG GGG TAT ATG AAA TAA C-3'
Exon 12R: 5'-GTA ACC TTG GTT TTA AAA TGC C-3'
Exon 13F: 5'-GGG CAT TAG AGT GGG AAA TG-3'
Exon 13R: 5'-GTC CTC AAG CTG AAG AAC AC-3'
Exon 14F: 5'-TTT CCT CAA TTC TGA TTC TAA C-3'
Exon 14R: 5'-GCA CTG AAT TAT ACT GAC TGG-3'
Exon 15F: 5'-TTT CCT CTT TTA TCA CAC TAT G-3'
Exon 15R: 5'-ACA TAT CCT ATC CTC AGA TTT C-3'
Exon 16F: 5'-TAT ACC ACA ATT TGG GGA AAG-3'
Exon 16R: 5'-TAT ACA GAT GTC ATC ATA ATG C-3'
Exon 17F: 5'-TTC TAA AGT GAT GGC ATT TCG-3'
Exon 17R: 5'-TCC AGT CTG TTT CTG ATA GC-3'
Exon 18F: 5'-GCT TGT TGT AGA GCT ATT ATA G-3'
Exon 18R: 5'-AAT GTC ATC TTA TCT AAA GCA C-3'
Exon 19F: 5'-GTC GTA CAA ACA GAG TAC TG-3'

Exon 19R: 5'-AAG TTT GGG ATG TTA TCA TCG-3'
Exon 19Fneu: 5'-AAG GCT ATT TCC ATG CCT AG-3'
Exon 20F: 5'-CCA CTT ATG AGA TAA ATT GTG G-3'
Exon 20R: 5'-GCG ATA ATG TGG GCT TGA C-3'
Exon 21F: 5'-CAT AAA ATA ATG TTC GGC TTC C-3'
Exon 21R: 5'-TAT GGC ACA ATT ATG ACT GTC-3'
Exon 22F: 5'-TCA AAA GAA AGT GGA AGA CAG-3'
Exon 22R: 5'-TAA GCA GTA AGT TCA TGT TCC-3'
Exon 23F: 5'-GTT ATG AGA ACT TAC ATG TCC-3'
Exon 23R: 5'-TTG GAC AAC TTA GAA GGT TCC-3'
Exon 24F: 5'-TCA TAG CTT CTG ATG AGA CG-3'
Exon 24R: 5'-CTT TAC TGG ACT TAC TGT CC-3'

6.3 PCR-Bedingungen für das *MSH3*-Gen

6.3.1 Exon 1

1. Runde: 94°C: 5 min, dann 68°C-58°C (9x), insgesamt 39 Zyklen 72°C: 1 min.

Primer: 1aFneu + 1bR

2. Runde: Identisches Programm. Primer: 1aFneu + 1bRneu.

Zum Sequenzieren: 1bF und 1bRneu

6.3.2 Alle andere Exons

Touchdown-Programm 64°C-54°C:

94°C: 10 min, 94°C: 30 min, 64°C: 30 min, -1°C pr Zyklus (9x Zyklus), 94°C: 30 min, 54°C: 30 min, 72°C: 30 min, 39 cycles, 72°C: 7 min, 4°C: 10 min

6.4 *MSH3*-Gen

6.4.1 Gen-Sequenz (BLAT)

TAGCGAACCA ACCATGACAG CAGCGGGAGG ACCTCCGAGC CCGCTCGTTA 50

CAGCAGAACG CGCGGTCAAG TTTGGCGCGA AATTGTGGCC GCCCCGCCCC 100

CCTCGTCCCC ATTTGTGCAG GCGAGGCCCC GCCCCCCCGC CCCGGCGCAC 150

GCAGGGTCGC GGCGTGCTCG CGCCCGCAGA CGCCTGGGAA CTGCGGCCGC 200
GGGCTCGCGC TCCTCGCCAG GCCCTGCCGC CGGGCTGCCA TCCTTGCCCT 250
GCCATCTCTC GCCGGAAGCC TGCCTCGGGC GGCCTCGCTG CCTCCAGCTC 300
AGCCCCTGCG AGGCAAGCGG TTTTGAGCCG ATTCTTCCAG TCTACGGGAA 350
GCCTGAAATC CACCTCCTCC TCCACAGGTG CAGCCGACCA GGTGGACCCT 400
GGCGCTGCAG CGGCTGCAGC GGCCGCAGCG GCCGCAGCGC CCCCAGCGCC 450
CCCAGCTCCC GCCTTCCCGC CCCAGCTGCC GCCGCACATA GCTACAGAAA 500
TTGACAGAAG AAAGAAGAGA CCATTGGAAA ATGATGGGCC TGTTAAAAAG 550
AAAGTAAAGA AAGTCCAACA AAAGGAAGGA GGAAGTGATC TGGGAATGTC 600
TGGCAACTCT GAGCCAAAGA AATGTCTGAG GACCAGGAAT GTTTCAAAGT 650
CTCTGAAAAA ATTGAAAGAA TTCTGCTGCG ATTCTGCCCT TCCTCAAAGT 700
AGAGTCCAGA CAGAATCTCT GCAGGAGAGA TTTGCAGTTC TGCCAAAATG 750
TACTGATTTT GATGATATCA GTCTTCTACA CGCAAAGAAT GCAGTTTCTT 800
CTGAAGATTC GAAACGTCAA ATTAATCAAA AGGACACAAC ACTTTTTGAT 850
CTCAGTCAGT TTGGATCATC AAATACAAGT CATGAAAATT TACAGAAAAC 900
TGCTTCCAAA TCAGCTAACA AACGGTCCAA AAGCATCTAT ACGCCGCTAG 950
AATTACAATA CATAGAAATG AAGCAGCAGC ACAAAGATGC AGTTTTGTGT 1000
GTGGAATGTG GATATAAGTA TAGATTCTTT GGGGAAGATG CAGAGATTGC 1050
AGCCCGAGAG CTCAATATTT ATTGCCATTT AGATCACAAC TTTATGACAG 1100
CAAGTATACC TACTCACAGA CTGTTTGTTC ATGTACGCCG CCTGGTGGCA 1150
AAAGGATATA AGGTGGGAGT TGTGAAGCAA ACTGAACTG CAGCATTAAA 1200
GGCCATTGGA GACAACAGAA GTTCACTCTT TTCCCGGAAA TTGACTGCCC 1250
TTTATACAAA ATCTACACTT ATTGGAGAAG ATGTGAATCC CCTAATCAAG 1300
CTGGATGATG CTGTAAATGT TGATGAGATA ATGACTGATA CTTCTACCAG 1350
CTATCTTCTG TGCATCTCTG AAAATAAGGA AAATGTTAGG GACAAAAAAA 1400
AGGGCAACAT TTTTATTGGC ATTGTGGGAG TGCAGCCTGC CACAGGCGAG 1450
GTTGTGTTTG ATAGTTTCCA GGA CTCTGCT TCTCGTTCAG AGCTAGAAAC 1500

CCGGATGTCA AGCCTGCAGC CAGTAGAGCT GCTGCTTCCT TCGGCCTTGT 1550
CCGAGCAAAC AGAGGCGCTC ATCCACAGAG CCACATCTGT TAGTGTGCAG 1600
GATGACAGAA TTCGAGTCGA AAGGATGGAT AACATTTATT TTGAATACAG 1650
CCATGCTTTC CAGGCAGTTA CAGAGTTTTA TGCAAAAGAT ACAGTTGACA 1700
TCAAAGGTTT TCAAATTATT TCTGGCATTG TTAACCTAGA GAAGCCTGTG 1750
ATTTGCTCTT TGGCTGCCAT CATAAAATAC CTCAAAGAAT TCAACTTGGA 1800
AAAGATGCTC TCCAAACCTG AGAATTTTAA ACAGCTATCA AGTAAAATGG 1850
AATTTATGAC AATTAATGGA ACAACATTA GGAATCTGGA AATCCTACAG 1900
AATCAGACTG ATATGAAAAC CAAAGGAAGT TTGCTGTGGG TTTTAGACCA 1950
CACTAAAAC TCATTTGGGA GACGGAAGTT AAAGAAGTGG GTGACCCAGC 2000
CACTCCTTAA ATTAAGGGAA ATAAATGCCG GGCTTGATGC TGTATCGGAA 2050
GTTCTCCATT CAGAATCTAG TGTGTTTGGT CAGATAGAAA ATCATCTACG 2100
TAAATTGCCG GACATAGAGA GGGGACTCTG TAGCATTAT CACAAAAAAT 2150
GTTCTACCCA AGAGTTCTTC TTGATTGTCA AAACCTTATA TCACCTAAAG 2200
TCAGAATTC AAGCAATAAT ACCTGCTGTT AATTCCCACA TTCAGTCAGA 2250
CTTGCTCCGG ACCGTTATTT TAGAAATTCC TGAACCTCCTC AGTCCAGTGG 2300
AGCATTACTT AAAGATACTC AATGAACAAG CTGCCAAAGT TGGGGATAAA 2350
ACTGAATTAT TTAAAGACCT TTCTGACTTC CCTTTAATAA AAAAGAGGAA 2400
GGATGAAATT CAAGGTGTTA TTGACGAGAT CCGAATGCAT TTGCAAGAAA 2450
TACGAAAAAT ACTAAAAAAT CCTTCTGCAC AATATGTGAC AGTATCAGGA 2500
CAGGAGTTTA TGATAGAAAT AAAGAACTCT GCTGTATCTT GTATACCAAC 2550
TGATTGGGTA AAGGTTGGAA GCACAAAAGC TGTGAGCCGC TTTCACTCTC 2600
CTTTTATTGT AGAAAATTAC AGACATCTGA ATCAGCTCCG GGAGCAGCTA 2650
GTCCTTGACT GCAGTGCTGA ATGGCTTGAT TTTCTAGAGA AATTCAGTGA 2700
ACATTATCAC TCCTTGTGTA AAGCAGTGCA TCACCTAGCA ACTGTTGACT 2750
GCATTTTCTC CCTGGCCAAG GTCGCTAAGC AAGGAGATTA CTGCAGACCA 2800
ACTGTACAAG AAGAAAGAAA AATTGTAATA AAAAATGGAA GGCACCCTGT 2850

GATTGATGTG TTGCTGGGAG AACAGGATCA ATATGTCCCA AATAATACAG 2900
ATTTATCAGA GGA CT CAGAG AGAGTAATGA TAATTACCGG ACCAAACATG 2950
GGTGAAAGA GCTCCTACAT AAAACAAGTT GCATTGATTA CCATCATGGC 3000
TCAGATTGGC TCCTATGTTT CTGCAGAAGA AGCGACAATT GGGATTGTGG 3050
ATGGCATT TTT CACAAGGATG GGTGCTGCAG ACAATATATA TAAAGGACG 3100
AGTACATTTA TGGAAGA ACT GACTGACACA GCAGAAATAA TCAGAAAAGC 3150
AACATCACAG TCCTTGGTTA TCTTGGATGA ACTAGGAAGA GGGACGAGCA 3200
CTCATGATGG AATTGCCATT GCCTATGCTA CACTTGAGTA TTTCATCAGA 3250
GATGTGAAAT CCTTAACCCT GTTTGT CACC CATTATCCGC CAGTTTGTGA 3300
ACTAGAAAAA AATTACTCAC ACCAGGTGGG GAATTACCAC ATGGGATTCT 3350
TGGTCAGTGA GGATGAAAGC AA ACTGGATC CAGGCGCAGC AGAACAAGTC 3400
CCTGATTTTG TCACCTTCCT TTACCAAATA ACTAGAGGAA TTGCAGCAAG 3450
GAGTTATGGA TTAATGTGG CTAAACTAGC AGATGTTCTT GGAGAAATTT 3500
TGAAGAAAGC AGCTCACAAG TCAAAGAGC TGGAAGGATT AATAAATACG 3550
AAAAGAAAGA GACTCAAGTA TTTTGCAAAG TTATGGACGA TGCATAATGC 3600
ACAAGACCTG CAGAAGTGG CAGAGGAGTT CAACATGGAA GAAACACAGA 3650
CTTCTCTTCT TCATTA AAAAT GAAGACTACA TTTGTGAACA AAAAATGGAG 3700
AATTA AAAAT ACCAACTGTA CAAAATAACT CTCCAGTAAC AGCCTATCTT 3750
TGTGTGACAT GTGAGCATAA AATTATGACC ATGGTATATT CCTATTGGAA 3800
ACAGAGAGGT TTTTCTGAAG ACAGTCTTTT TCAAGTTTCT GTCTTCCTAA 3850
CTTTTCTACG TATAAACACT CTTGAATAGA CTTCCACTTT GTAATTAGAA 3900
AATTTTATGG ACAGTAAGTC CAGTAAAGCC TTAAGTGGCA GAATATAATT 3950
CCCAAGCTTT TGGAGGGTGA TATAAAAATT TACTTGATAT TTTTATTTGT 4000
TTCAGTTCAG ATAATTGGCA ACTGGGTGAA TCTGGCAGGA ATCTATCCAT 4050
TGA ACTAAAA TAATTTTATT ATGCAACCAG TTTATCCACC AAGAACATAA 4100
GAATTTTTTA TAAGTAGAAA GAATTGGCCA GGCATGGTGG CTCATGCCTG 4150
TAATCCCAGC ACTTTGGGAG GCCAAGGTAG GCAGATCACC TGAGGTCAGG 4200

AGTTCAAGAC CAGCCTGGCC AACATGGCAA AACCCCATCT TTAATAAAAA 4250
TATAAAGTAC ATCTCTACTA AAAATACGAA AAAATTAGCT GGGCATGGTG 4300
GCGCACACCT GTAGTCCCAG CTA CTCTCCGGA GGCTGAGGCA GGAGAATCTC 4350
TTGAACCTGG GAGGCGGAGG TTGCAATGAG CCGAGATCAC GTCACTGCAC 4400
TCCAGCTTGG GCAACAGAGC AAGACTCCAT CTCAAAAAAAA AAAAAAGAAA 4450
AAAGAAAAGA AATAGAATTA TCAAGCTTTT AAAA ACTAGA GCACAGAAGG 4500
AATAAGGTCA TGAAATTTAA AAGGTAAAT ATTGTCATAG GATTAAGCAG 4550
TTTAAAGATT GTTGGATGAA ATTATTTGTC ATTCATTCAA GTAATAAATA 4600
TTAATGAAT ACTTGCTATA

6.4.2 Aminosäuren-Sequenz (<http://www.uniprot.org/uniprot/P20585>)

10	20	30	40	50	60
MSRRKPASGG	LAASSSAPAR	QAVLSRFFQS	TGSLKSTSSS	TGAADQVDPG	AAAAAAAAAA
70	80	90	100	110	120
AAPPAPPAPA	FPPQLPPHIA	TEIDRRKKRP	LENDGPVKKK	VKKVQQKEGG	SDLGMSGNSE
130	140	150	160	170	180
PKKCLRTRNV	SKSLEKLKEF	CCDSALPQSR	VQTESLQERF	AVLPKCTDFD	DISLLHAKNA
190	200	210	220	230	240
VSEDSKRQI	NQKDTTLFDL	SQFGSSNTSH	ENLQKTASKS	ANKRSKSIYT	PLELQYIEMK
250	260	270	280	290	300
QQHKDAVLCV	ECGYKYRFFG	EDAEIAAREL	NIYCHLDHNF	MTASIPTHRL	FVHVRRLVAK
310	320	330	340	350	360
GYKVGVMKQT	ETAALKAIGD	NRSSLFSRKL	TALYTKSTLI	GEDVNPLIKL	DDAVNVDEIM
370	380	390	400	410	420
TDTSTSYLLC	ISENKENVRD	KKKGNIFIGI	VGVPATGEV	VFDSFQDSAS	RSELETRMSS
430	440	450	460	470	480
LQPVELLLPS	ALSEQTEALI	HRATSVSVQD	DRIRVERMDN	IYFEYSHAFQ	AVTEFYAKDT
490	500	510	520	530	540
VDIKGSQIIS	GIVNLEKPVI	CSLAAIIKYL	KEFNLEKMLS	KPENFKQLSS	KMEFMTINGT
550	560	570	580	590	600
TLRNLEILQN	QTMKTKGSL	LWVLDHTKTS	FGRRLKWKW	TQPLLKLREI	NARLDAVSEV
610	620	630	640	650	660
LHSESSVFGQ	IENHLRKLDP	IERGLCSIYH	KKCSTQEFFL	IVKTLYHLKS	EFQAIIPAVN
670	680	690	700	710	720
SHIQSDLIRT	VILEIPELLS	PVEHYLKILN	EQAQKVGDKT	ELFKDLSDFP	LIKKRKDEIQ

730	740	750	760	770	780
GVIDEIRMHL	QEIRKILKNP	SAQYVTVSGQ	EFMIEIKNSA	VSCIPTDWVK	VGSTKAVSRF
790	800	810	820	830	840
HSPFIVENYR	HLNQLREQLV	LDCSAEWLDF	LEKFSEHYHS	LCKAVHHLAT	VDCIFSLAKV
850	860	870	880	890	900
AKQGDYCRPT	VQEERKIVIK	NGRHPVIDVL	LGEQDQYVPN	NTDLSSEDSER	VMIITGPNMG
910	920	930	940	950	960
GKSSYIKQVA	LITIMAQIGS	YVPAEEATIG	IVDGIFTRMG	AADNIYKQGS	TFMEELTDTA
970	980	990	1000	1010	1020
EIIRKATSQS	LVILDELGRG	TSTHDGIAIA	YATLEYFIRD	VKSLTLFVTH	YPPVCELEKN
1030	1040	1050	1060	1070	1080
YSHQVGNHYM	GFLVSEDESK	LDPGAAEQVP	DFVTFLYQIT	RGIAARSYGL	NVAKLADVPG
1090	1100	1110	1120	1130	
EILKKAHKS	KELEGLINTK	RKRLKYFAKL	WTMHNAQDLQ	KWTEEFNMEE	TQTSLLH

6.5 Beispiel für MS-MLPA - Sonden in den jeweiligen Genen

MGMT probes in ME011

```

GGTCTCTGCTGGTCTGGGGTCCCTGACTAGGGGAGCGGCACAGGAGGGGAGAGACTCG
CGCTCCGGCTCAGCGTAGCCGCCCGAGCAGGACCGGGATTCTCACTAAGCGGgcgCG 1
TCCTACGACCccggcgGCTTTCAGGACCACTCGGGCAGCTGGCAGGTGCGCTTGCACGCC 2
CGCGGACTATCCCTGTGACAGGAAAAGGTACGGCCATTGGCAAACCTAAGGCACAGAGC
CTCAGGCGGAAGCTGGGAAGgcgCGCCCGGCTTGTACCGGCCGAAGGGCCATCCGGGTC 3
AGgcgACAGGSCAGCGgcgTGCCGGAGGACAGGGCCGGCGTGCCGGCGTCCAGCGAG 4-5
GATgcgAGACTGCCTCAGGCCCGgcgCGCCGCACAGGGCAIggcgCGACCCGGTCCGG 6-7+8
CGGGAAACACCCCGCCCCCCCGGGCTCCGCCAGCTCCGCCCGgcgSCCCCGCCCC 9
GCCCCgcgGCTCTCTTgcttttctcaggctctcgctccgccccgctctagacccg 10
CCACCGCGCCATCCCGTGCCCCgsgcccgccccgcgccccggatgctctgggaca 11
GCCCgcgCCCTAGAAGCCTTTCGCTCCCGACGCCCGCAGGTCTCTCGGGTgcgCACCGT 12+13
TTCGACTTGGTGTGTCTGGGTCCCTCGCTCCCGAAGAGTGGGAGCTCTCCCTCG
GGACGGTGGCAGCCTCGAGTGGTCTGCAGggcCCTCCTCGCCGTGGGTGGGGC 14
CGCCCTGACCCCCACCCATCCCGGGCGAGCTCCAGGTgcgCCCCAAGTGCCTCCAGGTG 15
TTCGCCAGCCCTTCCCGGGCCTGGGTTCTTGACTAGGCTGGCTGCAGTGCAGTGTGG 16
ACTGGCGTGTGGCGGGGTCGTGGCAGCCCTGCCTTACCTCTAGGTGCCAGCCCCAGGC
CgGGGCCCCGGTTCCTTCTACCCTTCCATGCTGCCAGCTTCCCTCCGCCAGCTGCTCC
AGGAAGCTTCCAGAAGCCCTgcgGGGCCTTGGCTTGCAGCAACCCCTTAGCATACTTA 17

```

ATG = translation start codon.

ATG = mRNA start (NM_002412.3)

gcg: *HhaI* sites 1 to 17

Blue highlight: SNPs according to dbSNP vs. 137.

Red text: Repeat region according to the Santa Cruz website.

Underlined is the MGMT coding sequence of Exon 1.

In *italic/Underlined* the primers are marked (as used by Danam RP et al. 2005, *Mol Cancer Ther.* 4:61-69) to amplify the hotspot 1 region located from -250 nt to -101 nt with respect to the transcription start. Hot spot 2 region is located between +97 nt and +196 nt from the transcription start.

Abbildung 46: Sondenpositionierung

(http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe_Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID=_xNB2mDZi5MU)

6.6 Abkürzungsliste

Abb. = Abbildung

bp = Basenpaar

Ca/KA = Carzinom/Karzinom

CNV = *Copy Number Variation*

CRC = Colorectales Carzinom bzw. Kolorektales Karzinom

DNA = *desoxy ribonucleic acid*

FAP = familiäre adenomatöse Polyposis

F-Primer = *forward-Primer*

gDNA = genomische DNA

IDL = *Insertion/Deletion-loop*

LOH = *Loss of Heterozygosity*

MMR = *mismatch-repair*

MSI = Mikrosatelliten-instabil

MS-MLPA = *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MSS = Mikrosatelliten-stabil

n.a. = nicht auswertbar

o.B. = ohne Befund

OD = optische Dichte

ÖGD = Ösophagogastroduodenoskopie

PCR = *Polymerase Chain Reaction*

R-Primer = *reverse-Primer*

s. = siehe

SNP = *single nucleotide polymorphism*

SV = Sequenzveränderung

Tab. = Tabelle

Tu-DNA = Tumor-DNA

6.7 Code-Sonne

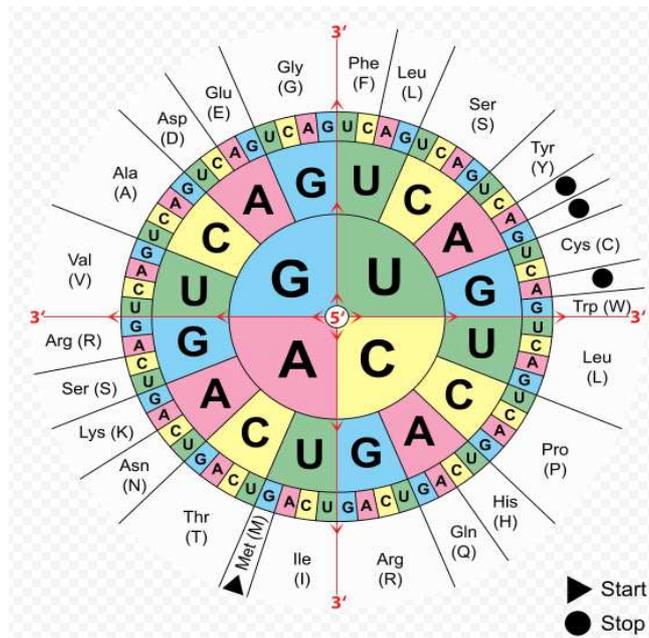


Abbildung 47: Code-Sonne (www.wikipedia.de)

7 Publikationsliste

- 1) Morak, M., Massdorf, T., Sykora, H., Kerscher, M., Holinski-Feder, E., *First evidence for digenic inheritance in hereditary colorectal cancer by mutations in the base excision repair genes*. Eur J Cancer, 2011. **47**(7): p. 1046-55.
- 2) Morak, M., Käsbauer, S., Kerscher, M. et al., *Loss of MSH2 and MSH6 due to heterozygous germline defects in MSH3 and MSH6*. Fam Cancer, 2017. **16**(4): p. 491-500

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Dipl. chem. Elke Holinski-Feder natürlich einerseits für die freundliche Bereitstellung des interessanten Themas und das Einbringen von konstruktiver Kritik und neuen Ideen. Vor allem aber für die Möglichkeit, die Doktorarbeit doch noch zu einem gelungenen Abschluss zu bringen.

Frau Dr. Monika Morak danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, die wissenschaftlichen Tipps und Ratschläge.

Herzlich danken möchte ich vor allem auch Sari Maßdorf, dass sie mir mit PCR- und Sequenziersessions mit Musikuntermalung den Laboralltag versüßt hat, sowie für ihre stets hilfsbereite Unterstützung und die ehrliche Freundschaft über die Doktorarbeitszeit hinaus.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Medizinisch Genetischen Zentrums (MGZ) für ihre Hilfe in sämtlichen arbeitstechnischen Belangen.

Der größte Dank allerdings gilt meinen Eltern, deren bedingungslose Liebe und Unterstützung mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich bin, und die mir die Kraft geben, das Leben mit all seinen Aufgaben zu meistern.

Eidesstattliche Versicherung

Spies Martina

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Analyse von Patienten
mit Verdacht auf HNPCC-Syndrom
auf MSH3-Sequenzveränderungen, CNVs und Methylierung in der
Keimbahn und in Tumoren

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.

Landshut, den 22.10.2018

Martina Spies

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin